

## 评述与进展

## 荧光偏振免疫分析技术的研究进展

朱广华 郑 洪 鞠焜先\*

(南京大学化学系, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

**摘 要** 对荧光偏振免疫分析技术的研究进展作了详细的评述。介绍了荧光偏振免疫分析技术的基本原理和研究热点, 评述了它在临床检验、环境与食品监测和农药残留量分析等领域中的应用, 对荧光偏振免疫分析方法的优缺点作了总结, 引文献 45 篇。

**关键词** 荧光偏振, 免疫测定, 免疫标记, 评述

## 1 引 言

自 1954 年 Yallow 与 Berson 提出放射性标记免疫分析法以来, 免疫分析已成为生物化学、临床化学与环境监测等领域中一个非常重要的方法。放射标记免疫分析法具有灵敏度高、特异性强和使用范围广等突出优点, 但它存在放射危害、废物难处理和标记物不稳定等方面的问题。在放射标记免疫法的启示下, 相继发展了酶免疫法、化学发光免疫法、荧光免疫法和电化学免疫法等多种非放射性标记免疫分析方法。这些方法各具特点, 在实际应用中大都使用非均相免疫分析技术。非均相方法的灵敏度高、特异性强, 但因操作过程繁琐复杂而有很大的局限性。60 年代, Dandliker 开创性地建立了均相荧光偏振免疫分析方法 (fluorescence polarized Immunoassay 以下简称 FPIA), 并用该法详细研究了生物系统中抗原-抗体和激素-受体之间的作用<sup>[1,2]</sup>。但因仪器及灵敏度等多方面原因, 该方法一直未得到发展和推广。均相法的最大特点是: 结合和未结合的抗原或抗体不需物理分离过程即可直接测定, 使标记免疫分析更方便地实现自动化。80 年代初, Jolley 等对 FPIA 方法作了改进, 并将该法用于人体内治疗药物和毒物含量的测定<sup>[3-5]</sup>。近年来, 国外有关应用于临床检验、毒品分析、农药残留量分析、环境和食品监测等方面的 FPIA 方法的报道逐年增加, 各种方法相继建立并已逐步推广应用。

在仪器装置方面, FPIA 的研究也取得了很大的进展。早期因缺乏专门的荧光偏振光分析仪器, 荧光偏振光强度测定的精度和灵敏度不高。80 年代后期, Abbott 实验室推出了商品化的 IDx 系列荧光偏振光分析仪, 同时配有近百种分析试剂盒。90 年代后, 美国 Jolley Consulting and Research 公司又推出了更为先进的专用荧光偏振光分析仪, 这种仪器有自动化程度高、测量精度好和输入参数多等优点<sup>[6]</sup>。2000 年, Baker 等设计了双光路荧光偏振光分析仪<sup>[7]</sup>。这种仪器可以自动扣除背景干扰, 在对复杂生物样品进行测定时能获得更高的灵敏度和准确度。因而 FPIA 法广泛应用的时机已经成熟, 一旦仪器与试剂盒的价格降低, 该方法必然会成为生化分析和环境监测中的一种重要工具。

## 2 FPIA 方法的原理

### 2.1 荧光偏振的原理

荧光偏振的原理是 1920 年由 Perrin 建立的。这方面的详细论述可参见有关资料<sup>[6,8-10]</sup>, 其原理简要介绍如下。从光源发出的一束光线经垂直起偏器后成为垂直偏振光, 样品被垂直偏振光激发而产生偏振荧光, 此荧光经检偏器后可测出与样品浓度有关的水平或垂直方向的荧光偏振光强度。荧光偏振光强度 ( $P$ ) 定义为:

2002-06-15 收稿; 2002-09-23 接受

本文系江苏省社会发展基金 (No. BS2001063) 资助项目

$$P = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + I_{\parallel}) \quad (1)$$

其中,  $I_{\perp}$  和  $I_{\parallel}$  分别为荧光光子被激发后, 发射光在垂直和水平方向上的强度。荧光偏振光强度  $P$  是一个无量纲的指数, 荧光子在溶液中的  $P$  值在 0 ~ 1 之间。荧光偏振光强度  $P$  与测定体系中各因素的关系为:

$$(1/P - 1/3) = 1/P_0 + (1/P_0 - 1/3) (RT/V) (\tau/\rho) \quad (2)$$

其中,  $P_0$  为极限荧光偏振光强度,  $R$  为气体常数,  $T$  为绝对温度,  $V$  为摩尔分子体积,  $\tau$  为荧光寿命,  $\rho$  为溶液的粘度。从式(2)可知, 对于荧光寿命一定的物质, 降低温度、增大分子体积和增加溶液粘度都会使  $P$  值变大。当溶液的温度和粘度都固定时,  $P$  值主要取决于荧光子的分子体积。由于荧光偏振光强度与荧光物质受激发时分子转动速度成反比, 所以小分子物质在溶液中旋转速度快,  $P$  值较小; 大分子物质在溶液中旋转速度较慢,  $P$  值较大。

## 2.2 荧光偏振免疫技术的原理

荧光偏振免疫技术中偏振光强度的变化如图 1 所示。荧光标记的小分子抗原在溶液中旋转速度快, 荧光偏振光强度小。当荧光标记的小分子抗原与其相应抗体结合后, 所形成的大分子在溶液中旋转速度变慢, 荧光偏振光强度增大。FPIA 方法依据荧光标记抗原和其抗原抗体结合物之间荧光偏振程度的差异, 用竞争性方法直接测量溶液中小分子的含量。例如, 将荧光素标记的小分子药物、含待测未标记的小分子药物的人体液及该小分子药物的抗体混和, 若体液中待测未标记的小分子药物浓度低, 则标记的药物分子与抗体结合的就多, 由于抗体分子大, 所形成的荧光素标记的药物分子与抗体的结合物体积亦大, 旋转减慢, 荧光偏振光强度就高。反之, 荧光偏振光强度就低。利用这一原理, 用标记药物的浓度与对应的荧光偏振值做工作曲线, 便可进行定量分析。另外, FPIA 方法不仅能检测抗原, 也能对抗体进行检测。

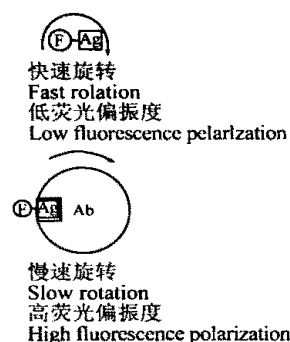


图 1 方法原理示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the principle of fluorescence immunoassay

## 3 FPIA 方法研究中的新技术

### 3.1 置换 FPIA 方法

置换 FPIA 方法将示踪剂与抗体在溶液中预先平衡。在样品加入后, 作为直接的免疫反应物(抗原), 从示踪剂与抗体的结合物中置换出示踪剂<sup>[11]</sup>。通过对置换出的示踪剂的测定, 可以换算出样品的浓度。在这种方法中, 所选择的抗体和示踪剂必须具有较大的离解常数, 荧光偏振光强度的变化取决于样品中分析物的浓度和置换时间。对于半定量分析, 2 ~ 3 min 孵育反应后即可获得分析结果, 而用比较精密的标准曲线法则需 15 ~ 30 min。Mel'nichenko 等用置换 FPIA 方法检测一些杀虫剂, 获得了满意结果<sup>[12]</sup>。

### 3.2 停流 FPIA 方法

影响 FPIA 方法灵敏度的一个主要因素是散射光和样品基底带来的背景信号较高, 采用停流 FPIA 技术可以有效地克服这一缺点。通常抗原和抗体反应非常迅速, 因而可用停流 FPIA 技术检测抗原和抗体起始反应时所产生的信号, 这样就降低了背景信号和由样品基底带来的干扰, 使方法的灵敏度提高 10 倍左右。另外, 停流 FPIA 技术是在反应物混合后的较短时间内进行测量的, 易于实现自动化控制, 能对大批量样品进行迅速检测。近来已有人把停流 FPIA 技术用于治疗性药物、饮料和水质检测<sup>[13-15]</sup>。如 Eremin 等用停流 FPIA 技术测定了河水、葡萄汁和白酒中的 2,4-二氯苯氧乙酸<sup>[15]</sup>, 方法的检出限为 4 μg/L, 检测范围为 10 ~ 1000 μg/L, 回收率为 92 % ~ 110 %。与传统 FPIA 方法相比, 测定灵敏度有所提高, 每个样品的测定时间下降到数秒以内。

### 3.3 有机介质中的 FPIA 方法

表面活性剂溶解在非极性溶液中所形成的反相胶束系统, 能溶解抗体等生物活性物质。在此体系中, 胶束溶液的透明度好, 抗体的特异性也能保持。Matveeva 等研究了杀虫剂莠去津和 2,4-D 在反相胶束溶液中的检测结果, 指出 FPIA 方法在有机介质中的测定灵敏度与在水溶液中的基本一致, 其优点在

于利用有机介质可以测定许多不溶于水的物质<sup>[16]</sup>。

另一个有前景的方法是用水与可混溶性有机溶剂如甲醇、己腈混合来提取样品。如 2,4,5-T 杀虫剂<sup>[17]</sup>在水-可混溶性有机溶剂中抗原抗体特异性反应的耐受性提高 10%。因此,对于食品和环境等中的复杂样品,可以先用有机溶剂提取,然后用 FPIA 法在有机溶剂中直接检测。

### 3.4 FPIA 方法用于金属离子的测定

Reardan 等发现,EDTA 和三价镧离子络合后再与牛血清白蛋白偶联,产物免疫动物后所得抗体能特异性地结合三价镧离子,并用 ELISA 法测定了三价镧离子<sup>[18]</sup>。Johnson 等用 FPIA 方法成功地测定了二价钙离子的含量<sup>[19]</sup>。方法的检出限低于 1 nmol/L,线性范围在 0~100 nmol/L 之间,其它金属离子基本没有干扰。相对于 ELISA 法,方法的检出限和线性范围都有所提高。而且检测是在均相水溶液中进行,测试速度快、重现性好,易于大批量样品的检验。与传统的原子吸收分光光度法相比,FPIA 方法能测定复杂体系中不同价态的金属离子,而且便携式 FPIA 仪器可以使 FPIA 方法更适合于现场分析。

## 4 荧光偏振免疫测定技术的应用

### 4.1 临床医学检验

由于血液和体液组成复杂,样品在测定时背景干扰较大,利用标记免疫分析法的高特异性进行选择性地测定已成为生物样品分析的重要手段。现代临床药理学研究表明,治疗性药物在血液中的浓度与其药效和毒副作用密切相关。血药浓度只有在一定的范围内才对疾病有治疗作用,低于这一范围疗效不显著;高于这一范围则会出现毒副作用。由于个体差异的影响,每个人对于特定药物的吸收和代谢速度都有所不同。因此,针对个体制定给药方案就变得尤为重要。这就需要对血浆和其他体液中的药物及其代谢产物的浓度进行测定。快速、廉价和特异性好的 FPIA 方法很适合于检测生物体内微量药物的浓度。目前,临床用 FPIA 方法对血清中的苯巴比妥<sup>[20,21]</sup>、丙米嗪<sup>[22]</sup>、甲状腺素<sup>[23]</sup>、黄体脂酮<sup>[24]</sup>、地高辛<sup>[25]</sup>和环孢菌素<sup>[26]</sup>等多种药物进行检测。如在测定血清中的环孢霉素时,方法的最低检出限可达 5  $\mu\text{g/L}$ ,测定范围在 15~1000  $\mu\text{g/L}$ ,批内 CV 为 3.6%~4.5%,批间 CV 为 5.6%~6.6%。FPIA 方法还可以快速检测血清中的牛结核杆菌胞外蛋白 MPB 70<sup>[27]</sup>和流产布鲁氏菌<sup>[28,29]</sup>所对应的特异性抗体。这一方法也应可以用于其它感染性疾病的诊断,尤其是那些能致使宿主发生抗体反应的物质。

### 4.2 食品分析和环境监测

FPIA 在农作物生产中,农药及其它生物毒性物质的应用日益广泛,然而,它们对于 FPIA 食品和环境污染以及对人类健康造成的负面影响也随之上升。因此,对它们的检测也日趋重视,且分析方法必须简单、快速、可靠和经济。农药分析过去常采用色谱法分离检测,操作烦琐,成本较高。最近 10 年来,标记免疫测定法在农药检测方面的重要性和可行性有了显著的提高,而荧光偏振免疫检测技术既简单、快速,又准确度较高,因而在食品分析与环境监测中的应用逐渐增加。Colbert 等最先将 FPIA 方法用于杀虫剂的检测<sup>[30]</sup>。他们用美国 Abbott 公司的 IDx 分析仪检测了血清样品中的百草枯,方法的检出限为 1.5 ng,线性范围为 0.025~2 mg/L。用 FPIA 方法测定 2,4-二氯苯氧乙酸<sup>[31~33]</sup>也有一些报道,其中 Rogers 等用便携式荧光偏振仪测定了海水和生活用水中的 2,4-二氯苯氧乙酸,测定方法快速(7~15 min)、简单。Eremin 研究小组成功地应用 FPIA 方法对多种杀虫剂进行了分析<sup>[33~36]</sup>。如测定 2,4,5-三氯苯氧乙酸的检出限为 4 ng,线性范围在 0.2~10 g/L;测定西玛三嗪的检出限可达 0.15 ng,线性范围在 0.001~1.0 mg/L。Maragos 等建立的玉米中马梭菌毒素的 FPIA 测定方法,检出限为 0.5 ng,线性范围在 0.5~20 mg/L,回收率为 93.7%。该法的测定结果与 HPLC 方法的比较吻合( $R=0.97$ ),而测定过程相对简单、快速<sup>[37]</sup>。

### 4.3 毒品检验

FPIA 方法在毒品检验方面也得到了较多的应用。Kraemer 等测定了尿液中的安非太明及其代谢物的含量<sup>[38]</sup>,安非太明的检出限为 50  $\mu\text{g/L}$ ,测定结果与 GC-MS 方法基本一致。Williams 等测定了血液和尿液中的可卡因及其代谢物的含量<sup>[39]</sup>,方法简单、快速。Tsatsakis 等测定了头发样品中的二苯基海因<sup>[40]</sup>,并与 HPLC 方法作了对照,两种方法的分析结果非常接近( $R=0.987$ )。

#### 4.4 生物酶含量及活性测定

在测定酶的活性及酶的含量时,方法的原理与前述 FPIA 方法稍有不同。蛋白质、DNA、RNA 和淀粉等与荧光标记物结合后,有较大的荧光偏振光强度;结合物经蛋白酶、DNA 酶、RNA 酶和淀粉酶酶解后,偏振光强度下降,由此可对酶的活性及含量进行监测。实际上,只要荧光物质及其载体结合后所形成分子的体积发生变化,就可以使用荧光偏振技术进行测定。Maeda 等<sup>[14]</sup>先将异硫氰酸荧光素与不同的蛋白质载体如纤维蛋白、免疫球蛋白和核糖核酸酶等结合,然后用不同浓度的胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和链蛋白酶等对标记后的载体进行酶解。由于酶解作用,荧光偏振光强度随时间的延长线性下降。Abbott 实验室将淀粉用荧光素标记后再用淀粉酶酶解,根据酶解反应前后荧光偏振度的变化,建立了血清和尿液中淀粉的快速测定方法<sup>[42]</sup>。Schade 等用异硫氰酸荧光素标记一种底物,该底物能被霍乱杆菌所产生的蛋白酶酶解,经短时间(4 min)孵育培养后,不需将菌体分离即可测定细菌总数<sup>[43]</sup>。

## 5 结 论

作为一种均相标记免疫分析技术,FPIA 方法与其它非均相标记免疫方法相比具有显著的优点: 抗原抗体间的反应和样品分子的测定在溶液中进行,避免了固相标记过程中反复多次的洗涤步骤,易于实现自动化控制和提高分析方法的精度,FPIA 方法的相对标准偏差(CV)一般可控制在 3%~5% 之间;(2) 检测过程仅需样品、示踪剂和抗体的加入和混匀,数分钟甚至数秒钟孵育后即可测定荧光偏振光强度,方法的测定速度快,有利于大批量样品的分析测试;(3) 因为荧光偏振不受内滤作用的影响,对于有颜色和浑浊的溶液仍能很好地完成检测任务;(4) 不需要使用放射性同位素,避免了污物不易处理的难题。

FPIA 方法的主要局限性在于:(1) 依据荧光偏振光强度测定的 Perrin 公式,FPIA 方法局限于测定分子量小于 160KD 的抗原,但近来有人尝试用长寿命荧光标记物如钆的络合物<sup>[44]</sup>或合成多肽<sup>[45]</sup>来测定大分子量的蛋白质;(2) FPIA 法的检出限一般在 0.1~10 ng 之间,其灵敏度低于 ELISA 法;(3) 对于不同的抗原,首先要制备或得到相应的单克隆或多克隆抗体,这一过程影响了 FPIA 方法的发展。

## References

- 1 Dandliker W B , Feigen G A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **1961** , 5 :299 ~ 304
- 2 Dandliker W B , De Saussure G A. *Immunochemistry* , **1970** , 7 : 799 ~ 802
- 3 Jolley M E. *J. Anal. Toxicol.* , **1981** , 5 :236 ~ 240
- 4 Jolley M E , Stroup S D , Schwenzler K S , Wang C L , Lur Steffes M , Hill H D , Popelka S R , Holen J T , Kelso D M. *Clin. Chem.* , **1981** , 27 :1557 ~ 1579
- 5 Jolley M E , Stroup S D , Wang C L , Panas H N , Keegan C I , Schmit R L , Schwenzler K S. *Clin. Chem.* , **1981** , 27 :1190 ~ 1197
- 6 Sergei A E. *Food Technol. Biotechnol.* , **1998** , 36 :235 ~ 243
- 7 Baker G A , Pandey S , Bright F V. *Anal. Chem.* , **2000** , 72 : 5748 ~ 5752
- 8 Jameson D M , Sawyer W H. *Methods Enzymol.* , **1995** , 246 : 390 ~ 416
- 9 Weber G. *Adv. Protein Chem.* , **1953** , 8 :415 ~ 459
- 10 Nasir M S , Jolley M E. *Comb. Chem. & High Screen* , **1999** , 2 :177 ~ 190
- 11 Colbert D L , Smith D S , Landon J , Sidki A M. *Clin. Chem.* , **1984** , 30 :1765 ~ 1771
- 12 Mel 'nichenko O A , Eremin S A , Egorov A M. *Russ. J. Anal. Chem.* , **1996** , 51 :512 ~ 517
- 13 Gaikwad A , Gomez Hens A , Perez-Bendito D. *Anal. Chim. Acta* , **1993** , 280 :129 ~ 134
- 14 Perez-Bendito D , Gomez Hens A , Gaikwad A. *Clin. Chem.* , **1994** , 40 :1489 ~ 1495
- 15 Eremin S A , Matveeva E G , Gomez Hens A , Perez-Bendito D. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* , **1998** , 71 :137 ~ 146
- 16 Matveeva E G , Aguilar-Caballeros M P , Eremin S A , Gomez Hens A , Perez-Bendito D , *Analyst* , **1997** , 122 :863 ~ 867
- 17 Matveeva E G , Samsonova Zh V , Eremin S A. *Russ. J. Anal. Chem.* , **1995** , 50 :198 ~ 202
- 18 Rerdan D T , Meares C F , Godwin D A , McTigue M , David G S. *Nature* , **1985** , 316 :265 ~ 272
- 19 David K J. *Anal. Chim. Acta* , **1999** , 399 :161 ~ 172

- 20 Adamczyk M, Fishpaugh J R, Harrington C A. *Ther. Drug. Monit.*, **1994**, 16:577 ~ 582
- 21 Charlier C J, Plomteux, Guy J. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **2000**, 38: 615 ~ 618
- 22 Choi M J, Choi J, YOON D Y, Park J, Eremin S A. *Biol. Pharm. Bull.*, **1997**, 20:309 ~ 314
- 23 Choi M J, Choi J, Park J, Eremin S A. *J. Immunoassay*, **1995**, 16:263 ~ 278
- 24 Kell M J, Techman T. *J. Addict. Dis.*, **1996**, 15:69 ~ 76
- 25 Biddle D A, Datta P, Wells A, Dasgupta A. *Clin. Chim. Acta*, **2000**, 300:151 ~ 158
- 26 Hamwi A, Veitl M, Manner G, Ruzicka K, Schweiger C, Szekeres, T. *Am. J. Clin. Pathol.*, **1999**, 112:358 ~ 365
- 27 Gäll D, Nielsen K, Forbes L, Davis D, Elzer P, Olsen S. *J. Wildl. Dis.*, **2000**, 36:469 ~ 476
- 28 Levine L M, Michener M L, Toth M V, Holwerda B C. *Anal. Biochem.*, **1997**, 247:83 ~ 88
- 29 Jolley M E. *J. Biomol. Screen*, **1996**, 1:33 ~ 38
- 30 Colbert D L, Coxon R E. *Clin. Chem.*, **1988**, 34:1948 ~ 1953
- 31 Rogers K R, Köhl S D, Riddick L A, Gass T. *Analyst*, **1997**, 122:1107 ~ 1111
- 32 Garcia F S, Navas F A, Lovillo J. *J. Agri. Food Chem.*, **1993**, 41:2215 ~ 2221
- 33 Lukin Y V, Dokuchaev I M, Polyak I M, Eremin S A. *Anal. Lett.*, **1994**, 27:2973 ~ 2978
- 34 Eremin S A. *ACS Symp. Ser.* 586, Washington D C: Am. Chem. Soc. Publ., **1992**: 223 ~ 234
- 35 Eremin S A, Landon J, Smith D S, Jackman R. *Analyst*, **1994**, 119:2723 ~ 2729
- 36 Eremin S A, Samsonova J V. *Anal. Lett.*, **1994**, 27:3013 ~ 3018
- 37 Maragos C M, Jolley M E, Plattner R D, Nasir M S. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49:596 ~ 602
- 38 Kraemer T, Theis G A, Weber A A, Maurer H H. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, **2000**, 738:107 ~ 118
- 39 Williams R H, Maggiore J A, Shah S M, Erickson T B, Negrusz A. *J. Anal. Toxicol.*, **2000**, 24:478 ~ 481
- 40 Tsatsakis A M, Psillakis T, Paritsis, N. *J. Clin. Psychopharmacol.*, **2000**, 20:5605 ~ 73
- 41 Maeda H. *Anal. Biochem.*, **1997**, 247:83 ~ 88
- 42 Hofman M, Shaffar M. *Clin. Chem.*, **1985**, 31:1478 ~ 1487
- 43 Schade S Z, Jolley M E, Sarauer B J, Simonson L G. *Anal. Biochem.*, **1996**, 243:1 ~ 7
- 44 Lim M, Sugden E A, Jolley M E, Stilwell K. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **1996**, 3:438 ~ 443
- 45 Nielsen K, Gäll D, Jolley M, Leishman G. *J. Immunol. Methods*, **1996**, 195:161 ~ 167

## Development of Fluorescence Polarization Immunoassay

Zhu Guanghua, Zheng Hong, Ju Huangxian\*

(Department of Chemistry, State Key Laboratory of Coordination Chemistry,  
Nanjing University, Nanjing 210093)

**Abstract** Fluorescence polarization immunoassay (FPIA) is comprehensively reviewed with 45 references. The principle of FPIA and its applications in clinical medicine, food safety and environmental monitoring are introduced. The advantages and disadvantages of FPIA are also described.

**Key words** Fluorescence polarization, immunoassay, fluorescence labeling, review

(Received 15 June 2002; accepted 23 September 2002)