

文章编号: 1001-098X(2002)05-0213-04

标记免疫分析技术及其进展

庞 华

摘要: 主要介绍了放射免疫分析、酶免疫分析、发光免疫分析及荧光免疫分析的现状 & 近来发展的新技术, 并对标记免疫分析技术的发展趋势及发展前景作了评价。

关键词: 放射免疫分析; 酶免疫分析; 发光免疫分析; 荧光免疫分析

中图分类号: R446.6 **文献标识码:** A

Present situation and progress of labelling immunoassay

PANG Hua

(The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: The study reviews the present situation of radioimmunoassay, enzyme immunoassay, luminescence immunoassay, fluorescence immunoassays, and some recent new techniques, also evaluates the current status of labelling immunoassay.

Key words: radioimmunoassay; enzyme immunoassay; luminescence immunoassay; fluorescence immunoassays

从本质上说, 免疫分析法是一种形式特殊的试剂分析法, 它的起点是抗体成为分析试剂。在免疫分析的发展和应用中, 免疫分析所指的抗体已超出了抗体的原始意义, 它泛指所有与待测分子特异结合的蛋白质分子, 包括免疫球蛋白、受体和其他结合蛋白质。标记免疫分析是指将标记技术与抗原、抗体的免疫化学技术相结合的一类技术, 根据标记物的不同, 标记免疫分析分为RIA(放射免疫分析)、EIA(酶免疫分析法)、LIA(发光免疫分析法)和FIA(荧光免疫分析法)等。

1 放射免疫分析

1959年, 美国科学家Yalow R和Berson SA创立的胰岛素放射免疫分析, 巧妙地将传统的免疫方法与现代标记方法相结合, 在分析中引入放射性核素和竞争分析原理, 使免疫分析从定性变为定量, 从常量分析提高到微量和超微量分析。该技术的精髓一是不直接测量待测物, 而是探测待测物上的标记信号, 利用标记物的放大效应, 改善了待测物的可

测下限; 二是废除了无机或有机试剂, 代之以抗体作为结合试剂, 大大提高了方法的特异性。

放射免疫分析在应用上的优点是准确灵敏、特异性强、仪器试剂价格低廉、技术成熟, 在我国仍将在相当长一段时间内被应用、推广和有所发展。然而, 其在应用上的缺点也是显而易见的, 如药盒的使用寿命短, 批间、批内变异较大, 虽涉及放射性微小, 但仍会面临公众的反核的负面影响。此外, 放射免疫分析较难进行自动化分析, 将面临新一代更灵敏、稳定、快速而且自动化程度高的测量技术的挑战。40年来, 在这一实验原理的基础上发展了一大批新的测量技术^[1]。

2 酶免疫分析

此法的基本原理是在抗体或抗原分子上连接酶分子, 进行免疫反应, 免疫复合物上的酶将特定的底物转化为特定的颜色, 用分光光度计测定, 由颜色的深浅确定待测物的量。因其催化底物可与核素一样起到信息放大作用, 而且减少放射性废物, 曾被认为可以完全取代RIA。但是, 这种依靠比色法或偏振光法的检测技术所受的干扰因素太多(即使是优秀的“管式酶标”, 其试管形状的变化也会影响试验的结果), 其灵敏度和稳定性未能高于RIA,

收稿日期: 2001-12-24

作者简介: 庞华(1973-), 女, 重庆市人, 重庆医科大学附属第一医院(重庆, 400016)硕士研究生, 主要从事临床核医学研究。

审校者: 重庆医科大学附属第一医院 罗 加

因而始终未能替代RIA。此外,EIA一旦将底物显色后,就难于复原,因此是一次性的,难以重复测量,这也是EIA不如RIA之处。

自1974年以来,酶免疫分析已被大量应用于物质测定中,ELISA(酶联免疫吸附分析)是常用测定方法之一,对于小分子物质一般使用竞争抑制法^[2],近年来利用各种放大体系使其灵敏度有很大改进,除常用的底物循环、酶联级放大和生物素-亲和素体系放大等方法外,出现了CARD(催化受体沉积)技术和微颗粒放大技术^[3]等。CARD技术利用酶催化苯酚联结物沉积和生物素-亲和素联结、酶催化放大等技术,可使体系放大200倍以上;而在微颗粒放大技术中,用微颗粒硅胶(直径40 nm左右)作为中间体联结酶和抗体,避免酶和抗体的直接联结,每粒硅胶可联上千个酶分子,使体系增敏。

3 发光免疫分析

发光有物理、化学和生物发光三类,后两类与免疫反应相连得到广泛应用。常用的发光剂为氨基苯二酰肼(异鲁米诺和鲁米诺)和吖啶酯类^[4]。狭义的发光免疫分析,主要指化学发光。

化学发光免疫分析是将标记物改为能产生化学发光的化合物,最后的信号是化学发光的强弱,以代替放射性测量。抗体通常标以小分子吖啶酯,后者具有空间阻碍小,增加标记物的扩散;一秒内完成快速强发光;非靶物质不产生化学发光和37℃温育非平衡期反应等特点。吖啶酯体系的灵敏度与自动化程度较高(此类方法的代表为ACS-180免疫分析仪),但发光时间短,重复性较差。

酶促化学发光免疫分析是酶和化学发光的一种结合,以酶(如:碱性磷酸酶等)标记抗原或抗体、免疫反应后,免疫复合物上的酶作用于发光底物(如:金刚烷等),使其灵敏度有所提高。DPC公司推出的Immulite自动分析仪是此类方法最早被推向市场的代表。最近出现一些新的酶促化学发光技术,如用AMPPD(二氧杂环丁烷)标记,碱性磷酸酶催化氧化,克服了传统发光标记物的固有发光不稳定,反应过程中发生裂变导致结果不稳定等缺陷,使检测更稳定。全自动微粒子化学发光免疫分析仪即采用此发光体系,但由于价格昂贵,目前国内还未广泛推广。

ECL(电化学发光免疫技术)则是近几年发展起

来的一种新技术,它采用电促发光技术,利用稀土元素“钷”进行标记,磁颗粒作B/F分离及电极上的氧化还原反应来进行分析,测定结果十分稳定^[5]。目前商品化的试剂已可测定蛋白、激素等多种物质。

4 荧光免疫分析

荧光免疫分析的方法很多,如荧光偏振免疫分析和现有免疫方法中灵敏度最高的TrFIA(时间分辨荧光免疫分析)等。

TrFIA的测定原理与通常的荧光免疫法不同。所用示踪物不是荧光素,而是采用稀土元素(如:Eu³⁺)标记抗体,利用时间分辨荧光仪特定的延迟一段时间测量,获得Eu³⁺的特异荧光信号,几乎能够完全消除各种非特异性荧光物质的干扰。加之镧系荧光的发射光波峰窄,有利于进一步降低本底。此外,单位分子的镧系粒子所释放的荧光信号远远超过¹²⁵I原子所释放的信号,所以探测的灵敏度赶上并超过了放免分析,实现了分析方法灵敏度的突破,灵敏度可高达10⁻¹⁰mol/L^[6]。

与RIA和EIA相比,TrFIA具有更好的特异性和精密性^[7,8],因标记物具有制备简便、稳定性好、没有放射自分解、半衰期短和易防护等特点,故问世时间虽短,发展却十分迅速,成为当代配基结合分析中最有发展前途的一项超微量检测手段。

在仪器方面,由于采用了较为简单的氮分子激发器作为激发源,使得时间分辨仪甚至比普通荧光仪更为廉价和实用。芬兰Wallac公司生产的半自动、全自动和普及型的分析仪(1420、1235、any test),可测定40余个项目。国内也已研制出样机和10余种药盒,并已用此技术作DNA分析。

5 标记免疫分析的发展趋势

在标记免疫分析的几种方法中,RIA是第一个定量方法。RIA准确而灵敏,然而在实际应用上的缺点也是同样明显的,因此从其诞生之日起,研究工作者就开始寻找可以取代它的新方法。EIA最先发起挑战,终于在进入20世纪80年代后首次占据主导地位。但该法所受干扰因素太多,其灵敏度和稳定性始终未能高于RIA。FIA在建立TrFIA后有了飞跃性发展,占目前工作量的10%~15%,由于其最大限度地提高了测定方法的灵敏度,有可能成为未来广泛应用的方法。非放射标记免疫分析的另一手

段发光免疫分析法,它始终维持了在免疫分析中的位置,每年约占5%的工作量。目前,标记免疫分析发展趋势有以下几个方面:

5.1 抗体

抗体是标记免疫分析的最重要试剂,近年来,通过现代基因工程技术对抗体进行改造而产生的抗独特型抗体开始受到广泛关注。抗独特型抗体的结合反应性质类似抗原,可在实验中代替固相上的抗原,当抗原不易获得、过于昂贵或分子质量过小时尤为适用。而双特异性抗体的特点是一端结合待测的抗原,另一端则结合标记物,如酶等,因此双特异性抗体就是一个单价的前标记抗体。由于省略了标记的过程及消除了标记带来的种种弊端,双特异性抗体分析有明显的优点和巨大的应用潜力。目前有将此抗体应用于 β_2 -微球蛋白、促甲状腺激素、乳铁传递蛋白、癌胚抗原等检测的报道。

5.2 标记方法

提高分析灵敏度的一个有效方法是增加抗体(或抗原)的标记率。小分子探针不存在空阻效应,因而多重标记法可以获得更高的标记率,尤其是螯系螯合物探针,由于没有有机荧光分子的多重标记荧光猝灭现象,加上多重标记荧光增强效应,可以获得1000~10000倍的荧光增强。在诸多方法中,以生物素-亲和素反应的方法倍受推崇。

TrFIA的一次螯合固相分析系统则是用一种新型螯合剂BCPDA(4,7-双(氯磺酰基苯基)-1,10-菲咯啉-2,9-二羧酸)把链霉亲和素与镧系元素连接,作为通用试剂,再把抗体与已被活化的生物素结合起来,形成一种高特异性、高灵敏度和高稳定性的标记系统^[9]。

5.3 多元标记免疫分析

多元标记免疫分析技术是免疫分析领域研究的热点之一。它不仅解决了人们向往已久的灵敏度高、操作简便、样本处理快捷等问题,而且实现了一个样本一次可同时测定多种抗原或抗体的目的,具有省时、省力、省试剂、省血样的优点。从理论上讲,此法可以同时检测106个分析物,灵敏度可达 10^{-15} mol/L。

多标记TrFIA法是迄今最理想、最有前途的多标记分析方法,已有同时应用四种镧系元素的标记免疫分析出现,用来测定TSH(促甲状腺激素),17- α -HP(17- α -羟孕酮),IRT(免疫反应性胰蛋白酶)以

及CK-MM(肌型肌酸激酶同功酶)^[10]。用这种方法可以从新生儿少量的血样中同时查出四个有价值的指标,使新生儿的先天性疾病如甲低、囊性纤维化、肾上腺增生等的早期筛选成为现实。

5.4 标记免疫分析的自动化

自动化标记免疫分析的优势在于干扰因素少、结果判断更加准确,也便于进行质量控制;分析快速,便于及时将各种信息向临床反馈;又可节约大量的人力物力,利于大批量样品的测定。目前一些大的实验室、标本量大的项目,正逐步过渡到应用非放射标记免疫分析的自动化设备来进行分析,这是现代技术发展的一种趋势。但是,自动化标记免疫分析仍存在若干问题,如自动化研究远较自动化生化分析困难、复杂,其仪器的研制及使用过程中的保养需大量投资,且试剂不稳定,随机药盒价格昂贵等。

随着单克隆抗体、基因重组、新材料合成、电子计算机自动化等各项技术的同步发展和相互渗透,标记免疫分析技术的发展前景更为广阔。

(1)标记免疫分析技术日趋完善,非放射标记免疫分析技术的产生是放射免疫技术的发展和衍生。放射免疫技术和非放射免疫技术将长期共存一段相当长的时间。

(2)非放射标记免疫分析需要一定的财政投入,且全面应用时病人开支增加,而放射免疫技术由于成本低、灵敏度高、技术成熟,在我国尤其是中小城市和乡村,有继续存在并发挥作用的较大空间。

(3)非放射标记免疫分析技术也存在逐步完善和发展的过程,某些不适应的技术将被淘汰,其中一些甚至比放射免疫淘汰得早。

(4)为了学科的发展和在市场经济中发挥优势,有条件和需要的单位应尽快开展非放射标记免疫分析技术。

参考文献:

- [1] Hage DS. Immunoassays[J]. Anal-Chem, 1999, 71(12): 294R-304R.
- [2] 李金明. 小分子物质酶免疫测定方法的研究进展[J]. 国外医学·临床生物化学与检验学分册, 1995, 16(2): 50-52.
- [3] 王刚焱, 何凤生, 荣康泰. 农药免疫分析方法进展[J]. 国外医学·卫生学分册, 1998, 25(5): 301-304.
- [4] Baeyens WR, Schuiman SG, Calokerions AC. Chemiluminescence-based detection: principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays[J]. J Pharm

- Biomed Anal, 1998, 17(6-7): 941-953.
- [5] Warsinke A, Benkert A, Scheller FW. Electrochemical immunoassays[J]. Fresenius J Anal Chem, 2000, 366(6-7): 622-634.
- [6] Wu FB, Han SQ, He YF. Time-resolved immunofluorometry of serum hTSH with enhanced sensitivity[J]. J Immunoassay Immunochem, 2002, 23(2): 191-210.
- [7] Bacigalupo MA, Ius A, Meroni C. Comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and immunoenzymometric assay for clenbuterol[J]. Analyst, 1995, 120(8): 2269-2271.
- [8] Maple PA, Jones CS, Andrews NJ. Time resolved fluorometric immunoassay, using europium labelled antihuman IgG, for the detection of human tetanus antitoxin in serum [J]. J Clin Pathol, 2001, 54(10): 812-815.
- [9] Ruedl C. A novel and sensitive method for the detection of secreted cell products using time-resolved fluorescence[J]. J Immunol Methods, 1994, 168: 61.
- [10] Diamandis E. Multiple labelling and time-resolvable fluorophores. Clin Chem, 1991, 37: 1486-1491.

文章编号: 1001-098X(2002)05-0216-04

MIBG及其衍生物的研究进展

罗全勇

摘要: MIBG (间碘苄胍) 是神经递质去甲肾上腺素的功能性类似物, 其转运、滞留与释放机制均与去甲肾上腺素相似。放射性核素标记的MIBG及其衍生物既可用于嗜铬细胞瘤、神经母细胞瘤等神经嵴起源肿瘤的诊断与治疗, 也可用于心肌交感神经显像, 评估心肌交感神经元的完整性与功能。

关键词: 间碘苄胍; 神经内分泌肿瘤; 嗜铬细胞瘤; 神经母细胞瘤; 心肌交感神经

中图分类号: R594.8 **文献标识码:** A

The recent research progress of MIBG and its derivatives

LUO Quan-yong

(Department of Nuclear Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Abstract: MIBG (metaiodobenzylguanidine) is a functional analog of the neurotransmitter norepinephrine. It is transported, stored and released by a mechanism similar to that of norepinephrine. MIBG and its derivatives are useful radiopharmaceutical for the clinical scintigraphy and treatment of neural crest tumors such as pheochromocytoma and neuroblastoma. Also it is applicable for myocardial imaging in evaluating the integrity and function of myocardial presynapse sympathetic neuron.

Key words: metaiodobenzylguanidine; neuroendocrine tumor; pheochromocytoma; neuroblastoma; myocardial sympathetic

放射性碘标记的MIBG(间碘苄胍)不管是用于

神经内分泌肿瘤的诊断和治疗, 还是用于心肌交感神经显像, 都有着重要的临床应用价值。近年来, 一系列不同核素标记的MIBG及其衍生物的成功研制, 使MIBG类放射性药物的临床应用日益广泛。

收稿日期: 2001-03-16

作者简介: 罗全勇 (1972-), 男, 四川隆昌人, 上海市第六人民医院, 上海交通大学附属第六人民医院核医学科 (上海, 200233) 主治医师, 医学硕士, 主要从事核素诊断与治疗的研究。

审校者: 上海市第六人民医院, 上海交通大学附属第六人民医院核医学科 朱瑞森

1 MIBG及其衍生物的标记进展

1.1 放射性卤素标记物