
免疫化学法

免疫化学法是利用抗原抗体在适宜条件下发生特异性、可逆性和非共价结合形成抗原-抗体复合物的原理，采用不同技术对抗原或抗体待测物进行定性、定量或定位检测的一种分析方法。该法可广泛用于生物原料药或制剂的鉴别试验、纯度与杂质分析、含量或生物活性/效价测定及稳定性等质量属性的监测。

根据对抗原或抗体是否进行标记，免疫化学法可分为标记免疫化学法和非标记免疫化学法。标记免疫化学法可采用酶、荧光基团、发光基团或放射性核素等作为标记物，常见方法有酶联免疫吸附法、免疫印迹法、免疫荧光分析法、发光免疫分析法、放射免疫分析法等。非标记免疫化学法常见方法有免疫沉淀法、免疫电泳法、凝集反应等。各类方法的优缺点和典型用途见附表。

在免疫化学法的方法开发阶段，可使用不同的实验设计（DOE）考察多种因素和各因素之间的相互作用对实验结果的影响，还可设定适宜的系统适用性要求以判定实验结果的有效性。免疫化学法开发时的主要问题为交叉反应，应通过严格筛选试剂来控制交叉反应，实验中使用的试剂一般有关键试剂和非关键试剂：关键试剂是特定免疫化学法中所特有和专用的，其成分或稳定性有细小变化即会影响实验结果；非关键试剂是指成分上有一定改变也不影响免疫化学法检测性能的试剂。免疫化学法的建立既可采用自制试剂，也可采用商品化的试剂盒。对于采用自制试剂的，抗体的选择至关重要，其决定了方法的特异性和灵敏度，应根据实验的预期用途来选择合适的抗体；另外还需关注自建方法的检测范围、定量区间、检测稀释液的选择、试剂不同批次间的差异性和标准化的操作等。对于采用商品化试剂盒的，需考察供试品的适用性，如用于供试品中低浓度杂质残留等检测时，尤其要关注高浓度制品本身的组分是否会对残留杂质的检测产生干扰；同时还需考察试剂盒推荐的数据拟合模型的适用性，并关注检测稀释液的适宜性和试剂盒不同批次间的一致性。

对新建立的免疫化学法进行验证时，应系统地拟定实验方案、分析步骤和可接受标准，还需对系统适用性要求进行进一步确认。分析方法的预期用途决定了其验证指标：定性的鉴别试验一般仅需验证专属性；而限度试验在验证专属性的基础上还需确定检测限；定量的杂质测定方法和含量测定方法则需参考相关的方法验证指导原则对专属性、准确度、精密度、线性和范围等指标进行验证。

标记免疫化学法

一、酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法（ELISA）系将固相载体上抗原-抗体的特异性反应与酶催化底物相结合而对供试品中待测物进行定性或定量分析的方法。根据检测目的和操作步骤不同，ELISA 一般可分为直接法、间接法、竞争法和夹心法，其中夹心法又可分为直接夹心法、间接夹心法和桥式法。本法主要适用于生物原料药或制剂的鉴别试验、纯度与杂质分析、含量或生物活性/效价测定等。

1. 对仪器的一般要求

若为全自动化检测，所用仪器为全自动酶免疫分析仪；若为半自动化检测，所用仪器主要有酶标仪、恒温箱或水浴箱、微孔振荡器、微量移液器等。

2. 对标记物的一般要求和常用标记方法

酶标抗原或酶标抗体为本法检测的基础。待标记抗原或抗体应经高度纯化，用于标记的酶一般需符合特异性强、活性高、可溶性好、来源方便、相应底物易于保存和制备等要求。常用的酶有辣根过氧化物酶（HRP）、碱性磷酸酶（ALP）、 β -半乳糖苷酶（ β -GAL）等，相应底物分别有四甲基联苯胺（TMB）、对硝基苯磷酸盐（pNPP）、4-甲基伞酮- β -半乳糖苷（4-MUG）等。

酶标抗原或酶标抗体常用的偶联方法有戊二醛交联法、过碘酸钠交联法、酶-抗酶免疫复合物法等。经标记的抗原或抗体一般可通过饱和硫酸铵沉淀法或柱层析法等进行纯化，并采用适宜方法进行质量鉴定，包括酶结合量、酶活性和酶标记的灵敏性测定等。对制备好的酶标抗原或酶标抗体应置适宜温度保存，且宜小量分装，避免反复冻融。

3. 测定法

如使用商品化试剂盒，按试剂盒使用说明书操作；如使用自制试剂，按各品种或通则项下的规定操作，操作步骤一般如下：

（1）**包被** 是指用适宜的缓冲液将抗原或抗体按适宜比例稀释，选择适宜的温度和时间吸附至固相载体上的过程。常用的包被缓冲液有碳酸盐缓冲液、Tris-HCl 缓冲液和磷酸盐缓冲液等；常用的固相载体有微孔板、管、磁颗粒、微珠、塑料珠等；固相载体原料一般有聚苯乙烯、尼龙、硝基纤维素、聚乙烯醇等。

包被易受抗原/抗体浓度、固相载体原料、包被缓冲液、包被温度、包被时间等因素的影响，应评估确定适宜的包被条件。

(2) 洗涤 洗涤贯穿于整个测定过程，在包被、封闭、供试品或酶标试剂加样孵育后均需洗涤。常用的洗涤液有磷酸盐缓冲液或咪唑缓冲液，缓冲液中一般添加有聚山梨酯 20。洗涤模式有手工洗涤及仪器洗涤，在方法开发时应评估不同洗涤模式的洗涤效果，并确定最佳模式。

(3) 封闭 在洗涤去除未结合的包被抗原或抗体后，加入封闭液可降低非特异性结合。常用的封闭液有牛血清白蛋白、脱脂奶粉、明胶、酪蛋白、马血清、牛血清、聚山梨酯 20 等。封闭液的选择受抗原/抗体、固相载体、包被缓冲液、供试品稀释液等因素的影响，需根据具体的实验条件选择适宜的封闭液。

(4) 供试品前处理 试验过程中，应通过供试品前处理去除其中的非特异性干扰物质，并评估前处理步骤是否会引起供试品本身变性或引入新的干扰物质。

(5) 加样 选择适宜量程的移液器将供试品、标准品和（或）酶标试剂按设定体积加入已包被的固相载体中。移液过程中应注意避免交叉污染、泡沫或气泡的产生。应根据加入液体的粘度选择适宜的吸头，避免非特异性吸附影响加液的准确性。

(6) 孵育 在加样和/或加酶标试剂后需进行孵育。在方法开发时，应确定各孵育步骤的最佳条件，包括干湿育条件、孵育时间、温度和是否需要旋转或振荡等。

(7) 信号检测 根据使用的标记酶和底物不同，最终产生的检测信号不同，常见的有颜色反应、化学发光和荧光。

(8) 数据分析

定性分析 一般可通过设定临界值来判定供试品中待测物的存在与否，报告结果为“阴性”与“阳性”或“有反应”与“无反应”。设定临界值的一般方法有标准差比率法（SDR）、供试品对阴性比值法（TNR）、以阴性对照均值+2SD 或 3SD 法、百分位数法、ROC 曲线法等。不同方法设定的临界值会存在一定差异，应根据具体的检测方法选择适宜的临界值，以确保检测方法具备合适的灵敏度和特异性。

定量分析 通常是将供试品结果带入由同步试验的已知浓度标准品制备的标准曲线计算而得，报告结果为量值。数据处理可采用简单的线性模型，也可选择复杂的非线性模型，需视实验设计及预期用途而定。必要时，应报告测定结果的置信区间。

二、免疫印迹法

免疫印迹法系将膜固相载体上抗原-抗体的特异性反应与酶、荧光基团或放射性核素等标记技术相结合而对供试品中待测物进行定性或定量分析的方法。根据是否发生电泳分离，免疫印迹法可分为电泳免疫印迹法和非电泳免疫印迹法；根据蛋白质分离原理，电泳免疫印迹法又可分为单向电泳免疫印迹法和双向电泳免疫印迹法；非电泳免疫印迹法主要包括斑点免疫印迹法和狭缝免疫印迹法。本法常用于分析和鉴别混合物中蛋白质的特性、表达与分布，尤其适用于根据蛋白质分子量大小和电荷差异进行分离后的蛋白质分析。

1. 对仪器及材料的一般要求

电泳免疫印迹法中全自动化检测一般使用全自动免疫印迹仪；半自动化检测所用仪器主要包括各类电泳装置、蛋白转印装置、检测装置等。非电泳免疫印迹法除了可能需要点样设备和检测装置外，一般不需其他特殊装置。

常用的膜固相载体有硝酸纤维素膜（NC）、尼龙膜和聚偏氟乙烯膜（PVDF），可根据蛋白质分子量、转移效率和使用的缓冲液等因素选择使用不同的膜。

2. 对标记物的一般要求和常用标记方法

本法常用的标记物有酶、荧光基团或放射性核素，相关要求分别见本通则酶联免疫吸附法、免疫荧光分析法和放射免疫分析法相应项下。

3. 测定法

若为全自动化检测，按仪器使用说明书操作；若为半自动化检测，按各品种或通则项下的规定操作，操作步骤一般如下。

3.1 电泳免疫印迹法

3.1.1 单向电泳免疫印迹法

(1) **SDS-PAGE 凝胶电泳** 见通则 0541 第五法项下。

(2) **蛋白转印** 将通过 SDS-PAGE 凝胶电泳法分离的蛋白质采用半干法或湿法转移到膜固相载体上。转印的效率受蛋白质大小、凝胶中丙烯酰胺的百分比、

电场强度、转印时间和缓冲液 pH 值等多种因素的影响，可使用多层膜以防蛋白质转印的丢失。

(3) 封闭 常用的封闭试剂有牛血清白蛋白、脱脂奶粉和明胶。应选择适宜的封闭试剂和封闭时间，以减少抗体孵育的背景信号。

(4) 抗体孵育 一般包括一抗孵育和二抗孵育，参考抗体使用说明书采用封闭液将抗体进行适当稀释，加入抗体后应轻轻振摇固相膜，并选择较低的温度进行适宜时间的孵育，孵育过夜时常置 2~8℃。

(5) 信号检测 检测信号也取决于使用的标记物和底物，常见的有颜色反应、化学发光、荧光和放射活性。

(6) 数据分析

定性分析 通常是通过与阳性对照和阴性对照对比来判定结果是阳性或阴性。

定量分析 一般是通过与同步试验的特定标准蛋白的比较来量化结果。根据不同检测信号选择不同的定量方法：若为颜色反应，常用分光光度计进行吸光度检测；若为化学发光或荧光，常用含电荷耦合器 (CCD) 的成像系统软件包对膜固相载体上的条带进行光密度分析；若为放射活性，常用适宜的闪烁计数器进行放射活性测定。

3.1.2 双向电泳免疫印迹法

本法除供试品制备和蛋白分离过程外，其余同单向电泳免疫印迹法。

(1) 供试品制备 按各品种项下方法制备。常用的供试品缓冲液包含以下成分：尿素、二硫苏糖醇 (DTT) 或三丁基膦 (TBP)、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (CHAPS)、两性电解质和溴酚蓝。可通过调整两性电解质浓度使供试品在 pH 梯度范围内产生一致的电导率。

(2) 蛋白分离 分为第一向等电聚焦分离和第二向 SDS-PAGE 分离两个阶段。

等电聚焦分离 按通则 0541 第六法试验；也可使用商品化的固定 pH 梯度 (IPG) 的预制胶条按厂家说明书进行上样和设置电泳条件，IPG 胶条的选择取决于目的蛋白的等电点 (pI)。自制或商品化胶条尺寸的大小应与 SDS-PAGE 凝胶的大小相匹配。

SDS-PAGE 分离 在等电聚焦分离结束后，需使用 SDS-PAGE 凝胶电泳缓冲

液先平衡 IPG 胶条，再将 IPG 胶条置于 SDS-PAGE 凝胶顶部，并用 SDS-PAGE 凝胶电泳缓冲液制备的琼脂糖胶覆盖 IPG 胶条。

3.2 非电泳免疫印迹法

本法不需要进行蛋白分离和转移，而是通过手工点样或真空设备点样将供试品直接固定于膜固相载体上，其余操作和注意事项同单向电泳免疫印迹法。

三、免疫荧光分析法

免疫荧光分析法系将抗原-抗体的特异性反应与荧光标记技术相结合而对供试品中待测物进行定性、定量或定位检测的方法。根据抗原抗体反应的结合步骤不同，一般可分为直接染色法、间接染色法、补体荧光抗体法和特殊染色法等。本法多用于生物原料药或制剂的效价测定、细胞表面抗原和受体的检测等。

1. 对仪器的一般要求

所用仪器有荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计、荧光偏振光分析仪、时间分辨荧光计和流式细胞仪等，需根据供试品类型和待测物含量水平选用不同的检测仪器。

2. 对标记物的一般要求和常用标记方法

荧光标记抗原或抗体为本法检测的基础，以荧光标记抗体更为常用。待标记抗体一般多选用单克隆抗体，应特异性强、滴度高、并经适宜方法纯化。用于标记的荧光素需具备以下条件：具有共轭双键体系；标记后不影响自身和待标记物的生物学活性；荧光效率高；产生的荧光与本底对比明显。常用的荧光素包括异硫氰酸荧光素 (FITC)、四乙基罗丹明 (RB200)、四乙基异硫氰酸罗丹明 (TRITC) 和镧系螯合物等。另外，某些酶的底物本身无荧光效应，经酶作用后可分解形成具有强荧光的酶解产物，如 β -GAL 的底物 4 甲基伞酮- β -半乳糖苷等。

不同荧光素一般通过透析标记法对抗体进行标记，经标记的抗体可采用透析法、柱滤过法、离子交换层析法、免疫吸附剂等进行纯化，并采用适宜方法进行质量鉴定，包括荧光素结合比率、抗体浓度和抗体特异性测定等。对制备好的荧光标记抗体应置适宜温度保存，也宜小量分装，避免反复冻融。

3. 测定法

按仪器使用说明书或各品种或通则项下的规定操作，操作步骤一般包括供试品前处理、封闭、染色（加荧光标记抗体）、洗涤、信号检测 and 数据分析。试验

中应设置适宜的对照，并根据预实验结果选择最佳的染色条件，数据分析方法取决于所用的检测仪器。

四、发光免疫分析法

发光免疫分析法是将抗原-抗体的特异性反应与高灵敏度的发光分析技术相结合而对供试品中待测物进行定性或定量分析的方法。根据产生发光反应的体系不同，一般可分为生物发光法和化学发光法；根据所用标记物和发光原理不同，化学发光法又可分为直接法、酶促法和电化学法。本法常用于活细胞的各种生物学功能的检测如细胞增殖或凋亡以及蛋白质印迹等。

1. 仪器的一般要求

所用仪器大多为全自动免疫分析仪，主要由试剂区、供试品区、反应测试管加样区、反应废液区等组成；少数为半自动化的酶标仪。

2. 对标记物的一般要求和常用标记方法

发光标记物标记的抗原或抗体为本法检测的基础。待标记抗原或抗体应经高度纯化并保持免疫学稳定性。发光标记物可直接参与发光反应，也可是仅起催化作用或作为能量传递过程中的受体而不直接参与发光反应。前者如常用于化学发光直接法的发光剂吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物等；后者如常用于生物发光法的荧光素酶、化学发光酶促法的 HRP 及 ALP 等酶标记物和常用于化学发光电化学法的三联吡啶钌[Rb(bpy)₃]²⁺ 等非酶标记物。

常用的标记方法主要有生物标记法和化学标记法，其中化学标记法有碳二亚胺（EDC）缩合法、过碘酸钠氧化法、重氮盐偶联法、N-羟基琥珀酰亚胺活化法等。不同的标记方法有各自不同的特点，应根据发光标记物和待标记抗原或抗体的结构特点来选择合适的标记方法。经标记的抗原或抗体可通过透析法、凝胶过滤法或盐析法进行纯化，并采用适宜方法进行质量鉴定，包括结合物含量、免疫学活性、发光率的测定等。应将制备好的结合物置适宜温度下保存。

3. 测定法

若为全自动化检测，按仪器和配套试剂盒使用说明书操作，应符合试剂盒说明书中的质量控制及方法适用性要求。数据处理按仪器内建的标准曲线进行分析。

若为半自动化检测，按各品种或通则项下的规定操作。根据具体检测方法选

择适宜的数学模型，常用模型有四参数逻辑斯蒂（logistic）回归函数、半对数模型和双对数模型等。

五、流式细胞术

流式细胞术系将细胞或颗粒载体上的抗原-抗体特异性反应与荧光标记技术相结合而对供试品中待测物进行定性或定量分析的方法。本法属于免疫荧光分析法，主要用于药品鉴别试验、结合活性测定和细胞类产品的分析，包括细胞亚群比例测定、表型分析、细胞因子、细胞增殖、细胞凋亡及细胞周期等功能性检测。

1. 对仪器的一般要求

所用仪器通常为分析型流式细胞仪，其结构主要分为液流系统、光路系统和检测分析系统。

2. 对标记物的一般要求和常用标记方法

一般采用特定的荧光素偶联单克隆抗体的方式进行标记。本法中常用于标记的荧光素有 FITC、藻红蛋白（PE）、叶绿素蛋白（PerCP）、别藻蓝蛋白（APC）、绿色荧光蛋白（GFP）和碘化丙锭（PI）等。标记方法主要有直接标记法和间接标记法：一般若仅需分析单一的抗原，建议使用直接标记法；若需同时分析多种抗原，则考虑使用间接标记法。其余相关要求见本通则免疫荧光分析法相应项下。

3. 测定法

按仪器使用说明书或各品种或通则项下的规定操作，测定中应设置阴阳性对照。操作步骤一般如下。

(1) 供试品制备 采用适宜方法将供试品制备成单细胞悬液。

(2) 封闭 由于抗体 Fc 段与细胞载体表面表达的 Fc 受体可发生非特异性结合而引起假阳性结果，因此在往细胞载体中加入荧光标记抗体前应采用适宜方法对其进行封闭。一般选择的荧光标记抗体应与细胞载体的种属不同。

(3) 仪器设置与操作 对激光器电流、电压和功率等参数进行设置和操作。还应进行补偿设置，以去除标记用的荧光素在非特定检测通道内出现的其他信号。

(4) 信号检测 流式细胞仪接收到的信号主要有散射光信号和荧光信号两种。散射光信号为流式细胞术中细胞固有的参数值，包括前向角散射（FS）和侧向角散射（SS），其中 FS 值反映细胞的大小，而 SS 值反映细胞的颗粒度；荧

光信号为流式细胞术重要的功能性参数,可根据检测系统是否接收到荧光信号和其相对强度,判断细胞是否表达相关分子和表达的多少。

(5) 数据分析 一般采用流式细胞仪分析软件中的流式图来分析处理细胞信号数据。最常用的流式图有直方图和散点图。直方图仅能表示一群细胞某一个参数的情况,而散点图可以表示一群细胞两个参数的情况。可通过设定噪音信号阈值和设门的方式以排除不需要或不相关的细胞信号。

六、放射免疫分析法

放射免疫分析法系将抗原-抗体的特异性反应与放射性核素标记相结合而对供试品中待测物进行定性或定量分析的方法。一般可分为竞争性结合分析和非竞争性结合分析,经典的标记抗原的放射免疫分析法(RIA)即属于前者,而标记抗体的免疫放射分析法(IRMA)则属于后者。根据操作步骤不同,IRMA法又可分为直接法、间接法、双抗体夹心法及生物素-亲和素系统法。本法主要用于激素和各种蛋白质的测定等。

1. 对仪器的一般要求

所用仪器为放射免疫分析仪,一般包括晶体闪烁计数器和液体闪烁计数器。晶体闪烁计数器通常由 γ 射线探测头、信号处理电路和计算机系统组成,用于检测 ^{125}I 等发出的 γ 射线;液体闪烁计数器通常由 β 射线探测模块、测量模块和计算机系统组成,用于检测 ^3H 、 ^{14}C 等发出的 β 射线。

2. 对标记物的一般要求及常用标记方法

放射性核素标记的抗原或抗体为本法检测的基础。待标记的抗原和抗体应高度纯化,并具有良好的免疫活性。用于标记的放射性核素应具备下列条件:半衰期长,易防护;与待标记物结合好,不影响其活性;计数效率较高,测定简单方便。常用的放射性核素有 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P 等,以 ^{125}I 最为常用。抗原和抗体的碘化标记法基本相同,一般有氯胺T法、乳过氧化物酶(LPO)法、氯甘脲法和连接标记法等。经标记的抗原或抗体应采用适宜的方法进行纯化和质量鉴定,包括放射性化学纯度、免疫学活性、放射性比活度的测定等。

3. 测定法

按仪器使用说明书或各品种或通则项下的规定操作,如使用放射免疫分析药盒,应符合试剂盒说明书中的质量控制及方法适用性要求。

定性分析 是将供试品检测结果与设定的临界值进行比较，判定供试品中待测物为阳性或阴性。临界值的设定方法见本通则酶联免疫吸附法相应项下。

定量分析 可根据具体检测方法选用适宜的数学模型。常用模型包括 Logit-Log 模型、双对数模型、半对数模型、四参数逻辑斯蒂 (logistic) 回归函数、二次多项式拟合法和折线拟合法等。RIA 通常首选 Logit-Log 模型；IRMA 一般选用双对数模型 (待测物在 ng~pg 级水平)，也可选用半对数模型 (待测物在 μg 级水平)。四参数逻辑斯蒂 (logistic) 回归函数为目前最符合免疫学规律而受到广泛推荐使用的数学模型，可用于 RIA 和 IRMA 两类分析方法，但需通过复杂的计算机程序实现。

非标记免疫化学法

一、免疫沉淀法

免疫沉淀法系指可溶性抗原 (如血清、毒素等) 与相应抗体，在适宜电解质存在的条件下发生结合，当比例适当时在澄清的溶液中形成肉眼可见的浑浊沉淀物的反应，主要用于抗原或抗体的定性或定量检测。根据反应介质和检测方法不同，免疫沉淀法可分为液体内沉淀反应和凝胶内沉淀反应：液体内沉淀反应主要有絮状沉淀反应、环状沉淀反应和免疫比浊法；凝胶内沉淀反应有单向免疫扩散法和双向免疫扩散法。

1. 对仪器及试剂的一般要求

定性分析方法一般不需特殊设备，仅需小试管、玻片、吸管等器具；而部分定量分析方法需要紫外-可见分光光度计、全自动蛋白分析仪或全自动生化分析仪等。

关键试剂一般包括标准品和特异性抗体，非关键试剂有供试品稀释液和反应缓冲液等。应尽可能选用单克隆抗体和高纯度抗原，并根据具体的实验体系选择适宜浓度及 pH 值的缓冲液。

2. 测定法

按各品种或通则项下的规定或仪器使用说明书操作。

(1) 絮状沉淀反应 试验中应设置阴阳性对照。若为定性分析，出现絮状颗粒为阳性，反之为阴性；若为定量分析，需以标准品溶液的絮状反应为参照，求得供试品的絮状单位值。

(2) 环状沉淀反应 试验中也应设置阴阳性对照，注意加入反应体系的抗原和抗体不能相混，且应避免气泡产生。若为定性分析，两液面交界处有白色沉淀环出现者为阳性，反之为阴性；若为定量分析，一般用于抗体效价滴定，以出现环状沉淀的最高稀释度为抗体效价。

(3) 免疫比浊法 包括透射比浊法和散射比浊法，一般为定量分析，可根据具体检测方法选用适宜的数学模型，常用模型有直线回归、双对数回归和 Logit-Log 回归等。

(4) 单向免疫扩散法 制板时要掌握好温度，避免过高或过低，且应注意勿产生气泡，加样量要准确。一般为定量分析，可以抗原参考品形成的沉淀环的直径对其相应抗原浓度作直线回归。若沉淀环直径与待测抗原含量呈非直线关系，也可采用其他适宜模型进行数据处理。

(5) 双向免疫扩散法 制板时应注意勿产生气泡。扩散时间要适当，时间过短，沉淀线不能出现；时间过长，会使已形成的沉淀线解离或散开而出现假阴性。若为定性分析，应同时设置阳性对照作为判断试验成立的条件，可根据沉淀线的有无和形式初步判定抗原成分及抗体种类的同源性。若为定量分析，一般也用于抗体效价滴定，以出现沉淀线的最高稀释度为抗体效价。

二、免疫电泳法

免疫电泳法包括经典免疫电泳法、火箭免疫电泳法、对流免疫电泳法和交叉免疫电泳法。经典免疫电泳法系将琼脂糖凝胶电泳和免疫扩散相结合的实验方法：先采用琼脂糖凝胶电泳将供试品中的蛋白质按电泳迁移率的不同进行分离，然后通过免疫扩散与相应抗体形成沉淀线，并根据沉淀线的数量、位置、形态等特征分析供试品中各成分。其他三种免疫电泳法均由经典免疫电泳法衍生而来。

1. 对仪器及试剂的一般要求

一般包括电泳仪及直流电源，具体要求参见通则 0541。

关键试剂主要有标准品和特异性抗体，非关键试剂主要有电泳缓冲液和凝胶基质。抗原抗体的反应性、特异性程度、浓度比例、稀释度、用量及琼脂糖凝胶基质的电渗作用均会对实验结果造成影响，在建立免疫电泳法时应对上述影响因素加以重点考察。

2. 测定法

按各品种或通则项下的规定或仪器使用说明书操作。经典免疫电泳法操作步骤一般包括制板、加样、电泳、扩散和结果判定，而火箭免疫电泳法、对流免疫电泳法和交叉免疫电泳法不需扩散，其余步骤与经典免疫电泳法基本相同。

(1) **经典免疫电泳法** 沉淀线的清晰度跟抗原抗体特异性程度和比例有关。如抗体效价较低，则需适当考虑抗原孔与抗体槽的距离。电泳扩散后可直接观察，也可染色观察。一般为定性分析，可通过与阳性对照比较判定是否为待测蛋白。

(2) **火箭免疫电泳法** 可采用方阵滴定法确定抗原抗体的稀释度，以形成轮廓清晰，前段尖窄而闭合的峰的抗体最小用量为最适用量，峰的高度一般以 2~5cm 为宜。大多为定量分析，以标准品沉淀峰高度/面积对抗原量作直线回归，计算供试品中抗原的含量。

(3) **对流免疫电泳法** 需注意电泳时抗原抗体的电极方向一定不能放反，电流不宜过大，电渗应适当；电泳结束后如沉淀线不清晰，可将琼脂板放入 37℃ 湿盒孵育数小时后再观察。一般为定性分析，可通过与阳性对照比较判定是否为待测蛋白。

(4) **交叉免疫电泳法** 试验中抗原抗体浓度需适当，如抗原太浓，沉淀峰可能呈弥散状而无法测量；而抗体太浓，可使沉淀峰过低。一般沉淀峰高度也以 2~5cm 为宜。可根据沉淀峰的位置及面积（或高度）对待测抗原进行定性或定量分析。

三、凝集反应

凝集反应系指颗粒性抗原（如红细胞、细菌或者吸附可溶性抗原的惰性颗粒等）与相应抗体，在适宜电解质存在的条件下发生特异性结合，当比例适当时形成肉眼可见的凝集块的现象。根据凝集反应的原理、方法及检测目的不同，凝集反应一般分为直接凝集反应、间接凝集反应和 Coombs 试验：直接凝集反应又可分为玻片凝集试验和试管凝集试验；间接凝集反应又可分为正向间接凝集试验、反向间接凝集试验、间接凝集抑制试验和协同凝集试验；Coombs 试验又可分为直接 Coombs 试验和间接 Coombs 试验。

1. 对材料和试剂的一般要求

所用实验器材一般有玻片、试管、血凝板、滴管、稀释棒等，试验前必须保持清洁。

关键试剂主要包括特异性抗体，非关键试剂一般有反应缓冲液等。应注意检查试剂本身有无自凝颗粒，并将缓冲液的电解质浓度和 pH 值保持在适当范围内，以免造成非特异性凝集。

2. 测定法

按各品种或通则项下的规定操作。建立凝集试验方法时应设置阴阳性对照，以减少判断的主观性对实验结果造成影响；同时对凝集反应呈现较短暂的实验结果还应注意结果的判定时间。

一般为定性分析和半定量分析：定性分析是将供试品结果与阴阳性对照相比较而进行判定；而半定量分析一般是对定性结果进行进一步的分级，如通过凝集块大小的不同来判定凝集程度。

四、表面等离子共振法

表面等离子共振法（SPR）系一种通过实时测定液相和固相界面上抗原-抗体复合物形成时偏振光折射的变化来定量供试品中待测物的方法。本法无需标记，常用于检测生物分子间相互作用的特异性和亲和力大小及定量检测供试品中待测物的浓度。

1. 对仪器的一般要求

所用仪器为表面等离子共振仪，主要由光路系统、光学检测器、液流系统、传感器芯片和含有仪器控制及数据收集处理软件的计算机系统组成。传感器芯片主要是作为固相界面偶联不同的多聚物以形成不同的表面环境，用于捕获液流系统中的待测物分子，可根据待测物分子的特性选择适宜的传感器芯片。传感器芯片表面可通过再生重复使用，若待测物或形成的复合物很容易被缓冲液洗去，则芯片表面不需进行再生，应根据芯片上生物分子与待测物分子结合反应的特性和实验的目的选择合适的再生条件。

2. 测定法

按各品种或通则项下的规定或仪器使用说明书操作，操作步骤一般如下。

(1) 供试品溶液和缓冲液的制备 按各品种或通则项下的规定制备供试品溶液、流动缓冲液和再生缓冲液。供试品中的不溶性颗粒物可采用离心法或低蛋白吸附过滤法等去除。流动缓冲液使用前应滤过并脱气，可通过调整其 pH 值、离子强度或其他条件减少非特异性结合。再生缓冲液需根据表面等离子共振仪液流

系统的材质来进行选择。

(2) **传感器芯片表面的制备** 传感器芯片表面的制备为 SPR 的核心步骤，通常是将特异性配体生物分子直接或间接地固定在传感器芯片表面的过程，使用的生物分子应具有较高的纯度。试验中既可使用预制的芯片表面，也可按仪器说明书自制芯片表面。

(3) **信号检测** 试验中应设置适宜的对照，并对基线、液流系统的流速和分析时间等测定参数进行设置和操作。

(4) **数据分析** 检测结束后，由计算机系统的分析软件获得不同溶液的传感图。供试品溶液的传感图应以流动缓冲液或对照的传感图为空白进行扣除，再将基线调零后进行分析。应根据不同检测目的选择适宜的数据分析方法。

附表 各类免疫化学方法优缺点及典型用途

方法分类	方法名称	优点	缺点	典型用途
标记 免疫 化学法	酶联 免疫吸附法	<ul style="list-style-type: none"> • 敏度高 • 通量 • 性动力学范围宽 	<ul style="list-style-type: none"> • 作步骤繁锁 • 涤步骤耗时且会产生生物危险废弃物 • 要标记试剂 	<ul style="list-style-type: none"> • 杂供试品中特定蛋白质浓度测定 • 白质鉴别 • 度测定 • 疫原性测定 • 价测定
	免疫印迹法	<ul style="list-style-type: none"> • 析待测蛋白分子量大小或电荷信息 • 离含有相同抗原表位的不同抗原、降解/聚合物 • 测定复杂混合物 	<ul style="list-style-type: none"> • 常仅适用于线性表位 • 作繁琐 • 通量和低产出 • 果判断相对主观 • 限于蛋白质检测 	<ul style="list-style-type: none"> • 白质纯度测定 • 白质稳定性测定 • 白质鉴别试验
	免疫 荧光分析法	<ul style="list-style-type: none"> • 特异性高 • 直接法非特异性荧光少 • 接法灵敏度高 	<ul style="list-style-type: none"> • 接法灵敏度偏低，每检测一种抗原就需要制备一种荧光抗体 • 间接法参加反应的因素 	<ul style="list-style-type: none"> • 细胞表面抗原和受体的检测 • 异性抗原的鉴定

			多, 受干扰的可能性大, 操作繁琐, 耗时长	价测定
	发光 免疫分析法	<ul style="list-style-type: none"> • 灵敏度高 • 线性动力学范围宽 • 全自动化、高通量 	<ul style="list-style-type: none"> • 仪器成本高 • 发光的发射强度依赖于各种环境因素 	<ul style="list-style-type: none"> • 细胞增殖或凋亡等检测 • 蛋白质印迹
	流式细胞术	<ul style="list-style-type: none"> • 高通量 • 高度自动化 	<ul style="list-style-type: none"> • 用限于与磁珠相结合的细胞或颗粒性样品 • 对聚合体和样品基质敏感 	<ul style="list-style-type: none"> • 价测定 • 细胞治疗类产品的功能性检测
	放射 免疫分析法	<ul style="list-style-type: none"> • 灵敏度高 • 特异性强 • 操作简便 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要放射性标记物, 存在放射性辐射和污染 • 衰期短的放射性核素需定期制备示踪剂 	<ul style="list-style-type: none"> • 蛋白质鉴别 • 杂供试品中特定蛋白质浓度测定 • 效价测定
非标记 免疫 化学法	免疫沉淀法	<ul style="list-style-type: none"> • 操作简便 • 多数方法仪器成本低 • 免疫比浊法可定量 	<ul style="list-style-type: none"> • 仪器法结果判断相对主观 • 多数方法灵敏度较低 	<ul style="list-style-type: none"> • 疫苗鉴别试验 • 抗原或抗体的纯度测定 • 抗原含量或抗体效价测定
	免疫电泳法	<ul style="list-style-type: none"> • 操作简便 • 重复性好 • 过程及结果便于监测和测定 • 仪器成本低 	<ul style="list-style-type: none"> • 分析速度较慢 • 灵敏度较低 • 较难精确定量 	<ul style="list-style-type: none"> • 供试品各成分及其电泳迁移率的测定 • 抗原或抗体的纯度测定 • 蛋白质含量测定
	凝集反应	<ul style="list-style-type: none"> • 微量、快速、操作简便 • 应用范围广泛 • 仪器成本低 	<ul style="list-style-type: none"> • 结果判断相对主观 • 对抗原纯度及血清效价要求较高 	<ul style="list-style-type: none"> • 疫苗鉴别试验 • 菌种的诊断或分型 • 抗体效价测定
	表面等离子 共振法	<ul style="list-style-type: none"> • 直接检测结合反应 • 可精密测定亲和力, 包括结合/解离速率 	<ul style="list-style-type: none"> • 芯片表面固定可影响结合 • 芯片表面再生可影响结合 • 通量和低产出 	<ul style="list-style-type: none"> • 疫苗原性测定 • 疫苗活性测定 • 抗体间亲和力测定 • 杂样品中特定蛋白质浓度的测定

课题承担单位：上海市食品药品检验所

021-38839900-26104

协作单位：

中国食品药品检定研究院

广东省药品检验所

江苏省食品药品监督检验研究院

北京万泰生物药业股份有限公司

信达生物制药（苏州）有限公司

信本医药