

《免疫诊断试剂实用技术》编委会

主编：唐秋艳 王云龙 陈兴业

编委：（按姓氏笔划排列）

王云龙	王法云	王 鹏	史 楠	李 瑾
赵 阳	汤 剑	陈兴业	陈绮名	唐秋艳
高喜梅	桑平阳	察雪湘		

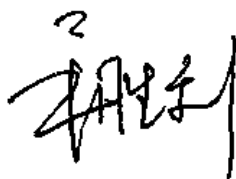
序

免疫诊断技术越来越广泛地应用在临床检验、生物学研究中，发挥着越来越大的作用，因而得到了业界同仁的重视。近20年来，免疫诊断试剂在检测诸如AIDS等病毒病需求的促进下得到了快速发展。然而，正像其他门类的学科发展一样，其技术水平的提高是没有巅峰的。作者从20世纪80年代初开始从事免疫诊断试剂的研究、开发和生产，在该领域进行了可贵的探索，积累了宝贵的经验。作为我国在该领域的最早开拓者之一，作者集其近30年从事免疫诊断试剂研究生产的经验以及对本行业国内外先进技术的了解，编著了《免疫诊断试剂实用技术》一书。作为与作者有着20多年科研协作伙伴，我为其专著出版甚感高兴。

本书内容包括标本采集、免疫基础知识、免疫诊断技术常用的酶、放射免疫诊断技术、酶免疫测定技术、胶体金免疫技术、化学发光免疫诊断技术、荧光免疫技术、PCR技术的基本原理等，同时还包括常用仪器、生物危害与安全防护、诊断试剂的质量评价、诊断试剂的质量监督管理等。

本书集基础理论、生产技术与质量监督管理为一体，具有很高的实用价值，是一部免疫诊断试剂生产、科研、临床检验及教学的实用工具书。相信《免疫诊断试剂实用技术》的付梓问世，必将对该领域的相关人员起到帮助借鉴作用，为我国免疫诊断技术的提高作出新的贡献。

中国疾病预防控制中心病毒病所



2009年4月

前 言

免疫诊断试剂是利用抗原与特异性抗体互相结合的反应来进行定性或定量的，免疫诊断技术是现代最灵敏、应用最广泛的微量和超微量诊断技术之一。检测抗原抗体特异性好、灵敏度高、操作简便、便于实现机电一体化，免疫诊断技术依据其方法学，可以分为：反射免疫法、荧光免疫法、化学发光免疫法和酶联免疫法等。它涉及生物学、医学、化学、环境学和材料科学等多学科领域。体外诊断试剂是伴随着医学检验学的发展而产生的，而临床诊断试剂的产业化发展又极大地推动了新的科学技术在医学检验学、基础医学和药理学等学科的发展应用。免疫诊断产品在目前所有诊断试剂产品中的发展速度是最快的。据统计 2007 年，全球体外诊断产业规模在 200 亿美元的水平，而中国的行业规模目前只有 30 亿~50 亿元人民币的年营业额，年均增长率为 20%~30%。其中仪器设备占 50%~60%。据统计，临床化学市场占 34% 的份额，免疫学诊断试剂占 29%，血糖检测占 14%，血液学占 7%，微生物学占 5%，血库占 4%，核酸探针占 3%，其他（包括凝结剂）占 4%。目前我国免疫诊断技术已基本达到国际同期水平，有些已经达到国际先进水平。

国家食品药品监督管理局为使体外诊断试剂生产厂家健康有序的发展，相继出台了相关政策和规定来改善生产环境，提高生产人员的质量意识，规范生产及质量管理，提高产品质量。

本书主要是为免疫诊断试剂研究与生产人员提供参考资料，使免疫诊断技术不断提高。

由于自身的学术水平、技术水平、业务水平和实践经验有限，书中有些方面可能还存在一些欠缺，不当之处在所难免，恳请有关专家、学者及广大读者批评指正。

编者

2009 年 3 月

目 录

第1章 标本的采集与保存	(1)
1.1 血液标本的采集与处理	(1)
1.2 尿液标本的收集与处理	(10)
1.3 粪便标本的采集和处理	(16)
1.4 精液检查	(20)
1.5 前列腺液检查	(21)
1.6 阴道分泌物的收集和处理	(22)
第2章 免疫基础知识	(24)
2.1 抗原	(24)
2.2 抗体	(30)
2.3 抗原的制备	(39)
2.4 抗体的制备	(52)
第3章 免疫诊断技术常用的酶	(59)
3.1 酶的概念与发展	(59)
3.2 酶的作用特点	(61)
3.3 酶的催化反应动力学	(63)
3.4 酶的保存	(66)
3.5 酶的测定技术	(66)
3.6 酶在医药方面的应用	(69)
3.7 免疫分析常用的酶	(72)
第4章 放射免疫分析诊断技术	(79)
4.1 放射免疫分析诊断技术	(79)
4.2 放射免疫的测定方法	(84)
4.3 放射免疫分析法的建立	(87)
4.4 免疫放射分析	(90)
4.5 生产和使用放射免疫诊断试剂(盒)的卫生防护	(92)

第5章 酶联免疫诊断技术	(95)
5.1 酶联免疫测定方法及原理	(95)
5.2 酶联免疫诊断试剂的组成	(103)
5.3 酶免疫的反应条件及质量控制	(112)
5.4 ELISA 中常见问题及解决方法	(118)
5.5 ELISA 的应用实例	(128)
5.6 临床意义	(129)
5.7 酶联免疫吸附测定的局限性	(130)
第6章 胶体金免疫技术	(132)
6.1 胶体金与免疫金的特性	(132)
6.2 胶体金的制备	(135)
6.3 免疫金的制备	(140)
6.4 免疫金测定技术	(148)
6.5 免疫金组织化学技术	(152)
6.6 胶体金类诊断试剂的生产	(155)
6.7 胶体金诊断试剂的生产及质量控制	(157)
6.8 免疫胶体金技术应用前景	(160)
第7章 化学发光免疫诊断技术	(163)
7.1 化学发光免疫技术概述	(163)
7.2 化学发光剂	(165)
7.3 化学发光酶联免疫技术	(168)
7.4 化学发光酶联免疫技术的应用	(174)
7.5 生物发光酶联免疫分析	(178)
7.6 化学发光酶联免疫法的应用	(181)
第8章 荧光免疫技术	(184)
8.1 荧光免疫技术概述	(184)
8.2 荧光抗体的质量控制	(191)
8.3 荧光免疫显微技术	(193)
8.4 荧光偏振免疫技术	(195)
8.5 时间分辨荧光免疫技术	(196)
8.6 荧光酶联免疫技术	(200)
第9章 PCR 技术	(204)
9.1 PCR 技术的基本原理	(204)

9.2	PCR 技术的特点	(205)
9.3	PCR 反应体系与反应条件	(206)
9.4	PCR 扩增产物的分析方法	(209)
9.5	PCR 常用技术	(211)
9.6	免疫 PCR 技术的应用	(217)
9.7	PCR 临床应用领域	(220)
 第 10 章 其他免疫技术及免疫技术新进展		(222)
10.1	非标记免疫反应	(222)
10.2	免疫技术新进展	(228)
 第 11 章 免疫诊断试剂常用仪器与设备		(233)
11.1	酶标仪	(233)
11.2	发光免疫分析仪	(234)
11.3	荧光分光光度计	(237)
11.4	点金标机	(239)
11.5	可编程切条机	(240)
11.6	金标免疫定量分析仪	(241)
11.7	洗板机	(242)
 第 12 章 生物危害与安全防护		(244)
12.1	生物安全的含义	(244)
12.2	生物安全性评价	(248)
12.3	生物危害的防护措施	(249)
12.4	国内外生物安全法规	(253)
 第 13 章 诊断试剂的质量评价		(262)
13.1	室间质量评价的意义	(262)
13.2	诊断试剂质量评价的基本概念	(263)
13.3	室内质量控制	(266)
13.4	室间质量评价	(272)
13.5	空间质评结果评定	(273)
 第 14 章 体外诊断试剂的质量监管		(287)
14.1	外诊断试剂在临床中的重要作用	(287)
14.2	体外诊断试剂发展历程	(288)
14.3	国内外体外诊断试剂发展概况	(289)

14.4	体外诊断试剂的注册管理	(290)
14.5	药品生产质量管理规范(GMP)	(298)
14.6	体外诊断试剂生产企业的质量体系基本要求	(303)
14.7	GMP 与 ISO9000 的比较	(308)
参考文献		(310)

第1章 标本的采集与保存

1.1 血液标本的采集与处理

1.1.1 概述

血液是由占45%的血细胞（红细胞、白细胞、血小板）和占55%的血浆（plasma）组成的红色黏稠液体。正常成人的血液总量占体重的6%~8%，成人平均约5000mL（妊娠期血量可增加23%~25%）。血液的红色来自红细胞内的血红蛋白，因红细胞含氧量不同而异。含氧量多的动脉血呈鲜红色；含氧量少的静脉血呈暗红色。血浆（或血清）因含少量胆红素，呈透明淡黄色；如含乳糜微粒，则呈乳白色混浊；如发生溶血，则呈红色。血液不加抗凝剂而自行分离出来的黄色透明液体为血清（不含纤维蛋白原），加抗凝剂后所分离出来的黄色透明液体称血浆（含纤维蛋白原）。血浆中水分占91%~92%，固体成分占8%~9%，包括7%的蛋白质（白蛋白、纤维蛋白原、球蛋白、凝血酶原等）；0.9%的无机盐类（钠、钾、氯、钙、镁、磷等）；其他约占0.8%，如非蛋白氮（尿素、尿酸、肌酸、肌酐等）、脂肪、磷酸类、胆固醇、葡萄糖、激素、维生素、抗体、酶等。血液的比重为1.050~1.060，pH值为7.35~7.45，相对黏稠度为4~5，正常人血浆在标准状态下，渗透压为678.88kPa，在37℃时为770.07kPa，与0.9%氯化钠溶液的渗透压相等。

血液通过循环系统与全身各组织器官密切联系，参与机体气体交换、运输、防御、调节渗透压和酸碱平衡等各项生理活动，维持机体正常新陈代谢和内外环境的平衡。临床血液学检验是采用各种实验室手段分析和研究血液的病理变化，从而阐明血液系统疾病的发生机制，协助诊断、治疗观察和判断预后的一门科学。血液检查一般可分为细胞成分的检查（即通常所说的血液常规检查）和血浆血清成分的检查（即生物化学、免疫学、血凝学、内分泌学等分析范围）。

1.1.2 血液标本的采集与保存

为了获得准确、可靠的血液检验结果，必须注意和标本的采集与保存有关的影响化验结果的因素。只有正确地采集血液标本，才能保证血液检验结果的准确性。

1.1.2.1 血液标本的采集

（1）血液标本采集前应考虑的因素

1）情绪：紧张与生气可影响神经内分泌系统，使儿茶酚胺、皮质醇、血糖、白细胞、中性粒细胞等增高。

2) 饮食: 普通进餐后, 血甘油三脂将增高 50%, 血糖增加 15%, 丙氨酸氨基转移酶及血钾增加 15%。高蛋白膳食可使血尿素、尿酸及血氨增高; 高脂肪饮食可使甘油三酯大幅度增高, 被采血者当天饮食, 巧克力对脂肪血影响程度最大, 且食后造成的脂肪血在血液内停留时间大于 4h; 肉制食品及豆浆、油饼对脂肪血有很大的影响; 采血前应控制此类饮食; 牛奶对少数人 (40%) 有轻度影响, 且食后 2h 内采血不会造成脂肪血; 鸡蛋对脂肪血无影响; 高核酸食物 (如动物内脏) 可导致尿酸明显增高。

3) 饮酒: 长期饮酒者可导致丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、 γ -谷氨酸转移酶增高; 慢性酒精中毒者, 其血中胆红素、碱性磷酸酶、甘油三酯等增高。

4) 吸烟: 长期吸烟者血中白细胞计数、血红蛋白浓度, 碳氧血红蛋白、癌胚抗原等增高; 而免疫球蛋白 G 则减低, 血管紧张素 I 转换酶活性减低。

5) 药物

①非成瘾性

A. 乙酰水杨酸及其代谢产物因具有还原性, 可干扰 Trinder 反应导致检验结果减低;

B. 右旋糖酐干扰双缩脲法测定总蛋白, 使结果假性增高;

C. 汞化合物与氟化物可抑制尿素酶活性, 均致尿素假性减低;

D. 维生素 C、高浓度葡萄糖和一些抗生素可与碱性苦味酸反应, 引起肌酐增高;

E. 大量含氟、溴或碘离子药物治疗时, 可使血清氯偏高;

F. 长期口服避孕药可诱导肝细胞内酶合成增加, 而使 ALT 升高。

②成瘾性药物

A. 吗啡: 可使血淀粉酶、脂肪酶、丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶活性增高, 又使胆红素、胃泌素、促甲状腺素 (TSH)、催乳素增高, 而引起胰岛素、去甲肾上腺素、神经紧张素及胰多肽水平减低;

B. 大麻: 可增高血中钠、钾、氯、尿素、胰岛素浓度, 减低血肌酐、血糖及血尿酸;

C. 海洛因可使 PCO_2 、甲状腺素、胆固醇、血钾增高, PO_2 及清蛋白则减低。

6) 运动: 强烈的肌肉运动可明显地影响机体代谢, 使丙酮酸和乳酸明显升高, 影响 ALT 的测定。

7) 当卧位变为坐位或站位时, 体内水分由血管流向间质。大分子物质不能滤过进入组织, 在血液内浓缩, 脂肪酶和蛋白质结果会明显增高。

8) 在月经周期的 3 个不同时期, 与生殖有关的多种激素将产生不同的变化。纤维蛋白原在月经前期开始增高, 血浆蛋白质则在排卵时减低; 胆固醇在月经前期最高, 排卵时最低。

(2) 标本种类及收集方法

要获得高质量的标本, 临床医师应主动告诉患者如何配合好; 护理人员负责规范的标本采集; 运输人员要及时快速规范地转运好标本; 检验人员在实验室进行规范的标本检测、检验结果审核和报告发放。

最好做到: 其一, 采集标本前医师应认真、完整地填写检验申请单, 包括一般内容

及患者服药史、特殊病理变化、留取标本、送检标本的时间等。其二，医护人员应了解在标本采集前影响结果的非病理性因素，正确指导患者，采取切实措施，规范采集标本前患者的一切行为，保证采集的标本符合疾病的实际情况，留取合格的标本。应告诉患者：试验名称、所需标本类型、为什么要检测、检验前注意事项（如是否空腹、药物影响情况和采取措施、标本采集时间要求、生理情况如饮食习惯、烟酒嗜好、运动对结果的影响及采取措施等）、检测报告时间、如何获得结果等。其三，保证足够合格的采血人员、标准化的采血程序、合格的采血器材，标本采集容器上必须有唯一性标识（如条码）。

一般血液标本的种类分为：全血、血浆、血清、分离或浓缩的血细胞成分。全血又分为毛细血管全血标本、静脉全血标本、动脉全血标本。

按照检验目的不同，采用不同的采集部位和方法。

（1）毛细血管全血（皮肤采血）：多用于细胞记数、血红蛋白测定及仅需微量血液的检验或婴幼儿。

①部位：WHO 推荐取左手无名指指尖内侧血液做血常规检验。针刺后若流血不畅，可于穿刺点四周稍加压力。取血完毕后，用消毒干棉球稍加压穿刺伤口，以防流血；婴幼儿则可在足跟或拇趾上采血。严重烧伤病人，则视具体情况，选择皮肤完整部位采血。

②采血方法：用75%酒精棉球或用棉签蘸5%聚维酮碘溶液（又称碘伏）对左手无名指指尖进行环行消毒，待干，用左手的拇指和示指固定采血部位，右手持无菌采血针迅速刺入组织，深约3mm，取出刺针，血液自行流出后，再用消毒干棉球擦去第一滴血；如血流不畅，可于离刺孔较远的四周稍加压力；但切忌在刺孔近处用力挤压，以免组织液混入血液影响结果。用血红蛋白吸管吸取所需量血液做检验用。采血顺序依次为：血小板记数、红细胞记数、血红蛋白检验、白细胞记数和血型等。

③注意事项：出血不止时，可用无菌干棉球压迫止血；皮肤消毒后一定要待乙醇挥发，干燥后采血，否则血细胞被乙醇破坏，且因血液会四处扩散，不易成滴造成采血困难。

（2）动脉全血：主要用于血气分析，采血部位有股动脉；肱动脉和桡动脉。

①器材准备：2mL或5mL干燥注射器（以玻璃注射器为佳）、1000U/mL 无菌肝素生理盐水溶液、橡皮塞、消毒器材等。

②选择动脉：多选用桡动脉（最方便）、股动脉、肱动脉。

③采血方法：以血气分析标本为例，常规消毒患者皮肤及操作者左手食指、中指后，以左手绷紧皮肤，右手持注射器，用左手示指触摸动脉搏动处，以60°进针。动脉血有较高的压力，会自动注入针筒内，至2mL后拔出针头，嘱患者按压采血处（穿刺点）止血10~15min。立即用软木塞或橡皮塞封闭针头（针头斜面埋入橡皮中即可），以隔绝空气，搓动注射器，使血与肝素混合，并立即送验。

④注意事项：A. 避免空气：用于血气分析的标本，采集后立即封闭针头斜面，再混匀；B. 立即送验：标本采集后应立即送检，若不能，则标本应置于2~6℃保存，但不应超过2h；C. 防止血肿：采血完毕，拔出针头后，嘱患者用消毒干棉签按压采血处止血，不要揉，以防形成血肿。

（3）静脉全血：来自静脉的全血，血液标本应用最多。过去的静脉血采集主要采

用注射器采集法。随着血源性传染疾病的日益加剧,标本采集方法和产品的安全性日益受到医务工作者的关注。

为了解决传统标本采集方法所存在的种种弊端,人们经过长期的研究,标本采集技术不断完善和发展。目前多数实验室的静脉血采集均已采用真空采血系统(该系统由标准双向采血针头、配套持针器、无菌真空采血管组成),采血时,该系统中双向针的一端在持针器的帮助下刺入静脉,另一端插入真空采血管内,采血管中预置真空度可以准确控制采血量,与预置的适合不同实验、含量准确的相应添加剂共同作用,可保证添加剂与采血量的准确比例。血液标本在采集、混匀、运输、分类、离心整个操作过程都处于完全封闭状态,不仅安全而且严格控制了试验前影响因素。

真空采血管从根本上改变了注射器采血的各种弊端,推动了临床静脉血样采集技术的发展。标准真空采血管是采用国际通用管盖识别颜色规则的(蓝色→1:9枸橼酸钠管,黑色→1:4枸橼酸钠管,紫色→血常规管,绿色→肝素管,灰色→血糖管,黄色→促凝管,淡黄色→分离胶促凝管,红色→无添加剂),清晰指示采血管内添加剂种类和试验用途,便于采血人员准确辨认和使用。真空采血管侧面标签内容包括:添加剂种类、采血量、是否无菌、生产批号、失效日期、生产商和品牌名称。真空采血管管盖(安全头盖),有效避免了医务人员或患者在标本采集、运输、分发、前处理过程中接触血样的危险性。关于静脉采血针专用收集盒(桶)用硬质高分子材料,装满污染针头后可利用锁死装置完全封闭,直接高压焚烧,彻底杜绝针头重复使用和扎伤采血师或清洁工人所导致的血源性传播疾病的发生。持针器可以重复使用,若持针器被污染,应立即停用并严格消毒或弃置。

(4)下面我们将从两种方法来进一步阐述采血法,那就是普通采血法和真空采血管采血法。

①普通采血法

A. 部位:一般采用上臂静脉,肘正中静脉是最常用的静脉采血部位,因为肘正中静脉往往比较粗大、表浅,穿刺成功率相对较高,对患者造成的痛苦最小。其次是贵要静脉。当所有静脉都不明显时,应采用食指或中指触摸感觉静脉的位置决定穿刺点。让患者握拳可以使静脉更明显。如果需要,也可以使用身体其他部位的静脉,如手和腕的静脉。小儿可用颈静脉采血。必要时还可从股静脉、大隐静脉、锁骨下静脉、脐旁静脉等处采血。但从这些部位采血,必须在有经验者指导下进行,或由临床医生采集,以免发生意外事故。

B. 采血操作步骤:以肘静脉取血为例:

a. 首先选择适宜静脉,在上臂扎上压脉带,用75%酒精棉球或5%碘伏从内向外,对欲刺部位的皮肤进行环形消毒,嘱患者紧握拳头,使静脉显露。一般应选择粗直、弹性好且容易固定的静脉进行穿刺,每个人的静脉的深浅不一致,静脉深者,完全是靠手指去触摸,对于触摸不明显的只能靠经验,根据解剖位置进行穿刺。

b. 取无菌注射器,检查针头是否接牢,有无阻塞和漏气。左手拇指固定静脉穿刺部位的下端,右手持注射器,使针头斜面和针筒刻度向上,沿静脉正面将针头与皮肤成30°角先向血管旁刺入皮下,触及管壁后,再顺血管平行刺入静脉腔内,见回血后,立

即固定注射器,以免针头滑出血管。此时用左手缓缓抽动注射器针栓,至所需血量后解除止血带,放松拳头,用无菌干棉球压住穿刺部位,拔出针头。在针孔处进行局部按压3~5min进行止血。注意不要揉,以免造成皮下血肿。

c. 取下针头,将血液沿试管壁缓慢注入试管内,任其凝固。待血块收缩后,即可分离出淡黄色透明的血清。如果需要全血或血浆,则将血液注入事先准备的抗凝管中,轻轻混匀,防止凝固,即为抗凝血。经适当离心沉淀后,淡黄色上清液即为血浆。血清和血浆的主要差别是,血清中失去了纤维蛋白原。

d. 注意事项:其一,试管不干燥,不清洁,穿刺不顺利致损伤组织过多,抽血速度太快,血液注入容器时未取下针头或产生大量泡沫,过分振荡,均可造成溶血,应予以避免。其二,止血带过松或过紧影响抽血速度,过紧可造成深部动脉血流循环受阻,过松造成表浅静脉充盈不足。其三,注射器与针头应紧密衔接,勿使漏气。抽血前,应检查针尖是否锋利或带钩。其四,抽血时进针不要过深,以免穿破血管,造成皮下血肿。将针尖斜面和注射器刻度向上。其五,由于穿刺时易引起迷走神经兴奋、血管痉挛出现血管弹性不足,引起静脉塌陷,此时可放松或松开止血带,让献血者握拳即可。其六抽血时,只能外抽不能内推,以免注入空气,形成气栓,造成严重后果。采血前应;向患者耐心解释,消除不必要的顾虑和恐惧心理。如遇个别患者采血后发生眩晕,可让其平卧休息片刻,即可恢复,亦可拇指掐(或针刺)人中和合谷穴,或吸芳香氨酊。

②真空采血管采血法

国际标准真空采血在基本技术上与传统注射器采血大同小异,步骤如下:

A. 准备器材:采血针、持针器、采血管、压脉带、75%酒精棉球或碘伏棉球、无菌干棉签或棉球;

B. 部位:同注射器采集法;

C. 采血操作步骤:

a. 确定患者身份,采血者首先带上一次性手套,同时保护好自己和患者。协助患者摆好姿势,一般门诊患者宜采取坐位,病房宜采取卧位,患者应处于心理平静和空腹状态。

b. 用75%酒精棉球或5%碘伏静脉穿刺点为中心从内向外进行环形消毒,消毒范围的直径为3~5cm。消毒等待过程中防止接触此处皮肤,否则静脉穿刺点可能被污染,必须重新消毒。注意,采集血培养标本时还要给采血管和培养瓶穿刺部位消毒。

c. 患者采取坐姿,上身与地面垂直,肘部置于稳固的操作台面,采用枕垫置于肘关节下,使患者上臂与前臂呈直线,使肘部静脉伸直,在距离消毒部位上方5~7cm处绑上压脉带,应松紧适度,充分暴露静脉穿刺点。拧松并轻轻除掉针头保护用彩色硬质封套,在进针前用一只手握住患者手臂,另一只手的拇指和食指持穿刺针,沿静脉走向使针头与皮肤成30°角,快速刺入皮肤,然后成5°角向前刺破静脉进入静脉腔,见回血后,让患者松开拳头,将双向采血针的另一端直接刺入真空采血管盖中央的胶塞中,使管内真空与患者静脉相通,松开压脉带,单手继续固定持针器,管内真空自动将血标本缓缓柔和地吸入采血管,待真空耗尽,血流自行停止。

d. 观察采血管内液面波动,血液完全停止后,单手严格固定持针器,另一手拔出

采血管并立刻颠倒 5~8 次。如果需要采多管血，再向持针器内插入另一根采血管，然后重复相应步骤。当采集多管标本时，应按以下顺序：血培养瓶/血培养管→红头管→浅蓝头管→含添加剂的其他采血管（绿头管、紫头管、灰头管）→SST 金黄头管。

e. 采血完毕，用干净棉球或棉签压迫静脉穿刺点，拔出穿刺针，然后退出带针持针器，出针时用棉签轻按穿刺处，轻轻沿穿刺方向将针拔出，然后嘱咐患者加压 5min 使静脉闭合。

f. 当完成患者的静脉血液采集和采血管标记等全部操作后，需要更换包括手套在内的所有一次性相关采血物品和器械。全部废弃物均应根据国际通用安全操作规程或所在机构的规定弃置在合适的污物容器内。

g. 血样采集成功后，应尽快送检。

D. 注意事项：

a. 采血时间尽可能安排在上午 7:00~9:00 之间进行。患者在采血前应禁食 8~12h；

b. 采血应尽量避免静脉输液的干扰。若患者手臂上有一个或多个静脉输液装置，首先应考虑在静脉输液装置的对侧采血；若患者双臂都在进行静脉输液或对侧手臂不适合穿刺（如有血肿或血管太细），可以从尽量远离静脉输液部位的远心端采血，减少血样污染的可能。若这些部位不可能找到一个适合静脉穿刺的部位，可以在征得主管医师允许后从患者的脚面或踝部采血（对糖尿病患者可能会造成穿刺部位的严重感染，也可能形成血栓，造成肢端循环不良）；

c. 对于婴幼儿或儿童患者，应努力使孩子和家长的的精神放松；而对于为隔离病区的患者采血，要遵循所在医疗机构的隔离操作规程。采血时除了携带该患者所需的全套采血器械。一般要多带一套备用的采血针、采血管和持针器，为某项试验采血失败后免于再次进出隔离病房而做好积极备份。

d. 尽可能缩短压脉带使用时间，一般应控制在 2min 以内。在做皮肤消毒时，应解开压脉带，穿刺时再绑上。

e. 采血过程中，采血管的底部应始终低于采血针前端，防止管内添加剂或血液接触采血针后端；

f. 在日常采血工作中，有时会遇到采血量达不到采血管预设的容量，或应该见到回血却见不到回血，此时有两种可能，其一是由于针头穿刺斜面时顶在静脉内壁上，阻断了血流，若是这种情况，只要将持针器沿顺时针转动 90°，血流就会通畅；若在采血的过程中血流突然中断，则可能是因为患者静脉压太小，静脉塌陷所致。此时，应嘱患者缓缓握拳松拳，促进血流恢复。其二，则是采血管插入持针器时偏斜，而造成管盖不能被双向针的后端针头穿透，即采血管并没有和患者的静脉相通，此时，需要在固定持针器的前提下调整穿刺角度，或将采血管拔出后重新插入，若仍无效，则需重新换一个新的采血管。

1.1.2.2 血液标本的保存

血液标本保存应当在规定的时间内、确保标本特性稳定的条件下，按要求分为室温

保存、冷藏保存、冷冻保存。

(1) 分离后标本。若不能及时检测或需保留以备复查时,一般应置于4℃冰箱,部分需保存1个月的检测项目标本,存放于-20℃冰箱;需要保存3个月以上的标本,分离后(包括菌种)置-70℃保存。标本存放时需加塞,以免水分挥发而使标本浓缩。标本应避免反复冻融。

(2) 立即送检标本。如血氨(密封送检)、红细胞沉降率、血气分析(密封送检)、酸性磷酸酶、乳酸及各种细菌培养,特别是厌氧菌培养等标本

(3) 检测后标本。检测后标本不能立即处理掉,应根据标本性质和要求按照规定时间保存,以备复查需要。急诊标本、非急诊标本须妥善保存,在需要重新测定时,确保标本检索快速有效。保存的原则是在有效的保存期内被检测物质不会发生明显改变

(4) 标本信息的保存。保存检验标本时应包括标本信息的保存,且与分离的血浆或血清标本相对应。

1.1.3 血液的抗凝

应用物理或化学的方法,除掉或抑制血液中的某些凝血因子,阻止血液凝固,称为抗凝。能够阻止血液凝固的化学试剂或物质,称为抗凝剂或抗凝物质。临床检验常用的抗凝剂如下。

1.1.3.1 枸橼酸钠

能与血液中的钙离子形成可溶性螯合物,从而阻止血液凝固。常用于临床检验的各项实验,其使用浓度有以下几种。

(1) 0.106mol/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$,是一般常用浓度,如做血型检查等。其配方为:31.3g/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ 。采用抗凝剂与血液比例是1:9用于凝血功能测定。

(2) 0.105mol/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$,配方为:30.88g/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$,是国际血液学标准化委员会建议魏氏法血沉测定用。

(3) 0.109mol/L, $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$,配方为32.00g/L,是凝血象检查常用浓度。由于枸橼酸钠毒性小,也用输血保养液的成分之一。枸橼酸钠抗凝剂由于已稀释不适于细胞的计数。

1.1.3.2 乙二胺四乙酸盐(EDTA)

常用的钠盐($EDTA - Na_2$)或钾盐($EDTA \cdot K_2 \cdot 2H_2O$),能与血液内的钙离子结合成螯合物,从而阻止血液凝固。对血细胞形态和血小板记数影响很小,适用于多项血液学检查,尤其是血小板记数。因钠盐溶解度明显低于钾盐,有时影响抗凝效果,根据国际血液学标准化委员会的建议,血细胞分析仪分析血细胞用 $EDTA \cdot K_2$ 作抗凝剂。用量为 $EDTA \cdot K_2 \cdot 2H_2O$ 12~22g/L浓度(或终浓度为1.5~2.2mg/mL血液)在室温或温箱中待干后备用。EDTA影响血小板聚集,不适合于凝血象检查和血小板功能试验。EDTA浓度过高能引起红细胞和白细胞皱缩及变性。

1.1.3.3 肝素

肝素是生理性抗凝剂，广泛存在于肺、肝、脾以及肥大细胞和嗜碱性粒细胞的颗粒中，它是一种含有硫酸基团的黏多糖，相对分子质量 15000。带强大负电荷，具有多方面的抗凝作用，主要是加强抗凝血酶Ⅲ灭活丝氨酸蛋白酶的作用，从而阻止凝血酶的形成，并有阻止血小板聚集等多种抗凝作用。

通常用肝素粉剂，配成 2g/L 水溶液，取 0.5mL（相当于 100U）置试管中，放 37~50℃ 烘干后能使 5mL 血液不凝固。肝素钠抗凝血试管的制备：取 0.9% 生理盐水配好的 300IU/mL 肝素钠 100 μ L 滴入干燥洁净的试管内，加血 3.0mL，轻轻混匀，离心即得血浆。

肝素具有抗凝能力强，不影响血细胞体积，不引起溶血等优点，是一种较好的抗凝剂。但过量的肝素会引起白细胞凝集，不能用于白细胞计数，还可使血片染色后背景成淡蓝色，不适于作白细胞分类。肝素抗凝血应于短时间内使用，否则搁置过久，血液又可发生凝固。肝素抗凝剂不适于血涂片和白细胞计数以及血小板计数。

1.1.3.4 草酸盐

常用的有草酸钾、草酸钠、草酸铵，它们溶解后的草酸根与标本中的钙离子形成草酸钙沉淀，使钙失去凝血功能。

除用化学方法抗凝外，亦可用物理方法脱纤维蛋白。即将血液注入盛有玻璃球的容器中，不停地转动，使纤维蛋白缠绕凝固于玻璃球上，从而防止血液形成凝块，此血液适用于免疫学检验和红斑狼疮细胞检查等。

草酸盐抗凝的优点是溶解度好，价廉。2mg 草酸盐可抗凝 1mL 血液。草酸钠通常用 0.1mol/L 浓度，与血液按 1:9 比例使用，过去主要用于凝血象检查，通过实践发现，草酸盐与钙离子结合后形成的沉淀物，影响自动凝血仪的使用，因此，在测定凝血功能时应选择枸橼酸盐。草酸钾或草酸钠可使红细胞缩小，而草酸铵可使红细胞胀大，二者适当混匀后（一般用草酸钾和草酸铵，也叫双草酸盐抗凝剂），恰好不影响红细胞形态和体积，适用于血细胞比容、血细胞记数、血液指数计算、网织红细胞记数等检查。但双草酸盐可引起血小板聚集，并影响白细胞形态，故不用于血小板记数和白细胞分类记数。

1.1.3.5 脱纤维蛋白法抗凝血

即将血液注入盛有玻璃珠的容器中，不停地转动，使纤维蛋白缠绕凝固于玻璃珠上，从而防止血液凝固，这种抗凝方法分离的抗凝血叫脱纤维蛋白血。主要用于制备血培养基，以及不能用抗凝剂的血液标本的抗凝，如红斑狼疮细胞检查。

1.1.4 血液标本运送与处理

处理血液标本时应特别注意：其一，把每一份标本都看做是无法重新获得、唯一的标本，必须小心地采集、保存、运送、检测和报告；其二，严禁直接用嘴吸取标本，避免标本与皮肤、黏膜接触或污染器皿的外部 and 实验台；其三，要视所有的标本都有传染

性。对于乙型肝炎、艾滋病患者血液标本等，要注明标识；其四，检验完毕，标本必须消毒处理，盛装标本的容器均要进行高压消毒、毁型、焚烧等。

1.1.4.1 血液标本运送

采血完成后，应尽量减少运送和保存时间，尽快处理，尽快检验。

(1) 唯一标识原则。采集后的血液都应具唯一标识，除编号之外，还包括患者姓名等最基本的信息。目前，解决唯一标识最好的方式是应用条形码系统。

(2) 生物安全原则。血样是具有生物危险性的物质，即使是近距离的运送，若采用普通试管收集血样，必须注意避免血样外溅，应使用可以反复消毒的专用容器运送。若采用真空采血管收集血样，就可以避免这样的问题。特殊标本应有特殊标识字样（如剧毒、烈性传染等）的容器密封运送。必要时，还应使用可降温的运送容器。

(3) 尽快运送原则。标本尽快检验，符合检验质量要求和临床诊治的需求。若标本不能及时转运，或欲将标本送到上级检验中心进行分析时标本待检时间预计大于2h，应该在采血后1h内将血样离心，制成血浆或血清，血涂片应该在采血后2h内完成。运送血清和血浆时，应用清洁、不易破碎的容器严密包装，并置冷藏箱内运送。运送过程中应避免剧烈震荡和日光直射，标本在运送过程中应处于完全封闭状态，对光敏感的标本（如胆红素、维生素A检测）在运送过程中及试验前应注意避光。

1.1.4.2 标本拒收

在检验前，对确认不符合血液采集规定要求的标本，应拒绝接收。标本拒收常见原因包括：患者信息不全、血液采集容器不当、采血量不准、溶血、抗凝标本出现凝固、储存温度不当、转运条件不当、申请和标本标签不一致、标本污染、容器破损等。标本拒收不但可造成检验费用增高和时间耗费，还可由于测定出不准确的结果而危害患者。因此，对所有涉及标本采集的工作人员，都必须在标本采集、转运和处理各个环节进行全面的培训。

1.1.4.3 血液检验前预处理

(1) 分析血清或血浆。标本采集后就应及时采用离心法分离血清或血浆。加抗凝剂血液，应立即离心分离血浆；无抗凝剂的血液分离血清时，则应置于室温或37℃水浴箱内一段时间，待血块部分收缩，出现少许血清时才能离心分离。血清或血浆离心次数越多，标本溶血的现象越明显，所以所有的血清或血浆标本只能离心一次。

(2) 分离细胞。分离细胞原则上先是根据各类细胞的大小、沉降率、黏附和吞噬能力加以粗分，然后依据调查不同的检验目的，加以选择性分离。

(3) 混匀血样标本。全血试验标本在试验前必须混匀。

1.1.4.4 检验后血液标本的处理

根据国家标准《实验室生物安全通用要求》(GB19489-2004)，实验室废弃物管理的目的如下：①将操作、收集、运输、处理及处理废弃物的危险减至最小。②将其对环

境的有害作用减至最小。因此,检验后废弃的血标本应专人负责处理,根据《医疗废物管理条例》用专用的容器或袋子包装,由专人送到指定的消毒地点集中,一般由(专门机构)采用焚烧的办法处理。

1.2 尿液标本的收集与处理

1.2.1 概述

尿液是血液经过肾小球滤过,肾小管和集合管重吸收和排泌所产生的终末代谢产物。尿液是具有重要意义的排泄物,尿液的组成及含量的变化,不仅能反映泌尿系统及周围组织器官病变,而且能反映血液、循环、内分泌、代谢系统及肝、胆功能,反映局部和全身疾病情况,并且为临床疾病的诊治及预后判断也有重要的参考价值。

为了保证尿液检测结果的可靠性,就要正确、合理、规范地采集和处理尿液标本。不合格的尿液标本的检测 results 并不能反映被测试者的真实状况,即使使用质量最好的诊断试剂、最好的检验仪器以及最优秀的检验人员,也无法弥补尿液标本在收集、处理、保存以及运送过程中的差错。所以,必须制定出书面的,详细规定尿液标本收集中各个环节的标准文件,并将文件分发给相关人员。影响检验质量的重要流程是:提出检验申请→患者按要求准备→尿液标本收集→运送到实验室及室内传送→分析检验结果。

1.2.2 尿液标本的收集与保存

只有正确地收集尿液标本,才能保证尿液检验结果的准确性。

1.2.2.1 标本种类及收集方法

尿液临床检验的标本,应根据需要而定。详见表 1-1。

表 1-1 不同时间段尿液适用于不同的检查目的

标本类型	应用范围
随机尿	常规筛查
晨尿	常规筛查、妊娠试验、直立性蛋白尿
餐后 2h 尿	糖尿病检测、葡萄糖试验
葡萄糖耐量试验	与血液标本一起作尿糖耐量
24h 尿	化学成分定量
导尿	细菌培养
中段清洁尿	常规筛查、细菌培养
穿刺尿	细菌培养、细胞学检查
三杯试验标本	尿道炎、前列腺炎、膀胱炎

(1) 随机尿。即留取任何时间的尿液,使用这种标本,可能会出现尿液成分的相当大的变化,因而不能准确反映被测试者的状况,但因为随机尿标本新鲜、易得、不失

为最适合门诊、急诊患者检测的尿液标本。

(2) 晨尿。指清晨起床后的第一次尿液标本,由于该尿液标本在膀胱中的留存时间常达6~8h,浓缩尿显酸性,血细胞,上皮细胞及管型等有形成分在酸性环境中较为稳定,也可避免饮食干扰,保证化学成分检测的准确性。但在晨尿收集前一天,应向被测试者提供收集容器及注意事项。晨尿收集2h内送检,否则应采取适当的防腐措施。应注意的是晨尿中高浓度的盐类冷却至室温可形成结晶,干扰尿液的形态学检查。晨尿标本最适用于泌尿系统有疾病的患者的一般检查及早期妊娠试验等。

第二次晨尿是指收集首次晨尿后2~4h的尿液标本,要求患者在前一天晚上开始到尿收集标本结束,只能饮水200mL,以提高细菌培养及有形成分的计数。

(3) 中段清洁尿。首先留尿前应先清洗外阴,女性应清洗阴道口,男性应清洗龟头,但不能用肥皂洗尿道口,以免影响细菌的生存能力。其次,留中段清洁尿,即弃去前后段排出的尿液,用无菌容器收集中间段的尿液,主要是为了避免生殖道和尿道远端细菌的污染。中段尿一般用于细菌培养,但衣原体,支原体应留取前段尿,且应憋尿3h以上。

(4) 24h尿。早晨起床后,一般在早晨7时,患者排尿后弃去尿液,直至次日早晨7时,计时并留尿于清洁无污染的大容器内(预先加入合适的防腐剂),先准确测量尿量,然后混匀标本,从中取出适量(一般约为40mL)送检,余尿弃去。对于儿童,在收集过程中应避免粪便污染。该标本主要用于定量、代谢测定等。

(5) 三杯试验标本。患者一次连续排尿,分别留取前段、中段、末段的尿液,分装于3个尿杯中。第1、第3杯各留尿10mL,第2杯留其余大部分尿液。该试验多用于泌尿系统出血部位的定位及尿道炎的诊断。

(6) 葡萄糖耐量试验

①目的:测定胰腺功能。正常人服一定量葡萄糖后,血糖随即升高,待一段时间后,血糖恢复到空腹血糖水平。如给一定量葡萄糖负荷后,观察血糖升高、恢复的水平和速度,可间接了解胰岛 β 细胞的储备功能。

②设备:抗凝血标本瓶5个,尿标本瓶5个,静脉穿刺盘1套。

③操作方法:a. 试验前3d,每日碳水化合物进量不少于300g。b. 试验前1天晚餐后禁食至试验完毕;c. 试验日清晨抽血2mL检查血糖,并留尿1次。

④将100g葡萄糖溶于300mL开水中,请病人服下,服后30min、1h、2h、3h各收集尿标本查尿糖,并分别抽血查血糖,应将标本迅速送验。

1.2.2.2 收集尿液标本的容器要求

(1) 送检尿液标本的容器上应有标签,上面标注清楚患者的信息:姓名、性别、年龄、留尿日期和时间、尿量、标本种类及检测项目等,或以条形码做标识。

(2) 容器只限一次性使用,材料与尿液不发生反应,应清洁(菌落计数小于 10^4 CFU/L)。

(3) 容器至少容纳50mL尿液标本,圆形开口直径不小于4cm,底部宽有盖可防止倾翻时尿液溅出,如尿液标本需转运,容器还应为安全且易于开合的密闭容器。

(4) 收集 24h 的尿液的容器的开口要更大, 容积达 2~3L, 且避光。

(5) 尿液如作细菌培养, 应用无菌容器, 对于必须储存 2h 以上才能检测的尿液标本, 同样建议使用无菌容器。

(6) 对于儿科患者, 特别是新生儿, 可使用专用的清洁柔软的聚乙烯塑料袋收集尿液。

1.2.2.3 相关器材的准备

(1) 显微镜: 尽量选用光线强度可调的内置光源显微镜, 具备 40 倍、10 倍的物镜及 10 倍的目镜。

(2) 离心机: 用水平式离心机获取尿沉渣。离心机工作时, 应盖上盖子, 保证安全, 机内温度尽量低于 25℃。

(3) 离心管: 用于尿液沉渣检验的离心管应带刻度, 清洁而透明, 刻度线上应注明 0.2mL、1mL、10mL, 容积应大于 12mL, 试管底部呈锥形或缩窄形。试管口应具有密封装置。离心管最好使用一次性玻璃试管或塑料试管。

1.2.2.4 尿液标本的保存和处理

(1) 冷藏保存法

尿液标本收集后不能马上送检, 或送检后不能马上检验的尿液标本需作 4℃ 冷藏保存。一般可保存 6~8h, 但要避光加盖, 24h 内完成检测的尿液标本不主张冷藏, 冷藏后取出的标本, 半数以上将显示出浑浊, 但只要稍稍加温, 大部分尿液就会恢复澄清状态。

冷冻法保存尿液会造成盐类胶体物质的改变, 故标本融化后不再是透明和均匀的, 而是含有混悬不溶解的固体。因此, 冷冻也不能完全防止尿胆原、胆红素及酮体的损失, 并且会改变或破坏细胞及其他有形成分。

(2) 防腐剂保存法

尿液标本收集后应于 30~60min 内完成检测, 如在 2h 内无法完成检验的, 标本中可加入特定的化学防腐剂, 同时, 尿液标本仍需冷藏。常用的防腐剂有如下几种。

①甲苯: 尿液中加入适量的甲苯, 可在尿液标本表面形成一层薄膜, 阻止尿液与空气接触, 达到防腐效果, 用量: 每 100 mL 尿液加甲苯 0.5 mL。适用于尿糖、尿蛋白等检查。是尿液检验最好的防腐剂。

②甲醛: 又称福尔马林。每 100 mL 尿液加甲醛 0.2~0.5 mL, 对有形成分有固定作用。但由于甲醛有还原性的醛基, 不适于化学成分的检查。

③浓盐酸: 在留取的 24h 尿液中加入浓盐酸 10mL。适用于尿液中激素及化学成分定量检查, 浓盐酸具有极强的腐蚀性, 常温下又易挥发, 所以容器要耐腐蚀、耐压, 并且应嘱咐使用者必须小心, 以免烧伤皮肤, 灼坏衣物, 使用时一定要收集第一次尿液以后再加入浓盐酸。

④硼酸: 每 100mL 尿液中加入 1 g 硼酸, 在 24h 内可抑菌, 适用于保存蛋白, 尿酸等检测标本防腐。

⑤麝香草酚: 每 100mL 尿液中加入麝香草酚小于 0.1g, 既能抑菌, 又能保存有形

成分。可用于尿液显微镜检查,尤其是尿浓缩结核杆菌检查以及尿液化学成分检验的标本保存。但过量的麝香草酚可使尿蛋白出现假阳性,还可能干扰胆色素的检出。

⑥氟化钠:氟化钠能防止尿糖酵解,适用于葡萄糖测定的尿液标本的防腐。

1.2.3 尿液标本收集的注意事项

- (1) 临床医护人员和试验室工作人员应指导患者采用正确的留尿方法。
- (2) 根据不同的实验室要求留取不同种类的尿液标本及采用不同的留取方式。
- (3) 用于细菌培养的尿液标本收集前应避免使用抗生素。
- (4) 女性患者应避免在月经期留取尿液标本,避免阴道分泌物或经血污染尿液,必要时清洁外阴后留取中段尿液。
- (5) 男性应避免精液,前列腺液的污染。
- (6) 收集新生儿、婴幼儿尿液标本时,应由儿科医护人员指导。
- (7) 标本留取后立即送检,以免因光照生长造成化学成分物质和有形成分的改变与破坏。

1.2.4 尿液标本检验后的处理

1.2.4.1 尿液标本

检验后的尿液标本均应视为有传染性的生物污染物,必须经过10g/L过氧乙酸或漂白粉消毒处理后才能排入下水道。

1.2.4.2 一次性尿杯

使用后的一次性尿杯,应先消毒后毁型再烧毁,或送医疗垃圾回收站统一处理,并做好记录。

1.2.4.3 标本容器

如果盛装尿液标本的容器与试管不是一次性的,用完后必须先用10g/L次氯酸钠液中浸泡2h,也可用5g/L过氧乙酸浸泡30~60h,再用清水冲洗干净烘干备用。

1.2.5 尿液标本收集与处理的质量保证

在尿液标本的检验工作中,由于存在诸如:患者状态,饮食,用药,尿液标本存放条件,送检不及时,标识不清楚,试剂未标准化,检验操作不规范等一系列问题,为了保证尿液检验结果的准确性,必须在实验室内建立一系列切实可行的标准操作规程来规范尿液标本的收集与处理,以达到让医患双方都满意的质量保证。

1.2.5.1 生理状态及时间对尿液标本的影响

(1) 生理状态对尿液标本的影响

1) 年龄:不同年龄由于新陈代谢的状态不同,检测的指标也有明显的差异,所以,应设定不同年龄段的参考值,以消除年龄因素对检验结果的影响。

2) 性别: 尿液有形成分参考值男女不同。

3) 情绪: 精神紧张和情绪激动均可影响神经-内分泌系统, 使尿液中儿茶酚胺升高, 严重时可出现生理性蛋白尿。

4) 妊娠: 妊娠期间因 hCG 含量不断变化, 在前七天往往难以检出, 之后开始升高。而妊娠后期, 由于产道微生物代谢物的污染, 尿液中白细胞定型检查往往出现假阳性。

5) 月经: 月经周期尿液中红细胞常常出现假阳性。

(2) 生活习惯对尿液标本的影响

1) 饥饿: 长期饥饿可使尿酸升高, 酮体增加。

2) 饮食: 高蛋白饮食可使血尿素、尿酸升高; 高核酸食物可致尿酸明显增多, 多食番茄、香蕉等, 可使尿中 5-羟吲哚乙酸的排泄增加, 某些餐后尿糖会增高, 短时间内大量吃海鲜导致尿酸急剧升高。

3) 饮酒: 长期饮用啤酒者尿酸增高。

4) 运动: 运动会使人体的各项生理功能都处于一种与静止时完全不同的状态, 也会导致体内多项检测指标发生改变。

(3) 保存温度及保存时间对尿液标本的影响

随着保存时间的延长, 尿中有形成分将会有不同程度的破坏, 细胞、管型会逐渐减少, 而结晶、细菌则逐渐增多 (见表 1-2)。

表 1-2 在不同时间间隔及不同温度下尿红细胞、白细胞和管型检测结果的变化

时间	RBC/ μ L (18~30℃)	RBC/ μ L (6℃)	WBC/ μ L (23~25℃)	WBC/ μ L (6℃)	颗粒管型/LP (28~30℃)	透明管型/LP (28~30℃)
立即	1706	1706	333	333	32	28
2h	1620	1682	300	310	28	25
4h	1148	1311	147	268	20	12
6h	1080	1252	111	221	15	7
8h	780	1040	76	132	9	3

1.2.5.2 理化因素对尿液标本的影响 (见表 1-3)

表 1-3 一些理化因素可干扰尿液标本的检验出现假阳性或假阴性

项目	假阳性	假阴性
红细胞	过氧化氢、肌红蛋白尿、不耐热酶	甲醛、高比重尿 (>1.020)、维生素 C (100mg/L) 高蛋白尿
白细胞	福尔马林、胆红素尿、呋喃坦啶	高比重尿 (>1.020)、庆大霉素、高浓度草酸
葡萄糖	过氧化氢	高比重尿 (>1.020)、维生素 C (750mg/L)、乙酰乙酸 (400mg/L)、大剂量青霉素、长期服用左旋多巴
尿蛋白	碱性尿、季胺盐	大剂量青霉素、本周蛋白、黏蛋白

续表

项目	假阳性	假阴性
尿胆原	胆红素、酚噻嗪	阳光照射、服用对氨基水杨酸
胆红素	大剂量氯丙嗪	阳光照射、亚硝酸盐、维生素 C (250mg/L)
酮体	苯丙酮酸尿、BSP、左旋多巴、头孢类抗生素	
亚硝酸盐	长时间放置被细菌污染	维生素 C

1.2.6 尿液标本收集的质量控制

1.2.6.1 文件准备

为了保证尿液检验结果的准确可靠,必须在实验室内制定出一套尿液标本收集操作规程。

(1) 患者准备

1) 控制情绪、饮食、活动、用药、月经等因素影响。

2) 实验室工作人员提前将尿液标本收集的相关要求和注意事项以适当的方式(书面)通知患者,取得患者的配合,从而使采集的尿液标本尽可能少的受各种非疾病因素的影响,保证标本客观反映当前的疾病状态。尿液与其他标本的检验一样,依据不同病情有针对性地选择检验项目。患者应在检验申请单上详细填写基本信息。检验目的,送检日期等,钢笔填写,字迹清晰,不得涂改。

(2) 器材准备

用于收集尿液标本的容器如一次性尿杯,试管应按严格要求标准采购,清洁无裂痕;离心机等仪器应定期校验。

(3) 标本收集

1) 标识:为避免尿液标本在收集处理及送检过程中出现差错,每个尿液标本都要有一个唯一性标识。容器上应有充分的空白处,用来填写包括患者的全名、特有标识码、标本收集日期、时间及容器内所放防腐剂的名称。某些实验室若需要表便包括另外的信息或条形码。为了保证良好的检测,标签应贴在容器上,不可贴在盖子上。

2) 时间:根据检验项目不同选择不同的时间留取尿液标本,在标本容器上必须注明留取时间。

3) 取尿方式指导:实验室人员及医护人员有必要对患者如何留取尿样进行指导,务必使尿道口保持清洁,并根据不同的试验目的,收集不同时期的尿液。

(4) 标本的处理及保存

尿液标本收集后应及时送检,尽量在2h内完成检测,一般不主张添加化学防腐剂。但如果由于种种原因而延误检测的,则应将尿液标本置于2~8℃冰箱内冷藏保存,但时限以小于6h为宜。部分需留取的尿液标本进行检验的项目,则需要在尿液标本中加入10%的浓盐酸,作防腐处理。而不同类型的防腐剂根据不同种类的检测项目慎重选择,否则易造成检测结果假阳性或假阴性的出现。

(5) 标本的运送

为了避免尿液标本在运送过程中因主客观因素造成的检测结果的不准确,应尽量减少运送环节和缩短储存时间。在运送过程中,应保持盛装标本容器直立,平稳,防止标本渗漏侧翻,而造成环境、衣物、器材及其他标本的污染。

(6) 标本的拒收

为保证尿液标本检测结果的准确可靠,出现以下几种情况的尿液标本应拒收,并及时与送检部门相关人员联系,建议其重新收集标本或重新核实标本,而对那些重新收集确实有困难的尿液标本,必须在检验报告上详细注明标本收集不合格的原因及本结果仅供参考,如:

- 1) 收集不足以完成检验;
- 2) 尿液标本由于容器破损而流失;
- 3) 尿液标本标识内容与检验申请单内容不符;
- 4) 尿液标本类型错误;
- 5) 尿液标本中可见粪便及其他污染物;
- 6) 使用了造成与检验项目不准的防腐剂;
- 7) 无特殊注明而超过 2h 的尿液标本。

(7) 标本的检测

严格按照尿液标本收集的标准操作规程,在 2h 内(冷藏标本必须在 6 h 内)运送到检验科,由有经验的检验人员用质量合格的诊断试剂按照相关尿液检验标准操作规程去检测,得出准确可靠的检测结果。

1.3 粪便标本的采集和处理

1.3.1 概述

粪便是食物在体内经消化后的最终产物。食物经口腔、咽、食管进入胃后被消化形成半液体状的食物糜,再由胃进入十二指肠,经胰液、胆汁、小肠继续充分消化,并在消化的同时将已消化的营养成分吸收到血液中,到大肠时,剩余的仅是不能消化的残渣,加上肠道分泌液、黏膜脱落物、细菌等形成粪便,通过直肠由肛门排出体外。

如果消化道发生病变(炎症,出血,梗阻及寄生虫感染)时,就能从粪便表现出来。粪便检验对于了解消化道及通向消化道的器官有无病变,了解消化功能和筛选消化道恶性肿瘤。粪便检验主要包括物理学、化学和显微镜检查等。

1.3.2 粪便标本采集

粪便检验标本采集及送检正确与否,将直接影响检验结果的准确性。不同检验项目应采用不同的采集方法。

1.3.2.1 收集粪便标本的注意事项

- (1) 粪便标本应新鲜,盛装于干燥、洁净、无吸水性,有盖子的容器中;不得混

有尿液或其他物质。

(2) 排不出粪便又必须检测时,可经肛门指诊采集粪便。

(3) 粪便标本有脓血时,应当挑取脓血或黏液部分;外观无异常的粪便,可在表面、深处及粪端多点取材,取3~5g粪便送检;检验阿米巴滋养体,应在排便后立即从脓血部分或稀软部分取材,运送及检查时均需保温,保持滋养体活力以利检出。

(4) 检查蛲虫卵需要用生理盐水棉签或透明薄膜拭子于晚12时或晨排便前,自肛门皱襞处拭取标本,必须立即镜检;在对某些寄生虫及虫卵的检测,初筛结果为阴性时,应连续送检3d,因为许多肠道原虫和某些蠕虫有周期性排卵现象。

(5) 做细菌学检查的粪便标本必须用无菌操作采集于无菌容器内。标本采集后一般应在1h内检查完,否则因pH值及消化酶等因素影响,可导致有形成分的分解破坏及病原菌的死亡。

(6) 粪便隐血试验:当上消化道有出血时,因消化液的作用红细胞被破坏,用肉眼或显微镜检验均为阴性,需要用化学法、免疫法等才能检查出出血,称为隐血,检查粪便隐血的试验称为粪便隐血试验(fecal occult blood test, FOBT)。粪便隐血试验是筛查消化道出血与胃肠道肿瘤有临床重要意义的试验。良性病变粪便隐血试验为间断阳性,而消化道恶性肿瘤时多为持续阳性,阳性率可达95%。其中应注意化学法、免疫法的干扰因素。

1.3.2.2 化学法的干扰因素

(1) 标本因素:假阴性,因粪便标本陈旧而使灵敏度减低,血液在肠道停留过久,血红蛋白被细菌降解,血红素消失。假阳性,粪便隐血来源于牙龈出血、鼻出血、月经血等非消化道出血。

(2) 食物因素:假阳性,因食物含血红蛋白的动物血、肉、鱼、肝脏及含过氧化物酶的叶绿素的新鲜蔬菜。

(3) 药物因素:假阴性,服用大量维生素C或其他具有还原作用的药品;假阳性,使用铁剂、铋剂,引起胃肠道出血的药物如阿司匹林、皮质固醇、非类固醇抗炎药、引起肠炎药物、秋水仙素、罗芙木碱中药。

(4) 操作过程:假阴性,试验反应时间不足,显色判断不准;假阳性,试验前在标本中加水减低灵敏度,而实际上同时增高假阳性。

(5) 器材和试剂:假阴性,过氧化氢浓度低或过氧化氢陈旧失效、试剂保存温度和湿度不当(冰冻、受光、受热、受潮等)可失效;假阳性,器材污染了铜离子、铁离子、消毒剂、溴、铁、硼酸、过氧化物酶。

1.3.2.3 免疫法的干扰因素

(1) 食物因素:各种动物血红蛋白(500mg/L)、辣根过氧化物酶(200mg/L)对免疫法无干扰,故不必限制饮食。

(2) 药物因素:单克隆抗体交体金法具有特异性强、灵敏度高、检测简便等优点;但常人与某些患者服用刺激胃肠道药物后可造成假阳性。

(3) 生理因素：胃肠道每天排出血液 0.5 ~ 1.5 mL/24h，个别可达 3 mL/24h，长跑运动员平均可达 4 mL/24h。服用阿司匹林 2.5g，即可引起消化道出血 2 ~ 5 mL/24h，免疫学检查法粪便隐血可呈阳性。

(4) 标本因素：假阴性见于消化道大量出血，粪便血红蛋白浓度过高，即抗原过剩时，此为后带现象。假阴性见于上消化道出血，如血红蛋白经过肠道消化酶降解变性，丧失原有免疫原性或单克隆抗体与粪便血红蛋白抗原不匹配。

(5) 器材和试剂：试剂盒保存不当、失效等出现假阴性。

(6) 操作过程：直接使用低温保存（15℃ 以下）的标本试验，可出现假阴性结果。

1.3.2.4 脂肪定量试验

(1) 先定量服食脂肪膳食，每天 50 ~ 150g，连续 6d，从第 3d 起开始收集 72h 内粪便，将收集的标本混合称量，从中取出 60g 左右送检。

(2) 简易方法：可在正常膳食情况下收集 24h 标本，混合称量，从中取出 60g 左右送检。

1.3.2.5 粪胆原定量试验

应连续收集 3 d 粪便，每天混匀称重，取 20g 左右送检。

1.3.3 粪便处理

粪便检验后，应将粪便和纸类或塑料等容器用火焚烧；若为玻璃等器皿，应浸泡于消毒液中（如 5% 甲酚皂溶液）24h 后弃消毒液；或用 0.1% 的过氧乙酸处理 12h，将粪便倒入厕所，将容器煮沸 30min，清洗干净，烘干备用。

1.3.4 粪便检验质量控制

1.3.4.1 粪便标本

(1) 容器应干燥、洁净，不含任何消毒剂和化学药物，容器必须有能够密封的盖子，并有明确的标记。盛装后不漏、不溢，且容器外面也应无污染。

(2) 标本必须新鲜，并注意保温。

(3) 标本采集时，应选择其中含脓、血、黏液等异常部分，若无明显的脓、血、黏液成分，最好多部位取材。粪便标本采集量一般以 5 ~ 10g 为宜，特殊检验应按不同的检验项目和要求收集标本。

(4) 标本收集后应在 1h 内完成全部的检验项目。

1.3.4.2 镜检标本制作要求

(1) 收到粪便标本后应选取有脓血及其他异常部分及时制作生理盐水涂片，涂片应混合均匀，薄厚适宜。标本厚度以尚能够透过字迹为宜。查原虫的标本尤其应抓紧时间，尽快检查，并注意标本保暖。室温较低时应将生理盐水及载玻片置 37℃ 温箱预温后再制作镜检标本。

(2) 检查寄生虫虫卵或阿米巴包囊, 最好用浓集法制作镜检标本。

1.3.4.3 检验规则及报告方式

(1) 先用低倍镜(10×10, 视野宽度1.8mm)检视全片。

(2) 寄生虫虫卵分别记数10个低倍视野的虫卵数, 求均值报告(××/低倍镜视野); 细胞以高倍镜(10×40, 视野宽度0.45mm)检查10个视野, 求均值报告(××/高倍镜视野)。原虫检查的标本必须在低倍镜检查的基础上再换高倍镜检查, 仔细观察原虫的结构特征, 确定后再报告。用浓集法查虫卵或包囊时, 必须在报告单上注明其方法。

若所用显微镜的视野宽度与上述要求相差悬殊(1倍以上), 应参照尿沉渣镜检计算K值法对虫卵和(或)细胞检查结果进行校正。

1.3.5 粪便检验质量保证

1.3.5.1 采集与转运的质量保证

(1) 患者准备: 检测前应告知患者停用影响检查结果的药物和食物。

(2) 容器要求: 一般常规检查的粪便标本, 应使用一次性、无吸水性、有盖、无渗漏、无污染物的干净容器, 容器大小应适宜; 细菌培养标本所用容器应无菌, 且应有明显的标志。

(3) 标本要求: 应根据检验目的, 选择最有价值的标本, 如含脓血、黏液或色泽异常的标本送检; 选择合适采集寄生虫和虫卵检查的标本, 送检量尽量多, 避免因标本量不足而造成漏检。寄生虫卵检查应尽量用浓集检查法。

(4) 送检时间: 肠内原虫滋养体, 应立即检查, 冬天应保温送检; 一般常规检查不应超过1h送检, 寄生虫和虫卵检查不宜超过24h。

1.3.5.2 显微镜检查质量保证

(1) 工作人员: 要做好技能培训, 提高专业水平和镜检识别能力, 正确掌握粪便病理成分的形态学特点和鉴别方法, 加强质量意识, 重视粪便检验工作;

(2) 标本涂片: 厚薄保证均匀, 应以能够透视纸上字迹为宜, 加盖玻片。视野应清晰, 必要时涂片应染色。涂片时使用新鲜生理盐水, 避免试剂有杂菌生长;

(3) 显微镜观察: 应按“城墙垛”观察顺序, 先用低倍镜观察全片, 然后用高倍镜观察10个以上视野, 以防漏检。

1.3.5.3 化学检查质量保证

(1) 隐血试验

1) 检测前: 如用化学法隐血试验, 患者必须在实验前3d停止服用引起消化道出血的药物如维生素C、禁止食用动物血、肉、鱼、肝脏及含过氧化物酶的新鲜蔬菜。因出血在粪便中分布不均匀, 故应将在粪便各部位采集的标本混匀后, 在1h内检查完毕。不宜采集直肠指检标本和便池中的标本作粪便隐血试验。

2) 检测中: 强调规范操作, 即严格按试剂盒说明书操作, 作好质量控制。如加热器材会破坏过氧化物酶; 每次试验必须做阴性和阳性质控对照试验; 避免试剂因失效造成假阴性; 判断过氧化氢有效性, 可将过氧化氢滴在血片上, 产生泡沫或滴加重铬酸钾硫酸液显褐色为有效, 否则必须重新配制; 保证试验反应温度。免疫单克隆抗体法, 避免后带现象引起的假阴性, 对明显柏油样标本而检测结果阴性的标本, 应适当稀释标本后再检查。

3) 检测后: 应及时与临床沟通, 尤其是有些重要的检验报告, 如粪便检出霍乱弧菌, 念珠菌等, 核实检验结果与疾病的符合率, 如有不符, 应分析检验前和检验中可能存在影响检验结果准确的因素。

(2) 脂肪定量试验

先定量服脂肪膳食后收集标本; 粪胆原定量标本, 应避免光照, 尿胆原分解。

1.4 精液检查

1.4.1 概述

精液是男性生殖系统的分泌物, 由精子和精浆组成。精子产生于睾丸, 在附睾内发育成熟, 为男性生殖细胞。精浆是由男性附属性腺(精囊、附睾、前列腺、尿道旁腺和尿道球腺)等分泌的混合液, 精浆是精子生存的介质和能量来源, 对精子的存活和生理运动功能有重要作用。正常人一次射精量与射精频度有关, 一般为3~5mL/次射精; 刚射精后精液为灰白色或乳白色, 久未射精可略呈淡黄色; 刚射出的精液具有高度的黏稠性, 呈胶冻状, 由于纤溶酶的作用, 精液离体后5~20min后自行液化; 正常精液pH值为7.2~8.0, 呈弱碱性, 可中和阴道酸性分泌物, 以维持精子的活动力; 正常精液具有一种特有的腥臭味, 这种气味来自前列腺分泌的精氨酸被氧化所致。当睾丸、输精管及其附属腺体的结构和功能损害或发生病变时, 都能影响精液质量。此外, 全身性疾病、营养不良、饮酒、抽烟以及接触有害物质等因素也会引起精液质量改变。

精液检查的目的: 评价男性生殖力, 检查男性不育症的原因及其疗效观察; 辅助诊断男性生殖系统疾病; 观察输精管结扎术后的效果; 婚前检查; 法医学鉴定; 为人类精子库和人工授精筛选优质精子。

1.4.2 精液标本的采集

精液标本采集前应禁欲(无性交、无手淫、无遗精)3~5d, 若怀疑精子生成能力低下时, 需禁欲7d。精液标本的采集以手淫法为最常用的方法, 手淫后将一次射出的全部精液收入清洁干燥的玻璃容器内, 不要将刚开始射出的精液丢失; 如果手淫法采集不到标本, 可以用体外射精法, 也不要将刚开始射出的精液丢失; 遇到不能射精的病人可采用电振动法或前列腺按摩法采集标本。

1.4.3 收集精液标本的注意事项

(1) 容器应加盖, 标明采集信息(姓名、采集日期、采集时间)。

(2) 因安全套内含有对精子有害的物质,可杀死精子和抑制精子的活力,从而影响检测结果的准确性,所以不能用安全套作为收集容器。

(3) 精液采集后应保温,特别是气温比较低时,应将盛标本的容器放入内衣贴身运送。

(4) 采集后应立即送检,送检时间不超过 1h。

(5) 采集不完整的精液标本不宜进行精液检查。

(6) 采集微生物培养标本须无菌操作。

(7) 精子生成数目变化较大,不能仅凭一次检测结果作出诊断。出现一次异常检测结果,应间隔 1~2 周后再采集标本检测,一般应复查 2~3 次。

1.4.4 精液标本的处理

精液内可能含有乙型肝炎病毒、疱疹病毒和人类免疫缺陷性病毒等,故精液应按具有潜在生物危害物质处理。标本检测完毕后应用火焚烧,或浸入 5% 甲酚皂溶液中 24h 或 0.1% 过氧乙酸 12h 处理。

1.5 前列腺液检查

1.5.1 概述

前列腺液是由前列腺分泌的不透明的淡乳白色液体,是精液的重要组成部分,占精液的 30%。通过前列腺按摩所采集的前列腺液为静态液;而由射精排入精液中的前列腺液为刺激性分泌物;这两种液体很可能不同,因为在性兴奋过程中某些化合物加速分泌,且性高潮时由于前列腺收缩,会使分泌物全部排空,而用前列腺按摩法留取的标本只是其中的一部分。前列腺液的成分包括酶类(纤溶酶、 β -葡萄糖苷酶、酸性磷酸酶)、蛋白质、葡萄糖及无机离子(钠、钾、锌、钙)、免疫物质和一些有形成分等。前列腺液能维持精液适当的 pH 值、参与精子能量代谢、促使精液液化、抑制细菌生长。正常前列腺液为 2mL 左右,呈乳白色、半透明的稀薄液体;pH 值 6.3~6.5,75 岁以上者 pH 稍高,若混入较多精囊液时,则 pH 值可增高。

前列腺液检测主要用于前列腺炎、前列腺肥大、结石、结核、肿瘤的辅助诊断和疗效观察以及性病的检测。

1.5.2 前列腺液标本采集

令患者排尿后,用前列腺按摩法,取胸卧位,手指从前列腺两侧向正中方向按摩。再沿正中方向,向尿道外挤压,如此重复数次,再挤压会阴部尿道,即可见有白色粘稠液体自尿道口流出。首先将第一滴前列腺液弃去,然后再收集标本。量少时可直接涂于载玻片上,量多时可将标本收集于洁净干燥试管中。若标本用于细菌培养,应无菌采集并立即送检。

1.5.3 收集前列腺液的注意事项

(1) 前列腺液采集前 3d 应禁止性生活, 因为性兴奋后前列腺液内的白细胞常增加。

(2) 检查前应掌握前列腺按摩禁忌症: 前列腺结核、脓肿、肿瘤、急性炎症且有明显压痛者, 应禁忌或慎重进行前列腺按摩。

(3) 由于前列腺有许多小房, 按摩时不一定把炎症部分挤出, 因此, 可能首次检查正常的前列腺液, 复查时又可见成堆的白细胞, 所以, 一次检测结果阴性, 而又有临床指征时, 可间隔 3~5d 后复查。

1.5.4 前列腺液标本处理

检验后前列腺液标本、试管、载玻片均应浸入 5% 甲酚皂溶液中 24h 或 0.1% 过氧乙酸 12h 处理; 若试管和载玻片反复使用, 应先煮沸, 再用流水冲洗烘干后备用。

1.6 阴道分泌物的收集和处理

1.6.1 概述

阴道分泌物是女性生殖系统分泌的液体, 主要由阴道黏膜、前庭大腺、宫颈腺体、子宫内膜的分泌物混合而成, 俗称白带。正常阴道分泌物为白色稀糊状、无味、分泌量多少与激素水平高低和生殖器官充血程度有关, 具体分泌量及外观特点有如下变化: 排卵期阴道分泌物量增多, 清澈透明、稀薄似鸡蛋清; 排卵期 2~3d 后, 阴道分泌物量减少, 浑浊黏稠; 行经前, 阴道分泌物量又增多; 妊娠期, 阴道分泌物量也较多; 绝经后, 阴道分泌物量减少 (因雌激素减少, 生殖器官腺体减少所致)。

病理情况下, 阴道分泌物可出现颜色形状以及量的变化。阴道分泌物中含有白细胞、细菌、阴道黏膜及宫颈的脱落细胞等。阴道分泌物的酸碱度在正常生理状况下, pH 值为 4.0~4.5, 阴道分泌物呈酸性, 因此健康女性的阴道具有自净作用, 并产生自然的防御功能。阴道分泌物的检测主要用于雌激素水平的判断, 女性生殖系统炎症、肿瘤的诊断以及性病的检查。

1.6.2 阴道分泌物标本的采集

阴道分泌物标本由妇科医师采集。根据不同的检测目的, 从不同的部位采集标本。一般采用消毒刮板、棉拭子, 自阴道深部或后穹窿部、宫颈口等处采集分泌物, 然后制备成生理盐水分分泌物涂片, 也可以制备成薄涂片, 以 95% 乙醇固定后, 经吉姆萨染色、革兰染色或巴氏染色, 检查阴道清洁度、病原微生物和肿瘤细胞筛查。

1.6.3 收集阴道分泌物注意事项

(1) 月经期不宜进行阴道分泌物检查。

(2) 标本采集容器和器材应清洁干燥, 不含任何化学药品和润滑剂。

- (3) 标本采集前，患者应停用干扰检查的药物。
- (4) 标本采集前 24h，应无盆浴、性交、阴道检查、阴道盥洗和局部用药。
- (5) 采集用于细菌学检查的标本，须无菌操作。
- (6) 标本采集后要防止污染。
- (7) 检查滴虫时，应注意标本保温（37℃），立即送检。

(史楠)

第 2 章 免疫基础知识

2.1 抗原

抗原 (antigen, Ag) 是能够引起免疫反应的分子, 它是形成特异性免疫的始动因素和必备条件, 没有抗原刺激, 就没有特异性免疫的形成。

2.1.1 抗原的概念与分类

2.1.1.1 抗原的概念

抗原是指可被 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞识别, 能刺激生物体免疫系统产生抗体或形成致敏淋巴细胞、并能与相应抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合的物质。

抗原有两个基本性质: ①免疫原性 (immunogenicity) 或抗原性 (antigenicity): 即刺激免疫系统产生抗体或形成致敏淋巴细胞, 诱生体液免疫或细胞免疫的性能; ②免疫反应性 (immunoreactivity): 即能与相应抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合, 引起免疫反应的性能。总之, 具有免疫原性和免疫反应性的物质都是抗原。免疫原性及免疫反应性有时均通称为抗原性。

2.1.1.2 抗原的分类

(1) 根据抗原的基本性质分为两类:

①完全抗原: 具有免疫原性和免疫反应性的抗原, 称为完全抗原。微生物、异种蛋白等均属完全抗原。

②半抗原或不完全抗原: 无免疫原性, 但有免疫反应性。半抗原与某种蛋白质结合后, 即可获得免疫原性, 成为完全抗原。赋予半抗原以免疫原性的蛋白质, 称为载体, 半抗原部分则为抗原决定簇 (antigenic determinant), 它决定着抗原的特异性, 磺胺及青霉素等药物均为半抗原。

(2) 根据抗原激活 B 细胞产生抗体时是否需要 T 细胞协助

分为胸腺依赖抗原 (thymus dependent antigen, TdAg) 及非胸腺依赖抗原 (thymus independent antigen, TiAg)。

①TdAg: 这类抗原需要在 T 细胞及巨噬细胞参与下, 才能激活 B 细胞产生抗体。大多数天然抗原, 如细菌、病毒、异种血清等。TdAg 结构复杂, 分子量大, 均含有蛋白质成分, 抗原表面决定簇种类多, 能引起体液免疫与细胞免疫。产生的抗体多数为 IgG 型, 且能引起记忆反应。

②TiAg: 这类抗原不需要 T 细胞协助, 能直接刺激 B 细胞产生抗体。少数抗原如细

菌脂多糖、细菌多聚鞭毛素等均属之。TiAg 只引起体液免疫，不引起细胞免疫，产生的抗体为 IgM 型，不引起记忆反应。

(3) 根据抗原的来源可分为外源性抗原及内源性抗原

外源性抗原包括：①异种抗原：如微生物、动物蛋白等；②异嗜性抗原：是一类在动植物、微生物与人类间共有的、抗原决定簇相同的抗原，首先由 Forsman 发现，又称为 Forsman 抗原；③同种异型抗原：如人类个体间不同的血型抗原、人类主要组织相容性抗原等。

内源性抗原是机体内部对免疫系统有激活作用的自身物质，又称为自身抗原，此类抗原往往是引起自身免疫病的因素。

(4) 根据抗原引起免疫应答的类型可分为变应原与耐受原。

引起机体异常免疫应答、造成免疫损伤的外源性抗原称为变应原。在某些条件下，有些抗原能诱导免疫系统。

耐受原的概念：在一定条件下机体免疫系统接触某些抗原刺激后所表现出来的特异性免疫低应答或无应答状态，称为免疫耐受。其特征是机体再次接触同一抗原时，不发生可查见的免疫反应，但对其他抗原仍保持正常的免疫应答。诱导免疫耐受形成的抗原称之为耐受原。

2.1.2 决定抗原性 (antigenicity) 的条件

免疫原需具备以下条件。

2.1.2.1 异物性

免疫系统能识别正常自身与非己抗原，并将非己抗原摧毁排出体外。异物性是构成抗原免疫原性的首要条件。绝大多数抗原是异种物质，例如病原微生物及动物血清对人体都是良好抗原。生物间种族亲缘关系越远，大分子物质结构差异越大，免疫原性越显著。同种异体间，由于个体的遗传差异，组织细胞或体液中有些成分的分子结构也存在不同程度的差异。例如人类血型抗原、主要组织相容性抗原及免疫球蛋白的同种异型抗原等，在不同个体间不同。将这些同种异型抗原输送或移植给另一个体，即可引起免疫反应。在正常情况下，机体自身成分无免疫原性，但在感染、烧伤、冻伤、电离辐射、药物等因素影响下，体内某种细胞中分子成分结构发生改变，可成为自身抗原，引起免疫系统对自身物质进行排斥，发生自身免疫病。体内有些物质从胚胎发生时起即处于隐蔽状态，未曾与免疫细胞接触，生成后由于某些因素影响，如炎症、外伤等，使隐蔽物质释放，成为自身抗原，与免疫细胞接触，即可引起免疫反应。所以免疫学认为凡是胚胎时期未与免疫细胞接触过的物质，都可视为异物。

2.1.2.2 大分子物质

凡是有免疫原性的物质分子量都较大，一般在 10kD 以上，低于 4.0kD 者一般无免疫原性。分子量越大，免疫原性越强，因大分子表面的抗原决定簇更多，大分子在体内存留时间长，不易被迅速酶解而排除，故有利于抗原刺激免疫系统，产生免疫应

答。

2.1.2.3 化学组成

抗原物质必须有一定的化学组成。多数抗原为蛋白质，蛋白质中含有大量芳香族氨基酸，尤其是酪氨酸时，免疫原性更强。以非芳香族氨基酸为主的蛋白质，免疫原性则弱。例如明胶蛋白分子量虽高达 100kD，因其主要由直链氨基酸组成，在体内易降解为低分子物质，所以免疫原性很弱。若在明胶分子内引入少量酪氨酸（2%），抗原性就显著增强。胰岛素分子量仅为 5.734kD，由 51 个氨基酸组成，因其中有 9 个芳香族氨基酸，故也有免疫原性。多糖类、脂类及核酸的免疫原性均很差，若与蛋白质结合，其免疫原性则明显加强。

2.1.2.4 分子结构

抗原分子的立体结构是决定抗原分子与淋巴细胞抗原受体结合、引起免疫应答的功能关键，也是决定抗原与相应抗体结合、出现各种免疫反应的物质基础。若某些原因引起抗原立体结构发生改变，可使抗原性改变或丧失。例如溶菌酶为良好抗原，若将分子内双硫键还原失去立体结构，抗原性即消失。某些化学基团（如酪氨酸）在分子中分布的部位与抗原性强弱有关，在分子表面时，因易与淋巴细胞抗原受体结合，抗原性强；若存在于大分子内部，则表现不出免疫原的性能。此外，蛋白质等抗原可因加热、融冻、光照、振荡等物理因素引起变性，使抗原性改变或丧失。

具备了上述条件的物质能否成为免疫原，还受机体遗传因素、年龄、生理状态及免疫系统功能正常与否等因素的影响。有的物质对成年人为良好抗原性，但对新生儿不引起免疫反应；有的物质对正常人无免疫原性，但对过敏体质者则有抗原反应。此外，给予抗原的途径也影响免疫原性的效果，如口服抗原易被消化道的酶降解，失去免疫原性；注射抗原，常可维持抗原分子的完整性，可保留免疫原性。

2.1.3 抗原的特异性与交叉反应

2.1.3.1 抗原的特异性

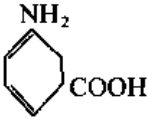
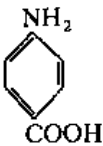
抗原都有特异性，它只能与相应的抗体或淋巴细胞抗原受体结合，引起特异的免疫反应。例如伤寒杆菌只与伤寒杆菌抗体结合发生反应，不与其他杆菌抗体结合。特异性是生物体中免疫反应最突出的特点，为免疫学诊断、防治的理论依据。

抗原的特异性是由抗原分子表面的抗原决定簇决定的。抗原决定簇是指抗原分子表面的特殊成分基团，约 5~7 个氨基酸、单糖或核苷酸组成。由于这些化学基团的种类、性质及空间结构不同，特异性也不同。抗原依靠其决定簇与特异性抗体及淋巴细胞抗原受体结合。

用人工合成抗原更易阐明抗原决定簇与特异性的关系。用简单的化学基团作决定簇，通过偶氮化作用连接在血清蛋白载体上成为合成抗原，再用这种抗原给家兔注射获得抗体。用此抗体去检测不同化学基团连接的合成抗原，即可证明抗原特异性决定于决定簇的种类、位置及空间结构。例如用结构类似的苯胺衍生物制备合成抗原，因酸性基

团的种类、位置不同,抗原的特异性也不同,它们只能与相应的抗体起反应(表2-1)。用旋光性不同的酒石酸制备抗体,左旋酒石酸只能与左旋酒石酸抗体发生反应,不能与右旋或消旋者抗体发生反应,是因为二者互补方式不同。天然抗原的特异性也是由决定簇决定的。例如不同种系动物血清白蛋白,因氨基及羧基末端氨基酸种类或排列顺序不同,致抗原特异性也不同。

表2-1 抗原决定簇种类、位置与抗原特异性的关系

抗 体	合成抗原表面决定簇			
	苯胺 	间位氨基苯甲酸 	对位氨基苯甲酸 	对位氨基苯磺酸 
苯胺抗体	++++	-	-	-
间位氨基苯甲酸抗体	-	++++	-	-
对位氨基苯甲酸抗体	-	-	++++	-
对位氨基苯磺酸抗体	-	-	-	+++

注:“+”代表阳性反应强度,“-”代表无反应。

抗原的结合价是指抗原能与抗体结合的抗原决定簇总数。有些半抗原只能与抗体的一个抗原结合部位结合,则为单价抗原。天然抗原结构很复杂,分子表面常有多种多个决定簇,是多价抗原。每种决定簇都刺激机体产生一种特异性抗体,所以天然抗原能使机体产生多种抗体。例如伤寒杆菌有鞭毛抗原、毒力抗原及菌体抗原,在伤寒患者血清中则可检出鞭毛抗体、毒力抗体及菌体抗体。

在理化因素变化影响下,若抗原表面决定簇消失,分子内部决定簇暴露,三维结构化学键发生改变,引起抗原的特异性发生改变。

2.1.3.2 抗原的交叉反应

有些复杂的抗原,除各有其主要的特异性抗原决定簇外,相互间也可存在部分相同的抗原决定簇,这种共有的抗原决定簇称为共同抗原。亲缘关系很近的生物间存在的共同抗原,称为类属抗原,例如伤寒杆菌与甲、乙型副伤寒杆菌间的共同抗原,即为类属抗原。在无种属关系的生物间存在的共同抗原,称为异嗜性抗原,例如大肠杆菌 O₁₄ 的脂多糖与人的结肠粘膜间有共同抗原。一种共同抗原刺激机体产生的抗体,可与其他含有共同抗原的物质结合发生反应,称为交叉反应。血清学诊断中出现交叉反应时,易造成判断上的混乱。有时两种抗原决定簇的化学成分并不相同,但立体结构很相似时,其抗原与抗体间也可发生交叉反应,但结合力不如特异性者强。

2.1.4 常见抗原物质

2.1.4.1 病原微生物

细菌、病毒、立克次体及螺旋体等微生物都有较强的免疫原性，机体感染这些微生物后，可获得免疫力，因此用病原微生物制成疫苗作预防注射，可提高人群免疫力，控制传染病流行。还可根据病原微生物抗原的特异性，用免疫学方法鉴定由患者体内分离出的病原微生物，或测定患者血清中特异性抗体，以帮助诊断传染病。病原微生物结构虽简单，但化学组成很复杂，每种病原微生物都是由多种成分组成的抗原复合体。以肠道杆菌为例，其主要抗原表面有表面抗原、菌体抗原、鞭毛抗原等，每种抗原又有多种抗原决定簇。这些决定簇中有的对某种细菌是特异的，称为该菌的特异性抗原，有些决定簇是近缘细菌或其他菌中共有的类属抗原。

2.1.4.2 细菌的外毒素和类毒素

有些细菌在生长繁殖过程中，向菌体外分泌有毒的物质，称为外毒素。外毒素是蛋白质，毒性很强，抗原性也很强。外毒素经 0.3% ~ 0.4% 甲醛处理后，失去毒性，但仍保留抗原性，成为类毒素。外毒素和类毒素均能刺激机体产生抗体，该抗体能降低毒素，阻止毒素与敏感细胞结合，避免机体中毒，这种抗体称为抗毒素。用白喉类毒素作预防注射可预防白喉流行，注射破伤风类毒素可防止外伤时因感染而发生的破伤风。

2.1.4.3 动物血清

常用的各种抗毒素，是将类毒素给马注射，然后从马血清中取得的。将这种动物来源的抗毒素注入人体，可发挥两种作用：①供给人体特异性抗毒素，可中和被感染者体内相应的外毒素，起到防治疾病的作用；②对人体来说，它是异种动物蛋白，能刺激人体产生抗马血清蛋白的抗体，当再次接受马血清制成的抗毒素注射时，可能发生过敏性休克，严重者可死亡。

2.1.4.4 异嗜性抗原

有些病原微生物与人体某些组织细胞间有共同抗原，是引起免疫性疾病的原因之一。例如：A 族溶血性链球菌细胞壁的多糖类抗原与心瓣膜的糖蛋白有共同抗原，链球菌蛋白质抗原（M 蛋白）与心肌成分有共同抗原，因此感染该菌可引起风湿性心脏病。A 族链球菌与肾小球基底膜也有共同抗原，有时感染该菌后引起急性肾小球肾炎。大肠杆菌 O₁₄ 的脂多糖与人结肠粘膜有共同抗原，现认为感染该菌与溃疡性结肠炎的发病有关。

临床辅助诊断也常借助于异嗜性抗原。例如引起原发性非典型肺炎的肺炎支原体与 MG 株链球菌间有异嗜性抗原。引起斑疹伤寒的立克次体与变形杆菌某些菌株间也有异嗜性抗原。传染性单核细胞增多症（EB 病毒引起）患者血清中可出现使绵羊红细胞凝集的异嗜性抗体。因此可采用异嗜性凝集反应协助诊断。

2.1.4.5 同种异型抗原

由于遗传基因的差异,同种不同个体间有多种抗原不相同,人体主要有两类同种异型抗原:①红细胞血型抗原:包括 ABO 血型及 Rh 血型抗原等。ABO 血型不合的个体间相互输血,可引起严重输血反应,因此输血前供血与受血者应先配血型。如母亲为 Rh 阴性,胎儿为 Rh 阳性,可引起流产或新生儿溶血。

②人类主要组织相容性抗原:是指有核细胞膜上的蛋白抗原,在世界人群中已发现 155 种。除卵双生者外,不同个体组织的相容性抗原不全相同。在器官移植时,为防止过强的移植排斥反应,也应进行组织配型,以选择供体主要组织相容性抗原与受体相近者。

2.1.4.6 自身抗原

自身抗原有如下三种类型。

(1) 隐蔽的自身抗原

有些自身物质在正常情况下与血流和免疫系统相隔绝,称为隐蔽抗原。当外伤、感染或手术不慎等原因,使隐蔽抗原进入血流成为自身抗原,则可引起自身免疫性疾病。例如甲状腺球蛋白释放入血流,引起变态反应性甲状腺炎;眼葡萄膜色素抗原释放,引起交感性眼炎、精子抗原引起男性不育症等。

(2) 修饰的自身抗原

正常情况下自身物质对自身无抗原性,但在病原微生物感染,电离辐射或化学药物等影响下,自身成分的分子结构有时可发生改变,形成新的决定簇成为自身抗原,刺激机体引起自身免疫性疾病。例如有的病人服用甲基多巴后,可使红细胞抗原发生改变,引起自身免疫性溶血性贫血;有的病人服用安基比林,引起白细胞抗原结构改变,导致白细胞减少。

(3) 自身正常物质

若体内淋巴细胞异常,不能识别自己与非己,则对自身正常物质出现免疫应答,也可引起自身免疫病。

2.1.4.7 变应原

变应原是引起变态反应的抗原。变应原的种类甚多,完全抗原有鱼、虾、蛋、乳制品、植物花粉、动物皮毛等。半抗原有磺胺青霉素等药物,油漆、塑料等化学物质,它们与体内蛋白结合,以半抗原为决定簇,以蛋白质为载体而获得免疫原性,可引起变态反应。变应原能否引起变态反应,与机体遗传因素有关,患者多有家族史,为常染色体显性遗传。

2.1.4.8 肿瘤抗原

肿瘤抗原是细胞癌变过程中产生的大分子物质,有免疫原性。可分为如下两类。

(1) 肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)是肿瘤细胞表面特有的抗原。

用理化因素或某些病毒能诱发动植物肿瘤,在动物瘤细胞表面可出现 TSA,机体免疫系统能将其识别为异己,并进行排斥。在人类肿瘤中尚未得到充分证实。

(2) 肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)是在寻找 TSA 过程中发现的与肿瘤有关的抗原,这类抗原并非肿瘤细胞所特有,但在细胞癌变时体内含量明显增多,无严格的特异性。TAA 有两类:

①与肿瘤有关的病毒抗原:人类某些肿瘤与病毒有密切关系,例如鼻咽癌组织中有 EB 病毒基因及抗原,宫颈癌细胞内有人类单纯疱疹 2 型病毒基因及抗原。这些肿瘤患者血清中常能查到较高滴度的相关病毒抗体;

②胚胎性抗原;有些肿瘤细胞在产生胚胎时合成的大分子物质,即胚胎性抗原。与人类肿瘤有关的胚胎性抗原种类较多,在临床上最有意义的是甲胎蛋白(α fetoprotein, AFP),它原是胎儿肝细胞合成的一种糖蛋白,分子量为 70kD,胚胎 6 周时出现在胎儿血清中 14~16 周达高峰,21 周后下降,出生后至成年血清中 AFP 含量极微,低于 20ng/mL。在原发性肝癌患者血清中 AFP 含量多在 300ng/mL 以上,孕妇及其他肿瘤患者血清中 AFP 含量也可增多,但很少超过 100ng/mL,目前 AFP 检测试验已广泛用于原发性肝癌的诊断和普查。

此外有些物质同抗原一起或预先注入机体,能增强机体对该抗原的免疫应答能力,这些物质被称为免疫佐剂。常用的佐剂有细菌脂多糖、氢氧化铝、明矾、植物油、矿物油(如弗氏佐剂八分枝杆菌(如结核杆菌、卡介苗)等。佐剂可使免疫原性微弱的物质成为有效的免疫原。提高抗体产生的滴度,增强细胞免疫反应。

2.2 抗体

免疫系统受抗原刺激后,B 细胞转化为浆细胞,由浆细胞产生能与抗原发生特异性结合的球蛋白,这类球蛋白称为抗体(antibody, Ab)。抗体主要存在于血清内,但也见于其他体液及外分泌液中,因此,将抗体介导的免疫称为体液免疫。

1983 年, Tiselius 用电泳法将血清蛋白分为白蛋白、甲种(α)球蛋白、乙种(β)球蛋白及丙种(γ)球蛋白,并证明抗体活性主要在丙种球蛋白组分中。甲种及乙种球蛋白中也含有部分抗体。

具有抗体活性的球蛋白和化学结构与抗体相似的球蛋白,均命名为免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。它包括抗体球蛋白和骨髓瘤、巨球蛋白血症等病人血清中未证实抗体活性的异常免疫球蛋白。Ig 是化学结构的概念,抗体则是生物学功能的概念。所有的抗体都是 Ig,但并非所有的 Ig 都有抗体活性。

2.2.1 免疫球蛋白的分子结构

2.2.1.1 基本结构

Ig 的基本结构是由二硫键连接四条肽链构成的单体,也是 Ig 的基本功能单位。两条长的肽链称为重链(heavy chain, H 链),每条重链约由 450 个或 570 个氨基酸残基组成,重链间有双硫键相连。两条短的称为轻链(light chain, L 链),每条轻链约含有

214 个氨基酸残基，并以双硫键与重链相连。整个 Ig 分子单体呈 Y 形（图 2-1），在重链恒定区含有少量糖类，故 Ig 为糖蛋白。

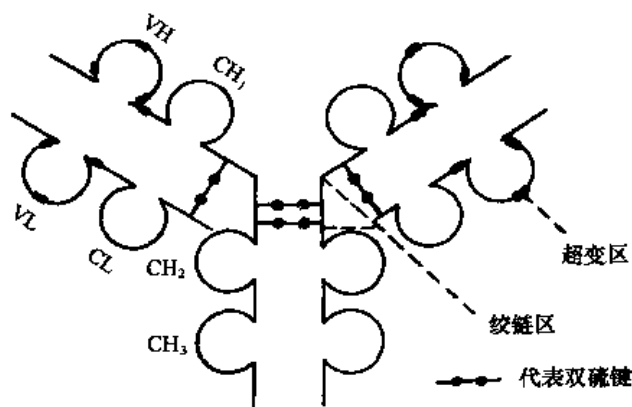


图 2-1 IgG 分子结构示意图

按 Ig 重链的成分、结构及抗原性不同，可将重链分为 5 类，分别以希腊字母 γ 、 α 、 μ 、 δ 及 ϵ 表示之。因此根据 Ig 所含的重链类别不同，也相应地分为 IgG、IgA、IgM、IgD 及 IgE 五类。各类 Ig 的轻链可相同，根据轻链结构及抗原性不同分为二型，即 κ 型及 λ 型。每个 Ig 分子上的两条重链同类，两条轻链同型。在人类血清中各类 Ig 所含的轻链， κ 多于 λ 型，约为 2:1。

Ig 轻链氨基末端（N 端）的 1/2、重链 N 端的 1/4（ γ 、 α 、 δ ）或 1/5（ μ 、 ϵ ）肽段、其氨基酸种类及排列顺序多变，故将此区称为可变区（variable region, V 区），因抗体的特异性不同而变化。V 区以外的部分，即轻链羧基末端（C 端）1/2 及重链 C 端的 3 或 4/5 肽段，氨基酸组成和排列较恒定，称为恒定区（constant region, C 区）。在 V 区中某些特定位置的氨基酸残基更加变化多端，因抗体特异性不同呈现极大的变异性，故称这些部位为超变区（hypervariable region, HV 区），它是抗体 Ig 与抗原发生特异性结合的部位。轻链 V 区中有 3 个 HV 区，分别位于第 26~32、48~55、90~95 位氨基酸。重链 V 区有 4 个 HV 区，分别位于第 31~37、51~68、84~91、101~110 位氨基酸。

2.2.1.2 免疫球蛋白的功能区

Ig 的三维结构含有若干功能区，每一功能区约由 1~10 个氨基酸肽段组成，含有链内双硫键，肽链经 β 折叠后，经双硫键联系而呈球状结构。轻链有两个功能区，称为轻链易变区（VL）和轻链恒定区（CL）。IgG、IgA、IgD 的重链有 4 个功能区，一个重链易变区（VH）和 3 个重链恒定区（CH），即 CH₁、CH₂、CH₃。IgM 及 IgE 的重链则有一个 VH 及 4 个 CH，多了一个 CH₄ 功能区。Ig 的 VL 及 VH 的超变区共同组成抗原结合部位，该部位的肽链通过双硫键连接及 β 折叠，使原来比较分散的高变区相对集中，在 V 区表面形成凹槽。它可与相应的抗原决定簇在空间结构上形成精确的空间互补，并借助与抗原间形成的氢键和离子键，使抗原与抗体呈稳定的结合。IgG 的 CH₂ 是补体结合部位，与 IgG 通过胎盘有关；CH₃ 有与免疫细胞 IgG F_c 受体结合的作用。IgE 的

CH₄可与肥大细胞结合，与I型变态反应的发生有关。在IgG和IgA的CH₁与CH₂之间的区域称为绞链区(hinge region)，此区含有大量脯氨酸和双硫键，富有弹性，张合自如，可展开至180°。抗体分子的这种变构性质适宜于抗原结合部位与不同距离的抗原决定簇结合，也易使补体结合点暴露，为补体活化创造条件。

2.2.1.3 免疫球蛋白的水解片段

用酶水解Ig分子，是研究Ig结构与功能的重要方法之一。用木瓜酶水解IgG，从绞链区双硫键N端裂解，获得两个相同的F_{ab}段和一个F_c段。F_{ab}段即抗原结合片段(fragment antigen binding)，它含有一条完整的轻链和重链N端的1/2部分，能与一个抗原决定簇发生特异性结合，为单价，故不能形成大的抗原-抗体复合物。F_c段即可结晶片段(fragment crystalizable)，因在低温下可结晶故名。F_c含两条重链C端的1/2及重链间的双硫键，它不能与抗原结合，但仍保留活化补体以及与细胞Fc受体结合的能力。用胃蛋白酶水解IgG分子，则从绞链区双硫键的C端裂解，而将IgG裂解为大小两个片段。大片段仍保留绞链区双硫键，为具有双价抗体活性的片段，称为F(ab')₂。小片段被继续水解成小分子肽，称为pFc'。pFc'无抗原性，无任何生物活性。对Ig酶解片段的研究，不仅对阐明Ig分子结构和功能有重要意义，对制备免疫制品和医疗实践也有实际意义。见图2-2。

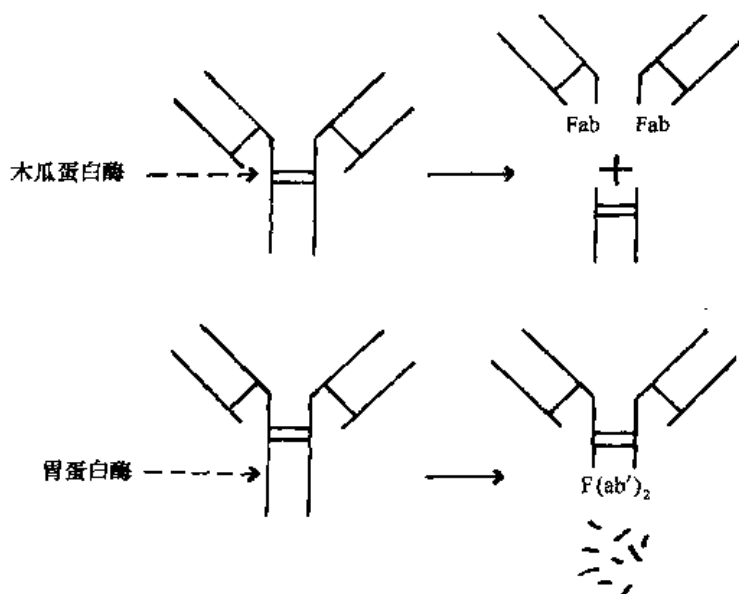


图2-2 IgG分子经蛋白酶水解后片段

2.2.2 各类免疫球蛋白的结构、性状与功能

2.2.2.1 IgG

IgG是血清中Ig的主要成分，占血清Ig总量的75%，多以单体形式存在，结构型为 $\gamma_2\kappa_2$ 或 $\gamma_2\lambda_2$ ，分子量为160kD。IgG有4个亚类，即IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄，它们

的 γ 重链上氨基酸序列很相似,但以双硫键与轻链联结时, γ 链上半胱氨酸位置不同,绞链区双硫键的数目也不同。见图 2-3。在正常人血清中的浓度, IgG_1 为 IgG 总量的 60% ~ 70%, IgG_2 为 15% ~ 20%, IgG_3 为 5% ~ 7%, IgG_4 为 1% ~ 7%。 IgG 易通过毛细血管,50% 的 IgG 在血清中,其余则广泛分布于各组织的细胞外液中。

IgG 是唯一能通过胎盘的抗体,对防止新生儿感染起重要作用。出生后 3 个月的婴儿开始合成 IgG ,5 岁时达成年人水平。 IgG 主要由脾和淋巴结中的浆细胞合成,在血清中分解缓慢,半衰期为 16 ~ 24 天,故临床使用抗体做人工被动免疫时,以每 2 ~ 3 周注射一次为宜。

抗感染的抗体主要是 IgG ,抗毒素及大多数抗菌性抗体、抗病毒性抗体均属 IgG 。不少自身抗体,如抗核抗体、抗甲状腺球蛋白抗体等也属 IgG 。 IgG 可固定补体、激活补体,发挥免疫效应。 IgG 还能以其 Fc 段与吞噬细胞结合,有促进吞噬的调理作用。 IgG 以 Fc 段与 K 细胞、NK 细胞结合,可促进 K 细胞及 NK 细胞杀伤靶细胞;与 Ts 细胞、B 细胞结合,可调节该细胞的活性。

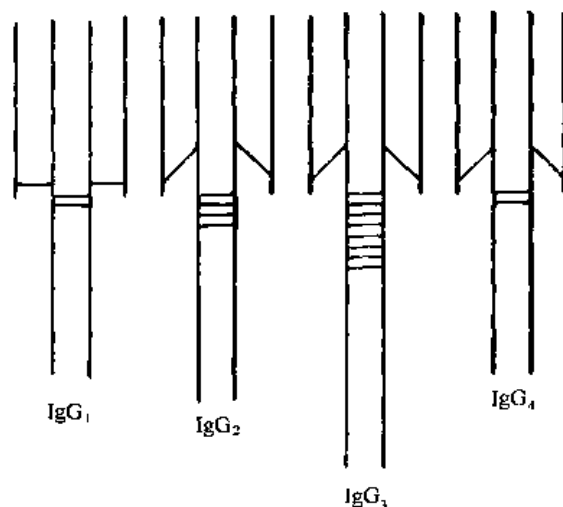


图 2-3 IgG 亚类结构示意图

2.2.2.2 IgA

IgA 有单体和多聚体两种型式。在血清中绝大多数 IgA 是单体,结构型为 $\alpha_2\kappa_2$ 或 $\alpha_2\lambda_2$ 。分子量为 170kD,占血清 Ig 总量的 10% ~ 20%,在血清中似不显示重要的免疫作用。在外分泌液中的 IgA 主要为双聚体,称为分泌型 IgA (secretory IgA , SIgA),分子量 390kD,也有少数三聚体。 SIgA 由两个 IgA 单体、一个连接链 (joining chain, J 链) 和一个分泌片 (secretory piece, Sp) 共同组成,其结构型为 $(\alpha_2\kappa_2)_2 - \text{J} - \text{Sp}$ 或 $(\alpha_2\lambda_2)_2 - \text{J} - \text{Sp}$ 。 IgA 和 J 链主要由呼吸道、胃肠道、泌尿生殖道等处黏膜固有层中的浆细胞合成,在分泌出浆细胞之前两者已连接在一起, Sp 由黏膜上皮细胞合成,当 IgA 双体分泌出浆细胞,经过黏膜上皮细胞时,与 Sp 结合,形成完整的 SIgA ,随分泌液分布于粘膜表面。 Sp 能保护 SIgA 免遭各种蛋白酶的破坏。

SIgA (图 2-4) 存在于唾液、初乳、呼吸道分泌物、胃肠液、泌尿生殖道分泌液中,是机体黏膜防御感染的重要因素,若 SIgA 合成障碍,易发生呼吸道、胃肠及泌尿生殖系统感染。 IgA 不能通过胎盘,婴儿可从初乳中得到 SIgA ,出生 4 ~ 6 个月后开始合成 IgA ,以后渐增,至青少年时期 (12 岁左右) 即达成人水平。见图 2-5。



图 2-4 SIgA 结构示意图

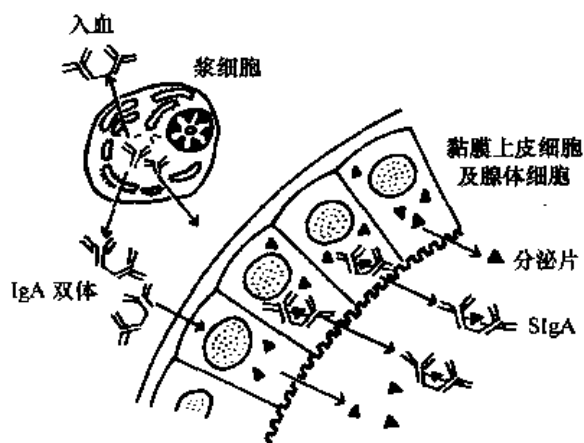


图 2-5 SIgA 的生成与分泌过程

2.2.2.3 IgM

IgM 是分子量最大的 Ig (900kD)，故又称巨球蛋白。IgM 占血清 Ig 总量的 6% ~ 10%，由 5 个单体和一个 J 链组成五聚体，结构型为 $(\mu_2\kappa_2)_5 - J$ 或 $(\mu_2\lambda_2)_5 - J$ ，呈花环状。 μ 重链的 C 区有 4 个功能区，即 CH_1 、 CH_2 、 CH_3 及 CH_4 ，J 链以双硫键与两个单体 C 末端相连，其他单体之间也是靠双硫键维系（图 2-6）。理论上 IgM 的抗原结合价应为 10 价，但与大分子抗原结合时，往往因空间位阻只表现 5 价。IgM 的凝集颗粒抗原作用及结合补体的能力都很强。一个 IgM 分子与抗原结合后即能激活补体，而 IgG 最少需要两个分子。IgM 的凝集作用、促进吞噬的作用、杀菌作用均比 IgG 大。但中和毒素及中和病毒的能力比 IgG 差。

脾是 IgM 的主要合成部位，因分子量大，不能透过血管壁，合成的 IgM 几乎全在血液中，因此，IgM 在防止发生菌血症中起重要作用。IgM 缺乏者易发生败血症。但 IgM 也可在腺体组织的黏膜固有层局部产生，故分泌液中可有少量 IgM 存在。当患 SIgA 缺乏症时，分泌液中 IgM 可代偿性增加。IgM 不能通过胎盘，初乳中有 IgM，可被婴儿吸收，出生后血清 IgM 很快增多，1 岁时已达成人量的 90%。

在个体发育中最早合成的 Ig 是 IgM，在胎儿晚期已能合成。胎儿或新生儿血液内出现高浓度 IgM 时，即表明已发生子宫内感染。风疹病

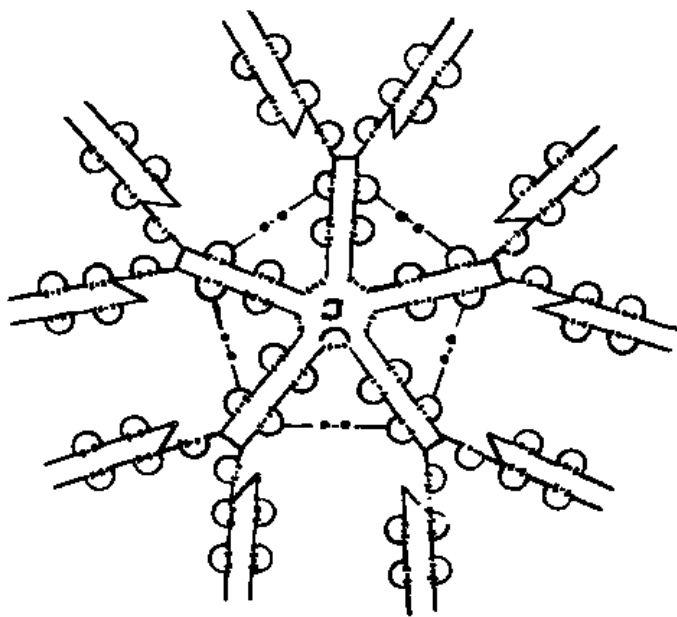


图 2-6 IgM 分子结构示意图

毒、巨细胞病毒及梅毒螺旋体等感染时,都能使胎儿产生大量 IgM,产后可取脐带血检测。新生儿脐带血中 IgM 含量一般在 $11.7\text{mg}/100\text{mL} \pm 6.4\text{mg}/100\text{mL}$,如超过 $300\text{mg}/100\text{mL}$ 则说明胚胎期有感染。成人感染后最早出现在血液中的抗体也是 IgM 型抗体,以后才出现 IgG 型抗体。IgM 的半衰期比 IgG 短、约 5d 左右,因此血清中出现 IgM 型特异抗体,表示有近期感染,检测之有助于早期诊断。

天然血型抗体、类风湿因子等均为 IgM 型抗体。

IgM 除了以五聚体形式进入血液中,也有少量 IgM 单体, B 细胞膜上有 IgM 的单体,它构成 B 细胞的抗原受体, B 细胞表面的这类 IgM 被称为膜表面 IgM (Surface membrane immunoglobulin, SmlgM)。

2.2.2.4 IgD

IgD 在血清中含量很低 ($20 \sim 50\mu\text{g}/\text{mL}$),约占血清 Ig 总量的 1%。IgD 为单体,分子量 175kD,结构型为: $\delta_2\kappa_2$ 或 $\delta_2\lambda_2$ 。血清中的 IgD 功能尚不清楚。B 细胞成熟时,膜上带有 SmlgD,也是 B 细胞的抗原受体。

2.2.2.5 IgE

IgE 在正常人血清中含量极少 ($0.1 \sim 0.4\mu\text{g}/\text{mL}$),仅占总血清 Ig 总量的 0.002%。IgE 为单体,分子量 190kD,结构型为 $\epsilon_2\kappa_2$ 或 $\epsilon_2\lambda_2$ 。 ϵ 重链有 4 个 CH 功能区, CH_4 部位极易与组织中肥大细胞及血液中嗜碱性粒细胞膜上 IgE Fc 受体结合,与引起 I 型变态反应有关。IgE 不能通过胎盘,不能激活补体。IgE 对热不稳定, 56°C 即失活,这与 CH_3 、 CH_4 功能区发生不可逆的变性有关。IgE 由鼻咽、扁桃体、支气管、胃肠黏膜固有层的浆细胞产生。

不同年龄的正常人血清中 IgG、IgM、IgA 的含量列于表 2-2。

表 2-2 不同年龄正常人血清中主要 Ig 含量 (mg/mL)

类型名称		变异部位	血清型举例
同种型	类	CH	IgG、IgA、IgM、IgD、IgE
	亚类	CH	IgC ₁₋₄ , IgA ₁₋₂ , IgM ₁₋₂
	型	CL	$\kappa\lambda$
	亚型	CL (λ)	kem ⁺ , kem ⁻ , O ₂ ⁺ , O ₂ ⁻ , Mcg...等
同种异型		CH ($\gamma_1 \sim \gamma_3$)	Gm ₁ , Gm ₂ , ...Gm ₃₀
		CH (α_2)	A ₂ m1, A ₂ m2
		CL (κ)	Km1, Km1.2, Km3
独特型		VH/VL	极多, $>10^8$

2.2.3 抗体的多样性与血清型

2.2.3.1 抗体的多样性

人血清中的抗体多种多样,种类在 10^8 以上,可与众多不同抗原发生特异性结合。抗体多样性的原因主要有以下两方面。

(1) 外源性因素:环境中抗原种类甚多,每种大分子抗原又有多种抗原决定簇,每种抗原决定簇均可选择激活体内一个 B 细胞株及其子代细胞,产生一种特异性抗体。

(2) 内源性因素:抗体多样性的另一个原因是由 B 细胞中 Ig 基因的结构及功能特征所决定的。人类 B 细胞中有三个 Ig 基因库,即轻链 κ 、 λ 基因库及重链基因库,分别位于第 22、2、14 号染色体上。抗原刺激 B 细胞后,这些基因库经过不同形式的重组,形成具有转录功能的 Ig 基因。重组部位往往是编码 V 区超变区的部位,所以 Ig 基因重组是 B 细胞合成无数特异性抗体的原因。

2.2.3.2 抗体的血清型

一种动物的抗体对另一种动物来说,它是抗原。例如将鼠 Ig 给家兔注射,家兔可产生抗鼠 Ig 抗体,用此血清抗体可检测鼠 Ig 的抗原性质及含量。因此将 Ig 的特异性抗原成分称为血清型。Ig 的抗原成分复杂,不同部分各有其特异的抗原决定簇。人 Ig 的血清型包括同种型、同种异型及独特型(表 2-3)。

表 2-3 免疫球蛋白的血清型

	多克隆抗体	单克隆抗体
产生抗体的细胞来源	多株 B 细胞及其子代细胞 人或动物免疫血清或恢复期血清	单株 B 细胞及其子代细胞 B 细胞杂交瘤的小鼠腹腔液
有效抗体含量	0.1 ~ 1.0mg/mL 血清	0.5 ~ 5.0mg/mL 小鼠腹水
抗体成分及性质	能识别多种抗原决定簇的各类及各亚类 Ig	只识别一种抗原决定簇的同--亚类 Ig,其分子结构纯一,重链、轻链、独特型完全相同
用途	用于常规多价抗原的免疫学检测,易出现交叉反应 用于紧急预防及治疗各种微生物、外毒素引起的疾病	作为第一抗体,用 ELISA、放免、免疫酶等方法检测微量抗原,可避免交叉反应 肿瘤特异性 McAb 与药物连结,用于治疗肿瘤

(1) 同种型(isotype):同一物种所有个体的同类 Ig 共有的抗原特异性成分,称为同种型。同种型抗原特异性因种而异。例如将某人的 IgG 免疫家兔,获得的抗人 IgG 抗体,可以与所有人类的 IgG 发生特异性反应,因此可用抗人 Ig 抗体检测患者血清中 Ig 的含量。同种型的抗原决定簇存在于 Ig 的 C 区,它包括 Ig 的类、亚类、型与亚型。根据 Ig 重链 C 区抗原特异性的差异,可将人类 Ig 分为 5 类,即 IgG、IgA、IgM、IgD 与 IgE。这 5 类 Ig 的重链抗原性不同,互不出现交叉反应。同一类 Ig 重链 C 区抗原性也有

部分差异,借此可分为若干亚类,例如 IgG 可分为4个亚类 (IgG_{1-4}), IgA 及 IgM 各分为两个亚类 (IgA_{1-2} , IgM_{1-2})。亚类之间有强烈的交叉反应。根据轻链 C 区抗原差异分为 κ 与 λ 两个型。 κ 无亚型。 λ 轻链 C 区因某些位置氨基酸的差别分为若干亚型。

(2) 同种异型 (allotype): 在同一种系不同个体间,同类 Ig 也有特异性不同的抗原决定簇,因而出现同种异型,这主要反映在 Ig 分子的 CH 和 CL 上一个或数个氨基酸的差异上,这是因为 Ig 等位基因中某一碱基发生点突变所致。因决定同种异型的等位基因均为显性基因,在杂合子个体的血清中可同时存在两种同种异型的同类 Ig,但就一个 B 细胞株而言,在合成 Ig 时因发生等位基因排斥,只合成抗原性全相同的 Ig, Ig 的两条重链及两条轻链全相同。已发现 IgG_{1-3} 的同种异型有 30 型,以 Gm 表示之,即 $\text{Gm}1 \sim \text{Gm}30$; IgA_2 有两型 ($\text{A}_2\text{m}1$, $\text{A}_2\text{m}2$); κ 轻链有 3 型 ($\text{Km}1$, $\text{Km}1.2$, $\text{Km}3$)。多次输入与自己遗传性状不同的 Ig,可引起变态反应。

(3) 独特型 (idiotype, Id): 在同一个体内,特异性不同的抗体,其 V 区的抗原特异性不同。由 V 区特异性抗原决定簇区分的型别,称为独特型。独特型抗原决定簇主要由 V 区 (VH 及 VL) 超变区氨基酸序列所决定。除 V 区的非超变区外,实际上 Ig 的超变区、抗原结合部位和独特型抗原决定簇三者指的都是 Ig 分子上的同一结构,从不同角度阐明其概念与功能。除血清中 Ig 分子外,少 T 细胞与 B 细胞表面的抗原受体也具有独特型。独特型抗原决定簇不仅能刺激异种、同种异体产生相应抗体,在自身体内也可诱生抗独特型抗体。

由上述可见,抗体分子是矛盾的统一体,它既是抗体又是抗原,它既有独特型又有抗独特型的功能。它的结构既易变又恒定,其易变可保证各种抗体与相应抗原结合,其恒定又确保了各种抗体在发挥免疫效应方式上的相似性。体内独特型与抗独特型的存在,保证了机体的免疫应答维持在恒定的水平。

2.2.4 人工制备抗体的类型

2.2.4.1 多克隆抗体

一般制取的免疫动物血清,其中含有大量抗体,称为免疫血清或抗血清。抗血清是将抗原注入人或动物体内,由其体内 B 细胞群产生的抗体。因抗原通常含有多种抗原决定簇,所以体内产生的抗体,是由许多 B 细胞及其子代,即多种纯系细胞所产生的多种抗体的混合物,称为多克隆抗体 (polyclonal antibody, PcAb)。

2.2.4.2 单克隆抗体

是针对一个抗原决定簇,由一个 B 细胞分化增殖的子代细胞基团,即单纯系细胞合成的抗体,称为单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb)。单克隆抗体的制备,是利用 Köhler 和 Milstein 的杂交瘤技术和原理,将能在体内外无限增殖并能分泌无抗体活性的 Ig 的骨髓瘤细胞,能产生抗体,但不能无限增殖的 B 细胞,使两者融合为杂交瘤细胞。这种杂交瘤细胞具有亲代细胞双方的主要特征,既可人工培养使之无限增殖,又可针对一种抗原决定簇产生特异性抗体。将这种细胞培养经无限增殖而为克隆,由此克隆产生完全均一的抗体即 McAb。一种 McAb 的 Ig 分子,其重链、轻链、独特型完全相

同,它是只能识别一种抗原决定簇的同一亚类的 Ig,而且纯度高、效价高、特异性强,可避免血清学上的交叉反应。现已应用于许多方面,例如:①用于传染病病原及肿瘤抗原的检测以协助诊断;②检测各种细胞抗原及受体;③测定激素、神经递质等活性物质;④用特异的 McAb 或连结药物的 McAb 治疗肿瘤。

单克隆抗体与多克隆抗体(免疫血清)的比较见表 2-4。

表 2-4 单克隆抗体与多克隆抗体的比较

	多克隆抗体	单克隆抗体
产生抗体的细胞	多株 B 细胞及其子代细胞人或动物免疫血清或恢复期血清	单株 B 细胞及其子代细胞
来源	人或动物免疫血清或恢复期血清	B 细胞杂交瘤的小鼠腹腔液
有效抗体含量	0.1 ~ 1.0mg/mL 血清	0.5 ~ 5.0mg/mL 小鼠腹水
用途	用于常规多价抗原的免疫学检测,易出现交叉反应 用于紧急预防及治疗各种微生物、外毒素引起疾病	作为第一抗体,用 ELISA、放免、免疫酶等方法检测微量抗原,可避免交叉反应 肿瘤特异性 McAb 与药物连结,用于治疗肿瘤

2.2.4.3 基因工程抗体

动物源性的 McAb 用于人体会产生变态反应。至今尚未获得用于人体的理想的 McAb,随着 DNA 重组技术的发展,人们开始用基因工程的方法产生抗体,这种抗体被称为基因工程抗体(genetic engineering antibody)。此研究工作从 20 世纪 80 年代初开始,进展迅速,已取得一些成果。例如用鼠抗体的 VH 基因与人 CH 基因重组,制造人-鼠嵌合抗体,用于人体时可减少不良反应。基因工程抗体的研制与发展,为新一代抗体的制备与应用展示了广阔的前景。

2.2.5 免疫球蛋白异常

Ig 异常主要表现为量或质的变化。正常人血清中各类 Ig 的含量随年龄而变化,但含量相对恒定。某些疾病时含量超出正常范围,称为高 Ig 血症;反之,称为低或无 Ig 血症。

2.2.5.1 多克隆高 Ig 血症

多克隆高 Ig 血症指血清中 IgG、IgM、IgA 均增加,某些疾病时可能使某类 Ig 增加得更显著。多克隆高 Ig 血症常见于:①麻风、结核、梅毒、骨髓炎、疟疾等慢性感染性疾病。②系统红斑狼疮、类风湿性关节炎、甲状腺炎、自身溶血性贫血等自身免疫性疾病。③急性肝炎、肝硬化、慢性活动性肝炎等肝脏疾病。

2.2.5.2 单克隆 Ig 血症

单克隆 Ig 血症由一种浆细胞产生的、重链及轻链分子结构完全相同的一类或亚类

Ig 增生性疾病。此种 Ig 往往无抗体活性，因其来自同一纯系细胞，分子均一，故又称为 M 蛋白（mono-clonal protein）。

①多发性骨髓瘤（又称浆细胞瘤）是最常见的单克隆 Ig 血症。最多见的是 IgG 型，血中 IgG 含量可高达 70mg/mL。其次为 IgA 型。患者血清中其他类型的 Ig 减少甚至消失。50% ~ 60% 的患者尿中出现凝溶蛋白，特点是将尿加热至 50℃ ~ 60℃ 时发生凝固，加热至沸点又溶解。此蛋白首先由 Bence - Jones 从该患者尿中检出，又称为 Bence - Jones 蛋白。已证实该蛋白为游离的 Ig 轻链，分子量小，能从尿中排出。此种患者易反复感染，有广泛的骨质损害、贫血及肾功能损伤。

②巨球蛋白血症，又称 Waldenström 症，是产生 IgM 的浆细胞恶性增生，血清中 IgM 含量可高达 20mg/mL。因 IgM 为巨球蛋白，故血液黏度增高，心脏负担加重。脾及淋巴结肿大。

③重链病是指血清中出现大量的游离 Ig 重链，尿中也可出现。患者易反复感染，淋巴结肿大。 γ 重链病是典型的淋巴瘤。

2.2.5.3 低或无 Ig 血症

低或无 Ig 血症可分原发性与继发性两类。原发者是由于 B 细胞分化障碍所致，可以是血清中多种 Ig 缺乏，也可以是某种 Ig 低下，或 Ig 含量正常但无抗体功能，机体抗感染力差。继发者可由于 Ig 大量丧失（如肾病综合征患者、大面积烧伤或烫伤患者）、免疫系统肿瘤、长期大量使用免疫抑制剂或放射线照射所致。

2.3 抗原的制备

2.3.1 抗原剂型及组分介绍

自然界的许多物质都可以作为抗原，但用作诊断试剂的抗原必须是单一特异性的，即纯化的抗原，所以必须将所需的抗原从复杂的组分中提取出来，下面就抗原剂型制备做介绍。

2.3.1.1 颗粒性抗原的制备

颗粒性抗原主要指细胞抗原或细菌抗原，最常用的细胞抗原是制备溶血素用的绵羊红细胞。它的制备方法比较简单，采集新鲜绵羊红细胞，以无菌盐水洗涤 3 次，最后配成 10^6 个/mL 浓度的细胞悬液即可。细菌抗原多用液体或固体培养物经过集菌后处理制得。有些虫卵、细胞膜成分都可制成颗粒抗原。颗粒抗原呈乳浊液，多采用静脉内免疫法，较少采用佐剂作皮内注射。

2.3.1.2 可溶性抗原的制备和纯化

可溶性抗原主要包括蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、细菌毒素、酶、补体等。但是这些蛋白的成分比较复杂，免疫前需要纯化，常用的纯化过程按以下步骤进行。

（1）组织和细胞粗抗原的制备：将新鲜或超低温保存的样品组织清洗干净后，剪

成小块后进行粉碎,常用的粉碎方法有高速组织捣碎机法和研磨法,粉碎后的组织匀浆液离心后,上清液中就含有可提取可溶性抗原材料粗抗原。

(2) 组织细胞可溶性抗原的制备:可用于制备抗原用的细胞包括正常细胞、病理细胞或传代细胞。制备抗原时需将细胞破碎后释放出抗原。制备方法有反复冻融法、冷热交替法、超声破碎法、自溶法、溶菌酶处理法等。

(3) 超速离心和梯度密度离心法:超速离心是分离亚细胞部分及蛋白质大分子的有效手段,它又分为差速离心和梯度离心。离心纯化抗原的方法是依据抗原的比重特点进行分离,目前仅适用于少部分大分子抗原,如 IgM、C₁₉、甲状腺蛋白等;对于大量的中、小分子量蛋白质,多不适合用离心的方法进行分离纯化。

(4) 选择性沉淀法:选择性沉淀是采用各种沉淀剂或改变某些条件促使抗原成分沉淀,从而达到纯化的目的,主要包括盐析沉淀法、有机溶剂沉淀法、水溶性非离子型聚合物沉淀法等。

(5) 亲和色谱、凝胶过滤和离子交换色谱采用各种色谱手段,可将某种蛋白质从复杂组分中纯化出来。

(6) 纯化抗原的鉴定常用的方法有聚丙烯酰胺凝胶电泳法、结晶法、免疫电泳法、免疫双扩散法等。一般常把几种方法联合使用才能判断出可靠的结果。

2.3.1.3 半抗原的制备

半抗原包括多肽、药物、脂肪胺、核苷酸、甾族激素等小分子物质。它们有免疫反应性而无免疫原性,不能诱导体产生,只有将它们与蛋白质或其他高分子量物质结合后才能刺激机体产生相应的抗体。常用的结合方法有物理法和化学法。物理法吸附的载体有淀粉、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、硫酸葡聚糖、羧甲基纤维素等,通过电荷和微孔吸附抗原;化学法是利用化学反应将半抗原和载体交联起来。

常用的载体有蛋白质类如牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白等;多肽类聚合物如多聚赖氨酸;大分子聚合物和某些颗粒如 PVP、羧甲基纤维素等。由于半抗原的种类、结合方法、免疫动物类别等的不同,免疫效果也不尽相同。

半抗原与载体交联应掌握以下 3 个基本原则:①带有游离氨基或游离羧基,或两种基团都有;②带有羟基、羰基的半抗原,它们不能直接与载体连接,需用化学方法在半抗原上引进羧基才能与载体连接;③芳香族半抗原由于环上带有羧基,它邻位上的氢很活泼,极易取代。所用的双官能团试剂有碳化二亚胺、戊二醛、氯甲酸异丁酯等,这些试剂与抗原的反应在实验室内可以完成,但需要严格控制实验条件,以免抗原失活或载体严重变性。

对于某些类固醇和药物,其分子结构中无羧基或氨基,可采用琥珀酸酐法、O-(羧甲基)羟胺法、一氯乙酸钠法、重氮化的对氨基苯甲酸法等方法,转变为带有羧基或氨基的衍生物,再和载体交联。

2.3.1.4 佐剂

某些物质预先或与抗原同时注入体内,可以增强机体对该抗原的免疫应答或改变免

疫应答, 这样的辅助剂称为佐剂 (Adjuvant)。佐剂本身可以具有免疫原性, 也可以不具有免疫原性。从本质上说, 它是一种非特异性的免疫增强剂, 可以增强体液免疫应答与细胞免疫应答。

常用的佐剂有生物制剂如百日咳杆菌、卡介苗、结核分枝杆菌、枯草分枝杆菌、革兰性杆菌等; 化合物如磷酸钙、明矾、矿物油、羊毛脂、表面活性剂、聚核苷酸、脂质体等。其中最常用的福氏佐剂是由石蜡油、羊毛脂和卡介苗混合而成, 它分为福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂 (不含卡介苗)。

佐剂的作用机理极为复杂, 主要有: ①改变抗原的物理性状, 延缓抗原降解和排除, 从而更有效地刺激免疫系统; ②刺激单核吞噬细胞系统, 增强其处理和递呈抗原的能力; ③刺激淋巴细胞增殖与分化。

佐剂的主要用途有: ①增强特异性免疫应答, 用于预防接种及制备动物抗血清; ②作为非特异性免疫增强剂, 用于抗肿瘤与抗感染的辅助治疗。

福氏佐剂在使用时, 应首先和抗原按 1:1 的比例混合均匀。由于佐剂是油剂, 混合的方法有两种: 一为研磨法; 二为搅拌混合法。直到把佐剂和抗原混合均匀成为乳剂才可以进行注射免疫。

2.3.2 抗原的制备方法

根据各种不同的细胞内存在的各种分子量不同的物质, 除完整的细胞可作为抗原外, 不完整的细胞也都具有抗原或半抗原的性质, 某种抗原物质可能是某一类细胞所特有的, 可作为这种细胞的一个标志。由于细胞存在着许多性质不同的抗原物质, 有时要从这众多的物质中提取、纯化某种抗原物质, 以供科学研究之用。抗原的制备是按照生物化学技术原理, 对不同的物质, 根据目的物要求, 采用相对应的分离、纯化等步骤进行提纯。根据物理化学特性进行相应的分离、纯化方法。抗原物质的制备工艺流程如下: 材料的选择和预处理→细胞的粉碎 (细胞器的分离) →提取→纯化→浓缩或干燥→成品保存。现将抗原制备技术详述如下。

2.3.2.1 材料的选择及预处理

选择材料的原则一般是, 选择什么材料主要根据目的抗原而定。首选含量高、工艺简便、成本低廉的材料。材料选定后, 通常要进行预处理, 剔除结缔组织、脂肪组织等, 清洗干净后, 把组织块剪碎。若取材后不立即进行提取, 则应分装若干包装, 做好标记冷冻保存, 动物组织更要低温保存, 并尽量避免反复冻融。

2.3.2.2 细胞的粉碎

除了提取体液、组织液内的多肽、蛋白质、酶不需粉碎细胞外, 凡要提取组织内、细胞膜上及细胞内的生物活性物质, 都必须把组织和细胞粉碎, 使活性物质充分释放到溶液内。不同的组织, 细胞的破碎难易不一, 因此所使用的粉碎方法也不完全相同。如脑、胰、肝等比较软嫩的组织, 用普通匀浆器研磨就行, 肌肉、心脏等则需绞碎后再作匀浆。现将常用的细胞粉碎方法介绍如下。

(1) 生物物理法

1) 高速组织捣碎机: 把材料放于筒内 (约占筒内容积的 1/3) 固定筒盖, 开动马达, 调速器由慢逐渐增至所需速度。此法适用于内脏组织。

2) 玻璃匀浆器: 把绞碎的组织置于管内, 加适量溶液, 插入研杆, 用手或电动转动研杆, 并上下移动。用此法细胞破碎程度比高速组织捣碎机高, 对大分子的破坏也少。是粉碎少量软嫩材料 (脑、胰、肝等) 时常用的方法。

3) 超声波处理法: 此法多用于软嫩组织, 根据不同组织采用不同频率, 处理 10 ~ 15min, 超声波处理时溶液温度升高, 使不耐热的物质失活, 使用时为防止温度升高, 除间歇开机外, 还需人工降温, 避免溶液内存在气泡。

4) 反复冻融法: 先把待碎样品冷却到 $-15^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$, 冻成固体后取出, 然后缓慢的解冻, 如此反复操作, 可使大部分动物性细胞及细胞内的颗粒破碎, 但也可能会使一些生物活性物质失活, 所以要根据所处理的材料和目的, 确定使用的方法。

5) 冷热交替法: 把材料投入 90°C 左右的水中, 维持数分钟后取出投入冰浴内, 可以使大部分细胞破碎, 此法常用于提取蛋白质和核酸。

(2) 生物化学法

1) 自溶法: 把新鲜材料置于一定的溶剂和温度下, 利用组织细胞自身的酶, 把组织破坏, 使细胞内容物释放出来。动物材料的自溶温度选在 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$, 自溶的溶液一定要控制 pH 值, 同时还需要加入少量防腐剂。由于自溶时间较长, 不易控制, 故不是常用的方法。

2) 溶菌酶处理法: 多用于破坏大肠杆菌等微生物的细胞壁。在每毫升含 2 亿个细胞的悬液中加 0.1 ~ 1mg 溶菌酶, 37°C , 保温 10min, 细胞就可以破坏了。此外, 蜗牛酶、纤维素酶也可作为破碎细菌细胞之用。

3) 表面活性剂处理法: 较常用的有十二烷基磺酸钠、氯化十二烷基吡啶、去氧胆酸钠等。

2.3.2.3 抗原的提取

提取、抽提、萃取这 3 个词的含义基本相同。但一般说来, 提取是指在分离纯化前期, 将经过处理或粉碎了的细胞置于一定条件和溶剂中, 让被提取物充分地释放出来的过程, 而抽提则是贯穿于分离纯化的整个过程中, 如在制备核酸过程中, 用氯仿反复提取蛋白液, 用苯酚反复抽提分离 DNA 和 RNA。影响提取的因素主要来自被提取物在提取的溶剂中的溶解度大小以及它由固相扩散到液相的难易。一个物质在某一溶剂中的溶解度大小和该物质的分子结构及使用的溶剂的理化性质有关。一般说来, 极性物质易溶于极性溶剂, 非极性物质易溶于非极性溶剂中, 也就是符合相似相溶原则。因此, 在不同的抗原提取过程中, 所选用的溶剂的性质、pH 值、离子强度、抽提温度、介电常数等因素是提取成败的重要因素, 要达到分离提纯的目的, 必须周密地考虑这些因素, 并加以灵活应用。现将蛋白质、核酸、多肽等抗原 (半抗原) 的提取方法概要叙述如下。

(1) 蛋白质和酶的提取

蛋白质是由许多氨基酸连接而成的高分子物质, 分子量从数千至百万。数以千计的

蛋白质,按它们的功能可分成两大类:一类是活性蛋白,包括酶、激素蛋白、受体蛋白、运动蛋白、运输和储存蛋白、防御蛋白等;另一类是非活性蛋白,如胶原蛋白、角蛋白等,不同的蛋白质由于其结构的差异,它们的溶解度也各不相同,大部分蛋白质都可溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液中,少数与脂类结合的蛋白质则溶于有机溶剂中,如乙醇、丙酮、丁醇等。选择蛋白质的溶剂对提取蛋白质和酶的成败具有重要意义。

1) 水溶液提取:由于蛋白质大部分溶于水、稀酸和稀碱溶液,因此提取蛋白质以水溶液为主,其中尤以稀盐液和缓冲液对蛋白质的稳定性影响较小,溶解度较大,而且氢是最常用的溶剂。但在使用过程中应注意下列几点。

①盐浓度,常用等渗溶液、特别是 $0.02 \sim 0.05\text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液、 $0.02 \sim 0.05\text{mol/L}$ 碳酸盐缓冲液和 0.15mol/L 氯化钠溶液应用较多。如脱氢酶以 0.66mol/L 磷酸氢二钠溶液提取,6-磷酸葡萄糖脱氢酶以 0.1mol/L 碳酸氢钠液提取,脱氧核糖核蛋白在低盐溶液中溶解度小,就要用 1mol/L 以上的氯化钠液提取,而某些脂肪酶,用水提取比低盐溶液提取效果更好。

②pH 值的选择对蛋白质提取颇为重要,因为蛋白质的溶解度和稳定性与 pH 值关系很大。提取液的 pH 值首先要保证在蛋白质稳定的范畴内,通常在等电点的两侧,碱性蛋白如细胞色素 C 和溶菌酶选在偏酸一侧,酸性蛋白如肌肉甘油醛-3-磷酸脱氢酶应选在偏碱一侧。

③温度:为防止活性蛋白变性、降解而失活,温度通常选在 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 之间。对少数耐温的蛋白质和酶,可适当提高温度,可以使杂蛋白变性而有利于分离、提纯,如胃蛋白酶、醇脱氢酶以及许多多肽激素可选择 $37^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ 条件下提取,效果比低温提取更好。

2) 有机溶剂提取:一些不溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液的蛋白质和酶,常用不同比例的有机溶剂来提取。如用 $70\% \sim 80\%$ 乙醇提取麸蛋白;用 $60\% \sim 70\%$ 的酸性乙醇提取胰岛素,既可抑制水解酶对胰岛素的破坏,又可除去大量杂蛋白,用丁醇提取某些附于微粒体和线粒体的酶,一些与脂质结合牢固的蛋白质和酶可用丁醇提取,效果较好,丁醇提取法对 pH 及温度的选择范围较广(pH 值为 $3 \sim 10$),温度由 $-2^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 均可。我国科学家曾用此法成功地提取了琥珀酸脱氢酶和碱性磷酸脂酶。

(2) 核酸的提取

核酸分为两大类:一类为核糖核酸(RNA),另一类为脱氧核糖核酸(DNA)。核酸的分子量极大,从数万到亿万。核酸是两性化合物,在一定的等电点溶于水,其水溶液呈酸性,不溶于乙醇等有机溶剂。细胞内的核酸常和蛋白质结合成核蛋白。核糖核蛋白和脱氧核糖核蛋白在不同浓度的电解质溶液中的溶解度有显著区别,在一定浓度范围的氯化钠溶液中,脱氧核糖核蛋白的溶解度随着氯化钠浓度的增加而逐渐下降,当氯化钠浓度为 0.14mol/L 时,其溶解度仅为水中溶解度的 $1/100$,但当氯化钠浓度再增加时,脱氧核糖核蛋白的溶解度重新增加,氯化钠浓度增加到 0.5mol/L 时,其溶解度与水中溶解度相似,当氯化钠浓度增加到 1mol/L 时,它的溶解度比在水中大 2 倍。核糖核蛋白在 0.14mol/L 氯化钠溶液中仍有相当大的溶解度,因此常用 0.14mol/L 氯化钠溶液提取核糖核蛋白。而提取脱氧核糖核蛋白时,则用 1mol/L 氯化钠溶液。两种核糖核

蛋白的溶解度与溶液的 pH 也有关, 当 pH 值为 4.2 时, 脱氧核糖核蛋白的溶解度最低, 而 pH 值为 2.0~2.5 时, 核糖核蛋白的溶解度最低。所以调节氯化钠溶液的浓度和 pH 值, 可使核糖核蛋白和脱氧核糖核蛋白分离开来。

1) RNA 的提取

RNA 在细胞中主要有三种类型, 即 rRNA (核微粒核糖核酸)、tRNA (转移核糖核酸) 和 mRNA (信使核糖核酸)。mRNA 代谢极不稳定, 提取时要求条件较严格; tRNA 当细胞破碎后, 用酸处理得到 pH 值为 5 的沉淀, 即可从中分离 tRNA; rRNA 占全部 RNA 的 80% 以上, 比较稳定, 一般提取的大分子 RNA 主要为此部分。核内 rRNA 常先将细胞核分离后, 再进行提取, 可避免其他细胞组分 RNA 的干扰。

RNA 的提取, 通常是用 0.14mol/L 氯化钠溶液将组织做匀浆并反复提取细胞质中的核糖核蛋白, 而留下含有 DNA 的细胞核物质, 然后用 10% 醋酸调至 pH 值为 4.2 时, 产生沉淀, 离心, 弃去上清液, 先用 0.5mol/L 氯化钠溶液, 后用水洗涤沉淀, 将核糖核蛋白溶解于 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液中, 离心再取上清液, 调节 pH 值为 4.2 的沉淀, 沉淀用 0.5mol/L 氯化钠溶液洗涤, 再一次除去脱氧核糖核蛋白。核糖核蛋白中的蛋白质可用含有少量辛醇的氯仿抽提除去, 核酸留在碳酸氢钠水溶液中, 加入乙醇, RNA 即以钠盐形式沉淀出来。

提取 RNA 另一类方法, 不须事先用 0.14mol/L 氯化钠提取核糖核蛋白, 而一步将 RNA 的蛋白质分开, 并同时把 RNA 抽提出来, 此类方法是在破碎细胞做成匀浆时, 加入去污剂十二烷基磺酸钠或二甲苯磺酸钠; 而现在最常用的方法是直接加入含水苯酚与匀浆一起振荡, DNA 和蛋白质沉淀于酚层中, 水层中含 RNA 和多糖, 然后用乙醇使 RNA 沉淀, 四种物质一步便可初步分离开。苯酚法是目前提取不降解的 RNA 最有效的方法, 其应用举例如下。

肝脏 rRNA 的提取 按肝重 (鲜) 加入 10 倍容积苯酚-甲酚混合液 (500g 苯酚及 70mL *N*-甲酚于 50mL 蒸馏水中, 另加入 0.5g 8-羟基喹啉配成) 及 10 倍容积的 0.5% 蔡-1, 5-二磺酸水溶液 (g/V) 做匀浆后在 20℃ 搅拌 20min。

肝脏细胞核内 mRNA 的提取 先分离细胞核, 再将核悬浮于 3 倍容积的 0.5% pH 值为 6.5 的蔡二磺酸水溶液 (g/V) 中匀浆后加入等量 90% (g/V) 苯酚水溶液 (内含 0.1% 8-羟基喹啉) 在 2℃ 振荡提取 30min。

tRNA 的提取 100g (湿重) 加入 200mL 水, 300mL 90% 苯酚水溶液, 振荡 2 h, 4℃ 冰箱中过液, 使之提取完全。

以上介绍了用冷酚法提取各种 RNA 的一些实例, 近来还有皂土酚法 (即除苯酚外, 再加入皂土吸附蛋白质) 提取 RNA, 据报道皂土酚法比普通酚法提取 RNA 的生物活性高 10 倍左右。但应用苯酚法提取核酸时, 必须注意市售苯酚常含有少量重金属和杂质, 可能会导致核酸降解, 使用时一般需要减压重新蒸馏, 以保证苯酚的纯度。

2) DNA 的提取

DNA 主要存在于细胞核中, 天然状态的 DNA 绝大多数是以脱氧核糖核蛋白形式存在的。从人体细胞中提取 DNA 时, 一般先获得脱氧核糖核蛋白, 再将蛋白质除去, 从中分离 DNA。常用的方法是以 1mol/L 氯化钠溶液抽提, 得到的脱氧核糖核蛋白溶液与

含有少量辛酸或戊醇的氯仿一起振荡,除去蛋白质;或者在组织细胞破碎后以低浓度 0.14mol/L 氯化钠溶液(也可用 0.1mol/L 氯化钠加 0.05mol/L 柠檬酸代替)反复洗涤除去核糖核蛋白,再以 1mol/L 氯化钠提取脱氧核糖核蛋白,提取是用氯仿-戊醇抽提法除去蛋白质。两种方法比较,后一种方法使核酸降解可能少一些。以稀盐溶液提取 DNA 时,加入适量去污剂更有助于蛋白质与 DNA 的分离。

应用苯酚法也可以提取 DNA,而且不用经过脱氧核糖核蛋白这一步骤,例如大鼠肝匀浆在 6% 对氨基水杨酸盐溶液内,加入同体积 90% 苯酚水溶液,室温下提取 1 h,再经过进一步提纯可获得 98% ~ 99% 纯度的 DNA。苯酚法也是目前提取 DNA 最常用的方法之一。

(3) 活性多肽及递质的提取

大体上与蛋白质的提取方法相似,可参照进行。经典神经递质如去甲肾上腺素、肾上腺素、乙酰胆碱、5-羟色胺等均可化学合成,无需用很多精力去提取。

2.3.2.4 抗原的分离与纯化

从细胞中提取出来的生物大分子是不纯净的,必须进一步分离纯化才能获得纯品。在生物大分子制备工作中,分离纯化是比较复杂和重要的一个环节。对于异类的物质,如提纯蛋白质和酶时混杂着核酸,提纯核酸时混杂着蛋白质或多糖,一般可用专一性酶水解、有机溶剂抽提、选择性分步沉淀等方法处理,小分子物质常在整个制备过程中多次液相与固相互转化,被分离或最后用透析方法除去。而对同类物质,如酶和杂蛋白、RNA 和 DNA 以及不同结构的蛋白质、酶、核酸之间的分离,情况则复杂很多,主要应用的方法有盐析法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法、吸附法、结晶法、电泳法、超速离心法、柱层析法等。其中盐析法、等电点法、结晶法用于蛋白、酶的提纯较多;有机溶剂抽提和沉淀用于核酸提纯较多;柱层析法、梯度离心法在蛋白质和核酸的提纯工作中应用均十分广泛。下面主要侧重对蛋白质、酶和核酸分离纯化中与溶解度有关的一些方法作一简要叙述。

(1) 蛋白质分离纯化的一些方法

1) 盐析法

盐析法对于许多非电解质的分离纯化都是适合的,也是蛋白质和酶提纯工作应用最早,至今仍广泛使用的方法。

①原理:蛋白质、酶在低盐浓度下的溶解度随着盐液浓度升高而增加(此时称为盐溶);当盐浓度不断上升时,蛋白质和酶的溶解度又以不同程度下降并先后析出,称为蛋白质的盐析。这一现象是由于蛋白质分子内及分子间电荷的极性基团有着静电引力,当水中加入少量盐类时,由于盐类离子与水分子对蛋白质分子上的极性基团的影响,使蛋白质在水中溶解度增大。但盐浓度增加到一定程度时,蛋白质表面的电荷大量被中和,水化膜被破坏,于是蛋白质就相互聚集而沉淀析出。盐析法就根据不同蛋白质和酶在一定浓度的盐溶液中溶解度降低程度的不同而达到彼此分离的方法。

②盐的选择:蛋白质盐析常用中性盐,主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最广的是硫酸铵,其优点是温度系数小而溶解度大(25℃时饱和

溶解度为 4.1mol/L ，即 767g/L ； 0°C 时饱和溶解度为 3.9mol/L ，即 676g/L ），在这一溶解度范围内，许多蛋白质和酶都可以盐析出来，而且硫酸铵价廉易得，分段效果比其他盐好，不容易引起蛋白质变性。应用硫酸铵时，对蛋白氮的测定有干扰，缓冲能力比较差，故有时也应用硫酸钠，如盐析免疫球蛋白，用硫酸钠的效果也不错，硫酸钠的缺点是 30°C 以上溶解度太低。其他的中性盐如磷酸钠的盐析作用比硫酸铵好，但也由于溶解度太低，受温度影响大，故应用不广。

硫酸铵浓溶液的 pH 值在 $4.5 \sim 5.5$ 之间，市售的硫酸铵常含有少量游离硫酸，pH 值往往降至 4.5 以下，当用其他 pH 值进行盐析时，需用硫酸或氨水调节。

③硫酸铵饱和度算法及加入方式：在分段盐析时，加盐浓度一般以饱和度表示，饱和溶液的饱和度定为 100% 。用硫酸铵盐析时其溶液饱和度调整方法有 3 种。一是当蛋白质溶液体积不大，所需调整的浓度不高时，可加入饱和硫酸铵溶液；二是饱和硫酸铵配制方法可加入过量的硫酸铵，热至 $50^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 保温数分钟，趁热滤去沉淀；三是在 0°C 或 25°C 下平衡 $1 \sim 2\text{d}$ ，有固体析出时即达 100% 饱和度。

④盐析时注意的质量控制：

a. 盐的饱和度。盐的饱和度是影响蛋白质盐析的重要因素，不同蛋白质的盐析要求盐的饱和度不同。分离几个混合组分的蛋白质时，盐的饱和度常由稀到浓渐次增加，每出现一种蛋白质沉淀进行离心或过滤分离后，再继续增加盐的饱和度，使第二种蛋白质沉淀。例如用硫酸铵盐析分离血浆中的蛋白质，饱和度达 20% 时，纤维蛋白原首先析出；饱和度增至 $28\% \sim 33\%$ 时，优球蛋白析出；饱和度再增至 $33\% \sim 50\%$ 时，拟球蛋白析出；饱和度大于 50% 以上时，白蛋白析出。用硫酸铵不同饱和度分段盐析法，从牛胰中酸性提取分离可得到 9 种以上蛋白质及酶。

b. pH 值。在等电点时，蛋白质溶解度最小容易使沉淀析出，因此，盐析时除个别情况外，pH 值常选择在被分离的蛋白质等电点附近。

c. 蛋白质浓度。在相同盐析条件下，蛋白质浓度越大越易沉淀，使用盐的饱和度的极限愈低，如血清球蛋白的浓度从 0.5% 增到 3.0% 时，需用中性盐的饱和度的最低极限从 29% 递减至 24% 。某一蛋白质欲进行两次盐析时，第 1 次由于浓度较稀，盐析分段范围较宽，第 2 次则逐渐收窄，例如用硫酸铵盐析胆碱酯酶时，第 1 次硫酸铵饱和度为 $35\% \sim 60\%$ ，第 2 次为 $40\% \sim 60\%$ 。蛋白质浓度高些虽然对沉淀有利，但浓度过高也容易引起其他杂蛋白的共沉作用，因此，必须选择适当浓度，尽可能避免共沉作用的干扰。

d. 温度。由于浓盐液对蛋白质有一定保护作用，盐析操作一般可在室温下进行，至于某些对热特别敏感的酶，则宜维持低温条件。虽然蛋白质在盐析时对温度要求不太严格，但在中性盐下结晶纯化时，温度影响则比较明显。

e. 脱盐。蛋白质、酶用盐析法沉淀分离后，常需脱盐才能获得纯品。最常用的脱盐方法是透析法，把蛋白质溶液装入透析袋中，袋的两端用线扎紧，然后用蒸馏水或缓冲液进行透析，这时盐离子通过透析袋扩散到水或缓冲液中，蛋白质分子量大不能穿过透析袋而保留在袋内，通过不断更换蒸馏水或缓冲液，直至袋内盐分透析完毕。透析需要较长时间，常在低温下进行，并加入防腐剂避免蛋白质和酶的变性或微生物的污染。

2) 有机溶剂沉淀法 有机溶剂能降低溶液的电解常数,从而增加蛋白质分子上不同电荷的引力,导致溶解度的降低;另外,有机溶剂与水的作用,能破坏蛋白质的水化膜,故蛋白质在一定浓度的有机溶剂中的溶解度存在差异,而分离的方法,称“有机溶剂分段沉淀法”,它常用于蛋白质或酶的提纯。使用的有机溶剂多为乙醇和丙酮。高浓度有机溶剂易引起蛋白质变性失活,操作时必须在低温下进行,并在加入有机溶剂时注意搅拌均匀以避免局部浓度过大。由此法析出的沉淀一般比盐析容易过滤或离心沉降,分离后的蛋白质沉淀,应立即用水或缓冲液溶解,以降低有机溶剂浓度。操作时的pH值大多数控制在待沉淀蛋白质的等电点附近,有机溶剂在中性盐存在时能增加蛋白质的溶解度而且减少变性,提高分离的效果,在有机溶剂中添加中性盐的浓度为 0.05mol/L 左右,中性盐过多不仅耗费有机溶剂,可能导致沉淀不好。沉淀的条件一经确定,就必须严格控制,才能得到可重复的结果。有机溶剂浓度通常以有机溶剂和水容积比或用百分浓度表示。有机溶剂沉淀蛋白质分辨力比盐析法好,溶剂易除去;缺点是易使酶和具有活性的蛋白质变性。故操作时要求条件比盐析严格。对于某些敏感的酶和蛋白质,使用有机溶剂沉淀尤其要小心谨慎。

3) 等电点沉淀法

利用蛋白质在等电点时溶解度最低而各种蛋白质又具有不同等电点的特点进行分离的方法,称为等电点沉淀法。但在等电点时,各种蛋白质仍有一定的溶解度而使沉淀不完全,同时许多蛋白质的等电点十分接近,故单独使用此法效果不理想,分辨力较差。大多用于提取后去除杂蛋白,即利用变动提取液的pH值使某些与待提纯的蛋白质等电点相距较大的杂蛋白从溶液中沉淀出。实际工作中常把等电点沉淀和盐析法、有机溶剂沉淀法联合使用。

4) 吸附法

在蛋白质的提纯方法中,选择性吸附也是应用历史较久迄今仍在广泛采用的方法之一。早期工作常用高岭土(我国的一种土质,其分子式大致是 $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、氧化铝(Al_2O_3)及活性炭等吸附剂,由于这些吸附剂吸附力较弱,或者易引起蛋白质变性而应用不广,现已为凝胶性吸附剂所代替,如氢氧化铝凝胶和磷酸钙凝胶,尤其后者使用最广。吸附剂的应用有两种不同方式。当蛋白质较易吸附时,可以选择适当条件主要吸附蛋白质而分离去杂质;当蛋白质较难吸附时,则选择利于吸附杂质条件将杂质与蛋白质分开。有时两种方法可先后使用,以达到较高的提纯目的。吸附条件通常在微酸性条件(pH值为5~6)及稀盐溶液中进行,盐浓度过高会干扰对蛋白质及酶的吸附,亦即是说需要用更多量的吸附剂才能达到一定结果。洗脱时一般在弱碱条件下或适当提高洗脱液离子强度,可将吸附的蛋白质或酶完全洗脱下来。

吸附操作可以用静态吸附,也可以用柱层析吸附,即将凝胶装成柱进行吸附操作。凝胶装柱后如溶液的通过能力很差,可用助滤剂(如硅藻土)和凝胶混合,当调整二者的比例时得到一系列通过能力和吸附能力不同的层析柱。使羟基磷灰石 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2]$ 分离蛋白质和酶,它可以在高盐浓度下吸附中性及酸性蛋白质而排除碱性蛋白质。吸附常在pH值为6.8的磷酸缓冲液中进行。洗脱完全时凝胶可反复使用3~4次,吸附杂质较多的凝胶以 0.1mol/L 氢氧化钠或 1mol/L 盐酸洗净后再用。

5) 离子交换法

蛋白质和酶都具有电解质性质, 故可用离子交换剂进行分离提纯, 特别是经过了初步纯化后的蛋白质和酶采用此法效果尤为显著。这里介绍近年来以纤维素衍生物作为离子交换剂纯化蛋白质及酶的方法。在这类衍生物中以二乙氨基乙基纤维素 (简称 DEAE-纤维素, 为阴离子交换剂) 及甲基纤维素 (简称 CM-纤维素, 为阳离子交换剂) 应用最广泛。

DEAE-纤维素是纤维素结构中的氢原子被一定量的二乙氨基-乙基取代而成弱碱性化合物, 它作为阴离子交换剂的原理是: 在实际工作中常用磷酸缓冲液平衡 DEAE-纤维素后, 才对蛋白质进行交换吸附的。用 DEAE-纤维素吸附酶和蛋白质时常用 pH 值为 7~9, 然后提高盐浓度 (使蛋白质与交换剂的结合键减弱) 或降低 pH 使之洗脱, 洗脱后的蛋白质溶液有时可进一步上 CM-纤维素柱纯化。此外, 纤维素离子交换剂还具有层析条件温和、物质易于洗脱、分辨力强、被分离的蛋白质不易变性等优点。

除了纤维素离子交换剂外, 离子交换凝胶也是目前应用于分离蛋白质和酶的一种很好的离子交换剂。常用的有 DEAE-葡聚糖凝胶和 CM-葡聚糖凝胶。离子交换凝胶不仅具有交换当量高、层析条件温和、操作简便等优点, 而且具有分子筛的性能, 在梯度洗脱时, 对不同分子量的蛋白质具有很高的分辨能力。

(2) 核酸的分离纯化

从细胞中提取核酸后, 仍混杂着蛋白质、多糖和各种大小分子核酸同类物, 除去这些“杂质”。在核酸的分离纯化时, 为防止核酸大分子的变性降解, 必须在 0℃~4℃ 的低温条件下操作。核酸酶的水解作用, 是过去制备具有活性核酸大分子的严重障碍, 现普遍采用加入去污剂或加入 EDTA、8-羟基喹啉、柠檬酸钠以除去核酸酶的激活剂 Mg^{2+} , 就可以抑制核酸酶的活性, 保证在提纯过程中核酸大分子的完整。关于核酸分离纯化阶段中除去多糖、蛋白质及不同类型核酸之间分离的一些方法, 分别介绍如下。

1) 多糖的除去

肝糖元、淀粉及黏多糖, 由于其物理化学性质与核酸有许多相似之处, 常在提取液中残存下来。除去的方法常有:

①取材前尽量减少组织中多糖的含量, 如先使动物饥饿数天然后杀死, 可使细胞内肝糖元大大减少。

②加入淀粉酶, 将大分子多糖分解为小分子, 在以后纯化步骤中逐渐被除去。

③在浓磷酸盐存在下, 以 2-甲氧基乙醇抽提核酸提取液, 使多糖溶于下层水相, 核酸在上面有机层中。

④以钙盐沉淀 DNA, 再以草酸钾处理, 使之形成 DNA 钾盐回收, 然后用离子交换法吸附 DNA, 使之与多糖分离。

2) 蛋白质的除去

由于核酸在细胞内以核蛋白体形式存在, 不论采用哪种方法提取核酸, 蛋白质都不同程度地存在于体系中。因此, 除去蛋白质是核酸分离纯化不可避免的步骤。常用方法有下列几种:

①加入去污剂如硫酸十二脂钠, 从提取到分离纯化各阶段均可反复使用此法。去污

剂与氯仿法或苯酚法结合使用,效果更加理想。

②氯仿-戊醇或辛醇对提取液振荡抽提,蛋白质在氯仿-水界面形成凝胶,离心后除去,核酸留在水溶液中。此法在分离纯化中也常反复使用。

③苯酚水溶液抽提,在对氨基水杨酸等阴离子化合物存在下,DNA或RNA都可以进入水相,蛋白质则沉淀于酚层,然后取水相加入乙醇或2-乙氧基乙醇沉淀RNA或DNA,残余的酚可用葡聚糖凝胶G-10或G-25除去。

3) 不同类型核酸的分离

两种类型核酸的制备过程中,DNA制品中混杂着少量RNA或RNA制品中混杂着少量DNA是经常发生的。由于DNA和RNA结构和性质都很相似,而且分子量都很大,所以两类核酸的分离是核酸纯化工作中比较复杂和繁琐的。从DNA中除去RNA的方法常有:

①核糖核酸酶选择地破坏RNA,这是比较有效的方法,但使用的核糖核酸酶中常含有极微量的脱氧核糖核酸酶,必须事先加热处理除去,然后将纯净的核糖核酸酶与样品溶液一起在37℃孵育数分钟,就可达到破坏RNA的目的。

②钙盐分步沉淀:在核酸溶液中加入1/10体积10%的氯化钙溶液,使DNA与RNA均成为钙盐后,再利用DNA钙盐在2/10体积乙醇中形成沉淀析出,RNA钙盐不形成沉淀而彼此分离。

③活性炭吸附:将处理好的活性炭按1/15~1/20体积加入每毫升含有0.5~1mg DNA溶液中,0℃~4℃下搅拌1h,以31000 r/min离心1h,除去RNA后的DNA回收率可达94%。

在RNA制品中除去DNA,苯酚水溶液抽提是较有效和常用的方法。在没有阴离子化合物存在下,以等体积90%苯酚水溶液反复抽提RNA,可以除去绝大部分DNA。此外,也可采用加入脱氧核糖核酸酶处理,破坏DNA,或参考上述DNA与RNA分离方法将DNA除去。

4) 同类核酸的分离

①RNA混合物的分离:经过提取初步纯化的RNA制品中含有各类RNA和某些已降解的RNA混杂物。进一步纯化时,多应用柱层析、梯度离心及逆流分溶等方法。例如tRNA与rRNA的分离用吸附于硅藻土表面的甲基化白蛋白柱吸附后,以不同梯度氯化钠溶液洗脱,或用蔗糖梯度(顶部5%浓度,底部20%浓度)离心法分开。mRNA的代谢速度较快,在细菌中平均寿命为90min,在哺乳动物中约为几小时至十几小时,常用密度梯度离心法和DNA-琼脂柱进行分离。制备rRNA时,由于共沉作用,常混有mRNA,一般可用蔡-1,5-二磺酸处理,使二者分开。各种tRNA的提纯,通常采用逆流分溶法在磷酸缓冲液-甲酰胺-异丙醇系统下进行,分离效果较好。

②DNA混合物的分离:主要是变性或降解的DNA和天然的分离,常用磷酸钙、ECTEOLA-纤维素、DEAE-纤维素和甲基化白蛋白柱层析,逆流分溶,梯度离心等方法。一个具有生物活性高度提纯的DNA制品应具有如下标准:不含有蛋白质及多糖;不含有可透析的小分子杂质;在pH值为7时紫外吸收最大值在257~261nm之间;固体为纤维状,水溶液具有高的黏度并有流动双折射作用;具有电泳均一性及超离心中单

分散性；具有生物活性。

2.3.2.5 抗原的浓缩

浓缩是低浓度溶液通过除去溶剂（包括水）变为高浓度溶液的过程，在制备生物大分子及各种生化产品时，常在提取后和结晶前进行浓缩，有时也贯穿在整个制备过程中。沉淀（包括盐析和有机溶剂沉淀），广义上来说也是一种浓缩方法，经过沉淀再溶解，浓度可大大提高，但有时提取液很稀，体积又很大或结晶前除去少量溶剂，则常用其他方法浓缩。

（1）蒸发法

液体在任何温度下都在蒸发，蒸发是溶液表面的溶剂分子获得动能脱离液面逸向空间的过程。当溶液受热，液体中溶剂分子动能增加，蒸发过程加快。蒸发的快慢和温度、蒸发面积、液体表面积、液面蒸气分子密度，即蒸气压大小有关。各种液体在一定温度下都具有一定饱和蒸气压，当液面上的溶剂蒸气分子密度很小，经常处于不饱和的低压状态，液相与气相的溶剂分子为了维持其分子密度的动态平衡状态，溶液中的溶剂分子就必须不断地气化逸出空间，以维持其一定的饱和蒸气压。因此，根据上述原理，蒸气浓缩装置常按照加热、扩大液体表面积、低压和加速空气流动等因素而设计。

（2）冰冻法

冰冻法也是生物大分子及其他有机化合物浓缩的一种有效方法。生物大分子在冰冻时，水分结成冰，盐类及生物大分子不进入冰内而留在液相中。操作时先将待浓缩的溶液冷却使之变成固体，然后缓慢地融解，利用溶剂与溶质融解点的差别而达到除去大部分溶剂的目的。如蛋白质和酶的盐溶液，用此法浓缩时，不含蛋白质和酶的纯冰结晶浮于液面，蛋白质和酶则集中于下层溶液中，移去上层冰块，可得蛋白质和酶的浓缩液。

（3）吸收法

吸收法是一种通过吸收剂直接吸收溶液中的溶剂分子使溶液浓缩的方法。使用的吸收剂必须与溶液不起化学反应，对生物大分子不起吸附作用，易与溶液分开，吸收剂除去溶剂后能重复使用。实验室中最常用的吸收剂有聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮、蔗糖和凝胶等。使用凝胶时，首先选择凝胶粒度大小适当的溶剂及低分子物质，能渗入凝胶内，而生物大分子却完全排除于凝胶之外的，然后将洗净和干燥的凝胶直接投入待浓缩的稀溶液中，凝胶亲水性强，在水中溶胀时，溶剂及小分子被吸收到凝胶内，生物大分子留在剩余的溶液中，离心或过滤除去凝胶颗粒，即得已浓缩的生物大分子溶液。凝胶溶胀时吸收水分及小分子物质可同时起到浓缩及分离纯化两种作用，对生物大分子结构和生物活性都没有影响。吸收法是近年来生物化学及分子生物学日益广泛使用的浓缩和分离方法之一。

使用聚乙二醇等其他吸收剂时，需先将生物大分子溶液装入半透膜的袋里，扎紧袋口，外加聚乙二醇复盖，袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去，聚乙二醇被溶剂饱和后，可更换新的，直到浓缩至所需的浓度为止。用完一次以后的聚乙二醇经过加热除去溶剂便可再次使用。

(4) 超滤法

超滤法是使用一种特制的薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择过滤的方法。当溶液在一定压力下（外源氮气压或真空泵压）通过膜时，溶液和小分子透过，大分子受阻保留于原来溶液中。新方法是适于生物大分子尤其是蛋白质和酶的浓缩或脱盐，并具有成本低、操作方便、条件温和、能较好地保持生物大分子生理活性、回收率高等优点。除浓缩、脱盐外，并可应用生物大分子的分离纯化。

通过超滤法，蛋白质和酶的稀溶液一般可浓缩到 10% ~ 15% 浓度，回收率高达 90%。超滤法应用关键在于膜的选择。不同类型规格的膜、水流速（在规定压力下以 $\text{mL}/\text{cm}^2/\text{h}$ 或 min 表示）、分子量截止值（即大体上能被膜的保留分子最小分子量数值）等参数均不同，必须根据工作的需要来选用。此外，超滤装置形式、溶质成分及性质、溶液浓度及黏度都对超滤的效果有一定影响。

制品浓缩到一定程度，即可储存，如有必要可采用低温干燥（冰干）的方法除去制品中溶剂，使之成干粉。

制品的储存可分干态储存和液状储存。但不论是何种方法储存，都要避免长期暴露在空气中，防止微生物的污染。温度对生物活性物质的活性影响很大，在绝大多数情况下应采取低温保存。

干态储藏：干燥的制品一般比较稳定，如制品含水量很低，在低温情况下，生物大分子活性可在数月甚至数年没有显著变化。储藏方法也很简单，只将干燥后的样品置于干燥器内（内装有干燥剂）密封，保持在 0°C ~ 4°C 冰箱中即可。有时为了取样方便和避免取样时样品吸水和污染，可先将样品分装成许多小瓶中，每次用时，只取一小瓶。

液态储藏：液态储藏的优点是使样品省去干燥这一步骤，生物大分子的生理活性和结构破坏较少，缺点是需要较严格的防腐措施，储藏时间不能太长。如样品量大时封装、运输不方便，实验室常采取少量安瓿封存方法。液态储藏的注意事项如下。

1) 样品不能太稀，必须浓缩至一定浓度后才能封装储藏，样品太稀时容易引起生物大分子变性。

2) 一般需加入防腐剂和稳定剂，常用防腐剂有甲苯、苯甲酸、氯仿等。蛋白质和酶常用的稳定剂有蔗糖、甘油等，如酶加入底物和辅酶以提高其稳定性，此外钙、锌、硼酸等盐溶液对某些酶也具有一定保护作用。核酸大分子一般保存在氯化钠或柠檬酸与氯化钠的标准缓冲液中。

3) 储藏温度要求较低，大多数在 0°C 左右冰箱保存即可，有的则要求更低温度。但注意某些具有活性的大分子如 DNA 溶液低温保存时，有易使溶液结冰以造成其分子结构被破坏，另也有文献报道某些蛋白质和酶在低温中反而引起变性。故应分别情况对待，不能一概而论。

4) 生物大分子和各种生化制品的储藏和保存，总的来说，温度和水分是影响稳定性的两个重要因素，其次是各种稳定剂的应用是否适当也有很大的关系。实际应用时，必须对各方面都加以考虑。

5) 所提取、纯化的抗原物质，在使用前应进行定量测定。定量测定的方法，可根

据不同的物质,选择合适的方法进行。

6) 某些分子量较小的抗原,如肽类半抗原,由于其结构较为简单,目前已有化学合成的纯品供应,不必自己去从组织中提取。

2.4 抗体的制备

2.4.1 抗体制备的基本方法

选择质量好的抗原,还必须选择适当的免疫途径,才能产生质量好(特异性强和效价高)的抗体。抗体制备的基本方法主要包括以下方面。

2.4.1.1 用于免疫的动物

用作免疫的动物有哺乳类和禽类,主要为羊、马、家兔、猴、猪、豚鼠、鸡等,实验室常用动物为家兔、山羊和豚鼠等。动物种类的选择主要根据抗原的生物学特性和所要获得抗血清数量,如一般制备抗 γ -免疫球蛋白抗血清,多用家兔和山羊,因动物反应良好,而且能够提供足够数量的血清。用于免疫的动物应适龄,健壮,无感染性疾病,最好为雄性,此外还需十分注意动物的饲养,以消除动物的个体差异以及在免疫过程中死亡的影响。若用兔,最好用纯种新西兰兔,一组3只,兔的体重以2~3kg为宜。

2.4.1.2 免疫途径

免疫途径有多种多样,如静脉内、腹腔内、肌肉内、皮内、皮下、淋巴结内注射等,一般常用皮下或背部多点皮内注射,每点注射0.1mL左右。途径的选择决定于抗原的生物学特性和理化特性。例如:激素、酶、毒素等生物学活性抗原,一般不宜采用静脉注射。

2.4.1.3 佐剂

由于不同个体对同一抗原的反应性不同,而且不同抗原产生免疫反应的能力也有差异,因此常常在注射抗原的同时,加入能增强抗原的抗原性物质,以刺激机体产生较强的免疫反应,这种物质称为免疫佐剂。

佐剂除了延长抗原在体内的存留时间,增加抗原刺激作用外,更主要的是,它能刺激网状内皮系统,使参与免疫反应的免疫活性细胞增多,促进T细胞与B细胞的相互作用,从而增强机体对抗原的细胞免疫,增加抗体的产生。

常用的佐剂是福氏佐剂(Freund adjuvant),其成分通常是羊毛脂1份、石蜡油5份,羊毛脂与石蜡油的比例,视需要可调整为1:2~1:9(V/V),这是不完全福氏佐剂,在每毫升不完全佐剂加入1~20mg卡介苗就成为完全佐剂。

配制方法:按比例将羊毛脂与石蜡油置容器内,用超声波使之混匀,高压灭菌,置4℃下保存备用。免疫前取等容积完全或不完全佐剂与免疫原溶液混合,用振荡器混匀成乳状,也可以在免疫前取需要量佐剂置乳钵中研磨,均匀后再边磨边滴加入等容积抗原液(其中加卡介苗3~4mg/mL或不加),加完后再继续研磨成乳剂,滴于冰水上5~

10min 内完全不扩散为止。为避免损失抗原,亦可用一注射器装抗原液,另一注射器装佐剂,二者以聚乙烯塑料管连接,然后二者来回反复抽吸,约数十分钟后即能完全乳化。检查合格后即以其中一注射器作注射用。

2.4.1.4 免疫方法

抗原剂量,首次剂量为 300 ~ 500 μ g,加强免疫的剂量约为首次剂量的 1/4 左右。每 2 ~ 3 周加强免疫一次。加强免疫时用不完全佐剂,首次免疫时皮下注射百日咳疫苗 0.5mL,加强免疫时不必注射百日咳疫苗。

在第 2 次加强免疫后 2 周,从耳缘静脉取 2 ~ 3mL 血,制备血清,检测抗体效价。如未达到预期效价,需再进行加强免疫,直到满意时为止。当抗体效价达到预期水平时,即可放血制备抗血清。

2.4.1.5 抗血清的采集与保存

家兔是最常用以产生抗体的动物,因此这里主要讨论兔血的收集。

取兔血有两种方法,一是耳缘静脉或耳动脉放血;二是颈动脉放血,也可心脏采血。取动脉或静脉放血时,将兔放入一个特造的木匣或笼内,耳露于箱(笼)外,也可由另一人捉住兔身。剪去耳缘的毛,用少许二甲苯涂抹耳廓,30s 后,耳血管扩张、充血。用手轻拉耳尖,以单面剃须刀或尖的手术刀片,快速切开动脉或静脉,血液即流出,每次可收集 30 ~ 40mL。然后用棉球压迫止血,凝血后洗去二甲苯。2 周后,可在另一耳放血。此法可反复多次放血。颈动脉放血时,将兔仰卧,固定于兔台,剪去颈部的毛,切开皮肤,暴露颈动脉,插管,放血。放血过程中要严格按无菌要求进行。

收集的血液置于室温下 1h 左右,凝固后,置 4 $^{\circ}$ C 下,过夜(切勿冰冻)析出血清,离心 4000r/min, 10min。在无菌条件,吸出血清,分装(0.05 ~ 0.2mL/瓶),储于 -40 $^{\circ}$ C 以下冰箱,或冻干后储存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.4.1.6 抗血清质量的评价

在免疫期间,不仅各个不同的动物,而且同一动物在不同的时间内抗血清效价、特异性、亲和力等都可能发生变化,因而必须经常地采血测试。只有在对抗血清的效价、特异性、亲和力等方面作彻底的评价后,才可使用所取得的抗血清。

(1) 效价:抗血清的效价,就是指血清中所含抗体的浓度或含量。效价测定的方法常用的是放射免疫法,此法对所有的抗体均适用。某些由大分子(如蛋白类)抗原所产生的抗体,可用双扩散等方法测定。前者测定的效价极为精确。而后者则粗糙得多。

①放射免疫法。以不同稀释度的抗血清与优质标记抗原混合,37 $^{\circ}$ C 下孵育 24h 后,测定其结合率。通常以结合率为 50% 的血清稀释度为效价。如某抗血清的结合率为 50% 时的稀释度为 1:15000,则该血清的效价就是 1:15000。抗血清的效价,除由抗血清本身的性质决定外,还受标记抗原的质量、孵育时间,所用稀释液的成分及其 pH 等

因素的影响,在工作中必须引起注意。

②双向扩散法。利用大分子抗原和抗体在琼脂平板上扩散,两者在相交处产生沉淀线,以观察和判断抗血清中是否有抗体及其浓度。

琼脂板的制备:100mL pH 值为 7.1 的磷酸盐缓冲液加到 15g 的琼脂内,于水浴中加温,搅拌,使琼脂完全溶解,趁热用纱布过滤,待溶液冷却到 65℃ 左右时,加入叠氮钠 (NaN_3),使其在溶液中的浓度为 0.1%。用移液管把琼脂放在干净平皿或玻片上,约 3mm 厚,待其冷却,完全凝固后,用打孔器打孔。中央孔内加适量抗原(容量为 50 μL),周围各孔内分别加入 50 μL 稀释度为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 及不稀释的抗血清,37℃ 下孵育 24h,观察有无沉淀线产生,以判断血清的稀释度。

(2) 特异性测定:抗血清的特异性或称专一性是指抗血清对相应的抗原及近似的抗原物质的识别能力。特异性好就是抗血清的识别能力强。通常,特异性是以交叉反应率来表示的。交叉反应率低,表示抗血清的特异性好,反之则特异性差。交叉反应率一般是用竞争抑制曲线来判断的。

$$S = y/Z \times 100\%$$

式中: S 为交叉反应率, y 为 IC_{50} 时抗原浓度, Z 为 IC_{50} 时近似抗原物质的浓度。

(3) 亲和力:在免疫学中,亲和力是指抗体与结合抗原体的活度或牢固度。抗体与抗原结合疏松,结合后会迅速解离,称为亲和力低,反之,亲和力高。亲和力的高低是由抗原分子的大小,抗体分子的结合位点与抗原的决定基之间的立体结构型的合适程度决定的。亲和力常以亲合常数 K 表示。 K 的单位是升/摩尔 (L/mol)。在 RIA 中, K 是该抗血清能达到的最小检出量(灵敏度)的倒数, $K = 1/[H]$, $[H]$ 是最小检出量,通常, K 的范围在 $10^8 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ 之间,也有高达 10^{14} L/mol 的。

计算亲合常数的方法 20 余种,计算出的 K 都不能真实反映实验情况,只能作为参考。

2.4.1.7 免疫失败的原因及应采取的措施

有时不能获得满意的抗血清,可从下列几个方面找原因,以求改进。

(1) 种属及品系:免疫动物的种属及品系是否合适,可考虑改变动物的种属或品系,或扩大免疫动物的数量。

(2) 抗原质量:是否良好,可改用其他厂家的产品或改用同一厂家的其他批号,也可考虑改变抗原分子的部分结构,或改进提取方法。

(3) 抗体:制备的免疫原是否符合要求,可从偶联剂,载体、抗原或载体的比例、反应时间等多方面去考虑,并加以改进。

(4) 佐剂:所用的佐剂是否合适,乳化是否完全,可改用其他佐剂,或加强乳化。

(5) 程序:免疫的方法、剂量,加强免疫的间隔时间和次数,免疫的途径是否合适。

(6) 饲养管理:动物的饲养是否得当,如营养(饲料、饮水)、环境卫生(通风、采光、温度)是否符合要求,动物的健康情况是否良好等。

2.4.2 多克隆抗体的制备

多克隆抗体 (Polyclonal antibody, PAb) 是采用天然抗原免疫动物制备的血清,

PAb 中含有大量抗体,称为免疫血清或抗血清。由于天然抗原中常含有多种不同的抗原表位,可以刺激体内多个 B 细胞增殖,产生多种不同抗原表位的抗体并释放于血清中,抗血清又未经免疫纯化,因此其为多种抗体的混合物,称为多克隆抗体,所采用的动物多为鼠、羊、兔、马等动物。多克隆抗体具有中和抗原、免疫调理等重要作用,来源广泛,易于制备,其缺点是特异性不高,易发生交叉反应。

2.4.2.1 动物的选择

选择合适的动物是制备抗血清的首要条件。选择时应注意以下几个问题:①抗原与免疫动物的种属差异越远越好,亲缘太近不易产生抗体应答;②抗血清的需求量。从大型动物如马、骡等可获得大量的血清;③抗血清的要求。抗血清可分为 R 型和 H 型,其中常用 R 型;④根据抗原的情况选择。蛋白质抗原适合于大部分动物如山羊和家兔,但某些动物体内含有类似的物质如 IgE,多种酶对这些动物的免疫原性极差,免疫后不易出现抗体;⑤留体激素免疫多用家兔,酶类免疫多用豚鼠。

2.4.2.2 免疫剂量、时间和途径

抗原的剂量选择应考虑抗原性强弱、分子量大小、动物大小、免疫时间等因素。抗原需要量多,时间间隔大,剂量可适当加大。大动物抗原剂量约为 0.5~1.0mg/只,小动物约为 0.1~0.6mg/只。注射动物时一般采用多点注射,一只动物注射总点数约为 8~10 点,如足掌、耳后、背部两侧、颌下等处皮内或皮下,还可采用肌肉、静脉、腹腔等途径。免疫间隔的时间也很重要。首次免疫后动物机体处于识别抗体和 B 细胞增殖阶段,如很快接着第二次注入抗原,极易造成免疫抑制。一般首次和第二次间隔 10~20d 为好,二次以后每次间隔一般为 7~10d,不能太长,以免刺激变弱,抗体效价不高。

2.4.2.3 动物采血

将动物免疫 3~5 次后,若其产生的抗血清鉴定合格,应在免疫后 5~7d 及时采血,否则抗体浓度会下降。常用的采血方法有:①颈动脉放血法,在动物颈外侧做皮肤切口,找到颈总动脉后剪断血管,放出动脉血;②心脏采血法,此法多用于豚鼠、鸡等小型动物,采血时应注意穿刺位置;③静脉多次采血法,家兔可用耳中央静脉,山羊用颈静脉,这种放血法可以隔日一次,多次采血,共可获得 1500~2000mL 血液。

抗血清的分离多采用室温自然凝固,然后放置在 37℃ 或 4℃ 凝块。前者迅速,但血清较少;后者时间长,但血清量多。

2.4.2.4 抗体的鉴定

抗血清在保存和使用前,必须做效价和特异性鉴定。

(1) 双向免疫扩散法鉴定抗体的特异性按双向免疫扩散技术打两排孔,上排放抗原粗提物和纯化抗原,下排放抗血清,进行双扩散 18~24h 后,仔细观察上下两排孔之间出现的沉淀线。若与粗抗原及纯抗原之间皆出现一条沉淀线,且两者相互融合,则证明该动物已产生单价特异抗体;不出现沉淀线,表明未免疫成功。若与纯化抗原出现一

条沉淀线，而与粗抗原出现多条沉淀线，且其中一条沉淀线与纯抗原沉淀线相连接，也是成功的免疫，只需将其中的杂抗体除去，即可成为单价特异性抗体。

(2) 双向免疫扩散法测定血清效价测定抗血清效价有两种稀释方法：一是稀释抗血清，如 1:2、1:4、1:8、1:16 对倍稀释，分别与一个浓度的纯抗原反应；另一是稀释抗原，即把抗原做对倍稀释，分别与不同浓度的抗血清进行双扩散实验。效价在 1:8 以上即可采血用于一般试验。

2.4.2.5 抗体的储存

抗体具有严密的三维结构，使之能够抵御轻度变性的环境，长期存放较为容易。通常将甘油或其他稳定剂加入储存的抗体中。为了防止细菌或真菌污染抗体，可根据需要在抗体中加入抗微生物制剂，如 0.02% 的叠氮化钠或 0.01% 的硫柳汞。储存温度可以有 3 种选择：①4℃ 保存，将抗血清除菌后液体状态放入普通冰箱，可存放 3 个月到半年以上；②低温保存，即存放于 -20℃ ~ -40℃ 的低温冰箱，一般可保存 5 年以上效价不会有明显下降；③冻干粉状保存，最后抗体的水分不应高于 0.2%，封装后可长期保存 5 ~ 10 年效价不会明显下降。

在保存时应注意抗体溶液不应反复冻融，因为反复冻融会导致部分抗体失活并产生不需要的蛋白-蛋白凝聚物，从而使活性降低甚至丧失。

2.4.2.6 抗体的纯化

粗制的抗体可用于一般免疫化学试验，但较多情况下应使用纯化后的单价特异性抗体。单价特异性抗体是指抗血清只与其特异性抗原发生反应的抗体。由于抗原的纯度问题，在制备的抗血清中通常会含有其他杂抗体，因此必须除去杂抗体。纯化抗体的方法较多，如亲和色谱法、吸附剂法、离子交换色谱法等。建议采用蛋白 A 或蛋白 G 微球纯化法，这种方法效率高。A 蛋白或 G 蛋白基质有商品化的产品，能将任何来源的抗体纯化，而且比常规方法简单，纯化效果是其他常规方法的数倍。

2.4.3 单克隆抗体的制备

利用细胞杂交技术制备出免疫小鼠脾细胞与恶性浆细胞瘤细胞融合的杂交瘤细胞。它可以经过人工培养而无需增殖，又可以针对某一抗原决定簇，由一个 B 细胞分化增殖的子代细胞集团，即由单一纯系细胞合成的抗体称为单克隆抗体 (Monoclonal antibody, MAbs)。一种 MAbs 的 Ig 分子，其重链、轻链、独特型完全相同，而且性质纯、效价高、特异性强，可以避免血清学上的交叉反应，易于体外大量制备和纯化，已被广泛应用于疾病诊断、抗原检测等各个方面。

单克隆抗体由细胞杂交技术制备而成，具有理化性质高度均一、生物活性单一、与抗原结合特异性强、产量大且稳定、易于人为处理和质量控制等特点，在医学的各个领域如免疫学、微生物学、生物化学等方面得到了广泛的应用。制备单克隆抗体的基本步骤如下。

2.4.3.1 抗原提纯和动物免疫

对抗原的要求是纯度越高越好,尤其是初次免疫所用的抗原。如为细胞抗原,可取 1.0×10^7 个细胞做腹腔免疫。可溶性抗原需加完全福氏佐剂并经充分乳化。如为聚丙烯酰胺电泳纯化的抗原,可将抗原所在的电泳条带切下,研磨后直接用于动物免疫。

选择与所用骨髓瘤细胞同源的 BALB/c 健康小鼠,鼠龄在 8~12 周,雌雄不限。为避免小鼠反应不佳或免疫过程中死亡,可同时免疫 3~4 只小鼠。

免疫过程和方法与多克隆抗血清制备基本相同,因动物、抗原形式、免疫途径不同而异,以获得高效价抗体为最终目的。免疫间隔一般 2~3 周。一般来说被免疫动物的血清抗体效价越高,融合后细胞产生高效价特异抗体的可能性越大,而且单克隆抗体的质量(如抗体的浓度和亲和力)也与免疫过程中小鼠血清抗体的效价和亲和力密切相关。末次免疫后 3~4d,分离脾细胞融合。

2.4.3.2 骨髓瘤细胞及饲养细胞的制备

选择瘤细胞株的最重要一点是与待融合的 B 细胞同源。如待融合的是脾细胞,各种骨髓瘤细胞株均可应用,但应用最多的是 Sp2/0 细胞株。该细胞株生长及融合效率均佳。此外,该细胞株本身不分泌任何免疫球蛋白重链或轻链。细胞的最高生长密度为 9.0×10^5 个/mL,倍增时间通常为 10~15h。融合细胞应选择处于对数生长期、细胞形态和活性俱佳的细胞(活性应大于 95%)。骨髓瘤细胞株在融合前应先用含 8-氮鸟嘌呤的培养基作适应培养,在细胞融合的前一天用新鲜培养基调细胞浓度为 2.0×10^5 个/mL,次日一般即为对数生长期细胞。

在体外培养条件下,细胞的生长依赖适当的细胞密度,因而,在培养融合细胞或细胞克隆化培养时,还需加入其他饲养细胞(Feeder cells)。常用的饲养细胞为小鼠的腹腔细胞,制备方法为用冷冻果糖液注入小鼠腹腔,轻柔腹部数次,吸出后的液体中即含小鼠腹腔细胞,其中有巨噬细胞和其他细胞。亦有用小鼠的脾细胞、大鼠或豚鼠的腹腔细胞作为饲养细胞的。

在制备饲养细胞时,切忌针头刺破动物的消化器官,否则所获细胞会有严重污染。饲养细胞调至 1.0×10^5 个/mL,提前一天或当天置板孔中培养。

2.4.3.3 细胞融合

细胞融合是杂交瘤技术的中心环节,基本步骤是将两种细胞混合后加入聚乙二醇(PEG)使细胞彼此融合。其后以培养液稀释 PEG,消除 PEG 的作用。将融合后的细胞适当稀释,分置培养板孔中培养。融合过程中有几个问题应特别注意。①细胞比例:骨髓瘤细胞与脾细胞的比值可从 1:2 到 1:10 不等,常用 1:4 的比例,应保证两种细胞在融合前都具有较高活性。②反应时间:在两种细胞的混合细胞悬液中,开始 1min 滴加 4~5mL 培养液;间隔 2min 滴加 4.5mL 培养液;间隔 2min 滴加 5mL 培养液,而后加培养液 50mL。③培养液的成分:对融合细胞,良好的培养液尤其重要,其中小牛血清、各种离子和营养成分均需严格配制。如融合效率降低,应随时核查培养基情况。

2.4.3.4 有限稀释法

筛选阳性株一般选用的骨髓瘤细胞为 HAT 敏感细胞株, 所以只有融合的细胞才能持续存活 1 周以上。融合细胞呈克隆生长, 经有限稀释后 (一般稀释至 0.8 个细胞/孔), 按 Poisson 法计算, 应有 36% 的孔为 1 个细胞/孔。细胞培养至覆盖 10% ~ 20% 孔底时, 吸取培养上清液用 ELISA 检测抗体含量。首先依抗体的分泌情况筛选出高抗体分泌孔, 将孔中细胞再行克隆化, 而后进行抗原特异的 ELISA 测定, 选高分泌特异性细胞株扩大培养或冻存。

2.4.3.5 制备与纯化

筛选出的阳性细胞株应及早进行抗体制备, 因为融合细胞随培养时间延长, 发生污染、染色体丢失和细胞死亡的概率增加。抗体制备有两种方法。一是增量培养法, 即将杂交瘤细胞在体外培养, 在培养液中分离单克隆抗体。该法需用特殊的仪器设备, 一般应用无血清培养基, 以利于单克隆抗体的浓缩和纯化。另一种最普遍采用的是小鼠腹腔接种法, 选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠, 先用液体石蜡进行小鼠腹腔注射, 一周后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中去。通常在接种一周后即有明显的腹水产生, 每只小鼠可收集 5 ~ 10mL 的腹水, 有时甚至超过 40mL。该法制备的腹水抗体含量高, 每毫升可达数毫克甚至数十毫克水平。此外, 腹水中的杂蛋白也较少, 便于抗体的纯化。接种细胞的数量应适当, 一般为 5×10^5 个/鼠, 可根据腹水生长情况适当增减。

选出的阳性细胞株应及早冻存, 冻存的温度越低越好, 冻存于液氮的细胞株活性仅有轻微的降低, 而冻存在 -70°C 冰箱则活性改变较快。细胞不同于菌种, 冻存过程中需格外小心。二甲基亚砜 (DMSO) 是普遍应用的冻存保护剂。冻存细胞复苏后的活性多在 50% ~ 95% 之间。如果低于 50%, 则说明冻存复苏过程有问题。

单克隆抗体的纯化方法同多克隆抗体的纯化, 腹水中特异性抗体的浓度较抗血清中的多克隆抗体高, 纯化效果较好。按所要求的纯度不同采用相应的纯化方法, 一般采用盐析、凝胶过滤和离子交换色谱等步骤达到纯化目的, 也有采用较简便的酸沉淀方法。目前最有效的单克隆抗体纯化法为亲和纯化法, 多用葡萄球菌 A 蛋白或抗小鼠免疫球蛋白与载体 (最常用 Sepharose) 交联, 制备亲和色谱柱将抗体结合后洗脱, 回收率可达 90% 以上。A 蛋白可与 IgG₁、IgG₂ 和 IgG₃ 结合, 同时还结合少量的 IgM。洗脱液中的抗体浓度可用紫外光吸收法粗测, 小鼠 IgG 单克隆抗体溶液在 280nm 处吸光度为 1.44 时相当于 1.0mg/mL。经低 pH 洗脱后在收集管内预置中和液或速加中和液对保持纯化抗体的活性至关重要。

(陈兴业)

第3章 免疫诊断技术常用的酶

3.1 酶的概念与发展

3.1.1 酶的研究发展概况

酶是生物催化剂，它具有作用专一性强、催化效率高和反应条件温和等显著特点。一切生物的生命活动都是由代谢的正常运转来维持的，代谢中的各种生物化学反应几乎都是在酶的催化下进行的。因此，酶是生命活动的产物，又是生命活动不可缺少的条件之一。同时，酶还是分子生物学研究的重要工具，正是由于某些专一性工具酶的出现才使核酸一级结构测定有了重要突破。1970年，美国约翰·霍普金斯大学的 Smith 等从细菌中分离出能识别特定核苷酸序列，而且其切点专一的限制性酶，命名为 Hind II。Nathans 用该酶降解病毒 SV40 DNA，排列了酶切图谱，从此，Hind II 成为分子克隆技术中不可缺少的工具酶，Smith 等因此荣获 1979 年诺贝尔生理医学奖。限制性内切酶的发现提供了特异剪切 DNA 的工具，促进了 DNA 重组技术诞生，推动了基因工程的发展，同时也是基因结构表达、调控及分子生物学、分子遗传学研究不可缺少的工具。

早在几千年前，人类就开始利用微生物来制作食品和饮料。我国在 4000 多年前已经开始在酿酒、制酱、制饴等过程中，不自觉地利用了酶的催化作用，但是真正认识它、利用它还是近几百年的事。

国外知道酶的存在是与发酵和消化联系在一起的。1833 年，Payen、Persoz 从麦芽水提取物中用酒精沉淀得到一种对热不稳定的活性物质，它可以促进淀粉水解成可溶性糖，他们把这种物质称为淀粉糖化酶（diastase），其意为“分离”，表示可以从淀粉中分离出可溶性糖来，并指出它的热不稳定性，初步触及了酶的一些本质问题。19 世纪中期，Pasteur 等人对酵母发酵进行了大量研究，指出酵母中存在一种使葡萄糖转化为酒精的物质。1878 年德国 Kunne 首先指出这类物质称之为 Enzyme，Enzyme 一词来自希腊文，原意为“在酵母中”，中文译为酶。1896 年德国学者 Buchner 兄弟发现了酵母的无细胞提取液也能将葡萄糖转化为乙醇和 CO_2 ，这表明了酶不仅能在细胞内，而且在细胞外也可进行催化作用，此项发现促进了酶的分离和对其理化性质的探讨，也促进了对有关生命过程中酶系统的研究。一般认为酶学研究始于 1896 年 Buchner 兄弟的发现。

20 世纪初，酶学研究得到了迅速发展。1913 年，Michaelis 和 Menten 提出了中间产物学说，并推导出酶促反应的基本方程式——米氏方程。这一学说的提出对酶反应机理的研究是一个重要突破。1926 年，Summer 首次从刀豆中得到脲酶结晶（这是第一个酶结晶），并提出酶的化学本质是蛋白质的观点。但是直到若干年后获得了胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶结晶后，Summer 的观点才被广泛接受，并获得了

1947 年诺贝尔奖。

20 世纪 50 ~ 60 年代, Koshland 提出了“诱导契合”理论, 以解释酶的催化理论和专一性, 同时也搞清楚了某些酶的催化活性与生理条件变化有关。1960 年, 法国的 Jacob 和 Monod 提出操纵子学说, 阐明了生物合成的调节机制, 使酶的生物合成可以按照人们的意愿加以调节控制。通过酶的诱导和解除阻遏, 可以显著地提高酶的产量。1969 年, 首次报道由氨基酸单体化学合成牛胰核糖核酸酶, 这同样是一个伟大的进展, 证明了酶和非生物催化剂没有显著区别。自 20 世纪 70 年代以来, 将 DNA 重组技术用于酶学研究得到很快的发展。用定点突变法可以改变酶的催化活性和专一性。这有助于认识酶的作用机制, 并为设计特定需要的酶奠定了基础。

到目前为止, 已发现生物体内存在的酶有 4000 多种, 而且每年都有新酶发现。数百种酶已纯化到了均一纯度并得到了结晶。由于蛋白质分析技术的飞速发展, 特别是在运用 X 射线衍射分析等方法后, 人们相继弄清楚了溶菌酶 (129 个氨基酸残基)、胰凝乳蛋白酶 (245 个氨基酸残基)、羧肽酶 (307 个氨基酸残基)、多元淀粉酶 A (460 个氨基酸残基) 等的结构和作用机理。现在对于细胞基本代谢过程中的各种酶, 很多已有比较清楚的认识, 但有关遗传过程中的酶还有待深入研究。

近年来发现, 除了蛋白质以外, 某些生物分子也具有催化活性。1982 年 Cech 等人在四膜虫的 RNA 分子中发现一个具有自身切接功能的片断, 它可以从前体 RNA 中特异地把与它自身相同的 RNA 片断切下来, 然后把剩余的 RNA 重新连接起来。切下来的片断环化成为具有催化活性的 RNA 称为核酸类酶 (ribozyme)。1986 年, Schultz 和 Learner 报道了用事先设计好的过渡态类似物作半抗原, 按标准单克隆抗体制备法获得了具有催化作用的抗体, 即抗体酶 (abzyme)。这些成果为酶的结构功能研究和酶的应用开辟了新的研究领域。

3.1.2 酶的基本概念

自然界存在许多的化学反应, 其中相当一部分可以被催化剂所催化。催化剂是能够加速化学反应速度而反应前后本身并无变化的物质。一般按来源把催化剂分为两类。一类是非生物催化剂, 即一般的化学催化剂, 如镍为乙烯加氢反应的催化剂。另一类是生物催化剂 (酶)。从 1833 年 Payen 和 Persoz 发现第一个酶起, 直至 20 世纪 80 年代初期, 已经发现 4000 多种酶。这些酶都是由生物体自然产生的具有催化能力的蛋白质。然而, 任何事物的认识都经历一个逐步发展的过程。近些年来, Ribozyme、抗体酶、人工酶、生物酶工程生产的酶以及模拟酶的出现, 使酶的传统概念受到了严峻的挑战。

长期以来, 人们认为只有某些蛋白质才具有生物催化剂功能, 但近年来的研究发现, 某些 RNA 分子也具有生物催化功能, 被称为 Ribozyme。现在可以把 Ribozyme 分为 3 类: 自我剪接 Ribozyme、自我剪切 Ribozyme 和催化分子间反应的 Ribozyme。Ribozyme 的底物也由 RNA 扩大到 DNA、糖类、氨基酸酯。这些事实表明 Ribozyme 是普遍存在的, Ribozyme 的催化活性依赖于 RNA 的结构, 具有很高的底物专一性, 与传统酶的催化行为极其相似。

20 世纪 80 年代后期出现的抗体酶, 是抗体的高度选择性和酶的高效催化能力巧妙

结合的产物,本质上是一类具有催化活性的抗体分子,在可变区域赋予了酶的属性,所以也称为催化性抗体。用事先设计好的抗原(或半抗原)按照一般单克隆抗体制备程序可获得有催化活性的抗体。

3.1.3 酶的重要性

组成生命活动的大量生化反应都是由特定的酶所催化产生的。如,光合作用、食物的消化等均离不开酶。在一个细胞内存在着各种物质分子,它们之间可以发生各种各样的反应,细胞利用酶使这些复杂的生化反应得以有序的顺利进行,保证正常代谢途径的畅通而不发生副反应。生物体内条件温和,酶催化反应却非常迅速,某些细菌在20min就增殖一代,酶在这短短的时间内能合成新细胞内全部的复杂物质。

生物活动需要能量,如人体所需要的能量来自糖类、酯类和蛋白质。在酶催化作用下,糖类转变为单糖,脂肪转变为脂肪酸和甘油,蛋白质转变为氨基酸,再经过氧化途径进行分解代谢而释放能量,并伴随生成高基团转移势化合物,以便于能量的转移和利用。

酶是具有专一性和高度催化效能的蛋白质,是生物体内产生的,生物体内几乎所有生化反应都是酶催化进行的。新陈代谢就是酶催化的许多同化与异构反应的复杂体系。生物的发育、生长、繁殖等都涉及到酶的催化作用。酶系统的完善性与协调性成为生命的关键。否则,将引起疾病,甚至危及生命。许多毒物之所以有毒,就在于它们是酶的抑制剂,会使酶失活。生物体内酶的种类和性质是由其基因决定的,如基因发生突变,可能会导致遗传疾病。

3.2 酶的作用特点

酶是由活细胞产生的一类具有催化作用的蛋白质,故又有生物催化剂(Biocatalyst)之称。与一般催化剂相比,酶的催化作用有高度专一性、高度催化效率及其催化活性的可调节性和高度的不稳定性(变性失活)等特点。酶的这些性质使细胞内错综复杂的物质代谢过程能有条不紊地进行,使物质代谢与正常的生理机能互相适应。若因遗传缺陷造成某个酶缺损,或其他原因造成酶的活性减弱,均可导致该酶催化的反应异常,使新陈代谢紊乱,甚至发生疾病,因此酶与医学的关系十分密切。

随着具有催化功能的RNA和DNA的陆续发现,目前认为生物体内除了存在酶这类催化剂外,另一类则是核酸催化剂,因其本质为RNA则称为核酶(Ribozyme),现代科学认为酶是由活细胞所产生,能在体内或体外发挥相同催化作用的一类具有活性和特殊结构的生物大分子,包括蛋白质和核酸,但由于核酸参与催化反应有限,而且这些反应均可由相应的酶所催化,因此酶仍是体内最主要的催化剂。

催化剂有一般的化学催化剂和生物催化剂两大类。生物催化剂(Biocatalyst)是具有催化功能的生物大分子(蛋白质或RNA)。酶(Enzyme)就属于生物催化剂,是具有催化功能的蛋白质。酶具有催化剂的共性,只要有少量酶存在即可大大加快反应的速度,它能使反应迅速提高,而不改变反应的平衡点;它参与反应,但在反应后其本身无

变化,因此可以重复使用。

3.2.1 酶催化的高效性

酶的催化效率非常高,酶催化反应速度比非催化反应速度高 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍,至少高出非酶催化反应速率的几个数量级。

3.2.1.1 酶可极大地降低反应所需的活化能

处于初态的分子要发生反应,首先要吸收能量成为活化分子,才能产生有效碰撞,打破和形成一些化学键,最终形成产物。活化态分子的能量超过初态分子的平均水平,超出的那部分能量就是活化能。活化能定义是:在一定温度下,1mol 反应物全部进入活化态所需要的自由能。其单位是 J/mol。

3.2.1.2 酶催化是多种催化因素的协同作用

形成酶催化高效性的主要因素有:酶与底物的临近效应和定向效应,酶与底物相互诱导的扭曲变形和构象变化的催化效应,还有广义的酸碱催化,共价催化及酶活性中心微环境的影响。在一个具体的酶催化反应中,往往是上述因素中的几个因素同时起作用,从而表现出酶催化功能的高效性,这是一般化学催化无法比拟的。

3.2.2 酶的底物专一性

酶的底物专一性是指酶对它的催化对象有严格的选择性。一种酶只能催化某一类物质,甚至某一种分子,另外酶催化反应几乎没有副产物。

3.2.2.1 底物和其他分子与酶结合物的非共价力

在性质上与维系酶本身立体构象的力是相同的,包括范德华力、静电力、氢键和疏水力。通常一个底物结合部位由一个酶分子表面的凹槽或空穴组成。这是酶的活性中心,它的性状与底物分子性状互补。底物分子或底物分子的一部分像钥匙一样,可专一地楔入到酶的活性中心部位,通过多个结合位点的结合,形成酶-底物复合物;同时,酶活性中心的催化基团正好对准底物的有关敏感键,就可顺利地进行催化反应了。

3.2.2.2 酶的底物专一性类型

一种物质分子能否成为某种酶的底物,必须具有两个条件:一是该分子上有被酶作用的化学键;二是该分子上有一个或多个结合基团能与酶活性中心结合,并使其敏感键对准酶的催化基团,才能进行结合,同时这种结合所释放的能量,又可以作为催化的驱动力。

3.2.3 酶催化作用的温和性

酶催化作用与非酶催化作用的另一个显著差别在于,酶催化作用的条件温和。如:

温度低于 100℃，正常的大气压下，中性的 pH 环境，相反，一般化学催化往往需要高温、高压和极端的 pH 条件。究其原因，一是由于酶催化作用所需的活化能较低，二是由于酶是具有生物催化功能的生物大分子，在极端的条件下会引起酶的变性而失去其催化功能。

3.3 酶的催化反应动力学

根据酶反应的专一性和高效性，研究酶的催化动力学方法已用于测定底物、酶、激活剂和抑制剂。从分析的角度考虑掌握酶反应系统的动力学理论是非常重要的。

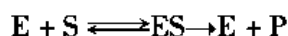
根据质量作用定律，化学反应的速率与反应物浓度的乘积成正比。这表明对单一组分参加的反应，其反应速率直接与反应物的浓度成正比，而对二组分反应，反应速率与两种反应物浓度的乘积成正比。这种关系可以表示为：

$$\begin{array}{ll} \text{速率} \propto k [\text{试剂}] & \text{单一组分反应} \\ \text{速率} \propto k [\text{试剂}_1] \cdot [\text{试剂}_2] & \text{二组分反应} \end{array}$$

式中： k 为反应速率常数；两个反应分别为一级和二级反应。有时，增加反应试剂的浓度时反应速率并不增加，这样的反应称之为零级反应。

对于酶催化反应，其反应动力学的预测是非常复杂的。但对只有一种底物参与的酶催化反应，实验结果如图 3-1 所示：当底物浓度很小时，反应速率与底物的浓度成正比，呈直线上升，属于一级反应；当底物的浓度升高到一定的程度时，反应速率不再随底物浓度的增加而增大，这时变成零级反应。

在标准的酶分析和经典的酶动力学研究中，与底物和可溶性辅助物相比，酶分子的浓度非常低。假设只有一个底物（S）和一个产物（P），酶的催化反应可以表示如下：



在催化反应时，E 首先与 S 形成一种不稳定的中间产物 ES（也称为中间复合物），然后 ES 再分解成产物和原来的酶。在酶浓度恒定的条件下，当底物浓度较低时，酶未被饱和，这时反应速率取决于底物的浓度，底物的浓度越大，单位时间内 ES 生成也越多，而反应速率取决于 ES 的浓度，故反应速率也随之增大，表现为一级反应。当底物浓度加大后，酶逐渐被底物饱和，反应速率的增加和底物的浓度就不成正比，当底物浓度增加至极大值，所有酶分子的活性部位均被底物饱和，所有的 E 均转变成 ES，使 ES 复合物的浓度为最大，因而表现出最大的反应速率。底物浓度再增加时，不能提高 ES 复合物的浓度，因而反应速率将保持不变，即为零级反应。

在一个简单的反应过程中，如图 3-2 的开始部分明显地显示了中间复合物的浓度 [ES] 随反应时间逐步达到稳定的过程。当酶和底物在反应中结合后，其中间产物 ES 浓度增加，而游离的酶浓度减少，系统很快达到稳定状态，此时 ES 浓度为常数；这时所达到的恒定的反应速率 v ，可以通过底物或产物浓度曲线的斜率表现出来，保持酶的浓度不变，随着底物浓度的增加，中间复合物的浓度 [ES] 和相应的反应速率都会增加。反应进行到一定程度即底物被消耗时，反应速率逐步下降。增加底物的初始浓度

[S], 而游离酶的浓度 [E] 不变、底物-酶复合物的浓度 [ES] 和反应速率都会增加。当底物 [S] 达到一定限度时, 反应速率达到最大值, 最大反应速率用 $v_{\max}$ 来表示, 反应速率 $v = v_{\max}/2$ 时的底物浓度被定义为米氏常数 K_m , 此时反应的速率随底物浓度变化最显著。从图 3-1 中可以看出, 米氏常数 K_m 越低, 酶与底物的亲和力越强。当 ET (总酶) 的浓度一定时, ES 的平衡浓度取决于使所有酶分子都达到饱和, 并且反应具有最大速率时的底物的浓度。

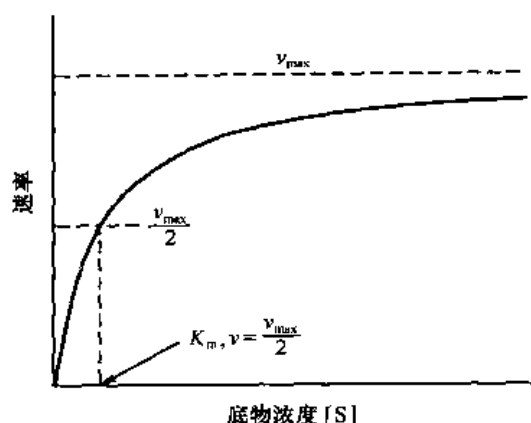


图 3-1 酶催化反应中反应速率和底物浓度 [S] 的关系曲线

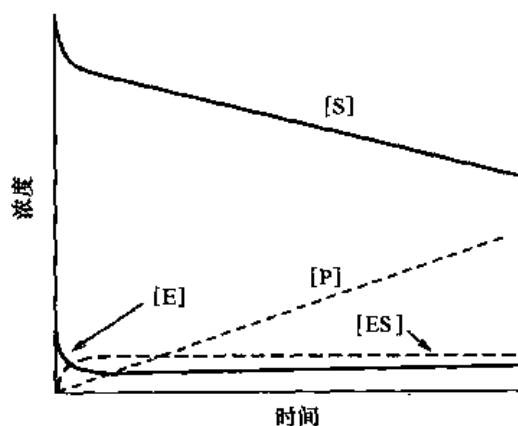


图 3-2 在一个简单的反应过程中，单一的底物浓度 [S]，产物浓度 [P]，游离酶浓度 [E] 和中间复合物浓度 [ES] 随时间的变化曲线

为了解释这一现象，并说明酶催化反应速度与底物浓度间量的关系，Michaelis 和 Menten 做了大量的定量研究，积累了足够的实验数据，从而提出了酶催化反应动力学的基本原理，并归纳成如下公式：

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (3-1)$$

此式即为米氏方程，它反应了底物浓度与酶催化反应速率间的定量关系。对于许多简单的酶来说，图 3-1 中所示底物的曲线函数图与由米氏方程计算出的 v 与 [S] 所得的图都极为吻合。

米氏常数的 4 种求法。

(1) 反应速度 (v) 对底物浓度作图：米氏常数 (K_m) 的单位与底物浓度单位相同，用 mol/L、mmol/L 或 $\mu\text{mol/L}$ 等表示。但由于底物溶解度有一定限度，其最大反应速率不易精确获得，故常难用此法求得精确 K_m 。

(2) 双倒数作图法 (Lineweaver - Burk 倒数作图法)：以 $1/v$ 作为纵坐标， $1/[S]$ 为横坐标作图，得 K_m ，如图 3-3 所示。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (3-2)$$

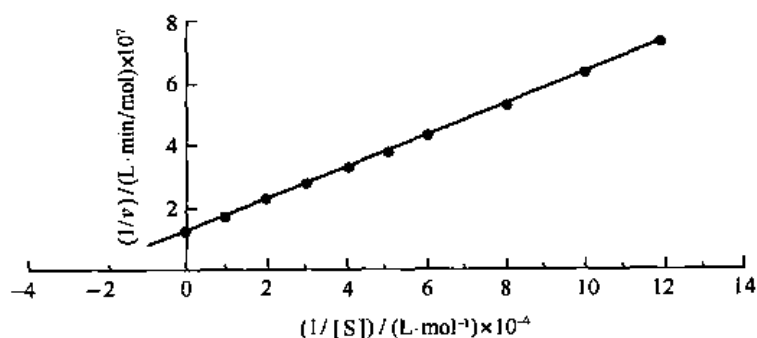


图 3-3 Lineweaver - Burk 倒数作图法

$$1/K_m = 2.5 \times 10^4, K_m = 4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}, v_{\max} = 80 \text{ nmol/ (L} \cdot \text{min)}$$

(3) Hanes 作图法: 以 $[S]$ 为横坐标, $[S]/v$ 为纵坐标作图, 得 K_m , 如图 3-4 所示。

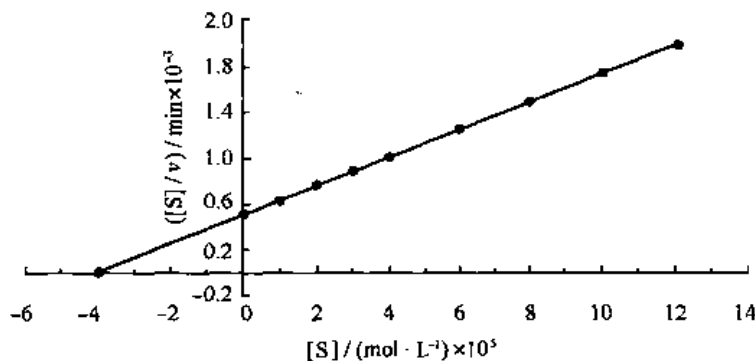


图 3-4 Hanes 作图法

$$\text{斜率} = 1/v_{\max} = 1.25 \times 10^5, v_{\max} = 80 \text{ nmol/ (L} \cdot \text{min)}, K_m = 4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$\frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m}v + \frac{v_m}{K_m} \quad \text{公式 - 3}$$

(4) Eadie - Scatchard 作图法 以 $v/[S]$ 为横坐标, v 为纵坐标作图, 得 K_m , 如图 3-5 所示。

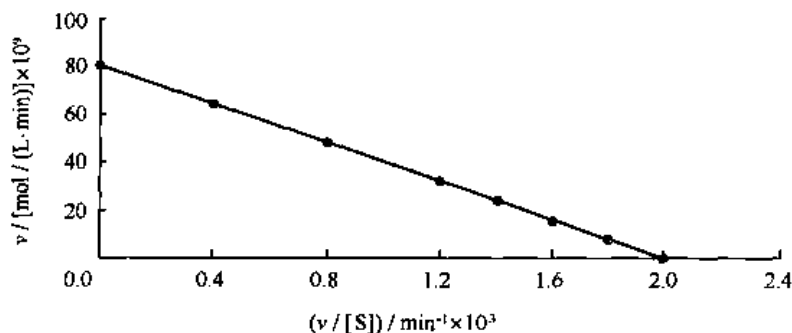


图 3-5 Eadie - Scatchard 作图法

$$\text{斜率} = -K_m, K_m = 4 \times 10^{-5}$$

$$\frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m}v + \frac{v_m}{K_m}$$

Lineweaver - Burk 法可得到比较满意的 K_m 和 v_{max} , 但是由实验设计时, 底物浓度为成倍等距在横轴上, 而 $1/[S]$ 则不成等距, 使点稀密分布不均, 稀疏处易引起误差。故在设计实验时, 底物浓度一般是在 K_m 左右, 且浓度间应有适当距离。应用 Hanes 法可获得更为准确的结果。

3.4 酶的保存

酶的保存条件的选择必须有利于维护酶天然结构的稳定性, 保存酶应注意以下几点。

3.4.1 温度

酶的保存温度一般在 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$, 但有些酶在低温下反而容易失活, 因为在低温下亚基间的疏水作用减弱会引起酶的解离。此外, 零度以下溶质的冰晶化还可引起盐分浓缩, 导致溶液的 pH 值发生改变, 从而可能引起酶巯基间连接成为二硫键, 损坏酶的活性中心, 并使酶变性。

3.4.2 缓冲液

大多数酶在特定的 pH 值范围内稳定, 偏离了这个范围便会失活, 这个范围因酶而异, 如溶菌酶在酸性条件下稳定, 而固氮酶则在中性偏碱性条件下稳定。

3.4.3 氧防护

由于巯基等酶分子基团或 Fe-S 中心等容易为分子氧所氧化, 故这类酶应加巯基保护剂或在氩气或氮气中保存。

3.4.4 蛋白质的浓度及纯度

一般来说, 酶的浓度越高, 酶越稳定, 制备成晶体或干粉更有利于保存。此外, 还可通过加入酶的各种稳定剂如底物、辅酶、无机离子等来加强酶稳定性, 延长酶的保存时间。

3.5 酶的测定技术

酶纯化的目的是使酶制剂具有最大的催化活性和最高的纯度, 以下几种方法可用于检验这些指标。

3.5.1 酶纯度的检验

经分离纯化后的酶, 应检验其纯度, 以了解酶的纯化程度。许多分离方法都可用于检验酶的纯度。但是必须指出, 任何单独一种鉴定方法都只能认为是酶分子均一性的必要条件而不是充分条件。由于酶分子结构高度复杂, 不同的检验方法检验结果可能不完全一

致, 因此, 酶的纯度应标明达到哪种方法测定的结果, 如电泳纯、层析纯或 HPLC 纯等。

常用的酶纯度的检验方法有超速离心、电泳、SDS - 电泳、等电聚焦 N - 末端分析、免疫技术等。

3.5.1.1 超速离心法

超速离心法需在专用的超速离心机上进行, 通过观察离心过程中样品的沉降峰等检测酶的纯度, 具体采用的方法有沉降速度法和沉降平衡法。该法对检测少量杂质 (小于 5%) 时不太满意。

一般实验室常用电泳法检验酶的纯度, 电泳法所用样品少 ($10\mu\text{g}$ 左右), 速度快 (2 ~ 4h), 仪器简单, 操作简便。使用最多的是聚丙烯酰胺凝胶电泳。该方法不同于一般的自由界面电泳或其他介质电泳, 电泳时, 电泳系统兼有“电荷效应”、“浓缩效应”和“分子筛效应”, 因而分辨率较高。当聚丙烯酰胺的孔径约为被分离的酶分子平均大小一半时, 分离效果最佳。因此, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳来鉴定酶的纯度时, 应根据被检测酶分子量的大小, 选用合适孔径的凝胶 (见表 3-1)。

表 3-1 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的最适凝胶浓度

被分离蛋白质的分子量 (kD)	凝胶浓度 (%)
小于 10^4	20 ~ 30
$(1-4) \times 10^4$	15 ~ 20
$(4-10) \times 10^4$	10 ~ 15
$1-5 \times 10^5$	5 ~ 10
大于 6×10^5	2 ~ 5

3.5.1.2 SDS

聚丙烯酰胺凝胶电泳也常用于检验酶的纯度。这种方法分离蛋白质时, 可使蛋白质分子按分子量大小排列, 非常直观。SDS 可使蛋白质变性, 使蛋白质肽链舒展, 并按每两个氨基酸残基一个 SDS 分子的比例与蛋白质结合, 其结果使得每个蛋白质分子所带电荷基本相同。因此, 电泳迁移率只与蛋白质分子量的大小有关。如果被检测的酶含有不同分子量的亚基, 那么即使是纯酶, SDS 凝胶电泳仍会按亚基分子量的大小显示出多个条带。

3.5.1.3 等电聚焦法

分辨率较高, 可将蛋白质按照等电点的大小一一分开, 可以检测出其他方法无法区别的电荷差异很小的同工酶。如纯化人胎盘雌二醇 17 β - 脱氢酶用普通电泳法在 pH 值为 6.2、pH 值为 7.8 条件下电泳结果为一条带, 但等电聚焦电泳还可分辨出其他 5 条微弱的区带。该法的缺点是仪器试剂昂贵, 操作较为复杂。

肽链 N - 末端分析也可用于酶纯度的检测。通常如果酶分子只有一条肽链组成, 理

论上只能检测出一种 N - 末端的氨基酸, 如酶分子含有多个亚基, 则检测的 N - 末端氨基酸数目与亚基数一致。有些酶分子由于 N - 末端的氨基和肽链中的羧基形成环状结构, 在这种情况下不能采用该法检测纯度。

3.5.1.4 免疫法

利用抗原 - 抗体间的免疫反应也可检测酶的纯度, 常用的有免疫扩散和免疫电泳法。这两种方法都应预先准备好被测酶蛋白的抗血清。在免疫扩散法中, 通常将纯化制得的酶样品和抗血清分别加到琼脂糖凝胶板上小孔中, 让其自由扩散, 通过观察抗原 - 抗体间形成的沉淀弧的数量和形状来分析酶的纯度。免疫电泳是将酶样品经电泳分离后, 再将抗血清加到抗体槽中进行双向扩散, 使其形成沉淀弧, 免疫电泳由于利用扩散和电泳两种方法将不同抗原组分开, 故其灵敏度比单纯的免疫扩散法要高得多。

用免疫学方法的优点是灵敏度和特异性高, 且不受体液中其他物质的影响, 特别是抑制剂和激活剂的影响, 当血液中有酶抑制剂存在, 或因基因缺陷, 合成了无活性的酶蛋白时, 可以测出灭活的酶蛋白量, 有利于疾病诊断和科学研究。

3.5.2 酶活性的测定

检测纯化酶的催化活性时, 要使测定条件下在最适状态。如测定体系中有无足够的激活剂和辅因子、抑制剂等, 还需搞清酶在什么条件下保存较为稳定。在有些情况下需加入一些还原剂 (如二硫苏糖醇、巯基乙醇), 以保证半胱氨酸侧链巯基处于还原态。在低温储存酶时, 可将酶在 50% (V/V) 的甘油溶液中保存 (-18°C), 以避免酶失活。长期保存酶制剂时, 应考虑到痕量蛋白水解酶降解作用的可能性。

3.5.2.1 酶活性测定的意义

在科学研究、工农业生产和医学实践中经常进行酶的活性测定, 因为机体的技能状况、产品质量的好坏常会在某种或某些酶的含量和活性上得到反映, 而这些只有通过检测才能确定, 因此酶活性测定具有重要的理论与实际意义。这类分析已用于临床诊断。酶在细胞内合成各种资质细胞并都有体现各自特征的标志酶, 这些酶在正常情况下, 很少渗出细胞。但当机体发生病变时, 它们在组织和体液内的活性就会发生变化, 因此, 人们可以通过检测其中某些酶的活性作为早期诊断、鉴别以及预后的参考。以体液内的酶活性为例, 引起其改变的原因大致有以下几种。

(1) 组织病变导致膜平衡破坏, 如谷草转氨酶 (GOT) 在心肌中含量最高, 但心肌梗塞情况下, 细胞透性增大, 因而患者的血清中 GOT 显著升高, 高峰时可达正常值的 10 倍以上。

(2) 细胞病变引起合成机能异常, 例如, 一种称为“血浆特异酶”的卵磷脂胆固醇转酰基酶 (LCAT) 是在肝细胞中合成的, 而后分泌到血液中发挥作用, 肝炎患者合成此酶能力下降, 因而它在血清中的水平低于正常水平。

(3) 疾病导致的分泌排出受阻, 使酶转而流入血液中, 因此血清中酶的活性水平改变。如梗阻性黄疸癌转移至肝脏, 使胆管阻塞, 故而血清中碱性磷酸酶升高。

(4) 药物直接影响酶活性,如有机磷不可逆地抑制血清中乙酰胆碱酶。

3.6 酶在医药方面的应用

人体是一个复杂的生物反应器,代谢反应有数千种之多。为保持人体健康,酶必须准确地调节各个反应,以保持身体内物质和能量的平衡。当身体内缺乏某种酶时,代谢反应就受到障碍,导致疾病的产生。酶在医药领域的用途很广,随着酶分子修饰和酶固定化等酶技术的发展,将不断扩大酶在医药方面的应用。

酶在医药方面的应用多种多样,可归纳为如下3个方面:用酶进行疾病的诊断、治疗各种疾病和制造各种药物。

3.6.1 酶在疾病诊断方面的应用

疾病治疗效果的好坏,在很大程度上决定于诊断的准确性。疾病诊断的方法很多,其中酶学诊断发展迅速。由于酶催化的高效性和特异性,酶学诊断方法具有可靠、简便又快捷的特点,在临床诊断中已被广泛应用。酶学诊断方法包括两个方面:一是根据体内原有酶活力的变化来诊断某些疾病;二是利用酶来测定体内某些物质的含量,从而诊断某些疾病。在疾病诊断方面的常见酶如表3-2所示。

表3-2 酶在疾病诊断方面的应用

酶	疾病与酶活力变化
葡萄糖氧化酶	测定血糖含量,诊断糖尿病
胆碱酯酶	测定胆固醇含量,治疗皮肤病、支气管炎、气喘
尿酸酶	测定尿酸含量,治疗痛风
淀粉酶	胰脏疾病、肾脏疾病时,活力升高;肝病时,活力下降
酸性磷酸酶	前列腺癌、肝炎、红血球病变、佝偻病、甲状旁腺机能亢进时,活力升高;软骨发育不全等,活力下降
谷丙转氨酶	肝炎、心肌梗塞等,活力升高
谷草转氨酶	肝炎、心肌梗塞等,活力升高
胃蛋白酶	胃癌时,活力升高;十二指肠溃疡时,活力下降
磷酸葡萄糖变位酶	肝炎、癌症时,活力下降
醛缩酶	癌症、肝病、心肌梗塞等,活力升高
葡萄糖醛缩酶	肾癌及膀胱癌,活力升高
碳酸酐酶	坏血病、贫血等,活力升高
乳酸脱氢酶	癌症、肝病、心肌梗塞,活力升高

此外,酶联免疫法测定在疾病诊断方面的应用也越来越广泛。常用的标记酶有碱性磷酸酶和过氧化物酶等。通过酶联免疫测定,可以诊断肠虫、毛线虫、血吸虫等寄生虫病以及疟疾、麻疹、疱疹、乙型肝炎等疾病。随着细胞工程的发展,已生产出各种单克隆抗体,为酶联免疫测定带来极大的方便和广阔的应用前景。

3.6.2 酶在疾病治疗方面的应用

由于酶具有专一性和高效率的特点,所以在医药方面使用的酶具有种类多、用量少、纯度高的特点。先介绍一些主要用于医药的酶。

3.6.2.1 溶菌酶

溶菌酶也是一种应用广泛的药用酶。具有抗菌、消炎、镇痛等作用。溶菌酶作用于细菌的细胞壁,可使病原菌、腐败性细菌等溶解死亡,对抗生素有耐药性的细菌同样起溶菌作用,具有显著疗效而对人体的副作用很小,是一种较为理想的药用酶。溶菌酶与抗生素联合使用,可显著提高抗生素的疗效。

3.6.2.2 蛋白酶

蛋白酶可用于治疗多种疾病,是在临床上使用最早、用途最广的药用酶之一。蛋白酶在医药领域的应用最初是在消化药上,用于治疗消化不良和食欲不振,其中胰凝乳蛋白酶是消化食物的重要酶类,与胰蛋白酶一样,酶前体是肝脏中形成的,在小肠中胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等分解成活性的酶。使用时往往与淀粉酶、脂肪酶等制成复合制剂,以增加疗效。作为消化剂使用时,蛋白酶一般制成片剂,以口服方式给药。目前临床上使用的蛋白酶大部分来自于动物和植物,如胰蛋白酶、胃蛋白酶和菠萝蛋白酶等。

3.6.2.3 L-天冬酰胺酶

L-天冬酰胺酶是一种用于治疗白血病效果较好的酶。癌细胞生长时需要天冬酰胺。L-天冬酰胺酶可以切断天冬酰胺的供给,因此对癌症,特别是白血病的治疗有显著疗效。当L-天冬酰胺酶注射进入人体后,人体的正常细胞内由于有天冬酰胺合成酶,可以合成L-天冬酰胺而使蛋白质合成不受影响。而对于缺乏天冬酰胺合成酶的癌细胞来说,由于本身不能合成L-天冬酰胺,外来的天冬酰胺又被L-天冬酰胺酶分解掉,因此蛋白质合成受阻,从而导致癌细胞死亡。

3.6.2.4 尿激酶

尿激酶具有溶解血纤维蛋白及溶解血栓的活性,也可用于溶解血块。现在日本和美国等国家已经广泛应用尿激酶。尿激酶是从人尿中提取的,存在于人尿中的尿激酶比微生物来源的链激酶的安全性高。应用组织培养的方法,可以从培养的肾脏细胞得到大量的尿激酶。最近,从人类的肝细胞培养物中也可以得到尿激酶。点滴注射可以治疗脑血栓、末梢动、静脉闭塞症及眼内出血等疾病。尿激酶也可以应用基因工程技术来进行生产,可以降低酶的生产成本。

3.6.2.5 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶(SOD)催化超氧负离子进行氧化还原反应,使机体免遭超氧负离

子的损害。因此 SOD 具有抗辐射作用, 并对红斑狼疮、皮炎、结肠炎及氧中毒等疾病有显著疗效。

3.6.3 酶在免疫检测方面的应用

酶的专一性可以使酶在一个复杂体系中, 不受其他物质干扰, 准确地测出某一物质含量。利用酶催化作用的高度专一性对物质进行检测, 已成为物质分析检测的重要手段。目前国外已普遍将酶学分析法应用于化学分析和临床诊断等方面。用酶进行物质分析检测的方法统称为酶法检测或酶法分析。实践证明酶学分析法具有灵敏度高、专一性强等优点。近来已发展成为快速、准确、灵敏、自动化的分析方法。而固定化为酶法分析的应用开辟了新途径, 发挥着越来越大的作用。

酶法检测是以酶的专一性为基础、以酶作用后物质的变化为依据来进行的。在酶的分析检测中, 使用的酶可以是游离酶, 也可以是固定化酶或单酶电极等。酶电极可能是固定化酶当前研究和应用最活跃的领域之一, 它使酶分析进展到高度简便化、自动化、微型化和连续化。目前常用的几种酶电极有: 脲酶电极测定尿素、葡萄糖氧化酶电极测定葡萄糖、乳酸脱氢酶电极测定乳酸、青霉素酶电极测定青霉素等。

3.6.3.1 单酶或多酶偶联反应检测

利用单酶与底物反应, 然后用各种方法测出反应前后物质的变化情况, 从而确定底物的量。这是最简单的酶法检测技术。以谷氨酸脱羧酶为例, L-谷氨酸脱羧酶专一地催化 L-谷氨酸脱羧生成 γ -氨基丁酸和二氧化碳, 生成的二氧化碳可以用气体检测法测定。该酶已广泛地用于 L-谷氨酸的定量分析, 可使用游离酶、固定化酶或酶电极。检测二氧化碳可以用华勃氏呼吸仪或二氧化碳电极等。利用脲酶专一地催化尿素水解生成氨和二氧化碳的特性, 通过气体检测或者使用氨电极、二氧化碳电极等, 测出氨或二氧化碳的量, 就可确定尿素的量。此外, 可用于单酶反应检测的还有葡萄糖氧化酶、胆固醇氧化酶、荧光素酶等。通过单酶催化反应进行物质检测, 具有简便、快捷、灵敏、准确的特点, 是酶法检测中最常用的技术, 具有广阔的应用前景。

多酶偶联反应检测是利用两种或两种以上的酶的联合作用, 使底物通过两步或多步反应, 转化为易于检测的产物, 从而测定被测物质的量。多酶偶联反应检测已有不少成功应用的例子。例如, 通过葡萄糖氧化酶与过氧化物酶偶联可以检测葡萄糖的含量, 使用时先将葡萄糖氧化酶、过氧化物酶与还原型邻联甲苯胺一起用明胶固定在滤纸条上制成酶试纸。测试时将酶试纸与样品溶液接触, 在一定的时间内试纸即显色, 从颜色的深浅判定样品液中葡萄糖的含量。还可利用 β -半乳糖苷酶与葡萄糖氧化酶偶联反应检测乳糖的含量, 己糖激酶与葡萄糖氧化酶偶联反应可以用于测定 ATP 的含量。

3.6.3.2 免疫反应检测

所谓酶联免疫测定, 是先把酶与某种抗体或抗原结合, 制成酶标记的抗体或抗原。然后利用酶标抗体(或酶标抗原)与待测定的抗原(或抗体)结合, 再借助于酶的催化特性进行定量测定, 测出酶-抗体-抗原结合物中的酶的含量, 就可以计算出欲测定

的抗体或抗原的含量。常用的标记酶有碱性磷酸酶和过氧化物酶等。

以过氧化氢酶为例,首先制成过氧化氢酶标记抗体(或标记抗原),然后通过免疫反应生成过氧化氢酶-抗体-抗原复合物。将此复合物与过氧化氢接触,过氧化氢酶催化过氧化氢生成氧和水。生成的氧可用氧电极测定,从而测定过氧化氢酶的量,再计算出欲测抗原(或抗体)的含量。

酶联免疫测定已成功地用于多种抗体或抗原的测定,从而用于某些疾病的诊断,还可以应用于某些具有亲和力的生物分子对之间的测定等。

3.7 免疫分析常用的酶

酶联免疫分析具有高敏感性,其关键是选用有生物放大作用的酶作为标记物。对酶有如下要求:①酶的纯度高、催化反应的转化速率高、酶作用的专一性强;②酶蛋白分子具有足够的偶联用标记基团,与抗原、抗体偶联后,仍能保持较高的催化活性;③酶的稳定性好,便于保存;④测定酶活活性方法简便、灵敏、快速;⑤待测液体中最好不存在与标记酶相同的酶,避免干扰实验;⑥待测标本中应无底物、反应抑制剂和其他干扰因素存在;⑦酶的来源、纯化和供应方便,价格亦较低廉;⑧均相酶免疫测定法中使用的酶,还要求当抗体与半抗原-酶结合物结合后,酶的活性表现出抑制或激活。

目前最常用的示踪酶有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶以及葡萄糖氧化酶, β -D 半乳糖苷酶等。其中,根据分子量的大小及酶的特点,在固相或非固相酶标免疫测定时应加以选择。

在酶联免疫分析技术中,由于酶标复合物一般是通过细胞膜进入细胞内与靶分子结合,所以,应选择分子量低而酶活性高的酶进行标记。在标记酶的质量评价中,通常需要两个指标:一个是 RZ 比值,另一个是活性单位。RZ 表示酶的纯度,即酶蛋白中活性部分与非活性部分最大吸光度的比值,根据酶的物理化学性质选择标记物。酶有多种测定方法,而且通过二级放大,还可测定分子量很小的酶,这说明酶是一类通用的标记物,可以在各种分析中广泛应用,从简易的操作到高灵敏的自动化程序,因此,酶是一种优良标记物,但酶比荧光化合物或化学发光化合物更易受到环境影响而失活。此外酶免疫分析法在低检测限或检测范围方面的局限性有待进一步改进,这种局限性可以通过选择终点测定法来克服。

3.7.1 过氧化物酶 (Peroxidase, POD)

过氧化物酶又称过氧化氢氧化还原酶,广泛分布于植物中,辣根中含量最高。从辣根中提取出来的称为辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP), 分子量为 44kD。它是一种糖蛋白,其酶活性部分包括脱辅基蛋白和血红素基团,辅基亚铁血红素在 403nm 波长呈现最大光吸收值。辣根过氧化物酶能催化过氧化氢氧化化的还原性底物,生成有色的产物,其最大吸收光波长为 275nm。HRP 的纯度以 A_{403nm}/A_{275nm} 的比值即 RZ 值来衡量,高纯度 HRP 的 RZ 不小于 3.0。其 RZ 比值越小,说明其中含有杂蛋白越多。如 RZ=0.6 的酶样品中,非酶蛋白的含量为 75%,在酶复活后酶的活性下降,而 RZ 比

值并不发生改变。HRP 质量的另一重要指标是酶的活性,以单位 U 表示。通常以能在 20℃、pH 值为 6.0、20s 的时间内催化底物邻苯三酚产生 1mg 红棕酚 (Purpurogalhn) 作为酶的一个活性单位。用于标记的 HRP 比活性应大于 250U/mg。过氧化物酶通常用于过氧化物的分析,也可用于葡萄糖、半乳糖、L-氨基酸及其他能生成、测量混合酶反应中 H_2O_2 的酶体系的偶合分析。

过氧化物酶对受氢体具有专一性,这些受氢体包括 H_2O_2 、甲基过氧化物及乙基过氧化物。许多物质可作为供氢体,如酚、氨基苯酚、二元胺、醌酚、无色染料、抗坏血酸及部分氨基酸。过氧化物酶比活性应大于 50U/mg 蛋白质,过氧化物酶的抑制剂有 CN^{1-} 、 S^{2-} ,过氧化物酶的冷冻干燥制剂和硫酸铵溶液性质很稳定。

3.7.2 酸性磷酸酶 (Acidphosphatase, ACP)

酸性磷酸酶又称正磷酸单酯、磷酸水解酶,其广泛分布于动物和植物中,如肝、肾、脾、胰、心、脑、骨、肠表皮细胞、红血球、白血球、乳、尿、米糠、马铃薯等。它对生物体核苷酸,磷蛋白和磷脂的代谢,在骨骼的形成与磷酸的利用过程中,酸性磷酸酶起着重要的作用。酸性磷酸酶的生物活性最早是从米糠中发现的,ACP 能催化脂肪族或芳香族的磷酸单酯和磷蛋白水解,释放出无机磷酸,因此磷酸酶的作用直接连接能量代谢、代谢调节和多种途径的细胞信息传递。近 10 年来,有关叶绿体类囊体膜蛋白质磷酸化的研究表明,膜蛋白质磷酸化是类囊体对其吸收的辐射能及随后发生的氧化还原反应平衡的一种生理适应过程。临床统计发现在前列腺癌症病人的血清中酸性磷酸酶的浓度升高。

采用正丁醇抽提、离心和色谱柱等方法,可以从菠菜叶绿体类肌体膜片中分离出酸性磷酸酶,此酶水解磷酸单酯类物质,酶活性的最适 pH 值在 7.0 以下,反应温度增至 60℃ 时反应速度达最高,具有高温酶的特性。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳实验表明,此酶制剂出现两条主要的蛋白带。

酸性磷酸酶催化反应的最适 pH 值为 4.9~5.0。一般酸性磷酸酶来源于小牛肝脏,以磷酸伞形酮为底物时,其米氏常数 K_m 为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (pH 值为 5.0, 25℃)。酸性磷酸酶促进许多种磷酸单酯和磷蛋白水解,但不能水解磷酸二酯。牛脾来自酸性磷酸酶催化三磷酸腺苷和二磷酸腺苷水解。酒石酸、草酸、甲醛和 Cu^{2+} 是酸性磷酸酶的抑制剂; F^- 、 IO_3^- 、 SCN^- 、 SO_4^{2-} 和 $H_2PO_4^-$ 在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$, 该酶的活性将受到不同程度的抑制,它们的抑制类型均为可逆性抑制。酸性磷酸酶在中性和高温下不稳定,其中 50% 以上的前列腺酸性磷酸酶在 25℃, 1h 内消失, pH 值低于 6.5 时稳定,加入柠檬酸或乙酸降低 pH 值,可使稳定性增加。ATP 抑制此酶活性。

3.7.3 碱性磷酸酶 (Alakine phosPhatase, AP)

碱性磷酸酶几乎存在于身体的所有组织中,尤其在肝脏、胎盘、白细胞、肾小管中含量高。研究表明,血清碱性磷酸酶产生于肝脏中,常见于 Paget 病、障碍性黄疸症及佝偻病中,其中在 Paget 病中含量最高,障碍性黄疸症次之,在佝偻病中也可达到正常值的 2~4 倍。AP 是一种磷酸酯的水解酶,它能够催化磷酸单酯、磷酸核苷及 6-磷酸

糖类的水解,在释放磷酸盐的同时产生有色或荧光产物。碱性磷酸酶的分子量为80~100kD,最适pH值为8.0~10.0,随酶源和底物的不同而变化。例如从大肠杆菌中提取的AP分子量为80kD,酶作用的最适pH值为8.0;从小牛肠膜中提取的AP分子量为100kD,最适pH值为9.0~10.0,酶的活力高于前者。AP活性的测定以对硝基磷酸苯酯(PNP)作为底物,结果有两种表示方式:分别以1.0mol/L二乙醇胺和0.1mol/L甘氨酸作为缓冲液系统测得的。用作标记酶的AP活性应在1000U/mg以上。

碱性磷酸酶对磷酸单酯、核苷磷酸酯以及葡萄糖-6-磷酸酯的水解有催化作用,磷酸单酯水解后的产物中主要包含伯醇、仲醇、糖醇、环醇、酰胺。 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 是碱性磷酸酶的激活剂,在 10^{-3} mol/L Mg^{2+} 条件下,活性达到最佳状况;磷酸盐、 Zn^{2+} 、 Be^{2+} 、 ASO_4^{3-} 、 CN^{-} 和草酸盐是碱性磷酸酶的抑制剂,另外一些有机物如L-苯氨基丙酸、L-半胱氨酸以及L-色氨酸也是抑制剂,碱性磷酸酶不能水解磷酸二酯。碱性磷酸酶的比活性应不小于25U/mg蛋白质。碱性磷酸酶在-20℃、5%甘油、5mmol/L $MgCl_2$ 、0.2mmol/L $ZnCl_2$ 、10mmol/L Tris-HCl, pH值在8.0~8.3条件下可长期保存,而血清碱性磷酸酶在20℃稳定。

3.7.4 β -D-半乳糖苷酶(β -D-Galactosidase, Gal)

β -D-半乳糖苷酶又称为乳糖酶广泛存在于动、植物器官、细菌、酵母和真菌中。当Gal催化水解 β -D-半乳糖苷时,若得到的半乳糖残基转移到水分子上,即水分子为受体,称为水解;若受体是糖或醇时,则称为转半乳糖苷。该酶在乳制品生产中用于水解乳糖。商品酶中来源于米曲霉的 β -D-半乳糖苷酶活性较高,价格相对便宜,而且具有较高的合成能力,因此应用较普遍。 β -D-半乳糖苷酶可以用来分析乳糖,且有一定的医疗意义。

β -D-半乳糖苷酶能催化半乳糖水解,而且转化效率高,比HRP易于标记,本底低,稳定性好。单价活性离子和5%浓度的酒精可以促进邻硝基酚 β -D-半乳糖苷(ONPG)的分解。比活性应不小于30U/mg蛋白质,5℃下能保存1~2年。

3.7.5 葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase, GOD)

葡萄糖氧化酶又称 β -D-葡萄糖氧化还原酶,一般由黑曲霉和青霉产生,催化 O_2 和 β -D-葡萄糖形成 H_2O_2 和D-葡糖酸- δ -内酯,酯再与水反应生成葡糖酸。

葡萄糖氧化酶对 β -D-葡萄糖的 β -异头碳有高度专一性。生产菌为曲霉,葡萄糖氧化酶作催化剂, β -D-葡萄糖的反应速率为1.00,而2-脱氧-D-葡萄糖反应速率为0.06,其他的反应速率则很低;生产菌为青霉时, β -D-葡萄糖的反应速率为1.00,2-脱氧-D-葡萄糖反应速率为0.25;6-脱氧-6-荧光素-D-葡萄糖的反应速率为0.03;6-甲基-D-葡萄糖反应速率为0.02;D-甘露糖和D-木糖的反应速率为0.01; α -D-葡萄糖反应速率为0.06。 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、对氯安息香酸汞盐和苯乙酸汞盐在酶反应中起抑制作用。黄素腺嘌呤二核苷酸对酶结构能起到稳定作用。葡萄糖氧化酶的比活性不小于20 U/mg。葡萄糖氧化酶在4℃下可稳定存在6~12个月。

3.7.6 脲酶 (Urease)

脲酶也叫尿素酶,不同来源脲酶分别由1~3个不同亚基组成。从幽门螺旋杆菌蒸馏水浸液中提取的脲酶含一个66kD和29.5kD的亚单位,并以6个分子聚合成625kD大分子蛋白,有很好的抗原性,并显示特异的血清学反应,脲酶主要是用于尿素分析的试剂,它是以结晶形状被分离出来的酶。

该酶对尿素有高度的选择性,只有羟基脲与杰克豆(Jack bean)型酶在一定的范围内反应,B. Pasteurii型的酶对尿素具有完全专一性。重金属离子、羟基脲、羟胺、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 和硫脲都是抑制剂,EDTA可以清除 Cu^{2+} 和 Pb^{2+} 对脲酶的干扰。所需试剂比活性不小于100U/mg蛋白质。天然脲酶在20℃下,50%丙三醇溶液中可稳定数月。

3.7.7 青霉素酶 (Penicillinase, PNC)

青霉素酶又称为 β -内酰胺酶,主要从革兰阴性或阳性细菌、链霉菌和蓝藻中提取,其他菌类中也存在,但不同菌种的青霉素酶的活性相差较大。该酶在pH值在4.0~9.5范围内稳定,中性条件下,50℃时仍能保持酶活性,青霉素酶来源于细菌,其分子量为28~31kD,能特异的水解青霉素分子结构中的内酰胺环。

3.7.8 过氧化氢酶 (Catalase)

过氧化氢酶是一种重要的工具酶,广泛存在于微生物及动植物体内,分子量为235kD。自1979年发现过氧化氢酶能催化某些有机磷毒剂的水解,且证实细菌过氧化氢酶优于牛肝过氧化氢酶,目前过氧化氢酶已被应用于生态毒理及生态化学领域。在土壤生态化学中,由于此酶可分解有机质降解过程中向土壤释放的过氧化氢,防止其对生物体的毒害作用,因此可作为了解土壤有机质状况及微生物数量的参数。在水生生态毒理学中,可用于估计受试化学品对水生生物的急性和亚急性效应。

烷基过氧化氢能替代过氧化氢作为底物,过氧化氢酶供氢体的底物有乙醇、焦赭酚、甲酸酯、硫醇化合物和维生素C作为过氧化氢酶抑制剂,要求比活性为 $1.0 \times 10^4 \text{U/mg}$ 蛋白质。所有成品在5℃下可保存6~12个月,冷冻和低压升华干燥均可引起失活。

3.7.9 葡萄糖淀粉酶 (Gluamylase, AG)

葡萄糖淀粉酶是一种具有外切活性的酶,通过水解淀粉、淀粉糊精、糖原等碳链上1,4连接的非还原端,而得到终产物 β -D-葡萄糖,也可水解 α -1,6和 α -1,3连接的碳链。主要作用于淀粉、肝糖以及有关的多糖和寡糖。水解 α -1,4-多糖葡聚糖的目的是连续去除链终端的糖单元,不丢失小分子,最适温度是55℃。来源于血液、霉菌和细菌。该酶可由很多种微生物产生,如酵母属、内孢霉属、曲霉属、青霉属、红曲属、毛霉属、根霉属和梭菌属等。目前工业化生产的酶制剂是来自曲霉和根霉;葡萄糖淀粉酶广泛应用于葡萄糖制造、发酵、酿酒工艺中,需要量日益增大。

3.7.10 碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase, CA)

碳酸酐酶是一种含锌金属酶,是催化 CO_2 与水化合成碳酸的一种必需酶,其比活性为 $5.6 \times 10^3 \text{ U/mg}$, 分子量为 $3.0 \times 10^4 \text{ D}$, 此酶分子含有大约 260 种具有高脯氨酸含量的氨基酸残基,是无二硫基团及巯基的单链致密球蛋白,它是一种裂解酶。碳酸酐酶在哺乳动物肌体中分布极为广泛,迄今在哺乳动物体内已发现至少有 8 种同工酶,它们的结构、分布、性质各异,多与各种上皮细胞分泌 H^+ 和碳酸氢盐有关。碳酸酐酶一般存在于人和动物血液中,在维持体内的酸碱平衡方面起到了重要作用,它有利于将细胞呼吸产生的 CO_2 快速转移到肺,对呼吸作用极为重要,非正常生理情况下及患某些疾病时,其含量亦有变化,故测定组织中 CA 含量具有重要价值。

硫化物的重金属盐、氰化物、叠氮化物以及磺胺药物都是该酶的抑制剂。所需比活性为 2000 U/mg 蛋白质。干粉在 4°C 时非常稳定,溶液的稳定性较差。

3.7.11 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH), 是人们研究较早的酶,其广泛存在于人体大多数组织中,以红细胞和白细胞的活性最高,血清中酶活性为红细胞的 20%, 马血液红细胞 G-6-PDH 的多态性最早由 Sandberg 等发现。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶可以用来进行 NADP、葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-1-磷酸、己糖激素和磷酸葡萄糖异构酶 (PGI) 的酶催化分析。在己糖激素存在下,葡萄糖的分析具有高效专一性。

从临床角度说,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的测量对于药物引发的溶血性贫血症具有诊断意义。导致易感人群红细胞中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶水平改变的原因如下:①药物诱导;②非药物诱导;③蚕豆病诱导;④疾病诱导。对于经常接触溶血试剂的人而言,更容易引起葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏的症状,特别是那些有可能接受抗疟疾药物的人。如果葡萄糖-6-磷酸脱氢酶不足,即使在输血后红细胞也会产生溶血现象,因此应禁止有这种可能性的献血者献血。众所周知,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是维持红血球活性的调整因素之一,所以为防止由于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏而引起的溶血,应避免摄入对红血球有毒的物质。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶对葡萄糖-6-磷酸酯具有高选择性,要求比活性不小于 140 U/mg 蛋白质。从酵母中提取的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶以 NADP^+ 为底物;而从柠檬链膜菌素中提取的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶可用 NAD^+ 作底物,也可用 NADP^+ 作底物。

浓度在 $5 \sim 10 \text{ mmol/L}$ 的 Mg^{2+} 可以促进酶生成;但更高浓度的 Mg^{2+} 或其他二价离子对酶的活性起抑制作用。单磷酸核苷和某些二、三磷酸盐,如 ADP、ATP、三磷酸鸟苷 (GTP) 及三磷酸尿苷 (UTP) 都有抑制作用。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在 pH 值为 6.0, 浓度为 3.2 mol/L 的硫酸铵盐溶液中结晶,在 4°C 下可稳定保存 9 个月,冻干的试样在 4°C 下可保存 3 个月。

3.7.12 溶菌酶

溶菌酶 (Lysozyme muramidase), Nicoile 早在 1907 年就发表枯草芽孢杆菌 (*B. sub-*

tilis) 溶解因子的研究报告。两年后, Laschtschenko 指出鸡卵白有强抑菌作用, 是酶作用的结果。1922 年 Fleming 在某些组织和分泌物中发现一种有明显溶解细菌的成分, 并把引起溶菌作用的因子命名为溶菌酶。从此, 便开始了对溶菌酶的研究, 并有了新的发展。Fleming 指出, 不仅在动物体中, 而且在植物(茺菁)和微生物(溶壁微球菌, *Micrococcus lysodeikticus*) 体中都有这种溶菌因子。溶菌酶是一种非特异性免疫因子, 参与机体的防御功能, 也就是说溶菌酶有抗病毒和细菌的能力, 溶壁微球菌提取的溶菌酶用于治疗眼部感染和肠胃病。溶菌酶在一定程度上能反映机体的免疫能力, 是一项较灵敏的临床诊断指标, 该指标在医学上应用已较广泛。

溶菌酶主要来源于脾、蛋白、鼻黏液和植物胶, 可水解 N-乙酰溶菌酸和残留于黏多糖、黏肽中的 2-乙酰胺-2-脱氧-D-葡萄糖之间的 $\beta-1, 4$ 链, 可溶解细胞壁, 也可以缓慢溶解角质。

3.7.13 无机焦磷酸酶

无机焦磷酸酶 (Inorganic pyrophosphatase) 即焦磷酸酶, 广泛地存在于自然界, 在多种代谢途径中, 焦磷酸起水解作用。焦磷酸酶在 DNA 和 RNA 聚合反应、辅物合成、氨基酸和脂肪酸活化等反应过程中都起着重要的作用。该酶是在 20 世纪 50 年代由 Kunitz 首次从酵母中提取的, 20 世纪 70 年代国外许多学者研究了该酶的性质。苟萍等人从酿酒酵母中分离纯化了无机焦磷酸酶, 该酶的最适温度为 60°C , 在 45°C 以下比较稳定。最适 pH 值为 $7.4 \sim 7.8$ 。 Mg^{2+} 为辅因子, Mg^{2+} 浓度对酶活性亦有影响, 在不同 Mg^{2+} 浓度下测定酶活性, 酶活性随 Mg^{2+} 浓度增加而增加, 在 10mmol/L 时, 酶活性最高, 但高于 10mmol/L 时, 酶活性迅速下降。米氏常数 (K_m) 为 19.3mmol/L , $v_{\max}$ 为 16.8U/mL 。 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 对酶活性有不同程度抑制作用, Ca^{2+} 则完全抑制酶活性。不同来源的无机焦磷酸酶其性质也稍有不同。

3.7.14 荧光素酶

荧光素酶 (Luciferase) 是生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的一类酶的总称, 它主要有萤火虫荧光素酶 (Fireflyluciferase, FL) 和细菌荧光素酶 (Bacterial luciferase, BL) 两大类。自然界中具有发光能力的生物种类很多, 常见的主要有: 发光蘑菇 (Luminous mushrooms)、发光蚯蚓 (Luminous earthworms)、发光细菌 (Luminous bacteria)、发光水母 (luminous jellyfish)、发光甲虫 (Luminous beetles)。目前, 除发光蘑菇和发光蚯蚓的发光机理尚不清楚外, 其余生物的发光机理已研究得较为透彻, 并使 BL 和 FL 形成商品酶用于分析检测。

北美萤火虫 (Photinus), 日本萤火虫 (LucilacruCiata) 及东欧萤火虫 (L. mingrelica) 可产生 FL。夏威夷弧菌 (Vibrio harveyi)、费氏弧菌 (Vfischeri)、明亮发光杆菌 (Photobacterium Phosphoreum) 及螻发光杆菌 (P. leiognathi) 等海洋发光细菌和发光致病杆菌 (Xenorhabdus luminescens)、羽田希瓦菌 (Alteomonashanedai) 等陆生发光细菌可产生 BL。

3.7.14.1 萤火虫荧光素酶

萤火虫荧光素酶简称虫荧光素酶,是一种能将化学能转变为光能的活性蛋白质,也称生物催化剂。它的分子量约为 60 ~ 64kD。最早在 1956 年,Green 和 McElroy 得到了萤火虫荧光素酶 (Luciferase) 的结晶。次年,Bilter 和 McElroy 又得到了荧光素 (Luciferin) 的结晶。荧光素酶由两个亚单位组成,分别是: α 亚基和 β 亚基。它们单独存在时均无发光活性。只有在它们相互结合成为完整的荧光素酶时,才具有发光活性。用酶固相化的方法可以保证酶分子的稳定性和发光活性。

3.7.14.2 细菌荧光素酶

细菌荧光素酶是杂二聚体,含 α 和 β 两个多肽亚基的酶。单独 α 亚基、 β 亚基均无发光活性,只有 α 、 β 共存时才有活性。从不同海洋细菌中提取到的 BL 其分子量基本相同,其中 α 亚基含 354 个氨基酸,分子量约 40kD, β 亚基含 325 个氨基酸,分子量约为 37kD。从陆生细菌中分离到的 BL 的亚基含 360 个氨基酸,分子量约为 41kD, β 亚基含 327 个氨基酸,分子量约为 38kD,其中陆生细菌的 α 亚基和 β 亚基氨基酸序列分别有 85% 和 60% 与海洋细菌同源。BL 催化长链脂肪醛、FMNH₂ (还原型的黄素单核苷酸) 和 O₂ 的氧化反应,并产生发光 $\lambda = 490\text{nm}$ 。

木糖醇、甘油等加入到培养基中可保护酶的活性,而 N - 乙基顺丁烯二酰亚胺对 BL 的活性有一定影响。细菌荧光素酶可冷冻干燥保存。

3.7.15 丙酮酸激酶

丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PyK) 在哺乳动物组织中有 4 个同工酶: L、R、M₁、M₂。它们都由 4 个分子量约为 60kD 的相同的亚基组成,但酶的性质、表达组织及特异性不同。M₁ 型见于骨骼肌、心脏、脑组织; M₂ 型见于胚胎组织、大多数成熟组织 (尤其是白细胞),如各种肿瘤; L 型主要见于肝脏,肾上腺皮质和小肠含量少;而 R 型仅存在于红细胞中。R 型和 L 型的电泳迁移率、酶动力学和免疫学特性与 M₁、M₂ 型截然不同。M₁ 型不受 1,6 - 二磷酸果糖 (FDP) 影响,而 M₂、L 及 R 型均受 FDP 的影响。L 型和 R 型对底物磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 具有动力学的协同作用。由于 M₂ - PyK 是一种癌胚蛋白,因此引起人们比 L - PyK 更多的兴趣。随着对 R 型 PyK 的了解及分子生物学进展、为 PyK 缺乏所致溶血性贫血的诊断及基因治疗奠定了基础。丙酮酸激酶是糖酵解途径中 3 个关键酶之一,催化 PEP 转变成丙酮酸。自 Valentine 等首次报道:红细胞 PK 的遗传性缺陷可引起非球形细胞性溶血性贫血,到目前全世界已报道了 400 多个该病的病例。仅次于 G - 6 - PDH 缺陷,居红细胞酶病第二位,对其分子水平的研究为治疗本病奠定了基础。

(王法云)

第4章 放射免疫分析诊断技术

1960年美国科学家 Yalow 和 Berson 创立了放射免疫分析诊断技术 (radio immunoassay, RIA), 1977 年, 因此项贡献, 两位科学家荣获诺贝尔生物学奖。放射免疫诊断技术是以放射性核素为标记物的标记免疫分析技术, 是一种超微量的测定方法。放射免疫分析方法的建立使得那些原先认为是无法测定的极微量而又具有重要生物学意义的物质得以精确定量, 能检出生物体内的微量免疫活性物质, 使人们有可能在分子水平上重新认识某些生命现象的生化、生理基础, 并迅速渗透到医学科学的其他领域, 如病毒学、药理学、血液学、免疫学、内分泌学、法医学、肿瘤学、遗传学以及与医学生物学相关的其他学科如农业科学、生态学及环境科学等。这是医学和生物学领域中方法学的一项重大突破, 开辟了医学检测史上的一个新纪元。40 多年的实践充分证明了这一超微量分析技术的巨大推动力, 放射免疫分析的物质, 由激素扩大到几乎一切生物活性物质。我国放射免疫分析研究起步于 1962 年, 并迅速发展与普及, 对我国生物医学的进展起了很大的促进作用。

4.1 放射免疫分析诊断技术

放射免疫分析诊断技术是用竞争性结合的原理, 应用放射性同位素标记抗原 (或抗体), 与相应抗体 (或抗原) 结合, 通过测定抗原 - 抗体结合物的放射活性判断结果。它将放射性核素具有的高灵敏度和抗原 - 抗体反应的特异性相结合, 使检测的灵敏度达 pg 水平。本方法可进行超微量分析, 敏感性高, 可用于测定抗原、抗体、抗原 - 抗体复合物。由于灵敏度非常高, 所以用一般方法难以测定的微量物质, 例如血液中的激素含量等可用此法进行测定。

4.1.1 放射免疫分析诊断技术的基本原理

放射性标记抗原 *Ag 和未标记抗原 (待测物) Ag 与不足量的特异性抗体 Ab 竞争性结合, 形成 $^*Ag - Ab$ 或 $Ag - Ab$ 复合物。因为加入的 *Ag 和 Ab 的量是恒定的, 当结合反应达到动态平衡后, 若 Ag 量增多, 生成的 $Ag - Ab$ 量会增多, $^*Ag - Ab$ 生成量相对减少, 游离的 *Ag 就会增多, 即 Ag 与复合物的放射性成反比。反应达到平衡后, 用有效的方法将 $^*Ag - Ab$ 和 $Ag - Ab$ 复合物与游离的 *Ag 和 Ag 分离, 测量其放射性, 即可求得样品中抗原 Ag 的含量。在放射免疫分析中, 用已知不同浓度的标准物和一定量的 *Ag 及限量的 Ab 反应, 采取一定方法将结合相 (B) 与游离相 (F) 分开, 即可算出该标准物在各浓度下 $^*Ag - Ab$ 复合物的结合百分率 (B/T)。

这一反应过程, 可用图 4-1 说明。图中黑圈表示标记抗原, 白圈表示非标记抗原,

长条代表抗体，每个抗体有两个结合位点，标记抗原与非标记抗原对抗体有同等的结合能力。例如，以未知量的无标记抗原（被检物），加到已知量的标记抗原和抗体的反应体系时，依靠测定无标记抗原对标记抗原同抗体结合的竞争性抑制达到的程度，从而可以测定被检物的数量。

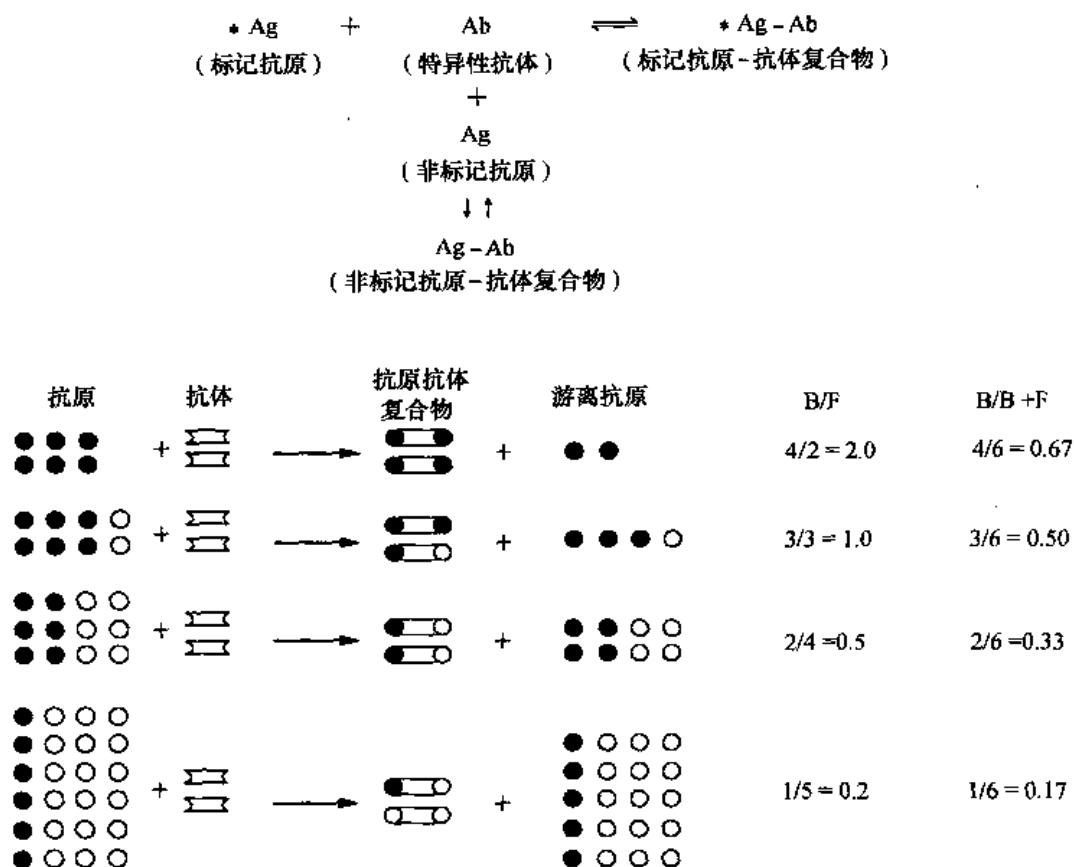


图 4-1 放射免疫分析原理示意图

从图 4-1 中可见，当标记抗原与抗体量一定时，结合率（ $B/B + F$ ）随待测样品中抗原量增加而降低。在实际工作中，以 B/T 的值为纵坐标，标准物的浓度为横坐标，绘成曲线，即竞争性抑制曲线，或称标准曲线。将未知浓度的样品按同样条件操作，所得结合率（%）与标准曲线相比，即可查出样品中待测抗原的浓度。

放射免疫分析典型的操作程序是首先配制一系列已知浓度的标准溶液，并各取一定体积，在其中加入一定量的标记抗原和特异性抗体；在一定条件下使之反应平衡后，采取适当方法将 B 与 F 分离；分别测量其放射性；绘制标准曲线（图 4-2）。对样品中抗原的测定，则可在同样条件下操作，在标准曲线上查得含量。

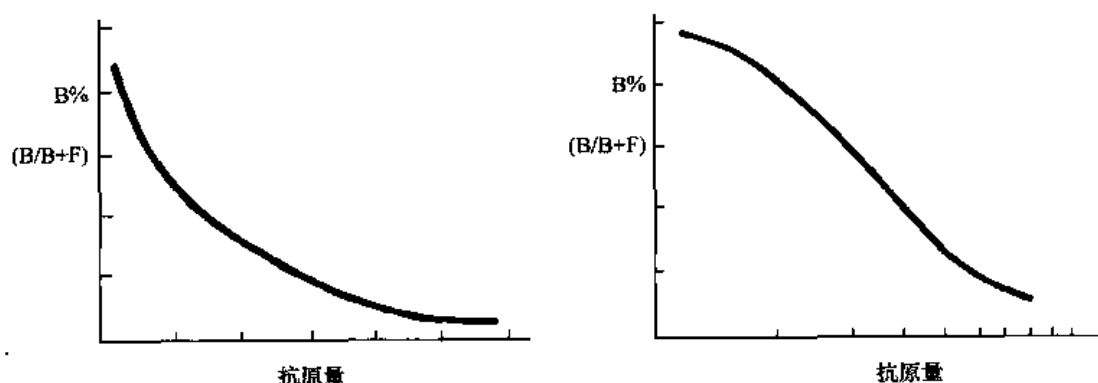


图4-2 标准曲线（左：横坐标为等份刻度；右：横坐标为对数刻度）

4.1.2 放射免疫抗原的制备

4.1.2.1 完全抗原

为了保证免疫反应的特异性，对放射免疫抗原要求的纯度较高，必须在90%以上。通常采用电泳、凝胶过滤、离子交换层析等技术获得较高纯度的抗原。纯化的抗原必须经过纯度鉴定才能使用。鉴定办法是通过电泳后只有一条沉淀线或者以圆盘电泳进行纯度分析。

4.1.2.2 半抗原

只有将半抗原与蛋白质大分子的载体结合起来形成一个完全抗原，才能获得较好的免疫原性。需要结合的载体，通常包括血清白蛋白、球蛋白、纤维蛋白、甲状腺球蛋白、鸡卵蛋白等。连接方式则因半抗原的功能基团与蛋白质载体功能基团所决定。常用的连接剂有二亚胺、二异氰酸、过碘酸盐等。

4.1.3 抗原的标记

4.1.3.1 放射性同位素的选择

按照以下原则选择同位素：①方法简单、经济、便于推广应用；②易于防护；③同位素与标记物结合好，不易从标记物上脱落；④对标记物不会引起辐射损伤而使蛋白变性；⑤具有较高的计数效率。

常用于标记抗原的放射性同位素有 ^{125}I 、 ^{131}I 及 ^3H ，其他还有 ^{14}C 、 ^{35}S 和 ^{32}P 等。

① ^3H 因所有的有机化合物中均含有氢，用 ^3H 来置换氢，不至于影响其原有化合物的化学性质。 ^3H 的半衰期长，是一个弱衰变、能量低、便于防护的同位素。一次标记可以使用较长时间，采用闪烁仪测量，测量效力可达60%， ^3H 标记要求条件较高，一般需由专门机构来承担，不易推广。

② ^{125}I 和 ^{131}I 碘标记的化合物比度高，标记方法简便，含有酪氨酸的蛋白质和多肽与小分子半抗原均可用放射性I标记。碘的放射能量较大，半衰期较短。虽然 ^{125}I 的放

射比活性仅为 ^{131}I 的13%，但 ^{125}I 的半衰期较 ^{131}I 长，同位素丰度大，辐射损伤小，计数效率也较高，因此 ^{125}I 比 ^{131}I 更为常用。

表 4-1 各种标记同位素的性质比较

同位素	毒性级别	衰变类型	半衰期
^3H	低	β^-	12.26 年
^{14}C	低	β^-	5730 年
^{131}I	高	γ, β	8.07 天
^{125}I	低	EC, γ	60.20 天
^{35}S	中	β^-	67.48 天
^{32}P	中	β^-	14.26 天

4.1.3.2 标记方法

(1) 标记 ^{125}I 的方法

可分两大类，即直接标记法和间接标记法。

1) 直接标记法

直接标记法是将 ^{125}I 直接结合于蛋白质侧链残基的酪氨酸上，此法优点是操作简便，为 ^{125}I 和蛋白质一步结合反应，它能使较多的 ^{125}I 结合在蛋白质上，故标记物具有高度比放射性。但此法只能用于标记含酪氨酸的化合物；此外，含酪氨酸的残基如具有蛋白质的特异性和生物活性，则该活性因标记而易受损伤。

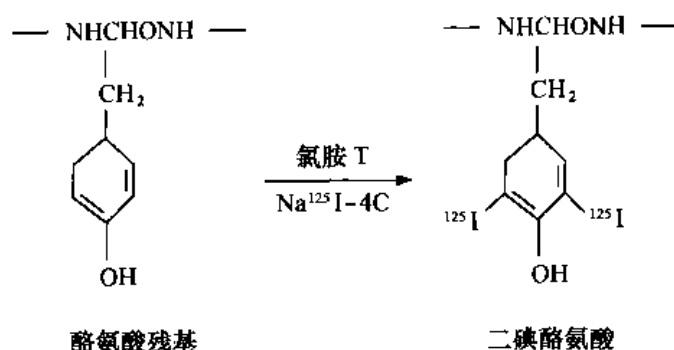
2) 间接标记法

间接标记法（又称连接法）是以 ^{125}I 标记在载体上，纯化后再与蛋白质结合。由于操作较复杂，标记蛋白质的比放射性显著低于直接法。但此法可标记缺乏酪氨酸的肽类及某些蛋白质。如直接法标记引起蛋白质酪氨酸结构改变而损伤其免疫及生物活性时，可采用间接法。它的标记反应较为温和，可以避免因蛋白质直接加入 ^{125}I 液引起的生物活性失活。

2) 碘标记方法

目前常用碘标记的方法很多，如氯化碘法、乳过氧化酶法、过氯酸法和连接标记法等。但比较起来，氯胺 T 法最为简便，效果好，易于采用。下面介绍最常用的氯胺 T 直接标记法。

氯胺 T 是对甲苯磺基酰胺的 N-氯衍生物的钠盐，是一种氧化剂，在水溶液中可以缓慢地释放次氯酸，因而可以在标记的过程中形成一种能产生温和氧化效果的中间体，它可使放射性碘离子氧化而呈活泼形式的碘离子，在偏碱溶液中（pH 值为 7.5），氯胺 T 将 ^{125}I 的 I^- 氧化为 I^+ ， I^+ 取代蛋白质酪氨酸苯环的氢，形成二碘酪氨酸。反应式如下。



放射性碘标记率的高低与抗原（蛋白质或多肽）分子中酪氨酸的含量及分子中酪氨酸的暴露程度有关，当分子中含有较多的酪氨酸，又暴露在外时，则标记率就高。其标记过程如下。

（1）将蛋白质抗原以 0.5mol/L 、 pH 值为 7.5 PB 液稀释为 $20\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，取 $5 \sim 10\mu\text{L}$ 加入到小试管底部。

（2）再取 Na^{125}I $5\mu\text{L}$ 也加入到同一个小试管底部。

（3）然后将新鲜配制的氯胺 T（ 1mg 氯胺 T 溶于 0.5mol/L pH 值为 7.5 PB 液 0.1mL ）快速加入试管中，混匀后于冰浴中搅拌 5min 。

（4）再加入 0.1mL （含 3mg ）偏重硫酸钠（以 PB 液配制）终止反应。

（5）然后加 1% KI 溶液 1 滴，观察液体是否完全透明。如仍呈棕色，应继续加少许的偏重硫酸钠。

（6）过 Sephadex G_{50} 柱进行分离，逐管收集，取第一峰，即为碘标记的蛋白质抗原，后部分为游离 ^{125}I 峰。在标记抗原峰试管内加等量 1% 血清蛋白作稳定剂，这就是标记抗原液。

4.1.3.3 标记的最佳条件

（1）放射性碘比活性要高。

（2）反应体积要小。

（3）标记反应的 pH 值以 7.5 为宜， pH 值超过 8.5 碘则可以取代酪氨酸以外的其他成分。

（4）氯胺 T 的用量：氯胺 T 的用量必须事先测定，其方法为定出在标记的蛋白质存在时， 10% 的三氯醋酸能沉淀最大量放射性碘所需要的最小量的氯胺 T。氯胺 T 的用量必须适当。用量少，虽能满足反应的要求，但产率低；用量大易使蛋白质变性。

（5）适宜的蛋白质浓度：蛋白质浓度决定碘化的效率，对含量中等的氯胺酸的蛋白质而言，当蛋白质浓度为 1mg/mL 时，蛋白质的回收率为 100% ；当浓度为 $300\mu\text{g/mL}$ 时，回收率则为 $80\% \sim 90\%$ ；当浓度降至 $50\mu\text{g/mL}$ 时，则回收率只有 $60\% \sim 70\%$ 。

4.1.4 标记物的鉴定

4.1.4.1 纯度鉴定

放射性化学纯度鉴定是指某一化学形式的放射性物质的放射强度在该样品中所占放射性总强度的百分比。加入 1% ~ 2% 载体蛋白 (BSA) 及等量的 15% 三氯醋酸, 摇匀静置数分钟后, 3000 r/min 离心 15min 将所有蛋白质沉淀, 分别测定沉淀物和上清液的脉冲值 (cpm)。一般要求游离碘在总放射性碘的 5% 以下。标记抗原在储存过久后, 会出现标记物的脱碘, 如游离碘超过 5% 则应重新纯化去除这部分游离碘。否则影响放射免疫分析的精确度。

4.1.4.2 采用碘标记的抗原

通常由于氧化剂的作用可引起部分活性的损伤, 应尽量避免这种损伤。检查方法是用少量的标记抗原加过量的抗体, 在一定的条件下充分反应后, 将 B 和 F 进行分离, 分别测定放射性, 算出 BT%。此值应在 80% 以上, 最大可超过 90%, 该值越大, 表示抗原损伤越少。

4.1.4.3 放射强度

放射性核素标记抗原必须有足够的放射性比度, 即单位重量抗原的放射性强度。标记抗原的比放射性用 mCi/mg (或 mCi/mmol) 表示。比度越高, 测定越敏感。标记抗原的比度计算是根据放射性碘的利用率 (或标记率)。

$$^{125}\text{I} \text{ 标记率 (利用率)} = \frac{\text{标记抗原的总放射性}}{\text{投入的总放射性}} \times 100\%$$

$$\text{比度 } (\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) = \frac{\text{投入的总放射性} \times \text{标记率}}{\text{标记抗原量}}$$

如 5 μg hGH 用 2mCi Na^{125}I 进行标记, 标记率为 40%, 则

$$\text{比放射性} = \frac{2000 \mu\text{Ci} \times 40\%}{5 \mu\text{g}} = 160 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

4.2 放射免疫的测定方法

用放射免疫分析进行测定时分 3 个步骤, 即抗原抗体的竞争抑制反应、B 和 F 的分离及放射性的测量。

4.2.1 抗原抗体反应

将抗原 (标准品和受检标本)、标记抗原和抗血清按顺序定量加入到小试管中, 在一定的温度下进行一定时间的反应后, 使竞争抑制反应达到平衡。不同质量的抗体和不同含量的抗原对孵育的温度和时间有不同的要求。如受检标本抗原含量较高, 抗血清的

亲和常数较大,可选择较高的温度(15℃~37℃)进行较短时间的孵育,反之应在低温环境中(4℃)作较长时间的孵育,形成的抗原-抗体复合物较为牢固。

4.2.2 B、F分离技术

当标记的抗原与未标记的抗原和抗体结合后,均形成抗原-抗体复合物。在RIA反应中,标记抗原和特异性抗体的含量极微,形成的标记抗原-抗体复合物(B)不能自行沉淀,而放射免疫测定的终点决定于标记抗原与竞争者的结合比,因此必须将抗原抗体复合物与游离的标记抗原完全分离才能保证放射免疫测定的准确性。因此需用一种合适的沉淀剂使它彻底沉淀,以完成与游离标记抗原(F)的分离。分离技术的选择是根据抗原的特性、待测样品的体积、测定需要的灵敏度和精确性等。另外对小分子量的抗原也可采取吸附法使B与F分离。较常用的B、F分离法有盐析法、双抗体法、聚乙二醇(PEG)沉淀法、PR试剂法和活性碳吸附法等(见表4-2)。

表4-2 B、F分离法

分离方法	(B) 抗原抗体复合物	(F) 游离抗原
平衡透析	在透析袋内	袋内外浓度相等
清蛋白或葡萄糖衣	不被活性炭吸附	被活性炭吸附于沉淀中
活性炭吸附	后于溶液中	先被洗脱
凝胶过滤	先被洗脱	通过滤膜被滤掉
微孔膜过滤	在醋酸纤维膜上	以其自己的电泳泳动度
电泳和层析电泳	在 γ 球蛋白电泳带	移动
双抗体法	被第二抗体沉淀	离心后在上清液中
固相抗体法	结合到固相物上	在溶解相中
硫酸铵沉淀法	离心后于沉淀中	在溶液中
聚乙二醇(分子量6000kD)	离心后于沉淀中	在溶液中

4.2.2.1 盐析法

利用33%饱和硫酸铵液可使其抗原抗体复合物沉淀下来。向溶液内加入饱和硫酸铵,使其最终饱和度达到36%左右,摇匀静置,然后离心沉淀即为标记抗原抗体复合物,而游离的标记抗原仍留于溶液中。此法的缺点是,游离抗原也同时有随标记抗原抗体复合物沉淀的可能。

4.2.2.2 双抗体法

这是RIA中最常用的一种沉淀方法。将产生特异性抗体(第1抗体)的动物(例如兔)的IgG免疫另一种动物(例如羊),制得羊抗兔IgG血清(第2抗体)。在抗原与特异性抗体反应后加入第2抗体,形成由抗原-第1抗体-第2抗体组成的双抗体复合物。但因第1抗体浓度甚低,其复合物亦极少,无法进行离心分离,为此在分离时加

入一定量的与第1抗体同种动物的血清或IgG,使之与第2抗体形成可见的沉淀物,与上述抗原的双抗体复合物形成共沉淀。经离心即可使含有结合态抗原(B)的沉淀物沉淀,与上清液中的游离标记抗原(F)分离。此法反应比较温和,分离也较完全(可达80%~90%),操作简便、快速。

4.2.2.3 聚乙二醇(PEG)沉淀法

目前RIA反应系统逐渐采用了PEG溶液代替双抗体法。PEG沉淀剂的主要优点是制备方便,沉淀完全。缺点是非特异性结合率比用双抗体法要高,且温度高于30℃时沉淀物容易复溶。

4.2.2.4 PR试剂法

PR试剂法是一种将双抗体与PEG二法相结合的方法。此法保持了两者的优点,节省了两者的用量,而且分离快速、简便。

4.2.2.5 活性炭吸附法

活性炭吸附法是将活性炭悬浮于一定浓度的葡聚糖水溶液(或清蛋白)中,葡聚糖分子在活性炭表面形成一层具有一定孔径网眼的膜,这层膜可以使小分子游离抗原或半抗原通过并被活性炭吸附,大分子复合物不能通过,所以留在溶液中而不被活性炭吸附。从而达到分离的目的。离心使颗粒沉淀,上清液中含有结合的标记抗原。此法适用于测定类固醇激素,强心苷和各种药物,因为它们是相对非极性的,又比抗原抗体复合物小,易被活性炭吸附。此法快速、方便而且分离效果好。但是当标记抗原与抗体结合不牢固时,待游离抗原被活性炭吸附后打破了抗原抗体反应的平衡,而造成抗原-抗体复合物的离解,在这种情况下,此法不能应用。

4.2.3 放射性强度的测定

B、F分离后,即可进行放射性强度测定。测量仪器有两类,液体闪烁计数器(β 射线,如 ^3H , ^{32}P 、 ^{14}C 等)和晶体闪烁计数器 β 射线,如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{57}Cr 等)。

计数单位是探测器输出的电脉冲数,单位为cpm(计数/分),也可用cps(计数/秒)表示。如果知道这个测量系统的效率,还可算出放射源的强度,即dpm(衰变/分)或dps(衰变/秒)。

每次测定均需作标准曲线图,以标准抗原的不同浓度为横坐标,以在测定中得到的相应放射性强度为纵坐标作图,如图4-3所示。放射性强度可任选B或F,亦可用计算值 $B/(B+F)$ 、 B/F 和 B/B_0 。标本应作双份测定,取其平均值,在制作的标准曲线图上查出相应的受检抗原浓度。

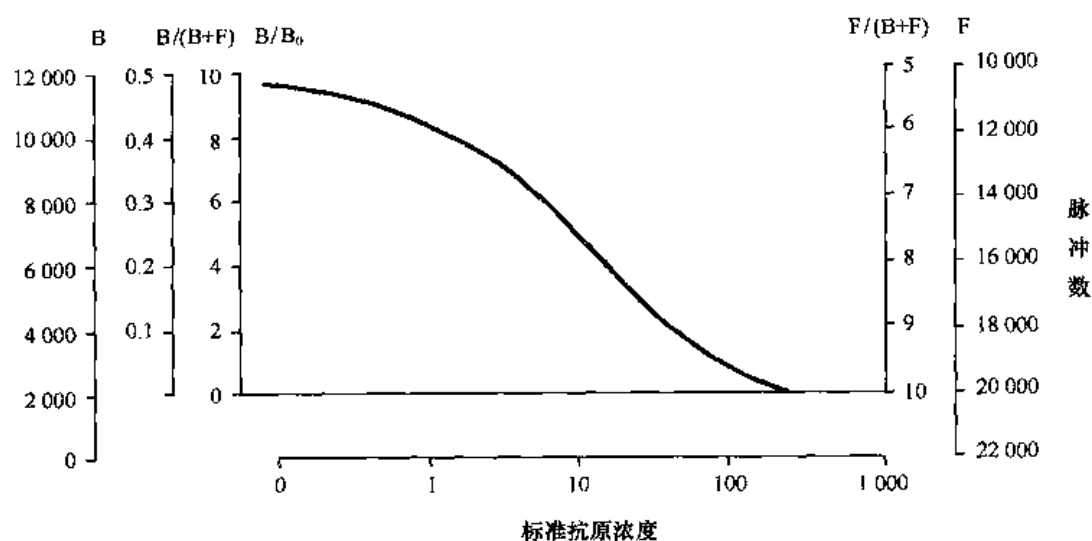


图4-3 放射免疫分析标准曲线图

4.3 放射免疫分析法的建立

4.3.1 放射免疫分析的基本试剂

4.3.1.1 标准品

标准品是放射免疫分析法定量的依据, 由于以标准品的用量来表示被测定物质的量, 故标准品与被测定物质应当化学结构一致并具有相同的免疫活性。标准品作为定量的基准, 应具有高纯度和准确性, 而且稳定性要好, 也就是说在一定的储存条件下保持原来的特性。标准品用缓冲液配成含不同剂量的标准溶液, 将标准溶液测得的值作标准曲线。

4.3.1.2 标记物

标记抗原应具备①比放射性高; ②免疫活性好; ③所用的核素的半衰期尽可能长, 标记一次可较长时间使用, 这对来之不易的抗原尤其重要; ④标记简便、易防护。

要准确测量 B 与 F 的放射性, 必须有足够的放射性强度, 所选用的标记抗原的量, 在使用¹²⁵I 时达 5000 ~ 15000cpm。

4.3.1.3 抗体

抗体应选择特异性高、亲和力强及滴度好的抗体, 用于放射免疫测定。根据稀释曲线, 选择适当的稀释度, 一般以结合率为 50% 作为抗血清的稀释度。

4.3.1.4 B 与 F 分离剂

2% 加膜活性炭溶液的配制: 活性炭 2g, 右旋糖酐 200.2g, 加 0.1mol/L PB 至 100mL。电磁搅拌 1h, 然后置冰箱中待用。

4.3.1.5 缓冲液

放射免疫分析技术所用的缓冲液有多种,要通过实验选用抗体和抗原结合最高的缓冲液。目前最常用的缓冲液有下列几种:①磷酸盐缓冲液;②醋酸盐缓冲液;③巴比妥缓冲液;④Tris-HCl 缓冲液;⑤硼酸缓冲液。其中以磷酸盐缓冲液应用最多。

在缓冲液中,除必须有弱酸及弱酸盐成分外,还应根据不同检测项目加入下列物质:①保护蛋白,常用的有牛血清白蛋白或明胶,浓度为0.1%~0.2%,用以降低试管对抗原的非特异性吸附。②防腐剂,多采用0.1%叠氮钠、0.01%柳硫汞、溶菌酶或抗菌素。③酶抑制剂,如测定心钠素等肽类激素时,要加入适量的抑肽酶,用以抑制血浆内源性水解酶对待测物的降解;又如测定cAMP、cGMP时,需加入EDTA·2Na,抑制磷酸二酯酶的活性。④阻断剂,在测定甲状腺激素或测定某些甾体激素时,必须加阻断剂,使和蛋白质相结合的激素,变为游离型。常用的阻断剂有8-苯胺-1-萘磺酸、柳硫汞、水杨酸钠、三氯醋酸钠等。⑤载体蛋白,采用二抗作B与F分离剂时,要向反应液中加入适量与第一抗体同种动物的正常血清。在测定不含有血浆蛋白的样品时,用PEG沉淀剂分离B、F,必须加适量 γ 球蛋白或正常人混合血清。

4.3.2 放射性免疫分析的加样程序

4.3.2.1 基本原理

所谓平衡饱和,是指抗原和抗体反应达到再不结合、也不解离的平衡状态,称为饱和状态,即平衡饱和。也称此为饱和分析法。这意味着抗原或被测抗原、标记抗原、抗体三者一起孵育。

4.3.2.2 加样程序

一般先加标准物或被测样品,再加抗血清,最后加标记物。这样的顺序是让标准物或被测物与抗体有短暂的结合,提高抗原的竞争抑制能力。在小分子半抗原的放射免疫分析中,标记抗原和未标记抗原与抗体结合的亲和力常常是不相同的,前者比后者的亲和力高。因此,上述加样程序就更有必要,所以一般都采用先加标准物或样品和抗血清,后加标记物。这样测定也比较稳定。

在大分子蛋白质抗原的放射免疫分析中,如果是双抗体分离法,抗原和标记抗原与抗体三者加样,可不分先后,有的是标准物、标记物、抗血清的加样顺序,但一般习惯还是标准物或血样、抗血清、标记物、然后混匀孵育4℃ 24~48h,再加双抗体,继续孵育4℃ 24h,使免疫反应达到平衡。对一些多肽激素的放射免疫分析,应用双抗体分离法,其流程比较长,这样的顺序同样可不分先后。孵育后分离B与F,每管加入2%加膜活性炭溶液300 μ L,摇匀,立即离心,弃去上清液,测沉淀(F)的cpm数。

4.3.2.3 计数、绘制标准曲线与测定样品含量

以活性炭分离B与F,沉淀计数是F的cpm。 $T-F-NSB$,得B的cpm数。计算标

准管与样品管结合 (B) 的 cpm 数及与零标准管结合 (B_0) 的比 ($B/B_0 \times 100\%$)。用半对数纸, 以标准管的 B/B_0 为纵坐标, 以各标准管含量为横坐标, 绘制标准曲线。根据样品的结合率 ($B/B_0 \times 100\%$), 从标准曲线中找出被测样品抗原的含量, 再换算成每毫升血浆含某抗原的量, 或每毫克 (组织湿重) 含某抗原的量。

4.3.3 放射免疫分析的质量控制

4.3.3.1 质量控制的意义

放射免疫分析的质量控制分 4 个方面: ①在一个测定方法内产生的误差; ②在同一实验室内不同方法之间产生的误差; ③用同一测定方法, 在各实验室之间产生的误差; ④采用不同方法, 在各实验室之间产生的误差。

4.3.3.2 测量误差的因素

误差包括系统误差和随机误差。系统误差发生在测量过程中由于仪器不准、试剂不纯、标准品不稳定等原因, 使测定结果呈倾向性偏大或偏小, 这种误差应尽量避免。随机误差是测量过程中各种偶然因素造成的, 没有固定的倾向性, 这类误差是不可避免的, 必要时做统计学处理。

放射免疫分析中造成误差的可能来源有以下几个方面: ①各种仪器、设备的准确性、稳定性、效率以及被污染等情况带来的误差; ②试剂的纯度、质量和稳定性的影响也是造成误差的重要因素; ③在放射免疫分析中一些基本操作不当造成的误差; ④样品误差, 样品的收集方法、贮存温度、放置条件, 微量样品取样的准确度, 样品可能造成的污染以及样品的变性也都能造成测量的误差; ⑤提取及层析分离过程中的丢失。

4.3.3.3 测量误差的控制

- (1) 选择准确性高的方法, 对各种方法进行比较, 淘汰粗糙及难以重复的方法。
- (2) 建立方法对比, 用相同的测量方法和不同的测量方法在同一实验室和不同实验室, 在同一地区 and 不同地区, 在同一时间和不同时间, 对同一样品进行对比, 检查产生误差的原因。
- (3) 建立各种类型的标准, 对标准品应规定纯度及制备方法, 使用年限及储存条件。
- (4) 建立操作规程, 按章操作。对使用的试剂、仪器设备要经常检查其有效性, 更换试剂时应进行必要的鉴定, 必要时对测定方法要做重复性试验和回收试验。
- (5) 建立可靠的检查制度, 经常对测定结果进行核查, 利用控制血清、标准血清检查每批结果的准确性。

4.3.4 放射免疫分析的优缺点

4.3.4.1 RIA 的优点

RIA 具有许多其他分析方法无可比拟的优点。它既具有免疫反应的高特异性, 又具

有放射性测量的高灵敏度，因此能精确测定各种具有免疫活性的极微量的物质。

①灵敏度高，一般化学分析法的检出极限为 $10^{-3} \sim 10^{-6} \text{g}$ ，而 RIA 通常为 $10^{-9} \sim 10^{-18} \text{g}$ 。

②特异性强，由于抗原-抗体免疫反应专一性强，所被测物一定是相应的抗原。良好的特异性抗体能识别化学结构上非常相似的物质，甚至能识别立体异构体。

③应用范围广。据不完全统计，目前至少已有 300 多种生物活性物质已建立了 RIA。它几乎能应用于所有激素的分析（包括多肽类和固醇类激素），还能用于各种蛋白质、肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原、寄生虫抗原以及一些小分子物质（如环型核苷酸等）和药物（如地高辛、毛花苷 C 等）的分析，应用范围还在不断扩展。近年来由于小分子半抗原制备抗体的技术有很大的发展，有人预测几乎所有的生物活性物质，只要其含量不低于 RIA 的探测极限，都可建立适当的 RIA 法。

④操作简便，RIA 所需试剂品种不多，可制成配套试剂盒。加样程序简单，一次能分析大量标本，标本用量也少。反应时间不长，测量和数据处理易于实现自动化。RIA 属体外诊断技术，对患者无任何辐射危害。

4.3.4.2 RIA 的缺点

①只能以免疫反应测得具有免疫活性的物质，对具有生物活性但失去免疫活性的物质是测不出的。因此 RIA 结果与生物测定结果可能不一致。

②由于使用了生物试剂，其稳定性受多种因素影响，需要有一整套质量控制措施来确保结果的可靠性。

③灵敏度受方法本身工作原理的限制，对体内某些含量特别低的物质尚不能测定。

④由于放射免疫分析是竞争性的反应，被测物和标准物都不能全部参与反应，测得的值是相对量而非绝对量。

⑤存在放射线辐射和污染等问题。放射免疫分析技术虽然存在一些缺点，但仍不失其定量分析方法的先进性。所以随着科学技术的进步，将会得到更加广泛、更加深入的发展。

4.4 免疫放射分析

免疫放射分析（IRMA）也称非竞争性 RIA，是在放射免疫分析（RIA）的基础上发展起来的核素标记免疫测定，其特点为用核素标记的抗体直接与受检抗原反应并用固相免疫吸附剂作为 B 或 F 的分离手段。IRMA 于 1968 年由 Miles 和 Heles 改进为双位免疫结合，在免疫检验中得到了广泛应用。

4.4.1 免疫放射分析的基本原理

IRMA 属固相免疫标记测定，其原理与 ELISA 极为相似，不同点主要为标记物为核素及检测是利用放射性的量。单位点 IRMA 的反应模式如图 4-4。抗原与过量的标记抗 Heles 改进为双位免疫结合，在免疫检验中得到了广泛应用。双位点 IRMA 的反应模

式(图4-5)与双抗体夹心 ELISA 的模式相同。

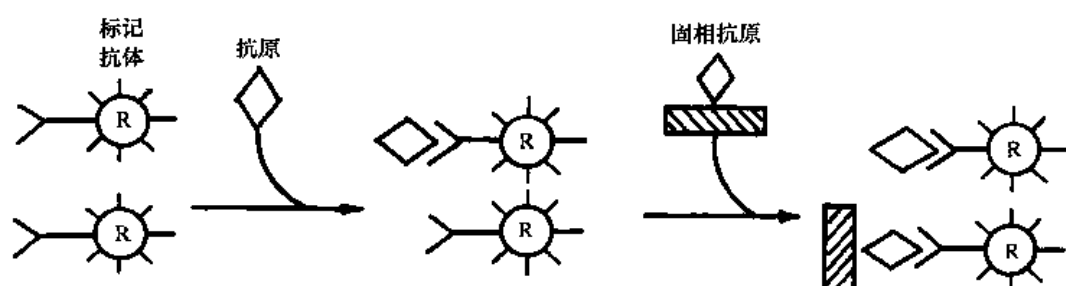


图4-4 单位点 IRMA 原理示意图

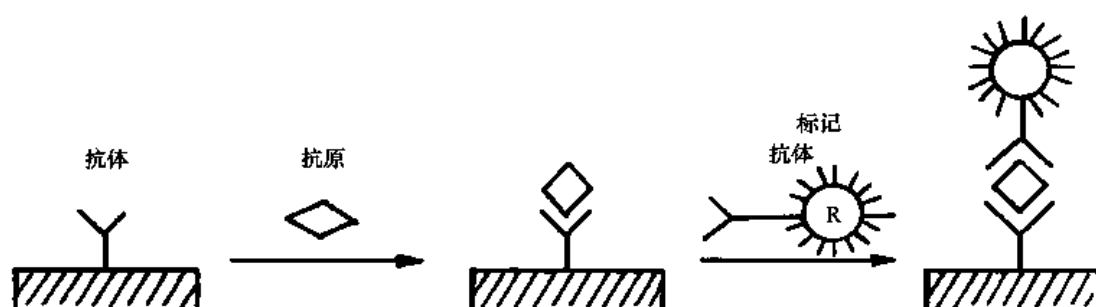


图4-5 双位点 IRMA 原理示意图

受检抗原与固相抗体结合后，洗涤，加核素标记的抗体，反应后洗去游离的标记抗体，测量固相上的放射性的量，测得的放射性与受检抗原的量成正比。

4.4.2 IRMA 与 RIA 的异同点

4.4.2.1 标记物

在 RIA 中为核素标记抗原，在 IRMA 中为核素标记抗体。抗原有不同种类，根据其化学结构，标记时需用不同的核素和不同的方法。抗体为蛋白质，有利于碘化标记，不同抗体标记方法基本相同。标记抗体的比活度高，提高了分析的灵敏度。

4.4.2.2 反应速率

反应速度与反应物的浓度成正比，在 IRMA 中标记抗体是过量的，而且不存在竞争性结合的复杂反应，所以反应速度较 RIA 快。在 RIA 中抗体量是微量的，所以一定要用高亲和力的多克隆抗体，而在 IRMA 中应用亲和力较低的单克隆抗体也能得到满意的结果。

4.4.2.3 反应模式

RIA 为竞争抑制，测得放射性的量与受检抗原成反比。IRMA 为非竞争结合，剂量与反应曲线为正相关的直线关系。

4.4.2.4 特异性

在单位点 IRMA 中,一般均应用针对不同位点的单克隆抗体,其交叉反应率低于应用多克隆抗体的 RIA。

4.4.2.5 标准曲线的工作浓度

通常 RIA 的工作范围为 2~3 个数量级,而 IRMA 可达 3 个数量级以上。

4.4.2.6 分析误差

RIA 中加入的抗体和标记抗原都是定量的,加样品误差可严重影响测定结果。IRMA 中标记和固相抗体在反应中都是过量的,只有受检标本的加样误差才会影响分析结果。因此,IRMA 的批内和批间变异均比较小。

4.4.2.7 其他

RIA 可以测定大、小分子量的物质,双位点 IRMA 只能测定在分子上具有 2 个以上抗原表位的物质。

在 RIA 中应用的多为多克隆抗体,亲和力和特异性要求较高,但用量很少。IRMA 中标记抗体和固相抗体用量较多,一般均用来源丰富、特异性较高的单克隆抗体。

4.5 生产和使用放射免疫诊断试剂(盒)的卫生防护

放射免疫分析试剂(盒)的生产(包括研制)和使用以及储存、运输、经销等过程中的放射防护基本要求有如下几个方面。

4.5.1 放射免疫诊断试剂(盒)的含义

放射免疫分析试剂盒(radioimmunoassay kit)是指将标准品、标记物、结合试剂、分离剂和缓冲溶液等组装在一起的一整套组分(包括操作说明书)。根据放射免疫分析原理,利用该整套组分可在体外测定某一超微量生物活性物质的量,并能达到一定的精确度或准确度,简称放免试剂盒。

4.5.2 放射免疫试剂的生产单位的防护要求

4.5.2.1 一般原则

①生产放免试剂(盒)的单位属开放型放射工作单位,它的分类及其工作场所的分级和放射卫生防护要求应按 GB8703 执行。

②生产放免试剂(盒)的单位必须按有关规定要求办理放射卫生许可登记。

③生产放免试剂(盒)的单位在实践中的放射防护和监督管理要求应符合我国有关法规和标准的规定。

4.5.2.2 操作防护要求

- ①生产放免试剂盒的工作场所，应根据有关规定实行分区管理，防止交叉污染。
- ②操作开放型放射性物质应严格遵循操作程序和安全规程，必要时应事先通过“模拟操作”熟练掌握技能。新开展的或可能发生意外的操作应在防护人员监督下进行。
- ③开瓶、转移、标记、分离纯化等易产生放射性物质逸出或飞散的操作，其操作的放射性物质活度达到乙级工作场所水平时，需在有适当负压的通风柜或工作箱内进行。
- ④操作液体放射性物质应在易去除污染的工作台上放置的搪瓷盘内进行，并铺以吸水性好的材料。
- ⑤吸取液体的操作必须用合适的器具，严禁用口吸取。
- ⑥伴有外照射的操作应充分运用屏蔽、距离和时间三大防护要素，采取相应的防护措施。
- ⑦操作放射性物质的工作人员应正确穿戴好所需的个人防护用品。不允许用裸露的手直接接触放射性物质或进行污染物件操作。
- ⑧放射性操作之后应对工作台、设备、地面及个人防护用品等进行表面污染检查、清洗、去污。工作人员应进行淋浴。
- ⑨严禁在放射性工作场所进食、饮水、吸烟和存放食物。

4.5.2.3 放射源（液）的防护要求

- ①生产放免试剂盒所用的放射源（液）应有专人管理并建立保管、领用、注销和定期检查制度。
- ②放射源（液）的容器必须有明显的标签：注明核素名称、理化状态、活度水平、存放起始日期和负责人等。
- ③放射源（液）的容器应采取措施防范破损泄漏和污染扩散。
- ④放射源（液）用后应及时存放在专用柜内，需防盗、防水、防火，柜外应有电离辐射标志。

4.5.2.4 放射性废物的收集、处置和处理

- ①生产放免试剂盒过程中应采取必要措施尽量减少放射性废物的产生量，严禁把带有放射性污染的废物混同一般废物处理。放射性废物的分类应按 GB9133 执行。
- ②放射性气载废物的排放应按 GB8703 第 4.3 条执行。
- ③放射性液体废物应收集在能防止破损、泄漏的容器内置于暂存间衰变。小于或等于 $3.7 \times 10^5 \text{ Bq/L}$ 的低放废液的排放应按 GB8703 的第 4.4 条执行。
- ④放射性污染的固体废物不准乱扔乱放，应及时收集并按污染核素半衰期的长短或可燃否而分别装入容器内采取密封措施，严禁将液体废物和易腐蚀物混入其中，视情况按有关要求送指定的废物库或放入暂存间处置。经放射防护部门测定，比活度小于 $7.4 \times 10^4 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的放射性污染固体废物可按非放固体废物处理。

⑤废物暂存间应有通风措施和电离辐射标志。

4.5.2.5 放射防护监测

- ①生产单位应根据有关防护标准、规定结合本单位的具体特点制定监测实施计划。
- ②生产单位应具备必要的监测仪器、仪表和专（兼）职放射防护人员。
- ③对监测工作应全面、认真、详细地记录、建档。
- ④根据监测结果定期进行评价，不断改进和完善放射防护工作。

4.5.3 放射免疫诊断试剂的储存、运输和经销的防护要求

4.5.3.1 放免试剂盒的包装和标志

- ①放免试剂盒应有抗挤压、抗震动、防破漏和一定的屏蔽效能措施。
- ②放免试剂盒表面放射性物质污染水平应小于 $0.4 \text{ Bq} \cdot \text{cm}^2$ 。

4.5.3.2 储存

- ①生产、经销放免试剂盒应具备储存库（室）。库门上应有电离辐射标志。
- ②储存库内不得存放易燃、易爆及腐蚀性危险品，应设有防火、防水、防盗措施。
- ③应有专人负责保管。建立登记制度，做到出库、入库账物相符。

4.5.3.3 使用的防护要求

①使用放免试剂盒应在单独的房间内进行。房间门口应有电离辐射标志。为预防污染扩散，无关人员和物品不得入内。

②使用、操作放免试剂盒的人员应经过职业卫生培训，具备相应的技能和防护知识。

③使用放免试剂盒之前需进行外观检查，若发现有破漏污染迹象应停止使用。必要时要向有关部门报告、追查原因并做进一步地处理。

④使用操作应在指定的工作台或搪瓷盘内进行，并采取必要可行的防污染措施。

⑤操作人员需佩戴个人防护用品，应避免皮肤直接接触放射性物质。

⑥操作完毕应及时清整用品，妥善收存。接触过放射性物质的用品，未经放射防护部门测量不准挪做他用。

⑦储存放免试剂盒应备专用柜并加锁，柜门上应有电离辐射标志。

⑧放免试剂盒需有专人管理交收、库存和消耗账目。

（陈兴业）

第 5 章 酶联免疫诊断技术

酶联免疫吸附诊断技术是以酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 为基础的测定技术。由于抗体可以高度特异与抗原分子结合, 因此通过抗原 - 抗体的特异性识别反应来进行检测就可以成为一种简便的检测程序。

酶联免疫吸附试验, 创始于 1971 年, 当时, 瑞典学者 Engvall 和 Perlmann, 荷兰学者 Van Weerman 和 Schuurs 分别报道将免疫技术发展为检测体液中微量物质的固相免疫测定方法, 称为酶联免疫吸附试验。1974 年 Voller 等又将固相支持物改为聚苯乙烯微量反应板, 使 ELISA 技术得以推广应用。ELISA 是免疫测定技术中应用最广、最有发展前途的一种技术, 可用于测定抗原, 也可用于测定抗体。

酶免疫测定方法的基本原理是: 先将已知的抗体或抗原结合在某种固相载体上, 并保持其免疫活性。测定时, 将待检标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。用洗涤的方法分离抗原抗体复合物和游离成分。然后加入底物显色, 根据颜色深浅进行定性或定量测定。

最初发展的免疫酶测定方法, 是使酶与抗体或抗原结合, 用以检查组织中相应的抗原或抗体的存在。后来发展为将抗原或抗体吸附于固相载体, 在载体上进行免疫酶染色, 底物显色后用肉眼或分光光度计判定结果。

5.1 酶联免疫测定方法及原理

自 1971 年酶联免疫吸附测定技术建立以来, 其技术已经日趋成熟, 最经典的当属 Clark 和 Adams 于 1977 年建立的双抗原夹心法。后来人们又建立了许多改进的方法, 成功地用于病毒的检测与鉴定。根据检测目的和操作步骤的不同, 常用的酶联免疫吸附测定方法有两种类型。用于测定抗原的技术类型有双抗体夹心法、双位点一步法和竞争法; 用于测定抗体的技术类型有间接法、双抗原夹心法和竞争法。此外, 还有捕获法, 下面分别进行介绍。

5.1.1 双抗体夹心法

5.1.1.1 对抗体夹心法的原理

ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性, 酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性, 又保留酶的活性。受检标本与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。加入酶标记的抗原或抗体, 通过反应也结合在固相载体上。加入酶反应的底物后, 底物被酶催化成为有色产物, 产物的量与

标本中受检物质的量直接相关, 根据呈色的深浅进行定性或定量分析。若有颜色反应, 说明检测样品中含有相应的抗体, 所以是阳性反应; 反之, 若无色, 说明样品中无相应抗体, 为阴性反应。

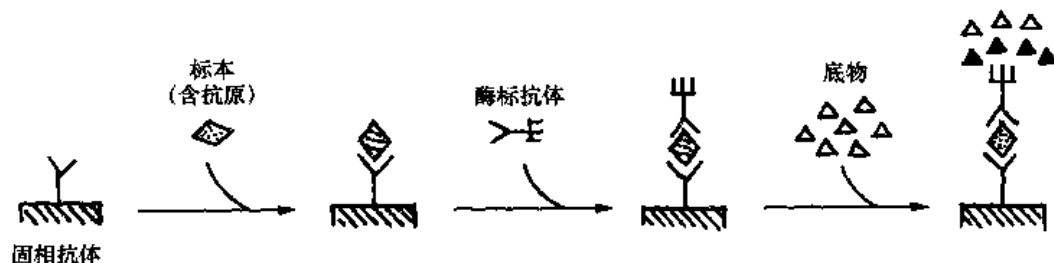


图 5-1 双抗体夹心法示意图

5.1.1.2 双抗体夹心法的操作步骤

- ①用已知特异性抗体包被固相载体, 孵育一定时间, 使形成固相载体, 洗涤除去未结合的抗体和杂质;
- ②加待检标本, 经过温育使相应抗原与固相抗体结合, 形成固相抗原抗体复合物, 洗涤, 除去无关的物质;
- ③加酶标特异性抗体, 经过温育使形成固相抗体—待检抗原—酶标抗体夹心复合物。洗涤, 除去未结合的酶标抗体;
- ④加底物显色, 温育, 固相上的酶催化底物产生有色产物; 显色;
- ⑤终止反应后, 目测定性或酶标仪测量光密度值进行定量测定。

5.1.1.3 双抗体夹心法的评价

双抗体夹心法是检测抗原最常用的方法, 具有 ELISA 技术的优点, 但仅适用于二价或二价以上的大分子抗原的检测。

5.1.1.4 双抗体夹心法的应用

此法适用于多价大分子抗原的检测, 而不能用于测定半抗原等小分子物质。运用此法可以测定: 甲肝抗原 (HAVAg), 乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg), 乙型肝炎病毒 E 抗原 (HBeAg), 乙型肝炎病毒核心抗原 (HBcAg), 甲胎蛋白 (AFP) 等。以检测乙型肝炎病毒表面抗原为例, 举例如下。

检测乙型肝炎病毒表面抗原的适应症为: 检测血清或血浆中乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg), 用于临床肝炎诊断、分类及献血员的筛选。其原理为: 本试剂采用双抗体夹心法, 将纯化的抗 HBs 吸附于固相载体表面, 加入待检血清 (或血浆), 如其中含有 HBsAg, 则与载体上的抗 HBs 结合, 继而加入辣根过氧化物酶标记的抗 HBs 结合物, 又与结合的 HBsAg 反应, 最后用比色法测定结合于载体上酶标抗体的酶活力, 据此反应检测血清或血浆中 HBsAg 含量。

5.1.1.5 双抗体夹心法的注意事项

注意测定中类风湿因子 (RF) 的干扰。RF 是一种自身抗体, 多为 IgM 型, 具有和多种动物 IgG 的 Fc 段结合的能力。在作双抗体夹心法测定时, 血清标本中含有的 RF 可同时结合固相抗体和酶标抗体, 形成固相抗体-类风湿因子-酶标抗体夹心复合物, 也可催化底物, 出现假阳性反应。如将抗体试剂事先用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶处理去除 Fc 段, 能够有效地改善检测特异性。

5.1.2 双位点一步法

5.1.2.1 双位点一步法的原理

应用识别抗原不同位点 2 个单克隆抗体 (McAb) 作双抗体夹心法测定。包被一个 McAb 后, 同时加入待检抗原和另一个 McAb 酶标物, 待检抗原上的 2 个抗原决定簇同时与固相 McAb 和酶标 McAb 结合, 形成固相 McAb-待检抗原-酶标 McAb 复合物, 加底物通过显色反应进行测定。

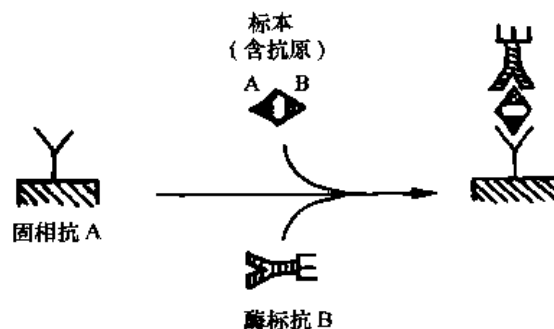


图 5.2 双位点一步法示意图

5.1.2.2 双位点一步法的操作步骤

- ①将 1 个 McAb 与固相载体连接, 形成固相 McAb。洗涤除去未结合物。
- ②同时加入待检标本和酶标 McAb, 温育, 使待检抗原和固相 McAb 及酶标 McAb 反应形成双抗体夹心复合物。洗涤除去未结合物。
- ③加底物显色。

5.1.2.3 双位点一步法的评价

由于应用 McAb, 双位点一步法具有很高特异性, 一步法省时、简便。

5.1.2.4 双位点一步法的应用

适用于双抗体夹心法的试剂, 有些也可用双位点一步法检测。如 HBsAg 同样可用此法进行检测, 其原理为: 将纯化的抗 HBs 吸附于固相载体表面, 加入待检血清 (或血浆), 同时加入辣根过氧化物酶标记的另一个抗 HBs (酶结合物), 如血清或血浆中含有 HBsAg, 则通过温育形成固相 McAb-HBsAg-酶标 McAb 复合物, 加入底物, 通过显色反应进行测定。若血清或血浆中不含 HBsAg, 通过洗涤除去未结合物质, 加底物后就不显色。

5.1.2.5 使用双位点一步法的注意事项

当待检抗原浓度过高时, 大量过剩抗原分别饱和固相 McAb 和酶标 McAb 而抑制夹心复合物的形成, 这种现象称为钩状效应 (hook effect), 可出现假阴性结果。可将待检

标本稀释后再做或提高抗体试剂的亲合力、浓度、纯度等以消除钩状效应。

5.1.3 间接法

5.1.3.1 间接法的原理

标本中的待检抗体与固相抗原结合后，利用酶标与抗抗体（抗人 Ig）进行检测。

测定抗体的间接 ELISA 法。病原体或其他外源大分子物质进入机体后都可能刺激机体产生相应的抗体，所以可以通过检测某种病原体的相应抗体来判断机体是否曾经被某种病原体所感染，达到诊断的目的。

此法是测定抗体最常用的方法。该方法首先将已知定量的抗原（如某个病原体的蛋白质）吸附（也称包被）于固相载体（微孔滴定板的微孔内），加入待检测的样品（如病人血清含相应抗体为第一抗体）与之结合。温育反应一定时间。此时，如果血清中含有该病原体蛋白质的抗体（第一抗体）时，则该抗体与固相抗原发生特异性结合，然后，加入酶标抗球蛋白抗体（第二抗体即酶标抗抗体，如血清为人血清，则加入抗人抗体的抗体），该酶标抗抗体就与已和固相抗原结合的第一抗体结合，形成抗原—抗体—酶标第二抗体的复合物，同样保温、洗涤后加入无色的酶底物，保温一定时间进行酶促反应，酶催化底物显色，观察反应后颜色的有无及深浅来判断反应结果。若有颜色反应，说明检测样品中含有相应的抗体，所以是阳性反应。根据颜色深浅，还可以进行定量分析。反之，若无色，说明样品中无相应抗体，为阴性反应。

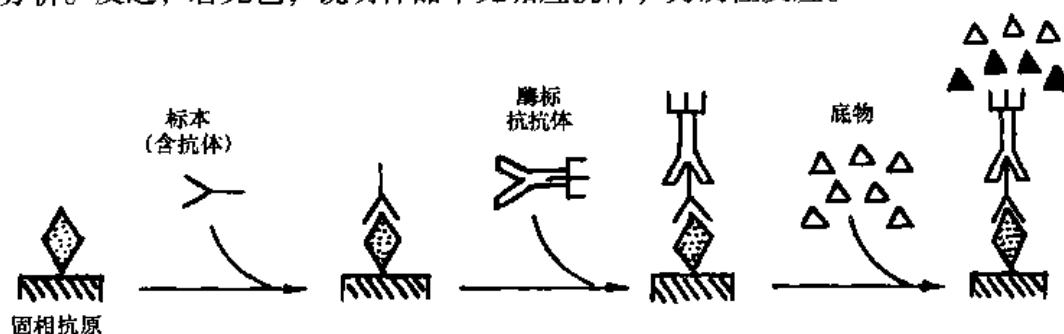


图 5-3 间接法示意图

5.1.3.2 间接法的操作步骤

①包被固相载体：用已知抗原包被固相载体，形成固相抗原，洗涤除去未结合的抗原和杂质；

②封闭：用高浓度无关蛋白封闭，阻止待检血清中非特异 IgG 吸附固相；

③加待检标本：经过温育（37℃ 2h），使相应抗体与固相抗原结合。洗涤，除去无关的物质；

④加酶标抗抗体或酶标 SPA：再次温育（37℃ 2h），使酶标抗抗体与固相载体上抗原抗体复合物结合，形成固相抗原—待检抗体—酶标抗抗体（酶标 SPA）复合物；洗涤，除去未结合的酶标抗抗体；

⑤加底物显色：温育（37℃ 30min）；

⑥终止反应判定结果，目测定性或酶标仪测光密度进行定量分析。

5.1.3.3 间接法的方法评价

间接法是检测抗体最常用的方法，应用广泛，敏感，应用一种酶标抗抗体可以用于检测一个种系内各种抗原的相应抗体。

5.1.3.4 应用

间接 ELISA 法主要用于抗体的检测。运用此法可以检测：人类免疫缺陷病毒 HIV（-1/2）抗体，丙型肝炎病毒抗体（抗 HCV），戊肝抗体（抗 HEV），庚肝抗体（抗 HGV）等。以检测丙型肝炎病毒抗体为例举例如下。

检测丙型肝炎病毒抗体的适应症为：用于检测血清或血浆中丙型肝炎抗体，供献血员筛选及临床辅助诊断。其原理为：将 HCV 结构区核心蛋白和非结构区蛋白的混合抗原包被于微孔条，样品加到固相抗原板上，当样品中含有 HCV 特异性抗体（第一抗体时），则该抗体与固相抗原发生特异性结合，然后加入过氧化物酶标记的抗人（IgG），则该抗体与固相抗原发生特异性结合，然后加入过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体（第二抗体），该酶标抗体就与已和固相抗原结合的第一抗体结合，形成抗原-抗体-酶标第二抗体的复合物，再加底物，酶催化底物显色。在阴性反应中，因样品中不含抗 HCV 的抗体，酶标抗体不能与之结合，故无颜色变化。

5.1.4 双抗原夹心法

5.1.4.1 双抗原夹心法的原理

同双抗体夹心法原理类似，是以包被抗原和酶标抗原检测待检抗体，反应层次为包被抗原-待检抗体-酶标抗原-底物。

5.1.4.2 双抗原夹心法的操作步骤

①将已知抗原包被固相载体，形成固相抗原。洗涤除去未结合物。

②加入待检标本，温育，使待检抗体和固相抗原结合。洗涤除去未结合物。

③加入酶标抗原，温育，形成固相抗原-待检抗体-酶标抗原复合物。洗涤除去未结合物。

④加底物显色。

5.1.4.3 双抗原夹心法的应用

以乙型肝炎病毒表面抗体诊断试剂盒，用于人血清（浆）中的抗 HBs 检测，梅毒螺旋体抗体试剂盒用于检测血清中梅毒螺旋体抗体 IgG 和 IgM 等。

ELISA 的工作原理主要是利用了第一抗体与目标分子的特异性结合。假定目标分子是一种蛋白，那么要得到可用于检测的抗体，则首先需要纯化出这种蛋白质，然后用纯化的蛋白免疫动物，一般都是免疫兔子；在免疫过的兔子的血清（serum）中就会产生

不同的抗体，每一种抗体都能够特异地与目标分子上的不同的抗原决定簇（epitope）相结合，这种抗体混合物称为多克隆抗体。对于诊断检查来说，使用多克隆抗体有两大缺点：①同一抗体混合物中不同抗体的含量会有差异，而且每次制备的抗体之间量也会有差异；②无法区分相类似的目标分子，例如：如果病原分子与非病原分子之间只相差一个抗原决定簇，这时多克隆抗体就无法区分，因为在 ELISA 检测中都会发生颜色变化。因此要对某一目标分子进行诊断检查，最好是采用只与某一单个的抗原决定簇结合的抗体蛋白，即单克隆抗体。由于单克隆抗体只结合抗原上某一单一的位置，因此采用单克隆抗体进行 ELISA 检测，其特异性就比多克隆抗体要高得多。目前人们已经成功地制备了许多不同化合物和病原的单克隆抗体用于免疫诊断。

表 5-1 已制备的单克隆抗体的化合物和病原

种类	具体成员
多肽激素	绒毛膜促性腺激素（chorionic gonadotropin hormone） 促甲状腺素（thyroid-stimulating hormone） 生长激素（growth hormone） 黄体生成素（luteinizing hormone） 促乳素（prolactin） 促卵泡激素（follicle-stimulating hormone）
肿瘤标记	癌胚抗原（carcino-embryonic antigen） 前列腺特异性抗原（prostate-specific antigen） 白细胞介素 2 受体（interleukin-2 receptor） 表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor）
细胞因子	白细胞介素 1~8（interleukin 1~8） 集落刺激因子（colony-stimulating factor）
药品监控化合物	茶碱（theophylline） 环孢素（cyclosporin） 庆大霉素（gentamicin）
传染病原	衣原体（chlamydia） 军团菌（Legionella） 疱疹（herpes） 艾滋病（HIV） 病毒性风疹（rubella） 乙型肝炎（hepatitis B）
其他	甲状腺素（thyroxine） Tan 蛋白（tan protein） 维生素 B12（vitamin B12） 铁蛋白（ferritin） 血纤蛋白降解产物（fibrin degradation product）

5.1.5 竞争抑制法

此法可用于抗原和半抗原的定量测定，也可用于测定抗体。以测定抗原为例。

5.1.5.1 竞争抑制法的原理

小分子抗原或半抗原缺乏可作双抗体夹心法的2个或2个以上位点，可用竞争法测定。其原理是将待检抗原和酶标抗原与相应固相抗体竞争结合，标本中抗原越多，与固相抗体结合的酶标抗原越少，与底物反应生成的颜色越浅，因此根据颜色深浅可定量测定。

将特异性抗体吸附于固相载体；加入待测抗原和一定量的酶标已知抗原，使二者竞争与固相抗体结合；经洗涤分离，最后结合于固相的酶标抗原与待测抗原含量呈负相关。

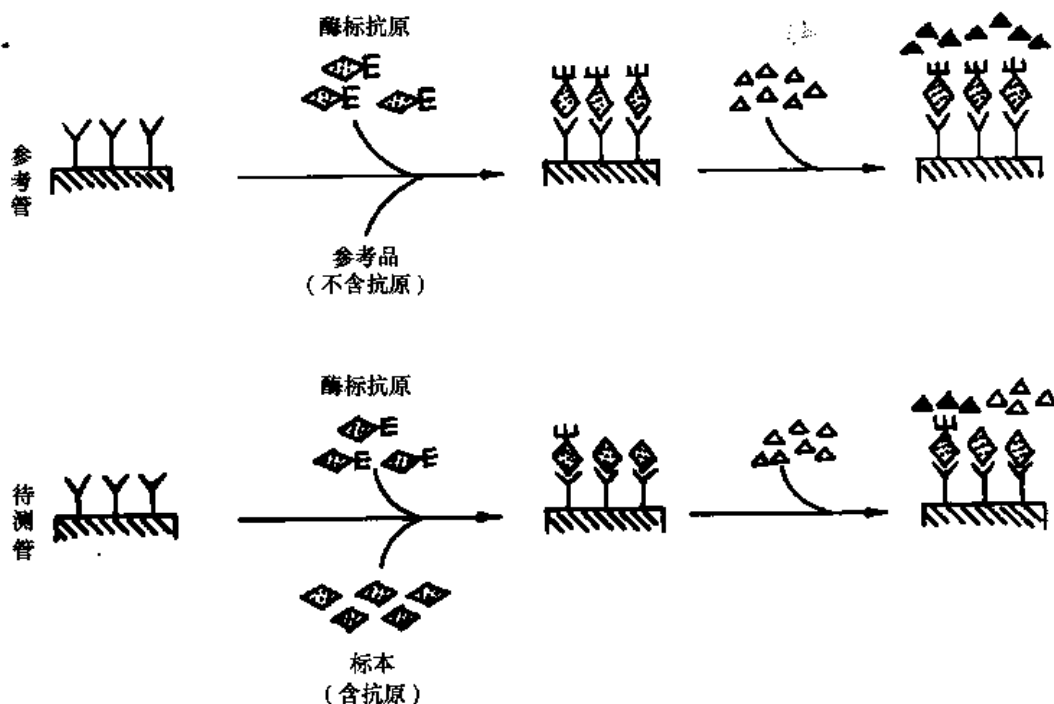


图 5-4 竞争抑制法示意图

5.1.5.2 竞争抑制法的操作步骤

①用已知特异性抗体包被固相载体（微孔板），形成固相抗体，洗涤除去未结合物；

②测定孔加入待检样品和一定量的酶标抗原，经过温育，使两者与固相抗体竞争结合；对照孔只加一定量酶标抗原与固相抗体直接结合。分别洗涤，除去未结合到固相上的游离酶标抗原及其他未结合物；

③加底物显色，对照孔由于只加酶标抗原，与固相抗体充分结合，故分解底物显色深；测定孔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。即颜色深浅与待测抗原量成反比。分别测定各孔的光密度（OD）值，根据对照孔与测定孔 OD 值之比，计算标本中待测抗原含量。

同理，也可用固相抗原和酶标抗体做试剂，使固相抗原和标本中的待检抗原竞争结合酶标抗体。待检抗原竞争抑制酶标抗体和固相抗原结合，即待检抗原越多，显色越浅。

测定抗体的竞争法与测定抗原的竞争法类似，是包被已知抗原，让待检抗体与酶标抗体与之竞争结合，加底物显色。待检抗体越多，颜色越浅；待检抗体越少，颜色越深。

5.1.5.3 竞争抑制法的应用

抗 HBc，抗 pres2，抗 HAV，抗 HDV 等

5.1.6 IgM 抗体捕获法

5.1.6.1 IgM 抗体捕获法的原理

血清中针对某些抗原的特异性 IgM 常和非特异性 IgM，以及特异性 IgG 同时存在，后者会干扰 IgM 的测定。捕获法则较好地解决了上述问题，其原理是先将针对 IgM 的第二抗体（如羊抗人 IgM μ 链抗体）连接于固相载体，用以结合（“捕获”）样品中所有 IgM（特异或非特异），洗涤出去 IgG 等无关物质，然后加入特异抗原与待检 IgM 结合；再加入抗原特异的酶标抗体，最后形成固相第二抗体 - IgM - 抗原 - 酶标抗体复合物，加酶底物作用显色后，即可对样品中待检 IgM 是否存在及其含量进行测定。蓝色产物产生表示该标本抗 - HBc - IgM 为阳性。

5.1.6.2 IgM 抗体捕获法的应用

此方法主要用于检测各类早期感染的特异性 IgM。如：抗 HBc IgM 抗 HAV IgM，抗 HEV IgM 等。

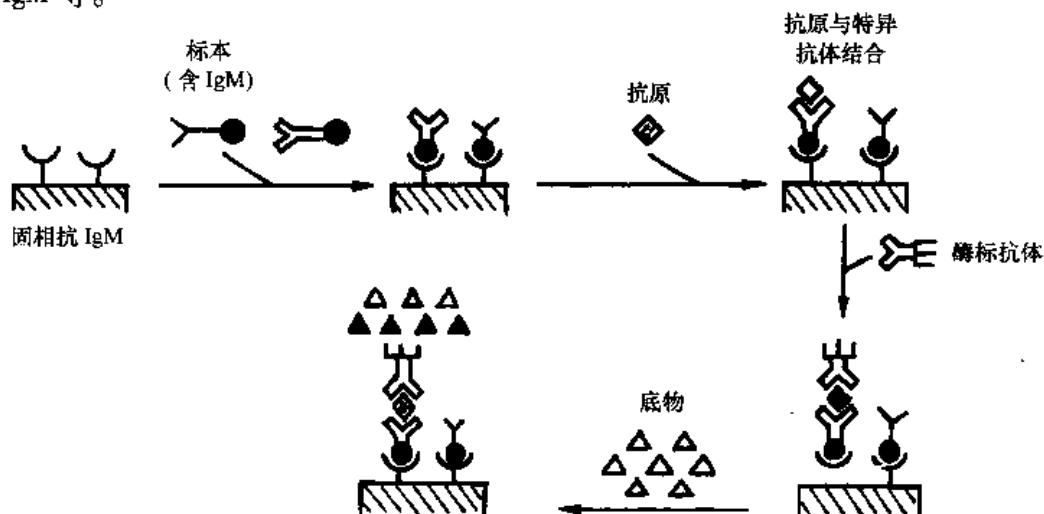


图 5-5 IgM 抗体捕获法原理示意图

5.1.7 应用亲和素和生物素的 ELISA

亲和素是一种糖蛋白,可由蛋清中提取分子量为 60kD,每个分子由 4 个亚基组可以 4 个生物素分子紧密结合。现在使用更多的是从链霉菌中提取的链霉亲和素(streptavidin)。生物素(biotin)又称维生素 H,分子量为 244.31,存在于蛋黄中。用化学方法制成的衍生物,生物素-羟基琥珀亚胺酯(biotin-hydroxysuccinimide ester, BNHS)可与蛋白质、糖类和酶等多种类型的大小分子形成生物素化的产物。亲和素与生物素的结合,虽不属免疫反应,但特异性强,亲和力大,两者一经结合就极为稳定。由于 1 个亲和素分子有 4 个生物素分子的结合位点,形成一种类似晶格的复合体。因此把亲和素和生物素与 ELISA 藕联起来,就可大大提高其灵敏度。

生物素系统在 ELISA 中的应用有多种形式,可用于间接包被,亦可用于终反应放大。可以在固相上先预包被亲和素,用吸附法包被固相的抗体或抗原与生物素结合,通过亲和素生物素反应而使生物素化的抗体或抗原固相化。这种方法不仅可以使其结合点充分暴露。另外,在常规免疫吸附测定中的酶标记抗体也可用生物素化的抗体代替,然后连接亲和素与酶的结合物,以放大反应信号。

5.2 酶联免疫诊断试剂的组成

在酶联免疫吸附法中有 3 个必要的条件,就是已经包被过的板、酶结合物和底物,ELISA 还需要包被抗原或抗体的微孔板、阳性对照品、阴性对照品、酶结合物、底物及标本的稀释液和反应终止液等试剂。所使用的材料主要指固相载体——微孔板。

5.2.1 固相载体

可作为 ELISA 固相载体的物质很多,例如聚乙烯、聚丙烯酰胺、琼脂糖、玻璃和硅橡胶等,但现已不多用。理想的 ELISA 板应该是吸附性能好、空白值低、透明度高、各孔的大小和性能相同。目前最常用的是聚苯乙烯,它有较强的吸附蛋白质的性能,并且不损害蛋白质的免疫活性,不影响 ELISA 过程中的免疫反应和显色反应,价格低廉,来源容易,因此被普遍采用。

5.2.1.1 固相载体的特征

ELISA 载体的形状主要有 3 种:微量滴定板、小珠和小试管。以微量滴定板最为常用,专用于 ELISA 的产品称为 ELISA 板,国际上标准的微量滴定板为 8×12 的 96 孔式。为便于做少量标本的检测,有制成 8 联孔条或 12 联孔条的,放入座架后,大小与标准 ELISA 板相同。ELISA 板的特点是可以同时进行大量标本的检测,并可在特制的比色计上迅速读出结果。现在已有多种自动化仪器用于微量滴定板型的 ELISA 检测,包括加样、洗涤、保温、比色等步骤,对操作的标准化极为有利。聚苯乙烯经射线照射后,其吸附性能特别是对免疫球蛋白的吸附性能增加,应用于双抗体夹心法可使固相上抗体量增多,但用于间接法测抗体时空白值较大。

良好的 ELISA 板应该是吸附性能好, 空白值低, 孔底透明度高, 各板之间、同一板各孔之间性能相近。聚苯乙烯 ELISA 板由于原料的不同和制作工艺的差别, 各种产品的质量差异很大, 因此, 每一批号的 ELISA 板在使用前须事先检查其性能。常用的检查方法为: 以一定浓度的人 IgG (一般为 10ng/mL) 包被 ELISA 板各孔, 洗涤后每孔内加入适当稀释度的酶标抗人 IgG 抗体, 保温后洗涤, 加底物显色, 终止酶反应后, 分别测每孔溶液的吸光度。控制反应条件, 使各孔读数在吸光度 0.8 左右。计算全部读数的平均值。所有单个读数与全部读数的均数之差, 应小于 10%。

与聚苯乙烯类似的塑料是聚氯乙烯。作为 ELISA 固相载体, 聚氯乙烯的特点为质软板薄, 可剪裁, 价廉, 但光洁度不如聚苯乙烯板, 孔底亦不如聚苯乙烯平整。聚氯乙烯对蛋白质的吸附性能比聚苯乙烯高, 但空白值也略高。

为比较不同固相在某一 ELISA 测定中的优劣, 可应用如下的试验: 用其他免疫学测定方法选出一个典型的阳性标本和阴性标本, 将它们进行一系列稀释后, 在不同的固相载体上按预定的 ELISA 操作步骤进行测定, 然后比较结果。在哪一种载体上阳性结果与阴性结果差别最大, 这种载体就是这一 ELISA 测定项目的最合适的固相载体。

在 ELISA 中, 用作固相载体的小珠一般为直径 0.6cm 的圆珠, 表面经磨砂处理后吸附面积大大增加。吸附面积的增大即意味着固相抗原或抗体量的增加。再者, 球型小珠的表面弧度更有利于吸附的抗原决定簇或抗体结合位点的暴露面处于最佳反应状态, 因此珠式 ELISA 的反应往往更为灵敏。小珠的另一特点是更易于使洗涤彻底, 使用特殊的洗涤器, 使小珠在洗涤过程中滚动淋洗, 其洗涤效果远较板孔的浸泡式为好。但由于磨砂工艺的难度较大, 小珠的均一性较差。

小试管作为固相载体也有较大的吸附表面, 而且标本的反应量也相应增加。板式及珠式 ELISA 的标本量一般为 $100 \sim 200\mu\text{L}$, 而小试管可根据需要加大反应体积, 标本反应量的增加有助于试验敏感性的提高。小试管还可以当做比色杯, 最后直接放入分光光度计中比色。

也有应用聚苯乙烯胶乳或其他材料制成的微粒作为 ELISA 固相载体的。其优点是表面积大, 反应在悬液中进行, 其速率与液相反应近似。以含铁的磁性微粒作为 ELISA 固相载体, 反应后用磁铁的吸引进行分离, 洗涤方便, 试剂盒一般均配以特殊仪器。

5.2.1.2 包被的方式

将抗原或抗体固定的过程称为包被 (coating)。换言之, 包被即是抗原或抗体结合到固相载体表面的过程。蛋白质与聚苯乙烯固相载体是通过物理吸附结合的, 靠的是蛋白质分子结构上的疏水基团与固相载体表面的疏水基团间的作用。这种物理吸附是非特异性的, 受蛋白质的分子量、等电点、浓度等的影响。载体对不同蛋白质的吸附能力是不相同的, 大分子蛋白质较小分子蛋白质通常含有更多的疏水基团, 故更易吸附到固相载体表面。IgG 对聚苯乙烯等固相具有较强的吸附力, 其联结多发生在 Fc 段上, 抗体结合点暴露于外, 因此抗体的包被一般均采用直接吸附法。蛋白质抗原大多也可采用与抗体相似的方法包被。当抗原决定簇存在于或邻近于疏水区域时, 抗原与固相载体的直接吸附可使抗原决定簇不能充分暴露, 在这种情况下, 直接包被效果不佳, 可以采用间

接的捕获包被法,即先将针对该抗原的特异抗体作预包被,其后通过抗原抗体反应使抗原固相化。此间接结合在固相上的抗原远离载体表面,其抗原决定簇也得以充分暴露。间接包被的抗原经固相抗体的亲和层析作用,包被在固相上的抗原纯度大大提高,因此含杂质较多的抗原也可采用捕获包被法,试验的特异性、敏感性均由此得以改善,重复性亦佳。间接包被的另一优点是抗原用量少,仅为直接包被的1/10乃至1%。不易吸附在聚苯乙烯载体上的非蛋白质抗原可采用特殊的包被方式。例如,在检测抗DNA抗体时,需用DNA作为包被抗原,而普遍的固相载体一般不能直接与核酸结合。可将聚苯乙烯板先经紫外线照射(例如30W紫外灯,75cm照射12h),以增加其吸附性能。固相载体先用碱性蛋白质,如聚赖氨酸、鱼精蛋白等作预包被,也可提高核酸的结合力。也可用亲和素生物素系统作间接包被,即用亲和素先包被载体,然后加入生物素化的DNA,这种包被方法均匀、牢固,已扩大应用于各种抗原物质的定量测定。

脂类物质无法与固相载体结合,可将其在有机溶剂(例如乙醇)中溶解后加入ELISA板孔中,开盖置冰箱过夜或冷风吹干,待酒精挥发后,让脂质自然干固在固相表面。抗心磷脂抗体的ELISA试剂一般采用这种包被方式。

5.2.1.3 包被用抗原

用于包被固相载体的抗原按其来源不同可分为天然抗原、重组抗原和合成多肽抗原3大类。

天然抗原可取自动物组织、微生物培养物等,须经提取纯化才能作包被用。如HBsAg可以从携带者的血清中提取,一般的细菌和病毒抗原可以从其培养物中提取,蛋白成分抗原可从富含此抗原的材料中提取等(例如AFP从脐带血或胎肝中提取)。

重组抗原是抗原基因在质粒体中表达的蛋白质抗原,多以大肠杆菌或酵母菌为质粒体。重组抗原的优点是除工程菌成分外,其他杂质少,而且无传染性,但纯化技术难度较大。以大肠杆菌为质粒体的重组抗原如不能充分除大肠杆菌成分,用于ELISA,在反应中可出现假阳性,因不少受检者受大肠杆菌感染而在血清中存在抗大肠杆菌抗体。重组抗原的另一特点是能用基因工程制备某些无法从天然材料中分离的抗原物质。例如丙型肝炎病毒(HCV)尚不能培养成功,而且丙肝病人血清中HCV抗原含量极微。目前检测抗HCV ELISA中所用包被抗原大多为根据HCV的基因克隆表达而制备的重组抗原。在传染病诊断中,不少重组抗原如HBsAg、HBeAg和HIV抗原等均在ELISA中取得应用。

合成多肽抗原是根据蛋白质抗原分子的某一抗原决定簇的氨基酸序列人工合成的多肽片段。多肽抗原一般只含有一个抗原决定簇,纯度高,特异性也高,但由于分子量太小,往往难于直接吸附于固相上。多肽抗原的包被一般需先使其与无关蛋白质如牛血清白蛋白(BSA)等偶联,借助于偶联物与固相载体的吸附,间接地结合到固相载体表面。应用多肽抗原的另一注意点为它仅能检测与其相应的抗体。一种蛋白质抗原往往含有多个不同的能引起抗体产生的决定簇,因此在受检血清中的其他抗体就不能与该多肽抗原发生反应。另外,某些微生物发生变异时往往发生抗原结构变化,在这种情况下,用个别多肽抗原进行包被可引起其他抗体的漏检。

5.2.1.4 包被用抗体

包被固相载体的抗体应具有高亲和力和高特异性，可取材于抗血清或含单克隆抗体的腹水或培养液。如免疫用抗原中含有杂质（即便是极微量的），在抗血清中将出现杂抗体，必须除去（可用吸收法）后才能用于 ELISA，以保证试验的特异性。抗血清不能直接用于包被，应先提取 IgG，通常采用硫酸铵盐析和 Sephadex 凝胶过滤法。一般经硫酸铵盐析粗提的 IgG 已可用于包被，高度纯化的 IgG 性质不稳定。如需用高亲和力的抗体包被以提高试验的敏感性，则可采用亲和层析法以除去抗血清中含量较多的非特异性 IgG。腹水中单抗的浓度较高，特异性亦较强，因此不需要作吸收和亲和层析处理，一般可将腹水作适当稀释后直接包被，必要时也可用纯化的 IgG。应用单抗包被时应注意，一种单抗仅针对一种抗原决定簇，在某些情况下，用多种单抗混合包被，可取得更好的效果。

5.2.1.5 包被的条件

包被用抗原或抗体的浓度、包被的温度和时间、包被液的 pH 值等应根据试验的特点和材料的性质而选定。抗体和蛋白质抗原一般采用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液作为稀释液，也有用 pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液及 pH 值为 7~8 的 Tris-HCL 缓冲液作为稀释液的。通常在 ELISA 板孔中加入包被液后，在 4~8℃ 冰箱中放置过夜，37℃ 中保温 2h 被认为具有同等的包被效果。包被的最适当浓度随载体和包被物的性质可有很大的变化，每批材料需通过实验与酶结合物的浓度协调选定。一般蛋白质的包被浓度为 100ng/mL ~ 20μg/mL。

5.2.1.6 封闭

封闭（blocking）是继包被之后用高浓度的无关蛋白质溶液再包被的过程。抗原或抗体包被时所用的浓度较低，吸收后固相载体表面尚有未被占据的空隙，封闭就是让大量不相关的蛋白质充填这些空隙，从而排斥在 ELISA 其后的步骤中干扰物质的再吸附。封闭的手续与包被相类似。最常用的封闭剂是 0.05% ~ 0.5% 的牛血清白蛋白，也有用 10% 的小牛血清或 1% 明胶作为封闭剂的。脱脂奶粉也是一种良好的封闭剂，其最大的特点是价廉，可以高浓度使用（5%）。高质量的速溶食用低脂奶粉即可直接当做封闭剂使用，但由于奶粉的成分复杂，而且封闭后的载体不易长期保存，因此在试剂盒的制备中较少应用。

封闭是否必要，取决于 ELISA 的模式及具体的实验条件。并非所有的 ELISA 固相均需封闭，封闭不当反而会使阴性本底增高。一般说来，双抗体夹心法，只要酶标记物是高活性的，操作时洗涤彻底，不经封闭也可得到满意的结果。特别是用单抗腹水直接包被时，因其中大量非抗体蛋白在包被时同样也吸附在固相表面，业已起到了类似封闭剂的作用，但在间接法测定中，封闭一般是不可少的。包被好的 ELISA 板干燥后放入密封袋或锡袋中，在低温可保存数月。

5.2.2 ELISA—酶结合物

酶结合物即酶标记的抗体（或抗原），是 ELISA 中最关键的试剂。良好的酶结合物应该是既有酶的催化活性，也保持了抗体（或抗原）的免疫活性。结合物中酶与抗体（或抗原）之间有恰当的分子比例，在结合试剂中应尽量不含有或少含有游离的（未结合的）酶或游离的抗体（或抗原）。此外，酶结合物尚要有良好的稳定性。

5.2.2.1 酶

用于 ELISA 的酶应符合以下要求：纯度高，催化反应的转化率高，专一性强，性质稳定，来源丰富，价格不贵，制备成酶结合物后仍继续保留它的活性部分和催化能力。最好在受检标本中不存在相同的酶。另外，它的相应底物易于制备和保存，价格低廉，有色产物易于测定等。在 ELISA 中，常用的酶为辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）和碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）。在少数商品 ELISA 试剂中，应用的酶尚有葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶和脲酶等。

国产 ELISA 试剂一般都用 HRP 制备结合物。HRP 是一种糖蛋白，含糖量约为 18%，分子量为 44000kD，是一种复合酶，由主酶（酶蛋白）和辅基（亚铁血红素）结合而成，是一种卟啉蛋白质。主酶无色糖蛋白在 275nm 波长处有最高吸收峰，辅基是深棕色的含铁卟啉环，在 403nm 波长处有最高吸收峰。HRP 的纯度用 RZ（Reinheit Zahl，德文，意为纯度数）表示，是 403nm 的吸光度与 280nm 吸光度之比，高纯度的 HRP 的 $RZ \geq 3.0$ 。

HRP 除符合上述的 ELISA 中标记酶的要求外，更有价格低廉和性质较稳定的特点。值得注意的是，在选用酶制剂时，除其纯度 RZ 外，更应注意酶的活力。高纯度的酶如保存不当，活力也会降低。酶制剂的活力以所含的酶活力单位表示，可用对底物作用后生成产物量的测定进行试验。

国外很多 ELISA 试剂采用碱性磷酸酶（AP）作为标记酶。常用的 AP 有两个来源，分别从大肠杆菌和小牛肠膜中提取。不同来源的酶生化特性略不相同，从大肠杆菌中提取的 AP 分子量为 80000kD，酶作用的最适合 pH 值为 8.0；用小牛肠膜中提取的 AP 分子量为 100000kD，最适 pH 值为 9.6。在 ELISA 中，AP 系统的敏感度一般高于 HRP 系统，空白值也较低，但 AP 价格昂贵，制备酶结合物所得的收率也较 HRP 低。

5.2.2.2 抗原和抗体

制备结合物时所用抗体一般均为纯度较高的 IgG，以免在与酶联结时其他杂蛋白的干扰。最好用亲和层析纯的抗体，这样全部酶结合物均具有特异的免疫活性，可以在高稀释度进行反应，实验结果本底干净。如用 $F(ab)_2$ 进行标记，则更可避免标本中 RF 的干扰。在 ELISA 中用酶标抗原的模式不多，总的要求是抗原必须是高纯度的。

5.2.2.3 ELISA—酶结合物的制备

酶标记抗体的制备方法主要有两种：戊二醛交联法和过碘酸盐氧化法。

(1) 戊二醛交联法

戊二醛是一种双功能团试剂,它可以使酶与蛋白质的氨基通过它而联结。碱性磷酸一般用此法进行标记。交联方法分一步法、两步法两种。在一步法中戊二醛直接加入酶与抗体的混合物中,反应后即得酶标记抗体。

ELISA 中常用的酶一般都用此法交联。它具有操作简便、有效(结合率达 60% ~ 70%)和重复性好等优点。缺点是交联反应是随机的,酶与抗体交联时分子间的比例不严格,结合物的大小也不均一,酶与酶,抗体与抗体之间也有可能交联,影响效果。在两步法中,先将酶与戊二醛作用,透析除去多余的戊二醛后,再与抗体作用而形成酶标抗体。也可先将抗体与戊二醛作用,再与酶联结。两步法的产物中绝大部分的酶与蛋白质是以 1:1 的比例结合的,较一步法的酶结合物更有助于本底的改善以提高敏感度,但其偶联的有效率较一步法低。

(2) 过碘酸盐氧化法

本法只适用于含糖量较高的酶。辣根过氧化物酶的标记常用此法。反应时,过碘酸钠将 HRP 分子表面的多糖氧化为醛基很活泼,可与蛋白质上的氨基形成 Schiff 氏碱而结合。酶标记物按克分子比例联结,其最佳比例为:酶:抗体 = 1 ~ 2:1。此法简便有效,一般认为是 HRP 最可取的标记方法,但也有人认为所有试剂较为强烈,各批实验结果不易重演。

按以上方法制备的酶结合物一般都混有未结合物的酶和抗体。理论上,结合物中混有的游离酶一般不影响 ELISA 中最后的酶活性测定,因经过彻底洗涤,游离酶可被除去,并不影响最终的显色。但游离的抗体则不同,它会与酶标抗体竞争相应的固相抗原,从而减少了结合到固相上的酶标抗体的量。因此制备的酶结合物应予纯化,去除游离的酶和抗体后用于检测,效果更好。纯化的方法很多,分离大分子化合物的方法均可应用。硫酸铵盐析法最为简便,但效果并不理想,因为此法只能去除留在上清液中的游离酶,但相当数量的游离抗体仍与酶结合物一起沉淀而不能分开。用离子交换层析或分子筛分离更为可取,高效液相层析法可将制备的结合物清晰地分成 3 个部分:游离酶、游离抗体和纯结合物而取得最佳的分离效果,但费用较贵。

结合物制得后,在用作 ELISA 试剂前尚需确定其适当的工作浓度。使用过浓的结合物,既不经济,又可使本底增高;结合物的浓度过低,则又影响检测的敏感性。所以必须对结合物的浓度予以选择。最适的工作浓度就是指结合物稀释至一定浓度时,能维护一个低的本底,并获得测定的最佳灵敏度,达到最合适的测定条件和测定费用的节省。就酶标抗体本身而言,它的有效工作浓度是指与其相应抗原包被的载体作试验时,能得到阳性反应的最高稀释度。例如某一 HRP:抗人 IgG 制剂标明的工作浓度为 1:5000,表示该制剂经 1:5000 稀释后,在与人 IgG 包被的固相作 ELISA 试验时,将发生阳性反应。但在用于具体的 ELISA 检测中,酶标抗体的最适工作浓度受到固相载体的性质、包被抗原或抗体的纯度以及整个检测系统如标本、反应温度和时间等的影响,因此必须在实际测定条件下进行“滴配”选择能达到高敏感度的最大稀释度作为试剂盒中的工作浓度。

5.2.2.4 ELISA—酶结合物的保存

酶标抗体中的酶和抗体均为生物活性物质，保存不当，极易失活。高浓度的结合物较为稳定，冰冻干燥后可在普通冰箱中保存1年左右，但冻干过程中引起活力的减低，而且使用时需经复溶，颇为不便。结合物溶液中加入等体积的甘油可在低温冰箱或普通冰箱的冰格中较长时间保存。早期的ELISA试剂盒中的结合物一般均按以上两种形式供应，配制稀释液，临用时按标明的稀释度稀释成工作液。现在较先进的ELISA试剂盒均已用合适的缓冲液配成工作液，使用时不需再行稀释，在4℃~8℃保存期可达6个月。由于蛋白质浓度较低，结合物易失活，需加入蛋白保护剂。另外再加入抗生素（例如庆大霉素）和防腐剂（HRP结合物加硫柳汞，AP结合物可加叠氮钠），以防止细菌生长。

5.2.2.5 ELISA—酶结合物的稀释液

用于稀释高浓度的结合物以配成工作液。为避免结合物在反应中直接吸附在固相载体上，在稀释缓冲液中常加入高浓度的无关蛋白质（例如1%牛血清白蛋白），通过竞争以抑制结合物的吸附。一般还加入具有抑制蛋白质吸附于塑料表面的非离子型表面活性剂，如吐温-20，0.05%的浓度较为适宜。在间接测定抗体时，血清标本须稀释后进行测定，也可应用这种稀释液。

5.2.3 ELISA—酶的底物

ELISA—酶的底物系统见表5-2。

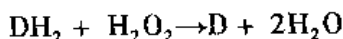
表5-2 ELISA中常用的酶—底物系统

酶	底物	显色反应	测定波长/nm
HRP	邻苯二胺	橘红色	492 ^① , 460 ^②
	邻联甲苯胺	蓝色	425
	邻联茴香胺	粉红色	460
	5-氨基水杨酸	棕色	449
	TMB	棕色	450
	A-萘酚	红色	沉淀
	ABTS	蓝绿色	642
碱性磷酸酶	3, 3'-二氨基联苯胺	深褐色	沉淀
	对硝基磷酸苯酯	黄色	405
	酚酞磷酸酯	红色	530
β-D 半乳糖苷酶	邻硝基-β-D 半乳糖苷	黄色	405
	4-甲基伞形酮-β-D 半乳糖苷	—	荧光
葡萄糖氧化酶	葡萄糖 + 甲硫酸吩嗪 + 噻唑蓝	深蓝色	420
	ABTS + HRP + 葡萄糖	黄色	405

注：①终止剂为2mol/L 硫酸，②终止剂为2mol/L 柠檬酸

5.2.3.1 HRP 的底物

HRP 催化过氧化物的氧化反应, 最具代表性的过氧化物为 H_2O_2 , 其反应式如下:



上式中, DH_2 为供氢体, H_2O_2 为受氢体。在 ELISA 中, DH_2 一般为无色化合物, 经酶作用后成为有色的产物, 以便作比色测定。常用的供氢体有邻苯二胺 (O-phenylenediamine, OPD)、四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB) 和 ABTS [2, 2'-azino-di-(3-ethylbenziazobine sulfonate-6)]。OPD 氧化后的产物呈橙红色, 用酸终止酶反应后, 在 492nm 处有最高吸收峰, 灵敏度高, 比色方便, 是 HRP 结合物最常用的底物。OPD 本身难溶于水, OPD-HCL 为水溶性。曾有报道 OPD 有致突变性, 操作时应予注意。OPD 见光易变质, 与过氧化氢混合成底物应用液后更不稳定, 须现配现用。在试剂盒中, OPD 和 H_2O_2 一般分成二组分, OPD 可制成一定量的粉剂或片剂形式, 片剂中含有发泡助溶剂, 使用更为方便。过氧化氢则配入底物缓冲液中, 有制成易保存的浓缩液, 使用时用蒸馏水稀释。先进的 ELISA 试剂盒中则直接配成含保护剂的工作浓度为 0.02% H_2O_2 的应用液, 只需加入 OPD 后即可作为底物应用液。TMB 经 HRP 作用后共产物显蓝色, 目视对比鲜明。TMB 性质较稳定, 可配成溶液试剂, 只需与 H_2O_2 溶液混和即成应用液, 可直接作底物使用。另外, TMB 无致癌性等优点, 因此在 ELISA 中应用日趋广泛。酶反应用 HCL 或 H_2SO_4 终止后, TMB 产物由蓝色呈黄色, 可在比色计中定量, 最适吸收波长为 405nm。

ABTS 虽不如 OPD 和 TMB 敏感, 但空白值极低, 也为一些试剂盒所采用。

另一种 HRP 的底物为 3-(4-羟基) 苯丙酸 [3-(4-hydroxy) phenyl propionic acid, HPPA], 经 HRP 作用后, 产物显荧光, 可用荧光光度计测量。用于 ELISA 的优点为可加宽定量测定的线性范围。

HRP 对氢受体的专一性很高, 仅作用于 H_2O_2 、小子分醇的过氧化物和尿素过氧化物 (urea peroxide)。 H_2O_2 应用最多, 但尿素过氧化物为固体, 作为试剂较 H_2O_2 方便、稳定。试剂盒供应尿素过氧化物片剂, 用蒸馏水溶解后, 在底物缓冲液中密闭、低温 (2℃ ~ 8℃) 可稳定 1 年。

5.2.3.2 AP 的底物

AP 为磷酸酯酶, 一般采用对硝基苯磷酸酯 (p-nitrophenylphosphate, p-NPP) 作为底物, 可制成片剂, 使用方便。产物为黄色的对硝基酚, 在 405nm 波长处有吸收峰。用 NaOH 终止酶反应后, 黄色可稳定一段时间。AP 也有发荧光底物 (磷酸 4-甲基伞酮), 可用于 ELISA 作荧光测定, 敏感度较高于用显色底物的比色法。

5.2.4 ELISA 洗涤液

在板式 ELISA 中, 常用的稀释液为磷酸缓冲液或 Tris-HCL 缓冲液, 加入 0.05% Tween-20 可加强去除非特异性反应的作用。一些洗涤仪器设计有特殊的冲洗装置, 用蒸馏水作洗涤液, 同样有彻底洗涤的效果。

5.2.5 ELISA 终止液

常用的 HRP 反应终止液为硫酸, 其浓度按加量及比色液的最终体积而异, 在板式 ELISA 中一般采用 $2 \text{ mol/LH}_2\text{SO}_4$ 。

5.2.6 阳性对照品和阴性对照品

阳性对照品 (positive control) 和阴性对照品 (negative control) 是检验试验有效性的控制品, 同时也作为判断结果的对照, 因此对照品, 特别是阳性对照品的基本组成应尽量与检测标本的组成相一致。以人血清为标本的测定, 对照品最好也为人血清, 因为正常人血清在各种 ELISA 模式中可产生不同程度的本底。由于大量正常人血清较难得到, 国外试剂盒中的对照品多以复钙人血浆 (recalcified human plasma) 为原料, 即在血浆中加入钙离子, 使其中的纤维蛋白质凝固, 除去凝块后所得的液体, 其组成与血清相似。

阴性对照品须先行检测, 确定其中不含待测物质。例如 HBsAg 检测的阴性对照品中不可含 HBsAg, 最好抗 HBs 也是阴性。阳性对照品多以含蛋白保护剂的缓冲液为基质, 其中加入一定量的待检物质, 此量最好在试剂说明书中标明。加入的量应与试剂的敏感度相称, 在测定中得到的吸光值与受检标本吸光值比较, 可对标本中受检物质的量有一个粗略的估计。国外检测 HBsAg 的 ELISA 试剂盒检测敏感度约为 0.5 ng/mL , 阳性对照品中含量约为 10 ng/mL 。在对照品中一般加入抗生素和防腐剂, 以利保存。

5.2.7 待测样品

可用作 ELISA 测定的标本十分广泛, 血清、血浆或其他体液均可作为酶免疫测定法中使用的待测标本, 待测标本的质量液影响最后的测定结果。标本中蛋白质浓度过高会产生非特异性吸附干扰固相包被, 而过分稀释的血清或血浆会影响抗原-抗体之间的免疫学反应, 标本中可能存在的内源性过氧化物酶会干扰显色反应等, 克服或减少这些问题的最简单办法 Shiite 采用适当的稀释办法, 在确定包被液浓度、酶结合物浓度及孵育时间后, 将待测血清标本不同程度的稀释后按 ELISA 生产工艺操作, 比较血清各稀释度反应后测得的吸光度值, 一般取该值为 1.0 时的稀释度为宜。然而, 稀释法虽可减少样品中的蛋白质或其他成分与固相的非特异性结合及降低底物反应时的非特异性显色程度, 但也可能降低酶免疫法的检测的敏感性。

人血清中的自身抗体成分, 特别是类风湿因子 (为 IgM 类抗自身 IgG 抗体) 对双抗体夹心法测定有一定的影响, 是造成假阳性反应的原因之一。测定 HBsAg 或甲胎蛋白 (AFP) 时常出现假阳性结果, 因此, HBsAg 筛选试验阳性者还要用抗-HBs 中和后作确诊试验; 测 AFP 时则在标本中先用已加热聚合的人 IgG 与可能存在的类风湿因子反应, 以消除类风湿因子的干扰作用。保存的血清标本切忌反复冻融, 以免降低血清中的抗体或抗原的免疫活性 (滴度)。分离血清最好是让血液在室温中放置一定时间, 使其自然凝固后将血清析出。血液标本不宜置于 4°C 下凝固, 以防丢失大量的 IgM 及部分 IgG。

5.3 酶免疫的反应条件及质量控制

在酶免疫吸附法操作中,无论是定性还是定量,都必须按照操作规程的方法来制备和测定试剂。主要试剂的制备如 5.2 中所述,其他一般试剂,如包被缓冲液、洗涤液、标本稀释液、结合物稀释液、底物工作液和酶标反应终止液等,配制时也要严格按照操作规程配制,不可掉以轻心。这些试剂最好临用时配制,缓冲液可以在冰箱中短期保存,使用前应观察有无变质。蒸馏水的质量也是至关重要的,最好使用时重新蒸馏,不合格的蒸馏水可使本底升高。所以在酶免疫吸附法操作中,应力求各个环节都规范化、标准化。

5.3.1 标本的采取和保存

可用作 ELISA 测定的标本十分广泛,体液(如血清)、分泌物(唾液)和排泄物(如尿液、粪便)等均可作标本以测定其中某种抗体或抗原成分。有些标本可直接进行测定(如血清、尿液等),有些则需经预处理(如粪便和某些分泌物)。大部分 ELISA 检测均以血清为标本。血浆中除尚含有纤维蛋白原和抗凝剂外,其他成分均同等于血清。制备血浆标本需借助于抗凝剂,而血清标本只要待血清自然凝固、血块收缩后即可取得。除特殊情况外,在医学检验中均以血清作为检测标本。在 ELISA 中血浆和血清可同等应用。血清标本可按常规方法采集,应注意避免溶血,红细胞溶解时会释放出具有过氧化物酶活性的物质,以 HRP 为标记的 ELISA 测定中,溶血标本可能会增加非特异性显色。

血清标本宜在新鲜时检测。如有细菌污染,菌体中可能含有内源性 HRP,也会产生假阳性反应。如在冰箱中保存过久,其中可发生聚合,在间接法 ELISA 中可使本底加深。一般说来,在 5d 内测定的血清标本可放置于 4℃,超过一周测定的需低温保存。冻结血清融解后,蛋白质局部浓缩,分布不均,应充分混匀宜轻缓,避免气泡,可上下颠倒混和,不要在混匀器上强烈振荡。混浊或有沉淀的血清标本应先离心或过滤,澄清后再检测。反复冻融会使抗体效价跌落,所以测抗体的血清标本如需保存作多次检测,宜少量分装冰存。保存血清自采集时就应注意无菌操作,也可加入适当防腐剂。

5.3.2 试剂的准备

按试剂盒说明书的要求准备实验中需用的试剂。ELISA 中用的蒸馏水或去离子水,包括用于洗涤的,应为新鲜的和高质量的。自配的缓冲液应用 pH 计测量校正。从冰箱中取出的试验用试剂应待温度与室温平衡后使用。

5.3.3 加样

在 ELISA 中一般有 3 次加样步骤,即加标本,加酶结合物,加底物。加样时应将所加物加在 ELISA 板孔的底部,避免加在孔壁上,并注意不可溅出,不可产生气泡。

加标本一般用微量加样器,按规定的量加入板孔中。每次加标本应更换吸嘴,以免发生交叉污染,也可用一次性的定量塑料管加样。有此测定(如间接法 ELISA)需用稀释的血清,可在试管中按规定的稀释度稀释后再加样。也可在板孔中加入稀释液,再在其中加入血清标本,然后在微型振荡器上振荡 1min 以保证混和。加酶结合物应用液和底物应用液时可用定量多道加液器,使加液过程迅速完成。

5.3.4 保温

ELISA 属固相免疫测定,抗原、抗体的结合只在固相表面上发生。以抗体包被的夹心法为例,加入板孔中的标本,其中的抗原并不是都有均等的与固相抗体结合的机会,只有最贴近孔壁的一层溶液中的抗原直接与抗体接触。这是一个逐步平衡的过程,因此需经扩散才能达到反应的终点。在其后加入的酶标记抗体与固相抗原的结合也同样如此。这就是为什么 ELISA 反应总是需要一定时间的孵育保温。

孵育常采用的温度有 43℃、37℃、室温和 4℃(冰箱温度)等。37℃ 是实验室中常用的保温温度,也是大多数抗原抗体结合的合适温度。在建立 ELISA 方法作反应动力学研究时,实验表明,两次抗原抗体反应一般在 37℃ 经 1~2h,产物的生成可达顶峰。为加速反应,可提高反应的温度,有些试验在 43℃ 进行,但不宜采用更高的温度。抗原抗体反应 4℃ 更为彻底,在放射免疫测定中多使反应在冰箱中过夜,以形成最多的沉淀。但因所需时间太长,在 ELISA 中一般不予采用。

保温的方式除有的 ELISA 仪器附有特制的电热块外,一般均采用水浴,可将 ELISA 板置于水浴箱中,ELISA 板底应贴着水面,使温度迅速平衡。为避免蒸发,板上应加盖,也可用塑料贴封纸或保鲜膜覆盖板孔,此时可让反应板漂浮在水面上。若用保温箱,ELISA 板应放在湿盒内,湿盒要选用传热性良好的材料如金属等,在盒底垫湿的纱布,最后将 ELISA 板放在湿纱布上。湿盒应先放在保温箱中预温至规定的温度,特别是在气温较低的时候更应如此。无论是水浴还是湿盒温育,反应板均不宜叠放,以保证各板的温度都能迅速平衡。室温温育的反应,操作时的室温应严格限制在规定的范围内,标准室温温度是指 20℃~25℃,但具体操作时可根据说明书的要求控制温育。室温温育时,ELISA 板只要平置于操作台上即可。应注意温育的温度和时间应按规定力求准确。为保证这一点,一个人操作时,一次不宜多于两块板同时测定。

5.3.5 洗涤

洗涤在 ELISA 过程中虽不是一个反应步骤,但也决定着实验的成败。ELISA 就是靠洗涤来达到分离游离的和结合的酶标记物的目的。通过洗涤以清除残留在板孔中没能与固相抗原或抗体结合的物质以及在反应过程中非特异性地吸附于固相载体的干扰物质。聚苯乙烯等塑料对蛋白质的吸附是普遍性的,而在洗涤时又应把这种非特异性吸附的干扰物质洗涤下来。可以说在 ELISA 操作中,洗涤是最主要的关键技术,应引起操作者的高度重视,操作者应严格按照要求洗涤,不得马虎。

洗涤的方式除某些 ELISA 仪器配有特殊的自动洗涤仪外,手工操作有浸泡式和流水冲洗式两种,其工作过程如下。

(1) 浸泡式

①吸干或甩干孔内反应液；②用洗涤液过洗一遍（将洗涤液注满板孔后，即甩去）③浸泡，即将洗涤液注满板孔，放置 30s 摇动，浸泡时间不可随意缩短；④吸干孔内液体。吸干应彻底，可用水泵或真空泵抽吸，也可甩去液体后在清洁毛巾或吸水纸上拍干；⑤重复操作洗涤 3~4 次（或按说明操作）。在间接法中如本底较高，可增加洗涤次数或延长浸泡时间。

微量滴定板多采用浸泡式洗涤法。洗涤液多为含非离子型洗涤剂的中性缓冲液。聚苯乙烯载体与蛋白质的结合是疏水性的，非离子型洗涤剂既含疏水基团，也含亲水基团，其疏水基团与蛋白质的疏水基团借疏水键结合，从而削弱蛋白质与固相载体的结合，并借助于亲水基团和水分子的结合作用，使蛋白质回到水溶液状态，从而脱离固相载体。洗涤液中的非离子型洗涤剂一般是吐温-20，其浓度可在 0.05%~0.2% 之间，高于 0.2% 时，可使包被在固相上的抗原或抗体的吸附减弱而降低试验的灵敏度。

(2) 流水冲洗式

流水冲洗法最初用于小珠载体的洗涤，洗涤液可为蒸馏水甚至可用自来水。洗涤时附接一特殊装置，使小珠在流水冲击下不断地滚动淋洗，持续冲洗 2min 后，吸干液体，再用蒸馏水浸泡 2min，吸干即可。浸泡式犹如盆浴，流水冲洗式则好比淋浴，其洗涤效果更为彻底，且又简便、快速。已有实验表明，流水冲洗式同样也适用于微量滴定板的洗涤。洗涤时设法加大水流量或加大水压，让水流冲击板孔表面，洗涤效果更佳。

5.3.6 显色和比色

5.3.6.1 显色

显色是 ELISA 中的最后一步温育反应，此时酶催化无色的底物生成有色的产物。反应的温度和时间仍是影响显色的因素。在一定时间内，阴性孔可保持无色，而阳性孔则随时间的延长而呈色加强。适当提高温度有助于加速显色进行。在定量测定中，加入底物后的反应温度和时间应按规定力求准确。定性测定的显色可在室温进行，时间一般不需要严格控制，有时可根据阳性对照孔和阴性对照孔的显色情况适当缩短或延长反应时间，及时判断。

OPD 底物显色一般在室温或 37℃ 反应 20~30min 后即不再加深。若再延长反应时间，可使本底值增高。OPD 底物液受光照会自行变色，显色反应应避光进行，显色反应结束时加入终止液终止反应。OPD 产物用硫酸终止后，显色由橙黄色转向棕黄色。

TMB 受光照的影响不大，可在室温中置于操作台上，边反应边观察结果。但为保证实验结果的稳定性，宜在规定的适当时间判断结果。TMB 经 HRP 作用后，约 40min 显色达顶峰，随即逐渐减弱，至 2h 后即可完全消退至无色。TMB 的终止液有多种，叠氮钠和十二烷基硫酸钠（SDS）等酶抑制剂均可使反应终止。这类终止剂尚能使蓝色维持较长时间（12~24h）不褪，是目视判断的良好终止剂。此外，各类酸性终止液则会

使蓝色转变成黄色,此时可用特定的波长(450nm)测定吸光值。

5.3.6.2 比色

比色前应先用洁净的吸水纸拭干板底附着的液体,然后将板正确放入酶标比色仪的比色架中。以软板为载体的试验,需先将板置于标准96孔的座架中,才可进行比色。最好在加底物液显色前,先将软板边缘剪净,这样,此板就可完全平妥地坐入座架中。

比色时应先以蒸馏水校零点,测读底物孔(未经任何反应仅加底物液的孔)和空白孔(以生理盐水或稀释液代替标本作全过程的孔),以记录本次试验的试剂状况。其后可用空白孔以蒸馏水校零点,以上各孔的吸光度需减去空白孔的吸光度,然后进行计算。比色结果的表达以往通用光密度(optical density, OD),现按规定用吸光度(absorbance, A),两者含义相同。通常的表示方法是,将吸收波长写于A字母的右下角,如OPD的吸收波长为492nm,表示方法为“A_{492nm}”或“OD_{492nm}”。

5.3.7 酶标比色仪

酶标比色仪简称酶标仪,通常指专用于测读ELISA结果吸光度的光度计。针对固相载体形式的不同,各有特制的适用于板、珠和小试管的设计。许多试剂公司配套供应酶标仪。酶标仪的主要性能指标有:测读速度、读数的准确性、重复性、精确度和可测范围、线性等。优良的酶标仪的读数一般可精确到0.001,准确性为 $\pm 1\%$,重复性达0.5%。举例,若某孔测得的A值为1.083,则该孔相对于空气的真实A值应为 1.083 ± 0.01 (1.073~1.093),重复测定数次,其A值均在 1.083 ± 0.05 (1.078~1.088)之间。酶标仪的可测范围视各酶标仪的性能而不同。普通的酶标仪在0.000~2.000,新型号的酶标仪上限拓宽达2.900,甚至更高。超出可测上限的A值常以“*”或“over”或其他符号表示。应注意可测范围与线性范围的不同,线性范围常小于可测范围,比如某一酶标仪的可测范围为0.000~2.900,而其线性范围仅为0.000~2.000,这在定量ELISA中制作标准曲线时应予注意。

酶标仪不应安置在阳光或强光照射下,操作时室温宜在15℃~30℃,使用前先预热仪器15~30min,测读结果更稳定。

测读A值时,要选用产物的敏感吸收峰,如OPD用492nm波长。有的酶标仪可用双波长式测读,即每孔先后测读两次,第一次在最适波长(λ_1),第二次在不敏感波长(λ_2),两次测定间不移动ELISA板的位置。例如OPD用492nm为 λ_1 ,630nm为 λ_2 ,最终测得的A值为两者之差($\lambda_1 - \lambda_2$)。双波长式测读可减少由容器上的划痕或指印等造成的光干扰。

各种酶标仪性能有所不同,操作时应详细阅读使用说明书。

5.3.8 结果判断

5.3.8.1 定性测定

定性测定的结果判断是对受检标本中是否含有待测抗原或抗体作出“有”或“无”的简单回答,分别用“阳性”、“阴性”表示。“阳性”表示该标本在该测定系统中有

反应。“阴性”则为无反应。用定性判断法也可得到半定量结果，即用滴度来表示反应的强度，其实质仍是一个定性试验。在这种半定量测定中，将标本作一系列稀释后进行试验，呈阳性反应的最高稀释度即为滴度。根据滴度的高低，可以判断标本反应性的强弱，这比观察不稀释标本呈色的深浅判断为强阳性、弱阳性更具定量意义。

在间接法和夹心法 ELSIA 中，阳性孔呈色深于阴性孔。在竞争法 ELISA 中则相反，阴性孔呈色深于阳性孔。两类反应的结果判断方法不同，分述于下。

(1) 间接法和夹心法

这类反应的定性结果可以用肉眼判断。目视标本无色或近于无色者判为阴性，显色清晰者为阳性。但在 ELSIA 中，正常人血清反应后常可出现呈色的本底，此本底的深浅因试剂的组成和实验的条件不同而异，因此实验中必须加测阴性对照。阴性对照的组成应为不含受检物的正常血清或类似物。在用肉眼判断结果时，更宜用显色深于阴性对照作为标本阳性的指标。

目视法简洁明了，但颇具主观性。在条件许可下，应该用比色计测定吸光值，这样可以得到客观的数据。先读出标本 (sample, S)、阳性对照 (P)、和阴性对照 (N) 的吸光值，然后进行计算。计算方法有多种，大致可分为阳性判定值法和阴性对照比值法两类。

阳性判定值 (cut-off value) 一般为阴性对照 A 值加上一个特定的常数，以此作为判断结果阳性或阴性的标准。

用此法判断结果要求实验条件十分恒定，试剂的制备必须标准化，阳性和阴性的对照品应符合一定的规格，须配用精密的仪器，并严格按照规定操作。阳性判定值公式中的常数是在这特定的系统中通过对大量标本的实验检测而得到的。现举某种检测 HBsAg 的试剂盒为例。试剂盒中的阴性对照品为不含 HBsAg 的复钙人血浆，阳性对照品 HBsAg 的含量标明为 $P = 9 \pm 2 \text{ ng/mL}$ 。每次试验设 2 个阳性对照和 3 个阴性对照。测得 A 值后，先计算阴性对照 A 值的平均数 (NCX) 和阳性对照 A 值的平均数 (PCX)，两个平均数的差 (P - N) 必须大于一个特定的数值 (如 0.400)，试验才有效。3 个阴性对照 A 值均应不小于 $0.5 \times \text{NCX}$ ，并不大于 $1.5 \times \text{NCX}$ ，如其中之一超出此范围，则弃去，而以另两个阴性对照重新计算 NCX；如有两个阴性对照 A 值超出以上范围，则该次实验无效。阳性判定值按下式计算：

$$\text{阳性判定值} = \text{NCX} + 0.05$$

标本 A 值大于阳性判定值的为阳性，小于阳性判定值的为阴性。应该注意的是，式中 0.05 为该试剂盒的常数，只适合于该特定条件下，而不是对各种试剂均可通用。

根据以上叙述可以看出，在这种方法中阴性对照和阳性对照也起到试验的质控作用，试剂变质和操作不当均会产生“试验无效”的后果。

标本/阴性对照比值在实验条件 (包括试剂) 较难保证恒定的情况下，这种判断法较为合适。在得出标本 (S) 和阴性对照 (N) 的 A 值后，计算 S/N 值。也有写作 P/N 的，这里的 P 不代表阳性 (positive)，而是病人 (patient) 的缩写，不应误解。为避免混淆，更宜用 S/N 表示。在早期的间接法 ELISA 中，规定 S/N 为阳性标准，现多为各

种测定所沿用。实际上每一测定系统应该用实验求出各自的 S/N 的阈值。更应注意的是, N 所代表的阴性对照是不含受检物质的人血清。有的试剂盒中所设阴性对照为不含蛋白质或蛋白质含量较低的缓冲液, 以致反应后产生的本底可能较正常人血清的本底低得多。因此, 这类试剂盒规定, 如 $N < 0.05$ (或其他数值), 则按 0.05 计算, 否则将出现假阳性结果。

(2) 竞争法

竞争法在 ELISA 中, 阴性孔呈色深于阳性孔。阴性呈色的强度取决于反应中酶结合物的浓度和加入竞争抑制物的量, 一般调节阴性对照的吸光度在 1.0 ~ 1.5 之间, 此时反应最为敏感。竞争法 ELISA 不易用目视判断结果, 因肉眼很难辨别弱阳性反应与阴性对照的显色差异, 一般均用比色计测定, 读出 S、P 和 N 的吸光值。计算方法主要有两种, 即阳性判定值法和抑制率法。

1) 阳性判定值法

与间接法和夹心法中的阳性判定值法基本相同, 但在计算公式中引入阳性对照 A 值, 现举某种检测抗 HBc 的试剂盒为例。试剂盒中的阴性对照为不含抗 HBc 的复钙人血浆, 阳性对照中抗 HBc 含量 $125\text{U/mL} \pm 100\text{U/mL}$ 。每次试验设 2 个阳性对照和 3 个阴性对照。测得 A 值后, 先计算阴性对照 A 值的平均值 (NCX) 和阳性对照 A 值的平均数 (PCX), 两个平均数的差 (N - P) 必须大于一个特定的数值 (例如 0.300), 试验才有效。3 个阴性对照 A 值均应小于 2.000, 而且应不小于 $0.5 \times \text{NCX}$, 并不大于 $1.5 \times \text{NCX}$, 如其中之一超出此范围, 则弃去, 而以另 2 个阴性对照重新计算 $\times \text{NCX}$; 如有 2 个阴性对照 A 超出以上范围, 则该次实验无效。阳性判定值按下式计算:

$$\text{阳性判定值} = 0.4 \times \text{NCX} + 0.6 \times \text{PCX}$$

标本 A 值不大于阳性判定值的反应为阳性, A 不小于阳性判定值的反应为阴性。

2) 抑制率法

抑制率表示标本在竞争结合中标本对阴性反应显色的抑制程度, 按下式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{阴性对照 A 值} - \text{标本 A 值}) \times 100\% / \text{阴性对照 A 值}$$

一般规定抑制率不小于 50% 为阳性, 小于 50% 为阴性。

5.3.8.2 定量测定

ELISA 操作步骤复杂, 影响反应因素较多, 特别是固相载体的包被难达到各个体之间的一致, 因此在定量测定中, 每批测试均须用一系列不同浓度的参考标准品在相同的条件下制作标准曲线。测定大分子量物质的夹心法 ELISA, 标准曲线的范围一般较宽, 曲线最高点的吸光度可接近 2.0, 绘制时常用半对数纸, 以检测物的浓度为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 将各浓度的值逐点连接, 所得曲线一般呈 S 形, 其头、尾部曲线趋于平坦, 中央较呈直线的部分是最理想的检测区域。测定小分子量物质常用竞争法, 其标准曲线中吸光度与受检物质的浓度呈负相关。标准曲线的形状因试剂盒所用模式的差别而略有不同。

5.4 ELISA 中常见问题及解决方法

ELISA 试验以灵敏度较高、特异性较好的特点在临床中得到了广泛的应用,但操作中的各个环节对试验的检测效果影响较大,如不注意,有可能导致显色不全、花板等结果。现将操作中各个环节常出现问题的原因及解决办法汇总如下,以利提高产品质量。

5.4.1 表面效应

首先必须明确指出的是,“固相”ELISA 与传统的“液相”血清学试验的最大、最本质的区别是有一个预先固相抗原或抗体固定到载体表面的步骤,以及抗原-抗体结合反应由液态环境转移到了固相载体表面进行。蛋白质分子在吸附过程中,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,再通过范德华力吸引而固相到载体表面。表面效应可直接影响抗原、抗体的构象和功能;此外,表面效应亦影响抗原-抗体结合反应的动力学过程。

5.4.1.1 固相导致抗原的变化

为了测定抗体水平,需预先将抗原固定(包被)到聚苯乙烯(PS)或聚氯乙烯(PVC)酶标板上。用直接物理吸附方法固定蛋白抗原及 DNA 等,导致的变化是多方面的,可引起分子构象和抗原性发生改变;酶活性测定时可产生假阴性或假阳性结果;乳酸脱氢酶、色氨酸合成酶固相之后,导致抗原性改变及酶活性消失;牛血清白蛋白固相之后,其抗原价可由 5 价降为 1 价;此外,发现被动吸附方法固相铁蛋白,呈团串状、不均一的随机分布,这种情况比较普遍;大多数小分子半抗原不易直接吸附到载体表面。解决这一难题的办法,一般是采用在小分子抗原上,先偶联上葡聚糖、明胶等手臂后再进行固相包被。对于有多重表达抗原决定簇的大分子抗原,用抗体桥式包被法可避免表面效应的影响。将蛋白抗原吸附于胶体 $Al(OH)_3$ 后再固相也可以避免蛋白变性。用 γ 射线辐照(400Gy) PS 板,不但可增加蛋白抗原吸附能力,而且还有降低抗体测定本底的作用。

5.4.1.2 固相对抗体的影响

直接吸附法固相抗体(IgG)分子,除了呈团串状、不均分布和易解吸等一般不利因素之外,IgG 分子摊开在载体表面,不但构象发生改变,而且影响抗体的活性,如 IgG 的结合价减少,可由 2 价变为 1 价,甚至完全失活。实验结果表明,单克隆抗体比多克隆抗体更易失活,固相后仍能保持结合能力的分子分别仅占:3% 和 5%~10%。这不但浪费抗体试剂,更可惜的是空置了有限的微孔表面积。抗体分子 N 末端为 F_{ab} , C 末端为 F_c ,直接被动吸附的随意性,造成一部分 F_{ab} 结合位点朝向载体一面,或因用量过多而造成的重叠性吸附,部分 F_{ab} 结合位点被遮盖,均可导致其总体结合能力下降。为此,出现了可以“锚定” F_c 段在载体表面,而使 F_{ab} 朝外的共价结合法,即在载体上

导入氨基、胍基等活性基团,然后在水溶性碳二胺作用下,与 IgG 的羧基共价结合,或直接与羟氧化糖基产生的醛基共价结合;含溴乙烯基团的 PS 板,可在双功能交联剂如戊二醛的帮助下与蛋白质共价结合。目前,国外已有有关的酶标板产品(专利)供应,如 Avidplate-Hz 等,而实验室一般可用桥式固相法。

桥式法是一种避免 IgG 与载体直接接触的固相方法,有几种不同的类型:①抗抗体法;②SPA 法;③链霉亲和素-生物素法,这种方法应用最为成功,只需要预先将第一捕捉抗体生物素化;④抗半抗原抗体法,这需要将捕捉体预先标记半抗原。

5.4.1.3 抗体介导的抗原分子变构

抗原与抗体分子在液态环境和固相载体表面结合反应的动力学过程有所不同,在液态环境中,抗原、抗体分子在三维立体空间自由运动,互相碰撞,彼此特异性结合,这种结合不似早期想像中的单纯的“锁-匙”关系,而是一种柔性的诱导契合。抗原分子决定簇可以突入到 F_{ab} 的深底部,反过来, F_{ab} 为了执行其固有生物学功能,主动地发生变角折弯、锥形转动及最 N 末端可变区的“球穴”摆动,以契合抗原决定簇, F_{ab} 亦可突入到大分子抗原的较深的位区。液态中的抗原抗体分子在完成一级结合反应之后,该复合物可以通过抗原抗体之间的特异性结合,亦可通过抗体 F_c - F_c 段的非特异性结合而进一步交联,形成肉眼可见的晶格形网络沉淀或凝集型的抗原抗体二级反应复合物。纵观全过程,抗原分子一般总能保持其固有的构象,而复合物中的抗体构象变化则较大。相反,在固相抗体测定抗原的过程中,由于表面效应的关系,抗体介导的抗原分子变构具有特殊意义。

5.4.2 HD-HOOK 效应

发生在固相法试验过程中的可造成“假低值”甚至“假阴性”错误结果的特殊效应,称为“高剂量钩端(HD-HOOK)效应”。它的产生条件、分子基础、导致的后果等,都与传统的液相沉淀、凝集反应中的“区带现象”不一样。在一步二位点夹心 ELISA 中,主要是因为待测抗原的总量过高,竞争结合反应系统中的限量标记二抗,从而产生抗原越多,最终反应信号越低的 HD-HOOK 效应,如 HBsAg 等可出现假阴性。抗原“量”是决定的因素,一般认为二步二位点夹心固相测定法不会产生抗原过剩的“阴滞现象”之观点,早已被 Miles 的实践否定,只是并非所有二步夹心法都会产生 HD-HOO 效应。迄今为止,仅少数具有多重抗原决定簇的大分子蛋白质抗原,如铁蛋白、前列腺特异抗原(PSA)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、甲胎蛋白(AFP)、细胞溶素-D 等,本身具有分子变构内因的抗原,测定时发现了 HD-HOO 效应。抗原“质”的特性是决定的因素,而标记二抗介导抗原分子变构是重要的外因。抗原的数量亦是必备的相关因素,以铁蛋白为例,被捕捉的铁蛋白抗原分子,与亲和性比一抗大的标记二抗发生交叉重叠结合后,由于立体效应,可促使铁蛋白分子变构,使其与一抗解离,形成标记二抗与铁蛋白分子复合物,而被随后的洗涤过程洗离出去,最终的信号下降。在剂量反应曲线的高剂量(HD)区段,其线型走向不是呈平台状无限后延,而呈向下弯落状,似一只钩子或一把镰刀(HOOK)。若单纯从剂量反应曲线的钩状图形来看,与区

带现象中抗原过剩型复合物的“后带现象”十分相似。然而，其分子基础完全不同，“晶格理论”，仅能解释区带现象，而对固相二步夹心 ELISA 的 HD-HOOK 效应的解释，目前认为，“抗原分子变构理论”比较贴切。

克服 HD-HOOK 效应，主要依靠试剂盒产品的生产厂家。首先，对靶抗原的决定簇应尽可能弄清楚，在此基础上，选择仅有一种而且仅有两个重复表达的决定簇，或者两种且每种仅有一个表达的决定簇，选用相应的一个单抗，或者两个相应单抗来组建试剂盒产品，有可能从根本上解决 HD-HOOK 效应的弊端。作为应用者，可用稀释测定法解决这一问题，在测定未知标本的时候，用原标本与 10 倍稀释的标本同时测定，原倍孔 A 值低于稀释孔，即为 HD-HOOK 的存在，从而可以保证试剂产品避免了实验的误（漏）检。

5.4.3 边缘效应

由于抗原-抗体结合反应和酶催化反应的速率都具有温度依赖性，所以应在恒温条件下完成全部实验过程。事实上，一般是操作在室温，孵育在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴。这种轮换操作过程中，由于 96 孔板周边孔与内部孔升降温速率的差别，造成周边孔与内部孔结果的差异，这亦可看做是一种“位置效应”。若室温和 37°C 悬殊过大时，在板上加盖或贴密封膜有一定效果。必要时，放弃周边孔不用，这样将造成 37.5% 的资源浪费。

5.4.3.1 扩散限制

在固相法中抗原抗体结合、底物与酶的接触、转换的信号产物向液体内扩散等过程中，液、固相中的分子必须要穿过液面的 Nernst 层，亦称液固屏障，使反应速率受到限制。采用振荡、离心、微波或超声等方法，可使 Nernst 层变薄，从而加速反应速率。

5.4.3.2 干扰物质

（1）内源性物质

据统计，大约有 40% 的人血清标本中含有非特异性干扰物质，影响测定结果。主要的内源性干扰物质有以下几种。

1) 类风湿因子

人血清中的 IgM、IgG 型类风湿因子 (RF)，可与 ELISA 系统中的捕捉抗体与标记二抗的 F_c 段直接结合，从而导致假阳性。制造商采用 $F_{(ab')_2}$ 替代完整的鼠 IgG 是最好的办法。标本预先用热变性 IgG (63°C 、10min) 的固相吸附剂处理，可以除去 RF 的干扰。将热变性 IgG 加入到标本稀释液中同样有效。

2) 补体

补体经典活化途径从 Clq 开始，在固相一抗和标记二抗的过程中，抗体分子发生变构， F_c 的 Clq 分子结合位点暴露出来，则 Clq 可将二者连结起来，造成假阳性。用 ED-TA 稀释标本，亦可用 56°C 下 30 min 灭活补体的方法。

为避免上述 RF 及补体的干扰，特别推荐禽类如鸡、鹌鹑等的卵黄抗体，即 IgY。它不激活哺乳动物的补体，不结合抗体分子的 F_c ，不与 RF 结合，从而避免假阳性。

IgY 也不结合哺乳动物细胞的 F_c受体,为免疫组化提供方便。

3) 嗜异性抗体

人类血清中含有可与鼠等啮齿类动物 IgG 结合的天然的嗜异性抗体,可将一抗和标记二抗连接在一起,造成假阳性。在标本稀释中加入过量动物的 IgG 有效。然而亦可因加入的鼠 IgG 用量不足或者是亚类不同而失败。

4) 医源性诱导的抗鼠 IgG 抗体

临床上逐渐开展用鼠源性 CD₃ 等单抗治疗疾病、用放射性同位素标记鼠源性抗体的影像诊断及靶向治疗等新技术,这些患者可能产生抗鼠抗体,而造成假阳性。此外,被鼠等啮齿类动物咬伤后的患者体内,可有抗鼠 IgG 的抗体,这要靠了解病史,测定抗原时,在标本中加入足量的正常鼠 IgG,可克服由此而产生的假阳性。

5) 抗靶抗原的自身抗体

抗甲状腺球蛋白、抗胰岛素等的自身抗体,均可干扰抗原或抗体的测定结果,需要同时作抗原与抗体测定,有时自身抗体与待测靶抗原形成复合物,测定之前需要用理化方法解离后再测定。

6) 交叉反应物质

与靶抗原交叉反应的物质,如类地谷新、类 AFP 样物质等,原来大都用多抗来测定抗原,少数交叉抗原决定簇对测定结果的影响不大。现在普遍用单抗测定,倘若这个决定簇正好是所用单抗对应的靶决定簇,结果是不难想像的,会出现假阳性或假阴性结果。

其他物质:内源性酶如碱性磷酸酶、过氧化物酶对二步夹心 ELISA 影响较少,主要干扰免疫组化的结果。前者可用 0.1 mol/L EDTA 室温过夜;后者可用 Na₃N、H₂O₂ 液或过碘酸灭活组织切片中的活性酶。而内源性酶、底物和抑制酶活性的药物等,对一步法 ELISA 干扰作用较明显。此外,血清黏度过大、血脂过高、胆红素、血红蛋白等也有干扰作用。应该特别指出的是,还有一些体内天然存在的物质,可与靶抗原互相结合而引起靶抗原变构,如已证实胆红素和游离脂肪酸可结合 AFP 分子而导致其分子变构,与 AFP 分子结合的单抗还有 Ca²⁺ 依赖性的差别。这些因素都可能会干扰 AFP 的测定结果。所以,AFP 定量、定性测定不但不同试剂盒之间定量测定值的可比性很差,而且同一试剂盒的室间、室内测定值的变化也较大。此外还经常发生假阳性与假阴性结果。

(2) 外源性物质

采集血清标本时,加入的抗凝剂,如肝素、EDTA 以及快速分离血清的分离凝胶等,均有干扰作用。标本储存过程中的变化,如 AFP 可形成二聚体,影响定量测定。测定试剂中含有酶抑制剂如 Na₃N,可抑制 HRP 活性。

除此之外,还有与操作人员的素质有关的实验误差、随机误差等问题。

综上所述,固相 ELISA 的测定结果,由于方法学固有的缺陷,要达到临床上能够接受的批内 RSD 小于 10%,批间 RSD 小于 15% 这一标准,是有相当难度的。此外,应该特别指出的是,由于干扰物质及 HD-HOOK 效应等因素的影响,有个别原因不明的假阳性、假阴性实验误(漏)检在所难免。国家卫生部质检中心批准生产销售的试剂盒,相对敏感性和特异性指标的要求一般在 95% 以上即可。即使应用指标为 99.9% 的

试剂盒,也仍会有0.1%的假阴、假阳性结果的发生概率,百分之百绝对准确无误是不可能的。关键问题是要分析和找出原因,有关实验结果与临床资料反馈到产品生产单位,有助于改进和提高试剂盒的质量。也许这是一个更为深层的科学发现的机遇,不要轻易放弃。

5.4.4 ELISA 中阴性本底的形成原因和消除方法

在酶联固相免疫实验中,尤其在间接ELISA法中,经常会碰到阴性本底的问题。主要是本底过高和不同标本的本底值差异较大。本底或称背景,是ELISA中的非特异性显色。底物未经过酶作用而呈现的颜色称为空白。底物液如配制不当会出现一定的空白值。这个空白值只要不太高($A < 0.05$),可从各测定值中减除,并不影响实验结果。这里讨论的是不含待测抗原或抗体的阴性标本在ELISA中出现的本底。从理论上讲,只有阳性标本最终才能引出显色反应,在以下情况会出现本底。

5.4.4.1 固相载体的吸附

在酶免疫测定中,ELISA的特点是利用固相载体作为分离游离和结合的酶结合物的手段。固相载体与吸附在其上的抗原或抗体形成固相抗原或固相抗体,即免疫吸附剂(Immu-nosorbent)。通常所用的固相载体聚苯乙烯其表面主要是疏水基团,通过疏水键与蛋白质结合。这种吸附是物理性的非特异性吸附,虽然蛋白质的分子量、等电点、浓度等对吸附的量有一定的影响,但总的来说各种蛋白质均能吸附在聚苯乙烯载体的表面。因此除在包被时有目的地使抗原或抗体吸附在载体上外,在ELISA各个步骤中均有可能发生干扰物质的吸附,使最终产生与受检抗原-抗体反应无关的显色,这是形成本底的主要原因。

5.4.4.2 阳性的显色和阴性的本底

以常用的间接法和夹心法为例。阳性标本中含有检测系统中特异的抗体或抗原,作为桥梁联结免疫吸附剂和酶结合物,使酶结合物吸附在固相上,无色底物在酶的作用下转变成有色产物,这就是阳性的显色,显色的深度与阳性标本中待测抗体或抗原的量成正比。阴性标本中不含待测的抗体或抗原,酶结合物不能联结在固相上,故不显色。但ELISA是一个复杂的、多步骤的反应过程,反应各步中酶结合物都有可能发生非特异性地吸附在固相载体上,与底物反应呈现颜色,这就形成了阴性的本底。酶结合物在固相上的非特异吸附通常有以下几条途径。

①酶结合物直接吸附在固相载体上。酶结合物是蛋白质,可以直接吸附在固相载体表面。但在ELISA这一步骤中选择了不利于这种吸附的条件,一般说来只要酶结合物工作浓度适当、反应一段时间后,经过彻底洗涤,可以避免这种吸附。

②酶结合物与固相上包被蛋白质成分起反应。包被抗原不纯时,杂质蛋白也会吸附在固相载体上,某些杂质可与酶标抗体因“错认”而结合。

③在间接法中,杂抗原还有可能与血清标本中的免疫球蛋白特异或非特异地结合。另外非特异的免疫球蛋白也可吸附在包被的特异抗原上,特别是这种抗原为碱性蛋白质

时。此时没标记的二抗就与吸附的免疫球蛋白反应而形成阴性本底。

④在间接法中,标本中的非特异免疫球蛋白的含量远远超过特异性抗体,因此可以直接吸附在固相上,这是形成阴性本底的主要原因。聚苯乙烯对免疫球蛋白有很好的吸附性能,IgM的吸附力大于IgG,聚合IgG的吸附力大于单体的IgG。酶标记的抗Ig(二抗)对吸附在载体上的Ig和与固相抗原结合的特异性Ig有着同样的亲和力,因此在加入标本的反应中,虽然采取了不利于吸附的条件,但假设血清标本不作适量的稀释,高浓度的Ig中仍有一些能吸附在固相上,因而产生较高的本底。

⑤在双抗体夹心法中,标本中如含有类风湿因子,也能使阴性血清显色。类风湿因子是作用于多种动物IgG F₂段的自身抗体,多为IgM类,是一种多价抗体。在夹心法检测中充当抗原成分,同时与固相抗体及酶标抗体反应,使酶标抗体结合到载体上。

⑥在ELISA中引入生物素-亲和素系统,可以提高检测的灵敏度,但如果使用不当,可使本底加深,反而得不偿失。生物素标记蛋白质如比例不合适,极易形成较高的阴性本底。从蛋清中提取的亲和素是一种碱性糖蛋白,可以通过静电作用吸附在聚苯乙烯上,也是造成ELISA高本底的因素之一。从链球菌中提取的亲和素改善了这一非特异吸附现象。

5.4.4.3 降低阴性本底的措施

(1) 为了减少血清标本中Ig和其他干扰物质以及酶结合物在固相载体上的非特异性吸附,在ELISA中采用以下措施。

1) 封闭。封闭是载体经抗原或抗体包被后,用大量无关蛋白填补载体表面未被占据的空间。封闭过程与包被相类似,但封闭液中蛋白含量往往较大,一般如:10%小牛血清、0.5%~1%牛血清白蛋白、5%低脂奶粉等。有人认为小牛血清灭活后其封闭效果更好,可能是其中某些蛋白质(如IgG)受热聚合成为聚合大分子,更易吸附在固相上。在有些ELISA测定中特别是双抗体夹心法中,封闭这一步骤并非必要,可经实验确定。

2) 稀释液。在加入血清标本和酶结合物的两次反应中,应创造条件以减少其对固相载体的非特异性吸附。一般在酶结合物的稀释液中,加入与上述封闭液相同浓度的蛋白质,使酶结合物本身的吸附机会相对减少。非离子型洗涤剂如Tween-20、TritonX-100,具有削弱疏水吸附的作用,甚至可使已吸附的蛋白质脱落。在稀释液中常用0.05%的Tween-20,本底高时可增加至0.3%,更高浓度会使阳性反应减弱。溶剂通常采用PBS或TBS,有人认为增加NaCl浓度有助于减少非特异性吸附,对此目前尚有争议。血清标本如需稀释后进行测定(如在间接法中),一般也用如上的稀释液。

3) 洗涤。洗涤虽不参与ELISA反应,但ELISA就是靠洗涤来达到分离的目的,因此,它也是决定实验成败的关键。在以微孔板为载体的ELISA中,洗涤分浸泡和吸干两个步骤。浸泡时间以30s为宜。吸干应彻底,可用水泵抽吸。如用甩干法,应在吸水纸上拍干。在夹心法中每一反应结束时洗涤5次即可。在间接法中如本底较高,应增加洗涤次数或延长浸泡时间。如以小珠为载体,可使用特殊的冲洗吸干器,洗涤方便而彻

底。

(2) 降低阴性本底除采用以上措施外, 也应注意 ELISA 各个环节, 主要有以下几个方面。

1) 固相载体。在 ELISA 实验中有时会碰到空白孔吸光值过高或复孔实验结果差异很大, 其原因可能与酶标板的质量有关。ELISA 被采用前应先抽样筛选, 常用检测 IgG 的直接法, 以观察 ELISA 板的均一性。

2) 包被抗原。包被抗原应先经纯化。从人血清或组织中提取的抗原成分例如 HBsAg, 要彻底除去 Ig 杂质是很困难的, 用基因工程重组抗原可以避免这种干扰。

3) 酶标抗体。应制备高效价的酶标抗体, 工作浓度高, 稀释度大就可减少吸附。制备 $F_{(ab)2}$ 或 F_{ab} 酶结合物可以消除类风湿因子的干扰。

4) 血清标本。红细胞在溶解时会释放出过氧化物酶, 黄疸病人血清中含有内源性过氧化物酶, 因此溶血和黄疸血清标本用于以辣根过氧化物酶为标记物的 ELISA 检测时, 很容易增加非特异性显色。血清标本宜在新鲜时检测, 如在冰箱中保存过久, 其中 IgG 可发生聚合, 在间接法测定中使显色加深。如有细菌污染亦会产生假阳性反应。在双抗体夹心法中, 血清一般无需稀释后检测, 在间接法中原液血清本底大多很高, 一般采用 1:100 或 1:200 稀释。

5) 缓冲液。配制试剂的蒸馏水的质量十分重要, 以新鲜重蒸为宜, 去离子水应检验合格。缓冲液的 pH 值应该用 pH 计校正, 配制后应放置低温处 ($2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$), 以免变质。PBS 可大量配制后分装高压灭菌保存。

综合采取以上措施, 可望使 ELISA 本底达到最佳状态。ELISA 是一个多试剂、多反应、多步骤的检测方法, 每一步都必须注意, 才能得到准确可靠的试验结果。

5.4.5 结果分析

ELISA 检测的结果可有多种形式的表示方法, 如上所述。用阳性和阴性可以表达半定量或定性结果。肉眼观察定量实验结果常不十分理想, 定量实验常采用分光光度计检测。

检测抗原或抗体的剂量反应曲线常呈“S”形, 曲线上确定出阳性和阴性界值, 这个值的选择涉及假阳性或假阴性结果出现的概率, 常用阴性血清标本平均值加两个或三个标准偏差作为阴性和阳性之间的界值, 或者用适当的参考标准血清确定界值。

用滴度表示的结果不十分准确, 如果界值的点定在“S”形曲线的尾端, 那么结果趋于偏低。

抗体反应的剂量曲线存在一个问题, 不同浓度的抗体和不同亲和力抗体的剂量曲线并非总是平行的, 因此, 一份血清的某个稀释度表现高水平的抗体, 而在不同的稀释度时抗体水平则较低, 所以必须注意在不同稀释度时存在的这种差别。

5.4.5.1 参考血清和免疫酶单位

在用 ELISA 检测时 (以检测弓浆虫 IgM 为例), 用无特异抗体的血清稀释阳性血清绘制标准曲线, 选择的稀释度应很容易区别阴性和阳性结果的稀释度。每次试验均应同

时使用阴性对照血清,可选择强阳性的血清作为标准对照血清,并可自己设定其为100单位(免疫酶单位-EIU)。这样每次试验均参考此阳性血清结果确定每份血清的相对抗体水平,其计算公式如下: 标本值 - 阴性对照值 / 阳性对照值 - 阴性对照值

$$\text{抗体水平(样本)} = \frac{\text{标准值} - \text{阴性对照表}}{\text{阳性对照表} - \text{阴性对照值}} \times 100\% \text{ EIU}$$

用在450nm检测的吸光度计算,最后的值为EIU。

如有国内或国际上的标准抗体和检测方法,那么所用的参考血清应与标准血清对照实验进行标准化,但如果所用的检测方法不同,标准化时就存在差别,不同的方法检测出的结果不能反映出参考血清和标准血清之间的差别。

自己制备的标准参考血清应保证质量,并要有足够的血清,小量分装存储于-20℃,或冻干存储。标准血清检测的吸光度值应保证在一定范围内,以便检测每次试验的吸光度值的变化。

5.4.5.2 对照血清

除标准血清外,还需要对照血清,其中包括强阳性血清、阴性血清和弱阳性血清,弱阳性血清在监测检测方法灵敏度发生变化时是非常有用的,弱阳性血清本身就是抗体量少,而不是高稀释度的阳性血清。这3个对照血清也需要保证质量,并小量分装存储于-20℃,或冻干存储。每次试验均应用这3个对照血清,并注意每次吸光度结果,以便检测方法具有可靠性。这些对照血清在应用时应与待检血清进行一样的稀释。

5.4.5.3 质量控制图

为了适当地评价质量控制,可将每次试验对照血清的结果绘成图,这样可以比较直观地表示实验方法的稳定性和变异性。将每一对照血清连续20个工作日或20个以上工作日的检测结果记录下来,并计算其平均值和标准偏差。用标准偏差和平均值与实验次数绘出坐标图,这就是高斯正态分布曲线,在统计学上,均数加减标准偏差的数字范围包括95%的对照血清值,不同批次试验的对照血清值随机分布在均数两侧。对于落在统计学范围外的对照血清需详细分析原因,如果每个月的标准偏差和相对标准偏差明显上升,则需对实验方法进行检查。

5.4.5.4 确定方法

以ELISA检测弓浆虫IgM抗体的质量控制为例,说明质量控制和进一步验证过程。用96孔酶标板作为固相,每份血清只用一个稀释度,但需加两个孔,这样每块板可测48份血清。对照血清一般是加在每块板的起始孔和终末孔,以及有待检血清按顺序加入板的其他孔,这样就可以检测整块板的变异情况。对照血清也可加在待检血清孔之间,其适用于比较实验,但不能监测整块板的变异性。每一块板均应包括所有的对照孔,除阳性和阴性对照血清外,还应有抗原对照、酶标抗体对照和底物对照。实验程序按一定的顺序进行,结果是以底物对照为空白孔检测的吸光度值。有些检测仪器附带微机,可进行检测和运算,并将结果存储于磁盘中。

5.4.5.5 结果验证和分析

检测的结果可用表 5-3 的程序分析和验证,它是用 ELISA 检测弓浆虫 IgM 时采用的方法,对于其他 ELISA 实验所得到的吸光度值可能有差别,可根据各自的实验确定这些值的标准。如果所有这些标准均满足实验要求,那么就可以得出正确的结果。倘若这些标准未满足实验要求,那么就需要有经验的人员判断是否需要重新试验,并要确信空白孔没有错误,以及酶标抗体对照孔和阴性对照孔均为低吸光度值。

每份标本的两个孔相对标准偏差应小于 10%。高的相对标准偏差可能是由于血清稀释时的误差引起,或是每步骤加样和弃液不准确引起的。

表 5-3 ELISA 检测弓浆虫 IgM 的结果判定程序

条 件	可 能 原 因	解 决 方 法
1. 底物孔 $A = 0.000$	非, 空白校对错误	→ 重新校对空白对照
2. 酶标抗体(抗原)对照孔 $A < 0.08$	非, 酶抗体(抗原)过强, 孵育条件错误	→ 重新确定酶标抗体稀释度, 再试
3. 复孔相对标准偏差 $< 10\%$	非, 稀释和冲洗错误	→ 再试
4. 阳性血清 $A > 0.80$ 阴性血清 $A < 0.80$	非, 血清、试剂和孵育条件错误	→ 检查血清和试剂
5. 阳性血清和阴性血清 A 比值 > 2.5	非, 血清、试剂和孵育条件错误	→ 检查血清和试剂
6. 阳性血清在一块微量板上的相对标准偏差 $< 10\%$	非, 固相质量和操作错误	→ 再试
7. 强和弱阳性对照血清 A 值在 $\bar{x} \pm 2s$ 范围内	非, 方法失控 回报临床检测结果	→ 进行质量控制
结果可靠		

(1) 参考血清和对照血清检测结果

阳性和阴性对照血清的吸光度值应在预计的范围内,如果超出范围很可能是试剂用错、孵育温度不对或血清错误。如果阳性血清的吸光度降低,表明此血清可能有变化,小量分装的阳性血清常常容易丧失活性,因此,有时需再制备阳性对照血清。底物孵育阶段的时间过长可导致阴性对照血清吸光度上升,细菌污染和陈旧的底物液均可引起阴性对照值升高。

阳性和阴性血清吸光度的比值是对检测方法评价的一个指标,如果比值大于 2.5,则实验结果可以接受;如果比值较低,则表明实验不能区别阳性和阴性血清,但这个比值在有些情况下不适用,如阴性对照血清的吸光度十分低,则这个比值变得非常大,较难判断结果,特别是在用单克隆抗体时更易出现这种现象。另外这个比值与滴度之间并非线性关系,并不能用其作为定量试验的结果。

(2) 均数、标准偏差和相对标准偏差

通过参考血清的均数、标准偏差和相对标准偏差检测每一块板内的变异,如果相对标准偏差超过 10%,那么在孵育温度、加样顺序和速度、血清稀释和孵育条件等方面存在问题,固相板本身质量问题也可以使相对标准偏差超过 10%。这些因素均可影响

每一块板的均一性。因此,在开始试验前就应检测固相板的均一性,并选用适当的阳性血清,如果板的相对标准偏差始终高于10%,那么这样的板不适用于ELISA。

(3) 实验批内变异

用强阳性和弱阳性血清检测,以适当的统计学计算,确定每次试验的结果是否可靠,需要对实验方法进行调整,以使检测的结果准确。

(4) 对照血清的标准

图5-6是用ELISA检测弓浆虫IgM时所确定的对照标准,按顺序确定每个标准。对照血清的这些标准在不同的方法上是不同的,这些标准值在用其他方法检测时需进行重新设定。

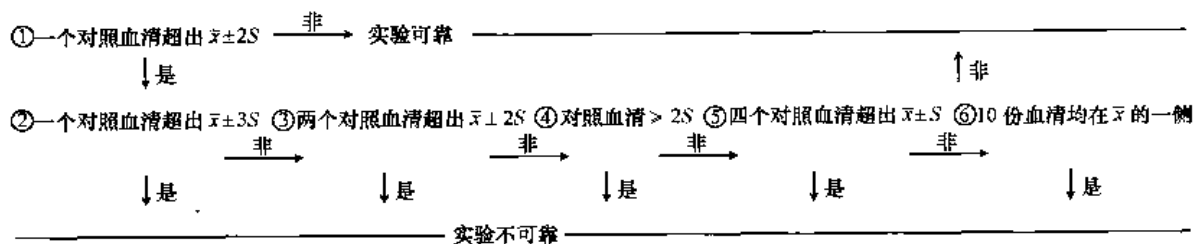


图5-6 阳性对照血清质量控制

①如果某次实验,1个对照血清结果超出平均数 $\pm 2S$ 的范围,那么需进一步分析这次实验结果,以便得出这次试验是否成功的结论。

②如果某次实验1个对照血清的值超出平均数 $\pm 3S$ 的范围,那么这次实验是失败的。

③如果某次实验两个对照血清的值一样均超出平均数 $\pm 2S$ 的范围,那么这次实验是失败的。

④如果在一次实验中,2个对照血清的差异超出4个 S ,也就是一个血清超出均数加两个 S ,另一血清超出均数减两个 S ,这样的实验是失败的。

⑤如果4个同样对照血清的结果超出均数加减1个 S 的范围,那么这次实验是失败的。

⑥如果10个同样的对照血清结果均在均值范围的一侧,那么这次实验是失败的。

(5) 漂移和偏差增大的趋势应特别注意阳性结果是否超出两个标准偏差的标准,如结果发生漂移和有偏差增大的趋势,那么结果不可靠,需要对方法进行调整。连续6次对照的血清值均增高或降低,则为有偏差增大的趋势。4次连续试验对照的血清值超过2个标准偏差的标准或6次连续试验的值均在均值的一侧,则认为有漂移,2个对照血清两次超过1个标准偏差的标准或3次的值均在均值的一侧,这样的结果是不可靠的。

实验结果无论是否超过两个标准偏差的标准均应准确分析结果,一旦有漂移或偏差增大的趋势,必须重新调整试验方案。

(6) 平均值。累计每月的均数对于检测试验方法的可靠性是非常有帮助的,每月的平均数必须与上月的均数和累计数无差异。

如果检测的对照结果在统计学上均可以被接受,那么试验检测的标准结果才能进行

分析和判断,但有些血清的结果可疑,需要重新检测。如果1份血清的两个孔的吸光值相对标准偏差超过10%,那么这样的血清液必须重复检测。

对照血清和分析验证其结果是必要的,每次实验均应注意质量控制,以便及时发现实验误差。

5.5 ELISA 的应用实例

ELISA 的简便、敏感使它得到越来越广泛的应用,现代仪器设备的发展使 ELISA 的操作流程更加规范化,稳定性和重复性进一步提高。在临床检验或实验研究中,ELISA 可广泛应用于多种抗原和抗体、肿瘤相关抗原、激素和血液中的某些蛋白成分的检测。以抗 HBs 检测 (ELISA 双抗原夹心法) 为例,应用举例如下。

5.5.1 原理

将 HBsAg 包被到固相载体表面,加入待检血清,血清中的抗 HBs 与固相 HBsAg 结合,形成 HBsAg-抗 HBs 复合物,再与酶标 HBsAg 反应,加入酶的底物,颜色的深度与待检血清中所含抗 HBs 量成正比。反应层次为包被 HBsAg-待检抗 HBs-酶标 HBsAg-底物。

5.5.2 试剂

(1) 包被工作液

包被缓冲液 (0.05mol/L 碳酸盐缓冲液 pH 值为 9.5) + 测乙肝表面抗体包被物 (原液)。

(2) 封闭液

0.01M 磷酸盐缓冲液: (pH 值为 7.0)、蔗糖、NaCl 和小牛血清。

(3) 酶结合物稀释液

磷酸盐缓冲液: (pH 值为 7.2) 含 0.1% 吐温-20 和 1% BSA。

(4) HBsAb 酶结合物工作液

酶结合物稀释液 + 测乙肝表面抗体酶结合物 (原液)。

(5) HBsAb 阴性对照

(pH 值为 7.0~7.2): 选用质检合格的 HBsAb 阴性血清 + 0.1% Pröclin300, 配制阴性对照。

(6) HBsAb 阳性对照

(pH 值为 6.5~7.0): 选用质检合格的 HBsAb 阳性血清, 配制阳性对照时经稀释液适当稀释。

(7) 洗涤液

(pH 值为 7.0~7.2) Tris、吐温-20 和浓 HCl。

(8) 底物液

(pH 值为 5.0~5.5) TMB、柠檬酸、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和过氧化脲。

(9) 显色剂

(pH 值为 4.0 ~ 4.5) TMB、无水乙醇和柠檬酸。

(10) 终止液

2mol/L H_2SO_4 。

5.5.3 操作方法

(1) 包被

用包被液稀释包被用 HBsAg 至所需要量, 每孔加 0.1mL, 置 4℃ 24h, 用蒸馏水洗 1 次, 每次均需要注满各孔。

(2) 封闭

用封闭液封闭, 每孔加 0.2mL, 置 4℃ 24h, 然后甩去液封闭后干燥, 密封保存。

(3) 加样

每块板均设阳性对照、阴性对照和空白对照各 2 孔, 其余加样品, 每孔加待检血清 50 μ L, 加入酶标 50 μ L, 混匀后, 盖封板纸;

(4) 孵育

置 37℃ 30min。

(5) 洗涤

用洗涤液洗 5 次, 每次均拍干。

(6) 显色

每孔加底物 0.1 mL, 37℃ 10min。

(7) 终止

每孔加 2mol/L H_2SO_4 50 μ L 终止反应。

5.5.4 结果

(1) 肉眼观察

阴性为无色或极淡红色, 阳性为橘红色。

(2) 比色测定

用空白孔调零, 测定波长为 450nm, 参考波长为 630nm。

抗 HBs 阳性 $\geq \frac{\text{阴性对照平均值}}{\text{阳性对照平均值}} \times 2.1$; 反之为阴性。

5.6 临床意义

抗 HBs 阳性表示曾经感染过乙型肝炎病毒 (HBV), 无论临床上曾经有无肝炎症状表现, 现已经得到恢复, 而且对 HBV 有一定的免疫力。或者, 抗 HBs 阳性表示曾经接种过乙型肝炎疫苗, 对 HBV 有一定的免疫力。

乙肝二对半的模式及临床意义如表 5-4。

表 5-4 乙肝二对半的模式及临床意义

HBsAg	HBeAg	HBcAb - IgG	HBcAg - IgM	HBeAb	HBsAb	临床意义
+	+	-	-	-	-	急性 HBV 感染早期 HBV 复制活跃
+	+	+	+	-	-	急慢性 HBV 感染, HBV 复制活跃
+	-	+	+	-	-	急慢性 HBV 感染, HBV 复制较活跃
+	-	+	+	+	-	急慢性 HBV 感染, HBV 复制较不活跃
+	-	+	-	+	-	HBV 复制停止或极低
-	-	+	+	-	-	平静的 HBV 携带状态, HbsAg
-	-	+	-	-	-	HBV 既往感染, 未产生抗 - HBs
-	-	+	+	+	-	抗 HBs 出现前期, HBV 复制低
-	-	+	-	+	+	HBV 感染恢复期
-	-	+	-	-	+	HBV 感染恢复期
+	+	+	+	-	+	不同亚型 HBV 再感染
+	-	-	-	-	-	HBV - DNA 整合
-	-	-	-	-	+	病后或接种疫苗后获得免疫

5.7 酶联免疫吸附测定的局限性

ELISA 检测已用于很多种疾病的诊断, 总的来说实践证明是行之有效的。但是在很多情况下, 仅凭 ELISA 结果是难以得出确定结论的。ELISA 的检测结果必须与其他检测方法的结果一起综合考虑才能够作出诊断结论。由于误诊会给受害者带来极其严重的后果, 因此医生在根据 ELISA 结果作结论时必须十分慎重。

1997 年在美国就发生过这样的事情, 一位先生在献血时做血常规 ELISA 检查时, 其血样呈 HIV 阳性。进行检查的医生简单的据此下结论通知受检者已被 HIV 感染了。受检者得知此消息后惊恐万状, 认为自己将不久于人世, 他甚至想到了自杀。好在这位先生抱着侥幸的心理到别的医院做了进一步的检查, 结果第二次, 第三次的 ELISA 检查的结果 HIV 均呈阴性。事实证明, 检验结论是误诊, 最后受检者经过地狱般地痛苦煎熬之后, 终于重获新生。之所以发生这种事情, 主要就是由于 ELISA 检测的结果受到很多因素的影响, 由于目前的技术水平的限制, ELISA 检测中所用的抗体并不能够高度专一地仅针对 HIV 病毒, 很多其他病毒如流感病毒、腮腺炎病毒、水痘病毒等感染人体后, 对血样进行 ELISA 检查都有可能显示与 HIV 阳性患者同样的阳性反应。因此 ELISA 检测只能作为一种初步的检测手段, 要进一步确诊, 还必须进行确认检测。

这个事例同时也说明, 要提高 ELISA 检测的准确度, 就必须提高一抗的特异性。目前如何得到高度特异性的单克隆抗体是很多科学家正在积极进行深入研究的一个热点。

总的来说，大多免疫诊断检查系统都带有灵敏、专一、简单的特点。可以广泛地应用于药物监测、各种癌症的发现和监控、检测某些特定的代谢产物、致病病原的鉴定和监控等。当然，除了刚才提到的缺点以外，免疫诊断还有许多其他局限性。例如在使用抗体时要求其抗原的编码其目标识别位点的基因要表达，而且目标位点不能够以任何方式被覆盖或阻断，否则都将影响抗体与抗原的结合。

(唐秋艳)

第6章 胶体金免疫技术

在过去的10多年里,基于膜基础上的侧向层析和渗透层析快速诊断技术为免疫金标试剂开创了巨大的市场份额。胶体金体外诊断试剂是近年来的生物产业化最成功的产品之一,现在很多生物学者纷纷开始研究开发胶体金体外诊断试剂产品,为胶体金快速诊断试剂的生产奠定了良好的基础。金免疫技术的特点是以胶体金作为标记物。这一技术在20世纪70年代初期由Faulk和Taylor始创,最初用于免疫电镜技术。迄今为止,金标记仍主要用于免疫组织化学中。在免疫测定中,金标记常与膜载体配合,形成特定的测定模式,典型的如斑点免疫渗滤试验和斑点免疫层析试验等,已是目前应用广泛的简便、快速检验方法。

免疫胶体金技术的基本原理是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术。胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸等作用下,聚合成为特定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态,称为胶体金。胶体金在弱碱性环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响蛋白质的特性。

胶体金除了与蛋白质结合外,还可以与许多其他生物大分子结合,如SPA、PHA、ConA等。根据胶体金的一些物理性状,如高电子密度、颗粒大小,形状及颜色等,加上结合物的免疫和生物学特性,因而使胶体金广泛地应用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学等领域。胶体金的实质是免疫反应,核心问题是在标记技术。

胶体金试纸条具有灵敏度高、特异性强、操作简便、检测快速、准确等显著的优点。不仅广泛应用于人类疾病的诊断和检测感染性疾病、对环境污染物的检测、药物研究等,而且在兽医疾病诊断中也已经开始使用该项技术,已有检测猪瘟抗体的和检测鸡传染性法氏囊病病毒的试纸条等。因此,体外诊断试剂胶体金技术的应用及其试剂的生产具有广阔的市场前景和发展空间。

6.1 胶体金与免疫金的特性

6.1.1 胶体金的特性

胶体金是一种不具有特定结构的原子,由氯化金(Gold Chloride)还原而成;不同还原剂可调控胶体金颗粒形成的大小,而不同颗粒大小的胶体金会有不同的应用。胶体金溶液是指分散相粒子直径在1~150 nm之间的金溶胶,属于多相不均匀体系,颜色呈橘红色到紫红色,胶体金作为标记物用于免疫组织化学始于1971年。Faulk等应用电镜免疫胶体金染色法(IGS)观察沙门氏菌,此后他们把胶体金与多种蛋白质结合,1974年Romano等将胶体金标记在第二抗体(马抗人IgG)上,建立了间接免疫胶体金染色

法。1978年 Qeoghega 发现了胶体金标记物在光镜水平的应用。胶体金在免疫化学中的这种应用, 又被称为免疫金。

胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标志物或显色剂, 应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。胶体金能稳定又迅速地吸附蛋白质, 而蛋白质的生物活性无明显改变。它可以作为探针进行细胞表面和细胞内多糖、蛋白质、多肽、抗原、激素、核酸等生物大分子的精确定位, 也可以用于日常的免疫诊断, 进行免疫组织化学定位, 由于它不存在内源酶干扰及放射性同位素污染等问题, 且利用不同颗粒大小的胶体金还可以作双重甚至多重标记, 使定位更加精确。因此在临床诊断及药物检测等方面的应用已受到广泛的重视, 已成为继荧光素、酶、同位素及乳胶标记技术之后的一种新型标记技术。现已广泛应用于电镜、流式细胞仪、免疫印迹、蛋白染色、体外诊断试剂的制造等领域。由于胶体金作为标记物具有很多优点, 因此自其问世以来, 在国内外的许多研究领域中得到了迅速的发展。近年来, 它更多的被应用于免疫学和细胞学相关分子水平的检测中。尤其随着人们物质生活的改善, 有关人类健康的问题在现实生活中已显得非常突出。

不同大小的胶体金都可以在特定的条件下制备出来, 大小不同其用途也不一样。由于胶体金可见性和空间位阻的平衡关系, 胶体金免疫层析试剂大都选用 1 ~ 100nm 的胶体金颗粒作为它们的标记物。目前生产 1 ~ 100nm 胶体金颗粒的方法都是化学还原法, 即将 1% 柠檬酸三钠加入沸腾的 0.01% 氯金酸水溶液中就能生产出想要的胶体金溶液。但是说起来非常简单, 而真正能生产出单一分散的胶体金是需要严格控制生产过程中的每一个细节的。

6.1.1.1 胶体金的结构

胶体金的产生过程包括晶核生成和晶核生长, 加入还原剂后的短时间内, 溶液中的金原子含量直线上升并达到过饱和状态。这时金原子开始生成由 11 个原子构成的中央二十面体晶核。为了减少溶液中过饱和的金原子游离出来, 晶核构架形成的速度非常快。一旦晶核形成, 溶液中剩余的金原子就会根据其能量递减梯度继续结合到晶核上。

6.1.1.2 胶体金的稳定性

溶胶的稳定性介于小分子离子溶液和粗分散相之间, 其颗粒作布朗运动, 不易受重力影响而下沉。然而, 溶胶又是不稳定体系, 它的胶粒溶剂化作用很弱, 总面积较大, 因在胶粒相互碰撞时, 有自动合并为较大、较重的颗粒倾向。当胶体颗粒直径变大, 超出胶体范围而从介质中沉淀出来的现象叫聚沉。影响其稳定性的主要原因有如下 3 点。

(1) 胶粒间的相互吸引力

当胶粒相距很近时, 这种吸引力可能导致胶体颗粒合并而变大。

(2) 胶粒及其溶剂化层

胶粒及其溶剂化层(溶剂是水时就是水化层)的带电情况。一种溶胶的各个胶粒都带有相同的电荷。同性电荷相斥, 双电子层变厚, 胶粒带电量愈大, 排斥力愈大, 愈能阻止胶粒合并聚结, 溶胶愈稳定。

(3) 胶体接口的溶剂膜

当两个固体间夹有一厚层液体时，这层液体膜有一个反抗二固体接近的排斥力。两个胶粒要进一步接近，只有克服它们之间的溶剂化膜的排斥力才有可能，因此溶剂膜的斥力是使溶胶稳定的原因之一。

6.1.1.3 胶体金粒径大小

胶体性质胶体金颗粒大小多在 1 ~ 100nm，微小金颗粒稳定地、均匀地、呈单一分散状态悬浮在液体中，成为胶体金溶液。胶体金因而具有胶体的多种特性，特别是对电解质的敏感性。电解质能破坏胶体金颗粒的外周水化层，从而打破胶体的稳定状态，使分散的单一金颗粒凝聚成大颗粒，而从液体中沉淀下来。某些蛋白质等大分子物质有保护胶体金的作用，可以增加其稳定性。

6.1.1.4 胶体金呈色性和光吸收性

微小颗粒胶体呈红色，但不同大小的胶体呈色有一定的差别。最小的胶体金（2 ~ 5nm）是橙黄色的，中等大小的胶体金（10 ~ 20nm）是酒红色的，较大颗粒的胶体金（30 ~ 80nm）则是紫红色的。根据这一特点，用肉眼观察胶体金的颜色可粗略估计胶体金颗粒的大小。

胶体金在可见光范围内有一个单一吸收峰，这个光吸收峰的波长（ $\lambda_{\max}$ ）在 510 ~ 550nm 范围内，随胶体金颗粒大小而变化，大颗粒胶体金的 $\lambda_{\max}$ 偏向长波长；反之，小颗粒胶体金的 $\lambda_{\max}$ 则偏于短波长。

表 6-1 四种粒径胶体金的制备及特性及 $\lambda_{\max}$

胶体金粒径 (nm)	柠檬酸三钠加入量 (mL)	胶体金特性呈色	$\lambda_{\max}$
16	2.00	橙色	518nm
24.5	1.50	橙红	522nm
41	1.00	红色	525nm
71.5	0.70	紫色	535nm

6.1.2 免疫金的特性

6.1.2.1 免疫金的定义

胶体金可以和蛋白质等各种大分子物质结合，在免疫组织化学技术中，习惯上将胶体金结合蛋白质的复合物称为金探针。用于免疫测定时胶体金多与免疫法性物质（抗原或抗体）结合，这类胶体金合物常称为免疫金复合物，或简称免疫金。

6.1.2.2 免疫金的特点

免疫金的形成机制尚不清楚，一般认为是胶体金与蛋白质的物理吸附作用。由于胶

体金表面带有一层阴性电荷,与蛋白质表面的阳性电荷通过静电感应相吸附。因此环境的 pH 值和离子强度是影响吸附的主要因素,其他如胶体金颗粒的大小,蛋白质的分子量及其浓度等也会影响蛋白质的吸附。

6.2 胶体金的制备

胶体金的制备方法很多,其中应用较为广泛的是还原法,而分散法和其他凝聚法都不合乎要求。还原法的基本原理是在氯化金溶液中加入一定量的还原剂,使金离子还原为金原子。在医学研究中最常用的还原剂有白磷、乙醇、过氧化氢、抗坏血酸、硼氢化钠、柠檬酸钠及 U 酸等。本节将重点介绍应用上述还原剂制备胶体金的具体方法和步骤,还可根据各实验室的条件及所需合成颗粒的大小,来选择合适的方法。现将常用的几种方法介绍如下:①白磷还原法可合成粒径为 3nm 左右的金颗粒;②白磷还原法经改良后,可合成粒径为 5~12nm 大小的金颗粒;③抗坏血酸还原法可合成粒径为 6~13nm 大小的金颗粒;④柠檬酸三钠还原法可合成粒径为 5nm、15nm、30nm、60nm 大小的金颗粒;⑤乙醇—超声波还原法可合成粒径为 6~10nm 大小的金颗粒;⑥硼氢化钠还原法可合成粒径为 3~17nm 大小的金颗粒;⑦单宁酸—柠檬酸三钠还原法可合成粒径为 3~17nm 大小的金颗粒。主要用单宁酸—柠檬酸三钠还原法、柠檬酸三钠还原法及硼氢化钠还原法,主要根据合成颗粒大小来选择。

6.2.1 胶体金制备前的准备

6.2.1.1 玻璃器皿的清洁

还原法是重结晶过程,颗粒的大小取决于结晶核形成的速度及结晶核生长的速度。因此,用于制备胶体金的玻璃器皿应绝对清洁。因为玻璃表面性状对还原过程的启动有重要作用,少量的污染会影响胶体金的生成,造成颗粒大小不一或液体浑浊。处理方法是将玻璃器皿清洁晾干后,放入清洁液内浸泡 24h,取出后依次用自来水和蒸馏水洗净,凉干,硅化,也可不经硅化。第一次生成胶体金稳定玻璃器皿表面,然后弃去,再用蒸馏水洗后即可再用。最好是所有的玻璃器皿专用化,以减少污染。玻璃器皿表面应无明显的划痕,否则也会影响胶体颗粒的均一度。

6.2.1.2 试剂的配制要求

(1) 配制试剂均用双蒸馏水或三蒸馏水,或用去离子水。

(2) 氯化金水溶液的配制氯金酸 ($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl}$) 每支为 1g 装,用时用蒸馏水一次全部稀释成 1% 水溶液,呈现黄色的透明状,应无任何沉淀,未用完部分可保存在 4℃ 冰箱内,长期使用。

(3) SPA 纯品、特异性抗体或第二抗体必须经亲和层析,琼脂免疫双扩散效价为 1:64 以上才可选用,其他蛋白及受体也需高度纯化。

(4) 白磷或黄磷乙醚溶液的配制

白磷在空气中易燃烧,操作时要小心。把白磷放在蒸馏水中切成小块,放在滤纸上吸干水分后,迅速放入已准备好的乙醚中,轻轻摇动,等完全溶解后即得到饱和溶液,并储藏于棕色密闭瓶内,阴凉处保存。

(5) 其他试剂配制后最好用一定规格的超滤膜过滤,以去除大分子聚合物。

6.2.2 胶体金分散颗粒的制备

胶体金可用多种方法制备,其中应用较为广泛的是化学还原法。这一方法的原理是向一定浓度的金溶液中加入一定量的还原剂使金离子变成金原子,形成金颗粒悬液。目前常用的还原剂有:白磷、乙醇、硼氢化钠、抗坏血酸、柠檬酸钠及鞣酸等。根据不同的还原剂可以制备大小不同的胶体金颗粒。常用来制备胶体金颗粒的方法如下。

6.2.2.1 柠檬酸钠还原法

柠檬酸钠还原法(Frens)制备过程十分简单,制备出的金颗粒均匀一致,因此广为采用。通过改变柠檬酸钠的用量可以制得不同颗粒大小的胶体金,十分方便。

(1) 10nm 胶体金粒的制备:取 0.01% HAuCl_4 水溶液 100mL,加入 1% 柠檬酸钠水溶液 3mL,加热煮沸 30min,冷却至 4℃,溶液呈红色。

(2) 15nm 胶体金颗粒的制备:取 0.01% HAuCl_4 水溶液 100mL,加入 1% 柠檬酸钠水溶液 2mL,加热煮沸 15~30min,直至颜色变红。冷却后加入 0.1mol/L K_2CO_3 0.5mL,混匀即可。

(3) 15nm、18~20nm、30nm 或 50nm 胶体金颗粒的制备:取 0.01% HAuCl_4 水溶液 100mL,加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 柠檬酸钠水溶液 4mL、2.5mL、1mL 或 0.75mL,继续煮沸约 5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒则分别为 15nm、18~20nm、30nm 和 50nm。

表 6-2 并不表明按照 Frens 法只能制备出上述几种颗粒的胶体金,大量研究已表明该法制备胶体金时,颗粒的大小是柠檬酸钠用量的函数,即在一定的范围内任意给定一个柠檬酸钠的量,总有一定大小的胶体金颗粒与它相对应。

表 6-2 柠檬酸钠用量与胶体金颗粒直径的关系

0.01% 氯化金用量 (mL)	1% 柠檬酸三钠加入量 (mL)	胶体金粒径 (nm)
50	2.00	10
50	1.50	15
50	1.00	16.0
50	0.75	24.5
50	0.50	41.0
50	0.30	71.5
50	0.21	97.5
50	0.16	147.0

6.2.2.2 鞣酸-柠檬酸钠还原法

A 液：1% HAuCl_4 水溶液 1mL 加入 79mL 双馏水中混匀。

B 液：1% 柠檬酸钠 4mL，1% 鞣酸 0.7mL，0.1mol/L K_2CO_3 液 0.2mL，混合，加入双蒸馏水至 20mL。

将上述 A 液加热到 60°C ，然后将 B 液快速加入到 A 液中，继续搅拌，在极短的时间内加热到煮沸（大约 10min），此时颜色由黑→蓝→亮红（近似红葡萄酒颜色）变化。将 pH 值调到所要求（根据所标记蛋白质种类的不同，所需的 pH 值也不一样）。上述用量合成的胶体金为 10nm，根据所加入鞣酸（或称单宁酸）量的不同，可合成 3~17nm 颗粒大小的胶体金，在鞣酸-柠檬酸钠还原法中，柠檬酸钠是主要的还原剂；而鞣酸则具有双重作用，既起还原作用，也有保护作用，它控制着“晶核”的形成过程，故可改变鞣酸的用量来制备不同颗粒的胶体金。

表 6-3 鞣酸-柠檬酸钠还原法配制表

胶体金粒径 (nm)	A 液		B 液			
	1% HAuCl_4	双蒸馏水	1% 柠檬酸钠	0.1mol/L K_2CO_3	1% 鞣酸	双蒸馏水
5	1	79	4	0.20	0.70	15.10
10	1	79	4	0.025	0.10	15.875
15	1	79	4	0.0025	0.01	15.9875

6.2.2.3 白磷还原法

(1) 传统法

白磷还原法是建立已有近百年的历史，此法操作较为简单，制备出来的胶体金颗粒大小较一致，因而应用较为广泛，现简单作一介绍。

1) 取 1% 氯化金 1.5mL、0.1mol/L K_2CO_3 1.2mL，加入 120mL 双蒸馏水。

2) 上述溶液充分搅拌混匀 3min 以上。

3) 在搅拌条件下将 1mL 新鲜配制的 20% 饱和白磷乙醚溶液加入上述混合液中，约在 5min 内溶液变为棕红色。

4) 将上述混合液加热煮沸，直至变成鲜明的橙红色为止，一般约需 10min。橙红色的出现表明氯化金的还原反应终止，胶体金制备成功。按上述法制备的金颗粒直径为 $(5.6 \pm 0.9) \text{ nm}$ 。

(2) 现代法

白磷还原法一般只能制备出单一颗粒直径的胶体金。因此，用于电镜双重标记或多重标记时此法显得有些不足，还需结合其他方法。Henegouwen 等发展了传统的白磷还原法，可制备出多种不同直径的胶体金，取得了良好的效果，具体方法如下。

1) 取 0.5mL 新鲜配制的 20% 饱和白磷乙醚溶液，加入到 60mL 用上述方法制备的胶体金中 $(5.6 \pm 0.9) \text{ nm}$ 充分振摇 5min 以上。

2) 将1%氯化金0.75mL及0.1mol/L K_2CO_3 0.6mL加到上述溶液内,振摇数分钟溶液变成棕红色。

3) 将上液煮沸加热,直至变成鲜明的红色,一般需10min。

上述还原过程使胶体金颗粒直径增大,随着还原次数的增加,胶体金颗粒的直径亦越来越大,二者之间的关系见表6-4。

这种方法的特点是通过循环还原的引入使原白磷还原法的适用范围得到扩大,其次,在循环还原过程中氯化金不再形成新的金颗粒,而只与原先的金颗粒结合,使它直径变大。原先加入的胶体金颗粒起着“晶核”的作用。因此可以利用这一方法制备出一系列颗粒直径不同但具有相同颗粒密度的胶体金。

表6-4 白磷还原法制备胶体金颗粒大小与还原次数的关系

还原次数	粒径 (nm)	标准差
0	5.6	0.9
1	6.7	0.9
2	7.9	0.9
4	9.8	1.3
5	12	1.05

在120mL双蒸馏水中加入1.5mL 1%氯金酸和1.4mL 0.1mol/L K_2CO_3 ,然后加入1mL五分之一饱和度的白磷乙醚溶液,混匀后室温放置15min,在回流下煮沸直至红褐色转变为红色。此法制得的胶体金直径约6nm,并有很好的均匀度,但白磷和乙醚均易燃易爆,一般实验室不宜使用。

要得到大小更均匀的胶体金颗粒,可采用甘油或蔗糖密度梯度离心,经分级后制得胶体金颗粒直径的变异系数(CV)可小于15%。

6.2.2.4 乙醇-超声波还原法

- (1) 取1% $AuCl_3 \cdot HCl$ 水溶液1mL加入100mL双蒸馏水。
- (2) 用0.2mol/L K_2CO_3 调pH值为7.2,再加入1mL无水乙醇。
- (3) 用20KC、135W超声波探头浸入溶液内进行超声振荡,此法制备的颗粒为6~10nm。

6.2.2.5 硼氢化钠还原法

- (1) 取0.6mL 1%氯化金水溶液,加入40mL预冷(4℃)双蒸馏水。
- (2) 再加入0.2mol/L K_2CO_3 0.2mL。
- (3) 边搅拌边加入新鲜配制的硼氢化钠水溶液(0.5mg/mL)2mL,至溶液由蓝紫色变为橙红色为止。然后继续搅拌5min,获得的金颗粒直径在2~5nm之间。

6.2.2.6 放射性胶体金制备法

- (1) 取0.01% $AuCl_3 \cdot HCl$ 水溶液100mL,加热至沸腾。

- (2) 加入 40 μL ^{195}Au 。
- (3) 迅速加入 4mL 1% 柠檬酸三钠水溶液, 搅拌 5 ~ 7min, 直至出现透明的橙红色。
- (4) 其含量为脉冲数 $1 \times 10^6/\text{min}$ 。

6.2.3 胶体金的质量鉴定

胶体金的制备并不难, 但要制好高质量的胶体金却也并非易事。因此对每次制好的胶体金应加以检定, 主要检查指标有颗粒大小, 粒径的均一程度及有无凝集颗粒等。

肉眼观察是最基本也是最简单和方便的检定方法, 但需要一定的经验。良好的胶体金应该是清亮透明的, 若制备的胶体金混浊或液体表面有漂浮物, 提示此次制备的胶体金有较多的凝集颗粒。在日光下仔细观察比较胶体金的颜色, 可以粗略估计制得的金颗粒的大小。最好采用分光光度计扫描 λ_{max} 来估计金颗粒的粒径。制备的胶体金作电镜观察, 并选一些代表性的作显微摄影, 可以比较精确地测定胶体金的平均粒径。

若制备的胶体金混浊或液体表面有漂浮物, 提示制备的胶体金有较多凝集颗粒。

6.2.3.1 胶体金颗粒直径测定

用预先处理好的覆有 Formvar 膜的 300 目镍网浸入胶体金溶液内, 取出放在空气中干燥或 37℃ 烤干。于透射电镜下观察其颗粒大小及均匀度, 计算平均直径。如电镜放大 10 万倍, 照片放大 2.5 倍, 则 $10 \text{ 万} \times 2.5 = 25 \text{ 万} = 25 \text{ nm}$ 。理想的金颗粒大小基本相等, 均匀一致, 无椭圆形及多角形的金颗粒存在。

6.2.3.2 胶体金颗粒均匀度的测定

一般需测量 100 个以上的胶体金颗粒, 然后用统计学方法, 计算胶体金颗粒的平均直径及标准差。

6.2.4 影响胶体金颗粒大小的因素

如果总数超过 10% 以上大小不等的金颗粒及椭圆形、三角形金颗粒存在, 应重新制备。其原因如下: ①还原剂不是一次快速加入; ②容器太大或太小, 及在 100℃ 加温时间超过 15min; ③在室温或 4℃ 保存太久; ④低温保存。

6.2.5 胶体金的保存

胶体金在洁净的玻璃器皿中可较长时间保存, 加入少许防腐剂 (如 0.02% NaN_3) 可有利于保存。保存不当时会有细菌生长或有凝集颗粒形成。少量凝集颗粒并不影响以后胶体金的标记。

6.2.6 制备高质量胶体金的注意事项

- (1) 氯金酸易潮解, 应干燥、避光保存。配制时, 最好将整个小包装一次性溶解。

(2) 氯金酸对金属有强烈的腐蚀性, 因此在配制氯金酸水溶液时, 不应使用金属药匙称量氯金酸。

(3) 用于制备胶体金的蒸馏水应是双蒸馏水或三蒸馏水, 或高质量的去离子水, 或在临用前将配好的试剂经超滤或微孔滤膜 ($0.45\mu\text{m}$) 过滤, 以除去其中的聚合物和其他可能混入的杂质。

(4) 用以制备胶体金的玻璃容器必须彻底清洗保证绝对清洁, 用前应先经酸洗并用蒸馏水冲净。最好是经硅化处理的玻璃器皿。硅化的方法是用 5% 二氯甲硅烷的氯仿溶液浸泡数分钟, 用蒸馏水冲净后干燥备用, 否则可能影响生物大分子与金颗粒的结合, 也可影响活化后金颗粒的稳定性, 不能达到预期金颗粒的大小。

(5) 配制胶体金溶液的 pH 值以中性 (pH 值为 7.2) 为好。

6.3 免疫金的制备

免疫金 (immungold) 是指胶体金与抗原或抗体的结合物, 在免疫组织化学染色技术中, 习惯上称之为金探针。

6.3.1 免疫金的制备原理

胶体金颗粒表面带负电荷, 与蛋白质表面带正电荷的基团间靠静电力相互吸引, 达到范德华引力作用范围内即形成牢固的结合, 同时胶体金颗粒的粗糙表面也是形成吸附的重要条件。环境 pH 和离子强度是影响吸附的主要原因, 其他如胶体金颗粒的大小、蛋白质的分子量及蛋白质浓度等也会影响胶体金和蛋白质的吸附。

6.3.2 待标记蛋白质的准备

6.3.2.1 透析除盐

蛋白质在提取和纯化过程中会保留一部分盐类成分, 但用于胶体金标记的蛋白质应尽量降低电解质的成分, 因此, 在用前必须将多余的电解质除去。因为过高的盐类物质会降低胶体金颗粒的 Zeta 电位, 影响蛋白质的吸附。方法: 将待标记的蛋白质装入透析袋中, 用蒸馏水或低浓度的盐水 (0.005mol/L NaCl , pH 值为 7.0) 透析 2h。

6.3.2.2 去除聚合的蛋白质

对于长期低温保存的蛋白质, 特别是浓度超过 2mg/mL , 很容易形成聚合物, 这些聚合物可影响标记效率及胶体金探针的稳定性, 因此在标记前应离心除去, 用时以 100000r/min 于 4°C 离心 1h 即可。调整蛋白质浓度至 1mg/mL 即可用于标记。

6.3.3 胶体金 pH 值的调整

胶体金与蛋白质的结合成功与否, 取决于 pH 值, 一般只有在蛋白质等电点略偏碱性的条件下, 二者才能牢固地结合, 因此, 标记之前须将胶体金溶液的 pH 值调至标记

蛋白质的等电点略偏碱性。一般可用 0.1mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调高或调低 pH 值。由于金溶胶会损害 pH 计探头, 故采用 pH 试纸测定 pH 值。几种常用的蛋白质标记时, 胶体金所用 pH 值见表 6-5。

表 6-5 胶体金合成中各种蛋白、酶的等电点

蛋白	pH 值	蛋白	pH 值
IgG	9.0	DNA 酶	6.0
$F_{(ab)2}$	7.2	RNA 酶	9.0~9.2
McAb	8.2	低密度脂蛋白	5.5
SPA	5.7~6.2	亲和素	10~10.6
HRP	7.2~8.0	链霉亲和素	6.4~6.8
BSA	5.2~5.5	凝集素	8.0
胰岛素~BSA	5.3	A-球蛋白	6.0
亲和层析 IgG	7.6	霍乱毒素	6.9
大豆凝集素	6.1	破伤风毒素	6.9

6.3.4 确定胶体金与待标记蛋白质用量

6.3.4.1 目测法

根据具体的小批量半成品试验结果确定最佳的上述试验指标。通常采用试制一种与最终检测产品尽可能近似的简易检测产品以确定小批量胶体金结合物的最佳指标。对于基于膜基础上的检测分析来说, 通常采用仅需要捕获抗体、纯化抗原的最简易检测方法来评价小批量的胶体金结合物, 在不必面临相关干燥技术、样本缓冲液等技术指标的情况下确定胶体金结合物的最佳制备条件。

为了满足上述试验的要求, 常常需要 3mg 抗体或者 5mg 抗原。采用小样样本, 能够获得最优化的胶体金结合物生产指标和最优的胶体金标记技术指标。以上指标一经确定, 就可以直接批量、可重复生产出高质量的胶体金标记抗体或抗原。

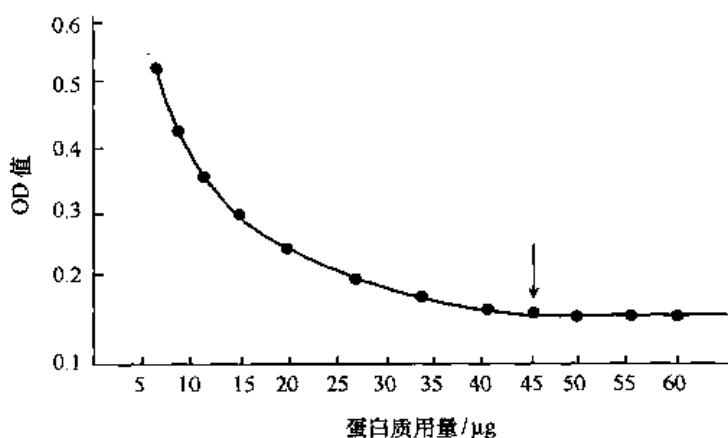
将待标记的蛋白质逐级稀释后, 以 5~40 μ g 各取等体积顺序加入一系列装有 1mL 胶体金的试管中, 另设一不加蛋白的对照管, 混匀。5min 后, 再于上述各管中分别加入 0.1mL 10% NaCl 溶液, 混匀后, 静置 20min, 观察结果。未加蛋白质和加入蛋白质的量不足以稳定胶体金的试管, 呈现由红变蓝的聚沉现象, 而加入蛋白质质量达到最低稳定量的试管则保持红色不变。其中蛋白质最低的试管即含稳定 1mL 胶体金的必需蛋白质量。在此基础上再加 10%~20%, 即为稳定蛋白质的实际用量〔设 X = 加入蛋白质量, $X + (X \times 10\%) =$ 每毫升胶体金需加蛋白量〕, 见图 6-1; 或加入 BSA 使其最终浓度为 5%。

用于测定颗粒直径为 5nm 的胶体金标记蛋白质的用量, 测定时必须在每毫升金溶液中加入 30% H_2O_2 10 μ L, 用 0.1mol/L K_2CO_3 调 pH 值至待标记蛋白质的等电点, 再加入蛋白质溶液 (5~40 μ g) 和 100 μ L 10% NaCl, 5min 后观察结果, 不出现蓝色絮状物

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
① 胶体金/mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
② 标记蛋白/ μL	4	8	16	20	26	30	35	40	80	0
③ 10%NaCl/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

图 6-1 胶体金待标记蛋白质用量比例测定示意图

的试管即是足以稳定胶体金的蛋白质质量。一般羊抗兔 IgG 适量为 $27\mu\text{g/mL}$ 胶体金溶液，葡萄球菌 A 蛋白适量为 $15\mu\text{g/mL}$ 胶体金溶液。

图 6-2 蛋白质用量 (μg)

6.3.4.2 光电比色法

制备一系列不同浓度的等体积蛋白质溶液 (1mL)，分别加入 5mL 胶体金，迅速混匀，各加入 1mL 10% NaCl 溶液，摇匀，静置 5min 后测各管 OD 值。根据胶体金颗粒大小，决定 OD 值波长，一般在 520 ~ 580nm 之间，测完后，绘制曲线图，以 OD 值为纵坐标，蛋白质用量为横纵标作一曲线，取曲线最先与横轴水平的那一点为蛋白质用量最稳定量。图 6-2 中 10nm 的胶体金溶液中蛋白质的最适稳定量为 $40\mu\text{g/mL}$ 。

6.3.5 免疫金的标记技术

免疫金标记技术是一种将胶体金颗粒与包括抗原、抗体在内的许多蛋白质偶联而形成免疫金复合物的标记技术。除了许多领域应用以外，该技术目前主要应用于疾病的快速检测诊断和临床监测领域。如同其他标记结合物一样，采用优质的试剂（包括蛋白质和胶体金）、拥有丰富的生产经验以及对最终客户免疫金操作技术培训方面知识体系是该技术取得成功的关键。

6.3.5.1 蛋白质的偶联

在体外诊断试剂生产领域,通常采用抗原或抗体与免疫金结合制备免疫金结合物。偶联抗体采用单克隆抗体或多克隆抗体,是影响抗体偶联的因素之一。

除了临床诊断中常见 IgG 抗体以外, IgM、IgE 和 IgA 抗体也可以偶联上胶体金。偶联抗体时,必须考虑抗体的亚型。例如在小鼠 IgG 亚型中, IgG₁ 亚型最容易偶联胶体金,而将 IgG₃ 亚型偶联胶体金面临较大的技术难题。

将抗原偶联胶体金也面临不同的技术难题。将常见的蛋白质抗原偶联上胶体金比较容易,但前提为结合到抗原上的胶体金对蛋白质抗原决定簇的影响小于 50%。因此,免疫金和蛋白质结合方式是研发成功的关键。

6.3.5.2 胶体金与蛋白质偶联的机理

研究人员普遍认为,三种特异的氨基酸残基在胶体金与蛋白质的偶联作用中发挥着重要的作用,而赖氨酸、色氨酸和半胱氨酸这三种氨基酸残基与胶体金偶联的作用机理各不相同。赖氨酸带有较强的负电荷,因而能够吸附带负电荷的胶体金颗粒,色氨酸主要通过疏水相互作用与胶体金相偶联,半胱氨酸通过 SH- 与胶体金颗粒以共用电子的形式形成配位键。抗体通过这几种作用力与胶体金颗粒牢固、稳定地结合在一起。

在很大程度上,蛋白质与胶体金的偶联成功与否取决于上述三种氨基酸残基在蛋白质上的位置。在某种情况下,结合胶体金的氨基酸残基定位于蛋白质的活性部位,从而干扰蛋白质的反应活性。当这几种氨基酸残基定位于抗体的抗原结合部位或抗原的特异抗体结合决定簇部位时,如果偶联胶体金颗粒的蛋白质分子未做特定的处理就不可能克服这种空间位阻的干扰作用。

这三种与胶体金颗粒偶联相关的氨基酸残基在蛋白质中适合的定位对于达到最佳的检测灵敏度非常重要。就标记抗体来说,这三种氨基酸应定位于 F₁ 区,而对于标记抗原,它们应远离抗原的反应决定簇位置。

6.3.5.3 结合的优化

在开发、优化单一标记的胶体金结合物时,通常制备小批量的大约几十种不同的胶体金结合物。每种胶体金结合物在某一关键制备步骤与其他胶体金结合物不同,从而确定哪种胶体金结合物对于最终的检测分析是最佳的符合反应需要的胶体金结合物。这项调试应该包括所有可以改善胶体金结合物的灵敏度、交叉反应以及潜在稳定性的技术参数。用来检测的指标应包含抗体工作缓冲液、防腐剂的类型、盐度、表面活性剂含量、胶体金颗粒的尺寸、封闭剂的类型、总蛋白浓度、结合物工作缓冲液以及结合物的浓度等诸多方面的影响因素。例如,为了确定不同封闭剂的效果,可以按以下步骤进行调试:①封闭剂的类型(如 BSA、卵清蛋白、人血清白蛋白、PEG、非特异性 IgG);②封闭剂的纯度;③封闭剂的含量;④封闭剂对整个测试反应的兼容性。

6.3.6 胶体金标记蛋白质的纯化

纯化的目的就是除去其中未标记的蛋白质、未充分标记的胶体金及在标记过程可能形成的各种聚合物。其纯化方法有超速离心法、色谱柱法以及以上二者相结合应用。

6.3.6.1 超速离心法

根据胶体金颗粒大小不同及蛋白质种类不同,离心的转速和时间也不同。用牛血清白蛋白稳定的胶体金标记羊抗兔 IgG,可先从低速离心(20nm 颗粒用 250r/min; 5nm 用 4800r/min, 20min),弃去聚集的金颗粒所形成的沉淀,然后将上清液 5nm 金标记物用 60000r/min 于 4℃ 离心 1h, 20nm 和 40nm 金标记物用 14000r/min 于 4℃ 离心 1h。小心地吸出上清液,将管底沉淀再用 1% 牛血清白蛋白缓冲液混悬至原量,平衡过夜后,重复离心 2 次,最后一次洗涤离心的沉淀,再用 1% 牛血清白蛋白缓冲液(含 0.02mol/L NaN_3)稀释到 1:20。40nm 金颗粒在 $\lambda_{520\text{nm}}$ 检验吸光度为 0.35; 20nm 金颗粒为 0.30; 5nm 金颗粒为 0.25。制备的免疫金可保存于 4℃,如加入 50% 甘油可储于 -18℃ 以下保存 1 年以上。

以聚乙二醇稳定的葡萄球菌 A 蛋白标记胶体金,按胶体金制备方法及所得颗粒大小不同,可用不同离心转速分离纯化。以白磷还原法制备的 5.0nm 胶体金 A 蛋白,采用 125000r/min 离心;抗坏血酸法制备的 11.3nm 胶体金 A 蛋白,用 150000r/min 离心 45min,可见离心管底部附贴有小片紧密的沉淀,其上为较疏松的红色沉积物,再上为透明的上清液。附贴管底的沉淀无用,以后操作步骤中不要搅起来,仍保持其贴于管底。弃去上清液后,用等体积的 0.01 mol/L PBS (pH 值为 7.2) 溶解疏松红色沉积物,同上重复离心 1 次,小心移去上清液,剩余 0.5 mL 上清液,将疏松红色沉积物溶解后,即为初步提纯的金标-A 蛋白试剂。

6.3.6.2 凝胶过滤法

凝胶过滤法必须以 BSA 为稳定剂。将前述胶体金-蛋白质复合物装入透析袋内,置硅胶中浓缩至原体积的 1/10 左右,用蒸馏水冲洗软化透析袋后,取出浓缩液,以 15000r/min 离心 15min (或用上述离心法纯化后的胶体金,再进一步用此方法纯化)。吸取上清液加到丙烯葡聚糖: S-400 (Sephacryl S-400, Pharmacia 公司产品, Sweden) 色谱柱上分离纯化。柱床高 20cm, 直径 0.8cm, 加样体积为柱床体积的 1/10。用 0.02mol/L TBS 液(内含 0.1% BSA, 0.05 mol/L NaN_3 , pH 值为 8.2 者用于胶体金标记 IgG, pH 值为 7.0 者用于胶体金标记蛋白 A) 洗脱,流速为 8mL/h,按红色深浅分管收集洗脱液。可见先滤出的液体呈微黄色,有时略浊,内含大颗粒聚合物等杂质。纯化的金标记蛋白滤出液随浓度增加而红色逐渐加深,清亮透明,此后为略呈黄色的未标记蛋白组分。表 6-6 列出胶体金与蛋白质结合后,用离心法纯化的条件。表 6-7 列出几种免疫金离心纯化的条件,仅供参考。

表 6-6 超速离心转速与金颗粒直径的关系

粒径 (nm)	离心力 (r/min)	粒径 (nm)	离心力 (r/min)
2 ~ 3	125000	10 ~ 15	64000
4 ~ 5	120000	15 ~ 20	14000
6 ~ 8	100000		

表 6-7 几种免疫金离心纯化条件

粒径 (nm)	pH 值	标记蛋白	离心力 (r/min)	时间 (min)
5	9.0	羊抗人 IgG	45000	45
10	8.2	McAb	45000	30
15	6.5	链霉亲和素	120000	45
20	6.0	SPA	120000	30
10	9.0	羊抗兔 IgG	120000	30

6.3.6.3 最为常见的标记步骤

(1) 用 0.1mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调节金溶胶至所需 pH 值 (标记 SPA 时调到 pH 值为 6.0)。

(2) 于 100mL 金溶胶中加入最佳标记量的蛋白质溶液 (体积为 1 ~ 2mL), 搅拌 2 ~ 3min。

(3) 加入 5mL 1% PEG20000 溶液。

(4) 于 10000 ~ 100000r/min 离心 30 ~ 60min (根据粒径大小选择不同离心条件), 小心吸去上清液 (切忌倾倒)。

(5) 将沉淀悬浮于一定体积分含 0.2 ~ 0.5mg/mL PEG20000 的缓冲液中, 离心沉淀后, 再用同一缓冲液恢复, 浓度以吸光值 $A(1cm/540nm) = 1.5$ 左右为宜, 以 0.5mg/mL 叠氮钠防腐, 置 4℃ 保存。

(6) 包被后的金溶胶也可浓缩后于 Sephadex G-200 柱进行凝胶层析分离纯化, 以含 0.1% BSA 的缓冲溶液洗脱。通常用 IgG 包被的金溶胶洗脱液 pH 值为 8.2, 以 A 蛋白包被的金溶胶洗脱液 pH 值为 7.0。

6.3.7 免疫金标记原料的质量要求

用于制备免疫金结合物的特异抗体的稳定性取决于检测试验的生产技术条件。单克隆抗体是侧向层析分析中最佳的抗体类型。在这类检测分析中, 一种单克隆抗体标记胶体金颗粒作为指示剂, 而另一种单克隆抗体被固着于硝酸纤维素膜上作为捕获剂, 而检测抗原上这两种单克隆抗体的相应抗原决定簇在空间位置上距离较远。在侧向层析分析中使用的多克隆抗体必须经过 A 蛋白柱层析纯化, 在多数情况下, 亲和层析纯化的胶体金标记抗体具有较高的敏感性和特异性。

6.3.7.1 亲和纯化

硫酸铵沉淀或 DEAE 纯化的血清含有大量的可竞争性结合胶体金颗粒表面结合位点的杂蛋白, 这些含有影响胶体金颗粒结合的三种氨基酸残基的杂蛋白很容易与带负电荷的裸露的胶体金颗粒结合, 从而影响检测分析的结果并降低检测分析的灵敏度; 如果采用 A 蛋白或 G 蛋白柱层析纯化抗体作为胶体金结合物标记原料, 由于抗体原料中含有大量的非特异性的 IgG, 导致胶体金结合物中含有大量非特异性的胶体金结合物, 从而降低检测分析的灵敏度。从层析柱上洗脱下的高亲和抗体的亲和层析纯化可以获得高亲和抗体, 从而可以产生高特异性的胶体金结合物。虽然亲和纯化方法耗费大量的时间、经费、血清, 但是通过该方法可以获取任何免疫分析所必需的关键原料——高质量的结合物。

6.3.7.2 抗原的偶联

成功偶联抗原的关键取决于抗原的分子量和抗原上决定抗原与胶体金颗粒偶联的三种氨基酸残基的空间位置。在体外诊断试剂的检测中, 例如竞争法检测抗原、夹心法检测抗体时, 需要胶体金标记抗原。在这种情况下, 通常选择 40nm 胶体金颗粒作为标记物。经大量研究发现, 40nm 胶体金颗粒标记的蛋白分子量下限为 30kD。在某种条件下, 通过特异的标记技术可以将 40nm 胶体金颗粒的标记下限降低到 15kD。可标记胶体金颗粒的蛋白质分子量下限, 并可以保证蛋白质有足够数量的赖氨酸、色氨酸和半胱氨酸残基与胶体金颗粒相结合。如果蛋白质抗原含有的半胱氨酸残基数量不够, 抗原和胶体金颗粒之间的结合力相对较弱, 尤其存在较高亲和力的抗体时抗原与胶体金颗粒之间的偶联容易断裂, 这样的结合就不稳定。所以一定要保证蛋白质有足够数量的赖氨酸、色氨酸和半胱氨酸残基与胶体金颗粒相结合。

对于分子量低于 30kD 的抗原, 通常采用较小的胶体金颗粒进行标记, 造成由于检测线处的胶体金颗粒小、可见度低, 可能会导致检测的灵敏度降低。

对于含有较少或者没有上述三种特异氨基酸残基的抗原, 可以通过预先偶联载体分子, 比如 BSA 或 KLH。这种预先偶联载体分子的方法比较复杂, 有较强的专业基础。必须谨慎考虑连接物类型、长度以及半抗原与 BSA 的比例、载体分子类型等因素, 确保抗原反应活性部位, 如抗原决定簇无空间位阻, 制备可重复生产的具有最大敏感性的蛋白载体胶体金结合物。

胶体金颗粒大小的选择取决于胶体金结合物的用途。如下段落描述了两个最常用的胶体金应用领域: 显微检测技术和快速诊断技术。

1~40nm 的胶体金结合物可以应用于电子显微镜和光学显微镜检测领域。即使在透射电镜放大 25 万倍的情况下, 人们也不可能看到 1~2nm 的胶体颗粒。利用银增强胶体金技术可以让终端客户能够看到胶体金标记的这种较小的抗原性位点, 银增强染色技术是指通过银盐在胶体金颗粒表面沉积, 使胶体金颗粒增大到在显微镜下能观察的尺寸。该技术具有批间差异小、效率高、易控制的特点。1~2nm 的胶体金颗粒便于接近抗原决定簇位点, 不存在较大的胶体金颗粒有空间位阻等缺点。因而, 这种较小的胶体

金颗粒便于在特异位点结合,而且一旦在抗原表面定位后也易于银增强染色技术实现。在不采用银增强染色电镜技术的情况下,可以用相同胶体金结合物标记几个不同的抗原决定簇反应部位。例如,采用可分辨的胶体金标记特异不同决定簇反应位点的抗体。

40nm 的胶体金颗粒对于分子量为 160kD、长度为 8nm 的 IgG 分子拥有最小的空间位阻和最大的敏感性。40 ~ 100nm 的胶体金颗粒比较容易偶联到 IgG 抗体上。较大颗粒的胶体金比 40nm 胶体金颗粒有较大的敏感性,但在 520nm 处较大胶体金颗粒在 1mL 溶液中的光吸收较小,而且较少在检测线处被捕获。同 40nm 或 60nm 胶体金标记的抗体相比,较大颗粒的胶体金结合物对 1 ~ 10ng/mL 分析物具有较低的灵敏度,虽然 60nm 胶体金颗粒可以应用于体外诊断试剂的技术中,但实际应用中很少用于体外诊断试剂的技术中。60nm 胶体金颗粒与 40nm 胶体金颗粒的颜色稍微不同。优质的 40nm 胶体金为鲜红色,而 60nm 胶体金为深粉红色。在某种情况下,样本可使膜着色引起背景颜色,可以将这种轻微的颜色差异识别。如果用于标记分子的分子量小于 160kD,20nm 胶体金颗粒更适合用于标记结合物。20nm 胶体金颗粒通常用于标记链霉亲和素、A 蛋白和分子量小于 60kD 的抗原分子。

随着快速诊断领域的技术进步,胶体金结合物的灵敏度逐步提高。目前,在大多数快速诊断分析中,检测下限达到 1ng/mL。如果采用高质量的抗体,快速诊断分析检测下限甚至可以达到 10pg。随着银增强技术对检测灵敏度的进一步提高,或许检测灵敏度会提高 10 ~ 100 倍。

6.3.8 免疫金的质量鉴定

6.3.8.1 金颗粒的大小及均匀度

用有 Formvar 支持膜的镍网蘸取金标记试剂,空气干燥后,透射电镜下观察金颗粒的大小及均匀度,计算平均直径,如电镜放大倍数 10 万,照片放大为 2.5 倍,100000 $\times$ 2.5 = 250000 = 25nm。空气中干燥后乙酸铀负染,在透射电镜下观察,可见金颗粒周围有一明显的空晕,表示颗粒表面吸附着蛋白质分子。

支持膜(火棉胶膜)的制备;50mL 15% 的火棉胶 + 50 mL 乙酸戊酯,制得 2.5% 的乙酸戊酯火棉胶。

6.3.8.2 用免疫细胞化学滤纸模型鉴定免疫金制剂的特异性和敏感性

在 Whatman I 号滤纸条上滴加 2 μ L 的抗原溶液(含抗原量分别为 1 μ g、100ng、10ng、3ng 和 1ng),干燥后,纸条在甲醛蒸气中固定。加适当稀释的抗体作用 1h,用 TBS (0.05mol/L pH 值为 7.4 Tris 缓冲液,含 0.15mol/L NaCl),1% TritonX - 100 洗 3 次,每次 10min。随后,纸条再用洗脱 Sephacryl s - 400 柱的相同洗脱缓冲液洗 10min,再滴加不同稀释度的金标探针孵育 1h。纸条再用 TBS - Triton 缓冲液洗 3 次,每次 10min。用 TBS (不含 TritonX - 100)洗 10min。再用双蒸馏水洗 3 次各 5min。用银显影液显影 30 ~ 40min 用双蒸馏水洗终止显影。

也可用下法试验免疫金:将系列稀释的 1:100、1:200、1:500、1:1000 和 1:10000

的正常兔血清 2 μ L 分别滴加在滤纸条上, 然后用甲醛蒸气固定, 纸片再用适当稀释的羊抗兔 IgG 免疫金在室温中孵育 1h, 洗涤, 再按上述方法用银显影。这方法可以初步测定免疫金的质量, 也可用于一些抗原分析研究。

6.3.9 免疫金的保存

免疫金复合物最终用稀释液配制成工作浓度保存。稀释液通常是含稳定剂的缓冲液; 缓冲溶液常用中性的 PBS 或 Tris 缓冲液。多种蛋白质、葡聚糖、PEG2000、明胶等均为良好的高分子稳定剂, PEG 和 BSA 是最常用的稳定剂。

6.4 免疫金测定技术

胶体金标记技术由于标记物的制备简便, 方法敏感、特异, 不需要使用放射性同位素, 或有潜在致癌物质的酶显色底物, 也不要荧光显微镜, 它的应用范围广, 除应用于光镜或电镜的免疫组化法外, 更广泛地应用于各种液相免疫测定和固相免疫分析以及流式细胞技术等。

6.4.1 液相免疫测定法

将胶体金与抗体结合, 建立微量凝集试验检测相应的抗原, 如间接血凝一样, 用肉眼可直接观察到凝集颗粒。利用免疫学反应, 金颗粒凝聚导致颜色减退的原理, 建立均相溶胶颗粒免疫测定法 (Sol particle immunoassay, SPIA) 已成功地应用于 PCG 的检测, 直接应用分光光度计进行定量分析。

6.4.2 金标记流式细胞技术

胶体金可以明显改变红色激光的散射角, 利用胶体金标记的羊抗鼠 Ig 抗体应用流式细胞术, 分析不同类型细胞的表面抗原, 结果胶体金标记的细胞在波长 632nm 时, 90°散射角可放大 10 倍以上, 同时不影响细胞活性。而且与荧光素共同标记, 彼此互不干扰。

6.4.3 胶体金固相免疫测定法

6.4.3.1 斑点金免疫渗滤测定法

斑点金免疫渗滤测定法 (dot immuno - gold filtration assay, DIGFA) 的原理完全同斑点免疫金染色法, 只是在硝酸纤维膜下垫有吸水性强的垫料, 即为渗滤装置。在加抗原 (抗体) 后, 迅速加抗体 (抗原), 再加金标记第二抗体, 由于有渗滤装置, 反应很快, 在数分钟内即可显出颜色反应。此方法已成功地应用于人的免疫缺陷病病毒 (HIV) 的检查和人血清中甲胎蛋白的检测。

(1) 原理

斑点金免疫渗滤试验 (dotimmunogold filtration assay, DIGFA) 是在以硝酸纤维素膜为载体, 并包被了抗原或抗体的渗滤装置中, 依次滴加标本、免疫金及洗涤液, 因微孔

滤膜贴置于吸水材料上故溶液流经渗滤装置时与膜上的抗原或抗体快速结合并起到浓缩作用,达到快速检测目的(一般5min左右完成)。阳性反应在膜上呈现红色斑点。

(2) 技术类型

①双抗体夹心法将抗体包被在硝酸纤维素膜中央,滴加待检标本,若标本中有待测抗原则在渗滤过程中与膜上抗体结合,然后滴加胶体金标记抗体,加洗涤液洗涤后,阳性者即在膜中央呈红色斑点(胶体金聚集)。

②间接法将抗原包被在硝酸纤维素膜上,依次滴加待测标本、洗涤液和胶体金标记抗人G抗体,再加洗涤液洗涤,阳性者即在膜中央呈红色斑点(胶体金聚集)。该法由于人血清标本中非目的IgG的干扰,易产生假阳性结果,临床上较少用。

(3) 技术要点

1) 试剂盒组成

①渗滤装置,是斑点金免疫渗滤试验试剂盒中主要组成成分之一(图6-3),由塑料小盒、吸水垫料和点加了抗原或抗体的硝酸纤维素膜片三部分组成;

②胶体金标记物;

③洗涤液。

2) 技术要点

①将渗滤装置(或称反应板)平放于实验台面上,于小孔内滴加待测标本1~2滴,待完全渗入;

②于小孔内滴加免疫金试剂1~2滴,待完全渗入;

③于小孔内滴加洗涤液2~3滴,待完全渗入;

④在膜中央显示清晰的淡红色或红色斑点者判为阳性反应,反之则为阴性反应。斑点呈色的深浅相应地提示阳性程度。

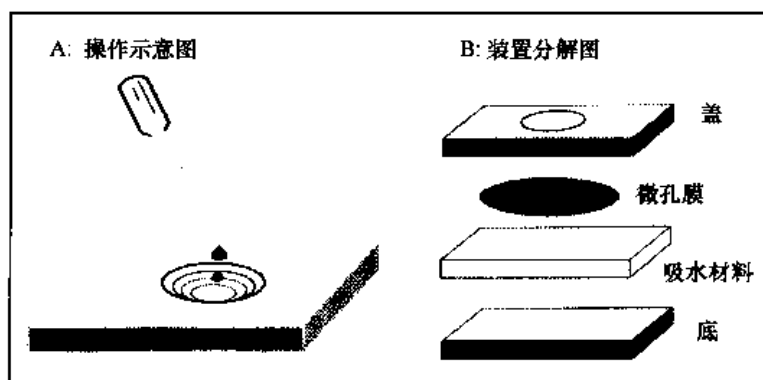


图6-3 斑点金免疫渗滤试验装置及操作示意图

6.4.3.2 斑点金免疫层析试验

(1) 原理

斑点金免疫层析试验(dot immunogold chromatographic assay, DICA)是将胶体金标记技术和蛋白质层析技术相结合的以硝酸纤维素膜为载体的快速的固相膜免疫分析技

术，与斑点金免疫渗滤试验的过滤性能不同，DICA 中滴加在膜一端的标本溶液受载体膜的毛细管作用向另一端移动，犹如层析一般，在移动过程中被分析物与固定于载体膜上某一区域的抗体或抗原结合而被固相化，无关物则越过该区域而被分离，然后通过胶体金的呈色条带来判断实验结果。

(2) 技术类型

① 双抗体夹心法

如图 6-4 所示，G 处为金标特异性抗体（兔型），T 处包被了特异性抗体（兔型），C 处包被羊抗兔免疫球蛋白抗体，B 处为吸水纸。测试时 A 端滴加待测标本，通过层析作用，待测标本向 B 端移动，流经 G 处时将金标特异性抗体复溶，若待测标本中含待测抗原，即形成金标特异性抗体-抗原复合物，移至 T 区时，形成金标特异性抗体-待测抗原-特异性抗体复合物，金标特异性抗体被固定下来，在 T 区显示红色线条，呈阳性反应，多余的金标记特异性抗体移至 C 区被羊抗兔免疫球蛋白抗体捕获，呈现红色质控线条。

② 竞争法

如图 6-5 所示，G 处为金标特异性抗体（兔型），T 处包被了标准抗原，C 处包被了羊抗兔免疫球蛋白抗体。测试时待测标本加于 A 端，若标本中含有待测抗原，流经 G 处时结合金标特异性抗体，当混合物移至 T 处时，因无足够游离的金标特异性抗体与膜上标准抗原结合，T 处无棕红色线条出现，实验结果为阳性，游离金标特异性抗体或金标特异性抗体复合物流经 C 处，与该处的羊抗兔免疫球蛋白抗体结合出现棕红色的质控带；若标本中不含待测抗原，金标特异性抗体则与 T 处膜上的标准抗原结合，在 T 处出现棕红色线条，实验结果为阴性，而质控带仍然出现棕红色线条。

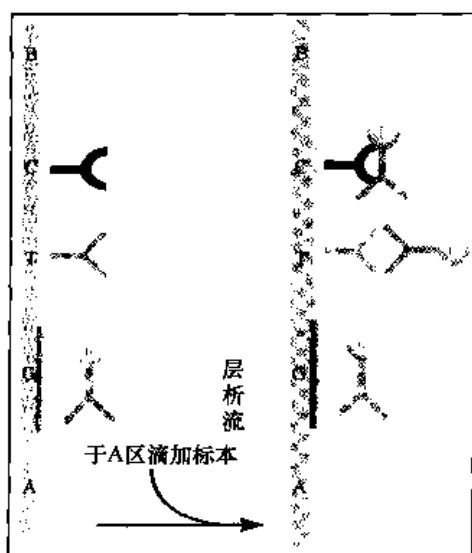


图 6-4 免疫层析试验双抗体夹心法检测大分子抗原原理示意图

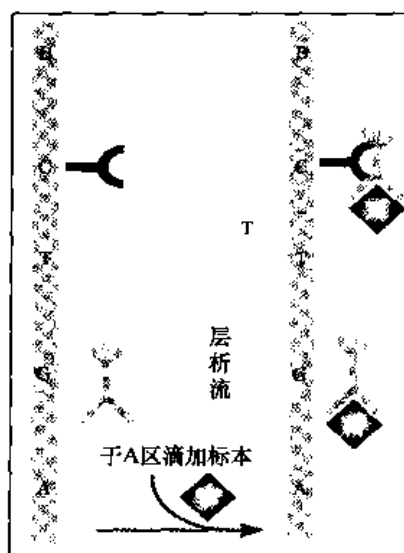


图 6-5 免疫层析试验竞争法检测小分子抗原原理示意图

③间接法

待测血清标本中大量的非特异性 IgG 与特异性 IgG 竞争结合金标记兔抗人免疫球蛋白抗体, 会降低试验敏感性, 为了消除其影响, 胶体金间接免疫层析法测抗体常设计成反流免疫层析法 (图 6-6)。

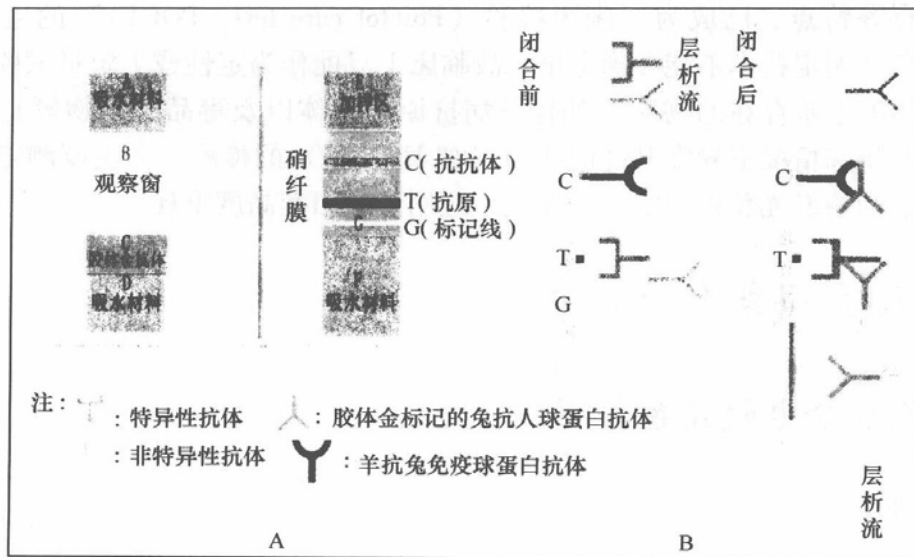


图 6-6 间接法

测试卡分成可左右折叠的两部分, 右面中央纵向贴有 NC 膜条, 膜上 T 处包被有已知抗原, C 处包被了羊抗兔免疫球蛋白抗体, E 处为含能与蛋白结合的有色染料的标本加样区, F 处为吸水材料; 左面中央开有观察窗口 B, G 处固定有金标记兔抗人免疫球蛋白抗体, A、D 处为吸水材料。测定时先将缓冲液加在 D 处层析至 G 处使金标记兔抗人免疫球蛋白抗体复溶, 然后, 将标本加在 E 处使其与染料一起在膜的层析作用下向 F 端移动, 若标本中有待测抗体存在, 则与膜上抗原结合形成抗原抗体复合物, 待有色染料延伸至膜上标记线 G 处时, 在 F 处加缓冲液, 合上测试卡, A 处的强大吸水作用使膜上液体反向流动, 标本中非特异性抗体及无关物向 E 处反向层析, 随后而来的金标兔抗人免疫球蛋白抗体与抗原抗体复合物结合, 出现棕红色线条, 过量金标兔抗人免疫球蛋白抗体层析至 C 处, 与羊抗兔免疫球蛋白抗体结合, 出现棕红色质控线条。若标本中不含待测特异性抗体, 金标兔抗人免疫球蛋白抗体则不能固定在膜上 T 处已知抗原上, 使在 T 处不出现棕红色线条, 实验结果为阴性, 而质控带仍然出现棕红色线条。该法有效地排除了非特异性抗体对测试的干扰。

(3) 技术要点

①试剂盒组成主要成分为胶体金层析条, 所用试剂全部为干试剂, 它们被组合在一试剂条上。

②操作要点以双抗体夹心法为例, a 将试剂条标记线一端浸入待测标本中 2~5s 或标本加样处加一定量待检标本, 平放于水平桌面上; b 5~20 min 内观察结果; c 结果判断: 出现一条棕红色质控条带为阴性, 出现两条棕红色条带为阳性, 无棕红色质控条

带出现则试剂失效。

6.4.3.3 应用及评价

本法具有操作简便、快捷以及操作人员不需技术培训, 无需特殊仪器设备, 试剂稳定、便于保存等特点, 已成为“床边检验 (Pointof care test, POCT)”的主要方法之一。由于金免疫测定技术不能准确定量, 故临床上只能作为定性或半定量试验, 目前主要应用正常体液中不存在的物质 (如传染病抗原和抗体以及毒品类药物等) 和正常含量极低而且在特殊情况下异常升高的物质 (如 HCG 等) 的检测。金免疫测定技术灵敏度不及酶标法和酶发光免疫测定法, 在临床应用中应引起高度重视。

6.5 免疫金组织化学技术

6.5.1 免疫金电镜染色技术

6.5.1.1 原理

本法是由 Geoghegan 等 (1978 年) 首次应用金标探针检测 B 淋巴细胞表面抗原, 将胶体金颗粒 (大于 20nm) 标记在第二抗体或 SPA 分子上, 制备成金标二抗; 其原理是当特异性抗体与抗原结合后, 用金标二抗或金标 SPA 与特异性抗体结合, 形成抗原-抗体-金标抗体复合物, 此时在光镜 (10×100 倍) 下可见红色颗粒物, 即为抗原-抗体结合物。该方法称为免疫金染色 (immunogoldstaining, IGS)。其特点简便、快速 (因不需银显影), 要求金标抗体浓度高, 而且金颗粒直径大于 20nm。

6.5.1.2 技术要点

(1) 标本包埋用戊二醛固定标本, 后进行锇酸固定 (固定膜结构), 丙酮或乙醇脱水, 包埋 (Epon812 树脂), 超薄切片 (80 nm), 置 300 目镍网上。

(2) 免疫组化染色白蛋白封闭, 加第一抗体, 孵育, PBS 冲洗, 卵白蛋白封闭, 加第二抗体 (胶体金标记 IgG), 孵育, PBS 冲洗, 蒸馏水冲洗, 醋酸双氧铀、枸橼酸铅复染, 电镜观察。

6.5.1.3 IGS 间接法染色步骤

(1) 4μm 石蜡切片常规脱蜡至水, 0.05mol/L (pH 值为 7.4) TBS 洗 2×3min。

(2) 1% 卵蛋白 [EA, 用 0.05mol/L (pH 值为 7.4) TBS 稀释] 温育 15 min, 不洗。

(3) 加入适当稀释特异性抗体, 37℃ 温育 1h, 0.05mol/L (pH 值为 7.4) TBS 洗 2×3min。

(4) 0.02 mol/L (pH 值为 7.4) TBS (内含 0.1% BSA) 洗 10min。

(5) 1% 卵蛋白温育 15min, 不洗。

(6) 适当稀释的金标记 SPA 30nm (PAG 30nm) 室温孵育 1~2h, 0.05mol/L (pH 值为 7.4) TBS 洗 $3 \times 3\text{min}$ 。

(7) 双蒸馏水洗 5min, 1% 戊二醛洗 10min, 双蒸馏水洗 5min。

(8) 用 0.01% 伊文斯蓝衬染 3min, 50% 缓冲甘油封片。

(9) 结果观察: 阳性呈现红色细颗粒状。

6.5.2 免疫金(银)光镜染色技术

6.5.2.1 原理

免疫金银染色 (immunogold silver staining, IGSS.) 是在金免疫技术基础上发展起来的敏感的技术。1983 年, Holgate 等人将免疫金染色与银显影方法相结合创立了免疫金。基本原理是通过免疫反应沉积在抗原位置的胶体金颗粒起着一种催化剂作用, 用对苯二酚还原剂将银离子 (Ag^+) 还原成银原子 (Ag), 被还原的银原子于是围绕金颗粒形成个“银壳”, “银壳”一旦形成, 本身亦具有催化作用, 从而使更多银离子还原并促使“银壳”越长越大, 最终使抗原位置得到清楚放大 (图 6-7)。结果在抗原抗体反应处发生金颗粒聚集, 形成肉眼可见的红色斑点, 此称为斑点免疫金染色法 (Dot-IGS)。此反应可通过银显影液增强, 即斑点金银染色法 (Dot-IGS/IGSS)。

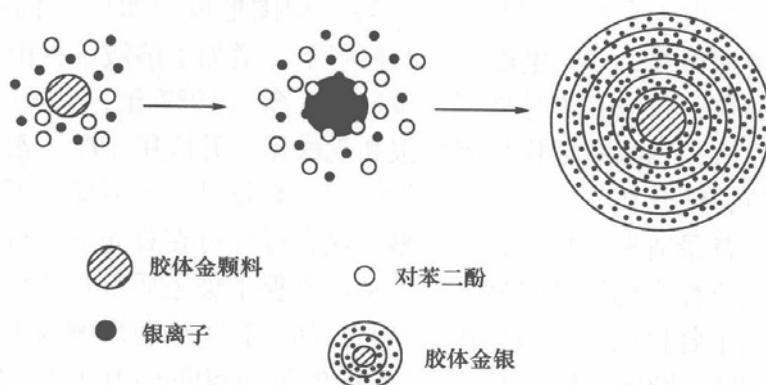


图 6-7 用银增敏示意图

此法只有在抗原存在的情况下, 才有金颗粒并促使金壳的形成。没有抗原区域就没有抗原-抗体反应, 也就不会有颗粒存在, 银离子与对苯二酚的反应则很慢, 这样光镜下就能看见抗原-抗体反应部位呈黑色或黑褐色。IGSS 方法可提高抗原-抗体反应部位金粒子的可见度, 它是一种简便、特异而敏感的方法。

6.5.2.2 技术要点

(1) 配制银染色液

在 pH 值为 3.5 柠檬酸缓冲液中加入明胶、对苯二酚、硝酸银配制而成。

(2) 染色

①被检血清经适当稀释后均匀滴加在细胞抗原片上, 被检血清中抗体与片上的抗原结合, 流水冲洗后再用缓冲液冲洗, 加 BSA 进行封闭;

- ②滴加适当稀释的 SPA - 胶体金进行反应;
- ③滴加新鲜配制的银染色液, 室温避光进行染色反应;
- ④流水冲洗, 晾干, 中性树胶封片后光镜下检查, 见银灰色颗粒沉积者为阳性。

6.5.3 IGSS 法的评价及其注意事项

6.5.3.1 IGSS 法的评价

IGSS 法与 PAP 法、ABC 法及其他免疫组化方法一样, 具有其方法本身的优点。

IGSS 的优点在于不仅可以在石蜡切片、冰冻切片、细胞涂片以及培养细胞上进行光镜观察, 而且还能用于树脂包埋切片的电镜观察, 并能准确定位抗原。近年来, 它逐步应用于 DNA 或 RNA 的原位分子杂交检测中, 为该技术提供了又一新的应用领域。

IGSS 法与其他免疫组化方法相比敏感性高, 它是目前最敏感的免疫组化方法之一, 尤其对只含微量抗原的组织标本, 应首先选用 IGSS 法。该法不仅定位准确, 银颗粒沉积在抗原 - 抗体反应部位, 一般无扩散现象。而且背景清晰, 对比度好, 方法简便、安全, 成本较低, 结果可长期保存。

近几年来, 为了提高染色质量, 减少背景染色, 有人试图用乳酸银代替硝酸银, 以改善方法的专一性。由于在显影过程中, 金颗粒周围形成“银壳”的同时, 其溶液本身也可形成亚微金属银核, 并在电磁射线的照射下, 增加了溶液中自由银离子的量, 而造成背景不断加重, 影响其染色效果。Skutetsky 等 (1987 年) 和 Gerhard 等 (1988) 改进了以上显影方法, 用醋酸银代替硝酸银和乳酸银, 并应用于凝集素受体及其各种肿瘤的多种抗原定位, 使其在光下可获得非常好的显影效果。不但保持了原有方法的高度敏感性、特异性、背景清晰等特点, 而且整个显影过程可在日光下进行, 从而避免了在暗室内显色, 其反应程度也比较容易控制, 从而确保了染色质量及效果。

醋酸银显影液中各种成分量的变化对显影时间、背景染色影响较大。醋酸银最终浓度的变化范围为 100 ~ 400mg/100mL, 对苯二酚的量为 600mg/100mL, 结果无明显的质量问题。对苯二酚的浓度变化可影响最终的染色结果, 显影液中对苯二酚的量大约在 600mg/100mL 和醋酸银的浓度为 100mg/100mL 左右, 显影增强 8 ~ 12min 以内, 基本不会引起背景染色。如果超过这个范围, 则可引起背景染色的增加, 这是因为增加了在显影过程中的自身催化反应。同一醋酸银的最终浓度 100mg/100mL, 对苯二酚的最终浓度变化范围为 100 ~ 600mg/100mL, 最终的染色结果无明显的变化。高浓度对苯二酚一般加速显影的进程, 而高浓度醋酸银可使显影速度减慢。明胶浓度增加, 只延长反应的时间, 而不影响最终的染色结果。这一条件的提出, 使显影的反应速度变得更易控制, 无论什么时候, 要达到最理想的染色结果, 必须按高明胶浓度、低浓度对苯二酚的原则。显影的时间长短, 除了对苯二酚的浓度外, 明胶浓度影响很大。如在醋酸银显影液中不加入明胶, 并降低对苯二酚的量 (200mg/100mL), 显影的时间可减少到 3 ~ 6min, 显影控制适当对结果无重大影响。最常用的还是在显影液中加入明胶, 时间可延长到 15 ~ 30min 或更长, 这主要取决于金的结合率和免疫反应程度。当显影时看到切片变成淡灰色时, 就应在常规的光学显微镜下监控, 如需使切片有更强的染色, 切片就应继续

显影,一旦切片达到所需的反应强度,立即将切片浸入固定液中终止反应。另外因国产醋酸银不易溶解,必须在使用前1h加温(37℃),充分搅拌溶解。

6.5.3.2 使用 IGSS 法的注意事项

(1) 组织标本处理。组织的固定和保存与其他免疫组化方法相同,但经含汞固定液固定的组织,必须经脱汞程序处理后再作 IGSS 染色。

(2) 金标记抗体在用前必要时可以 3000 r/min 离心 15min,或用适当孔径的超滤膜过滤,以除去游离聚合的金颗粒。

(3) 在配制显影液时,必须用新鲜的双蒸馏水配制,不能用 NaN_3 防腐,否则会出现乳白色沉淀,临用前把各液过滤混合。

(4) 显影时应该在镜下控制,但每次将切片从显影液中取出后须用双蒸水洗净方可镜检。

(5) 银盐及对苯二酚用量不宜过大,否则反应太快,不易掌握而造成背景非特异染色,明胶及阿拉伯树胶具有稳定显影液和调节显影时间的作用。关于保护性胶的浓度,一般 1%~2% 明胶和 10% 阿拉伯树胶即可。

(6) 显影时间及温度。显影温度一般为 18℃~25℃ 较合适。温度过高或过低都会对显色质量造成不利的影响。关于显色时间,可根据各实验室的经验掌握,一般以 5~30min 为宜。

(7) 在利用 IGSS-HRP 双标记染色时,抑制内源性过氧化物酶应在 IGSS 染色前进行,否则会影响 IGSS 的染色结果。

(8) 第一抗体质量要高,临用前稀释到最佳工作浓度,显影后经固定再用温水(37℃~60℃)充分洗 20min。以除去多余的明胶。

6.6 胶体金类诊断试剂的生产

胶体金免疫试纸条的组成:吸样材料、玻璃纤维、硝酸纤维膜、吸水材料和含双面强胶的白色塑料板组成。用点样仪将胶体金涂于玻璃纤维上作为示踪物,将抗原或抗体包被于硝酸纤维膜作为检测线和质控线,将吸样材料、玻璃纤维、硝酸纤维膜、吸水材料依次粘在白色塑料板上,用切条机切成宽度为 3mm 的小条,加干燥剂密封 4℃ 保存。

6.6.1 HBsAg 全血金标检测试纸条的生产工艺

6.6.1.1 胶体金技术制备

取双蒸馏水 99mL 加 10.0g/L 氯金酸 1mL 混匀,煮沸 10min 后,加 10.0g/L 枸橼酸钠 0.7mL,原为金黄色的溶液在 2min 内变为紫红色,继续煮沸 15min。冷后用蒸馏水恢复至原体积,放冷后备用,吸收峰在 535nm,用此法制成的金溶胶直径为 60~70 nm,用于免疫凝集比色实验。

6.6.1.2 免疫金标记

免疫金实质上是蛋白高分子被吸附到胶体金颗粒表面的一个包被过程, 吸附机制目前认为可能是胶体金颗粒表面带负电荷, 与蛋白质的正电荷基团靠静电相互吸引而形成牢固结合。通常用 0.1 mol/L K_2CO_3 或 0.1 mol/L HCl 调节金溶胶 pH 值, 标记 IgG 时调至 9.0; 标记单克隆抗体时为 8.2; 标记亲和层析抗体时为 7.6; 标记 SPA 为 5.9~6.2。待标记蛋白溶液预先对 0.005 mol/L NaCl (pH 值为 7.0) 透析, 除去多余盐离子, 并经 100000r/min 离心 1h 除去聚合物。

胶体金与蛋白质溶液结合的一般方法是在电磁搅拌下将所需量金溶胶与蛋白质溶液混合, 即在胶体金标颗粒上包被抗-HBs 单抗 (Au-sAb1), 10min 后再加入一定量的 50.0g/L 牛血清白蛋白 (BSA) 水溶液, 使之达到 10.0g/L 浓度。也可用最终浓度为 0.5g/L 的聚乙二醇代替。制成的免疫金标, 经超速离心后保存备用。

6.6.1.3 胶体金垫的制作

HBsAg 金标试纸正是采用胶体金免疫层析技术, 在硝酸纤维膜上检测线包被胶体金颗粒结合的抗-HBs 单抗 (sAb2) 羊抗鼠 IgG。检测阳性标本 (T); 质控区 (C) 包被的是胶体金颗粒结合的 HBsAg 的抗原。样本血清中 HBsAg 与胶体金标抗体结合形成复合物, 由于层析作用复合物沿纸条向前移动, 经过检测线与预包被的抗体结合形成 “Au-sAb1-HBsAg-sAb2” 夹心物而凝聚显色, 游离金标抗体则在对照线处与羊抗鼠 IgG 结合而聚集显色, 全血金标试纸又在此基础上加以改进, 在纸条加样区预包埋高效抗凝剂 (或使用红血球凝集剂), 同时在加样区下方加层过滤膜, 该膜只允许血清通过, 而阻止血细胞渗透, 这样在检查中只需采集被检者的末梢血点在试纸条的垫片上, 5min 内观察结果即可。

在测试区 (T) 内会出现一条紫红色条带。这条带是 HBsAb-HBsAg-金标粒子的复合物在膜上结合形成的。如是阴性, 则测试区 (T) 内将没有紫红色条带。无论 HBsAg 是否存在于标本血样中, 一条紫红色条带都会出现在质控区 (C) 内。质控区 (C) 内所显现的紫红色条带是判定是否有足够的标本通过层析, 实验过程是否正常的标准, 同时也作为试剂的内控标准。

若为阳性样品, 则可分别在检测区和对照区各凝聚形成一条红色线, 如为阴性样品, 则只在对照区形成一条红色线。

阳性 (+) 结果的意义是试纸上出现两条红线, 表示血液 HBsAg 阳性。说明样品血液被高度怀疑为 HBsAg 感染。

阴性 (-) 结果的意义是试纸上仅出现一条红线 (对照线), 表示血液 HBsAg 阴性。说明样品血液未被 HBsAg 感染。

如果试纸未出现红线, 说明试验失败。可能的原因是: 未按操作程序进行操作, 或试纸本身存在质量问题 (极少), 请另取试纸卡进行检测。

6.6.2 HIV 胶体金生产实例

在硝酸纤维素膜上的检测区包被基因重组的 HIV - (1 + 2) 抗原, 在对照区包被抗 HIV 抗原单克隆抗体。检测时样品中的抗 HIV 抗体与标记胶体金的基因重组 HIV - (1 + 2) 抗原形成 Ag - Au 复合物, 由于层析作用, 复合物沿膜带移动, 可与包被的基因重组 HIV - (1 + 2) 抗原形成双抗原夹心免疫复合物。如为阳性样品, 则可分别在检测区和对照区各凝集形成一条红色线, 如为阴性样品, 则只在对照区形成一条红色线。

阳性 (+) 结果的意义是: 试纸上出现两条红线, 表示血液 HIV 抗体阳性。说明样品血液被高度怀疑为 HIV 感染, 若要最终确认, 需要由省一级或以上的艾滋病检测实验室所做的 Western - Blot 试验。当然这个试验需要他完成, 并出具检验报告, 其他任何医疗单位所做的 HIV 检测都只与本试纸检测具有相同的意义。

阴性 (-) 结果的意义是: 试纸上仅出现一条红线 (对照线), 表示血液 HIV 抗体阴性。说明样品血液未被 HIV 感染。

如果试纸未出现红线, 说明试验失败。可能的原因是: 未按操作程序进行操作, 或试纸本身存在质量问题 (极少), 请另取试纸卡进行检测。

试纸条是采用胶体金免疫层析技术研制的新一代检测试剂, 可检测血清或血浆标本中的 HIV - (1 + 2) 特异性抗体。整个操作过程仅需 15min, 操作简便、快速、准确、自带质控对照、不需任何附加试剂。适用于临床检验、无偿献血、现场筛查等。

6.7 胶体金诊断试剂的生产及质量控制

胶体金试剂是指应用胶体金免疫技术, 采用胶体金标记的抗体或抗原包被于玻璃纤维膜、聚脂膜或其他载体, 将相关抗原或抗体固相连接在硝酸纤维素膜, 应用层析法的原理检测样品中的抗原或抗体的快速检测试剂。用于第三类体外诊断试剂中胶体金试剂的生产及质量控制, 鉴于本类诊断试剂所应用的原理、方法、分类等的复杂性, 其他的类可以借鉴, 仅从试剂的主要原材料、制备工艺、半成品及成品提出质量控制要点。

6.7.1 原材料质量控制

6.7.1.1 主要生物原料

与生产的产品质量最密切相关的生物原料包括各种活性抗原、重组抗原、单克隆抗体、多克隆抗体以及多肽类生物原料。这类原料可用于胶体金标记、包被硝酸纤维素膜及用于制备质控线的抗原或抗体等。

(1) 外观

肉眼观察, 大部分生物原料为澄清透明的液体, 不含异物, 没有浑浊或摇不散的沉淀; 如果是固体则应是白色粉末, 不含其他颜色的杂质, 特殊生物原料应具备相应外观标准。

(2) 纯度和分子量

应通过 SDS - PAGE 电泳和电泳结果扫描仪进行检测, 也可用其他适宜的方法, 如

高效液相等。根据所检测生物原料的分子量选择适宜丙烯酸胺凝胶浓度进行电泳。一般情况下,每个电泳道加样量为5mg,同时用已知分子量标准作参照,采用合适的电泳电流和电泳时间;电泳后的凝胶可用考玛氏亮蓝染色或银染法染色。染色后的凝胶用电泳扫描仪分析原料的纯度和分子量。作为免疫诊断试剂用生物原材料,用银染法染色后,纯度一般都要大于90%,用考玛氏亮蓝染色后,纯度一般都要大于95%。

(3) 蛋白浓度

蛋白浓度可通过Lowry法、208nm光吸收法、双缩脲方法等进行检测。

(4) 效价

效价的测定一般根据蛋白含量测定结果,通过倍比稀释法进行效价的测定,应达到规定的要求。

(5) 功能性实验

功能性实验是指生物原料用于试剂盒生产过程中的实际情况,一般考察该原料使用后的试剂灵敏度、特异性和稳定性。用于制备质控线的抗原或抗体可采用其他适宜方法进行功能性实验。

6.7.1.2 生物辅料

生物辅料指的是在生产过程中作为蛋白保护剂等作用的一类生物原料,主要包括牛血清白蛋白等材料。这些生物原料的质量标准应符合2000年版的《中国生物制品主要原辅材料质检标准》上规定的标准要求,并且要适合于企业的生产。

(1) 牛血清白蛋白

外观应为浅黄色冻干粉末,无吸潮,无结块,无肉眼可见的其他杂质颗粒。溶解性:将牛血清白蛋白配成10%溶液,溶解时间应不大于15min。pH值:1%水溶液的pH值为6.5~7.1;OD₄₀₃值:1%水溶液OD₄₀₃值小于0.15。总蛋白含量:用双缩脲方法来测定,质量标准为不小于95%。硫酸铵含量:纳氏试剂法测定,其标准为小于等于0.1%。尿素含量:采用二乙酸一肟法测定,其标准为小于等于0.1%。总蛋白中的BSA含量:采用硝酸纤维素膜电泳法。其标准为95%BSA的净含量:总蛋白含量乘总蛋白中的BSA含量,其标准为不小于90%。

(2) 功能性试验

按照酶联免疫测定,不得出现非特异性反应。

6.7.1.3 化学原材料

主要的检测指标包括一些基本的检测,如含量测定、溶液的pH值、溶解度、干燥失重、炽灼残渣等的检测。

6.7.1.4 其他原辅料

(1) 玻璃纤维或聚酯纤维膜及滤纸

玻璃纤维或聚酯纤维膜及滤纸应具有厚度、毛细迁移速度、重量等要求,均一性(厚度偏差范围,毛细迁移速度偏差范围,重量偏差范围)应达到规定的要求。

(2) 玻璃纤维膜

适用于全血检测的胶体金试剂, 过滤红细胞所用玻璃纤维膜或其他材料具有不吸附蛋白质的特点, 应具有厚度、孔径大小等要求。

(3) 硝酸纤维素膜

硝酸纤维素膜应具有厚度、孔径大小等要求, 毛细迁移速度, 韧性(切割时膜破损引起的废品率)、均一性(厚度偏差范围、毛细迁移速度偏差范围)应达到规定的要求。

(4) 塑料衬片

塑料衬片应具有厚度、硬度(切割时一次未能整条切下的百分率)、尺寸(与标识吻合)、黏性(切割时造成玻璃纤维与塑料衬片分离的百分率)等要求。

(5) 其他

黏胶纸、铝箔袋、说明书、包装外盒、瓶子和干燥剂等都应有相应的质量标准进行控制。

6.7.2 生产过程中的质量控制

生产过程中的质量控制, 包括胶体金及胶体金记抗原或抗体的制备, 胶体金记的包埋, 检测线及质控线的制备, 胶体金记物、包埋抗原或抗体等浓度确定, 各种工作溶液的配制等步骤, 并通过产品的半成品检定和成品检定两个质控过程来完成。

6.7.2.1 胶体金记物制备过程中的质量控制

采用枸橼酸三钠还原法或其他方法制备胶体金, 胶体金颗粒大小应符合规定, 胶体金记物在 510 ~ 550nm 波长处应有最大吸收值, 置 2℃ ~ 8℃ 保存, 应在规定的保存期内使用。采用合适的方法确定胶体金记物、包被抗原或抗体工作浓度, 将工作浓度的胶体金记物吸附于玻璃纤维或聚酯纤维膜上。

6.7.2.2 检测线及质控线制备过程中的质量控制

取已确定使用浓度的抗原或抗体, 在硝酸纤维素膜上制备检测线, 应用同样的方法制备质控线, 根据生产工艺在规定的温度、湿度条件下进行干燥, 置规定的条件下存放; 检测线与质控线的间隔距离要符合质量要求; 胶体金标记用玻璃纤维及硝酸纤维素膜等进行质量检测, 如尺寸、外观、包装及吸附性能等, 并记录批号、数目、标识, 不同批号的玻璃纤维及硝酸纤维素膜不要混用。

6.7.2.3 贴膜、切割、装袋

贴膜、切割及装袋应在具有湿度(通过验证方法确定相对湿度要求)要求条件下操作, 切割的膜条应有宽度要求。

6.7.2.4 胶体金储存条件及质量要求

胶体金试剂在密封完整的情况下, 试剂盒置于 2 ~ 8℃ 保存, 保质期一般为 12 个月, 不得冻存。胶体金试剂开封后如没有使用完, 应用分口带封好, 并尽快使用, 不要

超过一个月。运输时应防高温和日晒,气温高时冷藏运输。

6.7.3 质量检定

用于半成品及成品质量控制的质控品包括灵敏度、特异性、均一性等指标,如具有国家标准品或参考品的产品应使用国家标准品(参考品)或经标化质控品进行检定。

6.7.3.1 半成品质控品

(1) 半成品抽样

检验人员按批号抽取规定数量的半成品,作号标记,待检。

(2) 半成品检定

对所抽样的半成品做灵敏度、特异性、均一性等试剂盒性能方面的检定,应符合质量标准。

6.7.3.2 成品质控品

(1) 物理检查

应进行外观是否平整,材料附着是否牢固,液体迁移速度,膜条宽度等物理检查,应符合质量标准。

(2) 性能方面的检测

灵敏度、特异性、均一性等试剂盒性能方面的检测,应符合质量标准。

6.7.4 检验操作注意事项

(1) 仅用于体外诊断,在有效期内使用。

(2) 单份操作为宜,操作每个步骤需连续,样品或试剂一旦完全、彻底渗入后,要立刻计时。

(3) 吸取样品的吸头必须确保清洁,胶体金试剂内侧也切忌污染,否则胶体金受污染后会发生自凝,胶体金的颜色会改变,直接影响测定结果的准确性。

(4) 冰冻或 $4^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 存储多日的血清、血浆应离心后取上清液使用,以去除样品中一切细微沉淀,确保无颗粒堵塞反应板中纤维素膜上小孔,保证背景干净。如背景呈红色,会使定量结果偏高,应检查原因。

(5) 血清等体液物质,包括健康人体液,都存在可能的潜在性传染物质,操作者应戴手套,测试后凡接触血清的物品应消毒后再丢弃。

6.8 免疫胶体金技术应用前景

6.8.1 免疫胶体金技术应用前景概述

目前免疫胶体金技术广泛应用于医学临床检测。如疾病的检测、药物残留物的检测、早早孕的检测等。胶体金试纸条法是一种膜载体的免疫检测法,胶体金试纸条具有

灵敏度高、特异性强、操作简便、检测快速、准确等显著的优点。

一些基层医院和个体诊所一般使用此法。胶体金试纸条还广泛应用于献血人员的初次筛选。此外兽医在诊断传染病上也已开始使用该技术,已有检测猪瘟抗体的和检测鸡传染性法氏囊病病毒的试纸条。因此,胶体金技术的应用及其试剂的生产具有广阔的市场前景。

6.8.2 免疫胶体金诊断试剂产品市场分析

目前市场上应用的试剂有乙肝五项胶体金诊断试纸条,早早孕胶体金诊断试纸条,人类免疫缺陷病毒(HIV)的检测,人血清中甲胎蛋白的检测,检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条,促黄体激素(LH)胶体金试纸条等。

6.8.2.1 人用产品的市场分析

胶体金技术最早的商品化是早早孕检测试纸条,目前国内几家大的胶金试剂条生产公司如北京“蓝十字”、“杭州艾康”、北京“万华普曼”、汕头“大卫”都有早早孕类的产品,尤以“蓝十字”为主,占了国内市场的80%多。该类产品主要包括HCG, LH, FSH, 唐氏等,国内的HCG已经被广大客户认可,销售量一直都非常好。由于早早孕检测试纸条等人用产品技术成熟,参与竞争的厂家多,已经到了靠节约成本降低消耗,量大获利阶段。市场近几年的容量将随着试纸进入家庭而进一步扩大,传统工艺试纸还将持续为公司提供利润,但获利空间明显萎缩。

毒品、药物残留的测试是目前的另一个热点。滥用药物的控制是政府安全机构的一项重要任务,目前该产品的客户群体主要是公安机关、戒毒所、安全局等社会安全机构。由于毒品的制造工艺在不断翻新,导致了测试条的工艺也随之发生了非常大的改变,原有的多合一产品、尿杯等产品将不能再简单地复制后就占有市场,目前K粉、G粉的检测都采用了更加简便的检测方式。如果有强硬的政府力量支持,抑制毒品将成为此行业长期的最大赢利支撑点。在高端研发平台上,人体内药物残留的研究正在进行,它与普通的毒品检测差异在于检测对象已经从非法药品转移到合法样品,许多国外药品制造机构都有这方面的考虑,检测项目将与他们所销售的药品直接关连,以便对药品的情况进行有效而又简便的监控,但该产品赢利前景尚无法预计。

传染病检测,这里又包括HIV、HCV、HBV、HBsAg等。就市场需求而言,空间是非常大的,但大批量生产的技术似乎还不是很成熟,单批次的产量还是非常小。一放大就出现很多的问题。同时涉及到血清、全血的检测导致客户范围只能局限于医疗机构,市场接受情况良好,有望为公司创造一定的收益。

肿瘤标志物的技术方向,总的来说还是非常不成熟,研发的投入还要进一步加大,短时期内赢利可能有些困难。

6.8.2.2 农、兽、食品安全类产品的市场分析

“瘦肉精”事件想必大家还记忆犹新,瘦肉精检测试纸为众多畜牧类测试条的生产

企业带来了第一桶金。这个领域内做得比较好的是大连“普瑞康”，“WHPM”现也在开发食品安全检测类的产品。目前有禽流感、家畜疫病、农药残留、食品药物残留等多个方向，真正到达产业化的不多，市场也比较空白，赢利前景非常好。

(高喜梅)

第7章 化学发光免疫诊断技术

7.1 化学发光免疫技术概述

化学发光免疫技术是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。是继放射免疫分析、酶联免疫分析、荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。

化学发光免疫技术包含两个部分,即化学发光系统和免疫反应系统。化学发光系统是利用化学发光物质经催化剂的催化和氧化剂的氧化,形成一个激发态的中间体,当这种激发态中间体回到稳定的基态时,以光辐射的形式释放能量。这一过程多是氧化还原反应,反应中间产物的活性粒子越多,产生的光子量也越多,发光亦越强。化学发光免疫反应系统是将发光物质(在反应剂激发下生成激发态中间体)直接标记在抗原(化学发光免疫)或抗体(免疫化学发光)上,或作用于发光底物上。

化学发光(Chemiluminescence, CL)分析是根据化学反应产生的光辐射确定物质含量的一种痕量分析方法。如果此种反应存在或起源于活的生物体,则相应的分析方法称为生物发光(Bioluminescence, BL)分析。生物发光亦可视为特殊形式的化学发光。一般而言,生物发光量子产率(发射的光量子/起反应的分子数)和特异性均比化学发光高,量子产率接近100%,发光强度大,持续时间长,发光稳定,因而生物发光分析灵敏度高,容易测定。由于化学发光分析和生物发光分析具有高的灵敏度(检测限常可达 $10^{-18} \sim 10^{-12} \text{ mol/L}$)、宽的线性范围(3~6个数量级)及操作简单,便于自动化等三大优点,使得该项技术在现代痕量分析中起到十分重要的作用。尤其是在生物医学、临床诊断学和环境分析等方面展示了化学发光技术特殊的优越性。

化学发光免疫分析是将发光物质(如吖啶酯、鲁米诺等)标记抗原或抗体进行反应,发光物质在反应剂(如过氧化阴离子)激发下生成激发态中间体,当激发态中间体回到稳定的基态时发射出光子,用自动发光分析仪接收光信号,测定光强度,以反映待检样品中抗体或抗原的含量。该法灵敏度高于放射免疫测定法,常用于血清超微量活性物质的测定,如甲状腺素等激素。研究证明组织细胞在生命活动中经过许多氧化还原反应产生活性自由基,如 H_2O_2 等,这些基团与组织细胞内可激发物质起反应产生微弱的化学发光。根据发光物质的性质和在免疫测定中的作用,Whitehead等把化学发光免疫测定分成四种类型:发光免疫测定(Luminescent immunoassay, LIA)、发光酶免疫测定(Luminescent enzyme immunoassay, LEIA)、发光辅助因子免疫测定(Luminescent cofactor immunoassay, LCIA)和发光酶放大免疫测定技术(Luminescent enzyme -

multiplied immunoassay technique, LEMIT)。

化学发光反应参与的免疫测定分为两种类型：第一种是以发光剂作为酶免疫测定的底物，通过测定发光反应光强度的敏感性检测标本中抗原或抗体的含量；第二种是以发光剂作为抗体或抗原的标记物，直接通过发光反应检测标本中抗原或抗体的含量。

化学发光免疫分析分为三大类型，即标记化学发光物质的化学发光免疫分析 (CLIA)，标记荧光物质的荧光化学发光免疫分析 (FCLIA) 和标记酶的化学发光酶联免疫分析 (CLEIA)。

7.1.1 化学发光标记免疫技术

化学发光标记免疫分析又称化学发光免疫分析 (CLIA)，是用化学发光剂直接标记抗原或抗体的免疫分析方法。常用的化学发光标记物有异鲁米诺、鲁米诺、异鲁米诺的衍生物如氨基乙基异鲁米诺、氨基丁基乙基异鲁米诺、吖啶酯及邻苯三酚类。因为三磷酸腺与萤火虫素的生物发光反应迄今为止是人们所知发光效率最高的发光反应，所以用三磷酸腺或萤火虫素作为免疫分析的标记物是最为理想的发光试剂。

用化学发光剂标记的化学发光免疫分析法存在的主要问题是标记发光剂（或者抗体）发生特异性免疫反应的性能将改变，并且每次标记发光剂的标记率变化很大。用作标记的化学发光剂应符合以下几个条件：①能参与化学发光反应；②与抗原或抗体偶联后，能形成稳定的结合物；③偶联后的结合物仍能保留高的量子产率和反应动力；④不改变或极少改变被标记物的理化特性，特别是免疫活性。

鲁米诺类化合物的发光反应必须有催化剂（例如过氧化物酶）催化，且与蛋白质或肽结合后其发光作用减弱，因此鲁米诺类化合物在化学发光免疫分析中是很好的底物。

吖啶酯类化合物对化学发光免疫分析非常重要，其显著的优点是：①氧化反应不需催化剂，只要在碱性环境中就可以进行；②发光反应迅速、本底低；③在氧化反应过程中，结合物被分解，游离吖啶酯的发光不受抑制，试剂稳定性好。

化学发光免疫分析具有以下明显的优越性：①敏感度高，甚至超过放射免疫分析法；②精密度和准确性均可与放射免疫分析法相媲美；③试剂稳定、无毒害；④测定耗时短；⑤测定项目多；⑥已发展成自动化测定系统。因此化学发光免疫技术在诊断医学中，应用广泛发展迅速。

7.1.2 标记荧光物质的荧光化学发光免疫技术

在 FIA 法中，由于被检测的样品的背景信号很高，使得荧光免疫分析的灵敏度大大降低，利用内源光源进行荧光免疫分析测定的终点检测，可以消除忧郁外源光源散射造成的背景信号，可以大幅度提高测定的信噪比，从而可以提高荧光测定的灵敏度。

这类反应可以使用多种荧光标记物，其中以荧光素和 8-苯氨基-1-萘磺酸 (NAS) 为最佳。

7.1.3 化学发光酶联免疫技术

化学发光酶免疫分析 (chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA)，应属酶免

疫分析,只是酶反应的底物是发光剂,操作步骤与酶免分析基本相同,以酶标记生物活性物质(如酶标记的抗原或抗体)进行免疫反应,免疫反应复合物上的酶再作用于发光底物,在发光试剂作用下发光,用发光信号测定仪进行发光测定,其检测限低至 10^{-17}mol/L 。一些金属配合物能催化鲁米诺的化学发光反应。有人曾用 $\text{Co}(\text{II})$ 和 $\text{Fe}(\text{II})$ 的配合物代替酶作为抗原(或抗体)的标记物,进行化学发光免疫分析,已经获得了成功。其中 $\text{Fe}(\text{II})$ 的4,11,18,25-四羧基酞花菁配合物具有最高的催化活性,并应用于白朊的免疫测定,以 $\text{Luminol}-\text{H}_2\text{O}_2$ 作为发光底物,检测限为 $2\mu\text{g}$ 。目前常用的标记酶为辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(ALP),它们有各自的发光底物。

通过用发光测定仪检测化学发光免疫分析中的发光强度来对抗原、抗体等物质进行定量分析,由于标记物的不同,所采用的测定方法及其反应机理也就各不相同。可使用限量的特异性抗体进行竞争性结合分析,也可应用过量的标记抗体做非竞争性结合分析。有效地将化学发光物质标记到抗原或抗体上是化学发光免疫分析成功的关键。小分子物质的标记主要通过偶联反应制备;一些生物大分子的标记是利用交联剂使标记物与被标记物分子结构中游离的氨基($-\text{NH}_2$)、羧基($-\text{COOH}$)、巯基($-\text{SH}$)、羟基($-\text{OH}$)、羧羟基和咪唑基等基团形成不可逆连接。

除用发光剂直接与被测物交联外,用催化发光反应的酶与被测物连接所形成的酶标记物也属于化学发光标记的范畴而广泛应用。利用生物素(Biotin)和抗生物素(Avidin)之间独特的亲和力以及生物素侧链末端羟基易与发光剂结合等特点,形成了发光标记中最具特异性、稳定性的抗生物素-生物素系统,亲合素-生物素-过氧化物酶复合物法(ABC)已在微量定量和细胞定位分析上得到应用。

近年来化学发光免疫分析技术的发展实现了微磁粒子标记,增强了标记反应面积,克服了影响因素——分离剂离心过程,并达到自动化、智能化,所以发展迅速,被称为第三代免疫分析技术。

7.2 化学发光剂

一般情况下,化学发光反应的效率不是很高,因此化学发光分析灵敏度的提高有一定的限度。人们已经研究出几种新型的化学发光反应系统,其中包括1,2-二氧乙烷反应聚合体和用于化学发光辣根过氧化物酶催化氧化反应的羟基芴酮、唑、噻唑、咪唑等的衍生物。

目前许多有利于分析的生物发光蛋白质现在已经被克隆出来了,同时还提供了一些选择性强,并且能重复利用的化学试剂,像A蛋白细菌荧光素酶这样的蛋白质也可以用于免疫分析。固定化试剂使我们的分析更加便利,而且也很稳定,混合荧光素酶在生物发光(BL)分析中具有相对固定的应用范围。

任何含有 H_2O_2 反应的成分都可以通过化学发光进行检测。通常检测物的过氧化产物是利用鲁米诺或过氧化草酸盐反应进行检测的。新的检测方法是基于血浆中存在血小板活性因素、草酸盐、卵磷脂过氧化物等。头孢菌素抗生素使得 $\text{Luminol}-\text{CO}^{2+}$ 过氧化

反应的发射光,得到了增强并延长了发光持续的时间。这也测定头孢菌素、先锋霉素这些化合物的方法基础。

由于抗氧化剂可以抑制了鲁米诺过氧化反应光的发射,利用这个方法可以测定生物血液中的抗氧化剂。这个抗氧化剂的发射光有拖后的现象,可以利用这一现象作为研究测定抗氧化剂浓度的方法。

7.2.1 吖啶酯类化合物

吖啶酯盐不需要催化剂,在碱性条件下,与 H_2O_2 反应就可以产生化学发光现象,吖啶酯还是一种有效的化学发光标记物,已经广泛应用。在 1984 年以前,吖啶酯盐标记物高亲和力单克隆抗体的合成,证明在通过使用这种方法对甲状腺刺激激素 (TSH) 进行分析时可以达到非常高的灵敏度,这种标记物能够产生的检测灵敏度比其他的直接化学发光标记物免疫分析方法高 10 倍以上,分析结果稳定,而且操作简单。

吖啶鎓盐经过化学发光反应产生一个双氧烷基酮的中间体,最终形成 N-甲基吖啶酮,并产生化学发光。

吖啶酯是一种用途广泛的化学发光示踪物,它是一个三环有机化合物,容易氧化,而且氧化反应无需催化剂。当在碱性介质中氧化时,这些化合物经历共价键的断裂,经过一个二氧酮的中间体,产生电激发的 N-甲基吖啶酮,当它恢复到基态时,在 430nm 处释放出光子。在加入 H_2O_2 及随后加入 NaOH 调节至所需 pH 值之前维持一低的 pH 值以实现最佳氧化过程,并加速了氧化反应。

吖啶酯作为免疫分析示踪物具有许多优点。

(1) 因为无需催化剂,简化了反应。发光反应快速,增加了计数的充分性,背景噪声低。主要的优势在于当一种蛋白质、多肽或其他有机分子结合以形成免疫示踪物,这种结合发生在分子的一定部位,在吖啶酯分子氧化过程从发光的部分断裂并分离下来,这就排除了任何对于发光的抑制作用,因此也增加了敏感度;

(2) 这种标记的试剂极其稳定,如 2-甲基吖啶酯,因其独特的结构使其有效期长达 1 年甚至更久;

(3) 发光过程快速,在 1s 内光子散射达到高峰,整个过程在 2s 内完成。在典型的分析过程中,计数率可达到每秒 5.0×10^5 相对光子单位 (或可计数的光子数),即可达到 $1.0 \times 10^{-16} \text{ mol/L}$ 或 fg 级的敏感度水平。

(4) 吖啶酯还具有高特异活性,它反应的高度有效性极大地缩短了读数时间。1s 内直接发光的光子强度可比 I^{125} 发光记数所获光子数多 10 万倍。

利用高敏感性的化学发光示踪物吖啶酯作为标记物,以极细的磁粒子作为固相系统,提供最大的包被面积,反应体系在一永久性磁场中,免疫复合物聚集在比色皿的底部区域,而游离抗原、抗体和吖啶酯标记物经蒸馏水冲洗后,不必离心即被移出比色皿,存留的吖啶酯复合物在碱性环境的 H_2O_2 溶液中瞬时发光,其光量子数与物质浓度呈良好的线性关系。检测限可达 $1.0 \times 10^{-18} \sim 1.0 \times 10^{-15} \text{ g/mL}$ 。

该化学发光分析技术基本上有两种方法:比较细小的抗原分子如 T_4 、地高辛等可使用竞争法,其原理是先加入样本 (抗原),再加入吖啶酯标记抗体,最后加入抗原致

敏磁微粒子,通过化学发光反应,测得光量子数与样本中抗原浓度成反比关系。而大分子抗原如促卵泡激素(FSH)、甲胎蛋白(AFP)等,夹心法原理为在抗体致敏磁微粒子中加入待测样本,再加入吖啶酯标记抗体复合物,通过化学发光反应,测定光量子数与样本中抗原浓度成正比关系。

吖啶酯化学发光反应的典型代表是光泽精(N,N-二甲基吖啶硝酸酯)。它在碱性条件下,与 H_2O_2 等过氧化物作用形成发光体激发态N-甲基吖啶时释放出光能。能使光泽精激发的物质有丙酮、次黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、羟胺及维生素C等。

7.2.2 苯酚类化合物

用于化学发光免疫测定的酚类物质主要是邻苯三酚(即焦性没食子酸),它是一种强还原剂,在催化剂(如辣根过氧化物酶、血红素)催化下,与 H_2O_2 反应释放出光能。

7.2.3 氨基苯二酰肼类化合物

鲁米诺(5-氨基-2,3-二氢-1,4-酞嗪二酮)和异鲁米诺(6-氨基-2,3-二氢-1,4-酞嗪二酮)及其衍生物是最成熟的化学发光剂,1964年While曾作了化学发光的研究报道。鲁米诺及异鲁米诺可在6位的氨基进行烷基取代,制得各种衍生物,其中氮丁基乙基异鲁米诺

(ABEI),氮己基乙基异鲁米诺(AHEI)和5-氮丁基乙基-2,3-二氢-1,4-酞嗪二酮(ABENH)用于化学发光免疫测定已取得较理想的结果。

7.2.4 咪唑类化合物

咪唑类发光剂主要有咯吩碱,其反应过程首先是咯吩碱在碱性二甲基亚砷水溶液中形成过氧化物中间体,再进行重排,降解,同时伴随产生化学发光。

7.2.5 芳基草酸酯类化合物

这类化合物主要有:双(2,4,6-三氯苯基)草酸酯(TCPO)。此类物质的发光反应是在反应体系中加入一种荧光染料作为荧光载体,通过过氧化草酸酯中间产物捕获化学能,并使其转变成可见光,加强了发光效率。过氧化草酸酯的化学发光体系由两部分组成:一是由芳基草酸酯和 H_2O_2 反应生成的“化学泵”;二是辐射受体,它在可见光范围内是高荧光的染料,如8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)。在 H_2O_2 碱性溶液中,加入双(2,4,6-三氯苯基)草酸酯和荧光分子染料(如ANS)而产生化学发光。双(2,4,6-三氯苯基)草酸酯和 H_2O_2 反应形成中间产物过氧化草酸酯和1,2-二噁二酮,后者将化学能转移到荧光体上,使荧光体从激发态退至基态时,而放出光子。

双(2,4,6-三氯苯基)草酸酯发光反应的pH值范围较宽(pH值为4~10),并适用于某些特殊反应,因而被推广应用。

以上5种化学发光剂化学发光量子产率高,水溶液稳定,能被多种氧化剂直接氧化而发光,也可被众多的金属催化发光反应而发光,许多无机、有机和生化组分也能增强

或抑制其发光,因此应用十分广泛。目前报道的有邻菲咯啉,碱基水杨酸、罗明丹-B、没食子酸、香豆素、皮素,茜素紫、苏木色精,培花青,三苯甲烷类染料,丙酮、乙醇、羟胺等。这些试剂商品化程度高,价廉,使用方便,但化学发光量子产率较低,因此,研究增敏试剂来提高它们的化学发光量子产率是非常关键的。

7.3 化学发光酶联免疫技术

20世纪70年代末, Halman 和 Velan 首先把化学发光反应和酶联免疫反应结合起来,建立了测定灵杆菌抗原和葡萄肠毒素(SEB)的化学发光酶联免疫分析(Chemiluminescence enzyme joint immunity analysis, CLEIA)测定技术,为生物物质的超痕量分析开辟了新的途径。从标记免疫测定来看,化学发光酶联免疫分析应属酶免疫分析,测定中两次抗原抗体反应步骤均与酶免疫测定相同,仅最后一步酶催化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。但在酶联免疫吸附测定中,化学发光检测比常规分光光度测定的灵敏度高16~95倍。化学发光酶联免疫分析具备酶联免疫分析的优点,保留了化学发光法的高灵敏度,化学发光酶联免疫分析可以检测抗原、抗体、激素、药物和微生物等,在人和动植物疾病的诊断上越来越广泛地被采用,并弥补了它在特异性上的不足,在检测灵敏度、特异性、准确度及精密度方面均可与放射免疫分析相媲美,而且在化学发光酶联免疫分析中不涉及放射性同位素防护、污染物处理及标记物衰变等问题,操作安全,方法更加简便、快速,具有更大的发展潜力。

一般情况下化学发光酶联免疫分析中常用的酶标记物有过氧化物酶(POD),多采用辣根过氧化物酶(HRP)、葡萄糖氧化酶、丙酮酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、萤火虫素酶、碱性磷酸酶和 β -D-半乳糖苷酶等。常用的是过氧化物酶,如乳酸过氧化物酶、辣根过氧化物酶,还有一些低分子量的小肽,如猪心细胞色素C经胰蛋白酶降解切割后的部分,有10个左右氨基酸残基与一个血红素的铁卟啉相连,称为微过氧化物酶。其中最常用的是辣根过氧化物酶。辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶(AP)均有其发光底物,由此建立的CLEIA均在临床检验中已得到广泛应用。辣根过氧化物酶标记的化学发光酶联免疫分析,常用的底物为鲁米诺或其衍生物。鲁米诺的氧化反应在碱性缓冲液中进行,通常以0.1mol/L、pH值为8.6, Tris缓冲液作底物液,鲁米诺和 H_2O_2 在无辣根过氧化物酶催化时也能缓慢自发发光,而在最后光强度测定中造成空白干扰,因而宜分别配制成2瓶试剂溶液,只在用前即刻混合。辣根过氧化物酶催化鲁米诺的氧化反应,可被某些酚类物质(如对碘苯酚)或萤火虫荧光素酶等增强。增强剂的作用原理是增强发光和延长发光时间,由此可提高敏感度。

7.3.1 标记过氧化物酶的化学发光酶联免疫技术

在标记过氧化物酶的化学发光酶联免疫分析中,酶的活性是基于在过氧化物酶(常用HRP)存在下,发光剂和 H_2O_2 组成化学发光测定酶活性的底物进行发光反应,来进行检测的。常见的发光底物有Luminol- H_2O_2 , 邻苯三酚- H_2O_2 , Luminol-过硼酸盐等。在这些底物中,鲁米诺、邻苯三酚等是以化学发光反应剂而参与反应的。可以根

据不同的免疫反应和测定条件,选择合适的化学发光底物。

过氧化物酶标记化学发光酶联免疫分析在检测病毒抗原、血清蛋白、各类药物、代谢物及激素等方面都具有很高的灵敏度。

目前辣根过氧化物酶已广泛应用于各种测定,这种酶的可用性、易结合性和小分子量具有很重要的现实意义。尽管已有很多显色检测剂,如四-甲基苯醌、邻苯二胺、氯酚红(二氯酚磺肽)和3-乙基苯并噻唑(3-ethylbenzothiazolone)已经用于使过氧化物酶活性可视化,唯一用于辣根过氧化物酶检测的化学发光试剂的重要用途就是改善了发光检测系统的性能,比起其他酶标记化学发光检测来,这种酶的检测限要小三个数量级,并能够通过新的底物进一步提高灵敏度。最近提出了一种新的辣根过氧化物酶的底物—酸性铬蓝K(ACBK),以 H_2O_2 为氧化剂,辣根过氧化物酶的加入能加速氧化反应的进行,使酸性铬蓝K被氧化分解用于IgG-辣根过氧化物酶的测定,最高稀释比为1:5000。有关过氧化物酶标记的化学发光酶联免疫分析的部分应用如表7-1所示。

表7-1 过氧化物酶标记的化学发光酶联免疫分析的部分应用

检测物	标记物	被标记物	检测体系
伤寒杆菌	PDO	A 蛋白	邻苯三酚- H_2O_2
细胞肥大病毒	PDO	抗体	异鲁米诺- H_2O_2
单纯疱疹病毒	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2
支原体	PDO	A 蛋白	Luminol- H_2O_2
梭状芽孢杆菌	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2
IgG	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2
人绒毛膜促性腺激素	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2 -萤火虫素
脱氢异雄酮	PDO	抗原	Luminol- H_2O_2
人绒毛膜促性腺激素	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2
血浆中17- β -雌二醇	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2
脱氢表雄酮	PDO	抗原	Luminol- H_2O_2
甲胎蛋白	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2 -萤火虫素
脱氢表雄酮	PDO	抗原	Luminol- H_2O_2
地谷新	PDO	抗原	Luminol- H_2O_2 -萤火虫素
野兔热杆菌	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2
灵杆菌	PDO	抗体	邻苯三酚- H_2O_2
白色念珠菌	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2
抗鲁白宁病毒 IgE	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2 -萤火虫素
巨细胞病毒抗体	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2 -6 羟基酞噻唑
巨细胞抗原	PDO	抗体	异鲁米诺- H_2O_2
委内瑞拉马脑炎病毒	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2
孕酮	PDO	抗体	Luminol- H_2O_2 -对碘苯酚
癌胚抗原	HRP	抗体	Luminol- H_2O_2 -N-四甲基苯胺

续表

检测物	标记物	被标记物	检测体系
甲胎蛋白	HRP	抗体	异鲁米诺 - H_2O_2 - 取代酚
抗鲁白宁病毒 IgE	HRP	抗体	异鲁米诺 - H_2O_2 - 取代酚
孕酮	HRP	抗体	Luminol - H_2O_2 - 对碘苯酚
绒毛膜促性腺激素	HRP	抗体	Luminol - H_2O_2 - 对碘苯酚
地谷新	HRP	抗体	Luminol - H_2O_2 - 对苯基苯酚
地谷新	HRP	抗原	Luminol - H_2O_2 - 对碘苯酚
铁蛋白	HRP	抗体	Luminol - H_2O_2 - 对碘苯酚
人血白蛋白	HRP	抗体	Luminol - H_2O_2
人血白蛋白	HRP	抗体	Luminol - 过磷酸盐
人血白蛋白抗体	PDO	抗体	Luminol - H_2O_2
皮质醇	PDO	抗原	Luminol - H_2O_2
皮质醇	PDO	抗原	异鲁米诺 - H_2O_2
细菌细胞壁抗原	PDO	抗体	邻苯三酚 - H_2O_2
细胞内毒素	PDO	抗原	邻苯三酚 - H_2O_2
葡萄球菌肠毒素 B	PDO	抗体	邻苯三酚 - H_2O_2
人 IgE	PDO	抗体	Luminol - H_2O_2 - 萤火虫素
弹性蛋白	PDO	抗原	Luminol - H_2O_2 - 萤火虫素
A 型类毒素 a	PDO	抗体	Luminol - H_2O_2
登革热 II 型病毒 B	PDO	抗体	邻苯三酚 - H_2O_2
伤寒杆菌	PDO	抗体	邻苯三酚 - H_2O_2
白蛋白	PDO	抗体	Luminol - H_2O_2
Sindbis 病毒	PDO	抗 Sindbis 病毒	邻苯三酚 - H_2O_2
胰岛素	PDO	抗原	Luminol - H_2O_2
促甲状腺素	PDO	抗原	Luminol - H_2O_2
甲胎蛋白	HRP	抗体	Luminol - H_2O_2
IgG (兔)	氯化血红素	抗体	Luminol - H_2O_2
淋巴细胞免疫球蛋白	PDO	抗体	Luminol - H_2O_2
肌红蛋白	PDO	抗体	Luminol - H_2O_2

7.3.2 标记葡萄糖氧化酶的化学发光酶联免疫分析

葡萄糖氧化酶 (GOD) 是另一类化学发光酶联免疫分析中常用的标记物。用化学发光反应测定免疫反应后葡萄糖氧化酶的活性, 是利用葡萄糖氧化酶对葡萄糖的催化氧化产生 H_2O_2 , 用化学发光反应底物检测产生的 H_2O_2 , 可间接测定葡萄糖氧化酶的活性。常见的发光反应底物有: Luminol - $K_3Fe(CN)_6$ 、双 (2, 4, 6 - 三氯苯基) 草酸

酯-荧光素染料等。

葡萄糖氧化酶的活性分两步进行检测, 第一步是: 无荧光的无色 2', 7'-二氯荧光素被氧化为有荧光的 2', 7'-二氯荧光素, H_2O_2 由葡萄糖氧化酶催化氧化葡萄糖产生。第二步是: 有荧光的与双(2, 4, 6-三氯苯基)草酸酯- H_2O_2 在 MeCN 介质中产生化学发光。对 H_2O_2 的检测限为 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 对葡萄糖氧化酶的检测限为 1.0 mU/mL , 这个方法成功地与酶联免疫分析结合并对 T_4 进行检测, 采用酶联免疫方法作为对照, 二者相关性很好。利用双(2, 4, 6-三氯苯基)草酸酯-荧光物质作底物的主要缺点是反应要在非水介质中进行, 这就限制了它的应用。最近已经有人进行了在有表面活性剂参与下的水溶液中双(2, 4, 6-三氯苯基)草酸酯发光反应的研究。用葡萄糖氧化酶(GOD)标记的化学发光酶联免疫分析的部分应用如表 7-2 所示。

表 7-2 用葡萄糖氧化酶等作标记的化学发光酶联免疫分析部分应用

检测物	标记物	被标记物	检测体系
17- α 羟基孕甾酮	PDO	抗原	Luminol - H_2O_2 - $K_3F(CN)_6$
甲胎蛋白	PDO	抗体	Luminol - H_2O_2 - $K_3F(CN)_6$
胰岛素	PDO	抗原	Luminol - H_2O_2 - $K_3F(CN)_6$
17- α 羟化黄体酮	PDO	抗原	TCPO - H_2O_2
17- α 羟基孕甾酮	PDO	抗体	TCPO - H_2O_2 - ANS
17- α 羟基孕甾酮	PDO	抗体	TCPO - H_2O_2
T_4	PDO	抗原	TCPO - H_2O_2 - ANS
甲状腺素	PDO	抗体	Luminol - H_2O_2 - $K_3F(CN)_6$
胰岛素	PDO	抗体	Luminol - $K_3F(CN)_6$
皮质醇	PDO	抗原	Luminol - H_2O_2 - $K_3F(CN)_6$
脱氢表雄甾酮	PDO	抗原	TCPO - H_2O_2 - ANS
脱氢表雄甾酮硫酸盐	PDO	抗原	TCPO - H_2O_2 - ANS
甲胎蛋白	PDO	抗体	TCPO - H_2O_2 - ANS
甲胎蛋白	PDO	抗体	TCPO - H_2O_2 - 荧光素
促甲状腺素	PDO	抗原	TCPO - H_2O_2 - 荧光素
催乳素	PDO	抗体	TCPO - H_2O_2

可用双(2, 4, 6-三氯苯基)草酸酯发光剂来测定不同梯度活力的葡萄糖氧化酶的量, 葡萄糖氧化酶是用合成的方法得到的, 在合成法得到的发光物质中, 它是发光效果最好的一种, 其量子产率达 25%, 它所参与的是一种非酶催化的发光反应, 其本身不能发光。但双(2, 4, 6-三氯苯基)草酸酯可以诱发化学发光反应, 在弱碱溶液中加入双(2, 4, 6-三氯苯基)草酸酯和荧光分子(如 ANS)可以产生发光反应。用 β -D-葡萄糖为底物, ANS 为荧光物质, 当葡萄糖氧化酶为 $0.1 \sim 3 \text{ mU/mL}$ 时, 与发光强度的升高呈良好的线性关系 ($y = 0.57 + 49.0x$, $r = 0.9978$), 最低检测限为 4 mU/L 。

碱性磷酸酶的 1, 2-二氧乙烷芳基磷酸盐具有去磷作用, 并能形成一个不稳定的

酚盐中间体, 这个中间体能够分解产生一个持久性的发射光。这个分析具有很高的灵敏度, 并能清楚地被检测到。针对碱性磷酸酶和 β -D-半乳糖苷酶的其他化学发光分析主要基于 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸酯和 β -D-半乳糖苷作为底物。

7.3.3 增强化学发光酶联免疫技术

近年来出现的增强化学发光酶联免疫分析是提高化学发光酶联免疫分析灵敏度的新途径, 为了克服有的化学发光剂量子产率低的缺点, 可以使用发光增强剂, 从而提高化学发光的灵敏度。它是利用加入某种物质(称为增强剂), 该物质具有增强化学发光强度, 提高化学发光测定的信噪比, 从而可以提高化学发光酶联免疫分析灵敏度的作用。这类物质最常用的有萤火虫荧光素(Firefly luciferin)、苯并噻唑(Benzothiazoles)、苯酚取代物、萘酚等。

传统的化学发光多在几秒钟内以闪光形式发射, 因此必须将反应物瞬间充分混合, 立即测定, 否则常因为混合不均而影响结果的重复性。1982年, Carter 发现萤火虫素、6-羟基苯并噻唑衍生物等能加强辣根过氧化物酶催化鲁米诺等的化学发光反应, 使其强度提高 80 倍。一些酸类衍生物尤其是对碘酸、苯酸等的增强效果更佳, 可提高 1000 倍, 而且能够延长发光持续时间, 对羟基联苯的增强作用更大具有推广意义, 常规检测所需过氧化物酶的浓度为微克水平, 在加入增强剂对羟基联苯后仅需毫微克或更低水平, 由此建立了地谷新血浓度的化学发光酶联免疫分析技术, 指导临床用药。采用化学发光酶联免疫测定技术测定地谷新标准品及临床慢性心功能不全且正接收地谷新治疗者的血浓度, 并进行比较分析, 发现地谷新线性范围为 0.1 ~ 50ng/mL, 平均回收率为 94.65% 和 93.68%, 与放射免疫分析法有良好的相关性 ($r=0.9356$)。

对碘苯酚或对苯基苯酚可以分别使辣根过氧化物酶催化体系的化学发光的强度增强。其结果是, Luminol-H₂O₂体系增强 2492 及 814 倍, 异鲁米诺-H₂O₂体系增强 120 倍及 37 倍。测定的最佳 pH 值为 8.5 ~ 8.6, 两种发光剂分别用二甲亚砜作溶剂, 最佳的反应浓度分别为 0.34mmol/L 及 0.011mmol/L。Thorpe 等人使用对碘苯酚及对苯基苯酚作为化学发光增强剂, 用 HRP 作为标记物, 对人绒毛膜促性腺激素、地谷新等进行了测定, 并与不加增强剂的化学发光酶联免疫分析方法进行对照, 灵敏度提高至少 1000 倍。6-羟基苯并噻唑、芳香羟基化合物可以增加辣根过氧化物酶标记体系化学发光酶联免疫分析的灵敏度, 这种方法已用于测定孕酮。杂化物增敏化学发光酶联免疫分析也已广泛应用, 它利用了酶与一个增敏的化学发光检测体系的放大效应, 已对甲状腺素、特定肿瘤及一些垂体激素进行了测定。

Kricha 等利用四甲基联苯胺作为化学发光增强剂, 用辣根过氧化物酶作为标记物, 采用 Luminol-H₂O₂-四甲基联苯胺作为发光底物, 对癌胚抗原进行了测定, 检测限可达 10ng/mL, 四甲基联苯胺的浓度为 0.5g/mL, 使用光子计数, 灵敏度提高了近 3 倍。Whitehead 等人使用对碘苯酚、对苯基苯酚、2-氯-对苯基苯酚作为化学发光增强剂, 采用辣根过氧化物酶作为标记物, Luminol-H₂O₂或异鲁米诺-H₂O₂作为发光底物, 对甲胎蛋白、抗鲁白宁 IgG 等进行了测定, 灵敏度很高。Wang 等使用对碘苯酚作为增强剂, 辣根过氧化物酶作为标记物, Luminol-H₂O₂作为发光底物, 对孕酮进行了测定,

检测限为 0.5pg, 并与放射免疫分析方法进行了对照, 二者相关性很好, $\gamma = 0.990$ 。Coyle 等人利用对碘苯酚作为增强剂, HRP 作为标记物, 应用异相竞争酶联免疫分析法对地谷新进行了测定, 并用 ELISA 显色光度法作为对照, 二者相关性很好 $\gamma = 0.9870$ 。Whitehead 等发现, 在 HRP 催化的 Luminol - H_2O_2 的发光体系中加入 D - 荧光素后可以增敏几倍。D - 荧光素是萤火虫生物发光试剂, 由此发展了增敏化学发光酶联免疫分析技术, 达到了与吖啶酯类标记体系相当的灵敏度, 并对激素、半抗原、缩氨酸进行了测定。化学发光酶联免疫分析通过使用增强剂 (例如对碘苯酚) 与 HRP 一起进行发光时可使发光寿命延长, 这样发光就可以稳定几分钟, 便于测定。该方法以其成熟的酶标记技术及高灵敏的增敏化学发光检测手段愈来愈引起人们的重视。

近年来发展起来的化学发光酶联免疫分析的另一个途径是偶合反应化学发光酶联免疫分析, 它是采用一个酶催化的化学反应与发光反应相偶合。这样酶标记物能够与酶催化的反应底物充分接触, 使 HRP 的催化作用得到充分发挥, 大大提高了分析的灵敏度。章竹君等人利用辣根过氧化物酶催化 H_2O_2 氧化 KI 生成 I_2 的反应与 I_2 在碱性介质中氧化鲁米诺产生化学发光的反应相偶合, 建立了偶合反应化学发光酶联免疫分析方法, 并应用于乙型肝炎病人血清中的 5 种抗原和抗体的临床分析及流行性出血热病人血清中 M 临床检测, 比常规酶联免疫吸附测定方法灵敏度高 100 倍。他们还利用流动注射化学发光植物组织传感器对草酸盐进行了测定, 取得了较好的结果。科学家利用对 - 碘苯酚作为化学发光增强剂, Luminol 作为发光底物, 辣根过氧化物酶作为标记酶, 对铁蛋白及甲胎蛋白进行了定量测定, 方法的灵敏度很高, 比酶联免疫吸附测定法高 1 ~ 2 个数量级。

在 NaOH 介质中, 焦性没食子酸对 Luminol - $K_3Fe(CN)_6$ 化学发光体系有很强的增敏作用, 据此建立了焦性没食子酸的测定方法流动注射化学发光增强法。该法的化学发光增强值 (ΔI) 与焦性没食子酸浓度在 $3.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 检测限为 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, ($n = 11$), 相对标准偏差为 2.8%, 用于没食子酸热解产物中的焦性没食子酸测定。

最近科学家还开展了增强化学发光酶联免疫分析法联用技术的研究, 如流动注射协同增强化学发光免疫分析法的建立, 以兔 IgG 为模型, Luminol - H_2O_2 - HRP 混合液为发光体系, HRP 标记抗体, 建立了灵敏度高、特异性强、重现性好的流动注射协同增强化学发光免疫分析法。结果表明, 在 $2 \sim 60 \mu\text{g/L}$ 范围内兔 IgG 量与发光强度有良好的线性关系, 相关系数 $\gamma = 0.9941$ ($P < 0.01$), 绝对检测限为 0.65fmol, 方法精密度为 4.72% ~ 9.31%, 回收率 92.50% ~ 99.40%, 免疫柱可反复使用 200 次以上。目前这方面的研究正在展开, 如研究人员还发现新合成的 N - (2 - 四氢苯并噻唑) - 2 - 羟基苯甲亚胺希夫碱与酸性高锰酸钾反应产生微弱的化学发光, 甲酸的存在有显著的增敏作用。基于抗坏血酸与铬的还原反应产生的铬催化 Luminol - H_2O_2 发光体系的研究, 还建立了一种快速测定痕量抗坏血酸的新方法。该方法线性范围为 $8.0 \times 10^{-9} \sim 1.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 检测限为 $8.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 对 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 抗坏血酸 11 次平行测定的相对标准偏差为 0.9%, 可以用于医用维生素 C 片剂中抗坏血酸含量的测定。

7.4 化学发光酶联免疫技术的应用

化学发光酶联免疫分析是以某些工具酶（如辣根过氧化物酶和葡萄糖氧化酶）标记抗体，在免疫反应终点，再用 Luminol - H_2O_2 等发光体系测定发光强度。其反应的形态分为如下 3 种类型。

(1) 液相法：即在液相中进行免疫反应，经过分离其游离发光物和发光抗原 - 抗体复合物，再进行发光测定。

(2) 固相法：这是最广泛应用的一种方法，将发光免疫复合物结合到固相载体上，然后分离除去未结合的发光标记物，再进行发光测定。

(3) 均相法：这种检测方法与酶联免疫分析的方法相似，不经分离，即可直接测定发光强度，其原理是发光标记物与抗原结合后，其发光反应明显增强，这种方法干扰因素较多，测量特异性受到影响，故采用此法时应注意避免干扰。

7.4.1 化学发光酶捕获免疫测定大肠杆菌

大肠杆菌作为食物和水中可能存在的病菌污染物的指示剂，迫切需要灵敏度高、特异性好的快速检测方法。大约 97% 的大肠杆菌株会产生 β - 葡萄糖苷酸酶 (GUS)，这种物质可以用一种特异性微生物酶替代大肠杆菌而被检测。

以 1, 2 - 二氧化物衍生物作为底物的化学发光检测 β - 葡萄糖苷酸酶的步骤已被研究开发，其灵敏度比荧光免疫分析高出 10 倍，当含 0.3mmol/L 对硝基磷酸葡萄糖苷酸在培养基中存在 8h 之后，大肠杆菌中 β - 葡萄糖苷酸酶的感应性最强，在 37℃ 时使用免疫捕获方法，可以将 β - 葡萄糖苷酸酶从培养基中隔离出来， β - 葡萄糖苷酸酶抗体以共价键固定在磁微粒子上用于免疫捕获检测，捕获大肠杆菌 β - 葡萄糖苷酸酶培养物。相比对 β - 葡萄糖苷酸酶培养液滤液的化学发光检测来说， β - 葡萄糖苷酸酶免疫磁性捕获提供的信号要增强 81 倍。使用这种方法可检测在培养基中孵化 8h 之内的大肠杆菌中 1GUS/mL。而目前，食物和水中大肠杆菌的检测原理基于来自乳糖的 β 半乳糖在一种选择性介质中释放酸性气体产物的活性。采用的如膜过滤技术、模拟确定方法和使用紫罗兰红胆汁琼脂倾注平皿方法等均需要 48h 得到假定结果，96h 得到完全的结果。相比之下优势明显。

酶捕获测定法，其原理是使用 β - 葡萄糖苷酸酶抗体固定在稀释板上，检测被捕获 β - 葡萄糖苷酸酶反应所产生的发色产物和荧光产物。这种方法可以用于监测大肠杆菌、食物和临床血样品。

另外，化学发光反应并不需要内置光源，反应中间体和产物的激发态本身就是光源，可以用轻便的光度计很容易地测出。 β - 葡萄糖苷酸酶抗体以共价键与微磁粒子头结合，免疫微磁粒子头分离 (IMS) 可以有效地从不同种类的细胞悬浮液中分离出细菌细胞。此项技术对检测低数量级的大肠杆菌的灵敏度、特异性和缩短预富集时间方面都是有利的。

7.4.2 偶合反应化学发光酶联免疫分析测定人血清甲胎蛋白

甲胎蛋白是原发性肝癌诊断的一项重要指标,在临床检验中具有重要意义。目前使用的间接血凝、琼脂双扩散、电泳和酶联免疫吸附测定等方法灵敏度不高,放射免疫分析又存在放射性危害等问题。偶合反应化学发光酶联免疫分析测定人血清甲胎蛋白是一种新的方法,偶合辣根过氧化物酶(HRP)催化 H_2O_2 氧化曙红(Eosin)的反应和HRP催化 H_2O_2 与鲁米诺的化学发光反应,利用前一反应的中间产物具有增强后一化学发光反应的特性,提高化学发光信号强度,通过测定标记在甲胎蛋白抗体上的HRP的量,求得发生免疫反应的甲胎蛋白含量。

7.4.2.1 主要仪器和试剂

LKB-1250 化学发光光度计(瑞典“LKB”公司生产)。

标准甲胎蛋白溶液,甲胎蛋白抗体和辣根过氧化物酶标记的甲胎蛋白抗体(厂家提供)。

载体:聚苯乙烯小珠,直径6.4 mm。

抗原和抗体稀释液:1%牛血清白蛋白溶液。

包被缓冲液:0.01mol/L 碳酸盐缓冲液(pH=9.5),用于包被抗体的稀释。

洗涤液:称取 NaCl 8.09、KCl 0.29、 Na_2HPO_4 2.99、 KH_2PO_4 0.29 和 Tween-200.5mL,用蒸馏水溶解后定容为1L。

底物溶液:于25 mL 容量瓶中加入0.01mol/L HCl 溶液0.4mL、1% Tween-200.2mL、0.01mol/L EDTA 1.0 mL、 1.0×10^{-3} mol/L 曙红溶液2.0mL 和 7.5×10^{-3} mol/L H_2O_2 1.0 mL,用蒸馏水稀释至刻度,此溶液用时临时配制。

发光剂: 5.0×10^{-4} mol/L 鲁米诺溶液(pH 值为9.5)。

7.4.2.2 免疫反应过程

包被抗体于两组小试管中各加入一粒载体小珠和500 μL 抗体稀释液,37℃ 恒温孵育2h,在4℃ 冰箱过夜。取出后洗涤3次,制得包被抗体小珠。于第一组小试管中分别加入不同稀释度的标准甲胎蛋白溶液,作为标准对照管;第二小组试管中各加入待检血清100 μL 和抗原稀释液400 μL ,作为样品测定管。于37℃ 孵育2h,抽干,洗涤3次,载体上形成抗原-抗体免疫复合物。

各管均加入辣根过氧化物酶标记的甲胎蛋白抗体(1:1000)500 μL ,37℃ 孵育2h,用洗涤液洗3次,再用蒸馏水洗两次,在载体上形成具有辣根过氧化物酶标记抗体的甲胎蛋白双抗体夹心免疫复合物。

7.4.2.2 化学发光检测

向各管中加入底物溶液300 μL ,在37℃ 恒温反应20min,将小试管放入发光计检测室,加入300 μL 50×10^{-4} mol/L 鲁米诺溶液,测量化学发光强度,用第一组试管所测数据绘制标准曲线,在曲线上查出第二组试管中甲胎蛋白含量。

7.4.2.3 偶合反应条件

试验了 pH 对 HRP 催化 Eosin - H_2O_2 反应产生发光增强剂的影响,

结果表明, pH 值在 3.4 ~ 3.6 范围内最有利于反应的进行。Eosin 和 H_2O_2 的最佳浓度分别为 $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 、和 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。在上述反应剂条件下, 于 37°C 反应 15min 可达到平衡, 而且 1h 内信号保持稳定。在有少量 EDTA 存在时, 空白信号 1h 内无明显变化。

7.4.2.4 化学发光反应条件

在碳酸盐缓冲液 pH 值为 9 ~ 10 时发光信号最强, 鲁米诺浓度在 $1.0 \times 10^{-4} \sim \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围内发光信号稳定, 选择 pH 值为 9.5 的碳酸盐冲溶液, 鲁米诺浓度选为 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。一些表面活性剂对发光信号有增敏作用, 在所试验的 Tween - 20、Tween - 80、十二烷基磺酸钠、聚乙二醇辛基苯基醚、聚氧乙烯十二烷基醚等表面活性剂中, 以 Tween - 20 增敏效果最好, 可使峰高增加 5 倍左右, 故在底液中加入 200 μL 1% Tween - 20 以增敏测量信号。

7.4.3 增强化学发光酶联免疫分析法测定人绒毛膜促性腺激素

人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 产生于人体绒毛膜, 在临床上 HCG 的测定用于妊娠的早期诊断, 这在计划生育和优生优育上是十分重要的。此外, 生殖系统的某些疾病也会影响人体对 HCG 的分泌, 因此, HCG 的水平测定有助于这些疾病的诊断。应用活化鲁米诺, 用优化的增强化发光酶联免疫分析体系测定人绒毛膜促性腺激素, 检测限为 0.2mU/mL, 线性范围 0 ~ 200mU/mL。

7.4.3.1 试剂与仪器

FG83 - 1 型化学发光仪。

Tris - HCL (pH 值为 8.0) 缓冲液: 称取 0.6023g 固体 Tris 溶于 50mL 水中, 加入 0.25mL 浓 HCL, 再用水定容至 100mL。

Luminol - H_2O_2 混合液: 将商品鲁米诺用 5% NaOH 溶液重结晶 5 次得活化鲁米诺。称取活化鲁米诺 0.1201g, 配制成 10mL $6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的溶液, 将该溶液稀释 10 倍得溶液甲; 吸取 0.204mL H_2O_2 (30%) 稀释至 10mL 得溶液乙。使用时移取 0.2mL 溶液甲和 0.1mL 溶液乙, 用 Tris - HCl 缓冲液定容至 10 mL。

对碘苯酚溶液: 称取 0.3196 g 经纯化后所得对碘苯酚, 用二甲基亚砷定容至 100mL, 溶液浓度为 $1.8 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。

发光反应液: Luminol - H_2O_2 混合液与对碘苯酚溶液按 50:1 进行配制。

人绒毛膜促性腺素标准溶液: 称取固体 HCG 0.89mg 溶于生理盐水中, 定容至 10mL, 得 312U/mL 溶液。其他浓度溶液照此稀释而得。

所用水为石英亚沸蒸馏水; 化学试剂均为分析纯。

7.4.3.2 免疫反应过程

分别加标准溶液或病人样本（病人血清）50 μ L，于聚苯乙烯微杯内；向杯中加入酶联抗体100 μ L，轻摇混匀、于37 $^{\circ}$ C恒温槽中孵育30min，弃去各杯内的液体，用亚沸蒸馏水充满各杯洗涤5次，每次均需拍干。向一微杯内加发光反应液300 μ L（其他未加反应液的待测微杯放入4 $^{\circ}$ C冰箱），迅速将微杯放到微杯支持架上，推入发光仪暗盒中，盖上暗盒盖，打开快门，记录发光信号最强值。其他各微杯同上法依次测定其发光最强值。

7.4.3.3 增强发光反应体系各反应物浓度的优化

活化的鲁米诺作为发光剂能使鲁米诺的发光强度提高10倍。采用对碘苯酚为增强剂使发光强度又提高了两个数量级以上。因而称此发光体系为增强的发光体系。体系中各反应物浓度都不同程度地影响发光强度。

发光强度最大，且各反应条件的波动对发光强度的影响最小的反应物条件为：pH值为8.00；鲁米诺浓度为 1.2×10^{-4} mol/L； H_2O_2 浓度为 6.12×10^{-4} mol/L；对碘苯酚浓度为 1.8×10^{-4} mol/L。

7.4.4 增强化学发光酶联免疫分析法测定血清中的铁蛋白

铁蛋白（Ferritin）的测定多采用酶联免疫分析法。通过采用对碘苯酚增强的Luminol- H_2O_2 -HRP化学发光反应体系作为免疫分析的最终检测手段，建立了一种新的铁蛋白的免疫分析方法，与酶联免疫分析法相比，该方法具有灵敏度高，线性范围宽等优点。方法的相对标准偏差为3.7%。该体系比不含增强剂的Luminol- H_2O_2 体系的敏感性高20倍以上，其测定铁蛋白的线性范围为0.12~2000ng/mL。

7.4.4.1 仪器与试剂

LKB-1250 Luminometer（瑞典“LKB”公司生产）；752-紫外可见光栅分光光度计（上海第三分析仪器厂生产）；RF-540 荧光分光光度计（岛津公司生产）；鲁米诺（纯度为98.2%）配成 1.2×10^{-4} mol/L储备液备用；30% H_2O_2 ；对碘苯酚： 2.0×10^{-4} mol/L二甲基亚砷溶液备用；

铁蛋白标准品，铁蛋白、铁蛋白抗体（FTAb）及酶标铁蛋白抗体由厂家提供。所有试剂均为分析纯，所用水为重蒸馏水。

7.4.4.2 免疫反应过程

分别加标准溶液或病人样本（病人血清）50 μ L，于聚苯乙烯微杯内；向杯中加入酶联抗体100 μ L，轻摇混匀、于37 $^{\circ}$ C恒温槽中孵育30min，弃去各杯内的液体，用亚沸蒸馏水充满各杯洗涤5次，每次均需拍干，然后加入发光试剂。将结合了一定量FTAb-HRP的聚苯乙烯试管迅速放入LKB-1250中，推入发光仪暗盒中，盖上暗盒盖，打开

快门,记录发光信号最强值。其他各微杯同上法依次测定其发光最强值。发光的峰值信号与血清中铁蛋白量相关。

7.4.4.3 化学发光条件

实验表明,介质的 pH 值、发光试剂浓度、增强剂种类等对发光反应均有影响。化学发光体系为 Luminol - H_2O_2 及对碘苯酚,反应条件为 pH 值为 8.5; Luminol - H_2O_2 及对碘苯酚浓度分别为 $3.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $4.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 及 $3.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

7.5 生物发光酶联免疫分析

自从 20 世纪 80 年代,Marlene DeLuca's 第一个成功地获得表达萤火虫荧光素酶基因(luc 基因)的转基因烟草以来,生物发光的应用进入了一个新时代。生物发光和化学发光(BL/CL)的主要特点就在于发光信号的高度可测性,可以用光电倍增管和 CCD 成像系统来检测极少量的光子信号。生物发光是属于化学发光范畴之内,化学发光反应的特点是光子产生效率,要比其他的光学技术强得多。

最近的一些分子生物学进展使得一些生物技术工具极大地提高了生物发光和化学发光的检测和快速应用。这些发展方便了体外和体内持续检测生物过程(如基因表达,蛋白质-蛋白质相互间作用和疾病的进程),可应用于临床、诊断和药物开发等。而且,结合发光酶或某些在基因水平有生物特异结合位点的发光蛋白发展了超敏感和选择性的生物分析工具,如重组细胞生物传感器,免疫分析和核酸杂交系统。发光分析信号的高度可检测性使得它非常适合于微小化的生物分析装置(如微矩阵,微流设备和高密度的微孔板)以用于小量样品体积的基因和蛋白的高通量筛选。

BL/CL 已经发展出了很多具体的分析方法来诊断目前微摩尔或纳摩尔级的生物样本。通过 BL/CL 结合酶反应,如氧化酶、脱氢酶和激酶等,就可以达到如此的检测灵敏度。

现在已经可以提取纯度很高的荧光素和荧光素酶,建立许多生物发光酶联免疫分析方法,这些方法应用于生物体液中各种激素、药物、微生物、抗原、抗体等成分的测定。生物发光酶联免疫分析在临床分析上愈来愈广泛地引起人们的重视。

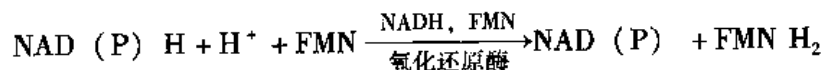
利用荧光素和荧光素酶,目前已经建立了许多生物发光酶联免疫分析方法,应用于生物体液中各种激素、药物、ATP、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)、黄素单核苷酸(FMN)等的测定。即将抗原或抗体与一个能参与生物发光免疫反应的酶偶联,再以生物发光强度来定量抗原或抗体的浓度,常用的生物发光反应有以下两种。

7.5.1 荧光素酶 - FMN 细菌生物发光

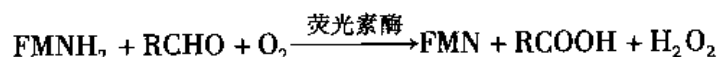
细菌生物发光分析主要有两种酶参与:荧光素酶和 FMN 氧化还原酶。FMN 氧化还原酶在还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(辅酶 n - NADPH)和 H^+ 存在下,能使 FMN 还原成还原型的黄素单核苷酸(FMNH_2)。

7.5.1.1 荧光素酶—FMN 细菌生物发光体系

细菌生物发光分析主要有两种酶参与反应，就是荧光素酶和 FMN 氧化还原酶，FMN 氧化还原酶在还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（辅酶 II - NADPH）和 H^+ 存在下，能使 FMN 还原成还原型的黄素单核苷酸（FMNH₂）。



接着荧光素酶在有 O_2 的情况下，催化还原型黄素单核苷酸和长链脂肪醛，氧化产生 FMN 和长链脂肪酸（RCOOH）并产生发光，发射波长为 $\lambda_{max} = 490nm$ 。



7.5.1.2 荧光素—荧光素酶生物发光体系

荧光素（LH₂）和荧光素酶（E）在 ATP、 Mg^{2+} 、 O_2 存在下，可以产生焦磷酸（ppi）和磷酸腺苷（AMP），接着 O_2 和 $E \cdot LH_2 \cdot AMP$ 引导荧光素脱羧，形成激发态产物—氧化荧光素（L*），它在返回基态时发光，发射光的波长 $\lambda_{max} = 562nm$ 。利用该生物发光反应与一个酶催化的反应相偶合，即可进行生物发光酶联免疫分析。例如：用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记三硝基甲苯（TNT），利用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶能催化葡萄糖-6-磷酸和 NAD^+ 的反应与生物发光反应相偶合，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的转换系数较大（ 7.0×10^4 ），活性较好， $1.0 \times 10^{-18}mol/L$ 的葡萄糖-G-磷酸脱氢酶每分钟能产生 $4.0 \times 10^{-14}mol/L$ 的 NADH，这样可以大大提高灵敏度，对 TNT 的检测限达 $1.0 \times 10^{-18}mol/L$ 。

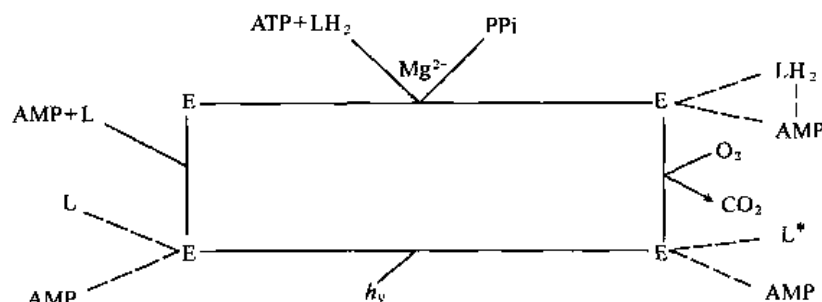


图 7-1 荧光素—荧光素酶生物发光体系反应原理

Wannlund 等利用荧光素酶标记二硝基苯酚（DNP）和 TNT，用固定化的细菌 NADH；FMN 氧化还原酶体系对酶催化反应产生的 NADH 进行测定，达到 2.5 pmol/LDNP 及 1.0pmol/L，TNT。他们还利用 G-6-PDH 标记 DNP 和 TNT，对 DNP 及 TNT 抗原进行测定，检测限为 $1.0 \times 10^{-17}mol/L$ 的水平。Jablonski 等讨论了用作标记的细菌荧光素酶的生物发光酶联免疫分析。Wannlund 等用荧光素酶标记 TNT 抗原，利用荧光素-ATP 生物发光体系测定 -TNT 含量，检测限可达 50fmol/L。相同原理测定氨甲嘌呤（MTX）和 DNP，灵敏度分别为 2.5pmol/L 和 10pmol/L；Balian 等用荧光素酶标记生物

素,用荧光素-ATP生物发光体系固相免疫法测定人血清IgG量,灵敏度比酶联免疫分析法高25倍。Yein等用细菌荧光素酶作为标记物,利用FMN:NADH氧化还原酶-荧光素生物发光体系测定雌三醇,检测限为50pg/L。Reichard等人利用丙酮酸激酶标记马来酰亚胺苯甲酰基-N-琥珀酰亚胺(MBS),ADP-Mg²⁺磷酸烯醇丙酮酸-荧光素-荧光素酶作为发光底物,对MBS进行检测。Wannlund等利用萤光素酶标记在氨甲蝶呤上,荧光素酶仍保持酶的活性,将MTX抗体共价结合到溴化氰活化的Sephrose 4B珠上,形成固相载体。荧光素酶-MTX能与固相载体上的抗体结合,建立了竞争结合生物发光酶联免疫分析法。当反应系统中加入标准的MTX时,它就与荧光素酶标记物共同竞争固相上抗体结合位点,荧光素酶-MTX与固相抗体结合量与标准MTX量成反比。MTX最小检测值为2.5pmol/L,此方法作为临床上药物的动态观察,提供简单、方便可靠的手段。Terowanne等人把生物发光与酶联免疫吸附测定法偶合起来发展了对孕酮、人绒毛膜促性腺激素、αFP进行检测的生物发光酶联免疫分析方法,并与放射免疫分析法作了比较,二者相关性很好。并且该方法适宜于小分子蛋白测定,操作易于自动化。Wood等利用丙酮酸激酶标记IgG抗体,利用荧光素-荧光素酶生物发光体系对血清中胰岛素、胰岛素抗体和庆大霉素进行检测,检测限达到25mUL,并与放射免疫分析方法进行了对照,二者相关性很好。Wannlund等利用荧光素酶标记TNT抗原,对TNT的检测限为50fmol/L。他们又发展了生物发光酶联放大免疫分析测定TNT,用G-6-PDH代替荧光素酶标记TNT,对TNT的检测限为10amol/L。Wannlund等利用荧光素酶或G-6-PDH作为标记物标记抗原,利用细菌生物发光体系检测酶催化产生的NADH及H₂O₂,形成了对TNT、DNP及MTX的定量检测方法。Derlalian等利用萤火虫荧光素酶作为标记物,荧光素-荧光素酶-ATP作为生物发光体系对血清中IgG及IgE进行了测定。Girotti等利用G-6-PDH标记地谷新,NADH:FMN氧化还原酶-细菌荧光素-荧光素酶作为生物发光检测体系,对地谷新进行测定,检测限为0.4ng/mL。Terouanne等利用G-6-PDH作为标记物,细菌荧光素-荧光素酶-NADH:FMN氧化还原酶体系作为生物发光底物,对孕酮、αFP、促黄体生成激素(LH)和催乳素进行了测定,检出范围为:孕酮1~200μg/L,αFP1~200μg/L,LH1~200μg/L,催乳素1~200μg/L,并与放射免疫方法作了对照,二者相关性很好。生物发光酶联免疫分析的部分应用如表7-3所示。

表7-3 生物发光酶联免疫分析的部分应用

检测物	标记物	被标记物	发光体系
DNP	Luciferase	抗原	NADH-FMN-Luciferase体系
YNT	Luciferase	抗原	NADH-FMN-Luciferase体系
DNP	G-6-PDH ^①	抗原	NADH-FMN-Luciferase体系
YNT	G-6-PDH	抗原	荧光素酶-荧光素发光体系统
转铁蛋白	丙酮酸激酶	抗原	荧光素酶-荧光素发光体系统
IgG	Luciferase ^②	生物素	荧光素酶-荧光素发光体系统
苯妥钠	G-6-PDH	抗原	荧光素酶-荧光素酶发光体系统

续表

检测物	标记物	被标记物	发光体系
胰岛素	丙酮酸激酶	抗原	荧光素酶-荧光素发光体系
TNT	Luciferase	抗原	荧光素酶-荧光素发光体系
MTX	Luciferase	抗原	荧光素酶-荧光素发光体系
DNP	Luciferase	抗原	荧光素酶-荧光素发光体系
雌三醇	细菌荧光素酶	抗原	荧光素酶-FMN 发光体系
MTS	Luciferase	抗原	荧光素酶-FMN 发光体系
MBS	Luciferase	抗原	荧光素酶-FMN 发光体系
胰岛素抗体	丙酮酸激酶	IgG	荧光素酶-FMN 发光体系
庆大霉素	丙酮酸激酶	抗体	荧光素酶-荧光素发光体系
地谷新	丙酮酸激酶	抗原	荧光素酶-FMN 发光体系
催乳素 α FP	G-6-PDH	抗原	酶-FMN 发光体系

①葡萄糖-6-磷酸脱氢酶；②荧光素酶。

7.6 化学发光酶联免疫法的应用

以偶合反应化学发光酶联免疫法测定人血清甲胎蛋白为例，甲胎蛋白是原发性肝癌诊断的一项重要指标，在临床检验中具有重要意义。目前使用的间接血凝、琼脂双扩散、电泳和酶联免疫吸附测定等方法灵敏度不高，放射免疫分析又存在放射性危害等问题。偶合反应化学发光酶联免疫分析测定人血清甲胎蛋白是一种新的方法，偶合辣根过氧化物酶（HRP）催化 H_2O_2 氧化曙红（Eosin）的反应和 HRP 催化 H_2O_2 与鲁米诺的化学发光反应，是利用前一反应的中间产物具有增强后一化学发光反应的特性，提高化学发光信号强度，通过测定标记在甲胎蛋白抗体上的 HRP 的量，求得发生免疫反应的甲胎蛋白含量。

7.6.1 主要仪器

化学发光-光度计。

7.6.2 试剂

标准甲胎蛋白溶液，甲胎蛋白抗体和 HRP 标记的甲胎蛋白抗体可以根据抗原、抗体及酶的制备方法制得。

固相载体：聚苯乙烯小珠，直径 6.4mm。抗原和抗体稀释液：1% 牛血清白蛋白溶液。

包被缓冲液：0.01mol/L $Na_2CO_3 - NaHCO_3$ 缓冲液（pH = 9.5），用于包被抗体的稀释。

洗涤液：称取 NaCl 8.09、KCl 0.29、 Na_2HPO_4 2.99、 KH_2PO_4 0.29 和 Tween -

200.5 mL, 用蒸馏水一起溶解后定容为 1L。

底物溶液: 于 25 mL 容量瓶中加入 0.01mol/L HCl 溶液 0.4mL、1% Tween - 200.2 mL、0.01mol/L EDTA 1.0mL、 1.0×10^{-3} mol/L, 曙红溶液 2.0mL 和 7.5×10^{-3} mol/L H_2O_2 1.0mL, 用蒸馏水稀释至刻度, 此溶液用时临时配制。

发光剂: 5.0×10^{-4} mol/L 鲁米诺溶液 (pH = 9.5)。

7.6.3 包被生产过程

于两组小试管中各加入一粒载体小珠和 100 μ L 包被液, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 2h, 然后在 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 时放置 24h。取出后洗涤 3 次, 制得包被抗体小珠。

于第一组小试管中分别加入不同稀释度的标准甲胎蛋白溶液, 作为标准对照管; 第二组试管中各加入待检血清 50 μ L 和稀释液 100 μ L, 作为样品测定管。于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 抽干, 洗涤 3 次, 载体上形成抗原 - 抗体免疫复合物。

各管均加入 HRP 标记的甲胎蛋白抗体 (1:1000) 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 用洗涤液洗 3 次, 再用蒸馏水洗两次, 在载体上形成具有 HRP 标记抗体的甲胎蛋白双抗体夹心免疫复合物。

7.6.4 化学发光过程

向各管中加入底物溶液 50 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温反应 10min, 将小试管放入发光计检测室, 加入 100 μ L 5.0×10^{-4} mol/L 鲁米诺溶液, 测量化学发光强度, 用第一组试管所测数据绘制标准曲线, 在曲线上查出第二组试管中甲胎蛋白含量。

7.6.5 偶合反应条件

试验了 pH 对 HRP 催化 Eosin - H_2O_2 反应产生发光增强剂的影响, 结果表明, 在 pH 值为 3.4 ~ 3.6 范围内最有利于反应的进行。Eosin 和 H_2O_2 的最佳浓度分别为 8.0×10^{-5} mol/L 和 3.0×10^{-4} mol/L。在上述反应剂条件下, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 15min 可达到平衡, 且 1h 内信号保持稳定。在有少量 EDTA 存在时, 空白信号 1h 内无明显变化。这个反应除 pH 的值要严格控制外, 其他反应条件均较宽容。

7.6.6 化学发光反应条件

在 Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲液 pH 值为 9 ~ 10 时发光信号最强, 鲁米诺浓度在 1.0×10^{-4} ~ 1.0×10^{-3} mol/L 范围内发光信号稳定, 选择 pH 值为 9.5 的碳酸盐缓冲溶液, 鲁米诺浓度选为 5.0×10^{-4} mol/L。一些表面活性剂对发光信号有增敏作用, 在所试验的 Tween - 20、Tween - 80、十二烷基磺酸钠、聚乙二醇辛基苯基醚、聚氧乙烯十二烷基醚等表面活性剂中, 以 Tween - 20 增敏能力最强, 可使峰高增加 5 倍左右, 故在底液中加入 200 μ L 1% Tween - 20 以增敏测量信号。

7.6.7 测定酶标抗体

在最佳反应条件下对不同稀释度 HRP 标记甲胎蛋白抗体进行测定, 并与无偶合反

应参加的直接化学发光测定结果对照。直接化学发光法测定该酶标抗体的最高稀释度为 $1:6.4 \times 10^4$ ，而偶合化学发光法测定该酶标抗体的最高稀释比为 $1:5.1 \times 10^5$ 。由于偶合反应产生了增强剂，使该偶合化学发光法测定酶标甲胎蛋白抗体的灵敏度提高了8倍。直接法化学发光测定吸附于载体上的酶标抗体，较该法测定溶液中酶标抗体的灵敏度约降低了8倍，而偶合法化学发光测定的灵敏度仅降低约2倍，在此情况下，偶合法较直接法的灵敏度约高30倍。

7.6.8 测定甲胎蛋白

按上述实验方法对标准甲胎蛋白稀释液进行测定，实验结果表明测定人血清甲胎蛋白的灵敏度高，仪器简单，对健康无损害，测定范围为 $0.10 \sim 100.0 \text{ ng/mL}$ ，检测限为 0.08 ng/mL ，相关系数 $\gamma = 0.998$ ，比现行的 ELISA 法灵敏度高10倍，且两法的相关性很好，能满足临床检验需要。用上述方法对11份病人血清样品进行测定，并与 ELISA 法的测量结果进行比较，试样分析结果所得数据如表7-4所示。

表7-4 试样分析结果

样品号	本法测得量 (ng/mL)	ELISA 法对照值 (ng/mL)	样品号	本法测得量 (ng/mL)	ELISA 法对照值 (ng/mL)
1	1200	1280	7	5.2	5.0
2	6.4	5.0	8	3.2	5.0
3	25	23	9	175	170
4	1000	1010	10	200	220
5	6.0	5.0	11	6.0	5.0
6	780	800			

以 ELISA 法的结果为横坐标 x ，本法的测定结果为纵坐标 y ，绘制相关曲线，其曲线方程为 $y = 0.926x + 2.343$ ($n=11$, $\gamma=0.998$)，二者有很好的相关性。

(王法云)

第 8 章 荧光免疫技术

8.1 荧光免疫技术概述

荧光免疫技术是标记免疫技术中发展最早的一种，始创于 20 世纪 40 年代初，由 Coons 等首次用异氰酸荧光物质标记抗体，检查小鼠组织切片中的可溶性肺炎球菌多糖抗原。至 20 世纪 50 年代末期，开创了免疫荧光技术 (Immunofluorescence technique)，又称为荧光抗体技术 (Fluorescent anti-body technique)。Riggs 等合成性能较为优良的异硫氰酸荧光 (fluorescein isothiocyanate, FITC)，并由 Marshall 等对荧光抗体的标记方法进行了改进，从而使荧光免疫技术逐渐推广应用。自 20 世纪 70 年代以来，在传统荧光抗体技术的基础上，根据放射免疫和酶免疫测定的原理，发展建立了各种免疫荧光测定法，可用于定量测定体液中抗原或抗体。近年来由于免疫学各个领域的发展，在临床检验工作中免疫荧光技术已逐渐突出，如自身抗体的检测，B 细胞、浆细胞的功能探索等皆获得了广泛的应用。由于将抗原、抗体的反应特异性与荧光的敏感性结合起来，因此广泛应用于医学、生物学、分子生物学、生物化学、免疫学等领域。荧光免疫分析技术分为传统的免疫荧光技术和现代免疫荧光技术。

传统的免疫荧光技术用异硫氰酸荧光黄 (FITC)、罗丹明 (RB₂₀₀)。标记特异抗体，对组织切片、细胞细菌、病毒和液体物质作固相荧光染色，荧光显微镜下分析荧光状态及分布情况。该技术及流式细胞仪和荧光偏振分析已经广泛用于临床诊断和基础研究。

现代荧光技术的应用发展十分广泛，如蛋白质、DNA、细胞膜受体、细胞内物质、复合抗体、亚细胞分子的标记等。仪器先进，如荧光激活细胞分析仪、单克隆荧光技术电子计算机图像、显示器、荧光自动化分析测试仪。现代荧光免疫技术在标记与探测上，稀土元素 Eu 配合物抗体标记 Eu (TIFA) 的灵敏度高 (达 $\mu\text{g} \sim \text{ng}$ 水平)。此外，还有竞争性可磁性固相荧光，双位点免疫荧光等。20 世纪 80 年代在普通荧光标记基础上发展的新技术——时间分辨荧光技术 (TRFIA) 是以稀土离子 (镧系元素) 标记抗原或抗体，建立的细胞、核酸探针新技术。

8.1.1 荧光免疫技术的基本原理

荧光是由荧光物质的分子吸收外界能量 (如光能等)，发生电子跃迁，而后以光子的形式释放出能量，停止能量供给，发光亦立即停止。这个过程中将损失部分能量，因而释放的光子比激发光的波长要长，二者波长之差反映了荧光物质的特征，称为“stokes 改变”。此外，荧光没有指向性，因而可在任意方向放入检测器，而不一定在激

发光的直线上。免疫荧光技术是以不影响抗原抗体活性的荧光色素标记在抗体（或抗原）上，与其相应的抗原（或抗体）结合后，在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应。荧光素是具有共轭双键体系结构的化合物，当接受紫外光等照射时，由低能量级的基态向高能级跃迁，形成电子能量较高的激发态。当电子从激发态恢复至基态时，发出荧光。

8.1.2 荧光和荧光物质

8.1.2.1 荧光

（1）荧光的产生 一些化学物质能从外界吸收并储存能量（如光能、化学能）而进入激发态，当其从激发态再回复至基态时，过剩的能量可以电磁辐射的形式发射即发光。荧光发射的特点是可产生荧光的分子或原子在接受能量后即刻引起发光，而一旦停止供能，发光（荧光）现象随即停止。可引发荧光的能量种类很多，由光激发所引起的荧光称为光致荧光。

（2）荧光效率 荧光效率是指荧光分子将吸收的光能转变成荧光的百分率。荧光分子不会将全部吸收的光能都转变成荧光，而是或多或少地以其他形式释放。发射荧光的光量子数亦称荧光强度，除受激发光强度影响外，也与激发光的波长有关。各个荧光分子有其特定的吸收光谱和发射光谱（荧光光谱），即在某一特定波长处有最大吸收峰和最大发射峰。选择激发光波长最接近于荧光分子的最大吸收峰波长，测定光波最接近于最大发射光波峰时，可得到最强的荧光效率。

$$\text{荧光效率} = \frac{\text{发射荧光的光量子数}}{\text{吸收光的光量子数}} \times 100\%$$

（3）荧光寿命 指荧光物质被一瞬时光脉冲激发后产生的荧光随时间衰减到一定程度时所用的时间。

（4）荧光的淬灭 指荧光分子在某些理化因素作用下，荧光分子的辐射能力受到激发光较长时间的照射后会减弱的现象。这是由于激发态分子的电子不能回复到基态，所吸收的能量无法以荧光形式发射所致。如紫外线照射、高温（ $\geq 20^{\circ}\text{C}$ ）、没食子酸、苯胺、酚、 I^- 、 Cl^- 、 Fe^{+3} 、 Ag^+ 等均会使荧光淬灭。

（5）影响因素

①pH：荧光素在溶剂中基本上处于离子化状态，因此，溶剂中的氢离子浓度对荧光强度的影响是极大的。每一种荧光素都有自己合适的pH值，它保持荧光素分子与溶剂之间的电离平衡。pH值的改变可以引起荧光素荧光光谱的改变，并可造成荧光强度的降低。

②温度：环境温度对荧光染色有明显的影响。一般情况下，温度在 20°C 时，荧光素即开始表现温度淬灭作用，以后随温度升高而加强，可使荧光完全淬灭。温度在 20°C 以下，荧光素的荧光强度随温度的变化改变不明显，基本上保持恒量。荧光显微镜观察在适当的低温环境中进行可得到更好的结果。

③荧光素的浓度：浓度对荧光素的发光影响极大。在一定浓度范围内，荧光强度随荧光素浓度增加而增加。

④杂质对细胞荧光染色的影响：杂质对荧光的淬灭作用多由于溶剂中含有一些不发光的物质如溴化物、碘化物和氨基苯等杂质的存在可使荧光减弱。

⑤某些细胞固定剂对细胞荧光染色的影响：在细胞染色中，固定细胞的溶剂对荧光染色有明显影响。如戊二醛、甲醛固定的细胞比不固定的细胞荧光强度减弱 50% 左右。

⑥一些化合物如苯胺、酚、硝基苯及一些卤化物等都有较强的荧光淬灭作用，在进行荧光免疫试验中，要避免这些物质的污染。另外，这些物质可被用作淬灭剂来消除不需要的荧光，如用硝基苯处理有荧光的镜油等。荧光物质的保存应注意避免光（特别是紫外光）的直接照射和与其他化合物的接触。

8.1.2.2 常用荧光素及特征

荧光素是一种有机染料，用于抗体标记的荧光素具有以下特点：①通常是环状复合物，与延伸物相连接。单键与双键的交替数目越大，被激发的分子稳定性越大，即荧光增强；②分子平面性和硬度越大，荧光倾向越大；③有些分子尤其是螯合物，加入金属离子可产生强烈荧光；④浓度、温度、pH 值和离子强度均可对分子的荧光效率产生显著影响。荧光物质的稀释溶液，可在室温下使用。荧光可采用常见的、相对较便宜而无害的方法来检测。此外，结合物在一般储存条件下性能稳定，可保存使用较长时间。目前用于标记抗体的荧光素主要有异硫氰酸荧光黄（FITC）、四乙基罗丹明（tetraethylrhodamine B₂₀₀, RB₂₀₀）、四甲基异硫氰酸罗丹明（tetramethyl rhodamine isothio - cyanate, TRITC）镧系稀土元素螯合物、藻红蛋白（phycoerythrin, PE）及 7 - 氨基 - 4 - 甲基香豆素（7 - amino - 4 - methyl couma - rin, AMC）等。其中 FITC 应用最广，罗丹明、PE 和 AMC 常与 FITC 联合使用，作为对比染色或双标记，特别是 PE 在流式细胞术（flow - cytometry, FCM）中较常用。

（1）异硫氰酸荧光素（Fluorescein Isothiocyanate, FITC）

FITC 纯品为黄色或橙黄色结晶粉末，易溶于水和酒精等溶剂。分子量为 389.4kD，最大吸收光波长为 490 ~ 495nm，最大发射光波长为 520 ~ 530nm，呈明亮的黄绿色荧光。有两种同分异构体，其中异构体 I 型在效率、稳定性和与蛋白质结合力等方面都很好，在冷暗干燥处可保存多年，是应用最广泛的荧光素。其主要优点：①人眼对黄绿色较为敏感；②通常切片标本中的绿色荧光少于红色，有利于降低背景干扰。

（2）四乙基罗丹明（Rhodamine B₂₀₀, RB₂₀₀）

RB₂₀₀ 为橘红色粉末，不溶于水，易溶于酒精和丙酮，性质稳定，可长期保存。最大吸收光波长为 570nm，最大发射光波长为 595 ~ 600 nm，呈橘红色荧光。本品性质稳定。

（3）四甲基异硫氰酸罗丹明（Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate, TRITC）

TRITC 为罗丹明的衍生物，为紫红色粉末，较稳定。最大吸收光波长为 550 nm，最大发射光波长为 620 nm，呈橙红色荧光，与 FITC 的翠绿色荧光对比鲜明，可配合用于双标记。其异硫氰基可与蛋白质结合，但荧光效率较低。

（4）藻红蛋白（Phycoerythrin, PE）

PE 是从红藻（red alga）中提取的一种藻胆蛋白（phycobiliprotein），最大吸收波

长为 490nm ~ 560nm, 激发产生的荧光波长为 595nm, 呈现红色荧光。PE 可和 FITC 同时用于对各种抗体或配体进行双标记, 在流式荧光免疫技术中较常用。

(5) 其他荧光物质

1) 镧系稀土元素

某些三价镧系稀土元素如镧 (Eu^{3+})、钐 (Sm^{3+})、铽 (Tb^{3+}) 等的螯合物可发射特征性的荧光, 其中以 Eu^{3+} 应用最广。 Eu^{3+} 螯合物激发光波长范围宽、发射光波长范围窄、荧光衰变时间长, 最适合于时间分辨荧光免疫测定。

2) 酶作用后产生荧光的物质

某些化合物本身无荧光效应, 一旦经酶作用便形成具有强荧光的物质。例如, 4-甲基伞酮- β -D 半乳糖苷 (MUG), 受 β -半乳糖苷酶 (β -G) 的作用分解成 4-甲基伞酮 (MU), 后者可发出荧光, 激发光波长为 360nm, 发射光波长为 450 nm。其他如碱性磷酸酶 (AP) 的底物, 4-甲基伞酮磷酸盐 (MUP) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 的底物, 对羟基苯乙酸 (HPA) 等都具有荧光底物的性质, 可以用于荧光酶免疫分析。

表 8-1 酶和荧光底物

酶	底物	产物	激发光	发射光	相应的信号
β -G	MUG	MU	360	450	10
AP	MUP	MU	360	450	10
HRP	HPA	二聚体	317	414	0.03

8.1.3 荧光标记物的制备

8.1.3.1 荧光素选择的条件

(1) 应具有与蛋白质形成稳定共价键的化学基团。与蛋白质结合后不易解离, 而未结合的荧光素及其降解产物易于去除。

(2) 荧光效率高, 与蛋白质结合后, 仍能保持较高的荧光效率。

(3) 荧光色泽与背景组织的色泽对比鲜明。

(4) 与蛋白质结合后, 不影响蛋白质原有的生化和免疫性质。

(5) 标记方法简单、快速、安全无毒。

(6) 与蛋白质的结合稳定, 易于保存。

8.1.3.2 荧光素标记抗体的方法

用于荧光素标记的抗体应具有高特异性和高亲和力。所用抗血清中不应含有针对标本中正常组织的抗体。一般需经纯化, IgG 纯化后再作标记。常用的标记方法有搅拌标记法和透析标记法两种。

(1) 搅拌标记法

以 FITC 标记为例, 先将待标记的蛋白质溶液用 0.5mol/L pH 值为 9.0 的碳酸盐缓冲液平衡, 随后在磁力搅拌下逐滴加入 FITC 溶液, 在室温持续搅拌 4 ~ 6h 后, 离心,

上清即为标记物。此法适用于标记体积较大、蛋白含量较高的抗体。优点是标记时间短, 荧光素用量少。但本法的影响因素多, 若操作不当会引起较强的非特异性荧光染色。

(2) 透析标记法

仍以 FITC 标记为例, 先将待标记的蛋白质溶液装入透析袋中, 置于含 FITC 的 0.01mol/L pH 值为 9.4 碳酸盐缓冲液反应过夜, 以后再对 PBS 透析去除游离荧光素。低速离心, 取上清液即为标记物。此法适用于标记样品量少, 蛋白含量低的抗体溶液。此法标记均匀, 非特异性荧光染色也较弱。具体操作如下。

1) FITC 标记法 (透析袋内渗透标记)

①将 FITC 溶于 0.5mol/L 、pH 值为 9.2 的碳酸盐缓冲液中, 使 FITC 的最终浓度为 $8 \sim 10\text{mg/mL}$ 。

②将待标记的抗体 (IgG , $10 \sim 20\text{mg/mL}$) 装入一透析袋内, 4°C 条件下用 0.15mol/L 氯化钠溶液透析 2d, 其间换液 3 次。然后改用 0.05mol/L 、pH 值为 8.5 的碳酸盐缓冲生理盐水继续透析 4 ~ 5h。最后, 再用 0.05mol/L 、pH 值为 9.2 的碳酸盐缓冲生理盐水透析 2h。

③将该透析袋置于上述 FITC 溶液中透析, 使荧光素与抗体 IgG 结合。FITC 的最终浓度是 0.1mg/mL , 体积是透析袋内 IgG 溶液体积的 10 倍。在 4°C 条件下, 透析 14 ~ 16h。

④终止荧光素标记反应, 改用 0.02mol/L 、pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液, 在 4°C 条件下继续透析 2 ~ 3h, 过滤, 保存备用。

2) RB_{200} 标记法

RB_{200} 标记过程分为两个步骤, 第 1 步骤是制备可与蛋白质结合的 $-\text{SO}_2\text{Cl}$ 残基染料; 第 2 步骤是标记抗体蛋白质。

第 1 步骤: 取 $\text{RB}_{200} 0.5\text{g}$ 和 $\text{PCl}_5 0.1\text{g}$ 置于研钵中, 迅速搅匀, 加入无水丙酮 5mL 。混合 5min 后, 形成紫褐色溶液。然后, 过滤或离心以除去不溶性杂质, 澄清部分即为磺化的 RB_{200} 。

第 2 步骤: 取待标记 IgG ($10 \sim 200\text{mg/mL}$) 与 0.5mol/L 、pH 值为 9.5 的碳酸盐缓冲液以 1:2 (体积比) 的比例混合, 然后加入 SO_2Cl 化的 RB_{200} , 每 $50 \sim 600\text{mg}$ IgG 中, 加入 0.1mL 磺化的 RB_{200} , 边加边搅拌。取相当于 IgG 蛋白量 1:2 的活性炭加入标记溶液, 继续搅拌 1h。然后离心分离 30min (4000 r/min)。离心后, 取上清液部分, 装入透析袋中, 透析 4h。最后, 用 40% 的饱和硫酸铵沉淀 1 次, 弃去上清液, 沉淀物溶于少量缓冲液中, 再透析脱盐。以上操作均应在 4°C 条件下进行。

(3) 荧光素标记抗体的纯化

荧光素标记抗体完成后, 还应对其做进一步纯化, 纯化的目的在于清除未结合的游离荧光素和结合荧光素过多的抗体。采用透析法和凝胶柱层析法 (Sephadex G-25 或 Sephadex G-50) 去除游离的荧光素; 采用 DEAE-纤维素或 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析法, 去除未标记及过度标记的抗体; 采用组织制剂 (正常大白鼠或小白鼠的肝粉) 吸收法和固相抗原吸收法去除非期望抗体或交叉反应抗体。具体操作如下。

1) 去除游离的荧光素

①透析法：将荧光素标记的抗体装入透析袋中，先用流水透析10min，然后用0.01mol/L、pH值为7.1的磷酸盐缓冲液或生理盐水透析1周左右，期间每天换液3次，直到外透析液在紫外灯下不发射荧光为止。

②Sephadex G25 滤过法制备：Sephadex G25 洗脱柱(2.5cm×25cm)，1次可过滤15mL，选用0.01mol/L或0.005mol/L、pH值为7.1的磷酸盐缓冲液平衡。样品进入柱床后，很快显示出两个颜色相同的移动带，其中快速移动带是由未标记的蛋白和标记的蛋白组成的，而慢速移动带是由游离的荧光素组成的，两带之间为缓冲液。因此，应收集快速移动带，即可去除游离的荧光素。

2) 去除过度标记的抗体蛋白，抗体蛋白每结合1分子荧光素，就可增加2个单位的负电荷。因此，结合荧光素越多，标记蛋白质的负电荷越多。依据这一原理，采用离子交换色谱法，可分离各种离子化的高分子物质。离子交换剂的分离机理是由于各种蛋白质的等电点不同，在不同pH值和离子强度的溶液中，能够可逆地吸收和解离，因此可将其分离。

3) 去除非特异性交叉反应的标记抗体，某一些非特异性的微量抗原，在用特异性抗原免疫动物时，被带入动物体内，诱导产生了相应的抗体，这些抗体也会引起交叉荧光反应，因此，需采取一些措施，消除这些抗体的影响。常用的方法有如下3种。

①组织制剂吸收：用动物脏器组织制成干粉或匀浆，与标记的抗体混合，吸收掉与同种脏器组织成分有交叉或额外特异性反应的标记抗体。常用的组织制剂是肝粉。

②颗粒性抗原交叉吸收：由于特异性抗原与非特异性抗原之间有共同抗原，所引起的交叉反应，用组织制剂吸收不能消除，因此可用颗粒性共同抗原直接吸收标记抗体。

③免疫吸附剂吸收：对于可溶性共同抗原所引起的交叉反应，可采用免疫吸附剂吸收。免疫吸附剂是不溶性基质，通过一定的化学反应与可溶性抗原或抗体连接，形成稳定的不溶性复合物，利用此复合物特异地吸附抗原或抗体，然后，再通过一定条件的溶液，使抗原抗体复合物解离，从而洗脱出免疫纯的抗原或抗体。常用的免疫吸附剂是纤维素和琼脂糖。

(4) 荧光素标记抗体的鉴定

荧光素标记的抗体，在使用前应加以鉴定。鉴定指标包括抗体效价（抗体活性）和荧光素与蛋白质结合比率等。

1) 抗体的含量及特异性测定

一般来说，抗体浓度越大，标记抗体在应用时特异性就越高，非特异荧光就越少。测定抗体的含量常采用双向免疫扩散试验。抗体效价在1:16~1:32者即为理想的抗体浓度。测定抗体的特异性常采用免疫电泳法。在紫外灯下，由特异性抗原和抗体形成的沉淀线可发出荧光。

2) 荧光素与蛋白质结合比率(F/P)的测定和计算方法

将制备的荧光抗体溶液稀释至 A_{280nm} 约为1.0，分别测定标记荧光素的特异吸收峰和蛋白质特异吸收峰(A_{280nm})，按公式计算。

$$(\text{FITC}) F/P = \frac{2.87 \times A_{495\text{nm}}}{A_{280\text{nm}} - 0.35 \times A_{495\text{nm}}}$$

F/P 比值越高,说明抗体分子上结合的荧光素越多,反之则越少。一般用于固定标本的抗体以 F/P 比值 = 1.5 为宜,用于活细胞染色的以 F/P = 2.4 为宜。

3) 抗体工作浓度的确定方法:将荧光抗体做系列倍比稀释(1:4 ~ 1:256),对切片标本作荧光抗体染色,以能清晰显示特异性荧光、而且非特异染色弱的最高稀释度为荧光抗体工作浓度。

4) 荧光素标记抗体的效价测定:

常采用检测抗核抗体的方法测定荧光素标记抗体的效价。具体方法如下:将抗核抗体阳性血清按 1:10、1:40、1:160、1:640 稀释,然后分别将此不同稀释度的抗核抗体阳性血清加到涂有细胞的玻片上,将此玻片置湿盒中,37℃ 孵育 30min,然后用磷酸盐缓冲液冲洗,再将不同稀释度的荧光素标记的羊抗人 IgG (1:4 ~ 1:250) 分别加入标本,然后置湿盒中,37℃ 孵育 30min,用磷酸盐缓冲液冲洗,用荧光显微镜观察,凡能显示最清晰明亮的阳性细胞核,而非特异性荧光最弱的最高血清稀释度即为使用效价。

(5) 荧光抗体的保存

标记抗体完成之后应过滤除菌,并加入 0.1% ~ 1% 的 Na_3N ,或 0.01% ~ 0.02% 的硫柳汞防腐,最好小量分装 (0.5 mL/瓶),防止抗体失活,还要防止荧光素脱落和淬灭,所以置 -20℃ 冻存,这样可放置 3 ~ 4 年。在 4℃ 中一般也可存放 1 ~ 2 年。

8.1.3.3 镧系稀土元素标记物的制备

镧系稀土元素离子不能直接与蛋白质结合,因此需要利用具有双功能基团的螯合剂,将稀土元素与抗体或抗原分子的氨基藕联,以获得稳定的稀土元素标记物。

(1) 常用的螯合剂

1) 多羧酸类螯合剂:异硫氰酸-苯基-EDTA、异硫氰酸-苯基-DTTA、二乙烯三胺五乙酸(DPTA)和环酞(CDPTA)等。

2) β -二酮体类螯合剂:2-萘酰三氟丙酮(2-NTA)。

3) W1174、4,7-双(氯化苯酚磺酸盐)-1,10 菲洛林(简称 BCPDA)。

(2) 标记方法

对于抗体和完全抗原可直接标记,对于小分子半抗原则需先与大分子载体蛋白如牛血清白蛋白(BSA)、多聚赖氨酸等连接,再标记 Eu^{3+} 。标记方法分为一步法和二步法两种。

一步法是螯合剂先螯合 Eu^{3+} ,再连接蛋白质。方法是:在纯化的抗体溶液中加入 Eu^{3+} -DTTA 螯合物,调 pH 值至 9.5,4℃ 反应过夜。用 Sephacryl S-200 凝胶柱层析,经 $A_{280\text{nm}}$ 值测定,收集含蛋白的洗脱液,同时取样加荧光增强液测定 Eu^{3+} 含量。

按公式: $\text{Eu}^{3+}/\text{IgG} = \text{Eu}^{3+} (\mu\text{mol/L}) / \text{蛋白} (\mu\text{mol/L})$ 计算标记率,一般为 10.0 左右。

二步法是先连接蛋白质,再螯合 Eu^{3+} 。方法是:在纯化的抗体溶液中加入 DPTA 螯合剂,调 pH 值至 7.0,快速旋动混合,室温反应,4℃ 透析除去未结合的 DPTA。加

入 EuCl_3 或 SmCl_3 溶液, 室温搅拌反应。用 Sephadex G-50 凝胶柱层析, 其余步骤同一步法。

8.1.3.4 香豆素类标记物

香豆素类衍生物作为荧光底物在底物标记荧光免疫分析 (SLFIA) 及荧光酶联免疫分析方面有非常广泛的应用, 伞形酮 (7-羟基香豆素) 就是其中一例。伞形酮的最大优点是当 7-位的羟基被衍生化时将会产生非荧光的分子。伞形酮或其 3 位取代衍生物的 7-位的羟基可形成糖苷键或磷酸酯键而用于 SLFIA。结合物是非荧光的, 淬灭荧光的化学键可以在酶催化水解时生成强荧光产物。四甲基伞形酮的磷酸酯作为荧光底物与碱性磷酸酶标记系统结合已被广泛用于 SLFIAF。

8.1.3.5 藻胆蛋白类标记物

藻胆蛋白类 (藻红朊, 藻青朊, 别藻青朊) 的水溶性非常好, 在它们的结构中含有几个线性四吡咯辅基, 因而具有很高的吸光能力。这类化合物常在微粒浓缩荧光免疫分析中用作荧光探针。

与藻胆蛋白相近的还有一些其他类型的大环类荧光探针。如叶绿素作为标记物已经被用于小分子化合物的免疫分析。美国 Diagnostic 公司合成出了一种称作 Ultralite 680 的酞菁类化合物, 其 Stokes 位移达 300nm, 最大发射波长在 682nm 处, 荧光量子产率为 0.6, 已经用于荧光免疫分析。红外激光二极管和半导体检测器的商品化, 促使人们发展更长波长的标记物。在近红外区域, 只有花菁染料才发射荧光。这些长波长荧光染料的使用, 使得波长分辨荧光免疫分析成为可能, 从而彻底地克服血清的干扰。

8.1.3.6 异硫氰酸荧光素 (FITC)

异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 为黄、橙黄色或褐黄色结晶粉末, 相对分子质量为 389.4kD。最大激发波长是 490 ~ 495nm, 最大发射波长是 520 ~ 530nm, 黄绿色荧光。溶于水、乙醇, 性质稳定, 在低温干燥的环境中可以保存多年。分子中带有异硫氰酸活性基团 ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$), 标记时与蛋白质分子赖氨酸残基反应, 可标记上 15 ~ 20 个荧光素。

8.2 荧光抗体的质量控制

对制备的荧光抗体必须进行质量鉴定, 主要进行特异性和敏感性两个方面的鉴定。

8.2.1 染色特异性和敏感性的测定方法

8.2.1.1 特异性染色效价测定

直接染色效价以倍比稀释荧光抗体溶液, 如 1:2、1:4、1:8……, 与相应抗原标本作一系列染色, 荧光强度在 “+++” 的最大稀释度为其染色滴度 (效价) 或单位。

实际染色应用时,可取低1个或2个稀释度(即2~4个单位),如染色效价为1:64,实际应用时可取1:32或1:16。间接染色效价可按间接免疫荧光组化染色步骤,先用特异性抗体与抗原结合,再用不同稀释度的荧光抗体染色,结果以荧光强度“+”至“+++”为标准,染色用效价和直接法相同。

8.2.1.2 非特异性染色测定

根据荧光抗体的用途不同,可用相类似的抗原切片或涂片,倍比稀释荧光抗体,按常规染色,在标本上出现的非特异染色应显著低于特异性染色滴度,否则应采取消除非特异性染色的方法处理荧光抗体。

8.2.1.3 吸收试验

在荧光抗体中加入过量相应抗原,于室温中搅拌2h后移入4℃中过夜,3000 r/min离心30min,收集上清液,再用相应抗原阳性标本染色,结果应不出现明显阳性荧光。

F(荧光素)和P(抗体蛋白)的摩尔比值反映荧光抗体的特异性染色质量,一般要求F/P的摩尔比值为1~2。过高时,非特异性染色增强;过低时,荧光很弱,敏感性低。F/P比值可按下述方法进行测定。

(1) 蛋白质定量测定荧光抗体的蛋白质浓度(mg/mL)。

(2) 结合荧光素定量先制作荧光素定量标准曲线,即准确称取FITC 1mg,溶于10mL 0.5mol/L (pH值为9.0)碳酸盐缓冲液中,再用0.01mol/L (pH值为7.2) PBS稀释到100mL,此时荧光素含量为10μg/mL,以此为原液。再倍比稀释9个不同浓度的溶液,用分光光度计在490nm波长测定光密度值(OD),以光密度为纵坐标,荧光素含量为横坐标,作标准函数图。荧光素与蛋白质结合后,其吸收光谱峰值向长波方向位移约5nm, FITC和蛋白质结合后吸收光谱峰值由490nm变为493~495nm, RB₂₀₀和蛋白质结合后吸收光谱峰值变为595 nm。

(3) F/P比值的计算:可按以下公式计算。

$$F/P \text{ 摩尔比值} = \frac{C_{\text{FITC}} (\mu\text{g/mL})}{C_{\text{蛋白质}} (\text{mg/mL})} \times \frac{1.6 \times 10^5}{390 \times 10^6} = 0.41 \times \frac{C_{\text{FITC}} (\mu\text{g/mL})}{C_{\text{蛋白质}} (\text{mg/mL})}$$

式中, 1.6×10^5 为抗体蛋白质的相对分子量; 390 为 FITC 的相对分子量; 蛋白质从克(g) 换算为毫克(mg) 需乘以 10^3 ; 而荧光素从克(g) 换算为微克(μg) 需要再乘以 10^6 。

$$\text{RB200 荧光抗体的摩尔比值} = \frac{C_{\text{RB200}} (\mu\text{g/mL})}{C_{\text{蛋白质}} (\text{mg/mL})} \times \frac{1.6 \times 10^5}{580 \times 10^3} = 0.28 \times \frac{C_{\text{RB200}} (\mu\text{g/mL})}{C_{\text{蛋白质}} (\text{mg/mL})}$$

按图8-1测定法更为简便,即先用276nm波长测得蛋白质的OD值,再用493nm波长测得FITC的OD值,将这两个OD值在图8-1上连成一直线,直线与各纵线交叉处,即可查出标记抗体的: FITC的浓度(μg/mL)、F/P的质量比值(μg/mg)、F/P的摩尔比值、蛋白质的浓度μg/mL等。

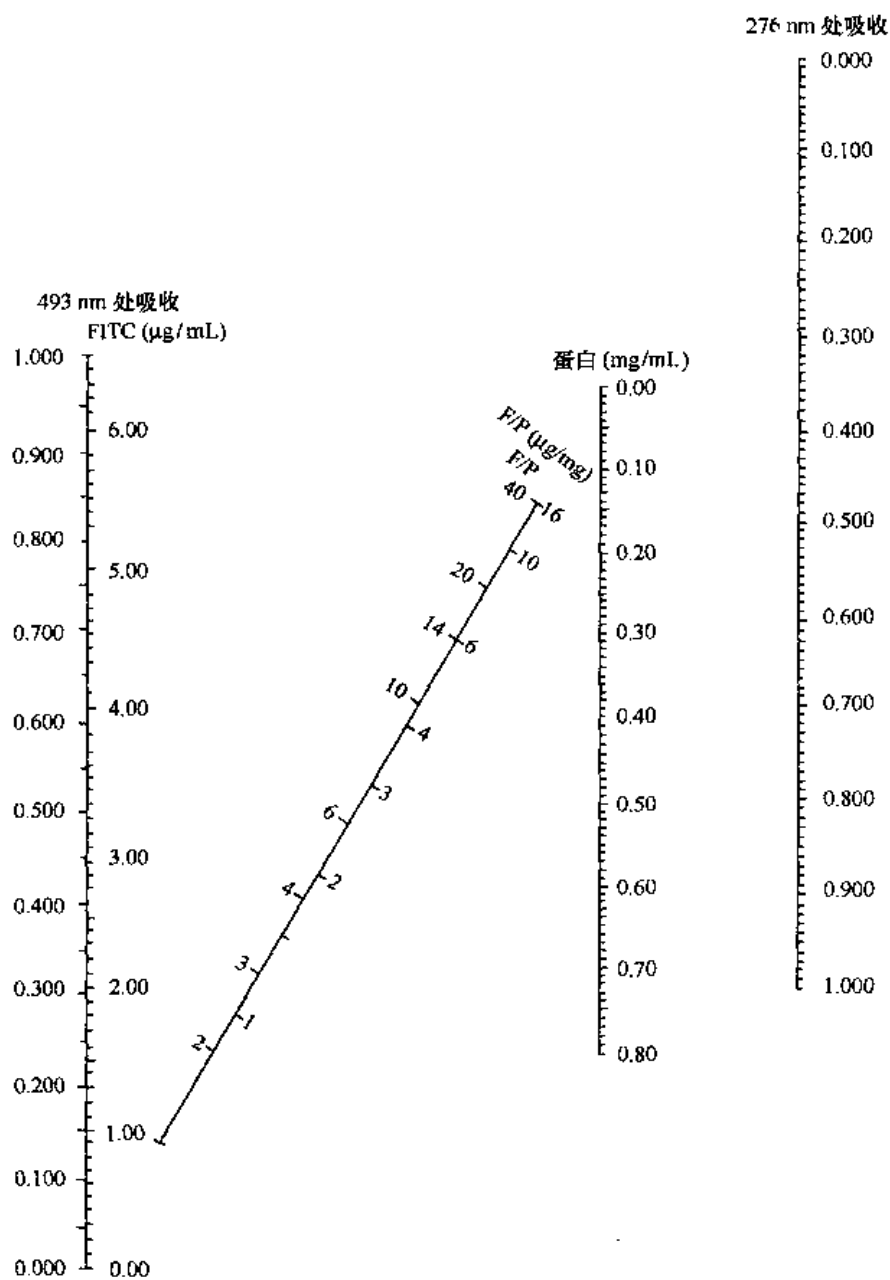


图 8-1 FITC 标记物中球蛋白荧光色素和 F/P 比值计算图

8.3 荧光免疫显微技术

8.3.1 免疫荧光显微技术的原理

用荧光素标记特异性抗体或抗抗体，检测固定组织细胞上的抗原或血清中的抗体，经洗涤除去游离的荧光抗体后，于荧光显微镜下观察，在黑暗背景上可见明亮的特异荧光。该技术常用于定性和定位检查。

8.3.1.1 标本的制作

荧光显微技术主要靠观察切片标本上荧光抗体的染色结果作为抗原的鉴定和定位。因此标本制作的好坏直接影响到检测的结果。在制作标本过程中应力求保持抗原的完整性,并在染色、洗涤和封埋过程中不发生溶解和变性,也不扩散至临近细胞或组织间隙中去。标本切片要求尽量薄些,以利抗原抗体接触和镜检。标本中干扰抗原抗体反应的物质要充分洗去,有传染性的标本要注意安全。

常见的临床标本主要有组织、细胞和细菌3大类。按不同标本可制作涂片、印片或切片。组织材料可制备成石蜡切片或冷冻切片。石蜡切片因操作繁琐,结果不稳定,非特异反应强等已经很少应用。组织标本也可制成印片,方法是用洗净的玻片轻压组织切面,使玻片粘上1~2层组织细胞。细胞或细菌可制成涂片,涂片应薄而均匀。涂片或印片制成后应迅速吹干、封装。置-10℃保存或立即使用。

8.3.1.2 荧光抗体染色

在已固定的标本上滴加经适当稀释的荧光抗体。置湿盒内,在一定温度下孵育一定时间,一般为25℃~37℃ 30min,不耐热抗原的检测则以4℃过夜为宜。用PBS充分洗涤,干燥。

8.3.1.3 荧光显微镜检查

经荧光抗体染色的标本,需要在荧光显微镜下观察。最好在染色当天即作镜检,以防荧光消退,影响结果。

荧光显微镜检查应在通风良好的暗室内进行。首先要选择好光源或滤光片。滤光片的正确选择是获得良好荧光观察效果的重要条件。在光源前面的一组激发滤光片,其作用是提供合适的激发光。激发滤光片有两种:MG为紫外光滤片,只允许波长275~400nm的紫外光通过,最大透光度为365nm;BG为蓝紫外光滤片,只允许波长325~500nm的蓝外光通过,最大透光度为410nm。靠近目镜的一组阻挡滤光片(又称吸收滤光片或抑制滤光片)的作用是滤除激发光,只允许荧光通过。透光范围为410~650nm,代号有OG(橙黄色)和GG(淡绿黄色)两种。观察FITC标记物可选用激发滤光片BG12,配以吸收滤光片OG4或GG9。观察RB₂₀₀标记物时,可选用BG12与OG5配合。

8.3.1.4 实验的类型

(1) 直接法:用特异荧光抗体直接滴加于标本上,使之与抗原发生特异性结合(图8-2)。本法操作简便、特异性高、非特异荧光染色因素少;缺点是敏感度偏低,每检查一种抗原需制备相应的特异荧光抗体。

(2) 间接法:可用于检测抗原和抗体,原理见图8-3。本法有两种抗体相继作用,第一抗体为针对抗原的特异抗体,第二抗体(荧光抗体)为针对第一抗体的抗抗体。本法灵敏度高,而且在不同抗原的检测中只需应用一种荧光抗体。

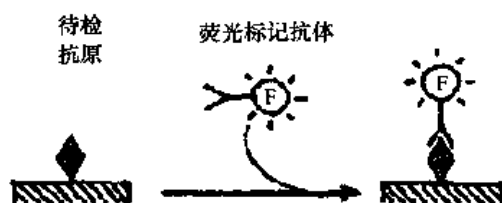


图 8-2 直接免疫荧光法原理示意图



图 8-3 间接免疫荧光法原理示意图

(3) 补体结合法：本法是间接法的第一步抗原抗体反应时加入补体（多用豚鼠补体），再用荧光标记的抗补体抗体进行示踪（图 8-4）。本法敏感度高，且只需一种抗体。但易出现非特异性染色，加之补体不稳定，每次需采新鲜豚鼠血清，操作复杂。因此较少应用。



图 8-4 补体结合免疫荧光法原理示意图

(4) 标记法本法：用 FITC 及罗丹明分别标记不同的抗体，而对同一标本作荧光染色。在有两种相应抗原存在时，可同时见到橙红和黄绿两种荧光色泽。

8.4 荧光偏振免疫技术

荧光偏振免疫技术法（fluorescence polarization immunoassay, FPIA）是一种定量免疫分析技术，其基本原理是荧光物质经单一平面的蓝偏振光（485nm）照射后，吸收光能跃入激发态，随后回到基态，并发出单一平面的偏振荧光（525nm）。偏振荧光的强弱程度与荧光分子的大小呈正相关，与其受激发时转动的速度呈反相关。FPIA 最适宜检测小至中等分子物质，常用于测定半抗原的药物浓度及激素的测定。

反应系统内除待测抗原外，同时加入一定量用荧光素标记的小分子抗原，使二者与有限量的特异性大分子抗体竞争结合。当待测抗原浓度高时，经过竞争反应，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，在液相中转

动速度较快,测量到的荧光偏振程度也较低。反之,如果待测抗原浓度低时,大部分荧光素标记抗原与抗体结合,形成大分子的抗原抗体复合物,此时检测到的荧光偏振程度也较高。荧光偏振程度与待测抗原浓度呈反比关系。先测定待测抗原标准品,绘制标准曲线,通过检测反应体系中偏振光的大小,从标准曲线上就可以精确地得知样品中待测抗原的相应含量。

8.5 时间分辨荧光免疫技术

时间分辨荧光免疫技术(TRFIA)是20世纪80年代初问世的一种新型非放射性免疫检测技术。其主要特点是以三价稀土元素为示踪剂,标记蛋白质、多肽、激素、抗体、核酸探针或生物活细胞,待反应体系(如抗原抗体免疫反应、生物素亲和素反应、核酸探针杂交反应、靶细胞与效应细胞的杀伤反应等)发生后,用时间分辨荧光分析仪测定最后产物中的标记物的荧光强度,以此来判断反应体系中被分析物的浓度。该方法的灵敏度高、重现性好、线性范围宽、操作简单,并可进行多标记同时测定。如今这一检测技术已经应用于生物学、医学的超微量分析,并可对肿瘤标记物、激素、生物大分子进行测定,已经成为医学临床检验的重要方法之一。

在时间分辨荧光免疫分析中,人们采用长寿命荧光标记物,其寿命要比散射光及来自样品、样品管、滤光片等背景荧光的寿命长得多,如一些镧系螯合物的荧光寿命在 $10 \sim 1000 \mu\text{s}$ 范围内,因而适合于微秒级时间分辨荧光测定。简单无机离子 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 及 Dy^{3+} 的荧光非常弱,但当它们与合适的有机配体配位时荧光会大大增强。有机配体吸收能量后由分子外层的电子单线基态 S_0 被激发到单线激发态(S_1 , S_2 等),处于激发态电子的能量可以通过非辐射能量转移(如以热的方式)损失掉,可以以辐射的方式回到基态(荧光)或经系间窜跃到半稳定的三线态 T ,回到基态时发出磷光。在有上述金属离子存在的情况下,能量可以从配体的三线态 T ,传递给中心离子的合适能级并使之上升到单线激发态,最后发射出离子型荧光。

由于处于激发态的分子在光发射之前的能量损失,发射光的波长总是比激发光的波长要长。对于一般的有机分子,Stokes位移通常比较小($30 \sim 50\text{nm}$),而对镧系螯合物该值会更大,如对 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 其差值在 200nm 以上。镧系螯合物荧光寿命一般在 $10 \sim 1000 \mu\text{s}$ 之间,而一般有机分子的荧光寿命在 $1 \sim 10\text{ns}$ 之间。

在时间分辨荧光测定中,样品被一个来自激光或闪光灯的很短的光脉冲所激发,激发态分子发射出短或长寿命荧光的强度均按对数衰减,但短寿命荧光在 $100 \mu\text{s}$ 之内便衰减到零。如果在激发之后的 $100 \sim 200 \mu\text{s}$ 时间内不进行荧光的测定,则短寿命荧光及散射光均会被完全除去,这使得长寿命荧光的测定具有非常高的灵敏度。在每个循环的开始时加一个激发光脉冲,镧系螯合物荧光的测定在一个延迟期(使背景荧光及杂散光衰减到零)之后进行,在一个恢复期之后进行下一循环的测定。对不同的体系,测量前的延迟时间及测量时间范围均可通过实验进行优化。

8.5.1 时间分辨荧光分析的测量方法

8.5.1.1 解离增强测量法

解离增强测量法 (Dissociation enhancement survey law) 是解离增强稀土离子荧光方法, 简称 DELFIA 法。通过双功能基团把 Eu^{3+} 或 Sm^{3+} 螯合到抗原、抗体或 SA 上, 免疫反应后, 部分标记物结合到固相载体上, 未结合的标记物被洗掉。最后用低 pH 值的增强液, 把 Eu^{3+} 或 Sm^{3+} 从免疫复合物中解离下来, 组成 $\text{Eu}^{3+}(\text{NTA})_3 \cdot (\text{TOPO})_3$ 或 $\text{Sm}^{3+}(\text{NTA})_3 \cdot (\text{TOPO})_3$ 新的螯合物, 使荧光强度增强将近百万倍。用 Arcus 型系列仪进行液相检测。本法重复性好, 特别适用于大、小分子活性物质的检测。采用 DELFIA 测量, 灵敏度可达 $10^{-16} \sim 10^{-18} \text{ mol/L}$ 的 DNA 量。此法的不足之处是不能直接测量固相样品的荧光, 需要外加增强液, 容易受外源性 Eu^{3+} 或 Sm^{3+} 干扰, 而影响结果, 应进行有效的改进。

8.5.1.2 固相荧光测量法

固相荧光测量法 (Solid phase fluorescence survey law) 又称为 DSLFIA 法。它是通过具有特殊双功能基团的螯合剂 BCPDA, 把 Eu^{3+} 或 Sm^{3+} 与抗体或抗原螯合。当抗原与抗体发生免疫反应后, 固相免疫复合物中 $\text{Eu}^{3+} - \text{BCPDA}$ 荧光强度可直接测量。整个过程不用外加增强液, 可以直接测量固相样品的荧光, 解决了液相测量容易污染和操作复杂的难题。现已用于核酸探针检测, 并取得了满意进展。

8.5.1.3 直接荧光测量法

直接荧光测量法 (Direct fluorescence survey law) 是采用双功能螯合剂二乙三胺五乙酸 - 对氨基水杨酸 (DTPA - PAS) 与抗原或抗体偶联, 免疫反应后, 再加入适量的 Tb^{3+} , 直接测量液相荧光强度。不需要预先制备 Tb^{3+} 标记物, 简化了操作步骤, 但灵敏度较低, 仅为 $10 \sim 9 \text{ mol/L}$ 。为提高检测灵敏度, 可以引入酶放大系统, 以 SA - 碱性磷酸酶水解 5 - 氟水杨酸磷酸酯, 生成 5 - 氟水杨酸, 后者在碱性条件下, 与 $\text{Tb}^{3+} - \text{EDTA} - \text{HCl}$ 形成高荧光强度的复合物, 可直接测定。

8.5.1.4 均相荧光测量法

均相荧光测量法 (Homogeneous phase fluorescence survey law) 是利用特殊的双功能螯合剂 W1174, 将 Eu^{3+} 标记小分子活性物质, 当与抗体结合后, 免疫复合物对 Eu^{3+} 荧光信号有显著增强或淬灭作用, 所以在测量前不必进行分离, 就可以直接进行测量液相中的荧光强度。该法省去了洗涤、分离和加增强液等繁琐的步骤, 具有快速、方便等优点, 但不足之处是需要特殊螯合剂。

8.5.1.5 协同荧光测量法

协同荧光测量法 (Coordination fluorescence survey law) 是利用一些不发荧光的稀土

离子, 如 Cd^{3+} 、 Y^{3+} 、 La^{3+} 、 Lu^{3+} 等, 能使发荧光的稀土离子的荧光信号大大增强。在免疫分析体系中, pH 值为 6.0~8.0 时, 它们的荧光强度最大, 有利于提高检测的灵敏度。此外, 此法可以对一份样品中不同成分含量进行同时测量。但需要特殊的增强液, 同时 Cd^{3+} 、 Y^{3+} 、 La^{3+} 、 Lu^{3+} 等稀土离子的纯度对测量结果有明显影响。

8.5.2 时间分辨荧光免疫分析的应用

时间分辨荧光免疫分析可用来检测生物活性物质, 特别是在生物样品免疫分析中, 显示出它愈来愈多的独特优点。在内分泌激素的检测, 肿瘤标志物的检测, 抗体检测, 病毒抗原分析, 药物代谢分析以及各种体内或外源性超微量物质的分析中, 应用 TRFIA 法越来越普遍。近年来, 已将这项技术应用于核酸探针分析和细胞活性分析、生物大分子分析, 该项技术发展十分迅速。

8.5.2.1 TRFIA 法在内分泌学中的应用

内分泌激素是一些活性小分子, 它们能与适当的抗体反应, 具有免疫反应性, 但不能产生抗体, 不具有免疫原性, 它们属于半抗原。对这些半抗原的测定, 一般多用竞争性时间分辨荧光免疫法测定。这方面的测定主要有血清中孕酮、雌二醇、睾酮、甲状腺激素、前列腺素的测定等。

8.5.2.2 TRFIA 在肿瘤学中的应用

对一些完全抗原, 它们大多是既有免疫反应性又有免疫原性的蛋白质类, 主要包括促甲状腺激素、血清胰岛素、血清癌胚抗原、血清甲胎蛋白、乙型肝炎病毒表面抗原等, 主要采用非竞争性 TRFIA 法进行测定。

8.5.2.3 TRFIA 法在免疫学中的应用

某些免疫细胞 (如 NK、LAK、T 杀伤细胞等) 的活性, 可以用 TRFIA 法来检测。如 Blomberg 等用该方法测定了 NK 细胞的活性; Granberg 等用 TRFIA 法测定杀伤性 T 淋巴细胞活性; Volgmann 等测定了 LAK 细胞的活性; Maley 用 TRFIA 法测定细胞介导的、补体介导以及抗体依赖的细胞活性; Lovgren 和 Blomberg 用此法同时测定两种靶细胞的活性; 陈泮藻等也用此法测定了 T 淋巴细胞的活性。这些测定均取得了良好的结果。

8.5.2.4 TRFIA 法在微生物学中的应用

荧光抗体技术在临床检验上已用作细菌、病毒和寄生虫的检验及自身免疫病的诊断等。在细菌学检验中主要用于菌种的鉴定。标本材料可以是培养物、感染组织、病人分泌排泄物等。本法较其他鉴定细菌的血清学方法速度快、操作简单、敏感性高, 但在细菌实验诊断中, 一般只能作为一种补充手段使用, 而不能代替常规诊断。荧光抗体染色法对脑膜炎奈氏菌、痢疾志贺菌、霍乱弧菌、布氏杆菌和炭疽杆菌等的实验诊断有较好效果。荧光间接染色法测定血清中的抗体, 可用于流行病学调查和临床回顾诊断。免疫荧光用于梅毒螺旋体抗体的检测是梅毒特异性诊断常用方法之一。免疫荧光技术在病毒

学检验中有重要意义,因为普通光学显微镜看不到病毒,用荧光抗体染色法可检出病毒及其繁殖情况。

在寄生虫感染诊断中,间接荧光抗体染色法有非常广泛的应用。间接免疫荧光试(IFAT)是当前公认的最有效的检测疟疾抗体的方法。常用抗原为疟疾患者血液中红内期裂殖体抗原。IFAT对肠外阿米巴、尤其是阿米巴肝脓肿也有很高的诊断价值,所用抗原是阿米巴培养物悬液或提取的可溶性抗原。

荧光抗体技术的一种特殊应用是流式细胞分析(flow cytometry)。在这种分析方法中检测仪器不是荧光显微镜,检测对象不是固定了的标本,而是将游离细胞作荧光抗体特异染色后,在特殊设计的仪器中通过喷嘴逐个流出,经单色激光照射发出的荧光信号由荧光检测计检测,并自动处理各处数据。这种方法可用于检测细胞大小、折散率、黏滞度等,更常用于T细胞亚群等的检测。

8.5.3 免疫荧光技术在医学检验中的应用

由于TRFIA技术具有灵敏度高和特异性强的特点,TRFIA法在微生物检测和分析中的应用日益广泛和深入。目前TRFIA已广泛应用于乙型肝炎病毒、脑炎病毒、流感病毒、呼吸道合胞体病毒(RSV)、副粘病毒、风疹病毒、马铃薯病毒、轮状病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、出血热病毒和梅毒螺旋体的抗原抗体以及某些细菌和寄生虫抗体的检测。潘利华等用TRFIA法进行了人血清中丙型肝炎病毒抗体(Anti-HCV)的检测,效果明显高于酶联免疫法。

8.5.4 免疫荧光技术与其他免疫分析方法比较

8.5.4.1 荧光免疫分析的优势

(1) 安全性好。时间分辨荧光免疫分析不使用放射性同位素进行标记,而采用荧光物质作标记物无放射性,从而避免了放射性废物处理难、污染环境和危害从业人员健康等问题。

(2) 标记物稳定。试剂盒使用寿命长,使运输和储存更为方便。由于标记物没有衰变期,试剂盒的使用寿命不再由标记物决定,而由生物制品决定,因此其有效期一般可达到一年。而一般放射免疫分析试剂盒的有效期只有数周。时间分辨荧光免疫分析法的荧光标记物的稳定性也优于酶免疫分析法中的酶标记物。

(3) 灵敏度高。时间分辨荧光免疫分析的检测下限可达到 10^{-19} mol/L,优于其他检测方法:酶免疫分析方法的检测下限为 10^{-15} mol/L,放射免疫分析方法的检测下限为 10^{-17} mol/L,化学发光免疫分析方法的检测下限为 10^{-17} mol/L。

(4) 测定的动态范围宽。时间分辨荧光免疫分析法的测定范围一般可以达到3~4个数量级。

(5) 测定过程简单快捷。由于采用了微孔包被的固相分离技术,测定过程变得简单快捷。

(6) 检测成本适中。与化学发光免疫分析相比,时间分辨荧光免疫分析法在进行检测分析过程中,不需要多种检测仪器,所有的检测药盒都对应一种检测仪器,使其在

具有等同、甚至优于化学发光免疫分析法的效果的同时,检测成本却大大降低。

8.5.4.2 荧光免疫技术在操作中的局限性

(1) 传统荧光探测器在使用上的限制来自光的散射,背景荧光和淬灭的干扰能在100~1000nm之间减少潜在性荧光测量的敏感度。通过蛋白水解酶、氧化或改性试剂预处理等可以减少这种干扰。

(2) 荧光检查条件:用于免疫分析技术应有一个高的荧光强度,能从背景中给出一个容易区别的信号。为了达到这一点,在缓冲液体系中,必须有一个高的摩尔吸光系数大于 $10^4\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 和尽可能高的量子产率,光散射和短波长背景可以通过应用发射波长大于500nm或Stokes转变超过50nm的荧光团来降低。必须拥有一个能对抗体或抗原共价偶合的适当的官能团(例如,含有羧基的酸、脂肪胺、羧基或磺酸的残基),中间反应已用于连接包括酯(二亚胺或混合酸酐的连接)、酸酐、重氮盐、异氰酸盐、异硫氰酸盐、三嗪基化合物、顺丁烯二酰亚胺和N-羟基丁二酰亚胺等。由于荧光检查或抗原的疏水结合而带来的不溶解性的问题可以用亲水的键合(缩氨酸、糖或氨基糖)来克服。

荧光技术飞速发展并扩展到了新的研究和应用领域,传统意义上,荧光用于临床检验的例子已层出不穷,利用HPLC偶合荧光测定可以分析治疗性药物的控制作用和药物动力学研究。荧光免疫测定作为少数几个可替代放射性同位素免疫测定的技术之一,现在可以用于常规检测。当无需很高的灵敏度时,同种技术如荧光极化免疫测定可以发挥很大的优势;若要求灵敏度高,可使用异种时间分辨荧光免疫测定。作为灵敏度最高的方法之一,时间分辨荧光免疫测定已越来越多的被用于核酸检测。环孢菌素检测对于检测免疫抑制患者意义重大,现在可由荧光极化免疫测定作常规检查。另外一个重大领域是基于荧光原理的诊断试剂,尤其是肿瘤检测和外科手术中的肿瘤定位以及荧光成像。显而易见,在传统领域中,荧光技术飞速发展,在新的领域中荧光免疫也有着广阔的发展前景和应用价值。

8.6 荧光酶联免疫技术

8.6.1 荧光酶联免疫分析原理

荧光酶联免疫技术(ELFIA)另一种独特的免疫荧光,是利用具有潜在荧光的底物作为酶标抗体(或抗原),当此类底物被酶分解(酶+底物)后,其产物可产生荧光,这个过程称为荧光酶联免疫技术。据此可以进行荧光酶联免疫分析。这种方法综合利用了酶联免疫技术中酶解产物测定所具有的累计放大性和荧光测量的高度敏感性,大大提高了分析方法的灵敏度。目前已经获得许多产生荧光和发光的酶底物,并得到广泛的应用。

荧光酶联免疫分析即在普通的酶免疫分析的基础上,只改用理想的酶的荧光底物代替生色底物就可提高分析的灵敏度和拓宽测量范围,并可减少各种试剂及样品的用量,成为一种微量、灵敏的酶免疫分析。它有两点优点:一是与酶联免疫检测的生色底物相

比,使酶联免疫检测的灵敏度得到了很大的提高;二是荧光分析法比分光光度法具有更宽的测量范围。

酶免疫技术的灵敏度依赖于免疫反应制剂(主要指抗体)的特异性和亲和力、酶结合物的比活性(Specific activity)及对酶反应产物的可检测限值。在抗体和酶系统已达到优化的条件下,对酶反应产物的检测能力就决定着分析的灵敏度。

在酶免疫分析的早期及目前仍大量应用的、大多数的酶底物为生色底物,但早已有荧光底物(Fluorogenic substrate),如 β -萘酚磷酸酯即可作为碱性磷酸酶(AP)的底物,产生荧光产物 β -萘酚,实际上荧光测定要比分光光度测定灵敏得多,分光光度测定的限值约为 $1.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$,而荧光测定的限值约为 $1.0 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$,如果应用激光激发,其灵敏度还可以提高,这是因为荧光测定是测定接近于零或很低的本底荧光水平的增加信号,而分光光度测定却是测定强透光信号吸光度的减少。荧光测定也拓宽了测定的范围,而分光光度测定的吸光度变化范围却限定在0.001或0.01~2.0之间。当然,在大多数实际情况下,荧光测定的检测限值常受血清和其他生物样品中本底的影响。因此,实用的荧光免疫分析绝大多数为固相的非均相体系,通过洗涤最大限度地降低本底以提高灵敏度。

酶作用后产生荧光的物质是指,某些化合物本身无荧光效应,一旦经酶作用便形成具有强荧光的物质。例如4-甲基伞酮- β -D-半乳糖苷受 β -半乳糖苷酶的作用分解成4-甲基伞酮,后者可发出荧光,激发光波长为360nm,发射光波长为450nm。其他如碱性磷酸酶的底物4-甲基伞酮磷酸盐和辣根过氧化物酶的底物对羟基苯乙酸等。

8.6.2 荧光底物的选择

在荧光酶联免疫技术中对荧光底物有着严格的要求,应符合以下条件。

- (1) 稳定要好 在一定条件下保存时间长,不产生非酶解的荧光底物,性质稳定。
- (2) 酶催化作用速度快。
- (3) 生成产物稳定并有强荧光。
- (4) 具有宽的 Stokes 位移,并倾向选用激发光波长较长者,因为低能量的激发产生较低的荧光本底。

碱性磷酸酶(AP)、辣根过氧化物酶(HRP)及 β -D-半乳糖苷酶是 ELFIA 法中应用最广泛的三种酶。四甲基伞形酮磷酸酯(4-MUP)被广泛用于 AP 酶的荧光底物。近来,5-氟水杨酸的磷酸酯被用作时间分辨法测定 AP 酶活性的荧光底物,当发生酶催化水解时,水解产物在碱性溶液中与 Tb^{3+} -EDTA 形成强荧光配合物。测定 HRP 的灵敏的荧光法基于过氧化氢与对羟基苯乙酸之间的氧化反应,当使用对羟基苯丙酸时灵敏度最高。四甲基伞形酮- β -D-半乳糖是 β -D-半乳糖苷酶荧光底物的最佳选择。上述底物的荧光反应如图 8-5 所示。

其中四甲基伞形酮磷酸酯及 5-氟水杨酸磷酸酯用作 AP 的荧光底物;对羟基苯丙酸和四甲基伞形酮- β -D-半乳糖苷分别用作 HRP 和 Gal 的荧光底物。

龚福春等近期合成了一种新型辣根过氧化物酶(HRP)荧光底物-4-羟基苯乙基吡啶(pHSP),并首次将它运用于荧光酶联免疫体系。对 pHSP 化学性质的研究证实,

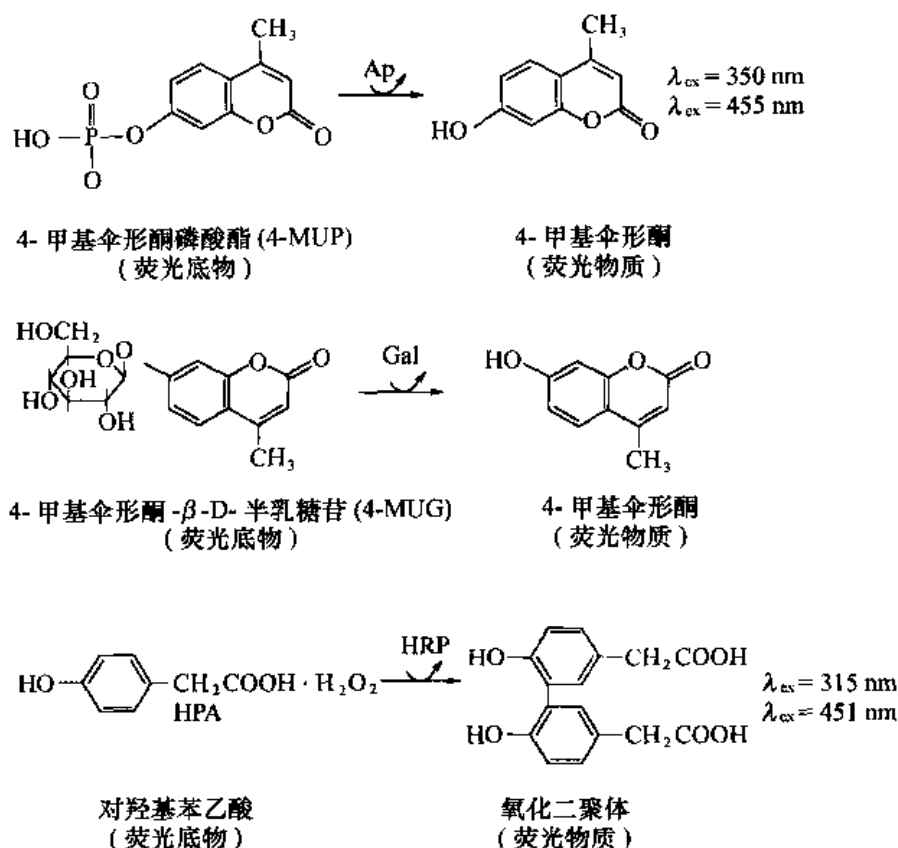


图 8-5 三种荧光酶联免疫分析的荧光底物的荧光反应

pHSP 在空气中较稳定, 对 HRP、 H_2O_2 的荧光响应性能优于传统的 HRP 荧光底物, 如对羟基苯乙酸、Amplex Red 和佳味醇等, 在 pH 值为 5.8 的 Britton - Robinson 缓冲溶液中, pHSP 本身只有极弱的荧光, 在 HRP - IgG 催化下可被 H_2O_2 氧化成二聚体产物, 该二聚体在 300nm 的激发光下能发射波长为 437nm 的强荧光, 并且反应体系的荧光增加与 HRP 量在一定浓度范围内成线性相关。根据此原理, 建立了兔布氏杆菌抗体的酶联荧光传感分析新方法, 运用制备的传感装置测定兔布氏杆菌抗体的线性范围为 $6.3 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$, 抗体检出限为 $6.3 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$, 相对标准偏差为 4.1% ($n = 11$), pHSP 的二聚体产物水溶性很低, 利用设计的装置较好地解决了传统测定溶液体系方法灵敏度不高的问题。

8.6.3 应用荧光酶联免疫技术应注意的问题

多种试验结果已证实, 该技术具有很高的敏感性, 但是若掌握不好也可带来很高的背景染色, 可有多种因素影响到最终产物在酶结合位点的沉积, 这是因为这个沉积过程是一种复杂的化学反应和物理变化的综合结果。在 ELF 的反应过程中很容易形成假的荧光结晶, 使 FISH 信号减弱, 引起非特异性结晶沉积在组织细胞表面, 造成背景信号, 试验结果证实, 只要延长 ELF 的反应时间, 就可以避免背景染色。

具体的解决方法有如上 3 种。

- (1) 商品化试剂盒内提供一种延时试剂。
- (2) 在显色液中加入 4% PVP。
- (3) 显色时间控制在 15 ~ 30min 内。

(蔡雪湘)

第 9 章 PCR 技术

聚合酶链反应技术 (Polymerase chain reaction, PCR) 起源于 20 世纪 80 年代, PCR 技术有助于鉴定某一特定的片段, 它能在短时间内精确地复制扩增上百万的该 DNA 片段, 使一度非常稀有的实验所需要的遗传物质变得丰富。遗传物质不但总量变多, 而且不再受限于活的生物体。该技术与克隆技术相比较而言, 克隆虽然也能使稀有的遗传物质变丰富, 但必须采用活的生物体作为复制遗传物质的载体。PCR 技术在摆脱此种活体依赖性方面前进了一大步, 促进了基因操作效率的提高以及操作简便灵活等方面的进步。PCR 技术极大地扩展了遗传物质鉴定与操作的可能性, 对分子生物学的发展产生了不可估量的影响。目前 PCR 技术已经与 DNA 克隆、DNA 重组和 DNA 测序等技术一样, 成为分子生物学以至医学科学研究不可缺少的工具。

9.1 PCR 技术的基本原理

PCR 技术是在模板 DNA、引物和四种脱氧核糖核苷酸存在下, 依赖于 DNA 聚合酶的酶促合成反应。DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板, 借助一小段双链 DNA 来启动合成, 通过一个或两个人工合成的寡核苷酸引物与单链 DNA 模板中的一段互补序列结合, 形成部分双链。在适宜的温度和环境下, DNA 聚合酶将脱氧单核苷酸加到引物 3' - OH 末端, 并以此为起始点, 沿模板 5'→3' 方向延伸, 合成一条新的 DNA 互补链。

PCR 反应的基本成分包括: 模板 DNA (待扩增 DNA)、引物、4 种脱氧核苷酸 (dNTPs)、DNA 聚合酶和适宜的缓冲液。类似于 DNA 的天然复制过程, 其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性→退火→延伸 3 个基本反应步骤构成。

9.1.1 变性 (denaturation)

模板 DNA 的高温变性是模板 DNA 经加热至 93℃ 左右一定时间后, 使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离, 使之成为单链, 以便它与引物结合, 为下轮反应作准备; 变性一般是在 92℃ ~ 96℃ 条件下进行, 在此温度下, 模板及以后新合成的双链都变性成为单链, 该步骤一般只需 30 ~ 60s。

9.1.2 退火 (annealing)

模板 DNA 与引物的低温退火 (复性) 是指模板 DNA 经加热变性成单链后, 温度降至 55℃ 左右, 引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合; 退火一般在 37℃ ~ 65℃ 条件下进行, 此时寡核苷酸引物可以特异地结合到变性后的 DNA 链上。如果需要提高扩增片段的特异性, 可以适当提高退火温度, 但是有时会减少扩增产物的量, 所以需要依

据不同的基因片段和引物来调节退火温度,这一步骤也只需 30 ~ 60s。由于引物短、不易缠绕,引物的量又大大多于模板的量,加之引物序列是与模板序列互补的,因此引物与模板形成复合物的概率远远大于 DNA 分子自身的复性。

9.1.3 延伸 (extension)

引物的适温延伸是指 DNA 模板与引物的结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链重复循环变性-退火-延伸三过程,就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2 ~ 4min, 2 ~ 3h 就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。延伸温度一般为 72℃,时间为 1 ~ 2min。DNA 聚合酶根据模板的顺序,在引物 3 端接上一个三磷酸脱氧核苷酸,从而使新合成的互补链不断延伸。新合成的链在第 1 次循环时可能长短不一,但以后的循环就可以使新合成的产物绝大多数位于两条引物之间。PCR 产物一般为几百个碱基 (bp),长的可以达到几十千个碱基 (kb)。如果需要合成长片段则可适当延长时间。

第 1 个 PCR 循环后, DNA 片段就增加 1 倍。以后随着循环进行下去, DNA 分子数呈指数增长,即 2^n (n 为循环次数)。从理论上讲,一个 DNA 分子经过 25 次 PCR 循环后就可以扩增到 3000 万倍以上。但在实际反应时,由于底物的减少、产物的增加、产物本身复性等各种因素影响, PCR 反应达到一定水平时就会以线性形式而非指数形式扩增。如果 1 次循环需 2 ~ 3min, 基因放大几百万倍需要 1 ~ 2h 就可以完成,并足够用于各种检测。如需继续扩增,可将扩增产物 DNA 样品稀释 1 000 ~ 10 000 倍后作为后续模板进行新的 PCR。用这种方法,经过 60 个循环,扩增倍数可达 $10^9 \sim 10^{10}$ 。

9.2 PCR 技术的特点

9.2.1 特异性强

自从耐热 TaqDNA 聚合物被提取出,在热变性处理时不被消化、不必在每次循环扩增中再加入新的酶以及在较高温度下连续反应,显著提高了 PCR 反应产物的特异性。

PCR 反应的特异性决定因素有 ①引物与模板 DNA 特异正确的结合;②碱基配对原则;③TaqDNA 聚合酶合成反应的忠实性;④靶基因的特异性与保守性。其中引物与模板的正确结合是关键,引物与模板的结合及引物链的延伸是遵循碱基配对原则的。聚合酶合成反应的忠实性及 TaqDNA 聚合酶耐高温性,使反应中模板与引物的结合(复性)可以在较高的温度下进行,结合的特异性大大增加,被扩增的靶基因片段也就能保持很高的正确度。再通过选择特异性和保守性高的靶基因区,其特异性程度就更高。

9.2.2 灵敏度高

PCR 产物的生成量是以指数方式增加的,能将极微量的起始待测模板扩增到足够检测的水平,能从 100 万个细胞中检出一个靶细胞,在病毒的检测中,PCR 的灵敏度可达 3 个 RFU (空斑形成单位),在细菌学中最小检出率为 3 个细菌。

9.2.3 简便、快速

目前国内外有多种类型的 PCR 扩增仪, 只要把待检品按一定的浓度混合, 置于 PCR 扩增仪内, 反应便按所输入的程序进行。PCR 反应用耐高温的 TaqDNA 聚合酶, 一次性地将反应液加好后, 即在 DNA 扩增液和水浴锅上进行变性→退火→延伸反应, 整个过程一般在 4 h 内完成。扩增产物一般用电泳分析。

9.2.4 对标本的纯度要求低

不需要分离病毒或细菌及培养细胞, 既可以是纯化 DNA 又可以是 DNA 粗制品及总 RNA 均可作为扩增模板。也就是说直接用临床新鲜标本如血液、体液、洗嗽液、毛发、细胞、活组织, 也可以用陈旧的标本都可以进行 DNA 扩增检测。

9.3 PCR 反应体系与反应条件

9.3.1 标准的 PCR 反应体系

10 × 扩增缓冲液 10 μL;
10 ~ 50 mmol/L Tris - HCl (pH 值为 7.5 ~ 9.0);
6 ~ 50 mmol/L KCl 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
1.5 ~ 5.0 mmol/L MgCl_2 或 MgSO_4 ;
4 种 dNTP 混合物各 200 μmol/L;
每种寡核苷酸引物各 0.1 ~ 1.0 μmol/L;
耐热 DNA 聚合酶 2.0 ~ 2.5 U;
核酸模板 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝;
加双或三蒸馏水至 100 μL。

9.3.2 PCR 反应要素

参加 PCR 反应的物质主要有 5 种, 即引物、酶、dNTP、模板和 Mg^{2+} 引物。

9.3.2.1 设计引物

引物是 PCR 特异性反应的关键, PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度。从理论上讲, 只要知道任何一段模板 DNA 序列, 就能按其设计互补的寡核苷酸链做引物, 利用 PCR 就可将模板 DNA 在体外大量扩增。设计引物应遵循以下原则:

①引物长度为 15 ~ 30 bp, 常用引物长度为 20 bp 左右。

②引物扩增跨度以 200 ~ 500 bp 为宜, 特定条件下可扩增长至 10 kb 的片段。

③引物碱基 G + C 含量以 40 ~ 60% 为宜, G + C 太少扩增效果不佳, G + C 过多易出现非特异条带。引物中 4 种碱基对最好随机分布, 避免 5 个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列。

④避免引物内部出现二级结构,避免两条引物间互补,特别是3端的互补,否则会形成引物二聚体,产生非特异的扩增条带。

⑤引物3端的碱基,特别是最末及倒数第二个碱基,应严格要求配对,以避免因末端碱基不配对而导致PCR失败。

⑥引物中有或能加上合适的酶切位点,被扩增的靶序列最好有适宜的酶切位点,这对酶切分析或分子克隆很有好处。

⑦引物的特异性。引物应与核酸序列数据库的其他序列无明显同源性。

⑧引物量,每条引物的浓度为 $0.1 \sim 1 \mu\text{mol}$,以最低引物量产生所需要的结果为好,引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体的机会。

9.3.2.2 TaqDNA 聚合酶

在20世纪80年代PCR技术中,DNA聚合酶应用的是大肠杆菌DNA聚合酶的Klenow片段。由于该酶不能忍受反应循环中解链所需的高温($93^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$),因此在反应过程中必须不断添加聚合酶以满足每次扩增的需要;另外,由于Klenow片段聚合反应温度偏低(37°C),容易引起引物与DNA模板的非专一性配对,或受某些DNA二级结构干扰,结果产生许多非均一性的产物区带。

耐热DNA聚合酶引入到PCR技术中后,使其操作大大简化,克服了用Klenow酶每一循环中反复追加酶的缺点,并成为PCR自动化和迅速应用于分子生物学和其他学科的促进剂。现在PCR耐热DNA聚合酶中以TaqDNA聚合酶应用最广泛。该酶是从水生栖热菌(*Thermus aquaticus*,简称Taq)株中分离出来的,其功能是在有4种核苷三磷酸盐的反应体系中,以高温下变性的DNA为模板,从分别结合在目的DNA两端的引物出发,按 $5' \rightarrow 3'$ 方向合成DNA新链。产物dsDNA再经加热解链,耐热的TaqDNA聚合酶又在下一轮新的DNA链的合成中显示活性。Taq酶的合成速率取决于温度、 Mg^{2+} 、去污剂、模板的二级结构、dNTP浓度等。1989年Gelfoad等和1990年White等总结出Taq酶的合成速率如下。

75℃ ~ 80℃	150 核苷酸/s/酶分子
70℃	>60 核苷酸/s/酶分子
55℃	24 核苷酸/s/酶分子
37℃	1.5 核苷酸/s/酶分子
22℃	0.25 核苷酸/s/酶分子

可见在一定范围内,温度越高,Taq酶的合成速率越高。但是在PCR操作过程中,合成温度不能超过 75°C ,变性温度不能超过 95°C 。因为温度越高,Taq酶的半衰期越短,Taq酶的半衰期与温度的关系如下:

92.5℃	130min
95℃	40min
97.5℃	5 ~ 6min

一般情况下,在 $50 \mu\text{L}$ 反应体积中Taq酶的用量为 $0.5 \sim 2.5 \text{U}$,酶浓度不是越高越好,有时增加酶浓度会降低专一性。在用PCR诊断疾病时可以适当增加Taq酶用量,

因为患者血清中有抑制剂存在。

TaqDNA 聚合酶具有依赖 DNA 合成的、链置换的 $5' \rightarrow 3'$ 外切核酸酶活性。如果模板上有一段退火的不能延伸的 ($3'$ -磷酸化) 寡聚核苷酸“阻断物”时, 它会被外切核酸酶活性逐个切除而不会阻止来自上游 ($3'$ -OH) 的链的延伸; Taq 酶无 $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶活性, 因此它不具有 Klenow 酶的 $3' \rightarrow 5'$ “校正活性”。

TaqDNA 聚合酶还具有反转录活性, 类似于反转录酶。在 $2 \sim 3 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$, 68°C 时即能发挥此活性。有学者报道该酶在 Mg^{2+} 存在时, 反转录活性更佳, 没有 Mg^{2+} 时不能反转录 $150 \sim 250 \text{ bp}$ 以上的核酸片段。这一特性可直接用于 RNA 的扩增, 使 RNA-PCR 简化。

TaqDNA 聚合酶具有类似脱氧核糖核酸末端转移酶 (TdT) 的功能, 可在新合成双链产物的 $3'$ 端加上一个非模板依赖的碱基。尽管 4 种碱基均可被聚合到 $3'$ 端, 但 Taq 酶对 dATP 的聚合能力远高于其他 3 种 dNTP。所以, 在标准 PCR 条件下, PCR 产物 $3'$ 端这一非模板依赖的聚合碱基几乎总是 A。利用这种特性可以构建 dT-载体来克隆带 dA 尾的产物。

TaqDNA 聚合酶可在 -20°C 储存至少 6 个月。反复冻融会使 dNTP 降解。在 PCR 反应中, dNTP 应为 $50 \sim 200 \mu\text{mol/L}$, 尤其是注意 4 种 dNTP 的浓度要相等 (等摩尔配制), 如其中任何一种浓度不同于其他几种时 (偏高或偏低), 就会引起错配。浓度过低又会降低 PCR 产物的产量。dNTP 能与 Mg^{2+} 结合, 使游离的 Mg^{2+} 浓度降低。

9.3.2.3 PCR 的缓冲液

$10 \times \text{PCR}$ 缓冲液一般包括: $10 \text{ mmol/L Tris} \cdot \text{HCl}$ (pH 值为 5.3), 50 mmol/L KCl 和 $1.5 \text{ mmol/L MgCl}_2$ 。Tris 是一种双极性离子缓冲液, 在 PCR 中使用不同浓度 $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ 是为了调节 pH 值, 使 TaqDNA 聚合酶的作用环境维持碱性。反应缓冲液中一定浓度的 KCl 有利于引物的退火, 小牛血清白 (清) 蛋白 (BSA) 或 0.01% 明胶或 0.05% ~ 0.1% Tween-20 有助于维持酶的稳定。

Mg^{2+} 浓度是 PCR 反应成败的重要决定因素, 其功能一是增强酶蛋白的稳定性, 维持酶活性的重要辅因子; 二是增加 dsDNA 的 T_m 值, 提高融合温度; 三是与游离的 dNTP 形成可溶性复合物, 有利于 dNTP 的渗入。 Mg^{2+} 浓度一般为 $0.5 \sim 5 \text{ mmol/L}$, 在 dNTP 用量高时, Mg^{2+} 要适当增加。需要注意的是, PCR 混合物中的 DNA 模板、引物和 dNTP 的磷酸基团均可与 Mg^{2+} 结合, 降低 Mg^{2+} 实际浓度; 另外, 引物和模板原液中如果含有 EDTA 等螯合剂也会影响游离 Mg^{2+} 浓度。因此, PCR 中 Mg^{2+} 的加入量要比 dNTP 浓度高 $0.2 \sim 2.5 \text{ mmol/L}$, Mg^{2+} 浓度过高, 反应特异性降低, 出现非特异扩增, 浓度过低会降低 TaqDNA 聚合酶的活性, 使反应产物减少。

9.3.2.4 底物

三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP), dNTP 是 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的总体。PCR 中每种 dNTP 的终浓度为 $20 \sim 100 \mu\text{mol/L}$, 4 种 dNTP 终浓度应相等, 以减少错配误差。dNTP 溶液具有较强的酸性, 应用 NaOH 将 dNTP 储存液 (50 mmol/L) 的 pH 值调至

7.0, 分装后置 -20°C 保存。

9.3.2.5 模板 DNA

PCR 可以 DNA 或 RNA 为模板进行核酸的体外扩增, 不过 RNA 的扩增需首先逆转录成 cDNA 后才能进行正常的 PCR 循环。另外, 无论标本来源如何, 待扩增的部分都需纯化, 以除去核酸标本中 DNA 聚合酶抑制剂。PCR 中模板加入量一般为 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝的靶序列。 $1\mu\text{g}$ 人基因组 DNA 相当于 3×10^5 个单拷贝的靶分子; 1ng 酵母 DNA 相当于 3×10^5 靶分子; 1g 大肠杆菌 DNA 相当于 3×10^5 靶分子; 1% 的 M_{13} 噬菌体相当于 10^6 靶分子。

以质粒 DNA 或染色体 DNA 为模板时的扩增最适条件是不同的, 前者所需的酶量少, 循环次数少, 温度不如染色体 DNA 要求严格, 扩增染色体 DNA 时至少需 25 ~ 30 个循环。

石蜡油反应体系中加入石蜡油目的是防止样品在反复加热与冷却过程中蒸发, 要求所用石蜡油质量高, 不能含抑制 TaqDNA 聚合酶活性的杂质。

9.4 PCR 扩增产物的分析方法

PCR 扩增产物可分为长产物片段和短产物片段两部分。短产物片段的长度严格地限定在两个引物链 5' 端之间, 是需要扩增的特定片段。短产物片段和长产物片段是由于引物所结合的模板不一样而形成的。以一个原始模板为例, 在第一个反应周期中, 以两条互补的 DNA 为模板, 引物是从 3' 端开始延伸, 其 5' 端是固定的, 3' 端则没有固定的止点, 长短不一, 这就是“长产物片段”。进入第二周期后, 引物除与原始模板结合外, 还要同新合成的链 (即“长产物片段”) 结合。引物在与新链结合时, 由于新链模板的 5' 端序列是固定的, 这就等于这次延伸的片段 3' 端被固定了止点, 保证了新片段的起点和止点都限定于引物扩增序列以内, 形成长短一致的“短产物片段”。该片段是按指数倍数增加, 而“长产物片段”则以算术倍数增加, 几乎可以忽略不计, 这使得 PCR 的反应产物不需要再纯化, 就能保证足够纯 DNA 片段供分析检测。

对 PCR 扩增产物的分析, 可以根据研究对象和目的不同而采用不同的分析方法。常用的方法有: 凝胶电泳分析、琼脂糖凝胶电泳、酶切分析、分子杂交、Southern 印迹杂交、斑点杂交、免疫和核酸序列分析等方法。

9.4.1 凝胶电泳分析

PCR 产物可通过琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 可以初步确定有无预期的扩增产物以及扩增产物的分子量大小。聚丙烯酰胺凝胶电泳的灵敏度远高于琼脂糖凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶电泳所需试剂配制方法复杂, 故常用琼脂糖凝胶电泳。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物时最常用的浓度为 1% ~ 1.5%。不同浓度的凝胶分辨 DNA 的有效范围不同 (表 9-1、表 9-2), 不同等级和不同批号的琼脂糖也存在差异。一般低渗琼脂糖即可用于 PCR 产物的检测, 但高纯度的琼脂糖通常对紫外线的淬灭程度低,

因而 EB 染色后提高了观察 DNA 的灵敏度。

表 9-1 琼脂糖凝胶电泳分辨 DNA 片段的有效范围

琼脂糖含量 (%)	分离线状 DNA 的有效范围 (kb)
0.3	5 ~ 60
0.6	1 ~ 20
0.7	0.8 ~ 10
0.9	0.5 ~ 7
1.2	0.4 ~ 6
1.5	0.2 ~ 3
2.0	0.1 ~ 2

表 9-2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨 DNA 片段的有效范围

聚丙烯酰胺 (%)	有效分离范围 (bp)	溴酚蓝位置
3.5	1000 ~ 2000	100
5.0	80 ~ 500	65
8.0	60 ~ 400	45
12.0	40 ~ 200	20
15.0	25 ~ 150	15
20.0	6 ~ 100	12

聚丙烯酰胺凝胶电泳与琼脂糖凝胶电泳相比有两个主要优点：①分辨力强，能分离只相差 1 个核苷酸的不同 DNA 片段；②从聚丙烯酰胺凝胶中回收的 DNA 纯度高。

非变性聚丙烯酰胺凝胶主要用于分离和纯化双链 DNA；变性聚丙烯酰胺凝胶用于分离、纯化单链 DNA。

9.4.2 酶切分析

根据 PCR 产物中限制性内切酶的位点，用相应的酶切、电泳分离后，获得符合理论的片段，此法既能进行产物的鉴定，又能对靶基因分型，还能进行变异性研究。

9.4.3 PCR - 寡核苷酸连接试验法

寡核苷酸连接试验 (DLA) 是为检出单一核苷酸的突变而设计的，它可以单独或结合 PCR 快速确定紧密相关的 DNA 序列。DLA 是通过设计两种能与靶序列 DNA 精确配对杂交的寡核苷酸完成的。寡核苷酸杂交后，DNA 连接酶可使其正常配对的相邻碱基共价连接，而错配的相邻碱基可通过调节连接酶和 NaCl 浓度防止其连接，连接产物可通过凝胶电泳观察其大小，或通过引物端修饰技术使一个寡核苷酸 5' 端带有一个碱基，连接后通过固相化的亲和碱基使其固定，漂洗后检测另一寡核苷酸 3' 端携带的适当标记分子。这一过程如重复进行多个循环，则连接产物会呈线性增加，故称此循环进

行的 DLA 为连接检测反应。

9.4.4 Southern 印迹杂交

在两引物之间另合成一条寡核苷酸链（内部寡核苷酸）标记后做探针，与 PCR 产物杂交。此法既可作特异性鉴定，又可以提高检测 PCR 产物的灵敏度，还可知其分子量及条带形状，主要用于科研。

9.4.5 斑点杂交

将 PCR 产物点在硝酸纤维素膜或尼龙膜薄膜上，再用内部寡核苷酸探针杂交，观察有无着色斑点，主要用于 PCR 产物特异性鉴定及变异分析。

9.4.6 PCR - ELISA 法

因为引物 5'端修饰后不影响 PCR 扩增，因此可以通过修饰一条引物的 5'端使其携带便于产物固定的功能基团（如标记生物素，可使产物与固定于包被板上的亲和素结合），另一引物 5'端标记另一显色基团（如标记 FITC，用 HRP 标记的抗 FITC 结合显色），以使产物便于检测。该法省去了电泳和杂交的步骤，适于常规 ELISA 计数仪检测。

9.4.7 核酸序列分析

核酸序列分析是将 PCR 产物经克隆后测序或直接对 PCR 产物进行测序，是所有检测方法中最灵敏、最全面的分析技术。但是，测序法所需的仪器和高昂的费用使得它并没有在临床诊断中得到普及。

9.5 PCR 常用技术

9.5.1 多重 PCR (multiplex PCR)

多重 PCR 是指应用多对引物同时扩增一个基因中的几个不同 DNA 片段，或不同基因的几个 DNA 片段。多重 PCR 中所设计的多对引物对必须有非常接近的退火温度，如果两对引物间的接链温度 (T_m) 值相差悬殊，可引起扩增产物量的差别，常出现其中一个引物对无明显的扩增产物。另外，靶基因 DNA 的扩增长度也必须相类似，否则较短的靶基因 DNA 的扩增效率明显优于扩增片段较长的 DNA。因此，为了取得相同的扩增效率，必须调节各引物对之间的 T_m 值和 PCR 扩增产物的长度以及各引物对的量。

9.5.2 反转录 PCR (RT - PCR)

又称 RNA - PCR，不仅可以检测 DNA，也能对 RNA 进行分析和研究。反应的第 1 步是提取总 RNA，加入一个与 mRNA 3'端互补的引物，在反转录酶作用下合成 cDNA；第 2 步是以 cDNA 为模板，再加入与 cDNA 互补的另一引物（两引物应位于不同的外显子上，以避免基因组 DNA 污染），进行 PCR 扩增。此方法的优点是可以从少量的 mRNA 出发

(从1~2个哺乳动物细胞提取的 mRNA) 构建 cDNA 文库。RT-PCR 可使所需模板 mRNA 量大大减少, 因此对低浓度 mRNA 的 cDNA 克隆及 cDNA 文库的构建非常有利。

9.5.3 不对称 PCR (asymmetric PCR)

经典 PCR 得到的是一个靶序列的双链 DNA 拷贝, 而用不对称 PCR 方法可以产生一个单链 DNA (ssDNA)。其主要原理是在扩增体系中引入不同引物浓度, 不对称引物的比例一般为 50:1 或 100:1, 在开始的 10~15 个循环中主要产物是双链 DNA, 但当低浓度的引物被耗尽后高浓度引物介导的 PCR 则会产生大量单链 DNA。这种 ssDNA 产物可以进行一系列研究, 如 DNA 序列分析等。

9.5.4 反向 PCR (inverse PCR)

经典 PCR 扩增的是位于两个引物之间的未知序列 DNA 片段, 而反向 PCR 可以扩增一个已知 DNA 片段两侧的未知序列。将已知 DNA 序列看做核心 DNA 区, 其两侧序列未知, 然后选择核心区无切点的两端供有限制酶切位点进行酶切、连接形成环状 DNA 分子。此时选择与核心 DNA 区两末端序列互补、3'端反向的两条引物进行 PCR, 可以得到未知序列两侧区或某一侧区的 DNA 片段。

9.5.5 锚定 PCR (anchored PCR)

一般采用的 PCR 技术必须首先知道欲扩增 DNA 或 RNA 片段两侧的序列, 而大多数情况下对某些序列本身或其旁侧序列并不清楚, 这就限制了 PCR 技术的广泛应用。“锚定 PCR”可以克服序列未知或未全知带来的障碍。该法适用于 mRNA 的扩增, 而不适用于基因组 DNA 的扩增。首先分离细胞总 RNA 或 mRNA, 在反转录酶作用下合成 cDNA, 然后在 DNA 末端转移酶作用下, 在 cDNA 3'端加上 poly(dG) 尾巴, 最后用特异性的 3'端引物和一种锚定引物 poly(dC) 一起做 PCR 扩增。为保证扩增特异性, 建议此段寡聚(dC)在十二聚体以上, 其 5'端可带上某些限制酶序列或其他序列信息。用此方法使带同源多聚物尾巴的 cDNA 序列得以扩增。

9.5.6 原位 PCR

原位 PCR 是 PCR 技术和常规的原位杂交技术的结合, 亦即通过 PCR 技术对靶序列在染色体上或组织细胞内进行原位扩增, 使其拷贝数大增, 然后通过原位杂交方法检测, 从而对靶核酸进行定位定量分析。原位 PCR 具有 PCR 的快速、灵敏、特异性强和原位杂交定位精确的特点, 目前除用于致病微生物的原位检测外, 还用于研究细胞染色体上的 DNA 序列、染色体基因定位和组织细胞基因表达等。原位 PCR 主要操作: ①染色体、细胞及组织切片样本的制备, 此阶段中固定很重要, 10% 甲醛 (福尔马林)、4% 多聚甲醛和乙醇为常用固定剂; ②PCR 前处理, 包括石蜡切片、去石蜡、染色体变性和细胞穿透; 蛋白酶和胰酶是常用消化膜试剂, 不同材料处理时间和所用酶浓度有所不同; ③PCR 扩增, 一般采用热启动 PCR; ④原位杂交及检测。

9.5.7 定量 PCR

定量 PCR 是对 PCR 的进一步发展和补充。应用 PCR 技术可以定量检测标本中靶基因的拷贝数,这在研究基因的扩增方面具有重要意义。定量 PCR 的目的就是以终产物量推测样品中待测靶分子的起始量。它是将目的基因和一个单拷贝的参照基因置于同一个试管中进行 PCR 扩增,电泳扩增分离后呈两条区带。比较两条区带的核酸浓度或在引物 5'端标记上放射性核素后,通过比较两条区带放射性强度即可测出目的基因的拷贝数。在定量过程中需广泛借助各种形式的内、外参照物。

参照物在定量 PCR 中具有以下作用:①作为扩增系统的阳性对照;②作为未知样本定量的参比标准;③通过竞争性作用校正扩增系统之间的扩增效率,使其具有可比性。内参照物与待检样本一起加到同一扩增系统,与待检样本共用同一对引物或采用另一对不同引物。内参照物若与待检样本共用同一对引物,两模板的扩增存在竞争性,则内参照物又称为竞争性参照物,这种条件下进行的定量 PCR 又称竞争性定量 PCR。而后者,内参照物与待检样本并不共用同一对引物,这种定量 PCR 因其不存在竞争性故属非竞争性定量 PCR;外参照物独立于待检样本定量 PCR 扩增系统,常采用系列稀释的已知含量标准品。在非竞争性定量 PCR 中,通过外参照物单独扩增建立标准品初始含量与最终产物间的标准曲线,用于未知样本的类推定量。

9.5.8 AP-PCR (arbitrarily primed PCR)

AP-PCR 技术是在对所扩增的基因序列一无所知的情况下随意设计或选择一个非特异性引物,在 PCR 反应体系中,首先使引物与模板 DNA 中许多序列通过错配而复性。在理论上并不一定要求整个引物都与模板复性,而只要引物的一部分特别是 3'端有 3~4bp 与模板互补复性即可使引物延伸。如果在两条单链上相距一定距离有反向复性引物存在,则可经 TaqDNA 聚合酶的作用使引物延伸而发生 DNA 片段的扩增,经 1 至数轮不严格条件下的 PCR 循环后,再于严格条件下进行扩增。扩增的产物经 DNA 测序凝胶电泳分离后,经过放射自显影或荧光显示即可得到 DNA 指纹图,通过对不同来源基因指纹图的比较,即可反映出待分析基因组的特征。

9.5.9 差异显示反转录 PCR (differential display reversetranscription PCR, DDRT-PCR)

1992 年, Liang 等在 AP-PCR 和 RT-PCR 技术的基础上建立了差异显示反转录 PCR 技术,该法可以有效地筛选差异表达基因。Liang 等开始建立此技术时,设计的 3'端引物 T12MN (M 为 A、C 或 G; N 为 A、G 或 T) 即 3'端有 12 条引物,而 5'端有 20 条随机引物,每条引物由 10bp 组成,通过计算机随机分析这种组合从统计学上讲差异表达的基因可 100% 地被筛选表达出来。但操作时非特异性带较多,假阳性较高,后续步骤较麻烦。因此人们对 3'端引物和 PCR 参数等都进行了改进,以降低假阳性获得最佳效果。

9.5.10 扩增耐突变系统 - PCR (amplification refractory mutation system PCR)

扩增耐突变系统 PCR, 又名等位基因特异 PCR, 它的基本原理是, TaqDNA 聚合酶缺少 3'→5' 外切酶活性, 在一定条件下 PCR 引物 3' 末端的错配导致产物的急剧减少, 针对不同的已知突变, 设计适当的引物可以通过 PCR 方法直接达到区分突变型和野生型基因的目的。这种方法最首要的一步就是根据已知的突变设计合适的引物, 其次就是 PCR 循环条件的优化, 最后通过电泳观察即可判读结果。

9.5.11 大引物 PCR 定点诱变技术

由于定点诱变的方法很多, 其以快速、简便、准确而应用最为广泛。经典的大引物 PCR 定点诱变技术需要 3 条寡核苷酸引物 (包括两条外侧正向和反向引物以及内部突变引物) 和两轮 PCR 循环, 模板通常是克隆到载体中的待诱变的野生型目的片段。首先由突变引物 (M) 和相应的外侧引物引发第 1 轮 PCR 扩增, 其产物经纯化后又作为引物与另一外侧引物用于第 2 轮 PCR 反应, 因这一 PCR 扩增得到的双链 DNA 分子少则几十碱基, 多则上千碱基, 远大于普通意义上的引物, 故把它称之为大引物, 最后扩增出含突变位点的终产物。在以后改进的方法中, 纯化或未纯化的大引物均能在野生型模板的指导下被延伸。只有大引物的其中一条链是有效延伸, 从而可合成一条单链全长突变模板, 此模板再用两个外部引物通过随后的 PCR 循环产生大量的双链突变 DNA。此含突变分子的 DNA 片段克隆到表达载体以做进一步的测序或表达分析。

9.5.12 免疫 PCR 技术

PCR 技术自 1985 年问世以来, 已成为实验室的常规技术, 也是现代分子生物学研究中不可缺少的手段, 是一种极为敏感的放大系统。1992 年 Sano 等人将免疫测定技术与 PCR 结合, 创建了一种全新的、极其敏感的放大抗原抗体反应的特异性的检测技术, 即免疫 PCR。

9.5.12.1 免疫 PCR 的基本原理

免疫 PCR 主要由两部分组成, 第 1 部分是类似于普通 ELISA 的抗原抗体反应, 第 2 部分即常规的 PCR 扩增和电泳检测。免疫 PCR 与 ELISA 的区别在于 ELISA 是以 ALP 或 HRP 来标记抗体, 用颜色反应来表明阳性或阴性结果; 而免疫 PCR 则是以一段特定的双链或单链 DNA 来标记抗体, 用 PCR 扩增抗体所连接的 DNA, 并进行电泳检测, 因此 PCR 产物的量可反映抗原分子的量。由于 PCR 的高扩增能力, 只要存在极微量的抗原抗体反应, PCR 都能大量扩增抗体所连接的 DNA 分子, 再用电泳表明实验结果。

免疫 PCR 的关键之处在于用一个连接分子将一段特定的 DNA 连接到抗体上, 在抗原和 DNA 之间建立互相对应的关系, 从而将对蛋白质检测转变为对核酸的检测。最初 Sano 等人建立的免疫 PCR 实验步骤如下。

- (1) 在包被缓冲液稀释抗原 BSA, 并固定在微孔板上。
- (2) 微孔板上加入相应的已稀释的单克隆抗体, 并洗去未结合的抗体分子。
- (3) 加入稀释的已与生物素化 PUC19 结合的链亲和素-蛋白 A 嵌合体 (蛋白 A 能与抗体结合, 而链亲和素可与生物素化 PUC19 中的生物素结合), 并洗去未结合的嵌合蛋白-PUC19 复合物。
- (4) PCR 扩增抗体所连接的 PUC19。
- (5) 琼脂糖凝胶电泳, EB 显色检测 PUC19。

9.5.12.2 免疫 PCR 扩增产物的 ELISA 检测

PCR 产物一般是通过凝胶电泳来检测。1997 年 Niemeyer 提出所谓的免疫 PCR 和 PCR-ELISA 检测, 即用 ELISA 来检测半定量 PCR 产物。它主要是用一对分别标记了生物素和地高辛的引物来扩增标记 DNA, 以亲和素作为捕获抗体固定扩增产物, 用标记上 ALP 的抗地高辛抗体进行双抗夹心 ELISA, 分别检测鼠 IgG、兔 IgG 和重组 HBsAg, 证实凝胶电泳 EB 显色的变异系数 (CV) 达到 38%, 而 ELISA 的变异系数只有 10%。而且, 以荧光染料 Attophos 作为显色底物的 ELISA 检测灵敏度比凝胶电泳 EB 显色高 10 倍。另外, 荧光强度和抗原检测量的相关系数也高达 99%。同时, 这种 PCR-ELISA 更节省时间, 易于自动化操作, 便于临床检测。

免疫 PCR 作为一种抗原检测系统, 同时具有抗原抗体反应的特异性和 PCR 的高灵敏度, 适合于微量抗原的检测。预先将抗体和标记 DNA 偶联, 简化了实验操作, 并可以同时检测多种抗原, 而标记物和引物被设计为带有亲和配体, 则可以用常规 ELISA 方法进行检测。

9.5.12.3 免疫 PCR 的改进

虽然 Sano 等人构建的免疫 PCR 具有极高的灵敏度, 但 Sano 所用的连接分子链亲和素-蛋白 A 嵌合体还没有商品化, 因此限制了它在实际应用中的广泛普及。Ruzicka 等人以生物素化的抗体取代 Sano 免疫 PCR 系统中的抗体, 用商品化的亲和素代替链亲和素-蛋白 A 嵌合体作为连接分子构建了一个新的免疫 PCR 系统。Ruzicka 用此免疫-PCR 系统检测小鼠抗载脂蛋白 E 抗体。可以检测出包被浓度为 10fg/mL 的 E 抗体。另外, Sano 的免疫 PCR 实验操作需要众多的洗涤步骤, 整个实验过程相当繁琐而且耗时。Zhou 等人对此作了改进, 他们用生物素化的二抗和游离链亲和素作为连接分子进行免疫 PCR 实验, 把每个步骤的洗涤次数从原先的 7~15 次减至 3~5 次, 从而减少了操作时间, 但不影响实验结果的准确性。另外, 用修饰过的抗原稀释缓冲液代替 Sano 免疫 PCR 中的 TBS 作为抗原稀释液, 它主要把 TBS 中胍的浓度调到 2mol/L, 由此解决了抗原的溶解问题。Zhou 检测了人原癌基因 ETSI, 检测浓度可达到 9.6×10^{-15} mol/L, 是常规 ELISA 的 10^5 倍。与 Sano 的免疫 PCR 系统相比, Ruzicka 和 Zhou 所用的方法不需要特殊的试剂, 生物素和亲和素 (链亲和素) 都已经商品化, 因此在实际操作中得到广泛应用。随后在一系列实验中建立了各种夹心免疫 PCR, 扩大了检测范围。然而亲和素 (链亲和素) 作为一个连接分子对生物素的结合具有 4 价特性, 亲和素与生物素化 DNA 结合可得

到5种不同产物,即游离亲和素、结合饱和亲和素和部分饱和亲和素才能在检测过程中发挥作用,游离亲和素与固相中生物素化抗体结合会降低方法的敏感性。

9.5.12.4 多分析物免疫 PCR

在以上的免疫 PCR 实验中,生物素化的 DNA 通过不同的生物素结合试剂(链亲和素、亲和素)连接到生物素化的抗体上。这样, DNA 标记和抗体就被组装在同一位点上,因此可能产生可变的化学计量。另外它需要额外的步骤加入生物素试剂和连接试剂,并需要众多的洗涤步骤去除过量的试剂和非特异性连接试剂的实验组分,作为一个免疫 PCR 实验就相当复杂且需要相当多的操作时间。Hendrickson 等人用异双功能化学交联剂预先连接好抗体和 ssDNA 标记,形成标记 DNA-抗体偶联物。特别是将不同的抗体标上特异的 DNA 序列,形成一种新的、基于双抗夹心免疫模式的免疫 PCR,并可同时检测多种抗原,避免了免疫实验敏感性的限制和在一个实验中检测抗原的种类。而且,免疫 PCR 夹心模式可以用常规的免疫实验完成。这样就大大降低了原先免疫 PCR 实验的复杂性,并减少了大量的操作时间。这种免疫 PCR 系统的关键改进就是用异双功能化学关联剂制备标记 DNA-抗体偶联物。制备过程如下。

(1) 氨基修饰寡核苷酸与 SATA 反应,形成乙酰硫代乙酰修饰 DNA。

(2) Sulfo-SMCC 与抗体反应,形成马来酰亚胺修饰抗体。

(3) 混合马来酰亚胺修饰抗体和乙酰硫代乙酰修饰 DNA,并加入羟胺盐酸,在黑暗条件下反应,使抗体和标记 DNA 偶联。

(4) 反应混合物用 HPLC 凝胶过滤纯化偶联物,收集的偶联物在 4℃ 下保存。

在这偶联物中,ssDNA 是连在抗体的 Fc 段上,因此并不影响抗体的活性。Hendrickson 用此方法把设计独特的 3 种寡核苷酸(分别为 55、85、95 个碱基)分别共价连接到 3 种分析物 hTSH、hCG、 β -Gal 的特异性抗体上,每一个寡核苷酸标记物含有相同的引物序列。这样,一对引物就可以促成 3 种 DNA 的共同扩增,Hendrickson 用预先制备好的 3 种抗体-RNA 偶联物同时检测 hTSH、hCG、 β -Gal 实验使用双抗夹心模式。实验结果表明,分析物检测的敏感度超过普通 ELISA 约 3 个数量级。

由于化学合成寡核苷酸标记物序列长度不能超过 100 个碱基。因此,在多分析物免疫 PCR 实验中,ssDNA 标记物和引物的设计就受到了限制。Joerger 等人用 dsDNA 作为标记物与抗体偶联。数千个 bp 的 dsDNA 可以通过生物学和生物化学方法制备。Joerger 通过 PCR 和单向缺失在以 PUC18 为基础的重组质粒上制备了各种长度、具有相同引物序列的 dsDNA,选择适合长度的 dsDNA 作为特异性抗体的标记物。另外,在免疫-PCR 实验中,dsDNA 比 ssDNA 具有更多的优越性。dsDNA 中的一条链与抗体的 Fc 段连接,另一条链在 PCR 第一步变性步骤中就释放到溶液中,使链复制没有空间位阻。而且 dsDNA 比 ssDNA 具有更高的稳定性。此外,长链 DNA 分子更容易用荧光标记和光吸收检测,并且可以引入更多的非同位素标记,序列长度的提高可以促进杂合检测。

免疫 PCR 作为一种抗原检测系统,同时具有抗原抗体反应的特异性和 PCR 的高敏感性、适合于各种微量抗原的检测,并且可以直接检测细胞上的抗原。预先将抗体和标记 DNA 偶联,简化了实验操作,并可以同时检测多种抗原。而标记物和引物被设计为

带有亲和配体,则可以用常规 ELISA 方法进行检测。随着免疫 PCR 技术的进一步发展完善,免疫 PCR 的功能将得到更充分的发展,新的标记物和引物设计将扩大可检测分析的范围,简化实验步骤。具有侧链 DNA 标记物的偶联物能够承担的标记物的检测,产生更准确的结果。

9.6 免疫 PCR 技术的应用

9.6.1 生物素标记特异性抗体的制备

由于免疫球蛋白(如 IgG、IgM)的 Fc 片段上有糖基存在,所以可用能与糖基结合的 Biotin-hydrazide 作生物素进行标记。

(1) 将纯化的抗体(IgM 或 IgG, 0.1~1.0mL)在标记缓冲液(0.1mol/L NaAc, pH 值为 5.5, 0.1mol/L NaCl)中 4℃ 透析过夜。

(2) 吸取 0.5mL 至微量离心管中,加过碘酸钠溶液至终浓度为 10mmol/L,为使抗体分子上的糖基氧化置冰浴上于暗处孵育 30min。

(3) 将氧化的抗体过 PBS 平衡的 Sephadex G25 PD-10 预装柱,使之与过碘酸钠分开。收集蛋白峰。

(4) 向抗体管中加入 Biotin-LC-hydrazide (Pierce) 至终浓度 5mmol/L,置混摇器上室温孵育 1h。

(5) 用含 0.02% NaN₃ 的 PBS 平衡 Sephadex G25 预装柱,将生物素标记的抗体分子过柱与游离的生物素分开。收集蛋白峰,置 -20℃ 保存。

9.6.2 生物素标记 DNA 片段的制备

作为将与抗体偶联的报告 DNA 片段,应确保在待测抗原来源的肌体 DNA 中无同源序列,如可选用大肠杆菌的序列作为报告 DNA 去检测人源的标本。DNA 片段大小为 300~500bp,生物素标记可采用 PCR 方法,根据报告 DNA 的核苷酸序列合成一对引物,其中一个引物的 5'端碱基上带有生物素标记。在 0.5mL PCR 管中将表 9-3 中列出的试剂混合。

表 9-3 PCR 系统组成

试剂	添加量 (μL)	终浓度
10 × PCR 缓冲液	10.0	1 ×
2.5mmol/L 4dNTP 混合物	8.0	0.2mmol/L
50μmol/L 生物素标记的上游引物	1.0	0.5μmol/L
50μmol/L 生物素标记的下游引物	1.0	0.5μmol/L
15mmol/L 模板 DNA	1.0	1.0μg
TaqDNA 聚合酶	1.0	5U
加水至混匀后上面覆盖液体石蜡	100.0	

混匀后上面覆盖液体石蜡在 95℃ 加热 5min 后, 放入 PCR 仪中按下列程序扩增: 94℃ 1min; 55℃ 1min; 72℃ 1min; 40 个循环。最后 72℃ 延伸 10min。加等量酚-氯仿抽提, 然后加 10 μ L 3mol/L KAc, 250 μ L 无水乙醇, 置 -70℃ 30min。离心沉淀 DNA 片段, 用 70% 乙醇洗 1 次。将沉淀 DNA 干燥后溶于 TE 缓冲液中, 置 -20℃ 保存。

9.6.3 制备抗体-亲和素-DNA 复合物

将生物素标记的抗体与亲和素按等分子浓度混合于含有 1mg/mL BSA 的 PBS 中, 室温孵育 30min, 再加入两倍分子浓度的生物素标记的 DNA 片段, 继续孵育 30min, 最后加入 10 倍分子浓度的生物素, 将亲和素分子上的结合部位饱和。最后过凝胶过滤柱将复合物与未结合的单体分开, 加入 BSA 达 1mg/mL, 分装后冻存于 -20℃。

9.6.4 免疫 PCR

(1) 按常规 ELISA 方法, 用饱和缓冲液稀释抗原, 加到 96 孔塑料板或 0.5mLPCR 管中, 4℃ 过夜。

(2) 用 PBS 洗 3 次, 然后每孔加 200 μ L 封闭液 (PBS 含 10mg/mL BSA, 1mg/mL 鱼精 DNA), 室温孵育 30min。

(3) 用 TETBS (其配方: 20mmol/L EDTA, 0.02% NaN₃) 洗三次。

(4) 将抗体-亲和素-DNA 复合物稀释于含有 1mg/mL BSA 和 0.1mg/mL 鱼精 DNA 的 TETBS 中, 每孔加 50 μ L, 室温孵育 1h。

(5) 用 TETBS 洗 5 次, 然后将塑料板或管倒置在吸水纸上拍打以控干水分。

(6) 每管中加 50 μ L PCR 反应液, 含成分如表 9-4 所示。

表 9-4 PCR 反应液组成

试剂	添加量 (μ L)	终浓度
10 $\times$ PCR 缓冲液	5.0	1 $\times$
2.5mmol/L 4dNTP 混合物	4.0	0.2mmol/L
50 μ mol/L 生物素标记的上游引物	0.5	0.5 μ mol/L
50 μ mol/L 生物素标记的下游引物	0.5	0.5 μ mol/L
15mmol/L MgCl ₂	5.0	1.5 μ g
TaqDNA 聚合酶	0.5	2.5U
加水至 50 μ L		

混匀后上面覆盖液体石蜡, 95℃ 加热 5min, 然后在 PCR 仪上按下列程序扩增 35 个循环: 94℃ 1min; 55℃ 1min; 72℃ 1min。最后 72℃ 延伸 10min。每管取 5 μ L 作琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭染色后观察结果, 如在 PCR 时加入了放射性核素标记, 则可用 X 光片显影。亦可在凝胶电泳后做 Southern-blot, 用特异性探针杂交, 进一步提高其特异性和敏感性。

9.6.5 PCR 的质量控制与注意事项

9.6.5.1 PCR 的质量控制

PCR 的质量控制主要涉及 3 个方面：①生产及试验人员的质量意识和技术操作培训；②生产及试验仪器设备试剂管理；③原辅材料的质量控制。任何一个方面出现问题，都会影响 PCR 检测质量。

(1) 人员要求：PCR 的生产及试验人员要进行岗前培训，严格按照操作规程 (SOP) 进行操作。在生产过程中，有一套试剂生产质量控制体系。每一试剂组分都经过灵敏度、敏感性、特异性质量控制的检测，在有效期内能确保每种试剂的质量。

(2) 仪器设备的质量控制 PCR 的生产及检验仪器应该通过质量验证来实施仪器设备的质量控制，并定期进行仪器的校验和保养，确保所有仪器设备处于正常的工作状态。

(3) 原辅材料的质量控制 在 PCR 的质量控制中，使用的所有试剂都有可能影响产品的质量，所以原辅料的选择具有十分重要的作用，控制 PCR 产品质量的前提是把握好原辅料关。根据需要制定原辅料的质量标准及检验操作规程，原辅料的选择要经过对供应商质量审计合格，并经检验质量符合要求的原辅料，一旦选定后最好不要轻易改换。如果必须改换时应与原产品进行严格比对试验，包括敏感性、特异性、试剂保存期等试验。并且经常要注意不同批次产品质量的差异。比如说 TaqDNA 聚合酶，不同厂家生产的质量是有差异的，尽管都是标出相同活性单位，但其标定方法和保存液的成分以及运输过程的不同常常导致实际活性单位的差异，有时由于其活性低，使得弱阳性样品漏检；有时由于其活性过高出现非特异扩增。这与 ELISA 检测中酶结合物的作用相似。其实影响 PCR 检测结果的试剂很多，可以这样说，PCR 检测用的所有试剂都可能影响检测效果。

实验耗材也是影响 PCR 检测质量的因素之一。PCR 反应管壁厚以及传导热量性能等直接影响 PCR 检测效果。在热盖 PCR 仪上一般不需要加入矿物油，但有些 PCR 反应管盖子不严密，导致扩增过程中反应液水分蒸发，严重影响检测灵敏度。PCR 反应体系是微量的，移液器的 Tip 头生产质量不好时，有时致使液体残留量多或虹吸作用强，导致试剂盒中试剂量不够，配置 PCR 反应体系不准，造成检测质量下降。

(4) 在每次 PCR 检测时，必须设立阴性对照和阳性对照。阴性对照检测为阴性时，表明试验全部过程的试剂没有受到污染；阳性对照检测为阳性时，表明 DNA 提取 (RNA 提取、RNA 反转录)、DNA 扩增和电泳鉴定工作体系正常。在阴性对照和阳性对照检测结果成立的前提下，才能对检测样品进行判定。因此，每次试验都应设立表明 DNA 提取 (RNA 提取、RNA 反转录)、DNA 扩增和电泳鉴定对照，只有设立试验全程的对照，才能证明试验结果成立。这一点对 PCR 的检测试验是非常重要的。

(5) 在生产和检验过程中应做到：①配制好的 PCR 试剂小量分装，避免反复冻融；②引物设计应遵循引物设计原则；③预混合试剂时应先加试剂，后加样品；④操作时勤换手套；⑤Eppendorf 离心管在每次开盖前要离心片刻，开盖要小心，避免样本溅出离心管；⑥实验用的容器要严格分开。

9.6.5.2 注意事项

PCR 技术虽然具有很多优点,但是如果操作不慎也会出现假阳性或假阴性结果。一般出现假阳性结果主要是由于以下几个方面的原因:

①新扩增的目的 DNA 特异性不强,不仅存在于病原菌中,而且在非病原菌中也有存在;②扩增时退火温度过低造成非特异性条带的出现;③在被测模板中有杂质污染,这是 PCR 出现假阳性的最常见原因。为了避免假阳性的出现,必须严格遵守操作规程,PCR 出现假阴性的可能原因主要有:①PCR 扩增体系中存在 Taq 酶的抑制剂,如酚类物质、SDS、血红蛋白等;②模板含量过少;③模板 DNA 纯度不够。为了避免假阴性的出现,应进一步改进 DNA 的提取技术,利用分子生物学方法改造 Taq 酶,使其能够在有杂质存在的情况下仍有较高的活性,同时在实际操作时也要设置好对照。

9.7 PCR 临床应用领域

单克隆抗体技术曾使免疫学理论与实践有了新的突破,近几年来 PCR 技术使分子生物学及相关学科发生了一次方法学的革命。在不到 10 年的时间内,在以下几个领域中 PCR 技术已具有实用价值,且其应用范围还在不断扩大中。

9.7.1 遗传病的产前诊断

用胎儿羊膜细胞,羊水或母血可以检查胎儿的性别,这在与性染色体关联遗传病诊断中是必要的。对于高发的遗传病,如地中海贫血、镰刀状细胞贫血、凝血因子缺乏、DMD 等已在临床应用多年,为优生优育作出了贡献,对于有遗传倾向的疾病尤其是老年性疾病,如糖尿病、高血脂症、甚至部分肿瘤,都将会在近期内有望突破。

9.7.2 致病病原体的检测

外源入侵的基因,一旦阐明其部分核酸序列,就可以设计引物或探针,用 PCR、PT-PCR 或杂交方法来检测,其中包括细菌、病毒、原虫及寄生虫、霉菌、立克次体、衣原体和支原体等微生物,PCR 诊断的特点是可以选择其基因中的保守区作通用检测,也可以选定差异较大的基因部位作分型检测。既可以做病原体的专用检测,也可以将有关病毒、细菌中不同的品种作一次多元检测。而且检测的灵敏度和特异性都远高于当前的免疫学方法,所需时间也已达临床要求,这对于难于培养的病毒,细菌和原虫等来说尤为适用。

9.7.3 癌基因的检测和诊断

虽然对癌基因的研究大部分还属于基础阶段,但癌变是由基因变异所导致的这一基本事实已毋庸置疑,所以癌基因及抗癌基因的研究,离不开分子水平的诊断技术,临床上现在已经可以应用 PCR 技术在残留细胞进行定量(包括慢粒和急粒)、肺癌中 P₅₃及 Rb 等抗癌基因的失活测定、神经质瘤 N-myc 基因的激活和表达等。通过原位杂交观

察特定癌基因及抗转移基因的植入和反义寡核苷酸对强表达癌基因的阻断均已成为近代基因治疗的着眼点。

9.7.4 法医物证

DNA 指纹、个体识别、亲子关系鉴别及法医物证,这是公、检、法部门所重视的课题,目前在许多国家已经取得法律认可。肌红蛋白小卫星基因, β -珠蛋白基因、ApoB 基因等的多肽性和重复次数的差异都被应用于鉴定,其灵敏度已达到一根头发、一个细胞、一个精子取得个体特征图谱,这一领域也已发展到骨髓或脏器移植配型及动物种系的研究中。

9.7.5 动物、植物检疫

灵敏度高、特异性强、速度快的诊断检测方法是检查出入国门的人员、动物、植物等是否携带烈性传染病(艾滋、动物病毒、植物病毒等)病原体,食品、饲料等是否带沙门氏菌等均需要基因诊断手段将这些病菌拒之于国门之外,是提高我国综合国力的必要保证。

9.7.6 高科技生物医学领域中的应用

在转基因动植物中检查植入基因的存在。PCR 技术尚可应用于基因拼接、测序等领域。

(高喜梅)

第 10 章 其他免疫技术及免疫技术新进展

免疫反应可以分为标记免疫反应和非标记免疫反应。如将 Ag 或 Ab 用标记物（如荧光素、酶、放射性同位素等）进行标记，则在与标本中的相应 Ab 或 Ag 反应后，可以不必测定 Ag - Ab 复合物本身，而测定复合物中的标记物，通过标记物的放大作用，进一步提高了免疫技术的敏感性，称为标记免疫反应，在其他章节已经介绍。本章主要介绍非标记免疫反应和免疫反应的新技术。

10.1 非标记免疫反应

非标记免疫反应（Non - mark immune response）又称为传统免疫反应，它是利用 Ag - Ab 反应后的理化性质变化对抗原抗体进行测定的方法。包括：沉淀反应、免疫扩散、免疫电泳、免疫浊度和免疫凝聚反应等方法。

10.1.1 沉淀反应

可溶性抗原与相应的抗体混合，在电解质存在的条件下，两者比例适合，即可有沉淀物出现，叫沉淀反应（Precipitation）。由于沉淀反应抗原多系胶体溶液。沉淀物主要是由抗体蛋白所组成。早在 1897 年 Kraus 发现细菌培养液与相应抗血清混合时可以发生沉淀反应，所以说沉淀反应是免疫技术中最早使用的方法。

为了求得抗原与抗体的适宜比例，保证有足够的抗体，而且抗原分子小，具有较大的反应面积，因此操作上通常是稀释抗原，不稀释抗体。沉淀反应的种类有环状沉淀、絮状沉淀、荚膜膨胀、琼脂扩散及免疫电泳等。

10.1.1.1 絮状沉淀反应

絮状沉淀反应是将已知抗原与抗体溶液在试管（如凹玻片）内混匀，在电解质的存在下，如抗原抗体对应，而且二者比例适当时，抗原抗体的结合会形成肉眼可见的絮状沉淀，以此可以判为阳性反应。

10.1.1.2 环状沉淀反应

早在 1902 年 Ascoli 建立了环状沉淀反应方法，当抗原与相应抗体形成一个接触面时，二者比例适当，接触面上可形成一个乳白色的环状物即为阳性沉淀反应。

10.1.2 免疫扩散

免疫扩散是利用抗原抗体在凝胶中的扩散，形成浓度梯度，抗原抗体浓度比例适当

的位置形成明显的沉淀。适宜浓度的凝胶中水分占98%以上,且形成网络,将水分子固定,抗原抗体可以在凝胶中自由扩散。琼脂扩散试验是抗原抗体在凝胶中所呈现的一种沉淀反应。抗体在含有电解质的琼脂凝胶中与抗原相遇时,便出现可见的白色沉淀线。这种沉淀线是一组抗原抗体的特异性复合物。如果凝胶中有多种不同抗原抗体存在时,便依各自扩散速度的差异,在适当部位形成独立的沉淀线,因此广泛地用于抗原成分的分析。琼脂扩散试验可根据抗原抗体反应的方式及特性分为单向免疫扩散和双向免疫扩散。

10.1.2.1 单向琼脂扩散

单向琼脂扩散是在琼脂胶中混入一定量的抗体,使待测的抗原溶液从局部向琼脂内自由扩散,在一定区域内形成可见的沉淀,可以定性、定量抗原。

10.1.2.2 双向免疫扩散

双向免疫扩散是指可溶性抗原与相应抗体在琼脂介质中相互扩散,彼此相遇后形成一定类型的特异性沉淀线。沉淀线的特征与位置不仅取决于抗原抗体的特异性及相互间比例,而且与其分子大小及扩散速度相关。当抗原、抗体存在多个系统时,可呈现多条沉淀线乃至交叉反应。依据沉淀线的形态、条数、清晰度及位置可了解抗原或抗体的若干性质,如浓度、特异性等。

10.1.3 免疫电泳

免疫电泳法是将凝胶电泳与双向免疫扩散两种技术相结合的一种实验方法。在电场作用下标本中各组分因电泳迁移率不同而分成区带,然后沿电泳平行方向将凝胶挖一沟槽,将抗体加入沟槽内,使抗原与抗体相互扩散而形成沉淀线。根据沉淀线的数量、位置及形状,分析标本中所含各组分的性质,该法常用于抗原分析及免疫性疾病的诊断。

10.1.3.1 对流免疫电泳

该方法是在琼脂扩散基础上结合电泳技术而建立的一种简便而快速的分析方法。此方法能在短时间内结果,故可用于快速诊断,敏感性比双向扩散技术高10~15倍。

血清蛋白在pH值为8.6条件下带负电荷,所以在电场作用下都向E极移动。但由于抗体分子在这样的pH值条件下只带微弱的负电荷,而且它的分子量又较大(为 γ 球蛋白)。所以游动慢。更重要的是抗体分子受电渗作用影响较大,也就是说电渗作用大于它本身的迁移率。所谓电渗作用是指在电场中溶液对于一个固定固体的相对移动。琼脂是一种酸性物质,在碱性缓冲液中进行电泳,它带有负电荷,而与琼脂相接触的水溶液就带正电荷,这样的液体便向负极移动。抗体分子就是随着带正电荷的液体向负极移动的。而一般的蛋白质(如血清抗原)也受电渗作用的影响,使泳动速度减慢,但它的电泳迁移率远远大于电渗作用。这样抗体就达到了定向对流,在两者相遇且比例合适时便形成肉眼可见的沉淀线。

10.1.3.2 火箭免疫电泳

火箭免疫电泳是1965年Laurell等人首先报道的,它是有单向琼脂扩散发展起来的,又称为单向电泳扩散免疫沉淀试验。火箭免疫电泳的基本原理是:在电场作用下,抗原在含定量抗体的琼脂介质中泳动,二者比例在合适时在较短时间内形成形状像火箭或锥形的沉淀线,而此沉淀线的高度常与抗原量成正比关系,因此本法可以测定样品中抗原的含量。利用火箭免疫电泳只能测定到mg/L水平的含量,低浓度的样品难以形成可见的沉淀峰。在操作中应选择合适的时间,并控制低浓度的抗体和抗原的适当浓度,使沉淀峰达到1~5cm,同时应避免边缘效应的出现。

火箭电泳作为抗原定量只能测定mg/mL以上的含量,如低于此水平则难于形成可见的沉淀峰。加入少量 ^{125}I 标记的标准抗原共同电泳,则可在含抗体的琼脂中形成不可见的放射自显影。根据自显影火箭峰降低的程度(竞争法)可计算出抗原的浓度。放射免疫自显影技术可测出ng/mL的抗原浓度。

10.1.3.3 免疫固定电泳

免疫固定电泳(immunofixation electrophoresis, IFE)是Alper和Johnson(1969年)推荐的一项有实用价值的电泳加沉淀反应技术。可用于各种蛋白质的鉴定。该法原理类似免疫电泳,不同之处是将血清直接加于电泳后蛋白质区带表面,或将浸有抗血清的滤纸贴于其上,抗原与对应抗体直接发生沉淀反应,形成的复合物嵌于固相支持物中。将未结合的游离抗原或抗体洗去,则出现被结合固定的某种蛋白。区带电泳支持物选用滤纸、醋酸纤维膜、琼脂或聚丙烯酰胺和交叉电泳皆可。

(1)琼脂电泳:琼脂凝胶结构均匀,含水量大,吸附量小,因此电泳速度快,电泳结果区带整齐,分辨率高,易染色,制成薄膜标本保存方便。所以琼脂凝胶电泳最常用。

(2)醋酸纤维膜电泳:醋酸纤维膜电泳是一项简便而又迅速的方法。它的优点是:①电泳区带分离清楚,比琼脂平板电泳分辨率高;②可以定量;③样品用量少,只需要几微升即可。

(3)圆盘电泳:圆盘电泳即聚丙烯酰胺凝胶电泳。它是利用丙烯酰胺和双丙烯酰胺在催化剂的作用下聚合成大分子的凝胶物。它同时兼有分子筛和电泳效应。当样品通过凝胶进行电泳时,便可以根据其样品中各分子的电荷和分子量的不同而泳动出不同的区带。由于聚丙烯酰胺凝胶化学性质较琼脂稳定,很少带有侧基,在电泳过程中,吸附作用与电渗作用均小,所以该技术的分辨率均高于其他琼脂电泳技术。

(4)交叉电泳:交叉免疫电泳是把琼脂平板电泳和火箭电泳结合起来的一种方法。先将抗原样品在琼脂凝胶中进行电泳分离,然后使已分开的各抗原成分与原泳动方向呈90°角的方向泳向含抗体的琼脂凝胶中,于是该抗原样品中的各个抗原成分和它相对应的抗体依次形成若干锥形沉淀线,根据沉淀线的位置及面积(或高度)可确定该抗原的质和量。

此试验可以用来鉴定抗原,即与标准抗原抗体系统相比较,就可知待测样品中抗原

的质和量。此法也可以鉴定抗体,把未知的含抗体的样品与标准抗原反应,所得的结果与标准的抗原、抗体反应结果比较,从而可以确定其中所含抗体成分及其滴度。

10.1.3.4 高效毛细管电泳免疫分析技术

高效毛细管电泳(HPCE)是从传统电泳发展而来的,是电泳技术与色谱技术的完美结合。它以高压(可达30 kV)下产生的强电场为驱动力,以小内径的石英毛细管(常用25~100 μm)为分离通道,依据各组分之间电泳淌度或分配系数的差异实现分离。HPCE具有快速、高效、操作方便、样品消耗少、应用范围广等特点。根据分离模式的不同,HPCE分为毛细管区带电泳(CZE)、胶束电动毛细管色谱(MECC)、毛细管凝胶电泳(CGE)、毛细管等电聚焦电泳(CIEF)、毛细管等速电泳(CITP)、毛细管电色谱(CEC)。此外,以有机溶剂代替水配制缓冲溶液的非水毛细管电泳(NACE)也有应用报道。

HPCE在分子生物学、医学、药学、化学、环境保护的领域有极其广泛的应用,P/ACE5000型高效毛细管电泳仪配有紫外和激光诱导荧光(LIF)检测器,提供小分子、手性化合物、DNA、氨基酸、蛋白质等生物大分子方面的分析服务。

10.1.3.5 影响电泳的因素

不同带电质点在同一电场中的迁移率(或泳动度)不同,影响迁移率的因素有:

①带电质点的性质:即颗粒所带净电荷的量,颗粒大小及形状等。带电荷越多,分子越小,泳动速度越快。

②电场强度:电场强度是单位厘米的电位差。电场强度越大,带电质点泳动速度越快;反之亦然。

③溶液的pH值:溶液的pH值决定了带电质点的解离程度,也决定了物质所带电荷的多少。对蛋白质、氨基酸等两性电解质而言,pH值离等电点越远,颗粒所带的电荷越多,电泳速度也越快;反之则越慢。蛋白质在酸性溶液中易变性,在偏碱溶液中比较稳定,所以蛋白质电泳大多用pH值为8.2~8.8的巴比妥或硼酸缓冲液,在这种pH值的溶液中,血清蛋白一般都带负电荷。

④溶液的离子强度:溶液的离子强度越高,颗粒泳动速度越慢,反之越快。血清电泳一般最适宜离子强度在0.025~0.075之间。离子强度越低,缓冲液的电流下降,扩散现象严重,使分辨力明显降低。离子强度太高,将有大量的电流通过琼脂板,由此而产生的热量使板中水分大量蒸发,严重时可使琼脂板断裂而导致电泳中断。溶液中离子强度与溶液的浓度成正比。 $\mu = 1/2 \sum CZ^2$ (μ 为离子强度, C 为克分子浓度, Z 为离子的价数)。

⑤电渗作用:电渗是在电场中液体对于固体支持物的相对移动。由于琼脂中含有 SO_4^{2-} ,带负电荷,造成静电感应致使附近的水带正电荷,而向负极移动,所以电泳时有两种力,即电泳力和电渗力。如果物质原来带正电荷,向负极移动,则因电渗作用向负极移动得更快。如果物质向正极移动,所带电荷少,电泳力抵不过电渗力,则也向负极移动,血清中的 γ 球蛋白就是如此。

⑥吸附作用：即介质对样品的滞留作用。它导致了样品的拖尾现象而降低了分辨率。纸的吸附作用最大，醋酸纤维膜的吸附作用较小或无。

⑦电泳时间：电泳时间与迁移率成正比。

10.1.4 免疫浊度

根据抗原与抗体能在液体内快速结合的原理，20 世纪 70 年代出现了微量免疫沉淀测定法，即免疫透射浊度测定、免疫胶乳浊度测定和免疫速率散射浊度测定法。这 3 种技术皆已常规用于临床体液蛋白的检测，并已创造出了多种自动化仪器。

10.1.4.1 免疫透射浊度测定法

抗原抗体在免疫浊度测定的基本原理是：抗原抗体在一定的电解质溶液中快速形成抗原抗体复合物，使反应液出现浊度。当反应液中保持抗体过量时，形成的复合物随抗原量的增加而增加，反应液的浊度亦随之增加，用浊度仪进行测定，与一系列的标准品对照，即可计算出受检物的含量。

10.1.4.2 免疫胶乳浊度测定法

在上述比浊法中，少量的小的抗原抗体复合物极难形成浊度，除非放置较长时间；如形成较大的复合物，则抗原和抗体用量也较大，显然不符合微量化的要求。于是发展了免疫胶乳浊度测定，其基本原理是：将抗体吸附在大小适中、均匀一致的胶乳颗粒上，当遇到相应抗原时，则使胶乳颗粒发生凝集。单个胶乳颗粒在入射光波之内不阻碍光线透过，两个或两个以上胶乳颗粒凝聚时则使透过光减少，这种减少的程度与胶乳颗粒凝聚的程度呈正比，当然也与待测抗原量呈正比。该技术的关键在于两个方面，首先是选择适用的胶乳，其大小（直径）要稍小于波长。用 500nm 波长者，选择 100nm 颗粒较适合；用 585nm 波长者，则选用 100~200nm 颗粒为好。目前多用 200nm 的胶乳颗粒。其次，胶乳与抗体结合时用化学交联虽好，但失活也较严重。

10.1.4.3 免疫速率散射浊度测定法（ratenephelometry）

速率散射浊度法是 Sternberg（1977 年）创建的。光沿水平轴照射时，碰到小颗粒的免疫复合物可导致光散射，散射光的强度与复合物的含量成正比，亦即待测抗原越多，形成的复合物也越多，散射光就越强。速率散射浊度测定是一种抗原抗体结合的动态测定法。经典的沉淀反应皆在抗原抗体结合完成后进行复合物的定性或定量测定（终点法）；若在抗原抗体反应的最高峰（约在 1min 内）测定其复合物形成的速率（速率法），则可达到快速、准确的目的。

浊度测定亦有其弱点。其一是抗原或抗体量过剩的太多时易出现可溶性复合物，造成测定误差，测定单克隆蛋白时这种现象更易出现；其二是应维持反应管中抗体蛋白量始终过剩，这个值要预先测定，使仪器的测定范围在低于生理范围到高于正常范围之间；其三是受血脂的影响，尤其是低稀释度时，脂蛋白的小颗粒可形成浊度，使测定值假性升高。

免疫浊度法经典的沉淀试验有4个缺点无法克服：即操作繁琐、敏感度低（ $10 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ ）、时间长和难以自动化。

10.1.5 凝聚反应 (condense)

凝聚反应在微生物细胞悬液中，加入含有特异性抗体的血清，在一定浓度的电解质条件下，微生物细胞凝聚成团，叫做凝聚反应。可分为直接凝聚反应与间接凝聚反应。由于病毒是可溶性抗原，必须把病毒的抗体先吸附于一种与免疫无关的颗粒表面，然后与相应的抗原结合反应。用于吸附抗体的颗粒有皂土、乳胶、炭末、红细胞等。

10.1.5.1 直接凝胶反应

直接凝胶反应是指细菌螺旋体和红细胞等颗粒抗原在一定的电解质中与相应的抗体结合后产生凝聚现象的过程。根据反应中使用的载体材料的差异可以分为玻片法、试管法和微量血凝办法。直接凝胶反应可以进行定量和定性，而玻片法只能进行定性。

(1) 玻片法凝集试验操作方法

①抗血清：通常用于玻片凝集试验的免疫血清（多价或单价血清），一般应用0.25%石炭酸生理盐水或1:10000 硫柳汞生理盐水，按其效价做适当稀释后分装保存。

免疫血清应冷藏保存，但应避免反复冻融。使用时按照无菌操作要求蘸取或吸取，防止细菌或真菌污染使效价降低，并应注意有效日期。

②电解质溶液：电解质在细菌凝集反应中起着重要作用，如无适当浓度的电解质参与，凝集现象就不能出现，常用的电解质溶液是生理盐水。

③被测菌制备：被检细菌供做玻片凝集试验用的细菌，可取血琼脂平板及琼脂斜面18~24h培养物或肉汤培养基6h培养物，直接与稀释后的免疫血清混合。做试管凝集试验时，应先用0.25%石炭酸生理盐水，将试验菌制成 $(10 \sim 20) \times 10^8/\text{mL}$ 浓度的菌悬液。如检查菌体抗原，应将菌液置于 100°C 水浴中60min，以破坏鞭毛抗原。

(2) 试管法凝集试验操作方法

①菌液制备：将待测菌接种于琼脂斜面上， 37°C 培养18~24h，用无菌生理盐水制成悬液，用标准比浊管测定细菌浓度为 $(9 \sim 10) \times 10^8/\text{mL}$ 。

②实验步骤：取小试管10支，编号，按顺序排列于试管架上。于第1管中加生理盐水0.9mL，其余各管均加0.5mL，取免疫血清0.1mL加入第1管中，充分混匀后，吸出0.5mL移入第2管中混匀，从第二管中吸出0.5mL加入第3管，依此稀释至第9管，混匀后从第9管吸出0.5mL弃去。第10管不加免疫血清作为对照。每管再加入被检细菌悬液 $(10 \times 10^8/\text{mL})$ 0.5mL直至第10管。充分振摇混匀后，置 37°C 水浴中2~4h，取出初步观察结果，然后再置 4°C 冰箱或室温过夜，读取最后结果。

10.1.5.2 间接凝胶反应

间接凝胶反应是指吸附于适当大小的颗粒性载体表面的可溶性抗原（或抗体）与相应的抗体（或抗原）作用后，在适当的电解质存在的条件下产生特异性凝聚现象，也叫被动凝聚反应。它适用于各种抗体和可溶性抗原的检测。根据起致敏载体作用的是

抗原或抗体以及间接凝胶反应的方式,间接凝胶反应又可分为:①正向间接凝胶反应,其程序是以抗原致敏载体来检测标本中的相应抗体;②反向间接凝胶反应,以特异性抗体致敏载体来检测标本中的相应抗原;③间接凝集抑制反应,采用抗原致敏颗粒载体以及相应的抗体来检测标本中是否存在与致敏抗原相同的抗原。具体方法是先将标本与抗体试剂作用,然后加入致敏的载体,若出现凝集现象,说明标本中不存在相同抗原,抗体试剂未被结合,因此仍与载体上的抗原起作用,如标本中存在相同的抗原,则凝集反应被抑制。

10.2 免疫技术新进展

10.2.1 免疫微粒技术

免疫微粒技术是利用高分子材料合成一定粒度大小的固相微粒作为载体,包被上具有特异性亲和力的各种免疫活性物质(抗原或抗体),使其致敏为免疫微粒,用于免疫学及其他生物学检测与分离的一项技术。作为载体的微粒通常是以某种高分子有机单体为原料,经过乳液聚合、悬浮聚合及辐照聚合等高分子聚合方法制备而成。由于制备材料及工艺不同,微粒的种类繁多,现已制成惰性微粒如聚苯乙烯胶乳微粒、活性微粒如羧化聚苯乙烯微粒、磁性微粒及标记微粒(用同位素、荧光素或酶标记)等四大类微粒,数量多达几十种。将制备好的微粒与抗原(或抗体)经物理吸附、化学偶联及生物素亲和素桥联法等致敏方法形成免疫微粒。广泛应用于各种可溶性大分子物质的检测、分离与纯化、细胞标记与识别等。近年来,微粒技术在核酸分子杂交、DNA与RNA的分离及PCR等研究领域亦显示出广阔的应用前景。

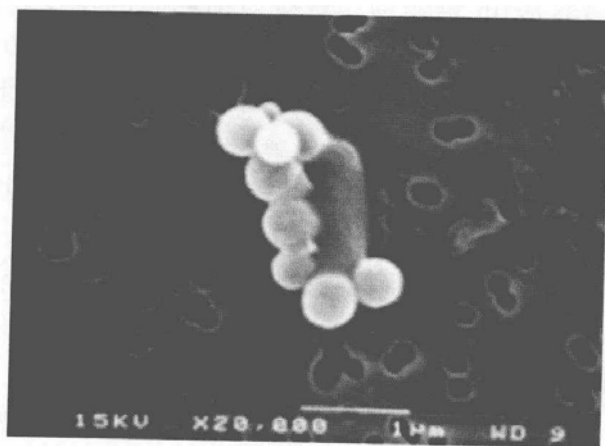


图 10-1 磁性微粒结合并分离

10.2.1.1 免疫磁性微粒分离与纯化技术

磁性微粒(magnetic microspheres, MMS)是20世纪80年代初,用高分子材料和金属离子为原料,聚合而成的一种以金属离子为核心,外层均匀地包裹高分子聚合体的固相微粒。在液相中,受外加磁场的吸引作用,MMS可快速沉降而自行分离,无需进行

离心沉淀。因此,将 MMS 应用于免疫检测,可使操作过程大为简化。经过特异性抗体包被制成免疫 MMS,与检品中的抗原结合形成免疫 MMS-靶分子(或靶细胞)复合体,通过外加磁场的作用即可与其他成分分离开来。再以适当方式使复合体解离,在磁场吸引下除去游离的免疫 MMS,即可获得纯化的靶分子或细胞。

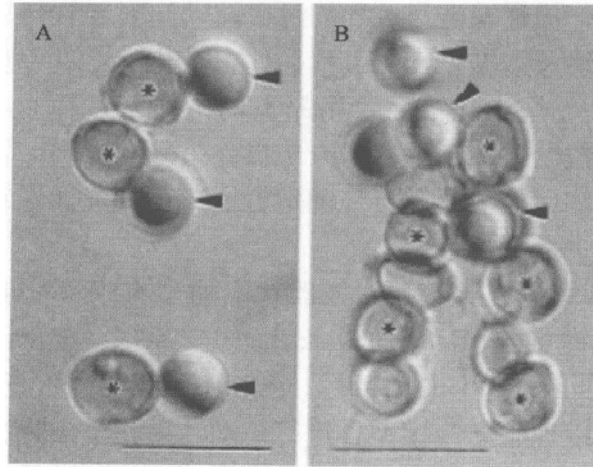


图 10-2 磁性微粒分离细胞

10.2.1.2 胶乳微粒免疫检测技术

胶乳微粒免疫检测技术是在胶乳凝集定性试验基础上发展建立的一种非放射性均相免疫测定法,可以对各种微量的抗原物质和小分子半抗原(加药物、团体激素等)进行精确的定量测定。根据特异性抗体致敏的胶乳微粒(一般为直径约 $1\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯胶乳),与待测标本中的相应抗原相遇时发生凝集反应,胶乳凝集程度与被测物的浓度呈函数关系,由此可测出标本中待测物的含量。

10.2.2 免疫脂质体技术(liposome immunity, LIA)

1965 年,英国学者 Bangham 和 Standish 将磷脂分散在水中进行电镜观察时发现了脂质体,并将其作为研究生物膜的模型提出。它是磷脂分子分散于水介质中形成的密封的双分子单层或多层的囊泡,其膜内可包含上万个标记物分子,具有很高的信号放大作用。脂质体免疫检测中,脂质体通常用来包埋大量的传统免疫标记(荧光或者酶的底物)抗原核抗体在脂质体表面结合后这些物质释放出来产生检测信号。因此,将脂质体用于免疫分析是提高非放射免疫分析灵敏度的有效方法之一。由于其具有独特的高敏感性和特异性、均相、快速的特点,引起人们的极大关注。经过不断发展和完善,近年来,脂质体作为标记物用于标记抗原或抗体得到广范的应用,目前已经形成多种测定模式并可用于多种物质的测定,而且已经有相应的商品化试剂盒上市。

10.2.3 流动注射免疫分析技术

1980 年, Lim 等将速度快、自动化程度高、重现性好的流动注射分析(flow injec-

tion analysis, FIA) 与特异性强、灵敏度高的免疫分析 (immunoassay) 集为一体, 创立了流动注射免疫分析技术 (flow injection immunoassay, FIIA) 目前已在疾病诊断试剂、药物分析、环境监测及农药残留检测等方面得到了广泛应用。

FIIA 具有以下优点: ①分析速度快, 自动化程度高。与其他免疫分析相比, 它无需耗时较长的孵育过程, 加样及洗涤过程均可由流动注射装置自动完成。计算机技术应用到流速控制、信号收集及数据处理等过程, 使自动化程度进一步提高。②应用可反复多次使用的固相抗原 (抗体), 节省了价格昂贵的抗原 (抗体)。③测定的重现性比传统方法有所提高。这得益于避免了过多的人工操作带来的误差。④可以根据不同的测定对象选择合适的固相载体、检测器和免疫测定方法, 更具灵活性和多样性。⑤灵敏度与检测限不亚于传统方法。

1990 年 Ruzika, 将具有注射器和选择器功能的多点阀 (Multiport valve, MPV) 取代单向阀, 根据“紊流模型” (Random walk model) 原理, 提出了新一代流动注射技术序列注射分析 (sequential injection, SIA)。近年来, FIIA 中广泛采用序列注射分析技术。1998 年 Dreveny 等以地谷新为模型, 进行流动注射化学发光免疫分析测定, 并将序列注射分析与常规流动注射分析进行了比较, 表明序列注射化学发光免疫分析法可显著提高分析测定的重现性和灵敏度, 缩短了分析测定时间。

10.2.4 电化学免疫技术

20 世纪 90 年代后期, 电化学发光免疫分析 (electro-chemiluminescence immunoassay, ECLIA) 以其快速、精确、重现性好及试剂安全无毒等特点, 显示出很好的临床应用前景。电化学发光免疫分析是继放射免疫、酶免疫 (EIA)、荧光免疫 (FIA)、化学发光免疫分析 (CLIA) 之后的新一代标记免疫分析技术, 是电化发光 (ECL) 和免疫测定相结合的产物。它包括了电化学和化学发光两个过程, 整个过程在一个全封闭的反应体系中进行, 全自动控制, 反应时间短, 15 ~ 30min 即可出结果, 且灵敏度高, 检测下限可达 1pmol/L。因此该项技术近年来发展迅速, 在临床诊断、环境监测、食品分析等领域得到广泛的应用。

根据电化学的检测手段的不同, 电化学免疫分析又可以分为常规法和电化学免疫传感器法。常规法是在免疫反应后, 用常规的电化学技术对免疫反应进行表征; 电化学免疫传感器法是将抗原或抗体固定在电化学电极的表面, 免疫反应在电极表面完成后接着用电化学手段进行检测, 两个过程一体化完成。两种方法的原理基本相同, 都是将免疫反应与电化学检测结合, 只是所用电极及分析过程有一定的区别。

10.2.5 表面增强拉曼光谱技术

拉曼光谱 (surface enhanced raman spectrum, SERS) 是一种光散射谱, 是研究分子振动的一种光谱方法, 它提供待测组分的结构信息, 是关于分子内部各种振动频率及有关振动能级的情况, 可以用来鉴定分子中存在的官能团, 进行指纹鉴定分析。

拉曼光谱的缺点是检测非常低, 对基底表面需要进行特殊的处理, 通过电磁场及化学吸附的作用, 使吸附在表面上的分子可以给出比常规拉曼光谱强 $10^2 \sim 10^5$ 倍的信号,

即所谓表面增强拉曼光谱技术,因此,进行基底表面处理以增强信噪比,提高的尝试是拉曼光谱技术得以有效应用的关键,由于该技术利用测量组分化学结构的差异,可以在不经过样品处理的情况下(无损)对固态、粉末态和液态样品进行拉曼光谱扫描,获得待检样品的特征指纹谱。

近年来 SERS 在电化学和生物医学研究领域受到极大的关注。人们利用 SERS 开展结构、生物物种的形成和临床诊断等研究,其中包括:①DNA 遗传探针、基因诊断;②生物体、细胞与细胞之间、细胞与病毒之间的相互作用;③生物膜的组成和跨膜物质运送过程;④药物在体内定量分布的药物代谢动力学研究;⑤免疫检测和抗肿瘤药物中靶复合物的研究等。在免疫反应过程中拉曼光谱表现出敏锐和高分辨率的光谱谱带,其光谱中包含了大量的分子及其化学性质等信息。

10.2.6 免疫印迹技术

免疫印迹 (immunoblotting) 又称蛋白质印迹 (Western blotting), 是一种借助特异性抗体鉴定抗原的有效方法。该法是在凝胶电泳和固相免疫测定技术基础上发展起来的一种新的免疫生化技术。将含有目标蛋白 (抗原) 的样品首先用 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 或非变性电泳 (Native - PAGE) 等分离后, 通过转移电泳原位转印至硝酸纤维素膜或其他膜的表面, 然后将膜表面的蛋白质再用抗原抗体反应进行特异性检测。例如, 将经 SDS - PAGE 分离的蛋白质带转移到膜上后, 膜用封闭液处理, 然后与第一抗体反应, 膜经漂洗后再与偶有辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸 (酯) 酶 (AP) 的第二抗体反应, 加入生色底物反应之后, 即可显示出目标蛋白的位置。由于免疫印迹具有 SDS - PAGE 的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性, 其优点是方法简便、标本可长期保存、结果便于比较, 故广泛应用于分子生物学等领域, 成为免疫学、微生物学及其他生命科学常用的一种研究方法。

10.2.7 蛋白质芯片技术

蛋白质芯片技术又称蛋白质微阵列 (protein microarray), 是指固定于支持介质上的大量蛋白质构成的微阵列。根据蛋白质分子间特异性结合的原理, 可实现快速、准确、高通量的检测。蛋白质芯片的基本原理是将各种蛋白质有序地固定于介质载体上成为检测的芯片, 标记特定荧光物质的抗体与芯片上相对应的抗原结合, 然后将未与芯片上的结合的抗体洗去, 利用荧光扫描或激光共聚焦扫描技术, 测定芯片上各点的荧光强度。抗体上的荧光将指示对应的蛋白质及其相互结合的程度。抗体芯片是指将抗体固定在芯片表面, 利用其特异性结合能力, 检测相应的抗原。抗原、抗体芯片在微生物感染检测中具有广泛的应用价值。

10.2.8 免疫技术与其他技术的联用

发展简便和高灵敏度的分析技术是目前在免疫分析研究领域的一个重要课题, 许多新技术不断出现, 免疫技术与其他技术的各种联用模式越来越多。

2004 年黄香宜等发表的高灵敏的化学发光微流控电泳芯片检测系统的研究, 利用

毛细管电泳和微流控芯片检测、毛细管电泳-化学发光联检方法成功地用于氨基酸、蛋白质、ATP、过渡金属离子和镧系元素离子等的检测,对金属离子的检测限达到 $10 \sim 12 \text{ mol/L}$ 。然而,目前文献报道的毛细管电泳芯片-化学发光检测的灵敏度低于常规毛细管电泳4~5个数量级。

2008年李林林发表的基于磁球技术的DNA单分子的体积放大以及电化学检测,该方法分为三步:首先利用生物素与链霉亲和素的特异性反应将生物素化的DNA捕捉探针固定在链霉亲和素修饰的聚乙烯板上,然后滴加目标DNA溶液,使其与捕捉探针杂交;第二步,取一定量链霉亲和素修饰的 $5.91 \mu\text{m}$ 的磁球与过量的生物素化的检测探针反应,利用磁分离除去过量的检测探针;最后,将第一、第二两步反应的产物按一定比例混合,进行第二次杂交反应,通过目标DNA与检测探针的杂交,使形成捕捉探针-目标-检测探针-磁球的结构,进而将磁球固定在聚乙烯板上。用倒置显微镜以 $\times 25$ 倍或 $\times 40$ 倍物镜用CCD照像或 $\times 250$ 或 $\times 400$ 倍用眼观察。如果在上面的第一步中,使固定在微孔板上的目标DNA足够稀,通过杂交反应最终一个磁球上只结合一个目标DNA分子,这样,通过对磁球的计数检测,就等于实现对单个DNA分子的计数检测。该方法的最大优点是不需用复杂而昂贵的仪器,只用普通的显微镜配合常用的CCD(也可用目视)就可进行单个目标DNA分子的检测。

2008年彭昭枫发表的基于酶和纳米颗粒标记的荧光淬灭与电化学免疫分析技术论文提出,酶和纳米颗粒标记的生物分子由于其自身的特点和优势,在荧光淬灭与电化学免疫分析方面具有广泛的应用前景,该法是基于典型的对人IgG“三文治夹心”的非竞争异相免疫分析,并利用了纳米金标记的抗体可以产生荧光淬灭的特性。首先将羊抗人IgG吸附在微孔板上,接着人IgG被羊抗人IgG捕捉结合,再被纳米金标记的抗体夹心形成免疫复合物。然后加入氢氧化钠和柠檬酸三钠的混合溶液解离免疫复合物,将获得的含有纳米金标记抗体的溶液进行荧光淬灭分析。荧光素在 517 nm 处激发的荧光强度与人IgG的浓度成反对数线性关系,其检测范围是 $10 \sim 5000 \text{ ng/mL}$,检测下限达到 4.7 ng/mL 。同时通过可见紫外和电化学分析分别验证了纳米金标记的抗体在解离后是否团聚以及免疫复合物是否完全解离。该法的应用可以扩展至检测其他目标分子如DNA链和其他抗原,而且在临床诊断上有着广阔的应用前景。

利用新型酶联荧光、电化学免疫及DNA传感技术的联用,酶联荧光免疫传感技术是藕合高灵敏度的荧光检测与酶联化学倍增放大作用的一种新型免疫传感分析技术,该技术为极大地提高免疫诊断技术的灵敏度提供了可能性。

(唐秋艳)

第 11 章 免疫诊断试剂常用仪器与设备

免疫分析或称免疫学检验是以抗原抗体相互结合的免疫学反应为基础，主要研究免疫学技术及其在医学领域中的应用。根据分析过程中是否需要标记物分为标记免疫分析和非标记免疫分析两大类。前者根据标记物的不同又分为酶免疫分析、放射免疫分析、发光免疫分析、免疫金（银）标记技术等，后者的主要代表是由最初的免疫沉淀试验发展形成的免疫浊度分析技术。免疫分析技术在对临床疾病的发病机制（特别是免疫反应紊乱机制）的研究、感染性疾病、肿瘤的诊断等方面发挥了重要的作用。为了适应医学检验中自动、快速、简便的要求，随着各种免疫技术的出现，相应的免疫仪器与设备也不断问世。本章介绍免疫诊断试剂常见的仪器与设备。

11.1 酶标仪

酶标仪是采用比色的方法来检测抗原或抗体的含量的仪器，其原理和基本结构与光电比色计几乎相同，因此酶标仪也可以看做是一种光电比色计。由于酶免疫分析中可以采用多种形式的固相吸附载体（如微孔板，试管，小珠，微粒等），因而酶标仪的结构不尽相同，其中微孔板固相酶标仪是最常用的一种。图 11-1 是一种单通道，自动进样的酶标仪的工作原理图。

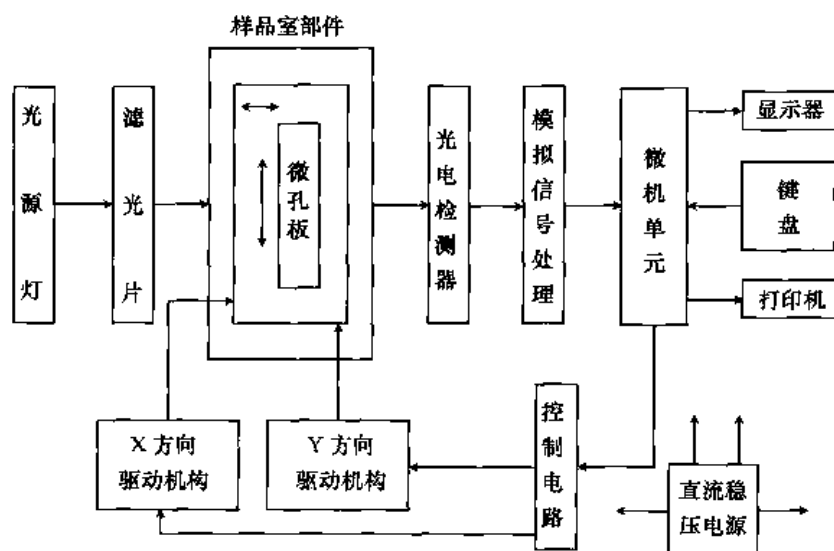


图 11-1 酶标仪的工作原理图

光源发出的光线经过滤光片或单色器后形成单色光，单色光通过微孔板中的待测标

本到达光电检测器，光信号转变成电信号，经放大处理后送入微处理器分析计算，显示并打印测试结果。微处理器通过控制电路控制电机运行，将待测标本送入指定的检测位置。酶标仪的光路系统如图 11-2 所示。

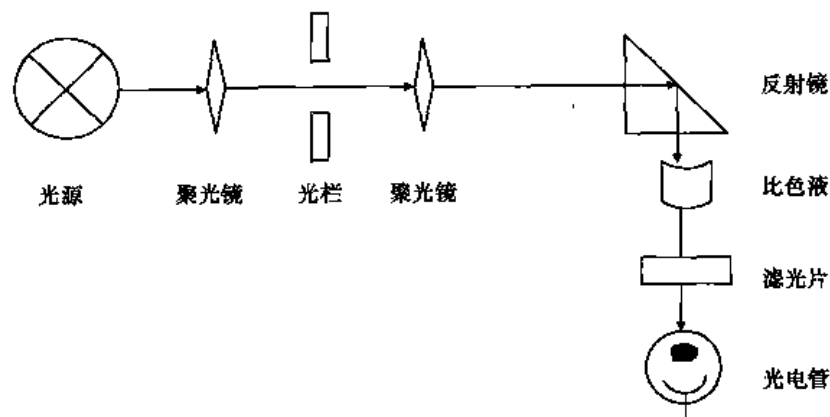


图 11-2 酶标仪的光路系统

光源灯发出的光线经过聚光透镜、光栏后，到达反射镜，经反射镜做 90° 反射后垂直通过比色溶液，再经滤光片到达光电管。滤光片置于微孔板前后的效果是一样的。酶标仪与一般比色计的不同之处在于它盛放比色液的容器是塑料微孔板而不是比色皿，因此酶标仪的光束是垂直通过比色液即微孔板的，另外酶标仪是以光密度 OD 来表示吸光度的。

酶标仪有单通道和多通道两种类型，自动多通道酶标仪有多个光束和多个检测器检测速度快。如 8 通道酶标仪有 8 条光束、8 个检测器和 8 个放大器，其结构相对较为复杂。酶标仪其他结构与光电比色计大体相同。

近年来，为了适应临床检验对质量控制和工作效率的要求，发展了多种形式的全自动、智能型酶免疫测试系统，它们的主要部件由加样系统、温育系统、洗版系统、读板系统、液路动力系统，软件控制系统组成，加样系统中放置样本、酶标记试剂、显色液及终止液等试剂，加样针依靠液路动力系统提供动力，通过注射器分配系统精确加样。温育系统由软件控制温育温度和时间，洗板系统由清洗针，板架，液体进出管路组成，由软件控制洗液量和洗板次数，读板系统由光源、滤光片、光导纤维、光电倍增管组成，检测出的光信号转换成电信号送入微处理器分析计算，得出最终结果。酶标板的移动依靠机械臂或轨道运输系统完成，由软件控制其运动，实现酶标板在各个系统之间的传送。

11.2 发光免疫分析仪

化学发光技术是近 20 年来发展非常迅速的非放射性免疫分析技术。化学发光免疫测定技术 (Chemiluminescent Immunoassay, CLIA) 是免疫测定技术继酶免技术 (EIA)、放免技术 (RIA)、荧光免疫技术 (FIA) 之后发展的一项新型测定技术。由于发光免

疫测定具备很高的特异性和很小的干扰,而且具有灵敏度高、检测速度快、操作简便、试剂无放射性等特点,因此,如同 RIA、FIA 等一样,利用免疫反应的特异性和化学发光本身的信号特异性形成了目前所说的化学发光免疫测定 (CLIA) 技术。

11.2.1 发光免疫分析的原理

发光免疫分析技术是将免疫反应和发光反应相结合的一种免疫分析方法。它的基本原理及操作与酶免疫和放射免疫方法基本类似,只是所用的标记物或检测信号不同。化学发光是发光分析系统中的一种,它利用化学反应中所释放的大量自由能从而产生激发态的中间体,该激发态的中间体回到稳定的基态时,同时发射出光子,利用发光信号的测量仪器检测所发出的光量子数。

根据标记物的不同,发光免疫分析技术可分为化学发光免疫分析,化学发光酶免疫分析、微粒子发光免疫分析、生物发光免疫分析、电化学免疫分析。根据发光反应检测方式的不同,发光免疫分析又可分为液相法、固相法和均相法。在发光免疫分析技术中所使用的标记物有 3 种,即发光反应中消耗掉的标记物,发光反应中起催化作用的标记物以及酶标记物,直接参与发光反应的标记物,在发光免疫分析过程中直接参与化学发光反应,它们的化学结构中有产生发光的特有基团,一般这类物质没有本底发光,但能够测定低水平的标记物,而制备标记物的偶联方法对发光的影响不大;不参与发光反应的标记物,作为一种反应的催化剂或者一种能量传递过程中的受体,不直接参与化学发光反应,标记物加入后起反应的发光物质越多,反应体系所产生的光越强;酶标记物通过其所催化生成的产物,再作用于发光物质,以产生化学发光或生物发光这种方法对分析物的检测基线有赖于反应产物的量。

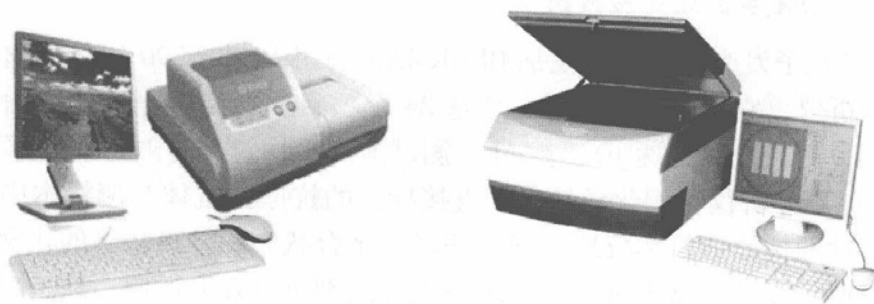


图 11-3 化学发光免疫分析仪

11.2.2 化学发光免疫分析仪的工作原理

化学发光免疫分析仪是通过检测患者血清从而对人体进行免疫分析的医学检验仪器。将定量的患者血清和辣根过氧化物 (HRP) 加入到固相包被有抗体的白色不透明微孔板中,血清中的待测分子与辣根过氧化物酶的结合物和固相载体上的抗体特异性结合,分离洗涤未反应的游离成分。然后,加入鲁米诺 Luminol 发光底液,利用化学反应释放的自由能激发中间体,从基态回到激发态,能量以光子的形式释放。此时,将微孔

板置入分析仪内,通过仪器内部的三维传动系统,依次由光子计数器读出各孔的光子数。样品中的待测分子浓度根据标准品建立的数学模型进行定量分析。最后,打印数据报告,以辅助临床诊断。

11.2.3 化学发光免疫分析仪的技术参数

测量系统:单光子计数器(PMT);
样品形式:96孔微孔板;
光谱范围:300~700nm;
检测时间:0.1~100s/孔;
检测速度:0.1s/孔时小于3min每96孔;
孔间干扰: $<1 \times 10^{-6}$;
本底噪声:0~100RLU/s;
检测范围:0~ 2.5×10^7 RLU/s;
灵敏度: 1×10^{-22} mol/L;
重复性:CV<3%;
功率:小于等于300W;
数据接口:RS232串行口或USB通信口;
工作环境:0℃~45℃,最大相对湿度85%;
工作电压:220V±10% 50Hz±1Hz。

11.2.4 常见化学发光免疫仪器介绍

11.2.4.1 全自动化学发光免疫分析仪

ACCESS微粒子发光免疫分析仪是BECKMAN公司19世纪90年代推出的全自动化学发光免疫分析仪,它具有批量测定、任选24个项目进行组合测定的能力和急诊随机加样的功能,检测灵敏度可达 10^{-15} g/mL,测试速度平均每小时100个测试。

ACCESS免疫分析仪:用化学发光剂直接标记的抗原或抗体与测标本中相应抗体或抗原、磁颗粒性的抗原或抗体反应,通过磁场把结合状态和游离状态的化学发光剂标记物分离开来,然后在结合状态部分中加入发光促进剂进行发光反应,通过对结合状态发光强度的检测进行定量或定性检测。它采用吖啶酯作为标记物,使用固相分离技术,以微粒子磁粉为固相包被物。

仪器由主机和微机两部分组成。主机包括样品部、试剂部(带24个冷藏试剂位)、液路系统、机械系统、电路系统和光路系统。样品部包括样品针、样品盘;试剂部包括试剂针、试剂盘;液路系统包括真空泵、管路、过滤器和电磁阀等。机械部分包括运输轨道,电机、传感器等;光路系统包括光源和光电倍增管;电路部分包括放大电路、模拟转换、控制电路。微机部分包括程序控制、数据处理、报警检测、指示判断等功能。

仪器在微机程序控制下,自动放置样品杯,通过试剂针和样品针加入相应的试剂和样品,根据检测项目要求进行温育和测定,光信号转换成电信号送入微机系统进行分析处理,显示并打印结果。测量过程中可随时加入急诊检查项目。测量过程中,仪器可根

据预先设定的各项目限定界限判断检测结果的正确性。报警检测可对测量过程的故障作出自我诊断和提示,使操作人员能迅速了解故障的原因,排除故障。

11.2.4.2 电化学发光免疫分析仪

电化学发光免疫分析的原理:电化学发光免疫分析是电化学发光和免疫测定相结合的技术,是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应,实际上包括了电化学和化学发光两个过程。罗氏公司的 ECL 是电启动发光反应,化学发光剂三氯联吡啶标记抗体,通过抗原抗体反应和磁颗粒分离技术,根据三氯联吡啶在电极上发出的光强度的大小对待测的抗原或抗体进行定量或定性检测。

ECL 发光免疫分析仪是全自动随机存取、软件控制的免疫分析系统,可对样本提供多个项目的定量、定性检测分析,每小时测定速度可达 86 项测试。它由分析单元和控制单元组成。

(1) 分析单元: ECL 系统有两种进样系统对小批量样品采用样品盘进样,可同时放置 30 个样品,对大批量样品采取样品架进样方式,可同时放置 100 个样品。分析单元包括样品/试剂区、消耗品区、测量区和电源开关。试剂盘保持恒温 20℃,最多容纳 18 个试剂包。消耗品区包括测试杯盘、废液容器、蒸馏水容器等;测量区包括孵育室、吸样探针、试剂探针和检测装置等,孵育室有 32 个位置,保持 37℃ 恒温,检测部分包括光电倍增管、温控器、流动测试池、磁铁驱动装置和放大电路,其温度保持在 28℃。流动检测池由一个激发电极和两个测定电极组成,有一个透光窗口可使发射的光子可以被光电倍增管接收,电极均由特殊的原材料(金或铂)制成。

(2) 控制单元:控制单元包括显示器、键盘、软驱和打印机。测量过程在软件的控制下进行,待测标本与包被与磁性颗粒的抗体和发光剂标记的抗体加在反应杯中共同温育,形成磁性微珠包被抗体抗原发光剂标记抗体复合物。该复合物在蠕动泵的作用下被吸入流动检测池,同时用缓冲液冲洗。当磁性微粒流经电极表面时,被安装在电极下的磁铁吸引,而游离的发光剂标记抗体被冲掉。同时在电极加电压,启动电化学发光反应,使发光试剂标记物在电极表面进行电子转移,产生电化学发光,同时用光电倍增管进行发光信号的测定,光的强度与待测抗原的浓度成正比。检测结束后,蠕动泵吸入清洗液进行洗涤,准备下一份样品的测定。

11.3 荧光分光光度计

荧光分光光度计是用于扫描液相荧光标记物所发出的荧光光谱的一种仪器。其能提供包括激发光谱、发射光谱以及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等许多物理参数,从各个角度反映了分子的成键和结构情况。通过对这些参数的测定,不但可以做一般的定量分析,而且还可以推断分子在各种环境下的构象变化,从而阐明分子结构与功能之间的关系。荧光分光光度计的激发波长扫描范围一般是 190 ~ 650nm,发射波长扫描范围是 200 ~ 800nm。可用于液体、固体样品(如凝胶条)的光谱扫描。

荧光光谱法具有灵敏度高、选择性强、用样量少、方法简便、工作曲线线性范围宽

等优点,可以广泛应用于生命科学、医学、药理学和药理学、有机和无机化学等领域。简单介绍:①采用滤光片式荧光技术;②荧光素检测水平可精确低于 1×10^6 ;③样品量最小可达到500 μL 、80 μL 、25 μL ;④可用于如NADH、NADPH、DNA、RNA、蛋白质、缩氨酸黄曲霉毒素、ATP、荧光标记底物、若丹明(一种红色荧光染料)、雌激素、蛋白酶活性、酶分析、细胞间动态分析、氨基酸、维生素、药物代谢物、类固醇的分析;或荧光极化测量等。

11.3.1 荧光分光光度计的工作原理

物质荧光的产生是由在通常状况下处于基态的物质分子吸收激发光后变为激发态,这些处于激发态的分子是不稳定的,在返回基态的过程中将一部分的能量又以光的形式放出,从而产生荧光。由高压汞灯或氙灯发出的紫外光和蓝紫光经滤光片照射到样品池中,激发样品中的荧光物质发出荧光,荧光经过滤过和反射后,被光电倍增管所接受,然后以图或数字的形式显示出来。

不同物质由于分子结构的不同,其激发态能级的分布具有各自不同的特征,这种特征反映在荧光上表现为各种物质都有其特征荧光激发和发射光谱,因此可以用荧光激发和发射光谱的不同来定性地进行物质的鉴定。

在溶液中,当荧光物质的浓度较低时,其荧光强度与该物质的浓度通常有良好的正比关系,即 $IF = KC$,利用这种关系可以进行荧光物质的定量分析,与紫外-可见分光光度法类似,荧光分析通常也采用标准曲线法进行。

11.3.2 荧光分光光度计的基本结构

(1) 光源:为高压汞蒸气灯或氙弧灯,后者能发射出强度较大的连续光谱,且在300~400nm范围内强度几乎相等,故较常用。

(2) 激发单色器:置于光源和样品室之间,为激发单色器或第一单色器,筛选出特定的激发光谱。

(3) 发射单色器:置于样品室和检测器之间,为发射单色器或第二单色器,常采用光栅为单色器。筛选出特定的发射光谱。

(4) 样品室:通常由石英池(液体样品用)或固体样品架(粉末或片状样品)组成。测量液体时,光源与检测器成直角安排;测量固体时,光源与检测器成锐角安排。

(5) 检测器:一般用光电管或光电倍增管作检测器。可将光信号放大并转为电信号。

11.3.3 荧光分光光度计的功能特点

(1) 荧光发射光谱:选择某一固定波长的光激发样品,记录样品中产生的荧光发射强度与发射波长间的函数关系,即得荧光发射光谱。

(2) 荧光激发光谱:选定某一荧光发射波长记录荧光发射强度作为激发光波长的函数,即得荧光激发光谱。

(3) 时间分辨技术:可用于对混合物中光谱重叠,但有寿命差异的组分进行分辨

并分别测量。

11.3.4 荧光分光光度计的应用

自从 1944 年出现荧光技术以来,它代表了荧光检测的最新技术。对经光源激发后产生荧光的物质或经化学处理后产生荧光的物质成分进行分析,可应用于生物化学、生物医学、环境化工等部门。

(1) 荧光分析的灵敏度可比其他方法高几个数量级。因此荧光分析的灵敏度可与放射同位素标记相媲美。此外,由于放射同位素在使用过程中产生的许多问题,荧光分析技术越来越多地受到重视。

(2) 荧光分光光度计可应用的领域很广泛如基础的神经化学、临床药理学、食品科学、环境监测等。

(3) NADH/NADPH 生化分析:许多酶的分析与 NADH 的形成有关。通过荧光检测,灵敏度可提高几个数量级,而且只需要很少的样品,它在小儿科研究方面很重要。此外,NADH 的产生可广泛应用的微量酶循环技术 (Lowry et al)。图 11-4 显示,采用荧光技术,在植物生理研究中可检测到 10^{-14} mol/L 蔗糖,在临床和环保分析中可检测到 1nmol 氨。

(4) DNA 分析:小牛胸腺 DNA 与溴化乙啶反应,最低可检测到 0.1ng。

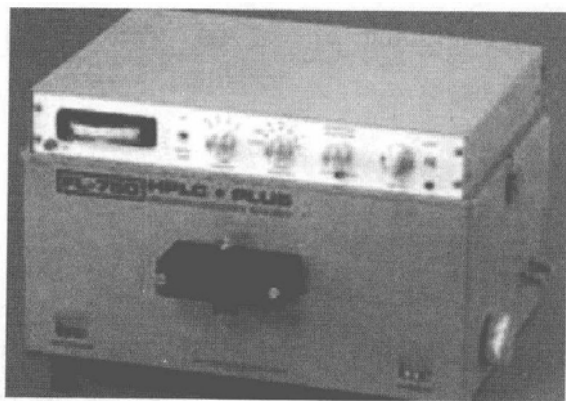


图 11-4 荧光光度计的外观图

11.4 点金标机

点金标机是胶体金等快速诊断试纸的专业制作仪器之一,作用是将标记物均匀地定量喷点到聚脂膜或玻璃纤维膜上,解决了传统浸泡工艺标记物溶液耗用量大,边缘效应和吸液不均匀等问题,显著降低批内及批间的差异,适合各类试纸的研发与生产(见图 11-5)。

11.4.1 点金标机的参数

载物平台尺寸: 500 mm × 100 mm

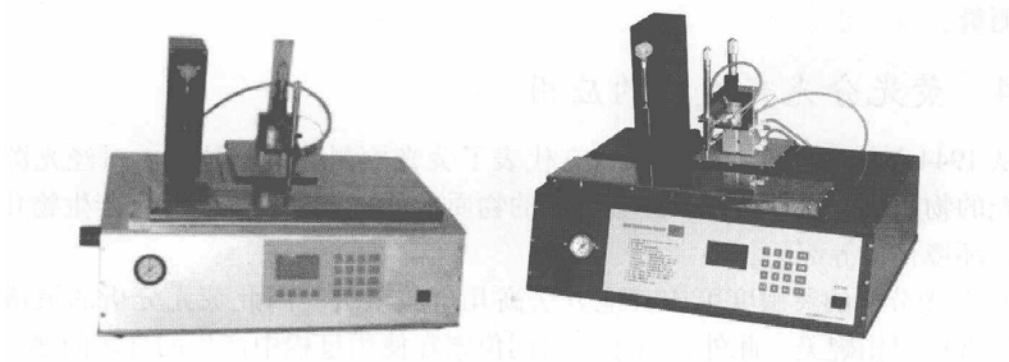


图 11-5 点金标机

程序控制 X , Y 两轴位移运动, 气泵控制 Z 轴;
位移精度: $\pm 0.1 \text{ mm}$;
气动喷头: 采用进口喷笔非接触定量喷点;
高精度步进泵 (控制喷量) 精度: 48000 步;
喷量范围: $0.6 \sim 9 \mu\text{L}/\text{cm}$, 喷量连续可调;
喷量误差: $\pm 1\%$;
喷线宽度: $0.5 \sim 10 \text{ mm}$ (介质有亲水性差异);
平台 (X 轴) 移动速度: $5 \sim 90 \text{ mm/s}$;
气源: $4 \sim 8 \text{ kgf}/\text{cm}^2$;
电源: $220\text{V} \pm 10\text{V}$;
重量: 20 kg ;
尺寸: 650 mm (长) $\times 420 \text{ mm}$ (宽) $\times 425 \text{ mm}$ (高)。

11.4.2 点金标机的主要特性

采用电脑芯片自动化控制, 操作简便, 通过参数设置可以进行自动连续操作, 可直接设定喷金起点的 X , Y , Z 轴坐标, 喷量, 喷线长度, 线条间距和 S 形重复次数等高精度步进电机与精密位移传感器联合控制 X , Y , Z 轴位移运动, 位移精度极高, 气缸控制 Z 轴升降, 可以调节喷笔与介质间的高度距离, 控制喷点溶液的塔形扩散使用 48000 步高精度步进泵控制喷量, 可精确控制喷点溶液与动力气体的混合, 减少了标记物溶液耗用量, 同时解决了边缘效应和吸液不均匀现象, 可以显著降低批差。

11.5 可编程切条机

可编程单刀切条机应用于生产过程中, 把片材材料快速切割成指定宽度试剂条, 是胶体金、乳胶等快速诊断试剂的专业生产设备之一, 也可作为实验设备 (图 11-6)。

11.5.1 可编程切条机的操作程序

(1) 开机, 检查设备的各项工作状况是否有异常, 参数设置是否合理, 设备的具

体操作可看详细的设备操作说明书。

- (2) 调节导轨, 放入待切片材。
- (3) 按送料键, 把片材前端停在上刀下面。
- (4) 按切割键可连续切割。
- (5) 操作员在切割过程中完成检验、接片等操作。



图 11-6 可编程切条机

11.5.2 可编程切条机的主要特性

- (1) 通过参数设置可以任意改变切割的速度和试纸条的宽度。
- (2) 在切条过程中可以完成计数、检验等过程。
- (3) 通过限位调节装置可以轻松导入不同宽度的片材材料。
- (4) 刀片零间隙结构能够在保证切割质量的同时有效延长刀片寿命和切割噪音。
- (5) 刀片能够很方便地拆卸、调整和安装。
- (6) 合理地设计有效解决边缘粗糙、试条粘刀和高废品率等问题。
- (7) 设备具有计数功能, 通过按钮操作可轻松实现减数、清零等功能。
- (8) 具有自动送料功能。
- (9) 具有连续切割和单切功能。
- (10) 操作简便、实用、稳定。

11.5.3 可编程切条机的技术参数

电源: 220VAC60Hz;
重量: 20kg;
尺寸: 430mm (长) × 330mm (宽) × 260mm (高);
切割精度: $\pm 0.1\text{mm}$;
切割尺寸: 1.0 ~ 99.0mm;
切割速度: 230r/min;
片材厚度: 2.5 ~ 100mm。

11.6 金标免疫定量分析仪

胶体金是一种常用的生物标记技术, 有其独特的优点。金标免疫层析法是目前生物医学检验中最常用的快速分析技术。但是, 传统的金标免疫层析法通过目试观察检测结果, 只能作定性分析, 受人为因素影响大, 且灵敏度低。金标免疫定量分析仪是一种定量或半定量的仪器。

11.6.1 金标免疫定量分析仪的工作原理

反射式光度计。胶体金对光的吸收 (反射) 具有选择性: 对绿光 (波长在 530nm

附近)的反射率随胶体金沉积量的增加而减少,由此可计算被测目标物的浓度。

11.6.2 金标免疫定量分析仪的应用领域

可应用的领域有海关检验检疫、环境监测、食品安全、临床诊断、药物筛选、重大疾病诊断等。在安检部门、进出口检验检疫部门、环保部门、卫生防疫站、疾病控制中心、医院、社区卫生站及生物医学研究单位等。

11.7 洗板机

洗板机的类型较多,以PW-960全自动酶标洗板机为例简单介绍。

11.7.1 洗板机的功能

PW-960全自动酶标洗板机有以下功能。

(1) 由微电脑控制,能快速高效完成各类酶联免疫吸附测定实验中对各种规格酶标板的清洗工作。

(2) 清洗头96针设计,可同时对96孔进行清洗,又能控制对各排选择清洗。

(3) 双酶标托盘设计可同时放置两块板,即可单板清洗,又能二板或多板同时循环清洗。

(4) 有堵孔排查程序,可方便地消除堵孔隐患,保证洗板的有效性。

(5) 双酶标托盘溢液自动汇集功能和漏液自动抽取功能。

(6) 洗液双重过滤功能和自动冲洗管道功能,使注液针结晶极难形成。

(7) 清洗液不足和废液满自动报警功能。

(8) 3种洗液可供选择并自动切换,开关机自动用蒸馏水对管路进行冲洗。

(9) 清洗头位置调节:4种,适用国内外各种酶标板。

(10) 具备浸泡功能,满足特殊的清洗要求。

(11) 具备微孔板底部冲洗功能。

(12) 具有微孔板振荡混匀功能。

(13) 酶标板上各条的孔数不足不必补孔。

11.7.2 洗板机的技术参数

(1) 专业洗头结构设计,96根针注液和96根针吸液,单条可控制。

(2) 具备两点吸液功能,每孔残留量小于 $1\mu\text{L}$,保证清洗干净。

(3) 二次液体分流技术,确保96孔间加液量 $\text{CV}\leq 2\%$ 。

(4) 清洗次数:0~99次可调。

(5) 清洗条数:整板或各条任意组合。

(6) 清洗方式:单板、双板或多板3种。

(7) 清洗液加入量:50~950 μL /孔间可调,间隔50 μL 。

(8) 洗板时间为:5s/板/次。

- (9) 洗板位：A、B 两个。
- (10) 浸泡或振板时间：0 ~ 999s 可调。
- (11) 吸液时间：1 ~ 9s 可调，间隔 1s。
- (12) 具有程序自动存储功能，可编制 100 个洗板程序。

11.7.3 洗板机的配置要求

- (1) 全中文菜单，3.5 英寸背光液晶大屏幕同屏显示所有参数。
- (2) 液瓶 4 个，蒸馏水、废液、洗液 A、洗液 B。洗液瓶 4L 或 300mL，废液瓶 4L。
- (3) 仪器采用真空泵工作原理，泵体安装在仪器主机内部，噪音小。

11.7.4 洗板机的其他要求

- (1) 具有包被功能，每小时可包被 1000 块酶标板。
- (2) 废液和清洗液配置报警线，可自动报警提示。

一机多能，具有洗板机和高速包被机两种功能：可单独作为洗板机或包被机使用，在超大标本量洗板用户可将两种功能结合起来注液功能可用来加注反应液、终止液等，仪器配有 250mL 洗液瓶，可供加注 5 块板的反应液用，5s 钟完成一板，即快又均匀。

(汤剑)

第 12 章 生物危害与安全防护

在体外诊断试剂生产、流通的各个环节中，因其自身以及检验材料的特殊性，所涉及到的生物安全问题应当引起重视。

作为体外诊断试剂，虽然不直接作用于人体，但某些试剂本身就含有对人体或环境有害的物质。所以一旦因人为疏忽或操作不当而造成泄露，必然会造成不良后果。在产品的研发、使用过程中，实验材料多含有致病微生物，如细菌、病毒、真菌等致病病原体，在材料处理、产物应用以及废弃物处理时，病原体感染实验室工作人员的情况也时有发生。病原体若在实验室中泄露，就有可能在实验室、实验室周围甚至外界公共环境中造成疾病的传播或流行。因此，工作人员在处理实验对象时，必须严格遵守操作规程，采取有效的防护措施，维护自身和环境的安全。

本章将分 4 个部分探讨生物安全的相关内容。

12.1 生物安全的含义

12.1.1 生物安全问题的由来

20 世纪以来，生物技术的飞速发展对人类社会产生了巨大影响。生物技术这个词最初是由一位匈牙利工程师 Karl Ereky 于 1917 年提出的。事实上，生物技术的发展和应用可以追溯到 1000 多年以前，而人类有意识地利用酵母进行大规模发酵生产是在 19 世纪。

1953 年，Watson 和 Crick 发现了 DNA 双螺旋结构，奠定了现代分子生物学的基础，从而给整个生物学乃至整个人类社会带来了一场革命。

1973 年，美国加利福尼亚大学旧金山分校的 Herbert Boyer 教授和斯坦福大学的 Stanley Cohen 教授共同完成了 DNA 体外重组实验。这是人类历史上第一次有目的的基因重组的尝试，是人类改造自然的又一次创举，标志着以基因工程技术为核心的现代生物技术的诞生。

1985 年，美国 PE - Cetus 公司人类遗传研究室的 Mullis 等发明了具有划时代意义的 PCR 技术。

近年来，生物技术的发展方兴未艾，生物技术逐步成为与微生物学、生物化学、化学工程等多学科密切相关的交叉性学科。其产品日趋商品化，并在医药和农业领域取得了重大成果，给人类社会和经济发展带来了巨大而深远的影响。

然而，任何科学技术都是一把“双刃剑”，它既可以造福于人类，也可能给人类带来灾难。在利用生物技术改变生物特性造福于人类的同时，也会对生物多样性、生态环

境以及人体健康造成一定的潜在威胁,尤其是当人们不能确保正确操作和运用这项技术时,这种影响可能是灾难性的。随着生物技术产业化发展,人们在看到了巨大商机的同时,也担心人类对自然的这种干预,会产生某些不能预知的危险。在1992年召开的联合国环境与发展大会上,由153个国家首脑共同签署的《生物多样性公约》第8条中有如下的叙述:“制定或采取办法酌情管制、管理或控制由生物技术改变的活生物体在使用和释放时可能产生的危险,即可能对环境产生不利影响,从而影响到生物多样性的保护和持久使用,也要考虑到人类健康和危险”。当前国际社会普遍关注的“生物安全”问题。

12.1.2 生物安全问题的概念

目前,生物安全问题的概念有狭义和广义之分。狭义的生物安全问题,是指现代生物技术研究、开发、应用以及转基因生物的跨国越境转移可能对生物多样性、生态环境和人类健康产生潜在的不利影响。特别是各类转基因活生物体释放到环境中,可能对生物多样性构成潜在威胁。

广义的生物安全问题,是国家安全问题的重要组成部分,是指与生物有关的各种因素对社会、经济、人类健康及生态环境所产生的危害或潜在风险。

这里,“与生物有关的各种因素”,一是天然的生物因子,主要包括动物、植物和微生物。其中由微生物特别是致病性微生物所导致的安全问题,如生物武器、生物恐怖、重大传染病的暴发流行等,是人类社会所面临的最重要、最现实的生物安全问题。二是转基因生物,主要包括转基因动物、转基因植物和转基因微生物。三是生物技术。人们在利用生物技术造福人类的同时,也可能带来意想不到的安全问题,特别是生物技术的滥用对人类健康、生态环境以及社会、经济都可能造成的严重危害。四是外来物种的迁入导致当地生态系统的不良改变或破坏。

所谓生物安全是指生物种群的生存发展处于不受人不当活动干扰、侵害、损害、威胁的正常状态,所谓正常状态即该生物种群的个体总量处于动态平衡的稳定状态。生物安全是一个系统的概念。即从实验室研究到产业化生产,从技术研发到经济活动和社会安全,从个人安全到国家安全,都涉及到生物安全性问题。生物安全又是一个动态的概念,它所涉及的具体内容有一定的时空范围,又随自然界的演进、社会和经济活动的变化及技术的发展而变化。

12.1.3 生物安全问题产生的原因和途径

人类生物安全问题存在已久,近几十年来世界范围内的医院内部感染、实验室感染和动物饲养管理过程中造成的工作人员感染都引起了广泛的关注,这是提出生物安全概念的直接原因。另外,近年来,人类在转基因动植物的研究领域取得了重大成果,利用基因工程技术生产的食品、药品、生物制品、化妆品等越来越多。由于担心这些产品的负面作用所致,有可能危及人类的安全,各国政府和生物学家都空前地关注生物安全问题。

12.1.3.1 医院感染

医院感染是指人们进入医院以后,因暴露在有传染因子的环境里而受到的感染。这种感染可发生在医院工作人员、住院患者和来院就医人员以及来院的其他人员中。感染率少则在1%以内,多则达30%以上,问题的严重程度不言而喻。在世界范围内,控制医院感染的组织机构很多,在较大、较先进的医院内部几乎都有类似的组织机构,由此可见问题的普遍性。医院感染所涉及的内容相当广泛,在此仅对与生物安全有关的、比较特殊的医院感染问题予以扼要介绍。

医院内部的各种场所都可能存在感染源。临床诊检和化验室人员所接触到的各种病人的血液、黏液、尿液、粪便和各种病理标本都可能含有各种致病因子,如肝炎病毒、AIDS病毒等已知的和其他未知的病原体,给医院工作人员带来很大威胁。医院的通风空调系统常常成为空气污染扩散的工具,空调器冷凝水中的致病因子(如侵肺军团菌和原虫等病原体)可借助空调机械通风造成空气传播感染。由于医院饮用水和沐浴用水中侵肺军团菌的污染,通过水流造成空气传播感染的报告也不少见。牙医在钻修牙齿的操作过程中产生的危险因素更多、更严重。因为牙科设备的机械动力可使患者口腔乃至血液内的AIDS病毒、肝炎病毒等病原体扩散为大量人体可吸入的气溶胶粒子,从而形成潜在的危害。外科手术是造成病人在医院受到感染的原因之一,这已经是比较熟悉和普遍存在的问题。

就生物安全的角度而言,研究的问题是手术中医护人员的安全、手术中他们会不会受到病人体内的病原体的威胁。除了手术中经接触传播感染不能完全排除以外,重要的是由于刀切锯割和其他医疗器械的使用都会使接受手术者的体液和血液气溶胶化,佩戴一般的常用医学口罩是难以完全避免吸入的。据有关研究报告,手术中有大量的人体血红素气溶胶产生。现代医院收治住院病人都是按照疾病性质分门别类入住病房的,但由于病人、探病者、医护人员之间直接或间接的往来接触,医院的交叉感染以及气溶胶感染都是难以避免的。据大量文献报道,在病房空气中、病人和医护人员受伤以及其他各种物体表面上常常可检出致病菌,它们对有关人员特别对免疫力低下的人,包括烧伤病人、骨髓移植病人、放化疗病人往往造成后果严重的感染。

医院感染的传播途径与一般情况下的感染传播途径大同小异,应该强调的是气溶胶感染者的病情一般都比较严重。

12.1.3.2 实验室感染

在医学生物研究实验(含动物实验)工作中,工作人员和有关人员收到实验涉及的病原微生物的感染称实验室感染。自从微生物学诞生以来,国内外实验室操作中病原微生物感染事件屡见不鲜。引起实验室感染的致病因子众多,而微生物实验室是引起室内或附近人员发生某种特殊感传染疾病的危险场所。近年来,采取了规范的生物安全操作的研究机构,实验室感染已能得到较好的控制。但由于许多实验室还没有建立完善的包括硬件和软件在内的生物安全系统,实验室感染还时有发生,因此实验室安全防护已经成为是否能开展致病微生物研究的先决条件。特别是针对开展传染性强、难以防治和

没有完全认识的新病原体的研究,包括某些基因工程微生物的研究工作,WHO和各国卫生部门根据生物种类、传染性、实验内容和操作方式,规定微生物研究必须在相应级别的生物安全实验室内进行。美国CDC、美国生物安全协会和美国工业卫生协会已经联合召开了多次国家级生物安全学术讨论会,并形成了许多技术和管理文件。

实验室感染的发生是多种因素综合作用的结果。除了人为因素、社会因素外,致病微生物特性即感染力、人体对致病因子的易感性、环境条件以及操作方法是构成实验室污染的四大主要因素。

致病微生物特性和人体对致病因子的易感性这两个因素在传染病学、流行病学和微生物学的书籍中均有详细的叙述。环境条件和操作方法紧密相关,可总称为操作条件。早期实验室感染原因可分为两大类:一类是受染人员知道其被感染的主要原因,这种直接原因主要有5种:

①使用吸管时用口吸液不慎将传染物吸入口内;②在接种时不小心将传染物注入体内;③被感染动物咬伤;④注射器喷溅;⑤离心机事故。另一类是不知其主要原因,称为“起因不明”事故。随着生物安全研究工作的发展,一些实验工作者观测了各种实验操作产生微生物的情况,结果表明,许多普遍的、常规的实验操作都会产生气溶胶,其粒子可在室内空气中存留相当长的时间,其中部分粒子可随着人呼吸的空气进入肺的深部造成感染。至此人们认识到“起因不明”的事故原因主要是在操作中产生了微生物气溶胶,从而造成空气传播感染。

12.1.3.3 实验动物饲养管理中造成的工作人员感染

在各项医学生物学研究工作中,在临床实验室、微生物实验室、毒理实验室等进行动物实验是不可缺少的内容。实验动物的质量及其管理水平不仅关系到研究成果的科学性、准确性和可靠性,而且关系到环境保护和人员安全的问题。实验动物的自身活动就能产生潜在的危害,比如动物抓伤或咬伤工作人员、工作人员不知不觉地吸入动物散发的气溶胶等,这些都有可能造成严重的后果。实验前,常规饲养的实验动物中可能带有非显性或隐性传染病污染环境,甚至造成人员吸入感染。据报道,由正常饲养的大白鼠(隐性感染)气溶胶传播感染的出血肾综合症病例,不少国家都有发生,病例达数百例之多,暴发性强。为此,各国实验动物部门与有关部门合作,制定了一些文件,如美国NIH出版的《实验室动物管理指南》、《实验动物饲养管理规则》和我国出版的《实验动物管理规范》等。

无论是传染性还是非传染性疾病的研究,其所使用的实验动物房舍应与其他实验室隔离。设计建造时要充分考虑便于管理和安全清洗,避免人流物流的交叉感染,洁净区、污染区要有可行的隔离措施。

为避免实验动物饲养管理中造成的工作人员感染,需要强调以下几点:①带进实验室的动物应进行检查处理,勿使其带有体外寄生虫和传染病;②已接种动物不得与健康动物混合饲养,要单独饲养在相应安全级别的隔离室内;③接触动物时,特别是猴、狗等大动物,要戴防护手套和穿防护靴。要针对各种动物行为特点,采取相应措施,防止被其抓咬;④实验室内的任何死亡动物必须经技术人员鉴定后才可处理,一般都应予以

焚烧。实验动物尸体焚烧前应装于密封塑料袋内，在指定的污染物专业焚烧炉内处理，以防扩大污染。

12.2 生物安全性评价

生物安全管理包括生物安全性的研究、评价、监测和控制措施等技术内容。其中，生物安全性评价是生物安全管理的核心和基础，其主要目的是从技术上分析生物技术及其产品的潜在危险，确定安全等级，制定防范措施，防止潜在的危害，也就是对生物技术研究、开发、商品化生产和应用的各个环节的安全性进行科学、公正的评价，以期有关生物安全管理提供决策依据，使其在保障人类健康和生态环境安全的同时，也有助于生物技术的健康、有序和可持续发展。

12.2.1 生物安全性的分级标准

目前还没有国际上统一的生物安全分级标准，各个国家一般都按照对人类健康和环境的潜在危险程度，将生物技术的安全性分为4个等级。我国对生物技术安全性的管理重点是基因工程，我国将基因工程范围分为如下4个等级。

等级Ⅰ：对人类健康和生态环境尚不存在危险；

等级Ⅱ：对人类健康和生态环境具有低度危险；

等级Ⅲ：对人类健康和生态环境具有中度危险；

等级Ⅳ：对人类健康和生态环境具有高度危险。

12.2.2 生物安全等级的划分程序

目前对生物技术的安全性评价一般采用个案评审的原则，也就是针对每项生物技术的具体情况确定其安全等级。一般程序可以分为如下7个步骤。

第一步：确定受体生物的安全等级；

第二步：确定基因操作对安全性的影响类型；

第三步：确定遗传工程体的安全等级；

第四步：确定遗传工程产品的安全等级；

第五步：确定接受环境对安全性的影响；

第六步：确定监控措施的有效性；

第七步：提出综合评价的结论和建议。

12.2.3 生物安全性评价的主要内容

12.2.3.1 受体生物的安全等级

一般根据受体生物的分类学地位、原产地、进化过程、自然生存环境、地理分布、在环境中的作用、演化成为有害生物的可能性、致病性、毒性、过敏性、生育和繁殖特性、适应性、生存能力、竞争能力、遗传交换能力和途径、对非目标生物的影响、监控能力等多个方面进行评估，在此基础上确定其生物安全等级。

12.2.3.2 基因操作对受体生物安全性的影响

主要根据目的基因、标记基因等转基因来源、结构、功能、表达产物和方式、稳定性等,载体的来源、结构、复制、转移特性等,供体生物的种类及其主要生物学特性,转基因方法等多个方面进行评价,确定整个操作过程的安全性。

12.2.3.3 遗传工程体的安全等级

根据对人类和其他生物体的致病性、毒性和过敏性,生育和繁殖特性,适应性和生存、竞争能力,遗传变异能力,转变为有害生物的可能性,对非目标生物和生态环境的影响等方面进行评价,确定遗传工程体的安全等级。

12.2.3.4 遗传工程产品的安全等级

遗传工程产品的安全等级一般是根据其遗传工程体的特性和安全性进行比较来确定。其分级标准与受体生物的分级标准相同。评价内容为:与遗传工程体比较,遗传工程产品的安全性有何改变。

12.2.3.5 基因工程工作安全性的综合评价

在综合考察遗传工程体及其产品的特性、用途、潜在接受环境的特性、监控措施的有效性等相关资料的基础上,确定遗传工程体及其产品的安全等级,形成对基因工程工作安全性的评价意见,提出安全性监控和管理的建议。

12.3 生物危害的防护措施

12.3.1 生物安全管理体系

生物安全管理体系应由生物安全管理组织体系和生物安全管理制度构成。

12.3.1.1 生物安全管理组织体系

生物安全管理组织体系由国家、地区、单位上级主管部门、单位和实验室5个层面构成。

12.3.1.2 生物安全管理制度

首先应当制定科学、严格的管理制度,并定期对有关生物安全规定的落实情况进行检查。建立生物安全管理制度应遵循的原则。

- (1) 应依法建章立制,紧密联系本单位实际;务求实用。
- (2) 生物安全管理制度应不断完善,涵盖生物安全的一切要素。
- (3) 由具有实际经验的技术和管理人员编制文件,文件要便于管理和使用。

12.3.2 生物安全管理的内容

(1) 组织成立一个由主要领导为首的生物安全领导小组,组织编写生物安全手册,对工作人员和参观者的生物安全负责;制定和修改生物安全管理计划,保证计划的贯彻实施并进行安全检查。应任命一位有经验并能胜任的人作为安全员,协助管理层工作。安全员负责提交生物安全培训计划,对本单位生物安全提出建议和指导,对生物危害性作评估,监督操作过程中的生物安全,及时发现隐患,提出解决方案。

(2) 保证工作区域整洁有序,非相关人员和物品不得进入实验室,外来人员进入实验室前应得到负责人允许。实验室内禁止吸烟、摄食、饮水或进行其他与实验无关的活动,实验设备维护或运出修理前应进行消毒。

(3) 事故处理和报告。实验室应制定报告危险隐患或事故发生的程序。所有的报告以文件形式保存,对事故原因、经过、处理及预防做详细说明。

(4) 培训工作人员必须是受过专业教育的技术人员,必须清楚地了解工作中存在潜在微生物的种类与危害级别,自愿从事实验室工作,接受安全教育,遵守生物安全规章制度和操作规程。为防止出现差错、事故,避免操作人员获得实验感染,实验室高级人员必须经常地、定期地对员工进行培训,保证每个人有识别和控制生物危害的能力,掌握接触病原微生物后预防感染的方法,新进人员工作前应熟悉操作规程,在专门人员指导下工作一段时间,通过岗位培训考核后方可独立工作。生物安全培训的内容包括:告知员工原辅材料及各种标本中具有可能的潜在感染物质,操作中存在的特别危害与潜在危害,让他们了解生物安全的具体内容,强调严格执行操作规程的重要性。必须对新进人员做有关病原微生物学理论和技术的培训,以便使他们掌握无菌操作技术和个人防护知识。

(5) 保证每一位操作人员有健康监测的机会,从而监测感染的疾病。具体做法如下:人员应职前进行体检;对接触2级危害性微生物的人员最好做临床检查及血清学检查;操作人员健康时,采集其血液按规定储存;提供有效的主动或被动免疫;对孕妇等易感者免于接触或从事高度生物危险性操作作出规定;若发生生物安全事故应立即报告;需要时应向每个人提供医学评价、疾病监测和治疗;有关记录应存档。

12.3.3 生物安全防护规定

12.3.3.1 实验室的生物安全防护规定

(1) 实验室的墙壁、天花板和地板应当光滑、平整、易清洁、不渗水以及耐化学药品和消毒剂的腐蚀。地板应是防滑的,并尽可能避免管线暴露在外。

(2) 工作台面应耐消毒剂、酸、碱、有机溶剂的腐蚀,耐中等以上的温度,防液体渗透,可消毒。

(3) 实验用的凳子、柜子及相关设备应牢固,摆放稳定,在实验台和其他设备之间及其下面要保证有足够宽敞的空间,以备清洗及方便打扫。

(4) 水池贴防酸碱的陶瓷砖,有紧急喷淋设备和洗眼装置,以保证紧急情况发生时可以立即处理。

(5) 实验室所用的安全设备器材应能防渗、抗腐、满足结构需要,避免锐角、毛口,不稳定或用玻璃类易碎材料制成,防止或限制操作者与感染性物质接触,方便操作,易于维护、清洗、消毒。

(6) 对具有潜在传染性材料的操作,应在生物安全柜中进行。

(7) 安装生物安全柜时,要考虑到房间的通风和排风,不会导致生物安全柜超出正常参数运行。生物安全柜应远离门、窗,远离行走区及其他可能引起风压混乱的设备,保证生物安全柜气流参数在有效范围内。

12.3.3.2 人员的生物安全防护规定

人员防护是指用于防止工作人员受到物理、化学和生物等有害因子伤害的器材和用品。在生物安全实验室中,这些器材和用品主要是保护实验人员免于暴露于生物危害物质(气溶胶、喷溅物以及意外接种等)危险的一种物理屏障。

(1) 将生物安全程序纳入标准操作规程或生物安全手册,所有实验室相关人员在上岗前都必须经过相应的培训,培训要有计划性和可持续性,并有完整的记录。要接受有关的潜在危险知识的培训,掌握预防暴露以及暴露后的处理程序,只有告知潜在风险并符合进入实验室条件特殊要求(如经过免疫接种)的人,才能进入实验室。在开展涉及有关病原微生物的工作时,实验室应禁止或限制人员进入。

(2) 在实验室工作时,工作人员须穿工作服,戴工作帽,必要时穿隔离衣、胶鞋,戴口罩、手套。在实验室内应穿舒适、防滑、防渗、不露脚趾的鞋。

(3) 操作人员不能佩戴首饰,为了防止眼睛或面部受到泼溅物、碰撞物或人工紫外线辐射的伤害,必要时需戴安全眼镜、面罩(面具)或其他防护设备。

(4) 所有操作均应按操作规程仔细小心进行,使气溶胶和微小液滴的产生减至最低限度。操作样本、血清或培养物的全过程应穿戴适当的且符合风险级别的个人防护装备。操作实验动物应穿戴耐抓咬、防水个人防护服和手套;应戴适当的面部、眼部防护装置,必要时,增加呼吸防护;应在生物安全柜内操作。生物安全柜内最好不用明火,而采用电子灼烧灭菌装置。

(5) 工作人员接触血液、体液、动物、污染表面或设备等具有潜在感染性的材料或其他有害物质进行操作时,宜戴大小合适,柔软舒适的手套。可能发生感染材料溢出、溅出的操作,应戴2副手套。穿戴前检查有无破损、污染。操作完毕或离开实验室,接触干净区域前应先消毒再摘手套,随后必须洗手,防止污染其他表面或环境。不要用戴着手套的手触摸暴露的皮肤、口唇、眼睛、耳朵和头发等;离开实验室前均应洗手。

(6) 穿过的工作服应定期洗换,被污染的工作服应立即更换,经消毒灭菌后再洗涤。一次性使用的工作服也应先消毒再丢弃,工作服不应与生活服装放在同一衣柜中。离开实验室时应脱去工作服并留在实验室内,限制在实验室以外的场所(休息室、图书馆、办公室、厕所等)穿工作服。

(7) 样品运输无论在室内或室外,均应按照有关传染性物品安全运输的规定,将样品放在可靠、安全、防漏的容器中运输,运送时严防对人员、环境的污染。

(8) 样本的处理应遵循正确的规范, 应规定标本有损坏或泄漏的处理程序。发生液体溅出、溢出等事故以及明显或可能暴露于感染性物质时, 应立即向实验室负责人报告, 及时处理并对事故的发生与处理作如实记录。

(9) 所有样品、培养物和废物应被假定含有传染性生物因子, 应以安全方式处理和处置。所有有潜在传染性或毒性的质量控制和参考物质在存放、处理和使用时应按未知风险的样本对待。

(10) 如有条件, 工作人员应接受必要的免疫接种(如乙肝等)。

12.3.3.3 实验室重复性设备的消毒、洗刷规范

凡直接或间接接触生物活性材料(抗原、抗体、阴阳对照和标本)等器材均应视为有传染性, 均应做消毒处理。金属器材、玻璃器皿可用压力蒸气或干热灭菌。①压力蒸气灭菌: 使用下排气压力蒸气灭菌器, 121℃ 15min; 使用预真空压力蒸气灭菌器和脉动真空压力蒸气灭菌器, 134℃ 4min。②干热灭菌: 使用干热灭菌器, 150℃ 2.5h, 或 160℃ 2h, 或 170℃ 1h, 或 180℃ 30min。也可以通过验证选择合适的消毒灭菌方法进行处理。

(1) 对可再次使用的玻璃制品、耐热的塑料器材或搪瓷容器, 按要求打包、表面有效消毒后, 121℃ 15~30min 高压灭菌处理, 吸管应直放, 空试管和空瓶口应朝下, 且不能完全密闭; 也可用 1g/L 有效氯漂白粉澄清液或二氯异氰尿酸钠浸泡 2~6h, 消毒液每日更换, 消毒后用洗涤剂及流水刷洗, 最后蒸馏水清洗并沥干备用。

(2) 不耐热拟回收再用的塑料器材可用 0.5% 过氧乙酸喷洒或在有效氯为 2000mg/L 的含氯消毒剂中消毒 1h 以上, 然后洗涤沥干; 或用环氧乙烷消毒柜, 在温度为 54℃, 相对湿度为 80%, 环氧乙烷气体浓度为 800mg/L 的条件下, 作用 4~6h。

(3) 使用过的玻璃吸管、试管、离心管、玻片、玻璃棒、三角瓶和平皿等应立即浸入 0.5% 过氧乙酸或有效氯为 2000mg/L 的含氯消毒剂中 1h 以上, 消毒后用超声波清洗的方法洗净沥干, 使用前再进行高压灭菌处理。

(4) 移液管使用后, 应完全浸入次氯酸盐或其他适当的消毒液中浸泡至少 18h, 然后再丢弃或灭菌清洗后重复使用。

(5) 贵重仪器, 如显微镜、分光光度计、离心机、酶标仪、PCR 扩增仪、气相色谱仪、冰箱、培养箱等不能用消毒剂浸泡或加热的仪器, 局部轻度污染时, 可用 75% 医用乙醇重复擦拭 2 次。

12.3.4 废弃物安全处理规定

(1) 实验室具有潜在传染性的废物, 应严格遵守国家有关法律法规和标准进行处理。在设计和执行关于生物危害性废弃物处理、运输和废弃的规划之前, 必须参考最新的相关文件的规定。

(2) 废弃物处理的首要原则是所有具有潜在感染性的材料, 必须在实验室内清除污染、高压灭菌或焚烧。

(3) 高压蒸气灭菌是清除污染时的首选方法。需要清除污染并丢弃的物品应装在

容器中(如根据内容物是否需要高压灭菌或焚烧而采用不同颜色标记的装袋),也可采用其他经过验证的方法。

(4) 液体废弃标本可用121℃ 30min 高压灭菌处理。实验室中一次性使用的污染材料可高压灭菌后焚烧或直接焚烧,按医疗废物处理。

(5) 可反复利用的已被污染的材料应选择先消毒再高压灭菌或直接高压灭菌。灭菌后的材料经洗涤、干燥、包扎、再灭菌后使用。推荐使用次氯酸盐和高级消毒剂进行消毒。一般新配制的次氯酸盐溶液有效氯含量应为1g/L,但用于消毒溢出的血液,有效氯含量应为5g/L。戊二醛可用于表面消毒。

(6) 培养基、组织、体液及其他具有潜在危险性的废弃物须放在防漏的容器储存、运输及经压力蒸气灭菌处理后按医疗废物处理。

(7) 高压灭菌过的废物可以在其他地方焚烧后处理,或在指定垃圾场掩埋处理。

12.3.5 危险品和剧毒药品的管理规定

(1) 危险品和剧毒药品的购置、使用应有严格的审批和监控,在管理制度中规定明确的程序。管理制度应涵盖危险品和剧毒药品的储存、运输、使用和意外事故处理等各个环节。

(2) 危险品和剧毒药品应设专门的保藏、储存区域,并有明显的标志,由专人保管。

(3) 建立危险品和剧毒药品管理台账,按性质或名称分类保存和使用,并做好记录。

(4) 工作人员对于拟操作的危险品或剧毒药品危害应充分了解,从事危险化学品操作之前应视情况进行培训后方可进行操作。

(5) 工作人员在使用化学品的过程中,应按照相关要求或SOP规范操作并合理使用个人防护用品或装备,工作结束后立即洗手。

12.4 国内外生物安全法规

12.4.1 国际生物安全法规的概况

12.4.1.1 国际性准则或协议

一些区域组织和国际组织对生物技术安全规范的形成完善发挥了不可缺少的作用。国际食品标准委员会制定的《食品标准》,联合国环境规划署制定的《国际生物技术安全技术准则》,世界贸易组织制定的《关于贸易技术壁垒的规定》、《关于卫生和植物卫生措施的协议》(SPS 协议)、《关于环境卫生和植物卫生标准的协定》,经济合作与发展组织《生物技术安全考虑》(1992年),《生物多样性公约》(1992年)等国际条约或国际法律政策文件,已包含有生物安全方面的内容。

在国际上,较早与生物安全有关的法律政策性文件是《植物遗传资源国际承诺》(1983年11月23日联合国粮农组织签订于罗马),它是一项不具有法律约束力的协议,

已有 110 多个国家加入。它与植物遗传资源委员会一道共同构成联合国粮农组织保护和利用植物遗传资源全球系统,已有 140 多个国家参加此系统。该系统承诺的宗旨是保障在当前或将来具有重要经济价值的植物遗传资源的探查、收集、保存、评价、利用和可得性。1991 年 11 月,植物遗传资源委员会在其制定的《联合国粮农组织关于植物生物技术行为国际准则的草案》中,有关于对转基因生物体处理和释放的安全准则和要求。1993 年 4 月植物遗传资源委员会作出的关于修订《植物遗传资源国际承诺》的决议,要求各国进行谈判,以便使该承诺与《生物多样性公约》相协调。

12.4.1.2 《实验室生物安全手册》

世界卫生组织于 1983 年制定了《实验室生物安全手册》(以下简称《手册》),《手册》鼓励各国针对本国实验室如何安全处理致病微生物来制定具体的操作规程,并为制定这类规程提供专家指导。同时针对以重组 DNA 技术为代表的新生物技术的出现,为此类实验室危险评估提供较为完善而又简明的指导。

《手册》分别于 1993 年、2003 年和 2004 年进行了修订,手册中对微生物的危险等级、实验室物理防护等级、标准实验室操作、感染性物质的处理、个人防护、生物安全柜的使用等作出了明确规定;介绍了危险度评价和重组 DNA 技术及其安全利用;强调了工作人员个人责任心的重要作用。2004 年的第三版中还增加介绍了生物安全保障的概念,即保护微生物资源免受盗窃、遗失或转移,以免因微生物资源的不适当使用而危及公共卫生。

12.4.1.3 《21 世纪议程》

《21 世纪议程》(1992 年 6 月)已经将环境保护与“一个更安全、更繁荣的未来”、“一个安全的多边贸易制度”和“人类对安全稳定的自然环境的需求”等环境安全问题联系起来。《21 世纪议程》第 16 章“生物技术的环境无害化管理”专门就生物技术的环境无害化管理提出了意见。该章指出:生物技术研究应用不仅有巨大的、正面的社会、经济和文化影响,而且有巨大的、反面的社会经济、生态环境和文化影响;为了确保生物技术的环境无害化管理,应该谨慎地发展和应用生物技术;应该通过生物技术的风险评估、风险管理、进行国际合作等途径来确保生物技术的安全开发、应用、交流和转让。

12.4.1.4 《生物多样性公约》

《生物多样性公约》(1992 年)是有关生物安全的一个最重要的全球性公约。该公约规定的内容大都与生物安全管理有关。例如,为了防止外来物种入侵,该公约第 8 条规定:必须预防和控制外来入侵物种对生物多样性的影响。该公约还规定:“每一缔约国应直接或要求其管辖下提供以上第 3 款所指生物体的任何自然人和法人,将该缔约国在处理这种生物体方面规定的使用和安全条例的任何现有资料以及有关该生物体可能产生的不利影响的任何现有资料,提供给将要引进这些生物体的缔约国”(第 19 条第 4 款):“缔约国应考虑是否需要一项议定书,规定适当程序,特别包括事先知情协议,

适用于可能对生物多样性的保护和持久使用产生不利影响的由生物技术改变的任何活生物体的安全转让、处理和使用，并考虑该议定书的形式”（第19条第3款）。该款提出了签订有关由生物技术改变的活生物体的安全转让、处理和使用的议定书的建议。根据上述规定，生物技术安全问题是该公约后续谈判的主要议题之一。1995年11月在印度尼西亚雅加达召开的《生物多样性公约》第二届缔约方大会通过第11/5号决定，决定成立一个特别工作组负责起草《生物安全议定书》，着手进行签订该议定书的谈判；第五届生物多样性公约缔约国大会于2000年5月26日在内罗毕结束，64个国家及欧盟分别于5月15日和6月5日在联合国内罗毕办事处和纽约总部正式签署了《卡塔赫纳生物安全议定书》；我国于2000年8月签署该议定书，是第70个签署国。

12.4.1.5 《关于生物技术生物安全的国际技术准则》

联合国环境规划署《关于生物技术生物安全的国际技术准则》于1995年12月11~14日在埃及开罗举行的政府指定专家全球协商会议上通过，是一个不具有法律约束力的国际性政策文件。该准则是在生物安全管理方面内容比较全面的一个国际文件，集中了现有的全球性、区域性和国家级生物安全管理法律文件中的共同的规定和原则。其目的是为了形成关于评价生物技术安全，查明有关管理生物技术的可预见的风险，以及对生物技术安全进行监测、研究和情报交流的机制。其作用是在关于生物安全的议定书签订之前为各国提供一个有关生物安全管理的临时性机制，在议定书签订之后作为它的补充。该准则重视对所应用的生物技术的风险的认定、评价和管理，特别是对那些具有非自然形成的结构的生物的管理；强调分析生物体的特性（特别是新引入的特性），生物的使用方式，以及受纳环境的特性；重视建立生物技术国际情报交流机制，建立有关生物技术可能带来的跨界环境影响的国际通报制度（包括通报程序和事先知情同意程序）。

12.4.2 其他国家和地区关于生物安全法规的概况

12.4.2.1 美国

1973年，美国加利福尼亚大学旧金山分校的Herber Boyer教授和斯坦福大学的Stanley Cohen教授进行了人类历史上第一次有目的重组尝试，首创了重组DNA（脱氧核糖核酸）技术，开辟了分子生物学向工程化、实用化发展的新领域。就在DNA技术诞生后不久的1975年，美国一些生物学家在加利福尼亚的会议上指出DNA技术可能对环境对人类产生巨大的风险或危险。1976年6月23日，美国国立卫生研究院（NIH）制定了世界上第一个实验室基因工程规则《重组DNA分子实验准则》。由于当时对这一新技术的利弊影响存在着较大的分歧，对可能由此项技术导致的风险估计过于严重，因而对该技术有很多很严的限制；之后曾对该准则多次进行修改，原有的限制性条款的85%被放宽或简化了。但是，目前美国基因工程农产品的商品化仍然必须经过农业部、食品和药物管理局以及环保局的层层严格审批。之后德国、法国、英国等30多个国家相继制定了同类准则，其中大多数国家以美国的《重组DNA分子实验准则》为蓝本。

目前美国与生物安全有关的法规主要有：《联邦仪器药品和化妆品法》（1938年制定，以后多次修改）、《有毒物质控制法》、《联邦植物杀虫法》、《植物检疫法》、《联邦种子法》、《濒危物种法》、《联邦杀虫、杀真菌、杀啮齿动物法》等。在动植物基因资源保护方面，美国于1970年颁布了《植物品种保护法》（1989年和1994年做了两次修订）。联合国环境与发展会议之后，美国已从单纯关注两大社会阵营之间的战略对抗、军事对峙的传统外交目标和政策向环境外交方面作出重要的战略调整，已经将环境问题与美国的国家安全利益更加紧密地联系在一起，已经将环境目标纳入其长远的外交日程和国际战略目标之中。

1993年，由CDC/NIH有关专家编写了《微生物和生物医学实验室生物安全手册》的第三版，其雏形只是本关于从事致病微生物某些实验室工作的小册子，即《基于危害程度的病原微生物分类》。而第三版中把病原体微生物和实验室活动分为4级的概念即来源于此。另外，第三版中着重描述了微生物实验室标准操作、实验室设计和安全设备的不同组合，形成1~4级的实验室生物安全防护等级，并依据微生物对人的危险程度分为4级危险组，在实验室实际操作中加以应用。1999年ABSA、CDC和NIH的生物安全专辑，根据近年发生的一些新情况，如雏形的传染病、生物恐怖活动、实验室3级和4级的设计、感染性微生物的国际运输等问题，在第三版的基础上进行了必要的修改和补充，出版了第四版的《微生物和生物医学实验室生物安全手册》。这一版本也被国际公认为最具权威性的标准。

12.4.2.2 澳大利亚

澳大利亚于1987年成立了基因调控咨询委员会（GMAC）、国家生物安全委员会（NBCs）和生物安全学术委员会，基因调控咨询委员会已经颁布《小规模和大规模转基因有机物（GMOs）工作准则》和《转基因有机物释放准则》。

12.4.2.3 亚洲

在亚洲，目前印度的生物技术部、环境部、农业部和林业部分别设立了负责生物技术安全的机构，各邦和县也有生物技术安全的管理机构。印度生物技术安全委员会在1983年颁布了一套生物技术安全准则，1989年出台了《危险微生物、遗传工程生物或细胞的生产、应用、进出口和储藏细则》，于1990年实施《重组DNA安全准则（有人译为法规）》。日本科学技术部早在1979年颁布了《重组DNA实验准则》（1991年修改），农业部、林业部和渔业部于1992年4月颁布了《重组DNA生物体在农业、林业、渔业、食品工业和其他相关工业部门的应用准则》，国际贸易和工业部制定了《重组DNA技术的工业应用准则》。2000年3月6日，日本科技厅提出了“关于有关人体克隆技术等规定的法律案”，禁止把用人体细胞移植到未受精卵后制造的克隆胚胎移植到人或动物的子宫内；禁止人和动物细胞融合而成的混合胚胎的移植。

12.4.2.4 非洲

在非洲，大部分国家的生物技术水平比较落后、没有制定或实施有关生物安全方面

的法规,但尼日利亚、肯尼亚、津巴布韦、乌干达、南非等国已经制定或正在制定生物安全规章。南非于1977年成立了“南非遗传实验委员会”(SAGENE),负责审批与重组DNA技术研究有关的研究申请。该委员会于1996年起草了《转基因生物法案》。

12.4.2.5 拉丁美洲

在拉丁美洲,自1991年“美洲国家间农业合作研究院”发起召开有关会议后,接着于1992年在阿根廷、1994年在哥伦比亚和哥斯达黎加相继举行了有关会议。阿根廷农业部已制定《转基因植物实验准则》,巴西和墨西哥已颁布生物安全法规,巴拉圭和乌拉圭正在制定生物安全规章。

12.4.2.6 俄罗斯

俄罗斯已于1996年制定了《联邦遗传工程活动国家调整法》。

12.4.2.7 欧盟及其成员国

(1) 欧盟有关生物安全的法规

欧盟除了全球性生物安全条约外,还签署了不少区域性国际生物安全条约或法律性文件。例如,1979年9月19日签署的《欧洲野生生物与自然界保护公约》要求缔约国承担严格控制引进非原生物种的义务。《关于地中海特别保护区的巴塞罗那公约附加议定书》(1995年6月10日)规定,禁止引进可能对公约使用范围内的生态系统、环境和当地物种造成有害影响的物种。

欧共体早在1984年2月就建立了一个生物技术委员会,负责协调共同体内生物技术政策;在1986年曾召开各国有关官员讨论有关生物安全问题。

欧盟有关生物安全的法规较多,其中欧共体《关于转基因微生物的封闭利用的指令》(1990年4月2日,第90/219/EEC号指令)、《关于对环境谨慎引入转基因产品的指令》(1990年4月23日,第90/220/EEC号指令,又译为《关于谨慎释放转基因产品的指令》)和《关于从事转基因生物工作人员安全保护的指令》是生物安全领域的三个重要法规,对成员国应用有关转基因生物体做了统一规定,其目的是保护人体健康和环境安全。

《关于转基因微生物的封闭利用的指令》规定了有关转基因微生物封闭利用的管理措施,主要包括:对转基因微生物进行分类;事先评估转基因微生物封闭利用对人和环境的影响;遵守有关惯例和安全卫生规则;向政府主管当局报告首次利用转基因微生物的设施的情况;保存有关记录资料并向有关人员事先通报转基因封闭利用情况;就有关活动制定应急计划,采取应急措施,进行现场检查。

《关于对环境谨慎引入转基因产品的指令》规定了为研究和开发目的将转基因生物引入环境,以及为商业目的将转基因生物投向市场的管理措施;规定成员国成立有法定资格的权威管理机构,并承担审查和实施的责任。前者主要包括:事前向有关成员国的有关当局通报有关情况,如转基因生物的情报、受纳环境的状况、被引入的转基因生物与受纳环境的关系、监测、控制、废物处理和应急计划;在引入前必须向主管当局通知

该引入活动对人体和环境的影响,并应得到有关主管当局的书面批准;公众咨询,欧共体委员会与成员国之间的情报交流。后者主要包括:就投入活动对人体和环境的影响进行风险分析;有关产品必须遵守欧共体的产品立法;有关产品包装和标志的建议;如涉及新产品,生产者和引入者都必须单独通知主管当局;向主管当局通知拟投入的转基因生物的资料及其他有关资料;在投入市场前必须向主管当局通知该投入活动对人体和环境的影响,并应得到有关主管当局的书面批准。为了保障转基因生物产品上市的安全,该指令规定了一套有关审批投放申请的国际决定程序。成员国主管当局在收到有关转基因生物产品投入的申请或通知后,应将该通知连同主管当局的意见呈报给欧共体委员会;欧共体委员会在收到有关材料后必须立即抄送给所有成员国的主管当局;如果没有成员国反对,则该投入成员国的主管当局应以书面文件批准该投入并报告其他成员国和欧共体;如果某成员国对投入表示反对,且不能达成一致意见,则由欧共体委员会按规定程序对该产品投入作出决定。该程序最终可要求欧共体理事会以“有限多数表决”就该投入作出决定。如理事会同意该产品投入,则该国主管当局可发出书面批准,且不必再通知就可以在市场流通。如某成员国有可证明的理由认为经批准的产品构成对人体健康和环境的危险或威胁,则可暂时限制该产品在该国领土上的使用和销售。该指令规定,基因工程的每一次微生物排放都必须取得许可,但商业性排放(指向市场投放由基因工程微生物组成或含有此微生物的产品)和实验性排放的程序不同;从1992年起,欧共体在其成员国实施关于基因工程微生物产品实验性应用和商业性应用的指令。

欧盟理事会于1998年6月16日辩论了《关于修改谨慎释放转基因产品的90/220/EEC指令的指令》草案,议会于1998年10月对指令草案提出了意见。该指令确立了风险评价的共同原则,引入了试验性排放的分类制度。

欧洲委员会设立的欧洲生物多样性工作组曾多次发出警告说:欧洲的濒危动植物正以高出自然状况4倍的速度走向灭绝。为了保护易受损害的地区及动植物,加强对从北极圈到地中海盆地的保护区、进行网络化管理,欧盟相继制定了一系列有关保护野生动植物及其生活环境的法规。在1997年《关于共同体生物多样性战略》中,提出将生物多样性纳入到有关的共同体的跨领域政策之中去,以实施《生物多样性公约》的战略。

2001年2月14日,欧洲议会通过一项关于转基因生物生产和销售的新规则,对如何标明、检测转基因的食物、饲料、种子、医药制品等方面做了更为严格的规定。根据新规则,在植物基因中加入抗菌素的做法会在未来8年中被分阶段淘汰。

(2) 欧盟成员国有关生物安全的法规

欧盟有关生物安全的法规是在一些成员国主动采取生物安全措施和实施安全法规后进行的。法国、德国、英国、丹麦、瑞典、挪威等欧盟国家均已制定各自的生物安全法规,成立了诸如“转基因咨询委员会”(英国)等机构。

奥地利于1994年制定了《基因技术法》,到2000年已有200多个条例涉及到生物技术领域。

在生物基因资源的安全性管理方面,英国于1978年制定了《重组DNA分子实验准则》1989年颁布了《遗传操作规则》、1992年颁布了《转基因生物体条例》、1997年修订发布了《遗传改良生物有意释放和危险评价规则》。在1992年的《环境保护法》

第6编中规定了对转基因生物体向环境释放和向市场投放的管理措施。英国根据克隆手段的不同,对克隆人的违法行为者分别处以2~10年以下的徒刑。

丹麦于1991年6月发布了《环境与基因工程法》,全面规定了基因工程环境安全管理的目的与适用范围、转基因生物的批准和监督以及有关行政处罚、申诉等内容。如果查明转基因生物对环境、自然和人体构成危害,有关管理部门可临时限制或禁止已获批准转基因生物的使用或销售。根据这一法律,丹麦环境与能源部还先后制定了转基因生物的研究试验、环境释放与上市销售、运输与进口等的审批许可和收费等规定。同年11月发布了《运输和进口转基因生物法令》。

挪威于1993年发布了《转基因生物的生产和使用法(简称基因技术法)》和《与生物技术应用有关的药品法》。制定《基因技术法》的目的是确保转基因生物的生产和使用,在伦理和社会等方面是公正的,是符合可持续发展原则的,并不对环境和人体健康构成危害。该法的内容包括一般规定、封闭使用、谨慎释放、实施等,所有转基因生物的环境释放都需要实行风险评价和审批制度、上市销售要实行标识制度。根据该法,挪威于1998年颁布了《转基因生物运输和进口条例》,对转基因生物的进口、运输、标识、包装、事故与执行等作出了详尽的规定。如该条例明确规定,在运输中,在每一转基因生物的包装物上应以挪威语或英语标明含有转基因生物的物种名称、提供者与接受者的地址与电话,要求记录转基因生物的每一个环节,包括运输的时间、路线、交接和交付方式等。《挪威食品法》也规定了转基因仪器必须实行标识和审批制度,禁止含有抗生素基因的食品。2001年,为进一步完善综合性生物安全法律法规体系,挪威专门成立了独立的生物多样性法规委员会,其秘书处设在环境部。

在动植物基因资源保护方面,德国于1985年颁布了《品种保护法》、《联邦物种保护条例》等;在生物基因资源的安全性管理方面,德国先后制定了《重组DNA分子实验准则》(1977年)、《基因技术法》、《基因技术安全条例》、《胚胎保护法》等。德国新的生物技术法于1990年7月1日生效。该法的目的是预防生物技术的使用和其产品对人和环境构成的危险;对生物技术的发展和使用规定研究框架;对生物技术的科学技术可能性提出主张。该法规定,只有获得生物技术许可证的设施才能利用和生产GMOs。如果设施符合法律规定的各种条件,则许可证必须授予。此外,许可证设施内的所有生物技术操作还必须获得特别许可。许可程序与妨害控制的法规类似,包括公开听证会。生物技术设施和生物技术操作必须服从政府机关的严格监督,所有有关安全的事件必须向有关机关报告。生物技术操作可分为四类:没有危险、低度危险、一般危险、高度危险。法律对每种生物技术操作规定了不同的安全措施,实施生物技术的联邦法令将对此作出详细规定。生物技术运营者要对GMOs造成的损害负责,损害赔偿金的最高数额为1.6亿马克。

在1992年以前,法国对基因工程微生物的排放没有作出限制性规定,但这些行业必须听取基因工程委员会的建议。基因工程委员会依据微生物及其生产工序的危险性对其作出分类,生物分子工程委员会就利用生物技术工序生产的物质的使用和基因工程微生物的排放提出建议。在生物基因资源的安全性管理方面,法国于1992年颁布了《控制遗传物质被改变了的机体的使用和扩散法》。法国对违反克隆人禁止法令者判20年

以下徒刑。

瑞典制定了《基因技术法》(1994年)和《基因技术活动条例》等生物安全法规。还制定了有关转基因生物封闭使用和环境释放的实施条例。

由于生物安全特别是转基因生物安全涉及到许多新的科学技术领域,为了谨慎起见,目前欧盟国家对其管理一般实行综合性的、多部门的管理体制和严格审批制度。例如,在丹麦,转基因生物的封闭使用、环境释放和上市销售均由环境与能源部主管(该部所属的森林与自然保护局具体负责转基因生物的管理工作),相关申请由其批准,食品、农业和渔业部及卫生部等部门参与动物和人体等方面的风险评估。对转基因生物研究、环境释放和上市销售的申请,森林与自然保护局需征求50多个管理与科研机构和非政府组织的意见,并通报欧盟成员国,在综合各方面的反馈意见后,向环境与能源部提出审批意见,再由丹麦议会的空间规划和环境委员会作出最终审批决定。在挪威,环境部负责本国履行《生物安全议定书》和欧盟生物安全指令等事务的统一监督和协调,该部设有专门的办事机构,除依据《基因工程法》实施统一管理外,还具体负责转基因活生物的管理,同时负责协调有关生物安全的16个部门,如渔业部、卫生和社会事务部、农业部、外交部、贸易和工业部、食品管理局、农业检验检疫局、生物技术专家咨询委员会等。在瑞典,形成了环保部门统一管理和各部门分工负责的管理体制,如环境部所属国家化学品检验局负责转基因微生物的管理,国家渔业委员会负责转基因水生生物的管理,国家森林委员会负责转基因森林树木的管理,国家农业委员会负责转基因动植物的管理,国家食品管理局负责转基因食品的管理,医药产品管理局负责转基因医药产品的管理。瑞典环境部所属的国家环境保护局和一个由议员、科学家和法律专家等组成的独立的基因技术咨询委员会,在生物安全管理中承担综合协调、监督和咨询的职能,各部门的决定必须通过瑞典基因技术咨询委员会的咨询,向环保局事先征求意见或事后备案,接受环保局的监督。

12.4.3 中国生物安全法的概况

我国政府非常重视生物技术安全与管理工作。在生物技术安全及监督机制方面,主要是通过以下法规进行严格管理的。

国务院以及国家相关各部委相继颁布了《基因工程安全管理办法》、《农业生物基因工程安全管理实施办法》、《人类遗传资源管理暂行办法》、《农业转基因生物安全管理条例》、《农业转基因生物安全评价管理办法》、《农业转基因生物进口安全管理办法》、《农业转基因生物标识管理办法》、《农业生物基因工程安全管理实施办法》、《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》等。

2002年10月国务院颁布了《生物两用品及相关设备和技术出口管制条例》,在所附管制清单中共列出了79种病原体、17种毒素、7大类双用途设备及相关技术,2006年又重新进行了修订,对生物两用品及相关设备和技术贸易性出口、对外交流和交换等实行严格管理,防止有关活动用于敌对目的。

2003年12月3日我国政府发表了《中国的防扩散政策和措施》白皮书,这是中国

政府介绍中国防扩散政策和措施的权威性文件。它首次介绍了中国政府防扩散出口管制体系的特点、落实防扩散出口管制法规的具体措施以及严格执行防扩散出口管制法规的情况。中国的出口控制体制普遍采取了出口经营登记制度、许可证管理制度、最终用户和最终用途证明、清单控制方法、以防扩散为根本出发点的审批原则、全面控制原则，并规定了处罚措施等国际通行做法。

在全球环境基金和联合国环境规划署的支持下，中国已完成《生物安全国家框架》的编制。

科学资料表明，人体基因大约有10万个，其中约1万个是致病基因。人体基因研究将彻底揭开人类生、老、病、死之谜，导致基因治疗和基因制药等产业的兴起。美国最近授予专利的两个人类基因的发现已经带来巨大的经济效益，一个是关于肥胖的基因，其专利实施许可费为3000万美元；另一个是关于哮喘的基因，其专利实施许可费高达9000万美元。中国有56个民族，有许多完整的家系，对人类基因组的研究极为有利。由于人类基因的发现和应用具有极大的经济价值，一些国家正在就中国人的地方病、易感染病进行研究，并窃取相应的基因资源，如血液、器官、毛发乃至尸体。争夺人类基因已经在国际上成为“一场没有硝烟的战争”。为了有效地保护和利用我国的人类基因遗传资源，促进平等互利的国际使用和交流，国务院办公厅于1998年6月10日转发了科学技术部和卫生部制定的《人类遗传资源管理暂行办法》，明确规定了获取遗传资源的申报、审批程序，采集、出口等环节的监控、审核办法，建立了申报登记、出境审批、证明书等制度，成立了中国人类遗传资源管理办公室。

（李瑾、桑平阳）

第 13 章 诊断试剂的质量评价

1949 年美国首先开始研究临床实验室室内质量控制（简称室内质控 internal quality control）问题。1950 年美国学者 Levey 和 Jennings 发表了第一篇关于使用质控图的实验室室内质控，临床检验实验室的室内质控工作正式开始。20 世纪 70 年代，实验室质量控制进入一个新的阶段，即全面质量管理（Good Laboratory Practice, GLP）阶段。进入 20 世纪 80 年代末期，GLP 的统一标准产生了，发展到“认证实验室”管理阶段。

13.1 室间质量评价的意义

随着生物技术的发展，体外诊断试剂的品种越来越多，覆盖面越来越广，其适用范围不仅涉及到疾病诊断、血液筛选，而且还涉及到健康普查以及遗传疾病的预测及调查等。体外诊断试剂的技术含量也越来越高，如免疫技术、核酸扩增技术、生物芯片技术等。正是因为体外诊断试剂的多样性和复杂性，产品质量参差不齐，所以为加强对体外诊断试剂产品的质量管理，保证检测结果判断的准确性，1979 年中华医学会检验学会成立，并派出第一个代表团访美，之后在国内部分医院小规模开始了室内质量控制的室间质评活动，并参加了世界卫生组织的临床化学室间质评活动。

1982 年我国卫生部依据中华医学会检验学会提议，在北京建立了国家临床检验中心（National Center for Clinical Laboratories NCCLs）。在世界卫生组织（WHO）的帮助下，卫生部临床检验中心首先开展了临床化学实验室室间质评工作，微生物检验、体液、血液检验和免疫学检验的室间质评工作相继开展。

随着标准化和法制化的进一步深入发展，室间质评工作已逐渐进入强制性评价阶段，即将室间质评推进到实验室能力比对试验（proficiency testing, PT）阶段。依据 ISO 标准和英美国家质评中心的经验，不断建立和完善我国临床检验质量保证是未来实验室质量的工作目标。

13.1.1 室间质量评价（external quality assessment, EQA）

室间质量评价是将实验室的性能与其同等组织或参考实验室进行比较而对其进行评价的过程，其目的是相互校正各实验室测定结果的准确性，并发现实验室本身不易发现的不准确性，了解各实验室之间结果的差异，帮助其校正，使其结果具有可比性、这种评价是一种回顾性评价，旨在建立实验室间结果的可比性室间质评不仅可用于定量测定，也可应用于定性检验，如微生物的鉴定，血型及细胞鉴定等。室间质评是指导实验室提高质量的有力工具。

室间质评活动在我国通常由卫生部及各省、市临床检验中心负责实施。作为卫生行

政部门的一种检查手段, 室间质评活动定期进行。

实验室质评偶尔会有不及格的室间质评结果, 不及格的室间质评结果可以揭示出标本处理不当, 或其他指征无法揭示的分析过程。应充分利用纠正问题的机会研究每一个不及格的结果, 不论何时都应尽可能利用从不及格结果中获得的信息来预防以后出现类似的问题。

13.1.2 实验室间比对检验 (interlaboratory test comparisons)

实验室间比对检验是指由两个或几个不同实验室按照预定的条件, 对相同或类似的项目或材料的检验进行组织、执行与评价; 实验室间比对检验的目的有如下几个方面。

- (1) 检查实验室整体检验能力。
- (2) 检查实验室工作人员个人检验能力。
- (3) 确定检验方法的效果。
- (4) 确定样品某一特定的准确度的能力。

通过以上内容, 可以清楚地了解检验医学中的室间质评就是生产企业实验室间比对试验, 两个名词概念是一致的、互通的。

13.1.3 实验室检验能力对比检验 (proficiency testing, PT)

能力对比检验也称为验证试验。利用实验室检验来检查实验室检验能力的方法。PT 试验是评价实验室的一种评审办法。通过 PT 试验, 可以得出实验室是否具有出具可靠检验结果的能力。

但是, PT 结果仅作为该实验室在特定时间内, PT 检验所涉及检验的特定条件下, 特定方面的技术能力的信息。我国国家技术监督局于 1995 年颁发了 GB/T 15483 “实验室能力比对检验的开发与运作” (1995 年版)。该标准是等同采用 ISO/IEC 导则 43 的标准。这是我国首次颁发的利用 PT 试验评审实验室的一个正式法律性文件。

13.1.4 室间质量评价的目的和作用

室间质评作为质量控制的工具, 可以帮助实验室提高质量、改进工作并减少差错; 建立各实验室间检验结果的可比性, 最终使参与的实验室能作出准确的检验结果。

全面质量管理的宗旨在于预防差错的产生, 质量控制和质量评价的目的是找出差错。质控图是统计学的一种方法, 室内质控是全面质量管理中的重要环节。

卫生部临床检验中心免疫质控室从 1988 年开始在全国范围内开展以乙型肝炎标志物的质量评价活动, 一直采取这一套质量评价方法, 并在实践中不断完善和提高, 为我国实验室室间质评提供了一个工作平台。

13.2 诊断试剂质量评价的基本概念

13.2.1 诊断试剂的质量控制

质量控制是为了排除差错, 维持标准化的一个管理过程, 也就是对全过程的监控,

包括：①规定控制对象；②规范控制对象的标准；③确定控制的方法和手段；④实际测定数据；⑤比较实际测定数据与预期值的差异，若超出预定误差范围，找出产生误差的原因；⑥采取行动，解决差异，恢复原标准状态。

质量控制主要采用质控图进行，质控图是把某一检验的性能数据与所计算出的预期的“控制限”进行比较的图，而“控制限”是通过统计计算出来的。这些性能数据是在按规定正常进行时，按时间顺序标出来的，其目的是使检验过程中的变异原因可以进行“追溯”。“追溯”性的误差原因，是指除去随机误差以外的其他原因。

13.2.2 实验误差

实验误差分为系统误差、随机误差和过失误差。

(1) 系统误差是指一系列测定结果与真值或靶值存在有同一倾向的误差，有明显的规律性，可在一定条件下重复出现，是可以通过质控工作预防和校正的。

(2) 随机误差又称为偶然误差，是一种偶然的、未能预料的误差，是难以避免和校正的误差。

(3) 过失误差是人为造成的。这种误差是可以通过加强人员培训和实验室管理避免的。

13.2.3 正态分布及标准差

体外诊断试剂试验中，检验同一样本 20 次以上时，就会发现其检测结果分布在均值两侧，大部分在均值附近。如果以测定值为横坐标，以出现的频率为纵坐标，就可以绘制一张正态的分布图，正态的分布图的顶端为均值，其他值以均值为中心左右对称分布。正态曲线以下的面积概率，常用标本的均数 ($\bar{x}$) 和标准差 (s) 来表示，其计算方法如下：

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \cdots + x_n}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

均值、标准差和概率的关系如下：

$\bar{x} \pm 1s$	概率为 68%
$\bar{x} \pm 1.96s$	概率为 95%
$\bar{x} \pm 2s$	概率为 95.4%
$\bar{x} \pm 2.58s$	概率为 99.0%
$\bar{x} \pm 3s$	概率为 99.7%

当检测同一标本达一定次数后，所得到的一组数据，其中靠近均值 $\bar{x} \pm 1s$ 范围内的数据，占该组数据的 68%；在 $\bar{x} \pm 2s$ 范围内分布的占该组数据的 95%，在 $\bar{x} \pm 3s$ 范围内的数据，占该组数据的 99.7%。要求检验结果在 $\bar{x} \pm 2s$ 范围内为合格时，将有 95% 的

数据可能合格。

13.2.4 真值

用确切的、最理想的决定性方法测得的值，称为真值。真值一般是测不到的。通过可靠的决定性方法测得的值，称为靶值，通常用靶值表示真值的大小。对于定量试验，指的是排除异常值（排除 $\bar{x} \pm 3s$ ）后，所有参加结果的平均数或美国国家临床实验室标准化委员会（NCCLS）的临床检验国家参考系统（NRSCL）可接受的决定性方法或参考方法建立的平均数。“靶值”一词可被归为更通用的“赋值”类，定义为：给定的目的值具有适当的不确定度。

13.2.5 准确度（accuracy）

主要是评价产品的系统误差，该指标反映样品的检测值和真值的一致性，通常以偏差来表示。偏差的计算公式：偏差 = （检测值 - 真值）× 100 / 真值。

13.2.6 精确性（precision）

主要是评价检测样品的随机误差，一般是通过重复检测某一特定样品并分析其数值的一致性来评价该项指标。通常以变异系数的百分比或相对标准误差来表示。精确性又分为批内和批间的精确性，在产品的检测范围内，不同浓度的样品对试剂的反应的动力学是不同的，其检测的误差也不同，为了在试剂的检测范围内更好地评价其精确性，用于分析精确性的样品应含有高、中、低三类。对定量试剂产品，高、低二类样品应分别代表定量范围的上限和下限。而且每个样品至少检测4次，增加检测次数可以提高可信性，其数值更能反映试剂产品的精确性。在实际工作中一般对该类样品检测10次或10次以上。通过对批间精确性的分析可以减少试剂产品批间的差异，该项指标对定量试剂产品尤为重要，如果批内精确性符合要求，而批间的精确性不符合要求，说明该批产品在生产制造过程中存在问题，造成不同批次对同一样品的定值差异较大，因此，对定量产品批间变异系数的要求较为严格。对定性产品目前尚未进行控制批间变异系数，但通过对批间变异系数的分析，可以了解生产工艺的稳定性，对提高或改进产品质量具有重要意义。

13.2.7 灵敏度（sensitivity）

灵敏度是指试剂的检测限度，通过检测一定数量的阴性样品或正常样品，样品的数量要根据样品的离散情况来决定，计算样品的均值及标准差，均值加上2个标准差即为最低检出限（临界值），即在最低检出限以上的样品有95%的可能为阳性。而且还应通过检测一系列临床样品包括正常人群、非正常人群和特殊人群对临界值进行核对，以便正确区分阳性和阴性样品。对一些特殊的产品还要求制定产品的不确定区，即灰区，不同的用途可以有不同的灰区。第一次检测在灰区的样品要加倍重新试验，重新试验仍在灰区者方为阳性。评价灵敏度还要从多方面考虑，因为诊断试剂主要用于临床患者的诊断，一些特殊患者如肾功能衰竭等，其血浆蛋白和各种无机离子明显增多，会影响产品

试剂的反应,在这种情况下,产品的灵敏度就会受影响,因此可以对特殊的人群制定不同的灵敏度。而且由于被测物的基因型不同或基因发生变异,或一种产品试剂同时检测几种不同的被测物,其检测的灵敏度也会发生改变。

13.2.8 特异性 (specificity)

造成产品试剂非特异性反应的主要原因有:

(1) 由于在产品制造过程中原料纯度不够、原料本身存在非特异性反应或反应模式不理想等因素,造成对非特异性样品产生阳性反应。根据文献报道,在免疫反应中,如样品的孵育时间缩短,其非特异性反应可提高 3~4 倍,当孵育时间非常短时,其非特异性反应有时达 10 倍。

(2) 样品本身含有干扰物质影响产品的特异性,这些干扰物质可以来自病人本身,如:病人患有系统性红斑狼疮、风湿性关节炎等自身免疫性疾病产生特殊物质,病人使用特殊药物,以及溶血性、黄疸性和脂溶性血样等;干扰物质也可以来自样品的处理过程,如:使用不同的抗凝剂、不同的试管或经过某些化学及去污剂处理以及反复冻融等。

(3) 交叉反应,由于被测物含有与其他类物质相似的抗原性或核酸序列造成非特异性反应,在制备过程中主要通过选择特异性强的抗原或核酸序列来减少这类反应。由于同类被测物的核酸序列相对较高,核酸诊断试剂中较容易造成一些交叉反应。

13.2.9 标准品

13.2.9.1 国际标准品

由 WHO 或相应组织标定的,用肯定的、公认的、准确度物理或化学方法测定的定值材料。

13.2.9.2 国家生物学活性标准品

根据生物学反应由 WHO 或相应组织标定的国家生物学活性的材料。

13.2.9.3 参考标准血清

国家标准化组织根据国际标准化生产的法定材料。可用于鉴定仪器和检定方法标准性。

13.3 室内质量控制

室内质量控制系指各实验室为了监测和评价本实验室工作质量,以决定常规检验报告能否发出所采取的一系列检查、控制手段,旨在检测和控制本室常规工作的精密度,并监测其准确度的改变,找出问题,及时解决;同时提高本室常规工作中批间和日间标本检测的一致性。

13.3.1 内控标准品

质控血清是已有靶值的血清,在每次的常规检验中加入1份或几份质控血清,通过所得出的检测结果来了解本次检验的情况。质控血清检验的结果如能控制在其误差范围内,就说明该检验没有发生不允许的误差。如果出现超出允许范围误差的异常结果,提示该检验不成功,应寻找原因,纠正后,重新检验。因此质控血清在质量控制工作中起重要作用。

13.3.1.1 质控血清的使用

卫生部临检中心制备的HBsAg标志物血清,可以在-20℃保存半年定值不变。使用时将冰冻状态标志物血清取出融化,恢复至室温,混匀后使用,未用完的部分可以保存在4℃冰箱中,保存时间不超过5d。

开展某项检验的室内质量控制工作需要的质控血清,一般按半年的用量准备。自制的不定值质控血清,在一批质控血清将使用完之前,需要准备下一批质控血清。质控血清要求性能稳定,在较长时间内效价不变,其理化性质应与病人标本相近,这样才能有效地起到监测作用。

13.3.1.2 临界值质控血清

质控血清分为定值和未定值两种。如只用一份质控血清定值,一般定在正常与异常交界上,定性测定时处于弱阳性水平,称为临界值。临界值质控血清可以作为试剂产品中的阳性对照品和阴性对照品以外的第三个对照品,它可以敏感地反映试剂产品的检出水平,确保弱阳性反应的标本不漏检。

13.3.1.3 质控血清的制备

每个实验室可以根据自己的条件,选用临检中心提供的质控血清,或按以下方法自己制备本室使用的质控血清(以HBsAg质控血清为例)。

(1) 收集新鲜的无溶血、无黄疸、无细菌污染的HBsAg阳性血清。

(2) 置56℃条件下灭活10h。

(3) 离心或过滤除去沉淀。

(4) 用10%的小牛血清或正常人血清(PBS缓冲液)将收集的血清稀释至所需的浓度。如能用正常人的血清稀释更好,因其成分更接近于检测标本。

(5) 抽滤除菌:按一次使用的量分装至无菌具塞的瓶中,封口后,贴上标签,标签内容应包括:名称、浓度、配制时间、有效期及配制人员等。 -20℃保存备用。不可反复冻融。被检物要求检出的水平常被认为是质控血清应选择水平。如果该试验还有其他要求,则应增加所要求浓度的质控物。

(6) 标定含量:对自制的质控血清要进行20~30次测定结果删除大于 $\pm 2s$ 数据的均值作为靶值,与已知定值血清对比测定。

13.3.2 常规室内质量控制

临床检验的检测结果，每次或每天之间不可能没有误差。决定允许的误差范围，以临床上不造成误诊与漏检为标准，通过以下步骤来确定质控范围：①最佳条件下的测定误差；②已知值的血清在常规检验条件下的误差；③未知值的血清在常规检验条件下的误差；④临床应用的要求。在满足临床要求的前提下，对任何一个试验都应确定一个允许的误差范围，如允许误差定得过小，在临床上不存在任何意义；如果将允许误差定得过大，使监测系统察觉不到临床上要求检出的误差，又失去质控的意义。

13.3.2.1 最佳条件下已知值质控血清变异 (optimal conditions variance, OCV) 的测定

在实验室最佳条件下（包括操作者、试剂、仪器等）检测质控血清 20~30 次，将测得的结果进行计算，求出该组数据的平均值 ($\bar{x}$) 和标准差 (s) 表示该实验室的最佳工作质量。

例如 HBsAg ELISA 法检测时 OCV 的测定，使用的质控血清为临界值血清，含 HBsAg 浓度为 0.5 ng/mL。在该实验室中选择素质好、操作熟练的技术员进行认真地专门测定，选用最佳的试剂盒产品。在检测之前，将恒温箱、加样器等认真校正、调试，使用新的加样吸头等，即在最佳的条件下进行检测。除质控血清外同时测定阴性对照品和阳性对照品。并作双份测定，得出 2 个吸光值 (A 值)，求出均值 $\bar{x}$ 。连续作 20 次，求出 20 个 $\bar{x}$ ，即 $\bar{x}_1, \dots, \bar{x}_{20}$ 。从这 20 个数据中，求出 OCV 的 $\bar{x}$ 和 s 。

13.3.2.2 常规条件下的变异 (routine conditions variance, RCV)

表明本室在目前条件下，常规工作中该项目检测的精密度水平。它不仅可以用于比较不同方法、仪器、操作者等在常规工作中的精密度，而且是室内质量控制中靶值和允许误差范围确定的依据。所以，除了每次测定 RCV 后，应对同批号血清进行 RCV 测定外，在常规室内质量控制工作中，每更换一次质控血清的批号，均应对新批号的血清测定 RCV。

13.3.2.3 常规条件下已知值质控血清变异 (routine conditions variance-known value, RCVK) 的测定

做常规检验的技术人员，在常规检验条件下，将质控血清放在常规检测样本中，进行 20 次检验，结果计算同 OCV 法。

常规条件下，由于工作量大，操作者技术不熟练，或者更换人员，RCVK 肯定要比 OCV 大。通过控制试验的各项条件，使 RCVK 的数据尽可能接近 OCV 值。RCVK 的数据反映该实验室日常工作的质量，用于作质控图，对室内检验的结果进行控制，判定每日检验结果是否正常，报告能否发出。

13.3.2.4 常规条件下未知值质控血清变异 (routine conditions variance-unknown value, RCVU) 的测定

有时为了避免主观性, 而作 RCVU 测定。测定步骤同 RCVK, 但检测的操作者不知质控血清的定值, 以排除操作者的主观性。

13.3.2.5 质控图

室内质量控制还可以采用质控图法来进行更进一步的质量控制。国外使用较广泛的是常规条件下未知值血清测定的变异和病人标本结果均值的计算分析等方法。

(1) 质控图的制作以 20 次质控物的检测结果, 计算平均值 ($\bar{x}$) 和标准差 (S), 定出控制限、警告限、失控限, 做质控框架图 (图 13-1)。

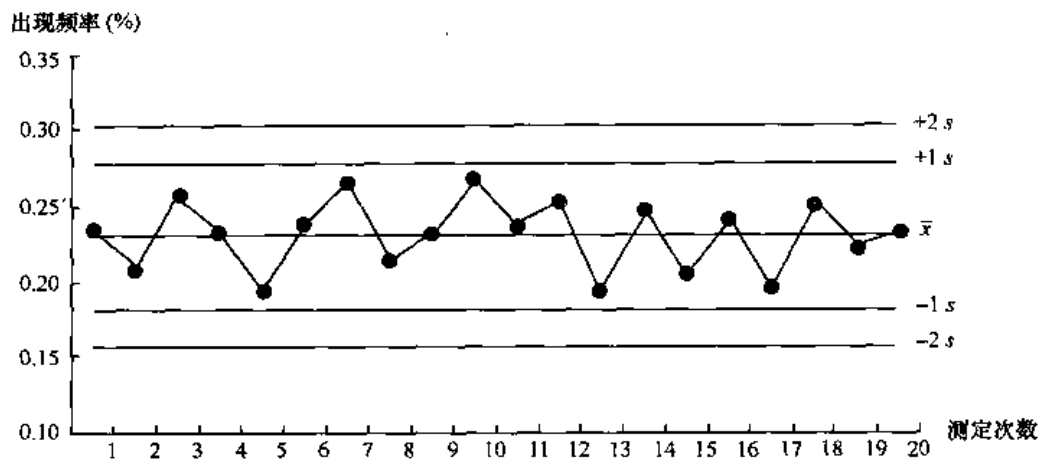


图 13-1 正常质控图

(2) 建议以下几种情况为失控:

- ①质控点落在 $\pm 2s$ 之外;
- ②一次超出 $3s$;
- ③连续 2 次超出 $2s$;
- ④连续 2 个质控点相差超出 $\pm 4s$ 范围;
- ⑤3~5 次连续处于一侧的 $2s$ 之内;
- ⑥连续 4 个质控点落在同一侧 $\pm 1s$ 之外;
- ⑦连续 7 个质控点落在均值之一侧;
- ⑧连续 7 个质控点呈连续上升或下降, 或周期性波动变化。

情况⑥和⑦, 单独依靠记录是不易觉察的, 但在质控图上可以清晰地发现失控。

(3) 质控图的几种失控表现

①曲线漂移: “漂移”现象提示存在系统误差, 准确度发生了一次性的向上或向下的改变。这种变化往往是由于一个突然出现的新情况引起的。如改换质控品或试剂批号变更, 重新配制试剂及更换操作人员等。在寻找原因时, 应重点注意“漂移”现象的

前后发生了哪些变动的因素（图 13-2）。

②趋势性变化：向上或向下的趋势性变化表明检测的准确度发生了逐渐的变化，这种变化往往是由于一个逐渐改变着的因素造成的，如试剂的挥发、蒸发、吸水、沉淀析出、分光光度计的波长逐渐偏移、光电池老化及质控血清本身的变质等。而更换质控品、试剂或操作者等一次性变化的因素则不大可能造成趋势性变化（图 13-3）。

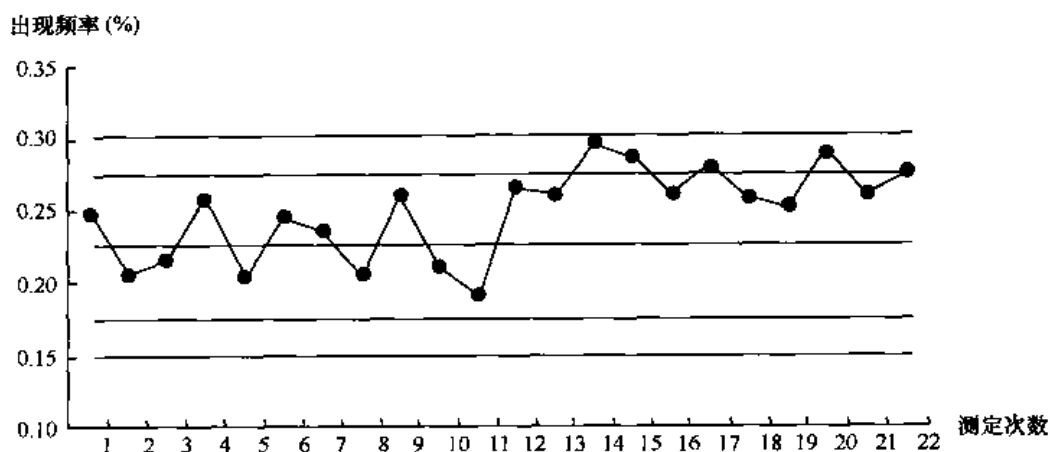


图 13-2 HBV 质控曲线向上漂移图

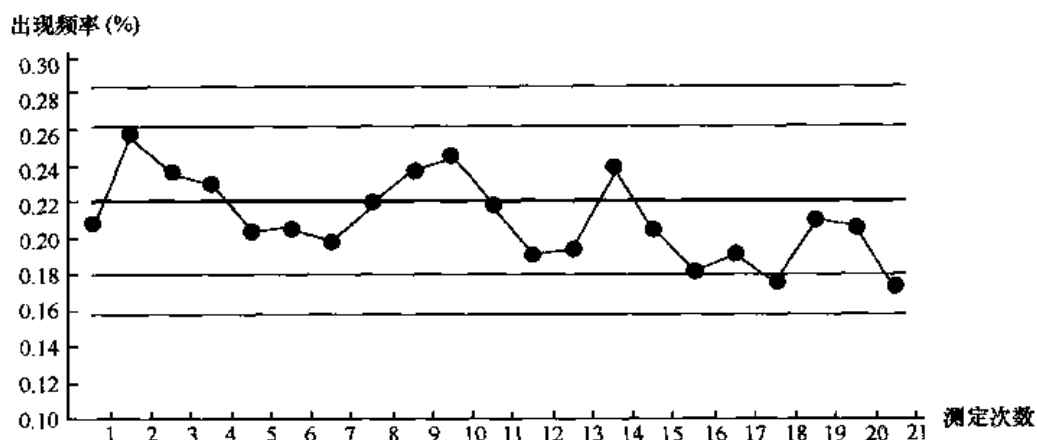


图 13-3 HBV 质控趋势变化图（质控品使用时间过长）

③规律性变化：图 13-4 有周期性规律变化，如该天有规律性变化，原因是负责该项检测的 2 个同志采取了每天换班制。该图则表现 2 名操作者的差别。

利用质控图可以对每次检验的结果进行检测，当没有更换试剂盒批号和质控血清时，该质控图可以继续做下去。

在酶联免疫法（ELISA）试验中，各种试验项目的误差允许范围均有待在实践中得出总结，以上只是举例说明质控方法，不是定论。 $2s$ 是一般公认的允许误差限度。每批测定放 1 份质控血清，1 次超出 $2s$ 应作为警告，2 次超出 $2s$ 为失控。当质控中出现失控时，应查找原因，找出原因纠正后重新检验。如果检验仍达不到要求或找不到原因

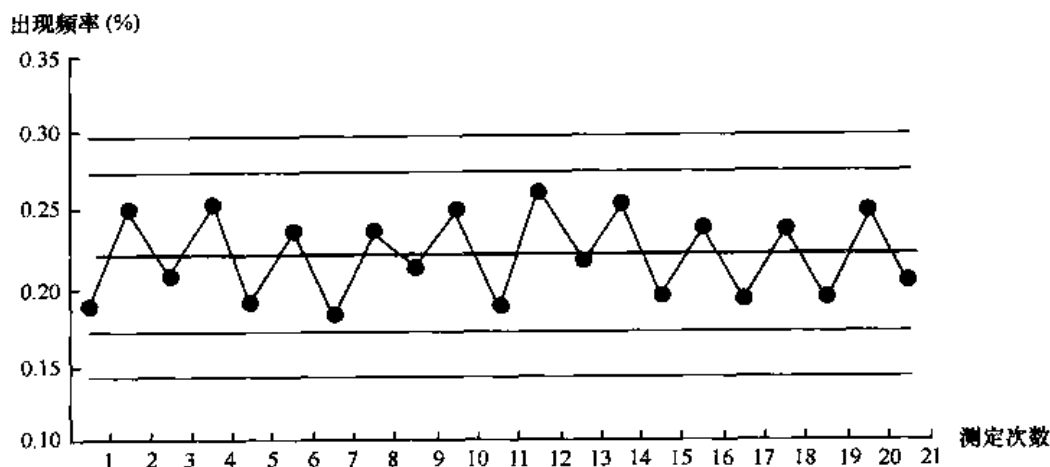


图 13-4 隔天规律变化曲线图

时, 应重复进行 OCV 检验。如果 OCV 检验的结果仍是好的, 说明常规操作出现问题。

13.3.2.6 即刻法质控统计法

以上介绍的质控方法基本上与临床化学测定的质控方法相同, 但 ELISA 有其特殊性, 最合适的质控方法尚待研究建立。有些实验室不是每天进行全部项目的检验, 而 ELISA 试剂盒效期短, 用一批号试剂盒连续常规测 20 次, 难度较大。采用即刻法质控统计方法, 只需连续测 3 次, 即可对第 3 次检验结果质控。即刻法的具体计算方法如下。

- (1) 先将测定值从小到大排列; $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$
- (2) 计算 $\bar{x}$ 和 s ;
- (3) 计算 SI 上限值和 SI 下限值;

$$SI_{\text{上限}} = \frac{x_{\text{最大}} - \bar{x}}{s}$$

$$SI_{\text{下限}} = \frac{\bar{x} - x_{\text{最小}}}{s}$$

- (4) 将质控方法与 SI 值表 (表 13-1) 中的数字比较。

表 13-1 SI 值表

n	3	4	5	6	7	8	9	10
n_3	1.15	1.49	1.75	1.94	2.10	2.22	2.41	2.48
n_{2s}	1.15	1.46	1.67	1.82	1.94	2.03	2.11	2.18

当 SI 上限值和 SI 下限值 $< n_{2s}$ 时, 表示处于控制范围内, 可以继续往下测定。并计算各项数值; 当 SI 上限值和 SI 下限值有一值处于 n_{2s} 和 n_{3s} 值之间时, 说明该值在 $2 \sim 3s$ 范围, 处于警告状态; 当 SI 上限值和 SI 下限值 $> n_{3s}$ 值时, 说明该值已在 $3s$ 范围之外,

属于“失控”。数值处于“警告”和“失控”状态应舍弃，重新测定该质控血清。舍弃的只是失控的这一次数据，其他测定值仍然可以继续使用。

13.3.3 常规室内质量误差分析

通过图形有关资料对比进行误差分析。

(1) 每个月的月底把该月全部的质量控制血清检测结果的总和 SD 与该批血清 RCV 测定中所求得的总和 SD 进行比较。如果当月 $\bar{x}$ 与 RCV 测定时的总和（即靶值）发生了偏离，则说明准确度发生了变化，提示有非随机误差存在。如果当月 SD 与 RCV 测定的 SD 不同，则表明检测的精密度发生了变化。

(2) 把同一批质量控制血清在数月中使用所得的月份 $\bar{x}$ 和 SD 按月份顺序列出，进行分析。如果 $\bar{x}$ 逐月上升或下降（特别是酶与微生物代谢密切相关的一些项目，如糖和磷等），应考虑有可能质控品的稳定性欠佳或变质。如果各月份 $\bar{x}$ 基本一致，而 SD 逐月加大，则主要提示常规工作的精密度下降，应重点考虑试剂、仪器及管理等方面原因。

(3) 在数年中，把每个月的 RCV 和失控规律列成表，可用于对该项目检测质量的历史回顾及趋势分析。

13.4 室间质量评价

室间质量评价（EQA）简称室间质控，是由卫生部临床检验中心采用一系列的办法连续、客观地评价各实验室的试验结果，并发现室内质控不易发现的问题，了解各实验室之间结果的差异，并帮助校正，使具有可比性。各实验室试验结果报到卫生部临床检验中心，经过统计分析，得出相互比较的结果。这种评价不能控制各实验室每天发出的检验报告，而是一种回顾性评价。室内质控主要监测试验结果的精密度，而室间质评主要控制试验结果的准确度，不能互相替代。参与质评的实验室应先做好室内质控。

13.4.1 室间质量评价的类型和方法

13.4.1.1 定期发放质控物调查

这是我国临床检验中心至今仍采用的方法。其做法是临床检验中心向所有的参加室间质评的单位定期发放质控物，各实验室接到室间质评样品后，在规定时间内，按常规测定程序予以检测。将测定结果按规定的格式填写室间质评报告单，在规定时间内寄回临床检验中心。临床检验中心根据各单位返回的检测报告，整理统计分析，评价（评分）检验质量，观察各项结果与靶值的偏离程度，然后将室间质评的结果及建议反馈各参加单位。也就是我们通常称为的“室间质评”。这种方法的优点是省时、省钱、覆盖面广；缺点是由于执行不规范，有不按常规程序检测的现象，所以往往不能反映其真实水平。

13.4.1.2 实验室实地调查

不定期、而且事先不通知的情况下,临时派调查员到实验室进行实地调查,现场抽样,即可封样带走检验,也可当场进行检验。

13.4.1.3 室间质量评价的组织和管理

全国性的临检 EQA 活动由卫生部临床检验中心负责组织,各省、市临检中心互相配合对全国医院和血站实行分级管理,使全国的各级医院和血站都能参加这个质控网络中,共同提高。区域性的 EQA 活动由各省、市临床检验中心组织。并负责所辖区的 EQA 活动。区域性的 EQA 组织者根据国家卫生部临床检验中心的 EQA 计划,结合本地区的实际情况制定自己的活动计划草案。并广泛征求所辖区各实验室的意见,修订后执行。每次质控活动至少需要有 20 个实验室参加。若参加的实验室过少,用合意法评价时将降低室间质控的评价意义。

另外,也将试剂生产单位纳入该质控网络中,因为试剂产品的质量直接影响各实验室检验水平。试剂生产单位的参与,可将临床实验室在质控中反映出来的试剂盒的质量问题反馈回试剂生产单位,使试剂质量同步提高。

13.4.1.4 室间质评调查样品的检验

(1) 室间调查样品必须按实验室常规与待测样品一同进行检验操作,检验人员也是实验室正常工作的人员。

(2) 检测调查样品的次数必须与检测日常待测样品的次数一样。

(3) 质评组织机构截止日期之前,将调查样品检测结果汇总,报送临检中心,不得进行关于调查样品检测结果的实验室之间的交流。

(4) 实验室对调查样品进行检测时,应将处理、准备、方法、审核、检验的每一个步骤和结果及有关人员签字等做好完整记录,形成文件化格式,并妥善保存。

13.5 室间质评结果评定

随着室间质评活动的不断深入,室间质评的方法和理论包括质控物的制备、靶值与评价限的确定、评定方法等也在不断地改进和提高,具体由国家卫生部临床检验中心及各省、市临床检验中心来确定,一般来说,临床免疫学、临床血液学、临床化学、临床微生物学等专业不同,其室间质量评价的评分方法也不一样,具体各专业的评分方法在后面的各专业中详述。

13.5.1 卫生部临床中心组织的临床免疫学检验室间质评

13.5.1.1 室间质评回报表

室间质评回报表内容应包括:

- ①室间质评回报表的说明;
- ②质控血清使用说明;
- ③回报的规则及注意事项;
- ④回报表(阴/阳性型检验项目回报表;数字型检验项目回报表;室内质控回报表)。
- ⑤回报表中使用的数字代码表。

13.5.1.2 方法学评价

通过室间质评回报的资料,进行方法学评价。通过这种方法学评价,可以了解当前参加质评的单位该项目检测所采用的主要方法学及该方法目前的水平,从而对临床实验室提供了一个客观数据,以帮助实验室选择更好的适合于本实验室的方法学。自1989年室间质评开始,从公布的HBsAg方法学评价资料,各实验室了解反向血凝法不如酶免法,从而选择酶免法。从1995年的相关资料可以看出,大多数实验室采用了酶免法,而且酶免法的灵敏度、特异性也有很大提高。

13.5.1.3 试剂盒评价

试剂盒临床使用评价定期公布,使各实验室在试剂盒选择上有明确方向,以质量为中心的市场导向,使试剂盒生产企业围绕质量,不断提高员工素质和技术水平,优化生产环境,按照GMP或ISO 9001标准的要求实施质量管理,已成为国内试剂厂家的方向。体外诊断试剂临床使用评价的定期公布,使体外诊断试剂的市场围绕着产品质量进行竞争,促使试剂厂家不断改进技术,提高产品质量,生产出更好的诊断试剂产品。

13.5.1.4 实验室操作能力评价

卫生部临检中心对实验室操作能力评价报告有3种类型。

- (1)数字型的免疫检测能力评价报告,例如IgG、IgA等项目的室间质评报告。
- (2)阴/阳性型的检测能力评价报告,如HBsAg、HCV等项目的室间质评报告。
- (3)室内质控的评价报告,如HBsAg和IgG的评价。

13.5.1.5 项目的年终评价

每个项目每季度有季度评价,年终也有年终评价。年终的项目评价,是该项目每季度评价的平均值。

通过年终SI图分布,可以了解本年度各实验室SI分布情况。阴/阳性项目的年终SI值 ≥ 0 时,该实验室本项检验成绩优秀。反之,成绩为差。如果连续三年均为差时,该实验室该项目的检测资格应被取消,停做试验,检查原因,改正后方可重新发出报告。

数字型项目的年终SI值 ≤ 1 时为优秀;SI值 > 2.0 时为差。连续三年该室均为差时,该实验室应取消该项目的检测资格,直至纠正并提高后,方允许重新发出报告。

目前卫生部临床检验中心只对优秀单位颁发优秀奖状;对不合格单位,并未进行处

置。

13.5.1.6 临床免疫室预期结果报告发出程序

- (1) 各参与实验室的结果,在规定日期内输入计算机中。
- (2) 在预定日期,计算机计算出该项目全国平均值及标准差,并分别报出不同方法学的结果及参考实验室结果。
- (3) 项目负责人参考质控血清来源及制备;评价各种检验方法结果及参考实验室结果,并了解以前有无相同样品的预期结果,综合以上各方面资料,获得该项目的预期结果。
- (4) 预期结果的报告及审核。预期结果要由项目负责人正式发出报告并签字,经技术负责人核对,并签字,方可生效。必要时可经过专家委员会审核通过。审核的目的是使预期结果更具科学性、权威性和准确性。质检合格后,方可由计算机录入人员采用,并输入计算机中使用。
- (5) 预期结果记录存档。从质评样品的设计、制备,到预期结果的发出,这是一个完整的系统。应在组织质评的单位系统内完成,而不应该由生产试剂的单位代为操作。生产试剂的单位依据自己试剂的特点,制备适合自己试剂检测的样品;依据自己试剂检测结果,出具预期结果,这种室内质评不具科学性和公正性,影响室内质评第三方的立场。这是组织室内质评单位应注意的问题。

13.5.1.7 室内质量评价活动的注意事项

为开展好室内评价活动,须注意以下几个问题。

- (1) 由于临床免疫学检验的室内质评工作开展较晚,室内质评系统还需要进一步完善,室内质评活动的开展难度很大,因此在开始阶段,参加者可以是自愿的,参加的实验室的数目可由少到多。从少数条件比较好的实验室开始,摸索出一些经验后再逐渐扩大范围。参评的试验项目亦可由少到多,这样可以促进临床免疫学检验的质评活动的全面展开,形成一整套切实可行的制度。
- (2) 室内质量评价方式采用不记名的方式,以了解本实验室的结果与正确结果之间存在多少差距。各参与实验室要正确对待室内质评工作,应将室内质量评价质控物随同常规标本一起测定,不可单独测定,使报告的结果能真实反映常规检验水平。
- (3) 每次质评活动,组织者都要认真总结、分析研究所存在的主要问题,并要求和帮助各参与实验室解决具体问题。采取一些有效措施,如统一试验方法、校正仪器、统一试剂盒等,以不断提高临床免疫学检验的质量,提高各实验室之间结果的可比性,为临床诊断提供科学的依据。

13.5.2 临床中心组织的临床血液学检验室内评价

13.5.2.1 室内质评的评分方法

- (1) 全血细胞计数室内质评的评分方法:参考国际血液学标准化委员会(Interna-

tional Committee Standardization Hematology, ICSH) 组织的国际血液学室间质评中采用的偏离指数法, 卫生部临床检验中心从 1999 年开始, 采用百分偏差 (偏差%) 法评价全血细胞计数室间质评。统计评价方法包括:

- ①按使用方法的仪器类型将参加实验室分组;
- ②先计算出各组的均值 $\bar{x}$ 和标准差 s ;
- ③删除 $\bar{x} \pm 3s$ 、以外的回报数据后, 分别重新计算各组的 $\bar{x}$ 和 S ;
- ④重复②的过程, 直至所有回报数据都在 $\bar{x} \pm 3s$ 后得到的 $\bar{x}$ 和 S , 分别称为加权 $\bar{x}$ 和加权 S ;
- ⑤分别用各组的加权均值作为靶值, 计算各批号质评物测定结果与靶值的偏差;
- ⑥评价标准: 每一项目每一批号的结果在允许范围内时, 测定结果为合格, 得分 100%, 若在允许范围外则不合格得分为 0, 各项得分计算公式为:

得分 = $\frac{\text{该项目的及格结果数} \times 100\%}{\text{该项目总的测定样品数}}$ 单个项目测定得分 $\geq 80\%$ 为合格, $< 80\%$ 为不合格。

5 个测定项目 (Hb、WBC、RBC、Hct、PLT) 的总分计算公式为:

得分 = $\frac{5 \text{ 个项目及格结果总数} \times 100\%}{5 \text{ 个项目测定样品数}}$ 5 个测定项目的总分 $\geq 80\%$ 为合格, $< 80\%$ 为不合格。

13.5.2.2 白细胞分类计数室间质评的评分方法

由于血液涂片白细胞分类计数的结果分布差异较大, 目前暂不作正式评分, 回报表中仅列出参加实验室分类的各类细胞个数与参考范围的相差数总和, 相差数目越小越好。

13.5.2.3 凝血试验室间质评的评分方法

凝血酶原时间 (PT) 测定、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 测定及纤维蛋白原 (FIB) 测定结果的评价, 目前暂未正式设定评分标准。各实验室可将自己的测定结果与参考实验室及参加质评实验室的加权 $\bar{x}$ 、加权 S 和变异系数进行对照, 差异较大时应查找原因。

13.5.2.4 细胞形态学检验室间质评

卫生部临床检验中心组织的细胞形态学实验室间质评, 用已确诊的血液或骨髓细胞彩图以识别单个细胞为主要内容进行室间质评, 反馈结果时告知参考答案及中靶与否, 要求参加者核对和校正自己的实验结果, 进一步提高诊断水平。

13.5.3 临床化学检验室间质评和评分方法

13.5.3.1 调查样品的定值

调查样品的定值确定在临床化学检验室间质评中是非常重要的。定值准确才能对各

参与实验室提高准确度起指导作用。目前确定靶值常用两种方法:

①由各个参考实验室用参考方法将调查样品的各种成分进行定值,作为靶值;

②将所有参与实验室的结果按测定方法不同算出总均值,反复剔除 $> \pm 3s$ 的数据后再算出方法均值 ($\bar{x}$) 作为靶值。参与的实验室愈多愈趋向于正态分布,则 $\bar{x}$ 也愈接近真值。

13.5.3.2 变异指数得分法评价

卫生部临检中心目前对临床化学检验室间质评的评分方法,采用由英国全国性室间质评所倡导,并被 WHO 推荐的变异系数得分 (VIS) 法。

变异指数 (variance index, VI) 指某实验室测定结果的变异百分数 (V) 与选定变异系数 (CCV) 的比值。是表示试验误差的指标 (不计正负号)。为消除小数,再将比值乘以 100。VI 值愈小,表示测定值与方法均值愈接近。以下是 WHO 使用的 VI 计算方法:

$$V = |X - \bar{x}| \times 100\% / \sqrt{\bar{x}}$$

式中: V 为变异百分数; X 为各试验室测定的某项试验结果; $\bar{x}$ 为各试验室同一试验项目结果均值 (剔除 $\bar{x} \pm 3s$ 以外的结果)。

$$VI = V \times 100 / CCV \quad \text{式中, CCV 为选定的变异系数。}$$

1985 年我国卫生部临床检验中心决定,用靶值代替原公式中的均值,将 V 值公式改为:

$$VI = |X - D| \times 100 / D \quad \text{式中, D 为靶值}$$

②变异指数记分 (variance index score, VIS): 当 $VI \leq 400$ 时, $VIS = VI$; 当 $VI > 400$ 时, $VIS = 400$ 。这样规定是为了防止由于个别过大的偶然误差对检测水平全面评价的过分影响所致的假象。当测定结果与靶值完全相同时, $VIS = 0$ 。

WHO 对发展中国家在国际质量评价中的标准是: $VIS \leq 50$ 为优秀; $VIS \leq 100$ 为良好; $VIS \leq 150$ 为及格。

我国确定对参加全国质量评价活动的实验室评分标准是: $VIS \leq 80$ 为优秀; $VIS \leq 150$ 为及格; $VIS > 200$ 表明结果有临床上不允许的误差; $VIS = 400$ 表明测定结果会造成临床上的严重失误,是绝对不允许的。

③选定变异系数 (chosen coefficient variation, CCV): 在 VIS 计算中, CCV 是一个十分重要的数值,是评定误差大小,判断测定结果是否合格的尺度,故定值必须适当。如定值过小,要求过高,使检测结果难以达到及格水平,会使检验者失去对室间质评的信心;如果定值过大,则使已经超出临床允许限的偏差得不到警告和控制。所以 CCV 一般采用室间质评初期较小的变异系数作为 CCV。在质评中其值必须统一,否则会造成混乱,不利于比较。我国统一采用 WHO 在国际质评所用的 CCV,详见表 13-2。

表 13-2 WHO 选用的 CCV

项目	CV (%)
钾	2.9
钠	1.6
氯	2.2
钙	4.0
磷	7.8
血糖	7.7
尿素氮	5.7
尿酸	7.7
肌酸	8.9
总蛋白	3.9
白蛋白	7.5

WHO 所使用的 CCV 在计算 VI 时, 对于一般的血清浓度是可以的, 但当某种成分浓度过高或过低时, 就会对较小的误差给出较大的 VIS, 或对较大的误差, 给出较小的 VIS。因此, 应使用统一的 CCV 计算 VI, 血清各成分必须符合规定的浓度范围, 详见表 13-3。

表 13-3 统一的 CCV 适用的血清成分浓度范围

项目名称	低值	高值	单位
钾	1.5	8.0	mmol/L
钠	110	160	mmol/L
氯	65	130	mmol/L
钙	1.0	4.0	mmol/L
磷	0.646	3.876	mmol/L
血糖	0.84	22.4	mmol/L
尿素氮	5.355	142.8	mmol/L
尿酸	178.5	892.5	$\mu\text{mol/L}$
肌酐	61.88	1758	$\mu\text{mol/L}$
总蛋白	40	100	g/L
白蛋白	15	60	g/L

13.5.3.3 百分数偏差评分方法评价

以测定结果偏离靶值的距离确定每一分析项目的正确结果, 即使每一项目确定了靶值后, 通过使用根据偏离靶值的百分数偏差的规律或标准差进行评价。卫生部临床检验中心推荐使用的准则是美国 CLIA'88 中的能力比对试验 (PT) 对分析质量的要求, 见

表 13-4。

表 13-4 美国 CLIA'88 能力比对试验对分析质量的要求

分析物或试验	可接受范围
谷丙转氨酶	靶值 $\pm 20\%$
白蛋白	靶值 $\pm 10\%$
碱性磷酸酶	靶值 $\pm 30\%$
淀粉酶	靶值 $\pm 30\%$
谷草转氨酶	靶值 $\pm 20\%$
胆红素	靶值 $\pm 6.84\text{mmol/L}$ (0.4mg/dL) 或 $\pm 20\%$ (取大者)
血气 PO_2	靶值 $\pm 3\text{s}$
血气 PCO_2	靶值 $\pm 5\text{mmHg}$ 或 $\pm 8\%$ (取大者)
血气 Ph	靶值 ± 0.04
总钙	靶值 $\pm 0.250\text{mmol/L}$ (1.0mg/dL)
氯	靶值 $\pm 5\%$
胆固醇	靶值 $\pm 10\%$
高密度脂蛋白胆固醇	靶值 $\pm 30\%$
肌酸激酶	靶值 $\pm 30\%$
肌酸同工酶	MB 升高 (存在或不存在) 或靶值 $\pm 3\text{s}$
葡萄糖	靶值 $\pm 0.33\text{mmol/L}$ (6mg/dL) 或 $\pm 10\%$ (取大者)
铁	靶值 $\pm 20\%$
乳酸脱氢酶	靶值 $\pm 20\%$
LD 同工酶	LD1/LD2 (+ 或 -) 或靶值 $\pm 30\%$
镁	靶值 $\pm 25\%$
钾	靶值 $\pm 0.5\text{mmol/L}$
钠	靶值 $\pm 4\text{mmol/L}$
总蛋白	靶值 $\pm 10\%$
甘油三酯	靶值 $\pm 25\%$
尿素氮	靶值 $\pm 0.71\text{mmol/L}$ 尿素 (2mg/dL 尿素 N) 或 $\pm 9\%$ (取大者)
尿酸	靶值 $\pm 17\%$
皮质醇	靶值 $\pm 25\%$
游离的甲状腺素	靶值 $\pm 3\text{s}$
人绒毛膜促性腺激素	靶值 $\pm 3\text{s}$ 或 (阳性或阴性)
三碘甲状腺素原氨酸	靶值 $\pm 3\text{s}$
促甲状腺激素	靶值 $\pm 3\text{s}$
甲状腺素	靶值 20% 或 12.9% ($1.0\mu\text{g/dL}$) (取大者)

得分标准, 某项目的测定值距离靶值的偏差百分数若在可接受范围内, 得 100 分,

若超出可接受范围,则得0分。

13.5.3.4 对 EQA 回报的分析总结

EQA 回报材料是反映实验室工作质量的重要资料,也是重要的业务档案,每次收到回报表后,都要认真进行研究分析,总结经验教训,不断改进工作。

(1) 定性测定 一般的定性测定如传染性血清学指标、病毒鉴定等,按如下方法评价:所有质评样本的测定结果与预期结果的符合率达到80%以上时,可判为及格,计算公式为:

$$\text{本次某项目测定得分} = \frac{\text{某项目测定结果可接受样本数}}{\text{某项目样本总数}} \times 100;$$

如评价多个项目本次质评得分,则计算公式为:

$$\text{本次某测定得分} = \frac{\text{所有项目测定结果可接受样本数}}{\text{所有项目样本总数}} \times 100。$$

出现一次质评未参加以及该次测定得分为0分时,成绩判为不及格。

未按时回报结果者判为不及格,该次 PT 成绩为0分。

对于参加 PT 活动未及格的实验室,必须进行技术培训,并采取必要的技术手段改正存在的问题。

连续2次 PT 或在连续的3次 PT 中有2次不及格,可定为 PT 不合格。

免疫血液学中的 ABO 和 D (Rho) 血型测定及组织相容性测定的 PT 评价与上述稍有不同,即其要求所有质评样本100%测定正确。

(2) 定量测定:定量测定按下述方法评价。

测定是否正确按参评实验室测定结果与靶值的符合程度来判定。每次质评每个项目的评分按下式计算:

$$\text{本次某测定得分} = \frac{\text{某项目测定结果可接受样本数}}{\text{某项目样本总数}}$$

如评价多个项目本次质评得分,则计算公式为:

$$\text{本次某测定得分} = \frac{\text{所有项目测定结果可接受样本数}}{\text{所有项目样本总数}} \times 100$$

(3) 每季度的评分:每季度该实验室的评分,以该室参与全部各项目的 SI 得分的平均分计算。

一般有两个成绩;一个是阴/阳性型检验项目的 SI 总平均成绩;另一个是数字型检验项目的 SI 总平均成绩。

一个实验室可以自行选择项目进行回报,部中心依据该室回报的项目,分别归入阴/阳性类型和数字类型项目中评价。

各室应该尽量多地参与各项目的质评,充分利用这一条件,尽快了解和改进该项目在自己实验室的检验水平。

(4) 年终评分:年终依据卫生部临检中心选择的主要项目,对阴/阳性型和数字型项目归成两类分别评价。因此,年终成绩与每季成绩是不一样的。每季成绩是每季全部检验项目成绩的平均值,而年终成绩是年终组织评价单位选定的主要项目成绩的总平均

值。有的单位每季总平均成绩都不错，而年终成绩不及格，这是由于每季度中重点项目成绩不好，而被其他众多项目好的成绩给拉上去，使本季度该室成绩还不错；而年终时，重点评价的主要项目成绩不好的问题被显现出来了，而未能获得好的年终评价。因此，各参与实验室在每季回报之中，可以对已开展的各项检验均参加回报，以了解本室检验能力。但应重点抓基本项目，促其提高和改进。卫生部临检中心临床免疫室对当年主要的基本质评项目也不是一成不变的，根据情况调整评价项目。比如 AFP、HCG 质评项目，会由于该目标标准品尚未正式出台，或难于购买到，各地采用的标准一时尚难统一，而不将其列为年终主要评价项目。经过一段时间，使之过渡到比较成熟阶段，再将其列入主要评价项目。

年终当该实验室的阴/阳性类型项目总的平均 SI 成绩不大于 0；同时数字类型项目的总的平均 SI 成绩不大于 1.5s 时，该室评为优秀，获得表扬。连续三年获优秀的实验室将获更高的荣誉。

(5) 预期结果的确定：预期结果主要是根据全国参与室间质评的实验室的检验结果或参考实验室的检验结果作出的，当然也包含卫生部临床检验中心临床免疫室的检验结果，而且其结果占据重要的分量。参考实验室的选择首先依据该实验室以往质评成绩来判断。还应考虑其处于的医院等级。还可依据不同检测方法，分别选择参考实验室，当参考实验室选择的范围扩大到全体参与实验室时，全国该项目检测平均值就是该项目预期结果。

某些项目有国际标准或国内标准时，应参考实验室同时检测标准血清与待检的质控血清的结果，分析比较两检测结果之间差异是否可以接受，以判断全国该项目检测的预期结果与国家标准有无差异，差异是否在允许接受范围。国内免疫球蛋白检测项目，全国预期结果与美国 CAP 标准品及中国生物制品检定所参考标准品的结果十分接近，结果令人满意。当然，在室间质评中，预期结果如果与国家标准品或国际标准品有较大差异，该差异又属不允许接受范围，那一定是某个环节出了问题，应分析产生误差的原因，找出解决问题的办法，使检验结果与国际或国内标准品趋于接近。

13.5.4 临床细菌学室间质量评价

微生物的种类繁多，同一微生物不同株，其生理、生化特性或血清学特性可能就不尽相同。同时微生物学方面的检验方法较多，但自动化仪器发展也较慢，检测要求条件较高（无菌），手工劳动也较多，技术操作与结果解释密切相关，有时出现和预期不一致的结果，而且还难以区分是技术错误，还是结果解释不当所致。所以说临床微生物学室间质量评价是比较复杂的。鉴于上述原因，微生物学范围内的室间质量评价活动远较临床化学室间质量评价目前发展相对缓慢。

13.5.4.1 室间质评的内容及方法

室间质评包括发放单一（或混合）菌株和模拟临床标本、参加质评的实验室检测、回报及结果的统计分析和评价等过程，简介如下。

(1) 发放单一（或混合）菌株：即将未知菌株穿刺半固体或冻干后发给参加质评

的实验室。这两种方法是微生物室间质控活动中使用最普遍的方法。

(2) 发放含未知菌株的半固体：即将单一（或混合）菌株接种于半固体培养基，经短时间培养后，采用邮寄或由人员传送等方法，将未知菌株分发到参加质评的实验室。WHO 对第三世界所进行的室间质评和我国大多数省市均采用此方法。这种方法具有制备简单、邮寄方便，且菌株在一个月内不易死亡等优点。

(3) 发放冻干菌株：即将单一或混合菌株通过冰冻干燥方法随之冻干后发给参加质评的实验室。冻干菌株的稳定期长，可存活 6 个月，故便于运送到较远的地区，同时也便于一些较脆弱菌株的保存，如脑膜炎球菌、厌氧菌等。因此许多国家均采用此种方法发放菌株，如英国、美国等。我国卫生部临床检验中心组织的全国细菌学室间质评也采用冻干法发放菌株。冻干法发放菌株可以是单一菌株，也可以是混合菌株（即一份质评物中除含有致病菌外，还含有一种或多种正常菌群）。混合菌株较单一菌株好，即模拟标本更接近于临床实际，如模拟的粪便标本中，除有沙门菌或志贺菌外，再混以一定数量的大肠杆菌，这样通过调整致病菌与正常菌群的比例，可以增加从标本中分离、鉴定致病菌的难度。另外，发放单一菌株只能评价参加质评者的鉴定水平，而混合菌株则考查其分离、鉴定菌株的综合分析能力。

尽管发放混合菌株好处很多，但制备混合菌株却有一定难度，关键是致病菌与正常菌群之间的比例制备，以及能否使冻干菌株 100% 存活。前者制备不当，会增加分离致病菌的难度。后者处理不当，会使一部分参加质评的实验室分离不到活的菌株。

发放单一或混合菌株，均应附有报告单，即在报告单上标出标本来源和处理原则，以及哪些菌株需做抗生素敏感试验，有时还要求报告抑菌环直径。同时要求在限定时间（一般不超过两周）内报告结果。

13.5.4.2 参加质评的实验室检验及回报

参加质评的实验室收到质评标本时，应按本室的设备条件及工作人员的能力进行分离培养及鉴定，不要特殊对待。只有按本室条件进行常规处理，才能发现自己实验室存在的问题，如能将本实验室的设备、人员的理论与技术水平中存在的问题及时加以解决，那么，这个实验室就可以随着参加室间质评活动而在技术水平上不断得以提高，检测临床标本的能力也就相应地提高，从而达到了参加室间质评的目的。为做好室间质评物的检测，应注意以下几点。

(1) 做好工作人员的教育培训 微生物也在因环境等因素的变化而变化。一些新的种别在不断出现，人类要想与致病微生物作斗争，就必须不断地学习和探索，熟悉和了解微生物所发生的变化。参加室间质评本身就是一种自我学习的过程，在实践中提高自己处理标本和鉴定细菌的能力。

(2) 尽量使收到的质评菌株存活。要想使质评菌株得以正确的鉴定，首先必须设法使收到的质评菌株存活，这是室间质评的重要环节，如这一点不能做到，就谈不到正确鉴定的问题。

为了保证质评菌株存活，我们对发来的质评菌株，无论是半固体培养基，还是冻干菌种，都是在接种分离培养基的同时，增加一只牛心浸汤作为增菌培养基，且于第 6、

第18h 分别用血琼脂平板和麦康凯琼脂分离一次,以保证尽管只有少数质评菌株存活,也能将其分离出来。

(3) 坚持正确的鉴定程序。当质评菌株被分离出来后,要按照正确的鉴定程序进行操作。

对认识或不熟悉的菌株,均应按照先定科、属,再分种、型的鉴定程序进行鉴定,这样做就不至于发生超越科属的错误;只要遵循正确的鉴定程序,即使是自己从未见过的细菌,至少也可以将其鉴定到属,如果资料齐全,甚至可以鉴定至种。对于临床标本中的细菌,如能这样做,有时还可能发现一些新的种别。

(4) 正确地使用自制或商品化的培养基和试剂。为了正确地鉴定未知细菌,必须认真地选用鉴定用培养基和试剂,了解其性能,对每一种培养基和试剂都必须用参考菌株进行检测,不合格的培养基和试剂坚决不能使用。

(5) 做好室内质量控制。室间质评是考核参加室间质评的实验室的重要手段,只有做好室内质量控制,才能使室间质评取得好成绩。为了保证实验室水平不断提高,搞好室间质评物的检测,正确和及时地处理临床标本,对实验室内的仪器、设备、培养基和试剂等要经常进行质量监测。

(6) 回报。质评培养物作出鉴定后,要填写回报单。并按规定时间将回报表寄往质控管理机构,在国内,即为各级临床检验中心的微生物质量评价实验室。

13.5.4.3 质评回报结果的统计分析与评价

参加室间质评的实验室将回报单寄到质评实验室后,质评实验室的管理人员要将回报结果加以汇总,一共发了多少份标本,做了多少次鉴定,正确鉴定占多大比例,对每一个未知培养物的鉴定正确率是多少,最后还要评出所有参加室间质评实验室的平均分数,以及每个参加室间质评实验室的得分。

(1) 国际上采用的评分制:采用评分制的方法比较合理,可以客观地反映各参控实验室的水平,同时对参控实验室的理论与技术水平的提高也可起到促进和推动作用。评分方法各国采取不同的方式,英、美发达国家及世界卫生组织均采用评分制。如美国采用以100分制的评价方法,分5个档次,即:①正确报告种、群或型;②正确报告属名;③正确报告属名,而种、群或型错误;④不正确报告属或不正确报告属和种;⑤不能分离主要的致病菌。世界卫生组织的评分方法与美国大体相似,对每一个质控菌株鉴定,正确鉴定给3分;部分正确,但可以接受的鉴定给2分;如果鉴定是部分错误给1分;完全鉴定错误给0分。

英国还采用统计学方法来评价各参加室间质评实验室的成绩。每6个月分析一次,所用公式为:

$$\text{实验室得分} = \frac{\text{标本正确数} - \text{平均实验室正确数}}{\text{平均实验室正确数的标准误}}$$

根据上述方式,参加室间质评实验室得正分表示该实验室得分比平均分高,成绩好;得负分表示比所有参加室间质评实验室的平均水平低,如得分小于1.96,则认为该实验室的成绩不佳,应予以指导和帮助。此方法能够较为公正地评价实验室的成绩。

(2) 我国卫生部临检中心采用的临床细菌学检验室间质评评分方法：每年一次性发放 01 ~ 15 号冻干菌株（单一或混合菌株），每年 5 月、7 月和 9 月分 3 次检测；每次检测 5 个菌株，其中 2 株规定要做 10 余种抗生素的药敏试验。

①样品处理方法：实验室收到样品后，低温（-70℃）保存。每次检测时，先用新鲜牛肉汤或无菌小牛血清或新鲜羊血，每支菌株 0.2mL，溶解冻干菌株，然后接种合适的培养基，分离致病菌，鉴定菌株和药敏试验。

②填报结果：每个实验室报告质评样品细菌培养和鉴定的结果，填写结果的编码，报告药敏试验结果，报告细菌药敏试验结果须填写抑菌环直径或 MIC 结果。

③评分标准。细菌鉴定正确得 100 分，鉴定错误得 0 分。

④每株菌对每个抗生素药敏试验结果正确得 100 分，错误得 0 分。

我国卫生部对各级医院采取分级管理，规定二级和三级医院均应参加微生物室间质量评价，因此，各级临床检验中心应积极组织室间质评，各级医院也要创造条件，培训人员，充实细菌室的人力及设备，积极参加室间质评，以不断提高分离和鉴定各种细菌的能力，促进微生物实验室的工作质量及技术水平的不断提高。

13.5.5 参加室间质评常见问题分析

对于参加室间质评的实验室，在进行室间质评活动中，常会出现一些问题，现汇总分析，以利于今后在进行室间质评活动中避免发生，提高参加室间质评的效率。

常见问题可归为如下几个方面：书写误差问题、方法学问题、技术问题、室间质评物问题、结果评价问题、经调整仍无法解释的问题等。

13.5.5.1 书写误差问题

书写误差或错误可造成单一或多项不及格结果。室间质评报告单的仪器、方法、报告单位都是由事先编好的代码，一定要核对无误才能报上数据。试验数据的小数点位数填写要正确。测试记录要完整，测定结果要准确地从仪器读数窗口抄写到报告单上，特别注意标本的加样顺序应与结果顺序相对应。

13.5.5.2 方法学问题

(1) 试验仪器。试验仪器性能不在正常状态（如温度、空白读数、压力、管道堵塞等），对仪器要定期校验，使用时进行校对。

(2) 反应时间。反应时间对许多试验结果影响是非常大的，一定要按要求的时间进行。

(3) 仪器的数据处理功能问题。一些带有数据处理软件的仪器，要检查软件是否正常。

(4) 加样工具。自动加样器要校准到可接受的精密度和准确度，并能准确加入标本。

(5) 试剂产品操作。在进行室间质评活动时要认真按试剂说明书操作。

(6) 标准物。不恰当的复溶和保存。

(7) 试剂。使用过期产品。

(8) 测定结果不在仪器或试剂线性范围内,可能是操作不精确或样品、试剂被污染。

(9) 对于微生物学检测,不适当的温孵条件,计算机数据库系统微生物的不正确鉴定等。

13.5.5.3 技术问题

(1) 室间质评物不恰当的复溶或复溶后保存不当。

(2) 检测仪器上标本放置顺序不恰当。

(3) 不正确的反应条件、稀释液及稀释度及不准确的手工移液稀释。

(4) 不适当的质控界限、规则,如可接受范围太宽,结果落在可接受范围之内的概率增加,同样会超过及格限。

(5) 形态学误差,如细胞病理学筛查误差、错误的解释(血液学、微生物学、细胞病理学等)。

(6) 第二级标本管不正确标记。

(7) 免疫血液学方面 阳性、阴性对照物的误差等。

(8) 细菌学方面,选择不适当的培养基,染色不充分,病情检查特定情况不适当的培养,结果并没有反映当前的分类学,因试验室常规没有进行微生物的实验导致EQA样品结果不适当等。

13.5.5.4 室间质评物问题

(1) 基质效应。有些仪器与其方法结合的性能会受到EQA样品基质的影响。当实验室使用该仪器与其方法时,以决定性方法或参加方法测得的平均值或所有方法平均值进行评价有可能导致不及格的结果。当分析物以相同组平均值评价时,基质效应可能会起作用。

(2) 非均匀性试验物的影响。如不恰当的混匀或冻干品不一致的加热等情况,将有可能影响变异系数。

(3) 室间质评物被细菌污染或溶血。

(4) 微生物学方面。无活性或没有代表性的样品在微生物检测中常出现问题。

13.5.5.5 室间质评评价问题

(1) 同组(分组)不当。

(2) 不适当的靶值,如非均匀性的测试材料或保留的异常值。

(3) 评价范围不适当。

(4) EQA提供不正确的数据输入等。

13.5.5.6 经调整后仍无法解释的问题

当已排除了所有可识别的误差后,单个不及格的结果可能来自随机误差,特别是当

重新检测时其结果是可接受的情况，此时不应采取纠正措施。

如果两个或多个结果不及格，且两个结果偏向一侧，则更可能是系统误差。重检的不及格结果分散在平均数的两侧提示试验方法不够精密。

13.5.6 室间质量评价的局限性

EQA 并不是万能的，在某些情况下其对参评实验室的测定水平的反映存在如下的局限性。

(1) 参评实验室没有同等地对待 EQA 样本和患者样本。这是一种较为常见的情况。实验室担心自己的质评成绩不好，常常采用特选的试剂多次重复检测质评样本，这其实是一种对自己实验室日常检测没有信心的表现，是不可取的。当然，这种质评的结果也就反映不了实验室的真实测定情况。

(2) 当使用单一靶值时，难于评价单个实验室和测定方法。由于临床免疫检验的标准化仍有待改进，不同的方法或不同的试剂盒间测定值的差异有时较大，有些方法或试剂盒本身就有较大的批间变异，此时单一的靶值对于特定的实验室测定的评价有时会欠准确。

(3) 可能会妨碍给出不同结果的改良方法的发展。由于质评样本的靶值是建立在现有的最常用的方法试剂的基础上的，如靶值为所有参评实验室的修正均值，或参考实验室的均值等，这样对于可能测定性能更优的改良方法，用此靶值来评价的话，质评结果有可能较差，这样就很有可能会妨碍这种新的方法在实验室的应用。

(4) 在不同的 EQA 程序中，对实验室的评价可能不同。由于不同的外部机构，其所发样本的类型、浓度、数量或评价方法可能会有所差异。因此，同一个实验室参加不同外部机构组织的室间质量评价，评价的结果很有可能会出现较大的不同。

(王云龙)

第 14 章 体外诊断试剂的质量监管

体外诊断试剂产品大致可分为临床化学产品、血液学产品、微生物学产品、免疫学产品等种类。其中以临床化学所占市场份额最大，接近 34%；其次为免疫学产品，约占 29%。免疫诊断试剂是利用抗原与抗体互相结合的特异性反应来进行定性或定量的，无论是技术还是市场，此类产品在目前所有诊断试剂产品中的发展都是最快的。根据诊断类别，体外诊断试剂又可分为传染性疾病、内分泌、肿瘤、药物检测、免疫学、血型鉴定等种类。

14.1 体外诊断试剂在临床中的重要作用

体外诊断试剂科学技术的飞速发展，在疾病的诊断和治疗上的重要作用日益突出。人口老龄化、疾病谱的变化及人类健康意识的增强、对医疗需求的增加，都拓宽了体外诊断试剂的发展空间。

14.1.1 有助于诊断及鉴别诊断与人体系统有关的疾病

体外诊断试剂的检测结果是支持诊断、鉴别诊断，甚至是临床确诊的重要依据。例如，贫血，若检测到红细胞总数减少和（或）血红蛋白降低都支持贫血的诊断，但是哪种性质的贫血，就需要分析红细胞的各项参数，从而对贫血作出鉴别诊断，如果再结合骨髓细胞学检验就可以对某种贫血作出明确的诊断。

14.1.2 有助于分析病情、观察疗效、判断预后

以血液成分为例，血液成分往往伴随着病情的发展变化而产生相应的变化，这对发现病情、观察疗效、判断预后具有重要的意义。如可以根据红细胞的数量或血红蛋白值来判断贫血的程度是否严重，根据治疗前后网织红细胞的变化判断对贫血的治疗是否有效，也可据此作出愈后判断。根据白细胞总数及各种白细胞的比例变化可对感染状态作出判断，并根据治疗前后白细胞的变化对疗效和愈后作出判断。

14.1.3 为预防疾病提供依据

为了预防乙型肝炎病毒的感染，可以检测乙肝五项，在没有被乙型肝炎病毒（即 HBsAg）感染的情况下，乙型肝炎病毒表面抗体（即 HBsAb）是阴性，证明机体没有抗体，也就是说，没有抵抗能力，如果与乙肝病人长期接触，就有可能被传染。这时可以接种乙肝疫苗，接种疫苗后，还可以定期检测表面抗体的浓度，如果浓度降低到一定的限度，可以再次进行接种疫苗来加强免疫，以达到预防疾病的目的。

14.1.4 指导临床用药

在临床上,对乙肝病人的治疗,是根据乙肝五项(HBsAg、HBsAb、HBeAb、HBeAg、HBeAb)检测的结果给药的,病毒携带者、大三阳和小三阳的给药及给药量都是不一样的。做到合理用药,可以使患者早日康复,并减少不必要的经济负担,所以体外诊断试剂的检测可以有效地指导临床用药。

14.1.5 开展临床医学及诊断学研究

体外诊断试剂在临床检验中的应用是非常广泛的,检测的参数多,各种病理因素都有可能引起体液的成分数量、质量或形态的改变,及时收集临床资料与实验室资料,并进行统计分析,对开展临床研究具有重要作用。同时随着临床医学的发展要求,利用体外诊断试剂进行的检验技术和检验方法也要不断地提高与发展,针对临床工作的需要或实验室发展的需要,开展新方法、新技术的研究势在必行。

14.2 体外诊断试剂发展历程

体外诊断试剂是伴随着医学检验学的发展而产生的,而同时临床诊断试剂的产业化发展又极大地推动了新的科学技术在检验医学、基础医学和药理学等学科的发展应用。

我国检验医学的发展长期远远落后于世界先进水平,这极大地阻碍了我国临床诊断试剂的产业化发展,到20世纪70年代,中国医学检验界仍沿用20世纪50年代的方法,由检验科人员自行配制各种所需试剂。20世纪70年代开始引进一些国外先进设备和技术,有了一些临床诊断试剂产业化的雏形,但此时试剂往往就由研制的实验室生产,没有成型的生产和销售组织过程,产品也无外包装和完整的说明书。

20世纪80年代以来,随着国家的改革开放引进外资,体外诊断试剂迅速进入了产业化进程。尤其在1985—1990年期间,大量国外先进技术进入中国,涌现了一大批生产诊断试剂的厂家,到20世纪90年代初期,生产临床生化试剂和免疫试剂的厂家甚至超过了300家。激烈的市场竞争,极大地推动了临床应用水平的提高。以乙型肝炎检测为例,从沿用数十年血凝法过渡到国际先进的ELIAS法仅仅用了不到5年的时间。

20世纪90年代初期,由于生产厂家过多,诊断试剂市场的竞争呈现白热化,同时由于厂家产品质量参差不齐,市场秩序异常混乱。1993年,国家开始对免疫类诊断试剂市场进行清理,取缔了无生产文号的厂家,并吊销了产品质量长期不合格企业的生产文号;1994年开始对血源临床诊断试剂采取相应的有效措施,使得无序的恶性市场竞争行为逐步得到了遏制,产品质量大幅度提高,市场进入了相对平稳的发展期。经过了一段时间的政府管理和市场淘汰,目前生产与血源检测有关的体外诊断试剂生产厂家在80家左右。

国家食品药品监督管理局为了对体外诊断试剂生产厂家进行更好的监督管理,要求按药品生产企业管理的体外诊断试剂厂家,必须在2005年12月31日前进行GMP认

证,改善生产环境,提高人员的质量意识,规范生产及质量管理,提高产品质量。

14.3 国内外体外诊断试剂发展概况

14.3.1 国际体外诊断试剂发展概况

显示数据统计,2000年全球诊断市场的购买力约为180亿~200亿美元(包括器械、试剂和其他消费品)。以专业划分,整个体外诊断市场大体由8个部分构成,其中临床化学最大,占市场份额的34%,接下来依次为免疫化学,占市场份额的29%,血糖检测占市场份额的14%,血液学占市场份额的7%,微生物学占市场份额的5%,血库占市场份额的4%,核酸探针占市场份额的3%,其他(包括凝结剂)占市场份额的4%。2006年全球诊断试剂市场销售额达到157亿美元,预计5年内其增长率将保持在平均16.6%的水平,远高于全球医药市场年均10%的增长速度。目前,国内临床诊断试剂市场规模约为30亿~45亿元人民币,年均增长率为20%~30%。当前全球诊断试剂生产行业中处于领先地位的7家公司,其年销售收入都在10亿美元以上。

14.3.2 我国的体外诊断试剂发展概况

2007年,成都中国体外诊断试剂产业论坛上的一组数据显示,中国体外诊断(IVD)工业现状:行业规模销售额在60亿~80亿元,70%以上为外资进口产品,其中仪器占50%~60%。全球体外诊断产业规模在200亿美元的水平,而中国的行业规模目前只有30亿~50亿元人民币的年营业额。

中国的体外诊断试剂70%需要从国外进口,这给我国体外诊断试剂企业造成的压力是可想而知的。在分子诊断方面,全球每年以46%的速度增长,而40%在美国,拉丁美洲和中国是最有发展潜力的国家。分子诊断试剂在中国基本上是空白,目前的分子诊断市场如果与美国相比的话,只相当于美国的15%。

纵观世界行业动向,体外诊断试剂受到严重的挑战;国内产业政策优化、医改深入,人们的健康需求在提升,消费习惯在改变,也对体外诊断试剂企业提出了更高的要求。中国体外诊断试剂要奋起追上全球产业的脚步,只有在技术上和产品质量上狠下功夫,解决好产品的稳定性、准确性和可比性才能与跨国公司进行竞争。

14.3.3 体外诊断试剂的市场需求

体外诊断试剂通常用于血站、医院及检验中心、家庭、诊所等场合。由于使用目的不同,诊断试剂的产品形式也不相同。诊断试剂目前主要用于医院及检验中心,其次用于家庭检测。家用诊断试剂具有操作简便、方便及快速的特性,没有受过专业训练的人员按照使用说明也可以使用。一般家庭使用的检测产品包括:早孕、排卵、血糖、尿液等的检测。此类试剂在整体市场所占的比例并不高,仅占9%左右。但是随着人们生活节奏的加快,医学知识的日益普及,以及人们对自身健康状况的关注程度不断提高,人们将更加注重早期检测与检测效率,因而这类试剂的市场目前呈不断增长的趋势。

14.3.4 中国体外诊断试剂的生产规模

目前国内临床诊断试剂市场规模已经发展到每年 30 亿 ~ 40 亿元人民币的销售额,其中临床生化产品占 30%, 免疫产品占 25%, 血液产品占 8% ~ 10%, 尿液分析产品占 3% ~ 5%, 微生物产品占 2% ~ 3%。根据专家估计, 未来 5 年, 国内临床诊断市场的年增长率高达 15% ~ 20%。

从国家药监局的数据库中检索到已批准上市的各种免疫临床诊断试剂近 400 个产品生产文号, 可以发现这些产品主要集中在肝炎及性病的临床诊断上。特别是乙肝的临床诊断试剂就占了 62%, 说明我们国内临床诊断试剂的品种比较单一, 仅集中在少数几个品种上。与美国近 700 种免疫临床诊断试剂品种相比, 品种还很少, 还处于跟踪仿制的水平。

目前在临床上应用比较广泛、市场广阔的项目 (如免疫试剂中的肝炎、性病和孕检系列, 临床生化中的酶类、脂类、肝功、血糖、尿检等系列), 国内主要生产厂家的技术水平已基本达到国际同期水平; 如基因检测中的 PCR 技术系列已经达到国际先进水平, 基因芯片、癌症系列正在迅速追赶国际水平。由于市场因素、政策因素和国内机电一体化应用技术的落后等原因, 微生物学等方面的一些项目进展缓慢, 技术水平较低。

14.4 体外诊断试剂的注册管理

《中华人民共和国药品管理法》(以下简称《药品管理法》)于 1984 年 9 月 20 日由第六届全国人民代表大会常务委员会第七次会议通过, 1985 年 7 月 1 日起施行。《药品管理法》主要规定了主管药品监督管理工作的机构, 有关药品研制、生产、销售、进口和出口、包装和分装、商标和广告等管理的制度, 药品监督制度, 违反药品管理规定、生产和销售假药或劣药应承担的法律责任等。该法中有关毒性药品、放射性药品管理的规定, 是防止化学品污染环境的重要措施。

依据《药品管理法》、《中华人民共和国药品管理法实施条例》, 国家食品药品监督管理局制定了《药品注册管理办法》(施行), 以法规来管理药品的注册工作, 严格规范药物的临床前研究, 临床研究和申报程序, 使未经批准的药物不得进入临床研究, 未经批准的药物不得生产、销售和使用, 从而规范药品的注册行为, 保证药品的安全、有效和质量可控。《药品注册管理办法》的颁布实施, 对于保证药品的质量, 加强药品注册管理以及保障人体用药安全有效, 维护人民身体健康都具有重大的意义。

根据《药品管理法》的规定, 凡是用于预防、治疗、诊断人的疾病, 有目的地调节人的生理机能并规定有适应证和功能主治、用法和用量的物质, 通称为药品。包括中药材、中药饮片、中成药、化学原料药及其制剂、抗生素、生化药品、放射性药品、血清 (antiserum)、疫苗 (vaccine)、血液制品 (blood product) 和诊断药品 (diagnostic reagent) 等。所以诊断试剂也是按药品管理和注册的。但自 2007 年 7 月 1 日起只有用于血源筛查的诊断试剂按照药品管理, 其他产品均按医疗器械产品进行管理。

14.4.1 《药品注册管理办法》(施行)的相关规定

2002年,原国家食品药品监督管理局根据《药品管理法》、《中华人民共和国药品管理法实施条例》制定并颁布了《药品注册管理办法》(施行)。该《药品注册管理办法》是国家依法对我国境内外申请药品,包括中药、化学药、生物制品及诊断试剂等药品的临床研究、药品生产、药品进口、药品分装及在药品批准证明文件有效期内的注册内容变更等审批。药品再注册是对药品批准证明文件有效期满后,需要继续生产、进口的药品及药品分装等实施审核和确认登记。

新药的申请,是指未曾在国内上市销售的药品的注册申请。已经上市的药品如果改变剂型、改变给药途径的,需按新药管理办法进行申请。

已有国家标准药品的申请,是指生产已有国家食品药品监督管理局颁布的正式标准的药品注册办法进行的申请。

进口药品申请,是指在国外生产的药品在国内上市销售的注册申请。

补充申请,是指新药申请、已有国家标准药品的申请和进口药品申请经批准后,改变、增加或取消原批准事项或内容的注册申请。审评过程中的药品注册、已经批准临床研究申请需要进行相应变更的以及新药技术转让、进口药品分装、药品试行标准转正,按补充申请的管理办法办理。

14.4.2 《体外诊断试剂注册管理办法》(试行)的相关规定

体外诊断试剂产品种类繁多,过去曾长期分散管理。《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》的出台,旨在从长远上解决统一注册管理的问题,规范体外诊断试剂的注册管理,以更好地对体外诊断试剂实施科学监管。

2007年4月国家食品药品监督管理局发布了《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》共计12章、92条,对体外诊断试剂的产品分类、产品标准、产品研制、临床试验和注册申请、注册检测、变更注册、重新注册等相关问题作出明确规定。除国家法定用于血源筛查的体外诊断试剂,及采用放射性核素标记的体外诊断试剂产品外,其他体外诊断试剂产品均属于该办法的管理范围,按医疗器械注册管理。

《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》,体外诊断试剂注册申请人应是在中国境内或中国境外合法登记的生产企业。注册审批部门对体外诊断试剂的审批依据,是注册申请人对产品安全性、有效性和质量可控性进行的研究及其结果的系统评价。这就要求体外诊断试剂生产企业在提出注册申请前,必须对产品进行深入细致的研究和系统的评价,并对批准后产品的安全性、有效性等产品质量负全部责任。

14.4.2.1 诊断试剂的定义

国家食品药品监管局印发《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》,自2007年6月1日起施行。这是我国食品药品监管部门首次为体外诊断试剂这一类产品专门制定的注册管理办法,是根据《医疗器械监督管理条例》、《医疗器械注册管理办法》制定本办法。在医疗器械管理上对体外诊断试剂进行了定义:诊断试剂,包括可单独使用或与仪器、器

具、设备或系统组合使用,在疾病的预防、诊断、治疗监测、预后观察、健康状态评价以及遗传性疾病的预测过程中,用于对人体样本(各种体液、细胞、组织样本等)进行体外检测的试剂、试剂盒、校准品(物)、质控品(物)等通称为体外诊断试剂。

14.4.2.2 体外诊断试剂产品分类及命名原则

《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》规定,体外诊断试剂按三个级别进行分类管理,分类原则是依据产品风险程度的高低进行的,产品的注册也是实行分类注册管理。具体分类如表14-1所示。

表 14-1 体外诊断试剂产品的分类细则

类别	产品范围	分类注册管理
第Ⅲ类产品	1. 与致病性病原体抗原、抗体以及核酸等检测相关的试剂 2. 与血型、组织配型相关的试剂 3. 与人类基因检测相关的试剂 4. 与遗传性疾病相关的试剂 5. 与麻醉药品、精神药品、医疗用毒性药品检测相关的试剂 6. 与治疗药物作用靶点检测相关的试剂; 7. 与肿瘤标志物检测相关的试剂; 8. 与变态反应(过敏原)相关的试剂	由国家食品药品监督管理局审查,批准后发给医疗器械注册证书
第Ⅱ类产品	1. 用于蛋白质检测的试剂 2. 用于糖类检测的试剂 3. 用于激素检测的试剂 4. 用于酶类检测的试剂 5. 用于酯类检测的试剂 6. 用于维生素检测的试剂 7. 用于无机离子检测的试剂 8. 用于药物及药物代谢物检测的试剂 9. 用于自身抗体检测的试剂 10. 用于微生物鉴别或药敏试验的试剂 11. 用于其他生理、生化或免疫功能指标检测的试剂	由省、自治区、直辖市药品监督管理部门审查,批准后发给医疗器械注册证书
第Ⅰ类产品	1. 微生物培养基(不用于微生物鉴别和药敏试验) 2. 样本处理用产品,如溶血剂、稀释液、染色液等	由设区的市级药品监督管理机构审查,批准后发给医疗器械注册证书
其他产品	第Ⅱ类产品中的某些产品,例如蛋白质、糖类、激素、酶类等的检测,如果用于肿瘤的诊断、辅助诊断、治疗过程的监测,或用于遗传性疾病的诊断、辅助诊断等,则按第Ⅲ类产品注册管理。在药物及药物代谢物检测的试剂中,如果该药物属于麻醉药品、精神药品或医疗用毒性药品范围,则按第Ⅲ类产品注册管理	

注:国家法定用于血源筛查的体外诊断试剂、采用放射性核素标记的体外诊断试剂不属于本办法的管理范围。

14.4.2.3 体外诊断试剂生产企业注册申请程序

开办医疗器械生产企业，要有与生产的医疗器械相适应的专业技术人员、生产场地及环境、生产设备；具有与其生产的医疗器械产品进行质量检验的机构或人员及检验设备。还要按照一定的程序进行注册登记，取得《医疗器械生产许可证》和《医疗器械产品注册证》，才可以生产。

提出注册《医疗器械生产许可证》申请→根据申请注册生产范围交国家局、省局或市局受理→进行现场检查→颁发《医疗器械生产许可证》→注册体外诊断试剂产品→质量体系自查报告→质量体系考核报告→颁发产品注册证书→方可生产。

(1) 首次注册申报及说明

首次注册申报资料要求如表14-2所示。

表14-2 注册申报资料

	第Ⅲ类	第Ⅱ类	第Ⅰ类
1. 申请表3份	√	√	√
2. 证明性文件	√	√	√
3. 综述资料	√	√	√
4. 产品说明书	√	√	√
5. 拟订产品标准及编制说明	√	√	√
6. 注册检测报告	√	√	×
7. 主要原材料研究资料	√	△	△
8. 工艺及反应体系研究资料	√	△	△
9. 分析性能评估资料	√	√	△
10. 参考值（范围）确定资料	√	√	△
11. 稳定性研究资料	√	√	△
12. 临床试验资料	√	√	×
13. 生产及自检记录	√	√	√
14. 包装、标签样稿	√	√	√
15. 质量管理体系考核报告	√	√	△

注：申请人应当根据产品类别按照上表要求提交申报资料。√：必须提供的资料；△：注册申请时不需提供，由申报单位保存，如技术审评需要时再提供。×：注册申请时不需提供。

(2) 申报资料说明

1) 注册申请表：申请人应当根据要求填写注册申请表（下载软件，同时报电子版）。

2) 证明性文件：①申请人的营业执照副本及生产企业许可证复印件，所申请产品应当在生产企业许可证核定的生产范围之内，第Ⅰ类只能生产第Ⅰ类产品，第Ⅱ类可以生产第Ⅰ类产品和第Ⅱ类产品。第Ⅲ类可以生产第Ⅰ类产品、第Ⅱ类产品和第Ⅲ类产

品；②申请人有关提交资料真实性的声明和委托书。

(3) 综述资料：包括①产品的预期用途；②产品描述；③有关生物安全性方面的说明；④有关产品主要研究结果的总结和评价。

(4) 产品说明书：应当符合《医疗器械说明书、标签和包装标识管理规定》的有关要求，并参考有关技术指导原则编写。

(5) 拟订产品标准及编制说明：拟订产品标准的文本及编制说明应当符合《医疗器械标准管理办法》的相关规定。对于第Ⅲ类产品，拟订产品标准的内容应当参照《生物制品规程》(2000版)编制。

(6) 注册检测报告：由国家食品药品监督管理局认可的检测机构出具的注册检测报告。

(7) 主要原材料的研究资料：包括抗原、抗体、质控品、标准品(校准品)等的选择、制备及其质量标准的研究资料，质控品、标准品(校准品)的定值试验资料等。

(8) 主要生产工艺及反应体系的研究资料：包括固相载体、显色系统等。反应体系包括样本采集及处理、样本用量、试剂用量、反应条件、校准方法和质控方法等。

(9) 分析性能评估资料：包括分析灵敏度、分析特异性、检测范围、测定准确性、批内不精密度及批间不精密度等项目。以有效地控制产品生产工艺及产品质量的稳定性。

(10) 参考值(参考范围)确定：应该详细说明确定参考值(参考范围)所采用的样本来源，说明参考值(参考范围)确定的方法，并提供参考值(参考范围)确定的详细试验资料。

(11) 稳定性研究资料：包括至少三批样品在实际储存条件下保存至成品有效期后的稳定性研究资料，必要时应当提供加速破坏性试验资料。

(12) 临床试验资料：应当参考有关技术指导原则开展临床试验，并提供临床试验资料。

(13) 生产及自检记录：提供连续三批产品生产及自检记录的复印件。

(14) 包装、标签样稿：应当符合《医疗器械说明书、标签和包装标识管理规定》的要求。

(15) 质量管理体系考核报告：首次申请第Ⅲ类和第Ⅱ类产品注册时，应当提供相应的药品监督管理部门出具的质量管理体系考核报告。第Ⅰ类产品根据需要提供生产企业的质量管理体系自查报告。

14.4.2.4 生产企业的质量管理体系自查报告

自查报告内容如下：①企业基本情况；②按照 GB/T19000 系列标准建立健全企业质量体系计划；③本次申请注册产品名称和报告适用范围；④企业质量管理职责；⑤设计控制；⑥采购控制；⑦过程控制；⑧产品检验和试验；⑨其他方面。

14.4.2.5 医疗器械生产企业质量体系考核报告的内容

①组成人员的姓名、工作单位、职务、职称等；②被考核方主要现场人员的姓名、

职务、所在职能部门和职称；③考核时间；④考核结论和建议；⑤对企业质量体系的基本评价；⑥对主要不合格内容的陈述；⑦考核结论（建议通过考核，建议整改后复核）；⑧考核组长签字。

14.4.2.6 产品重新注册

重新注册需要提交以下资料（程序基本同上）：①《医疗器械生产企业许可证》（变更）申请表3份；②《医疗器械生产企业许可证》副本复印件1份；③企业变更情况说明；④拟生产的相关产品标准复印件和产品简介；⑤主要生产设备及检验仪器清单；⑥拟生产的相关产品工艺流程图；⑦申报材料真实性自我保证声明；⑧授权委托书。

办法还规定，在体外诊断试剂产品注册前以及重新注册前，均要对体外诊断试剂生产企业质量管理体系进行考核。企业所在地的省级药品监管部门根据需要，不仅要对外诊断试剂生产企业产品注册前的质量管理体系进行考核，而且要对产品注册后的质量管理体系进行监督。

14.4.3 体外诊断试剂新产品研发与临床要求

14.4.3.1 体外诊断试剂产品研制的要求

对从事体外诊断试剂研制的机构应当具有与实验研究项目相适应的人员、场地、设备、仪器和管理制度，所用实验动物、试剂、原材料等应当符合有关要求和规定，并保证所有实验数据和资料的真实性。

申请体外诊断试剂注册而进行的产品研制工作应当包括：主要原材料的选择、制备；产品生产工艺的确定；注册产品标准的拟订；产品稳定性研究、参考值（参考范围）确定、产品性能评估等相关工作。申请人可以参考相关技术指导原则进行产品研制，也可以采用不同的实验方法或技术手段，但应当说明其合理性。

产品性能评估是指对体外诊断试剂分析性能和临床性能的评估。分析性能主要包括分析灵敏度、分析特异性、测定范围、测定准确性、批内不精密度、批间不精密度等。体外诊断试剂临床性能评估应通过临床试验完成。体外诊断试剂临床试验由申请人在提出注册申请前完成。

国家食品药品监督管理局和省、自治区、直辖市药品监督管理部门根据需要对本行政区域内的产品研制情况进行核查，要求申请人或者承担试验的研究机构按照申报资料项目、方法和数据进行重复试验，并派员现场核查试验过程，也可委托有关研究机构进行重复试验。

14.4.3.2 临床试验的要求

体外诊断试剂临床试验（包括与已上市产品进行比较研究在内的临床验证）是指在相应的临床环境中，对体外诊断试剂的临床性能进行的系统性研究。临床试验用样品应当严格按照《体外诊断试剂生产实施细则》的要求进行生产，按照拟定的产品标准对临床试验用样品检测合格后方可用于临床试验。

同一注册申请包括不同包装规格时,可只采用一个包装规格样品进行临床试验。

第Ⅲ类产品申请人应当选定不少于3家(含3家)、第Ⅱ类产品申请人应当选定不少于2家(含2家)省级卫生医疗机构开展临床试验。

临床试验机构应当具有与研究项目相适应的人员、场地、设备、仪器和管理制度,并保证所有研究数据和资料的真实性。临床试验完成后,申请人或临床试验牵头单位根据相关技术指导原则,对临床试验结果进行汇总,完成临床试验总结,并出具临床试验报告。参加临床试验的机构及人员应当了解临床试验者的责任和义务,及时、准确、真实地做好临床试验记录,不得修改,如有违反应当向所在地省级药品监督管理部门和国家食品药品监督管理局报告。

14.4.4 体外诊断试剂质量管理

为了保证体外诊断试剂的质量,体外诊断试剂注册就是药品监督管理部门依照法定程序,根据注册申请人的申请,对拟上市销售产品的安全性、有效性、质量可控性进行的研究及其结果实施的系统评价,这是保证体外诊断试剂质量的第一步,也是关键的过程。

作为体外诊断试剂生产企业应当建立相应的质量管理体系,形成文件和记录加以实施,并保持有效运行,其质量管理体系应当符合《体外诊断试剂生产实施细则》的要求。

申请第Ⅱ类、第Ⅲ类产品注册和重新注册前,申请人应当通过药品监督管理部门的质量管理体系考核。对于首次注册申请,质量管理体系考核还包括对申请注册产品研制情况的现场核查。申请第Ⅰ类产品注册的,质量管理体系由申请人自行组织核查。

药品监督管理部门对生产企业质量管理体系的建立情况、基本运行情况等进行全面考核合格后,方可给予注册或重新注册。

14.4.4.1 产品标准管理

体外诊断试剂产品的标准,是指为保证体外诊断试剂产品质量所制定的标准、技术参数以及生产工艺等的技术要求,包括国家标准、行业标准和注册产品标准。

申请人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下,依据产品研制、临床试验等结果,参考有关文献资料、国家标准、行业标准等,拟订申报产品的标准。申请人拟订的产品标准不得低于国家标准或者行业标准。

申请人拟订的产品标准经相应的药品监督管理部门核准,并在该产品获准注册后即成为注册产品标准,生产该产品的生产企业必须执行该注册产品标准。

体外诊断试剂标准物质,是指供体外诊断试剂试验用,且具有确定特性量值,用于评价测定方法的物质,包括标准品、参考品。标准品或参考品是体外诊断试剂生产检测和临床使用中必不可少的关键技术参数。

14.4.4.2 注册检测管理

注册检测是指国家食品药品监督管理局认可的、具有相应承检范围的医疗器械检测

机构（以下简称“检测机构”）对申请人提交的产品标准根据有关研究数据、国内外同类产品的标准和国家有关要求，针对其所设定的项目、指标，所采用的标准品或参考品的科学性、合理性等内容提出意见，并对送检样品进行检测，出具检测报告的过程。

申请体外诊断试剂首次注册，第Ⅰ类产品一般不需要进行注册检测；第Ⅱ类、第Ⅲ类产品应当进行注册检测；第Ⅲ类产品应当进行连续3个生产批次样品的注册检测。

国内生产企业的注册检测样品，由药品监督管理部门在对生产企业的质量管理体系考核合格后现场抽取。申请人应当向检测机构提出书面申请，并提供注册检测所需要的有关技术资料、注册检测用样品及标准品或参考品。

医疗器械检测机构应当在授检范围内开展注册检测工作，并应当在规定的工作时限内出具检测报告。

14.4.5 体外诊断试剂的注册申请与审批

14.4.5.1 体外诊断试剂的注册申请

注册申请，是指申请人对其生产的未在中国境内上市销售的体外诊断试剂所提出的注册申请，即首次注册申请。

申请第Ⅲ类和第Ⅱ类产品注册的，应在完成产品研发、临床试验、注册检测并通过质量管理体系考核后，向相应的药品监督管理部门提出注册申请。申请第Ⅰ类产品注册的，应在完成研制工作后，向相应的药品监督管理部门提出注册申请。

体外诊断试剂的注册单元应为单一试剂或单一试剂盒，一个注册单元可以包括不同的包装规格，即以品种为单元进行注册。

注册申报资料应当使用中文。根据外文资料翻译的申报资料，应当同时提供原文。注册申报资料应当完整、规范，数据必须真实可靠。注册申请人对其注册申报资料的真实性负全部责任。

14.4.5.2 体外诊断试剂的审批

审批是药品监督管理部门行政受理机构对注册申报资料进行形式审查，符合受理要求的，予以受理，发给受理通知书；不符合要求的不予受理，并以书面形式告知申请人。

药品监督管理部门技术审评机构对注册申报资料进行全面的技术审评，必要时可调阅原始研究资料。审评过程中，需要咨询专家或举行听证的，技术审评机构将书面告知申请人。技术审评机构在对注册申报资料进行技术审评时，需要申请人补充资料的，技术审评机构一次性发出书面补充资料通知。申请人应当在60个工作日内按照补充资料通知的要求一次性提交补充资料。

申请人对补充资料通知内容有异议的，可向相应的技术审评机构提出书面意见，说明理由并提供相应的技术支持资料。

经审查符合规定批准注册的产品，由相应的药品监督管理部门在规定的时限内核发《医疗器械注册证书》。注册产品标准和产品说明书由相应的药品监督管理部门根据申请人的申报资料予以核准，并以附件形式发给申请人。《医疗器械注册证书》有效期为

4 年。

14.4.5.3 体外诊断试剂的跟踪检查

体外诊断试剂生产企业，要在产品上市后其产品标准和说明书必须与药品监督管理部门核准的内容一致，其安全性和有效性等都要进行跟踪检查，收集不良反应，及时提出修改产品标准或说明书的申请。

14.4.6 体外诊断试剂的重新注册

体外诊断试剂重新注册，是指对产品注册证书有效期（4 年）延续生产、销售该产品所实施的审批过程。应当在产品注册证书有效期届满 6 个月前，提出重新注册申请，并提交申报资料。

14.4.7 体外诊断试剂的监督管理

体外诊断试剂注册申请审查过程中及批准后发生专利权纠纷的，当事人可以自行协商解决，或者依照有关法律、法规的规定，通过管理专利工作的部门或者人民法院解决。

体外诊断试剂产品获准注册后，对于体外诊断试剂质量管理体系未有效运行的生产企业，企业所在省级药品监督管理部门根据情节轻重责令改正或限期整改。

有下列情形之一的，药品监督管理部门对其产品注册批准文件予以注销：①产品注册批准文件有效期届满未延续的；②法人或者其他组织依法终止的；③产品注册批准文件依法被撤销、撤回或者依法被吊销的；④法律、法规规定的应当注销行政许可的其他情形。

生产企业被撤销《医疗器械生产企业许可证》的，该企业所持有的产品注册证书自行废止，药品监督管理部门对其产品批准文件予以注销，并予以公布。

违反本办法其他有关规定的，药品监督管理部门根据《医疗器械监督管理条例》和《医疗器械注册管理办法》予以处罚。

14.5 药品生产质量管理规范（GMP）

14.5.1 GMP 简介

《药品生产质量管理规范》，英文是 good manufacture practice for drugs 缩写为 GMP。它是在药品生产全过程中，用科学、合理、规范化的条件和方法来保证生产优质药品的一套系统、而且科学的管理办法，是药品生产和质量管理的基本准则，是世界各国对药品生产的全过程监督管理普遍采用的法定技术规范。由于频繁的药害事件的发生，特别是 20 世纪最大的药害事件——反应停事件的影响，人们逐渐认识到药品检验并不是保证药品质量的唯一办法，必须对药品生产的全过程进行质量控制，才能保证药品质量。GMP 是美国 6 位科学家在 20 世纪 60 年代初期提出来的。1962 年美国食品药品监督管理局（FDA）首次提出 GMP 作为药品生产质量管理的法定性文件。WHO 于 1975 年正式颁布

GMP 并向各成员国推荐。目前,已有 100 多个国家和地区实行 GMP 管理制度。实践证明, GMP 是行之有效的规范化、科学化、法制化和国际化的管理制度,并在药品生产过程中起着主导作用。

20 世纪 70 年代以后,世界许多国家都先后制定颁布了本国的 GMP。20 世纪 80 年代初期,药品 GMP 开始在我国推行,1988 年 3 月,我国卫生部批准颁布了《药品生产质量管理规范》,并于 1992 年、1998 年两次进行了修订。并制定了相应的《药品 GMP 认证检查项目》和《生物制品 GMP 认证检查项目》等;重新制定了药品 GMP 认证管理办法和药品 GMP 认证工作程序。为了加深对新版 GMP 的理解,2001 年中国化学制药工业协会、中国医药工业公司出版了《药品生产质量管理规范(GMP)实施指南》。

2002 年原国家药品监督管理局颁布《药品生产质量管理规范认证管理办法》。并实行按品种分批进行 GMP 认证管理。

国家分批实施 GMP 的基本情况是:

- (1) 血液制品企业于 1998 年年底完成 GMP 认证。
- (2) 大容量注射剂,小容量注射剂生产企业,于 2002 年年底完成 GMP 认证。
- (3) 固体口服制剂企业、膏贴、散剂、等其他剂型于 2004 年年底要求完成 GMP 认证。
- (4) 体外诊断试剂于 2005 年年底要求完成 GMP 认证。

即 2005 年 12 月 31 日前,我国所有药品制剂和原料药的生产必须符合 GMP 要求,并取得 GMP 证书,从此标志着我国进入 GMP 时代。GMP 的实施,极大地改变了我国药品生产厂房设备设施的落后局面,药品质量的管理更加科学化、系统化;从整体上看, GMP 的实施提高了我国药品的质量与安全性。但是我国通过 GMP 认证的药厂,虽然厂房硬件好了,纸上的管理文件规范了,并不意味着就能保证药品的质量。近年来的“齐二药”事件、“欣弗”事件,暴露出我国在 GMP 应用与监管上还存在有漏洞,我国药品生产企业正面临着新的挑战。

14.5.2 GMP 的概述

药品生产质量管理规范是在药品生产的全过程中,运用科学合理的条件和措施来保证生产优质药品的科学管理方法,是把发生差错事故的可能性降到最低程度的一种最有效、最可靠的办法。GMP 是国际通行的药品生产和质量管理必须遵循的基本准则,是国际贸易药品质量签证体制必不可少的条件,国际上早已把是否实施 GMP 要求作为能否进入国际市场的“通行证”。

GMP 是在药品生产过程的质量管理实践中总结出来的,其目的是保证所生产的药品安全、有效和均一。它覆盖的是所有药品生产企业。只要切实贯彻执行所制定的 GMP,就能生产出符合一定质量要求的药品,防止任何事故的发生,否则就必须通过验证后重新修订。GMP 适用于药品生产的全过程。

14.5.3 GMP 质量管理的意义

GMP 质量管理的指导思想是一切药品的质量形成都是生产出来的,而不是单纯检

验出来的。GMP 以生产高质量的药品为目的,从投料到完成生产、包装、标志、储存、销售等环节的整个过程实施 GMP 管理。在保证生产条件和环境的同时,重视生产和质量管理,并有组织地实施对生产各个环节规范操作,同时进行检查和记录。监督实施 GMP 是药品监督管理工作的重要内容,是保证药品质量和用药安全的有效的可靠办法。

14.5.4 我国实施 GMP 的迫切性和重要性

医药行业是当前世界上发展最快、竞争最激烈的国际化产业之一,也是受到各国政府高度重视的产业。随着世界制药行业的飞速发展,全球医药市场规模逐年快速递增,年均增长率在 7% 以上,远远高于全球经济增长速度,对世界经济产生的影响也是日益加深。中国人口众多,是全球公认的潜力巨大的医药市场,也是世界制药发达国家争夺的主要目标市场。在经济全球化浪潮中,国际跨国公司为了增强国际竞争力,通过大规模的重组与兼并,建立全球生产与销售网络,在不断扩大国际市场份额的形势下,中国医药产业则显得相对封闭与软弱。大多制药企业不仅技术落后,品种、剂型单一,而且产品的质量保证程度得不到国际市场的认可,使国产药品处于质量竞争力的劣势地位。其中占世界第二位的中国化学原料药品生产,出口量很大,但品种少,档次低,产品附加值也低,综合竞争能力不强;生产能力占世界第一的化学药品制剂,设备利用率也只有 50% 左右;进入国际市场的产品寥寥无几;具有强大优势的中草药生产目前也仅占世界植物药市场份额的 5%。究其原因,除我国医药产业在品种和整体技术水平上与国际先进水平仍有一定的差距外,质量监管体制仍未全面与国际接轨则是一个重要因素。

WHO 的“国际贸易中药品质量签证体制”已规定出口药品生产企业必须按照 GMP 要求进行监督。美国 FDA 认为,GMP 是法令范围内作为生产加工过程是否达到保证药品质量的最低要求,偏离 GMP 所生产的药品质量是不可信任和接受的。

GMP 是国家对药品生产企业管理和质量控制所制定的基本准则,是制药企业进行质量保证,防止生产过程中发生污染、差错和事故,提高生产效率,完善和优化质量保证体系的十分必要和有效的手段,也是我国制药企业产品打入国际市场的通行证和我国医药产业走出国门、迈向世界的关键。因此,我国要尽快适应世界医药业的发展趋势,当务之急就是要加快 GMP 的实施。这不仅是提高药品质量,确保人民群众安全用药的需要,而且对于提高我国制药企业的国际竞争力,缩小和国际间的差距,占领国际市场有着极其重要的意义。

《药品管理法》规定,“药品生产企业必须按照国务院药品监督管理部门依据本法制定的《药品生产质量管理规范》的要求组织生产。药品监督部门按照规定对药品生产企业是否符合《药品生产质量管理规范》的要求进行认证;对认证合格的,发给认证证书。”这就从法律上明确了药品生产企业实施 GMP 对于保证药品质量的重要意义。

14.5.5 GMP 的特点和内容

GMP 是在药品生产过程的质量管理实践中总结、抽象、升华出来的规范化的条款,它的目的是为了指导药品生产企业克服不良生产导致的劣质药品产生,保证优质药品的生产。它的覆盖面是所有的药品、所有的药品生产企业。

(1) GMP 一般具有以下特点。

①GMP 的条款仅指明了要求的目标,而没有列出如何达到这些目标的解决办法。因此各生产企业应结合本单位的生产实际制定各种文件化程序,才能保证贯彻执行。

②GMP 的条款是有时效的,因为 GMP 只能根据国家、地区现有的一般水平来制定,采用目前可行的、有实际意义的方面作出规定。GMP 的条款均需定期或不定期修订,这和制定的药品标准类似,对目前有法定效力(约束力或有效性)的 GMP,称为现行 GMP,或现版 GMP。新版 GMP 颁布后,前版 GMP 即废止。

③GMP 强调药品生产和质量管理法律责任,凡开办药品生产的企业,必须向药品监督管理部门履行审批手续,其产品质量严格按照 GMP 的要求,接受药品监督管理部门的监督。

④GMP 强调生产过程的全面质量管理,对凡能引起药品质量的诸多因素,均须严格控制,强调生产流程的检查与防范紧密结合,且以防范为主要手段。

⑤重视为用户提供全方位,及时的服务 按有关部门的要求建立销售档案,并对用户的信息反馈加以重视,及时解决。

(2) GMP 的内容

①从专业性管理角度,可以把 GMP 分为两大方面。一是对原材料、中间品、产品的系统质量控制,主要办法是对这些物质的质量进行检验,并随之产生了一系列工作质量管理。另一方面是对影响药品质量的生产过程进行管理,避免人为差错和污物异物引入,进行系统严格管理,以保证生产合格药品。前者被称为质量控制,后者被称为质量保证。

②从硬件和软件系统的角度,可以把 GMP 分为硬件系统和软件系统。硬件系统主要包括人员、厂房、设施、设备等的目标要求,这部分设计为必须的人、财、物的投入,以及标准化管理。软件系统主要包括组织机构、组织工作、生产工艺、记录、制度、方法、文件化程序、培训等,可以概括为意志力为主的投入产出。在实践中硬件部分涉及较多的经费,涉及各企业的经济能力;软件通常反映出管理技术水平问题。因此,用硬件和软件来划分 GMP 内容,有利于 GMP 的实施。许多发展中国家推行 GMP 制度初期,往往采用对硬件提出最低标准要求,而侧重于抓软件的办法效果比较好。

从不同的角度来讨论 GMP 的内容,可以加深我们对 GMP 的理解。具体内容应以所执行的 GMP 条款为依据。

14.5.6 GMP 的基本要素

实施 GMP 的基本要素在于:将人为的差错控制在最低的限度,防止对药品的污染,保证提高产品的质量管理体系。

14.5.6.1 人为因素

将人为的差错控制在最低的限度。

(1) 在管理方面

质量管理部门从生产管理部门独立出来,建立相互监督检查制度;制定各部门责任者;制定规范的实施细则和作业程序;各生产工序严格复核,如称量,配制。材料的领

用等；在各生产工序、对用于生产的运送容器、主要机械，要标明正在生产的产品名称、规格、批号等状态标志；整理和保管好记录（一般按产品有效期终止后1年，未规定有效期的应保存3年）人员配备、培训教育和管理。

（2）在设备方面

各工作间要保持宽敞，清除妨碍生产的障碍；不同品种操作必须有一定的距离，严格分开。

14.5.6.2 防止对药品的污染

一切对药品的污染和交叉污染，防止产品质量下降的情况发生。

（1）在管理方面

工作间及设备制定详细的卫生规程，并按验证的清洁规程实施。对生产人员进行严格的公共卫生和个人卫生培训；对操作人员定期进行健康体检，建立个人健康档案，防止操作人员带有病菌病毒而污染药品。限制非生产人员进入工作间。

（2）在设备方面

粉尘对药品的污染，设置相应的机械设备来保障生产环境（空调净化系统等）；生产车间及操作间专用化；对直接接触药品的设备、工具、容器具、选用对药物不发生化学反应的材质制造，注意防止机械润滑油对药品的污染。

14.5.6.3 建立健全质量保证体系

建立和健全完善的质量保证体系，确保规范的有效实施。

（1）在管理方面

质量管理部门应独立行使质量管理职责，配备足够的人员切实对生产过程实施监控管理。

（2）在设备方面

生产车间及设备应合理布局，采用先进的生产设备。为保障质量管理的实施，配备必要的实验室和检测设备。

14.5.7 GMP 的基本原则

①企业实施 GMP 不是本企业某几个人的事，而是全公司员工的事；

②要树立质量决定权，质量决定权是否树立，从一个侧面反映了企业的质量意识和道德作风，也是质量管理的支柱之一，一定要培养全体员工质量意识和法制观念，实行质量否决权；

③实行目标责任制；

④加强 GMP 规范的培训，让所有员工能够自觉按 GMP 的要求规范自己的全部生产活动。

14.5.7.1 影响产品质量的因素

影响产品质量的因素既有人员素质、生产方法和检验监控技术等内在因素，也有生

产环境、厂房设施、设备及原辅材料等外部原因。为了确保产品质量的万无一失, GMP 对生产中影响质量的主要因素, 提出了基本原则要求。可概括为以下 17 点。

(1) 药品生产企业必须有足够的与生产药品相适应的技术人员承担药品生产和质量管理工作, 并清楚地了解自己的职责。

(2) 操作者应经过专业培训, 以便能正确地按照规程操作。

(3) 应保证产品采用批准的质量标准进行生产和控制。

(4) 应按每批生产任务下达书面的生产指令, 不能以生产计划安排来代替批生产指令。

(5) 所有生产加工应按批准的工艺规程进行, 根据经验进行系统的检查, 并证明能够按照质量要求和其规格标准生产药品。

(6) 确保生产厂房、环境、生产设备、卫生符合要求。

(7) 符合规定要求的物料, 包装容器和标签。

(8) 合适的储存和运输设备。

(9) 对全生产过程进行严密的、有效的控制和管理。

(10) 应对生产加工的关键步骤和加工产生的重要变化进行验证。

(11) 合格的质量检验人员、设备和实验室。

(12) 生产中使用手工或记录仪进行生产记录, 以证明已完成的所有生产步骤是按正确的规程和指令要求进行的, 产品达到预期的数量和质量, 任何出现的偏差都应记录和调查。

(13) 采用适当的方式保存生产记录, 根据这些记录可追溯各批产品的全部历史。

(14) 对产品的储存和销售中影响质量的危险应降至最低限度。

(15) 建立销售和供应渠道收回任何一批产品的有效系统。

(16) 了解市场产品的用户意见, 调查质量问题的原因, 提出处理措施和防止再发生的预防措施。

(17) 对一个新的生产过程、生产工艺及设备 and 物料进行验证, 通过系统的实验以证明是否可以达到预期的结果。

只有训练有素的人员, 在符合药品生产条件的厂房设施中, 使用合格的原辅材料和生产设备, 采用经过验证的生产方法, 通过可靠的检验控制, 所生产的产品质量才是可信的。

14.6 体外诊断试剂生产企业的质量体系基本要求

国家食品药品监督管理局为加强对体外诊断试剂质量管理体系的监督管理, 切实保障注册产品的质量, 规范体外诊断试剂生产企业的生产行为, 组织制定了《体外诊断试剂质量管理体系考核实施规定(试行)》、《体外诊断试剂生产实施细则(试行)》和《体外诊断试剂生产企业质量管理体系考核评定标准(试行)》于 2007 年 4 月相继出台, 同时出台的还有《体外诊断试剂注册管理办法》, 该《办法》中规定: 除国家法定用于血源筛查的体外诊断试剂、采用放射性核素标记的体外诊断试剂外, 其他体外诊断

试剂均按医疗器械产品进行注册管理。

这些法规的规定对体外诊断试剂生产质量管理的基本要求。

14.6.1 体外诊断试剂生产企业的组织机构、人员与质量管理职责

(1) 体外诊断试剂生产企业应建立生产管理和质量管理机构, 配备与生产相适应的管理人员和专业技术人员, 并要求至少有2名内审员, 并明确相关部门和人员的质量管理职责。

(2) 生产负责人和质量管理负责人不得互相兼任, 并且要求生产和质量的负责人应具有医学检验、临床医学或药学等相关专业知识, 有相关产品生产和质量管理的实践经验。

(3) 对从事体外诊断试剂生产企业的各级人员应经过岗前专业培训, 并且要求考核合格后方可上岗。

(4) 特别对从事高生物活性、高毒性、强传染性、强致敏性等有特殊要求的产品生产和质量检验的人员必须进行相应的专业技术培训和安全防护培训。

14.6.2 体外诊断试剂的生产企业的设施、设备与生产环境控制

(1) 要有整洁的生产环境, 厂区环境不应対生产过程和产品质量造成影响; 生产、行政、生活和辅助区布局合理。生产、研发、检验等区域应相互分开。厂房与设施不得对原材料、半成品和成品造成污染或潜在污染。

(2) 仓储区要与生产规模相适应, 各个区域应划分清楚; 所有物料的名称、批号、有效期和检验状态等标识必须明确; 台账应清晰明确, 账、卡、物应一致。

(3) 易燃、易爆、有毒、有害、具有污染性或传染性、具有生物活性或来源于生物体的物料应专区存放并有明显的识别标识, 并由专门人员负责保管, 同时做好发放记录。

(4) 对生产过程中所涉及的化学、生物及其他危险品, 企业应列出清单, 并制定相应的防护办法, 其环境、设施与设备应符合国家相关的安全规定。

(5) 生产区应有与生产规模相适应的面积和空间用以安置设备、器具、物料等, 并按照生产工艺流程明确划分各操作区域。

(6) 明确工艺所需的空气净化级别, 进入洁净室(区)的空气必须净化。

①阴性、阳性血清、质粒或血液制品的处理操作应当在至少10 000级环境下进行, 与相邻区域保持相对负压。

②酶联免疫吸附试验试剂、免疫荧光试剂、免疫发光试剂、聚合酶链反应(PCR)试剂、金标试剂、干化学法试剂、细胞培养基、校准品与质控品、酶类、抗原、抗体和其他活性类组分的配制及分装等产品的配液、包被、分装、点膜、干燥、切割、贴膜、以及内包装等工艺环节, 至少应在100 000级净化环境中进行操作; 无菌物料的分装必须在局部百级。

③普通化学类诊断试剂的生产应在清洁环境中进行。

(7) 具有污染性和传染性的物料应在受控条件下进行处理, 不应造成传染、污染

或泄漏等。高风险的生物活性物料其操作应使用单独的空气净化系统，与相邻区域保持负压，排出的空气不能循环使用。使用病原体类检测试剂的阳性血清应有防护措施。对特殊的高致病性病原体的采集、制备，应按卫生部颁布的行业标准《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》等相关规定，具备 P3 级实验室等相应设施。

(8) 体外诊断试剂生产企业应配备符合工艺要求的生产设备、符合产品标准要求的检验设备、仪器和器具，建立仪器设备台账；与试剂直接接触的设备和器具应易于清洁和保养、不与成分发生化学反应或吸附作用，不会对试剂造成污染；定期对设备的有效性进行验证。

(9) 生产中的废液、废物等应有完备的回收与无害化处理的措施，应符合相关的环保要求。

(10) 对工艺用水制水设备应满足水质要求并通过验证；必须配备水质监测的仪器和设备，定期监测并认真记录结果。

(11) 配料罐容器与设备连接的主要固定管道应标明内存的物料名称、流向，定期清洗和维护，并标明设备运行状态。

(12) 对有特殊要求的仪器、仪表，应安放在专门的仪器室内，并有防止静电、震动、潮湿或其他外界因素影响的设施。

(13) 对空气有干燥要求的操作间，应配置空气干燥设备，保证物料不会受潮变质。应定期监测室内空气湿度，并有相应记录。

14.6.3 体外诊断试剂生产企业的文件与记录控制

(1) 体外诊断试剂生产企业应按《体外诊断试剂生产实施细则（试行）》的标准要求和产品特点，阐明企业质量方针、质量目标，建立质量管理体系文件，加以实施。

(2) 应建立文件的编制、更改、审查、批准、撤销、发放及保管的管理制度。发放、使用的文件应为受控版本。已作废的文件除留档备查外，不得在工作现场出现。

(3) 企业应按程序做好记录，对记录进行控制。记录应清晰、完整、不得随意更改内容或涂改并按规定签字。

14.6.4 体外诊断试剂生产企业的设计控制与验证

(1) 企业应建立完整的产品设计控制程序，设计过程中应按照 YY/T0316 - 2003 (IDT ISO 14971: 2000)《医疗器械风险管理对医疗器械的应用》标准的要求对产品的风险进行分析和管理。

(2) 企业应建立和保存产品的技术规范和应用技术文件，包括文件清单、引用的技术标准、设计验证文件、工艺文件和检验文件。

(3) 企业应对产品主要性能、主要原辅材料、采购、生产环境及设施设备、工序、检验进行验证，并形成验证控制文件，包括验证方案、验证报告、评价和建议等，验证报告应由验证工作负责人批准。

(4) 生产一定周期后，应当对关键项目进行再验证，当影响产品质量的主要因素（如工艺、质量控制方法、主要原辅料、主要生产设备等）发生改变时、质检或用户反

馈出现不合格项时,企业应进行相关内容的重新验证。

(5) 当生产车间停产超过规定的期限,重新组织生产前企业应对生产环境及设施设备、主要原辅材料、关键工序、检验设备及质量控制方法进行验证。

14.6.5 体外诊断试剂生产企业的采购控制

(1) 体外诊断试剂生产企业应建立生产所用物料的采购控制程序并按照程序要求执行,应确定外购、外协物料清单,并明确物料的技术指标和质量要求。

(2) 应建立供方评估制度,所用物料应从合法的,具有资质和有质量保证能力的供方采购,并定期进行评估,保存其评估结果和评价记录。

(3) 按照质量要求进行采购和验收,制定入库验收准则。

(4) 主要物料按照采购控制文件的要求采购,资料应能够进行追溯,并能证明外购的标准品和质控品的来源和溯源性。

(5) 不同性状和储存要求的物料应进行分类存放,按有效期管理,并建立复验制度。

(6) 必须能够提供质控血清的来源,应由企业或医疗机构测定病原微生物及明确定值范围。应对其来源地、定值范围、灭活状态、数量、保存、使用状态等信息有明确记录,并由专人负责。

14.6.6 体外诊断试剂生产企业的生产过程控制

(1) 根据国家批准的工艺进行生产,应制定生产所需的工序流程、工艺文件和标准操作规程,明确关键工序或特殊工序,确定质量控制点,并规定应形成的生产记录,应制定各级生产控制文件的编制、验证、审批、更改等管理制度。当生产工艺变更足以影响产品安全性、稳定性时,应重新申报变更生产工艺,并按程序进行工艺修订。

(2) 明确生产、检验设备的适用范围和技术要求,建立维修、保养、验证管理制度,需要计量的器具应定期校验并有明显的合格标识。

(3) 应当按照生产工艺和空气洁净度级别的要求制定生产环境、设备及器具的清洁规程,明确清洁方法、程序、间隔时间,使用的清洁剂或消毒剂等要求,并对生产环境进行定期检查或检测,确保能够达到规定的要求。

(4) 应对每批产品中关键物料进行物料平衡核查。

(5) 批生产和批包装记录应内容真实、数据完整,经操作人及复核人签名,记录不得随意涂改,批生产记录应按批号归档,保存至产品有效期后1年。

(6) 不同品种的产品的生产应做到有效隔离,以避免相互混淆和污染。有数条包装线同时进行包装时,应采取隔离或其他有效防止混淆的措施。

(7) 前一种产品生产结束必须进行清场,确认合格后才可以入场进行其他生产,企业应保存清场记录。清场时,配制和分装器具等应当进行清洗、干燥等洁净处理,并进行验证。

(8) 应制定工艺用水的操作规程,规定工艺用水的质量标准、检验周期和保存期限并进行验证。

(9) 企业应建立产品标识和生产状态标识控制程序,对现场各类物料和生产区域、设备的状态进行识别和管理。

(10) 物料应按照先进先出的原则进行,应明确规定中间品的储存条件和期限。已被取样的包装应有取样标记。

(11) 生产和检验用的菌毒种应建立生产用菌毒种的原始种子批、主代种子批和工作种子批系统,生产用细胞应建立原始细胞库、主代细胞库、工作细胞库。应建立细胞库档案资料和细胞操作日志。自行制备抗原或抗体,应对所用原料的来源和性质有详细的记录并可追溯。

(12) 体外诊断试剂的内包装材料不应影响试剂质量产生不良影响,并应进行相应的验证,保留验证记录。

14.6.7 体外诊断试剂生产企业的检验与质量控制

(1) 应单独设立产品质量管理部门,并履行质量职责。质量检验部门应设立独立的检验室,并设置待检、检验、留样、不合格品等区域,配备专门的检验人员和必需的检验设备。有特殊要求的检验项目应根据具体要求进行设置。

(2) 应按照产品标准配备检测仪器,并建立档案和台账,账、卡、物应一致。

(3) 应建立留样复验制度,规定留样比例、留样检验项目、检验周期和判断准则。留样品应在适宜条件下储存,以保证复验要求,应建立留样品台账,留样记录应注明留样品批号、效期、检验日期、检验人、检验结果等信息,留样期满后,企业应对留样结果进行汇总、分析并归档。

(4) 对不具备检测能力的外购物料,企业应制定验收规程。如委托检验,受托方应当具备相应的资质条件,企业应有委托检验协议,并保存检验报告和验收记录。如试样,企业应有试样验证的验收规程和记录,并保存试样批号、试样生产记录、检测报告、操作人员签字、批准人员签字等相关记录。

(5) 企业应有符合产品标准要求的出厂检验控制程序和记录,应有检验人员和产品放行批准人的签字。检验报告及记录应真实、字迹清晰、不得随意涂改和伪造,产品的检验记录应具有可追溯性。

(6) 企业应定期实施内部质量审核和管理评审,按照本细则要求对企业内部质量管理体系的运行状况进行审核并出具审核报告。

(7) 包装标识、标签、使用说明书应符合法规要求,经企业质量管理部门校对后印制、发放、使用、销毁。

14.6.8 体外诊断试剂生产企业的产品销售与客户服务控制

(1) 企业应建立销售记录。销售记录内容应包括:品名、批号、效期、数量、收货单位和地址、联系人、发货日期、运输方式,销售记录应保存至产品有效期后1年。

(2) 企业应指定部门负责调查、接收、评价和处理顾客反馈意见,并保存记录。应定期汇总和分析用户的反馈信息,及时通报相关部门,采取必要的纠正和预防措施。

(3) 企业应建立产品退货和召回的程序并保存记录,记录内容应包括:品名、批

号、规格、效期、数量、退货和召回单位及地址、退货和召回原因及日期、处理意见,因质量原因退货和召回的产品,应在质量管理部门的监督下销毁。

14.6.9 体外诊断试剂生产企业的不合格品控制、纠正和预防措施

(1) 企业应对不合格品控制的职责、权限进行规定,不合格品要有明显的标识,专区存放,以防止非预期使用。

(2) 企业应按照不合格品控制程序进行处理并保存记录。

(3) 质量管理部门应会同相关部门对不合格品进行评审,确认产品不合格的原因,并采取相应的纠正和预防措施,应保存评审、纠正和预防措施的记录,并在采取纠正或预防措施之后,验证其有效性。

14.6.10 体外诊断试剂生产企业的不良事件、质量事故报告制度

(1) 企业应建立产品不良事件监测报告制度,指定专门机构或人员负责管理。

(2) 企业应对用户的产品质量投诉进行详细记录和调查处理。对发生的不良事件、质量事故应按规定报告相关监管部门,对不良事件或质量事故进行及时的评估,必要时将评估结果通知用户和报告监督管理部门。

14.7 GMP 与 ISO9000 的比较

自国家实施 GMP 认证以来,特别是 GMP 提速到 2004 年 6 月 30 日之前完成,我国制药企业的 GMP 工作有了实质性的进展,制药行业的员工对 GMP 的认识已经逐步深入并贯彻执行到生产过程中。但对通过第三方认证加盟 ISO9000 族,却知之甚少,作为体外诊断试剂生产企业对 ISO9000 认证工作要有一定的思想准备,提前做好工作。

14.7.1 ISO9000 的概念

ISO9000 是国际标准化组织 (ISO) 于 1987 年发布的关于质量管理和质量保证的系列标准。自问世以来已得到世界上近百个国家和地区的普遍采用,从而成为国际上的供方质量保证体系和实施质量体系的统一标准。ISO9000 族标准的颁布将各国质量管理和质量保证的原则和方法进行了统一,使全球的质量管理和质量保证走向规范化和统一化。ISO9000 族标准适用于各种类型的组织,如:生产企业、服务行业、设计研究部门、管理部门。

通过取得 ISO9000 认证能带来如下的益处。

(1) 强调以顾客为中心的理念,明确公司通过各种手段去获取和理解顾客的要求,确定顾客要求,通过体系中各个过程的运作满足顾客要求甚至超越顾客要求,并通过顾客满意的测量来获取顾客满意程度的感受,以不断提高公司在顾客心中的地位,增强顾客的信心。

(2) 明确要求公司最高管理层直接参与质量管理体系活动,从公司层面制定质量方针和各层次质量目标,最高管理层通过及时获取质量目标的达成情况以判断质量管理

体系运行的绩效,直接参与定期的管理评审掌握整个质量体系的整体状况,并及时对于体系不足之处采取措施,从公司层面保证资源的充分性。

(3) 明确各职能和层次人员的职责权限以及相互关系,并从教育、培训、技能和经验等方面明确各类人员的能力要求,以确保他们是胜任的,通过全员参与到整个质量体系的建立、运行和维护活动中,以保证公司各环节的顺利运作。

(4) 明确控制可能产生不合格产品的各个环节,对于产生的不合格产品进行隔离、处置,并通过制度化的数据分析,寻找产生不合格产品的根本原因,通过纠正或预防措施防止不合格产品的发生或再次发生,从而不断降低公司发生的不良质量成本,并通过其他持续改进的活动来不断提高质量管理体系的有效性和效率,从而实现公司成本的不断降低和利润的不断增长。

(5) 通过单一的第三方注册审核代替累赘的第二方工厂审查,第三方专业的审核可以更深层次地发现公司存在的问题,通过定期的监督审核来督促公司的人员按照公司确定的质量管理体系规范来开展工作。

(6) 获得质量体系认证是取得客户配套资格和进入国际市场的敲门砖,也是目前企业开展供应链管理很重要的依据。

14.7.2 GMP 与 ISO9000 的异同点

GMP 与 ISO9000 的目的都是保证产品质量,确保产品质量达到一定的要求;都是通过对影响产品质量的因素实施控制来达到确保产品质量的目的;都强调从事后把关变为预防为主,实施工序控制,变管结果为管因素;都是对生产和质量管理的基本要求;而且标准是随着科学技术和生产的发展而不断发展和完善的。

GMP 是国际药品生产质量管理的通用准则,只适用于药品生产企业,绝大多数国家或地区的 GMP 是强制性标准,具有法律效力,它的实施具有强制性,其所规定的内容不得增删。

ISO9000 是由国际标准化组织 (ISO) 颁布的关于质量管理和质量保证的标准体系,是推荐性的技术标准,适用于各行各业,ISO9000 的推进、贯彻、实施是建立在企业自愿基础上的,可进行选择、删除或补充某些要素,随着国际贸易市场竞争的不断加剧,ISO9000 质量管理体系的认证会进一步普及。

(王云龙)

参考文献

- 1 陈石根,周润琦. 酶学. 上海: 复旦大学出版社, 1996
- 2 陈文斌,潘祥林. 诊断学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2007
- 3 船津胜,鹤大典. 溶菌酶. 济南: 山东科学技术出版社, 1982
- 4 丁桂凤,等. 医学免疫学纲要. 北京: 北京医科大学-中国协和医科学联合出版社, 1992.
- 5 郭勇,郑穗平. 酶学. 广州: 华南理工大学出版社,
- 6 国家食品药品监督管理局. 体外诊断试剂生产企业质量管理体系考核评定标准(试行). 2007
- 7 国家食品药品监督管理局. 药品注册管理办法. (试行). 2002
- 8 国食药监械[2007] 229号《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》, 2007
- 9 国际临床诊断试剂产业化现状及我国发展的建议. 医药. 2005. 6
- 10 何金昌. 尿液分析与临床诊断. 深圳: 海天出版社, 1993
- 11 何俊森,等. 医学免疫学. 郑州: 河南科学技术出版社, 1993
- 12 黄香宜,汪娇宁,任吉存. 高灵敏的化学发光微流控电泳芯片检测系统的研究. 高等学校化学学报. 2004 (21) 56~63
- 13 蒋成淦. 酶免疫测定法. 北京: 人民卫生出版社, 1984
- 14 焦奎,张书圣. 酶联免疫分析技术及应用, 北京: 化学工业出版社, 2004
- 15 吉尔鲍特,酶法分析手册, 上海: 上海科学技术出版社, 1983
- 16 孔繁德,黄印尧,赖清. 金免疫胶体金技术及其发展前景. 福建省科协第二届学术年会, 2002 (福建畜牧兽医. 2002 S1)
- 17 李林林. 基于磁球技术的DNA单分子的体积放大以及电化学检测. 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 2008 (01)
- 18 李振甲,王仁芝. 激素的放射免疫分析. 北京: 科学技术文献出版社, 1985
- 19 李艳,张平安,邵华. 感染免疫试验诊断与分析. 北京: 人民军医出版社, 2006
- 20 梁冰,李慧. 临床检验操作技术系列丛书. 微生物学检验分册. 北京: 军事医学科学出版社, 2007
- 21 刘谦,朱鑫泉. 生物安全. 北京: 科学出版社, 2001
- 22 刘真,等. 抗精氨酸加压素血清的制备及其初步应用. 动物学报, 1987, 33: 309~315
- 23 倪灿荣,马大烈,戴益民. 免疫组织化学实验技术及应用, 北京: 化学工业出版社, 2006
- 24 宁朝佑,等. 催产素的放射免疫分析. 中华核医学杂志, 1987, 7: 224~497
- 25 世界卫生组织. 实验室生物安全手册 第3版: 中文版. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2005
- 26 Sikoka K, Smedrey H N. 单克隆抗体. 上海: 科学技术文献出版社, 1987
- 27 宋卫青,于维林,辛苏宁. 临床检验操作技术系列丛书, 质量管理分册 北京: 军事医学科学出版社, 2007

- 28 陶义训. 免疫学和免疫学检验. 北京: 人民卫生出版社, 1988
- 29 童竞亚. 医学免疫学与微生物学第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2000
- 30 汪美先. 免疫学基础. 西安: 陕西科学技术出版社, 1983
- 31 王成海, 等. 强啡肽 A1-13 的放射免疫测定. 中国药理学报, 1987; 8: 494~497
- 32 王雍晋. 现代临床检验学. 北京: 人民军医出版社, 2007
- 33 Wright, TG. ELISA 在临床检验中的应用. 郑永晨, 等译, 吉林: 吉林科学技术出版社, 1992
- 34 吴海波, 张勇. 胶体金免疫层析快速诊断技术及其在临床中的应用. 2007 年浙江省医学病毒学、医学微生物学与免疫学学士年会论文汇编
- 35 吴健民. 临床化学自动化免疫分析. 北京: 科学出版社, 2000
- 36 吴敏毓, 等. 医学免疫学. 合肥: 中国科技大学出版社, 1993
- 37 卫生部临床检验中心. 2009 临床检验室间质量评价计划
- 38 夏宗勤. 实验核医学与核医学. 上海: 同济大学出版社, 1989
- 39 邢培清. 实用输血检验. 郑州: 郑州大学出版社, 2001
- 40 许屏. 荧光和荧光染色技术及应用. 北京: 人民卫生出版社, 1983
- 41 邢文革. 临床实验室质量管理. 第一届全国现代免疫诊断技术学术研讨会论文汇编. 2002
- 42 许春向. 生物传感器及其应用. 北京: 科学出版社, 1993
- 43 熊立凡, 刘成玉. 临床检验基础. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2008
- 44 杨延彬, 王钦富, 张正, 等. 免疫学与免疫学检验. 北京: 人民卫生出版社, 1998
- 45 尹伯元. 放射免疫测定基础. 天津: 天津科学技术出版社, 1985
- 46 尹伯元. 放射免疫分析在医学中的应用. 北京: 原子能出版社, 1991
- 47 于兆林. 生物传感器. 上海: 上海远东出版社, 1992
- 48 俞永霆, 李太华, 董德祥. 生物安全实验室建设. 北京: 化学工业出版社, 2006
- 49 于玺华. 现代空气微生物学. 北京: 人民军医出版社, 2002
- 50 赵惠扬, 张承刚. 实用核医学. 太原: 山西人民出版社, 1984
- 51 郑武飞等. 医学免疫学. 北京: 人民卫生出版社, 1989
- 52 周国安, 唐巧英. 生物制品生产规范与质量控制. 北京: 化学工业出版社, 2004
- 53 周光英. 免疫学原理. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000
- 54 周国安. 生物制品生产规范与质量控制. 北京: 化学工业出版社, 2004
- 55 周晓云. 酶技术. 北京: 石油工业出版社, 1995
- 56 中国药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005
- 57 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程 2000 年版. 北京: 化学工业出版社, 2000
- 58 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品主要原辅材料指控标准. 北京: 化学工业出版社, 2000
- 59 朱守一. 生物安全与防治污染. 北京: 化学工业出版社, 1999
- 60 祝元祥, 等. β -内啡肽的抗血清制备及其放射免疫测定. 第二军医大学学报, 1986, 7: 332~336
- 61 Abbas Ak, et al. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia W. B. Saunders Co. 1991
- 62 Dixon M. Enzymes. New york: Longman Press, 1979

-
- 63 Frobert Y, Grassi J. *Methods in Molecular Biology*, N. J. : Humana Press Totowa, 1992
 - 64 Jaklitsch A. *Enzyme mediated Immunoassay*, New York: Plenum Press, 1985
 - 65 Maohly AC, Chance B, *Method of Biochemical Analysis*. New York: 1954
 - 66 Mathis G, Lehn J M. 5th International symposium on quantitative luminescence spectrometry in biomedical sciences, Belgium: Univerity of Ghent, 1993
 - 67 Pasternak, CA. *Radioimmunoassay in Chinical biochemistry*. London Heyden, 1975
 - 68 Roitt I. M. *Essential Immunology*, 7th ed. London Black well Scientific Publications, 1991
 - 69 Stites DP. Terr AI. *Basic and Clinical Immunology*. 8th ed, 1994



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE