

TECHNOTE 308 免疫检测技术原理及分类



Enriching Biotechnology

Telephone: +86 021 55809378

E-mail address: marketing@bio-enriching.com

一. 免疫检测技术

免疫检测技术是基于抗原-抗体反应的检测技术，抗原是指一类能够刺激动物机体的免疫系统，诱导发生免疫应答，产生体液免疫的抗体和（或）细胞免疫的效应淋巴细胞，并与之反应的物质。抗体是指机体在对抗原刺激的免疫应答中，由B淋巴细胞产生的一类糖蛋白。抗原抗体的相互作用是所有免疫化学技术的基础，抗原与相应的抗体会发生特异性的结合，这种反应可以在体内发生也可以在体外发生。

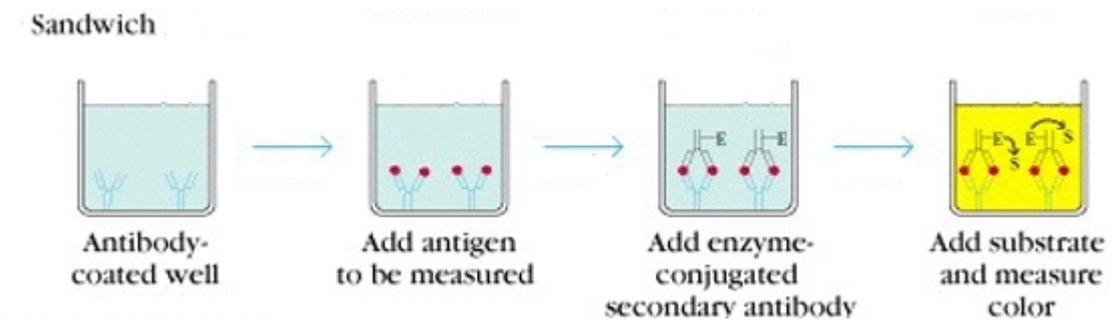
人们在免疫检测技术中引入了标记技术，提高了检测灵敏度，达到了定量检测的目的。标记免疫技术是指用荧光素、酶、放射性同位素等标记抗体或抗原，通过抗原抗体反应以检测相应抗原或抗体的技术。根据标记物是否具有放射性，又可将标记免疫检测技术分为放射免疫检测和非放射免疫检测两大类，其中非放射免疫检测又可分为酶免疫检测、荧光免疫检测、化学发光免疫检测。

二. 标记免疫检测的原理

标记免疫检测技术的检测原理基本类似，唯一不同的是标记物的改变。而根据抗原分子本身的不同性质，分别可采用双抗体夹心法、间接法、竞争法、抑制法等方法。

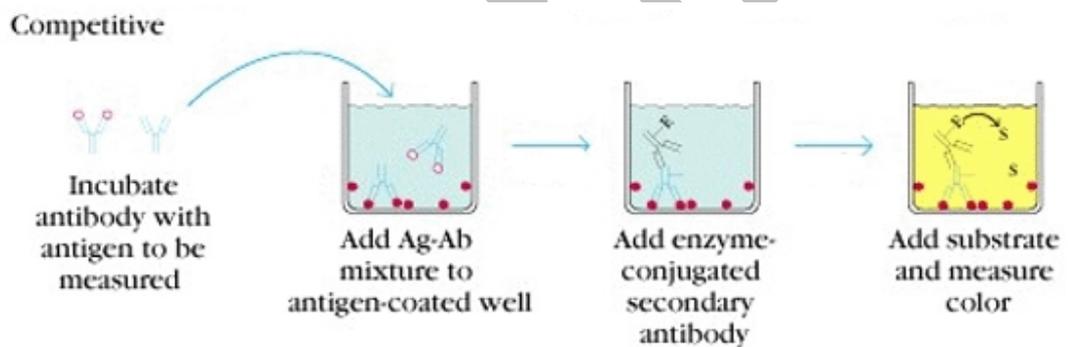
2.1 夹心法

夹心法是酶联免疫检测过程中非常经典的检测方法。其检测原理是利用一个**抗原能够与多个不同的抗体特异性结合**的特点。具体操作步骤如下：①将特异性的抗体包被在固相载体上（如**疏水性的聚苯乙烯板**），孵育一段时间后，洗去未结合的抗体和杂质；②再加入待测的抗原样品溶液；③加入标记过的特异性抗体与抗原反应；④加入底物溶液，显色。这种方法适用于检测各种蛋白质大分子，但不能用于半抗原等小分子的检测。



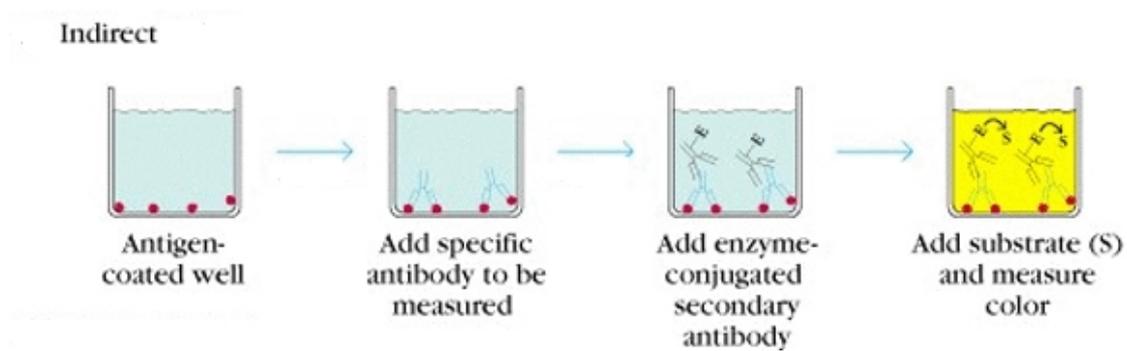
2.2 竞争法

竞争法可以用于检测抗原，也可以用于检测抗体。小分子的抗原或半抗原就可以用竞争法来检测。操作步骤如下：①将特异性的抗体（抗原）与固相结合形成固相抗体（抗原）②再加入待测的抗原（抗体）样品溶液；③加入标记过的抗体（抗原）；④加入底物溶液，显色。在受检的样品中，待测物质的含量越低，标记过的抗体（抗原）越能顺利地与固相抗原（抗体）结合。所以，受检样品中待测物质的含量越高，检测信号值越低。



2.3 间接法

间接法是检测抗体最常用的方法，原理是利用酶标记的二抗检测已与固相结合的特测抗体。操作步骤如下：①将特异性的抗原包被在固相载体上（氨基包被的96孔板与抗原用戊二醛进行交联反应），孵育一段时间后，洗去未结合的抗原和杂质；②再加入待测的抗体样品溶液；③加入标记过的二抗与抗体反应；④加入底物溶液，显色。采用本法进行检测时，只需更换不同的固相抗原，可以用同一种标记的二抗检测各种与抗原相应的抗体。



三. 标记免疫检测技术种类

3.1 放射免疫检测技术

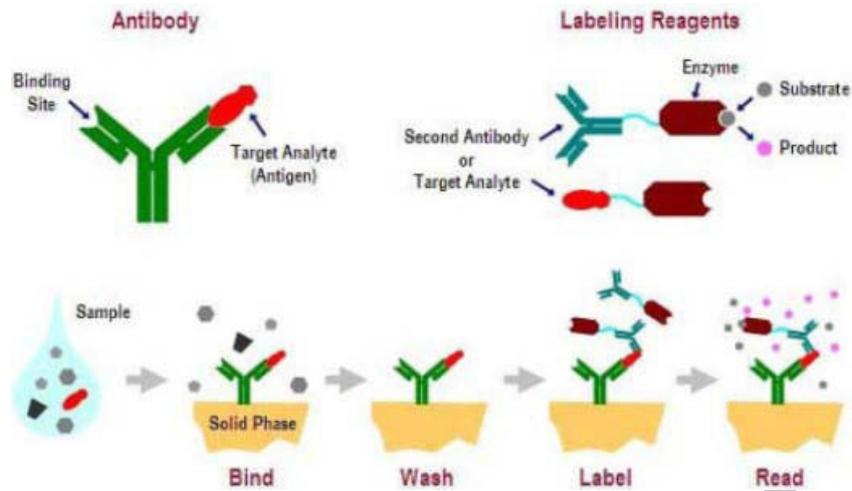
放射免疫检测技术 (Radio immunoassay, RIA) 是由美国科学家 Yalow 和 Berson 在 1959 年利用放射物标记抗原或抗体建立的。它是将具有高灵敏度的放射性核素示踪技术和特异性免疫化学技术相结合而建立的新方法。该技术利用核素标记物的放大效应, 改善了待测物的检测下限, 同时以抗体或抗原作为结合试剂, 大大提高了检测方法的特异性, 最常用的标记物有 ^{125}I 、 ^{121}I 、 ^3H 。放射免疫技术具有灵敏度高、特异性强、重复性好等优点, 广泛应用于相关疾病的诊断, 但其存在试剂有放射性污染、标记物半衰期短、试剂不易保存、需要专人操作、程序复杂等缺点, 正逐渐被非放射免疫检测技术所取代。

3.2 荧光免疫检测技术

荧光免疫检测技术 (fluorescence immunoassay, FIA) 是由 Conn 等首创于 20 世纪 40 年代的一种标记免疫学技术。其所用标记物是荧光素和荧光染料, 异硫氰酸荧光素 (FITC) 是应用的最为广泛的荧光标记物, 它与蛋白质上自由氨基结合。将抗原或抗体用荧光物质标记后与相应抗原或抗体结合, 在荧光显微镜或紫外线照射下, 检测荧光强度和荧光现象的一种检测方法。这种检测方法具有灵敏度高、不受自然荧光本底干扰、稳定性好等优点, 已广泛地应用于医学检验和基础研究中。但是这一技术的成本较高, 并且荧光素往往会产生生物学毒性, 导致抗体或抗原的灵敏度和选择性下降。

3.3 酶免疫检测技术

酶标记的酶免疫分析 (Enzyme immunoassay, EIA) 是继 RIA 和 FIA 之后建立起来的一项将酶反应的高效性与免疫反应的特异性有机结合的标记免疫学技术。最早是由 Engvall 和 Perlmann 与 Van Weemen 和 Schuurs 同时建立, 并用于医学研究。从建立到现在最经典是 Clark 和 Adams 在 1977 年建立的双抗体夹心法。主要是利用免疫复合物上的酶将特定的底物转化为特定的颜色, 再利用仪器检测信号。常用的标记酶有过氧化物酶 (POD)、碱性磷酸 (AP)、葡萄糖氧化酶 (GOD) 等。这一检测技术具有灵敏度高、操作简便、重复性好等优点。



3.4 化学发光免疫检测技术

化学发光免疫检测技术（Chemiluminescence immunoassay, CLIA）是由Halman在1977年时将化学发光反应系统与免疫检测系统相结合创立的。该方法兼有发光分析的高灵敏度和免疫反应的特异性。其基本原理与酶标记分析法相同，是用能够发生化学发光反应的试剂标记抗原或抗体，标记后的抗原和抗体与待测物经过一系列的免疫反应和理化步骤(如离心分离、洗涤等)，最后用相应的化学发光底物定量检测待测物。这一检测方法具有灵敏度高、标记物有效期长、可实现自动化等优点。