

技术与方法

临床生化标记免疫分析技术的一些新进展

孙 树 杰

(吉林省白城市卫生防疫站)

二十多年来,临床生物化学在诊断应用和化学病理学的研究方面有了显著进展,其中起重要作用的是同位素、非同位素标记免疫分析技术的推广和应用。有人认为,标记免疫分析技术的建立和应用是生化分析的一次革命^[1]。看来这种说法似乎并不过份。本文拟就临床生化工作者所重视的放射免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析和化学发光免疫分析等标记免疫分析技术有关方法学方面的新进展做一扼要介绍。

一、放射免疫分析

(Radio-immunoassay, RIA)

众所周知,放射性同位素作标记物的 RIA 在临床生化定量分析中应用已有二十多年。其优点是灵敏度高,特异性强。因而在某些领域还不能用其它免疫分析技术代替。但是,也应该看到由于该技术在计数结果前需进行结合的或游离的放射配体的分离。以往所应用的分离方法都涉及到离心、倾倒或洗涤等步骤,使得操作费时又不方便,不利于大批量全自动化操作,且易导致试管外的放射性污染。为解决这一问题,Thorell^[2]提出了一种名之为样品内衰变剂计数(Internal Sample Attenuator Counting, ISAC)的新分离技术。其原理是制备一种具有分离和衰变两种性质的试剂,加到抗原-抗体反应体系中,使其选择性地屏蔽(衰变)结合的或游离的放射性,无需进一步分离而直接计数,从而避免了上述缺点,给实际应用带来很大方便。目前,ISAC 有二种基本方法。一种称为吸附一

衰变剂法^[2,3],即将具有吸附作用的活性炭和具有衰变作用的氧化铊相混合,在琼脂糖或淀粉溶液中形成炭-铊微球。在检测抗原(如 T_3)时,待样品、 ^{125}I 标记抗原和特异抗体竞争结合后,加入炭-铊微球悬液。微球中活性炭将游离 ^{125}I 标记抗原吸附,氧化铊使吸附的 ^{125}I 衰变。由于微球自身沉降作用,无需离心即可直接计数结合放射性。该法优点是试剂容易制备,操作简便易行。但缺点是仅适用于小分子抗原物质的检测。另一种方法称为抗体-衰变剂法^[2],该法是首先制备含有氧化铊的聚丙烯酰胺微球,然后在戊二醛的作用下与特异抗体偶联,制成具有衰变作用的固相抗体。在检测抗原(如 HCG)时,加入样品及 ^{125}I 标记抗原后,加入该微球悬液,使其发生竞争结合,与其结合的 ^{125}I 标记抗原被微球内氧化铊衰变,同时由于微球自身沉降而不需进一步分离,即可直接计数游离 ^{125}I 标记抗原的放射性。该法缺点是对于每一种抗原都需制备其特异抗体与聚丙烯酰胺微球偶联。这样制备的微球只适用于一种抗原物质的检测。这一缺点可用第二抗体偶联聚丙烯酰胺-铊微球来解决。该微球可作为一种广谱试剂适用于不同的反应体系^[2]。在 Thorell 工作的启发下 Holub^[4]对这种 ISAC 技术进行了改良,方法是在检测抗原如 T_3 时,依次加入样品、 ^{125}I 标记抗原及特异固相抗体,待其竞争结合后,加入 50% 硫化镉与氧化铊的混悬液,或 80% 没食子酸铊,然后直接计数。这种方法制备的衰变剂很简单,可以与任何一种抗原-抗体的固相竞争法相结合,而适用于不同

的反应体系。最近, Eriksson 等参照 Thorell 的方法将 ISAC 与固相二抗分离技术相结合用于促甲状腺激素 (TSH) 的检测中^[5]。他们的方法是首先制备含有氧化铋的琼脂糖微球, 然后在溴化氰作用下, 与二抗偶联成固相化试剂, 在样品、¹²⁵I-TSH 和特异抗体混合竞争反应平衡后, 加入该微球, 与抗体结合的 ¹²⁵I-TSH 被沉淀并衰变, 检测结果即为游离 ¹²⁵I-TSH 的放射性。

ISAC 技术的应用使得 RIA 更为简便快速, 因而可以使 RIA 的大批量全自动化操作成为可能。实验证明; ISAC 在灵敏度、特异性、重复性等方面都和常规分离技术相同。目前, 该技术已用于 T₃、T₄、hLH、HCG、TSH、地高辛、苯妥英和睾酮的定量检测中。尽管迄今应用尚不广泛, 但可以看出, 这是一种很有前途的方法。

二、酶免疫分析 (Enzyme-immunoassay, EIA)

尽管 RIA 已在各种生物活性物质的检测中得到广泛地应用, 但是由于须使用同位素, 操作上欠安全, 且某些同位素半衰期短, 试剂运输和保存很困难, 因而亟需建立可以和 RIA 媲美的非同位素标记免疫分析技术。1971 年由 Engvall 等建立的以酶作标记物的酶免疫分析 (也称酶免疫吸附试验 ELISA) 便是目前应用较多的一种非同位素标记免疫分析技术。其优点是试剂可长期保存, 不需特殊检测仪器, 且无放射性损害。然而, 由于该技术在实验过程中也需进行结合的或游离的酶活性的分离, 因而在实际应用中也带来诸多不便。近来, 均质酶免疫分析 (Homogeneous Enzyme Immunoassay, HEI) 的应用使得试验过程中无需进行结合的或游离酶活性的分离, 而只须将各种试剂加在一起, 就可直接测定结果。这使得该技术更为简便。但是 HEI 的原理很复杂, 其中某些方法涉及到库伦静电引力^[6]具有酶活性的全酶解离成辅基和酶脒, 它们均失去酶活性, 但有重组成全酶的可逆性^[7]。根据辅酶循环放大系统和配对酶系统催化底物的连锁反应等基本原理

设计的有: 用全酶标记抗原的酶放大免疫分析技术 (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, EMIT)^[8] 和辅基标记抗原的辅基标记免疫分析 (Prosthetic Group Label Immunoassay, PGLIA)^[9] 也有用配对酶记抗体的酶增强免疫分析 (Enzyme Enhancement Immunoassay)^[6] 以及用配对酶分别标记抗原和抗体的酶连传免疫分析 (Enzyme Channeling Immunoassay)^[9] 等。现以 HEI 中有代表性的酶放大免疫分析技术为例说明其简单操作过程。首先将苹果酸脱氢酶与抗原 (如 T₄) 在交联剂 N-羟基丁二酰亚胺酯的作用下共价结合成标记试剂。试剂中的抗原仍保持与相应抗体的结合能力, 但其中的苹果酸脱氢酶 (MDH) 的活性却受到强烈抑制。该标记试剂与特异抗体结合后, MDH 受抑的活性得到恢复。对这一现象的解释是在 MDH 与抗原 T₄ 交联过程中, T₄ 分子除了在 MDH 活性位点附近形成牢固的共价结合键外, 还可能跨越活性中心, 形成一个比较弱的非共价键。而抗体与 T₄ 的结合可能解除这一非共价键, 从而使 MDH 恢复活性。

在进行血清 T₄ 含量测定时, 将样品、标记试剂、抗体及底物溶液依次混合, 待反应平衡后, 通过 L-苹果酸转化为草酰乙酸, 同时使 NAD 还原成可供比色的 NADH 的量就可判定抗体和标记抗原结合的多少, 然后根据竞争结合的原理, 通过标准曲线, 即可计算出样品中 T₄ 的含量。很明显, T₄ 含量与 NADH 含量成反比。本法测 T₄ 敏感性为 < 20 ng/ml。因为正常人血清中的内源性 MDH 能干扰测定结果, 所以正式试验前要用 0.1 M NaOH 对血清样品进行预处理, 经中和后方可测试。

HEI 是一种很有发展前途的新型酶免疫分析技术, 它是一种微量、特异、简便和灵敏的好方法, 目前已广泛地应用于吗啡、巴比妥、苯巴比妥、可卡因, 甲状腺素等定量检测。尤其值得指出的是此技术相当快速, 有的一分钟即出结果^[6], 便于临床快速自动化检测, 但是, 此技术制备标记试剂较难, 而一般单位目前尚难自行制备; 如有专门厂家制备 HEI 试剂盒, 供临床

应用还是可行的。

通常来说, EIA 的灵敏度略低于 RIA。为了提高 EIA 的灵敏度, Guesdon 等^[10]首先把抗生物素-生物素体系 (Avidin-Biotin System, ABS) 应用到 EIA 中。ABS 具有下列优点: ①抗生物素是一种分子量约为 68.000 的碱性糖蛋白, 对生物素具有异常高的亲和性(亲和常数为 $10^{15} M^{-1}$); ②每个抗生物素分子可结合 4 个生物素分子; ③生物素可和多数有机化合物结合, 并具很高比活力而不影响其与抗生物素的结合能力。^[11]鉴于上述优点, Guesdon^[10]等设计了用抗生物素架桥连接生物素标记特异抗体和生物素标记酶的酶标技术 (Bridged Avidin-Biotin, BRAB) 和抗生物素经酶标记的技术 (Labeled Avidin-Biotin, LAB)。他们详细地研究了抗生物素-生物素体系在 EIA 中应用的可能性, 并用这两种技术对人 IgE 和牛血清蛋白抗体进行了定量检测。所得的结果提示抗生物素-生物素体系在 EIA 中的应用是可行的。

在 Guesdon 等工作的启发下, Rappuoli 等^[12]将抗生物素-生物素体系应用到人绒毛膜生长激素 (HCS) 的竞争酶免疫分析技术中。方法是首先用抗 HCS 包被聚苯乙烯反应板孔, 然后加入待检样品和生物素标记 HCS, 待其竞争结合后加入碱性磷酸酶标记抗生物素, 作用一定时间后按常规方法加底物显色, 并测 OD 值, 结果证明该方法的灵敏度较高, 可测得 1 ng/ml HCS, 与 RIA 相关良好 ($r = 0.979$)。这些可喜的成果充分提示抗生物素-生物素体系在用于提高 EIA 灵敏度方面有很大潜力。

三、荧光免疫分析 (Fluorescent Immunoassay, FIA)

在过去荧光免疫分析应用不如 EIA 广泛, 主要的限制因素是缺少合适的检测仪器。近年来, 由于多种荧光比色计的研制成功, 使得这一技术的应用逐渐增多。和 RIA, EIA 等标记免疫分析技术一样, FIA 也需结合或游离荧光活性的分离。目前广泛应用的磁性固相和聚苯乙烯珠分离方法虽然省略了离心的步骤, 但是仍

需通过吸弃, 倾倒等步骤, 将结合的或游离的荧光活性分离。因而, 亟需建立一种均质荧光免疫分析。受均质酶免疫分析的启发, 而建立的底物标记荧光免疫分析 (Substrate-Labeled Fluorescent Immunoassay, SLFIA)^[13,14]是这种技术的典型代表。目前所建立的 SLFIA 大都选用荧光性底物 4-甲基伞型酮基- β -D-半乳糖苷标记抗原制荧光试剂。这种试剂仅在较短波长的激发 (340 nm) 和发射 (385 nm) 光时显示十分微弱的荧光。但与样品(含抗原)及特异抗体竞争结合反应后, 处于激离状态的荧光试剂中的 4 MUG 被加入到反应体系中的 β -半乳糖苷酶水解后产生的 4-甲基伞酮 (4 MG) 其光谱特性及荧光强度均不同于 4MUG。它在激发光波长 (400 nm) 和发射光波长 (450 nm) 处显示最大峰值, 而在此条件下, 和特异抗体结合的 4 MUG 不被水解, 基本上不显示荧光反应, 故无干扰作用。试验中生成的荧光强度与样品中抗原含量成正比。目前, 应用底物标记荧光免疫分析已能测定药物半抗原如庆大霉素、卡那霉素、苯妥英钠等。Li 等^[15]用它测定治疗抗癫痫药物卡马西平、敏感性 $<5 \mu g/ml$ 。与其它方法如酶放大免疫分析技术、高压液相色谱等比较, 结果相关良好 ($r = 0.97$)。用该技术也可测大分子蛋白抗原如 IgG 和 IgM 等^[16]纸片法 SLFIA 的建立^[17], 使得该技术更为简便、易行。

理论上讲, 荧光免疫分析的灵敏度可以和放射免疫分析媲美, 但实际上其灵敏度低于后者, 也低于酶免疫分析。这主要是由于背景荧光所致。这点在均质荧光免疫分析中尤为明显。因为体液成份可干扰反应。为解决这一问题, 最近, Jolly 等建立了一种称为微球浓缩荧光免疫分析 (Particle Concentration Fluorescence Immunoassay, PCFIA) 的新技术^[1]。其方法是制备聚苯乙烯胶乳微球 (直径 0.8 μm), 然后用抗原包被, 制成固相化抗原。实验时, 使用特制反应板(其板孔为漏斗状, 孔底开口直径为 2.0 mm, 上贴以规格 0.2 μm 醋酸纤维素滤膜), 每孔内加入样品(含抗体)及荧光标记抗体后,

加入抗原包被的胶乳微球悬液。由于微球布朗运动和表面积大的原因,待检抗体很快可和微球表面抗原结合,同时(或随后)与荧光标记抗体结合。待反应完成后,抽滤,孔内微球铺在孔底(2.0 mm),置于荧光计上测定其微球荧光强度。由于整个反应液总体积为 125 μ l,抽滤后,标记物含在 0.125 μ l 的体积内,因而实际上相当反应物浓缩 1000 倍,这样既可提高荧光免疫分析的灵敏度、又减少了非特异性干扰。作者用这种技术对杂交瘤上清单克隆抗体进行筛选,其灵敏度为 2-4 ng/ml。与常规固相 EIA 和 RIA 相同。此外,该技术相当快速,可在 10 分钟内完成实验,且可高度自动化。

为提高 FIA 的灵敏度,在 Guesdon 等工作的启示下, Berman^[18] 也将抗生物素-生物素体系应用到 FIA 中。方法是将 Thy-1 抗原阴性、干细胞抗原 (stem-cell antigen) 阳性的肿瘤细胞作靶细胞,与生物素标记兔抗小鼠脑组织抗体 (R α MB) 结合,然后加入荧光标记抗生物素、分离除去游离荧光活性后检测荧光强度。由于抗生物素-生物素体系的放大作用,使结果较常规 FIA 高三倍。如果在加入生物素标记 R α MB 后不加荧光标记抗生物素,而改用未标记抗生物素,之后再加抗抗生物素血清荧光标记物,则灵敏度提高五倍。由此可见用抗生物素-生物素体系提高 FIA 的灵敏度是可行的。

四、化学发光免疫分析 (Chemiluminescence Immunoassay, CLIA)

近几年来,非同位素标记免疫分析技术最引人注目的进展是化学发光免疫分析的推广和应用。CLIA 最初由 Halman 等^[19] 提出,用以检测灵杆菌菌体抗原。其原理是以化学发光物(如过氧化物酶和鲁米诺等)标记抗原(或抗体),以化学发光反应作最后检测步骤。由于具有化学发光反应的高敏感性 (10^{-15} mol/L) 和免疫分析的强特异性,因而引起生化家的广泛注意。目前已在甲状腺素 (T_4)、17 α -羟孕酮、hCG, LH, α -FP、孕酮皮质醇等的定量检

测中得到广泛地应用^[20-26]。以往的研究表明,它几乎具有临床生化快速分析所要求的全部优点,同目前公认的最佳免疫分析技术 RIA 和 EIA 相比,有过之而无不及。就其敏感程度而言,和 RIA 属于同一水平。就检测时间来说,一般要比 RIA 和 EIA 快 3—8 倍。而且 CLIA 标记物稳定、无放射性危害。1980 年 Olsson 等^[27] 所列比较表也充分说明了 CLIA 的优点(表 1)。

当然它和其它标记免疫分析技术一样,在计数结果前也需进行结合或游离发光活性的分离。其分离技术也多用固相或双抗固相法,操作较费事。1984 年 Messeri 等^[28] 提出一种称为均质发光免疫分析 (Homogenous Luminescence Immunoassay) 的新技术,无需进行结合的或游离的配体分离,只将各种试剂依次加入后,即可直接计数发光率,这给实际应用带来很大方便。现以检测尿中总雌激素为例,简单说明其操作过程。首先用 6-氨基丁基异鲁米诺 (ABEI) 作标记物与雌二醇-17 β -半琥珀酸酯共价结合成雌二醇-17 β -半琥珀酸酯-ABEI (E_2 -ABEI),实验时将尿液先用硫酸脂酶和半乳糖苷酶使其水解,然后向试管内依次加入等量水解尿液, E_2 -ABEI 和抗血清,温育 1 小时后,置于发光计小杯中。加微小过氧化物酶和 H_2O_2 使其发光。测得发光率,继而根据标准曲线求得雌激素含量。由于标记试剂 E_2 -ABEI 的发光率随着与抗血清的结合而增强,因而有人称这种均质发光免疫分析为抗体增强化学发光 (Antibody Enhanced Chemiluminescence)^[29]。但这种增强发光的反应可受加入样品抗原量的增加而抑制,

表 1 三种免疫分析特性的比较

特 性	CLIA	EIA	RIA
利用低分子标记物的可能性	+	-	+
使用催化标记物放大的可能性	++	+	-
用于均质分析的可能性	+	+	-
无放射性危险	+	+	-
检验程序快速	+	-	+
设备简便,费用低廉	+	(+)	-
标记物稳定性	(+)	(+)	-

微生物及其代谢产物检测中化学发光法

韩 澄 源

(北京丰台 59175 部队)

化学发光法 (chemiluminescent technique) 具有反应快和灵敏度高的优点, 又有较完善的测量仪器和良好的试剂供应, 国外已逐渐成为生物学、医学和生物化学研究和常规的测定手段。化学发光法不但在测定激素^[1,2]、IgG^[3] 等方面得到广泛应用, 而且在微生物学研究方面也

日益受到重视。早在 60 年代国外就研究用化学发光法测定水中细菌的数量^[4], 后来用于测定病人尿中的细菌数^[5]。在化学发光的基础上 Halmann 等^[6]以及 Velan 和 Halmann^[7] 先后将固相酶联免疫法与化学发光法结合起来, 形成了一种很有前途的化学发光免疫测定法 (chem-

因此, 该实验中发光率与样品抗原含量成反比。

均质发光免疫分析技术的建立, 使化学发光免疫分析的操作更为简便、快速和适于全自动化。因而在临床生化上应用有很大前途。但它和酶免疫分析一样, 能在多大程度上取代放射免疫分析, 目前尚难预料。因为放射免疫分析技术自身也在发展(如 ISAC 技术的应用)。

结 语

二十多年来、尤其是最近几年, 临床生化标记免疫分析技术的进展日新月异, 本文所介绍的只是其中的一少部分。尽管如此, 也不难看出, 标记免疫分析技术在提高灵敏度和简化操作步骤方面取得了可喜的进展。

参 考 文 献

- [1] Jolly, M. E. et al: *J. Immunol. Methods*, **67**: 21, 1984.
- [2] Thorell, J. I.: *Clin. Chem.*, **27**: 1969, 1981.
(或参见孙树杰等:《国外医学》临床生化与检验分册, 5: 61, 1984.)
- [3] Eriksson, H. et al: *J. Immunol. Methods*, **42**: 105, 1981.
- [4] Holub, W. R. et al: *Clin. Chem.*, **28**: 1555, 1982.
- [5] Eriksson, H. et al: *J. Immunol. Methods*, **71**: 117, 1984.
- [6] Gibbons, I. et al: *Clin. Chem.*, **27**: 1602, 1981.
- [7] Iin, J. D. et al: *Clin. Chem.*, **28**: 2081, 1982.
- [8] Ullman, E. F. et al: *Clin. Chem.*, **21**: 1011, 1975.
- [9] Litman, D. et al: *Anal. Biochem.*, **106**: 223, 1980.
- [10] Guesdon, J. L. et al: *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 1131, 1979.
- [11] Kendall, C. et al: *J. Immunol. methods*, **56**: 329, 1983.
- [12] Rappuoli, R. et al: *Anal. Biochem.*, **118**: 168, 1981.
- [13] Burd, J. F. et al: *Clin. Chem.*, **23**: 1402, 1977.
- [14] Burd, J. F. et al: *Methods Enzymol.*, **74C**: 79, 1981.
- [15] Li, T. M. et al: *Epilepsia*, **23**: 391, 1982.
- [16] Warah, D. M. *Clin. Chem.*, **26**: 986, 1980.
- [17] Greenquist, A. C. et al: *Clin. Chem.*, **27**: 1614, 1981.
- [18] Berman, J. W. et al: *J. Immunol. Methods*, **36**: 335, 1980.
- [19] Haiman, M. et al: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 473, 1977.
- [20] Wleersekera: *Ann. Clin. Biochem.*, **20**: 100, 1983.
- [21] Arakawa: *Dev. Immunol.*, **18**: 233, 1983.
- [22] Barnard, G.: *J. Clin. Chem.*, **30**: 538, 1984.
- [23] Brockelbank, J. L.: *Ann. Clin. Biochem.*, (in press).
- [24] Weeks, I. et al: *Clin. Chem.*, **29**: 1474, 1983.
- [25] Kohan, F. et al: *FEBS. Lett.*, **104**: 201, 1979.
- [26] Arakawa: *Anal. Biochem.*, **91**: 248, 1979.
- [27] Olsson, and Thore, A.: in *Immunoassays for the 80s* (Eds. Voller et al), 133, 1981.
- [28] Messeri, G. et al: *Clin. Chem.*, **30**: 653, 1984.

[本文于 1985 年 1 月 14 日收到]