

前 言

本标准的制定有助于免疫沉淀分析试剂的相关厂商统一试剂的制备方法,同时有利于临床实验室进行免疫沉淀分析的标准化质量管理,从而改变目前在免疫沉淀分析方面的混乱状况。

本标准从 2002 年 7 月 1 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准起草单位:上海医科大学华山医院。

本标准主要起草人:吕元、朱玉胜。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

免疫沉淀分析标准 有关应用材料的评价

WS/T 221—2002

Guidelines for immunoprecipitin analyses —Procedures for evaluating the performance of materials

1 范围

本标准建立了免疫沉淀分析所用材料制备的评价程序,同时介绍了常用的免疫沉淀分析方法的特异性问题,提出了试剂盒说明书中应包含的必要信息,推荐了参考品的制备方法。

本标准适用于从事免疫沉淀分析的临床检验人员及相关试剂生产厂商。

2 抗体质量评估及免疫化学特异性的评价

2.1 免疫原的质量评估

制备抗血清时,通常不需要使用单克隆蛋白质或来自单一供体的蛋白质作为免疫原,但应使用来自正常组织及体液中的正常蛋白质分子和/或同种型蛋白质以避免独特型或同种异型分子特异性对检测的干扰。在本标准中,主要以各种免疫球蛋白为例加以说明,因为这些免疫球蛋白分子代表了实验室所测定的蛋白质中抗原变异最大的。有关免疫球蛋白免疫沉淀分析的评价也可作为评价其他特异性较低的血清蛋白质分析时的参考。

制备抗体时,所用免疫原应包括所有抗原亚型,以尽可能避免所制备抗体的反应性及特异性的差异。例如,用于制备抗 IgG 抗体的免疫原免疫动物产生的抗血清经适当处理后只能与 IgG 分子反应,而不能与其他种类的免疫球蛋白或血清、血浆、尿液、脑脊液、精液、组织液及异常病理性体液中的其他蛋白质反应,产生的抗血清应当主要包含针对四种 IgG 亚类(IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)分子的共同部位的抗体,而且对这些亚类分子的反应性不应存在差异。抗血清不应与任何一种免疫球蛋白的游离型或结合型轻链发生沉淀反应。许多血清蛋白具有多态性及不同表位(如 α_1 -抗胰蛋白酶和结合珠蛋白),免疫原应尽可能包括此类蛋白分子的所有形式。抗 IgA 的制备亦应基本符合以上规定,即制备的抗 IgA 应与 IgA₁、IgA₂ 均能发生反应。

IgM 尚未发现亚类的存在,制备抗 IgM 的免疫原应使用包括 Waldenstrom's 巨球蛋白个体的血清及正常人血清。

2.1.1 同种型特异性

当某种免疫原用于制备针对异常免疫球蛋白组分的抗血清时,应注意同种型特异性问题。目前尚无可与所有临床样品均能发生反应的商品化抗血清,所以尽管这些抗血清是通过一系列纯化的蛋白质免疫动物产生的,但是偶尔会出现某种样品不能与抗血清进行完全反应的情况。

2.1.2 免疫原的降解

当免疫原可能发生显著改变分子结构的降解及欲分析样品在贮存过程中可能发生降解时,应使用其已降解的最稳定分子形式作为免疫原,而不是采用其在体内状态下的天然形式。例如:用于制备抗 C3 的抗血清时,应采用已降解且稳定的 C3c(B1a)作为免疫原。

中华人民共和国卫生部 2002-04-20 批准

2002-07-01 实施

2.2 抗体的特异性评估

2.2.1 方法

对多克隆抗血清的特异性评估应使用敏感度高的方法,如交叉免疫电泳、免疫印迹法等,不要使用敏感度及精确度差的方法如免疫扩散、免疫电泳等。单克隆抗体的特异性检查应采用竞争抑制模式,方法学可选择放免法、酶免法或免疫印迹法。

2.2.2 检测

用交叉免疫电泳法评价抗血清特异性的方法是在第二方向电泳完成后,凝胶在室温下孵育染色1 h后观察结果。用免疫印迹法进行评估时,转移膜应与抗血清孵育1.5 h,蛋白质条带的染色可用考马斯亮兰、银染、胶体金或其他具有相似敏感度的染料,不能使用丽春红S、氨基黑、快绿。

2.2.3 材料

尽量包括所有可能采用的材料如血浆、尿液及脑脊液,并且有不同稀释度(1:20、1:5、不稀释、最适浓度等),在使用脑脊液或尿液时,应使用10倍或100倍浓缩样品作为质控物。

用于抗血清定性评估的抗原可来源于新鲜血清、血浆。若怀疑或已知有交叉反应存在,在对抗血清进行特异性评估时,应使用含有交叉反应抗原的样品,并说明交叉反应的程度。

2.2.4 免疫沉淀法主要检测的蛋白质

2.2.4.1 免疫球蛋白与轻链:IgA, IgD, IgG, IgM, 轻链(κ , λ)。

2.2.4.2 补体: C1(q, r, s), C3, C4, C5。

2.2.4.3 急性时相反应蛋白: α_1 -酸性糖蛋白, α_1 -抗胰蛋白酶,C-反应蛋白,铜蓝蛋白。

2.2.4.4 血红蛋白与结合珠蛋白:血红蛋白A、血红蛋白F、结合珠蛋白。

2.2.4.5 出血相关蛋白:抗凝血酶Ⅲ、纤维蛋白原、纤溶酶原、凝血酶原。

2.2.4.6 脂蛋白与载脂蛋白:载脂蛋白(a),载脂蛋白A-I,载脂蛋白A-II,载脂蛋白B(ApoB-100),载脂蛋白C-II,载脂蛋白E。

2.2.4.7 其他:白蛋白、AFP、 α_2 -HS 球蛋白、冷沉淀球蛋白、纤维连接蛋白、Gc 球蛋白、 α_2 -巨球蛋白、前白蛋白、转铁蛋白。

2.3 抗血清的制备

2.3.1 免疫动物的选择:制备用于免疫沉淀反应分析的抗血清不应采用驴、马、骡等大型动物,应采用山羊、兔、鸡等小型动物,因大型动物产生的抗血清易导致抗原过剩。

2.3.2 纤维蛋白原的去除

血块凝固不完全的抗血清可能会有一定量的纤维蛋白原,在扩散过程中可凝固而产生沉淀,因此应去除抗血清中的纤维蛋白原。

2.3.3 脂质及微粒的去除

制备的抗血清应采用离心沉淀方法(10 000 g)去除脂质及微粒,免疫球蛋白的纯化可用盐析法和层析法等。

2.3.4 非特异性抗体的去除

某些抗血清可与某些血清或血浆标本,特别是异常标本形成非特异性的沉淀,在双向扩散过程中可形成与特异性沉淀反应相似的非特异性沉淀。

大多数免疫沉淀分析要求去除抗血清中不需要的非特异性抗体。通常采用两种方法:第一种为吸收,即加入可溶性抗原与相应抗体形成免疫复合物,通过离心沉淀和/或过滤法去除。第二种是吸附,即通过固相化抗原将相应抗体吸附。用吸附法可能会使抗血清中残留少量抗原抗体复合物。但由于此方法较实用,故采用吸附法较多。

2.3.5 免疫复合物的去除

在对抗血清进行吸收/吸附以获取相对单一特异性的抗血清的过程中,即使进行充分离心或过滤,可溶性抗原-抗体复合物仍不能去除,可在介质中加入适量增浊剂(如PEG8000)以尽可能去除可溶性

抗原-抗体复合物。

2.3.6 IgM 的去除

在某些情况下可能会发生反向免疫沉淀反应。如先天性 IgA 缺乏的患者血清中常含有一定水平低亲和力的人抗反刍类动物血清及牛奶蛋白的抗体,该抗体主要与反刍类动物 IgM 及鼠类的免疫球蛋白反应。在检测低水平 IgA 时,应使用兔源性或已去除 IgM 的鼠源性抗血清。

2.3.7 干扰物质

抗血清不应含有超过一定水平的干扰物质如肉眼可见的溶血、黄疸。

2.3.8 非特异性抗体的定量评估方法

用于免疫沉淀分析的抗血清经适当稀释后用单向免疫扩散(RID)法对其特异性进行定量评估。在大多数情况下,用于凝胶沉淀分析的抗人血浆蛋白的高质量商品化抗血清应按 1:3~1:8 稀释,甚至更高。

2.3.9 非特异性抗体的含量

抗血清应有特异性抗体的含量,若无法定量则要求提供抗原抗体最适比的效价及出现钩状效应时的抗原浓度。抗血清在高于 1:5 稀释时进行免疫扩散,其非特异性抗体不应出现可见的沉淀,并且不应与浓度大于 5 mg/L 的大多数血浆蛋白直接发生反应。

3 试剂盒说明书和产品评价

从用户的角度来说,在对产品进行评价时应考虑以下几个问题。

3.1 说明书的规格

试剂盒的用途和局限性应在试剂盒说明书中说明。实际上,抗血清对于抗原的绝对特异性是不存在的,用 RIA、EIA、FIA 测出具有非特异性抗体的抗血清仍可用于免疫沉淀分析。

试剂盒中来源于人体的材料应进行 HBsAg、HCV 抗体、HIV 抗体的检测并呈阴性,试剂说明书应对此明确说明,并提示所有人体来源的材料均按有传染性进行处理。

3.2 特异性

抗血清的特异性与所用测定方法有关,试剂盒说明书应标明抗血清的特异性通过何种方法测得。

3.3 免疫原的来源

免疫原的来源应按通用术语进行叙述。

3.4 抗血清处理方法

抗血清的处理方法如吸收/吸附的方法应在说明书及试剂的评价部分说明。

3.5 抗血清进一步处理的推荐方法

对用于散射测定法及可能含有可溶性抗原抗体复合物的抗血清应当提供进一步处理的推荐方法(见 2.3.3 部分)。

3.6 种间交叉反应

对于某些用户来说,有关种间交叉反应的信息可能比较重要,如果抗血清存在种间交叉反应,应在说明书中加以说明。

4 免疫沉淀反应的分析方法

尽管根据抗原-抗体沉淀反应的原理已设计出许多的分析方法,但本标准仅对几种广泛应用的分析方法进行评价。凝胶内免疫沉淀分析方法主要有 4 种:单向免疫扩散(RID)、火箭电泳、免疫电泳(IEP)和免疫固定电泳(IF)。另外还有两种液相免疫沉淀定量分析方法:透射比浊测定法和散射比浊测定法,包括终点法和速率法。

4.1 单向免疫扩散(RID)

RID 与抗原的分子量及分子构型有关。在进行免疫球蛋白测定时还受抗血清的特异性的影响。若

抗血清中含有其他混杂抗体或出现不同分子量的抗原降解产物,在进行 RID 分析时便可能会出现多重沉淀环。

4.2 火箭电泳

火箭电泳受抗原相对分子质量变化影响较小,但也易受混杂抗体或类及亚类表位特异性的影响。

当出现双重或模糊火箭沉淀时,提示抗体特异性欠佳或抗原具有特殊结构。

4.3 免疫电泳(IEP)及免疫固定电泳(IF)

IEP 和 IF 属非定量分析方法,对于低水平混杂抗体的敏感性较低。在实际工作中,混杂抗体应与临床常规样品中的大多数蛋白质(见 2.2.4)出现肉眼可见的染色条带。

4.4 液相免疫沉淀分析

液相免疫沉淀分析包括散射比浊法和透射比浊法。液相免疫沉淀分析不易检出抗血清中的非特异性抗体,可采用交叉免疫电泳、对流免疫电泳和免疫固定电泳检测抗血清中的非特异性抗体。在实际工作中,如果抗血清中的非特异性抗体的浓度较低,一般不会对液相免疫沉淀分析的结果影响太大。

进行液相免疫沉淀分析时,为加速免疫复合物沉淀的形成,必须加入增浊剂。增浊剂一般在缓冲液中加入,加入量应严格控制。

5 校准/校准品和质控品

采用自动化仪器进行血清特定蛋白测定技术如透射比浊和散射比浊法已达到与传统比色分析法相媲美的水平。另外,结果的精密度已达到或超过普通的比色分析法。尽管如此,由于 RID 法不需要特殊仪器,仍有相当数量的实验室采用 RID 法。

无论何种类型的分析,校准的目的相同,即将物理的或光电检测信号转化为质量单位。有两种基本的校准类型:多点校准和单点校准。无论何种方法,试剂厂商都应应对每一批试剂进行检测以确保试剂的批间稳定性和精密度。另一方面,用户应按不同的要求进行多点或单点校准。以下是一些常用免疫沉淀分析的一般校正方法,其他类型免疫沉淀分析技术的校准方法与此类似。

5.1 单向免疫扩散:校准品和质控品

在进行单向免疫扩散时,蛋白质在凝胶中的扩散受操作者本身因素的影响。为尽可能减小结果的变异程度,每块凝胶上均应有一套校准品和质控品。另外,凝胶板应在恒温且高湿度的环境中孵育。

5.1.1 校准品

校准品应包括从正常参考范围下限至上限的一系列不同浓度,一般推荐采用五种浓度。厂商对校准品浓度值的设定应按照 IFCC“人血清蛋白参考物的制备(RPPHS)/CAP/BCR/IFCC Lot 91/06 19”之规定。

5.1.2 质控品

质控品应包括高、中、低三种不同浓度。质控品可以由临床实验室制备的混合样品,并经分装后在一定条件下冻干,或经准确定量的商品化质控品。

5.2 免疫透射比浊和免疫散射比浊

仪器对样品进行精确取样、稀释,与抗血清混合后进行振荡,在一定的温度、湿度条件下形成具有光散射作用的免疫复合物,所以操作者本身带来的误差对仪器测得结果影响较小,尽管如此,用户亦应对仪器进行定期检查以保证其运作正常。

5.2.1 校准

目前,所有仪器均要求使用标准的校准方法以便将光电信号转化为质量单位或国际单位的相对值。理想的校准曲线应为直线,但实际上很难完全呈直线。

良好的试剂稳定性和仪器的精密性可减少校准的次数。但不管试剂仪器如何先进,用户仍应经常通过检测定值质控品以监测仪器的运行状态。

5.2.1.1 多点校准系统

多点系统的校准要求进行 6 点曲线校准,其中包括 0 点。试剂厂商应保证按照 IFCC 参考物制备校准品。校准曲线贮存于仪器中,可多次使用。通过不同水平质控品的检测以保证结果的准确性。

5.2.1.2 单点校准仪器

单点校准是多点校准的简化形式,但每个校准应重复 2~3 次以保证测定的准确性。如果剂量-响应曲线中剂量与响应的关系呈很好的比例,尽管有一定的漂移范围,但校准曲线仍然有效。

5.3 质控品

质控品应包括高、中、低三种浓度,质控材料必须与样品性质相似(即介质相似),且浓度呈一定比例。试剂厂商应保证质控品的线性应与新鲜血清的线性相似。

6 参考物

用于免疫沉淀法测定蛋白的参考物必须使用所能得到的最新且具有权威性的参考物。IFCC 已制备了一种能被广泛接受的新的血清蛋白参考物,该参考物参照世界卫生组织以 IU 为单位的参考物及美国疾病控制与预防中心的血清蛋白国家参考物(RPSP)或以 g/L 为单位的纯化蛋白质制备而成。

载脂蛋白参考物不包括在上述参考物之列。由于大多数方法需澄清血清,因此要求去除脂蛋白。

所有生产商品化血清蛋白参考物的厂商应参照 IFCC 参考物 RPPHS/CAP/BCR/IFCC Lot 91/06 19 的规定,该参考物在欧洲可从布鲁塞尔的 Bureau of Community References (BCR)获得,在北美可从美国病理学学会(CAP)获得。
