

第二节酶免疫技术分类

一、均相酶免疫测定

二、非均相酶免疫测定

第三节 酶联免疫吸附试验

一、基本原理

二、方法类型及反应原理

思索题

小结

三大经典标识技术

放射免疫技术

发光免疫技术

酶免疫技术

第一节 酶免疫技术特点

原理及特点

抗原抗体反应特异性

+

酶高效催化反应专一性

- 主要试剂：
酶标识抗体或抗原
- 酶标物特点：
免疫学活性
酶对底物催化活性

原理及特点

原理:

- 酶标抗体（抗原）与抗原（抗体）特异性反应
- 酶对底物显色反应
- 反抗原或抗体进行定位、定性或定量测定分析

特点:

- 灵敏度高、特异性强、准确性好
- 酶标识试剂能够较长时间保持稳定
- 操作简便、对环境没有污染。
- 易与其它技术偶联衍生出适用范围更广新方法。

一、酶和酶作用底物

标识酶要求：

活性高

性质稳定

专一性强

酶催化底物显色信号易于判断和测量

方法敏感，重复性好，简单易行

酶底物易于配制保留，酶及底物价廉

酶和酶作用底物

惯用酶

糖蛋白（主酶）
亚铁血红素（辅基）
主酶与酶活性无关
辅基是酶活性中心

RZ值与酶活性无关，
酶活性单位比RZ值
更为主要

辣根过氧化物酶（HRP）

RZ值：403nm（辅基）
与275nm（主酶）
OD值之比

ELISA中应用最为广
泛标识用酶

酶和酶作用底物

惯用酶

碱性磷酸酶 (AP)

菌源性AP
肠粘膜AP

β - 半乳糖苷酶 (β -Gal)

用于均相酶
免疫测定

酶和酶作用底物

惯用底物

HRP底物

HRP



H_2O_2 为受氢体，HRP对受氢体专一性很高

供氢体 DH_2 习惯上被称为底物，底物有各种

酶和酶作用底物

惯用底物

四甲基联苯胺 TMB

HRP常见底物

邻苯二胺 OPD

5-氨基水杨酸5-ASA

2, 2' -氨基-二(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐 ABTS

酶和酶作用底物

HRP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中应用最广泛底物。

酶和酶作用底物

惯用底物

AP
底物

对-硝基苯磷酸酯 (pNPP)

经AP作用后产物为黄色对硝基酚，最大吸收峰波长为405 nm。

β -Gal
底物

4-甲基伞酮基 β -D
半-乳糖苷 (4MUG)

酶作用后，生成高强度荧光物，用荧光计测量。

二、酶标识抗体或抗原

酶免疫技术关键组成部分

酶结合物
(conjugate)

酶标识物

经过化学反应或免疫学反应，让酶与抗体或抗原形成结合物

酶标识抗体或抗原

制备方法要求

➤ 抗原要求纯度高，抗原性完整

➤ 抗体需要特异性好、效价高、亲协力强以及比活性较高，能批量生产，易纯化。

酶标识抗体或抗原

技术方法简单、产率高，重复性好

制备方法要求

标识反应不影响酶和抗原或抗体活性

酶标识物稳定，不形成聚合物

酶标识抗体或抗原

制备方法

过碘酸钠法（直接法）
惯用于HRP标识抗体或抗原

戊二醛交联法

酶标识抗体或抗原

戊二醛交联法

戊二醛分子中有两个相同醛基，可分别与HRP和蛋白质分子中氨基结合。该法有一步法和二步法。二步法标识效率比一步法高，酶标识物质量较均一。

酶标识抗体或抗原

纯化及判定

标识完成后应除去反应液中游离酶、游离抗体或抗原、酶聚合物以及抗体或抗原聚合物，防止游离酶增加非特异显色，以及游离抗体或抗原起竞争作用而降低特异性染色强度

惯用纯化方法：
葡聚糖凝胶G-200/G-150过柱层析纯化
50%饱和硫酸铵沉淀提纯

三、固相载体

➤ 固相抗体或抗原就是把抗体或抗原结合到固相载体表面

➤ 固相抗体或抗原是非均相酶免技术中将游离和结合酶标识物快速分离最惯用方法

固相载体

要求

- 结合抗体或抗原容量大
- 抗体或抗原牢靠地固定在其表面
- 不影响免疫反应性
- 利于反应充分进行
- 固相方法简便易行，快速经济

种类

- 塑料制品
- 微颗粒
- 膜载体



包被与封闭

包被
coating

将抗原或抗体结合于固相载体

封闭
blocking

用1%~5%牛血清白蛋白或5%~20%小牛血清消除固相载体表面未结合位点，消除非特异性吸附

第二节 酶免疫技术分类

酶免疫技术

酶免疫组化

组织切片或其它标本中抗原定位

酶免疫测定

液体标本中抗原或抗体定性和定量

均相

非均相

固相酶免疫测定

液相酶免疫测定

一、均相酶免疫测定

用于小分子激素和半抗原（如药品）测定

原理

酶标识物与对应抗原或抗体结合后，标识酶活性会发生改变，不用分离结合和游离酶标识物，经过测定标识酶活性改变，而确定抗原或抗体含量。

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/898073130127006104>