

时间分辨荧光免疫分析法 (TrFIA)

胡 天 喜

(华东师范大学生物系, 上海)

提 要

时间分辨荧光免疫分析法是继放射免疫分析法 (RIA) 和发光免疫分析法 (LIA) 之后, 最新发展起来的一项免疫分析技术。它具有无背景光干扰、灵敏、稳定、线性范围宽、手续简便、分析速度快等特点。本文就 TrFIA 的原理、操作过程、实验方法及临床应用作了概要的介绍。

时间分辨荧光免疫分析法 (Time-Resolved Fluoroimmunoassay, TrFIA) 是七十年代末发展起来的一种崭新的荧光免疫分析法, 它克服了荧光免疫分析法背景光高的缺点, 极大地提高了分析的灵敏度; 它用物理因子激发发光, 有较高的稳定度。所以 TrFIA 在灵敏度、专一性、稳定度、操作简便等方面都可与放射免疫分析法 (RIA) 相媲美, 而其线性范围宽 (跨越 4—5 个数量级), 分析速度快, 却远远超过 RIA、荧光免疫分析法 (FIA)、发光免疫分析法 (LIA) 及酶标免疫分析法 (EIA), 成为目前超微量物质免疫分析最有发展前途的一项技术。

原 理

TrFIA 是利用稀土元素铕 (Eu)、铽 (Tb) 的螯合物与抗体形成共轭体作为发光标记物, 与体液中的抗原相结合。结合物的荧光极为微弱, 当加入一种增效剂时, Eu (或 Tb) 可从结合物中释放出来, 形成一种新的螯合物。在紫外光 (340 nm) 激发下, 新的螯合物会发出高强度的荧光 (613 nm)。这种荧光不仅强度高, 而且衰变的时间也长 (10—1000 μ s)。延缓了测量的时间, 使测量的样品池和样品中的蛋白质等所发的短寿命荧光 (1—10 ns) 完全衰变后再测螯合物的荧光, 可以完全排除背景光, 提

高分析的灵敏度 (图 1)。Eu (或 Tb) 的激发光和发射光之间有很大的 Stokes 位移 (约 270 nm), 而且激发光的谱带较宽, 利于增高激发能, 增加螯系标记物的比活性。发射荧光的谱带很窄, 有助于降低本底 (图 2)^[1,2,3]。测量 Eu (或 Tb) 所发的光强度, 就可判断抗原抗体结合的程度, 确定生物体液中抗原或抗体的数量。

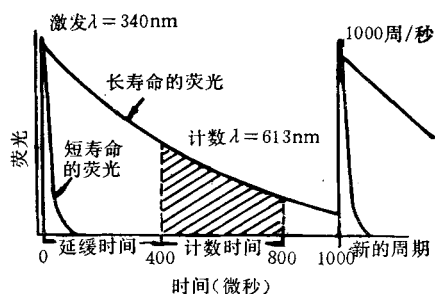


图 1 时间分辨荧光测量的原理示意图

Eu 螯合物所产生的荧光的半衰期比普通的荧光标记物要高出 5—6 个数量级 (表 1)。

Eu 离子发射荧光的顺序分四步: (1) 有机配位体受激发; (2) 配位体中的激发能交换 (能量从配位体的单线激发态向三线激发态转移); (3) 分子内的能量转移 (能量从配位体的三线激发态向 Eu 离子的共振级能态转移); (4) Eu 离子发射光子。

灵敏度相当^[4]。

Eu 标记的免疫复合物

利用螯合剂可以将 Eu 和免疫成分结合起来,组成 Eu 标记的免疫复合物。常用的螯合剂有氨基苯基 EDTA、异硫氰酸盐苯基 EDTA、1-(P-苯双氮)-EDTA^[1,5]。它们具有双功能基团的结构,一端螯合 Eu,另一端与蛋白质的酪氨酸、组氨酸(免疫成分)相连接(图 3)。各种羧酸类螯合剂螯合 Eu 离子的效率很高。因而标记共轭物有很高的比活性(高于 RIA 所用标记物的比活性),这有利于增高分析的灵敏度。

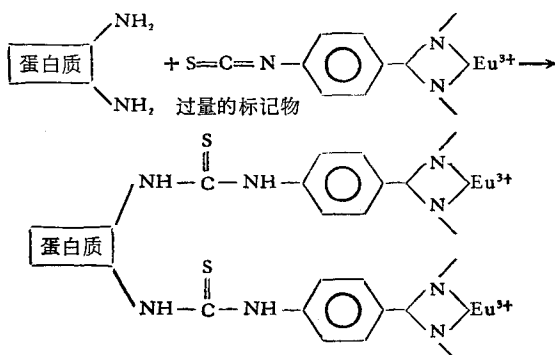


图 3 异硫氰酸盐苯基-EDTA-Eu 标记蛋白质的原理图

增效溶液

Eu 标记的免疫复合物,在高 pH(pH 7—9)时发光极弱,若在低 pH(pH 2—3)时, Eu 离子很容易从螯合剂的聚羧酸中解离出来。低 pH 的解离溶液称为增效剂,一般由 B-二酮体(常用的为萘酚-三-氟乙酰丙酮 (2-naphthoyl-trifluoroacetone, B-NTA)、3-辛烷基磷化氢的氧化物以及 Triton X-100, pH 3.2 所组成。解离出来的 Eu 离子在增效溶液中形成新的、能够高效率地受激发发光的螯合物。这一螯合物正是前述的微胶囊结构(图 4)。

荧光的测量

瑞典 LKB 公司已生产出时间分辨荧光免疫分析仪,名为 Arcus 1230 型荧光光度计(Fluorometer),其主要性能有(1)灵敏度: 10^{-17} mole Eu/管; (2)动力学范围: 4 个数量级;

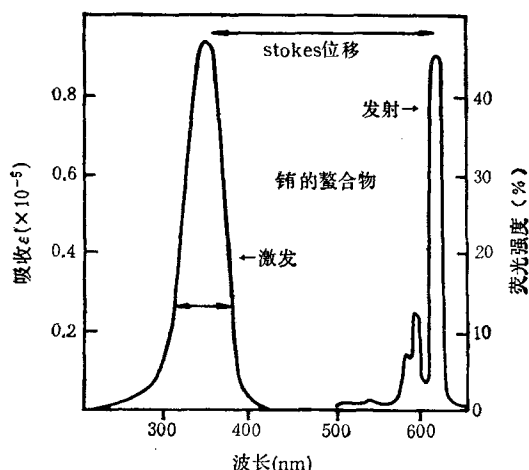


图 2 铕螯合物的吸收光谱和发射光谱

表 1 一些荧光体和蛋白质的荧光衰变时间

荧光物质	荧光衰变的时间(ns)
人的血清白蛋白	4.1
细胞色素 C	3.5
球蛋白	3.0
荧光素-异硫氰酸	4.5
丹磺酰氯	14
铕的螯合物	$10^3 \sim 10^6$

Eu 离子的荧光光谱取决 Eu 离子自身的特征,然而荧光的半衰期和强度却与配位体和所处的微环境相关^[1-3]。与 Eu 离子配位的二酮体 $R^1COCH_2COR^2$,具有吸收和转移外来激发能量的作用, R^1 和 R^2 上功能基团的变化,都会改变 Eu 离子二酮体螯合物的激发特性,出现不同的荧光强度。包围 Eu 离子的溶剂(主要是水)也会明显地影响荧光强度,受激的 Eu 螯合物的能量,会向水中扩散,水成为荧光的猝灭剂。为此需要使用非离子型的表面活性剂——Triton-X-100 去形成微胶囊,微胶囊内侧为疏水端,溶解脂溶性的二酮体,外侧为亲水端,与水相结合(图 4)。微胶囊有效地阻挡了二酮体吸收的能量向水中发散,而且能有效地传递给金属离子铕。若在体系中加入增效剂——3-辛烷基磷化氢的氧化物(Trioctylphosphine oxide)则效果更佳^[3]。有了微胶囊结构,时间分辨荧光免疫分析法测量 Eu 的灵敏度极高,其探测极限可达 $5 \times 10^{-14} \sim 10^{-7}$ mol/L,与 RIA 的

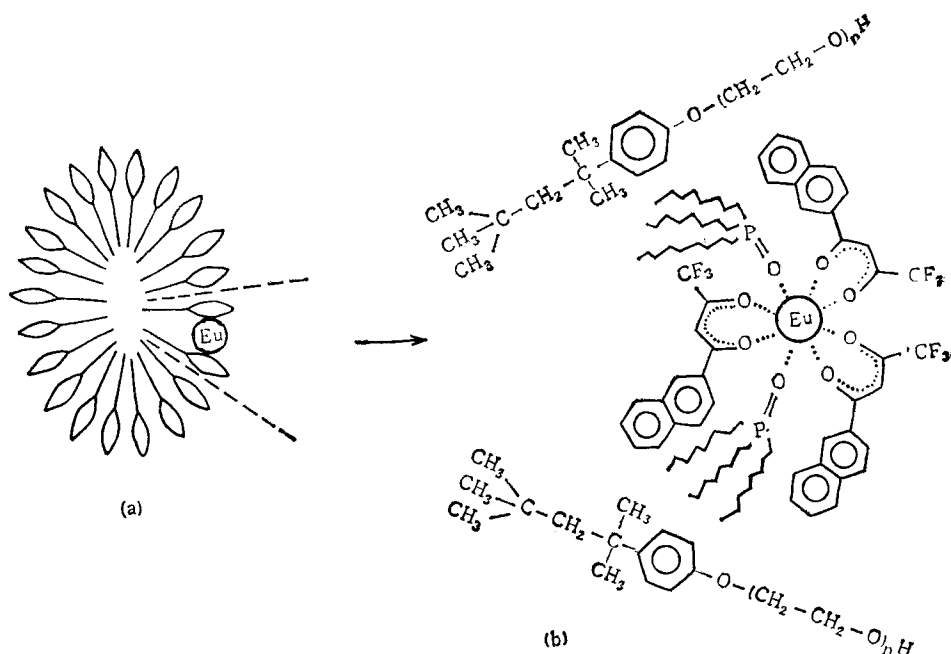


图 4 微胶囊结构的示意图

(a) Triton X-100 分子的微胶囊中嵌合着 140 个铕的荧光螯合物；(b) 微胶囊一部分进行放大。Triton X-100 分子之间嵌合着一个 Eu 离子,三个苯酚-3-氟乙酰丙酮和二 3-(n-辛烷基)磷化氢氧化物。

(3)精度: CV 少于 5%; (4)计数时间: 管/1 秒; (5)样品容量: 300 个计数杯或 360 个微滴度管; (6)样品通过量: 每小时 1500 个。有微电脑作程序控制 and 数据处理, 并有显示器和打印机。

时间分辨荧光光度计由光源、样品池、光电倍增管探头和放大器、甄别器、定标器等电子线路及微电脑等部分所组成。LKB 1230 型荧光光度计用氙闪光灯作为脉冲光源^[2,4], 新型的仪器则用氦镭离子激光器作为激发光源^[6](图 5)。激光器发出连续波长 (305 nm, 5—10 mW) 的激光, 由斩波器变频成 500 Hz 的脉冲式的激发光, 照射装在 1.0×0.2 cm 的石英杯中的样品。由发光二极管接收激光信号, 去触发脉冲发生器, 作适当的延时后, 再由它打开光子计数器的闸门。550 nm、带宽 40 nm 的干涉滤光片垂直于激光束, 对样品的荧光作谱的分离。样品的荧光由光电倍增管所接收, 经光电转化, 电子倍增后转变为电脉冲信号。信号经过放大、甄别, 由计数器或记录仪显示出来。

光电倍增管被关闭时, 样品受激光束照射;

光电倍增管接收样品所发的荧光信号时, 激光束被阻断, 两者在时间和空间上分离。发光二极管管和光电倍增管所输出的信号, 同时在示波器上显示出来。由示波器上的信息来确定激发和测量的时间。较适宜的定时顺序是: 激发 400 μ S, 延时 100 μ S, 光子计数 1000 μ S 及 500 μ S 的延时和恢复时间, 整个周期为 2000 μ S。

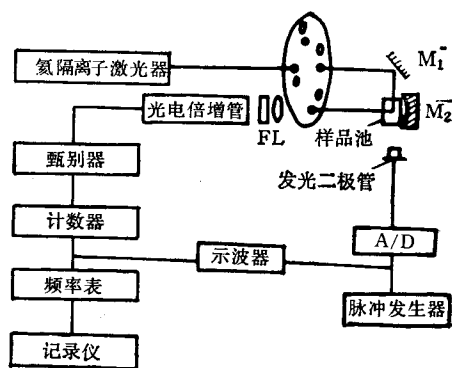


图 5 时间分辨荧光光度计方框图

M——反光镜 L——透镜 F——滤光片
A/D——模数转换器

时间分辨荧光免疫分析方法

有两种方法可供选择

1. 固相双位点的荧光免疫分析法 使用了过量的 Eu 标记的第二抗体,作“夹心”分析。

现以人的促性腺绒毛膜激素 (hCG) 为例,介绍如下:

(1) 原理 抗原 (hCG) 首先与固相中的相应的单克隆抗体相结合,而后与 Eu 标记的第二抗体相结合,成为抗体-抗原-标记抗体“夹心”状态。“夹心”的免疫复合物并不发荧光,经增效溶液处理以后,复合物中的 Eu 离子被解离出来,并形成受激发后能发荧光的新的螯合物——微胶囊。测量 Eu 所发射的荧光强度,就可在标准曲线中查对出未知的样品中的 hCG 的浓度。

(2) 步骤(二步法)

A. 固定单克隆抗体到聚苯乙烯珠或管子上,并用缓冲液洗涤珠或管;

B. 加入未知的或标准的 hCG 和分析缓冲液,温育 1 小时,然后洗涤三次;

C. 加入 Eu 标记的第二抗体,温育 1 小时,洗涤 6 次;

D. 加入增效溶液,摇匀;

E. 在时间分辨荧光光度计上测荧光 1 秒钟。

(3) 结果 线性范围 1—10000 IU/L, 变异系数<10%。单克隆抗体与 hCG 的 β 亚基的专一结合力极好,与 hCG 的 α 亚基, hLH、TSH 等的交叉反应极微。

2. 固相竞争结合荧光免疫分析法 结合到载体蛋白上的固相抗原和游离的抗原分别与有限数量的游离的 Eu 标记的抗体竞争结合。

上述两种方法,以固相双位点的 TrFIA 用得更为普遍。

TrFIA 在临床检验中的应用

TrFIA 已被用来分析某些超微量的物质,

其中包括人体性激素、甾体激素、蛋白质及病毒抗原。现将已报道的列于表 2。

表 2 TrFIA 分析的一些微量物质

定量测定的物质	检测极限	参考文献
人的甲胎蛋白(hAFP)	0.11IU/ml	*
人的肝炎表面抗原(hBsAg)	0.5ng/ml	7
人的促甲状腺素(hTSH)	0.03 μ IU/ml	2,*
人的促性腺绒毛膜激素(hCG)	0.5IU/ml	8
人的促黄体生成激素(hLH)	0.12IU/l	*
免疫球蛋白(IgG)	6 $\times 10^{-14}$ mol/管	6
兔的 IgG	25pg/ml	3
铁蛋白	2.0 μ g/l	*
胱氨酸蛋白酶抑制剂	0.1ng/ml	11
皮质醇	5nmol/l	*
睾酮	15fmol/管	9

* LKB 公司时间分辨荧光免疫分析仪说明书

LKB 公司有 hCG、hTSH、hCH、HBsAg、hAFP、铁蛋白、皮质醇、睾酮、孕酮、雌二醇、T₃、T₄ 及地高辛等 TrFIA 试剂盒出售,同时还供应增效溶液。我国 TrFIA 尚未开展,只要解决仪器的生产和试剂盒的供应,本技术将会得到广泛地应用。

参 考 文 献

[1] Butt, W. R.: *Practical immunoassay*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 84—101, 1985.

[2] Collins, W. P.: *Alternative immunoassay*, John Wiley & Sons Ltd, pp 96—101, 203—217, 1985.

[3] Hemmila, I. et al.: *Analyt. Biochem.*, **131**, 335, 1984.

[4] Soini, E. and Kojola, H.: *Clin. Chem.*, **29**, 65, 1983.

[5] Leung, C. S-H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 149, 1977.

[6] Kuo, J. E. et al.: *Clin. Chem.*, **31**, 50, 1985.

[7] Siitari, H. et al.: *Nature*, **301**, 258, 1983.

[8] Pettersson, K. et al.: *Clin. Chem.*, **29**, 60, 1983.

[9] Bertoft, E. et al.: *FEBS Letters*, **173**, 213, 1984.

[10] Soini, E. et al.: *Clin. Chem.*, **25**, 353, 1979.

[11] Joronen, I. et al.: *J. Immunol. Method*, **86**, 243, 1986.

[本文于 1987 年 2 月 5 日收到]