

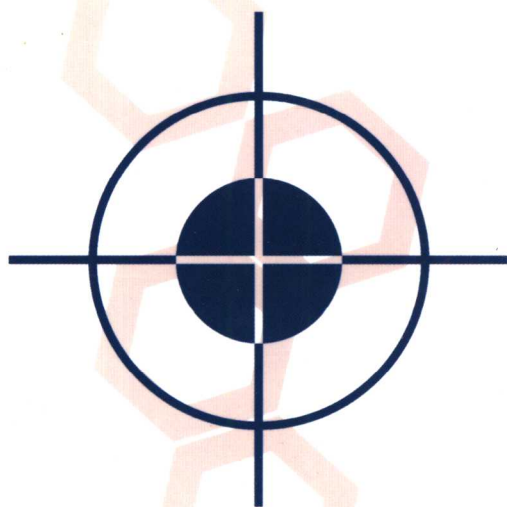
LINCHUANG MEIMIANYI

CEDING JISHU

临床酶免疫

测定技术

李金明 编著



人民军医出版社
PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

临床酶免疫测定技术

李金明 编著

人民军医出版社

临床酶免疫测定技术

LINCHUANG MEIMIANYI CEDING JISHU

李金明 编著



人民军医出版社

People's Military Medical Press

北 京

图书在版编目(CIP)数据

临床酶免疫测定技术/李金明编著. —北京:人民军医出版社, 2005. 5
ISBN 7-80194-671-5

I. 临… II. 李… III. 酶—免疫测定 IV. R446. 6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 046240 号

策划编辑:丁金玉 加工编辑:伦踪启 责任审读:黄栩兵
出 版 人:齐学进
出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店
通信地址:北京市复兴路 22 号甲 3 号 邮编:100842
电话:(010)66882586(发行部) 51927290(总编室)
传真:(010)68222916(发行部) 66882583(办公室)
网址:www. pmmp. com. cn

印刷:京南印刷厂 装订:桃园装订有限公司
开本:787mm×1092mm 1/16
印张:16 字数:378 千字
版次:2005 年 5 月第 1 版 印次:2005 年 5 月第 1 次印刷
印数:0001~4000
定价:33.00 元

版权所有 侵权必究
购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换
电话:(010)66882585 51927252

前 言

PREFACE

免疫测定方法是以抗原和抗体分子为测定靶标的方法,亦是目前临床最为常用的实验室诊断方法之一。从理论上说,一种生物或生理活性物质,只要有办法得到其特异的抗体,就可以建立这种物质的免疫测定方法。在以前看来一些难以进行质量测定的微量生物活性物质,如受体、细胞因子以及酶等均可使用免疫测定技术来测定。免疫测定方法是以抗原抗体间的特异反应为基础的,其与临床生化的化学反应有着本质的区别,并且由于标记物如同位素、酶、荧光素、微量元素、发光物质等的掺入,免疫测定技术从低灵敏的免疫沉淀和免疫凝集反应进入到了高灵敏的放射免疫、酶免疫、荧光免疫和发光免疫测定时代,可见免疫测定更多的是用于生物活性物质的微量测定。

目前在临床上,很多重要的疾病诊断标志物均使用免疫测定方法来检测,如抗 HAV IgM,乙肝“两对半”、抗 HCV,抗 HIV,梅毒抗体、优生优育 TORCH 系列、性病病原体的抗原或抗体等传染性病原体血清标志物、激素、肿瘤标志物、自身抗体、特种蛋白、细胞因子和治疗药物以及 HBV DNA, HCV RNA, 遗传病基因、肿瘤基因、基因突变等,这些标志物的检测质量直接关系到患者的临床诊断和治疗。而在血站, HBsAg, 抗 HCV, 抗 HIV 和梅毒抗体等标志物的检测,哪怕是 1% 的错误,对将要接受输血的特定患者来说,就是 100% 的灾难。近期,在电视、报纸等新闻媒体中,常可见到一些有关医患纠纷的报道,其中一些就与免疫测定有关,如输血后丙肝病毒、艾滋病毒感染的发生,性病检测的假阳性等。可见,临床免疫测定的质量控制有多么重要。

本书在结合我们自身工作的基础上,对临床酶免疫测定技术的原理方法尽可能从实用的角度进行阐述,以期能解答临床实验室技术人员在应用酶免疫测定中有可能感到困惑的问题,从而避免因此有可能出现的检验误差。本书的重点是探讨临床酶免疫测定(当然也适用其他的免疫测定)在实际应用中的一些关键性问题、室内质控方法、措施和室间质量评价的方法及意义,以期能对从事临床免疫检验的同行们开展质控工作有所帮助。

感谢同事们的鼓励以及在文稿校对、作图方面的大力支持,感谢家人的付出和支持。由于本人水平有限,书中肯定会存在有论述错误或不完善之处,敬请各位专家同道提出批评指正。

李金明

内 容 提 要

本书对临床酶免疫测定技术的发展、原理方法、基础知识以及临床应用的具体细节、室内质量控制、结果解释等尽可能从实用的角度进行阐述,以期能解答临床实验室技术人员在应用酶免疫测定中有可能感到困惑的问题,从而避免因此有可能出现的检验误差。重点是围绕临床酶免疫测定的质量保证展开相关的论述。本书可供从事临床免疫检验及相关领域的专业技术人员、临床检验专业的本科生、研究生等参考。

责任编辑 丁金玉 魏雪峰

序

FOREWORD

酶免疫测定技术是目前最为常用的临床免疫检验技术,它具有试剂保存期长、实验废弃物对环境污染小以及操作简单方便等特点,目前使用的主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)和以酶标为基础的各种全自动免疫测定分析系统等。在临床实际工作中,实验室技术人员按照试剂盒说明书进行相关的操作、结果判断和报告,但仍然存在测定准确性上的问题。这说明测定工作具有一定的复杂性。它要求测定人员必须具备对测定理论和实际操作的全面知识,对测定技术的关键环节有较深的了解。

李金明研究员在总结自己及所在科室多年酶免疫测定研究和工作经验的基础上,结合查阅的大量文献资料,从实用的角度,向临床免疫测定技术人员和从事涉及酶免疫测定技术的研究人员,提供一本较全面系统、涵盖测定原理、操作过程、结果判定和标准化及质量控制等多方面内容的参考资料。该书中,作者将实际工作中应注意的细节问题结合其原理作了详细的阐述,并对目前实际工作中的一些问题,如试剂盒结果判定方法的确定、数据处理、室内质量控制方法及临床意义等,做了较为详尽的描述,尽可能给读者提供一些实用的建议。有些地方具有相当的新意,具体的可用性需要同行们在实际工作中验证。

相信广大临床免疫检验工作者能从本书中提炼到自己所需要的东西。是这样,也达到了作者出版该书的目的。

相信在作者和全国临床免疫检验同行们的共同努力下,临床免疫检验的质量将更上一层楼。

李金明
2005-4-22

作者简介

ZUOZHE JIANJIE



李金明,男,1963年2月出生,籍贯湖南。1993年7月毕业于中国协和医科大学研究生院临床检验诊断学专业,获医学博士学位。现为卫生部临床检验中心临床免疫室主任,研究员,博士研究生导师。负责全国医院和血站实验室感染性疾病临床免疫学和PCR检验以及自身抗体免疫检验室间质量评价工作,并从事相关方面的研究,研究方向为:临床分子诊断及质量控制。目前以项目负责人承担国家自然科学基金和首都医学发展科研基金课题各一项。以单位负责人参与欧盟第六框架计划(FP6)国际合作研究项目一项。并参与国家“十五”科技攻关课题三项。学术兼职有:中华检验医学杂志编委、中华医学会检验分会分子生物学专家委员会委员、中华医学会检验分会肿瘤标志物监测专家委员会委员、中国计量测试学会国家标准物质委员会委员、中国输血协会专家委员会成员。在学术期刊上以第一作者和通讯作者发表论文50余篇。主编及参与编写专著10余部。所主持的项目《临床聚合酶链反应测定(PCR)室间质量评价方法的建立及应用》获2001年北京市科技进步三等奖。

目 录

CONTENTS

第 1 章 临床免疫测定技术发展的历史、现状和展望	(1)
第一节 临床免疫测定技术的发展历史	(1)
第二节 临床免疫测定技术的现状及展望	(3)
一、临床实验室对免疫测定技术的要求	(3)
二、临床免疫测定技术的发展现状及展望	(4)
三、酶免疫试验的优点及局限性	(8)
第 2 章 临床酶免疫测定技术的基本原理和方法	(11)
第一节 ELISA 的基本原理和测定模式	(11)
一、ELISA 的基本原理	(11)
二、固相上抗原抗体相互作用的免疫化学	(11)
三、临床 ELISA 测定的常用模式	(13)
第二节 全自动酶免疫分析仪的基本原理和测定模式	(20)
一、显色测定类	(20)
二、荧光测定类	(21)
三、发光测定类	(21)
第三节 均相酶免疫试验	(22)
一、酶放大免疫测定技术(EMIT)	(22)
二、使用羧化酶的均相酶免疫试验	(22)
三、CEDIA 均相酶免疫试验	(23)
四、均相脂质体酶免疫试验	(24)
第 3 章 免疫测定中的抗原和抗体	(27)
第一节 抗原	(27)
一、抗原的特性	(27)
二、抗原的分类	(29)
第二节 抗体	(29)
一、怎样制备用于免疫测定的抗体	(30)
二、动物对抗原物质的免疫应答	(30)
三、多克隆抗体的制备	(31)





四、单克隆抗体的制备	(36)
五、抗体的鉴定	(41)
第4章 临床酶免疫测定中的标记物及指示系统	(47)
第一节 用于酶免疫测定的常用标记用酶	(47)
一、辣根过氧化物酶	(47)
二、碱性磷酸酶	(48)
三、 β -半乳糖苷酶	(49)
第二节 酶的色原底物	(49)
一、辣根过氧化物酶的色原底物	(49)
二、碱性磷酸酶(AP)的色原底物	(52)
第三节 酶的发光底物	(53)
一、辣根过氧化物酶的发光底物	(53)
二、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶的发光底物	(53)
第5章 免疫测定中的固相支持物及抗原抗体的固相化	(55)
第一节 免疫测定的固相支持物	(55)
第二节 抗原抗体固相化	(55)
一、被动吸附	(55)
二、间接非共价吸附方法	(57)
三、共价吸附方法	(57)
第6章 酶免疫测定的酶结合物的制备	(62)
第一节 酶-大分子蛋白结合物的制备	(62)
一、酶-大分子蛋白结合物制备的影响因素	(62)
二、过碘酸钠方法	(64)
三、使用化学交联试剂耦联酶与抗体或其他蛋白	(66)
四、酶结合物的纯化、质量评价和贮存	(74)
第二节 蛋白(及酶)-小分子半抗原结合物的制备	(76)
一、小分子的特性及蛋白载体的选择	(76)
二、用于小分子与蛋白交联试剂的选择	(76)
三、小分子与蛋白的交联	(77)
四、小分子-蛋白结合物的鉴定及纯化	(80)
第7章 酶免疫测定的放大系统	(82)
第一节 建立 EIA 测定放大系统的一般原则	(82)
一、增加标记酶的量	(82)
二、非显色底物的应用	(82)
三、附加一个受标记酶催化的反应系统	(82)
第二节 以生物素-亲合素反应为基础的放大系统	(83)





第三节 多酶级联系统	(84)
一、AP 底物放大系统(substrate amplification system)	(84)
二、双酶级联(dual-enzyme cascade)放大系统	(84)
三、酶激活级联放大系统(enzyme activation cascade)	(84)
四、凝固因子酶级联放大系统	(85)
五、免疫复合物转移两位点酶免疫试验	(85)
第 8 章 临床 ELISA 测定操作中的注意事项	(87)
第一节 临床标本的收集和保存	(87)
一、患者准备及标本采集	(87)
二、可能影响测定结果的标本因素	(87)
第二节 试剂准备	(90)
第三节 加血清样本及反应试剂	(90)
第四节 温育	(90)
第五节 洗板	(91)
第六节 显色	(92)
第七节 比色	(92)
第八节 结果判定	(93)
第九节 结果报告及解释	(94)
第 9 章 免疫测定的数据处理及结果报告	(96)
第一节 与数据处理和结果报告有关的定义	(96)
第二节 测定结果的报告和数据处理	(99)
一、定性测定	(100)
二、定量测定	(105)
第 10 章 临床免疫检验中存在的问题及对策	(115)
第一节 临床免疫检验的标准化问题	(115)
一、临床免疫测定标准化的一般原则	(115)
二、临床免疫测定标准化中存在的问题	(119)
三、几种具体标志物免疫测定的标准化	(121)
第二节 临床免疫检验的室内质控问题	(125)
第三节 从全国室间质量评价看临床免疫检验中存在的问题	(125)
第四节 临床免疫检验项目的滥用问题	(135)
第 11 章 微量加样器的使用和校准	(138)
第一节 微量加样器的一般原理及分类	(138)
一、空气垫加样器	(138)
二、活塞正移动加样器	(138)
三、多通道加样器、电子加样器和分配器	(139)





第二节 加样器的使用	(139)
一、加样器使用的一般原则	(139)
二、主要加样器的介绍	(140)
三、加样器的具体操作	(141)
第三节 加样器的校准	(145)
第12章 酶标仪及洗板机的选择、使用及校准	(148)
第一节 酶标仪的应用及发展	(148)
一、国内医院和血站实验室酶标仪的应用情况	(148)
二、酶标仪的发展	(148)
第二节 正确地认识和使用酶标仪	(155)
一、测定波长	(155)
二、测定的吸光度范围	(156)
三、光学系统	(156)
四、检测速度	(156)
五、震板功能	(156)
六、温育功能	(157)
七、软件功能	(157)
八、语言界面	(157)
第三节 酶标仪的选择、自检和校准	(158)
一、酶标仪的选择	(158)
二、酶标仪的自检和校准	(158)
第四节 洗板机	(159)
一、洗板机洗涤板孔的一般机制	(160)
二、洗板机的发展	(160)
三、国内常见洗板机简介	(161)
四、洗板机的选用	(161)
五、洗板机使用中的注意事项	(162)
第13章 临床免疫测定的质量保证	(163)
第一节 定义	(163)
第二节 质量保证、室内质控和室间质评之间的关系	(165)
第三节 室内质量控制(IQC)	(166)
一、测定前的质量控制	(166)
二、统计学质量控制	(167)
三、室内质控数据的评价	(178)
四、室内质控的局限性	(178)
第四节 室间质量评价(EQA)	(178)
一、EQA的程序设计	(179)



二、EQA 的局限性	(182)
第五节 实验室信息系统在免疫质控管理中的应用	(183)
第 14 章 乙型肝炎病毒感染的免疫应答及常用血清标志物的临床意义	(185)
第一节 机体对 HBV 感染的免疫应答	(185)
一、细胞免疫应答	(185)
二、体液免疫应答	(186)
第二节 乙型肝炎病毒感染血清标志物的临床意义	(187)
一、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)	(187)
二、抗 HBs	(188)
三、HBeAg	(188)
四、抗 HBe	(188)
五、总抗 HBc 和抗 HBcIgM	(188)
六、乙肝“两对半”应用检测的误区	(189)
七、HBsAg 检测阴性 HBV 感染在输血安全中的意义	(189)
八、HBV DNA	(193)
第 15 章 丙型肝炎病毒感染的抗体应答及其免疫测定	(197)
第一节 丙型肝炎病毒的分子生物学	(197)
第二节 机体对 HCV 感染的抗体应答	(199)
一、对非结构蛋白的抗体应答	(199)
二、对 HCV 衣壳蛋白的抗体应答	(199)
三、对 HCV 包膜蛋白的抗体应答-免疫保护与免疫逃避	(199)
第三节 HCV 感染的免疫测定	(200)
一、第一代抗 HCV 检测试剂	(200)
二、第二代抗 HCV 检测试剂	(201)
三、第三代抗 HCV 检测试剂	(201)
第四节 目前抗 HCV ELISA 检测所存在的问题及其对策	(202)
一、抗 HCV ELISA 检测所存在的问题	(203)
二、如何减少抗 HCV ELISA 检测的漏检	(204)
三、血站在抗 HCV ELISA 检测中管理方面的问题与对策	(205)
第五节 抗 HCV 检测结果的报告及解释	(206)
第 16 章 人免疫缺陷病毒(HIV)感染的免疫应答和免疫学检测	(210)
第一节 机体对 HIV 感染的免疫应答	(210)
一、机体对 HIV 的体液免疫应答	(210)
二、机体对 HIV 的细胞免疫应答	(212)
三、儿童对 HIV 的免疫应答	(213)
四、致病性和保护性免疫应答	(213)
五、总结	(214)





第二节 HIV 感染的免疫测定	(215)
一、HIV 感染的酶免疫测定	(215)
二、HIV 感染的蛋白免疫印迹试验(Western blot, WB)	(216)
第 17 章 梅毒螺旋体感染的抗体应答及其免疫测定	(219)
第一节 梅毒螺旋体的抗原结构特性	(219)
一、外膜脂蛋白抗原	(219)
二、轴丝抗原	(219)
三、4D 抗原	(219)
第二节 机体对梅毒螺旋体感染的抗体应答	(220)
第三节 梅毒螺旋体感染的免疫测定	(220)
一、使用类脂质抗原的血清学试验	(220)
二、使用密螺旋体抗原的血清学试验	(221)
第 18 章 人绒毛膜促性腺激素(hCG)及其免疫测定	(225)
第一节 命名、结构和缩写	(225)
第二节 生成和代谢	(226)
第三节 hCG 及其亚单位和相关物质的抗体制备及特性	(226)
一、抗体的制备	(226)
二、hCG 及其亚单位和片段的免疫化学	(227)
三、hCG 样分子改变形式的识别	(228)
四、抗体的特异性及其评价	(229)
第四节 用于 hCG 免疫测定的临床标本的收集、处理和保存	(229)
一、血清	(229)
二、尿	(229)
三、脑脊液(CSF)	(229)
四、腹水	(230)
五、标本储存	(230)
第五节 hCG 的生物学测定方法	(230)
一、活体方法	(230)
二、体外方法	(230)
三、结合方法	(230)
第六节 hCG 的免疫测定	(231)
一、hCG 免疫测定中可能存在的交叉反应	(231)
二、免疫测定方法设计对测定特异性的影响	(232)
三、hCG 免疫测定中的非特异性干扰	(232)
四、hCG 的免疫测定方法	(233)
五、hCG 免疫测定方法的有效性评价	(235)
六、hCG 的免疫测定的参考品及单位	(236)



第七节 hCG 测定的临床应用	(237)
一、血清(浆)hCG 测定对妊娠及相关疾病的诊断	(237)
二、尿 hCG 测定诊断妊娠	(238)
三、滋养层肿瘤患者的跟踪监测	(238)
四、睾丸癌患者的跟踪	(238)
五、非滋养层肿瘤患者的诊断和跟踪	(239)



第 1 章 临床免疫测定技术发展的历史、现状和展望

众所周知,现代免疫学的发展与微生物学尤其是细菌学是密不可分的,临床免疫测定技术的发展亦是如此。当机体感染病原微生物时,要想使临床医师尽早采取适当的措施进行治疗,人们就希望能尽快尽早地知道机体所感染的是何种病原体,传统的病原体感染诊断一般要经过这样一个过程,即首先对可能存在有病原体的体液或分泌物标本进行体外培养,培养后,再通过分析其形态学、生物学和生物化学特性,以确定其到底是哪一类及哪一种病原体。这是一种行之有效的方法,直至今日,其仍是病原体感染诊断难以替代的“金标准”,但是采用传统的培养方法诊断病原体感染,不但繁琐、费时以及效率低,而且并不是万能的,因为有一些病原体,或采用体外培养方法生长特别缓慢,或根本就没有合适的培养方法,这就使得这一类病原体感染的诊断难以进行。比如,沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)作为一种细胞内专性寄生病原体,使用体外培养方法检测,不但时间特别长,而且很容易培养失败,得到假阴性结果。结核分枝杆菌的培养亦是如此。又如,有些病毒如大家熟知的乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒等到目前为止还没有发现合适的可用于临床诊断的培养方法。因此,这些难于采用传统培养方法检测的病原体感染诊断治疗的要求,迫使人们必须去寻找其他的检测途径,直接的或是间接的。此外,即使是可以用传统培养方法培养的病原体,仅进行形态及生物化学鉴定,有时并不足以完全准确地鉴定病原体,仍具有一定程度的盲目性。于是,随着人们对病原体感染与机体免疫应答的逐步认识,以抗原抗体特异反应为基础的,更为快速简便的免疫检验方法就应运而生了。总的来说,检测病原体感染的免疫检验方法根据其检测目的物可分为两类,一类是检测病原体抗原而直接反映病原体感染的方法,另一类是检测机体因对病原体的抗体应答所产生的抗体而间接反映病原体感染的方法。

第一节 临床免疫测定技术的发展历史

临床免疫检验技术的出现最早可追溯至 19 世纪末。1896 年,Widal 发现在伤寒杆菌中加入伤寒病菌人的血清可致伤寒杆菌发生特异的凝集现象,利用这种凝集现象可有效的诊断伤寒病,这就是最早的用于病原体感染诊断的免疫凝集试验,亦即著名的肥达试验(Widal test)。稍后,即 1897 年,Kraus 又发现将细菌培养液与其相应的抗血清混合后可发生肉眼可见的沉淀反应,于是,免疫沉淀试验又应运而生。到 1900 年,维也纳大学病理解剖系的年仅 32 岁的助教 Landsteiner 发现在一些人的血浆能使另一些的红细胞凝集,这种同种凝集现象的发现,成为人类血型分类的基础,并由此而衍生了生物科学中的一个特殊分支即免疫血液学,Landsteiner 也因人类血型的发现获得了 1930 年的诺贝尔生理学或医学奖。并且,直至今天,我们





仍然在使用基本的红细胞凝集试验鉴定 ABO 血型。在同一年代, Bordet 又发现了补体结合试验(complement fixation test, CFT), 即抗原抗体反应后具有补体结合的能力, 如红细胞与溶血素反应后, 如有补体存在即可出现溶血现象。因此, 利用这种免疫溶血机制做指示系统, 可以检测另一反应系统中抗原或抗体的存在与否。1906 年 Wassermann 将这种试验用于梅毒螺旋体感染的诊断, 建立了著名的华氏反应。

下面我们首先来看看免疫沉淀反应测定技术的发展历程。1902 年 Ascoli 建立了环状沉淀试验。1905 年 Bechhold 将抗体混溶在明胶中, 然后再将相应特异抗原加于其上, 抗原抗体的特异结合可在明胶中出现沉淀。1946 年 Oudin 报道了试管单向免疫扩散试验。到 1965 年 Mancini 又提出了平板单向免疫扩散试验, 这种试验的出现使得以前只能进行定性测定的免疫试验进入到了定量的时代, 并且其仍是目前最为常用的简易抗原定量方法, 如免疫球蛋白、补体 C3 和 C4 等的测定。由 Ouchterlony 首先报道的平板法双向免疫扩散试验, 仍然是抗原抗体鉴定的最基本方法之一。由 Grabar 和 Williams 在内 1953 年首先报道的免疫电泳, 其将区带电泳和免疫双扩散有机地结合了起来, 可很方便地用于纯化抗原和抗体成分的分析及正常和异体液蛋白的识别。其后, 又出现了对流免疫电泳、火箭免疫电泳和免疫固定电泳(immunofixation electrophoresis, IFE)等。免疫沉淀反应发展到此, 基本上可以说是经典免疫沉淀试验发展阶段, 这些所谓的经典免疫沉淀试验不但测定范围狭窄($10 \sim 100 \mu\text{g/ml}$)、灵敏度低, 而且繁琐费时, 不能自动化, 因此, 到了 20 世纪 70 年代, 根据抗原抗体能在液相中快速结合的原理, 出现了微量免疫沉淀试验, 即免疫透射比浊测定、免疫胶乳比浊测定和免疫散射比浊测定, 这几种比浊测定方法均已用于临床体液特定蛋白含量的测定, 现已有多种自动化检测仪器应用于临床检验, 尤其是免疫散射比浊测定。

免疫凝集反应测定技术则经历了直接凝集试验、间接凝集试验和自身红细胞凝集试验等几个发展阶段。直接凝集试验常用的有玻片法和试管法两种, 如在玻片上进行的红细胞 ABO 血型的鉴定试验, 在试管中进行的肥达试验和外斐试验(Weil-Felix test)以及交叉配血凝集试验等。间接凝集试验中曾经应用较为广泛的有间接血凝试验和胶乳凝集试验, 如国内 20 世纪 80 年代初广为应用于 HBsAg 测定的反向间接血凝试验, 用于 hCG 和类风湿因子(RF)测定的胶乳凝集试验等。自身红细胞凝集试验则是近些年来发展的不同于以前的免疫凝集试验的快速检验技术, 其最大的特点是采用一种双功能抗体试剂, 以患者自身红细胞作为凝集反应指示系统, 检测方便快捷, 只要 2min 就完成凝集反应。

由上述可见, 以免疫沉淀和免疫凝集反应为基础的免疫检验技术, 除了免疫比浊外, 均无需特殊的仪器设备, 操作简单方便, 有些具体测定方法, 即使是在今天, 仍有着广阔的应用空间, 有其不可替代的一面, 尽管如此, 以免疫沉淀和免疫凝集反应为基础的免疫检验技术的局限性还是非常明显的, 如测定灵敏度低, 除少数外, 基本上都是定性测定等, 这些缺陷大大限制了其在病原体感染诊断及体液中微量生物活性物质测定中的应用价值。

如果我们将免疫沉淀和免疫凝集试验定为经典的免疫测定技术, 那么, 标记免疫测定技术就可以说是现代免疫测定技术, 经典的免疫测定技术所不能解决的临床测定问题在标记免疫测定技术前均能迎刃而解。在标记免疫测定技术中最早使用的标记物是荧光素。1941 年 Coons 建立的荧光素标记抗体技术(fluorescent antibody technique)为定位组织和细胞中的抗原物质提供了一个直接而又有效的手段。在 20 世纪 40 年代以前, 所出现免疫测定技术基本上都是定性或半定量测定方法, 到 50 年代末 60 年代初, 才出现完全的定量测定方法, 即放射

免疫试验(radioimmunoassay, RIA)。高灵敏放免测定技术的出现,解决了以前难以测定的微量生物活性物质如激素的临床检测问题,其发明者之一 Yalow 因此而获得了 1977 年的诺贝尔生理学或医学奖。尽管放免测定技术的出现是免疫测定技术发展史上的一个里程碑,但由于其有试剂半衰期短,实验废液难以处理,污染环境等缺点,使得其现已在逐步退出在临床常规检验中的应用,而采用非放射性核素标记物建立标记免疫测定技术成为发展主流。1966 年,美国的 Nakane 和 Pierce 以及法国的 Avrameas 和 Uriel 同时报道了酶免疫测定技术。其将酶替代荧光素,用于抗原在组织中的定位,可通过光学显微镜和电子显微镜来观察。60 年代末,在酶免疫组织化学的基础上,Engvall 和 Perlmann 以及 Van Weeman 和 Schuurs 等发展了一种酶标固相免疫测定技术,即酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),这种简单方便的免疫测定技术出现后,不但成为了一种非常简便的研究工具,而且迅速地应用于各种生物活性物质及标志物的临床检测,并在临床应用中逐步取代了放免技术。其后,1972 年 Rubenstein 等又建立了一种无需分离洗涤步骤的均相(homogeneous)酶免疫测定技术——酶放大免疫分析技术(Enzyme multiplied immunoassay technique, EMIT),这种测定技术主要限于小分子物质如药物等的测定应用。随着 70 年代中期杂交瘤技术的发展,出现了单克隆抗体,其应用于免疫测定,极大地提高了免疫测定的灵敏度和特异性,且为各种免疫测定方法的设计提供了广阔的想象空间,各种免疫测定技术相继出现,如一步法双抗体夹心酶免疫测定,各种均相酶标或放射性核素标免疫测定方法等。到了 80 年代,研究人员又发现胶体金可以作为抗体的标记物,建立简便快速的免疫渗滤层析试验,即所谓的金标试纸条。进入 90 年代,使用不同测定原理的各种自动化免疫分析仪不断应用于临床检验,给我们实验室的日常工作不但带来了很大的便利,而且其测定较之人工操作更为稳定和准确。近几年,基因工程免疫测定试剂和基因工程抗体的发展,又一次拓宽了免疫测定技术的发展途径。

综观免疫测定技术 100 多年的发展历程,可以看出,这种建立在抗原抗体特异相互作用基础上的临床检验技术,已成为我们认识了解生命未知物质的一个难以替代的手段,其发展的每一步都来自于相关学科研究认识的深入。如果说抗原抗体特异相互作用只是免疫测定技术的基本框架,那么,标记物、单克隆抗体、固相支持物等等就像是这个框架上最丰富多彩的外装。

第二节 临床免疫测定技术的现状及展望

一、临床实验室对免疫测定技术的要求

所谓临床实验室就是为临床医师和患者出具检验报告,从而为患者疾病的诊断和治疗提供依据的实验室。所以,临床实验室对免疫测定技术的最基本要求就是准确和灵敏,其次是简便易行。那么,现有的免疫测定技术能达到这些要求吗?从理论上讲,任何一种生物活性物质,只要能得到它的抗体,就可以建立相应的免疫测定方法对其加以测定。因此,在临床上除了无机离子外,绝大部分生物活性物质如激素、酶、糖蛋白、药物、抗体等均可使用免疫测定技术来测定。免疫测定技术多种多样,现在临床上最常用的不外乎免疫比浊、四大标记免疫测定技术(酶免、放免、荧光免疫和金标测定技术)、免疫凝集、免疫沉淀等,不同的测定技术用在不同的标志物或不同的测定情况下。如灵敏度较低的免疫比浊、免疫沉淀等通常用于体内含量