



# 酶免疫技术



# 本章要点

- 1 酶联免疫吸附试验的原理、方法类型、应用及注意事项。
- 2 酶免疫分析技术的分类。
- 3 常用的酶及酶的底物。
- 4 其他酶免疫技术的基本原理及应用。



# 目录

## CONTENTS

01

**酶标志物  
的制备**

02

**酶联免疫  
吸附试验**

03

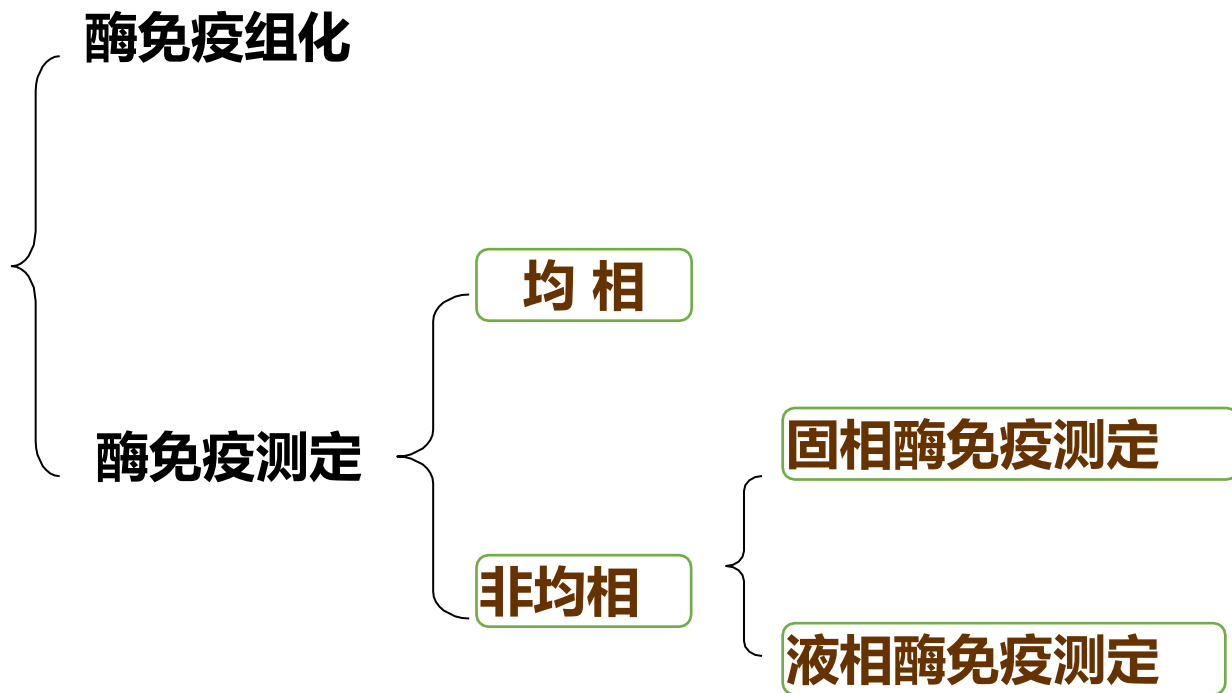
**其他酶免  
疫技术**



# 前言

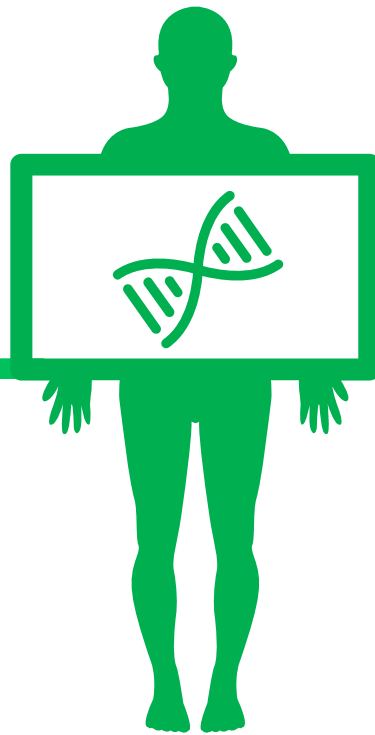
- 酶免疫分析技术是以酶标记抗原或抗体为主要试剂，检测样本中相应的抗体或抗原。
- 将抗原抗体反应的**特异性**和酶催化底物的放大作用和高**敏感性**相结合的一种免疫检测技术。

# 酶免疫技术





# 01 酶标志物的制备





# 酶标志物的制备

## 一、常用的酶和底物

### 标记酶的条件：

- 1.活性高，纯度高
- 2.作用专一性强
- 3.性质稳定，易与抗原或抗体偶联
- 4.测定方法简便易行、敏感、精确
- 5.酶和底物对人体无害且价廉易得



# 常用酶

## 1.辣根过氧化物酶 ( HRP )

糖蛋白 ( 主酶 )  
亚铁血红素 ( 辅基 )  
主酶与酶活性无关  
辅基是酶的活性中心

RZ值与酶活性无关，酶活性单位比RZ值更为重要

RZ值越大纯度越高

ELISA中应用最为广泛的标记用酶

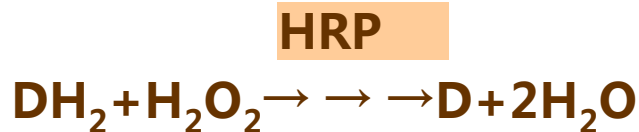






# 酶标志物的制备

## HRP的底物



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为受氢体，不稳定，需在用前临时配置。  
供氢体DH<sub>2</sub>习惯上被称为底物，底物有多种。

# 常用酶



## HRP的常见底物

OPD反应后显橙黄色，加酸终止反应后呈棕黄色，测定波长492nm。不稳定，致癌性。



TMB反应后显蓝色，加酸终止反应后变为黄色，测定波长450nm，稳定，无致癌性，ELISA中应用最广泛的底物。



# 常用酶

## 2.碱性磷酸酶

是一种磷酸酯水解酶，从大肠杆菌中提取。

ALP 底物

对-硝基苯磷酸酯 ( pNPP )

经AP作用后的产物为黄色对硝基酚，最大吸收峰波长为405nm。



# 酶标志物的制备

## 二、制备酶标记抗体(抗原)的方法

制备酶标记物的方法应符合简单、产量高，避免酶、抗体（抗原）、酶标记物各自形成聚合物，标记反应不影响酶的活性和抗原抗体的免疫反应性等原则。

主要方法：戊二醛交联法

改良过碘酸钠法



# 酶标志物的制备

## 三、酶标记物的纯化与鉴定

**纯化**的方法较多，分离大分子混合物的方法均可应用。常用的是凝胶层析法和硫酸铵盐析法，硫酸铵盐析法操作简便。

酶标记物的**鉴定**主要有：

- 1、酶活性和抗体（抗原）免疫活性的鉴定
- 2、酶标记率的测定



# 酶标志物的制备

## 四、固相载体

### (一) 固相载体的要求

- ①结合抗体或抗原的容量大；
- ②与抗原或抗体结合稳定且不易脱落；
- ③不影响所固定的抗体或抗原的活性；
- ④固化方法应简便、快速。



# 酶标志物的制备

## 四、固相载体

### (二) 固相载体的种类

1. **塑料制品** 由聚苯乙烯、聚氯乙烯制成。形状主要有微量反应板、小试管和小珠三种

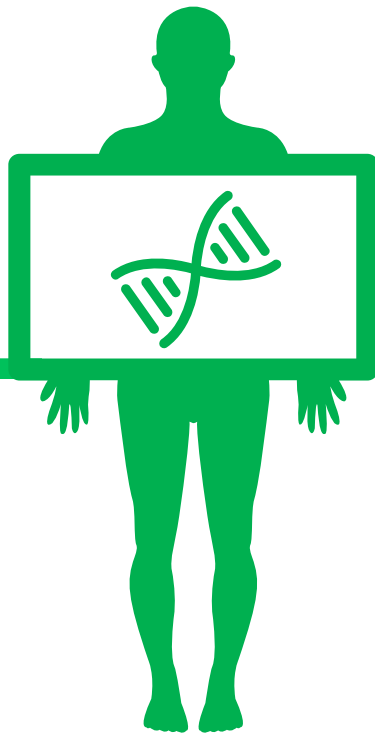
2. **微粒** 微颗粒是由高分子单体聚合成的微球或颗粒。

3. **膜载体** 是一种多孔薄膜过滤材料，包括硝酸纤维素膜（NC）、玻璃纤维素膜等。



02

# 酶联免疫 吸附试验







# 酶联免疫吸附试验

## 一、ELISA的检测原理

将已知抗原或抗体吸附在固相载体表面，使抗原抗体反应在固相表面进行，用洗涤的方法将固相上的抗原抗体复合物与液相中的游离成分分开。加入酶的底物后，通过酶对底物催化的显色反应程度，对标本中抗原或抗体进行定性或定量。



# 酶联免疫吸附试验

## 二、ELISA的方法类型

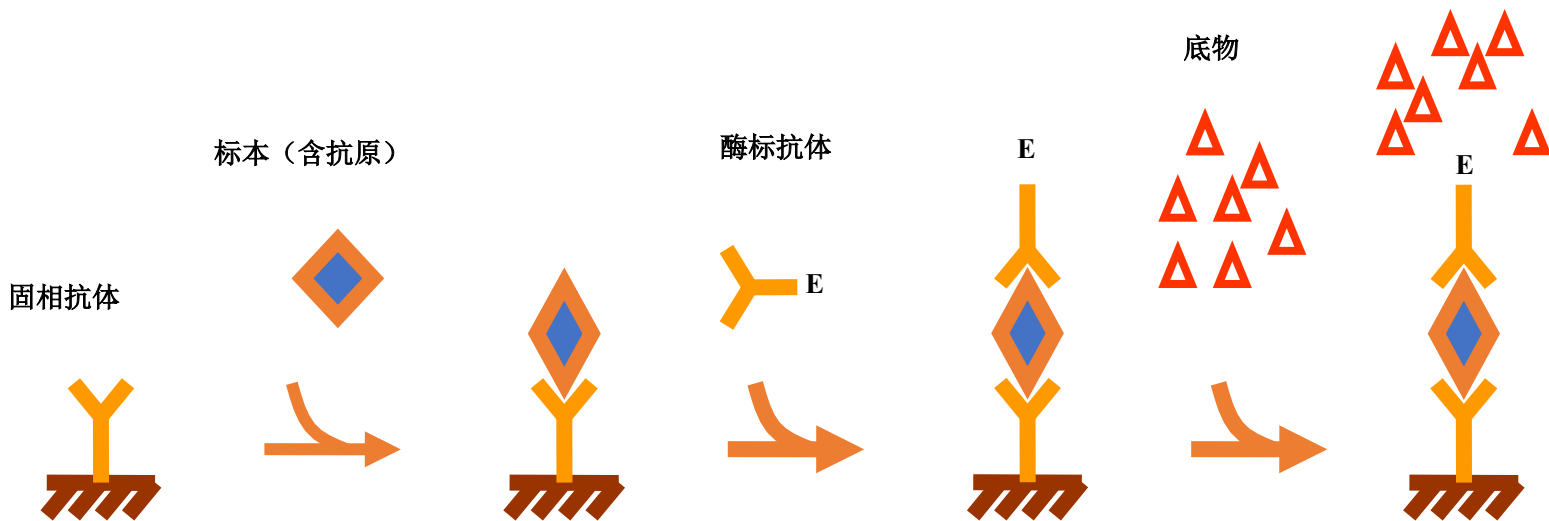
### (一) 双抗体夹心法

双抗体夹心法是检测抗原最常用的方法，适用于检测含有至少两个抗原决定簇的较大分子抗原的测定。



# 酶联免疫吸附试验

## (一) 双抗体夹心法





# 酶联免疫吸附试验

## (一) 双抗体夹心法

如果血清标本中含有类风湿因子 ( RF ) , 则可出现假阳性反应。因为类风湿因子是一种抗变性IgG的自身抗体, 它可同时与固相抗体和酶标抗体的Fc段发生结合, 导致假阳性的出现。



# 酶联免疫吸附试验

## 二、ELISA的方法类型

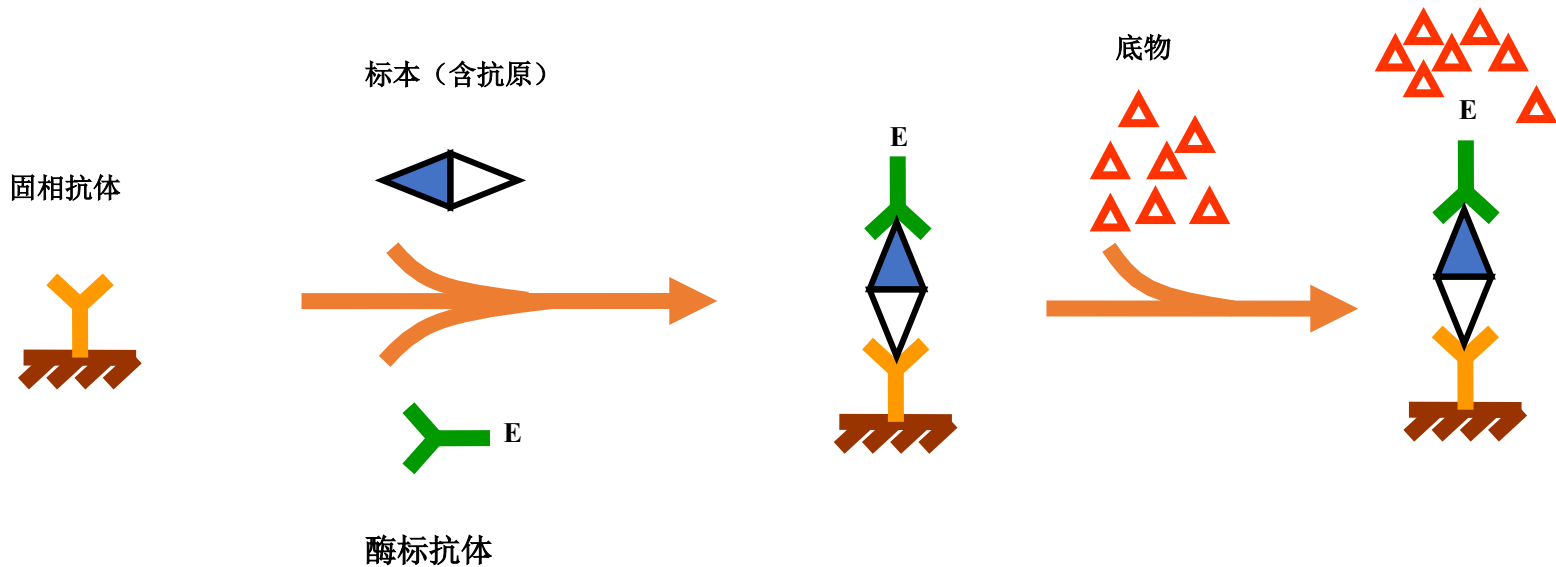
### **(二) 双位点一步法**

测定抗原时，如应用针对抗原分子上两个不同抗原决定簇的单克隆抗体分别作为固相抗体和酶标抗体，则在测定时可使标本的加入和酶标抗体的加入两步并作一步。



# 酶联免疫吸附试验

## (二) 双位点一步法





# 酶联免疫吸附试验

## (二) 双位点一步法

如果待检标本中抗原浓度过高，容易形成“钩状效应 ( hook effect )”。钩状效应严重时，可出现假阴性结果，必要时可将待检标本适当稀释后重新测定。



# 酶联免疫吸附试验

## 二、ELISA的方法类型

### **(三) 间接法**

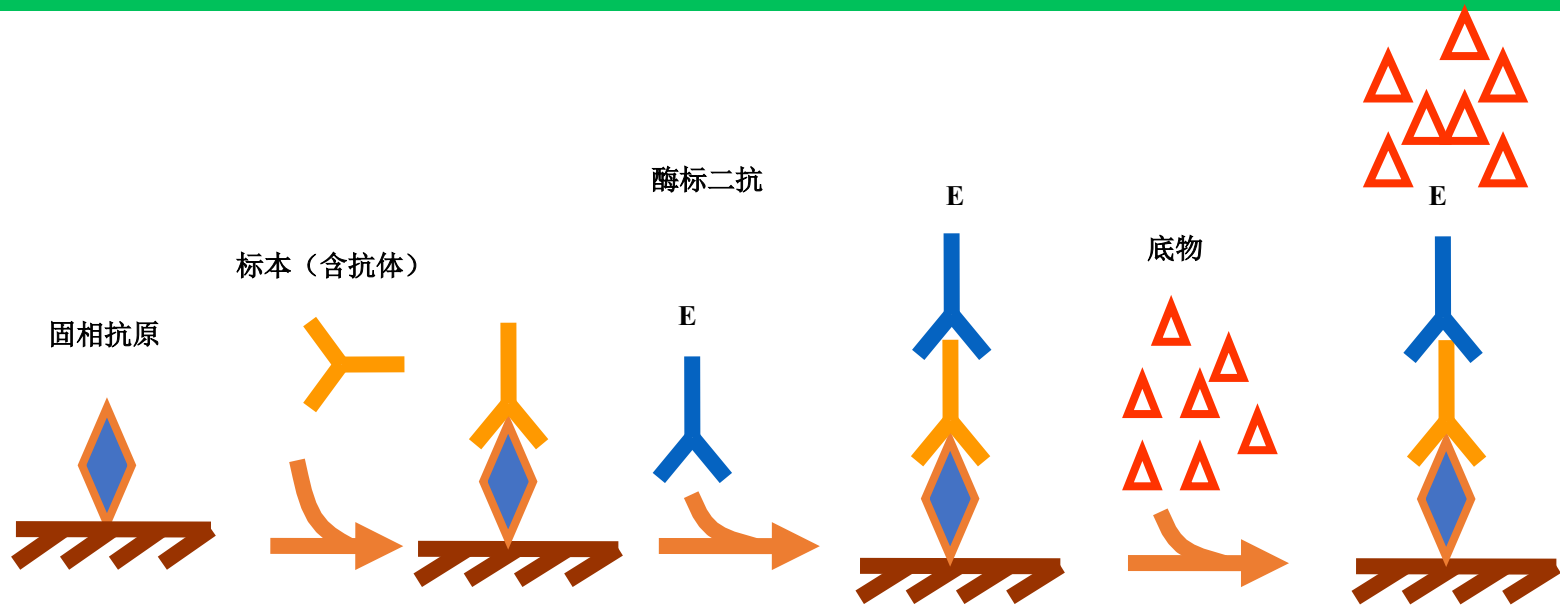
间接法是检测抗体最常用的方法，其原理为利用酶标记的抗抗体（亦称为酶标二抗）来检测已与固相结合的特测抗体。



# 酶联免疫吸附试验



## (三) 间接法



# 酶联免疫吸附试验



## (三) 间接法

此法由于受血清中高浓度非特异性IgG的干扰，通常要将待测标本进行一定稀释后才能测定。



# 酶联免疫吸附试验

## 二、ELISA的方法类型

### **(四) 竞争法**

竞争法既可用于检测抗原，  
也可用于检测抗体。



# 酶联免疫吸附试验

## (四) 竞争法

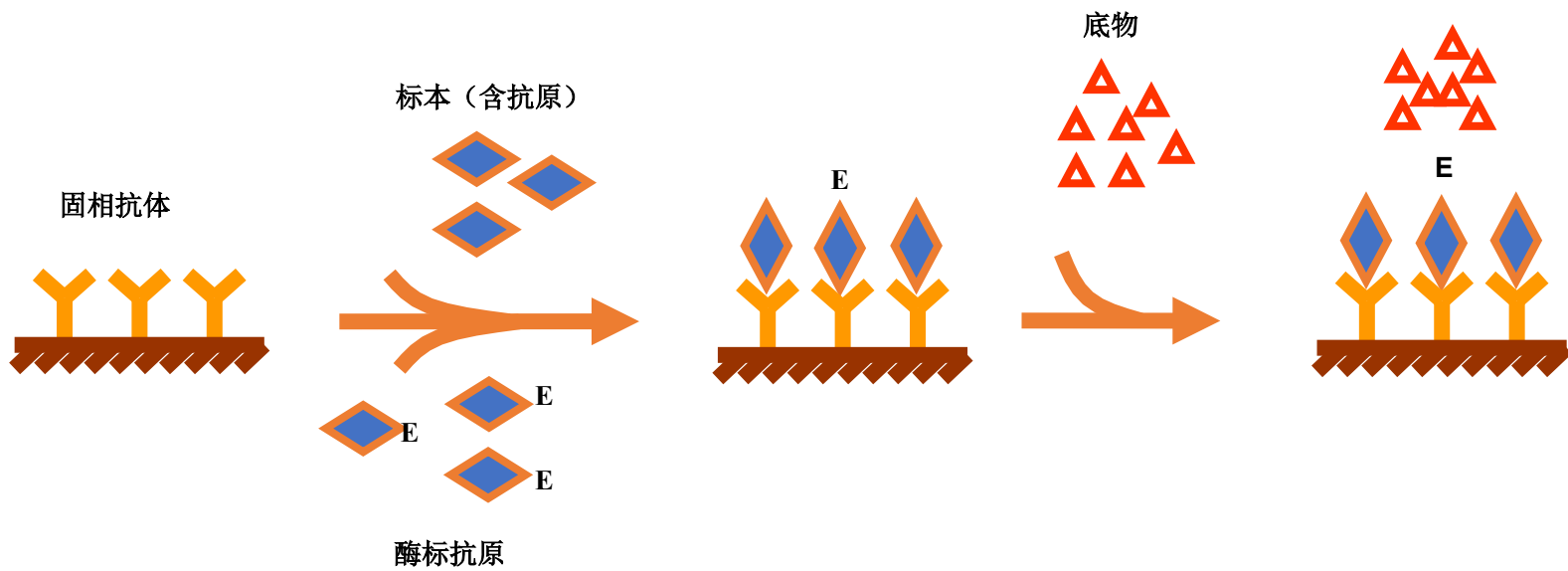
### 竞争法测抗原

待测抗原和酶标抗原竞争与固相抗体结合，因此结合于固相的酶标抗原量与待测抗原的量呈反比，待测抗原越多，其结合特异性抗体越多，而酶标抗原与特异性抗体结合就减少，底物显色反应浅；显色越深，待测抗原量则越少。

# 酶联免疫吸附试验



## (四) 竞争法



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/615322304221012000>