



临床免疫学检测技术及应用 Technique & application of Clinical Immunology 总论

1

讲课教师 曹文俊

<http://www.shsmu.edu.cn/>



1

经典免疫学技术

2

标记免疫技术



上海交通大学医学院



第一节 经典免疫学技术



上海交通大学医学院



Antigen and Antibody reaction

❖ 指抗原与相应抗体之间所发生的特异性结合反应。



❖ 物质基础:

抗原表位与抗体高变区间的互补结合

抗原表位与抗体高变区的沟槽分子表面的结合

抗原抗体之间的结合

亲水胶体转化为疏水胶体



上海交通大学医学院



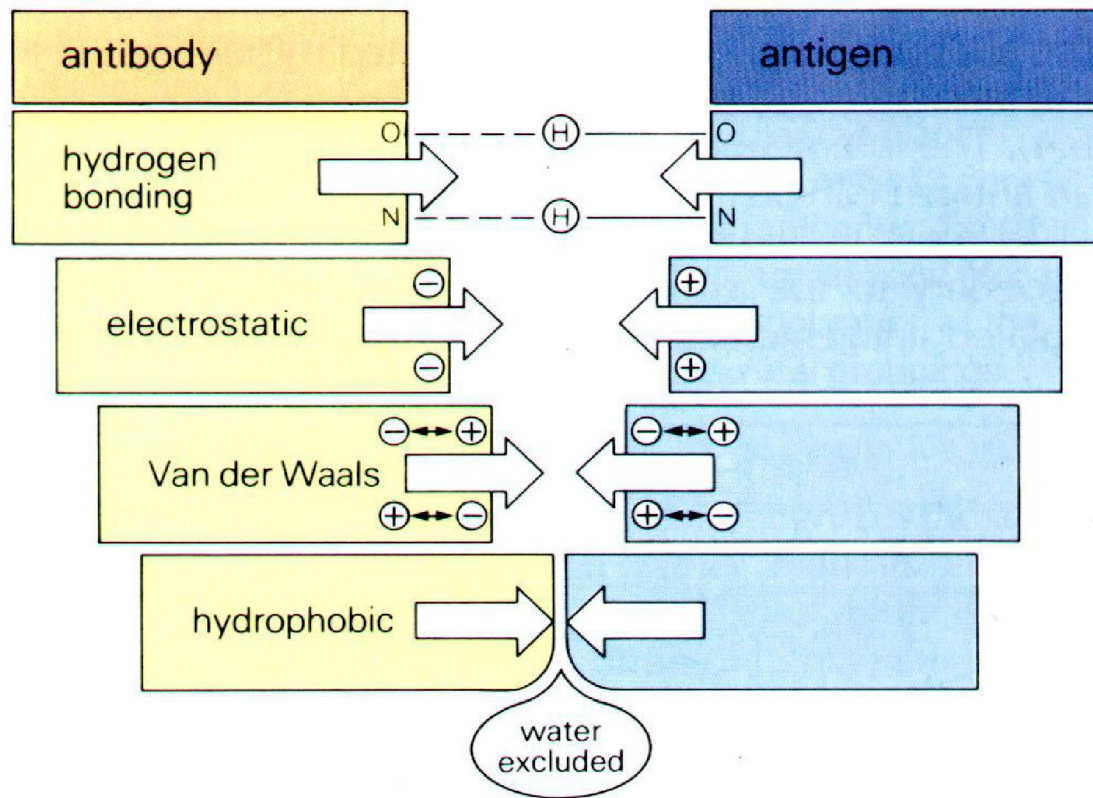
体内 (In vivo) :不同免疫应答的效应作用
(吞噬、融菌、杀毒、中和毒素等)

体外 (In vitro) : 多样性 (凝集反应、沉淀反应、中和反应、补体参与的反应等)



上海交通大学医学院

抗原抗体结合力





In vitro (classical~)

- ❖ Precipitation Reaction
(沉淀反应)
- ❖ Agglutination Reaction
(凝集反应)
- ❖ Antigen and Antibody Reaction Involved by Complement
(补体介导的抗原抗体反应)
- ❖ Et al



上海交通大学医学院



凝集反应

Agglutination Reaction

- ❖ 细菌和红细胞等**颗粒性抗原**与相应抗体结合后，可出现肉眼可见的凝集现象。
- ❖ 凝集试验是一个**定性**的检测方法，根据凝集出现与否判定结果阳性或阴性(也可以**半定量**检测)。



上海交通大学医学院



凝集反应的载体

❖ 红细胞载体

红细胞 → 醛化 → 鞣酸处理

❖ 聚苯乙烯胶乳载体

物理方法：不牢、易解离

化学缩合：稳定、保存时间长



上海交通大学医学院



❖ 例:

人类ABO血型检测(玻片)

肥达(Widal)反应

类风湿因子测定(乳胶)

抗红细胞不完全抗体试验(Coombs test)



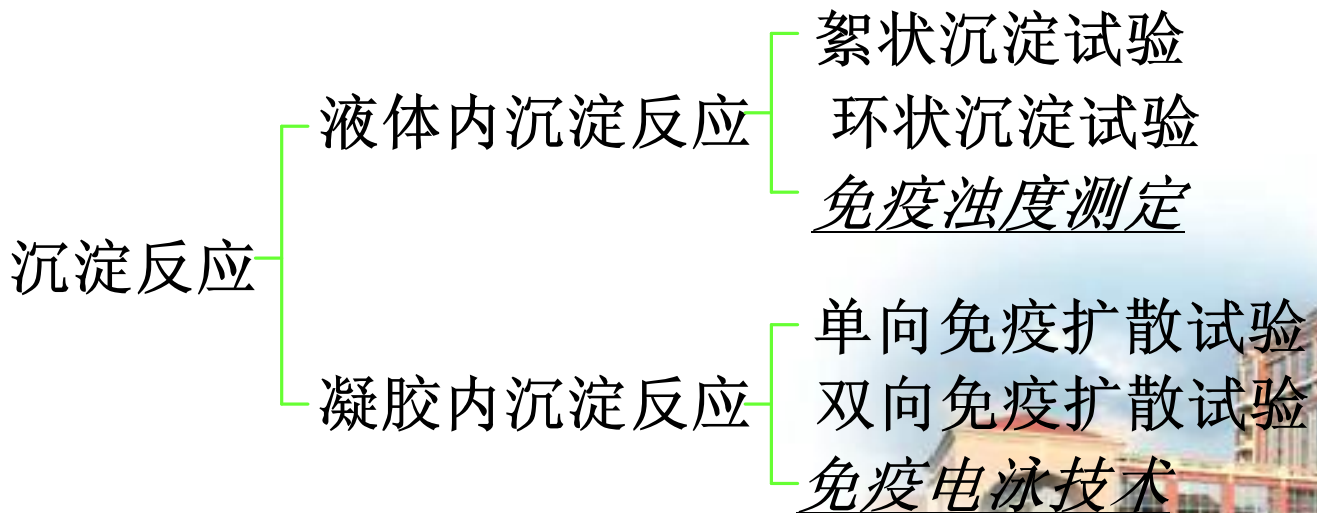
上海交通大学医学院



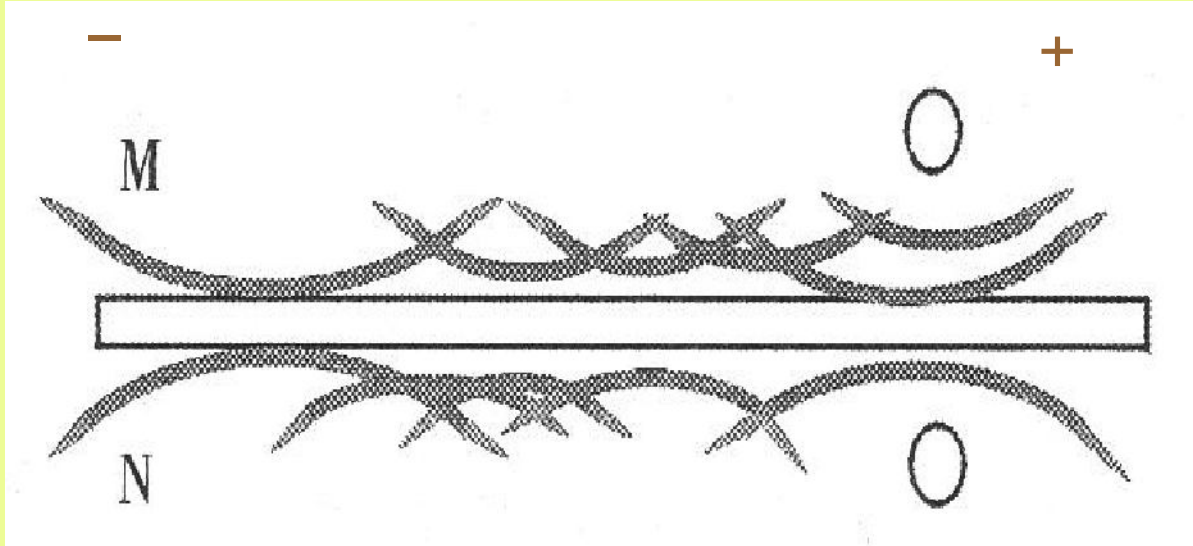
沉淀反应

Precipitation Reaction

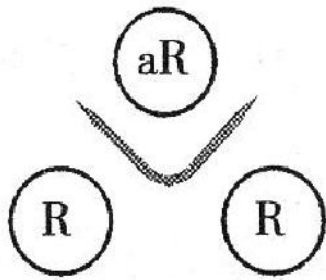
- ❖ 免疫沉淀反应是建立在可溶性抗原和抗体在液相中特异结合的反应。



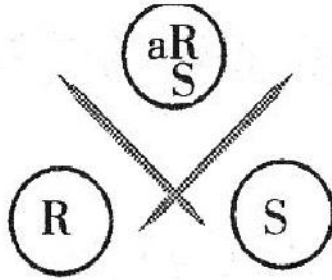
免疫电泳



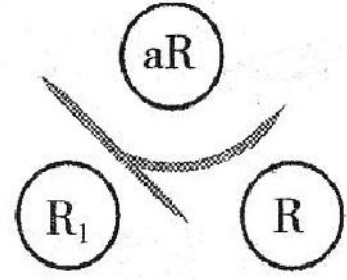
免疫双向扩散



吻合



相交

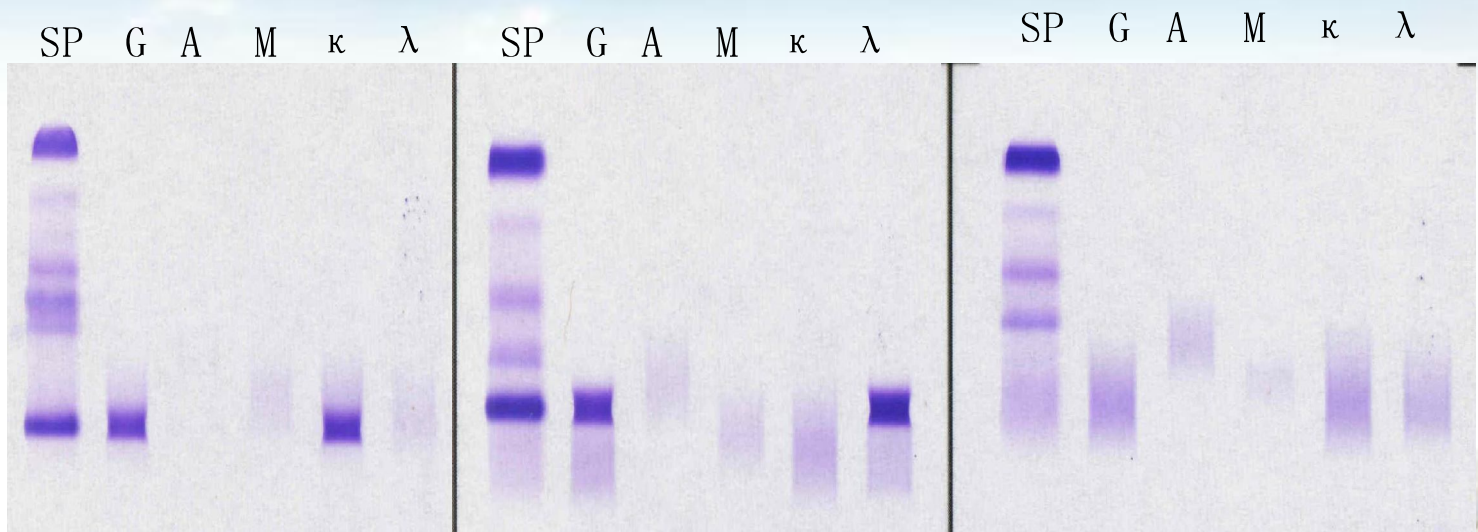


相切





免疫固定电泳示意图



左图为IgG κ 型，中图为IgG λ 型，右为正常

上海交通大学医学院



免疫浊度 (turbidimetry) 测定:

- ❖ 含义: 是将光学测量仪与自动分析检测系统结合, 应用于沉淀反应试验。
- ❖ 原理: 抗原抗体在检测反应液中会形成抗原抗体复合物, 使得反应液出现浊度。当反应液中保持抗体过剩, 形成的复合物随样本中抗原的量增加而增多, 反应液的浊度亦随之增高。与系列标准品对照(标准曲线), 可计算样本中被测抗原的浓度。



上海交通大学医学院



透射免疫比浊 (turbidimetry)

❖ 免疫比浊测定

散射免疫比浊 (nephelometry)

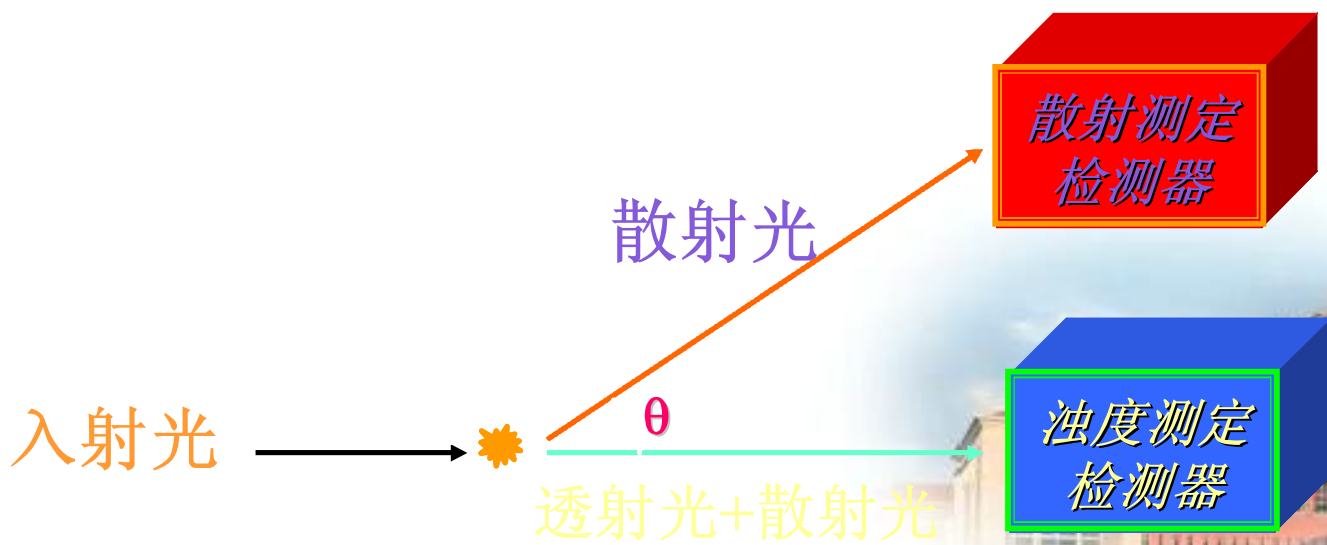
包括— 终点散射免疫比浊
速率散射免疫比浊



上海交通大学医学院



免疫浊度测定



上海交通大学医学院



补体参与的反应

❖ 免疫溶血试验

(immunohemolysis test)

❖ 补体结合试验

(complement fixation test , CFT)

❖ 补体依赖的细胞毒试验

(complement dependent cytotoxicity test, CDC test)



上海交通大学医学院



❖ 例:

CH₅₀ (complement hemolysis 50%) (测补体)

脂质体免疫法检测补体 (测补体)

微量细胞毒试验 (complement dependent
cytotoxicity; CDC) (交叉配型)

特定蛋白检测仪及配套试剂 (补体单成分)



上海交通大学医学院



1

经典免疫学技术

2

标记免疫技术



上海交通大学医学院



第二节 标记免疫技术



上海交通大学医学院



Immunolabeling Technique

- ❖ 原理：于抗原或抗体上标记可以微量检测的标记物（荧光素、酶或同位素等），待特异性抗原抗体反应后，所测的不必是抗原-抗体复合物本身，而测定复合物中的标记物，并可通过标记物的放大作用，进一步提高其检测的敏感度。



上海交通大学医学院



Immunolabeling Technique

- ❖ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
- ❖ Fluorescence immunoassay (FIA)
- ❖ Radioimmunoassay (RIA)
- ❖ Luminescence immune-technique
- ❖ Solid phase membrane-based immunoassay
- ❖ Biotin-avidin system (BAS)



上海交通大学医学院



酶免疫技术/ELISA

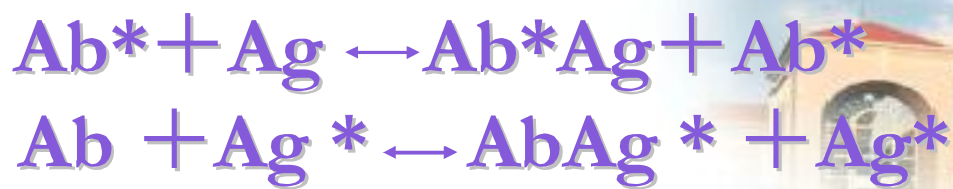
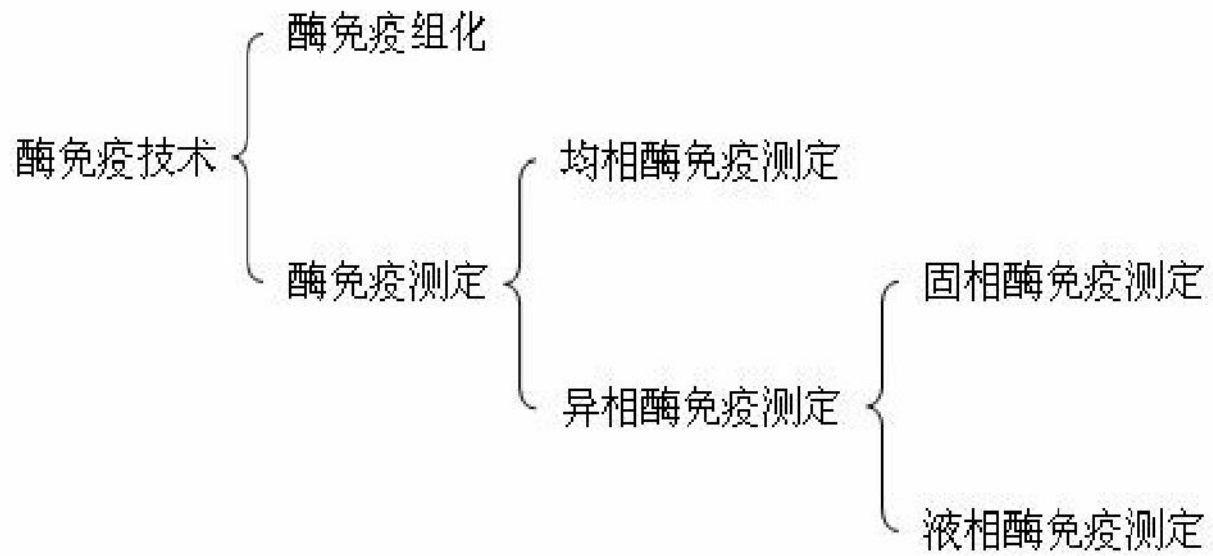
- ❖ 酶免疫技术（**enzyme immunoassay, EIA**）— 是以酶标记抗原或抗体作为主要试剂的免疫测定方法。
- ❖ 酶联免疫吸附测定（**enzyme linked immunosorbent assay, ELISA**）— 是以酶作为标记指示物、以抗原抗体反应为基础的固相吸附测定。



上海交通大学医学院

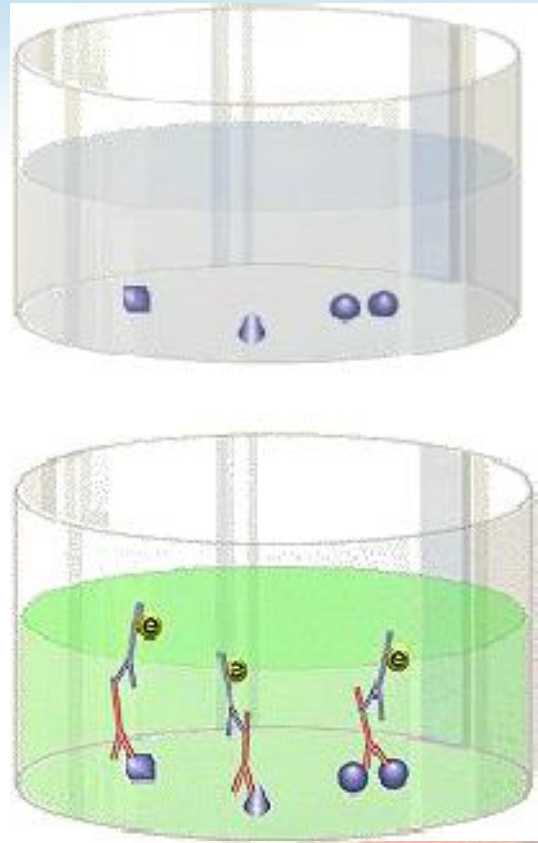


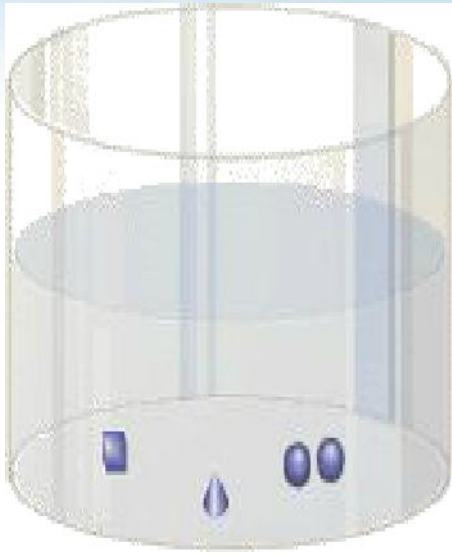
酶免疫技术的分类



ELISA:

- ❖ ELISA— 是以酶作为标记指示物、以抗原抗体反应为基础的固相吸附测定。





— 抗原/抗体的固相化
(coating, 包被)
(immunosorbent)
(蛋白分子表面效应)

操作: (例) Ag/Ab in pH 9.6 carbonate buffer
Incubated at 4°C for overnight



ELISA - Antibody Detection

video

上海交通大学医学院



ELISA - Antigen Detection

video

上海交通大学医学院





表面效应:

- ❖ 蛋白质分子在吸附（包被）过程，为了克服与固相载体之间的排斥力，需要重新分布其表面的功能性基团，使疏水性基团充分暴露，然后，局部接触区域的偶极分子脱氢，再通过范德瓦尔引力将其固相于载体表面。整个过程谓coating。



上海交通大学医学院



区别:

(1) 非共价吸附

- ❖ 抗体或蛋白通过疏水性相互作用而附着

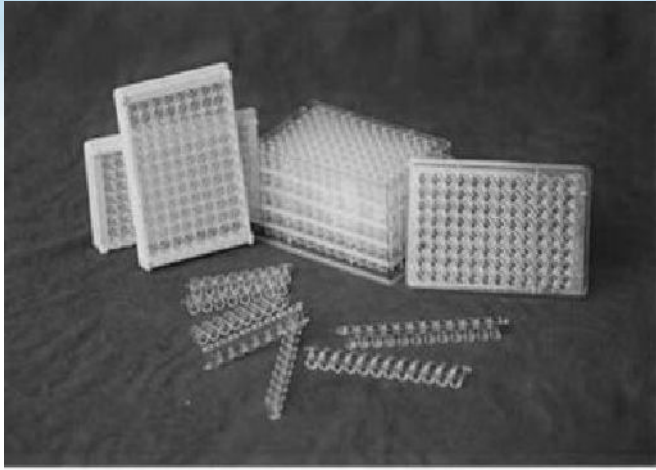
(2) 共价吸附

- ❖ 借助固相上的活性基团，通过化学交联剂与抗原/抗体分子上相应活性基团反应形成共价键，固着~



上海交通大学医学院

固相载体



材料要求:

- 1、结合容量
- 2、结合能力
- 3、结合性质
- 4、性价比

种类:

- 1、聚苯乙烯
- 2、聚氯乙烯
- 3、硝酸纤维素膜
- 4、尼龙膜
- 5、磁性微粒

孔间差异
($<10\%$)



对策

一、

- ❖ 用一定浓度的人IgG (10ng/ml)
- ❖ 适当稀释度的酶标抗人IgG
- ❖ 控制反应各条件
- ❖ 计算各孔读值的平均值并要求每孔的读值与其平均值间的差异小于**10%**。

二、

- ❖ 选择已知阳性与阴性标本，作系列稀释
- ❖ 在不同固相载体上按预定的ELISA法进行操作测定
- ❖ 评判的标准：阳性结果与阴性结果**差别最大**的好



上海交通大学医学院



封闭 (Blocking)

- ❖ Ag/Ab被固相化后，固相载体表面会留有少量未被吸附的位点（空），反应过程中加入的待检标本或酶标抗体等可能与之吸附（非特异），导致其检测的本底偏高。为避免之，包被后再用BSA或小牛血清包被一次——Blocking。



上海交通大学医学院



酶标记抗原或抗体

❖ 适宜标记用酶的要求:

- ①酶活性高
- ②具共价交联能力
- ③催化底物产有色信号并易于检测
- ④自身稳定, 不易受干扰

■ 酶标记的抗原或抗体称为**结合物**
(conjugate)。



酶和底物

- ❖ 辣根过氧化物酶（**horseradish peroxidase, POase**）
底物： H_2O_2 ，邻苯二胺（OPD），四甲基联苯胺（TMB），
- ❖ 碱性磷酸酶（**alkaline phosphatase, APase**）
底物：对硝基苯磷酸盐（PNP）
- ❖ **B-D-半乳糖苷酶（B-D-galactosidase, BGase）**
底物：甲基伞酮基半乳糖苷（4MuG）
- ❖ 葡萄糖氧化酶（**glucose oxidase, GOase**）
底物：**ABTS+HRP+Glu**



免疫测定技术常用的酶及其底物 (substrate)

酶	底物	显色反应	测定波长
辣根过氧化物酶	邻苯二胺 (OPD)	橘红色	492
	四甲基联苯胺 (TMB)	黄色	460
	氨基水杨酸	棕色	449
	邻联苯甲胺	兰色	425
	2, 2'-连胺基-2 (3-乙基-并噻唑啉磺酸-6) 铵盐	蓝绿色	642
碱性磷酸酶	4-硝基酚磷酸盐 (PNP)	黄色	400
	萘酚-AS-Mx磷酸盐+重氮盐	红色	500
葡萄糖氧化酶	ABTS+HRP+葡萄糖	黄色	405, 420
	葡萄糖+甲硫酚嗪+噻唑兰	深蓝色	405, 420
_B D-半乳糖苷酶	甲基伞酮基半乳糖苷 (4MuG)	荧光	360, 450
	硝基酚半乳糖苷 (ONPG)	黄色	420

上海交通大学医学院



用于酶免疫测定的抗原与抗体

- ❖ 1、用途：包被与标记
- ❖ 2、种类：抗原— 天然、重组、合成
抗体— 多克隆、单克隆
- ❖ 3、要求：抗原纯度高
抗体效价高
酶联结合力高
- ❖ 4、适宜工作浓度



上海交通大学医学院



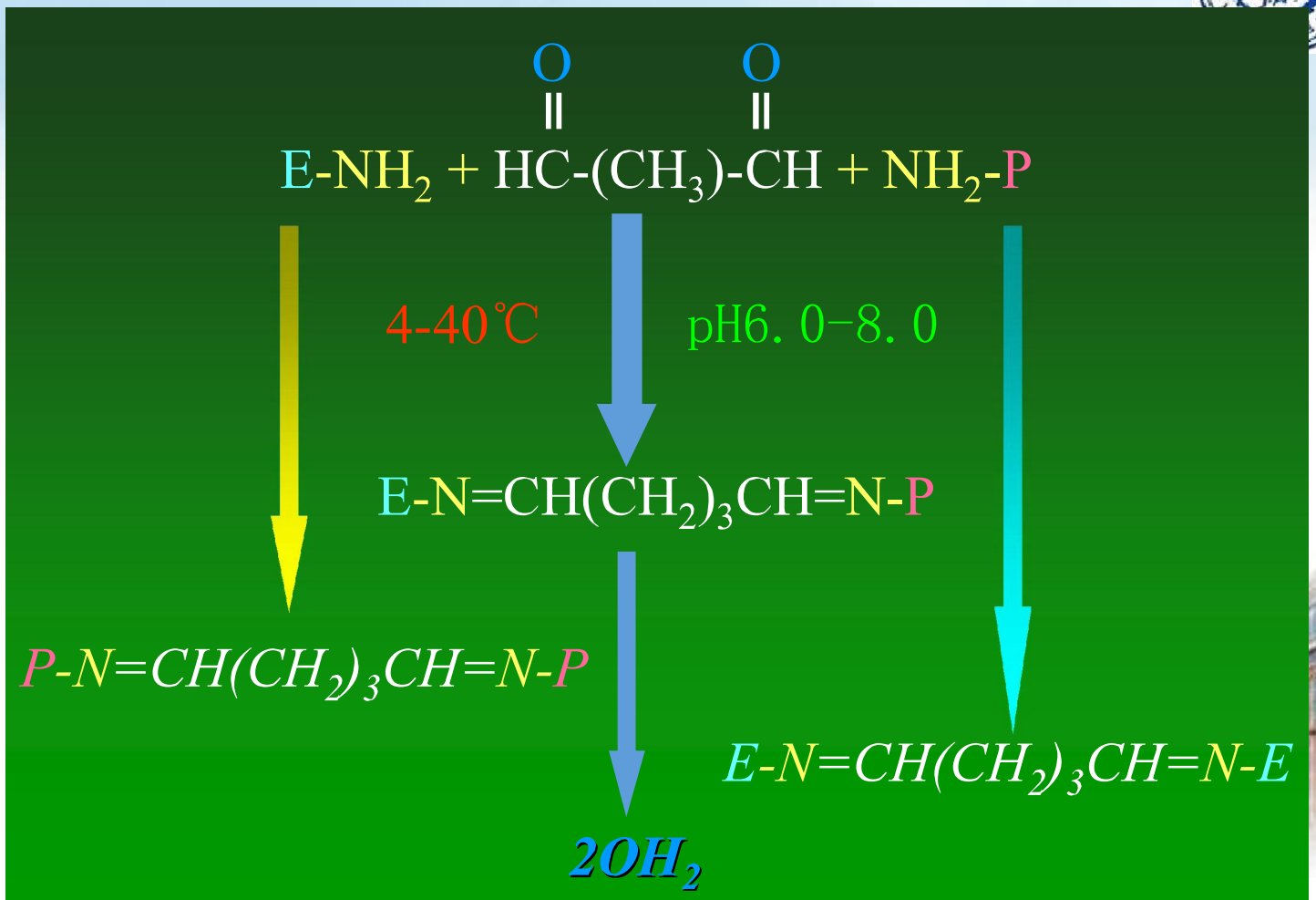
常用酶标记法

- ❖ 1、戊二醛交联法（一步/二步）
- ❖ 2、过碘酸钠法

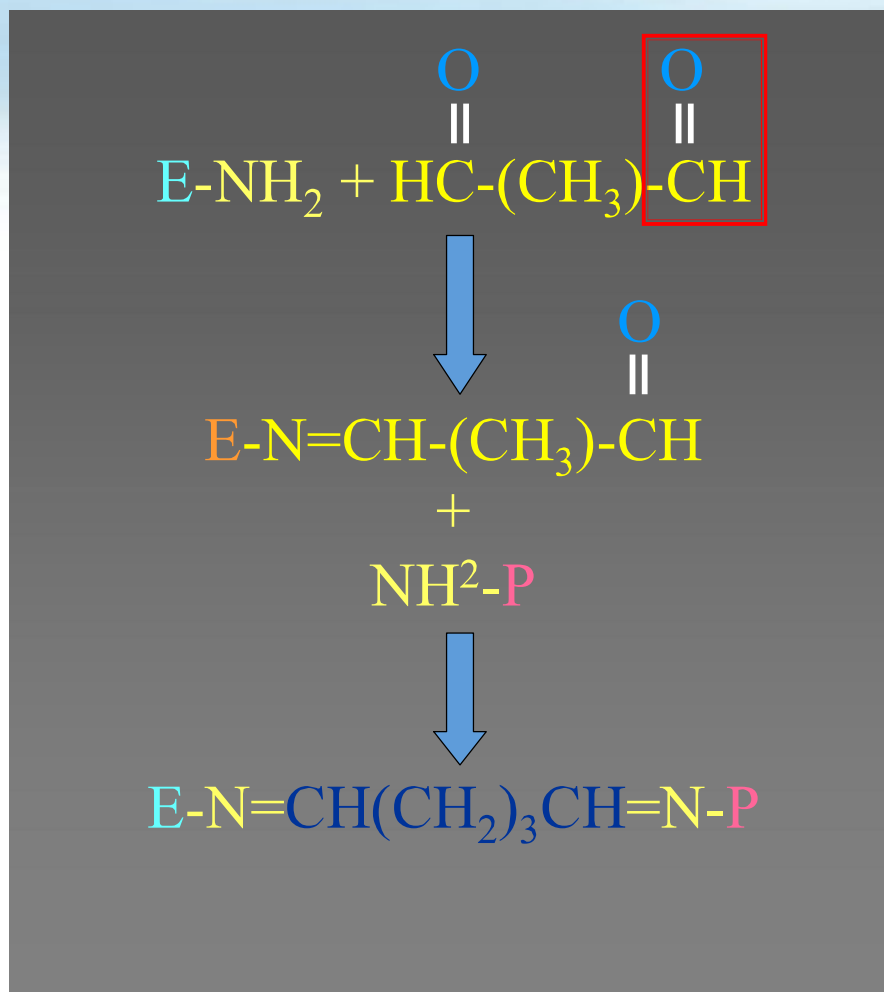


上海交通大学医学院

戊二醛交联一步法



戊二醛交联二步法





一步法

优点：操作简单、重复性好。

缺点：标记效率低（6%），酶与酶、抗体与抗体间也有交联。

二步法

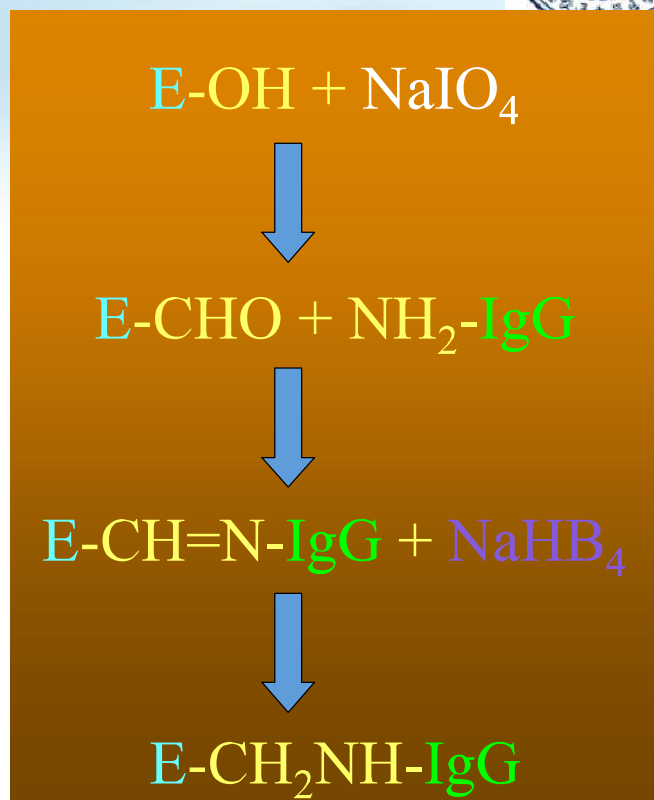
优点：标记效率高，是一步法2-8倍，无酶与酶、抗体与抗体间的交联。

缺点：操作较复杂，抗体与酶易变性，透析时抗体易沉淀析出。



过碘酸盐氧化法

利用过碘酸钠将酶蛋白分子中与酶活性无关的多糖分子的羟基氧化——成活泼的醛基 + 抗体蛋白游离氨基形成——Schiffs碱而交联。



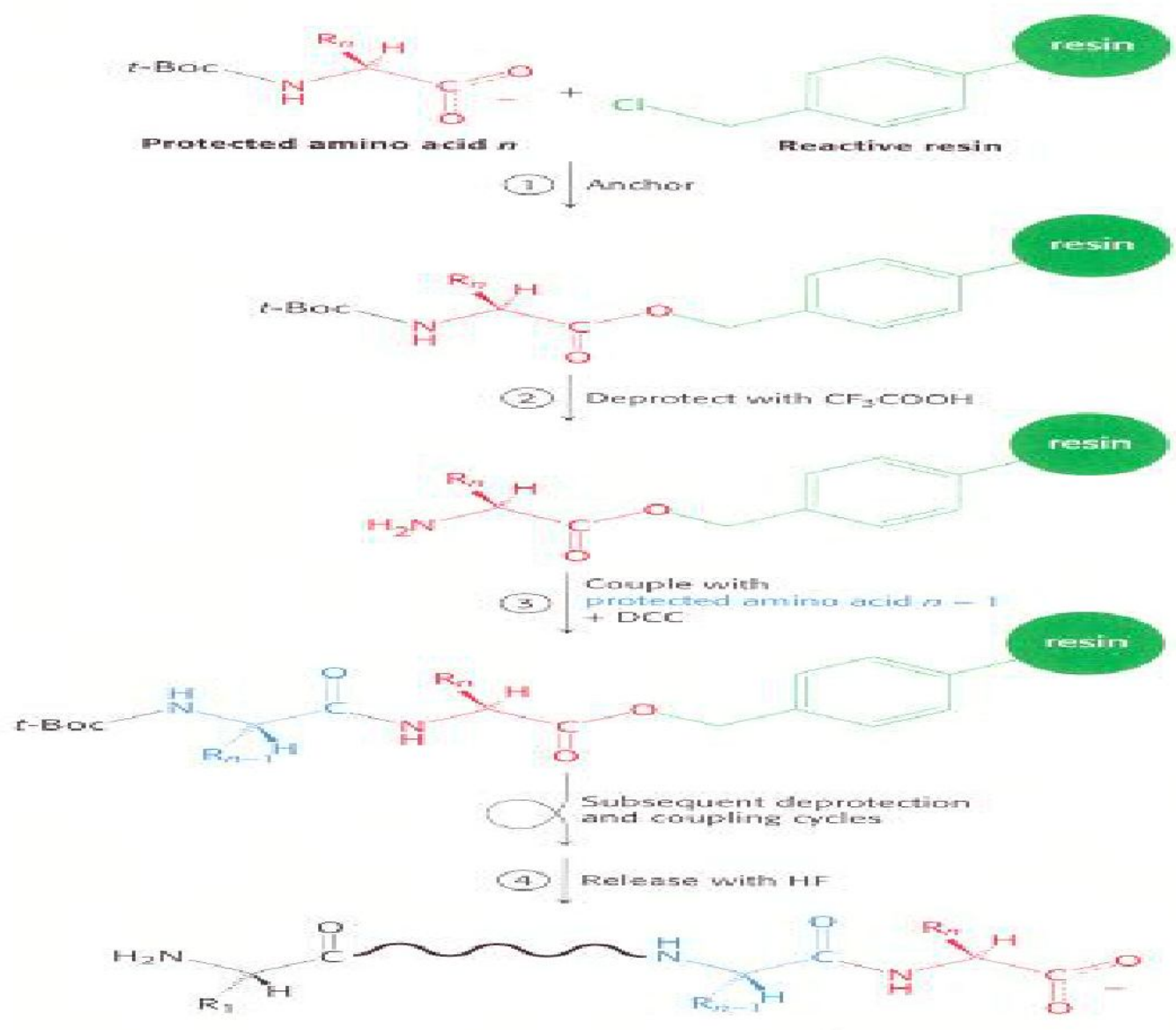


抗原性肽段的固相合成

- ❖ 以Fmoc-Gly-Wang树脂为载体，以N- α -Fmoc基团保护的氨基酸为原料，以HBTU/HoBt作为偶联试剂，从C-N端顺序依次偶联所需的氨基酸，直至合成所需的各肽段。然后将肽从树脂上裂解下来，洗涤，冻干得到短肽。



上海交通大学医学院





双抗体夹心法最佳工作浓度的选择

包被抗体的浓度及 酶标抗体稀释度	参考抗原		
	强阳性 (25ng/ml)	弱阳性 (1.5ng/ml)	阴性
10mg/L			
1:1000	1.17	0.15	0.09
1:5000	0.46	0.03	0
1:25000	0.12	0	0
1mg/L			
1:1000	>2	0.25	0.10
1:5000	0.91	0.12	0.01
1:25000	0.25	0.01	0
0.1mg/L			
1:1000	0.42	0.13	0.13
1:5000	0.11	0.03	0.02
1:25000	0.03	0	0

选择标准：强阳性参考血清A值为0.8左右，阴性参考血清A值<0.1

上海交通大学医学院



Homogenous (均相测定)



$Ab Ag * + Ag *$ —不需分离, 但 $Ab */ Ag *$ 酶需失活

例: enzyme-multiplied immunoassay technique

(EMIT, 酶扩大免疫测定技术)

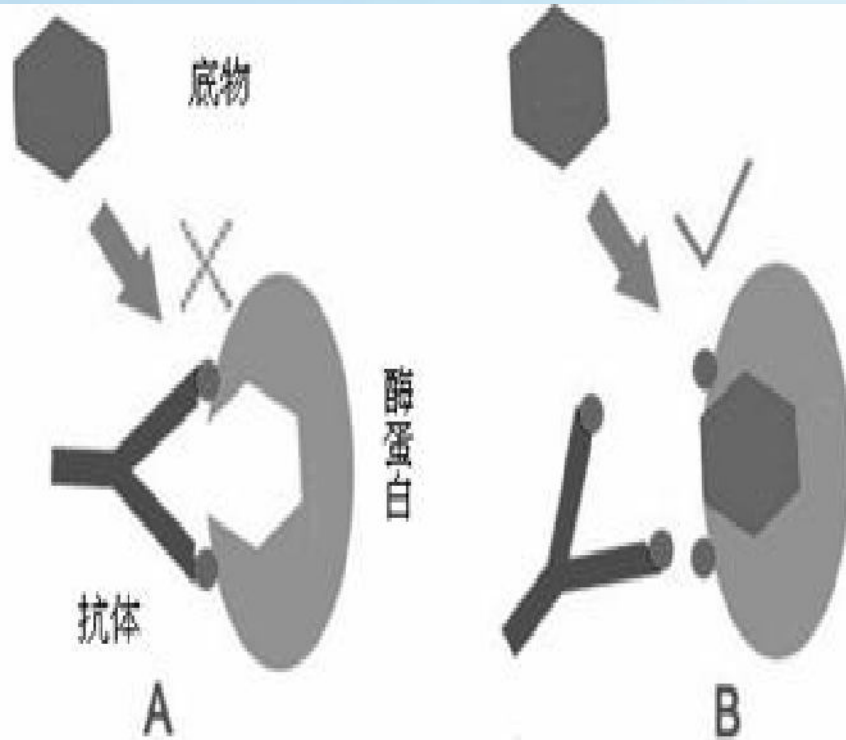
cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA)

(克隆酶供体免疫测定)



上海交通大学医学院

EMIT测定:



检测对象: 半抗原(药物)

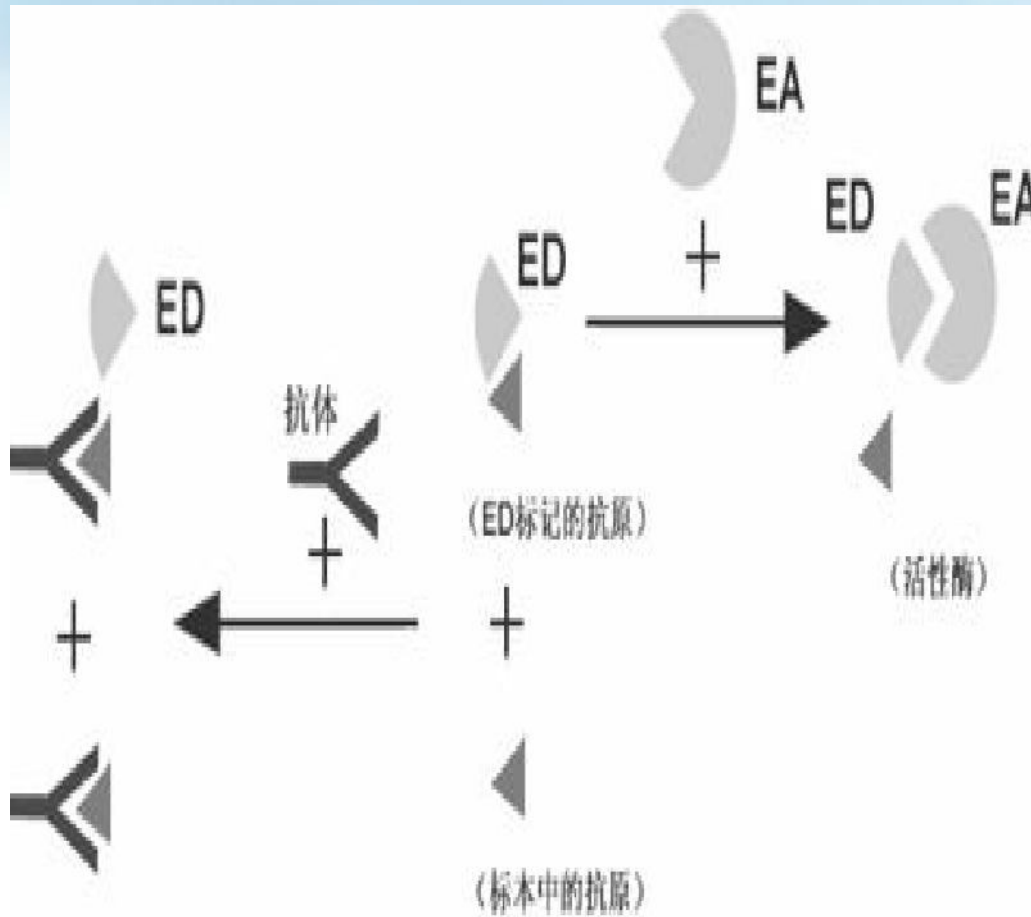
试剂: 抗体、酶标记半抗原、底物

反应模式: 竞争法





CEDIA测定:



enzyme acceptor, EA

(酶受体)

enzyme donor, ED

(酶供体)

EA、ED游离无酶活性

检测对象: 药物、小分子物

试剂: 抗体、EA

ED标记抗原
底物

反应模式: 竞争法



固相膜免疫吸附测定

- ❖ 固相载体：硝酸纤维素微孔膜
- ❖ 标记物选择：有色微粒子（胶体金）
- ❖ 反应形式：穿流（渗滤）
横流（层析）
Western Blot
重组免疫结合试验（RIBA）
- ❖ 应用：药物、激素、抗生素等

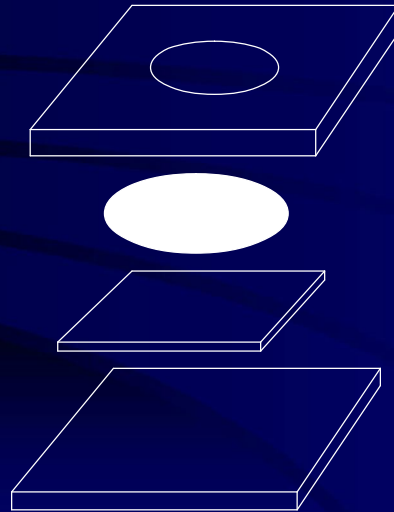


上海交通大学医学院



快速检测技术简介

GIFA的组成及操作 (图示)



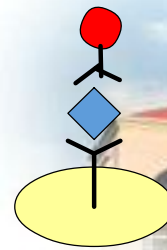
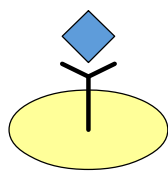
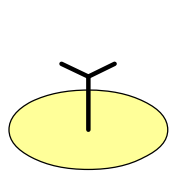
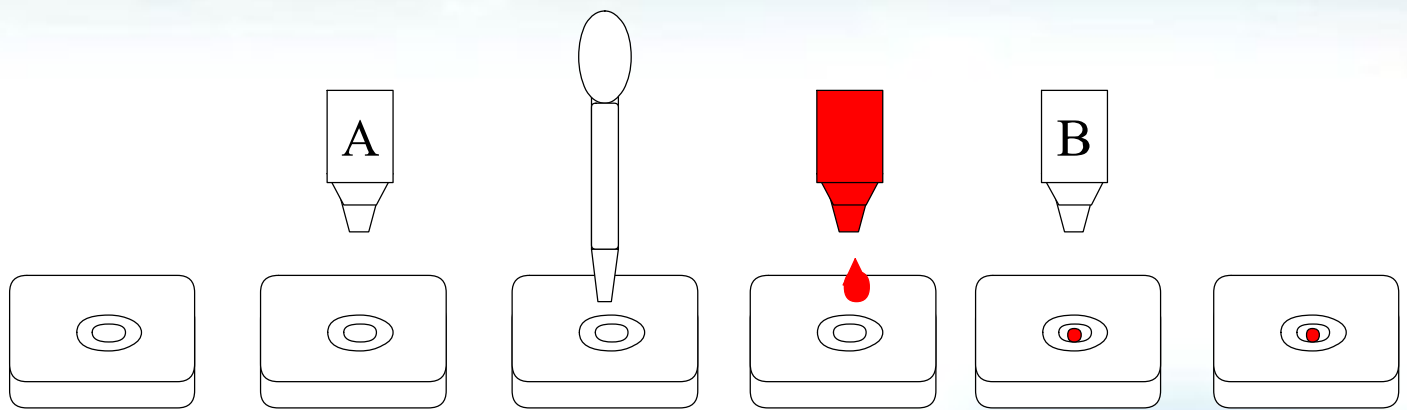
EY Laboratories, Inc

上海交通大学医学院



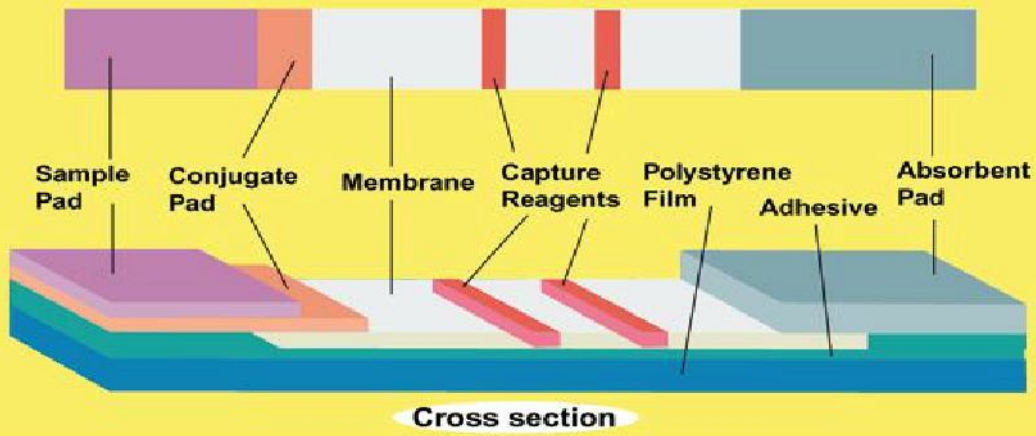
IFA

双抗体夹心法测抗原



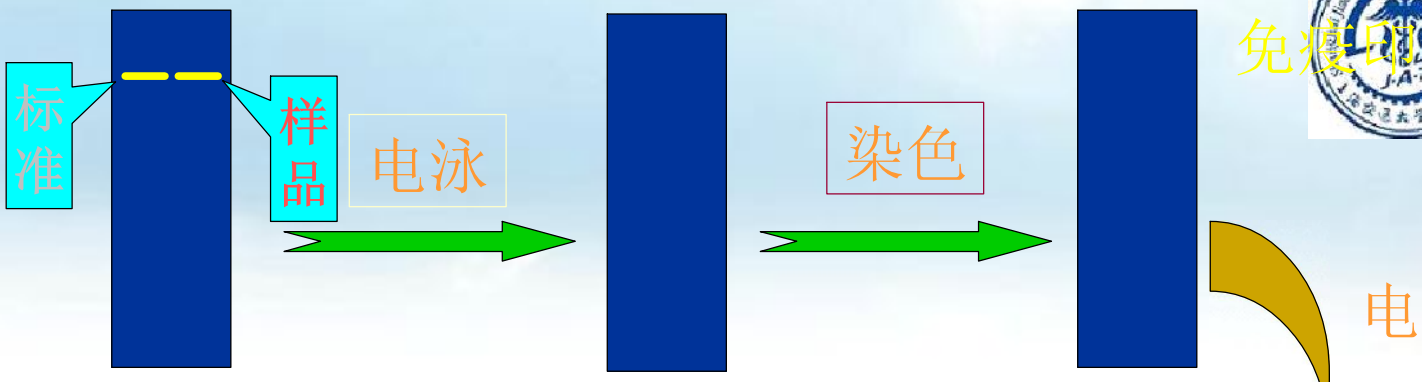
上海交通大学医学院

免疫层析层析试验

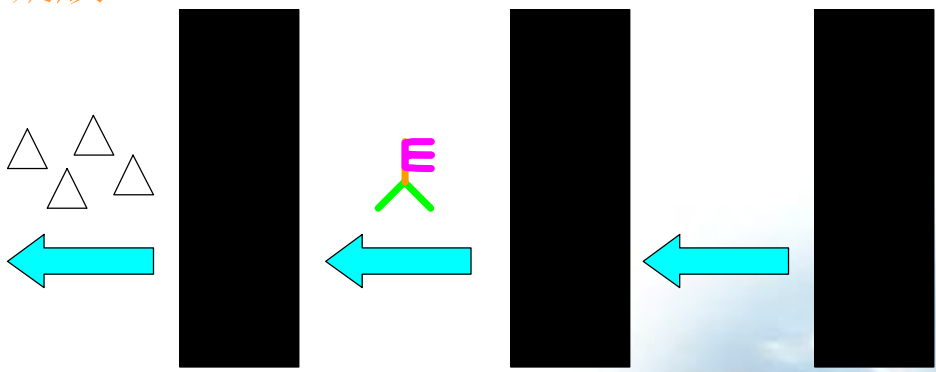
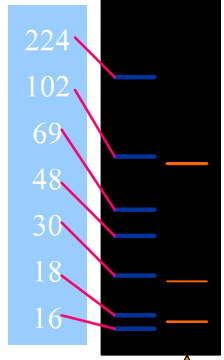




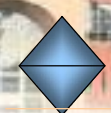
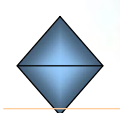
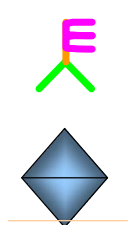
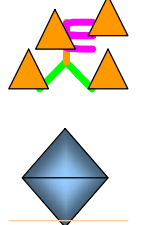
免疫印迹



聚丙烯酰胺凝胶



硝酸纤维素膜



上海交通大学医学院

Fluorescence immunoassay (FIA)



- ❖ 以荧光素为标记物并标记抗体/抗原，当抗原-抗体特异性结合，在荧光显微镜下可示踪，实际工作中普遍使用。由于主要用荧光素标记抗体去检测相应抗原（定位、定量），所以统称荧光抗体技术（fluorescent antibody technique）。
- ❖ 分类： 荧光抗体染色技术（荧光免疫显微技术）
荧光免疫测定（非均相/均相）



上海交通大学医学院



❖ 荧光 (fluorescence) :

某些物质在光的照射下，吸收光能进入激发态，当其从激发态返回原基态时，以电磁辐射形式放射出所吸收的光能，称为光致发光。

若用一短波长光照射某物质，该物质能发射较长波长的光，此种光被称谓荧光。

❖ 荧光素 (fluorochrome) :

是指一些具有光致荧光特性的染料物质。

❖ 荧光的淬灭现象:

某些理化因素可使得荧光色素的辐射能力减弱或消失的现象。



上海交通大学医学院



常用的荧光素

❖ 1、异硫氰基荧光黄（FITC）

纯品为黄色结晶粉末，最大吸收光谱490~495nm，最大发射光谱520~530nm，呈明亮黄绿色荧光。

❖ 2、四乙基罗丹明（RB200）

纯品为橘红色粉末，最大吸收光谱570nm，最大发射光谱595~600nm，呈明亮橙色荧光。

❖ 3、四甲基异硫氰基罗丹明（TRITC）

罗丹明的衍生物，纯品为紫红色粉末，最大吸收光谱550nm，最大发射光谱620nm，呈橙红荧光。





常用的荧光抗体标记方法

❖ 即荧光素与抗体的结合

荧光素有活泼的化学基（偶氮基—**N=N**—）

（异氰基—**N=C=O**）

（异硫氰基—**N=C=S**）

抗体蛋白有氨基酸的自由氨基

方法：透析法

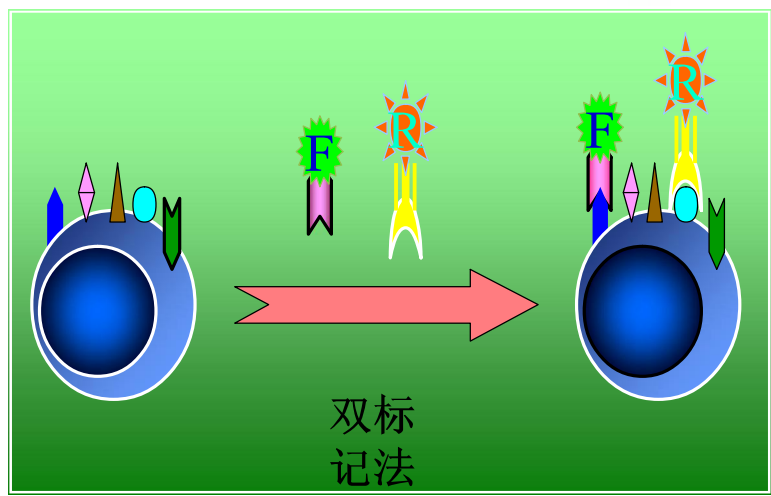
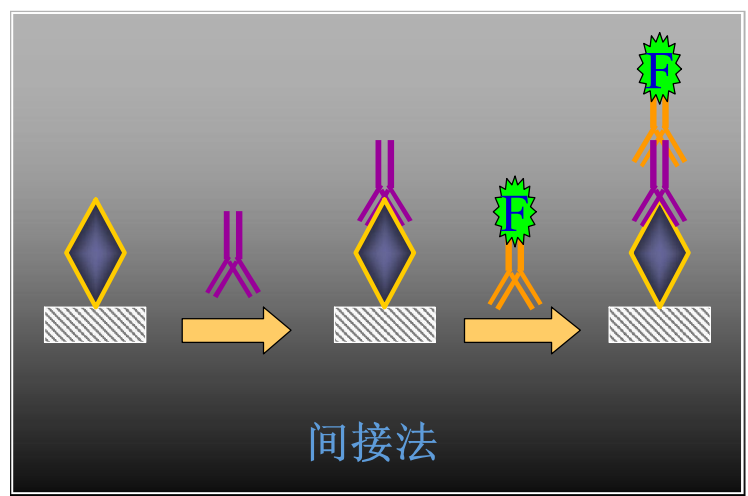
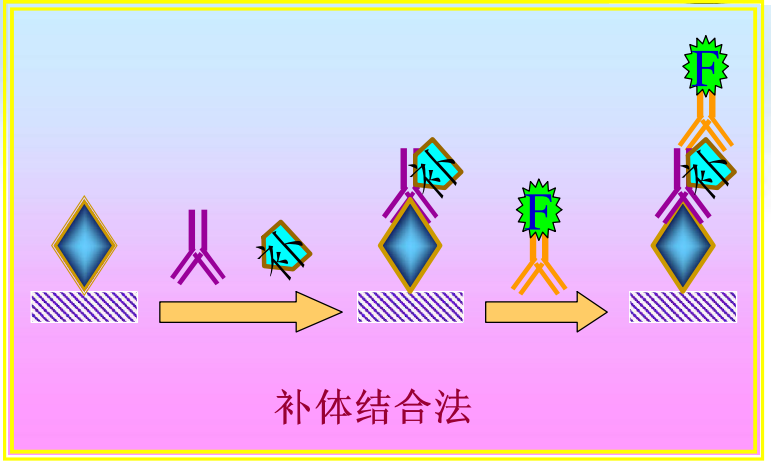
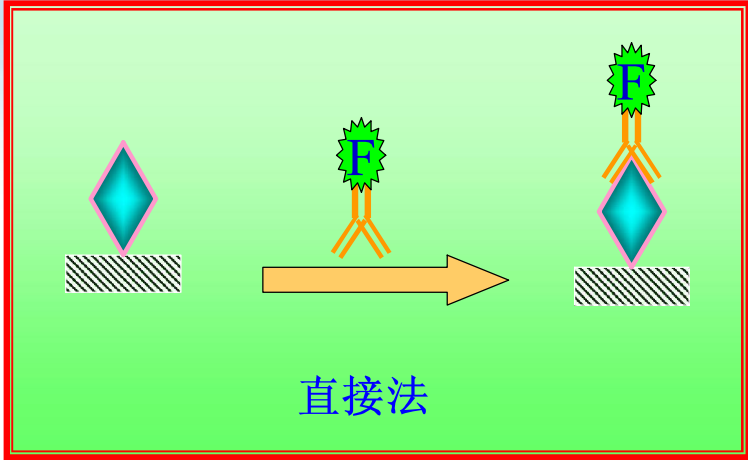
搅拌法

结合物 ——（荧光素—**N-C-N**-蛋白质）



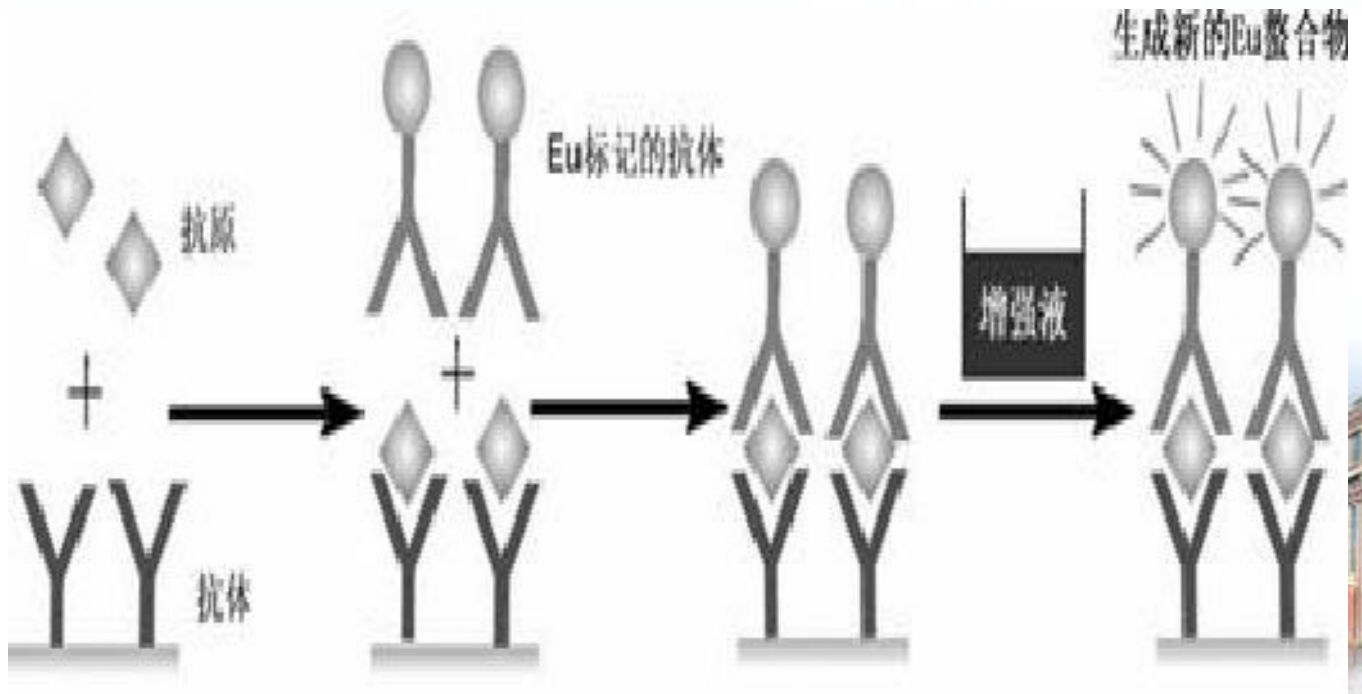
上海交通大学医学院

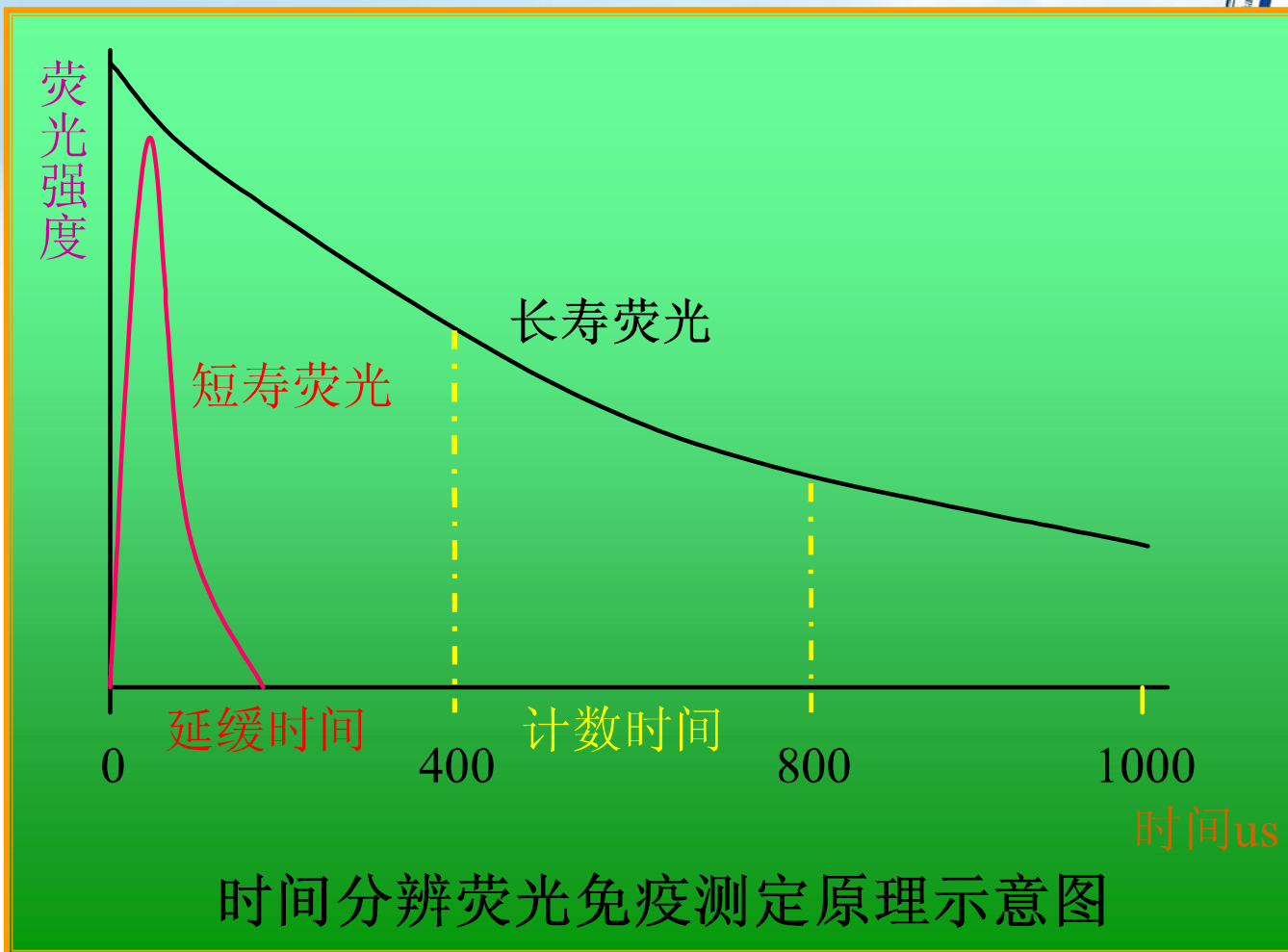
技术类型



荧光免疫测定（非均相/均相）

❖ 时间分辨荧光免疫测定（TR-FIA）（非）







时间分辨荧光免疫测定 (TR-FIA) 原理

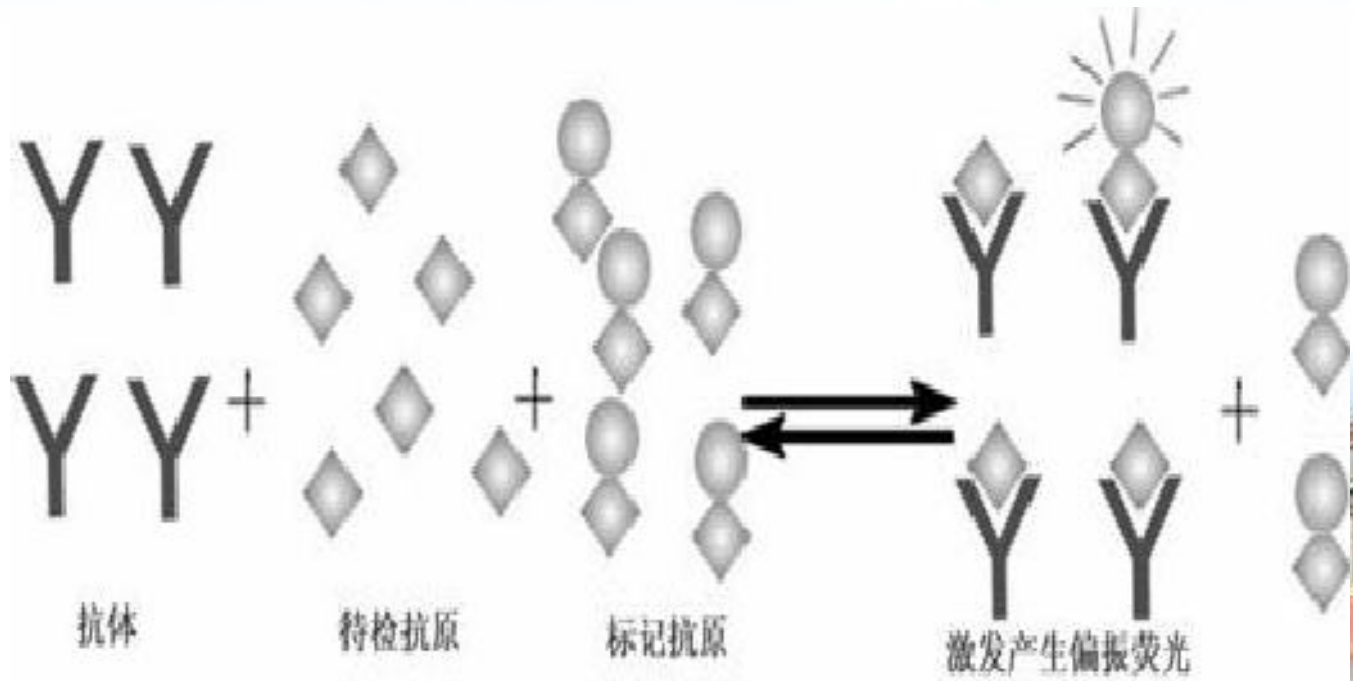
- ❖ 1、用荧光寿命较长的稀土金属 (Eu、Tb等) 作标记物，标记抗原或抗体。
- ❖ 2、利用时间分辨荧光分析仪
- ❖ 3、延缓测量时间，以排除标本中的自发荧光。因为后者的荧光寿命很短。
- ❖ 4、稀土金属的激发光波长与发射波长间距大 (Stokes移位290nm/一般荧光Stokes移位28nm)
- ❖ 5、灵敏度高 (0.2~1ng/ml)



上海交通大学医学院

荧光免疫测定 (非均相/均相)

❖ 荧光偏振免疫测定(FPIA) (均)





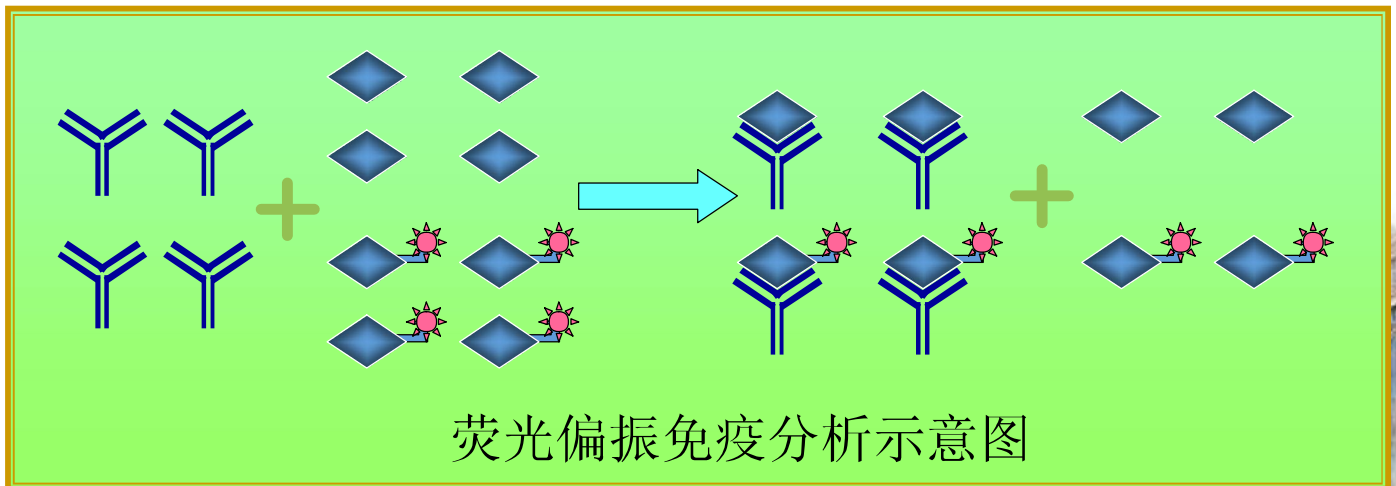
荧光偏振免疫测定 (FPIA) 原理

- ❖ 荧光物质在溶液中被单一平面的偏振光（波长 485nm）照射后，可吸收光能进入激发态；当其恢复至基态时释放能量的同时发射偏振荧光（波长 525nm）。
- ❖ 偏振荧光的强度与荧光物质受激发时分子转动的速度呈反比。（大分子/慢-强，小分子/快-弱）。



上海交通大学医学院

- ❖ 当待测抗原浓度高时，经竞争反应大部分抗体被其结合，而荧光素标记的抗原多呈游离的小分子状态。由于其分子小，测量到的荧光偏振光较低。反之，待测抗原浓度低时，大部分荧光素标记抗原与抗体结合，形成大分子的标记抗原抗体复合物，此时检测到的荧光偏振程度也较高。





FPIA的应用

- FPIA主要用于测定药物（小）浓度。
- 当药物与荧光标记药物一竞争一定量抗体，结果标本中药物高，荧光标记药物-抗体形成低，据标准曲线计算药物含量。（呈反比）



上海交通大学医学院



其他标记

❖ 1、放射性核素标记物～

❖ 2、发光标记物～

chemiluminescence immunoassay, CLIA

luminescence enzyme immunoassay, IEIA

bioluminescence immunoassay, BLIA

❖ 3、金标记物～

❖ 4、生物素-亲和素系统 (BAS) ～



上海交通大学医学院



放射免疫标记技术

- ❖ 放射免疫分析(**radioimmunoassay, RIA**)是以放射性核素为标记物的标记免疫分析方法,用于定量测定受检标本中的抗原。



上海交通大学医学院



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 β 计数以测定其放射性分布，利用标准曲线确定样品中待测物的含量。



上海交通大学医学院



免疫放射分析 (IRMA)

- ❖ **IRMA**是非竞争放射免疫分析技术，其原理一种是标记抗体与抗原结合，剩余的未结合的标记抗体再与固相抗原结合而被分离。另一种方法是用两种抗体，一个标记抗体，另一个是固相抗体，与抗原反应形成双位点夹心复合物，这就是双位点**IRMA**。



上海交通大学医学院

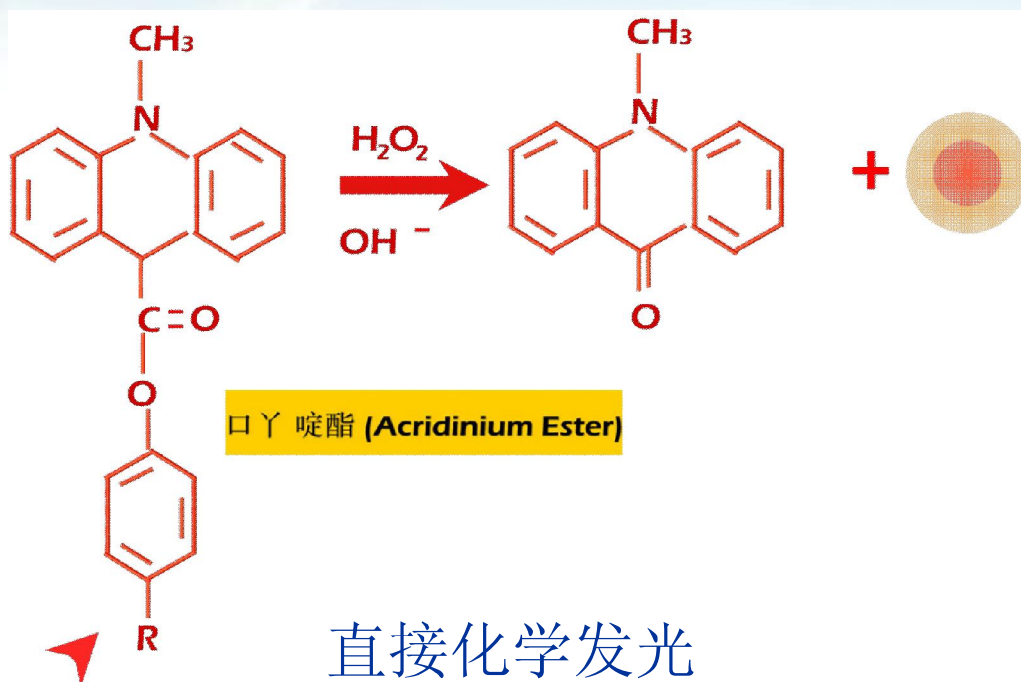


化学发光免疫测定

CLIA



化学发光底物





化学发光酶免疫测定 (chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA)

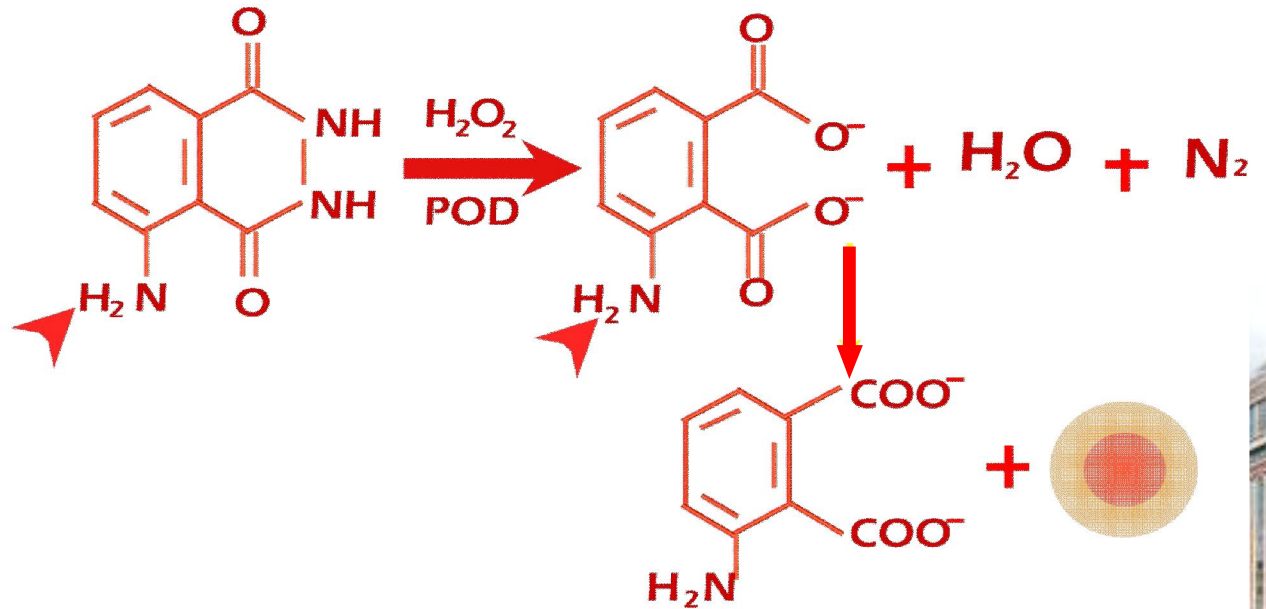
- ❖ 测定中**2**次抗原抗体反应步骤均与酶免疫测定相同，仅最后一步酶反应所用底物为发光剂，通过化学发光反应发出的光在特定的仪器上进行测定。



上海交通大学医学院

辣根过氧化物酶 化学发光底物

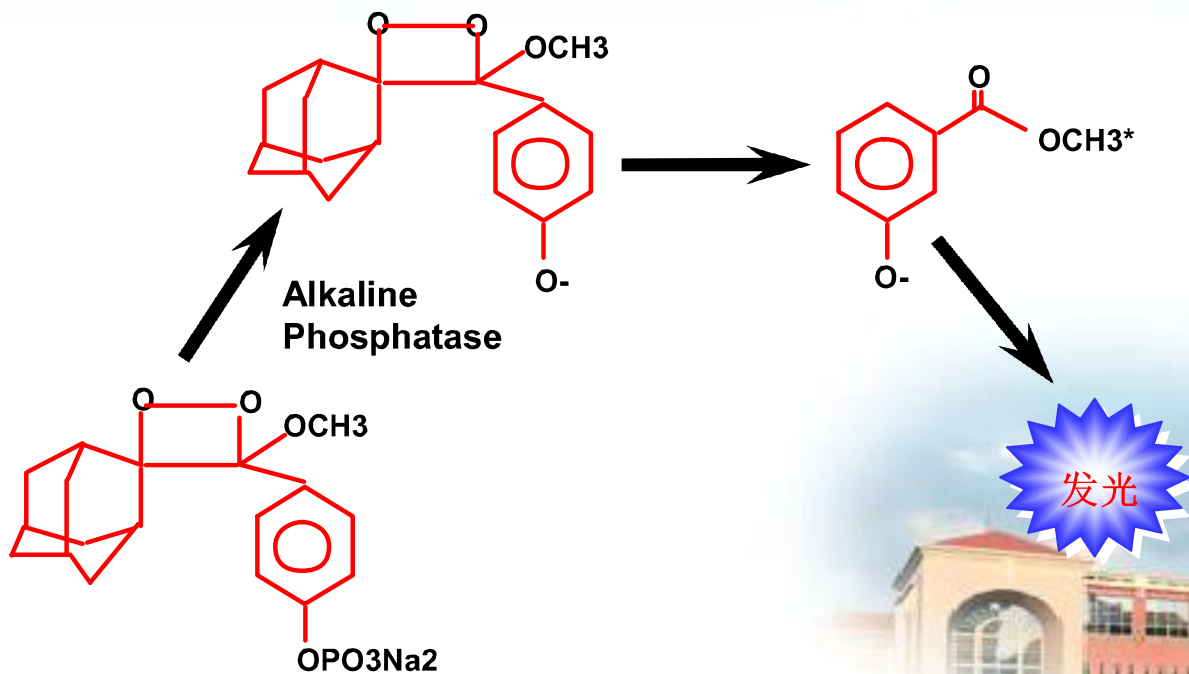
鲁米诺 (Luminol)





碱性磷酸酶 化学发光底物

金刚烷酮 (AMPPD)



上海交通大学医学院



电化学发光免疫分析 (ECLIA)

- ❖ 是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应，包括了电化学和化学发光两个部分。分析中常用的方法是双抗体夹心法，反应中生物素标记的抗体与标本中的抗原结合形成抗原-抗体

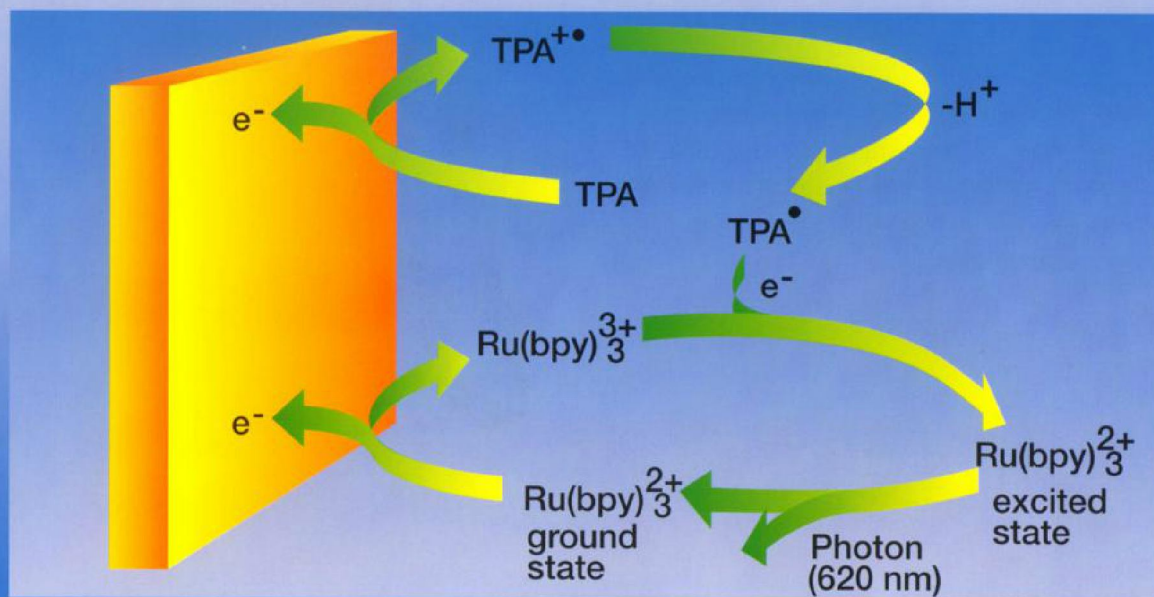


上海交通大学医学院



电极表面的电化学反应

The ECL* reaction at the electrode surface

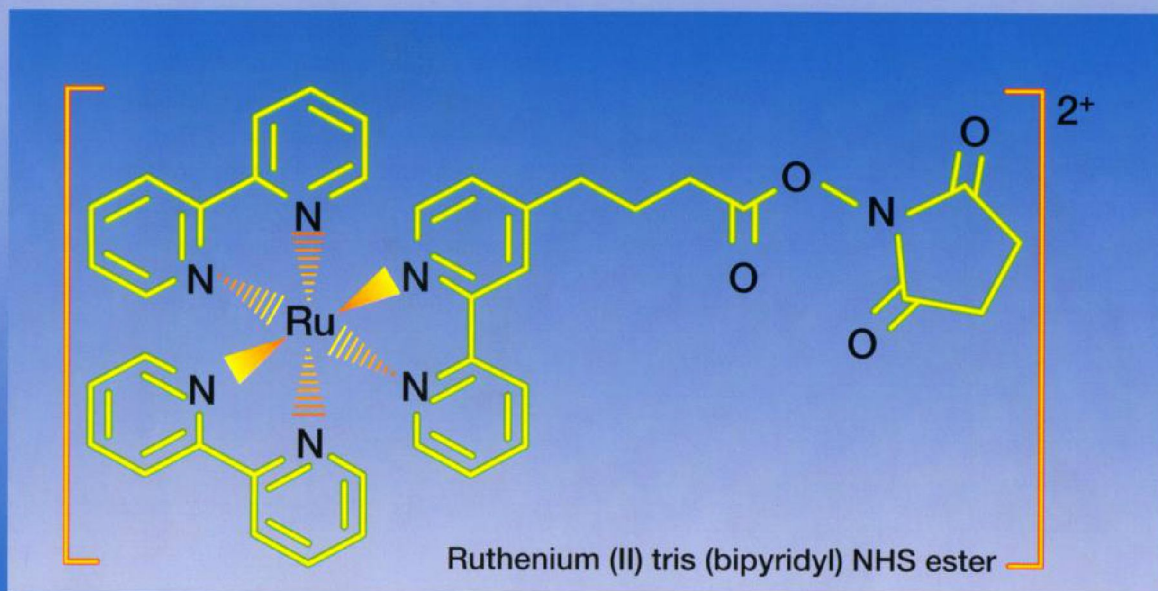


*Electrochemiluminescence

电化学发光底物-

三联吡啶钉 N羟基琥珀酰胺 (NHS) 酯

A ruthenium complex is used as the ECL* label



*Electrochemiluminescence



金标记免疫技术

- ❖ 金标记免疫技术 (immunogold labeling technique) 是以胶体金作为标记物，对样品中的抗体抗原进行检测。
- ❖ 胶体金：一般指金的水溶液，又称金溶胶。



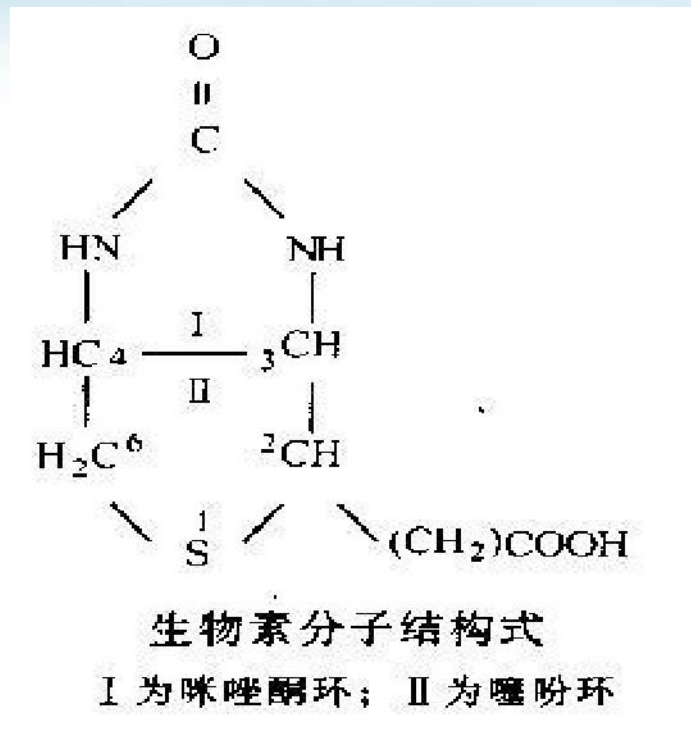
上海交通大学医学院



生物素-亲和素系统

Biotin-Avidin/Streptavidin System

❖ **Biotin**（维生素H）分子为双环状结构，咪唑酮环与亲和素结合，噻吩环上的戊酸侧连与抗体等蛋白分子结合。





- ❖ **Avidin**（抗生物素蛋白**or**卵白素）：从卵清蛋白中提取，有**4**个相同亚基组成，能结合**4**分子**biotin**。
- ❖ **Streptavidin**：由链霉菌分泌产生的一种蛋白质产物，有**4**条相同的肽链组成，能结合**4**分子**biotin**。



上海交通大学医学院



THANK YOU!



上海交通大学医学院