



# 生物化学实验

## 免疫学实验技术

### 6.2 抗原抗体反应与免疫学检测技术

北京大学 王青松 胡晓倩

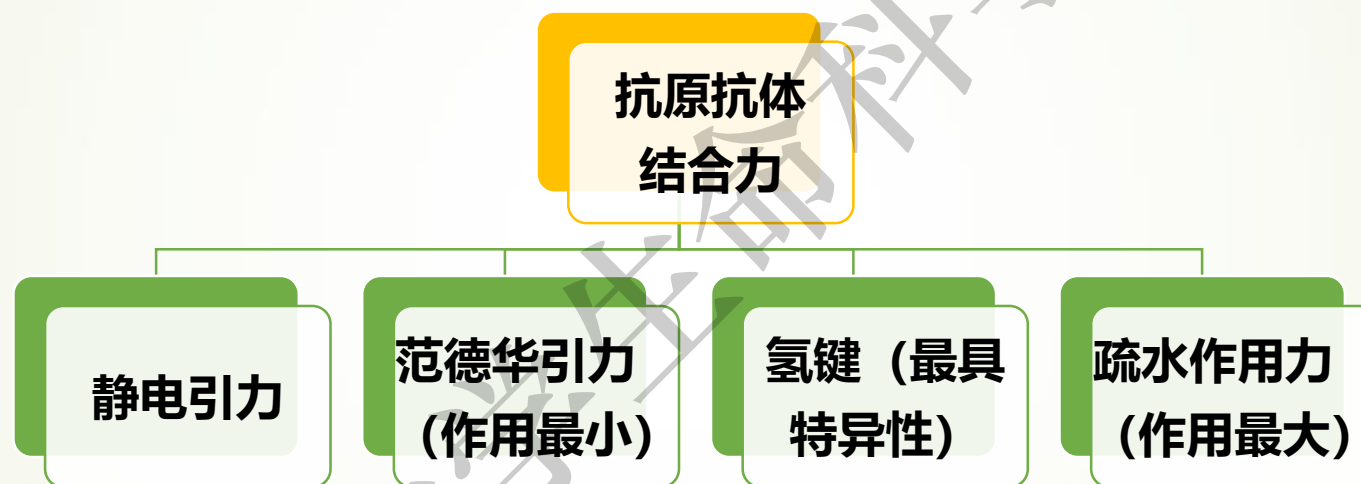
# 抗原抗体反应

- 抗原抗体反应：指抗原与相应抗体之间在体内或体外发生的特异性结合反应。
- 抗原抗体反应是免疫学检测技术的核心和基础。

# 抗原抗体结合力

- 抗原抗体结合反应是**抗原表位与抗体分子高变区之间的相互作用**，是一种分子表面**特异的、可逆的弱结合力**。
- 这种弱结合力只能在极短距离内发生效应，需满足：
  - **最重要的先决条件**是抗原与抗体间特定部位的空间结构必须相互吻合，具有互补性；
  - **抗原表位与抗体高变区必须紧密接触**，才能有足够的结合力，使抗原抗体分子结合。

# 抗原抗体结合力



- 抗原抗体的结合并没有共价键形成，而是由这些**特定部位之间的短程分子力相互作用**的结果。因此抗原表位与抗体结合位点在空间上必须处于紧密接触状态，才能产生足够的结合力。

# 抗原抗体反应的特点

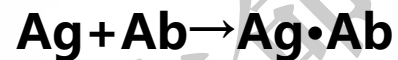


# 特异性

- 特异性：抗原与抗体结合反应的专一性。
- 抗原与抗体相互结合部位在**抗原表位和抗体结合位点之间**，且以亲和力的作用方式结合在一起。这种**分子间的互补结构**决定了抗原抗体结合的专一性。
- 分子基础：抗原表位与抗体分子高变区之间空间构型的互补性。

# 可逆性

- 抗原与抗体结合形成抗原抗体复合物 (Ag·Ab) 的过程是一种动态平衡, 复合物在一定条件下可解离为游离的抗原与抗体, 其反应式:

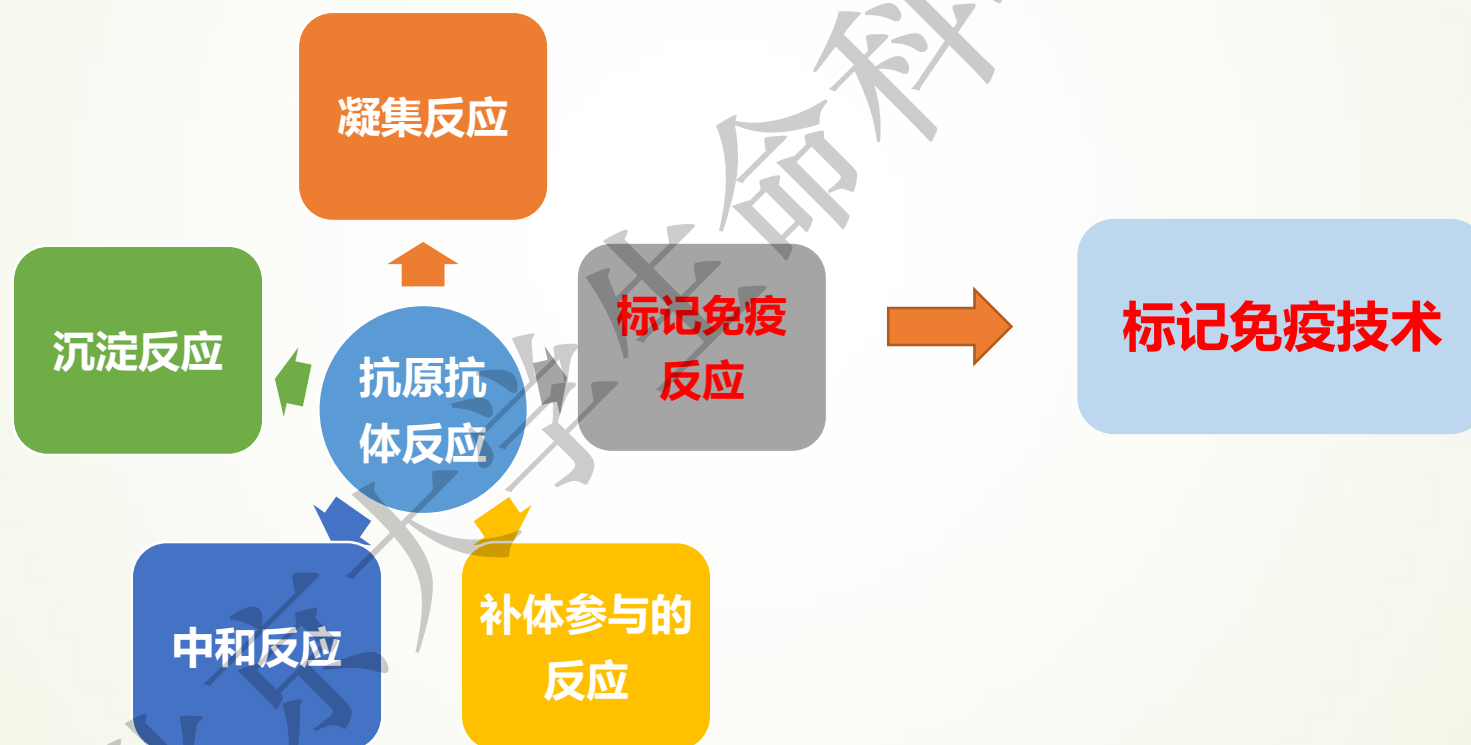


- 抗体的亲和力 (affinity) , 可以用平衡常数K表示:

$$K = [\text{Ag} \cdot \text{Ab}] / [\text{Ag}][\text{Ab}]$$

- Ag·Ab的解离程度与K值有关。高亲和力抗体的抗原结合位点与抗原表位在空间构型上契合, 两者结合牢固, 不易解离。
- 解离后的抗原或抗体均能保持原有的结构和活性。

# 免疫学检测技术的类型





# 标记免疫技术

- 标记免疫技术：用荧光物质、放射性核素、酶或化学发光物质等标记抗原或抗体，在抗原抗体反应后，可通过检测标记物对抗原或抗体进行定性、定位或定量分析。



- 示踪标记物：是既可以与抗原或抗体相结合，又可以被相应的仪器所检测的物质。其作用是示踪标记目的抗原分子，且标记物信号可被检测。

# 抗体的标记

- 免疫学检测中，抗体利用其与抗原特异性结合的能力，广泛用于各种免疫分析。抗体本身不带有任何标记，无法指示抗原抗体反应的结果。
- 实际应用中，需要对抗体进行标记，常用方法有：
  - 直接法：将标记物直接共价连接到与抗原特异性结合的一抗上（primary antibody）。
  - 间接法：将标记物连接到与一抗特异性结合的二抗上（second antibody）。
    - 二抗：能和一抗特异性结合，即抗抗体，其主要作用是检测一抗的存在，放大一抗的信号，达到间接检测抗原的目的。

# 抗体标记方法比较

## 直接法

- 优点：仅需使用一抗，检测快速；
- 缺点：标记可能导致一抗的免疫反应性降低；信号放大作用较弱。

## 间接法

- 优点：标记二抗可结合在一抗上多个表位，灵敏度高，信号放大作用强。
- 缺点：二抗可能发生非特异性结合；孵育洗涤步骤多。

- 实际应用中，多采用间接法，主要是：只需制备一种标记的抗体（即标记的二抗），便可用于对来自同一种动物的多种一抗的检测，达到分析检测抗原的目的，免去逐一纯化并标记各种一抗的麻烦，成本低，使用经济方便。

# 抗体标记方法



# 荧光素标记抗体

- **荧光素：**能够吸收激发光的能量产生荧光，可作为染料使用的有机化合物。
- **原理：**将荧光素作为标记物与抗体结合，标记后的抗体在保持抗原结合能力同时，抗体上的荧光素经恰当的激发可发光，通过荧光显微镜观察或流式细胞仪分析，可对抗原进行定性、定位及定量检测。
- **常用于标记抗体的荧光素：**异硫氰酸荧光素（FITC）、四乙基罗丹明（rhodamine, RB200）、四甲基异硫氰酸罗丹明（tetramethyl rhodamine isothiocynate, TRITC）。

# 荧光素标记抗体的应用

1. 流式细胞分析与细胞分选

2. 细胞免疫荧光分析

# 酶标记抗体

- 酶标记抗体技术是基于抗原抗体反应的特异性和酶催化反应的高敏感性而建立起来的免疫检测技术。
- 原理：用化学方法将酶共价连接到抗体上，使抗体**同时具有抗原或抗体原有的免疫学活性和酶原有的酶学活性**，既参与高度特异的免疫反应，又起到生物催化放大与检测的作用。
- 常用的酶：辣根过氧化物酶（HRP）和碱性磷酸酶（AP）。

**酶标记抗体技术特异、敏感，是目前应用最为广泛的免疫检测方法之一。**

# 酶标记抗体的应用

1. 蛋白质免疫印迹Western blot

2. 酶联免疫吸附测定ELISA

3. 免疫组织化学染色IHC



# 常用免疫检测技术

免疫分析方法	标记物
酶联免疫吸附测定ELISA	酶、生物素-链霉亲和素
蛋白质免疫印迹 (Western blot)	酶 (HRP或AP)
免疫组化 (immunohistochemistry)	酶、生物素-链霉亲和素
免疫荧光分析 (immunofluorescence)	荧光染料、 <b>荧光蛋白</b>
流式细胞分析 (flow cytometry)	荧光染料、 <b>荧光蛋白</b>

- 酶联免疫吸附测定ELISA, 详见: 6.5 间接法测定抗血清效价
- 蛋白质免疫印迹技术, 详见: 6.6 & 6.7 及8.9~8.12。