

国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

MIANYI JIAOTIJIN JISHU

免疫胶体金技术 临床应用

LINCHUANG YINGYONG


主编◎康熙雄



国家“十一五”重点图书出版项目——
生物医学实验技术丛书

免疫胶体金技术临床应用

主 编	康熙雄			
副主编	单保恩	刘志忠		
编 者	丁季荣	石 峻	吕 虹	张国军
	方 芳	戚晓渊	王雅杰	邵春青
	高社军	邹吉敏	王洛平	张 进
	黄其建	岳秀玲	李 玮	刘竞争
	索风霜	张亚南	王建成	孙艳艳
	陈 惠	廖 朗		

 军事医学科学出版社

· 北 京 ·

内 容 提 要

免疫胶体金技术是以胶体金作为标记物应用于抗原抗体反应的免疫学核心技术,广泛用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学领域。本书共分4章,分别介绍了免疫胶体金技术的原理和特点,制备和标记方法,主要应用技术如渗滤技术、层析技术,以及在电镜、光镜水平的联合应用;并且着重介绍了胶体金技术在临床实验诊断各领域的广泛应用。本书不是单纯的操作手册,而是采用图、文、表相结合的形式对应用领域的相关原理、方法学比较、结果判定、质量控制、关键技术等环节逐一说明,做到了层次清晰,表达准确、系统、易懂、实用。本书适合从事免疫相关的生命科学领域广大技术人员和大中专在校生参考,对开展胶体金实验的研究生也具有指导价值。

图书在版编目(CIP)数据

免疫胶体金技术临床应用/康熙雄主编. —北京:军事医学科学出版社,2010.7
ISBN 978-7-80245-491-0

I. ①免… II. ①康… III. ①免疫测定—诊断剂 IV. ①R981

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第071255号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路27号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)66931051,66931049,81858195

编辑部:(010)66931127,66931039,66931038,

86702759,86703183

传 真:(010)63801284

网 址:<http://www.mmsp.cn>

印 装:北京冶金大业印刷有限公司

发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:15

字 数:258千字

版 次:2010年8月第1版

印 次:2010年8月第1次

定 价:40.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

前 言

免疫标记学自 20 世纪 60 年代创立以来，随着新理论、新方法、新材料、新工艺、新产品不断开发，促使标记免疫分析技术向纵深处发展。目前已形成有多种标记、多种反应模式的综合性标记免疫分析体系，集基础医学、实验技术和临床应用于一体。1971 年 Faulk 和 Taylor 将胶体金引入免疫化学，此后，免疫胶体金技术成为继酶免疫标记、放射性免疫标记和荧光免疫标记三大标记技术之后的又一较为成熟的、并且得到广泛应用的重要技术，且随着单克隆技术的成熟和纳米技术的兴起而逐渐得到完善和发展。

免疫胶体金技术是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体反应的一种免疫标记技术。免疫胶体金技术是一种常用的标记技术，有其独特的优点，具有操作方法简单快速、敏感性高、特异性强、稳定性好、结果准确、易于判定等优点，对于从实验室研究到临床疾病辅助诊断都有一定的作用。免疫胶体金技术作为一种新型免疫标记技术，已广泛应用于众多领域，如肿瘤、心血管疾病、感染性疾病、消化系统疾病、毒品检测等。通过与电镜/光镜、流式细胞仪、凝集试验、蛋白印记技术、免疫层析等实验技术相结合，可定量或半定量测定内分泌激素、蛋白质、多糖、核酸、神经递质、受体、细胞因子、细胞表面抗原、肿瘤标志物、血药浓度等各种生物活性物质。目前在医学检验中的应用主要是免疫层析法（immunochromatography）和快速免疫金渗滤法（Dot-immuogold filtration assay, DIGFA），用于检测 HBsAg、HCG 和抗双链 DNA 抗体等，具有简单、快速、准确和无污染等优点。而将胶体金标记技术与床旁检测诊断技术（point-of-care testing, POCT）相结合，能快速获得结果，操作简单且设备小型化便于携带，能有效指导医师制订治疗方案，病人也能及时了解自己的病情。这一技术适应现代社会发展的需要，并为床旁检测诊断技术开拓了新的发展空间。

本书主要针对国内外临床实验室最具使用前景及目前使用比较广泛的胶体金标记技术，从原理、制备、应用、产品研发、质控等不同方面对其进行详细而全面的介绍，以期从事临床及实验室工作的人员提供参考性建议。在本书编写过程中，各个实验室及在检验一线工作的同志们给了我很好的启发，也是在大家团队合作以及对临床检验的热爱、对免疫标记技术熟练掌握的基础上共同撰写完成的。

尽管编者已经尽力完成编写任务，但由于本团队水平有限，书中若有不足之处，敬请各位同行和专家批评指正，以便再版时更正。

编 者

目 录

第一章 免疫胶体金技术原理和特点	(1)
1 免疫标记分析技术原理	(1)
2 免疫胶体金技术基本原理及应用领域	(13)
3 免疫胶体金的制备、标记	(21)
第二章 免疫胶体金技术的应用	(33)
1 免疫胶体金在电镜水平的应用	(33)
2 免疫胶体金在光镜水平的应用	(47)
3 免疫胶体金渗滤技术	(56)
4 免疫胶体金层析技术	(60)
5 免疫胶体金微阵列技术	(68)
第三章 免疫胶体金技术在实验诊断中的应用	(73)
1 肿瘤标志物检测	(73)
2 自身抗体检测	(102)
3 儿童疾病检测	(114)
4 药物残留检测	(122)
5 心血管标志物检测	(127)
6 感染性疾病检测	(137)
7 毒品检测	(178)
8 早孕检测	(190)
9 消化系统疾病检测	(195)
第四章 免疫胶体金产品研发及质控	(205)
1 免疫胶体金产品在 POCT 中的应用及研发	(205)
2 免疫胶体金产品质控现状	(220)

第一章

免疫胶体金技术原理和特点

1 免疫标记分析技术原理

目前我国标记免疫学正处于迅速发展的重要时期。标记免疫分析方法的创立和发展,特别是与分子生物学、细胞生物学这些医学前沿学科的互交叉、互相渗透,促进了标记免疫学的多样性发展,并广泛应用于临床医学各个领域,有力推动了临床各个专科的发展,使其成为疾病诊断、疗效观察和医学科研的重要途径和方法,这样也促进标记免疫学逐渐形成了一门独立的分支学科。

现代医学标记免疫学是集基础医学、实验技术和临床应用于一体的一门综合性学科。标记免疫分析技术具有极其良好的微量分析效果,应用范围极其广泛,可以测定内分泌激素、蛋白质、多肽、核酸、神经递质、受体、细胞因子、细胞表面抗原、肿瘤标志物、血药浓度等各种生物活性物质。近年来,标记免疫学在理论与技术上与分子生物学的广泛结合,使标记免疫分析应用更广泛、研究更深入。标记免疫分析的技术进步与细胞生物学发展关系密不可分,并形成新的边缘学科,具有良好发展前景。

1.1 现代医学标记免疫分析概况

1.1.1 标记免疫分析的发展过程

标记免疫学创立于20世纪60年代初期,开始以放射免疫分析为代表,以后相继派生出许多其他的标记免疫分析方法。在方法学的研究发展过程中,人们关注的焦点始终围绕着如何提高灵敏度和特异性这两大核心问题。随着基础医学和相关技术的发展,特别是1990年以来,新理论、新方法、新材料、新工艺、新产品不断开发,使标记免疫分析技术向纵深发展,目前已形成由多种标记、多种反应形式的综合性标记免疫分析体系。

1.1.2 标记免疫分析的发展现状

自从 Berson 和 Yalow 创立放射免疫分析(RIA)法以来,标记免疫分析即进入了蓬勃发展的时期,20 世纪 60 年代中期建立了固相抗体分离方法的概念,60 年代末期创立了免疫放射分析(IRMA),这一方法中典型的模式是双位点夹心法,其灵敏度、特异性、线性范围均优于液相竞争的放射免疫分析。70 年代中期,杂交瘤技术问世,体外合成单克隆抗体成功;可以制备许多特异性强的单克隆抗体,使免疫放射分析进入了实用化阶段,80 年代中后期在许多医学科研院所和各级医院的应用范围已经达到相当普及的程度。放射免疫分析的发展还与固相材料的研究,如试管固相 RIA 和 IRMA 技术、双位点夹心固相技术等有关。生物素和亲和素系统(BAS)与试管固相抗原技术相结合,建成新型 BAS-IRMA 固相抗原竞争法,利用生物素-亲和素系统的高亲和力和放大效应,使 RIA 具有更好的分离效果和更高的灵敏度。

20 世纪 80 年代末 90 年代初期由于基因克隆与 DNA 重组技术的应用,使标记免疫分析获得更多高质量的单克隆抗体。

酶标记免疫分析(EIA)自 20 世纪 70 年代初建立以来,由于标记物来源丰富、价格低廉、检测方便、无放射性污染,另一重要优点是酶标记物的有效期长,正常保存期可超过一年,因此发展迅速。1975 年杂交瘤技术产生大量的各种单抗,大大促进了 EIA 的发展,90 年代后期在 EIA 中引进放大系统,主要是生物素-亲和素系统的应用,使测定的灵敏度赶上或超过 RIA,目前 EIA 是标记免疫分析发展的重要组成部分。

20 世纪 70 年代中期,Arakaweu 首次报道用发光信号进行酶免分析,利用发光的化学反应分析超微量物质。化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)或免疫化学发光分析(immunochemiluminometric assay, ICMA)灵敏度高,可达 10^{-18} mol/L,快速,几秒钟内产生化学发光信号信息量大,持续时间长,可长达数小时,90 年代中期发展为全自动的化学发光免疫分析仪,因此成为非放射性免疫分析中最有前途的方法。

时间分辨荧光免疫分析(TRFIA),自 20 世纪 80 年代初期问世以来,已经显示出其良好的发展前景。与通常的荧光免疫分析不同,TRFIA 以镧系元素为标记物,标记抗原或抗体,用时间分辨技术(波长和时间两种分辨)测量荧光,有效地排除非特异荧光,大大地提高了分析的灵敏度,分析动态线性范围可达 4~5 个数量级,加之稳定性好、有效期长、测量速度快、易于自动化,因此被公认为有良好发展前景的非放射性标记免疫分析方法。

自从 1953 年 Watson 和 Crick 阐明 DNA 双螺旋结构,开创了分子生物学新时代,DNA 重组技术或基因工程是 20 世纪生物学的一项伟大成就,分子免疫学的主要任务是以淋巴细胞为中心,从分子水平研究淋巴细胞的活化、对抗原的识别、信号传递、受体和相关基因表达,研究中广泛应用的核酸的分离、分子探针的标记、分子杂交技术也在迅速发展。标记的核酸分子探针是探测特定靶基因片段存在、核酸分子杂交、基因序列测定的基础。理想标记物的选择,包括放射性同位素和非放射性标记物,如半抗原—生物素、地高辛、配体分子、荧光素等优选方案,及标记方法均有许多研究和进展。

细胞生物学的发展同样引人瞩目,由免疫细胞产生的细胞因子是一类极微量的、具有广谱生物活性的小分子多肽,20 世纪 80 年代细胞因子的研究进入活跃期,出现了多种特异性的细胞因子的单克隆抗体,为基础和临床研究提供了条件。

免疫细胞和靶细胞表面有很多分化抗原,它们为相应抗体所识别,称为分化抗体群(cluster of differentiation,CD)。随着单克隆抗体技术的发展,越来越多的表面标志物被发现,在世界卫生组织主持下 1982~1996 年共举办了 6 届人类白细胞分化抗原国际学术会议,对来自各国实验室的 CD 抗体进行统一命名,目前已有约 200 个分化抗体群被鉴定,并批准命名。借助于荧光标记的单克隆抗体技术,对悬浮细胞进行流式细胞术分析是当前研究白细胞和靶细胞分化抗原的核心技术。近年来许多学者发现了多种胞浆和细胞核的抗原结构,并制备了相应的单抗,研究这类细胞内部标志及其生命活动(信息传递、细胞周期、细胞凋亡等),将有令人兴奋的研究前景。

1.1.3 标记免疫分析的分类

标记免疫分析的基本原理是将多种示踪物的标记技术与免疫学技术相结合,用以定量或示踪极微量的生物活性物质。

(1)标记免疫分析按照示踪标记物及标记技术分类:

①放射性核素标记放射免疫分析(radioimmunoassay, RIA)

免疫放射量度分析(immunoradiometric assay, IRMA)

受体放射性配体结合分析(receptor radioligand banding assay, RRLBA)

放射受体分析(radioreceptor assay, RRA)

②酶标记免疫分析

酶增强免疫分析(emzyme multiplied immunoassay technique, EMIT)

酶标记抗原 EIA

4 □ 免疫胶体金技术 **临床应用**

酶标记抗体 EIA

酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

直接 ELISA

间接 ELISA

亲和层析介导的免疫测定(affinity chromatography immunoassay, ACIA)

单位点非竞争 ELISA

酶蛋白复活免疫分析(apoenzyme reactivation immunoassay, ARIS)

③ 荧光标记免疫分析

荧光增强标记免疫分析(FIA)

底物标记荧光免疫分析(substrate-labeled fluorescein immunoassay, SLFIA)

荧光偏振免疫分析(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)

荧光激发转换免疫分析(fluexcitation transfer immunoassay, FETIA)

时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)

④ 化学发光免疫分析

直接标记化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)

增强化学发光酶免疫分析(enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay, ECLIA)

生物发光免疫分析(biochemiluminescence immunoassay, BCLIA)

电化学发光免疫分析(electrochemiluminescence, ECL)

(2) 按反应体系的物理状态分类

① 均相标记免疫分析

酶免疫分析中酶放大免疫分析(EMIT)

荧光免疫分析中 FIA, FPIA, FETIA 等

② 非均相标记免疫分析

放射性核素分析中 RIA, IRMA

酶标记免疫分析中 ELISA

荧光标记免疫分析中 TRFIA

化学发光免疫分析中化学发光酶免疫分析

电化学发光免疫分析

均相标记免疫分析的最大特点是:结合的和未结合的抗原不需要用物理分离过程,使标记免疫分析更方便实现自动化测量;但多数均相标记免疫

分析中只能测定小分子的物质,结合的与未结合的抗原之间的较小差异确定了检测信号变化的局限性,也限定了该法的应用范围。

非均相标记免疫分析需要一个将结合与未结合游离的标记物的分离步骤,可能是一个较复杂的步骤,但却有效降低了非特异结合的本底信号,提高了检测灵敏度;而且非均相标记免疫分析对小分子和大分子物质都可以测定,故有更广泛的用途。

1.2 免疫标记分析技术基本原理与类型

1.2.1 酶免疫标记技术基本原理与类型

酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是一种固相免疫测定技术,其先将抗体或抗原包被到某种固相载体表面,并保持其免疫活性,测定时,将待检样本和酶标抗原或抗体按不同步骤与固相载体表面吸附的抗体或抗原发生反应,后加入酶标抗体与免疫复合物结合,用洗涤的方法分离抗原抗体复合物和游离的未结合成分,最后加入酶反应底物,根据底物被酶催化产生的颜色及其吸光度(A)值的大小进行定性或定量分析的方法。

ELISA 可用于测定抗原,也可用于测定抗体。在这种测定方法中有三种必要的试剂:①固相的抗原或抗体,即“免疫吸附剂”(immunosorbent);②酶标记的抗原或抗体,称为“结合物”(conjugate);③酶反应的底物。

根据试剂的来源和标本的情况以及检测的具体条件,可设计出各种不同类型的检测方法,主要有直接法、双抗体夹心法、间接法、竞争法四种类型的方法,其中后三种较为常用。

(1)直接法:直接法是用一活化剂首先将酶活化,被活化的酶分子上的基团直接可与抗体(抗原)结合形成标记物,如过碘酸钠法。形成的结合物为:酶-抗体(抗原)。

(2)间接法:此法是测定抗体最常用的方法。是将已知抗原连接在固相载体上,待测抗体与抗原结合后再与酶标二抗结合,形成抗原-待测抗体-酶标二抗的复合物,复合物的形成量与待测抗体量成正比,属非竞争性反应类型。

操作步骤:①包被固相载体:用已知抗原包被固相载体。②加待检标本:经过 37℃ 温育 2 h,使相应抗体与固相抗原结合。洗涤除去无关的物质。③加酶标抗抗体:再次 37℃ 温育 2 h 后与固相载体上抗原抗体复合物结合;洗涤除去未结合的酶标抗抗体。④加底物显色:终止反应后,目测定

性或用酶标仪测光密度值定量测定。

本法主要用于对病原体抗体的检测而进行传染病的诊断。间接法的优点是只要变换包被抗原就可利用同一酶标抗抗体建立检测相应抗体的方法,间接法成功的关键在于抗原的纯度。虽然有时用粗提抗原包被也能取得实际有效的结果,但应尽可能予以纯化,以提高试验的特异性。特别应注意除去能与一般健康人血清发生反应的杂质,例如以 E. Coli 为工程酶的重组抗原,如其中含有 E. Coli 成分,很可能与受过 E. Coli 感染者血中的抗 E. Coli 抗体发生反应。抗原中也不能含有与酶标抗人 Ig 反应的物质,例如来自人血浆或人体组织的抗原,如不将其中的 Ig 去除,试验中也发生假阳性反应。另外如抗原中含有无关蛋白,也会因竞争吸附而影响包被效果。间接法中另一种干扰因素为正常血清中所含的高浓度的非特异性。病人血清中受检的特异性 IgG 只占总 IgG 中的一小部分。IgG 的吸附性很强,非特异 IgG 可直接吸附到固相载体上,有时也可吸附到包被抗原的表面。因此在间接法中,抗原包被后一般用无关蛋白质(例如牛血清蛋白)再包被一次,以封闭(blocking)固相上的空余间隙。另外,在检测过程中标本须先行稀释(1:40~1:200),以避免过高的阴性本底影响结果的判断。

(3)双抗体夹心法:此法常用于测定抗原,是利用待测抗原上的两个抗原决定簇 A 和 B 分别与固相载体上的抗体 A 和酶标记抗体 B 结合,形成抗体 A-待测抗原-酶标抗体 B 复合物,复合物的形成量与待测抗原含量成正比,属非竞争性反应类型。

操作步骤:①用已知特异性抗体包被固相载体。②加待检标本,经过温育使相应抗原与固相抗体结合;洗涤,除去无关的物质。③加酶标特异性抗体,与已结合在固相抗体上的抗原反应;洗涤,除去未结合的酶标抗体。④加底物显色,终止反应后目测定性或用酶标仪测量光密度值进行定量测定。

在临床检验中,此法适用于检验各种蛋白质等大分子抗原,例如 HBsAg、HBeAg、AFP、hCG 等。只要获得针对受检抗原的异性抗体,就可用于包被固相载体和制备酶结合物而建立此法。如抗体的来源为抗血清,包被和酶标用的抗体最好分别取自不同种属的动物。如应用单克隆抗体,一般选择两个针对抗原上不同决定簇的单抗,分别用于包被固相载体和制备酶结合物。这种双位点夹心法具有很高的特异性,而且可以将受检标本和酶标抗体一起保温反应,做一步检测。

在一步法测定中,当标本中受检抗原的含量很高时,过量抗原分别

和固相抗体及酶标抗体结合,而不再形成“夹心复合物”。类同于沉淀反应中抗原过剩的后带现象,此时反应后显色的吸光值(位于抗原过剩带上)与标准曲线(位于抗体过剩带上)某一抗原浓度的吸光值相同,如按常法测读,所得结果将低于实际的含量,这种现象被称为钩状效应(hook effect),因为标准曲线到达高峰后呈钩状弯落。钩状效应严重时,反应甚至可不显色而出现假阴性结果。因此,在使用一步法试剂测定标本中含量可异常增高的物质(例如血清中 HBsAg、AFP 和尿液 hCG 等)时,应注意可测范围的最高值。用高亲和力的单克隆抗体制备此类试剂可削弱钩状效应。

假使在被测分子的不同位点上含有多个相同的决定簇,例如 HBsAg 的 a 决定簇,也可用针对此决定簇的同一单抗分别包被固相和制备酶结合物。但在 HBsAg 的检测中应注意亚型问题,HBsAg 有 adr、adw、ayr、ayw 4 个亚型,虽然每种亚型均有相同的 a 决定簇的反应性,这也是用单抗做夹心法应注意的问题。

双抗体夹心法测抗原的另一注意点是类风湿因子(RF)的干扰。RF 是一种自身抗体,多为 IgM 型,能和多种动物 IgG 的 Fc 段结合。用作双抗体夹心法检测的血清标本中如含有 RF,它可充当抗原成分,同时与固相抗体和酶标抗体结合,表现出假阳性反应。采用 Fab 或 Fab 片段做酶结合物的试剂,由于去除了 Fc 段,从而消除 RF 的干扰。双抗体夹心法 ELISA 试剂是否受 RF 的影响,已被列为这类试剂的一项考核指标。

双抗体夹心法适用于测定二价或二价以上的大分子抗原,但不适用于测定半抗原及小分子单价抗原,因其不能形成两位点夹心。

(4)竞争法:此法可用于抗原和半抗原的定量测定,也可用于测定抗体。它是用一定量的酶标已知抗原(抗体)与待测的非标记抗原(抗体)竞争性的与固相载体上的限量抗体(抗原)结合,待测抗原(抗体)多,则形成非标记复合物多,酶标抗原与抗体结合就少,也就是酶标记复合物少,经过洗涤分离,最后结合于固相的酶标抗原与待测抗原含量呈负相关。因此,显色程度与待测物含量成反比。如抗原中会有干扰物质,直接包被不易成功,可采用捕获包被法,即先包被与固相抗原相应的抗体,然后加入抗原,形成固相抗原。洗涤除去抗原中的杂质,然后再加标本和酶标抗体进行竞争结合反应。竞争法测抗体有多种模式,可将标本和酶标抗体与固相抗原竞争结合,抗 HBc ELISA 一般采用此法。另一种模式为将标本与抗原一起加入到固相抗体中进行竞争结合,洗涤后再加入酶标抗体,与结合在固相上的抗原反应。抗

HBe 的检测一般采用此法。

操作步骤:①用已知特异性抗体包被固相载体。②测定管加待测抗原和一定量的酶标抗原,经过温育,使二者与固相抗体竞争结合;对照管只加一定量酶标抗原与固相抗体直接结合。分别洗涤,除去未结合的成分。③加底物显色,对照管由于只加酶标抗原,与固相抗体充分结合,故分解底物显色深;测定管的显色程度则随待测抗原和酶标抗原与固相抗体竞争结合的结果而异。如待测抗原量多,竞争性地抑制酶标抗原与固相抗体结合,使固相上结合的酶标抗原量减少。因此,加入底物后显色反应较弱。分别测定两管的光密度(OD)值,根据对照管与测定管 OD 值之比,计算标本中待测抗原含量。

1.2.2 荧光免疫标记技术基本原理与类型

(1)直接免疫荧光法测抗原:将荧光素标记在相应的抗体上,直接与相应抗原反应。其优点是方法简便、特异性高,非特异性荧光染色少。缺点是敏感性偏低;每检查一种抗原就需要制备一种荧光抗体。此法常用于细菌、病毒等微生物的快速检查和肾炎活检、皮肤活检的免疫病理检查。

(2)间接免疫荧光法测抗体:染色程序分为两步,第一步,用未知未标记的抗体(待检标本)加到已知抗原标本上,在湿盒中 37°C 保温 30 min,使抗原抗体充分结合,然后洗涤,除去未结合的抗体;第二步,加上荧光标记的抗球蛋白抗体或抗 IgG、IgM 抗体。如果第一步发生了抗原抗体反应,标记的抗球蛋白抗体就会和已结合抗原的抗体进一步结合,从而可鉴定未知抗体。

(3)双抗夹心法:原理是将特异性单克隆抗体与固相载体连接,形成固相抗体。除去未结合抗体,然后加受检标本,使其中的蛋白抗原与固相抗体形成抗原抗体复合物。洗涤除去未结合物,接着加入荧光标记的单克隆抗体,使之与抗原特异性结合,形成抗体-抗原-抗体复合物。底物用磷酸-4-甲基伞形酮,检测产物发出的荧光,荧光强度与 Mb 浓度呈正比,可对蛋白抗原进行定量。结果以 Mb 每小时释放的速率(ΔMb)表示。该法重复性好,线性范围宽,具有快速、敏感、准确的特点。

1.2.3 放射免疫标记技术基本原理

放射免疫技术按其方法学原理主要有两种基本类型,放射免疫分析(RIA)和免疫放射分析(IRMA)。RIA 是以过量的未标记抗原与放射性物质标记的抗原,竞争性地与抗体结合,形成有放射性的抗原-抗体复合

物与无放射性的抗原-抗体复合物, 并有过剩的标记抗原与未标记的抗原。然后通过离心沉淀等方法, 将抗原-抗体复合物与游离抗原分离, 分别测定其放射性强度与标准曲线比较, 即可对未标记的待测抗原进行定量(图 1-1)。IRMA 是用放射性物质标记过量的抗体与待测抗原直接结合, 采用固相免疫吸附载体分离结合与游离标记抗体的非竞争放射免疫分析(图 1-2)。

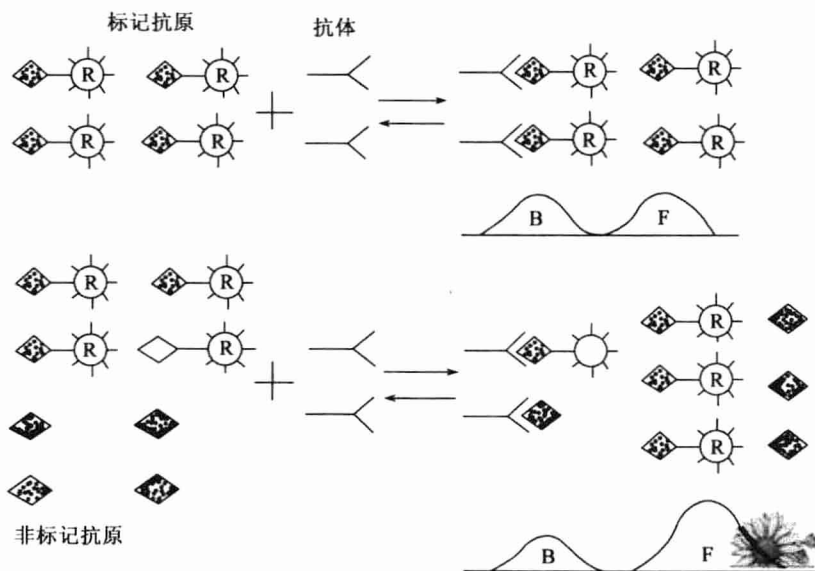


图 1-1 放射免疫分析原理示意图

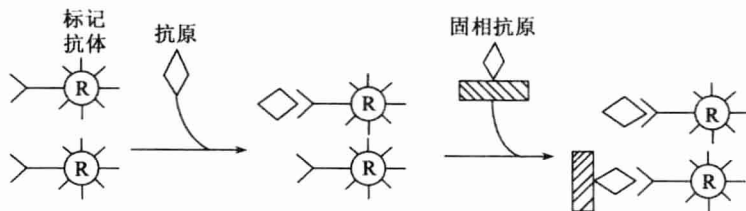


图 1-2 免疫放射分析原理示意图

常用的放射性核素有 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C , 使用最广泛的是 ^{125}I , 其优点是化学性质比较活泼, 可以用较简便的方法制备标记物; 衰变过程中不产生电离辐射较强的 β 射线, 对标记多肽、蛋白分子活性影响小; 其释放的 γ 射线测量方法简便, 易于推广。

RIA 法测定血清蛋白灵敏度、特异性强, 可准确定量到 ng/ml 水平。

但早期的方法操作麻烦,耗时长,且有放射性污染。近年来,随着单克隆抗体的应用,RIA 的灵敏度又有了较大提高,且操作大为简化,并已有商品试剂盒供应,使用方便。

1.3 标记免疫分析的质量评价系统

标记免疫分析的技术进步正在进入活跃发展阶段,同时应用范围更加广泛,目前全国有 4 000 多个单位开展标记免疫分析,临床医学各个专科在诊断治疗和临床研究中不同程度对标记免疫分析产生的需求和重视,对标记免疫学逐渐形成一门独立而完整的学科发挥重要影响。

各标记免疫实验室都致力于实现可靠而正确的测定结果,为临床提供准确的参考数据,同时应该以更大的精力实现建立和完善标记免疫实验室的质量保证系统;临床医务工作者亦越来越关注这一方面工作的进展情况,全面地、正确地了解和评价这一工作的发展和现状,对临床医务人员与实验室的沟通交流和互相促进,更好地利用标记免疫分析提供的参考数据和信息,将是十分重要的。

标记免疫分析的质量评价系统包括:实验室内部质量控制(internal quality control, IQC)和外部质量评价(external quality assessment, EQA)。IQC 包括:实验室内对一次测定的批内精密度及实验室内的批间测定的精密度评价;EQA 主要指:同一方法在不同实验室之间的精密度比较。

1.3.1 标记免疫分析质量评价应建立系统工程

标记免疫分析的广泛应用带来的现实问题:一是,如何在强有力的质量保证体系下,将大量检测数据准确地送达临床;二是,如何认识和克服标记免疫分析的质量和结果解释的局限性给临床带来的困扰。因此对标记免疫分析目前存在的质量管理和技术发展的现状应有一个全面和正确的认识。

加强标记免疫分析的实验室管理是世界范围内的重要课题,我国是一个发展中国家,这一管理体系的建立,对保证医疗资源的有效利用、保证广大病人的切身利益和保证标记免疫学学科的发展至关重要。目前在吸取国外成功和有益的经验的同时,也正在逐步形成符合中国国情的标记免疫实验室管理体系。

我国在 20 世纪 60 年代末已建立了实验室临床生化的实验室质量管理体系,但标记免疫分析属于新近发展起来的“高度复杂”的免疫学实验,更需要从社会管理机构,到试剂生产厂商,到实验室日常规范管理,以至临床的

正确送检和分析,从各个层面上建立相应的法规和制度,这是一个社会化的系统工程,是标记免疫分析的自身价值体现的基本保证。

世界各国对临床医学实验室都有不同程度的法规进行监管,美国国会于1967年通过第一个专门的对临床医学实验室管理的法律,即临床实验室改进法案(clinical laboratory improvement Act 1967, CLIA 67),由疾病控制中心(CDC)对跨州进行业务活动的实验室进行认证,随着保健经费管理局(HCFA)的成立,转由 HCFA 执行此法律,并将 CLIA 67 的监管范围扩大到接受 Medi—和 Medicaid 经费的实验室。在实行此法案 20 年的基础上,美国国会在 1988 年通过对 CLIA 67 的修正案(clinical laboratory improvement amendment 88, CLIA 88),并在 1992 年正式实行,从近年实际情况来看,确实加强了实验室的管理,明显提高了检测质量,减少了与临床实践的脱节,不管是医务界或是社会各阶层都表示满意。

CLIA 88 对三类不同种类的实验室进行分类认证,即豁免实验室、中度复杂和高度复杂实验室。对非豁免实验室 HCFA 先进行“发证登记”,并进行不定期的现场检查,达到相当 CLIA 甚至更为严格标准的实验室,将给予认可发证;认证有效期为两年,实验室改变所有者、主任、名称、地点需要一个月通知 HCFA,实验室改变方法学或增删检测项目需在 6 个月内通知 HCFA。

我国早在 20 世纪 60 年代末建立了临床化学的实验室内部评价方法和室间质量控制计划,现全国已发展成行之有效的监管系统。和西方国家一样,我国大部分放射免疫实验室(及后来发展起来的标记免疫实验室)大多是在核医学科和内分泌实验室基础上发展起来的,遍布全国各地的不同层次的实验室,在人员和基础条件上不平衡,在技术发展水平上不平衡,在地区经济水平上不平衡,造成一定程度上的对标记免疫实验室质量管理和监控的滞后,难以形成较明确的评价、监督的标准。我国尚无一个专门机构对放射免疫及其他标记免疫试剂的厂家与试剂盒的质量,以及对标记免疫实验室本身进行持续、全面的质量调研和监管。这一现实状况的主要原因是,没有严格的法律作为评价和执行的标准。随着社会需求发展和医疗制度的改革,这一领域里的立法工作将会得到各方面的重视,关系到千百万患者的切身利益和医疗质量的确切保证。

1.3.2 标记免疫分析的自身特点与质量控制的关系

对于标记免疫分析这一特异性强、灵敏度高的涉及多个技术领域的高度复杂的检测方法,影响因素也是多方面的。对于生产厂家出品的标记免

疫的试剂药盒,其抗原物质的提纯度,标准品的定值准确性,抗体的亲和力和滴度和特异性,标记物的比活性和免疫活性,以及相应选择的分离方法等都对测定结果产生直接的影响,可见标记免疫分析的影响因素是多方面的。

标记免疫分析所测定的靶物质许多都是 10^{-9} g(微微克)级以下水平,甚至 10^{-15} g级水平的极其微量的生物活性物质,体内、体外多方面因素的微弱影响,能够引起测定结果的较大波动。特别是从标本采集到实验室一系列的质量管理和操作规程上的疏忽,会造成实验室内部重复性和精密度的较明显的改变。根据美国 CLIA 88 能力检验的分析质量要求,可接受的 CV 值要求,对 mg 级水平的物质为 10% 左右,对 μ g 级水平的物质为 20%,对 ng 级水平物质可在 25%~30%。如对促甲状腺激素和三碘甲腺原氨酸的测定,其变异范围可在靶值 $\pm 3s$,这些,看起来似乎是比较宽松的接受范围,但 1976 年世界卫生组织做了一次为期 6 个月的实验性质量控制调查,研究了 100 多个生殖激素的实验室的质量,结果的离散程度令人吃惊,其他实验室也存在类似情况。因此如能严格执行上述标准,对实验室的监控无疑是非常有益的。

临床医师对标记免疫分析的理论依据和测定结果抱有信心,但不应代替对实验结果的正确分析。同时还要指出,标记免疫分析的极其微量的靶物质,在体内就存在许多生理变动因素,如生物周期的影响、精神情绪的影响、季节因素的影响、饮食变化和运动睡眠的影响等。如 20 世纪 60 年代末期 LH 的测定结果波动,使人们认识到 LH 的分泌是“脉冲式的”,并得到证实。不可否认的是还有许多未知因素,包括病理因素的影响,这些只会不断加深我们对疾病的发生、发展的病理生理和病理生化的认识。

1.3.3 质量评价中临床和实验室的关系

对可疑的检测结果在排除实验室误差前提下,需紧密结合临床情况,这是临床和实验室共同关注的问题。但由于实验室与临床之间存在知识和谅解方面的隔阂,加强两者之间的交流和紧密合作尤为当务之急。实验室与临床之间的差错来源(图 1-3)虽然没有根本解决,但已为许多医学专家所认识。

综上所述,实验室和临床医师在保证报告的质量和正确的临床应用上有共同的责任。加强交流、密切合作是解决问题困扰的钥匙。