

现代免疫分析方法最新进展

劳海苗 吴英松 刘天才

现代免疫分析技术是免疫分析技术在现代生物医学领域一个重要的研究课题。本文重点介绍现代免疫分析技术方法的最新进展情况,预测了其发展趋势为基于量子点技术的一种新型多元均相时间分辨荧光免疫分析方法,为今后实现快速便捷、高灵敏度、微量化及高通量化的现代免疫分析技术提供科学依据,具有十分广阔的发展前景。

一、现代免疫分析方法的研究进展

免疫分析技术已广泛应用于临床分析检测,是现代生物医学领域一个重要的研究课题。时至今日,免疫分析技术从传统走到现代,从放射免疫分析法发展到均相时间分辨荧光免疫分析方法的出现,是科学研究不断深入的结果,是免疫分析技术发展的必然趋势。现代免疫分析方法最早的形式就是放射免疫分析法(RIA),1959年由 Berson 和 Yallow 等人首次使用^[1]。这种传统的分析方法特异性强,灵敏度高,抗体抗原易用碘放射性核素标记,应用广泛。但其最大的缺憾是带来的放射性污染难以处理,操作人员的健康受到威胁,这大大限制了试剂的使用寿命,因为放射性核素的衰减周期等因素,难以获得长期稳定的标准线,导致较高的操作成本。即使有所改善,并实现了商业化,但仍然难以克服检测昂贵的检测成本,仍无法实现理想的长时间连续自动化分析,难以消除非特异性干扰信号等等缺点。因此,该技术的发展还存在困难,导致现代免疫分析减少采用放射性核素标记,其结果就是,非放射性免疫分析方法在分析检验领域逐渐得到普及^[2]。

近半世纪以来,多种非放射性免疫分析技术日新月异:酶联免疫分析、生物发光分析、电化学发光免疫分析、化学发光免疫分析、荧光偏振免疫分析、时间分辨荧光免疫分析等等。尽管这些分析方法通过不断

改进日趋成熟,但是,它们依然存在检测样品下限浓度不够低,灵敏度不高,很难定性定量地一次性检测同一个分析体系中产生的不同检测信号,而且微量化、自动化、高通量化程度都不高等缺点。克服传统免疫分析方法的不足,研发更加快捷、高效、灵敏、可靠、安全的多元免疫分析方法已经成为现代免疫技术发展的必然趋势。

二、多元免疫分析方法

多元免疫分析方法拥有较传统免疫分析更具独特性的优势:可一次性对多个待分析物进行检测,能有效降低采样偏差,通量更高,检测下限浓度低,灵敏度高,可进行痕量检测,有效提高筛选质量,从而减少昂贵分析样品的用量,极大地降低了分析成本。

多元免疫分析方法发展至今已有免疫聚合酶链反应技术、蛋白质微阵列芯片技术、流式细胞术以及量子点技术等等。免疫聚合酶链反应技术这种基因扩增技术因其简单易行,应用现已极为广泛,但其受到影响的因素很多,如核酸纯化过程中出现的扩增反应抑制物、扩增仪孔间温度的差异以及核酸提取中的随机误差均可导致假阴性的出现;又如,核酸提取中标本间的交叉污染,以及前扩增产物的污染等也易导致假阳性结果。诸多影响因素给检验结果带来许多不确定性,因此该分析方法对实验室环境要求极为严格,不宜普及化。蛋白质微阵列芯片技术具有高通量、微型化、自动化和成本低等特点,属于一种固相免疫分析方法,存在冲洗未反应的游离标志物等分离步骤,生产和检测过程人为干扰因素多、难以标准化,生化反应条件和过程不可控、反应效率较低,检测结果重复性较差等。流式细胞术是发展比较完善的现代免疫分析技术,但其检测所需的设备和试剂盒昂贵,导致分析测试成本较高。

而量子点技术是最近应用于免疫分析中的。量子点以其自身特点,仅仅改变其尺寸大小,即可发射不同颜色的荧光,而且可以在同一激发波长下同时激发,荧光发射峰最大半峰宽窄而对称,抗光漂白性极强,亮度高。这些独特的光学性质在生物医学应用中

基金项目:国家自然科学基金资助项目(2009, 30901382);高等学校博士学科点专项科研基金新教师基金课题;广东省高校人才引进专项资金;南方医科大学引进人才科研启动基金

作者单位:510515 广州,南方医科大学生物技术学院

通讯作者:刘天才,电子邮箱:liutc@fimmu.com

举足轻重,研究至今已 10 余年,依然方兴未艾^[3~5],在许多方面较传统的有机染料更具优势,适合多元待分析物的免疫标记,尤其是用于荧光共振能量转移(FRET)已成为分子间相互作用的研究热点^[6~11]。随着多年的研究发展,量子点产品越来越廉价易得,因此基于量子点技术发展而来的多元免疫分析技术方法也属必然。

三、均相时间分辨荧光免疫分析技术

免疫分析技术根据待测物是否悬浮在分析样品中的不同,分为均相与非均相(或固相)。一般而言,非均相分析(如 ELISA, TRFIA)整个操作过程步骤多,需要洗涤来分离结合标记与游离标记,耗时间长,不易自动化等缺点^[11~13]。随着免疫学技术的发展,针对单一待检测物的均相免疫分析(AlphaScreens 分析,均相时间分辨荧光免疫分析等)是近年来免疫分析发展的热点及趋势^[14~21]。该分析技术采用的检测方法是利用在纯液相中 FRET 机制,并具有免冲洗等步骤的优势,属于下一代的免疫分析方法。但基于 AlphaScreens 分析的均相免疫分析因需要制备高效的化学发光和感光剂,使其开发成本相当昂贵,而均相时间分辨荧光免疫分析相对更加廉价。

均相时间分辨荧光免疫分析主要用到的供体荧光发色基团是镧系螯合物。镧系螯合物的荧光特异性体现为^[22]:荧光衰变时间极长,是传统荧光的 $10^3 \sim 10^6$ 倍;激发光与发射光之间的 Stokes 位移大,可达 290nm,而普通有机荧光素的 Stokes 位移仅为 28nm 左右。因此,在利用镧系螯合物的分析中,利用某特定波长的激光激发分析样品后,关闭激发光源在延迟一定时间后,仍可检测到镧系螯合物发光信号^[22]。这样就极大地削弱因激发光源带来的背景荧光干扰,继而通过时间延迟的波长区分强特异性荧光和背景荧光(故称为时间分辨),得到的信噪比大大增强,从而增强检测灵敏度和检测下限浓度等。均相时间分辨荧光免疫分析方法利用镧系螯合物的这些光学特异性,采用双抗体夹心法模式,将荧光发色团(如有机染料、量子点或包埋有量子点或有机染料的纳米微球等^[23~26])和镧系螯合物(如铽螯合物)分别标记抗原的两株抗体,发色团和镧系螯合分别用作 TR - FRET 的受体和供体。若镧系螯合物的时间分辨荧光光谱与发色团的激发波谱重叠,当受体与供体靠近达到发生 FRET 所需要的最大距离时,镧系螯合物的时间分辨荧光将能量转移给受体发色团,而从触发 TR - FRET。根据受体发色团所发出的光谱最大

荧光发射峰位置可定性确定待测物,再根据供体和受体上的荧光强度的变化,即可确定待测物的量,如此实现均相时间分辨荧光免疫分析检测^[19~21]。

四、多元均相时间分辨荧光免疫分析方法

为实现多个待测物同时筛查,鉴于多元免疫分析和均相时间分辨荧光免疫分析技术具有上述强大的优势,借助量子点和镧系螯合物的独特优势,多元均相时间分辨荧光免疫分析方法已成多元免疫分析技术发展的必然趋势^[27~29]。该分析方法仍然采用相同的原理,镧系螯合物和荧光发色团(如量子点)分别标记双抗夹心法的两株抗体;供体/受体的组成模式是:一种镧系螯合物/多种荧光发色团。选择镧系螯合物与多个荧光发色团组合的原则同均相时间分辨荧光免疫分析方法一样,镧系螯合物的时间分辨荧光发射光谱与多个荧光发色团的激发谱重叠。为减少供体的荧光干扰,受体的发射峰尽可能地避免与供体发射谱重叠。检测时仍然是在均相中进行,免去冲洗未结合的游离标志物等步骤,直接利用抗体与抗原相互作用而导致的供体与受体间 TR - FRET,来定性定量分析多个待分析物。该技术具有灵敏度高,背景荧光低,无放射性污染,分析试剂性质稳定,不需要洗涤和分离步骤,多个待测分子同时分析,操作简便,分析快速,易于微型化自动化,应用范围广等优点,属于有待开发利用的免疫分析技术。由此可见,对多元均相时间分辨荧光免疫分析方法的建立的研究具有很强的理论和现实意义。

五、现代免疫分析方法的发展趋势

为了及早发现和预防疾病,提高分析灵敏度、特异度、最低检测限、准确度、线性范围及重复性等评价指标成为新型免疫分析方法发展目标。随着新世纪科学技术的不断发展,各个学科的交叉研究不断深入,多元均相时间分辨荧光免疫分析方法的建立成为免疫分析方法的发展趋势,该分析方法融汇免疫学、医学、化学、光谱学、纳米技术等多门类学科,可解决实际存在的科学问题,为现代生物医学领域的多个基础研究和技术开发提供可靠的技术支持,必将促进现有免疫分析技术的升级。

参考文献

- 1 Yallow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 1959, 184 (Suppl 21): 1648 - 1649
- 2 Nolan JP, Mandy F. Multiplexed and microparticle - based analyses: quantitative tools for the large scale analysis of biological systems. *Cytometry Part A*, 2006, 69A(5): 318 - 325

- 3 Chan WCW, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive non-isotopic detection, *Science*, 199, 281(5385): 2016 – 2018
- 4 Dahan M, Lévi S, Luccardini C, *et al.* Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single – quantum dot tracking. *Science*, 2003, 302(5644): 442 – 445
- 5 Resch – Genger U, Grabolle M, Cavaliere – Jaricot S, *et al.* Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods*, 2008, 5(9): 763 – 775
- 6 Patolsky F, Gill R, Weizmann Y, *et al.* Lighting – up the dynamics of telomerization and DNA replication by CdSe – ZnS quantum dots. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(46): 13918 – 13919
- 7 Medintz IL, Clapp AR, Mattoussi H, *et al.* Self – assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat Mater*, 2003, 2(9): 630 – 638
- 8 Medintz IL, Konnert JH, Clapp AR, *et al.* A fluorescence resonance energy transfer – derived structure of a quantum dot – protein bioconjugate nanoassembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9612 – 9617
- 9 Zhang CY, Yeh HC, Kuroki MT, *et al.* Single – quantum – dot – based DNA nanosensor. *Nat Mater*, 2005, 4(11): 826 – 831
- 10 Clapp AR, Medintz IL, Uyeda HL, *et al.* Quantum dot – based multiplexed fluorescence resonance energy transfer. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(51): 18212 – 18221
- 11 De Pauw PE, Vermeulen I, Ubani OC, *et al.* Simultaneous measurement of plasma concentrations of proinsulin and C – peptide and their ratio with a trefoil – type time – resolved fluorescence immunoassay. *Clin Chem*, 2008, 54(12): 1990 – 1998
- 12 Bacigalupo MA, Meroni G, Secundo F, *et al.* Time – resolved fluoroimmunoassay for quantitative determination of ampicillin in cow milk samples with different fat contents. *Talanta*, 2008, 77(1): 126 – 130
- 13 徐伟文, 吴英松, 杭建峰, 等. 时间分辨荧光免疫法定量检测 AFP 试剂盒临床应用研究. *标记免疫分析与临床*, 2006, 13(1): 43 – 45
- 14 Bacigalupo MA, Ius A, Longhi R, *et al.* Homogeneous immunoassay of atrazine in water by terbium – entrapping liposomes as fluorescent markers. *Talanta*, 2003, 61(4): 539 – 545
- 15 Liu L, Shao M, Dong X, Yu X, *et al.* Homogeneous immunoassay based on two – photon excitation fluorescence resonance energy transfer. *Anal Chem*, 2008, 80(20): 7735 – 7741
- 16 McGiven JA, Sawyer J, Perrett LL, *et al.* A new homogeneous assay for high throughput serological diagnosis of brucellosis in ruminants. *J Immunol Methods*, 2008, 337(1): 7 – 15
- 17 Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko AC, *et al.* Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method. *Clin Chem*, 1996, 42(9): 1518 – 1526
- 18 Wang G, Yuan J, Hai X, *et al.* Homogeneous time – resolved fluoroimmunoassay of 3,5,3' – triiodo – l – thyronine in human serum by using europium fluorescence energy transfer. *Talanta*, 2006, 70(1): 133 – 138
- 19 Kimura H, Matsumoto K, Mukaida M. Rapid and simple quantitation of methamphetamine by using a homogeneous time – resolved fluoroimmunoassay based on fluorescence resonance energy transfer from europium to Cy5. *J Anal Toxicol*, 2005, 29(8): 799 – 804
- 20 Leblanc V, Delaunay V, Claude Lelong J, *et al.* Homogeneous time – resolved fluorescence assay for identifying p53 interactions with its protein partners, directly in a cellular extract. *Anal Biochem*, 2002, 308(2): 247 – 254
- 21 王永成, 唐棣, 常文宝, 等. 时间分辨荧光免疫分析法间接测定雌二醇, *分析科学学报*, 2001, 17(2): 89 – 92
- 22 Uehara M, Lapcik O, Hampl R, *et al.* Rapid analysis of phytoestrogens in human urine by time – resolved fluoroimmunoassay. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 72(5): 273 – 282
- 23 Bradley M, Bruno N, Vincent B. Distribution of CdSe quantum dots within swollen polystyrene microgel particles using confocal microscopy. *Langmuir*, 2005, 21(7): 2750 – 2753
- 24 Wang H – Q, Liu T – C, Cao Y – C, *et al.* A flow cytometric assay technology based on quantum dots – encoded beads. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 580(1): 18 – 23
- 25 Riegler J, Ehler O, Nann T. A facile method for coding and labeling assays on polystyrene beads with differently colored luminescent nanocrystals. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 383: 645 – 650
- 26 Fournier – Bidoz S, Jennings TL, Klostranec JM, *et al.* Facile and rapid one – step mass preparation of quantum – dot barcodes. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47(30): 5577 – 5581
- 27 Harma H, Soukka T, Shavel A, *et al.* Luminescent energy transfer between cadmium telluride nanoparticle and lanthanide(III) chelate in competitive bioaffinity assays of biotin and estradiol. *Anal Chim Acta*, 2007, 604(2): 177 – 183
- 28 Weibel N, Charbonire LJ, Guardigli M, *et al.* Engineering of highly luminescent lanthanide tags suitable for protein labeling and time – resolved luminescence imaging. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(15): 4888 – 4896
- 29 Charbonnir LJ, Hildebrandt N, Raymond F Ziessel, *et al.* Lanthanides to quantum dots resonance energy transfer in time – resolved fluoroimmunoassays and luminescence microscopy. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(39): 12800 – 12809

(收稿: 2010 – 05 – 24)

欢迎订阅

欢迎赐稿