

免疫分析方法学的十年进展(续)

Gosling JP

有趣的发展和精细的改进

双分析法

用免疫分析法同时测定几种临床有关的分析物具有明显的潜在优势,特别是如果在正常情况下,每个单独的分析物的测定复杂而耗时。利用多道闪烁计数器同时对具有不同发射光谱的二种放射性同位素进行计数是一种很好的方法。在最初试验中,分别用 ^{125}I 和 ^{131}I 对三碘甲状腺原氨酸和甲状腺激素进行标记。用 ^{57}Co 和 ^{125}I 可用于促黄体激素和促滤泡素,甲状腺素和促甲状腺素的同时分析。另一种,也许效率低而且需要有关仪器,是用两种完全不同的标记物,如酶标(碱性磷酸酶)和 ^{125}I ,来测定IgA-结合 α -微球蛋白。同时测定三碘甲状腺原氨酸和甲状腺素的双竞争酶免疫分析法也已建立,其中 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶分别用来标记半抗原。此外,分别用 ^{3+}Eu 和 ^{3+}Tb 的双标时间-分辨免疫荧光法同时测量血清中促黄体激素和促滤泡素。双分析物胶乳凝集试验和三分析物放大的流式细胞免疫分析也已有报道。

分析程序的进展

“程序”的含意是进行分析的外环境的组合;试剂的性质、状态(固相等)和浓度;设备的型号和精密程度。因此,一种特殊形式的分析法(如某种抗原的固相、双位夹心ELISA用于酶标记和呈色分析)就可以许多不同的程序安排而适应不同的应用。用微量滴度孔板作为固相,是一种“高性能”的实验室分析法,而使用膜作为固相和用不可溶生色剂作为酶反应产物,则适用于随到随做的妊娠试验。

HCG的ELISA系统先将抗体成环形固化在尼龙膜上,该尼龙膜与一吸收层相接触,当样品和所有试剂依次穿过膜时,很快为吸收层吸收,5分钟之内,具有固相酶的参考区显色。如试验结果为阳性,则环状试验区也显色。颗粒浓缩荧光免疫分析法是免疫荧光分析法在特殊设计的96孔井板上进行的,该板具有多孔膜形成每个孔底,由小的聚苯乙烯颗粒作为固相,用一台特殊仪器加试剂,混合和去掉溶剂,用表面荧光术对浓缩在2mm直径的滤膜上的全部荧光颗粒进行测定。结合的信号很少丢失。抗体和血清免疫球蛋白测定的变异也有报道。

新型均相分析系统

均相免疫分析系统就浓度在 $\mu\text{mol/L}$ (ng/L)的治疗药物和非蛋白激素的定量而言,是最有效的,然而人们却大力开发了具有更低检测极限的适合蛋白质检定的系统,使用方便且易于自动化。

通常认为,放射性同位素标记物很难应用于均相分析。有一种真正的“无分离”的RIA,包被有抗体的微粒含有一种能减弱 ^{125}I 标记抗原 γ 射线的物质,结果仅能以20%的 ^{125}I 测量效率测得结合抗原。闪烁贴近免疫分析法(SPA)将抗体固定于荧光微球,从而抗体结合的(而不是游离的)放射性标记抗原/半抗原就能有效地引发闪烁光,这样既省了分离步骤,也不需闪烁液,其步骤与一般RIA完全相同,且无论半抗原或蛋白质均可测定。

Glad和Grubb最早测定了C-反应蛋白的免疫毛细迁移系统,实际是一种“夹心”ELISA的多步改装品。Zuk等又建立了把分析物的抗体固定于纤维素条上的类似系统。

新的均相酶免疫分析系统在发展中采用了多种办法。在结合酶供体免疫分析中,使用重组DNA技术得到大肠杆菌新株,后者可合成 β -D-半乳糖苷酶的非活性大片段(酶受体)和非活性小片段(酶供体),这些片段联合形成活性的全酶。此法的开发者选出一对稳定互补的片段,这样供体可以顺利地半抗原接合而勿需抑制有效的再联接。互补片段的使用,使均相分析半抗原只需5分钟时间。这样的分析法适合于很多临床分析者自动化的要求。

虽然辣根过氧化物酶是标记物中使用得最多的酶,但它在均相免疫分析的进一步开发中使用得并不多,除非是在用离心分析器测定血浆中蛋白C的分析时。这种分析的基础在于:过氧化物酶连接抗体与抗原(蛋白C)的复合物具有催化活性,即在高浓度 H_2O_2 环境条件下,复合物能将4-氨基安替比林和苯酚转变成醌式发色团,而未成复合物的过氧化物酶——抗体连接物被过剩的 H_2O_2 所抑制。这种方法可检测蛋白C达 10^{-12} mol。

人们曾设想使酶活性依赖于与标记物的结合。酶通过生物素化(如丙酰-辅酶A羧化酶)可以在游离亲和素-抗原连接物(亲和素-IgG或亲和素-茶碱)条件下激活酶的活性,而与结合物联接于抗体时呈非活性状态。然而,这种分析易受内源生物素干扰。另外一种方法是合成“抗酶-抗分析物”抗体复合物,这种抗体复合物与高分子量分析物(IgM)的结合抑制了它对酶(6-磷酸葡萄糖脱氢酶)进行结合和抑制的能力。

均相体系的前提条件是结合影响标记物荧光的发射,有一种体系是基于非蛋白结合荧光素发射的光子去污剂束选择性淬灭,这个体系已被用于检测尿中的苯异丙胺,用50mmol/L十二烷基(十二氧乙烯基)硫酸胶束淬灭可减少游离标记物发射荧光的70%。还有一种新的分析方法是基于稳

定的Eu螯合物在水溶液中发光。当螯合物接上半抗原,并将标记物化合到半抗原抗体后,发光可被淬灭达90%。总雌激素的均相发光免疫测定基于这样一种发现,即异鲁米诺因氧化作用而发出的光在异鲁米诺-17 β -雌二醇与抗雌激素抗体结合后增强5倍。据报道,它的检测极限在7fmol/管,这对于无分离的分析来说是相当低的。

新的均相分析体系发展的主要目标是方便、快速。例如,放大的流式细胞计荧光免疫分析法需要很多手动操作,并依赖于荧光-激活流式细胞计,但其探测极限可以低至 10^{-12} 至 10^{-14} mol/L。在这些分析法中,有竞争性的或非竞争性的,抗体包被的10 μ m直径聚苯乙烯颗粒与包被的荧光颗粒(0.1 μ m直径)相结合,为了测定终点,要用流式细胞计测量一定数量(如5000)大颗粒的荧光分布。另一类系统(有三种不同抗原吸附于5-, 7-或9.3 μ m直径的微球),能同时测定三种特异性抗体的浓度。据报道,该系统比标准酶免疫分析更适于区别健康者和患者样品。将两种亲和性的抗体固定于不同直径颗粒上可扩大分析法的动力学范围,并据此得到两条重叠的曲线,该曲线比标准浓度扩大了50%。

竞争性均匀免疫法中也可使用“光-发射标记物”,其依据是:半抗原和抗体均被标记,但双标抗体-半抗原复合物产生的信号与游离反应物产生的完全不同。最常报道的一种荧光能传递分析法就是采用这种方法。通常用两个标记分子:一个是“荧光发射体”用来标记半抗原,另一个是“淬灭物”用来与抗体结合,淬灭物必须有效地吸收荧光反射体发射的一定波长的光。最近几年内,所用的几对荧光发射体+淬灭物有荧光素+ β -phycoerythrin, β -phycoerythrin + Texas红,三氯2-2,7-二甲基荧光素衍生物+4,5-二甲基荧光素等。

免疫传感器

基于免疫分析原理的分析传感器具有潜在优点,如体内外浓度的遥测、长时期的连续操作、对高浊度或有色样品的适用性、低廉、操作简便。虽然很多免疫传感器的方案是建立在电化学探测基础上的,但电化学免疫分析也是有趣的,为常规免疫分析中的终点测定提供了新方法。某些形成的免疫传感器为酶免疫分析的变种,依靠电位测量和电流测量来测定酶活性。其他非连续系统可通过监测表面胞质振荡,直接测定与抗体或抗原包被表面的特异性结合,但所用的设备大而复杂。荧光毛细管-灌注装置,里面装有已知量的所需试剂,对于未经训练的使用者是适用的廉价的一次性免疫传感器。这是瞬息波免疫分析的例子,依赖于表面光的吸附或发射。纤维-光学传感器,是基于荧光能传递免疫分析原理,并能以连续、可逆方法监测 $5 \sim 500 \mu\text{mol/L}$ 的苯妥英。

游离分析物的分析法

甲状腺素和皮质醇等激素在循环时部分与蛋白质结合,普遍认为只有游离激素为“生物活性”并与临床有关。很多用于估计游离激素和药物浓度的免疫分析程序已被提出,其中一些可对游离激素的绝对浓度作出估价,另一些可提供与绝对浓度相对的测量数据或指数,最明确的方法是用一种分离步骤(透析、超滤、树脂吸附)以隔离和随后测定游离分析物。游离激素分析法在于将抗体引入样品中,这种抗体可与分析物结合,而抗体被分析物占有的程度反映了游离分析物的原有浓度。本法有一步和二步法。有的用标记抗体,有的用标记抗原或与血清蛋白有低亲和力的分析物类似物。在一步法中,因为所有试剂会同时出现,故血清中激素结合蛋白质的标记类似的结合必须最小,否则游离激素的估计会出现大的偏离。

临床上感兴趣的主要游离分析物是甲状腺素。许多游离甲状腺素试验已进入常规使用,包括很多标记甲状腺素类似物的一步

法。然而,很多情况表明,这种分析法对一般血清白蛋白以及偶尔在临床样品中发现的其它蛋白质的干扰具有敏感性。因此,必须强调整个分析法的可信性和对甲状腺素-结合球蛋白,甲状腺素-结合前白蛋白,以及白蛋白影响的研究。新颖的非同位素一步法对于这种蛋白质的出现有更大的抗拒力。

免疫分析的最优化和可靠性

一般观点

描述结合反应的 Scatchard 和 Langmuir 一般式是从化学动力学定律推导出来的。这些和有关的质量作用方程对于测定抗体亲和性、推导标准曲线适合的模型、阐明与各种分析法设计相关的基本原则以及分析法的最优化均为适用。

对于开发新的抗原免疫分析的直接相关因素与竞争性(有限试剂)和非竞争性(过量试剂)免疫分析有关的基本限制和优点,包括试剂过量分析法产生的较高灵敏度和对较小分子非蛋白质抗原的不适用性。

检测极限

竞争性免疫分析:根据 Jackson 和 Ekins 的模型数据,竞争性放射免疫分析包括碘标记物和具有一般缔合平衡常数为 10^{10}L/mol 的抗体,其最小检测极限在反应混合物中为 10^{12} 个分子/升 (2pmol/L)。但如果用高比度的非同位素标记物,特别是使用具有更高亲和力的特异性抗体(亲和力增大 100 倍,亲和常数达 10^{12}L/mol),竞争性免疫分析的检测极限可达 10^{10} 个分子/L (20fmol/L)。对于一般抗原如孕激素、 17β -雌二醇或其他低浓度、低分子化合物的竞争性免疫分析来说,最低检测极限的评价有理论上的重要性。更为重要的是,这样的结论可帮助总结不同试剂或步骤所具有的内在优点。

对非妊娠妇女,血液中孕酮的正常浓度范围是 $1 \sim 100 \text{nmol/L}$,唾液中为 $10 \sim 1000 \text{nmol/L}$ 。因此,如分析 $50 \mu\text{l}$ 血清, 50fmol

/管(15pg/管)的检测极限已足够了,而对于唾液,检测极限小于1fmol/管(300fg/管)较为理想。由于17 β -雌二醇的正常浓度较孕酮低,所以17 β -雌二醇分析法的灵敏度应更高。

最灵敏的免疫分析法是微滴度板、固相酶免疫分析(检测极限为790amol/孔和1300amol/孔)。这些方法是利用异源性抗血清-酶结合物来减弱“桥效应”而降低检测极限,也就是说,由类固醇-蛋白质结合物所产生的抗体对类固醇的亲合力低于对类固醇-酶的亲合力,后者具有相同的结合位点和间隔臂。最灵敏的17 β -雌二醇免疫分析是用辣根过氧化物酶-类固醇结合物做比色法测定(370amol)和增强化学发光法测定(1800amol),两种方法都使用了异源性抗血清-酶结合物。最近报道了一种类似的比色酶免疫测定睾酮,该法使用同源性结合物,检测极限达800amol/孔。

上述事例提示,灵敏度的实际极限已经达到每管约400amol(或2pmol/L,容积为200 μ L),接近Jackson和Ekins对使用具有一般亲和性抗体的免疫分析法提出的预测。但达到如此的检测极限并没有为制备和选择异常高亲和力的抗体费很大劲。上述的所有免疫分析法的较为简单的竞争性流程,尽管只包括微孔固相和辣根过氧化物酶-分析物结合体,但改变后的酶分析法或标记用物质能达到一个更低的极限。

过量试剂免疫分析法:按理论观点,已有的最低检测极限的免疫分析是试剂过量免疫分析法,最灵敏的可容易地测到amol水平(0.4amol/100 μ l孔,0.02amol/管)。但对于日常样品的测定,本法并非尽善尽美,因此,人们仍有兴趣测定常规免疫分析法的检测极限。

由于检测极限与临床直接相关,对于常规使用的促甲状腺激素的免疫分析法的检测极限及如何确定等问题进行了广泛的探讨。

一般多次重复0标准(或样品浓度接近0)的测定值,从而决定与0有显著性差别的最小浓度值($P < 1\%$ 或 5%)。另外也可由批间精密密度用内振法求出最小可测浓度。McC-onway等人采用后一种方法分析了10种常规促甲状腺激素免疫分析法,做了500次重复性测定,设CV为22%,结果发现最低检测极限 < 0.02 mIU。另外一组的10个药盒(互相重迭),较好的分析法也都是过量试剂免疫法,其最小可测值与多次0标准分析所得结果具有相同水平。设定促甲状腺激素的比活性为50IU/mg,其分子量为28000Da,这个极限(0.02mIU/L)相当于每100 μ l管含400fg或14amol。14amol和0.02amol之间的差别可能是稳定性所付出的代价,但这也提示常规测定抗原的免疫分析法很可能达到更低的检测极限。

干扰

随着免疫分析法被广泛接受,特殊患者的或具有某些特征样品的异常检测结果也不断出现,当它们关系到一般原理和牵涉到商品性药盒时,此类报道尤为重要。没有一种免疫分析在常规应用期间一直保持其可信性,对某一特定样品组,经常有可能出现显著的偏离。因此,没有一种免疫分析是完全可靠的。所以,对于使用实验室自制免疫分析法测定同一抗原产生很大争论。

分析法操作和易于受到样品载体蛋白质的干扰,很大程度上决定于缓冲液的性质。离子强度和pH值会不可预料地影响抗原-抗体反应。使用适当制备的“保护性”蛋白质和去污剂可大幅度地减低血浆蛋白质的干扰。此外,使用无Fc段结合点的抗体片段可明显降低非特异性结合。虽然应用很广,但我们实验室一般不使用“惰性”蛋白质如牛血清蛋白来“封闭”固相表面上的未由抗体占据的位点,因为我们发现这样做没有必要,并且常是有害的。

异嗜性抗体是内源性的抗体,发现于病

人血清或血浆中,能够与其他物种的免疫球蛋白结合,包括产生作为免疫分析试剂的抗体的物种。鼠单克隆抗体作为显像剂及帮助肿瘤治疗的技术正被广泛采用,这导致在许多病人体内诱导出人抗鼠抗体。Boscato和Stuart引证了许多在竞争性和双位点免疫分析法中由异嗜性抗体所致干扰的报道,这类抗体可与鼠单克隆抗体结合,并在一定程度上干扰双位点免疫分析法测定HCG。他们对这类情况进行了调查,结果由于异嗜性抗体的存在,所测血清样品中有10%的HCG假性增高。该干扰抗体是直接针对IgG F(ab')₂片段上的一个抗原决定簇。其他几类物种也有相同情况。对含有人抗鼠抗体的样品用鼠抗体包被的亚乙烯氟的絮状物进行预处理,已得到人们的赞同。

其他有关的干扰性物质包括补体、类风湿因子、溶菌酶和抗原制品污染的酶等。然而,重要的是精心选择抗体和标记物质,仔细配制缓冲液,利用非特异性结合倾向小的试剂及进行大量的分析和临床可靠性试验,从而减小干扰因子的影响。

未来趋势

以实验室为基础的免疫分析法和随到随做的药盒正逐渐改善以达到耐用和具有良好性能。这主要靠理想的程序安排和免疫试剂来达到。在某些情况下,试剂将包含Fab'片段来代替整个抗体以达到结合位点的耦合,Fab'-酶结合中受控比率为1:1,减少血

清成分的干扰,降低非特异性结合。由于许多耦合巯基的标记试剂容易得到,在化学发光、荧光及其他免疫法中使用Fab'片段也将增加。均相免疫分析将以有更低的探测极限和定量大分子化合物的能力而出现,从而具有较广泛的适用性——不管是作为病人试验还是用作离心分析仪进行的常规试验等。要有这样的试剂,使结合可转换100%的标记物信号。

半抗原免疫分析法的探测极限可因下述情况而明显改善:①选择较高亲和力的抗体,并应用于最优化的传统竞争性免疫分析中;②克服试剂过量分析方案不能用于半抗原的实际限制。

上述的很多进展取决于或得益于较精确制备的固相成分,例如,可安排一个以上的固定试剂以充分增加它们的有效性。这样还能使取决于三种(或更多种)成分互相作用的分析方案得到开发。

也许更有趣的发展,包括上述的许多发展都将取决于DNA重组技术的利用,从而产生新的标记物及从单克隆抗体衍生的结合蛋白质。结合计算机辅助的分子模拟方法,抗体的氨基酸顺序将精确改变,以改进(用位点-特异突变法)特异性和亲和性,或者改变反应性基团,从而产生更有效的分析方案。(续完)

[Clin Chem 1990, 36(8): 1403~1427 何晓娃
李金泉 何小乐节译 金坚林 汉校]