

技术与方法

化学发光免疫测定

李 益 新

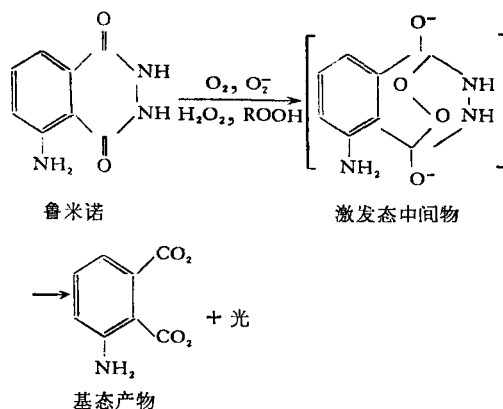
(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

一、前 言

放免测定技术具有极高的灵敏度, 再加上抗原-抗体反应本身所具有的特异性, 所以它一直是检测生物体系中所含的微量激素、药物以及其它代谢产物的理想工具。但其所用的标记物——放射性同位素不断衰变, 不能久存; 又对人体及被测生物大分子有损害, 同时检测用的仪器(如液体闪烁谱仪)昂贵, 维护成本高; 且需要将抗体结合的和游离的部分分离后测定(异相测定), 这就带来一套分离技术上的麻烦和由此造成的误差。尤其是不易实现自动化, 对临床大批量样品的检测极为不便。因此研究者一直在寻求既保持高度的反应特异性和检测灵敏度, 又能避免上述放免测定的缺陷的新方法。它们是: (1) 酶标免疫测定; (2) 荧光免疫测定; (3) 化学发光和生物发光免疫测定; (4) 浊度免疫测定。本文主要介绍化学发光免疫测定(CLIA)技术的基本原理, 分类、测定过程以及在生物医学研究中的应用现状和前景。

二、CLIA 的基本原理

从一个化学反应(一般是氧化反应)中获得能量, 使反应物或产物分子之一激发, 形成电子激发态, 当其驰豫返回基态时, 以发射光子的形式释放能量这一过程称为化学发光。常用的化学发光剂, 如鲁米诺(luminol, 3-氨基苯二甲酰肼), 在有氧化剂如氧气, H_2O_2 , O_2^- 以及其它过氧化物存在下, 可以被氧化, 产生一个电子激发态的中间物, 当其返回基态时, 即向外发光, 可



鲁米诺化学发光机理

以用发光检测装置定量测定^[1]。其它一些环酰肼类化合物如异鲁米诺及其草酸酯、吡啶盐等在合适的条件下都能产生化学发光。把这种发光剂或其衍生物加入到一个免疫反应体系中, 取代放射性同位素, 最终以发光强度来计算表征待测物质的量, 这就是 CLIA 测定的基本原理。应用化学发光剂取代放射性同位素优点是试剂稳定, 无毒、检测方便; 缺点是化学发光剂的发光量子产率低(0.01—0.05), 但由于现代电子技术的高度发展, 用灵敏的光电倍增系统也可以检测。目前应用 CLIA 在检测灵敏度、特异性、准确度和精确性方面均与定型的 RIA 达到同等水平。一般可检测 Picomole (10^{-12}M) 数量级。最高可达 10^{-18} — 10^{-20}M 。

三、CLIA 的分类及测定程序

化学发光试剂可以直接和间接两种方式参与一个免疫测定系统。当化学发光剂直接作标记物参与免疫测定时又可根据测定体系不同分

为匀相测定和异相测定两类,下面分别叙述。

1 匀相 CLIA 所谓匀相测定,就是反应混合体系不需要进行分离即可直接测定,这是与一般 RIA 所不同的地方。可以应用匀相测定的场合是:与抗体结合的部分和游离的部分发光强度上有明显不同,例如:Schroeder 等^[2] 1978 年合成的生物素——异鲁米诺这一发光共轭体,当与卵白素结合后,发光强度增高 10 倍,所以不需要将游离的部分除去,便可直接测定。匀相测定的优点是操作简便,分析快速、易于自动化,缺点是易受生物样品中存在的干扰物质的影响。

2 异相 CLIA 异相测定是指将抗体结合的与游离的部分分离后进行测定的方法,这与一般 RIA 测定过程相同。一般又可分为两种方式:一般固相法和双抗体“夹心”法。

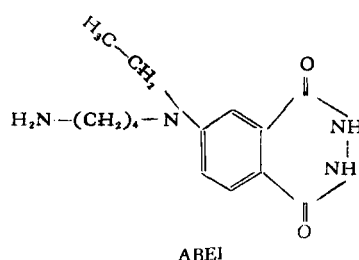
(1) 一般固相法 先将特异性的 IgG 抗体结合于聚乙烯试管壁上,然后与发光标记的抗原反应,反应混合物弃去,并用缓冲液冲洗管壁以除去未结合的抗原和其它干扰物质,最后加入适当的氧化体系激发化学发光并测定。如前所述,这种方法可除去干扰物质的影响,减小本底发光值。缺点是管与管之间的差异较大,已经证明抗体与不同种类的塑料管的反应不同。为了维持测定精确性和定量可比,必须使用同一规格型号的聚乙烯塑料管。

(2) 双抗体“夹心”法 这一方法在一般的放免测定(RIA)和酶标免疫测定(EIA)中已经应用。即先将抗体涂在一种固相载体的表面,然后加入抗原与其反应(如保温 2 小时)后,除去反应液并冲洗,然后再加入发光标记的抗体,这时抗原被固相抗体和标记的抗体夹在中间,故称为“夹心”法(Sandwich)。当一个抗原分子可以与多个标记的抗体分子相结合时,这种“夹心”法尤为适用,既可以减少本底干扰,提高灵敏度,同时又能缩短反应时间,而且已能够自动连续测定。

3 测定流程 现以双抗体固相“夹心”法测定为例说明一般的操作流程。

(1) 合成异鲁米诺衍生物 单纯的鲁米诺

发光量子产率比异鲁米诺要高,但当苯环上的氨基一经烷化修饰后,量子产率大大下降,相反异鲁米诺苯环上的氨基经烷化后,量子产率反而增加 5 倍,所以在制备发光共轭体时,常常使用异鲁米诺^[3]。已经合成了一系列异鲁米诺的衍生物,它们在苯环氨基上接上不同链长的“臂”,末端是一个游离-NH₂基,中间隔 2 个 CH₂ 的称为 AEEI(氨基乙基乙基异鲁米诺),中间隔 4 个 CH₂ 为 ABEI,隔 5 个的为 APEI,6 个的为 AHEI。下图为常用的氨基丁基乙基异鲁米诺(ABEI)的结构式:



(2) 制备发光共轭体 上述异鲁米诺的衍生物(如 ABEI)通过游离的-NH₂基与生物大分子(如胆固醇、生物素、前列腺素, IgG 等)的衍生物的游离-COOH 构成肽键,组成发光共轭体,作为发光标记的抗原或抗体参与以后的免疫反应。Collins 等^[4]合成了一系列胆固醇-异鲁米诺的衍生物用于测定血浆中胆固醇及尿中的代谢产物。Schroeder 等^[5]合成的 AHEI-抗人 IgG 共轭体,用于双抗体固相“夹心”法免疫测定中。

(3) 抗体的制备和固相化 在宿主动物中(如兔),用特异性的多克隆抗体和单克隆抗体技术产生特异性的抗体及其纯化鉴定,如同一般免疫学方法。可用各种固相载体作为支架制备固相化的抗体,如一般所用的聚乙烯、聚丙烯塑料管。如前所述,为了获得一致可比的结果,应选择同一规格型号的塑料管制备固相抗体。常用的缓冲体系是巴比妥缓冲液和磷酸缓冲液。加入 0.1—0.3% 的牛血清白蛋白(BSA)有助于增强发光,但要注意 BSA 的纯度以防止混入干扰物质。

(4) 与 NaOH 保温 有些测定过程中,为

了获得高的灵敏度,可增加 NaOH 保温这一步。但 NaOH 的浓度,保温的温度及时间等最适条件视不同测定体系而异,应根据经验加以确定。对采用这一步有人持异议^[4],因为升高 pH 虽有助于提高异鲁米诺发光剂的发光强度,但对标记物的理化性质也有影响,而且往往引起抗体结合的解离。

(5) 加入抗原进行反应。

(6) 再加入标记的抗体,完成“夹心”过程。

(7) 加入氧化反应体系 一般氧化系统采用过氧化氢 (H_2O_2) 和微过氧化物酶 (Microperoxidase 简称 MP) 系统。

(8) 测定化学发光强度 可用专门仪器如 LKB Wallac 1250 型发光仪,也可用液体闪烁谱仪或一般的计数器。更灵敏的测定可应用单光子计数器。数据可有两种方式给出:一是起动反应后某一时刻末了发光的峰值(如 1250 型直接给出 mV 数),也可用起动反应一定时间间隔内发光的积分值(如液闪谱仪 1 分钟内的计数值 C. P. m)表示。最终根据发光强度换算出对应的待测物质的量,完成整个免疫测定。

以上是双抗体固相“夹心”法全过程,对于匀相测定,需经第 1, 2, 3 (前半步), 5, 7 和第 8 步。对于一般固相法需经第 1, 2, 3, 5, 7, 8 步。第 4 步是否需要视实验条件而定。

以上是发光剂直接作为标记物应用的情况,以下讨论发光剂间接用于免疫测定。这实际上是一种酶标免疫测定 (EIA) 的过程,所不同的是最终不是用比色法测酶的活性,而是通过发光测定。在 EIA 中用作标记酶的一些过氧化物酶,如乳酸过氧化物酶,辣根过氧化物酶,还有一种小分子量的小肽,是猪心细胞色素 C 经胰蛋白酶降解切割后的部分,有 10 个左右氨基酸残基与一个血红素的铁卟啉相连,称为微过氧化物酶^[6]。ELA 测定的灵敏度与过氧化物酶的活性有关,在这些过氧化物酶作为标记物共轭连接到免疫体系的过程中酶本身活性丧失将近一半,再加上最后是通过一般比色的方法测定,所以 EIA 的灵敏度不如 RIA 高。而用化学发光酶标测定 (CLEIA) 时,过氧化物酶

只作为血红素供体的来源,通过血红素催化鲁米诺或异鲁米诺的发光反应,与酶活性无关,所以尽管共轭过程中过氧化物酶活性受到损失,并不影响化学发光,所以灵敏度可以提高。Pronovost 和 Baumgarten^[7] 在酶联吸附免疫测定中比较了应用化学发光检测和常规比色测定的灵敏度,发现用化学发光检测系统灵敏度可提高 16—95 倍。

不管发光剂直接作为标记物还是间接应用于免疫测定,最终起动化学发光时, H_2O_2 似乎是不可缺少的。 H_2O_2 激发鲁米诺或异鲁米诺衍生物产生化学发光一般在 1—2 秒钟内达到峰值,随后很快下降。用一般液闪谱仪测定时样品瓶送入测量部位需要时间,所以测得的已不是原初反应的真正结果。应用 LKB 发光仪的 1250-104 内部加样装置,可以在加样后立即观察。但应注意注入试剂用力过猛,容易造成气泡等,出现瞬间发光强度剧增,掩盖真正的化学发光过程;若注射缓慢,又使试剂加入量不准确,而且由于混合不均匀,易造成局部浓度过高。如果有象纯化的萤火虫萤光素酶-萤光素-ATP 发光 Kit^[8] 那样能获得相对稳定发光强度的体系取代 H_2O_2 体系,那就可以在外部加样搅匀,然后从容测定。这是对将来的发光试剂和发光测定仪器的研制提出的新课题。

四、CLIA 在生物医学研究中的应用

化学发光免疫测定目前在生物医学研究中的应用主要集中在三个方面:

1. 蛋白质特异性结合研究 这方面结合临床的研究工作即体液中低水平含量的药物,激素或其它代谢产物的测定。既有匀相测定,也有异相测定,还有用辣根过氧化物酶作标记物的酶标化学发光免疫测定 (CLEIA)。在应用固相化学发光免疫测定血和尿中胆固醇方面, Collins 等^[4]做了大量的工作。在酶标化学发光免疫测定中出现的新苗头是用草酸盐代替鲁米诺作发光剂,用葡萄糖氧化酶作标记酶^[9]。有关激素及其代谢产物的化学发光免疫测定灵敏度及与 RIA 比较结果,见表 1。

表 1 各种激素 CLIA 测定及与 RIA 结果的比较

测定物质	发光共轭体	灵敏度	与 RIA 比较*	参考文献
匀相测定系统				
生物素	生物素-异鲁米诺	50nM		[2]
皮质醇	皮质醇-APEI	20pg/管	0.98(20)	[10]
孕酮	孕酮-AHEI	25pg/管	0.97(15)	[11]
雌三醇-16 α -葡萄糖醛酸	E ₃ -16 α -G-ABEI	10pg/管	0.98(25)	[12]
生殖腺甾醇类	各种甾醇-异鲁米诺衍生物	--	--	[13]
异相测定系统				
甲状腺素	T ₄ -ABEI	25nM	0.98(28)	[3]
血栓素 B ₂	TXB ₂ -AHEI	4.2pg/管	0.96(20)	[14]
皮质醇	皮质醇-ABEI	0.1pM	0.97(36)	[15]
17- β -雌二醇	雌二醇-ABEI	1.5pg/管	0.97(54)	[16]
孕酮	孕酮-11 α -丁二酰-ABEI	4pg/管	0.98(33)	[4]
雌三醇	雌三醇-6-CMO-ABEI	1.5pg/管	0.97(54)	[4]
睾酮	睾酮-3-CMO-ABEI	1pg/管	0.93(12)	[4]
雌酮-3-葡萄糖醛酸	E ₁ -3-G-6-AEEI	1.45pg/管	0.94(6)	[4]
雌三醇-16 α -葡萄糖醛酸	E ₃ -16 α -G-6-ABEI	20pg/管	0.97(84)	[4]
孕烷二醇-3 α -葡萄糖醇酸	Pd-3 α -G-6-AHEI	30pg/管	0.93(10)	[4]
人 IgG	抗-IgG-AHEI	<1ng/管	—	[17]
免 IgG	异硫氰酸-ABEI	10aM	—	[18]
化学发光酶标测定系统				
皮质醇	H ₂ O ₂ -鲁米诺发光体系	10pg/管	0.91(28)	[19]
脱氢表雄甾醇	H ₂ O ₂ -鲁米诺发光体系	25pg/管	0.86(28)	[20]
17- α -羟基孕甾醇	H ₂ O ₂ -TCPO 鲁米诺发光体系**	0.5pg/管	0.93(40)	[9]

* 本栏所列相关系数 r 值。括号中所注为样本数目。

** TCPO: 双(2, 4, 6-三氯苯酚)草酸盐。

2. 病毒和细菌感染的快速诊断 已有的报导包括流行性腮腺炎病毒抗体^[21], B 族链球菌抗体^[22], Sendai 病毒抗原^[23], 乙型肝炎表面抗原^[24], 单纯性疱疹病毒抗原^[25], 白色念珠菌^[26]和巨细胞病毒^[27]等的化学发光免疫诊断。与一般其它诊断方法相比, CLIA 方法的最显著特点是“快速”, 这在临床检测中无疑是很令人感兴趣的。

3. 粒细胞吞噬功能的研究 Allen 等^[28]首先确认伴随着吞噬过程产生化学发光, 后来的一系列研究表明吞噬过程与细胞膜上的 NADPH 氧化还原酶系的活化以及与活性氧自由基的产生有关^[29]。严格说来, 吞噬功能的测定不属于本文讨论的范围, 请另参看国内外有关文献。

五、展 望

CLIA 作为一种新的测定技术, 与其它免疫

测定方法一样, 它过去的“发展”与今后的进步都依赖于以下三点: (1) 可用的试剂, (2) 配套的测定仪器, (3) 紧密结合实验和临床研究。首先, 现有的发光试剂鲁米诺, 或异鲁米诺衍生物, 虽已合成了不少, 但总的看来发光量子产率低, 为了增强发光, 需要升高 pH, 但这对生理条件下的测定受到限制, 现在正在探索新的发光试剂, 例如用发光效率较高的草酸盐, 吖啶酯类, 或合成新的二氧噁烷衍生物等发光试剂。最近, 用生物发光系统的生物发光免疫测定 (BLIA) 已初露头角。生物发光是生物体系中的一种化学发光, 由萤光素酶的催化, 萤光素为底物, 需要 ATP、NADH、FMN 等作为辅助因子。生物发光比一般化学发光具有专一性强, 量子产率高(可高达 100%)、发光稳定等优点。BLIA 在测定血清中的胰岛素, 胰岛素抗体庆大霉素, 抗肿瘤药氨甲喋呤等, 都具有极高的灵敏度^[30], 在测定二硝基苯酚和三硝基甲苯

利用 ^3H -哇巴因测定人红细胞钠泵数量的方法

徐 光 李茂深 沈慧芬 顾天爵

(上海第一医学院生化教研室)

红细胞钠泵对于维持红细胞形态及功能具有重要的意义。用 ^{86}Rb 测定钠泵活性,受细胞内代谢物及各底物浓度的影响,用 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性表示钠泵活性也受 $[\text{Na}^+]$ 、 $[\text{K}^+]$ 、 $[\text{ATP}]$ 等的影响^[1,2]。因此上述方法难以作为膜上钠泵数量的确切指标。

利用钠泵的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶 (E. C. 3、6、1、3) 能与哇巴因进行特异性结合的特点,用 ^3H -哇巴因对钠泵的特异性结合进行测定,可以作为膜上钠泵数量改变的指标。我们根据国内实验室条件改进了 Allen^[3] 等人的方法,选择了最优条件,为研究各种生理或病理条件下钠泵

(TNT)^[31] 灵敏度达到 10^{-17}M 。其次,是发光检测仪器的配套,一方面不断研制高灵敏度的单光子检测装置;另一方面为了满足一般临床监测需要,研制了操作简易,重复性好,一机多能的测定装置。进一步,计算机程序控制的自动化测试仪器以及可进行连续、微量检测的流动发光检测装置也正在研制和应用中。随着新的发光试剂和发光仪器的配套,CLIA 在基础研究与临床应用方面将不断有新的突破。

参 考 文 献

- [1] Roswell, D. F. and White, E. H.: *Methods in Enzymology*, vol. 57, pp. 409, 1978.
- [2] Schroeder, H. R., et al.: *Methods in Enzymology*, vol. 57, pp. 424, 1978.
- [3] Schroeder, H. R.: *Methods in Enzymology*, vol. 84, p. 303, 1982.
- [4] Collins, W. P. et al.: *Immunoassays for Clinical Chemistry*, pp. 373, 1983.
- [5] Schroeder, H. R. et al.: *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s*, p. 189, 1980.
- [6] Feder, N. J. J.: *Histochem. Cytochem.*, 18, 911, 1970.
- [7] Pronovost, A. D. and Baumgarten, A.: *Experientia*, 38, 304, 1982.
- [8] Thore, A.: *Science Tools*, 26, 30, 1979.
- [9] Arakawa, H. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 3036, 1982.
- [10] Kohen, F. et al.: *Steroids*, 36, 421, 1980.
- [11] Kohen, F. et al.: *FEBS Lett.*, 104, 201, 1979.
- [12] Kohen, F. et al.: *Steroids*, 36, 405, 1980.
- [13] Kohen, F. et al.: *Basic Chemistry and Analytical Applications*, pp. 357, 1981.
- [14] Weerasekera, D. A. et al.: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, vol. 11, p. 185, 1983.
- [15] Lindstrom, L. et al.: *J. Steroid Biochem.*, 16, 577, 1982.
- [16] Kim, J. B. et al.: *Clin. Chem.*, 28, 1120, 1982.
- [17] Cheng, P. J. et al.: *J. Immunol. Methods*, 48, 159, 1982.
- [18] Patel, A. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, 10, 224, 1982.
- [19] Arakawa, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 97, 248, 1979.
- [20] Arakawa, H. et al.: *Steroids*, 38, 453, 1981.
- [21] Konishi, E. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 12, 140, 1980.
- [22] Rote, N. S. et al.: *Infect. Immun.*, 27, 118, 1980.
- [23] Peterhans, E. et al.: *J. Immunol. Methods*, 47, 295, 1981.
- [24] Schroeder, H. R. et al.: *Clin. Chem.*, 27, 1378, 1981.
- [25] Pronovost, A. D. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 13, 97, 1981.
- [26] Stevens, P. et al.: *Immunoassays*, 205, 1980.
- [27] Pronovost, A. D. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16, 345, 1982.
- [28] Allen, R. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 679, 1972.
- [29] Gabig, T. G. et al.: *Superoxide Dismutase*, vol. II, 1, 1982.
- [30] Wood, W. G. et al.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 20, 825, 1982.
- [31] Wannlund, J. et al.: *Anal. Biochem.*, 122, 385, 1982.

[本文于 1985 年 1 月 26 日收到]