

# 第九章

## 酶免疫分析技术

# 酶免疫技术的特点与分类

---

- **特点：酶的高效催化作用 放大作用**  
**抗原抗体的特异性反应**
- **免疫组化技术（immunohistochemical technique）**  
组织切片或其他标本中抗原或抗体的定位
- **免疫测定（immunoassay）**  
液体标本中抗原或抗体的测定  
抗原抗体反应后是否需要分离结合的与游离的酶标记物而分为均相（homogenous）和异相（heterogenous）

# • 技术要点

---

## (一) 固相载体

结合容量高 吸附抗原/抗体后保留其免疫活性

形状主要有三种：小试管、小珠和微量反应板

微量反应板最常用

\*微孔滤膜，如硝酸纤维素膜、尼龙膜

## (二) 抗原和抗体 抗原纯度高 抗体效价高 亲和力强

天然抗原、重组抗原和合成多肽抗原抗体

抗体：多克隆的和单克隆 多克隆----提纯特异性IgG

## (三) 免疫吸附剂

包被 (coating)

封闭 (blocking)

## (四) 酶和底物

### 酶

特点：纯度高

催化效率高

专一性强

性质稳定

\*来源、价格、制备成的酶标抗体或抗原性质稳定、最好在受检标本中不存在相同的酶。底物应易于制备和保存，价格低廉，有色产物易于测定，光吸收高。

常用酶：辣根过氧化酶（HRP）碱性磷酸酶（AP）

- **HRP**: 糖蛋白, 含糖量约18% 分子量44kD  
复合酶, 由主酶(酶蛋白)和辅基(亚铁血红素) HRP的纯度用RZ  
(ReinheitZahl, 纯度数)

RZ=403nm的吸光度与280nm的吸光度之比

RZ≥3.0

常用的供氢体底物:

邻苯二胺(orthopenylenediamine, OPD)

四甲基联苯胺(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB)

ABTS[2, 2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazolinesulfonate-6)]

- **碱性磷酸酶(AP)**:

大肠杆菌提取AP分子量80kD, 最适pH为8.0;

小牛肠粘膜提取的AP分子量为100kD, 最适pH为9.6

底物: 对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenylphosphate, p-NPP)

- **其它**: 葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和脲酶  $\beta$ -半乳糖苷酸的底物常用4-甲基伞基- $\beta$ -D半乳糖苷(4-mehtyumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside), 经酶水解后产生荧光物质4-甲基伞酮(4-mehtylumbelliferone), 可用荧光计检测

## (五) 结合物

**抗体:** 特异性好 高亲和力 高效价

**抗原:** 高纯度 抗原性完整

**制备方法:**

### 1. 戊二醛交联法

双功能团试剂, 可以使酶与蛋白质或其他抗原的氨基通过它而偶联

一步法 (如连接AP), 二步法 (如连接HRP)

### 2. 过碘酸盐氧化法

只用于HRP的交联

过碘酸盐将其分子表面的多糖氧化为醛基, 而与抗体蛋白中的氨基形成Schiff's碱, 硼氢化钠终止反应

**\*\* 标记抗体的鉴定: 棋盘滴定**

# 均相酶免疫测定

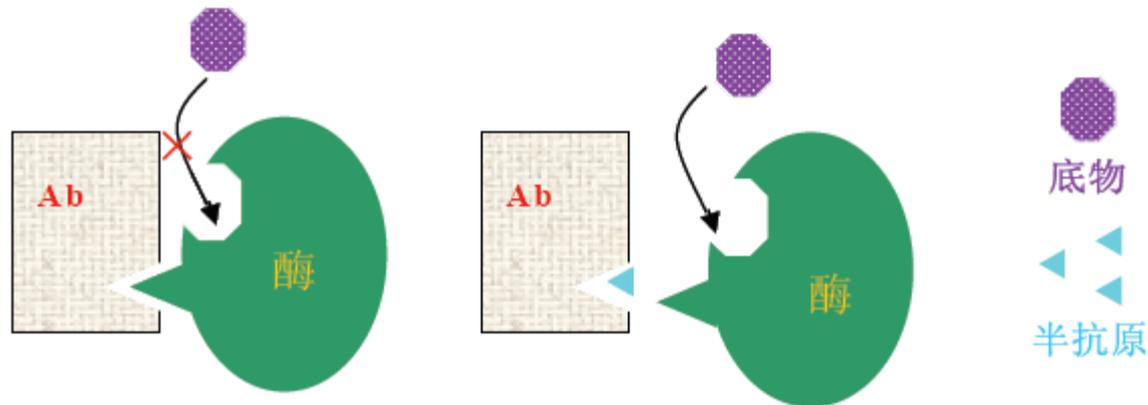
抗原竞争  $10^{-9}\text{mol/L}$  自动化

## 一、酶扩大免疫测定技术

(enzyme-multipliedimmunoassaytechnique, EMIT)

半抗原与酶结合成酶标半抗原

酶标半抗原与抗体结合后酶的活性中心受影响而活性被抑制



EMIT原理示意图

# 克隆酶供体免疫测定

(clonedenzymedonorimmunoassay,CEDIA)

## 重组DNA技术

大片段称为酶受体 (enzymeacceptor, EA)

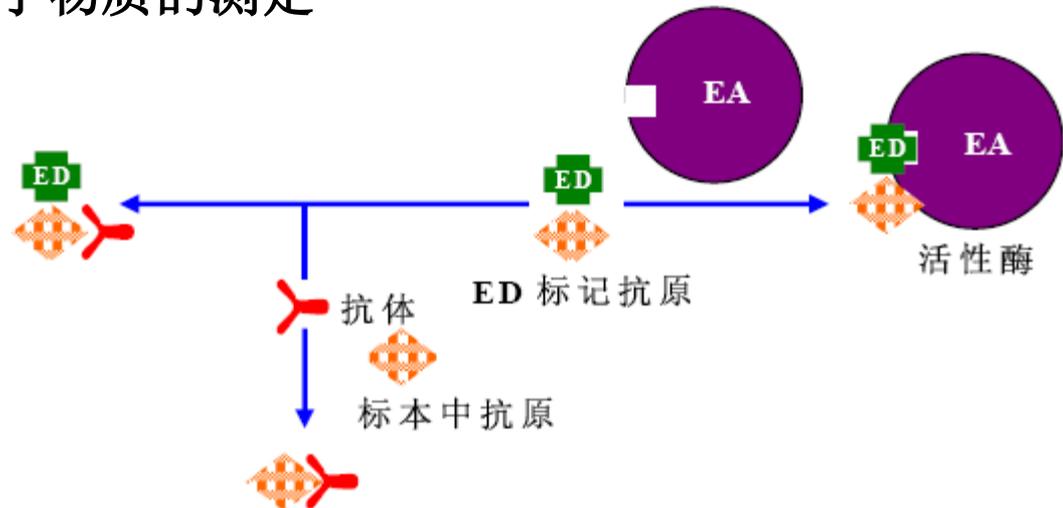
小片段称为酶供体 (enzymedonor, ED)

\*\*单独不具酶活性, 结合在一起就具有酶活性。

ED标记的抗原 竞争法

主要用于药物和小分子物质的测定

CEDIA原理示意图



- **酶联免疫吸附试验（enzymelinkedimmunosorbentassay, ELISA）**

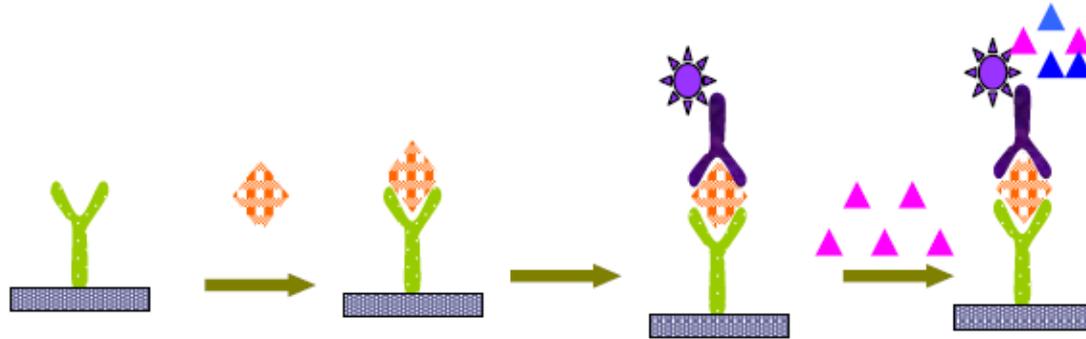
1971年Engvall和Perlmann

IgG定量测定

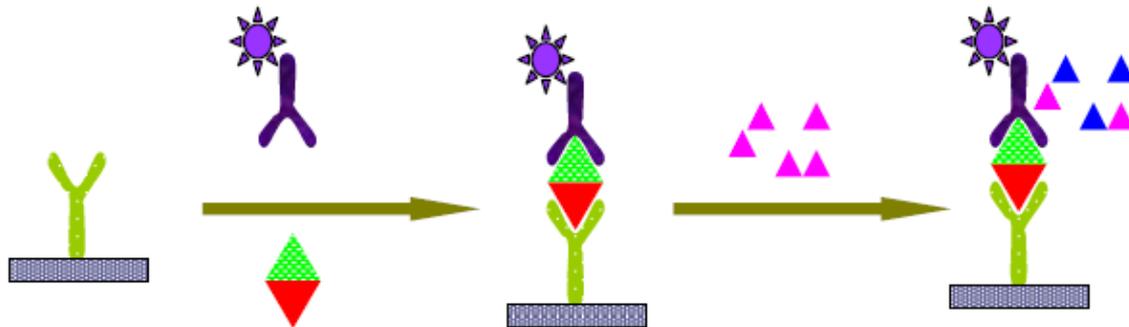
一、基本原理：

1. 包被
  2. 酶的标记
  3. 抗原抗体反应
  4. 洗涤
  5. 显色
  6. 检测及定性或定量
- \*\*酶的催化效能 高敏感度  
抗原抗体 高特异性

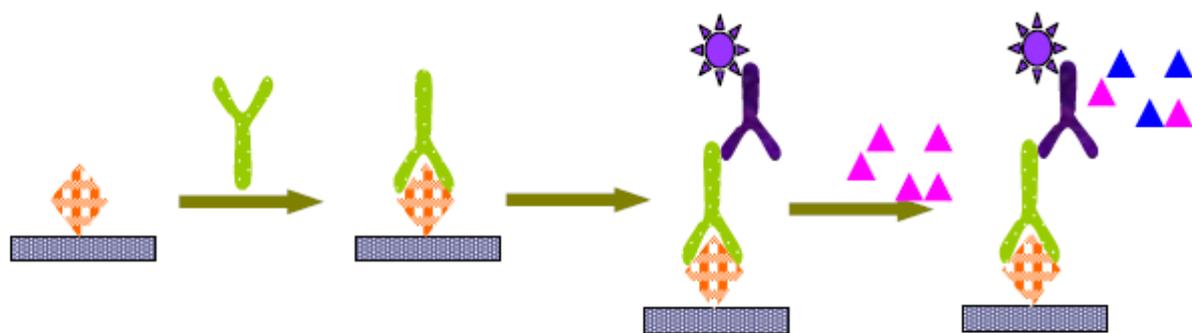
## 二、方法类型



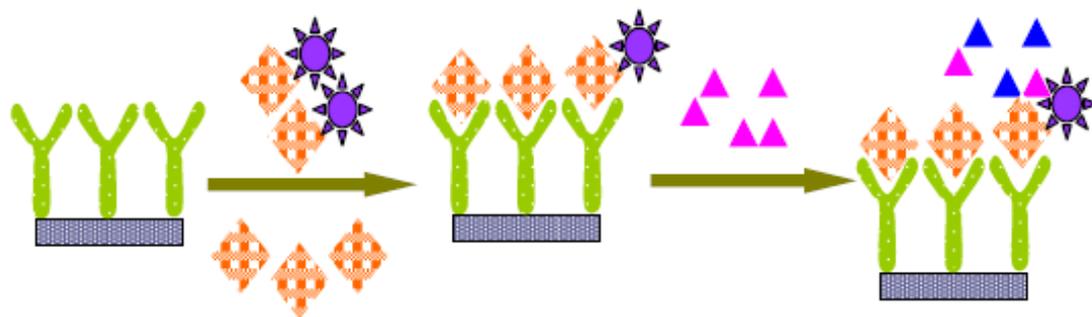
双抗体夹心法



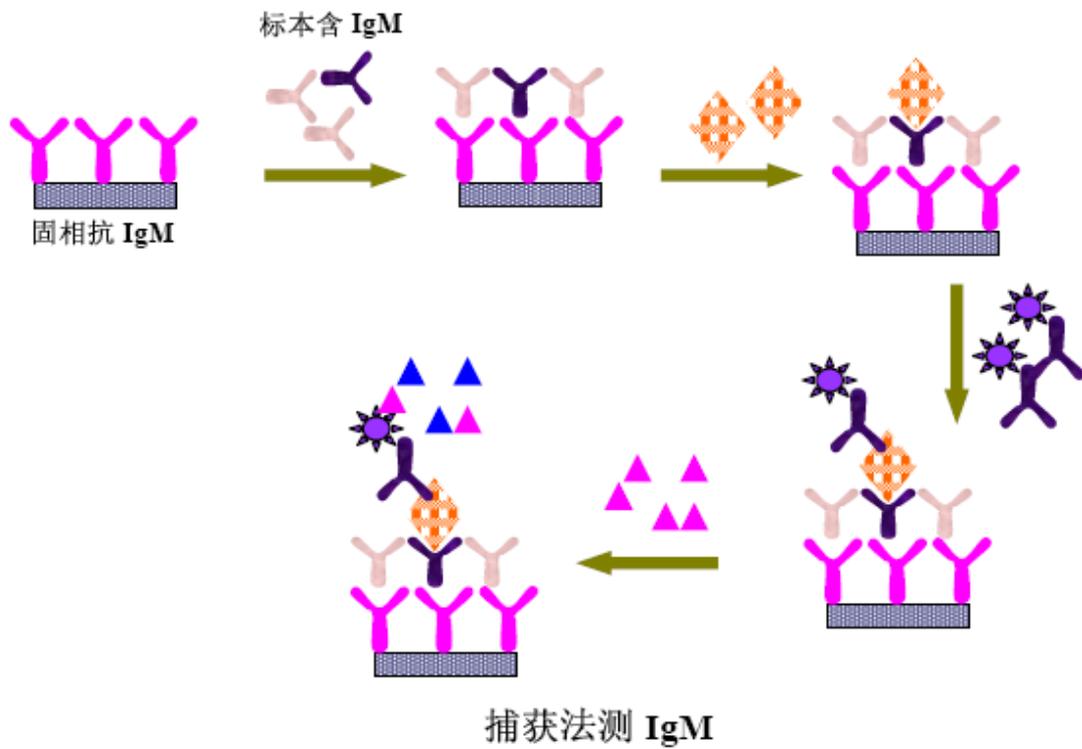
双位点一步法



间接法测抗体



竞争法



# 酶联免疫检测仪

---



# • 酶免疫测定的应用

---

## 半自动和自动化分析

### 均相酶免疫测定主要用于:

- 1、非肽类激素如T3、T4、雌激素、皮质醇等。
- 2、药物和毒品如地高辛、苯巴比妥、庆大霉素、吗啡等

### 非均相酶免疫测定主要用于:

- 1、病原体及其抗体的检测 病毒肝炎病毒、风疹病毒、疱疹病毒、轮状病毒等；细菌如链球菌、结核分枝杆菌、幽门螺杆菌和布氏杆菌等；寄生虫如弓形体、阿米巴、疟原虫等。
2. 蛋白质各种免疫球蛋白、补体组分、肿瘤标志物（例如甲胎蛋白、癌胚抗原、前列腺特异性抗原等）、各种血浆蛋白质、同工酶（如肌酸激酶MB）、激素（如HGG、FSH、TSH）。