

放免分析中的固相抗体系统

南京医学院第一附属医院核医学科 秦秋平综述

中国医学科学院放射医学研究所 林 汉审

自从Wide^[1]把固相首先引入放免分析以来,已有二十几个年头了,在此期间,有关固相的研究不断取得进展。现在,固相系统因其制备简单、成本低、无需离心、操作方便等优点倍受青睐,国际上许多著名的商业公司出售的放免药盒也有不少就是以固相系统为基础的,本文就这方面的进展作一综述。

一、分 类

放免中的固相系统实为固相抗体系统,因为固相抗原在放免中几乎不被使用(但它却可在其他的免疫分析中广为运用,如酶免疫分析和荧光免疫分析等)。固相抗体系统是指抗体通过物理吸附或共价偶联与固相基质相连后参与到免疫反应中所形成的一种体系。按其抗体的特性,可分为固相一抗系统^[2,3]和固相二抗系统^[4,5]。用于固相的抗体可以是多克隆抗体,也可以为单克隆抗体^[6]。根据抗体所连的固相基质的化学性质,又可分为纤维素多糖类和塑料类固相系统,前者包括纤维素、琼脂糖、葡聚糖等,后者包括聚苯乙烯、聚乙烯等。就固相基质在物理性状上的差别,又可分为颗粒固相基质和表面固相基质系统,前者如微晶纤维素^[7]、羟基微球^[5]、Sephadex、Sephacryl等^[2],后者有塑料管、塑料小珠^[8]和塑料微滴板^[9]等。

二、表面固相抗体系统

抗体固定在由聚苯乙烯或聚乙烯等制成的免疫反应管、小珠(直径为6 mm)、微滴板的表面,样品或标准品和标记物加入其

中,温育反应一定时间后,倒出管、板内的液体,洗涤后即可计数管子、小珠或板上的放射性。该系统中,抗体绝大多数是通过物理吸附固定到固相基质上的,用过的管子或小珠经盐酸、洗衣粉和超声洗涤后可重复使用^[10]。

这种固相管或珠的批间变异难以精确控制,同一厂商的不同批管子或珠子的吸附性不一样。抗体包被管或珠的缺点是①对一些高分子量的分析物,由于空间位阻的影响,使分析的灵敏度可能下降;②抗体消耗量较液相抗体系统大。但是,这种系统的操作十分简便,无需离心,因此误差小,NSB(非特异性结合)值低。NSB值是限制标记抗原分析(RIA),特别是标记抗体分析(IRMA)工作范围的一个重要因素,固相抗体系统的低NSB值,使RIA和IRMA能发挥出潜在的优势。

三、颗粒固相抗体系统

最常用的固相支持基质是纤维素、Sephadex、Sephacryl等。该系统中抗体全是通过化学偶联的方法连接到固相基质上的。这类固相基质可进一步分为①分析时无需振摇便以悬液形式存在的细颗粒,如微孔玻璃、微晶纤维素、羟基微球等。由此建立的固相系统温育反应后,需要离心去上清后才能计数放射性;②分析时需机械振摇混合的较大颗粒,如纤维素、Sephadex、Sephacryl等。由此建立的固相系统温育反应时需不断振摇混合,温育后的沉淀物常常因为很松散而不能满意地倒出。若温育后加一层10%的蔗糖,则无

需离心就能很好地沉降下来,吸去上清,计数沉降的放射性^[11]。此技术因其可以有效地洗涤固相颗粒,使颗粒上所含的游离部分降低,故而系统的NSB值很低,分析的精度很高。

第二类颗粒固相基质的特例是抗体与磁性颗粒偶联^[12]。通常使用纤维素包裹的三氧化二铁,这些颗粒被碾成直径为5~10 μ m的均一微粒,要求其在重力场中缓慢沉降,但在磁场中沉降很快。这种系统也能避开离心。抗体经化学偶联法连接到磁性颗粒上,在旋转振摇的条件下,与抗原、标记物进行温育,反应结束后将试管架放在特制的磁板上,静置5分钟后,倾去上清,测管内磁性颗粒放射性。

四、固相二抗系统^[4,5]

将第二抗体与固相颗粒基质相连,能克服使用一抗偶联的固相系统的某些不足,如空间位阻等,同时又保留了固相系统的优点,如低的NSB值。在固相二抗系统中,抗原与第一抗体之间的反应是处于液相中的,所以,避免了一抗与固相偶联后的抗原抗体的低反应动力学问题。此外,分析中固相二抗的加入是过量的,这就使得二抗与一抗的结合反应能够在短时间内完成,同时也降低了操作误差。固相二抗可以通过离心或蔗糖薄层技术或磁性分离技术与游离的标记物分开,然后测定固相二抗上的放射性。

五、固相基质与抗体的联结方法

1. 物理吸附

可以应用此法的固相基质通常是疏水性的聚苯乙烯或聚乙烯、聚丙烯等塑料做成的管子和小珠等。在碱性条件下,它们能比较稳定地吸附蛋白质,可将抗体直接吸附在这些固相表面。具体步骤为:将抗体溶于pH 9.6、0.05mol/L的碳酸盐缓冲液中,然后用此溶液来包被小珠或小管。把小珠浸泡于

这种包被液中,37℃温育1小时后4℃过夜,经PBS-Tween 20洗涤3次,除去非特异性吸附后,以0.5%BSA或0.5%Gelatin 37℃、1.5小时封闭剩余的未结合的活化基,再经PBST洗涤3次后便可应用或放置4℃,干燥保存待用。包被管子时,将溶有抗体的包被液以一定量加入每个管中,37℃温育1小时后转置4℃过夜,以下操作同上。

影响抗体吸附到疏水的固相基质上的因素有pH、温度、蛋白浓度和乙醇等^[8]。若固相基质在包被之前先用无水乙醇温育15分钟,发现能使固相基质具有良好的吸附性,并且这种特性至少能保持一个月的时间。天然的抗体在pH>7时对固相的吸附较pH<7时的吸附大,而经酸性(pH3.5)预处理的抗体在pH7.0时对固相基质的吸附最大,其原因是这种处理能部分地使抗体Fc部分变性,增加了IgG分子的疏水性,从而使固、液相接触面的吸附易于进行,此时抗体的Fab部分朝向液相,有利于免疫反应。另外,包被反应是温度依赖性的,其最适温度为37℃,且发现室温包被至少需20小时才能和37℃、1小时相匹配。如果在包被后的洗液中加入低浓度Tween20(0.5%),则可大大降低固相表面的非特异性吸附。在以上的诸因素中,包被液中的蛋白浓度最为重要。一般对抗体而言,最适浓度是3mg/L。在包被管子时,如果IgG包被浓度在1 μ g/管以上时,吸附没有差异;当包被浓度低于0.5 μ g/管时,则不足以有效地结合抗原^[13]。小珠的包被以5 μ g/珠最好,不过2 μ g/珠也可使用。从小珠和管子的包被效果看,小珠易于操作,但重复性不如管子好,原因是反应试剂难于到达小珠的下半面。因此,在国外包被管子是最易接受的^[13],然而国内的报道恰恰相反^[14],其不一致的原因可能与材料的制作工艺有关。

最近,Causse等^[15]报道了一种将抗体共价偶联在塑料管壁上的新方法,他们在聚

苯乙烯塑料管内壁先涂上一层苯乙烯-马来酸酐共聚物膜。其制法很简单：在不同比例的苯乙烯和马来酸酐的溶液中加入苯甲酰过氧化物，在水浴中加热到85℃，反应开始后立即转移到冰浴中冷却，生成的共聚物以3 ml丙酮/克共聚物溶解，并以硝基丙酮溶液在旋转混合下缓慢稀释，直至有轻微的混浊出现为止。用此溶液1ml加入管内，然后快速吸去液体，室温下吹干。这种涂了膜的管子被称为活化管，是透明的。向活化管内加入抗体，这时抗体上的氨基能与膜上的马来酸迅速反应，通过共价键的形成使抗体固定在管内壁。这种管子的最大优点是抗体在管壁上的反应时间很短，而且稳定，分析的重复性很好。

2. 化学偶联

将抗体共价连结到亲水性的固相基质上的方法有溴化氰活化法、羰基二咪唑活化法、重氮化法、戊二醛法和过碘酸盐氧化法等。这些方法在技术上不太复杂，这里仅对用得最多的溴化氰活化法和过碘酸盐氧化法作一介绍。

a. 溴化氰活化法^[3,16]。原理：多糖类基质在碱性条件下经过溴化氰的活化，产生活性的亚胺基，后者在中性或微碱性的水溶液中能与蛋白质或多肽的氨基共价偶联。具体步骤：一定量的溴化氰溶于pH10的0.1 mol/L硼酸缓冲液中，此步骤将释出有毒气体，故需在通风柜中进行，加入要活化的、悬浮在pH10、0.1mol/L硼酸缓冲液中的纤维素或多糖，5℃下维持pH在10.4~10.8间约30分钟，离心去上清液，沉淀经pH8.5、0.1mol/LNaHCO₃缓冲液洗涤完成活化过程。然后将抗体溶于pH8.5、0.1mol/L的NaHCO₃缓冲液中，加入活化的纤维素或多糖，室温下旋转混合24小时，离心去上清液。沉淀经碳酸盐缓冲液洗涤数次后，以5%的甘氨酸或1%BSA封闭剩余活化基，再以pH4.1、0.1mol/L的醋酸盐缓冲液洗

涤一次，最后以pH7.4的PBS洗涤3次，并悬浮于该液中待用。

b. 过碘酸盐氧化法^[2,17]。原理：纤维素或多糖类基质经过过碘酸盐氧化后，产生的活性醛基能与蛋白质或肽的氨基共价相连。具体步骤：将经去离子水充分溶胀的纤维素或多糖类悬浮在50mlpH5.0、0.1mol/L的醋酸盐缓冲液中，该缓冲液内含有5 mmol/L的偏过碘酸钠盐，能够使纤维素或多糖类基质氧化。室温下旋转混合1小时，加入10% (V/V) 的甘油，旋转混合1小时，去除剩余的过碘酸盐，再以pH9.0、0.1 mol/L碳酸盐缓冲液洗涤数次。然后将抗体溶于pH9.0、0.1mol/L碳酸盐缓冲液中，加入活化的纤维素或多糖，约8~11mg抗体/ml纤维素或多糖胶，室温下旋转混合16小时，用烧结玻璃移去未偶合的抗体。偶合上抗体的纤维素或多糖胶悬于50mmol/L pH为7.5的PBS中，沉降30分钟后去除上清液上的细小颗粒。再悬于PBS中，加入固体硼氢化钠，室温下旋转混合30分钟，还原未反应的活化醛基。然后以PBS洗涤数遍，再用含1%Tween20的PBS洗涤5次，并悬浮于该液中待用。

这里需指出的是，虽然溴化氰活化法已广为应用，但由于溴化氰是一种高毒物质，用它活化时会释出毒性气体，故不适合在实验室内大量制备。

六、固相基质的选择条件

一个理想的固相基质必须满足以下条件：①固相基质必须有结合足够抗体的容量，使其能够在可能广泛的范围内结合标记的抗原抗体复合物；②若使用多孔的多糖胶如Sephadex、Sephacrose等，孔径不仅应当大得足以容纳偶联的抗体，而且也应当大得足以接纳标记的抗原抗体复合物；③固相必须易于分离；④固相必须具有低的非特异结合标记物的性质。

七、结束语

综上所述,含有固相抗体系统的放免分析具有简单、快速、操作方便等优点,因此很受欢迎。固相抗体系统的制备在技术上都很简单,易于掌握。物理吸附由于是非共价键连结,因此在某些情况下,结果缺乏好的重复性;化学偶联涉及抗体分子与固相基质之间的共价键合反应,因此不易从固相上解离出来,具有精确的包被条件,重复性良好。但应该注意不论物理吸附还是化学偶联,都可能遇到这样一些问题,即需要高滴度的抗血清,某些包被的抗体亲合力减低,甚至丧失免疫反应性等等^[18]。所以,需要仔细摸索才能建立一个好的固相放免系统。

参考文献

1. Wide L, et al; *Biochim Biophys Acta* 1966, 130:257
2. Wright JF, et al; *J Immunol Meth* 1982, 48:311
3. Johansen L, et al; *J Immunol Meth* 1983, 59:155
4. Jury DR, et al; *Clin Chim Acta* 1985, 148:63

5. 沈荣森,等:生物化学与生物物理进展 1988, 15:54
6. Schramm W, et al; *Clin Chem* 1987, 33:1331
7. 张敬礼,等:放射免疫学杂志 1991, 4:76
8. Kakabakos SE, et al; *Clin Chem* 1990, 36:492
9. Schramm W, et al; *Clin Chem* 1990, 36:509
10. 陈素娟,等:放射免疫学杂志 1990, 3:12
11. Butt WR, in "Practical Immunoassay" (Butt WR, eds.) Marcel Dekker Inc. New York, 1984, P11
12. 李振甲:中华核医学杂志 1990, 10:185
13. Cheng PJ, et al; *J Immunol Meth* 1982, 48:159
14. 王永强:研究生论文(中国协和医科大学研究生院)1989, P22
15. Causse JE, et al; *Clin Chem* 1990, 36:525
16. Porth J, et al; *Nature* 1967, 215:1491
17. Sanderson, CJ et al; *Immunology* 1971, 20:1061
18. Bolton AE, et al, in "Hand book of Experimental Immunology Volume I, Immunochemistry" (Weir DM, eds.) Blackwell Scientific Publications Inc, California 1986, P26

(上接封四)

yi 医学 67
 医学肿瘤学——发展趋势 97
 胰岛素——副作用 142
 遗传性疾病 5
 乙种球蛋白 213
 镭 143 191 诊断应用 240
 阴离子 171 68
 吲哚辛——药理学 117
 you 髓类 168 分析 170
 yun 运动试验 142

Z

zao 造影剂 181
 造血干细胞——辐射效应 118

造血系统 117
 zeng 增生——放射性核素成像 192
 zhen 诊断 67
 zhi 直肠肿瘤——放射性核素成像 141
 植物——生物效应 262
 致癌基因 118
 zhong 中子活化分析——方法 270
 肿瘤——放射性核素成像 240 48 172
 192 放射疗法 121 病理学 73
 肿瘤转移——放射疗法 144
 肿瘤,放射引致 207 210 216 218
 219
 zi 自身抗体 143
 zu 组织相容抗原 213