

发光免疫测定法的标记技术

韩 刚 毅

(济南军区军事医学研究所, 济南)

提 要

本文是以蛋白质为主要标记对象, 讨论了目前常用的标记方法的原理、使用情况 and 影响因素。意在为读者开展发光免疫测定法时, 选择适合工作需要的标记方法提供方便。

发光免疫测定法是借助于化学发光或生物发光的敏感性和免疫反应的高度特异性建立的测定方法。这是继荧光免疫测定法、酶免疫测定法和放射免疫测定法之后, 在近几年内发展起来的免疫测定新技术。根据发光物质的性质和在免疫测定中的作用, 可将发光免疫测定法分为四种类型: 1. 发光免疫测定法 (Luminescent immunoassay; LIA); 2. 发光辅助因子免疫测定法 (Luminescent cofactor immunoassay; LCIA); 3. 发光-酶免疫测定法 (Luminescent-enzyme immunoassay; LEIA); 4. 发光酶复合免疫测定技术 (Luminescent-enzyme-multiplied immunoassay; LEMIA)^[1]。这四种类型的发光免疫测定法都需要应用标记技术。LEIA 和 LEMIA 是利用能催化发光的酶标记抗原和抗体, 通过酶对发光系统的催化作用进行定量免疫检测。它们应用的标记手段与酶免疫测定法相同或类似, 可参考酶标技术。LIA 和 LCIA 法中需要应用发光剂或发光辅助因子标记抗原、抗体, 以结合物的形式参与发光免疫测定^[2,3]。本文主要介绍在 LIA 和 LCIA 中应用的结合物制备技术分类、原理以及生物医学研究中的应用现状。

标记方法分类

标记方法可分为化学标记和生物标记。本

文讨论的内容属于化学标记, 也就是通过化学手段将一种分子共价联接到另一种分子上。参与联接反应的两种物质分别称为标记物和被标记物。化学标记的目的是使被标记物在保持自身性质(如免疫学性质)的基础上兼有标记物的某些性质(如发光性质)。

在 LIA 和 LCIA 中, 按照标记物在发光反应过程中所起的作用, 可分为发光剂标记和发光辅助因子标记。前者的标记物是发光剂, 通常包括: 环酰胺类、吡啶酯类、荧光素类等。后者的标记物包括: ATP、NAD、FMN 以及它们的衍生物。

按照被标记物的结构或性质可分为对小分子(如甾族激素、药物等)的标记和对大分子(如蛋白质、核酸等)抗原、抗体的标记以及对某些配基和载体的标记。

按照标记反应的过程和形成结合物的结构特点, 又可将标记反应分为“直接偶联”和“间接偶联”两种方式。直接偶联是指通过偶联反应使标记物分子中的反应基团直接联接在被标记物分子的反应基团上。下文将讨论的碳二亚胺缩合法、过碘酸盐氧化结合法、重氮盐偶联法和混合酸酐法等都属于直接偶联。间接偶联的特点是在标记物与被标记物之间插入一条链或一个基团, 使两种物质通过引进的“桥”联接成结合物。通过插入的“桥”, 可以在原有的结构中

引进新的活性基团、增加反应活性,还可以减弱参与偶联双方存在的空间阻碍效应。所以,此类方法适用范围广,具有一定的优点。常用的方法有:琥珀酸酐法, O-(羧甲基)羟胺法、硫氰酸酯法、戊二醛法等。

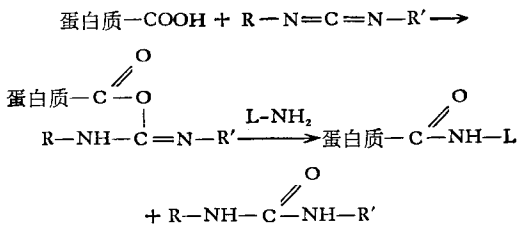
常用的标记方法

用发光剂或发光辅助因子与抗原、半抗原和抗体偶联形成的结合物已应用于许多药物、激素和蛋白质的发光免疫测定。其中象药物、激素等小分子物质的结合物主要是通过偶联反应制备,也有一部分是利用化学反应合成。这些小分子结合物多数具有性质稳定、结构明确、易纯化及有特定的物理和化学性质等特点。在用于发光免疫测定时可获得较好效果^[4]。

大分子抗原、抗体的标记是利用交联剂使标记物与被标记物结构中游离的氨基、羧基、硫氢基、咪唑基、酚基、羟基等基团形成不可逆联接。目前常用的标记方法有如下几种:

1. 碳二亚胺缩合法^[5]

水溶性碳二亚胺曾成功地用于制备大分子-大分子或大分子-半抗原衍生物的交联结合物。反应式为:



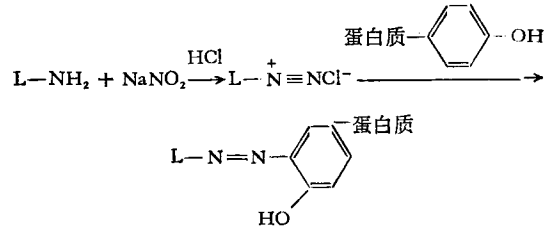
注 R、R' 分别为取代基团, L-NH₂ 为含有氨基的发光剂,“蛋白质-COOH”表示结构中含有游离羧基的蛋白质分子。

经过碳二亚胺缩合反应,蛋白质分子中的游离羧基能与发光剂分子中的氨基形成较为稳定的酰胺键。反应条件比较温和,应用范围广。结构中含有羧基或氨基的标记物均可选用此方法进行标记。可供使用的缩合剂有“二环己基碳二亚胺(DCC)”,和“1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺-HCl(EDC)”等。

2. 重氮盐偶联法^[6,7]

此法也称为“重氮化法”。是在酸性和低温

条件下,用亚硝酸盐将发光剂的伯氨基重氮化得到重氮盐。再与蛋白质作用生成发光剂-蛋白质结合物。反应式为:

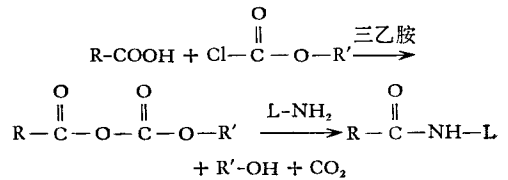


蛋白质分子能偶合重氮盐的位置有酪氨酸残基上酚羟基邻位,组氨酸残基的咪唑环、色氨酸残基的吲哚环等。

重氮化反应用于标记发光剂具有简便易行、成本低、重复性好等优点。但因反应是建立在 NO₂⁻与-NH₂作用的原理上,若标记物结构中无伯氨基则不易选用此方法。同时因脂肪族伯氨基与 NO₂⁻的反应产物不稳定,易分解放出 N₂。所以,象 ABEI、AHEI 等伯氨基位于侧链的发光剂也不能选用此法进行直接标记。这使重氮化法的应用受到一定的限制。

3. 混合酸酐法^[8,9]

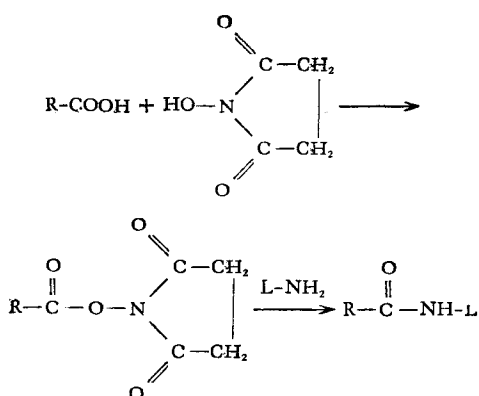
结构中含有羧基的分子(标记物或被标记物)在三乙胺或三正丁胺等的存在下与氯甲酸酯类反应,生成活泼的混合酸酐中间体。混合酸酐能与另一分子的氨基反应形成酰胺键联接的共价结合物。反应式为:



目前采用的氯甲酸酯类有氯甲酸乙酯、氯甲酸异丁酯等。

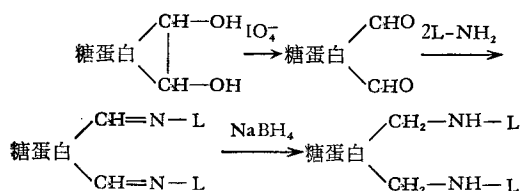
4. N-羟基琥珀酰亚胺活化法^[10]

一些结构中含有羧基的抗原,经过 N-羟基琥珀酰亚胺活化后再与发光剂的氨基偶联成酰胺键。同样,含有羧基的发光剂和催化剂(如血红素类)也可以经过活化用来与抗原的氨基偶联。



5. 过碘酸盐氧化结合法^[11,12]

此方法又称“过碘酸钠法”。是先利用过碘酸盐氧化糖蛋白中糖基的邻二羟基成为醛基，再通过醛基与发光剂的伯氨基反应形成 Schiff 碱。后者经 NaBH_4 还原— $\text{N}=\text{C}$ —键成为稳定的结合物。



过碘酸钠法也曾用于酶免疫测定中制备酶结合物并且获得较好结果。醛氨缩合成的 Schiff 碱经 NaBH_4 还原后的单键稳定性好，标记物不易脱落。凡含有芳香伯胺或脂肪伯胺的标记物都可选用此法。只是因过碘酸钠法的氧化反应需有邻二羟基存在，所以此法不适用于无糖基的蛋白质。对于某些虽含有糖基，但氧化糖基后会影响免疫学性质的物质，也不易选用过碘酸钠法进行标记。

6. 环内酸酐法^[13]

这是一种通过“桥”联接成结合物的标记方法。因较常采用琥珀酸酐作为联接的“桥”，所以又称为“琥珀酸酐法”。该方法是利用环内酸酐与分子中的羟基或氨基反应形成半酯或半酰胺。再经碳二亚胺法或混合酸酐法使其与另一分子中的氨基作用形成酰胺键。标记物与被标记物通过一个琥珀酰基联接到一起。除利用琥珀酸酐作为插入的“桥”外，还可以使用氧撑二

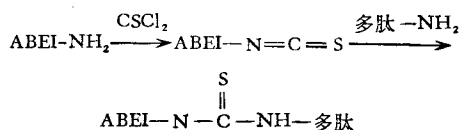
乙酸酐代替琥珀酸酐来插入作“桥”。

据报道，该方法的优点是能避免使用其它双功能交联剂时存在的副反应。保证标记物和蛋白质分子间的单向定量缩合，得到的结合物具有较高的标记率。某些发光剂与琥珀酸酐作用的中间产物已经商品化（如 ABEI-琥珀酰胺）。临用时略经活化就可制备成结合物。

7. 硫氰酸酯衍生物法^[14]

利用 CSCl_2 先与标记物（或被标记物）的— NH_2 反应形成硫氰酸酯衍生物。再通过结构

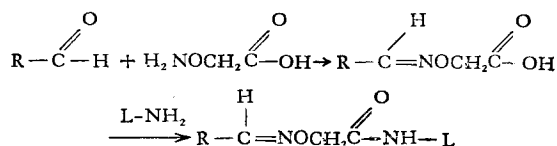
$$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ -\text{NH}-\text{C}-\text{NH}- \end{array}$$
 中的 — $\text{NH}-\text{C}-\text{NH}-$ 键与被标记物（或标记物）偶联成结合物。Patel (1983) 制备 ABEI-多肽结合物的反应式为：



偶联的位置主要是赖氨酸残基的游离氨基上。标记反应的条件温和，获得的结合物性质稳定，而且不损失活性。用此方法制备的 ABEI-ITC-IgG 结合物检测灵敏度可达 17fmole 。

8. O-(羧甲基)羟胺法^[15]

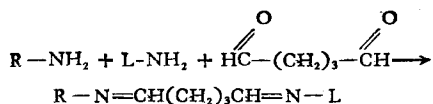
抗原结构中的羰基（或经反应形成的羰基）与 O-(羧甲基)羟胺作用能缩合成 O-羧甲基衍生物。后者再利用结构中的羧基与标记物中的氨基结合成结合物。



此方法制备的 ABEI-17 羟孕酮结合物检出灵敏度达 $0.5 \pm 0.2\text{ng/ml}^{[9]}$ 。

9. 戊二醛法

戊二醛作为一个双功能偶联试剂可通过其两个醛基分别与标记物及被标记物的伯氨基缩合成 Schiff 键，通过一个五碳桥偶联成结合物。



由于戊二醛在溶液中不仅以单体形式存在,而且出现大量的聚合物,故能在参与标记的双方分子间构成较大的距离,有利于减少在抗原抗体反应时的空间阻碍。因此该方法作为标记酶的手段曾得到较多的研究。但在发光免疫测定的 LIA 和 LCIA 标记中至今未受到广泛重视。其部分原因或许是由于戊二醛法的偶联不易定量控制并缺乏特异性,易引起同类物质的自身聚合。

影响标记的因素

1. 发光剂的选择

发光免疫测定法应根据实际需要和客观条

件的限制来选择发光剂。由发光剂的结构性质选择相应的标记方法。

在使用环酰肼类发光剂作为标记物时,应优先选用异鲁米诺及其衍生物,尤其是带有侧链的衍生物(如 ABEI, AHEI 等)。这不仅是由于参与偶合反应的氨基位于支链端而减弱了偶合时空间位阻效应,使之更易与蛋白质等大分子联接。同时也因氨基的烷基化作用可增加芳环的量子效应。在经过偶合反应后其发光效率也损失较少(甚至能够增加)。而用鲁米诺作标记物时,偶联反应造成的发光效应损失相当严重或完全损失^[2]。

吖啶酯类发光剂多选用 N-羟基琥珀酰亚胺法进行标记。发光素(Lucigenis, 联 N-甲基吖啶硝酸盐)等就属于这类发光剂。此类发光剂具有比鲁米诺大的发光效率。而且在比较

表 参与标记的双方结构特点与标记方法的选择

A	B	标记方法	主要偶联方式
—COOH 芳香伯氨基	—NH ₂ 酪氨酸、组氨酸、色氨酸残基	碳二亚胺法 重氮化法	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{NH}- \\ -\text{N}=\text{N}-\text{C} \end{array}$
—COOH	—NH ₂	混合酸酐法	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{NH}- \end{array}$
—COOH —CH—OH —CH—OH	—NH ₂ —NH ₂	N-羟基琥珀酰亚胺活化法 过碘酸钠法	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{NH}- \\ \\ 2-\text{C}-\text{NH}- \end{array}$
—OH, —NH ₂	—NH ₂	环内酸酐法	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{C}-\text{N}- \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \\ -\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{N}- \end{array}$
—NH ₂	—NH ₂	硫氰酸酯衍生物法	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ -\text{N}-\text{C}-\text{N}- \end{array}$
—CHO —NH ₂	—NH ₂ —NH ₂	O-(羧甲基)羟胺法 戊二醛法	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}=\text{NOCH}_2\text{C}-\text{N}- \\ -\text{N}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{N}- \end{array}$

注: A、B 分别为参与偶联的两种物质所具有的反应基团

温和的条件下,仅有 H₂O₂ 和稀碱便可激发化学发光^[10]。

荧光素作为发光剂标记抗体的方法可参考免疫荧光技术。在碱性溶液中利用异硫氰基荧

光素(FITC)与抗体蛋白质赖氨酸的 ε-氨基结合。据报道,一个 IgG 分子中有 86 个赖氨酸残基。一般最多能结合 15 个 FITC。

血红素类结构中具有游离的羧基。其作为

化学发光的催化剂也可通过 N-羟基琥珀酰亚胺活化法标记抗体蛋白质。借助于血红素-蛋白质结合物对发光系统的催化作用能用于进行免疫测定^[2]。

2. 被标记蛋白质

抗原作为被标记物时,应具有较高的纯度和免疫学稳定性。抗体作为被标对象则要求具有较高效价,同时还需要提纯 IgG 以代替全血清制备结合物,以减少血清中所含的某些氧化酶类妨碍结合物的稳定性。也可排除某些发光物质干扰发光免疫测定。

3. 标记方法的选择

目前所采用的标记方法相互之间差别较大。各种方法都有其独特的反应条件和适应对象。熟悉这些方法的原理和应用情况,正确选择与发光剂和被标记物结构特点相适应的偶联方式,是顺利开展发光免疫测定法的必要条件。上页表简要说明参与偶联双方结构与标记方法的关系。

4. 投料比、标记率和反应温度

在制备发光剂-IgG 结合物时, IgG: 发光剂和交联剂: IgG 的克分子浓度比(投料比)能影响结合物的发光效率。当确定一种交联剂后,必须仔细地选择它们之间的克分子浓度比。求出最佳反应的交联剂: IgG: 发光剂的反应浓度。

标记率是指结合物结构中 IgG 结合发光剂的克分子比。由于对应于每一种发光剂或被标记物制备的结合物都有特定的最佳标记率。标记率选择不好会造成发光效率低、不易保存和使用等现象。为确保结合物的发光效率和稳定性,应用中应当根据发光剂和被标记物的性质,通过实际实验选择出适用的标记率。

标记反应的温度控制,对于比较稳定的小分子来说被标记物的温度控制不必太严。而当被标记物是抗原或抗体蛋白质时,由于蛋白质对热的不稳定性,应当在保证反应进行前提下尽量选择低温条件,以免在标记过程中造成蛋白质分解、变性和丧失活性。

当标记反应需要应用有机溶剂时,要慎重

对待蛋白质类被标记物,防止有机溶剂可能引起的凝聚和变性作用。

5. 纯化与贮存

多数经偶合反应制备的结合物使用前都需要进行纯化。其主要目的是除去反应系统中存在的未结合发光剂和交联剂。一般可利用透析法、凝胶过滤法和盐析沉淀法等进行纯化。具体操作过程可借鉴荧光免疫技术和放射免疫技术中有关纯化结合物的方法。

提纯的结合物应及时测定蛋白质的含量、免疫学活性和发光效率等指标。由于标记过程的不规范或存放过程中可能出现的脱落现象,对于新制备的或经较长时间保存的结合物在使用前都要测定这三项指标,以保证实验结果准确、可靠。

结合物一般可分装保存在 4—70℃ 条件。最好能经过冰冻干燥保存,这可保存数年之久不丧失活性。

总 结

由于发光免疫测定法应用的标记物和被标记物结构多样性和检测系统的差别,往往不易正确选择所需标记方法和最佳实验条件。一般所遵循的原则是: 1. 标记过程不损伤被标记物的抗原、抗体性质。2. 标记好的结合物应具有发光剂的发光性质。3. 标记反应要具有一定的专一性,并且能够控制反应定量进行。4. 制备的结合物性质稳定,必要时能够进行分离纯化和长期保存。5. 标记方法简便易行、成本低。

随着近几年来发光免疫测定法的普及和发展,与其有关的标记技术也受到了一定程度的重视。但要满足发光免疫测定标准化、系统化和自动化的发展需要,目前的这些方法仍有待于进一步改进和完善。可以预见,良好、实用的标记方法的出现,必将为发光免疫测定法带来新的前景。

参 考 文 献

[1] Whitehead, T. P. et al.: *Clin. Chem.*, 25, 1553, 1979.

(下转第 21 页)

中国科学院生物物理所张少吾的报告“视觉平行算法”，触及到新一代计算机的基本运算法则。他列举了视觉信息处理中的一些平行算法，并探讨了将来在智能机设计中的可能应用。郑竺英的报告“立体视觉的信息处理”，介绍了体视研究的发展历史，体视理论的演变过程，以及当前的研究概况。立体视觉是视觉研究中重要课题之一，也是当前十分热门的领域之一。美英等国一些名牌大学集中专门人才钻研这一问题。郑竺英小组及其研究生，最近用准 DOG 函数作为视差匹配基元，对一维立体图对进行计算，取得一些好结果。这一方法与国际上现行算法相比，有所创新。

生物物理所汪云九在会上介绍了他们小组的研究工作，提出用广义 Gabor 函数作为视觉系统初级信息加工的权函数^[5]。这个模型可以描述视觉系统中各层次上的各类主要的感受野。它既反映了视觉信息加工中的层次性，又可代表时空通道的平行性，因此，比现有的一些理论模型具有更广泛的代表性。这个模型中的广义 Gabor 函数是神经网络中兴奋性突触和抑制性突触空间分布的一种描述。也可考虑为兴奋波在神经网络中传播的时空性质。因此，与神经生理学中的实验研究，有良好的对应关系。这一模型既可刻画对称性感野 (Hartline 型, Kuffler 型)，又可描述非对称性感野

(Hubel 和 Wiesel 的条型和边型)。所以这一模型比视觉生理中流行和运用了廿年的 Rodieck 的 DOG 函数模型要完善和合理。另外，这一模型虽然直接的刻画对象是各种类型的感受野，但也可以作为某些视觉心理现象进行神经学解释的工具。最后，这一模型也可供计算机视觉研究者，设计图象初级处理系统时参考使用，因为，从理论上看来，这一模型比计算机视觉研究中常用的 Marr 模型更为完善和优越。

由于这次会议筹备仓促，一定有许多工作未被邀请出席或因故未能参加，其中不乏有第一流的研究工作。

综上所述，从国内外对神经系统(脑)的信息处理问题的研究看来，它已成为生物物理学研究的一个重要领域。可以相信，随着实验手段的改进，各学科的相互渗透和促进，在这一领域中将会出现更大的发展。

参 考 文 献

- [1] D. Rose and V. G. Dobson: *Models of the Visual Cortex*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, 1986.
- [2] Masao Ito: *News in Physiological Science*, 1, 30, 1986.
- [3] D. Marr: *Vision*, San Francisco, CA: Freeman, 1982.
- [4] Xu Jing-hua and Li Wei: *Lecture Notes in Biomathematics* (Ed. Taramoto, E.), in press.
- [5] 汪云九等:《生物物理学报》, 1, 123, 1985.

[本文于 1986 年 11 月 10 日收到]

(上接第 30 页)

- [2] Olsson, T. et al.: *Immunoassay for the 80's* (A. volder, et al., ed.) P113, 1981.
- [3] Schroeder, R. et al.: *In Methods in Enzymology*, 57, 424, 1978.
- [4] 徐兆昌:《国外医学——药学分册》, 1, 47, 1985.
- [5] Cheng, P. J. et al.: *J. Immunoassay. Methods*, 48, 159, 1982.
- [6] Wood, W. G. et al.: *Anal. Appl. Biolumin. Chemilumin. Proc. Int. Symp.*, 3rd, P189, 1984.
- [7] Simpson, J. S. et al.: *Nature*, 279, 646, 1979.
- [8] Tsuji, A. et al.: *Enzyme Immunoassays*, (E. Eshika-

wa. et al., eds) P41, 1981.

- [9] Patel, A. et al.: *Clin. Chem.*, 29, 1604, 1983.
- [10] Weeks, I. et al.: *Clin. Chem.*, 29, 1474, 1983.
- [11] Hersh, L. S. et al.: *Anal. Biochem.*, 93, 267, 1979.
- [12] 蒋滋慧等:《中国免疫学杂志》, 5, 36, 1985.
- [13] Kransz, H. S. et al.: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 317, 723, 1984.
- [14] Patel, A. et al.: *Anal. Biochem.*, 129, 162, 1983.
- [15] Klingler, W. et al.: *Anal. Appl. Biolumin. Chemilumin. Proc. Int. Symp.*, 3rd, P265, 1984.

[本文于 1986 年 8 月 13 日收到]