

安培免疫传感器快速临床检测的新方法

江苏省肿瘤医院检验科(南京 210009) 严桂凤*综述
 南京大学化学系(南京 210093) 鞠焯先**审校

摘要 电化学安培免疫传感器是近十多年来发展起来的一种具有很好应用前景的免疫检测方法。它具有许多优越性能,自动化程度较高,因而已成为临床化学和电分析化学研究的前沿领域。本文介绍了这类传感器的分析原理及其构造,总结了近年来的研究成果,对它们在临床免疫检测中的应用及其前景作了综述。

关键词 安培传感器;临床免疫检测;电化学分析

自从本世纪 50 年代末 Berson 等将免疫学的研究成果用于分析目的以来^[1],免疫分析已被广泛用于生物化学、临床化学和环境监测,免疫反应的高选择性使这类技术可直接进行血样及尿样中复杂成分的分析,并成为现代临床检验中常用的手段。通过与可检测的标记物及生物催化过程联用,其检测灵敏度可得到很大提高,因而,该法的临床应用日益广泛。

将抗体用于化学免疫传感器的制备已有十多年的历史^[2],它是通过抗体-抗原反应的内在性质与灵敏的传导过程结合而获得的一种小型化的分析器件,可选择性地检测底物并提供与浓度成比例的响应信号,在临床诊断中具有很诱人的前景。有关研究成果在文献^[3,4]中已有全面的综述。本文集中介绍近年来发展较迅速的安培电化学免疫传感器及其临床应用,这种传感器用抗体或它们的相应结合物(抗原或半抗原)作为生物识别单元并与电化学传导系统(伏安电极)联用,发挥了免疫反应的高选择性和电化学安培检测的高灵敏度及仪器简易、价格低廉且可避免放射性危害的优势,因而它是生物传感器中具有较好应用前景的前沿研究领域。

根据检测信号的传输方式,安培电化学免疫传感器可分为两大类型:即利用免疫结合过程(抗体-抗原反应)的直接免疫传感器和通过免疫结合过程使检测对象(酶及电活性探头)浓度发生变化的间接免疫传感器。这两类传感器均可用于均相和异相免疫测量。另外,还有一种不需任何分离的准均相免疫测定系统,其中主要的免疫反应发生在电极表面。

1 安培免疫传感器的临床检测原理及过程

1.1 均相安培免疫传感器 这类传感器通常用酶作为标记物,在溶液中含有酶反应的底物,它的产物是电活性的,在电极上可产生电化学信号。当标记的抗原与抗体反应形成免疫结合物时,酶的活性点被

屏蔽,底物部分或完全不能接近这些活性点,从而导致酶催化速率及检测信号的变化。在免疫竞争平衡过程中,随着待测样中抗原浓度的增加,更多的标记抗原游离出来,响应电流增加,酶的放大作用提高了检测灵敏度。例如用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记 phenytoin,溶液中含有一定量的抗 phenytoin 抗体和 NAD⁺,安培法测定生成的 NADH 浓度可检测血样中 phenytoin 的浓度。用电活性物质直接标记抗原,免疫反应使电活性点受到屏蔽或标记物的扩散系数发生变化导致标记电流信号的降低。这类传感器利用竞争免疫反应进行测定,无需分离,大大简化了测试手续,缩短了分析时间。

1.2 异相直接安培免疫传感器 将电活性或酶标记的抗体(或抗原)直接固定在一个伏安电极表面,在电极上产生伏安电流。固定化的抗体(或抗原)与溶液中抗原(或抗体)发生免疫反应导致了检测信号的变化。这种变化与待测样本中的抗原(或抗体)浓度成正比关系。电活性或酶标记的抗体(或抗原)的固定化常用包埋和吸附法,近年来在金或铂基自组装单层上进行共价连接已显示出诱人的前景^[5]。这类传感器不需分离和免疫竞争过程,因而具有更快的检测速度,用于 HSA 和 thaumatine 的检测仅需 3 分钟^[6]。Suleiman^[7]将辣根过氧化物酶标记皮质醇抗体固定在 IAV 膜上,然后将该膜安装在氧电极上,在十分钟内测定了血浆中皮质醇的含量。然而,这一方法易受样品中电活性小分子的干扰,而且灵敏度尚需进一步的改善。

1.3 异相间接安培免疫传感器 异相免疫传感器的间接测定是近年来发展较为迅速的研究方向,其分析过程涉及洗涤步骤,因而耗时较上述方法稍长,但它具有更好的抗干扰能力,通过酶的生物放大或电子传递中间体的电催化可进一步提高检测灵敏度。这类传感器通常采用夹心法和竞争法进行测定。首先是将抗体(抗原)固定到电极表面制得免疫电

* 作者简介:严桂凤 1965 年出生,检验师,1986 年起在江苏省肿瘤医院检验科工作,目前主要从事临床免疫检测。

** 鞠焯先 1964 年生,教授,1992 年获南京大学博士学位后留校工作,1996 年 1 月~1997 年 7 月为加拿大 Montreal 大学博士后,从事电化学生物传感器和电化学分析研究。

极。竞争型方法是将免疫电极浸入含有待测抗原(抗体)及酶标记抗原(抗体)的溶液进行孵化,洗涤后再在含标记酶反应的底物中进行反应,测定反应产物在电极上产生的电流响应,电流的大小与待测抗原(抗体)的浓度成反比。夹心法是将免疫电极浸入仅含待测抗原(抗体)的溶液中进行孵化,洗涤后再插入含酶标记抗体(抗原)的溶液中,反应后进一步洗涤并插入含酶反应底物的溶液中,测定酶反应产物在电极上产生的电流信号,电流的大小与待测抗原(抗体)的浓度成正比。

抗体(抗原)在电极上的固定既可用包埋、吸附、化学衍生等方法直接在电极上进行,也可先将它固定在某一膜上,然后将膜包在电极(如氧电极)表面。

Nakanishi 等^[9]将固定有蛋白质 A(抗人血清白蛋白)的活化聚丙烯膜扎在 Pt 电极上,通过竞争法测定了人血清白蛋白。Cooper^[10]提出了一种可同时测定血样中促卵泡激素(FSH)和促黄体发生激素(LH)的多功能免疫传感器,中间体二茂铁的电催化使其检测限达 2.1U/L FSH 和 1.8U/L LH。Smyth^[10]将抗生物素共价键合在作为电子传递中间体的 Os-PVP₁₀膜上,利用 HRP 标记生物素和未标记生物素间的竞争提出了生物素的免疫测定方法。用 HRP 标记抗体的夹心法测定人血中 nmol/L 级 IgM 的免疫传感器也有报道^[11]。

表 1 近五年中安培免疫传感器的临床应用实例(1992~1997)

分析对象	介质	检测范围	耗时/分	标记物	检测物	方法
白蛋白	尿样	0.5~100mg/L	30	HAS-GOD	H ₂ O ₂	竞争法
Apolipoprot	血清	50~1000μg/L	120	Ab-ALP	PAP	夹心法
HCG	血清	20~10 ⁶ IU/L	75	hCG-H ₂ O ₂	O ₂	竞争法
HCG	尿样	150~2500IU/L	20	MAB ₂ -GOD	H ₂ O ₂	夹心法
HCG	血样	2.5~70IU/L	30	MAB ₂ -ALP	PAP	夹心法
皮质醇	血浆	10 ⁻⁷ ~10 ⁻⁵ mol/L	10	Ab-H ₂ O ₂ 酶	O ₂	直接法
皮质醇	血清	30~70μg/L	20	皮质醇-ALP	PAP	竞争法
FSH	血清	2.1~100U/L	170	Ab-HRP	H ₂ O ₂	夹心法
LH	血清	1.8~100U/L	170	Ab-HRP	H ₂ O ₂	夹心法
LH	血清	1~200μg/L	5	GOD/POD	I ₂	夹心法
HFABP	血清	5~80μg/L	27	Ab ₂ -GOD	O ₂	夹心法
IgE	血清	2~340μg/L	10	Ab-POD	I ₂	夹心法
前列腺素	血清	0.4~30μg/L	30	MAB ₂ -ALP	PAP	夹心法
甲状腺素	血清	30~1000μg/L	30	Ab ₂ -ALP	PAP	夹心法
TSH	血清	0.2~100mIU/L	30	ADH/NADH OD	H ₂ O ₂	竞争法
TSH	血清	10~200mIU/L	120	ALP/POD	H ₂ O ₂	夹心法
TSH	血清	0.0018~1mIU/L	90	MAB ₂ -β-GAL	O ₂	夹心法
苯异丙氨	血清	0.3~130μg/L	70	二茂钴	二茂钴	竞争法
地谷辛	血清	0.01~1μg/L	25	地谷辛-ALP	PAP	竞争法
Phenytoin	血清	2.5~100μg/L	70	二茂钴	二茂钴	竞争法

1.4 准均相无分离间接安培免疫传感器 无需分离和洗涤的免疫传感模式大大简化了免疫传感器的实际应用,将两种酶同时固定在电极上可方便地实现这一目标。其中一种酶与抗体一起固定在电极表

面,另一种酶键合在第二抗体上。在电极上,第一种酶的反应产物直接作为标记酶的底物,因而第二种酶的底物不需从溶液中扩散过来,从而大大增加了反应速率,提高了灵敏度。这种传感器的检测过程中用 Ivnitiski 提出的方法来描述^[12]:先用聚乙撑亚胺

将 GOD 固定在石墨电极上,它与葡萄糖反应的产物(H_2O_2)立即在电极上与夹心免疫结合物标记酶 HRP 一起氧化 I⁻,生成的 I₂ 立即在 -70mV 下还原而产生电流信号。这一零扩散障碍过程比在溶液中速度更快,从而可将电极表面的酶标抗体与溶液中未结合的酶标抗体区分开来。利用这一原理制备的安培免疫传感器已用于促甲状腺激素(TH)的测定^[13]。

2 安培免疫传感器的再生及微型化

免疫传感器的重复使用可降低检测成本,也是自动化测定的必要条件。有几种方法使安培免疫传感器再生。最容易的方案是利用一定的条件(如碱、酸、Chaotropic 试剂或高浓度盐等)打破 Ab-Ag 免疫结合键,然而,这一方法有时会使传感器失活。近年来提出的一些方法可克服这一缺点:(1)第一抗体与半乳糖苷酶键合后的产物可与 4-氨基硫酚-β-吡喃半乳糖甙可逆地结合。将后者用膜固定在电极表面,用过氧化氢酶标记第二抗体进行测定,测定结束后将电极在 pH10 的硼酸中洗去整个免疫结合物可使电极再生。这一方法已用于 AFP 的连续测定^[14]。(2)第一抗体直接吸附在玻碳电极上,测定结束后在硝酸中阳极氧化可除去免疫结合物而使电极表面更新^[15]。(3)将蛋白 A 键合在电极表面,利用抗体与蛋白 A 的可逆结合在完成测定后用酸液洗去整个免疫结合物^[16]。(4)将光学异构单元键合在抗原上,其构形可与 Ab 形成复合物产生信号,测定结束后光照,形成另一种构形而使其再生^[5]。(5)将抗原与石墨粉及环氧树脂一起制成刚性导电生物材料用于传感器制备,在免疫测定后通过抛光使其再生^[17]。

电化学生物传感器一个最显著的特点是它可进一步微型化,利用蚀刻(薄膜)技术已获得微型多功能的安培免疫器件^[9]。这方面的工作尚有待进一步发展。

3 临床应用

安培免疫传感器在临床检测中已得到广泛应用,在近五年中有不少报道,表 1 列举了一些应用实例。

4 结 语

安培免疫传感器是免疫检测的一种新技术,它可方便地用于临床检测,并且有耗费低廉、检测迅速(有的项目仅需几分钟)等优点,克服了经典免疫检

测方法中存在的缺陷。利用生物催化循环,其灵敏度可进一步得到提高^[18],经过技术上的改进,在检测过程中可无需分离,大大简化了测试步骤;同时,安培探头的再生和可微型化的特点增强了在线检测和自动化控制能力。因此,可以预见,经过人们的不断努力和探索,安培免疫传感器在不远的将来将成为临床免疫检测的主要方法之一,具有巨大的应用潜力。

参考文献

- 1 Berson SA, Ralow RS. Ann NY Acad Sci, 1959; 82: 338
- 2 North J. Trends Biotechnol, 1985; 3: 180
- 3 Aizawa M. Adv Clin Chem, 1994; 31: 247
- 4 Mogran CL, Newman DJ, Price CP. Clin Chem, 1996; 42: 193
- 5 Blonder R, Katz E, Cohen Y, et al. Anal Chem, 1996; 68: 3151
- 6 Sadik OA, John MJ, Wallace GG, et al. Analyst, 1994; 119: 1997
- 7 Xu Y, Suleiman AA. Anal Lett, 1997; 30: 2675
- 8 Kaku S, Nakanishi S, Horiguchi K. Anal Chim Acta, 1993; 272: 213
- 9 Pritchard DJ, Morgan H, Cooper JM. Anal Chim Acta, 1995; 310: 251
- 10 Lu B, Iwuoha EI, Smyth MR, et al. Anal Chim Acta, 1997; 345: 59
- 11 Ghindilis AL. Biosens Bioelectron, 1997; 12: 415
- 12 Ivnitski D, Rishpon J. Biosens Bioelectron, 1996; 11: 409
- 13 McNeil CJ, Athey D, Ho WO. Biosens Bioelectron, 1995; 10: 75
- 14 Boitieux JL, Biron MP, Thomas D. Anal Chim Acta, 1989; 222: 235
- 15 Fernandez-Sanchez C, Costa-Garcia A. Biosens Bioelectron, 1997; 12: 403
- 16 Palmer DA, Edmonds TE, Seare NJ. Anal Lett, 1993; 26: 1425
- 17 Santandreu M, Cespedes F, Alegret S, et al. Anal Chem, 1997; 69: 2080
- 18 Bauer CG, Eremenko AV, Ehrentreich-Forster E, et al. Anal Chem, 1996; 68: 2453

(1998-05-20 收稿 1999-01-15 修回)

将 GOD 固定在石墨电极上,它与葡萄糖反应的产物(H_2O_2)立即在电极上与夹心免疫结合物标记酶 HRP 一起氧化 I⁻,生成的 I₂ 立即在 -70mV 下还原而产生电流信号。这一零扩散障碍过程比在溶液中速度更快,从而可将电极表面的酶标抗体与溶液中未结合的酶标抗体区分开来。利用这一原理制备的安培免疫传感器已用于促甲状腺激素 (TH) 的测定^[13]。

2 安培免疫传感器的再生及微型化

免疫传感器的重复使用可降低检测成本,也是自动化测定的必要条件。有几种方法使安培免疫传感器再生。最容易的方案是利用一定的条件(如碱、酸、Chaotropic 试剂或高浓度盐等)打破 Ab-Ag 免疫结合键,然而,这一方法有时会使传感器失活。近年来提出的一些方法可克服这一缺点:(1)第一抗体与半乳糖苷酶键合后的产物可与 4-氨基硫酚- β -吡喃半乳糖甙可逆地结合。将后者用膜固定在电极表面,用过氧化氢酶标记第二抗体进行测定,测定结束后将电极在 pH10 的硼酸中洗去整个免疫结合物可使电极再生。这一方法已用于 AFP 的连续测定^[14]。(2)第一抗体直接吸附在玻碳电极上,测定结束后在硝酸中阳极氧化可除去免疫结合物而使电极表面更新^[15]。(3)将蛋白 A 键合在电极表面,利用抗体与蛋白 A 的可逆结合在完成测定后用酸液洗去整个免疫结合物^[16]。(4)将光学异构单元键合在抗原上,其构形可与 Ab 形成复合物产生信号,测定结束后光照,形成另一种构形而使其再生^[5]。(5)将抗原与石墨粉及环氧树脂一起制成刚性导电生物材料用于传感器制备,在免疫测定后通过抛光使其再生^[17]。

电化学传感器一个最显著的特点是它可进一步微型化,利用蚀刻(薄膜)技术已获得微型多功能的安培免疫器件^[9]。这方面的工作尚有待进一步发展。

3 临床应用

安培免疫传感器在临床检测中已得到广泛应用,在近五年中有不少报道,表 1 列举了一些应用实例。

4 结 语

安培免疫传感器是免疫检测的一种新技术,它可方便地用于临床检测,并且有耗费低廉、检测迅速(有的项目仅需几分钟)等优点,克服了经典免疫检

测方法中存在的缺陷。利用生物催化循环,其灵敏度可进一步得到提高^[18],经过技术上的改进,在检测过程中可无需分离,大大简化了测试步骤;同时,安培探头的再生和可微型化的特点增强了在线检测和自动化控制能力。因此,可以预见,经过人们的不断努力和探索,安培免疫传感器在不远的将来将成为临床免疫检测的主要方法之一,具有巨大的应用潜力。

参考文献

- Berson SA, Ralow RS. *Ann NY Acad Sci*, 1959; 82:338
- North J. *Trends Biotechnol*, 1985; 3:180
- Aizawa M. *Adv Clin Chem*, 1994; 31:247
- Mogran CL, Newman DJ, Price CP. *Clin Chem*, 1996; 42:193
- Blonder R, Katz E, Cohen Y, et al. *Anal Chem*, 1996; 68:3151
- Sadik OA, John MJ, Wallace GG, et al. *Analyst*, 1994; 119:1997
- Xu Y, Suleiman AA. *Anal Lett*, 1997; 30:2675
- Kaku S, Nakanishi S, Horiguchi K. *Anal Chim Acta*, 1993; 272:213
- Pritchard DJ, Morgan H, Cooper JM. *Anal Chim Acta*, 1995; 310:251
- Lu B, Iwuoha EI, Smyth MR, et al. *Anal Chim Acta*, 1997; 345:59
- Ghindilis AL. *Biosens Bioelectron*, 1997; 12:415
- Ivnitski D, Rishpon J. *Biosens Bioelectron*, 1996; 11:409
- McNeil CJ, Athey D, Ho WO. *Biosens Bioelectron*, 1995; 10:75
- Boitieux JL, Biron MP, Thomas D. *Anal Chim Acta*, 1989; 222:235
- Fernandez-Sanchez C, Costa-Garcia A. *Biosens Bioelectron*, 1997; 12:403
- Palmer DA, Edmonds TE, Seare NJ. *Anal Lett*, 1993; 26:1425
- Santandreu M, Cespedes F, Alegret S, et al. *Anal Chem*, 1997; 69:2080
- Bauer CG, Eremenko AV, Ehrentreich-Forster E, et al. *Anal Chem*, 1996; 68:2453

(1998-05-20 收稿 1999-01-15 修回)