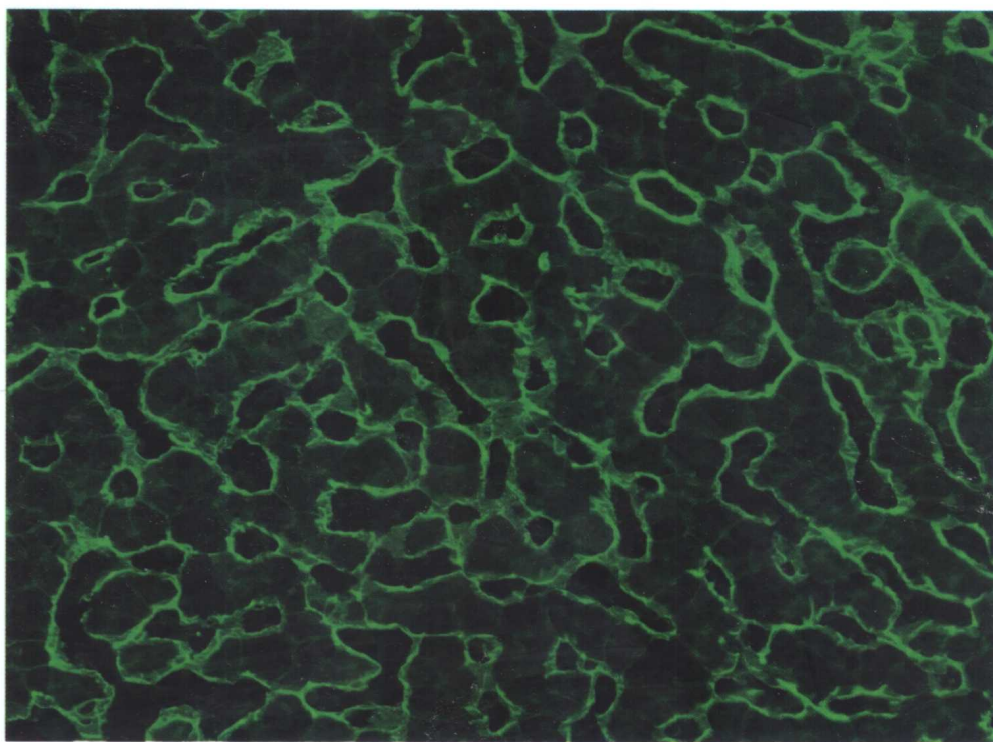


自身抗体及其免疫荧光模式

AUTOANTIBODIES AND THEIR
IMMUNOFLUORESCENT PATTERNS



主编 马东来 张少静 文夫瑞德·斯特克

北京科学技术出版社

111407

自身抗体及其免疫荧光模式

AUTOANTIBODIES AND THEIR IMMUNOFLUORESCENT PATTERNS

主编 马东来 张少静 文夫瑞德·斯特克

北京科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

自身抗体及其免疫荧光模式 / 马东来, 张少静, (德) 斯特克主编. —北京: 北京科学技术出版社, 2000.8

ISBN 7-5304-2397-5

I. 自... II. 马... III. 荧光抗体技术 - 应用 - 免疫性疾病 - 自身抗体 - 测定
IV. Q939.91

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 09825 号

自身抗体及其免疫荧光模式

主编 马东来 张少静 文夫瑞德·斯特克

*

北京科学技术出版社 出版

(北京西直门南大街 16 号 邮政编码: 100035)

各地新华书店经销

北京通天印刷厂印刷

*

787 毫米×1092 毫米 16 开本 7.25 印张 187 千字

2000 年 8 月第一版 2000 年 8 月第一次印刷

印数 1—1500 册

定价: 120.00 元

凡购买本社图书, 如有缺页、倒页、脱页者,
本社发行科负责调换。联系电话: 66161952

致 谢

作者衷心感谢在本书编写过程中给予过帮助的专家、同行、同事。非常感谢德国欧蒙免疫实验室同事 Dr. Stephan Proost 提供的技术帮助和封面设计, 感谢 Dr. Wolfgang Schlumberger 在 ELISA 方面、Dr. Evald Mueller-Kunert 在免疫荧光方面的指导以及 Ms. Cornelia Mattes 及时的信息传递。

感谢欧蒙实验免疫制品有限公司北京代表处的杨向阳女士、王秀杰女士对部分章节的修改, 及王颖小姐对日常工作的帮助。感谢加拿大 McMaster 大学同事 Dr. Robert Zawydiwski 博士提供的有价值的讨论及英文编辑。

还要特别感谢北京医科大学人民医院杨铁生教授、北京医院谭爱国主管检验师、中国人民解放军总医院黄烽教授和徐明检验师、上海第二军医大学长征医院仲人前教授、北京协和医院李永哲助理研究员、辽宁省人民医院张浩主管检验师对本书内容的部分修改和建议。感谢北京铁路总医院免疫室张红、许华林医师以及洛阳临床免疫中心邓昊副主任在各方面给予的协助和支持。

本书中所有图片均来自德国欧蒙免疫实验室, 若读者需要更详细的资料, 可与以下地址联系: EUROIMMUN GmbH · D-23627 Gross Groenau near Luebeck · Am Sonnenberg 9
Telephone: 0049 4509 87430 Fax: 0049 4509 874334 E-Mail: euroimmun@euroimmun.de
Internet: www.euroimmun.de

主编 (authors-in-chief)

马东来 副主任医师 (Dr. Dong Lai Ma)

Mucosal Immunology

Department of Pathology & Molecular Medicine, McMaster University

1200 Main Street West, HSC-3N26, Hamilton, Ontario, Canada L8N 3Z5

(作者原单位: 德国欧蒙实验免疫制品有限公司北京代表处、北京铁路总医院)

张少静 医师 (Dr. Shaojing Zhang)

德国欧蒙实验免疫制品有限公司北京代表处 首席代表

北京东三环北路8号, 亮马大厦2座, 德意志工商中心616室, 邮编: 100004

电话: 010 65906126 传真: 65906127 电子信箱: oumeng@public.bta.net.cn

文夫瑞德·斯特克 教授 (Professor Dr. med. Winfried Stocker)

Managing director of EUROIMMUN Laboratory for experimental Immunology GmbH

D-23627 Gross Groenau near Luebeck, Am Sonnenberg 9, Germany

(Professor Dr. med. Winfried Stocker 是马东来、张少静在德国学习时的导师)

序



自身免疫疾病的名称是随着近代免疫学的兴起而提出的，以往的称谓是胶原性疾病或风湿病。实际上，这是由于免疫失调而造成的一大组疾病，其发病机制还不清楚，诊断和治疗也是处于若明若暗。因此，这是一组疑难杂症。

长期以来，诊断自身免疫性疾病主要靠临床症状和体征，作为辅助诊断的自身抗体，也是诊断自身免疫病五种依据之一（有自身抗体，遗传倾向，性别和年龄，免疫抑制剂疗效，多器官发病等），虽然在正常人也有水平，但结合临床和抗体水平及动态变化，也不失为一个重要诊断指标。

自身抗体种类多达数十种，方法极不统一，质量标准和质量控制也是空白状态，目前急需要一个判定标准。《自身抗体及其免疫荧光模式》一书的出版无疑给这种无序状态提供一个宝贵的资料。

长期以来，我国从无一本可参考的自身抗体书及自身抗体图谱的资料。马东来教授，长期从事临床免疫工作，对自身抗体的检测积累了丰富的经验，更加上近几年他到德国 EUROIMMUN 免疫实验室工作过，使得本书既有理论又有实践，是一本很有价值的参考书。更值得一提的是，德国 EUROIMMUN 研究所的 Stocker 教授，他是一位对中国极为热情的学者，他的参与，无疑使本书增色不少。

《自身抗体及其免疫荧光模式》是一本理论和实践相结合的技术书，是一本对临床医师、实验人员皆有参考价值的教科书，也是一本中外合编的实用书，相信本书能给广大读者以实惠。

中国免疫学会临床免疫分会 主任委员
中华检验学会 副主任委员
全军检验学会 主任委员

孔宪涛 教授

2000年7月1日

前 言



本书适用于在医学免疫学实验室诊断领域工作的科技人员和内科医生。它对自身免疫性疾病的诊断手段及德国欧蒙实验室的方法和试剂作了最新概述。欧蒙的产品被广泛应用于40多个国家,1000多所实验室,它使自身免疫性疾病和感染性疾病的诊断更加简单、可靠,从而使临床能提供比10年前更有效的治疗。成千上万的人因为欧蒙发明的可靠的诊断产品而重获健康,甚至生命。

欧蒙成立于1987年,现有员工185人,包括40多名科研人员和专家。欧蒙拥有最先进的生产技术,最为突出的是欧蒙发明的生物薄片技术。欧蒙是一个在自身免疫性疾病诊断领域处于欧洲领先水平的研究机构。欧蒙产品主导德国市场,在质量和标准化方面处于世界领导地位。

五年前,我随同联邦德国领导人访问中国,在此受到的热情友好接待和中国专家对推广欧蒙产品的浓厚兴趣促使欧蒙融入了这个国家,并希望欧蒙对中国自身免疫性疾病实验诊断的进一步标准化有所帮助。欧蒙公司也将致力于把自己新的诊断方法介绍给中国,并为提高这里的医疗健康标准而不懈努力。

我们很荣幸已邀请了35位中国专家,来德国通过3—12个月的时间研究、学习欧蒙实验室的诊断方法。我们更感到欣慰的是在与他们共同探讨自身免疫性疾病和感染性疾病的实验诊断过程中建立了深厚的友谊。欧蒙已在北京成立分支机构,以后将在中国建立更多的中心,欧蒙产品也将很快在中国生产。欧蒙将一如既往,真诚地支持中国的检验医学事业。

文夫瑞德·斯特克 教授

2000年5月1日

目 录

第一章 自身抗体概述	1
第一节 自身免疫与自身免疫性疾病	1
一、自身免疫的概念	1
二、自身免疫性疾病	1
第二节 自身抗体的分类及命名	1
一、自身抗体的概念	1
二、自身抗体的分类	2
三、自身抗体的命名	2
第三节 自身抗体的检测方法	3
一、对流免疫电泳及免疫双扩散法	3
二、免疫荧光测定法	3
三、酶联免疫吸附测定法	4
四、免疫印迹法	4
五、酶免疫斑点(条带)实验 - EUROASSAY™ 技术	4
六、放射性核素法	5
七、免疫沉淀法	5
八、被动凝集试验	6
第四节 自身抗体与相关疾病	6
一、风湿病	6
二、肾脏病	11
三、皮肤病	11
四、胃肠及肝病	12
五、内分泌病	14
六、神经肌肉病	16
七、血液病	16
八、心脏疾病	17
九、眼病	17
十、不孕症	18
十一、恶性肿瘤	19
附录 1 疾病诊断相关性: 非器官/组织特异性自身抗体	20
附录 2 疾病诊断相关性: 器官/组织特异性自身抗体	21
第二章 间接免疫荧光法检测自身抗体	23
第一节 荧光显微镜	23
一、透射式荧光显微镜	24
二、落射式荧光显微镜	24
三、免疫荧光产生的原理	24
第二节 荧光标记的第二抗体	24

第三节 实验基质的选择及血清的稀释度	25
一、实验基质的选择	25
二、血清的稀释度	26
第四节 间接免疫荧光检测试剂的发展趋势	30
一、基质载片的化学活化技术	30
二、生产的自动化和实验的标准化: 生物薄片技术	30
三、实验基质的组合: 生物薄片马赛克™技术和欧蒙组合	31
四、实验操作的标准化: 滴定平板™技术	32
第五节 自身抗体检测的质量控制及注意事项	34
一、质量控制	34
二、实验结果的进一步确认 (两级测定)	34
三、实验报告及解释	34
四、实验室工作者与临床医生的交流及合作	35
第三章 非器官/组织特异性自身抗体	37
第一节 HEp-2 细胞/灵长类肝复合片用于抗核抗体检测	37
第二节 抗双链 DNA 及抗单链 DNA 抗体	39
第三节 抗组蛋白抗体	41
第四节 抗核糖核蛋白抗体及抗 Sm 抗体	42
第五节 抗 SS-A 抗体	44
第六节 抗 SS-B 抗体	45
第七节 抗原纤维蛋白抗体	46
第八节 抗 RNA 多聚酶 I 抗体	47
第九节 抗 PM-Scl 抗体	48
第十节 抗着丝点抗体	49
第十一节 抗 Scl-70 抗体	50
第十二节 抗增殖性细胞核抗原抗体	51
第十三节 其它抗细胞核抗原抗体	53
一、抗核仁形成中心抗体	53
二、抗核点型抗体	53
三、抗 Ku 抗体	54
四、抗板层素抗体	55
五、抗 Mi-1 及 Mi-2 抗体	55
六、抗核糖核酸抗体	55
七、抗核仁核糖核酸抗体	55
八、抗 7-2-核糖核蛋白 (To) 抗体	55
第十四节 抗有丝分裂相关抗原自身抗体	56
一、抗中心粒抗体	56
二、抗纺锤体纤维抗体	56
三、抗分离带抗体	57

四、抗染色体相关抗原抗体	58
第十五节 抗细胞浆成分的自身抗体	58
一、抗线粒体抗体	58
二、抗 Jo-1 抗体	61
三、抗核糖体抗体及抗核糖体 P 蛋白抗体	61
四、抗高尔基体抗体	62
五、抗溶酶体抗体	63
六、抗肌动蛋白抗体	63
七、抗波形蛋白抗体	64
八、抗 PL-7、PL-12、OJ 及 EJ 抗体	64
九、抗信号识别粒子抗体	64
第四章 器官/组织特异性自身抗体	66
第一节 抗中性粒细胞胞浆抗体: 胞浆型	66
第二节 抗中性粒细胞胞浆抗体: 核周型	67
第三节 抗肝肾微粒体抗体	69
第四节 抗肝细胞膜抗原抗体	71
第五节 抗可溶性肝抗原抗体	72
第六节 抗肝特异性蛋白抗体	73
第七节 抗平滑肌抗体	74
第八节 抗甲状腺微粒体抗体	75
第九节 抗甲状腺球蛋白抗体	76
第十节 抗胰岛细胞抗体	78
第十一节 抗胰腺腺泡抗体	79
第十二节 抗小肠杯状细胞抗体	80
第十三节 抗肾上腺皮质抗体	82
第十四节 抗肾小球基底膜抗体	83
第十五节 抗胃壁细胞抗体和抗内因子抗体	84
第十六节 抗桥粒抗体	86
第十七节 抗表皮基底膜抗体	87
第十八节 抗骨骼肌抗体	89
第十九节 抗心肌抗体	90
第二十节 抗涎腺导管抗体	91
第二十一节 抗角蛋白抗体	92
第二十二节 抗内皮细胞抗体	94
第二十三节 抗普肯耶细胞抗体	95
第二十四节 抗神经元核抗体	96
第二十五节 抗肌内膜抗体	98
附录 3 其它自身抗体荧光模式图谱集	100
附录 4 常见英文缩略语英中对照	104

第一章 自身抗体概述

summary of autoantibodies

第一节 自身免疫与自身免疫性疾病 (autoimmunity and autoimmune diseases)

一、自身免疫的概念 (conception of autoimmunity)

自身免疫是指机体免疫系统对自身成分发生免疫应答,产生针对自身成分的抗体和/或致敏的淋巴细胞性免疫效应。自身免疫可以是正常生理性的,例如,针对衰老或死亡的自体细胞,机体产生少量的自身抗体,以便被脾、肝及单核-吞噬细胞系统中的巨噬细胞吞噬,维持机体内环境的生理稳定;自身免疫也可以是病理性的,引起自身免疫病。研究发现,大部分自身免疫应答是由外界异物(病原体或化学品等)结合自身成分引起,或是由与自身抗原结构有部分类似或相同的异物抗原单独引起。

二、自身免疫性疾病(autoimmune diseases)

在内因与外因的共同作用下,机体的自身免疫应答失控,反应过度,直接或间接破坏自身组织,并引起相应器官病变或临床症状的一类疾病,则为自身免疫病。内因包括遗传易感、免疫耐受性减低或丧失、调节失常、衰老体弱等;外因主要包括感染、物理、化学等因素。

自身免疫病有以下特点:①多数自身免疫病是自发或特发性的,感染、药物等外因可能有一定的影响;②患者血清中有高水平的 γ -球蛋白;③患者血清中有高效价的自身抗体或出现与自身抗原反应的致敏淋巴细胞;④病损部位有变性的免疫球蛋白沉积,呈现以大量淋巴细胞和浆细胞浸润为主的慢性炎症;⑤病程一般较长,发作与缓解交替出现,仅有少数为自限性;⑥女性多于男性,老年多于青少年;⑦有遗传倾向;⑧应用肾上腺皮质激素等免疫抑制剂有效;⑨常有其它自身免疫病同时存在;⑩可复制出相似的动物疾病模型。

自身免疫病患者中,有相当一部分病人的血清或其它体液中可检测到一种或多种高效价的自身抗体,能为自身免疫病的诊断提供非常有价值的依据。

第二节 自身抗体的分类及命名 (classification and nomenclature of autoantibodies)

一、自身抗体的概念 (conception of autoantibodies)

由各种原因造成的机体B细胞产生针对自身组织成分的抗体,称为自身抗体(autoantibodies)。自身抗体可以是生理性的,也可以是病理性的。正常人群中生理性自身

抗体的存在相当普遍，其作用之一就是净化体内衰老及死亡的细胞（如上述）。

如果使用足够敏感的方法，每个人都可检测出一些自身抗体。但通常这种自然产生的生理性自身抗体滴度很低，与相应的抗原亲和力弱，且大多为 IgM 型。偶尔，没有任何临床症状的人也可检测到具有一定亲和力及高滴度的 IgG 型抗体，此时应注意观察并作为以后诊断的依据。每一实验室应当建立自己的自身抗体检测阈值，仅当自身抗体的滴度超出此阈值时，才认为有临床意义。

二、自身抗体的分类 (classification of autoantibodies)

自身抗体有多种分类方法。例如，按照自身抗原在体内分布的不同可分为器官/组织特异性自身抗体和非器官/组织特异性自身抗体；按照检测自身抗体所用基质的不同可分为细胞抗体（以游离的细胞为实验基质，例如用 HEp-2 细胞所检测的抗核抗体）及组织抗体（以动物组织切片为实验基质，例如用心肌所检测的抗心肌抗体）。细胞抗体还可分为细胞非特异性自身抗体 (cell-nonspecific autoantibodies, 例如抗核抗体等) 和细胞特异性自身抗体 (cell-specific autoantibodies, 如抗中性粒细胞胞浆抗体、抗红细胞抗体、抗血小板抗体以及抗淋巴细胞抗体等)。另外，还有抗血清成分自身抗体，例如抗凝血物质抗体 (anticoagulants)、类风湿因子 (rheumatoid factor) 等。这些分类方法的侧重点不同，但有着密切的联系。例如，细胞抗体主要为非器官/组织特异性自身抗体，而组织抗体主要为器官/组织特异性自身抗体。

三、自身抗体的命名 (nomenclature of autoantibodies)

自身抗体的命名尚不统一，一种自身抗体，往往有几个名称。例如，抗丝集蛋白抗体就还有以下名称：抗角蛋白抗体、抗大鼠食管角化层抗体、抗大鼠食管抗体、抗角质层抗体等。已证实其靶抗原是人类表皮的丝集蛋白，而不是细胞角质蛋白，故有人建议不用抗角质蛋白抗体这个名称。

自身抗体的命名，有的以抗体在细胞或组织中存在的位置进行命名，如抗细胞浆抗体、抗细胞核抗体、抗核仁抗体、抗肝肾微粒体抗体以及抗线粒体抗体等；有的以靶细胞或靶组织进行命名，如抗胰岛细胞抗体、抗小肠杯状细胞抗体、抗骨骼肌抗体等；有的以相关疾病进行命名，如抗天疱疮抗体、抗类天疱疮抗体等。

现以抗核抗体为例，介绍一下自身抗体的命名，如下：①以首先被检测到该抗体的患者名字的缩写进行命名，如抗 Sm、抗 Ro、抗 La、抗 Ma；②以相关疾病的名字的缩写进行命名，如抗 Scl-70、抗 SS-A、抗 SS-B 等；③以抗原的化学性质进行分类命名，如抗 DNA、抗 RNP 等；④以抗原的部位进行命名，如抗板层素、抗核膜抗体等。作者认为，自身抗体的命名应尽量根据抗体所针对的抗原进行命名。这样一方面可说明抗体的靶抗原，另一方面便于名词的统一。

第三节 自身抗体的检测方法 (detecting methods of autoantibodies)

随着对自身免疫病流行病学的调研和对自身抗体本身的不断研究, 目前已知, 相当多的自身抗体与某些特定的疾病相关联, 有些自身抗体是某种疾病的标志抗体。自身抗体检测已成为诊断自身免疫性疾病(以及某些肿瘤)的重要工具。下面简要说明目前用于检测自身抗体的主要方法:

一、对流免疫电泳及免疫双扩散法 (counterimmunoelectrophoresis and immunodiffusion assay)

对流免疫电泳 (CIE) 及免疫扩散 (ID) 法均需要在琼脂糖凝胶上进行。首先在铺好的琼脂糖板上打孔, 然后按一定顺序加入适量的可溶性抗原以及适当稀释的待测血清。对流免疫电泳法需在电流的作用下 (电泳仪) 进行, 而免疫扩散法在湿盒内放置于室温下反应即可。两者的阳性结果均为在已知抗原与待测血清之间出现沉淀线。

临床免疫实验室在用间接免疫荧光法对自身抗体进行初筛后, 针对可溶性核抗原相应的自身抗体, 往往采用对流免疫电泳及免疫扩散法进行进一步的确认或鉴定。对流免疫电泳及免疫扩散法均需要较多的抗原。对流免疫电泳法比免疫扩散法快速、灵敏 (约为免疫扩散灵敏度的 10 倍); 免疫扩散法不需要特殊设备, 但耗时较长, 操作不便, 另外检测的敏感性也相对较低, 主要用于自身抗体的进一步鉴定。

随着 ELISA、免疫酶斑点实验及免疫印迹法等商品化试剂盒在自身抗体检测中的应用, 对流免疫电泳及免疫扩散法在国内的应用有减少的趋势, 而在国外该法仍然很受欢迎。这主要因为对流免疫电泳及免疫扩散法对自身抗体进行检测和鉴定, 方法较为稳定, 临床符合率高。

二、免疫荧光测定法 (immunofluorescence assays, IFA)

免疫荧光测定法可分为直接免疫荧光法 (direct immunofluorescence assay, DIFA) 及间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence assay, IIFA 或 IIF)。在自身抗体检测中, 以间接免疫荧光法最为常用。该方法敏感、简单且重复性好, 如果有一台质量较好的荧光显微镜, 几乎所有的实验室都可开展。

间接免疫荧光法的基本操作程序及原理如下: 将已稀释的待检血清与实验基质进行温育, 如果标本阳性, IgA、IgG 和 IgM 类特异性抗体与实验基质中相应的抗原结合。然后用适当缓冲液冲洗去未结合物。再根据需要检测的自身抗体 Ig 类型, 选择荧光素标记的相应抗人 Ig 抗体 (IgG、IgA、IgM 或 IgGAM 的混合物) 进行第二次温育。此时, 已与实验基质中相应抗原结合的人抗体再与荧光素标记的抗人抗体结合。进行冲洗后, 滴加甘油缓冲液封片, 在荧光显微镜下观察相应部位出现的特异性荧光模式。该方法及其临床应用为本书的主要内容, 见第二章。

三、酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbant assays, ELISA)

由于纯化的或重组的抗原越来越多,以及商品化的高质量酶联免疫吸附测定试剂盒的面市,它应用于临床免疫实验室自身抗体的检测已日渐增多。该法检测自身抗体快速、敏感及特异性高,但对抗原的要求很高,必须使用高质量的纯化抗原。由于一种抗原只能检测一种抗体,多种抗体的检测就需要多种单独的抗原,因此该法在临床免疫实验室的应用受到一定限制。

酶联免疫吸附测定法检测自身抗体,首先需将纯化的抗原包被在固相载体(酶标板的反应孔)上,与一定稀释度的待检血清反应。然后与酶(如碱性磷酸酶)标记的第二抗体(抗人IgG、IgA、IgM或抗人IgGAM的混合物)反应,其酶可催化色原底物(自然状态下无色,在酶的作用下变为有色产物)。最后在酶标测定仪一定波长下进行比色,测定吸光度。

荧光免疫、放射免疫及酶联免疫被称为三大标记技术。

四、免疫印迹法 (immunoblot assay, IB)

免疫印迹也称西方印迹 (western blot)。它是将聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白及多肽与免疫反应的高特异性相结合的一项技术。首先,蛋白在聚丙烯酰胺凝胶电泳中依分子量大小分离,然后将分离好的蛋白转印到硝酸纤维薄膜(或PVDF薄膜)上。可以用酶或放射性核素标记的抗体或蛋白A进行免疫染色。

自从1979年该项技术被介绍引进,已得到广泛的应用,在自身抗体的研究中发挥着重要作用。然而,该法在国内应用于ENA抗体临床常规检测时有时存在以下问题:

(1) 该法试剂生产的第一步是先将抗原物质经凝胶电泳分离。由于方法学的限制或生产工艺原因,所分离的抗原时有不纯,随之会将非特异性的抗原(多余的蛋白质)转印至印迹膜条上,从而使膜条在检测后会出现一些非特异性的抗原条带,或是膜条背景较深,从而掩盖或干扰我们对有关特异性抗原条带及结果的准确判定。

(2) 试剂生产的第二步是将分离的抗原组分转印到硝酸纤维薄膜上。转印时,一是会发生抗原转印不充分,这样会导致阳性标本在检测后条带显色不清晰,从而影响结果的判定甚至导致假阴性结果;二是转印时会发生抗原丢失而影响结果判定,如较常发生的Sm 13.5kD抗原丢失而造成抗体检测假阴性的结果。

(3) 标准带中大多抗体对应两条或两条以上特异抗原条带,同一抗体或不同抗体的一些条带间的kD值很接近,如有些厂家的标准带上52、53、54、55kD分别对应不同抗体,这些条带间仅相差1mm,分子量如此接近的抗原有时电泳无法清楚分辨,而且在电泳分离时,抗原的kD值位置无法保证与标准带一致。通常条带与标准带相差1—2mm均可视为正常阳性。这样就导致在实际操作中有时无法准确分辨不同抗体的条带,因而决定了其结果判定及准确性方面可能存在一定的问题。建议临床实验室选用质量可靠的试剂盒。

五、酶免疫斑点(条带)实验-EUROASSAY™ 技术

该法是最近兴起的特异性检测抗体(如:ENA抗体,见图1)的新方法,以EUROIMMUN发明的EUROASSAY技术为代表,下面作一介绍。

将经亲和层析纯化的抗原分别包被在膜条上,然后将膜条固定在载片反应区。若是阳

性标本,已稀释血清中的特异性抗体将与固相上的抗原结合。第二步,碱性磷酸酶标记的抗人抗体与已结合的抗体反应。第三步,加入可产生颜色反应的底物溶液温育。若标本中含有特异性抗体,相应的抗原线将呈现深色的条带。

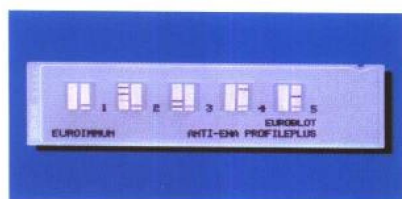


图1 EUROASSAY 技术检测 ENA

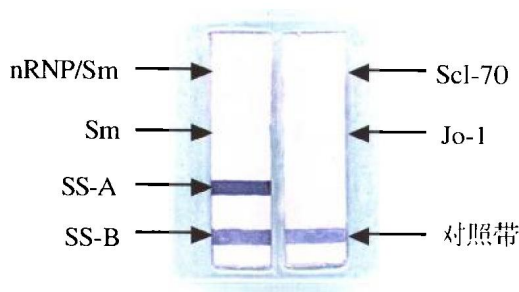


图2 ENA 检测结果: SS-A、SS-B 阳性

该法适合临床常规应用,有以下优点:将经亲和层析纯化的抗原包被在固定的位置,每一种抗体只对应一条条带,不会产生非特异性反应条带,结果灵敏度高,特异性好,判断实验结果比免疫印迹法简单;每个反应区均有质控带,可以显示操作是否正确;阳性与阴性结果的差别明显(见图2),容易判断,条带显色的强度与抗体滴度相关;不需特殊仪器,实验结果用肉眼观察;反应过的载片可长期保存,试验结果容易存档。

六、放射性核素法 (radioisotopic methods)

尽管放射性核素法不作为首选的方法,但在有些实验中仍然使用此法来检测自身抗体的相对水平。自身抗体的测定可采用直接结合法(即待测标本直接与放射性同位素标记的抗原进行反应),也可使用间接或竞争性测定法。

抗双链DNA(dsDNA)抗体的测定可使用间接结合测定法。一定稀释度的待测标本(血清)与 ^{125}I 标记的dsDNA进行温育,抗dsDNA抗体与 ^{125}I dsDNA结合而产生的复合物可被33%—50%的饱和硫酸铵溶液沉淀,沉淀物中放射性核素的含量与抗dsDNA抗体的含量成正比。结果以沉淀物中放射性测定值占最初加入 ^{125}I 的放射性测定值的百分率表示。

抗内因子抗体可用放射性竞争试验来测定。该法是基于放射性标记的维生素 B_{12} 可被随后加入的活性炭吸附而得以分离的原理。通过比较活性炭中沉积的放射性计数与上清中的放射性计数,可确定抗内因子抗体的量。

七、免疫沉淀法 (immunoprecipitation assay)

该法通常是用放射性核素(如 ^{35}S 、 ^{32}P 等)将细胞(或抗原)进行标记,破坏细胞获得混合抗原,然后与结合了蛋白A(金黄色葡萄球菌蛋白A)的琼脂糖珠的待测标本(血清)进行反应(免疫沉淀)。随后进行凝胶电泳,并将电泳后的凝胶对以X光片进行曝光,与正常及标准品比较而得结果。

该法高度敏感和特异,可用于Sm、U1-RNP、SS-A、SS-B等的检测,特别是当其它方法的结果不理想时。实验中应用的蛋白A,可以特异性地与许多哺乳动物的IgG亚类的Fc段牢固地结合(但与IgG3、IgM、IgA结合差)。蛋白A一边结合琼脂糖珠,另一边结

合抗体的Fc段，因此可以明显放大抗原抗体的沉淀反应。

该法的缺点为：①需要使用放射性核素；②单独使用不能够区分Sm与RNP；③细胞生长过程中代谢率低或与放射性核素（如³⁵S-甲硫氨酸）不等结合的蛋白抗原，不能用此法检测。

八、被动凝集试验 (passive agglutination)

1. 乳胶颗粒凝集试验 (latex agglutination test)

该试验最常用于类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) 的检测。首先用人免疫球蛋白包被乳胶颗粒 (通常由商家供应)，然后与一定稀释度的血清进行温育。如果存在IgM型类风湿因子，将在一分钟左右产生肉眼可见的粗大的颗粒凝集。该方法极为简便快速，任何实验室都可开展，但只能半定量测定IgM型的类风湿因子。

2. 被动血凝试验 (passive hemagglutination, PHA)

该法首先将合适浓度的抗原包被羊红细胞，再与不同稀释度的待检血清反应，观察96孔血凝板中血细胞凝集的终点孔，即为被检血清中某自身抗体的滴度。该方法敏感性高，但实验程序繁琐，干扰因素多，只有严格控制每个步骤，才能获得可靠的结果。

第四节 自身抗体与相关疾病 (autoantibodies and their clinical significance)

自身抗体的临床应用主要有四个方面：①协助自身免疫病的诊断；②协助判断病情、疗效及预后；③协助进行不同疾病的鉴别诊断；④用于各类疾病的免疫病理机制研究及流行病学的调研。

与某种自身免疫性疾病关系密切的自身抗体被称为该疾病的标志抗体。目前所公认的标志抗体，大多是通过大量临床统计资料得出的结论。随着研究工作的不断深入，新的标志抗体还会不断被发现。目前较为公认的部分标志自身抗体见表1。

下面对主要的自身免疫性疾病的相关要点及其自身抗体做一介绍：

一、风湿病 (rheumatic diseases)

风湿病是指一大类目前病因与发病机制尚未研究清楚，以损害滑膜、软骨、骨、关节、肌肉、韧带等为主，且可侵犯多个系统的全身性疾病。可分为自身免疫性风湿病、内分泌代谢性风湿病（如痛风）、感染性风湿病（如结核性关节炎）、退行性风湿病（如骨性关节炎）、遗传性风湿病（如黄褐病）等。自身抗体检测在自身免疫性风湿病（也称系统性风湿病）中有着非常重要的应用价值。常见的系统性风湿病如下：

表1 目前比较公认的部分标志抗体

标志抗体	相关疾病
双链 DNA 抗体	系统性红斑狼疮 (SLE)
Sm 抗体	系统性红斑狼疮
SS-B 抗体	干燥综合征 (SS)
着丝点抗体	进行性系统性硬化症, 局限型
Scl-70 抗体	进行性系统性硬化症, 弥漫型
PM-Scl(PM1)抗体	多发性肌炎/皮肌炎/重叠综合征
Jo-1 抗体	多发性肌炎/皮肌炎
高滴度 RNP 抗体	混合性结缔组织病
肾小球基底膜 (GBM) 抗体	肺出血肾炎综合征 (Goodpasture's)
肝肾微粒体抗体 (LKM-1)	Ⅱ型自身免疫性肝炎
平滑肌抗体 (SMA)	Ⅰ型自身免疫性肝炎
线粒体抗体 2 型 (M2)	原发性胆汁性肝硬化 (PBC)
丝集蛋白抗体 (AFA)	类风湿关节炎
抗桥粒抗体	寻常天疱疮
肌内膜抗体 (EMA)	麸质过敏性肠病

1. 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)

系统性红斑狼疮免疫学的显著特点为出现抗核抗体。其中抗双链 DNA 抗体及 Sm (Smith) 抗体最为特异。除抗核抗体外, 系统性红斑狼疮患者还发现有抗其它细胞和细胞成分的自身抗体, 如抗红细胞抗体、抗血小板抗体、抗神经元抗体、抗淋巴细胞抗体; 还发现类风湿因子、抗磷脂抗体等。系统性红斑狼疮主要的自身抗体及发生率见表 2。

表2 系统性红斑狼疮常见的自身抗体

抗原	发生率
双链 DNA	60%—90%
单链 DNA	70%—95%
RNA	50%
组蛋白	30%—70%
U1-nRNP	30%—40%
Sm	20%—40%
SS-A (Ro)	20%—60%
SS-B (La)	10%—20%
增殖性细胞核抗原(PCNA)	3%
Ku	10%
核糖体 RNP (rRNP)	10%
热休克蛋白 90 (Hsp-90)	50%
心磷脂	40%—60%