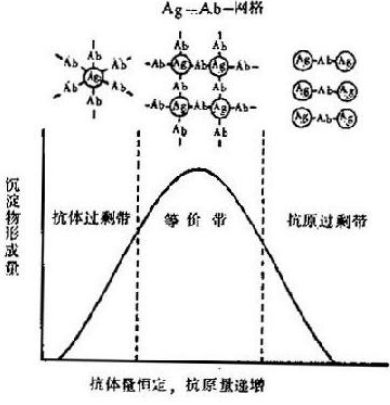
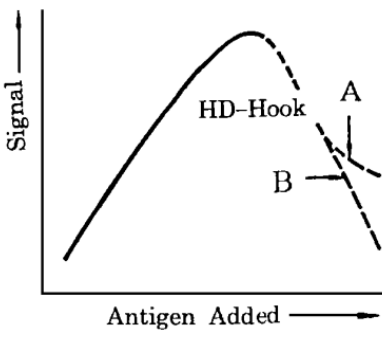


Hook 效应

一、实验现象

 <p>图 1</p>	<p>在传统免疫血清学（凝集、沉淀等）检测抗原抗体的方法，基本原理是抗原抗体分子在液（均）相的环境中，自由运动、互相碰撞从而完成其特异性结合的反应。</p> <p>反应过程中，剂量反应曲线呈抛物线状；简单地将曲线划分为三个区域：抗体过剩（前带）、等价带、抗原过身（后带）。</p>
 <p>图 2</p>	<p>免疫标记测定方法（ELISA、RIA 等）在检测高剂量抗原抗体标本时，会出现假低值甚至假阴性。（A——假低值，B——假阴性）</p> <p>以 AFP 为例，在原发性肝癌（PLC）患者血清中的 AFP 值高低悬殊极大，正常值（20ug/L）与病理值（5.94×10^6 ug/L）相差 5 个数量级。有文献报道，用 IEMA 测定一名原发性肝癌患者原血清 AFP 浓度为 29ug/L，然而将血清标本做一系列稀释后测定并计算出 AFP 实际浓度为 5.9×10^6 ug/L。</p>

二、基本概念

区带现象

区带现象是免疫血清学检测方法中的普遍性规律，图 1 即为较常见的 α -沉淀（或凝集）曲线。整个曲线可以简单的分为三个区域（有的则分的更细，划分为 5 个区域，见图 3）。

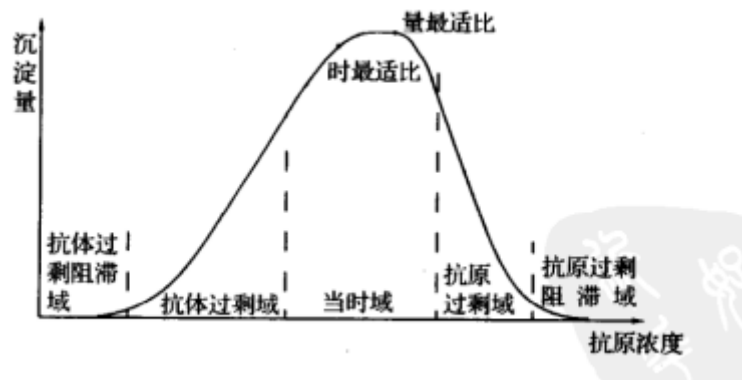


图 3

Hook 效应

英文名词 HOOK，直译为钩子或镰刀。Miles 最初用它来如实描述在用二步夹心 IRMA 测定铁蛋白的实验过程中，发现其剂量反应曲线的形状很特殊。该线型与带现象的近似抛物线型不一样，亦不像 ELISA 的正常剂量反应的 S 型曲线。其特点是：在抗原浓度不断增加时，线型上场，达到峰值后，迅速向下弯落。对这种在高剂量区段的、既像钩又似镰的异常线型，当时又无法解释 Miles 忠实于实验结果，按其线型的状态，写实性的杜撰出“HD-HOOK”效应（High Dose-Hook）这一新的学术名词。

HD-HOOK 效应是固相测定方法特有的异常现象，但不是所有固相法都存在“HD-HOOK 效应”的问题。迄今为止，采用竞争方法检测高剂量抗原，尚未发现假低值、假阴性情况的报道。而二步二位点夹心法（简称二步法）和一步二位点夹心法（简称一步法），均可产生“HD-HOOK 效应”，而且其分子基础不同。

一步夹心法：一步法是将待测抗原标本与限量标记二抗，同时加入已经预先包被了一抗的微板孔内。在这种情况下，抗原抗体的免疫化学反应过程，在固相与液相同时进行。在液相中，大量过剩的抗原与被捕捉的抗原，彼此竞争结合限量的标记二抗，其最终信号，与游离抗原的多少呈反比关系。其机理的核心是抗原“量”的问题；也可以说，一步法“HD-HOOK 效应”，实际上是一种“浓度效应（concentration effect）”。当然，在固相载体表面，标记二抗与被捕捉抗原的交叉重叠结合而导致抗原变构，亦可能是一个次要的因素。经验表明，只要靶抗原的正常值与病理值之差大于 3 个数量级，均应警惕由于严重的“HD-HOOK 效应”而发生假阴性（见图 2 右 B 线），其次是假低值（见图 2 右 A 线）的实验误诊。

二步夹心法：二步法的实验流程是，加待测抗原标本到预先包被第一抗体的微板孔内，未结合的抗原被洗涤出去，再加入标记第二抗体与被捕捉的抗原分子相结合，未结合的标记二抗被洗出。最终的结合物信号（CPM、OD、荧光强度等），理应与待测抗原的浓度呈正比关系。假若待测标本中含有高剂量抗原，能使一抗呈饱和结合状态，其剂量反应曲线应该呈平台状延伸。然而，事实相反，其线型呈向下弯落状态。最令人困惑不解的问题是，被一抗捕捉结合的抗原分子，为何在第二步与标记二抗反应后，离开一抗而被洗脱。1975 年，杂交单抗技术问世，Femand 等设计了一个堪称现代经典的实验模式，使这一课题的研究取得了突破性进展。当时所选用的试验方法是二步 IRMA，靶抗原是一个已知其 WM 为 22kDa、仅有二个不同抗原簇的人生长因子（hGH）。一个单抗用于包被，另一个作 ^{125}I 标记作二抗。用此实验系统，测定单体 hGH 抗原时，没有发现“HD-HOOK 效应”问题；奇怪的是，用同样实验系统，测定非共价结合的二聚体（D）-hGH，则呈现了“HD-HOOK 效应”。据此实验结果，推导出一个新理论：即标记二抗介导被捕捉抗原分子发生分子“变构（Conformational change）”，使

之形成标记二抗与变构的抗原分子复合物，从固相一抗上解离，最终产生反应信号减低的“HD-HOOK”效应。这种“抗原分子变构理论”的核心是抗原的“质”的问题。

三、实践应用

在实际应用过程中，尤其是针对一些临床可见范围较广的抗原抗体检测，Hook 效应的问题尤其值得注意。

在试剂盒研制过程中，Hook 效应应作为试剂盒的重要性能指标之一进行研究。试剂盒在检测浓度过高的样本时，即使不能报出准确的靶值，亦应该明确提示该标本已经超出试剂盒检测的上限，以提示使用者注意。为了减少 Hook 效应的影响，需弄清靶抗原的决定簇谱，合理地选择单抗组合。

目前，避免因 Hook 效应带来的误诊最稳妥办法是采取稀释测定（原倍血清与适当稀释的血清同时检测）。