

文章编号:1673-1689(2007)04-0117-04

免疫检测技术的研究进展

林影, 叶茂, 韩双艳, 吴晓英

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要:综述了近几年来出现的免疫检测技术的新方法,简要介绍了它们的原理、特点及其应用,并做出相应的比较。免疫检测技术是基于抗体抗原反应的原理对待测物进行定量定性分析的检测方法,具有特异性强、灵敏度高、简便等优点,是现代生命科学的重要研究手段,在生物分析检测领域有着广泛的应用前景。此外,展望了免疫检测技术的发展方向,以期有关的科研工作者提供参考。

关键词:免疫检测技术;分子印迹;流动注射免疫;免疫传感器;脂质体;多组分

中图分类号: Q 3

文献标识码: A

The Progress on the Research of Immunoassay

LIN Ying, YE Mao, HAN Shuang-yan, WU Xiao-ying

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Immunoassay is an important method in modern life science, and can be qualitative and quantitative analysis. The principle of immunoassay is the specific reaction between antibody and antigen, which has high sensitivity, high specificity, and convenient. So that it has widely application in bio-analysis. In this manuscript, the principle, characteristic, and application of immunoassay methods were discussed. Furthermore, the prospects of immunoassay technology also outlined in the manuscript.

Key words: immunoassay; molecular imprinting; flow injection; liposome; immunosensor; multicomponent

美国物理学家 Yallow 和 Berson 于 1959 年利用放射免疫检测法(Radioimmunoassay, RIA)检测血清中的胰岛素,从而将免疫检测方法引入化学分析界^[1]。从此,免疫检测技术被广泛应用于生物分析检测。

免疫检测技术是以一种抗体或多种抗体作为分析试剂,对待测物进行定量或定性分析的检测方法^[2]。其基本原理是抗体和抗原之间的相互作用,

其中抗原和抗体之间反应的特异性和灵敏性是免疫检测技术的关键^[3]。目前应用最广的免疫检测技术主要有:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),免疫荧光技术(immunofluorescence assay, IFA),免疫凝集试验(immune agglutination, IA)和免疫沉淀(immunoprecipitate, IP)等,它们在生物领域发挥了极其重要的作用。

收稿日期:2007-01-27.

作者简介:林影(1962),女,广东湛江人,工学博士,教授,博导,主要从事生物化学与分子生物学、生物工程的教学与科研工作. Email: feylin@scut.edu.cn

随着样品检测项目的不断增加,以及对快速、简单的原位检测的需求,促进了免疫检测技术的发展,出现了分子印迹技术(molecular imprinting technique)、流动注射免疫检测(flow injection immunoassay)、脂质体免疫检测(liposome immunoassay)、免疫传感器(immunosensor),以及多组分免疫检测(multicomponent immunoassay)等新免疫检测技术。

1 分子印迹技术

分子印迹技术是最近10多年来发展起来的一种交叉技术,是模拟抗体抗原相互作用的具有特异性识别位点性质的技术^[4]。它利用化学手段合成一种高分子聚合物——分子印迹聚合物(molecularly imprinting polymer, MIP)。MIP能够特异性吸附作为印迹分子的待测物,在免疫分析中可以取代生物抗体。与生物抗体比较,MIP具有稳定性好、制备周期短、费用低、易于保存和可以在复杂环境中应用等优势^[4-5]。该技术是传统意义的蛋白质类抗原抗体免疫检测技术的延伸。

分子印迹技术研究在国外得到较高重视,特别是在生物药物检测。Ester Caro等^[6]利用分子印迹技术第一次合成恩氟沙星的MIP,显示出与结构相似物环丙沙星的高度交叉反应性,能选择性识别混合抗生素中的喹诺酮类,并应用于清除复杂样品中的喹诺酮类的吸附剂;Fei Nie等^[7]应用合成的吡啶美辛MIP作为识别物质,以及可溶性锰(IV)-甲醛-吡啶美辛的检测体系,建立了新的吡啶美辛检测的分子印迹化学发光方法,检测极限为 4×10^{-6} g/mL。

分子印迹技术尚存在一些缺点,例如水溶液或极性溶剂中进行分子印迹和识别仍是一大难题^[4-5]。该技术目前处于研究阶段,主要是以有机小分子化合物为检测对象。小分子化合物属于半抗原,制备相应的免疫检测用抗体,需要与大分子蛋白质连接,分子印迹技术的应用则免除了这方面的考虑。

2 流动注射免疫检测

流动注射免疫分析技术(FIIA)是将流动注射分析^[8]与免疫分析结合的一种新的免疫检测技术^[9]。目前已在药物分析、环境监测及农药残留检测等生物检测方面得到了广泛应用。流动注射免疫分析一般采用异相免疫反应模式,使用固相载体固定抗原或者抗体,从而使游离部分从免疫反应结合物中分离^[10]。

关于流动注射免疫分析的研究较多。Liang等^[11]研究了检测白细胞介素-6的流动注射免疫分析方法,可在50 min内自动完成所有检测步骤(温育、洗涤、酶促反应和测定),与传统的ELISA有很好的—致性;钱昌顺^[12]检测癌胚抗原(CEA)时,采用时间分辨荧光免疫检测的FIIA技术,加快了分析速度,易于控制反应时间和试剂用量,提高了分析的精确度。

流动注射免疫分析属于流动免疫检测体系,潜在优势在于快速精确、易于实现自动化、可与其它检测技术联合使用。FIIA也有不足的地方,变异系数大,抗体和酶标的半抗原使用量大,一次只能分析单个样品,难以满足大批量样品分析的需要^[13]。

3 脂质体免疫检测

在脂质体免疫检测技术中,大量的免疫标记物(荧光物或酶等)包埋在脂质体腔内或结合在膜表面,免疫化学反应发生时,脂质体裂解,释放出标记物,产生扩增的检测信号^[14]。脂质体的特点是体表面积大、体腔容量大,具有能与多种生物识别物结合的脂类双分子层结构^[14-15]。

日本WAKO公司的脂质体免疫检测法——定性定量检测血清中总补体活性,是将脂质体作为一个人造红细胞,在补体激活过程中攻击并破坏脂质体膜,致使脂质体内的酶被释放,使试剂中的NAD还原成NADH,导致吸光度的变化,吸光度的增减与血清中总补体活性呈正相关^[16];Kumada等^[17]在进行检测表达目的蛋白菌落的菌落转移免疫分析时,采用脂质体免疫印迹分析的方法,主要把辣根过氧化物酶(HRP)包埋到脂质体中,使得显色物聚集在免疫脂质体内,其检测信号是常规免疫印迹分析的两倍,能高灵敏筛选表达目的蛋白质的菌落。

脂质体作为信号放大的工具已很好地应用于免疫检测技术。由于脂质体的包埋效果、结合的空间位阻现象和它的多价性质等原因,造成放大信号难以达到理论值,甚至可能产生低信号^[15],成为脂质体免疫检测技术需要解决的问题。

4 免疫传感器

1990年Herry等提出了免疫传感器的概念,这是将免疫检测技术与传感器技术结合的一类生物传感器^[18]。免疫传感器的工作原理和传统的免疫分析技术相似,属于固相免疫测试法^[19]。免疫传感器能够实时监测抗原抗体反应、进行动力学分析,以及缩短测定时间^[15-19]。

随着生物敏感元件的研发,出现了表面等离子体共振免疫传感器(surface plasmon resonance immunosensor)^[20]、平面阵列免疫传感器(planar array immunosensor)^[21]、表面声波免疫传感器(surface acoustic wave immunosensor)^[22]、石英晶体微量天平传感器(quartz-crystal microbalance immunosensor)^[23]、光导纤维免疫传感器(fiber-optic immunosensor)^[24]等新型免疫传感器,有着良好的应用前景。免疫传感器的出现,减少了分析时间,提高了灵敏度,使检测过程更简单。免疫传感器的发展趋势是标记物的种类层出不穷、与计算机的联用、一次性免疫传感器的研发、与其它仪器的集成、多元(多功能)化的测定,以及应用领域的拓宽等^[19,25]。

5 多组分分析物免疫检测

多组分分析物免疫检测(MIA)是指对同一份样品,同时测定其中两种或两种以上的相关分析物的免疫检测技术^[5,19]。有两种分析方式:多组分定位包被空间分辨分析法和多探针标记法^[5]。例如,王磊磊等^[26]将压电石英晶体阵列应用于补体系统免疫分析中,发展了新型的同步免疫分析方法,对补体系统的4种成分(C₄、C₅、C_{3b}、B因子)进行了分析检测,研究了补体系统免疫反应的特性和传感器阵列的响应特性的关系;Hulse等^[27]使用Bio-Rad公司的多球免疫检测方法,可同时检测分析9种细胞因子。

参考文献(References):

- [1] Ronald Kahn C, Jesse Roth, Berson, Yalow and the JCI: the agony and the ecstasy[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(8): 1051-1054.
- [2] Shepherd P, Dean C. Monoclonal Antibodies[M]. New York: Oxford University Press, 2000: 297-300.
- [3] Harlow E, Lane D. Using Antibodies: A Laboratory Press [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999: 18-20.
- [4] Cameron Alexander, Håkan S Andersson, Lars I Andersson, et al. Molecular imprinting science and technology: a survey of the the literature for the years up to and including 2003 [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2006, 19: 106-180.
- [5] 李兴霞,程玉来,王国来,等. 免疫检测新技术在食品检测中的应用 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 170-174.
LI Xing-xia, CHENG Yu-lai, WANG Guo-lai, et al. The application of new immunoassay methods in food inspection [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(3): 170-174. (in Chinese)
- [6] Ester Caro, Rosa M Marce. Novel enrofloxacin imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of fluorinated quinolones from urine and tissue samples [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 562: 145-151.
- [7] Fei Nie, LU Jiu-ru, HE Yun-hua, et al. Determination of indomethacin in urine using molecule imprinting chemiluminescence method [J]. *Talanta*, 2005, 66: 728-733.
- [8] Ruzicka J, Hansen E. Flow injection analysis part 1 a new concept of fast continuous flow analysis[J]. *Anal Chim Acta*,

6 结 语

免疫检测技术对促进生物检测领域的发展发挥了极大的作用,但传统免疫检测技术存在着信息量少、方法较繁琐等缺陷,免疫检测新技术的研究应用,使其得到了极大改善。

免疫检测新技术中,分子印迹技术侧重于反应对象的改进,流动注射免疫检测与免疫传感器侧重于快速、自动化及检测手法,脂质体免疫检测注重信号放大,多组分分析免疫检测研究的是样品的多样性;并且它们有一定的相关性。例如:分子印迹技术可以应用在免疫传感器、流动注射免疫检测中,代替普通的抗原蛋白;免疫传感器可以作为流动免疫检测、多组分分析物免疫检测的组成部件等。

目前这些新技术发展较快,但如前所述存在许多问题。分子印迹聚合物中残余印迹分子难以除尽会影响检测结果;使用更简单实用的固定化技术和性能更优越的载体材料仍是生物传感器今后的研究热点和难点;多组分分析物免疫分析中几种标记物的测定条件的相互协调,限制了测定的灵敏度和组分分数均等。总体来说,大多数检测技术仍然处于研究开发阶段,大规模的应用尚需先在检测精度的提高、稳定性的保持、操作的简便和经济性等方面加强研究。

相信,免疫检测新技术将不断朝着简便、快速、灵敏、标准的方向发展,以其明显优势处于生物检测的前沿。

1975, 78:145-150.

- [9] 骆建新, 伍莉萍, 杨秀岑, 等. 流动注射免疫分析技术的研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2001, 21(1):64-66.
Lu Jian-xin, WU Li-ping, YANG Xiu-chen, et al. The progress on the research of flow-injection immune analytical technique [J]. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2001, 21(1):64-66. (in Chinese)
- [10] Alexandra E Botchkareva, Fabiana Fini, Sergei Eremin, et al. Development of a heterogeneous chemiluminescent flow immunoassay for DDT and related compounds [J]. **Anal Chim Acta**, 2002, 453:43-52.
- [11] KE Zhong-liang, WEI Jun-mu. Flow-Injection immuno-bioassay for interleukin-6 in humans based on gold nanoparticles modified screen-printed graphite electrodes [J]. **Analytica Chimica Acta**, 2006, 580:128-135.
- [12] 钱昌顺. 流动注射-时间分辨荧光联用检测 CEA [J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(2):38-39.
Qian Chang-sun. The detection of CEA by flow-injection & time-resolved fluorescence immunoassay [J]. **Journal of Medical Laboratory Medicine**, 2005, 20(2):38-39. (in Chinese)
- [13] 郑晓冬, 何丹. 食品中农药残留免疫检测技术的研究进展 [J]. 中国食品学报, 2006, 2(6):88-95.
ZHENG Xiao-dong, HE Dai. The progress on the research of immunoassay for pesticide residue in food [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2006, 2(6):88-95. (in Chinese)
- [14] Agustina Gómez Hens, Juan Manuel Fernández-Romero. The role of liposomes in analytical processes [J]. **Trends in Analytical Chemistry**, 2005, 24(1):9-20.
- [15] Katie A Edwards, Anje J Baeumner. Liposomes in analyses [J]. **Talanta**, 2006, 68:1421-1431.
- [16] 黄光秀. 总补体(CH50)活体溶血检测法与脂质体免疫检测法的评价 [J]. 国际医药卫生导报, 2004, 10(2):65-66.
HUANG Guang-xie. Evaluation of haemolysis assay in vivo & liposome immunoassay of complement(CH50) [J]. **International Medicine & Health Guidance News**, 2004, 10(2):65-66. (in Chinese)
- [17] Yoichi Kumada, Masumi Maehara, Naoki Minami, et al. Colony lifts immunoassay utilizing antibody-coupled liposome encapsulating HRP [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2006, 29:98-102.
- [18] Mirhabibollahi B, Brooks J L, Kroll R G. A semi-homogeneous amperometric immunosensor for protein A bearing staphylococcus aureus in foods [J]. **App Lied Microbiology and Biotechnology**, 1990, 34(2):242-247.
- [19] 温志立, 汪世平, 沈国勋, 等. 免疫传感器的发展概述 [J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(4):642-646.
WEN Zhi-li, WANG Si-ping, SHENG Guo-li, et al. A summary description of development in immunosensor [J]. **Journal of Biomedical Engineering**, 2001, 18(4):642-646. (in Chinese)
- [20] Sook Jin Kim, Vengatajalabathy Gobi K, Ryohei Harada, et al. Miniaturized portable surface plasmon resonance Immunosensor applicable for on-site detection of low-molecular-weight analytes [J]. **Sensors and Actuators B**, 2006, 115:349-356.
- [21] Chris Rowe Taitt, Yura S Shubin, Roselina Angel, et al. Detection of salmonella enterica serovar typhimurium by using a rapid, array-based immunosensor [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, 7(1):152-158.
- [22] Christopher D Corso, Desmond D Stubbs, Lee Sang-Hun, et al. Real-time detection of mesothelin in pancreatic cancer cell line supernatant using an acoustic wave immunosensor [J]. **Cancer Detection and Prevention**, 2006, 30(2):180-187.
- [23] ZENG Hui, WANG Hua, CHEN Fang-ping, et al. Development of quartz-crystal-microbalance-based immunoassay array for clinical immunophenotyping of acute leukemias [J]. **Analytical Biochemistry**, 2006, 351(1):69-76.
- [24] TAO Ger-j, Mark T Morgan, Arun K Bhunia. Detection of low levels of *Listeria monocytogenes* cells by using a fiber-optic Immunosensor [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, 70(10):6138-6146.
- [25] 郭丰峰, 赵广英. 免疫传感器在食品检测中的应用及相关思考 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(7):98-100.
XING Feng-feng, ZHAO Guang-ying. The application of immunosensor in food detection and its interrelated consideration [J]. **Food Research and Development**, 2006, 27(7):98-100. (in Chinese)
- [26] 王磊磊, 方晖, 曾庆音, 等. 压电晶体传感器阵列在补体系统免疫分析中的应用 [J]. 分析科学学报, 2001, 17(5):358-363.
WANG Lei-lei, FANG Hui, ZENG Qing-yin, et al. Detection of complement factors using piezoelectric immunosensor array [J]. **Journal of Analytical Science**, 2001, 17(5):358-363. (in Chinese)
- [27] Hulse R E, Kunkler P E, Fedynyshyn J P, et al. Optimization of multiplexed bead-based cytokine immunoassays for rat serum and brain tissue [J]. **Journal of Neuroscience Methods**, 2004, 136:87-98.

(责任编辑:秦和平)