

## ·药物分析和鉴定·

## 时间分辨荧光免疫分析法 在血液地高辛浓度分析中的应用

广州军区武汉总医院(武汉 430070) 吴笑春 高 月

时间分辨荧光免疫分析 (Time-Resolved Fluoroimmunoassay, TRFIA) 是 70 年代末<sup>[1]</sup>发展起来的一种新型超微量免疫分析技术, 它克服了荧光免疫分析法(FIA)背景光强的缺点, 极大地提高了分析灵敏度。与放免分析法(RIA)相比, 具有完全相似的特异性和精密度, 而其线性范围宽, 分析速度快、标记物制备简便, 稳定性好, 没有放射自身分解, 半衰期短和污染等问题。因而虽问世不久, 发展却十分迅速。远远超过 RIA、FIA、发光免疫分析法(LIA) 及酶标免疫分析法(EIA), 成为当代超微量物质免疫分析中最有发展前途的一项技术<sup>[2]</sup>。

### 原 理

TRFIA 是利用稀土元素的螯合物的双功能基团与抗体形成共轭体, 制成标记抗体。当标记抗体和待测抗原结合成复合物后, 其荧光信号极为微弱, 如果加入一种特殊的增强溶液, 稀土离子可以从免疫复合物中解离出来, 和增强液中的某些成分生成一种新的螯合物。这种新的螯合物可显示很强的荧光信号<sup>[3]</sup>。在 15 种稀土金属离子中, 只有 4 种 ( $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$  和  $\text{Dy}^{3+}$ ) 有荧光, 其中应用最多的是  $\text{Eu}^{3+}$ 。当  $\text{Eu}^{3+}$  被适当能量紫外光 (319 nm) 照射时, 在可见光区发出金属离子的特征荧光, 尽管荧光很弱, 但当  $\text{Eu}^{3+}$  与适当的有机配体形成螯合物后便可显著提高荧光强度 (613 nm)。这种荧光不仅强度高, 而且衰变时间也长 (10—1000  $\mu\text{s}$ ), 比普通荧光标记物要高出 5—6 个数量

级。

当含有荧光化合物的混合物被发自激光或闪光灯短脉冲光激发, 则被激发的荧光分子可发出短或长寿命的荧光, 尽管这两种荧光都以指数形式衰减, 荧光寿命短的可在 100  $\mu\text{s}$  内衰减为零。若在激发后 100—200  $\mu\text{s}$  内不测量, 所有寿命短的荧光背景信号散射的激发辐射就会消失殆尽, 长寿命的信号就能够高灵敏度地被检测<sup>[4,5]</sup>。

所谓时间分辨荧光测量就是指延缓测量时间, 在激发后最初一段时间不测量, 使样品池和样品中的蛋白质等所发的短寿命自然本底荧光 (1—10 ns) 完全衰变后再测螯合物的荧光, 可以完全排除背景光非特异干扰的影响, 提高分析灵敏度 (图 1), 此为时间分辨荧光测量的最大特点<sup>[3]</sup>。

常见 FIA 所用荧光试剂往往 Stokes 位移较小, 激发光谱和发射光谱重叠。另外, 生物样品中的背景荧光通常在 350—600 nm, 恰与一般常用荧光基团存在所谓的内过滤效应<sup>[2,4]</sup>。螯合物可产生很大的 Stokes 位移 (约 300 nm), 吸收与发射光谱不重叠, 而且激发光谱带较宽, 利于增高激发能, 增加标记物的比活性; 发射光谱带较窄 (10 nm), 远离了本底荧光, 可使非特异信号影响较小<sup>[6]</sup> (图 2)。

TRFIA 免疫反应原理和 RIA 完全相同, 适用于大、小分子量的物质进行免疫分析, 可做竞争性或非竞争性免疫分析。一般半抗原药物 (甲状腺激素、垂体激素等) 多

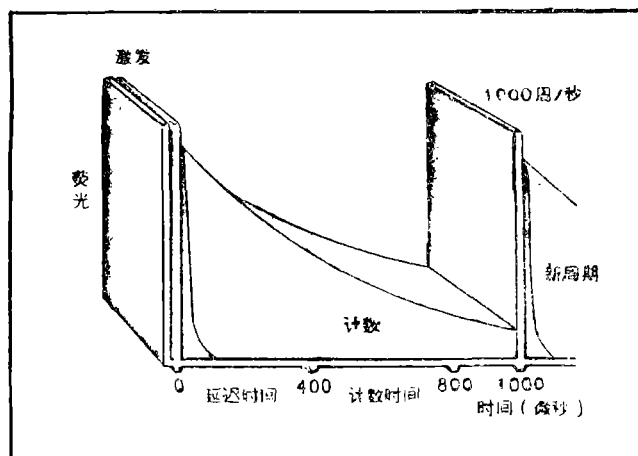


图1 时间分辨测量图解

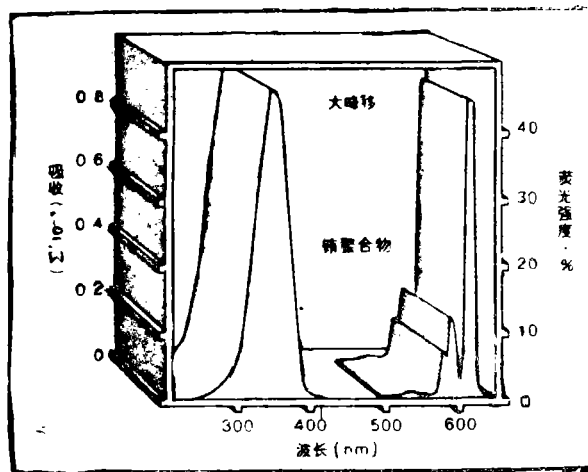


图2 螯合物的 Stokes 位移

用竞争结合法来测定。

竞争结合法是将小分子半抗原以共价键和蛋白结合,制成固相抗原。待测样品或标准品加至固相抗原孔中,然后加入 $\text{Eu}^{3+}$ 标记抗体。两种类型的半抗原共同竞争性地和 $\text{Eu}^{3+}$ 标记抗体结合。经洗涤后,测量结合到固相半抗原上的 $\text{Eu}^{3+}$ 的量,便可算出待测样品的浓度<sup>[3,7]</sup>。

#### TRFIA在血液地高辛浓度分析中的应用

TRFIA 用于血液药物免疫分析的试剂盒尚为数不多,主要有地高辛<sup>[7,8]</sup>、甲状腺素<sup>[9]</sup>、皮质激素<sup>[10]</sup>和胰岛素<sup>[11]</sup>等。目前以螯合物作为标记的 TRFIA 可分为 Delfia系

统和 Diamandis 系统。两种系统都可测定血液地高辛浓度,兹分述如下:

#### 1. 解离增强镧系荧光免疫分析系统 (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay, Delfia), 即液相测定系统。

地高辛的分析是根据血清或标准地高辛与固相结合的地高辛之间竞争性地与 $\text{Eu}^{3+}$ 标记的抗地高辛抗体结合,免疫反应完成后,加入 $\beta$ -二酮类增强液, $\text{Eu}^{3+}$ 标记的结合部分被从固相上解离下来, $\text{Eu}^{3+}$ 与 $\beta$ -二酮类形成新的螯合物并产生荧光(图3)。在具有时间分辨功能的荧光计上测定荧光强度。光强

与标准或样品中的抗原成反比。方法<sup>[7]</sup>如下:

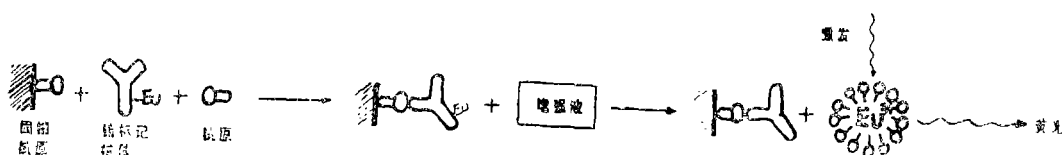


图3 DELFIA 竞争结合法分析原理

1.1 将抗地高辛抗血清加等量饱和硫酸铵析出抗体,经离心、脱盐后加入过量的  $\text{Eu}^{3+}$  标记试剂,柱层析分离  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体,测定每摩尔 IgG 结合  $\text{Eu}^{3+}$  的摩尔数。

1.2 按常规方法制备地高辛-兔血清白蛋白结合物。

1.3 包被:取地高辛-兔血清白蛋白结合物,用包被缓冲液配成  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,加至预先处理的微量滴定板孔中,每孔  $100 \mu\text{l}$ ,室温反应过夜,倾去液体,蒸馏水洗,无水乙醇脱水干燥,备用。

1.4 测定:取标准液或样品  $20 \mu\text{l}$  加至包被了地高辛-兔血清白蛋白的孔中;每孔加  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体工作液  $100 \mu\text{l}$  (含 IgG  $100 \text{ ng}/\text{ml}$ ) 反应  $30 \text{ min}$ ,倾去反应液,洗涤液洗 6 次;每孔加增强液  $200 \mu\text{l}$ ,最后在时间分辨荧光计上测量荧光强度。根据标准曲线计算出样品的地高辛浓度,本法最低检测限为  $<0.2 \text{ ng}/\text{ml}$ ,交叉反应率低于 FPIA 法。

### 2 Diamandis 系统(固相测定系统)

Diamandis 系统与 Delfia 系统不同之处在于: a. 标记物是铈螯合物,BCPDA(4,7-bis(chlorosulphophenyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid)代替了  $\text{Eu}^{3+}$ ; b. 标记的链亲合素被用来作探针试剂,并且与生物素化的抗体作为互补试剂,代替了用  $\text{Eu}^{3+}$  标记的抗体; c. 荧光复合物直接在干燥的固相上测定。

加拿大多伦多大学 Diamandis 等报道

了用兔抗地高辛抗体的一价 Fab 片段或鼠单克隆抗体分析地高辛的这种方<sup>[8]</sup>。血清地高辛和固相地高辛(地高辛:甲状腺球蛋白结合物被吸附在微量滴定孔表面)竞争结合可溶性的、生物素化的多抗的 Fab 片段或生物素化的单抗。洗涤后,生物素化的部分结合到固相(地高辛)的程度反比于样品中地高辛浓度。定量是根据带有链亲合素的桥反应来进行的。被共价结合了一个大容量蛋白质(甲状腺球蛋白)的链亲合素标记了多个 BCPDA 残基,在过量  $\text{Eu}^{3+}$  存在下,用自动时间分辨荧光计测定干燥固相上的荧光复合物(图 4)。固相法与液相法相比,长处在于避免了后者易受外源性  $\text{Eu}^{3+}$  污染的问题。

具体方法如下:

2.1 微量滴定条的包被 将每 ml 含有  $1 \mu\text{g}$  地高辛:甲状腺球蛋白结合物的包被缓冲液,每孔加  $100 \mu\text{l}$ ,室温过夜,洗涤液冲洗 1 次,加  $200 \mu\text{l}$  封闭缓冲液室温封闭 1h,洗涤 2 次,室温空气干燥过夜,置密封塑料袋中  $4^\circ\text{C}$  存放,至少可稳定 6 个月。

2.2 分析程序 每孔加入  $20 \mu\text{l}$  标准或血清样品和  $100 \mu\text{l}$  生物素化的 Fab 片段或单抗工作液。室温温育并振摇  $45 \text{ min}$ ,洗涤液洗 4 次,加  $100 \mu\text{l}$  示踪工作液(链亲合素:甲状腺球蛋白:BCPDA:  $\text{Eu}^{3+}$ )  $37^\circ\text{C}$  温育  $30 \text{ min}$  后,洗涤液洗 4 次,空气流吹干,在 Cyber Fluor 615 免疫分析仪上测表

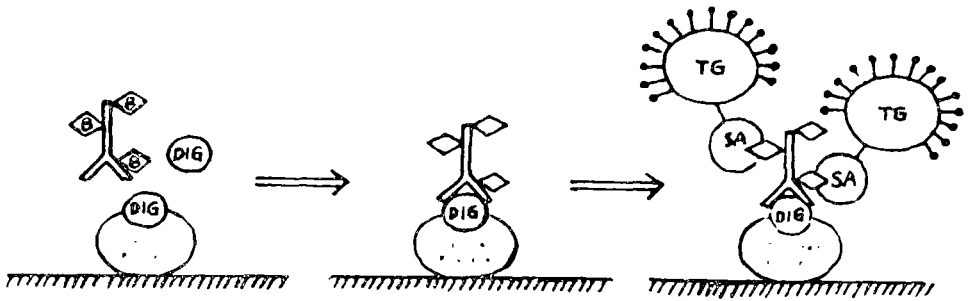


图4 地高辛分析图解(SA = 链亲合素; B = 生物素; 载体蛋白是甲状腺球蛋白; →是BCPDA; Eu 结合物; 是固相)。第1次温育, 样品中的地高辛(DIG)和固相上的地高辛(地高辛: 甲状腺球蛋白结合物)竞争结合生物素化的免疫反应物(抗体或Fab片断)洗掉未结合部分后, 加与负载了BCPDA的甲状腺球蛋白共价结合的链亲合素, 在Eu过量存在下, 定量生物素化部分被结合的程度。洗涤并干燥固相后, 最终荧光复合物(固相: 甲状腺球蛋白: 地高辛: 抗体: 生物素: 链亲合素: 甲状腺球蛋白: BCPDA: Eu)被用免疫分析仪测定。

图4 地高辛分析图解

而荧光并打印出结果。本法的最低检测限为0.25 ng/ml。

#### TRFIA 仪器和试剂

LKB 公司首先将 TRFIA 技术商品化, 在研制出 Arcus 1230 时间分辨荧光仪的同时, 陆续推出与之配套的药盒并不断完

善<sup>[5]</sup>。我国 80 年代后期也开始了从试剂到临床应用的研究, 并取得了一些成果<sup>[12-16]</sup>。目前, 国产仪器正在研制, 我们期望着今后 5—10 年 TRFIA 将在药物微量免疫分析中得到发展和应用。

#### 参 考 文 献

- [1] Soini E, and Hemmilä I. Clin Chem, 1979, 25(3): 353
- [2] 胡天喜. 生物化学与生物物理进展, 1987, 5: 8
- [3] 李振甲等. 中华医学检验杂志, 1988, 11(6): 338
- [4] 许莉等. 中国化学会第一届全国生物分析化学学术讨论会论文集, 1992, 151
- [5] DELFIA 时间分辨荧光免疫分析系统(Pharmacia 公司资料, 1992)
- [6] Hemmilä I, Dakubu S, Mikkala V—M, et al. Anal Biochem, 1984, 132: 335
- [7] Helsingius P, Hemmilä I AND Lövgren T. Clin Chem, 1986, 32: 1767
- [8] Diamandi A P, Conway K, and Diaman-
- dis E P. J Pharm Sci, 1989, 78(8): 617
- [9] Hemmilä I, Malminen O, Mikola H, et al. Clin Chem, 1988, 34(11): 2320
- [10] Eskola J U, Nanto V, Meurling L, et al. Clin Chem, 1985, 31: 1731
- [11] Toivonen E, Hemmilä I, Marniemi J, et al. Clin Chem, 1986, 32(4): 637
- [12] 李振甲, 杨梅芳, 陈素娟等. 解放军医学杂志, 1990, 15(1): 24
- [13] 李振甲, 杨梅芳, 陈泮藻等. 上海免疫学杂志, 1992, 12(2): 103
- [14] 魏文青, 王仁芝, 蒋中华. 中华医学检验杂志, 1992, 15(5): 281
- [15] 高平, 李振甲. 免疫学杂志, 1992, 8(3): 192—195
- [16] 李振甲, 陈泮藻, 杨梅芳等. 中国免疫学杂志, 1990, 6(5): 315