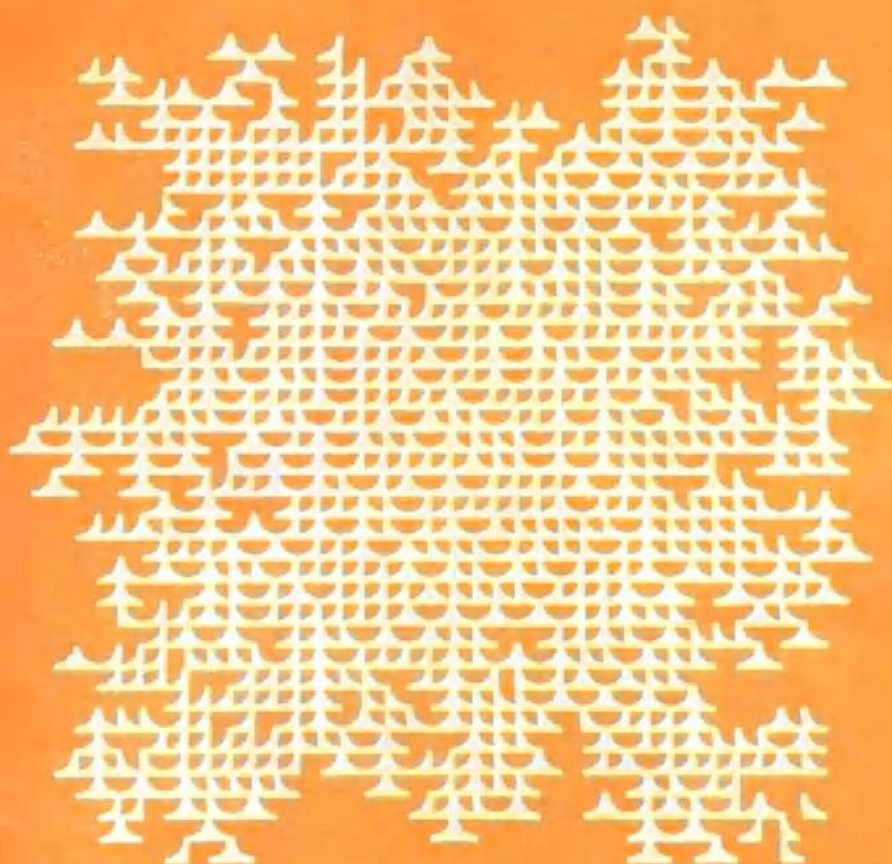


标记免疫学

尹伯元 王仁芝 等编著
李振甲 许以平



原子能出版社

标 记 免 疫 学

尹伯元 王仁芝 等编著
李振甲 许以平

原 子 能 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

标记免疫学 尹伯元等编著—北京:原子能出版社,1998.4

ISBN 7-5022-1766-5

I. 标… II. 尹… III. ①免疫测定 ②免疫诊断 IV. R392

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 21460 号

内 容 简 介

《标记免疫学》旨在较系统地介绍当前包括放射免疫分析及各种非放射性免疫分析在内的各种标记免疫分析的发展现状、理论基础及方法学和在生物医学研究及临床中的实际应用。全书分上下两篇共六章。上篇三章主要为理论部分,包括:对标记免疫学总体概括的绪论;标记免疫学基础论述即目前主要标记免疫分析的理论和方法学及标记免疫分析的质量控制。下篇三章主要为实际应用部分,包括:标记免疫分析在分子生物学和医学及临床上的应用;标记免疫分析的临床应用范例及标记免疫分析在中医药研究中的应用。全书内容丰富,理论联系实际,方法具体,注意介绍前沿进展。

本书可供临床医生、医学生物学研究人员、从事免疫分析的科技人员及医学大专院校的师生使用及参考。

©原子能出版社,1998

原子能出版社出版 发行

责任编辑:李 镁

社址:北京市海淀区阜成路 13 号 邮政编码:100037

北京地质印刷厂印刷 新华书店经销

开本:787×1092mm 1/16 印张 21.68 字数 510 千字

1998 年 4 月北京第 1 版 1998 年 4 月北京第 1 次印刷

印数:1—2200

定价:44.80 元

《 标 记 免 疫 学 》

主 编 尹伯元 王仁芝 李振甲 许以平
编著者 (按姓氏笔划为序)

王仁芝	王全立	尹伯元	田 文
刘之武	刘志民	许元初	许以平
许金廉	孙龙安	李 卫	李振甲
李培成	步恒富	沈 南	陈泮藻
陈顺乐	邵 莉	金志军	周玉坤
房静远	宫 斌	莫启忠	顾明君
缪金明	颜光涛	裴 军	

前 言

放射免疫分析为生物医学分析开创了一个新领域。随着放射免疫分析的开展,各和非同位素免疫分析(non-isotopic immunoassay)相继问世并迅速发展。根据所用标记物质和/或方法(labeling material and/or methods)的不同,已有酶免疫分析及其衍生的免疫分析,不同类型的荧光免疫分析,不同类型的发光免疫分析,胶体免疫分析及其他种类等等。由于不使用放射性物质及在灵敏度、快速检测及自动化等方面的综合优势及潜力,后者日益显示出超越放射免疫分析的优越性。包括放射免疫分析在内,这些类别的免疫分析可统称为标记免疫分析(labeled immunoassays)。标记免疫分析已广泛深入应用于生物医学的各个领域中,并随着生物医学向分子水平发展而应用于分子生物学和医学中。标记免疫分析正日新月异地向前发展,我国亟需赶上当前发展的趋势。

为适应上述形势和需要中国同位素公司决定并组织有关专家撰写了《标记免疫学》。本书分上下两篇,各三章。上篇为“标记免疫学基础”。第一章“绪论”对标记免疫学作总体的概括。第二章“标记免疫学基础”对目前主要的标记免疫分析进行理论及方法学的论述。第三章“标记免疫分析质量控制”则全面讨论保证和控制标记免疫分析质量的各种方法和指标。下篇为“标记免疫分析在分子生物学和医学及临床上的应用”。第四章“标记免疫分析在分子生物学方面的应用”重点介绍人体各系统及有关疾病的分子生物学基础和标记免疫分析的应用。第五章“标记免疫分析的临床应用范例”具体介绍标记免疫分析在临床医学各方面的重要应用。第六章“标记免疫分析在中医药研究中的应用”结合我国传统医学介绍标记免疫分析在中医药研究中的应用。

本书既注意理论联系实际,上篇的理论及方法学与下篇的实际应用密切联系;又注意当前生物学及医学向分子水平的发展方向,在第四章中重点介绍有关疾病的分子生物学基础;在第六章中还考虑到标记免疫分析在祖国医学研究中的应用。本书的内容丰富,涉及面广泛,信息量较大,兼顾深度及广度和理论与实际的结合。编著者希望能为临床医生、医学生物学研究人员,从事免疫分析的科技人员及医学院校的老师和学生提供一部兼有实用及理论价值的书籍。

由于本书内容涉及面广泛,国内工作开展也不够全面,实践经验有所不足,因此难免有疏漏、欠妥甚至是错误之处,非常欢迎读者提出宝贵意见以便修改更正。

编著者

1997年12月

目 录

上篇 标记免疫学基础

第一章 绪 论	(1)
第一节 标记免疫学的发展	(1)
一、标记免疫学的基本概念	(1)
二、标记免疫分析的进展	(3)
第二节 标记免疫学和生物学	(9)
一、标记免疫学与细胞代谢调节和细胞信号系统的关系	(9)
二、标记免疫分析与细胞化学信号的测定	(12)
第三节 标记免疫学和医学	(14)
一、标记免疫分析临床评价准则	(14)
二、标记免疫分析的临床应用	(17)
参考文献	(19)
第二章 标记免疫学基础	(20)
第一节 放射免疫分析基础	(20)
一、放射免疫分析的理论基础	(20)
二、放射免疫分析方法学指标	(23)
三、放射免疫分析和非竞争性放射免疫分析的数据处理	(25)
四、放射免疫分析法的质量控制	(29)
参考文献	(29)
第二节 酶免疫分析基础	(30)
一、酶免疫分析的原理和设计	(30)
二、抗体和固相抗体	(34)
三、酶	(37)
四、酶结合物	(41)
五、定量酶免疫分析的应用实例	(50)
六、酶免疫分析的放大技术和衍生发展技术	(55)
参考文献	(55)
第三节 时间分辨荧光免疫分析基础	(67)
一、概述	(67)
二、基本原理	(67)
三、镧系离子标记化合物的制备	(71)
四、时间分辨荧光免疫分析方法模式	(76)
五、时间分辨荧光免疫分析技术研究进展	(78)
六、时间分辨荧光免疫分析方法建立中有关问题探讨	(82)
参考文献	(85)
第四节 受体学基础	(86)

一、概述	(86)
二、受体鉴定的标准	(87)
三、受体的基本研究方法	(89)
四、受体结合反应的定量处理	(93)
五、受体的调节	(97)
六、受体与疾病	(100)
参考文献	(103)
第五节 基因检测基础	(104)
一、基因检测的意义	(104)
二、基因检测的基础和内容	(104)
三、基因检测的种类和方法	(105)
四、核酸探针与分子杂交	(105)
五、核酸的体外扩增技术	(107)
六、聚合酶链反应技术的发展	(108)
参考文献	(119)
第三章 标记免疫分析质量控制	(120)
第一节 标记免疫分析中方法学质量控制指标	(121)
第二节 标准曲线质量控制参数	(124)
一、标记免疫分析标准数据拟合曲线	(124)
二、典型的标准曲线应符合的条件	(125)
三、标准曲线的质控参数	(126)
第三节 精密度图的绘制和用途	(127)
一、绘制精密度图主要程序	(127)
二、精密度图的用途	(128)
第四节 标记免疫分析外质量评价	(129)
一、质控血清的制备	(129)
二、质控血清靶值的计算和评价	(129)
三、质控血清质量控制图的绘制和评价	(130)
四、质控血清测定结果误差分析	(130)
第五节 定性标记免疫分析质量控制	(131)
一、标记免疫定性分析结果表示	(131)
二、定性标记免疫分析的质量控制	(132)
第六节 双位点标记免疫分析质量控制	(134)
第七节 影响质量控制的因素和采取的措施	(135)
第八节 标记免疫分析质控中数据统计和微机数据处理	(138)
参考文献	(144)

下篇 标记免疫分析分子生物学及临床应用

第四章 标记免疫分析在分子生物学方面的应用	(147)
第一节 神经细胞分子生物学	(147)
一、发病机理的分子生物学分析	(147)
二、分子神经生物学在诊断和治疗中的应用	(149)
参考文献	(150)

第二节 内分泌细胞分子生物学	(150)
一、激素受体的分子生物学分析	(150)
二、信号转导的分子生物学分析及进展	(152)
三、内分泌疾病发病机理的分子生物学分析	(154)
参考文献	(156)
第三节 胰岛细胞分子生物学分析	(157)
一、胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)易感基因	(157)
二、非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)易感基因	(158)
参考文献	(161)
第四节 心血管系统的分子生物学	(166)
一、发病机理的分子生物学分析	(166)
二、分子生物学在诊断和治疗中的应用	(170)
参考文献	(173)
第五节 肿瘤细胞分子生物学分析	(173)
一、发病机理的分子生物学分析	(173)
二、分子生物学在诊断和治疗中的应用	(178)
参考文献	(180)
第六节 消化系统疾病的分子生物学	(181)
一、消化性溃疡	(181)
二、肝硬化	(182)
三、病毒性肝炎	(184)
四、消化系癌肿	(186)
参考文献	(193)
第七节 造血细胞及血液分子生物学	(194)
一、遗传性血红蛋白异常	(194)
二、白血病	(200)
三、遗传性凝血因子缺乏症	(203)
参考文献	(205)
第八节 呼吸系统疾病的分子生物学	(206)
一、肺囊性纤维病变	(206)
二、支气管哮喘	(207)
三、 α_1 -抗胰蛋白酶缺乏引起肺气肿	(209)
参考文献	(210)
第九节 肾脏细胞分子生物学	(210)
一、病因学方面的应用	(210)
二、发病机理方面的应用	(211)
三、肾脏疾病的遗传学研究应用	(211)
参考文献	(213)
第十节 生殖系统细胞分子生物学	(214)
一、产前诊断	(214)
二、妇科肿瘤研究	(216)
三、精子介导基因转移研究	(218)
四、基因治疗在妇科肿瘤领域中的应用展望	(219)

参考文献	(220)
第十一节 免疫系统分子生物学	(220)
一、免疫球蛋白基因结构、重排、表达和有关疾病	(220)
二、T 淋巴细胞受体的基因结构、重排、表达和有关疾病	(223)
三、MHC 相连锁疾病的分子生物学分析	(224)
四、免疫缺陷的分子生物学分析	(226)
参考文献	(229)
第十二节 风湿性疾病的细胞分子生物学	(229)
一、发病机理的分子生物学分析	(229)
二、分子生物学在风湿性疾病诊治中的应用	(231)
参考文献	(232)
第五章 标记免疫分析临床应用范例	(233)
第一节 内分泌系统应用范例	(233)
一、下丘脑和垂体激素	(233)
二、甲状腺	(236)
三、甲状旁腺	(245)
四、肾上腺	(245)
参考文献	(246)
第二节 代谢性疾病中应用范例	(247)
一、胰岛素	(247)
二、C 肽	(250)
三、胰高血糖素	(252)
四、胰岛素抗体	(253)
参考文献	(254)
第三节 肿瘤疾病中应用范例	(254)
一、甲胎蛋白(AFP)	(255)
二、癌胚抗原(CEA)	(257)
三、糖类抗原 CA50	(259)
四、糖类抗原 CA19-9	(260)
五、糖类抗原 CA125	(260)
六、CYFRA21-1	(262)
七、前列腺酸性磷酸酶(PAP)和前列腺特异抗原(PSA)	(262)
八、其它糖类抗原	(263)
九、 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)	(263)
十、血清铁蛋白(SF)	(264)
参考文献	(265)
第四节 心血管系统的应用范例	(265)
一、内皮素	(266)
二、心肌梗塞	(270)
三、血浆 D-二聚体检测及其临床应用	(272)
四、血栓素和前列环素	(273)
五、内洋地黄素	(275)
六、心钠素	(277)

参考文献	(279)
第五节 消化系统的应用范例	(280)
一、胃肠胰激素和 APUD 概念	(280)
二、胃肠道类癌	(281)
三、胃泌素	(281)
四、甲胎蛋白在肝癌临床的应用	(283)
五、异常凝血酶原	(283)
六、对肝硬化进行检测的血清学指标及其意义	(284)
七、胃动素	(287)
八、表皮生长因子	(290)
九、甘胆酸和胆汁酸	(292)
十、磷脂酶 A ₂ (PLA ₂)	(293)
参考文献	(293)
第六节 传染病的应用范例	(295)
一、概述	(295)
二、病毒性肝炎	(295)
三、结核菌的免疫学诊断	(304)
参考文献	(307)
第七节 生殖系统应用范例	(307)
一、促性腺激素	(307)
二、雌二醇	(310)
三、雌三醇	(311)
四、孕酮	(312)
五、睾酮	(312)
六、促绒毛膜性腺激素	(313)
七、人胎盘催乳素	(314)
参考文献	(316)
第六章 标记免疫分析在中医药研究中的应用	(317)
第一节 中医、中药基础理论研究中的应用	(317)
一、中医关于衰老的“肾精虚衰”学说及补肾益精中药延缓衰老的机理研究	(317)
二、补肾益精中药延缓脑组织衰老的机理研究	(319)
第二节 生殖系统疾病研究中的应用	(320)
一、中药治疗子宫肌瘤的临床和实验研究	(321)
二、异位安治疗子宫内膜异位的实验研究	(322)
第三节 心脑血管疾病研究中的应用	(322)
一、调理心肾中药治疗老年性痴呆的临床和实验研究	(323)
二、固本降脂丸治疗高脂血症的临床和实验研究	(323)
第四节 内分泌疾病研究中的应用	(324)
一、二仙汤治疗更年期综合征的实验研究	(324)
二、针刺结合抗甲状腺药物治疗 Grave 氏病的应用	(325)
第五节 中药治疗肿瘤疾病中的应用	(326)
一、乳宁冲剂治疗乳腺小叶增生和乳腺癌的临床和实验研究	(326)
二、益肺抗癌饮治疗肺癌的临床和实验研究	(326)

第六节 中药治疗呼吸系统疾病研究中的应用	(327)
一、入静诱发循经感传治疗儿童哮喘的临床和实验研究	(327)
二、中药敷贴疗法治疗小儿哮喘的临床和实验研究	(328)
三、仙灵、地黄液治疗老慢支的临床和实验研究	(328)
第七节 中药药理研究中的应用	(328)
一、复方补骨脂冲剂的药理作用研究	(329)
二、慢炎乐药理作用的研究	(329)
第八节 中医中药研究进展及思路	(329)
一、中医中药对机体的整体调节作用及与神经-内分泌-免疫网络学说的相似性	(330)
二、针刺足三里穴位对神经-内分泌及免疫系统的影响	(331)
三、中医中药研究进展及思路	(331)
参考文献	(332)

第一章 绪 论

第一节 标记免疫学的发展

自然科学的发展与进步实质上是方法学的进步。新技术和新方法的建立是自然科学发展的阶梯。当前,科学发展的前沿是各学科相互渗透所产生的新技术和新方法。标记免疫分析就是生物医学领域中所建立的新技术和新方法之一。尤其是在医学和生物学的实验研究中,更是广泛地应用了标记免疫学技术来测定内分泌激素、生长因子、蛋白质、多肽、核酸、神经递质、受体、细胞因子、细胞表面标志物、肿瘤特异性抗原、体内药物浓度及传染源等各种微量生物活性物质,从而提高了诊断和研究水平,促进了生物医学的发展。

一、标记免疫学的基本概念

标记免疫学是将多种标记技术与免疫学技术相结合而建立起来的技术系列,是一门不断发展的综合学科。标记免疫学的发展是与标记技术、单克隆抗体技术和分子生物学的发展紧密联系的。目前将这类新方法统称为标记免疫分析技术。将标记免疫分析技术引进临床医学中,使各种疾病的实验室诊断提高到了一个新水平。将临床诊断从宏观到微观,即从组织器官水平到细胞水平和分子水平;从疾病的临床表现和一般实验室诊断的变化深入到基因结构及功能、乃至基因调控的变化^[1]。使人们从生命的本质,包括基因的水平认识各种疾病的发生、发展及临床表现。从而大大深化了对各种疾病的认识 and 了解。

常用的放射性标记核素是 ^{125}I , ^{57}Co (γ 射线), ^3H (β 射线)。建立的方法有放射免疫分析(RIA)、免疫放射量度分析(immunoradiometric assay, IRMA)、受体放射性配体结合分析(receptor radio-ligand binding assay, RRLBA)及放射受体分析(RRA)等。这类方法的特点是以放射性核素标记抗原(如 RIA), 抗体(如 IRMA), 配基(如 RRLBA)或受体(如 RRA), 在体外条件下, 经过不同的结合反应(竞争或非竞争性的), 再将结合和未结合的标记物分开, 用 γ 计数器或液体闪烁计数器测量其放射性活度, 从而计算各种生物活性物质的含量。

1. 按标记技术分类^[1,2]

(1) 酶标记 用酶标记各种特异性配基(抗体、抗原等), 利用酶的催化放大作用和特异性作用而建立的标记免疫分析统称为酶免疫分析(enzyme immunoassay, EIA)。又根据其反应形式(均相或非均相)的不同分为酶检测免疫分析技术(enzyme measurement immune technic, EMIT)和酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。传统的(conventional)的酶免疫分析使用生色底物(chromogen)测量可见光的吸收光度。随着酶免疫分析技术的发展, 又采用了灵敏度更高的荧光底物和化学发光底物, 而改用测量荧光和化学发光, 成为酶免疫分析技术的衍生放大技术, 即荧光酶免疫分析及化学发光酶免疫分析技术^[1]。

(2) 荧光标记 荧光标记免疫分析可对荧光强度、能量转换或者偏振光进行测量。这类方

法有粒子浓度荧光免疫分析(particle concentration fluorescence immunoassay, PCFIA)、时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TrFIA)、荧光免疫分析(FIA)、荧光偏振免疫分析(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)、标记底物荧光免疫分析(substrate-labeled fluoroimmunoassay, SLFIA)、荧光增强免疫分析、间接猝灭免疫分析、荧光激发转换免疫分析(fluorescence excitation transfer immunoassay, FETIA)和荧光保护免疫分析(fluorescence protect immunoassay, FPIA)等。它们都是以荧光为信号,通过对荧光测量检测生物活性物质的含量^[3-7]。

(3)其它标记免疫分析 包括化学发光免疫分析、化学发光酶免疫分析、增强化学发光酶免疫分析、生物发光免疫分析及电化学发光免疫分析等。以上各种分析方法所用标记物及技术本身虽各有不同,但基本点都是通过测量能量转换过程中所发出的光子信号而实现的。其优点为发光速度很快,灵敏度很高,可以超过放射免疫分析,是目前发展很快的标记免疫分析技术。另外,胶体免疫分析(Sol-immunoassay)也是目前发展起来的一种快速简便的免疫分析^[4-7]。

2. 按反应系统的物理状态分类^[3]

按反应系统的物理状态分类,标记免疫分析可分为均相标记免疫分析和非均相标记免疫分析。

(1)均相标记免疫分析 均相标记免疫分析是利用酶的构象变化,酶的抑制作用、标记基质的荧光以及荧光的能量转换、保护或偏振等原理建立的技术。其最大的特点是结合的和未结合的抗原不需要用物理分离过程,使标记免疫技术全自动化测量成为可能。例如美国 Syva 公司的 EMIT 和 Abbott 实验室的 TD_x系统就是全自动化的均相标记免疫分析系统。

均相标记免疫分析主要有两大类,一是酶免疫分析中的 EMIT;二是荧光免疫分析中的 FPLA、SLFIA、FETIA、FPIA 以及荧光增强免疫分析和间接猝灭荧光免疫分析等技术。多数均相标记免疫分析只能测定小分子的物质。结合的和未结合的抗原之间的差异确定了荧光或者分光光度变化的局限性,也限制了该方法的使用范围^[8]。

(2)非均相标记免疫分析 非均相标记免疫分析需要一个将结合与未结合游离标记物的分离步骤。尽管分离步骤费时耗力,但可在定量分析之前降低非特异结合和本底信号,从而提高信噪比,提高了分析的灵敏度。

非均相免疫分析可分为三类:一是用放射性核素标记技术建立的 RIA,IRMA 等方法;二是用酶标记技术建立的 ELISA 等方法;三是用荧光标记技术建立的 PCFIA,TrFIA 等方法。非均相标记免疫分析用途很广,小分子和大分子物质都可以测量。与均相标记免疫分析只能测定小分子物质比较,应用更加广泛^[8]。

3. 标记免疫分析的基本原理^[8]

标记免疫分析包括用放射性核素、酶及荧光标记技术所建立的各种方法,各种方法的基本原理大体相同。现仅就我国常用的 RIA,IRMA,EMIT 等方法的基本原理介绍如下。

(1)放射免疫分析(RIA) RIA 属竞争免疫分析方法,其原理是:非标记抗原与放射性标记抗原同时竞争结合物(如抗体)上有限的结合位点。然后将结合和未结合的游离抗原分离,用液体闪烁仪或 γ 计数仪测定其放射性分布,利用标准曲线确定样本中待测物的含量。为了阐明 RIA 的特征,Ekins 及 Canvpfield 等都建了 RIA 的数学模型,并提出了下列 RIA 数学模式假设:

1)抗原是纯一的,只由一种化学成分组成;

- 2) 抗体也仅由一种化学成分组成;
- 3) 抗原和抗体都是单价的, 即一个分子的抗原只能和一个分子的抗体反应;
- 4) 标记的和未标记的抗原具有相同的物理-化学性质;
- 5) 抗原-抗体反应遵循质量作用定律, 假设不存在立体异构现象和协同效应;
- 6) 反应达到平衡;
- 7) 结合的抗原和未结合的游离抗原能完全分开, 并且不破坏反应平衡;
- 8) 可以准确测量结合抗原和游离抗原之比, 或结合抗原和总抗原之比。

因此, RIA 反应就可以推导出:



式(1.2)中 k_1 为结合速度常数, k_{-1} 为解离速度常数。反应平衡时,

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = (\text{AgAb}) / [\text{Ag}][\text{Ab}] \quad (1.3)$$

式(1.3)中 K 为亲和常数, 推导出:

$$b/f = (\text{AgAb}) / (\text{Ag}) = K(\text{Ab}) \quad (1.4)$$

$$b/f = K(\text{Ab}_T - B) \quad (1.5)$$

式(1.4)中 b/f 为结合抗原与游离抗原的比率; 而式(1.5)中 $\text{Ab}_T = \text{Ab} + \text{AgAb}$, 即为抗体的总浓度, $\text{Ag}_T = \text{Ag} + \text{AgAb}$, 为抗原的总浓度, B 为结合的抗原浓度。从式(1.5)中导出: b/f 与结合抗原 B 的浓度之间存在着线性关系。以图表示就是众所周知的 Scatchard 图^[1-3]。

在 RIA 实际操作中, 不同实验室对同一厂商提供的产品会得到不同的测定结果, 除了因实验条件不同, 操作人员技术差异所致外, 对商品技术参数意义不了解是造成实验偏差的最大原因之一。现以 RIA Scatchard 图为例加以说明。从图 1.1 中可以确定两个有用的参数: ①从直线的斜率确定亲和常数 K ; ②根据 x 轴截距确定抗体结合位点的浓度 (Ab_T)。

K 和 Ab_T 改变对 Scatchard 图性质的影响: ①从图 1.1a 中可看到, 增加抗体的浓度, 使曲线右移, 斜率不变。但是, 明显影响到测量范围。②从图 1.1b 中看到, 如果亲和常数增大, 曲线将以 x 轴的截距为支点, 从左向右旋转, 斜率变陡。明显影响到测量的灵敏度, 使灵敏度增加。③如果亲和常数增大, 而抗体浓度按比例下降, 曲线以 y 轴截距为支点, 从右向左旋转, 且逐渐变陡 (见图 1.1c) 使测量范围变小, 而灵敏度增加。

(2) 免疫放射量度分析 免疫放射量度分析 (IRMA) 是以过量的标记结合物, 如标记抗体

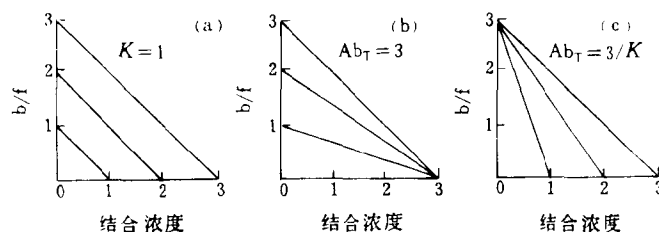


图 1.1 Scatchard 图(条件改变时的变化)

与抗原结合建立的方法。以附着在一个固定的支持物上的固相抗体和抗原及标记抗体形成一个“夹心”的结合复合物。这就是双位点 IRMA。其原理可以图 1.2 表示之^[3~9]。

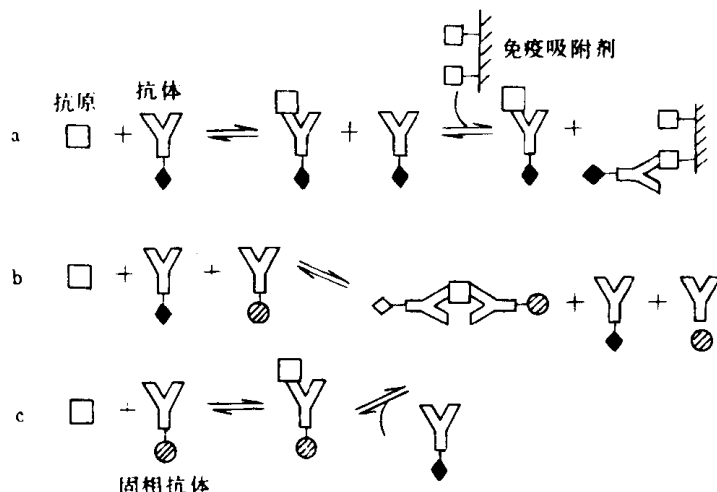


图 1.2 免疫放射量度分析原理示意图

随着单克隆抗体制备技术的发展,大规模生产抗体成为可能,促进 IRMA 的迅速发展。但是,因大剂量抗原存在能引起“大剂量钩变”效应,使 IRMA 反应方式不再是线性的,对浓度变化范围很大的待测物,例如患肝细胞癌病人血清中的肿瘤标志物甲胎蛋白(α -feto-protein, α FP),会带来麻烦。因该方法具有高灵敏度和温育时间短的特点,用于测定至少有两个不同抗体结合位点的多肽类抗原非常理想,而不适用于小分子的药物测定,三碘甲状腺原氨酸(T_3),甲状腺素(T_4)等。

(3)酶放大免疫分析 酶放大免疫分析(EMIT)是由 Syva 开发的均相酶免疫分析。酶标记物在免疫反应中起主要作用。样本的测量是通过酶的抑制作用、活化作用或构象的变化实现的。EMIT 的分析可用一个简单的分光光度计或一个自动化的化学分析仪完成。由于样本量小,试剂用量少,分析可以全自动化,所以被许多医院所接受,用于进行治疗药物的监测分析。其原理可用图 1.3 表示。

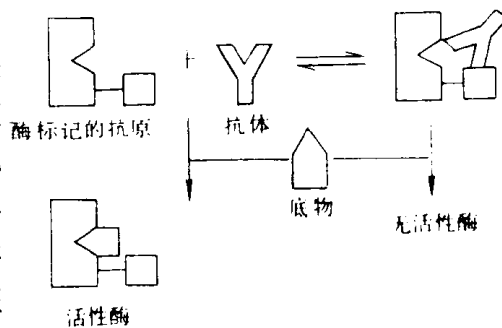
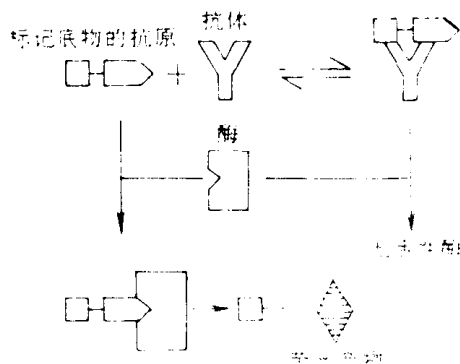


图 1.3 酶放大免疫分析原理图

(4)荧光免疫分析^[10] 荧光免疫分析方法很多。现仅以 SLFIA 和 FPIA 为例介绍荧光免疫分析的原理。

1)标记底物的荧光免疫分析(SLFIA) SLFIA 的原理是依据在抗原和荧光探针之间存在可水解的化学键。最普通释放型猝灭键是微形酮衍生物中的酯键和糖苷键。这类复合物形式中的探针没有荧光,但可通过酶的作用转化成荧光产物。其原理可由图 1.4 表示。



2)荧光偏振免疫分析(FPIA) 荧光偏振免疫分析(FPIA)是用偏振光激发荧光分子,由于荧光物质与抗体结合后旋转速度减慢,使产生的发射光与原荧光标记

图 1.4 标记底物的荧光免疫分析原理图

物有明显差异。利用荧光偏振信号的改变进行样本测量。美国 Abbott 实验室开发的自动 TDx 体系就是利用荧光偏振原理。该方法的主要优点是快速,且标准曲线至少在 4 周内仍然是稳定的。

4. 标记免疫分析的试剂组成^[8,9]

标记免疫分析包括了以放射性核素、酶和荧光标记的一系列新方法和新技术,方法虽然各异,但是组成标记免疫分析的主要试剂基本由以下三大类组成。

(1) 抗原 抗原可分为完全抗原和半抗原。

1) 完全抗原 完全抗原是一种注入动物体内能诱导抗体形成,并能与所形成的抗体结合生成抗原-抗体复合物的物质。它们大多为大分子量的蛋白质。

2) 半抗原 半抗原是一种单独注入动物体内不能诱导抗体形成,而与相应载体结合后注入动物体内能诱导抗体形成的物质。半抗原能与所形成的抗体生成抗原-抗体复合物。半抗原分子量小,如类固醇、T₁及药物等。

(2) 抗体或结合物 在标记免疫分析中的结合剂是抗体和结合物。

1) 抗体 抗体是由抗原诱导形成的一种血清球蛋白。在人类,根据结构可分为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。在哺乳动物中通常只有 IgG、IgM 和 IgA 三类。可用免疫动物制备多克隆抗体,用杂交瘤技术制备单克隆抗体,以及用基因工程生产抗体的某一片段。

2) 结合物 标记免疫分析的结合剂除抗体外,还有结合蛋白、受体等结合物。它们是与球蛋白不同的一类有结合能力的蛋白质。

在标记免疫分析中对抗体和结合物有共同的要求,即抗体和结合物要有高度的特异性;有较高的亲和力;能与抗原或分析物结合,又能与他们分离,分离后性质不变。

(3) 标记物 在标记免疫分析中,标记物可以是抗原(分析物),也可以是抗体(结合剂)所用的标记物通常有三类。①放射性核素标记物。常用的放射性核素标记物是发射 γ 射线的 ^{125}I 、 ^{57}Co ;发射 β 射线的 ^3H 和 ^{14}C 。 γ 射线用 γ 计数仪测量; β 射线由液体闪烁仪测量。②酶标记物。常用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶或溶菌酶等进行酶标记。利用酶的活性,酶的抑制和放大作用,采用分光光度计或偏振光、荧光等信号测定。③荧光标记物。荧光标记物主要是用通过荧光强度、能量转换或偏振光测量。

5. 标记免疫分析的分离技术^[3,8]

(1) 均相标记免疫分析 在均相标记免疫分析中不需要用物理分离方法将结合的及游离的成分分开。为检查抗原-抗体结合前后发生的变化,可利用酶的构象变化、酶的抑制作用,标记物的荧光,荧光的能量转换、保护或偏振作用来测量。

(2) 非均相标记免疫分析 非均相标记免疫分析将结合的及游离抗原分开的方法是依据游离抗原和抗原-抗体复合物的各种性质决定的。例如:它们的化学性质,包括电荷、大小、溶解度等;它们的免疫学性质,抗原决定簇;以及物理性质,固体物的吸附性等。常用的分离方法有以下几种:①双抗体法。从不同动物中得到两种抗体,用第二种抗体沉淀第一种抗体-抗原结合物,将结合抗原与游离抗原用离心方法分离。该方法第二抗体用量较大,但特异性高。②包被试管或板法。用第一种抗体包被试管或板,加入抗原后,结合的留在试管壁或板上,未结合的被倒掉。也有用一种抗体包被试管或板,加入抗原后,再加入标记的第二种抗体使抗原和两种抗

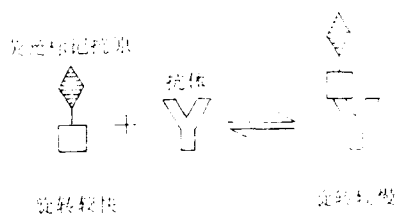


图 1.5 荧光偏振免疫分析原理图

体形成“三明治”，进行分离。③颗粒固相分离法。将抗体与纤维素，如 Sephadex，或聚苯乙烯偶联。与偶联抗体结合的抗原经离心分离。也可以将第二抗体偶联在纤维素或聚苯乙烯上，当第一抗体与抗原结合后，加入第二抗体，使抗原-第一抗体-第二抗体复合物沉淀，离心分离。测沉淀为结合抗原。④吸附法。利用活性炭的吸附作用吸附游离抗原，使结合的抗原留在液体中，离心分离，测上清液为结合抗原。⑤溶剂或盐析法。加溶剂或盐，如乙醇、硫酸铵或聚乙二醇等使蛋白质沉淀，抗原抗体复合物离心沉淀下来，测结合抗原。

6. 标记免疫分析的影响因素

标记免疫分析的基本反应是抗原-抗体在适当的条件下形成抗原-抗体复合物。由于抗体、受体及部分抗原是蛋白质，因此，凡是对蛋白质能产生影响的因素都能影响标记免疫分析的反应系统，使测量灵敏度降低，或失败。现就几个重要影响因素加以说明。

(1) 温度 温度升高一般可加快抗原抗体的反应速率。但温度升高可使抗体的亲和常数降低。亲和常数降低使测量灵敏度降低。一般蛋白质都对温度十分敏感。例如：温度从 37℃ 降到室温，就使甲状腺素结合球蛋白的亲和常数增加 3 倍。温度对放射性配基，尤其是多肽激素也会造成损伤。因此，在标记免疫分析中必需严格控制温育温度。

(2) 温育时间 在标记免疫分析中，抗原-抗体经温育达到平衡要有一定的时间。提高温度可以缩短温育时间，但会造成亲和常数降低而影响灵敏度。增加抗原和抗体的浓度也可以缩短温育时间，其结果也是降低了灵敏度。对于一些易于降解的标记抗原，缩短温育时间又特别重要。根据不同方法，选择最佳的温育时间和温度，以保证实验的顺利进行。

(3) 温育 pH 抗原与抗体的结合虽然有各种假设，例如：互补假设、静电吸引假设、疏水键假设及钥匙与锁孔假设等。但是，抗原与抗体之间电荷的分布对其结合力的影响是不容置疑的。因此，反应系统 pH 对抗原-抗体的最佳结合特别重要，例如：pH 8.0 对血清中皮质醇和皮质醇结合蛋白的反应是最佳条件。而环一磷酸腺苷(cAMP)和环一磷酸鸟苷(cGMP)与抗体结合的最佳条件是 pH4.75。如果将两者缓冲液的 pH 改变，分析方法必然失败。

二、标记免疫分析的进展

标记免疫分析的进展依赖标记技术和抗体制备技术的进步和发展。化学发光标记方法的建立；利用杂交瘤技术、蛋白质工程和基因工程生产的单克隆抗体和抗体片段，将标记免疫分析向前推进了一大步。

1. 发光免疫分析研究进展^[1,2,5,11]

自 1976 年 Schroeder 用化学发光法标记建立了竞争性蛋白结合法测定生物素后，次年他和 Halman 分别用化学发光免疫分析测定了 T_4 和快速定量分析了微生物等工作。以后 Whitehead (1979) 对这类方法进行了综合分类，为化学发光免疫分析的发展奠定了基础。近年来，由于氨基酸胍类及其衍生物对抗原或抗体的标记，吡啶酯类等发光剂的使用，某些酶技术和固相免疫技术的发展，推动了化学发光免疫分析的进展，相继建立了生物发光或化学发光免疫分析法(luminescence immunoassay, LIA)、免疫发光分析法(immunoluminescence assay, ILA)及发光酶免疫分析法(luminescence enzyme immunoassay, LEIA)，为发光免疫分析技术的应用开辟了广泛的应用前景。

(1) 发光免疫分析的类型^[11] 可按标记物的不同，将发光免疫分析技术分为以下三大类：