

稀土元素标记技术及在免疫分析中的应用

陈泮藻 李振甲

(解放军总医院基础所,北京)

提 要

稀土元素标记技术是建立当代崭新的时间分辨荧光免疫分析的关键。由于标记试剂稳定、使用时间长,又无同位素危害,颇受欢迎。本文着重介绍稀土元素标记的原理和特点。列举单克隆、多克隆抗体、抗原及链亲合素的稀土元素简易标记法。并扼要概述它在激素、多肽、蛋白质及病毒等免疫测定中的初步应用。

关键词 时间分辨荧光免疫,稀土元素,链亲合素

免疫分析技术是利用微量抗原与相应的高特异性的抗体,产生抗原抗体反应,来检测各种生物活性物质。时间分辨荧光免疫分析技术(time-resolved fluoroimmunoassay,简称TrFIA)属于标记免疫分析中的一种。是七十年代末发展起来的一种崭新的荧光免疫分析。按测定方法可分为双位点夹心法和固相竞争法,前者又称之时间分辨免疫荧光分析技术(time-resolved immuno fluorometric assay简称TrIFMA)^[1,2],目前文献报道多采用夹心法。

TrFIA和TrIFIA的测定原理和通常的荧光免疫分析法不同,它利用三价的镧系稀土离子如铈(Ce^{3+})、钐(Sm^{3+})、镝(Dy^{3+})和铽(Nd^{3+}),特别是铕(Eu^{3+})、铽(Tb^{3+})的螯合物,都可以与 β -二酮体,产生极强的特殊荧光。如 Eu^{3+} 与 β -二酮体反应后,荧光强度增强了近1百万倍。利用这一特点,若将 Eu^{3+} 与抗体螯合,形成一种新的标记化合物,再与抗原产生免疫复合物。复合物中的 Eu^{3+} 在紫外光(340 nm)激发下,能发出高强度的荧光(613 nm)信号,可用时间分辨荧光计记录下来。大大提高免疫分析法的灵敏度。如 Eu^{3+} 标记的TrFIA,最小检出值可达 10^{-18} mol/L^[3]。优越于RIA和EIA等现代分析法。

一、稀土元素标记物的特点

1. 提高荧光信号测量的特异性 稀土元素的荧光激发光波长范围较宽,有利于增高激发能,提高标记物的比活性。其发射光波长甚窄,有利于降低本底。同时激发光与发射光之间有较大的Stokes移位,十分有利于排除非特异荧光的干扰。而用普通荧光的激发光和发射光的波长,重叠相当严重,生物样品本身产生荧光(400—600 nm),几乎覆盖整个可见光波长范围。因此用普通荧光来检测生物样品时,自然本底干扰太大。

2. 消除自然荧光和样品荧光的干扰 稀土元素螯合物的荧光不仅强度高,而且半衰期也很长,介于10—1000 μs 之间,比普通荧光要高出5—6个数量级。样品中蛋白质类的自身荧光约1—10 μs ,而 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 的荧光分别为430 μs 和41 μs 。因此利用延缓测量时间,待样品中短寿命的荧光完全衰变后,再测稀土的荧光。从而消除样品、试剂及其其他的非特异性的荧光干扰。

3. 稀土元素标记物比较稳定 三价稀土离子,可以被二乙胺四乙酸等螯合剂螯合,形成稳定标记螯合物,加上制备和操作也比较简单。

一旦将稀土离子标记在抗体或抗原分子上,这种标记物可以经受洗涤等处理,而不脱落,并在酸性的增强溶液中,受到激发就能产生强烈荧光。所以标记一次,可供1—2年使用。克服了用同位素、酶、荧光物质标记的缺点。

二、稀土元素螯合物标记抗体的制备

标记物的质量好坏是建立 Tr FIA 法的关键,优质的稀土元素标记物必须具有高比活性,又不损伤抗体或抗原的免疫活性。

标记的方法是利用双功能基团螯合剂。既可标记抗体又能标记抗原,标记抗体优点更多。由于抗体比纯的抗原来源更丰富,加上抗体 IgG 上具有可供标记的酪氨酸和组氨酸残基,标记方法也远不如标抗原那样多种多样,标记操作简便,容易掌握。如标记第二抗体或链亲合素,则可以作为通用试剂,而且具有放大作用,有利于提高分析方法的灵敏度。

1. 稀土元素标记抗体需具备的条件

(1) 抗体: 无论多克隆抗体或单克隆抗体都需经硫酸铵分级提取,再亲和层析或离子交换柱层析,获得有活性 IgG,并防止不溶现象。

(2) 稀土元素: 选择 Eu 和 Tb 较为理想,取 EuCl_3 或 TbCl_3 ,用 0.05 mol/L pH 6.0 柠檬酸缓冲液配成 33 mmol/L。

(3) 双功能基团螯合剂: 可人工合成,使螯合剂的一端与稀土离子螯合,另一端则能与抗体或抗原分子上的氨基相联接,形成螯合物。

常用双功能螯合剂有: 异硫氰酸-苯基-二乙胺四乙酸 (EDTA)、二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)、N-[异硫氰酸-苯基]-二乙烯三胺四乙酸 (DTTA)、氨基-苯基-EDTA、1-[p-苯双氮]-EDTA^[4]。这一类螯合剂都具有溶解度高和稳定性强等特点。

标记中选用的螯合剂不同,对抗体免疫活性损伤的程度也不同。若用重氮化氨基苯基的 EDTA,每克分子抗体 IgG 标上 5 个以上的 Eu^{3+} 时,就会引起抗体的凝集,使免疫活性下降。若用异硫氰基 EDTA,即使每克分子的 IgG 标上 15--20 个 Eu^{3+} ,也不会降低抗体的

免疫活性和溶解度。值得指出: 带 7 个配基的 EDTA 的 p-异硫氰酸盐-苯基-DTTA 的 N_1 -异物体,形成比 EDTA 衍生物更稳定的 Eu^{3+} 螯合物。而且在酸性增强溶液中,能很快分解出 Eu^{3+} ,其速度都比 EDTA 或 DTTA 衍生物更快。因此后来的 TrFIA 几乎都利用 N_1 - (p-异硫氰酸盐-苯基)-DTTA 制备 Eu^{3+} 标记物。

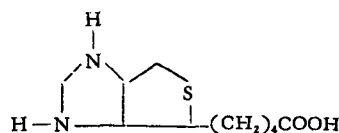
2. 标记化合物的制备

上述螯合剂共同特点,分子内既带氨基多羧酸,又带芳胺羧酸或异硫氰酸等活性基团,与 Eu^{3+} 螯合的能力很强,因而标记共轭物比度也高,对提高分析的灵敏度很有好处。

双功能螯合剂与抗体联接方法有: 重氮法、碳二亚胺法和异硫氰酸基反应法。由于稀土离子只与抗体 IgG 分子中个别基团结合,故不会引起抗体免疫活性、溶解度、稳定性、亲和力及特异性的改变,运用温和联接方法和水溶液系统,可以增加联接率。

三、稀土元素标记链亲合素制备

生物素 (biotin) 是动植物体内广泛存在的一种维生素 H, 分子结构如下:



亲合素 (avidin) 或称抗生物素,是一种碱性卵清糖蛋白,含四个相同亚基。每个亲合素可结合四个生物素分子。故亲合素是一个多价分子,具有放大作用。亲合素对生物素的亲和力高达 $10^{15} (\text{mol/L})^{-1}$,是抗原抗体反应的百万倍。两者结合极其稳定,不易解离。近些年来 BAS 在 TrFIA 和 TrIFMA 中得到广泛应用。现举例加以说明。

1. 稀土元素标记 BAS 制备^[5,6]

取 5 mg 链亲合素 (streptavidin) 溶于 3.3 ml, 0.1 mol/L pH 9.1 碳酸盐缓冲液中,为 A 液。另取 7 mg 的 (4,7)-双(氯化苯酚磺酸盐)-1,10 菲洛林(简称 BCPDA),溶于 200 μl

二甲基甲酰胺中为 B 液。将 A 液置磁搅拌器上,缓慢滴加 B 液,室温反应 1h,用 5L 0.1 mol/L NaHCO₃ 透析三次或过 G₅₀ 柱。临用前,用 0.05 mol/L pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液,按 1:50 稀释 Eu³⁺ 标记物(为 10 μmol/L)。收集反应液,0—4℃ 保存。

2. 测定生物素 DNA 探针的 Eu³⁺ 链亲合素制备

(1) 经亲和层析获得链亲合素;(2) 合成异硫氰酸苯基 EDTA-Eu³⁺ 螯合物;(3) 标记步骤: 取 1 mg 链亲合素,溶于 500 μL 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液,加入相当于 100 个克分子当量的异硫氰酸苯基 EDTA-Eu³⁺ 螯合物,混匀,4℃ 反应过夜,反应液经 Sephadex G₅₀ 柱,纯化链亲合素 Eu³⁺。测链亲合素中 Eu³⁺ 荧光强度,从 Eu³⁺ 标准曲线查出偶联 Eu³⁺ 浓度,算出 Eu/SA 比值。

用 Eu³⁺ 标记链亲合素来测定生物素 DNA 时,发现 Eu/SA 比值非常重要,当 Eu/SA 比值等于 10 时,信号/噪音为 25,是最合适的。而 Eu/SA > 10 时,信/噪比值降至 18,因本底噪音增加,影响生物素与标记的链亲合素的

亲和反应。

四、稀土元素标记抗原的制备

用稀土元素标记抗原,建立液相或固相竞争结合分析法,以我室二步法标记白蛋白抗原为例: 称 0.5 mg 人白蛋白溶于 100 μl pH 7.5 的生理盐水,加 0.5 mg DTPA 立即混匀,室温反应 40 min,加入 100 μL 三氯化铈(33 mmol/L),置室温反应 40 min,4℃ 放置 3h。反应液对 pH 7.5 稀生理盐水透析 3 天。用 Arcus 1230 型时间分辨荧光计,测量反应液的 Eu³⁺ 含量,计算 Eu 标记率为 10.2 克分子 Eu/1 克分子白蛋白。

五、TrFIA 和 TrIFMA 在免疫分析中应用

以镧系元素与抗原或抗体螯合,作为标记物建立 TrFIA 和 TrIFMA。这两种非同位素的免疫分析,因灵敏度高、标记物稳定,标准曲线量程宽,不受样品自然荧光干扰等优点,博得科学界和医疗界的关注。国外已报道了方法研究和临床应用^[7,10],已有包括激素、药物、蛋白

表 1 TrFIA 和 TrIFMA 检测物质

检测物质	最小检出值	标准曲线范围	测定方法
促甲状腺激素 (TSH)	0.03mIU/L	0.25—324mIU/L	单克隆抗体、双位点夹心法
甲状腺素 (T ₄)	1.0nmol/L	10—300nmol/L	竞争法
三碘甲腺原氨酸 (T ₃)	0.08nmol/L	0.5—10nmol/L	竞争法
皮质醇	5nmol/L	100—2000nmol/L	多克隆抗体、竞争法
睾酮	15fmol/管	—	—
催乳素 (pRL)	0.04μg/L	0.25—250μg/L	二种单克隆抗体、双位点夹心法
卵泡刺激素 (FSH)	0.05IU/L	1—256IU/L	—
人绒毛膜促性腺激素 (hCG)	0.5IU/L	2—10 ⁴ IU/L	二种单克隆抗体、双位点夹心法
促黄体生长素 (LH)	0.12IU/L	0—250IU/L	单克隆抗体、双位点夹心法
地高辛	0.26nmol/L	0.3—5nmol/L	多克隆抗体、竞争法
癌胚抗原 (CEA)	0.2μg/L	1—100μg/L	—
甲胎蛋白 (αFP)	0.1kU/L	1—1000kU/L	单克隆抗体、双位点夹心法
铁蛋白	2.0μg/L	5—450μg/L	多克隆抗体、双位点夹心法
免疫球蛋白 E (IgE)	0.25kU/L	1—1000kU/L	—
性激素结合球蛋白	0.8nmol/L	6.25—200nmol/L	—
先天性梅毒	0.125IU/L	1—250IU/L	—
乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)	0.12ng/样 (二步法)	0.03—2.1μg/L	—
乙型肝炎表面抗体 (HBsAb)	0.2μg/L	—	—

质、肿瘤标志物等测定试剂盒见表1。此外 TrFIA 还可测定病毒抗原：乙型肝炎病毒^[8]、粪便腺病毒、呼吸道融合细胞病毒、(副)流感病毒、还有风疹病毒抗体^[9]、破伤风抗体。酶类：人胰磷脂酶 A₂。还用铈标记代替 ⁵¹Cr 作细胞的标记，应用于测定天然杀伤细胞 (NK)。

一些药物和小分子激素、多肽类，属于半抗原，适用于 TrFIA 竞争法进行测定^[6,10]。简单原理：先将半抗原以共价键形式和蛋白质大分子偶联，制成固相抗原。加入待测样品或标准品，紧接着加入限量 Eu³⁺ 标记抗体。这样，两种抗原同时竞争与抗体结合。经洗涤后，测量结合到固相抗原上的 Eu³⁺ 的量，从标准曲线上查出待测样品的浓度。

一些大分子生物活性物质具有多个决定簇，可产生多个结合位点的多克隆抗体或获得二株以上单克隆抗体。这些抗体不仅用于包被固相材料，而且可作标记稀土元素的抗体 IgG。测定时，通常建立双位点夹心固相免疫分析法。以测定甲胎蛋白 (α FP) 为例：取 1mL (500 mg/L) 的亲合层析纯化的羊抗人 α FP 多克隆抗体 IgG，加入 1:500 克分子浓度的硫代琥珀酰亚胺-6-生物素酰胺己酸盐 (NHS-LC-biotin，溶于二甲基亚砷中)，混匀后，室温反应 1h。反应液对 5L 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液透析。4℃ 保存，临用时，用 Tris-HCl 液按 1:300 稀释。稀土元素标记亲合素制备 (见本文第三部分)。操作步骤：取 20 μ L 标准液或待测样品于包被 α FP 抗体的微孔板中，加 100 μ L 稀释液 37℃ 温育 45 min，洗微孔板二次，加 100 μ L 稀释生物素抗 α FP 抗体。37℃ 温

育 45 min，再洗二次。加 100 μ L Eu³⁺ 链亲合素，于 37℃ 温育 30 min，洗二次，用压缩空气吹干，经 Cyber Fluor 615 时间分辨荧光计 (带分析器)，测量微孔中固相物的荧光强度 (激发波长 337.1 nm，发射波长 615 \pm 5 nm)。

六、小 结

TrFIA 和 TrIFMA 是当代一项最有发展前途的微量分析技术，加之不用同位素、标记试剂稳定，可长期使用，测定时不受样品和自然荧光的干扰，操作时间短，测量速度快 (96 份样品在 10 min 内测完)。应用范围相当广泛，深受生物医学工作者的青睐。最近生物素-亲合素引入 TrFIA，使检测的灵敏度更进一步提高。大量的研究表明，TrFIA 完全可以与 RIA 和 EIA 相媲美，已成为 80 年代生化和生理研究中有可能取代 RIA 的一项技术。国外已生产成套试剂盒，供用户使用。国内也有几个研究单位，正在开展这方面的研究，相信在短期内，这一崭新的配基分析技术将在我国得到广泛普及推广和应用。

参 考 文 献

- 1 Hemmila I *et al.* *Anal Biochem*, 1984; 137: 335
- 2 Pettersson K *et al.* *Clin Chem*, 1983; 29: 60
- 3 Soini E *et al.* *Clin Chem*, 1983; 29: 65
- 4 Dechaud H *et al.* *Clin Chem*, 1986; 32: 1323
- 5 Dahlen P *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 164: 78
- 6 Reichstein E *et al.* *Clin Biochem*, 1989; 22: 23
- 7 Joronen I *et al.* *J Immun Meth*, 1986; 86: 243
- 8 Siitari H *et al.* *Nature*, 1983; 301: 258
- 9 Meurman O *et al.* *J Clin Microbiol*, 1982; 16: 920
- 10 Lovgren T *et al.* *Talanta*, 1984; 31: 909

[本文于 1989 年 6 月 19 日收到]