

免疫测定的电分析化学方法

刘 杰

(南通医学院化学教研室)

提 要

本文对于晚近发展起来的电化学免疫分析技术按免疫电化学传感器和伏安免疫法两大类作了简要的评述。

免疫测定在生化研究和临床检验中日益增加的重要性,推动人们努力开发新的免疫分析技术。值得提出的是,晚近电分析化学方法开

始向免疫测定领域渗透。本文打算简要地介绍电化学免疫分析中目前比较引人注目的两个方面——免疫电化学传感器和伏安免疫法。

遗传基因产物的改变来分析遗传疾病的发生。但对于那些不能用蛋白产物进行分析的遗传疾病,可用 DNA 杂交技术进行分析。对于那些因点突变引起的限制性内切酶作用部位的增加或消失,或因 DNA 顺序的增加、缺失或重排使各位点之间 DNA 长度发生改变而引起的遗传性疾病,可用 DNA 探针直接分析之。用 DNA 杂交技术已直接分析了动脉粥样硬化、糖尿病和生长激素缺陷等遗传病。目前,化学合成的寡核苷酸链探针也能进行基因内点突变的直接分析,其原理是根据寡核苷酸链和给定的等位基因之间的一个碱基对的错配来鉴别基因型(这个等位基因在此条件下完全不能杂交)。这种方法已用于分析 α_1 -抗胰蛋白酶缺陷、镰状细胞贫血和地中海贫血。但如果在没有适宜的限制性内切酶时,这种点突变常常不能被检测出。这可用另一种方法,即以研究位点侧翼的 DNA 限制性片段长度多态性(RFLP)作遗传标志来研究。应用这种方法检出的与 RFLP 紧密连锁的遗传病有载脂蛋白 C_{II} 缺陷、高脂血症、II 型糖尿病、血友病和镰状细胞贫血等等^[20]。

以上两种分析方法都需要特定的标记探针。现在,除 ³²P-标记的寡核苷酸链可作 DNA 分子的点突变分析外,生物素和碱性磷酸酶标

记的寡核苷酸也可作相同的分析。

参 考 文 献

- [1] Peter, W. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1977, **113**, 237.
- [2] Koch, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 7132.
- [3] Mackey, J. K. et al.: *Biochemistry*, 1977, **16**, 4478.
- [4] Radford, A. J. et al.: *Analytical Biochemistry*, 1983, **134**, 269.
- [5] Commerford, S. L. et al.: *Biochemistry*, 1971, **10**, 1993.
- [6] Gladek, A. et al.: *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1983, **31**, 541.
- [7] Lance, P. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 6633.
- [8] Chollet, A. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1985, **13**, 1529.
- [9] Leary, J. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 4045.
- [10] Renz, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 3435.
- [11] Jablonski, E. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 6115.
- [12] Bulow, S. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 3973.
- [13] Franzen, L. G. et al.: *The Lancet*, 1984, **I**, 525.
- [14] Myerson, D. et al.: *J. Inf. Dis.*, 1984, **150**, 272.
- [15] Brigati, D. J. et al.: *Virology*, 1983, **126**, 32.
- [16] Karathanasis, S. K. et al.: *Nature*, 1983, **304**, 371.
- [17] Brakel, C. et al.: *DNA*, 1984, **3**(2), 195.
- [18] 刘宗正:《分子生物学在医学中的应用》,科学出版社,北京,1986,57。
- [19] Syvanen, A. C. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 5037.
- [20] Cooper, D. N. et al.: *Hum. Genet.*, 1986, **73**, 1.

[本文于 1987 年 6 月 23 日收到]

免疫电化学传感器

随着离子选择电极技术的发展,一种利用生化反应特有的专一性,选择性地识别待测物质,并将生化反应能转换为电信号的装置——生物电化学传感器逐渐被开发出来。免疫传感器正是其中的一类,它可以定量分析抗原或抗体。根据已发表的文献,免疫传感器主要被设计成下列几种结构型式。

1. 免疫膜电极 人们曾试图直接应用商品离子选择电极进行免疫化学研究。然而,对大多数抗原或抗体,离子选择电极无法直接使用。于是,人们另辟蹊径,按照离子选择电极的结构组成去研制对特定抗原或抗体产生电位响应的免疫电极,便形成了免疫膜电极和免疫涂丝电极两种类型。先介绍前者,这是用固定化技术把特定抗原或抗体结合在疏水高分子膜上,并将此敏感膜接在电极腔体顶端,再在电极腔体内装上由内参液与内参比电极组成的内导体系而构成,参见图1所示。

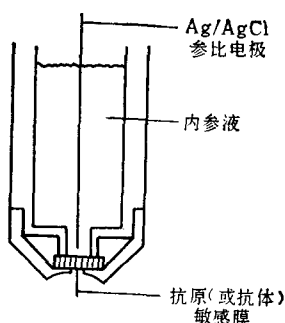


图1 免疫膜电极的结构

文献报道了将心磷脂或华氏抗原固定在醋酸纤维素上制成的膜电极对于梅毒抗体产生特征响应^[1,2]。还报道了用离子载体二苯并-18-冠-6(dibenzo-18-crown-6)把DNP(dinitrophenol, 2,4-二硝基苯酚)或BSA(bovine serum albumin, 牛血清白蛋白),分别固定在聚氯乙烯或醋酸纤维素上,制成的膜电极可以分别测定试液中抗DNP抗体或抗BSA抗体的含量^[3]。我国苏殿杰等也报道了通过共价交联把人血清IgG或马抗人IgG血清分别固定在聚苯乙烯

上制成的膜电极可以分别用来测定试样中抗IgG或IgG的含量^[4]。

2. 免疫涂丝电极 其制备是先将金属丝加热氧化并使之活化,再把固定结合了抗原或抗体的疏水高分子膜趁未固化时涂敷在金属丝表面即构成。图2示意出这种电极的结构。

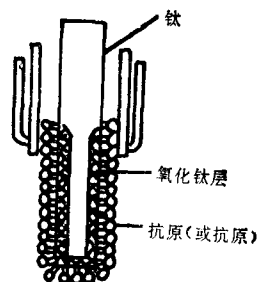


图2 免疫涂丝电极的基本结构

ConA(concanavallin, 伴刀豆球蛋白)与酵母甘露聚糖的反应通常被作为免疫反应的模型体系。将固定了ConA的聚氯乙烯膜涂在铂丝上,构成的电极可用于测定酵母甘露聚糖的浓度^[5]。文献还报道了为了测定HCG(human chorionic gonadotrophin, 人绒毛膜促性腺激素)的含量,可以用溴化氰使抗HCG偶联到热氧化的钛丝上,制成免疫涂丝电极进行。

应该指出,以上两种免疫电极所用的敏感膜是相似的,只是膜安装的方式不同而已。至于这种敏感膜之所以对于特定抗原或抗体产生特征的电位响应,其机制是迄未完全弄清的。因而免疫电极在稳定性和重现性上远未达到离子选择电极的水平,这就限制了它在近期内取得实际应用的价值。而一般认为具有乐观应用前景的,是以下述及的另两种采用标记方法构成的免疫传感器。

3. 离子型免疫传感器 对于其组成及工作机制,可由下例加以说明。当载有特定离子的红细胞抗原结合了待测抗体后,结合物可被补体酶系统识别,同时使红细胞溶解,释出所载离子,从而可以再用相应的离子选择电极加以检测,由此可以推算待测抗体的含量。该过程如图3所示。根据这一原理,业已报道了用羊红细胞为离子载泡,TPMA(trimethylphenylam-



图3 离子免疫分析的基本过程

monium, 三甲基苯基铵)为标记离子,可测定BSA的抗体^[6]。还报道了以人造脂泡代替红细胞所构成的离子型免疫传感器。这是以TPA(tetrapentylammonium, 四戊基铵)阳离子为标记,将一种脑代谢的中间物 G_M (ganglioside, 神经节苷脂)联接到脂泡表面作抗原,再用TPA离子选择电极通过薄层测量对微升量血清中 G_M 的抗体的浓度进行测定^[7]。

4. 酶免疫传感器 它已成功地用于对HBsAg(hepatitis b surface antigen, 乙型肝炎表面抗原)的间接测定^[8]。将固定了兔抗HBs的IgG的明胶膜接到碘离子选择电极的晶体膜上,插入含HBsAg的试液中,使待测的HBsAg与明胶膜上的兔抗HBs抗体结合,再用HRP(horseradish peroxidase, 辣根过氧化物酶)标记的兔抗HBS对结合物进行处理,得到如下的夹心(sandwich)结构:

固体支持膜——抗HBs……HBsAg……HRP标记的抗HBs(以上的实线表示共价键合,虚线表示静电作用)于测量体系中加入HRP的底物 H_2O_2 ,并加入KI。由于标记酶的催化,使 H_2O_2 被还原,KI被氧化而减少,这种变化可由碘离子选择电极指示。根据测得的电位变化与辣根过氧化物酶的活性成正比,便可以间接算出待测HBsAg的含量。

见于文献报道的酶免疫传感器,还有借脲酶标记,利用双抗体固相技术分离,再通过氨气敏电极间接测定BSA或cAMP(cyclic adenosine monophosphate, 环腺苷酸)的含量^[9];利用免疫沉淀法,借助HRP标记,再通过氟离子选择电极间接测定IgG的含量^[10]。

酶免疫传感器里还有一种属于电流分析式(amperometric)传感器,其特点是标记酶的活

性通过酶促反应产物的氧化还原作用,以电流形式加以测定。制作时常以Clark氧电极为基础,在其表面覆盖一层固定了抗体的敏感膜。以后者为免疫测定中的分子识别器,前者为信号变换器。测定步骤是先使固相抗体与待测抗原及标记了过氧化氢酶的同种抗原发生竞争结合;再测定标记酶的活性——由于过氧化氢酶催化 H_2O_2 分解出 O_2 ,只要测量透过膜相到达氧电极的 O_2 发生电化学还原产生的电流大小,求出单位时间 O_2 的生成量,就可以算出标记酶的活性。根据竞争反应的特点,待测抗原量越大,与抗体结合的标记抗原量就越小。因此,测出标记酶的活性,便有可能间接推算待测抗原的含量。据报道,电流分析式酶免疫传感器已用于测定IgG、肿瘤AFP(α -foetoprotein, 甲胎蛋白)。除了上述四种免疫传感器,还需提及的是,用免疫敏感膜代替场效应晶体管的绝缘栅区可制成免疫场效应晶体管。美、日等国已就此提出许多专利报告。这代表了使免疫传感器向全固态电子器件发展的趋势。

伏安免疫法

五十年代就有电分析化学家尝试用极谱法研究免疫测定。经过近三十年的沉寂,七十年代末由于开发新免疫分析技术的需要,在电化学伏安法技术长足进步的推动下,人们重新致力于探索把灵敏度高、检测限低的微分脉冲极谱、溶出伏安分析等现代手段用于免疫测定,开辟了伏安法免疫测定的新领域。伏安法是以电解过程电流-电压极化曲线为基础的电化学方法,因此要用于免疫测定,必须首先形成电活性的测定对象,这通常借助标记法实现。如果按照标记方式的不同,可以把伏安免疫法分为酶标记与非酶标记的两大类。在这两大类中,再根据是否需要把抗原-抗体的复合物与游离抗原或抗体加以分离,各区分成均相(homogeneous)测定与非均相(heterogeneous)测定两类。以下分述之。

一、酶标记伏安免疫法

1. 非均相测定 这是根据酶联免疫吸附测

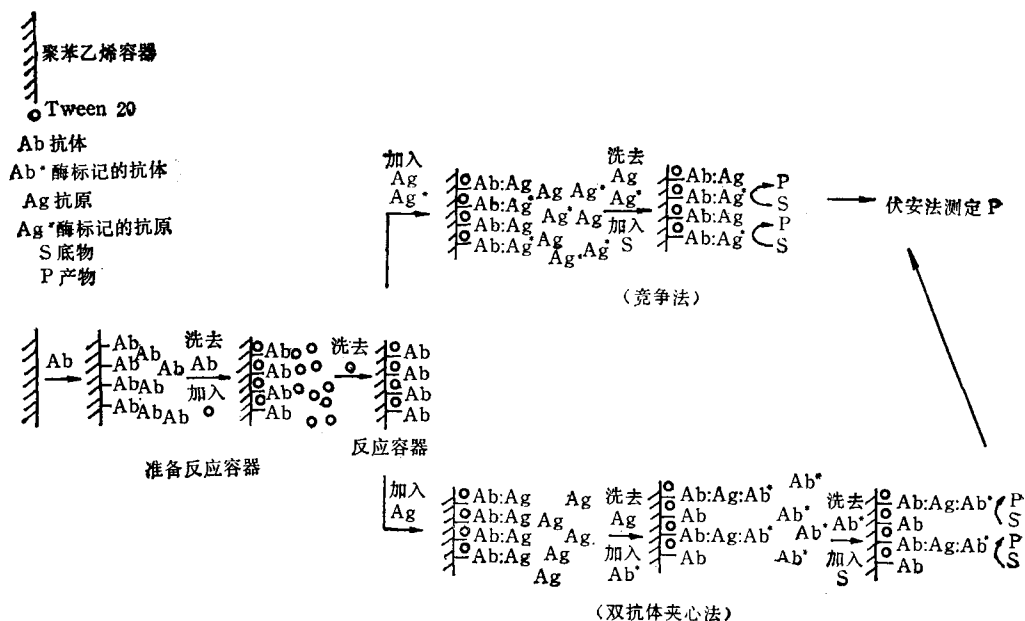


图 4 非均相酶标记测定流程图

定 (ELISA) 原理进行的。按照图 4 所示流程, 在制备了反应容器后, 可以分别按竞争法或双抗体夹心法进行。如果按竞争法, 则先将酶标记抗原 (用 Ag^* 表示) 和待测抗原 (记作 Ag) 一并加入反应容器, 使之与容器的固相抗体 (记作 Ab) 发生竞争结合。洗去游离的 Ag^* 和 Ag , 加入标记酶 (记作 E) 的底物 (记作 S)。 S 与 E 作用生成电活性的产物 (记作 P) , 最后用伏安法测定 P 的量。由于竞争反应的结果, Ag 量越大, 被 Ab 结合的 Ag^* 量就越小。这样, 测定了 E 的量就可以推算 Ag 的含量。该法已用于测定强心药地高辛, 用 AKP (alkaline phosphatase, 碱性磷酸酶) 作标记, AKP 可催化苯基磷酸酯生成电活性的苯酚, 从而进行测定^[11]。该法还用于测定 IgG ^[12] 以及 α_1 -酸性糖蛋白^[13]。

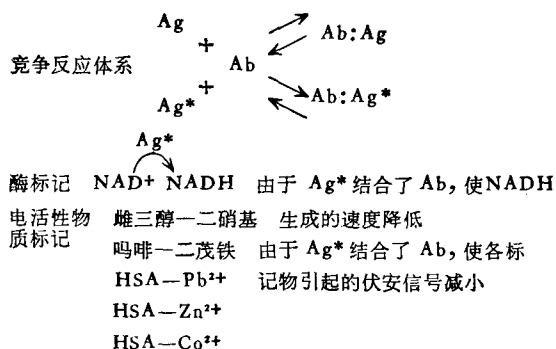
如果按双抗体夹心法, 则是在制备好的反应容器中加入 Ag , 当 Ag 与 Ab 结合达到平衡, 洗去游离的 Ag 。再加入酶标记抗体 (用 Ab^* 表示), 形成 $Ab:Ag:Ab^*$ 的夹心化合物。洗去过量的 Ab^* , 加入标记酶 E 的底物 S , S 转变为电活性的 P , 从而用伏安法测量之。该法中, 测定的电流信号大小将与 Ag 量成正比关系。文

献 [12] 中对 IgG 的测定就分别应用了竞争法和双抗体夹心法。非均相酶标记伏安免疫法不仅灵敏度高, 而且可以分离除去试液中干扰物质, 从而提高方法的适应性。缺点是操作比较复杂。

2. 均相测定 这是根据酶放大免疫测定 (EMIT) 原理在溶液中均相进行的, 不涉及对游离抗原或抗体的分离。将抗原试样与一定量的酶标记抗原加入溶液, 使之与溶液中抗体发生竞争结合。形成 $Ab:Ag^*$ 的复合物后, 标记酶的活性就受到抑制, 催化 S 生成电活性产物 P 的量就为之减少。通过检测 P 可以推算出待测抗原的含量。该法已用于苯妥英等抗癫痫药物的测定^[14], 测定过程中使用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶为标记, 它催化辅酶 I 氧化型 NAD^+ 转化为还原型 $NADH$ 。

二、非酶标记伏安免疫法

1. 均相测定 参看以下流程图可知, 无论酶标记或非酶标记的均相测定, 其原理是十分相似的, 都是在 Ag 和 Ag^* 与一定量 Ab 竞争结合后, 结合状态的 Ag^* 上的标记物 (酶或非酶) 引起的伏安信号为之减小。

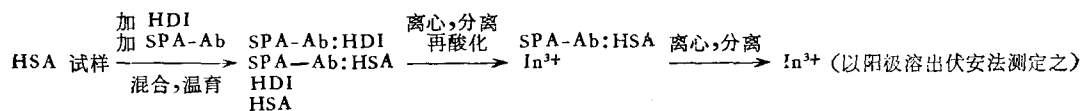


为了分析血浆或尿中雌三醇, 由于在一定电位范围雌三醇不是电活性的, 因此先引入硝基作标记形成电活性的二硝基雌三醇, 便可用微分脉冲极谱进行测定。若加入雌三醇的抗体形成 Ab:Ag* 复合物后, 则二硝基雌三醇在结合状态又成为非电活性的, 导致伏安峰高度降低。于是, 可以用伏安峰高度监测抗原与抗体结合^[15]。

非酶标记的均相测定, 还报道了用二茂铁标记吗啡, 再在玻碳电极上通过电流滴定测定之^[16]; 用重氮化对氨基苯甲酸标记卵蛋白, 再在滴汞电极上用极谱法测定之(B. Breyer 等在 50

年代的工作); 用醋酸汞标记雌三醇, 再用微分脉冲极谱测定之^[17]; 以及分别用 Pb²⁺、Co²⁺、Zn²⁺ 标记 HSA (human serum albumin, 人血清白蛋白), 再用微分脉冲极谱测定之。我国胡荫华等也报道以 Cd²⁺ 离子标记白喉类毒素, 在示波导数极谱图上形成特征伏安峰; 加入抗体白喉抗毒素, 伏安峰受抑制, 由此分别测定了白喉类毒素的浓度及白喉抗毒素的抗体水平^[18]。

2. 非均相测定 以 In-DTPA 作标记测定 HSA^[19], 可以作为该法的一个典型例子。先用螯合剂 DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid, 二亚乙基三胺五乙酸) 把 In³⁺ 离子标记到 HSA 上, 形成 HDI (表示 HSA-DTPA-In³⁺ 络合物), 然后将固定在 SPA (Staphylococcus aureus protein A, 金黄色葡萄球菌蛋白质 A) 上的兔抗 HSA 与 HSA 试样、HDI 混合, 使抗体与待测抗原及标记抗原发生竞争结合后, 离心分去游离的抗原, 再对抗原-抗体复合物作酸化处理, 使标记用的 In³⁺ 离子重新释出, 从而通过阳极溶出伏安法测定之。全过程如下所示:



展 望^[20]

诚然, 电化学免疫分析技术有待进一步发展, 其应用价值也迄未获得普遍重视。这在一定程度上或许与生化分析一贯比较看重光学方法的倾向有关。然而, 光学方法感到麻烦棘手的困难, 诸如样品混浊、荧光猝灭及吸附或荧光性物质产生的干扰等, 电化学测定中可以不受影响。电化学方法还便于实现自动监测, 仪器设备价廉, 操作简单, 加之近年来国外普遍把高效液相色谱、流动注射分析等手段与电化学测定联用, 进一步提高了测定的灵敏度, 降低检测限。因此, 我国免疫化学工作者加强对电化学免疫分析这一新领域的关注, 看来不是没有意义的。

参 考 文 献

- [1] Aizawa, M. et al.: *J. Membr. Sci.*, 1977, 2, 125.
- [2] Aizawa, M. et al.: *J. Solid Phase Biochem.*, 1979, 4(1), 25.
- [3] Solsky, R. L. and Rechnitz, G. A.: *Science*, 1979, 204, 1308.
- [4] 苏殿杰等: 《生物化学与生物物理进展》, 1985, (6), 73.
- [5] Janata, J.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, 97, 2914.
- [6] D'orazio, p. and Rechnitz, G. A.: *Anal. Chim. Acta*, 1979, 109, 25.
- [7] Shiba, K. et al.: *Anal. Chem.*, 1980, 52, 1610.
- [8] Boiteux, J. L. et al.: *Clin. Chem.*, 1979, 25, 318.
- [9] Meyerhoff, M. E. and Rechnitz, G. A.: *Anal. Biochem.*, 1979, 95, 483.
- [10] Alexander, P. W. and Maltra, C.: *Anal. Chem.*, 1982, 54, 68.
- [11] Wehmeyer, K. R. et al.: *Anal. Chem.*, 1986, 58, 135.
- [12] Wehmeyer, K. R. et al.: *Clin. Chem.*, 1985, 31, (下转第269页)

基础上,又采用 PEG 加 NaCl 和洗涤剂体系成功地获得外膜蛋白 Lam B 的晶体。Lam B 是用洗涤剂从 *E. coli* wll0 外膜中提取和纯化,储存在 0.1mol/L NaCl,20mmol/L 磷酸钠,3mmol/L NaN_3 , 1mmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol) 和 1% C_8 -POE (octyl polyoxyethylene), pH7, 蛋白质浓度为 20mg/ml 溶液中。晶体培养采用蒸发扩散方法,蛋白质浓度为 5mg/ml,沉淀剂为 3.6% (W/V) PEG4000,洗涤剂为 0.25% (W/V) C_8 -POE 和 0.25% (W/V) β -辛基葡萄糖苷,储液为 25.2% (W/V) PEG 4000, 0.7 mol/L NaCl, 0.14mol/L 磷酸钠以及 3mmol/L NaN_3 ,首先得到 8 Å 分辨率的晶体,随后用聚乙烯吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone) 10,000 代取 PEG 4000,得到分辨率为 4 Å 的晶体。

虽然膜蛋白的晶体培养工作仍然存在着困难,但是已经从成功的晶体培养工作中总结出一些规律^[12]。从已发表的膜蛋白的晶体培养程序同水溶性蛋白质的晶体培养程序相比较,两者无显著差别,不论采取哪一种体系,硫酸铵加洗涤剂或者 PEG 加洗涤剂,成功的关键在于选择合适的洗涤剂,一般采用非离子的,单分散性的洗涤剂,以及控制临界的胶粒浓度大小。洗涤剂是像脂类那样的亲脂水分子,在某一浓度下可形成一定大小的胶粒,与膜蛋白分子的憎水表面相互补偿,而使蛋白质分子间的极性相互作用加强,最后形成稳定的三维空间排列的晶体。

适合于 X 射线分析的某些膜蛋白晶体的培

养成功,使得详细地分析膜蛋白的结构成为可能,无疑将促进整个膜蛋白的晶体分析工作,从而不断地提供新的结构资料和进一步提高人们对球蛋白结构与功能关系的认识。

结束语

影响蛋白质晶体生长的因素很多,要通过每一因素的实验来寻找培养晶体的条件是相当困难的,及时总结国外在培养蛋白质晶体方面的新进展,提高我国培养蛋白质晶体的水平,无疑是相当重要的。随着我国蛋白质结晶学的迅速发展,晶体培养技术必将会有一个新的提高。

参 考 文 献

- [1] Mcpherson, A. Jr.: *Methods Biochem. Anal.*, 1976, **23**, 249.
- [2] Blundell, T. L.: *Protein Crystallography*, Academic Press, London, 1976, 59.
- [3] Mcpherson, A. Jr.: *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, 6300.
- [4] Carter, C. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 12219.
- [5] Kam, Z. et al.: *J. Mol. Biol.* 1978, **123**, 539.
- [6] Bot, R. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**(17), 9883.
- [7] Mcpherson, A. Jr. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**(4), 1969.
- [8] Michel, H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 1283.
- [9] Garavito, M. et al.: *J. cell Biol.*, 1980, **86**, 327.
- [10] Michel, H.: *J. Mol. Biol.* 1982, **158**, 567.
- [11] Garavito, R. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, **259** (7), 4254.
- [12] Michel, H.: *TIBS*, February, 1983, 56.
- [13] Doyle, M. J. et al.: *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 2355.
- [14] Eggers, H. M. et al.: *Clin. Chem.*, 1982, **28**, 1848.
- [15] Wehmeyer, K. R. et al.: *Clin. Chem.*, 1982, **28**, 1968.
- [16] Weber, S. G. and Purdy, W. C.: *Anal. Lett.*, 1979, **12**, 1.
- [17] Heineman, W. R. et al.: *Science*, 1979, **204**, 865.
- [18] 胡荫华、李庆满:《西北大学学报(自然科学版)》, 1986, **16**(1), 38.
- [19] Doyle, M. J. et al.: *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 2318.
- [20] Heineman, W. R. et al.: *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 1321A.

【本文于 1987 年 6 月 10 日收到】

【本文于 1987 年 7 月 4 日收到】