

免疫酶技术及其在细胞生物学中的应用

施渭康

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

长期来,许多细胞生物学工作者希望能够
在显微镜下直接看到组织和细胞中大分子物质
的分布。用物理学(如光谱吸收)或组织化学方
法虽能测定其在组织细胞中的存在,但反应专
一性往往不如免疫学上的抗原-抗体反应。
Coons等首先利用荧光素来标记抗体,在肺炎
球菌感染的小鼠组织切片内观察到肺炎球菌可
溶性多糖抗原^[1],为免疫组织化学技术的发展
奠定了基础。在类似原理基础上,Singer又
建立了马脾铁蛋白标记抗体方法,在超微结构
水平精确地定位细胞抗原^[2]。60年代末,又
发展了免疫酶染色技术^[3],其在某些方面比免
疫荧光和免疫铁蛋白标记抗体有更多优点,例
如可同时作普通显微镜和电镜观察,制品保存
时间较长,可作显微形态学的对比染色观察等。
同时结合酶标技术和放射免疫测定法又发展
了酶免疫测定法^[4],用以定量体液成份或可
溶性抗原。其灵敏度不仅近似放射免疫测定
法,而且不需要用测试放射性的特殊仪器,酶
标记物也远较同位素标记物稳定。由于近十多
年来免疫酶技术发展迅速,其在生物学及医学
等许多问题的研究上应用也极为广泛。本文
仅就免疫酶定位和酶免疫定量测定的基本原
理,常用方法及其在细胞生物学中的应用作一
概述。

免疫酶定位技术

一、组织制备

如前所述,免疫酶定位法是抗原-抗体专
一性反应和显微形态学相结合的一种技术,为
了保存组织细胞的正常形态结构,必须用固
定剂固定组织。不适当的固定剂会引起抗原分

子
结构改变或组织通透性降低,从而有可能阻
断抗原和抗体的反应。甲醛固定常会使组织
通透性降低,在大多数情况下会失去抗原-抗
体反应性。利用聚甲醛作短时间固定可减弱
这些不利的效果。经聚甲醛一类固定剂固定
的组织石蜡切片,用氧化物酶(HRP)标记物
可以进行一些物质的定位观察,包括促肾上
腺皮质激素,免疫球蛋白轻、重链,溶菌酶,
后叶激素运载蛋白,促胃酸激素,癌胚抗原,
乙型肝炎病毒表面抗原等。Bouin氏固定剂
固定的组织切片也证明能对生长激素,促甲
状腺激素和绒毛膜促性腺激素^[5]作定位观
察。当然冰冻切片常可得到更理想的结果。
不适当的固定会增加非特异性蛋白的吸附作
用,其原因还不清楚,可能与固定剂产生的
蛋白聚合作用有关。用高稀释度的第一抗血
清和酶标记物,可使这种非特异性染色有相
当大的降低。

二、免疫酶标法

1. 原理:包括直接法和间接法(图1)。
直接法是把酶直接和某种待测抗原的相应抗
体(第一抗体)相结合,然后利用这种酶标抗
体再与组织细胞中这种抗原起反应,形成抗
原-抗体-酶复合物,随后经与酶底物反应而
产生有

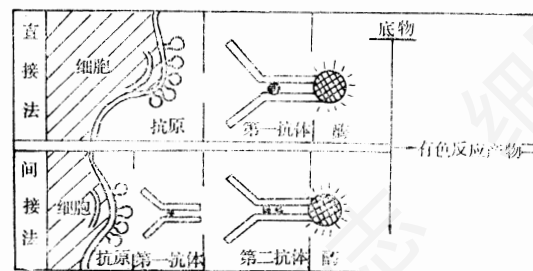


图1 免疫酶标法原理

颜色的沉淀物质。这种沉淀物质有些又是电子致密的，所以可在光学和电镜两种不同水平进行细胞抗原的定位分析。用直接法检测抗原需要对相应的特异性抗体进行标记，应用范围狭窄。因此，通常多采用间接法，即标记抗球蛋白抗体(第二抗体)的方法。这种酶标第二抗体与细胞中抗原-抗体复合物起特异性反应，同样可以达到抗原定位的目的。间接法的优点在于标记某一种动物的抗球蛋白的抗体之后，就可以同用该种动物所制备的多种特异性抗血清均可发生免疫反应，省略了繁复的标记过程。

酶标记抗体或抗球蛋白抗体常会产生非特异性染色。最近 Mason 和 Sanmos^[6] 发展了 HRP 或碱性磷酸酶(AKP) 标记抗原染色法。未标记的第一抗血清和切片反应后再与抗原-酶结合物反应。第一抗体反应呈双价，把标记抗原和组织切片上抗原连接起来。在这种反应

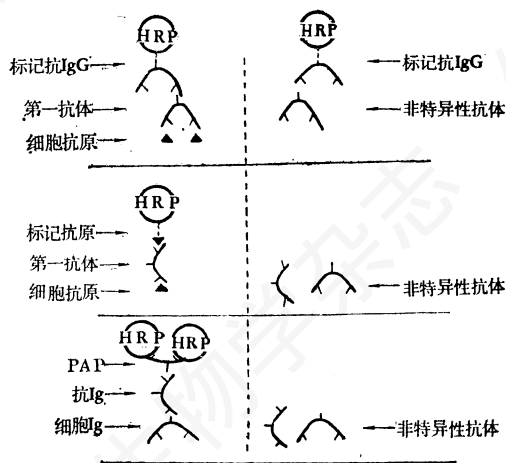


图2 酶标记抗原法和常规二步法的比较

上排：常规二步法——结合到组织上的抗体，包括特异的(图左)或非特异的(图右)均因酶标记第二抗体而检出。

中排：酶标记抗原法，只有特异性抗体(图左)能与酶标记物反应，结合到细胞上的非特异性抗体(图右)因其缺乏抗原结合点，不能与抗原-酶标记物反应。

下排：过氧化物酶(HRP)抗体—HRP可溶性免疫复合物(PAP)作反应试剂，经标记抗原法检测细胞免疫球蛋白(Ig)。

系统中，第一抗血清里一些非特异性的杂抗体不会与标记抗原起反应(图2)，因此不可能产生非特异性染色。这是一项有发展前途的方法。

2. 标记酶：用于制备结合物的酶必须具备稳定、高度的催化活性以及价格便宜等要求，并且须有相应的价廉、安全和易于制备的底物。目前仅有几种酶能满足这一标准，如 HRP，葡萄糖氧化酶和葡萄糖淀粉酶， β -半乳糖苷酶等^[7]。但应用最多的是 HRP，不过在对抗原或抗体定量测定中则以 AKP 的应用最为广泛。HRP 具有活性高，分子量小，标记物穿透性强，且可长期保存等特点，HRP 在 E_{403nm} 吸收峰最高。酶蛋白部分的吸收峰在 275—280nm 处，故 HRP 纯度常以 RZ(Reinheit Zahl)即 $O.D_{403}/O.D_{275}$ 的比值来表示。当 $RZ \leq 0.6$ 时，其中 75% 是杂蛋白，不宜作酶标用。但若仅以 RZ 作为 HRP 活性指标，则未必可靠，因为失活的酶中氯高铁血红蛋白/蛋白比值(即 RZ)照常很高。

3. 酶和抗体球蛋白结合方法：HRP 与抗体球蛋白连接方法主要有三种。其中两种均用双功能基团化合物作偶联剂(如戊二醛，二硝基氟苯等)。另一种是通过过碘酸使 HRP 分子糖链中乙二醇基氧化为醛基，这些醛基再与球蛋白分子中氨基反应。后一种方法制备的酶标记物要比用前两种方法有更高的酶和抗体活性。

(1) 戊二醛一步连结法^[8]：HRP 和抗体球蛋白或纯化 IgG 按一定比例溶于 pH6.8, 0.1M 磷酸缓冲液。逐滴加入一定量的戊二醛，缓慢搅拌。然后对磷酸缓冲的生理盐溶液(PBS)透析。最后取上清液存于 4℃ 备用，3 个月左右不变性。用这种方法制备的标记物，HRP 和抗体的结合比例并不十分确定，而且不同程度地夹杂着混合物，可用 50% 饱和度硫酸铵沉淀。若需进一步纯化，可再使用 Sephadex G-200 或 Bio-Gel P-300 柱层析分离。

(2) 戊二醛两步连结法：首先在一定条件下使 HRP 与戊二醛起反应。过 Sephadex G-25 柱，除去未反应的戊二醛。收集棕色的

含 HRP 活性部分。加入一定量的抗体球蛋白或 Fab。在碱性条件下反应 24 小时后，加赖氨酸使反应终止。PBS 透析。加等体积饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在 4 °C 沉淀。沉淀物溶于最少量蒸馏水中，再对 PBS 充分透析。但如果标记的是 Fab，就不需再经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 处理了。由于 HRP 的 NH_2^+ 基团较少。当加入过量的戊二醛时，酶分子上游离的 $-\text{NH}_2$ 仅与戊二醛分子上的一个 $-\text{CHO}$ 结合，不会发生酶与酶缩合，戊二醛上另一个活性 $-\text{CHO}$ 与加入的 IgG 分子上的 NH_2^+ 结合，因此两步法制备的酶标记物中，没有酶内部或球蛋白内部的自身结合物，HRP 和球蛋白克分子比例始终是 1:1。一步法中 HRP 经戊二醛处理后，其活性约失去 10%，而在两步法酶标记过程中，HRP 催化活性降低了 40% 左右，并且在免疫反应时，酶标记物与抗原的结合也仅为 50—60%^[9]。

(3) 过碘酸氧化法^[10]：HRP 是一种含糖 18% 的糖蛋白，酶活性不受糖链影响，因此可用过碘酸盐使糖链氧化。首先用能与 α 和 ϵ 氨基及羟基起反应的 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 处理 HRP，用以阻断 HRP 分子中这些基团和因过碘酸盐氧化产生的醛基发生自身连结。然后，过碘酸氧化生成的 HRP-醛基化合物加至抗体球蛋白，HRP 的醛基与抗体球蛋白中有效的 α 和 ϵ 氨基之间通过 Schiff 氏碱基产生结合反应。最后 HRP 中未反应的醛基被硼氢酸钠还原。最近发现，硼氢酸钠还原过程中会失去酶一些活性，改用 pH9.5，2M 乙醇胺处理 7 小时，则能得到较高酶活性的标记物。用过碘酸盐氧化法制备的标记物，HRP 和球蛋白的克分子比例约在 2:1—3:1 之间。游离的 HRP 较少，不需进一步处理就可使用。

三、非标记酶法^[11]

1. 原理

在免疫酶染色技术中，近年来越来越多地采用非标记酶法。组织细胞中抗原与其相应抗体的专一性结合后所形成的复合物，用第二抗

体，抗 HRP 抗体和 HRP 依次处理，最后与底物反应生成有色沉淀物，从而达到定位的目的。这种方法通常也称为抗体“搭桥”法。若将抗 HRP 抗体和 HRP 预先制备成可溶性 HRP—抗 HRP 免疫复合物(即 PAP)，可使染色过程中第二抗体处理后的抗 HRP 抗体和 HRP 二步操作简化成一步处理，这就是通常所称的 PAP 染色法(图 3)。

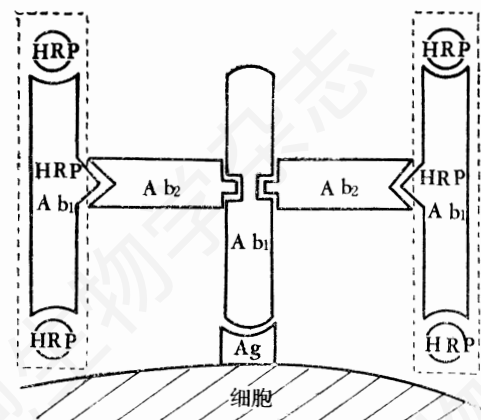


图 3 非标记免疫酶染色原理的示意图

Ag—抗原；Ab₁—抗Ag抗体；Ab₂—第二抗体；HRP—辣根过氧化物酶；HRPAb₁—抗 HRP 抗体；虚线部分为 PAP 复合物

非标记酶染色技术与酶标方法的主要区别在于，前者的各步骤(包括 PAP 的制备)皆是免疫反应，可以克服酶标过程中酶和抗体活性减退等不利因素。该方法的另一特点是灵敏度高，要比常规免疫荧光反应的灵敏度高约 100—1000 倍。采用 PAP 染色法比用纯化抗 HRP 抗体和 HRP 依次染色敏感 5 倍，而比用抗 HRP 抗血清和 HRP 先后染色敏感 20 倍。还应该指出，非标记酶染色法所用的抗 HRP 抗血清需在制备第一抗血清的同一种动物中产生。例如，第一抗血清若在豚鼠中制备，则抗 HRP 抗血清也应在豚鼠中产生。这里，非标记抗球蛋白仅起“桥”的作用，故兔抗豚鼠 γ -球蛋白或羊抗豚鼠 γ -球蛋白均可使用。

2. PAP 的制备

(1) 兔抗 HRP 抗血清：1 毫克/毫升

浓度的 HRP 加等体积福氏完全佐剂, 混匀后分别在家兔脚掌, 皮内和皮下多点注射。7—10 天后每周间隔在眼睑皮下, 静脉和背部皮下多部位注射 1 毫升含 0.5 毫克 HRP, 不加佐剂。连续三次后, 抽血测效价或放血^[12]。

(2) PAP 制备过程^[11]: 10 毫升兔抗 HRP 抗血清高速离心去沉淀, 逐渐加入 0.5 毫克/毫升 HRP 3.5 毫升。室温下缓缓搅拌 1 小时。经离心, 沉淀再用 pH 7.2, 0.01M PBS 洗三次。沉淀物悬浮于 2 毫克/毫升的 4 毫升 HRP, 在冰浴中, 用 0.1N 和 0.01N HCl 调 pH 至 2.3, 此时沉淀物完全溶解。继续用 0.1N 和 0.01N NaOH 调回 pH 到 7.5。离心后有少量沉淀物。此沉淀物可继续用 2 毫克/毫升的 HRP 使其溶解。可溶性 PAP 按其总体积的 1/10 量加入等体积的 0.075N 醋酸钠和 0.15N 醋酸铵的混合缓冲液, 随即加入等体积的饱和 (NH₄)₂SO₄ 溶液沉淀 PAP 复合物。再经离心沉淀, 以 50% 饱和 (NH₄)₂SO₄ 溶液洗一次, 溶于 5 毫升重蒸馏水并对 2 升 pH 6.75, 0.0075N 醋酸钠和 0.015N 醋酸铵缓冲液透析 (4 °C), 少量不溶性物质经离心去除, 用微孔滤膜过滤灭菌,

分装安瓿, 保存在 0 °C 备用。

(3) PAP 的工作浓度^[5]: 为鉴定 PAP 是否适用于实验系统和减少其在组织切片上的背景染色, 需经组织切片鉴定其最适工作浓度。根据抗体“搭桥”法染色原理, 可分两步来分析。第一, 在同一玻片中贴附多片组织切片, 用一系列 5 倍稀释第一抗血清和 1/10 稀释度的抗球蛋白抗血清, 依次处理含相应抗原的该组织切片, 然后再用成倍稀释的 PAP 处理, 可得到一反应“坪”(Plateau) 曲线。取一倍于反应“坪终点”(Plateau endpoint) 时的 PAP 浓度为其最适工作浓度; 第二, 选定组织切片中产生强染色的第一抗血清的最低稀释度和 PAP 的最适稀释度, 将抗球蛋白抗体适当稀释从而滴定出抗球蛋白抗体的最适工作浓度, 一般取产生强染色但浓度最低的抗球蛋白抗体。

(4) PAP 的克分子比例^[6,12]: 根据可溶性 PAP 复合物 280 毫微米和 403 毫微米波长的光密度以及 HRP 403 毫微米波长的光密度, 可以计算 PAP 复合物中 HRP 和 IgG 的克分子比例。计算方法如下:

$$(a) \quad \text{PAP 中 HRP 浓度} = \frac{\text{PAP 的 O. D.}_{403}}{1 \text{ 毫克/毫升的 HRP O. D.}_{403}} \text{ (毫克/毫升)}$$

$$\text{PAP 中 HRP 的 O. D.}_{280} = \frac{\text{PAP 的 O. D.}_{403}}{\text{HRP 的 RZ}}$$

$$\text{PAP 中 IgG O. D.}_{280} = \text{PAP O. D.}_{280} - \text{PAP 中 HRP O. D.}_{280}$$

$$(b) \quad \text{PAP 中 IgG 浓度} = \frac{\text{PAP 中 IgG O. D.}_{280}}{1 \text{ 毫克/毫升 IgG O. D.}_{280}} \text{ (毫克/毫升)}$$

$$\text{则 PAP 中 HRP/IgG 的克分子比例} = \frac{\text{HRP 浓度 (a)}}{\text{IgG 浓度 (b)}} \times 4$$

(按 HRP 分子量是 40,000, IgG 分子量为 160,000 计算)

在一般条件下, PAP 中 HRP 与抗 HRP 抗体结合的克分子比值为 1.5 左右, 即 3 克分子 HRP 和 2 克分子抗 HRP 抗体相结合。

四、染色过程

1. 酶作用底物: 常用的酶作用底物为四盐酸 3,3'-二氨基苯胺 (HCl-DAB) 或去碱基的二氨基苯胂 (DAB)。该物质需在使用前配制。称 HCl-DAB 25 毫克溶于 50 毫升 0.05 M, pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液中, 染色前直接

加 0.15 毫升 3% H₂O₂。但去碱基的 DAB 不易溶解, 需在暗处振荡数小时, 染色前过滤, 加 3% H₂O₂。

2. 固定的冰冻切片间接染色步骤^[5]: 冰冻切片贴于载玻片上在 1% 甲醛中固定, 用 15% 蔗糖磷酸缓冲液洗涤后, 经 PBS 适当稀释的抗血清处理并洗涤。然后由 PBS 适当稀释的 HRP 标记抗球蛋白溶液处理, 再经洗涤后, 以新鲜配置的 DAB 溶液显色。若需要对

比染色,可用苏木精或甲基绿复染,组织细胞有HRP反应的部位呈棕色沉淀;细胞核根据复染法呈蓝色或绿色。石蜡切片脱蜡后,依次经过酒精和PBS,再经抗血清处理后,作同样染色。

3. 对照染色: (1) 组织细胞中内源性HRP同样会与DAB反应而生成棕色沉淀。因此,可将两张切片直接用DAB染色,其中一张切片先经内源酶抑制剂甲醇/H₂O₂处理,检查组织切片中内源性HRP活性分布。其他一些抑制内源酶试剂有配于PBS的0.5% H₂O₂; 配于无水酒精的0.074%盐酸; 甲醇—硝基铁氰化合物等。另外,内源性HRP在免疫染色前先用另一底物如 α -萘酚派若宁染色,产生与免疫染色后DAB反应产物不同的颜色,以资区别。(2) 为证明抗原—抗体免疫反应的专一性,对照组必须包括制备第一抗血清所用的未经免疫的正常动物血清和/或用抗原适当吸收后的抗血清,染色结果应为阴性。

酶免疫定量测定技术

酶标免疫吸附测定法(Enzyme-linked immunoadsorbent assay, 简称ELISA)是继同位素标记免疫测定法以后发展起来的。如前所述,酶可以通过化学或免疫学方法与抗原或抗体结合成酶标记抗原或抗体复合物,在底物的参与下,酶催化底物使其水解,氧化或还原成为另一种带色物质,后者可用分光光度法测定。由于酶的降解底物和呈现色泽是成正比的,因此可反映出参与反应的抗原或抗体的含量。目前应用于抗原和抗体定量的常用方法主要有四种,但以ELISA双重抗体夹心法和ELISA间接法最为常见。

一、抗原定量

1. 酶标记抗原竞争法^[7]: 即利用混合的未标记抗原和酶标记抗原相互竞争抗体上结合点的现象,进行抗原定量的方法。未标记抗原浓度越高,则标记抗原和抗体的结合就越受到抑制(图4)。标记和未标记抗原与相对应的抗体温育后,在测定游离态抗原和与抗体结合

态抗原的活性之前,先需要用盐析、有机溶剂或第二抗体沉淀等方法把两者分开。把抗体共价地连接到各种不溶性多聚体,例如葡萄糖、琼脂糖或偶联剂共价地自身交联,或物理吸附到有机玻璃是另一类常用的分离手段。

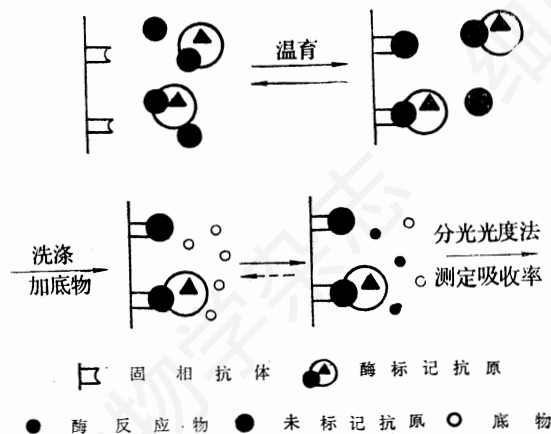


图4 ELISA竞争法原理图解

2. ELISA双重抗体夹心法^[7]: 酶标记抗原竞争法的不足之处,是有些生色试剂会产生类似血清样的颜色,影响分光光度测定结果。因此,每次测定时都需做空白对照。但固相双抗体夹心法免疫酶测定可避免这类缺点。测定的基本方法分为三步(图5),具体操作简述如下:

(1) 特异性抗体致敏的固相载体(I-Ab)反应管及抗原温育。

(2) 洗涤后与酶标记抗体(AbE)温育,每组实验包括两个对照:(a)管内用一定量的I-Ab,鸡血浆和Ab-E,用以检测I-Ab上的非特异性吸附,(b)另一对照管内含一定量的I-Ab,含抗原的血清和Ab-E,用以测定结合到I-Ab上的最高结合活性。

(3) 酶活性测定:若Ab-E中标记的是葡萄糖氧化酶,则I-Ab中的酶活性测定是加内含一定量的HRP,3,2'-氨基-二(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐(ABTS)和D-葡萄糖的反应液。反应管在25℃转动30分钟后,离心,读取上清液在405或420毫微米波段的光密度。

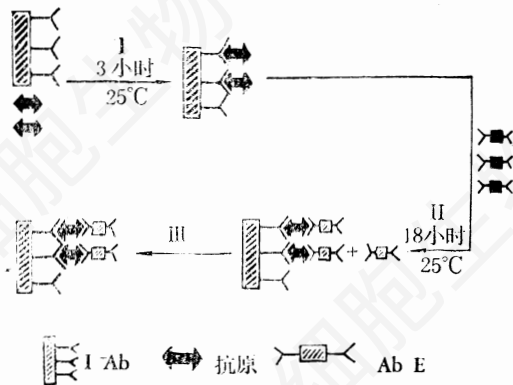


图5 固相抗体夹心法免疫酶测定示意图

- I. 抗原固定到特异性致敏固相载体
- II. 酶标记抗体和固相载体上的抗原—抗体复合物反应
- III. 固相载体上的酶活性测定

二、抗体定量

1. ELISA 间接法^[13]: 先将抗原吸附在固相载体上, 加入适当稀释的待测特异性抗血清, 所形成的免疫复合物经洗涤除去多余抗体及其他成份后, 再使免疫复合物与酶标记抗体球蛋白相结合。底物在酶的催化作用下发生降解或氧化还原反应, 产生有色产物, 用分光光度计测定抗血清中抗体的含量。

在测试时, 重要的是致敏于固相载体上的抗原量应该适当。加入抗原致敏的固相载体若过量, 有时则会产生前带(prozone)效应, 但可以将测试抗血清作一系列稀释而克服。

抗血清和酶标抗球蛋白的两者反应的最适条件是在 25°C 温育 4—5 小时。若把温育温度提到 37°C, 则可相应减少温育时间。有时也用 25°C 作短时间温育, 虽则这在一定程度上略影响测试灵敏度和精确度, 但在实际工作中往往也被采用。

测定的灵敏度随不同的抗原—抗体系统有差别。亲和力高的抗体和抗原反应较为强烈, 其检测也较亲和力低的系统容易。血清中非特异性球蛋白浓度也会影响测定的灵敏度, 例如检测 1 毫微克 IgE (相当于血清中总 IgE 的 10^{-3}) 要比 1 毫微克 IgG (相当于血清中总 IgG 的 10^{-7}) 的测定方便。另外, 由于某些抗原和

免疫球蛋白之间也会存在着非特异性反应, 因此正常血清的反应因不同抗原而可能不同。

2. 酶—抗酶抗体 (PAP) 法: 实际上, 这也是一种非标记免疫酶显色法。同 ELISA 间接法检测抗体的步骤一样, 将待测的特异性兔抗血清加至抗原致敏的固相载体。洗涤后, 加入羊抗兔球蛋白抗血清作“桥”(图 2)。然后依次加入兔抗酶抗体和酶或加 PAP, 最后因酶催化底物而产生有色物质。底物被降解的量即相当于被测的抗体量。

另外, Voller 等人还建立了 ELISA 微量塑料平板法^[14]。抗原吸附于聚苯乙烯微量血凝板的空穴表面, 待测抗体与致敏的固相表面起反应, 接着用酶标抗球蛋白和酶底物先后温育, 最终生成有色酶解产物。被降解的底物量相当于酶标记抗球蛋白与抗体球蛋白的结合量, 由此测算出待测溶液中的抗体量。这种方法简便迅速, 近年来广泛应用于各种疾病所产生的抗体定量。

在细胞生物学中的应用

免疫酶技术在细胞生物学中的应用主要可以概括为下列五个方面。

一、组织和细胞内抗原的定位

免疫酶染色技术已广泛应用于各种组织细胞抗原或其他成份定位。SV₄₀转化的细胞抗原、大鼠肾小球基膜抗原、人和小牛淋巴细胞表面移植抗原, 成红细胞发育过程中 A 型抗原的起源, 小鼠淋巴细胞表面 O-C₃H 标记, 粒线体抗原, 肝细胞内乙型肝炎表面抗原以及癌胚抗原、甲胎蛋白等肿瘤相关胚胎抗原细胞定位均已较多的报告^[7]。近年来国内对一些组织细胞中类似的或其他抗原定位研究报告也日益增多。

二、免疫细胞的蛋白合成

Kuhlmann^[9]利用 HRP 标记抗兔 IgG 抗体, 在光学和电镜水平系统地研究了兔淋巴结细胞 IgG 的分布。并用 HRP 免疫大鼠, 结合 ³H-胸腺嘧啶掺入细胞的电镜放射自显术, 观察了淋巴结抗体形成细胞发育过程中形态结构

和抗体蛋白合成及分泌的关系。免疫细胞在分化和成熟期间,除内质网系越来越发育,并合成抗体蛋白外,显然高尔基体结构也逐趋完备,并含有大量的抗体成份,表明高尔基体也有分泌抗体的功能。在淋巴细胞样细胞阶段, ^3H -胸腺嘧啶的掺入最高,以后持续下降,而无分裂能力的成熟浆细胞就根本无 ^3H -胸腺嘧啶掺入,说明它不具有合成抗体的能力,似只是贮存和分泌抗体蛋白。酶免疫电镜的观察也证明,正常人血流中B淋巴细胞的绒毛状突起表面,存在着IgM,而表面较平滑的T淋巴细胞却不显示这种标记物。用HRP分别标记抗 κ 和抗 λ 抗体,以半定量检测慢性淋巴白血病人和正常人淋巴细胞表面膜上免疫球蛋白轻链决定簇,发现正常人淋巴细胞表面与抗 λ 链抗体反应的阳性细胞数为4—10%;与 κ 链抗体反应阳性细胞数为16—24%。每个阳性细胞表面抗体分子平均数为100,000;而慢性淋巴白血病人淋巴细胞阳性数不论与抗 λ 或抗 κ 抗体均高达75%,但每个细胞表面膜上的轻链决定簇数目极低,平均仅为正常人的10%。这些结果不仅表明慢性淋巴白血病是一种单克隆增生性疾病,而且也证明这种方法可作为诊断慢性淋巴白血病人的一种有效手段^[16]。免疫酶技术也已成功地用于研究人体十二指肠正常和病理粘膜细胞IgA的合成及其与分泌片结合成11S IgA的过程。证明正常十二指肠粘膜层存在着许多IgA浆细胞,在其核周间和粗糙型内质网系槽内有致密的反应沉淀产物;IgA位于细胞间质膜的下半部以及杯状细胞与绒毛上皮细胞之间的细胞间隙。急性腹腔性疾病的十二指肠粘膜,IgA浆细胞数量显著增加,在上皮细胞和血管壁的基膜有大量反应沉淀物。结果证明这种分泌型IgA是抗体消化道粘膜局部抗感染免疫的一种重要因素。

三、激素和激素受体的研究

近年来从光学和电镜水平对多种激素如胰岛素,后叶加压素和相关蛋白的合成细胞,促黑素细胞激素(MSH)和促肾上腺皮质激素细

胞类型及其受体进行了深入研究^[7]。在1978年所举行的有关激素受体的国际讨论会中,用免疫酶技术研究激素和其受体的报告占据了相当大的比例^[16]。用抗 β 链的人绒毛膜促性腺激素(抗HCG β)抗血清和PAP免疫电镜染色技术研究发育过程中的大鼠胚胎睾丸,发现16天龄胎鼠输精管的Sertoli氏细胞腔面部和17天睾丸Leydig氏间质细胞有强烈的促性腺激素反应。此外,在细胞核、核仁、核糖体、中心粒和一些囊泡也显示不同程度的HCG β 的结合位点。18天的大鼠胚胎睾丸Leydig氏细胞和Sertoli氏细胞的细胞核或脂滴内存在着与抗睾酮抗体强烈的染色反应,而在18天胎龄以前的胚胎睾酮着色很弱。表明个体发育过程中促性腺激素具有结合到某些细胞受体,刺激睾丸发育并促使产生睾酮的功能。另外,雄性大鼠副性器官和大鼠前列腺癌组织是催乳素的靶器官。小鼠肾上腺束状带和网状带的细胞质具有类似促黄体生成激素释放因子(LHRH)配体的受体。

四、细胞核内的组分分析

最近Ripoche等^[17]将固定的小鼠组织切片用HRP-Ig标记物在pH 4.5染色时,核膜,染色质或染色体出现强染色反应。切片在染色前先用DNase或组蛋白酸性抽提处理,这种阳性反应则被阻断。结果似乎表明氧化的色素原或色素原结合DNA的复合物在酸性条件下有重新分配并结合DNA的能力。在用抗核昔或抗核苷酸抗体研究细胞周期中的DNA合成及其变化时,发现细胞核对抗核昔抗体免疫反应性和细胞核内DNA合成呈现平行关系。因此免疫酶技术可能成为判断某些细胞周期的S期与核酸关系研究中一种快速而又精确的方法,甚至可能发展为一项对染色质组分和功能进行原位分析的实验手段。

五、生物体液成份定量

如上所述,ELISA可用于各种体液中抗原和抗体的定量测定,如人体,大鼠和小鼠血清中甲胎蛋白,IgG和IgM,人体HCG,人

胎盘催乳素和胰岛素以及乙型肝炎病毒表面抗原等^[7],并且也可用于DNA抗体的测定。最近证明在一些有抗核抗体病人血清中,有94%存在着抗单链DNA抗体^[18];在另一些病人血清中,发现了抗组蛋白抗体^[19]。酶免疫测定也能用于细胞成份的定量,它比之同位素标记蛋白以测定各种成份有更多优点。

结 束 语

从上面谈到的几个方面可以看出,酶具有化学放大作用的特性,而抗原—抗体又是高度专一性的反应系统。因此,免疫酶技术是灵敏度高,特异性强的原位分析细胞组成物质的方法,也是灵敏度相似放射免疫测定水平的定量可溶性物质的有效手段。根据类似原理,免疫酶技术也已成功地应用于测定其他生物系统,包括激素—受体、植物凝集素—糖或糖蛋白等。

酶和抗体球蛋白结合物等免疫试剂,分子量达20万或更大;PAP法最终形成的产物也是相当庞大的大分子复合物。这些显然都不利于免疫试剂渗透细胞内部,影响实验结果。另一方面,形成的大分子产物也因空间占位等原因影响定位的精确性。因此,近年来,多采用HRP和抗体Fab片段的结合物;也有使用杂交抗体,使一个抗体分子能够同时对相应抗原和酶起反应,具有双重专一性,这样就简化了酶标记抗体和第二抗体染色的过程。这类分子较小的免疫试剂便于透进细胞与细胞内抗原反应。随着免疫学和免疫化学技术的继续发展,例如抗DNA抗体或抗杂交RNA-DNA抗体制备成功,免疫酶技术有可能结合染色体分带技术,应用于染色体结构组分的原位分析,成为研究细胞分化中基因表达和调控的一种重要手段。同时,这方面的任何重大进展也将会促进免疫酶技术发展成为更灵敏,更精细的定位和定量方法。

参 考 资 料

[1] Coons, A. H., 1956. *Intern. Rev.*

- Cytol.* 5: 1—23.
- [2] Singer, S. J., 1959. *Nature* 183: 1523—1524.
- [3] Nakane, P. K. and Pierce, G. B., 1966. *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 929—931.
- [4] Engvall, E. and Perlmann, P., 1971. *Immunochemistry*, 8: 871—874.
- [5] Johnson, G. D. et al. 1978. *Immunofluorescence and Immunoenzyme Techniques*. In *Handbook of Experimental Immunology*, ed. Weir, D. M. p. 15.1—15.30. Elackwell Scientific Publications.
- [6] Mason, D. Y. and Sammons, R. E., 1979. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 832—840.
- [7] Feldmann, G. et al. 1976. *Immunoenzymatic Techniques*. International Symposium on Immunoenzymatic Techniques. Ist. Paris, 1975. North-Holland Publishing Company.
- [8] Avramers, S., 1969. *Immunochemistry*. 6: 43.
- [9] Kuhlmann, W. D., 1977. Ultrastructural immunoperoxidase cytochemistry. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 10: 1—57.
- [10] Nakane, P. K., 1968. *J. Histochem. Cytochem.* 16: 557.
- [11] Sternberger, L. A. et al. 1970. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 315—333.
- [12] 丛笑倩等, 1979. *实验生物学报*, 12: 139—145.
- [13] Engvall, E. and Perlmann, P., 1972. *J. Immunol.* 109: 129—135.
- [14] Voller, A., et al. 1976. *J. Clin. Path.*, 29: 150—153.
- [15] Ternynch, T. et al. 1974. *Blood*, 43: 789—795.
- [16] Symposium on Hormone Receptor Immunocytochemistry. 29th Annual Meeting of the Histochemical Society. 1978. *J. Histochem. Cytochem.* 26: 485—607.
- [17] Ripoche, M. A. et al. 1979. *J. Histochem. and Cytochem.* 27: 841—845.
- [18] Gripenberg, M. et al. 1978. *Scand. J. Immunol.* 7: 151—157.
- [19] Leinonen, M. et al. 1978. *Scand. J. Immunol.* 8: 164.