

放射免疫分析技术自动化现状及展望

解放军总医院 陈素娟 王永强综述 李振甲审

提 要: 目前, 自动化免疫分析在临床实验室常规应用中远不及自动生物化学分析那样普及, 其主要原因是由于仪器复杂, 试剂不稳定以及放射性同位素的半衰期及废物处理等问题的限制。自从非同位素免疫分析进入临床实验室以来, 从根本上克服了RIA的缺点, 并将最终取代RIA。

1983年, Witherpoon^[1]曾在《免疫分析——将来还有核医学的地位吗?》一文中指出, 今后免疫分析技术的进展方向有可能包括使用固相和免疫计量分析(Immuno-metric Assay)及采用均相(Homogeneous)自动化分析系统, 而目前自动免疫分析在临床实验室常规应用中远不及自动生物化学分析那样普及。造成这种状态有诸多因素, 如果回顾这领域的历史概况, 那么对认识目前生物医学研究以及此领域的进展前景, 将会有更进一步的提高。

一、放射免疫测定的历史

早在30多年前就已建立了放射免疫测定方法(Radioimmunoassay, RIA), 而直到七十年代初期才开始免疫试剂盒的生产。最初的商品化免疫测定是手工操作, 大部份采用¹²⁵I作为放射性标记, 紧接着出现了抗体包被试管等固相材料, 这种最初固相结合剂的应用, 避免了免疫测定中所需的离心步骤, 即可将B、F相分开, 这种方法称之为免疫放射分析(Immunoradiometric assay IRMA)。因其操作简便, 利于自动化测量^[2], 为临床实验室RIA应用自动化奠定了基础。

早在RIA方法建立之前, 许多激素或活性物质的测定, 如FSH, HCG等采用的是经典的生物测定法。这种方法灵敏度不高, 受多种因素干扰。自RIA问世后, 人们将它看作是超微量分析技术的一项重大突破, 有

人提出是生化分析上的一场革命。这种方法不需巨额投资, 操作简单、方便易行, 而方法的灵敏度极高, 是以往定量分析难以比拟的; 且试剂比较便宜, 容易制备, 一般实验室均能开展, 尤其是单克隆抗体的应用, 提高了RIA特异性, 降低了非特异结合, 大大拓宽了RIA的应用范围, 使IRMA得到了发展。

随着科学技术研究的进展, 技术方法日臻完善, 到了70年代后期、80年代中叶, RIA药盒的品种不断扩大, 包括小分子半抗原的激素类, 大分子的蛋白类以及病毒, 药物等数百种物质^[3], 为临床的诊断^[4]和研究工作提供了很大的方便, 但工作量之大又给人们增加了许多困难^[5]。此时, 许多厂家开始涉足于RIA的自动化仪器的研究。用户面临着是采用自动化还是继续手工操作的抉择。

二、自动化发展的若干问题

自动化的应用可提高工作效率和质量控制的可靠性, 节省了大量的人力和物力^[6]。但由于免疫分析的复杂性及其试剂的不稳定性, 就其分析技术的建立以及自动化研制本身而言, 较之常规的自动化生物化学分析更为困难。主要表现以下方面: 仪器研制方面需大量投资, 仪器本身结构又较复杂。许多部件需要净化、清洗、维修, 所以要想进行连续的高质量测定是困难的。况且, 有些仪器要求必须订购随机药盒, 价格昂贵, 这样

就更限制了自动化分析的发展和推广。

与此同时,实验室的工作人员和厂家都清楚地意识到RIA本身存在的不利因素:与RIA有关的放射性同位素的半衰期以及废物处理的场地与费用问题,都急待需要解决。人们需要选择一种非同位素免疫试验代替RIA。但是这种转化又必须具备:非同位素实验必须与同位素实验价格相当,质量可靠,操作简便,才易被人们接受。于是科学家们将精力集中在了酶免疫分析、发光免疫分析、时间分辨荧光免疫分析等有可能取代RIA新方法的研制上^[7]。

大多数人认为:方法学的革新较自动化分析更重要。现在缺少的不是人力,而是更简便更容易为人们所接受的对人无害的方法。

三、非同位素免疫分析与自动化

自1974年非同位素免疫分析进入临床实验室以来,以其前所未有的增长率不断地发展,其优点正是从根本上克服了RIA的缺点:放射性同位素材料的管理,废物的处理,同位素半衰期等诸多因素,使得非同位素免疫分析的应用成为可能^[8]。这种测定方法比已有的RIA分析有更多的发展渠道可供选择。试验可采用异相或均相。示踪监测可采用多种方法中的任何一种(即荧光、比色、比浊、电位、化学发光等等)。

均相非同位素试验为免疫测定提供了广阔前景,该方法简便、快速、灵敏度高,可以达到RIA水平,特别适合临床药物的监测。由于均相免疫分析不需要分离B、F相,所以易于实现自动化。Rubenstein和Christia^[9]对这种不需分离的酶荧光均相免疫分析作过报道,并评价了仪器的自动分析系统,该方法能够自动化是其突出优点,造价低廉,而且更简便、快速。当然,一旦实验采用自动化,不管方法简单还是复杂,不管均相测定还是异相测定,对所有操作者

来讲都一样容易。

四、自动化现状

厂家设计和出售自动化仪器的原则是满足用户的要求。然而,厂家与用户之间的要求毕竟有着明显的区别:操作者希望非同位素的实验费用(仪器、劳力与试剂)能降到与RIA同等或更低水平;而发展自动化系统对机器制造商来讲,面临不少技术上的困难,如检测仪和读数仪的敏感度、机器的可靠性、储存曲线的能力、质量控制、诊断以及数据储存的线性关系、试剂的稳定性等,要想同时满足以上参数,则需极高代价,且厂家感兴趣的是设计自动分析仪并配备特殊试剂,以便以这种方式控制市场,确保能赚回他们发展这个系统的费用。

其实,自动化测定同时也顺应了免疫分析发展的方向。如固相IRMA比RIA更适合于自动化,其快速动力学允许用非平衡反应而不产生明显的结果漂移,再配以非离心分离技术,就可建立能处理大批量样品、使用也方便的自动化系统。

分析方法的简便与否,很大程度上取决于游离及固相结合部份的分离方法。包被抗体的试管、小珠或微量滴定板常用反复洗涤的办法,当样品多时较麻烦,增加了手工操作的步骤^[10]。近年来使用了磁性颗粒,它在外加磁场内能沉降,但仍需洗涤固相。蔗糖分层法可克服上述困难^[11、12]。这些当然是对手工操作者而言。最近,有的厂家已研制出自动洗涤器,大大提高了工作效率。因此,自动化后选择固相的着眼点就放到了提高物理吸附或化学偶联及提高方法灵敏度等问题上,方法的简便与否已不再是判断方法的优劣指标之一了。

五、自动化与分析仪器

免疫分析测定自动化分为两部份:一是数据处理的自动化,二是加样仪和测量的自

动化。自动化数据处理系统已被国内外厂家广泛用在测量仪上,多采用Logit线性,3/2线性回归,样条函数,概率单位和正切等^[13、14]。带式 and 链条式自动测量已相当普及。这里所谈的自动化主要针对加样仪的自动化问题。

国外市场能见到的全自动免疫分析处理机有Baxter-Dade Stratus; Abbott Tdx; Dupont acd等。瑞士 Tecan 公司专以研究生产用于实验室全自动加样、配液的各种精密仪器著称。近几年来,我国已引进了 Tecan 500系列全自动加样仪和400系列精密稀释配液仪近50余台。Tecan 500系列全自动加样仪提供全自动吸样、加样、稀释、系列稀释和混合制剂等多种功能。使用IBM(或其它相应的)电子计算机控制,使任何液体试样的配制达到全自动、高精度、省时省力以及防止有传染的血样和试剂(例如乙肝等患者样品)对操作者的污染,以确保安全。该仪器使用范围广泛,由于程序可自行编制,故任何试剂吸配工作皆可由电脑语言编后自动进行。

展 望

在自动化免疫分析仪常规应用之前,首先必须了解它的精密度和效率。其次要知道仪器本身所受的局限性。针对这两种情况再考虑人们的主观意愿和推动免疫分析技术发展的潜力。

纵观免疫分析的发展方向,非放射性免疫分析技术最终将取代RIA,因为这类分析技术不使用放射性核素标记,故没有辐射防护、环境污染和标记物衰变等问题,从而深受生物医学研究人员和临床检验师的欢迎。以时间分辨荧光免疫分析为例,基本原理和RIA相同,标记物可稳定贮存,而方法的灵敏度却比RIA高2~3个数量级,若再配以加样、温育、洗涤、测量、结果分析的全面自动化,则可使免疫分析在该领域内达到理

想的境地。那么,免疫分析将成为普遍的、勿需高技术人员操作的实验室研究和临床诊断手段,人们不再担心放射性的污染和危害。不必手工进行大批量样品测量的重复性劳动,象许多生物化学分析仪一样,必将以微型电子计算机的操纵代替一切手工操作。

总而言之,免疫分析领域的自动化尽管目前由于受各种因素的影响尚未普及,但随着免疫分析技术的不断更新,方法的日趋成熟和进一步的完善,免疫分析的全自动化指日可待。

参 考 文 献

1. Wiitersoon LR; J Nucl Med 1983, 24: 952
2. 陈泮藻,李振甲; 中华核医学杂志 1986, 6(3):167
3. Yalow RS; 中华核医学杂志 1989, 1: 1
4. Rosemary PC; Clin Immunoassay 1988, 11:69
5. Jennings RS, et al; In "Alternative Immunoassay" 1985, p59. John Wilen Sons. New York
6. Thomson R, et al; In "Radioimmunoassay in Clinical Biochemistry" 1975, p203
7. Soini E, et al; Clin Chem 1983, 29:65
8. Weeks I, et al; Clin Chem 1983, 29: 1474
9. Rubenstein KE, et al; Biochem Biophys Res 1972, 47: 846
10. O'Connell JP, et al; Clin Chem 1985, 31: 1426
11. Baker TS, et al; In "Alternative Immunoassays" 1985, p59
12. Wilfrid R. BUTT; In "Practical Immunoassay" 1984, p71 Marcel Dekker, Inc 270 Madison Avenue, New York, New York 10016
13. 王隼,陆坤元; 中华核医学杂志 1982, 2: 2
14. Jaarsma D; Computer Aided Radioimmunoassay 1978, p613