

目 录

第一章 蛋白质交联方法及其应用.....	1
第二章 配体结合分析中的蛋白质连接技术.....	17
第三章 单克隆抗体与毒素结合物的制备及应用.....	43
第四章 稀土元素标记免疫分析技术及应用.....	52
第五章 胶体金标记技术及其应用.....	70
第六章 蛋白质及多肽的放射性同位素标记.....	83
第七章 酶的固定化技术.....	94

第一章 蛋白质交联方法及其应用

仲伯华 奚雄麟

(军事医学科学院毒物药物研究所)

蛋白质交联系指将小分子物质(如药物、半抗原等)或大分子物质(如酶、蛋白毒素等)以共价键的方式连接于蛋白质分子,以制备人工抗原、酶标抗体、载体释放药物、抗体导向药物和免疫毒素等。随着放射免疫分析法、酶标免疫技术、载体药物学和导向药物学的发展,蛋白质交联技术的方法和手段也不断改进和完善,并且在生物学和医学领域得到愈来愈广泛的应用。

蛋白质交联方法首先发展于人工抗原的制备研究。自70年前Landsteiner第一次合成人工抗原以来,人们将许多没有抗原性的小分子物质(半抗原)如化学药物、神经递质和激素等与蛋白质或多糖等载体大分子共价结合,使其具备抗原性,以诱发动物产生特异性抗体,用于放射免疫分析等。为了使放射免疫分析达到灵敏度高、特异性强的要求,前人对半抗原和蛋白质连接的方法进行了大量的研究,建立了重氮化法、戊二醛法、混合酸酐法、二异氰酸酯法及卤代硝基苯法等交联技术。

近10多年来发展起来的酶标免疫检测技术,要求制备保持酶的生物活性和抗体的免疫结合活性的酶-抗体偶合物。常用的交联方法如戊二醛法、碳二亚胺法和混合酸酐法不可避免地要产生酶或抗体的自身交联产物或多聚物,致使交联效率降低、结合物活性减弱。为了克服这一不足,人们发展了异型双功能交联试剂,如N-羟基琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫)-丙酸酯,以实现控制交联,提高交联反应的选择性和交联产物的均一性。

将药物与大分子载体连接,制备药物-载体结合物,以改善和控制药物在体内的转运和代谢,实现缓释给药和定向给药,提高生物利用度和治疗指数。这是现代药物研究领域一个崭新的分支。载体药物必须能够在体内定量、定位释放原型药物,因此要求设计pH敏感或特定酶敏感的偶联键。

导向药物的发展对蛋白质交联方法提出了更高的要求。早在1906年,Ehrlich就提出了靶向给药的设想。随着生物医学的发展,这一设想不断得到具体的实现。单克隆抗体作为导向载体的出现,更使导向药物的研究成为当代药物研究中最活跃和最引人注目的领域之一,而其中研究得最广泛的是肿瘤治疗的抗体导向研究。其载体主要有针对肿瘤细胞表面相关抗原的抗体及其片段,肿瘤细胞表面受体的模拟配基。这些载体与药物或毒素分子连接而成的偶合物,能够选择性地杀伤肿瘤细胞,被誉为“生物导弹”。为了最大限度地保持导向载体和药物弹头的生物活性,同时实现最大的药物载运量,人们不断创新交联剂,改进交联方法,发展了一批新的各具特性的异型双功能交联剂,提高了导向药物的有效性和实用性。

随着新的交联试剂和交联方法的出现,使得放射免疫、酶标免疫和导向药物的研究不断深入;而后者的发展又反过来促进蛋白交联技术趋于成熟。目前的交联方法可以将任一个半抗原或细胞毒分子以一定方式与载体交联,获得所需的偶合物,下面分别介

绍蛋白质交联中常用的试剂、方法及其应用。

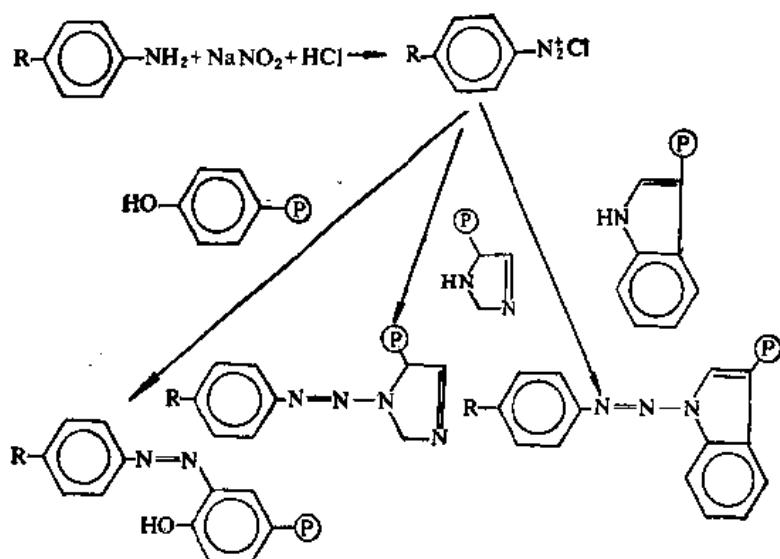
一、交联方法

一般说来，蛋白分子中可以用于交联的活性基团有游离氨基（如赖氨酸的 ϵ -氨基或末端氨基）、游离羧基（如天冬氨酸残基，谷氨酸残基及末端羧基）、苯基（苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸）、酚基（酪氨酸）、巯基（半胱氨酸）、羟基（丝氨酸或苏氨酸）、咪唑基（组氨酸）、吲哚基（色氨酸）或胍基（精氨酸）等。

为了避免蛋白质变性及其生物活性的损失，药物或半抗原等与蛋白的交联应采用具有中等反应活性的试剂，在温和的条件（如接近中性的 pH、室温、水溶液中）进行。

(一) 重氮化法

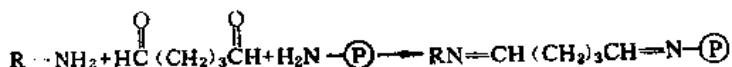
含芳香胺的化合物，可以与亚硝酸反应形成重氮盐，然后直接连接于蛋白质分子中酪氨酸残基上酚羟基的邻位，即得以偶氮键相联的结合物。这种重氮盐也能与组氨酸残基上的咪唑环或色氨酸残基的吲哚环反应：



本方法副反应较多，故一般限于人工抗原的制备。

(二) 戊二醛法

同型双功能交联剂戊二醛的两个醛基可以分别与两个相同或不同分子上的伯氨基形成Schiff 氏碱，将两分子以五碳链的桥连接起来。

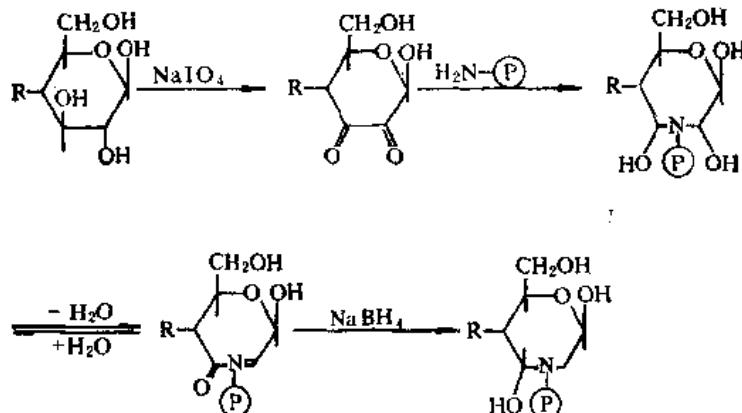


戊二醛连接反应是最温和的交联反应之一，可在 4~40℃ 温度范围，pH 6.0~8.0 的缓冲水溶液中进行，但是缓冲组份中不得含有氨基化合物。以硼氢化钠或氨基硼氢化钠还原 Schiff 氏碱可以形成稳定的单键；根据对偶联键的不同要求，还原步骤也可省略。

但是，本交联方法易形成相同蛋白间的连接，产物的均一性较差。因此，多用于酶标抗体的制备。

(三) 过碘酸盐氧化法^[1]

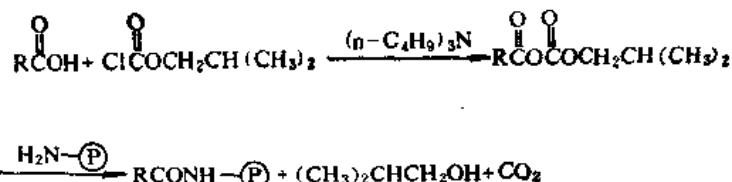
糖类或含糖基化合物分子中的邻二醇结构可被过碘酸钠氧化为醛基，然后与蛋白分子中的氨基形成 Schiff 氏碱：



与戊二醛的交联反应相似，过碘酸盐氧化法比较温和，可在常温和中性 pH 的条件下进行。这是一个两步反应，第一步生成醛基衍生物后，过量的过碘酸盐必须除去或消耗后，方可进行与蛋白交联的第二步反应。

(四) 混合酸酐法

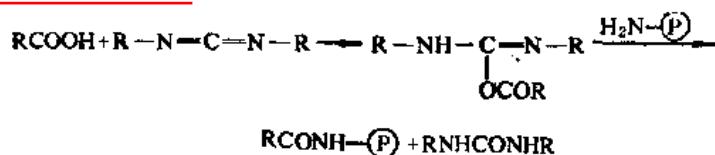
半抗原或药物及其衍生物分子中的羧基可以在三级胺存在下与氯甲酸异丁酯反应，生成活泼中间体混合酸酐，然后与蛋白载体上的伯氨基反应，形成酰胺交联键：



本反应过程简单，毋需制备和分离中间产物。

(五) 碳二亚胺法

碳二亚胺是一类很强的脱水剂，能使羧基和氨基脱水形成酰胺键。在反应时，一种分子中的羧基先与碳二亚胺反应生成一个加成中间产物，再与另一分子上的氨基反应形成酰胺键，实现两者的交联：

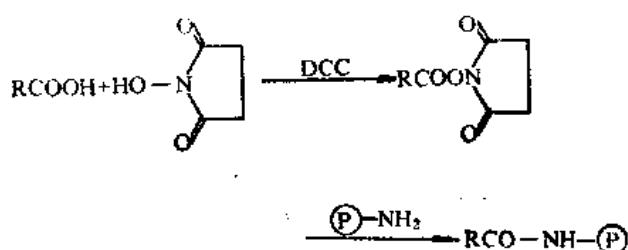


除戊二醛外，碳二亚胺是常见的另一类交联试剂，最早用于药物化学和有机化学领

域。脂溶性的二环己基碳二亚胺至今仍被广泛用于多肽合成领域，但其反应必须在有机溶剂中进行，不适用于蛋白质交联。水溶性的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC) 等的出现，使这一缩合反应成功地用于蛋白质交联中。本交联反应条件温和，即使在冷却 (0℃) 条件下，也能于中性 pH 中进行。但是，由于碳二亚胺的缩合反应没有选择性，易形成蛋白分子间的自身聚合，产生非均一性产物；先将含羧基的药物或半抗原分子与 EDC 反应，活化羧基后，再加入蛋白反应物，可以减少蛋白分子间的交联。

(六) 活泼酯法^[2]

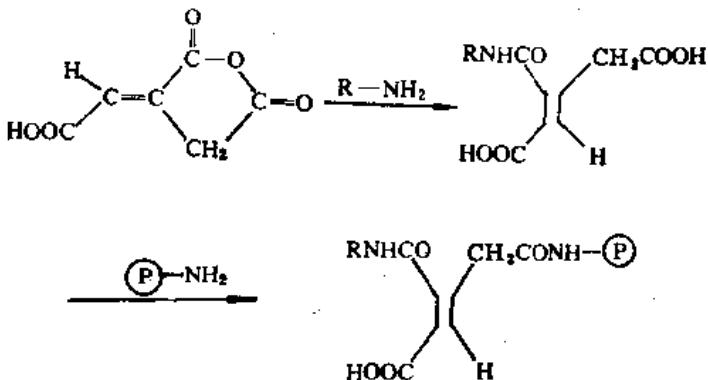
含有羧基的半抗原或药物在二环己基碳二亚胺 (DCC) 的作用下，与 *N*-羟基琥珀酰亚胺反应，生成活泼酯衍生物，后者与载体蛋白上的氨基反应，形成以酰胺键连接的偶合物：



本法是对碳二亚胺法的改进：由于避免了碳二亚胺对蛋白的直接作用，从而避免了蛋白分子间的交联。活泼酯法在导向药物的研究中得到广泛的应用。

(七) 多元酸酐法^[3]

半抗原或药物分子中的羟基或氨基与琥珀酸酐、顺-乌头酸酐等在无水吡啶催化下反应，形成单酯或单酰胺衍生物，引入游离羧基，然后以活泼酯法或碳二亚胺法与蛋白交联：

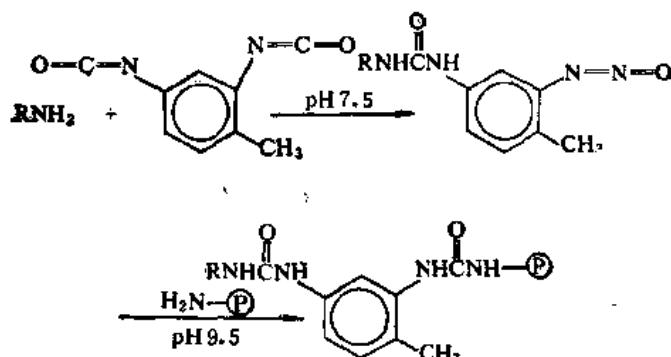


多元酸酐法可以十分方便地将小分子中的羟基或氨基转变为含游离羧基的衍生物，具有较广的应用范围。但是，与羟基形成的酯键在血浆中不稳定；而与氨基形成的酰胺键又往往不能充分降解，释放游离药物，影响导向药物的效价。有趣的是，药物通过顺-乌头酸与蛋白形成的偶合物，在中性 pH 介质（如血浆中）稳定，而在酸性 pH 介质中充分解离，释放活性药物。由此产生的溶酶体内降解性复合物，经细胞内化后，进入溶酶体内，在酸性条件下解离。

(八) 二异氰酸酯法

二异氰酸酯类双功能试剂中的两个异氰酸基分别与两个不同分子上的氨基反应，介

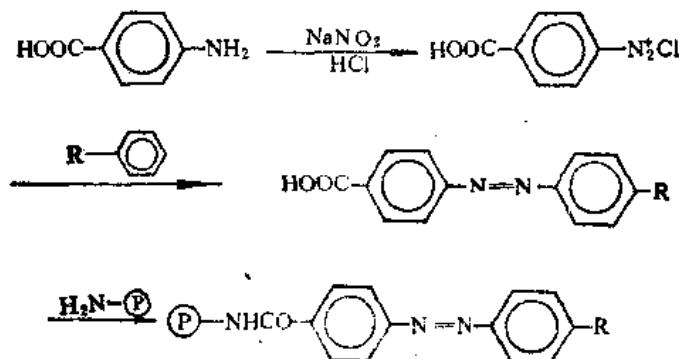
以不同碳链长度的桥将两者偶联:



这类试剂除了能与氨基反应形成取代脲外，(在 $\text{pH} > 7$ 时为主要反应)，尚能与羟基反应形成氨基甲酸酯衍生物；水溶液中的副反应(如第二个异氰酸酯基水解产生的胺，能与另一异氰酸酯分子连接)，可能通过疏水作用导致蛋白的聚合。

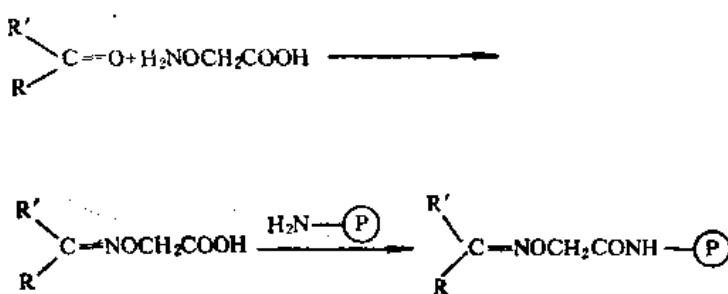
(九) 偶氮苯甲酸法

对氨基苯甲酸重氮化后，与带苯环的半抗原偶联引入羧基，再利用羧基的反应连接于蛋白上：



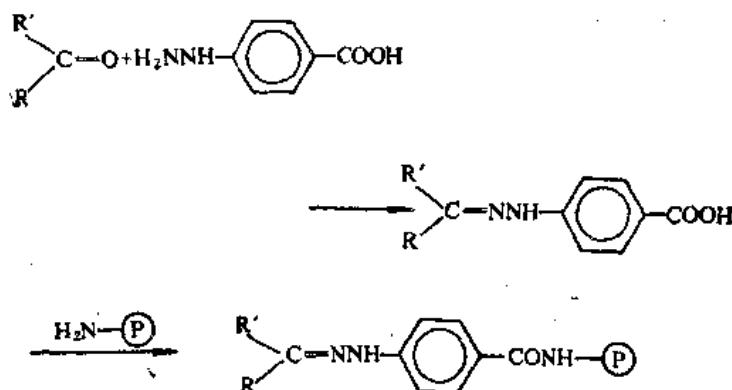
(十) O-羧甲基羟胺法

半抗原上的酮基与O-羧甲基羟胺反应，制备羧甲基肟衍生物。引入的羧基再与载体蛋白的氨基反应，形成半抗原-蛋白偶合物：



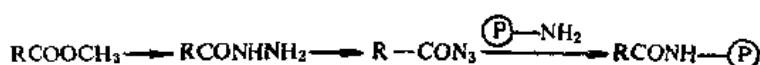
(十一) 对-肼基苯甲酸法

带酮基的半抗原也可以与对-肼基苯甲酸反应，引入羧基，再按常法与载体蛋白交联：



(十二) 叠氮化法^[4]

羧酸甲酯衍生物经肼解、亚硝化，转变为叠氮化物，再与载体蛋白上的氨基反应：



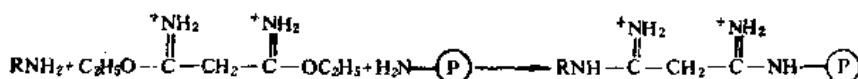
(十三) 氯乙酸钠法

半抗原的羟基与氯乙酸钠反应，形成羧甲基醚衍生物，再通过羧基与蛋白交联：



(十四) 亚胺酸酯法

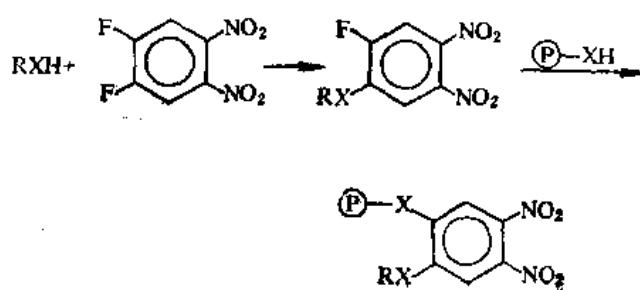
双功能试剂亚胺酸酯类如丙双亚胺酸二乙酯双盐酸盐可以与半抗原和载体蛋白的氨基交联，中间介以一个三碳桥：

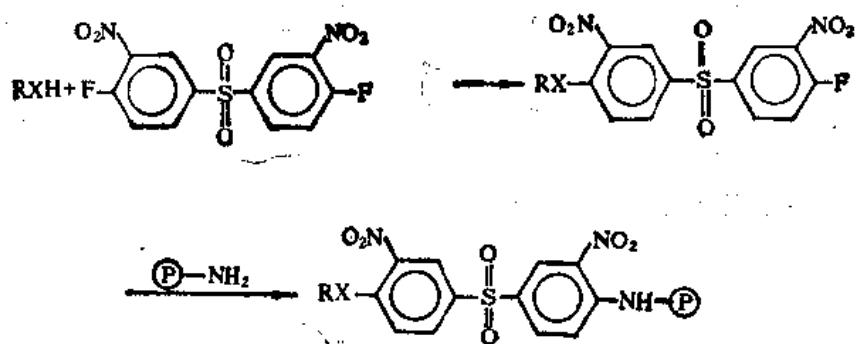


亚氨酸酯类水溶性良好，反应条件温和，与氨基的反应选择性高，这类试剂的最大特点是，可与蛋白分子上的赖氨酸残基广泛反应，而不影响蛋白分子的净电荷改变。具有不同碳链长度的亚氨酸酯可将半抗原间以一定距离与蛋白连接。

(十五) 卤代硝基苯法

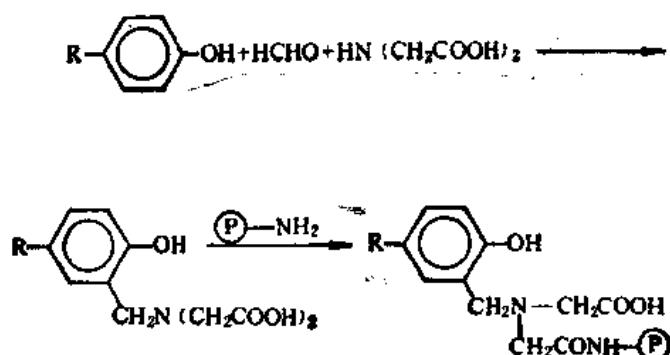
双功能试剂二硝基二氟苯或二氟二硝基苯砜分子中的氟原子，由于邻近硝基的活化作用，易和半抗原或载体蛋白上的亲核基团如氨基、羟基、巯基等反应：



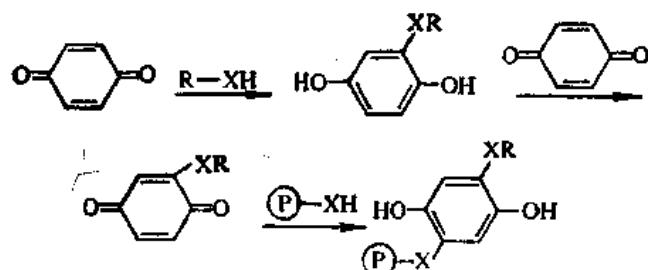


(十六) Mannich 反应法

酮、酚类半抗原，可以用 Mannich 反应引入羧基，然后与常法与蛋白交联；



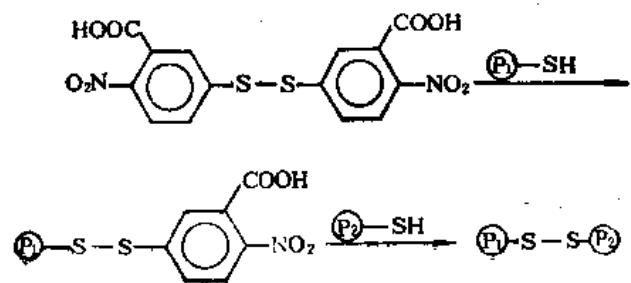
(十七) 苯醌法



交联过程分两步进行，第一步反应完成后，分离除去过量试剂，再进行第二步反应。

(十八) Ellman试剂法 [6]

Ellman 试剂即 5,5'-二硫-2,2'-双硝基苯甲酸(DTNB)，该试剂可以与巯基作用，交联反应分两步进行：

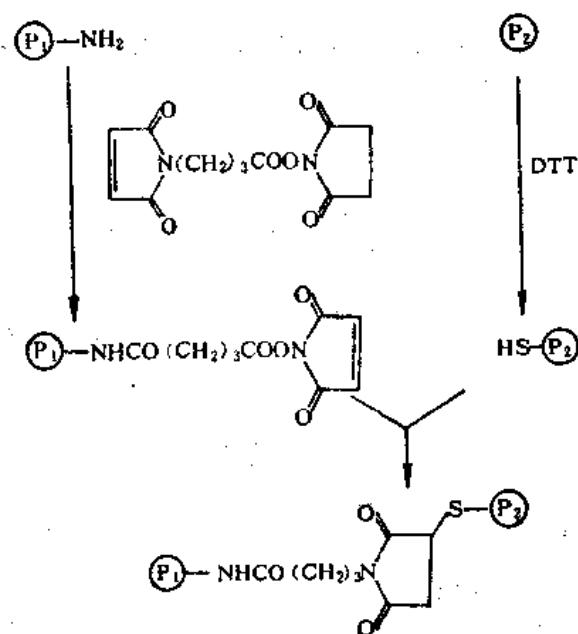


本法用于游离巯基的保护和活化，以便与游离巯基的另一蛋白分子进行巯基交换反应。

(十九) 马来酰亚胺基类活泼酯法

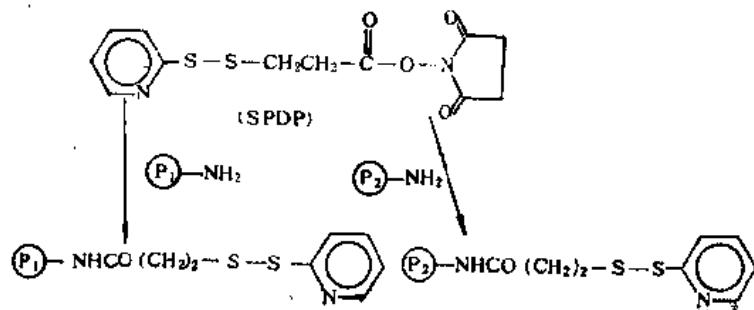
马来酰亚胺结构中的双键比较活泼，可与游离巯基进行选择性加成反应。马来酰亚胺基取代羧酸衍生物的 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯试剂与含氨基的药物或蛋白反应，引入马来酰亚胺基，与另一含有游离巯基的分子通过巯基对双键的加成反应连接起来。

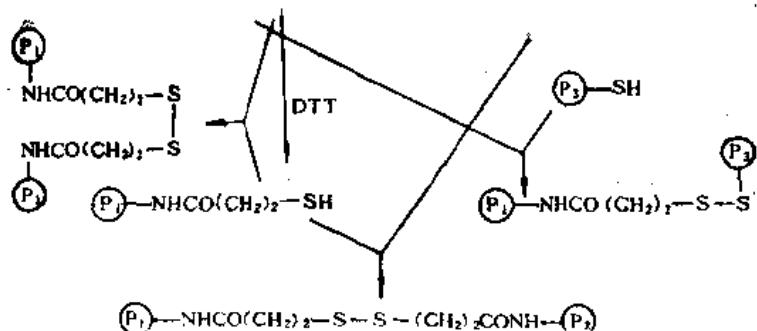
这是一组异型双功能交联剂，常用的有 *N*-羟基琥珀酰亚胺基-间-(*N*-马来酰亚胺基)-苯甲酸酯 (SMB)、*N*-羟基琥珀酰亚胺-4-(对-马来酰亚胺基)-苯丁酸酯 (SMPPB) 等。



(二十) SPDP 试剂法^[6]

异型双功能交联剂 *N*-羟基琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)-丙酸酯 (SPDP) 可以通过其分子中的活泼酯组份与氨基反应，也可以通过 2-吡啶二硫基团与脂肪硫醇反应。SPDP 能够于蛋白分子中引入巯基，然后利用巯基交换反应或巯基加成反应与另一分子交联：

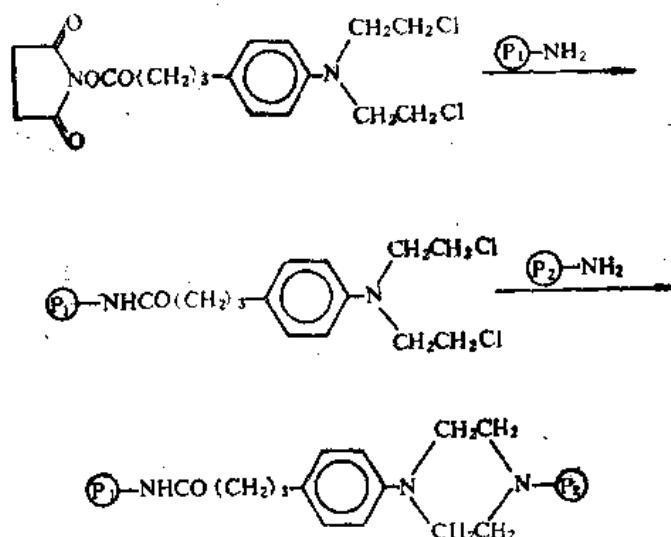




这是目前较为常用的一种交联剂，交联反应条件温和，副反应较少，能够定量地于蛋白分子中引入保护的巯基，且能够方便地测定其含量。同类的交联剂尚有N-羟基琥珀酰亚胺-(4- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代甲基)-苯甲酸酯(SMPT)⁽⁷⁾和N-羟基琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫)-丁酸酯(SPDB)⁽⁸⁾。通过在二硫键的 α -位引入位阻性基团如甲基，可以增加交联物中二硫键的稳定性。

(二十一) 苯丁酸氮芥衍生物法⁽⁹⁾

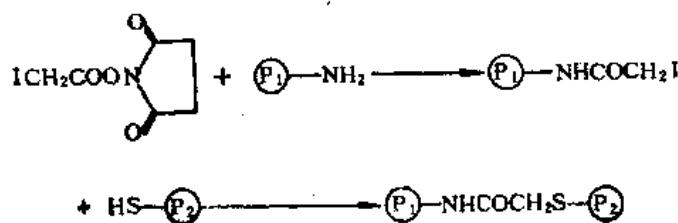
苯丁酸氮芥的N-羟基琥珀酰亚胺基酯或混合酸酐衍生物分子中的活性羧基和氮芥基可以分别与两个蛋白分子中的氨基反应，将两者连接起来：



在中性及微碱性 pH 条件下，氮芥基倾向于与巯基反应，而在较高 pH 时倾向于与氨基反应。

(二十二) 卤代乙酰衍生物法

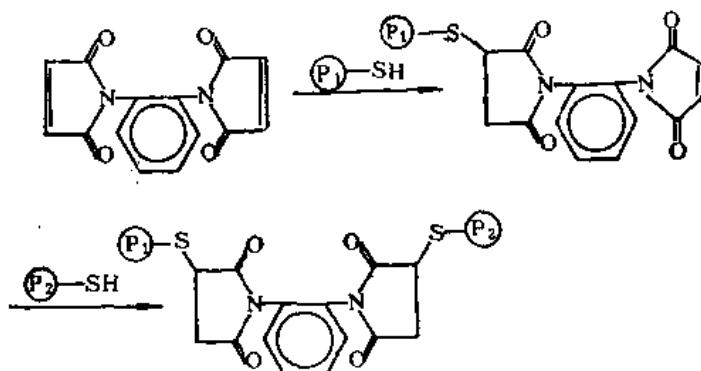
卤代乙酸的活泼酯衍生物如N-羟基琥珀酰亚胺基碘代乙酸酯分子中的活泼酯成分和 α -位活泼卤素可以分别与蛋白分子中的巯基及氨基反应，实现两种分子的交联：



本交联反应迅速，具有较高选择性，形成的硫醚键在血浆中十分稳定。

(二十三) 双马来酰亚胺试剂法^[10]

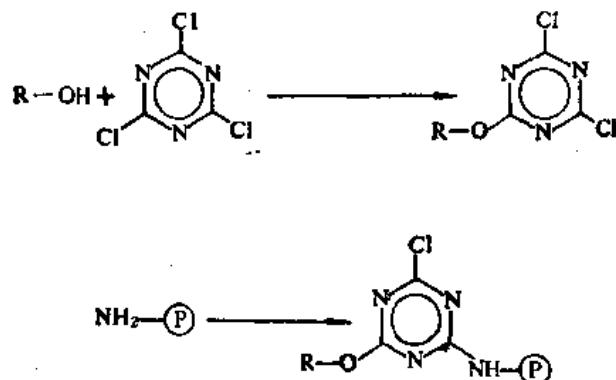
这类试剂的代表为N,N'-邻苯基双马来酰亚胺，可以连接两个含巯基的分子。



这是一类比较温和的交联剂，具有较高的反应选择性，但是易形成同类分子的交联产物。

(二十四) 三氯三嗪试剂法

三氯三嗪分子可以与含羟基的分子反应，剩余的第二个氯原子活性稍低，可为蛋白分子上的氨基取代，实现两分子的交联：



必须注意，第一个分子中不能含有氨基及巯基等亲核性较强的基团，否则，易形成自身聚合。

二、交联方法的选择及偶合物的设计

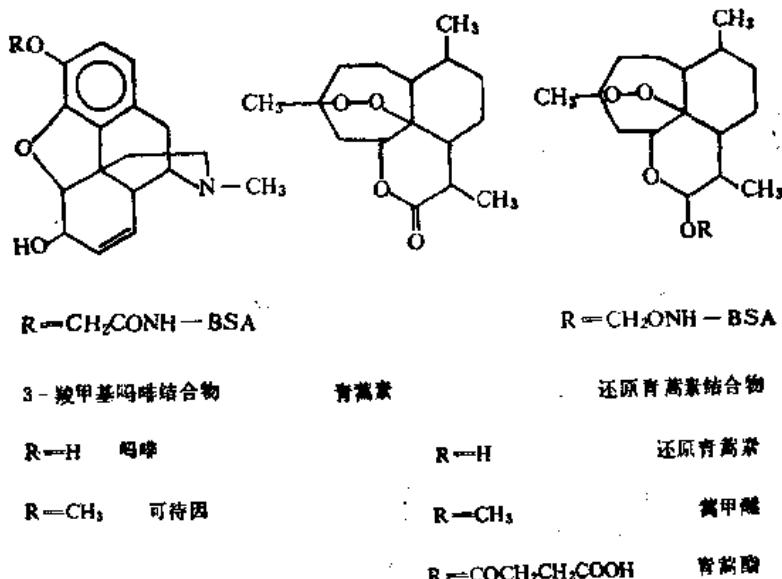
如上所述，蛋白质交联方法的类型繁多，虽然能够满足各方面的需要，但也增加了使用者选择的困难。评价某一交联方法时，应该考虑以下有关因素：① 交联反应的效果，如交联产物组成的均一性；② 交联反应的产率；③ 交联过程对生物活性的影响；④ 交联操作的简便性；⑤ 交联产物纯化的难易；⑥ 交联反应结果的可重复性；⑦ 偶合物的使用目的。理想的交联方法应该保证结合物得率较高，结合物的组成均一，结合比合适，最大限度地保持生物活性，操作方便，纯化容易；在同样条件下，重复性好。

然而，目前还没有一种交联方法能够同时满足上述要求。因此，必须根据结合物的使用目的，权衡不同方法的优缺点来选择合适的交联方法；最好同时使用几种交联方法进行比较，择其优者而用之。

在人工抗原的制备中，主要要求制备的人工抗原保持半抗原的结构特异性；所用交联方法不要明显改变半抗原结构，要保留抗原决定簇。必要时可在半抗原与载体之间引入一定碳链长度的桥结构，暴露抗原决定簇，以利于产生针对半抗原的抗体。

影响人工抗原的免疫效果的另一重要因素是每分子载体上结合的药物分子数。一般认为药物结合量越大越好，但最佳结合比也取决于半抗原的本质及载体的性质。由于抗体的特异性主要针对半抗原分子中远离偶联键的结构，因此，在设计人工抗原结合物时，应选择远离半抗原特征结构的基团进行交联。例如，与抗-睾酮-17-牛血清白蛋白相比，抗-睾酮-3-牛血清白蛋白能够更好地识别类似结构的甾体化合物。通过桥结构将载体蛋白连接于抗原分子中非生物特异性的位置如雌激素的C-6位，黄体酮的C-6或C-11位，制备的人工抗原结合物具有更好的特异性。由这些结合物产生的抗体能够识别半抗原的所有结构特征。

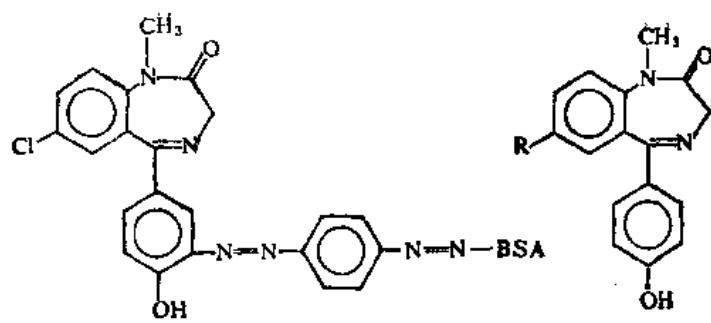
相应地，抗半抗原的抗体对结合部位或邻近结合部位的结构变化是不敏感的，如3-羧甲基吗啡-蛋白结合物诱生的抗体不能区分吗啡和可待因^[11]。还原青蒿素-蛋白结合物所诱生的抗体可以用于测定青蒿素、蒿甲醚及青蒿酯^[12]。而通过不同方法制备的安定



的两种蛋白偶合物所产生的抗体，都能特异性地识别安定。这些性质给人工抗原的制备带来极为有利的条件，人们可以适当改变半抗原结合部位的结构或引入交联活性基团，使制备人工抗原的方法更加多样化。

对于酶标抗体的制备，最重要的是同时保持酶和抗体的生物学活性，制备化学组份均一的结合物。异型双功能交联试剂的应用，基本实现了交联反应的控制进行，减少或避免了自身聚合和交叉聚合，保证了交联产物的有效性。

对于载体药物，首先要求其能够在体内定量或定位地释放出具有生物活性的游离药物。为此，连接药物与载体的偶合键必须能够在一定条件下以一定速度解离，而且解离



安定结合物 1

 $R = \text{Cl}$

安定

 $R = \text{N}=\text{N}-\text{BSA}$ 安定结合物 2

速度能够通过 pH 的改变或体内不同组织小环境的差异(如酶的种类或活性)得到调控,以达到定向给药的目的;在制备载体药物结合物时,对药物分子的结构不宜作永久性的改变,以免引起生物活性的改变;其次还要求每一载体能结合足够量的药物分子,以保证给药的效率。

在抗体导向药物的设计和制备中应该考虑以下几点:① 细胞毒分子-抗体偶合物在到达作用部位以前保持稳定,在血浆中不被降解;② 结合物的特异性能够反映载体的特异性,即具有原载体的专一性识别和结合作用;③ 结合物到达作用部位以后,能以某种方式进入细胞,发挥药理作用,即结合物本身具有细胞毒活性或结合物进入细胞后能够释放活性形式的药物。

因此,对细胞毒分子中药物活性所必需的部位不宜作不可逆化学修饰,而且偶联键要远离活性部位,以避免立体位阻对生物活性的影响。如甲氨蝶呤分子中的蝶呤部分对二氢叶酸还原酶有高度的亲和性,是抗代谢活性的必需结构,对其进行任何改变,均可导致药物活性的丧失;但是,远离蝶呤的谷氨酸残基,对酶抑制活性影响不大,可以用作交联基团。又如将细胞毒分子连接于抗体分子中远离抗原结合位点的 Fc 区,可以最大限度地保持抗体活性^[13]。

利用血浆与溶酶体 pH 的差别,设计 pH 敏感的偶联键,制备药物载体偶合物,可以实现药物的控制释放^[14,15]。如柔红霉素通过顺-乌头酸与蛋白形成的结合物,在生理 pH 时稳定;而进入细胞后,可以在溶酶体的酸性条件(pH4~5)下解离,释放柔红霉素原型药物分子,发挥细胞毒作用^[14]。

不论使用哪种蛋白载体,其所能提供的交联基团是相似的。因此,交联方法的选择以及交联物的设计主要取决于半抗原或药物分子上的功能团结构。下面就根据这些功能团的分类,分别讨论不同交联方法的应用。

(一) 羧基

药物或其衍生物分子上的羧基可以通过碳二亚胺法、混合酸酐法等与蛋白分子上的氨基形成酰胺键,其中碳二亚胺法在这类化合物的偶联反应中的应用最为广泛。血管紧张素和缓激肽、促胃液素、吗啡、前列腺素、托普霉素、1-β-E-阿糖味喃胞嘧啶、强的松-21-琥珀酸半酯等均可在水溶性碳二亚胺 EDC 的作用下,与蛋白或多聚氨基酸等载

体结合，制备人工抗原。许多含羧基的抗肿瘤药物如甲氨蝶呤^[13]、苯丁酸氮芥、柔红霉素^[13]的二元酸单酯衍生物、丝裂霉素 C-戊二酸单酯^[16]、新制癌菌素^[17]和磷酸酯酶 C 等均可在 EDC 作用下与抗体偶联，制备抗体导向偶合物。

同时含有氨基和羧基的小分子，可以先将氨基保护后，再用羧基与载体交联，以避免自身缩合，交联反应完成后再脱保护，游离氨基。不溶于水的药物可先以二甲基甲酰胺溶解，然后再加于蛋白水溶液中，进行交联反应。

为了减少蛋白分子间的自身聚合，可以先将药物分子上的羧基转化为 *N*-羟基琥珀酰亚胺的活性酯，然后再与抗体交联。例如，将丝裂霉素 C-戊二酸单酯转化为活性酯后，再与抗体交联，可以提高蛋白回收率和产品的均一性，更好地保持抗体活性^[18]。类似地，可以制备 *D, L*-10, 11-环氧麝香油酸及蜕皮激素的人工抗原结合物。

混合酸酐法也能用于形成酰胺键。通过混合酸酐法与蛋白载体交联的半抗原有考的松-21-琥珀酸半酯、尿核苷-5'-磷酸、睾酮-17-琥珀酸半酯、3-O-琥珀酰毛地黄毒甙配基、胆酸、甲状腺素及利血平等。

药物及半抗原的羧酸酯、活性酯或酸酐衍生物可以与肼反应，转化为相对稳定的酰肼衍生物。后者在水性介质中，很容易和蛋白分子上的醛基或酮基（由高碘酸钠氧化 IgG 分子上的糖残基产生）反应，形成腙结构的结合物。

此外，药物分子中的羧基还可以转变为酰基叠氮衍生物，然后再与蛋白分子上的氨基反应，形成以酰胺键连接的结合物，酰基叠氮衍生物可以由酰肼与冷的亚硝酸反应制备，也可以通过酰氯与叠氮钠反应产生。通过这种方法与蛋白交联的有阿斯匹林、去乙酰长春花碱、甲状腺素等。

（二）氨基

含氨基的半抗原及药物可以分为两类，即芳香胺类和脂肪胺类。这两类胺的交联方法有所不同，下面分别讨论。

许多芳香胺类的化合物可以在低温条件下与亚硝酸反应形成重氮盐，然后与载体蛋白分子上的酪氨酸或组氨酸残基反应，形成以偶氮键交联的结合物。芳香环上含硝基的化合物如氯霉素，可将硝基还原为氨基后，再制备重氮盐，与蛋白载体结合。但是，重氮盐交联法存在难以克服的副反应，可导致蛋白大量沉淀；而且，与重氮盐反应的酪氨酸和组氨酸残基多存在于 IgG 分子中抗原结合区及其附近，因此交联反应易导致抗体活性的损失。所以这一方法一般不用于抗体导向药物的制备中。

脂肪胺类化合物可以在水溶性碳二亚胺作用下，与载体蛋白上的羧基结合。用此方法连接的半抗原有缓激肽、血管紧张素、托普霉素、庆大霉素、阿霉素、5-羟色胺及精脒等。脂肪胺还可以与对-硝基苯甲酰氯反应，形成对-硝基苯甲酰衍生物，再将硝基还原为氨基后，通过重氮化与载体蛋白结合，以此法交联的半抗原有烟草花叶病病毒蛋白及血管紧张素等。通过双功能交联剂苯亚甲基二异氰酸酯将胺类化合物与蛋白上的氨基连接，可以制备缓激肽的人工抗原结合物。药物分子上的胺基还可以通过戊二醛试剂与蛋白分子上的氨基结合，由此可以制备促肾上腺皮质激素、高血糖素及去甲肾上腺素等的人工抗原结合物和阿霉素-抗体导向偶合物^[44]。

以上交联方法均是利用同型双功能交联剂连接两分子上的氨基。在交联过程中，不

可避免地会形成部分相同分子间的聚合产物。为了达到控制交联的目的，可以利用多元酸酐法，于含氨基的半抗原分子上引入游离羧基，然后再以活泼酯法或碳二亚胺法与蛋白交联。如先将柔红霉素与琥珀酸酐或顺-乌头酸酐反应，再利用引进的羧基与抗体上的氨基反应，形成抗体导向偶合物^[8]。也可以通过与 SPDP 反应，于半抗原分子上引入巯基，利用巯基反应与抗体交联。

(三) 羟基

含有羟基的半抗原分子包括醇类、酚类、糖类及核苷酸类。在这类化合物的交联中，通常先要制备其衍生物，以引进能够与蛋白反应的功能团。例如，甾体化合物可以通过与琥珀酸酐反应，形成琥珀酸单酯衍生物，然后按羧基交联方法与蛋白偶联。按照类似方法可以制备环腺昔酸、雌酮、 β -d-美沙醇、3-羟基氯硝安定、蜕皮甾酮、心得安、 Δ^9 -四氢大麻酚及 1- β -D-阿糖呋喃胞昔的蛋白结合物。也可以将醇羟基与光气反应，制备高度反应活性的氯甲酸酯，然后在碳酸氢盐存在下与蛋白分子上的氨基交联。

三氯三嗪或羧甲基取代的二氯三嗪试剂可以连接药物分子上的羟基与蛋白分子上的氨基，交联分两步进行，羟基化合物先与三嗪试剂反应，形成醚衍生物；剩余的取代氯反应活性较差，不能再被羟基取代，但可与亲核性较强的蛋白氨基反应，由此形成通过三嗪核偶联的结合物。双功能交联剂卤代硝基苯也可以用于连接药物分子上的羟基和蛋白分子上的氨基。

酚类化合物可以通过与重氮化的对-氨基苯甲酸反应，引入羧基，然后利用羧基反应与蛋白交联。这一类型的反应被成功地用于制备 17, β -雌二醇及 Δ^7 -四氢大麻酚的人工抗原结合物。

具有邻二醇结构的核昔或核苷酸类化合物，可用高碘酸盐氧化出醛基，后者可以与蛋白分子上的氨基反应形成 Schiff 氏碱，以硼氢化钠还原后即可得到稳定的以碳-氮单键连接的结合物。反应过程中，毋需分离中间产物，本法成功地用于制备地高辛及 G-毒毛旋花子甙的蛋白结合物。改进法被用于制备碱敏感性的核昔及核苷酸结合物。用高碘酸盐氧化法制备的抗体导向偶合物有柔红霉素-右旋糖昔-抗体结合物及柔红霉素-抗体偶合物。后者是通过氧化右旋糖昔上的邻二醇为醛基，利用醛基分别连接药物和抗体分子上的氨基制备而成。但本法也可以产生副产物，而且硼氢化还原可能破坏药物结构，影响药物活性^[10]。用高碘酸钠氧化抗体 IgG 分子 Fc 端的糖基，利用生成的醛基与氨基化合物交联。这样，将细胞毒组份区域选择性地连接于远离抗原结合位点的 Fc 端，可以更好 地保持抗体活性。

(四) 酰基

醛基化合物如吡哆醛及吡哆醛磷酸酯可以通过与蛋白分子上的氨基形成 Schiff 氏碱，实现与蛋白的交联。醛或酮均可以通过与 O-羧甲基-羟胺反应，转化为 O-羧甲基-肟衍生物，引入一个羧基，通过形成酰胺键与蛋白交联。以这种方法交联的半抗原分子有睾酮、孕酮、雌酮及 18-乙基炔诺酮。醛固酮及考的松等与对-肼基苯甲酸反应，再利用引入的羧基与牛血清白蛋白交联。在羰基的 α 位引入一个卤素原子，再与蛋白分子中的氨基反应，可形成碳-氮单键交联的产物。如 14-溴代柔红霉素在微碱性条件可与蛋白 IgG

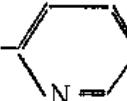
结合，形成抗体导向偶合物^[30]。

(五) 疏基

青霉烯酸分子上的疏基，可以与蛋白分子中引入的疏基反应，形成以二硫键交联的结合物。6,β-溴-孕酮及14-溴代柔红霉素^[31]可以与蛋白分子中引入的疏基反应，形成以硫醚键连接的结合物。

利用疏基反应进行偶联的方法主要用于蛋白毒素与抗体偶联，形成免疫毒素。一般来说，疏基可以通过二硫交换反应形成二硫键，或通过与马来酰亚胺基上双键的加成反应形成硫醚键，实现毒素与蛋白的连接。类似的交联方法同样可以用于制备酶标抗体。

由于蛋白质分子中通常没有疏基反应活性基团，因此，疏基交换反应具有较好的选择性，在一定程度上避免相同分子间的聚合，而且通过定量引进疏基及疏基反应活性基团，可以实现控制交联，以得到化学专一性和生物专一性更好的交联产物。

毒素或抗体分子可以与SPDP、2-亚胺基四氢噻吩+4, 4'-二硫吡啶、3-(4'-二硫吡啶基)-丙酰亚胺甲酯等反应，引入保护性疏基-二硫吡啶基(-S-S-),后者可以通过疏基交换反应与另一蛋白分子上的疏基形成二硫键。蛋白分子中的疏基可以由二硫吡啶基的还原产生，也可以通过与2-亚胺基四氢噻吩、3-巯基丙酰亚胺甲酯、N-乙酰同型半胱氨酸硫代内酯或S-乙酰硫代琥珀酸酐等试剂反应引入。利用马来酰亚胺基活泼酯试剂或碘代乙酸活泼酯于蛋白分子中引入疏基反应活性的马来酰亚胺双键或碘乙酰基，然后与另一蛋白分子中的疏基进行加成反应或取代反应，形成以硫醚键连接的偶合物。

三、结合物的纯化与鉴定

蛋白质交联反应中的小分子如未结合的药物、交联剂、反应副产物可以通过凝胶柱层析、透析或硫酸铵沉淀法与高分子结合物分离。对于蛋白-蛋白交联产物，可以根据产物和反应物分子量的大小，选用合适的凝胶柱层析，将交联产物与未反应的蛋白分离。为了获得分子量更均一的产物，也可以采用高效液相层析、电泳及离子交换柱层析进行分离纯化。

对于蛋白结合产物，首先必须测定其中各组份的含量。常用的测定方法有：①两种组份的吸收光谱不重叠者，可以选择合适的波长分别测定OD值，计算两组份的摩尔浓度，推算结合比。一般利用280nm处的特征吸收，测定蛋白含量；②载体蛋白含有一定数目的游离氨基，与含羧基的药物交联后，游离氨基必将减少，可以用三硝基苯磺酸法或二硝基苯酚法测定交联前后氨基的含量，推算结合比；③在交联过程中加入一定量的放射标记药物或蛋白，通过测定结合物的放射比活性，计算结合比；④将结合物水解后，利用药物所特有的颜色反应，测定解离药物的含量；或者利用考马斯亮蓝法及福林-酚法测定蛋白的含量；⑤对于蛋白-蛋白结合物，可以通过SDS-PAGE电泳测定结合物的分子量，推算结合比。

参 考 文 献

1. Avrames S, et al. Scand J Immunol 1978; 8 (suppl 7):7.
2. Kulkarni PN, et al. Cancer Res 1981; 41:2700.
3. Gallego J, et al. Int J Cancer 1984; 33:737.
4. Johnson JR, et al. Br J Cancer 1981; 44:472.
5. Raso V & Griffin T. J Immunol 1980; 125:2610.
6. Carsson J, et al. Biochem J 1978; 173:723.
7. Thorpe PE, et al. Cancer Res 1987; 47:5924.
8. Worrell NR, et al. Anticancer Drug Design 1986; 1:179.
9. Philpott GW, et al. J Immunol 1980; 125:1201.
10. Weston PD, et al. Biochim Biophys Acta 1980; 612:40.
11. Nilsson P, et al. J Immunol Methods 1981; 41:81.
12. 宋振玉, 等. 药学学报 1985; 20:610.
13. Shih LB, et al. Int J Cancer 1988; 41:832.
14. Diener E, et al. Science 1986; 231:148.
15. Umemoto N, et al. Int J Cancer 1989; 43:677.
16. Kato Y, et al. J Appl Biochem 1983; 5:313.
17. Kimura I, et al. Cancer Immunol Immunother 1980; 7:235.
18. Umemoto N, et al. J Appl Biochem 1984; 6:297.
19. Hurwitz E, et al. J Appl Biochem 1980; 2:25.
20. Zunino FR, et al. Tumori 1981; 67:521.

第二章 配体结合分析中的蛋白质连接技术

一、酶对抗原、半抗原、抗体的标记

洪孝庄

(军事医学科学院毒物药物研究所)

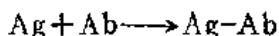
一、总论

自从60年代初Yalow和Berson首创放射免疫分析方法(Radio-immunoassay, RIA)以来,以放射性同位素或非放射性标记物为工具的一大类分析方法迅速发展。目前已初步形成一个新颖的分析技术系统——配体结合分析(Ligand Binding Assay),这是一类灵敏度高、特异性强的分析系统,已在生物医学各有关研究领域广泛应用。

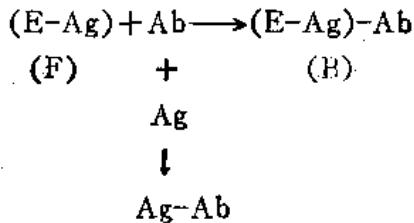
(一) 配体结合分析的概念及分类

1. **配体(Ligand)** 指凡能与生物大分子某一结构上的特定部位发生互补结合的分子或化合物,它们对生物大分子具有高度的专一性和很强的亲和力。在分子药理学研究中,配体系指与受体(Receptor)结合的活性信号分子。目前,配体一词应用广泛,它可以是小分子物质,也可以是大分子物质,如酶与底物,酶与抑制剂或辅酶,抗体与抗原或半抗原,受体与药物或激素等。从广义上讲,它们之间可互称为配体,如抗原是抗体的配体,反之,抗体亦可称为抗原的配体。

2. **配体结合分析** 利用生物大分子与其配体间的高度特异性亲和反应作为工具,进行定量分析的一类方法。以酶免疫分析(Enzyme Immunoassay, EIA)为例,是以酶标记的抗原(或半抗原)和非标记的抗原(或半抗原)对专一性抗体的竞争性结合反应为基础,其中抗原-抗体之间的免疫反应通式如下:



当用酶标记抗原(E-Ag)检测非标记的待测抗原(Ag)时,两者便与其特异抗体(Ab)发生竞争结合作用,此即为竞争性酶免疫分析的理论基础:



将游离(F)与结合(B)部分分离后,测其中(F)或(B)部分的酶活性,则与待测的非标记抗原量成比例。此类分析方法专一性强、灵敏度高、操作简便,在分子生物学、生化药理、免疫药理及临床医学研究中易于采用。

3. **配体结合分析的类型** 在配体结合分析中,常把与配体结合的大分子生物活性物

质称为结合剂。常用的结合剂有酶、抗体、受体和特异结合蛋白等（表2-1）。

表 2-1 常用的结合剂与配体

结合剂	配体	结合剂	配体
酶.....	底物	抗体.....	抗原
酶.....	抑制剂	抗体.....	半抗原
酶.....	辅酶	受体.....	药物
血浆蛋白.....	激素	受体.....	激素

目前，根据所用结合剂的不同，可将配体结合分析分为三大类：①以抗体为结合剂者为免疫分析；②以受体为结合剂者为受体分析；③以特异结合蛋白为结合剂者为竞争蛋白结合分析。

以下简要列出上述三类配体结合分析的主要方法：

(1) 免疫分析 (Immunoassay)

A. 放射免疫分析^(1,2)；

B. 酶免疫分析：

a. 非均相酶免疫分析 (Heterogeneous Enzyme Immunoassay) 或称酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)；

b. 均相酶免疫分析 (Homogeneous Enzyme Immunoassay) 或称酶放大免疫测定技术 (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, EMIT)⁽³⁾；

C. 荧光免疫分析 (Fluoroimmunoassay, FIA)⁽⁴⁾；

D. 发光免疫分析 (Luminescent Immunoassay, LIA)⁽⁵⁾：

a. 生物发光免疫分析 (Bioluminescent Immunoassay, BLIA)；

b. 化学发光免疫分析 (Chemiluminescent Immunoassay, CLIA)；

E. 无标记免疫分析 (Marker-free Immunoassay)^(6,7)：

a. 胶乳凝集免疫分析 (Agglutination Latex Immunoassay)；

b. 颗粒计数免疫分析 (Particle Counting Immunoassay, PACIA)；

F. 仪器免疫分析：

a. 激光浊度免疫分析 (Laser Nephelometric Immunoassay, LNIA)；

b. 荧光偏振免疫分析 (Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA)；

(2) 受体分析 (Receptor Assay)⁽⁸⁾

A. 放射受体分析 (Radio Receptor Assay, RRA)；

B. 酶受体分析 (Enzyme Receptor Assay, ERA)^(9,10)；

(3) 竞争蛋白结合分析 (Competitive Protein Binding Assay, CPBA)⁽¹¹⁾

(二) 配体结合分析中的标记 (即蛋白连接) 技术

1. 标记物的种类

(1) 放射性同位素：³H、¹²⁵I；

(2) 非放射性标记物

- ① 酶、辅酶、酶抑制剂；
- ② 荧光、生物发光及化学发光物质；
- ③ 金属原子；稳定自由基；
- ④ 红细胞、噬菌体；胶乳 (Latex)；
- ⑤ 毒素：白喉毒素、蓖麻毒素及红豆毒素等，此类物质不是用于配体结合分析的标记物，而是用于免疫毒素的制备。

2. 标记对象(被标记物) * 表示被标记物

(1) 生物大分子(绝大多数为蛋白质)

① * Ag 或 * Ab (* 抗原或 * 抗体)；

② L-* R (配体-* 受体)；

③ Biotin-* Avidin (生物素-* 抗生物素蛋白)^[18]；

④ * SPA-IgG (* 金黄色葡萄球菌A蛋白-IgG)；

⑤ * PHA-OH-R (* 凝集素-糖基)。

(2) 小分子物质

① * H (* Hapten, 即半抗原) 或

② * L (* Ligand, 即配体)；包括各种药物、毒物、固醇类激素等小分子物质。

3. 标记方法概述(用于非放射性标记物的标记)

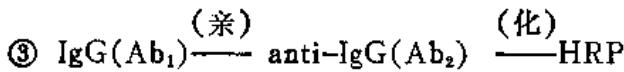
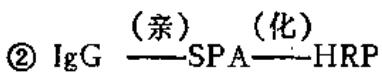
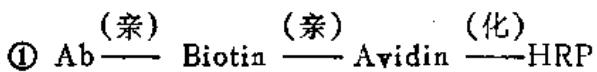
(1) 化学法

① 蛋白质大分子之间的交联：戊二醛法，高碘酸钠法，SPDP 法，苯醌法等；

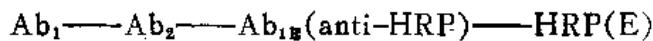
② 蛋白质大分子与小分子配体或半抗原的交联：碳化二亚胺法 (EDC)，混合酸酐 (MA) 法，琥珀酸酐法，N-羟基琥珀酰亚胺法等。

(2) 生物亲和配体交联法(或称间接标记法)

标记物本身既是(或作为)标记物，又是被标记物，通过与其相对应的亲和配体的亲和结合作用，达到标记之目的。常用的有以下几种方法：



④ 免疫学交联法(或称酶抗酶法, PAP)^[18]：



其中 Ab_1 为第一种动物的抗体， Ab_{1B} 为用同一种动物的抗酶 (HRP) 抗体， Ab_2 为第二种动物抗第一种动物 (IgG, 即种属球蛋白) 的抗体，通常称为第二抗体 (Ab_2)，亦称抗种属球蛋白。由上述三组 (Ag-Ab) 免疫反应关系，达到用酶 (HRP) 对抗体 (Ab_1) 的标记，这种酶对抗体的交联是不经过任何化学交联的免疫学亲和标记，故又称为不标记酶法。而在前三种生物亲和配体交联方法中，首先是生物亲和结合作用，但是，酶的标记还必需通过化学交联剂进行交联，才能最后完成。

上述各种类型的标记方法，根据所标记的对象，大体上可分为两类，一类是对大分子蛋白质的标记，另一类是对小分子物质的标记。以下则用酶作为非放射性标记物的代

表，简要介绍酶对蛋白抗原、抗体和小分子物质的标记，同时也将涉及半抗原（即无免疫原性的小分子物质）与蛋白载体的交联——人工抗原合成制备中的若干问题。

二、酶 标 记 技 术

通过化学反应（在化学交联剂的作用下）或亲和结合作用，使酶与抗原、半抗原或抗体结合的过程，称为酶的标记或交联。经交联所得之产物称为酶标记物或酶结合物（简称结合物）。

在酶免疫分析及其他各类配体结合分析中，标记结合物的制备甚为重要，是此类方法的关键所在。一般说来，对酶结合物的要求，① 具有高的酶活性；② 具有高的抗原或抗体免疫活性；③ 稳定性要好。在标记反应系统中，参与交联反应的组份，既有标记物，又有被标记物，同时还有化学或生物配体交联剂，它们在一定条件下，发生交联而形成标记结合物，此结合物的质量既与各组份的纯度、活性、稳定性有关，也与所选择的交联剂和交联方法有关。在严格控制交联反应条件下，使所得到的标记产物——结合物，能保留各组份原有的活性，以便在此后的配体结合分析中，既能参与与配体高度专一的亲和结合反应，又不失去标记组份的信号放大作用，以保证具有很高的灵敏度。除此之外，对所制备结合物的分离纯化及鉴定也是标记技术的必要步骤。

（一）在酶免疫分析(EIA)中所用的标记酶

酶在 EIA 中作为标记物，必须具有高活性、高纯度、高稳定性；酶在标记过程的化学修饰及免疫反应（或与配体结合）过程中其活性均无明显变化；对酶活性的检测方法要灵敏、准确、简易；酶源丰富价廉；同时，酶底物应对人体健康无害。

酶免疫分析，从其方法模型来看，可以分为两大类，一类即“非均相酶免疫分析”，其中，酶联免疫吸附试验(ELISA)是最常用的一种，也是大家很熟悉的，又称固相酶免疫分析；另一类称为“均相酶免疫分析”，最具代表性的是酶放大免疫测定技术(EMIT)，此类方法为美国 Syva 公司首创，目前国内还未见报道^[3,14]。

在非均相酶免疫分析(ELISA)进行过程中，结合的(B)与游离的(F)标记酶活性没有变化，因此，在对酶活性进行测定之前，必需将(B)与(F)两部分用物理的方法加以分离，以便测定(B)或(F)的酶活性，从而对待测物进行定量分析。在均相酶免疫分析(EMIT)进行过程中，由于酶结合物与抗体的结合，抗体(免疫球蛋白)大分子对酶的活性中心所引起的空间障碍或变构效应，从而使结合的(B)酶标物与游离的(F)酶标物之间的酶活性有明显的变化(抑制或活化)，因此，在EMIT 分析过程中，不需将结合的(B)与游离的(F)两部分酶标物进行分离，而始终是在均一的液相体系中进行反应和酶活性测定。

由于酶免疫分析具有上述两类截然不同的作用机理和方法模型，即 ELISA 和 EMIT，所以两者所用的标记酶也不相同。ELISA 所用的标记酶以辣根过氧化物酶(HRP)为最广泛，其次为碱性磷酸酯酶(AKP)(表2-2)^[15]。在 EMIT 中，应用最多的标记酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)，另外，苹果酸脱氢酶(MDH)和溶菌酶(lysozyme)也有使用(见表 2-2)^[14]。在这里应该强调指出，在 EMIT 中所用的

G6PDH 应该是由肠系膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*, LM.) 来源的酶^[13], 绝对不能使用由酵母来源的 G6PDH, 这是因为, LM.-G6PDH 对 NAD⁺ 有高度的专一性, 用这种酶可以排除溶血样品的干扰, 因为相应的人红细胞膜 G6PDH 对 NADP⁺ 是专一的, 而酵母来源的 G6PDH 也对 NADP⁺ 专一, 易受影响, 不能作为标记酶。MDH 的比活性较高, 根据文献报道, 它仅适用于对尿样的分析。

表 2-2 酶免疫分析所用的标记酶^[14-15]

	酶	酶的来源
非均相酶免疫分析	辣根过氧化物酶 (EC 1.11.1.7)	辣根
	碱性磷酸酯酶 (EC 3.1.3.1)	小牛肠粘膜
	β -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23)	大肠杆菌
	葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)	根霉菌
	葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4)	黑曲霉
	乙酰胆碱酯酶 (EC 3.1.1.7)	电鱼电器官
	谷氨酰胺羧酸酶 (EC 4.1.1.15)	大肠杆菌
	过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6)	牛肝
	尿素酶 (EC 3.5.1.5)	芽孢杆菌
	碳酸酐酶 (EC 4.2.1.1)	牛红细胞
均相酶免疫分析	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (EC 1.1.1.49)	肠系膜明串珠菌
	苹果酸脱氢酶 (EC 1.1.1.37)	猪心线粒体
	溶菌酶 (EC 3.2.1.17)	鸡卵蛋白
	己糖激酶 (EC 2.7.1.1)	酵母菌
	β -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23)	大肠杆菌
	淀粉酶 (EC 3.2.1.2)	马铃薯
	磷酸酯酶 C (EC 3.1.4.3)	

(二) 标记反应中可利用的化学功能基团

用酶作为标记物, 通常是对抗原、半抗原或抗体进行标记的; 在 ELISA 中被标记物可以是大分子抗原、抗体或其它蛋白类物质; 也可以是小分子半抗原、药物、毒物、激素等。而在 EMIT 中, 从目前已发表的文献资料看, 被标记物几乎全部都是小分子半抗原或药物。如抗体是一种含糖的蛋白质大分子物质, 而抗原及半抗原则是多种多样的, 它们的分子量可从几十、几百、到几十万, 含有许多不同的化学基团。从上述各种标记酶或被标记物质的多样性来看, 交联双方可以是小分子半抗原与蛋白质大分子之间的连接, 也可以是两种蛋白质大分子之间的结合。所利用的主要化学反应基团是羧基、氨基、糖基或芳香胺等。在两类酶免疫分析中, 由于所标记的物质不同, 可利用的化学功能基团也

表 2-3 可利用的化学功能基团及相应的交联方法

标记物 (或被标记物)	被标记物 (或标记物)	交联方法
-NH ₂	-COOH	碘二亚胺法; 混合酸酐法; N-羟基琥珀酰亚胺法
-NH ₂	-NH ₂	戊二醛法; SPDP 法
-OH (羟基)	-NH ₂	高碘酸钠法; 琥珀酸酐法
芳香胺	酪氨酸残基	重氮化法
>C=O	-NH ₂	O (羧甲基) 羧胺法

不同，因而，所选择的化学交联剂和使用的交联方法也不尽相同，必须根据交联双方即酶和抗原、半抗原或抗体分子所具有的化学反应基团而定（表 2-3）。

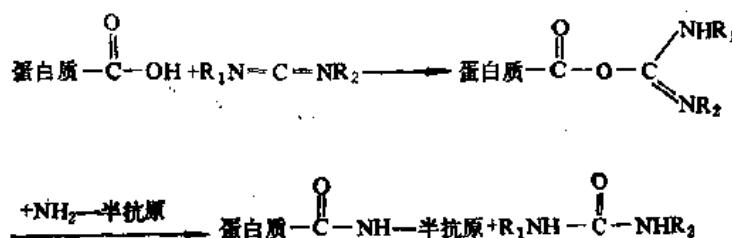
在进行标记时，对化学交联剂和交联方法的选择还必须注意以下几点原则：

- 1) 应采用非常活泼的交联剂，并在温和的条件下进行；
- 2) 对酶、抗原、抗体等蛋白质的生物活性影响要小，以尽量保护其生物活性；
- 3) 对不具有化学反应功能基团的物质，必需进行化学修饰或改造，以引入具有反应功能的基团；
- 4) 化学修饰不能改变或遮盖抗原关键的免疫活性决定簇，以保存酶结合物在进行免疫分析中的免疫反应专一性；
- 5) 某些小分子物质，虽然具有反应性基团，但为进行更有效的偶联，可预先连接作为“桥”或“间隔臂”的分子，然后再进行交联标记；
- 6) 酶结合物的产量要高，性质要稳定。

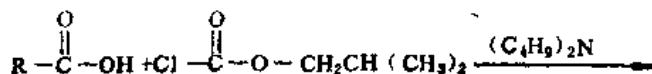
（三）在酶标记技术中常用的交联反应类型

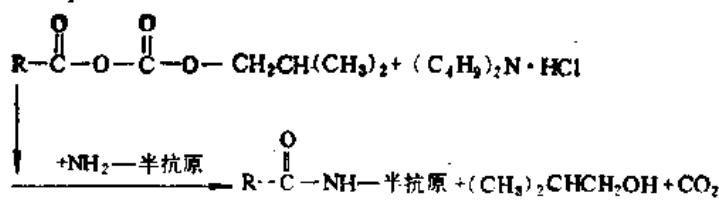
1. 氨基与羧基交联

1) 碳二亚胺 (EDC) 法：本方法原由 Goodfriend 提出，是最常用来联接小分子半抗原与蛋白质（载体）的方法。EDC ($R_1N=C=NR_2$) 是一种化学性质很活泼的试剂，能使氨基和羧基间脱水缩合而形成酰胺键。蛋白质或多肽分子上的羧基先与碳二亚胺反应，生成一中间产物，然后再与另一蛋白质或氨基化合物的氨基反应，形成偶联物。经常使用的水溶性碳二亚胺的化学名称为 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC)，它既可以和蛋白质或半抗原上的羧基结合，又可与其氨基结合，其结合反应的 pH 为 5~9，要根据交联对象选择最适 pH，如为生物蛋白样品，可选择 pH 7.0 左右。用本方法交联十分方便，只需将酶蛋白（或蛋白质载体）与半抗原按一定比例 (M:M) 溶解在适当的溶液中，混合均匀，然后加入 EDC，在 4 °C 或室温条件下，搅拌反应 24 小时，经透析分离除去未结合的半抗原，即得到酶结合物或人工抗原。

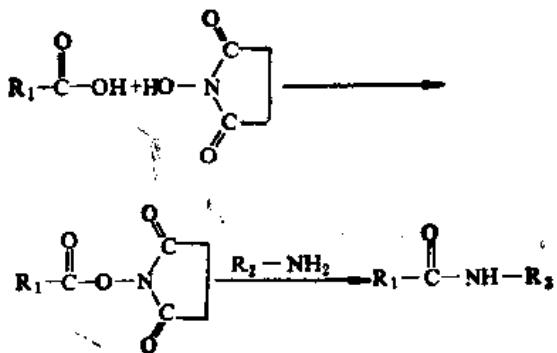


2) 混合酸酐 (MA) 法：含羧基化合物的羧基在三正丁胺（或三乙胺）存在时，与氯甲酸异丁酯反应，生成混合酸酐，这一活泼的中间体很容易与另一含氨基化合物反应形成酰胺键。



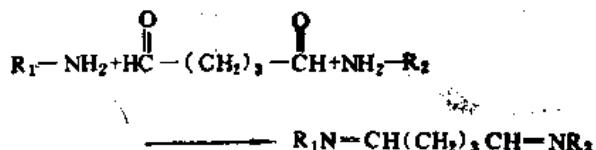


3) *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 法: 含有羧基的抗原或半抗原可与 *N*-羟基琥珀酰亚胺反应生成活化酯, 再与氨基化合物偶联。



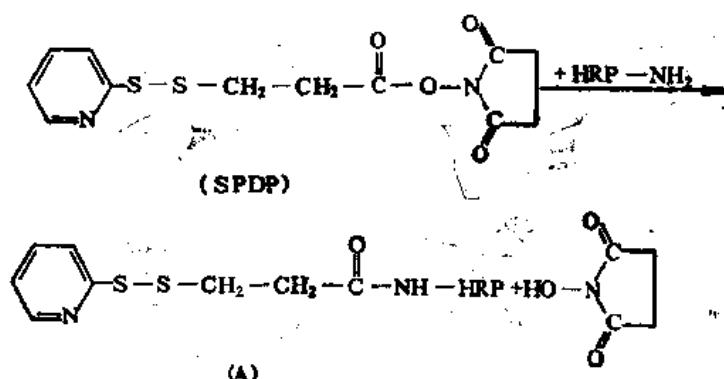
2. 氨基与氨基交联

1) 戊二醛法: 戊二醛是一种同型双功能交联剂, 它的两个醛基可分别与两个氨基化合物的氨基形成 Schiff 氏碱 ($-\text{N}=\text{C}-$), 在两个化合物之间插入一个五碳桥。

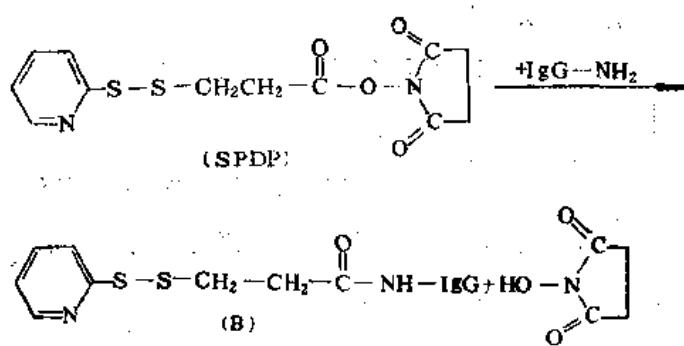


2) SPDP 法^(17,18): Carlsson 等应用一种新型的异型双功能交联剂 *N*-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯 (简称 SPDP) 进行蛋白质与蛋白质之间的交联或标记, 此反应机理可分为以下四个步骤:

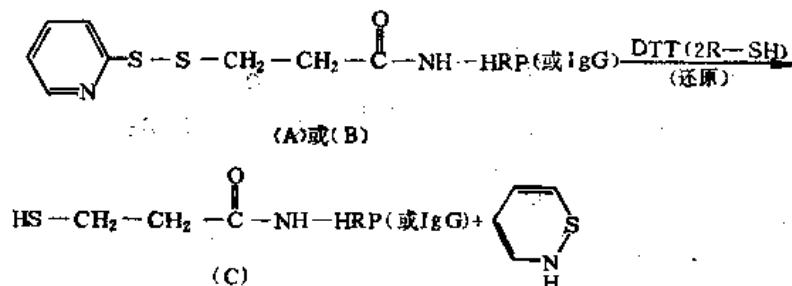
① SPDP 与第一种蛋白质 (HRP) 的氨基反应, 引入保护基——硫醇基, 得产物 (A):



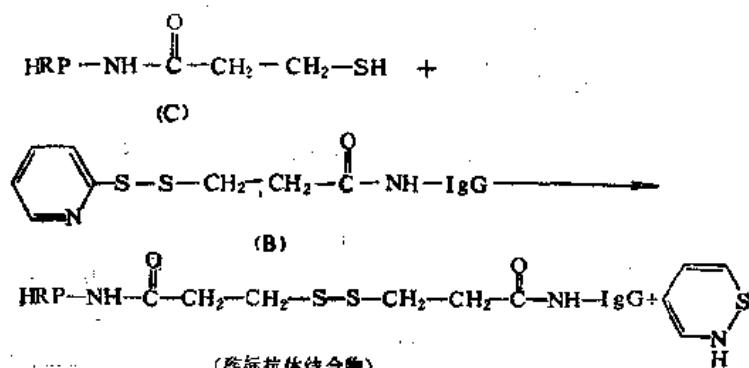
② SPDP 与第二种蛋白质 (IgG) 的氨基反应, 同反应 (1), 引入保护基——硫醇基, 得产物 (B);



③ 用还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 除去 (A) 或 (B) 中的2-巯醇吡啶保护基，得到含巯基的 (A) 或 (B)：



④ 在含巯基的 (C) 与含硫醇吡啶保护基的 (B) 之间，通过巯基与二硫键的交换作用，形成 (C) 与 (B) 的蛋白——蛋白结合物：



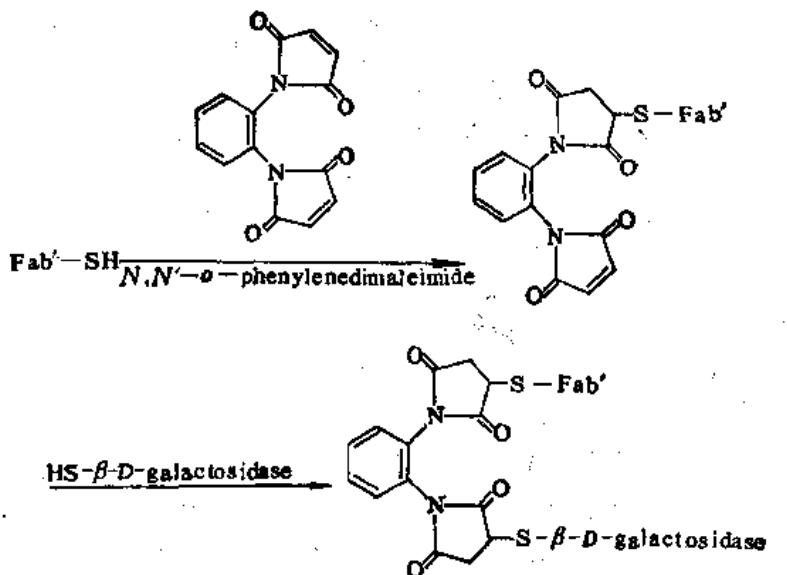
3) 其它双功能交联剂，如二异氰酸甲苯 (TDI)、苯醌 (EQ) 和氯二硝基苯砜 (FNPS) 等也可用于两种含氨基化合物的交联。

3. 巯基 (-SH) 与巯基 (-SH) 或巯基 (-SH) 与氨基 (-NH₂) 的交联^[19]

1) 苯二马来酰亚胺 (*N,N'*-O-Phenylenedimaleimide, PDM) 法：PDM是一种同型双功能交联剂，主要用于“-SH”与“-SH”的交联。

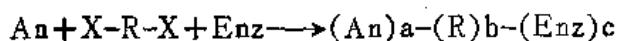
马来酰亚胺不仅可与巯基反应，而且可与氨基或羟基反应，当在相同的温和条件下进行反应时，PDM与蛋白质分子中的-SH反应最快，这对保护酶活性相当重要，同时，所形成的交联产物也很稳定，可以满足对交联结合物的要求。用PDM进行交联的方法主要分为两步，而对欲进行交联的两种蛋白质必须都具有-SH。第一步反应是首先用过量的PDM活化处理第一种蛋白，此时，PDM分子中的一个马来酰亚胺基先与第一个蛋白的-SH反应，而同一个PDM分子中的另一个马来酰亚胺基则保持原型不起反应，这是因为使用了过量的PDM之故；这时，一个马来酰亚胺基首先引入到第一个蛋白质分

子上，形成“马来酰亚胺-蛋白”中间产物。在第二步反应中，上述中间产物紧接着与第二种蛋白的—SH发生反应最后形成结合物。PDM对蛋白质(Fab'与 β -D-半乳糖苷酶)交联的化学反应简式如下：



同型双功能试剂 PDM 可用于多种蛋白质和肽类的交联，因为在温和条件下，可通过还原剂，如 *N*-乙酰基巯基琥珀酸酐(*N*-Acetylmercaptosuccinic Anhydride)将蛋白质分子中的二硫键(—S—S—)还原，很容易将巯基引入蛋白质或肽的分子中，以便用 PDM 进行交联。在抗体 Fab' 的每个分子中都有一个巯基，而在 IgG 分子中，可通过还原反应优先产生巯基，而这些巯基又是远离抗原结合部位的；由 *E. coli* 提取的 β -D-半乳糖苷酶的分子中则含有多个—SH，而这些巯基与其酶活性无关，因此，可利用这些活性基团有效地进行交联。

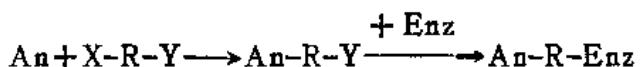
2) 马来酰亚胺-琥珀酰亚胺酯 (*N*-Hydroxysuccinimidyl Ester of Maleimide) 交联法：在免疫化学的新近发展中，为了制备蛋白质与生物分子的结合物，对用于此类结合物制备的交联剂进行了广泛地研究。一般地说，通用的一类同型双功能交联剂，如 EDC、戊二醛、二异硫氰酸酯和苯醌等，由于其分子内含有两个相同的化学活性功能团，使其在交联反应中，同时与被交联组分发生反应，因而缺乏选择性，对交联反应难以控制，易于导致相同分子的自身聚合，形成不均一的多种复合物，降低了交联反应的效率。例如在酶标记抗原或抗体的反应过程中，会发生如下情况：



其中 An 代表 Ag 或 Ab；X-R-X 代表同型双功能交联剂；Enz 代表酶；a, b, 或 c=0, 1, 2, 3, ……

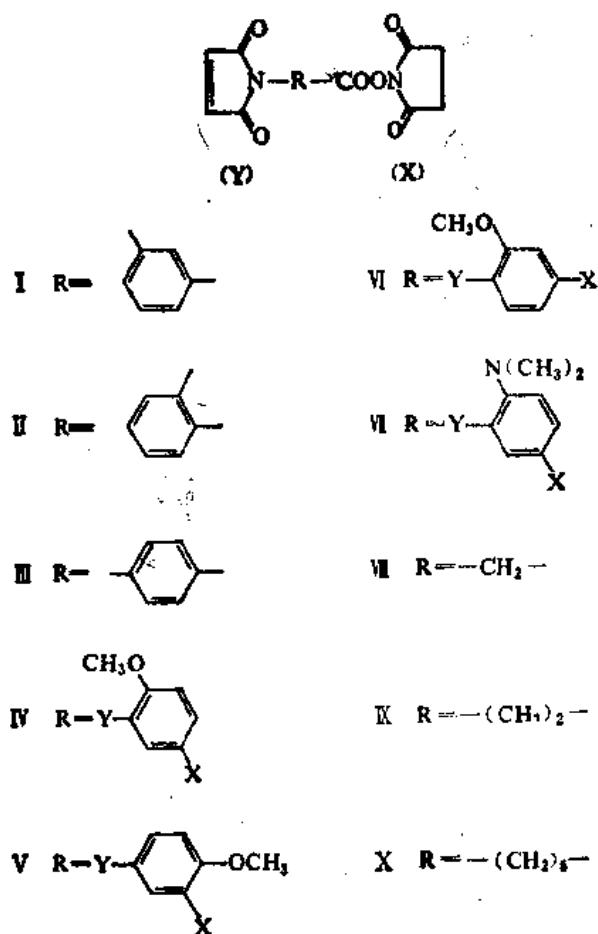
在通常情况下，所需要形成的产物 An-R-Enz 是很少的，欲将其从反应混合物中分离纯化也不容易，为了克服这些缺点，现已合成一类异型双功能交联剂，如 *N*-琥珀酰亚胺-间(*N*-马来酰亚胺基)苯甲酸酯(*N*-(*m*-Maleimidobenzoyloxy) Succinimide, MBS)这种交联剂具有两个不同的选择性反应基团，其一是 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯(*N*-Hydroxysuccinimidyl Ester, NHS)，可专一地与蛋白质分子中的氨基反应，而马来酰

亚胺 (Maleimide, MAD) 残基主要与酶或其它蛋白质的巯基反应，用这种交联剂制备酶标抗原或抗体时，可在温和的水溶液条件下，选用两步法容易地进行。第一步是将抗原或抗体蛋白的氨基与 MBS 中的 NHS 发生反应进行酰化，从而引入 MAD 反应基团，这样便于在第二步中与酶（如 β -D-半乳糖苷酶）的巯基发生交联反应。



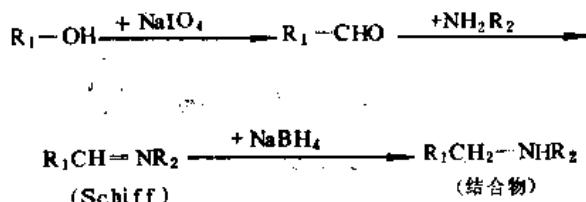
MBS 这类异型双功能交联剂具有两个选择性高活性反应基团，可与其它不同的化学基团发生反应，但是，MBS 在水溶液中不太稳定，容易分解。因此，在利用其进行化学交联时，有必要了解它们的化学结构及性质，特别是活化酯 (NHS) 的反应活性和MAD 的稳定性与结构的关系。

MBS 异型双功能交联剂的化学结构类型：在 MBS 结构中的 NHS 和 MAD 两个活性基团（分别以 X 和 Y 代表）之间通常都存在一个 R 基团。在目前已合成的此类化合物中，“R”基团有两大类型，一类是芳香族化合物，另一类是脂肪族化合物，前者又以两个活性基团 X 和 Y 基所在苯环上的位置，有间位 (*m*-), 邻位 (*o*-) 和对位 (*p*-) 之分，后者也因烃基碳链的长短而有不同。对上述化合物也有人统称为 MRS 类异型双功能交联剂，M 代表 MAD，S 代表 NHS，通常要求 M 基稳定，S 基活泼，R 基以芳香族链为最好，其中，间位又比邻位好。以下列出几种 MRS 类异型双功能交联剂的化学结构简式：

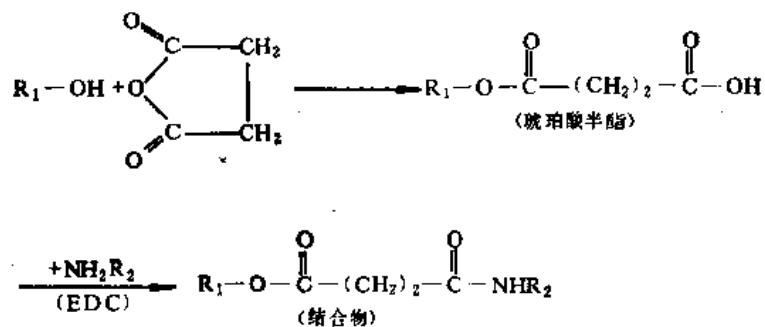


4. 糖基与氨基的交联

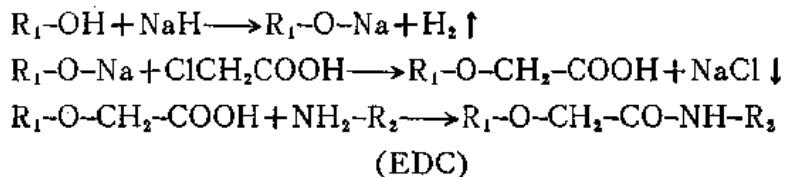
1) 高碘酸钠法：本法常用于含糖蛋白质与氨基化合物的交联，糖蛋白的羟基被氧化成醛基，然后再与氨基化合物作用形成 Schiff 式碱，最后，还原成稳定的结合物。



2) 琥珀酸酐法：含羟基的化合物首先与琥珀酸酐反应，生成琥珀酸半酯，此带羧基的中间体，再经碳二亚胺（EDC）或氯甲酸异丁酯作用，与氨基化合物反应形成酰胺键。在两个交联化合物之间插入一个琥珀二酰基。反应式如下：

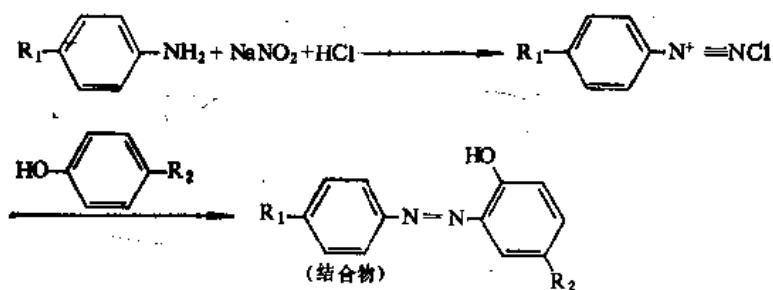


3) 氯乙酸法^[20]：含羟基的化合物与氢化钠（NaH）作用生成钠盐，然后再与氯乙酸反应形成醚基，最后在 EDC 的作用下，与蛋白质的氨基连接，生成结合物：



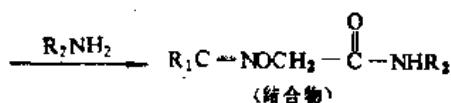
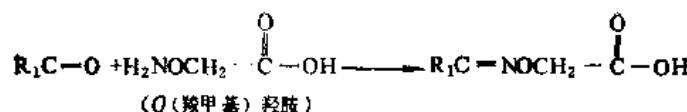
4. 芳香胺 ($\text{R}_1-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$) 与酪氨酸残基酚羟基 ($\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}_2$) 的交联

重氮化法：芳香胺能与 NaNO_2 及 HCl 反应生成重氮盐，后者可直接与蛋白质分子中的酪氨酸残基酚羟基的邻位发生反应，形成偶氮化合物。



5. 酰基与氨基的交联

O (羧甲基) 羟胺法：含酮基化合物与 O (羧甲基) 羟胺反应，生成 O-羧甲肟衍生物，此中间体的羧基与另一化合物的氨基结合，形成结合物。



(四) 酶与蛋白质的交联

酶的本质是蛋白质，因此，酶对蛋白抗原、抗体的标记，实质上就是两种不同蛋白质之间的交联。酶与蛋白质之间的交联反应，主要受到蛋白质分子内所具有的适合于偶联的化学功能团类型和数量的限制，大部分交联反应是通过蛋白质分子中的 α -和 ϵ -氨基、亚氨基和巯基的亲核性质，常用的交联方法主要是利用 α -氨基作为交联部位(表2-4)。

表 2-4 蛋白质分子的交联反应基团

反 应 基 团	相 应 的 氨 基 酸 残 基
酰 胍	天门冬酰胺，谷氨酰胺
氨基，亚氨基	精氨酸，组氨酸，赖氨酸，色氨酸
苯 基	苯丙氨酸，色氨酸，酪氨酸
羧 基	天门冬氨酸，谷氨酰胺
羟 基	丝氨酸，苏氨酸
酚 基	酪氨酸
巯 基	胱氨酸，半胱氨酸

如前所述，由于交联双方具有多种不同的反应功能团，故可据此选用不同的交联方法和交联剂。交联剂有多种，如单功能、双功能和多功能试剂。双功能试剂又可分为同型和异型两类，其中多数都可用于酶与蛋白质的交联。戊二醛法和高碘酸钠法是最通用的方法，而又以后者为最佳；二马来酰亚胺、氟二硝基苯砜、苯醌等方法也可采用。当酶与抗体蛋白用同型双功能试剂进行交联时，常常形成不均一的混合物，有酶与抗体蛋白的结合物，也有酶-酶、抗体蛋白-抗体蛋白自身结合而形成的聚合物同时存在。为克服同型双功能交联剂的这种缺点，可采用一类新型的交联剂——异型双功能试剂，其中，目前应用较多的一种是 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(简称 SPDP)，使用SPDP 可将酶与抗体蛋白通过两者的氨基进行交联，而不会形成酶或蛋白的自身聚和物。最近，生物素-亲和素系统 (Biotin-Avidin System, BAS) 的引用是标记技术一重大进展，已用于酶对抗原或抗体，以及多种物质的交联标记，它可明显地提高标记效率。利用 BAS 制备的酶标结合物，除具有抗原-抗体专一结合的特点外，还具有生物素-亲和素系统的特异亲和性，因此，结合物亦具有高度的专一性，同时也显著地增加了 ELISA 和 EMIT 的测定灵敏度。

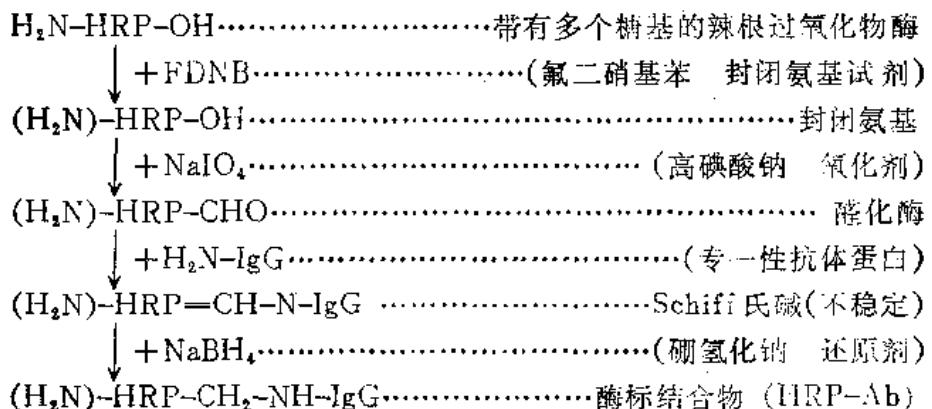
以下简要介绍酶标抗体的两种制备方法：

1. 高碘酸(钠)盐氧化法及其发展、改进的三个阶段 酶标抗体结合物是酶免疫分析中的重要试剂，酶结合物的制备是 EIA 或 ELISA 技术中的重要环节。在 ELISA 的研究和应用发展过程中，辣根过氧化物酶 (HRP) 是最常用和最方便的标记酶，而高碘

酸钠氧化制备酶标抗体结合物的方法也是最通用，最易实施的方法。因此，本方法在近20年的应用实践中，也得到不断的提高、改进和完善。

本方法的三个主要发展阶段：

(1) 1972年的 Nakane 法^[21]：其基本原理以下图示意



本法需用 FDNB (氟二硝基苯) 封闭氨基，但是，在此反应过程中所产生的氟化氢 (HF) 对酶活性有抑制作用，而且，又不能完全避免自身交联，标记周期需 4~5 天。

(2) 1978 年的 Wilson-Nakane 改良法^[22] 由于方法 (1) 存在不少缺点，Wilson 和 Nakane 等人于 1978 年又提出高碘酸钠改良法，本方法的特点是在 pH 4~5 条件下，用高碘酸钠直接氧化 HRP，而无需用 FDNB 预先封闭酶的氨基，并在加入抗体 (IgG) 蛋白之前，反应体系一直保持在低 pH 值条件。利用本方法进行标记的优点是，仅有 5% 的醛化酶 (HRP-CHO) 发生自身交联，而 (1) 法发生自身交联率则为 35%；同时，也免除了 FDNB 对酶活性的破坏；其标记周期仅为两天。

(3) 1984 年的 Tussen-Kurstak 改良法^[23] Tussen 等在前两个方法的基础上，进一步改进和简化了用高碘酸钠氧化制备 HRP-Ab 的方法，并对这一标记方法中的关键环节进行了研究。他们指出，高碘酸钠氧化法的中心问题是 NaIO_4 对酶分子中糖基（严格地说应该是指连二糖基）的氧化。在此氧化过程中，若氧化强度不足，会影响交联标记的效率；但是，如果氧化作用过强，则会导致 ① 氧化结果形成羧基而不是醛基；② 酶失活；③ 形成聚合物，这是因为强氧化所产生的 HRP-CHO 易成为两个 IgG 分子之间的桥分子；④ 给用 ConA-Sepharose 亲和层析纯化标记结合物带来困难。因此，特别强调要选择最佳氧化条件。由表 2-5 可以看到，高碘酸钠氧化的最佳浓度为 4~8 mmol，其结

表 2-5 酶结合的效率**

NaIO_4 浓度 (mmol)	结合的 HRP 部分 ($\text{OD}_{405\text{nm}}$ 单位)*b	比活性 % (与原活性比较)
1	0.714	98.7
2	0.836	94.3
4	0.935	89.6
8	0.950	78.5
16	0.922	64.1
32	0.897	46.0

* a 三次实验的平均值；

* b 结合部分的 HRP 是用 50% 饱和度硫酸胺沉淀得到的 (游离部分的 HRP 在 70~90% 饱和度硫酸胺沉淀)。

合率可以达到95%；酶活性可保留80~90%。由其实验结果表明，高碘酸钠的浓度对于有效的结合和酶活性的保护是非常关键的因素。

除此之外，他们还在以下几方面进行了探讨和改进：

① 在标记过程中，试剂系统要使用双蒸水配制，以避免pH及水中所含杂质对氧化作用和酶活性产生不良影响；

② 在酶与抗体交联时，要加入干燥的Sephadex G-25，这样可使其迅速吸收反应溶液中的液体，以增加HRP-CHO和IgG的反应浓度，而小分子交联剂(NaIO₄)则可被分子筛G-25吸进微孔中，以借此控制并降低反应系统中NaIO₄的相对浓度。此举有助于加速HRP-Ab结合物的形成；

③ 在标记时，所采用的HRP/IgG摩尔比应略高于1的比例，以保证HRP与IgG充分相互结合；

④ 对Schiff氏碱的稳定化作用，是采取类似于还原性甲基化反应的方法进行的，因为硼氢化钠在水溶液中几乎立即水解，所以要重复加入一次，同时孵育时间也缩短许多。

⑤ 在使用ConA-Sepharose亲和层析对结合物进行纯化时，只有在HRP的糖基部分没有被NaIO₄过分氧化，即高碘酸钠的浓度低于15mmol时，才能进行有效的纯化。

【附】Tussen-Kurstak改良法简要步骤(时间：1天)⁽²³⁾

(1) 活化 辣根过氧化物酶(HRP)的活化

① 在青霉素瓶中用新鲜配制的0.5ml~0.1mol/L碳酸氢钠溶液溶解5mg纯化的HRP(用双蒸水配制)；

(配制) 0.1mol/L NaHCO₃: 16.8mg NaHCO₃溶于2ml双蒸水中；

(注意：此时溶液颜色呈棕色)

② 在上述酶液中逐滴加入新鲜配制的0.5ml 8~16mmol/L NaIO₄(根据HRP使用量确定)，加塞，避光，室温(20℃)条件下慢速电磁搅拌反应2小时；

(配制) 20mmol/L NaIO₄: 21.4mg NaIO₄溶于5ml双蒸水中；

(注意：在滴加NaIO₄的过程中，反应液的颜色应由棕色逐渐变为暗绿色，如无变化，可加少许固体NaIO₄)

(2) 标记 活化HRP-CHO与IgG交联

① 用0.1mol/L NaHCO₃, pH9.2(1~2ml)溶解15mg纯化的IgG；

② 将HRP-CHO与IgG溶液混合，搅拌，把干燥的Sephadex G-25加入其中(G-25加入量相当于HRP和IgG总量的1/6)室温搅拌反应2~3小时；

(3) 稳定化

① 从上述交联反应液中离心分离出Sephadex G-25；

② 加入1/20体积的新鲜配制的5mg/ml NaBH₄(在0.1mmol/L NaOH中)，30分钟后再加入3/20体积的另外新配制的NaBH₄溶液，放置一小时，使Schiff氏碱还原成稳定的酶标抗体结合物；

(4) 纯化

① 用等体积的饱和硫酸铵溶液将结合物和游离的IgG沉淀，收集沉淀物，用PBS

溶解并充分透析；

② 准备一支小的 ConA-Sepharose 柱，加入上述溶液，用 PBS 洗脱游离的 IgG，吸附的结合物则用含有 0.01mol/L 甲基- α -D-甘露（糖）吡喃糖苷的 PBS 洗脱；

（说明：如果 HRP 和 IgG 的纯度较高，上述纯化过程可以省略）；

③ 在加入等体积的甘油后，将结合物置于 -20℃ 保存。

2. 异型双功能交联剂 SPDP 制备酶标抗体结合物^[17,18]

酶标抗体结合物的制备，常使用同型双功能交联剂，如戊二醛、碳二亚胺等。使用这类交联剂的缺点是在生成结合物的同时，还不可避免产生酶-酶和抗体-抗体的自身聚合物，致使结合物产量低，活性也不高。高碘酸钠法制备的结合物活性虽较高，但也有一定的自身聚合；同时由于 Schiff 氏碱的形成，结合物不稳定，必需用硼氢化钠还原，继而又会造成抗体和酶活性的明显丢失，且此法又仅限于 HRP。Carlsson 等^[17]应用异型双功能交联剂 N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯 (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP) 制备蛋白-蛋白结合物，Nilsson 等^[24]应用 SPDP 制备 HRP-IgG 结合物，中国医学科学院基础医学研究所王世中等^[18]对 SPDP/HRP、SPDP/IgG、HRP/IgG 的不同使用比例对交联标记产物活性的影响进行了研究，以期获得活性较高的酶标抗体结合物，同时还研究了从结合物中除去游离 HRP 和游离 IgG 的方法。

SPDP 法制备 HRP-IgG 结合物简要步骤：

1) 用 SPDP 处理 HRP：取 5mg HRP，溶于 0.5ml 0.1mol/L PBS (pH7.5) 中，迅速滴入一定量（表 2-6）SPDP 液（溶于无水乙醇），在 23~25℃ 反应 30 分钟，同时轻轻搅拌。反应结束后，将反应液通过 Sephadex G-25 柱以除去多余的 SPDP 及副产物，平衡及洗脱液均为 0.1mol/L 醋酸缓冲液，pH4.5 (含 0.1mol/L NaCl)。收集酶蛋白部分（简称 HRP-PDP），必要时进行浓缩。

2) 用 SPDP 处理 IgG：基本上与 HRP 的处理步骤相同，仅在用 G-25 分离时，平衡及洗脱缓冲液是 0.1mol/L PBS pH7.5，收集 IgG 部分（简称 IgG-PDP），必要时进行浓缩。

3) HRP-PDP 的还原：取上述 HRP-PDP 溶液，加入固体 DTT (二硫苏糖醇)，使其终浓度达到 25mmol/L，在 23~25℃ 反应约 25 分钟，不时搅拌。反应结束后，过 Sephadex G-25 柱。平衡及洗脱缓冲液为 0.1mol/L PBS pH7.5，收集酶蛋白部分（简称 HRP-SH），必要时进行浓缩。

4) HRP-SH 与 IgG-PDP 偶联：将上述 HRP-SH 和 IgG-PDP 液混合，在 4℃ 放

表 2-6 SPDP 制备酶标结合物 (HRP-IgG) 的反应物与活性之比

实验序号	SPDP/HRP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	SPDP/IgG ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	HRP/IgG (mg/mg)	结合物浓度 ($A_{280\text{nm}}/\text{ml}$)	结合物活性 (稀释度)
1	6.25	11.7	1.0	1.0	1: 500
2	8.00	12.48	1.0	1.0	1:1,000
3	11.69	12.48	1.33	1.0	1:11,520
4	11.69	12.48	1.33	1.0	1:20,000
5	15.62	12.48	1.07	1.0	1:13,888
6	23.38	24.96	1.33	1.0	1:5,600

置 20 小时，不时取出轻摇，再放回 4 ℃ 冰箱中；反应结束后，将溶液浓缩至 0.5ml。其中产物主要是 HRP-IgG 结合物。

5) HRP-IgG 中游离 HRP 的除去：用 Sephadryl S-200，层析柱为 67×1.3cm，床体积为 88ml，平衡及洗脱缓冲液均为 0.01mol/L PBS pH7.5，收集第一峰，测定各管 $A_{280\text{nm}}$ 和 $A_{403\text{nm}}$ ，第二峰主要是游离的 HRP，呈浅棕色。

6) HRP-IgG 中游离 IgG 的去除：在 HRP-IgG 结合物中可能含有少量游离 IgG，需用 ConA-Aff-Gel 柱除去。

7) 在上述标记过程中，凡涉及 G-25 层析步骤时，均可以透析法代替之。

(五) 酶与半抗原的交联

由于酶标半抗原与人工抗原都是由蛋白质（酶蛋白或载体蛋白）与小分子化合物（药物，毒物，激素等）组成的结合物（表 2-7）。因此，两者的交联制备方法从化学角度来看，是完全相同或基本类似的。所以，用作免疫原的人工抗原（即半抗原与载体蛋白结合物）的制备方法，大体上都可用作酶免疫分析试剂的酶标半抗原结合物的制备。但是，两者亦有差异。

表 2-7 酶标半抗原与人工抗原构成比较

结合物	蛋白质	半抗原(小分子)
酶标抗原	HRP	T-2 毒素
人工抗原	BSA	T-2 毒素
酶标抗原	G6PDH	利多卡因
人工抗原	BSA	利多卡因
	HCY	利多卡因

注：BSA：牛血清白蛋白；HCY：血蓝蛋白

酶标半抗原是作为酶免疫分析（ELISA 或 EMIT）的检测试剂（称检测抗原），因此，要求此结合物既具有酶活性，又具有抗原活性；而人工抗原则是作为免疫原的，其中的半抗原只有与载体蛋白结合后才具有免疫原性，在这里，载体蛋白仅仅作为载体，以在被免疫的动物体内诱导产生抗体。所以，在进行化学交联时，对两种交联产物（结合物）中蛋白活性的要求差异很大，对于酶蛋白应尽量保持其活性，对于载体蛋白则无严格要求，一般地说，只要不变性即可。

人工抗原的合成是化学免疫的重要问题，化学免疫研究的对象，除上面提及的药物、毒物、激素外，还有多糖类、神经递质、肽类、核酸及生物体内其它小分子活性物质，总起来说，它们大多都是无免疫原性的半抗原，在对其进行免疫学及其它相关研究时，一方面要通过化学合成的手段，即蛋白质连接技术，经与载体蛋白交联合成制备人工抗原，继而用其免疫动物制备相应的抗体或单克隆抗体，作为研究用的探针；另一方面还必须将此探针用各种标记物进行标记，如本文论及的酶标记，以便用作研究工具；在分子生物学研究中，包括核酸或基因探针的研究及应用，多种类型探针的标记也都将涉及蛋白质连接技术。

半抗原分子量一般较小，其结构及化学功能团的性质多种多样，数量各不相同，在与酶蛋白或载体蛋白进行交联时，必须考虑交联双方的性质、交联剂、交联方法和载体

的选择等。为了获得合格的人工抗原或酶标半抗原结合物，还要遵循以下几点原则：

- 1) 某些具有化学反应基团的小分子半抗原，一般不需要经过任何化学修饰，即可与酶或载体蛋白直接交联；
- 2) 另一些具有化学反应基团的药物或激素小分子物质，为增强其与抗体的免疫学识别，减少半抗原与抗体相互作用时的空间障碍，常需要在半抗原与酶分子之间插入4~6个碳链长的间隔臂；
- 3) 对某些不具备必须反应基团的半抗原，则必须进行人工化学修饰，将反应基团引入半抗原分子中，使之成为衍生物，然后才能与酶或载体蛋白进行交联。
- 4) 半抗原与酶交联时，必须注意与酶分子的交联结合部位，应该避开酶的活性中心，否则，将会影响酶活性，降低两种类型 EIA 的检测灵敏度；
- 5) 在酶与半抗原的交联反应中，必须注意保护酶活性，通常是在反应体系中，加入“酶底物-辅酶系统”，并在低温及温和条件下进行交联；
- 6) 作为检测用的酶标半抗原，与作为免疫原的人工抗原，在制备时，最好选用不同的交联剂或交联方法；在 ELISA 中，所使用的检测抗原及免疫原，其载体蛋白绝对不能相同^[20,26,28]。

酶与半抗原的交联方法以碳化二亚胺 (EDC) 法、混合酸酐 (MA) 法、琥珀酸酐法、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 法和重氮化法等最常用。EDC 和 MA 法都是先将反应基团——羧基引入半抗原，再将此半抗原衍生物与酶蛋白的氨基缩合成肽键。也有人将高碘酸钠法用于酶与半抗原的交联。从理论上讲，凡含有氨基的半抗原都可以用高碘酸钠氧化的 HRP-糖蛋白的醛基进行交联，但是，发现 T4 用高碘酸钠法的交联则是无效的。用新近合成的几种同型或异型双功能交联剂，如本文前面介绍的 *m*-马来酰亚胺-N-羟基琥珀酰亚胺-苯甲酸酯 (MBS) 可将含氨基的半抗原与含巯基的 β -D-半乳糖酐酶进行交联^[28]。

以下简要介绍几种酶标半抗原及人工抗原的制备方法实例：

1. 琥珀酸酐法制备 HRP-T2 (毒素)^[27,28] 或 T2-BSA 人工抗原结合物^[20]

由于 T2-毒素是含有羟基 (-OH) 的小分子半抗原，所以在用 HRP 标记或制备 T2-BSA 时，需采用琥珀酸酐法进行交联，具体步骤如下：

(1) T2-HS (T2-琥珀酸半酯) 的制备：

① 称取 T2-毒素 20mg，用 5ml 吡啶溶液溶解，加入琥珀酸酐 420mg，在 90~100℃ 搅动反应 4 小时；

② 减压蒸馏，除去溶剂吡啶；

③ 加氯仿 10ml 溶解，再加蒸馏水 10ml 混合，在分液漏斗中抽提，将未反应的试剂抽提到水相，T2-SH 仍留存于氯仿中；

④ 将 T2-HS 氯仿溶液在 60~70℃ 进行蒸馏以除去氯仿；

⑤ 蒸馏后余下的 T2-HS 为固体，再用 DMF (二甲基甲酰胺) 2ml 溶解之。

(2) T2-(HS)-HRP 结合物的制备 将 15mg HRP 溶于 3ml 0.01mol/L pH7.2 PBS 中，加 EDC 50mg 溶解，然后，将 T2-HS 0.5ml 缓慢逐滴加入酶液，室温反应 30 分钟后，再加入 50mg EDC，于 4℃ 反应 24 小时，然后用 PBS 充分透析。

(注：HRP-T2 结合物用于对 T2-毒素检测的竞争 ELISA)

2. 混合酸酐法制备 G6PDH (葡萄糖-6-磷酸脱氢酶) 标记利多卡因 (Lidocaine, Li) 结合物^[29]

(1) Li-混合酸酐的制备 首先将 Li 经化学修饰 (琥珀酸酐法, 略), 在其分子中引入羧基 (-COOH), 制成 Li-COOH (Li-琥珀酸半酯); 然后, 将此 Li-COOH 10mg (0.0285mmol) 溶于 375μl 的 DMF 中, 用电磁搅拌混溶。在 -10℃ 条件下, 边搅动边滴入 21μl 的三乙胺, 再缓慢滴入 14μl 的卡必醇氯甲酸酯, 于 -10℃ 继续搅拌反应 1.5 小时, 此全部过程应保持无水, 即获得 Li-混合酸酐 (Li-MA)。

(2) 酶——底物溶液的制备 在冰浴中, 将 G6PDH (L.m) 1mg 用 50mmol/L pH8.1 Tris-HCl 溶解, 同时加入 G6P-Na (葡萄糖-6-磷酸钠盐) 10mg 及 NADH 3mg (底物一辅酶系统, 用于保护酶活性), 使其溶解, 随后缓慢加入 300μl 卡必醇, 用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 9.0。

(3) G6PDH-Li 的交联 将酶-底物溶液置于冰浴中, 在搅拌条件下, 每隔 10~15 分钟向此酶液中缓慢加入一定量 (25μl, 50μl, 100μl……) 的 Li-MA 溶液, 反应 10~15 分钟后, 分别取出反应液 5μl 测定酶活性及 Li 半抗原的抗体对标记酶活性的抑制率。直至加入 Li-MA 的量所引起酶活性的下降程度最低, 而抗体对酶活性的抑制率又最高时, 此标记过程即完成 (表 2-8)^[29]。

表 2-8 G6PDH-Lidocaine 交联反应中酶活性变化及抗体抑制率

反应序号	反应物	pH	ΔOD	校正结合物 总体积(ml)	I %	D %	加入 MA 总量
1	酶溶液 + MA	9.04	745	1.31	—	—	—
2	1 + 25μl	9.00	725	1.335	7.9	3.2	25
3	2 + 50μl	8.97	681	1.385	16.1	9.0	75
4	3 + 50μl	8.94	626	1.435	27.9	16.5	125
5	4 + 100μl	8.90	553	1.535	57.5	23.1	225
6	5 + 50μl	8.89	495	1.585	69.6	34.0	275
7	6 + 50μl	8.88	432	1.635	81.4	42.4	326
8	7 + 50μl	8.87	310	1.685	93.5	58.6	375

注: ① 反应物为酶溶液与依次加入的 Li-MA 量;
 ② I % 表示 Li 半抗原的抗体对酶活性的抑制率;
 ③ D % 表示 Li 衍生物与酶交联引起的酶活性丢失;
 ④ 用本方法制备的 G6PDH-Li 结合物用于对 Li 检测的 EMIT 法。

3. 碳化二亚胺法 (EDC) 制备人工抗原

最近几年, 在对无免疫原性小分子物质的化学免疫研究中, 采用碳化二亚胺作为交联剂制备合成人工抗原的工作愈来愈多, 因为用这种试剂进行交联最为方便, 除交联的一方作为载体的蛋白质, 具有多个氨基或羧基外, 不少小分子化合物也具有此反应基团, 或通过化学修饰引入羧基。因此, EDC 交联法已被广泛应用, 并为大家所熟悉。然而, 在实践过程中, 也遇到不少问题, 给相关研究带来不少困难, 以下就有关问题略加讨论。

使用 EDC 试剂进行化学交联虽然非常方便, 但它除具有同型双功能交联剂的缺点外, 在合成人工抗原时, 还会出现异常情况。

如前所述, EDC 是一类非常活泼的化学交联剂, 据文献报道, 它可以交联含有多种类型化学功能基团的化合物, 包括羧酸、胺、磷酸、醇类、含巯基化合物等。交联过程至

少可分为两步：如图 2-1 中的反应①和反应②，假定含氨基的半抗原与载体蛋白的交联是通过酰胺键连接，如反应②；然而，EDC 也可以通过分子重排与蛋白的羧基结合，形成一种稳定的 N-取代脲，这一反应过程如图 2-1 中的反应①和③，在此反应中，载体蛋白如是白蛋白，取代脲就结合到该蛋白的羧基上。

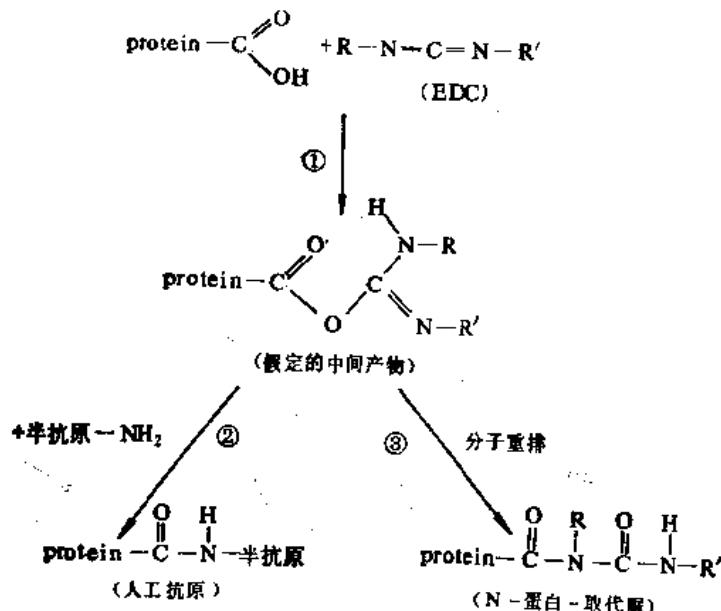


图 2-1 碳二亚胺法制备人工抗原交联反应的可能机制

有人认为，在用 EDC 合成人工抗原时，可能形成两种产物，一种是半抗原-蛋白复合物（即本合成的目的产物——人工抗原），另一种则是取代脲-蛋白复合物（图 2-1）。然而，这两种产物往往是被当作均一的人工抗原作为免疫原给动物免疫的，但是，实际上加到载体蛋白分子上的外源性抗原决定簇就有两种，一种是半抗原的，一种是取代脲的，因而，也就可能产生两种抗体。后一种抗体往往对半抗原的检测专一性和灵敏度有明显的干扰，使问题复杂化。为了克服或减少取代脲所产生抗体的影响，可以采用两种不同的碳二亚胺；用第一种碳二亚胺合成半抗原-蛋白结合物，即用于免疫动物的人工抗原（免疫原）；而用第二种碳二亚胺合成的结合物作为抗体的检测抗原，当然，两者也可调换使用。

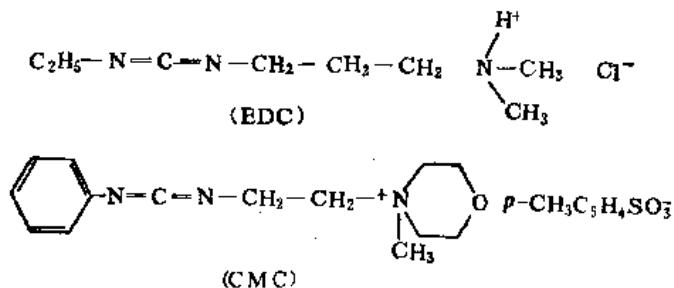
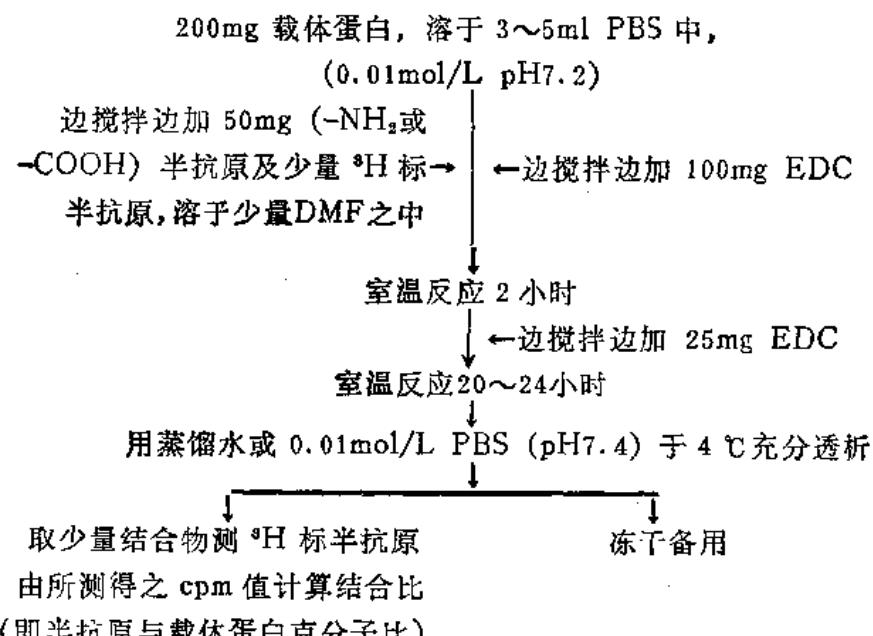


图 2-2 两种水溶性碳二亚胺 EDC 和 CMC 的分子结构

可以选用的两种水溶性碳二亚胺是 EDC 和 CMC（图 2-2），其化学名称分别为 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride[1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐，EDC 或 Ethyl-CDI]和 1-cyclohexyl-3-[2-morpholinyl-(4-ethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate[1-环己基-3-(2-吗啉代乙基)-碳

二亚胺对甲苯甲磺酸，CMC 或 Morpho-CDI)。

以下简要介绍 EDC 法制备人工抗原的操作步骤：



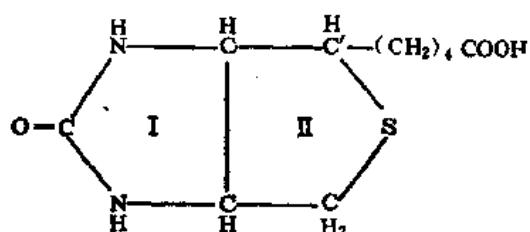
说明：在交联过程中，可不加 ³H 标半抗原，结合比可用其它方法计算。

(六) 亲和标记法

除上述使用化学交联法制备酶标结合物或人工抗原结合物以外，近 20 年来，又出现了生物亲和(配体)交联法，目前，已广为采用的有 BAS 法，SPA 法，PHA 法和 PAP 法等。

1. **BAS (Biotin-Avidin) 法^[80]** BAS 是利用生物素 (Biotin, B) 与亲和素 (Avidin, A) 之间具有很强亲和力的特性，作为酶对抗体标记的一种通用工具。

生物素又称维生素 H，是生物体内羧化酶的辅酶，广泛存在于动植物体内，特别是在蛋黄、肝、肾等组织中的一种小分子生长因子，分子量为 244.31，等电点为 pH 3.5，分子式为 C₁₀H₁₆O₅N₂S，其结构式为：



式中 I 环为咪唑酮环，又称 ureido 环，是与亲和素结合的主要部位，II 环是噻吩环，C' 上的侧链末端羧基是与酶和抗体标记结合的唯一部位。

亲和素亦称抗生物素蛋白，富于鸡卵清中，是一种分子量为 68,000，等电点为 pH 10.5 的碱性糖蛋白，由四个相同的亚基组成，其间通过二硫键相连接。已经知道，在生物素与亲和素的相互反应中，有很强的亲和力 ($K_a = 10^{16}/M$)，为抗原—抗体反应的百万倍，其结合后异常稳定而不易解离。由于 Avidin 与 Biotin 的结合仅仅发生在 Biotin

的 I 环结构部位，而对 Biotin 分子中 II 环侧链之羧基的化学修饰，在形成具有与生物大分子结合的反应活性基团的生物素衍生物时，此两过程互不干扰；也就是说，对 Biotin-II 环侧链羧基的化学修饰，及此后与生物大分子（抗体或酶）的结合，不影响 Biotin 通过 I 环与 Avidin 结合。同时，由于 Avidin 的每个亚基可以均等地结合一个 Biotin 分子，所以，每个 Avidin 分子可同时结合四个 Biotin 分子，因而，亲和素本身是一个多价分子。这样，如在同一个反应体系中，有两种不同的生物素化蛋白（例如抗体或酶）的生物素残基存在时，它们则可同时被亲和素分子所接受（或结合）。

Biotin 活化后具有很高的比活性，一个蛋白大分子或酶分子可与多个 Biotin 分子交联或标记，使酶或其它标记分子成为多价分子。因此，当酶与抗体通过 BAS 进行交联时，便构成一个多级放大系统^[10]。

利用 Avidin 与 Biotin 之间的独特的亲和力，以及两者既可与大分子蛋白（如抗体等）进行偶联，又可用酶等标记物所标记的特性，便形成了一种具有高特异性、高灵敏性和高稳定性的 Biotin-Avidin 系统（BAS）。BAS 既是一种标记工具，又是一种检测系统。由于上述优点，BAS 已在生物医学多种科研领域迅速推广使用。在实际应用中，通常可以分为几种类型（见表 2-9）

表 2-9 BAS 标记及检测方法类型

方法及类型	标记及反应层次
直接法	BAB
	BA
	ABC
间接法	BAB
	BA
	ABC

注：① Ag, Ab₁, Ab₂ 分别为抗原，第一抗体及第二抗体；

② Ab-B, Ab₂-B 分别为生物素化抗体及生物素化抗抗体；

③ A*, B* 分别为标记亲和素、标记生物素

在应用 BAS 的标记及检测技术中，必须进行 Biotin 活化，抗体或其它生物大分子的生物素（活）化，以及酶对 Biotin 或 Avidin 的标记。

(1) 活化生物素 (Biotin-N-羟基琥珀酰亚胺酯, BNHS) 的制备：

将 0.8 g 的生物素溶于 12 ml 的 DMF 中，加 0.8 g 双环己基碳二亚胺 (DCCI) 和 0.6 g N-羟基琥珀酰亚胺，室温下搅拌过夜，过滤后取上清液，在减压下加热到 100℃ 除去 DCCI 结晶，再用异丙醇重结晶，即获得活化生物素 (Biotin-N-羟基琥珀酰亚胺酯, BNHS)。

生物素活化除上述 NHS 法外，还有光敏活化法和肼化法，此不赘述。

(2) 生物素化抗体 (B-Ab) 或酶标生物素 (HRP-B) 的制备：

将含 0.1 mol/L BNHS 的 DMF 溶液 0.5 ml 与 10 mg 的 IgG 或 HRP 的 0.1 mol/L pH 9.0 NaHCO₃ 溶液 1 ml 混合，在室温下反应 1~3 小时，再于 4℃ 用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 透析过夜，4℃ 保存备用。

(3) 酵标亲和素的制备：用常规过碘酸钠法（略）。

在 Avidin-Biotin 系统的实际应用中，由于 Avidin 的强碱性质 (pI 10.5)，以及在

其分子上有糖基部分的存在而受到限制，容易引起较高的非特异性结合。有人在 1964 年^[30]发现一种由链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) 产生的 Biotin-结合蛋白，称为链亲和素 (即 Streptavidin)，它很类似于卵白蛋白亲和素，这种细菌蛋白可与 Biotin 形成一种结合很强又专一的非共价键复合物，它也由四个相同的亚基组成，每个亚基都含有一个单一的 Biotin 结合部位。链亲和素 (Streptavidin) 与亲和素的主要区别在于其每个单聚体都无糖基化，即是一种非糖基化蛋白，其 pI 为中性。两者尽管都富含色氨酸 (Tryptophan) 残基，但它们各自的氨基酸组成则有很大差异。在表 2-10 中列出两种亲和素制剂的主要性质。

表 2-10 Avidin 和 Streptavidin 的主要性质比较^[30]

	Avidin	Streptavidin
分子量	67,000	60,000
亚基分子量	15,600	14,600
K _a (avidin-biotin 复合物)	~10 ¹⁵ /M	~10 ¹⁵ /M
E ₂₈₂ (1mg/ml)	1.54	3.4
与 Biotin 结合部位	1	1
每 个 亚 基 含 有	寡糖	0
	甘露糖	0
	N-乙酰氨基葡萄糖	0
	色氨酸	8
	酪氨酸	6
等电点(pI)	>10	<7
赖氨酸	9	4
精氨酸	8	4
天冬酰胺 + 天冬氨酸	15	12
谷氨酰胺 + 谷氨酸	10	9
脯氨酸	16	—

由于链亲和素是一种既非碱性，又无糖基化的细菌蛋白，所以，在使用 Avidin-Biotin 系统中，时常遇到较强的非特异性结合等缺点，这时，则可由链亲和素代替而加以克服；因此，链亲和素及其结合物，为 Biotin-Avidin 试剂家族增添了一个很受欢迎的成员。目前，国内还未见报道此种产品，而进口价格比较昂贵，故未能推广使用。与 Avidin 一样，可通过固相 Biotin 亲和柱，来对其进行分离纯化。

综上所述，由于生物素与亲和素（或链亲和素）有极强的亲和力，在其作为标记或检测反应系统时，其反应时间短，结合后又极其稳定，生物素标记抗体或酶的摩尔结合比远比其它方法为高，同时也不影响抗体或酶的活性，而生物素化抗体的产率几乎达 100%，因此，不存在测定时未标记抗体的竞争性抑制；此外，生物素标记的结合物活性稳定，易于长期保存，灵敏度无明显下降。所以，在各种类型的配体结合分析中，可借助 BAS 标记及检测系统获得更为专一，灵敏快速，经济实用的效果。

Biotin-Avidin 技术的应用^[31]：BAS 技术的主要优点之一是，凡能与 Biotin 结合的任何物质都可通过 BAS 进行检测，因此，除上述利用免疫学系统进行检测外，也可不经过抗原-抗体反应，在下述领域开展研究：

- ① 核酸探针的标记与检测，包括 DNA、RNA、合成的寡核苷酸、修饰核酸分子探

针等，如将 Biotin 标记的病毒 DNA，用于在原位杂交中对病毒基因组的定位；

- ② Biotin 标记激素，用于检测和研究激素受体；
- ③ Biotin 标记毒素，用于毒素受体检测和研究；
- ④ Biotin 标记凝集素，可用于凝集素受体或特异性糖蛋白结合物的检测；
- ⑤ 将 Biotin 标记的凝集素注入轴突，用于研究轴突的逆向传导。
- ⑥ 用于对各种蛋白、核酸及其它生物大分子的分离纯化。

2. SPA 法 SPA 是金黄色葡萄球菌细胞壁中的 A 蛋白的简称 (Staphylococcal Protein A, SPA)，可与 IgG 的 Fc 段上的位点特异结合，它不是 IgG 的抗体，而是一种天然存在的蛋白质。SPA 只与 IgG₁, IgG₂, 及 IgG₄ 三个亚型结合，也能与多种哺乳动物 IgG 的 Fc 片段结合，其特异性相当高，同时，这种结合并不影响抗体的免疫活性。因此，近年来，曾将提纯的 SPA 代替第二抗体用于标记，现已制成 HRP 与 SPA 的酶标结合物，并有市售商品。

用 SPA 作为第二抗体制备标记结合物方法很简易，产物性质稳定，又可作为通用标记试剂，并可与多种标记物，如酶、同位素、荧光素、铁蛋白、胶体金等经多种交联方法进行标记。

3. PHA 法 植物凝集素 (PHA) 和刀豆球蛋白 (ConA) 等是一类分布很广的天然含糖蛋白质，又称选择素，可与糖类专一性地结合。利用这种特性，可将其作为标记工具与抗体或抗原交联结合，也可与其它含糖基的物质结合，直接或间接地用于标记分析。

4. PAP 法 PAP 是一种免疫学交联法，即用 HRP 为免疫原免疫动物，制备抗酶抗体，利用 HRP 与其抗体的免疫反应关系，形成酶——抗酶抗体结合物 (即酶抗原-抗体复合物)，再经对同一种动物的 IgG 抗抗体 (Ab₂) 的结合交联，构成一个完整的免疫检测系统。这种利用免疫反应进行交联的标记方法，又称为不标记酶法，意指不用通常所采用的化学交联法制备酶标抗体结合物的方法，此法是一种人工亲和配体交联法，而与前三者有异。

三、酶标抗体及人工抗原结合物的分离纯化与鉴定

在所制备的酶标结合物中，既含有酶与抗原、半抗原或抗体的交联产物，又含有未结合的酶、抗原、半抗原或抗体等组分的游离部分。在合成的人工抗原结合物中，其情况相对而言要比前者简单得多，也由于用途的差异，要求也不尽相同。对人工抗原的分离纯化，一般只需进行透析即可，由于在人工抗原合成的反应系统中，仅有载体蛋白一种大分子物质存在，半抗原及交联剂又都是小分子，小分子物质很容易经透析法除去，而未结合载体蛋白的存在，对作为免疫原的人工抗原来讲，一般无影响，可不进行分离。然而，对于酶标结合物来说，由于反应系统中有两种大分子蛋白存在，而反应产物即酶结合物本身也是非均一的，这些多种组分的同时存在，结合物作为免疫分析检测试剂，必然对不同类型的免疫分析产生程度不同的干扰。因此，在制备酶标抗体结合物时，除了严格控制酶标交联反应的条件，使之达到尽量完善的结合外，还必须根据酶结合物的种类、交联方法及免疫分析的具体要求，采用不同的方法对结合物进行分离、纯化及鉴

定，以获得高质量、高产率的结合物。

在酶免疫分析中，对酶与蛋白抗原、抗体结合物的纯化，是比较复杂和困难的工作，要达到满意或完善的纯化实际上是不可能的，然而，随着生物化学分离技术的发展与不断改进，通过采用一些有效的分离手段，目前，已基本上能够满足研究工作的实际需要。在这一工作中，最常使用的纯化方法，是蛋白质分级分离技术，如 Sephadex G-150 或 G-200 凝胶过滤，但是，要对不均一的结合物进行完全纯化是不容易的；用 Sepharose 6B 纯化 β -D-半乳糖苷酶结合物是有效的；用 Ultra-Gel-AcA44 纯化戊二醛交联的结合物特别成功，但用 Sephadex G-200 则无效；Ultra-Gel-AcA 也可用于高碘酸钠交联的 HRP-Ab 结合物的纯化；将 Sephaacryl S-200 与 ConA-Affi-Gel-10 联用，可分别除去 HRP-IgG 结合物中的游离 HRP 和 IgG⁽²⁰⁾；也可用密度梯度离心法纯化 HRP-Fab 及乳过氧化物酶-IgG 的结合物。亲和层析是最有效的纯化方法，已被广泛采用，但是，对于不同的研究对象，需制备不同的亲和柱，方法比较复杂。

对酶与小分子半抗原结合物的纯化，往往不为人们所重视。游离酶的存在，会产生高的背景（或空白）信号，而游离半抗原的存在，则会降低分析方法的灵敏度。当然，在非均相 EIA 中，游离酶的存在无明显干扰，因其不与固相化的半抗原或抗体结合而被洗除，但在 EMIT 系统中，游离酶的存在则对 EMIT 的灵敏度有相当严重的影响。由于酶标半抗原中两种组分的分子大小相差悬殊，所以，通常采用透析或凝胶过滤法便很容易地将游离小分子半抗原除去；对游离酶，则非用亲和层析法不可。

对酶结合物的鉴定，可用酶学、免疫学、化学或物理化学等方法进行，在纯化后，必需对结合物的酶活性及免疫活性进行检查，同时，还必须对酶标结合物进行定量和克分子比值（即交联结合双方的克分子结合比）的测定和计算。克分子结合比（值）的测定，要根据不同的对象采用不同的方法，对此，许多文献资料已有介绍。这里，仅以 HRP-Ab 结合物为例，将其定量和摩尔比计算简介如下：

(1) 酶标抗体的定量：(通常采用分光光度法)

① 当用戊二醛为交联剂时，结合物中 HRP 与 IgG 的量分别为：

$$HRP(\text{mg/ml}) = A_{403\text{nm}} \times 0.4$$

$$IgG(\text{mg/ml}) = (A_{280\text{nm}} - A_{403\text{nm}} \times 0.42) \times 0.94 \times 0.62$$

HRP 在 $A_{280\text{nm}}$ 的吸光值应为 $A_{403\text{nm}} \times 0.30$ ，在结合戊二醛后吸光值将会增加，其总和为 $A_{403\text{nm}} \times 0.42$ 。

IgG 与酶经戊二醛结合后， $A_{280\text{nm}}$ 增加约 6%，故乘以 0.94 进行校正。又由于 IgG(兔) $A_{280\text{nm}}$ 为 1.0 时其浓度为 0.62mg，故再乘以 0.62。

② 如用高碘酸钠法制备结合物时，则

$$HRP(\text{mg/ml}) = A_{403\text{nm}} \times 0.4$$

$$IgG(\text{mg/ml}) = (A_{280\text{nm}} - A_{403\text{nm}} \times 0.30) \times 0.62$$

用以上公式进行计算时，所用 HRP 及 IgG 必须是纯化制剂。

(2) 酶标抗体的摩尔比计算 酶/抗体摩尔比与其分子量有关，在计算 HRP/IgG 结合物的摩尔比时，则以 HRP 分子量为 40,000；IgG 分子量为 160,000 进行计算。

$$\text{酶/抗体摩尔比} = \frac{HRP(\text{mg/ml})}{IgG(\text{mg/ml})} \times 4$$

应该指出，不同交联方法所制得的酶结合物，其摩尔比是不同的，即使使用同一交联方法，也会产生不同摩尔比的结合物。在对 HRP-IgG 结合物的实际应用中，其摩尔比以 1~2 为最佳。

参 考 文 献

1. Therell JT. Clin Chem 1981; 27:1969
2. Hales CN et al. Method Enzymol 1980; 70:334
3. Rubenstein KE et al. Biochim Biophys Res Commun 1972; 47:846
4. Landon J et al. Immunoassay Employing Reactants Labelled with a Fluorophore, In, Voller A et al ed, Immunoassay for the 80s. 1st ed. England MTP Press Limited 1981; 91~112
5. Gorus F et al. Clin Chem 1979; 25:512
6. Masson PL et al. Particle Counting Immunoassay(PACIA), An Automated Non-Radioisotopic Immunoassay Method, suitable for Antigens, Haptens, Antibodies and Immune Complexes. In, Veller A et al. ed. Immunoassay for the 80s. 1st ed. England MTP Press Limited 1981; 35~41
7. Henkel E. J Clin Chem Clin Biochem 1984; 22:919
8. Hinman CL et al. Clin Chem 1985; 31:835
9. Santos LM et al. Microchem J 1990; 41(3):278~87
10. Hallowell SF et al. J Clin Lab Anal 1990; 4(1):64~73
11. Allen RH. Ligand Quarterly 1981; 4:3
12. Monroe D. Anal Chem 1984; 56:920A
13. 蒋成淦. 酶免疫测定法第 1 版, 北京, 人民卫生出版社, 1984; 56~59
14. 洪孝庄. 国外医学(军事医学分册) 1987; 3:139
15. Oellerich M. J Clin Chem Clin Biochem 1984; 22:895
16. Ullman EF ET et al. Principles of Homogeneous Enzyme Immunoassay, In, Maggio ET ed. Enzyme-Immunoassay, Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc. 1981; 105~134
17. Carlsson J et al. Biochem J 1978; 173:723
18. 王世中等. 生物化学杂志 1985; 1(2):19
19. Ishikawa EIJI et al. Enzyme Immunoassay IGaku-Shoin Tokyo New York 1981; 67~89
20. 洪孝庄等. 军事医学科学院院刊 1990; 14(3):203
21. Nakane PK et al. J Histochem Cytochem 1974; 22:1084
22. Wilsin MB et al. Recent Developments in the Periodate Method of Conjugating HRPO to Antibodies, In, Knapp W et al. ed. Immunofluorescence and Related Staining Techniques, Amsterdam, New York, Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1978; 215~224
23. Tussen P et al. Anal Biochem 1984; 136:451
24. Nilsson P et al. J Immunol Method 1981; 41:81
25. Blaak C et al. Analyst 1984; 109:533
26. 洪孝庄等. 军事医学科学院院刊 1984; 6:737

27. Pestka JJ et al. Appl Environ Microbiol 1980; 40:1027
28. Pestka JJ et al. J Am Oil Chem Soc 1981; 58:940A
29. US Pat 4069105, 1978
30. Collins WP. Complementary Immunoassay Chichester New York Brisbane Toronto Singapore 1988; 67~69.
31. Hsu SM. Immunoperoxidase Techniques Using the Avidin—Biotin System, In: Ngo TT et al. ed. Enzyme—Mediated Immunoassay. New York, Plenum Press 1985; 467~476.

第三章 单克隆抗体与毒素结合物的制备及应用

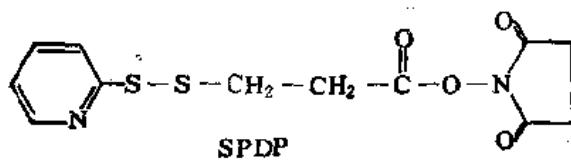
沈 倍 备

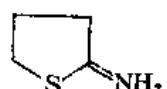
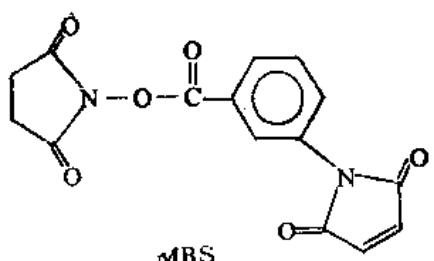
(军事医学科学院基础医学研究所)

单克隆抗体与毒素连接得到的结合物称免疫毒素，是导向药物的一种类型。目前在肿瘤治疗中常用的抗癌药物大部分只杀伤分裂细胞，它们的选择性取决于肿瘤细胞分裂较正常细胞快这一特点。但有些正常细胞如：胃肠道上皮和造血干细胞中有大量增殖细胞，所以在药物治疗过程中也受损伤。实际上许多类型的肿瘤细胞和正常细胞对药物敏感性差别很小。如果将药物连接到抗肿瘤相关抗原的抗体上，就有可能特异地将药物导向肿瘤细胞，减少对正常细胞和组织的损伤。定向药物的设想早在 100 年前就由德国药物化学家 Ehrlich 提出，但由于技术上的原因，特别是：① 可用于结合的药物不多，而且毒性不强；② 抗体的纯度和特异性差；③ 制备结合物的方法不理想。因此定向药物的设想在很长一段时间里一直未能实现。80年代以后由杂交瘤技术产生单克隆抗体的方法越来越普及，单克隆抗体特异性高，匀一性好，能大量生产。此外异型双功能交联剂的发展，大大推动了免疫毒素这一领域的发展^[1]。

一、蛋白与蛋白交联的原理

目前导向药物主要有：抗体上接放射性同位素、药物或毒素等类型。根据不同的目的可以选择不同的“弹头”。毒素由于其对细胞的杀伤力大大超过一般抗肿瘤药物，因此常被选作导向药物的“弹头”。常用作“弹头”的毒素有：白喉毒素、蓖麻毒素、红豆毒素、肥皂草素、天花粉等。这些毒素大多是蛋白质或糖蛋白，因此连接蛋白质的交联剂理论上都可以用来连接单克隆抗体和毒素。以前常用的同型双功能交联剂例如：戊二醛、甲苯-二异硫氰酸盐 (TDIC)、碳二亚胺等，往往引起高聚物或同种分子间的连接，即抗体与抗体连接，毒素与毒素连接，这样容易使抗体或毒素的活性降低。用异型双功能连接剂可以减少或避免同种分子间的聚合。常用于抗体与毒素连接的异型双功能连接剂有^{[2][3][4]}：3-(2-吡啶乙基)丙酸-N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、N-琥珀酰亚胺-间(N-马来酰亚胺基)苯甲酸酯 (MBS)、2-亚氨基四氢噻吩 (2-IT) 等，它们的结构式见下图。





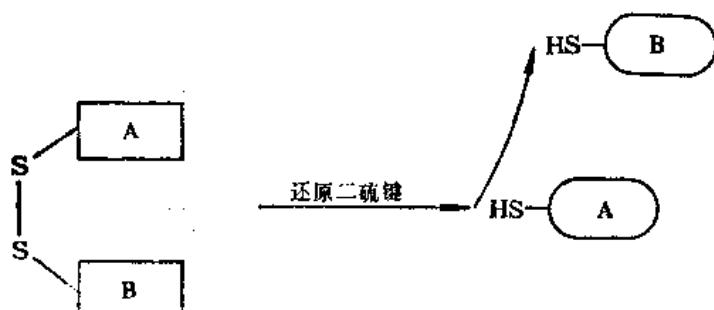
2-IT

(一) 连接反应及其特点

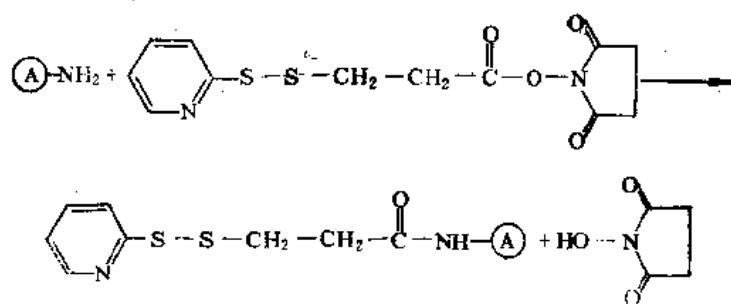
这些试剂在连接反应上的共同特点是：首先在第一个蛋白上产生一个游离巯基，然后修饰第二个蛋白，引入能与第一个蛋白上巯基特异性反应的功能基。

1. 在第一个蛋白上产生游离巯基 有二种方法可以在蛋白上产生巯基。

(1) 用二硫苏糖醇 (DTT) 还原蛋白上原有的胱氨酸残基，例如：

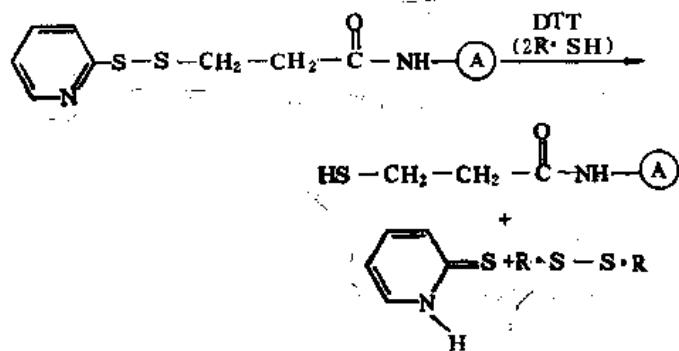


(2) 用化学方法在蛋白上引入巯基 最常用的引入游离巯基的试剂有 SPDP 和 2-IT。SPDP 与蛋白上游离氨基的反应如下：

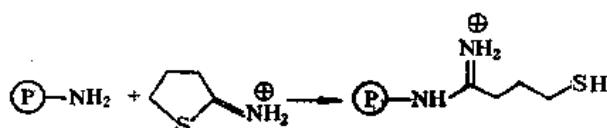


在一定条件下蛋白-SPDP 中的二硫键能被 DTT 裂解，产生巯基化的蛋白质，而使蛋白上原有的二硫键不受影响。Carlsson 等报道在 pH4.5 时，过量的 DTT 还原蛋白-SPDP 衍生物是非常特异的，甚至在较低的巯醇化离子浓度时，反应也很迅速。因为在这

一个 pH 条件下，芳香环上氮原子的质子化提高了 2-吡啶二硫化物的亲电子性，此外由于 2-硫代吡啶是一个很好的离去基团（leaving group），使反应向所希望的方向进行。



2-亚氨基四氢噻吩是通过开环反应在蛋白的氨基上引入游离巯基。蛋白质与不同量 2-IT 反应，结果引入的巯基数也不同。为了使抗体能有效地接到活化的蓖麻毒素上，需

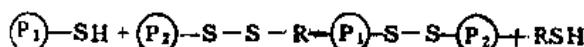


要在抗体上引入 1~2 个 2-IT 化的巯基（与此相反，如通过还原胱氨酸则需要在抗体上产生 10 个巯基才能得到抗体-蓖麻毒素结合物）。2-IT 的另一个好处是它修饰蛋白质时保存了它的正电荷，这样不影响蛋白质的构型，使保持原有的生物活性。

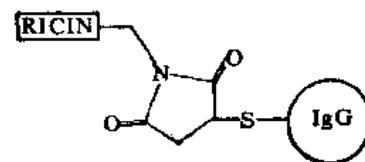
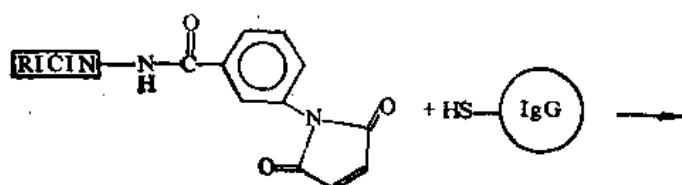
2. 在第二个蛋白上产生能与巯基反应的基团 一旦在第一个蛋白上产生巯基后，第二个蛋白必须接上能与第一个蛋白上巯基起特异反应的基团。根据修饰的情况，二个蛋白或通过二硫键连接或通过硫醚键连接。

(1) 二硫键连接 当第一个蛋白上的巯基与第二个蛋白上的二硫键交换时，形成新的二硫键，为了使反应向所希望的方向进行，R-SH 必须是一个好的离去基团。

SPDP 中的硫代吡啶基团是一个很好的离去基团。Ellman 试剂也可以用来形成二硫键。5-硫代-2-硝基苯甲酸也是一个好的离去基团。



(2) 硫醚键连接 通过马来酰亚胺与另一个蛋白上的巯基反应，反应是高度特异的，最适 pH 为 5~7。许多交联剂都含有马来酰亚胺部分，例如 MBS。由于硫醇基团是很



好的“soft”亲核试剂，与马来酰亚胺反应后加到双键上。结果形成的硫醚键非常稳定，在生理条件下不易裂解^[6]。

(二) 抗体与毒素的偶联方法

下面以异型双功能交联剂 SPDP、2-IT 和 MBS 为例，说明抗体与毒素偶联的常用方法。

1. 抗体与毒素以二硫键相连 以 SPDP 连接单克隆抗体与蓖麻毒素为例^[7]。

- 1) 抗体、毒素以 10mg/ml 的浓度分别溶于 0.1mol/L 磷酸缓冲液中，pH 7.5，含 0.1mol/L NaCl。并对同样的缓冲液透析。
- 2) 将 SPDP 溶在二甲基甲酰胺中，使最终浓度在 5~40mmol/L 之间。
- 3) 在透析过的抗体或毒素中加入 SPDP 溶液，室温搅拌反应 30 分钟。
- 4) 反应液过 Sephadex G25 柱或透析，以除去未反应的试剂。毒素-PDP 过 Sephadex G25 柱时，用含 0.1mol/L NaCl 的 0.1mol/L PB，pH7.5 缓冲液平衡并洗脱。抗体-PDP 过 Sephadex G25 柱时，用含 0.1mol/L NaCl 的 0.1mol/L 醋酸缓冲液，pH 4.5 平衡并洗脱。
- 5) 在抗体-PDP 溶液中加还原剂 DTT，室温反应 20 分钟，在 SephadexG25 柱上除去小分子物质。
- 6) 还原后的抗体-PDP 与毒素-PDP 混合，室温反应 16~24 小时。
- 7) 反应液离心后，取上清液过 Sephadex G-150 柱，使结合物与未反应的抗体和毒素分开。

蛋白质上取代的 SPDP 基团数可用下法测定：

- 1) 蛋白质与 SPDP 试剂反应后，用凝胶过滤法或透析法除去过量的未反应的 SPDP，然后测定蛋白-PDP 在 280nm 的吸收值。
- 2) 在上述溶液中加入 50μl DTT (100mmol/L) 水溶液，在 343nm 测光吸收，释放的 2-巯醇吡啶基在 343nm 的克分子消光系数为 8.08×10^3 。
- 3) 由于 2-巯醇吡啶基团在 280nm 有吸收，故应对蛋白浓度进行校正。

$$A_{280} (\text{校正}) = A_{280} - (B \times 5.1 \times 10^3)$$

B 为释放的 2-巯醇吡啶基的克分子数。例如：抗体-PDP 在 280nm 的 OD=0.815，343nm 的 OD=0.132。则 $B = 0.132 / 8.08 \times 10^3 = 1.6 \times 10^{-6}$ 克分子。

$$AIg_{280} (\text{校正}) = 0.815 - (1.6 \times 10^{-6} \times 5.1 \times 10^3) = 0.735$$

$$Ig \text{ 摩尔数} = 0.735 / 1.4 / 160000 = 3.3 \times 10^{-6}$$

$$SPDP/Ig = 1.6 \times 10^{-6} / 3.3 \times 10^{-6} = 4.8$$

结合物中各成份含量的测定，可以 IgG 抗体和蓖麻毒素结合物为例说明。

$$IgG \text{ 分子量} = 160000$$

$$\text{蓖麻毒素 (ricin) 分子量} = 65000$$

$$IgG \text{ 的 } E_{1cm, 280nm}^{0.1\%} = 1.4$$

$$\text{ricin 的 } E_{1cm, 280nm}^{0.1\%} = 1.18$$

$$\text{如果结合物在 280nm 的 O.D} = 0.324$$

$$1ml \text{ 用于制备结合物的放射性 ricin (1mg/ml) 的 cpm} = 26500$$

1ml 结合物的 cpm=2010

ficin 在结合物中的浓度=2010/26500 (0.0758mg/ml)。相当于 0.0895OD。

IgG 的 OD=0.324-0.0895=0.2345(0.1675mg/ml)。

每个 Ig 分子上接的 ficin 分子数为：

$$\frac{0.0758 \times 160000}{0.1675 \times 65000} = 1.1$$

注意事项：

1) SPDP 与其它双功能试剂相比是很稳定的，但贮存时如湿度较大，也会发生水解。因此贮存较长时间后，使用前最好测一下 SPDP 的浓度，方法如下：

a. 取 10μl SPDP 酒精溶液 (浓度范围 20mol/L~40mmol/L) 加到 2.5ml 5mmol/L PB, pH7.0 的缓冲液中，立即在 260nm 处测 O.D.，用同样的 PB 作对照。

b. 分别加 0.5ml 碳酸钠 (0.3mol/L) 到对照杯和样品杯中，20 分钟后测定，由于 N-羟基琥珀酰亚胺的释放 (克分子消光系数为 8.2×10^3) 而产生的吸收增高。

c. 取 10μl SPDP 乙醇液加到 3ml 0.1mol/L PB, pH 7.5 的缓冲液中，在 343 nm 测光吸收，同样缓冲液作对照。

d. 加 50μl 100mmol/L DTT 到二个测量杯中，10 分钟后在 343nm 测光吸收，计算从 SPDP 中释放的 2-巯醇吡啶基浓度，后者克分子消光系数为 8.08×10^3 mol/L。如果发生水解，则释放的 N-羟基琥珀酰亚胺比 2-巯醇吡啶基少，前者代表完整 SPDP 的浓度。

2) 在蛋白质上引入所期望的 SPDP 基团时，蛋白质与 SPDP 试剂的比例要通过实验确定⁽⁸⁾。

2. 抗体与毒素以硫醚键相连 以抗体与天花粉毒蛋白的交联为例。天花粉用 2-IT 修饰，抗体用 MBS 修饰。反应步骤如下：

1) 112μl (约 3mg) 天花粉毒素加 88μl 50mmol/L 硼酸缓冲液，pH9.0。混匀后加 50μl 22.5mmol/L 2-IT (溶解在同样缓冲液中)。

2) 室温反应 1 小时，加 35μl 10mmol/L Ellman 试剂 (5,5'-二硫 2,2'-双硝基苯甲酸)，继续在室温反应 30 分钟至 1 小时。

3) 反应物过 Sephadex G25 柱，柱体用 0.156mol/L 硼酸缓冲液，pH8.0 平衡并洗脱，收集蛋白峰 (第一流出峰)。

4) 浓缩到 200~300μl 备用。

5) 抗体溶解在 150μl (约 2.5mg) PBS, pH6.6 中，加 12μl MBS (2mg/ml，溶解在二甲基甲酰胺中)，室温反应 20 分钟。

6) 反应物过用 PBS, pH6.6 缓冲液平衡好的 Spin 柱。

7) 立即与巯基化的毒素混合，室温反应 2~3 小时。

8) 加 5μl N-乙基马来酰亚胺 (25mg/ml，配在二甲基甲酰胺中)，终止反应。用高效液相色谱 TSK 3000 柱分离结合物。

注意事项：

1) 对不同毒素来说，使一个分子毒素上产生 1~2 个巯基所需要的 2-IT 量不同，须经实验测定。例如在一个肥皂草素分子上产生 1 个巯基需要 4 倍过量的 2-IT。在一个

天花粉蛋白分子上产生一个巯基，反应体系中 2-IT 的浓度须达到 4mmol/L。

- 2) 含马来酰亚胺的交联剂在 pH 超过中性时易分解或发生聚合。因此一般用的缓冲液 pH<7。
- 3) 反应体系中 pH 偏高时，蛋白上的氨基将与 SH 基竞争交联剂中的马来酰亚胺。
- 4) 抗体与毒素反应时体积不能太大。

二、免疫毒素的制备及应用

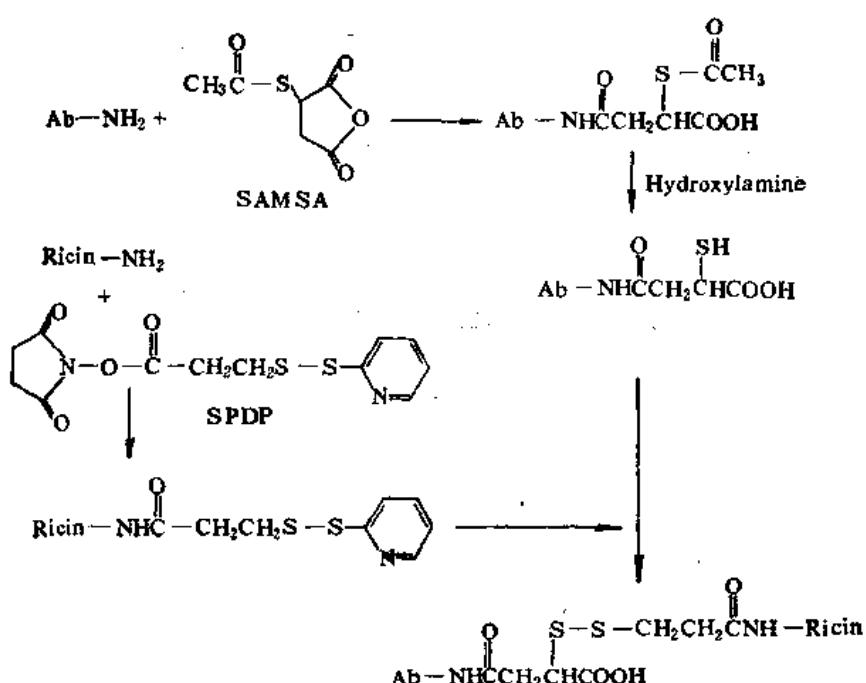
(一) 毒素及免疫毒素的作用特点

免疫毒素中常用的毒素为：白喉毒素、蓖麻毒素和相思豆毒素。它们共同的特点都是由二条多肽链 A 和 B 通过二硫键连接，B 链上有一个结合部位，它识别细胞表面的某个糖蛋白或糖脂。当它与细胞结合后通过吞饮作用进入细胞。在 B 链帮助下，A 链穿过吞饮微囊的膜进入细胞浆，破坏蛋白合成，引起细胞死亡^[6]。目前在自然界发现一些具有 A 链作用的天然单链毒素，例如白树素、肥皂草素和商陆抗病毒蛋白，它们对细胞无毒性，只有进入细胞内才发挥其强烈的毒性作用。根据毒素的种类，免疫毒素主要有二种类型，一种是抗体与完整毒素连接，另一种是抗体与毒素 A 链连接。用完整毒素制备的免疫毒素在体外实验中对靶细胞有强烈的细胞毒作用，但特异性较差，因为它们还能通过 B 链的结合部位与细胞结合，对由蓖麻毒素组成的免疫毒素，这种结合在体外可用高浓度半乳糖或乳糖阻断。血液肿瘤及骨髓转移性肿瘤是免疫毒素体外应用的适应病例^[6]。因为白血病和某些淋巴性肿瘤病人在大剂量放疗、化疗时能有效地杀死体内的异常细胞。但这种治疗往往破坏骨髓中的正常造血干细胞，病人需要输入骨髓以提供新的干细胞。骨髓来源有两个，或来自病人本身或由 HLA 相合的供体提供。前一种必须在病人进行放疗、化疗之前取出骨髓，但这种自体骨髓中还含有一定量异常细胞或肿瘤细胞，移植后会引起肿瘤复发。如果在移植前用相应的免疫毒素清除骨髓中的异常细胞，就有可能提高自体骨髓移植后的治疗效果。

异体骨髓移植，虽然骨髓中没有肿瘤细胞，但含有 T 细胞，它们能引起移植物抗宿主病 (GVHD)，移植前用抗 T 细胞的免疫毒素可以成功地从供体骨髓中去除 T 细胞，从而预防 GVHD 的发生。在动物试验成功的基础上，Filipovitch 及其同事用这一方法治疗了 14 例白血病病人，他们用三个抗不同的 T 细胞抗原的单克隆抗体与 ricin 组成的免疫毒素清除供体骨髓中的 T 细胞，移植后大部分病人显示了骨髓的迅速增殖，没有出现毒性症状和 GVHD。完整免疫毒素如果用作体内治疗，这种半乳糖阻断非特异性结合的方法是无效的，因为糖在动物体内很快被排除。由 A 链组成的免疫毒素在体外显示了很好的定向性，因为它们没有 B 链和由 B 链引起的非特异性结合。但它们的细胞毒活性不稳定，有些 A 链免疫毒素有效，有些只有微弱的细胞毒性。引起这一现象的因素除与抗体识别抗原决定簇的特性、靶细胞所处的细胞周期有关外，有可能与毒素 B 链的存在有关。因为在大多数情况下，完整毒素组成的免疫毒素对靶细胞的毒性比相应的 A 链免疫毒素强。此外游离的毒素 B 链能提高 A 链免疫毒素在体外的细胞杀伤效应。Vitetta 等发现将 B 链接到同样的抗体上能提高 A 链免疫毒素在体外的细胞杀伤效应。B 链如何帮助 A 链

进入细胞的机制尚不清楚，但似乎与细胞表面糖残基的结合无关。实验证明 B 链经过化学修饰后减弱了与糖基结合的特性，但并不影响由它组成的免疫毒素的毒性。目前已知在 B 链的多肽链上存在一个疏水区，可能这一区域插入细胞膜的类脂层中形成一个“孔”，有利于 A 链通过膜。另一种假设是 B 链保护了 A 链免受细胞中溶酶体水解酶的作用，使更多的 A 链进入胞浆。

为了克服由 B 链引起的非特异性结合，Geoffrey AP^[2]等采用 S-乙酰巯基琥珀酸酐 (SAMSA) 为交联剂制备免疫毒素 (下图)。由于抗体对 B 链结合位点的空间位障而使大部分免疫毒素不能结合到细胞表面的半乳糖残基上，这种免疫毒素保留了它的细胞毒效应而且显示较好的特异性。



(二) H65 抗体与蓖麻毒素的交联

以 CD₆ 抗体 H65 与蓖麻毒素交联为例。

1) 10mg H65 单克隆抗体溶在 2ml 磷酸缓冲液中，与 5 倍过量的溶解在无水二甲基甲酰胺中的 SAMSA 反应 30 分钟，反应物对含 2mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液透析，以除去过量未反应的试剂。

2) 5mg 蓖麻毒素溶解在磷酸缓冲液中，与 5 倍过量的溶解在无水二甲基甲酰胺中的 SPDP 反应，30 分钟后对含 2mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液透析 16~24 小时。

3) 经 SAMSA 修饰的 H65 单克隆抗体与 200μl 溶在 PBS 中的 1mol/L 巯胺在室温反应 30 分钟，去除保护基暴露出游离的巯基。

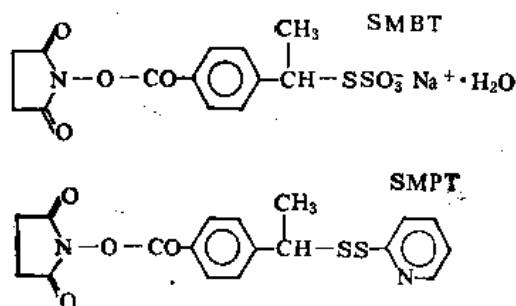
4) 暴露出巯基的抗体与 SPDP 修饰的蓖麻毒素按 1:1 克分子混合，反应 6 小时，加 N-乙基马来酰亚胺使终浓度达 6.6mmol/L，继续放置 1 小时。在 Sepharose 6B⁺柱上纯化抗体-毒素结合物，柱体用含 20mmol/L 乳糖的磷酸缓冲液平衡并洗脱，收集分子量在 21~22 万的部分。

利用唾液酸化胎球蛋白 (Asialofetuin) 能与蓖麻毒素 B 链上的半乳糖位点结合的

特性，用 *asialofetuin* 包板进行 ELISA 试验。结果证明用 SAMSA/SPDP 制备的免疫毒素与 *asialofetuin* 的结合力大大低于 SPDP 法制备的免疫毒素，约 40~90% 的半乳糖结合位点被封闭了。在不加半乳糖的情况下对靶细胞的细胞毒性与 SPDP 制备的免疫毒素有半乳糖时对靶细胞的毒性相同。说明蓖麻毒素 B 链上半乳糖结合部位被封闭并不影响由抗体导向的特异性细胞毒效应。

(三) 新的交联剂在免疫毒素制备中的应用

免疫毒素在体内的稳定性是免疫毒素能否体内应用的另一重要因素，但关于抗体与毒素间二硫键稳定性的报道颇不一致，可能与抗体-毒素连接后保护二硫键免遭还原剂攻击的能力不同有关。免疫毒素的不稳定性不仅降低了起治疗作用的量，还会由于其释放游离抗体与免疫毒素竞争肿瘤相关抗原而影响治疗效果。因此科学家们设计了一些新的交联剂 Sodium S-4-succinimidyl carbonyl- α -methyl benzyl thiosulfate (SMBT) 和 4-succinimidyl carbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyl)dithio) toluene (SMPT)^[10]，它们的结构式见下图：



SMBT 中的甲基和 SMPT 中的苯环位于与二硫键相邻的碳原子上，使二硫键被遮蔽起来，避免了其它硫醇化阴离子的攻击，保持了结合物在体内的稳定性。

以单克隆抗体 OX₁ 与蓖麻毒素 A 链的交联为例。

1. 抗体与 SMBT 反应

1) 20mg 抗体溶于 4ml 0.05mol/L 硼酸缓冲液，pH9.0，含 1.7% (W/V) NaCl 中，加 216μl 溶于二甲基甲酰胺中的 SMBT(1mg/ml)，使 SMBT 的量与抗体相比过量 4 倍，室温搅拌 1 小时。

2) 加入 40μl 溶于上述硼酸缓冲液中的 DTT(15.4mg/ml)，使 DTT 的最终浓度为 1mmol/L，继续搅拌 1 小时。

3) 加 40μl 溶于二甲基甲酰胺中的 Ellman 试剂 (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, 87.2mg/ml)，使最终浓度为 2.2mmol/L，室温搅拌 1 小时。

4) 反应物过 Sephadex G25 柱，柱体预先用磷酸-EDTA 缓冲液平衡，收集第一流出峰，浓缩后为有活性二硫基团的抗体。

2. 抗体与 SMPT 反应

1) 20mg 抗体溶于 2.67ml 硼酸缓冲液中。

2) 加 267μl 溶在二甲基甲酰胺中的 SMPT(0.48mg/ml)，使 SMPT 与抗体克分子数相比过量 2.4 倍。为了保持 SMPT 的溶解性，反应体系中二甲基甲酰胺的量在 10% (v/v)。反应物室温搅拌 1 小时。

3) 过 Sephadex G25 柱 ($30 \times 1.6\text{cm}$)，柱体用磷酸-EDTA 缓冲液平衡，收集第一流出峰。

3. SMBT-和 SMPT-衍生化的抗体与蓖麻毒素 A 链交联

1) 10mg 毒素 A 链溶在 7ml 磷酸-EDTA 缓冲液中，与 50mmol/L DTT 在室温反应 30 分钟。

2) 过 Sephadex G25 柱，从柱上流出的蛋白峰直接加到已浓缩的 SMBT- 或 SMPT- 衍生化的抗体中，毒素 A 链与抗体的克分子比为 2.5 倍。

3) 反应物浓缩到 10ml，然后在室温通氮气的情况下孵育 72 小时。

4) 用 0.2mmol/L 半胱氨酸在室温处理 6 小时，钝化免疫毒素中抗体上剩余的活性二硫基团，这一步处理不会使免疫毒素中的二硫键裂解，但如果不去除则 20~30% 分子量为 180000 的免疫毒素会与血浆中的白蛋白形成共价加合物。

5) 免疫毒素在 Sephadex G-200 柱 ($90 \times 2.2\text{cm}$) 上纯化，柱体用 0.05mol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.5 平衡并洗脱，收集和合并分子量为 180000 道尔顿的部分。

上述方法制备的免疫毒素与用 2-IT 制备的免疫毒素相比，在体外抑制蛋白质合成的效率是相同的。给小鼠静脉注射后 48 小时，血液中还保持一半 SMPT- 免疫毒素，占注入量的 10%，而 2-IT- 免疫毒素则注射后 8 小时已降解一半，48 小时时血液中的量仅为注入量的 1.5%。用 SMBT 和 SMPT 制备的免疫毒素由于在体内保留时间长，因此提高了它们的抗瘤活性。

到目前为止尽管免疫毒素在体内使用的结果不像所希望的那样，但体外试验及临床的初步试用结果表明免疫毒素在肿瘤治疗上有很大潜力。

参 考 文 献

1. 沈倍奋. 特异性抗体作为载体在肿瘤治疗中的应用, 国外医学药学分册 1985; 5:274.
2. 沈倍奋. 单克隆抗体与毒素的连接, 单克隆抗体通讯 1989; 2:51
3. Cumber AJ, et al. Preparation of antibodytoxin conjugates, Methods Enzymol 1985; 112:207
4. Gross, et al. Biochemical aspects of immunotoxin preparation, J. Immunol. Meth. 1985; 81:283
5. 波言山等. 不同交联方法制备的免疫毒素及其体内外特性, 生物化学与生物物理进展 1991; 18:443
6. 沈倍奋. 免疫毒素研究近况, 单克隆抗体通讯 1990; 6:1
7. Thorpe PE, et al. The preparation and cytotoxic properties of antibodytoxin conjugates. Immunol Rev 1982; 62:119.
8. Vallera DA, et al. Anti-T-cell reagents for human bone marrow transplantation, Ricin linked to three monoclonal antibodies. Science 1983; 222:512.
9. Geoffrey AP, et al. Novel Synthesis and in Vitro characterization of Disulfide-linked Ricinmonoclonal Antibody Conjugates Devoid of Galactose Binding Activity. Cancer Res 1988; 48:4469.
10. Thorpe PE, et al. New Coupling Agents for the synthesis of Immunotoxins Containing a Hindered Disulfide Bond with Improved stability invitro. cancer Res 1987; 47:5924.

第四章 稀土元素标记免疫分析技术及应用

陈 洋 蕤

(解放军总医院基础所)

免疫分析技术是利用微量抗原与相应的高特异性抗体之间的免疫反应，来检测如激素、药物、蛋白质、多肽、酶、肿瘤相关抗原、维生素、病毒、细菌及金属元素等生物体内活性物质。免疫分析技术包括标记免疫分析、非标记免疫分析和仪器免疫分析。本章介绍的稀土元素标记免疫分析技术是属于标记免疫分析之一种。

荧光免疫分析 (FIA) 和放射免疫分析 (RIA) 自问世以来，经历了近 30 年的发展，但人们越来越感到 FIA 因自然本底太高，干扰测定结果；RIA 采用同位素标记，对人体有危害并给实验带来不便。酶免疫分析 (EIA) 也因酶本身不稳定，受其他影响因素较大，推广应用受到限制。70 年代末、80 年代初，人们开始研究用稀土元素代替荧光物质和同位素标记蛋白质或抗体，将时间分辨技术引入到生物检测领域，建立了新型的超微量时间分辨荧光免疫分析技术 (Time resolved Fluoroimmunoassay, 简称 TrFIA)^[1]。该技术采用多学科先进技术，集结了其他免疫分析的优点。近 10 年来，TrFIA 在免疫学、分子生物学、细胞学和医学等领域，取得长足的发展和广泛应用。

TrFIA 按测定方法不同，又可分为双位点夹心法和固相竞争法两种。前者又称为时间分辨免疫荧光分析技术 (Time resolved Immuno Fluorometric Assay, 简称 TrIFMA)，目前文献报道多采用双位点夹心法。

一、时间分辨荧光免疫分析基本原理

TrFIA 和 TrIFMA 的测定原理和通常的荧光免疫分析不同，示踪物不是荧光素而是用稀土元素，如三价稀土镧系离子：铕 Eu³⁺、铽 Tb³⁺、铈 Ce³⁺、钐 Sm³⁺、镝 Dy³⁺ 和钕 Nd³⁺ 等。特别是铕 Eu³⁺ 构成的螯合物，在被激发后，可与溶液中 β-二酮体重新形成一种微胶囊螯合物，发出长寿命的极强的荧光。使原来微弱的荧光，增强了近 100 万倍。利用这一特点，将 Eu³⁺ 融合物与蛋白质或抗体偶联，构成一种新的标记化合物，后者与抗原产生免疫反应，形成免疫复合物。该复合物中的 Eu³⁺ 离子，在紫外光 (340nm) 激发下，发出高强度的荧光 (613nm) 信号，可用时间分辨荧光计记录下来。由于采用时间分辨光谱技术，从时间、空间区域上提取荧光信号，大大提高了免疫分析的灵敏度。

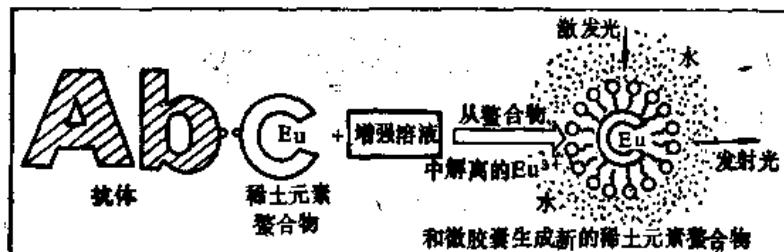


图 4-1 时间分辨荧光免疫分析原理示意图

如 Eu^{3+} 标记的 TrFIA，最小检出值可达 10^{-18}mol/L ，优越于 RIA 和 EIA 等现代标记免疫分析法。图 4-1 给出了稀土元素标记的荧光免疫分析原理示意图。

二、稀土元素标记物的特点^[2,3]

1. 提高了荧光信号测量的特异性 稀土元素的荧光激发光波长范围较宽，有利于增高激发能，提高稀土元素标记物的比活性。而发射光波长范围甚窄，有利于降低本底。同时激发光和发射光之间有一较大的 Stokes 位移，这十分有利于排除非特异荧光的干扰，极大地提高了荧光信号测量的特异性。

生物样品（如蛋白质）本身产生的荧光波长位于 400~600nm，几乎复盖整个可见光的波长范围。因此，普通荧光的激发和发射波长，两者互相重叠现象非常严重（见图 4-2）。所以用普通荧光来检测生物样品时，自然本底的荧光干扰太大。而稀土元素如铕荧光的激发波长为 300~380nm，发射波长甚窄，最大为 613nm，两者相距甚大（270 nm），因此采用干涉滤光片，就可以消除散射所引起的干扰。时间分辨荧光免疫分析法，就利用这个特点提高检测灵敏度。

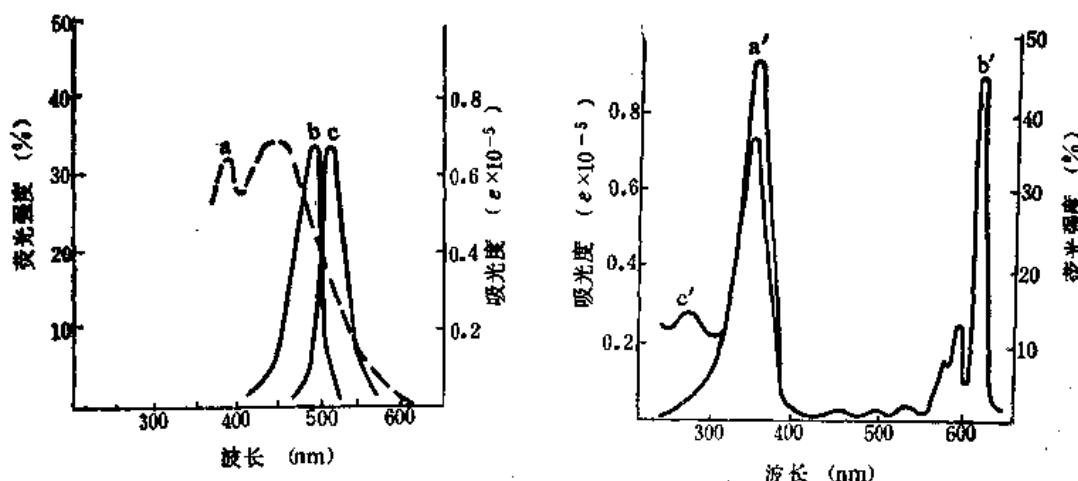


图 4-2 稀土元素荧光强度与波长关系

a. 血清样品发射的荧光光谱 b. 异硫氰酸激发的荧光光谱 c. 异硫氰酸发射的荧光光谱
a'. Eu^{3+} 激发荧光光谱 b'. Eu^{3+} 发射荧光光谱 c'. Eu^{3+} 吸收光谱

2. 消除自然荧光和样品荧光的干扰 稀土元素螯合物所产生的荧光不仅强度高，而且半衰期也很长，介于 10~1000μs 之间，比普通荧光标记物要高出 5~6 个数量级。样

表 4-1 蛋白质和荧光体的荧光衰变时间

种 类	荧光衰变时间(μs)
人球蛋白、血红蛋白	3.0
细胞色素 C	3.5
人血清白蛋白	4.1
异硫氰酸荧光素	4.5
丹磺酰氯	14
苯胺紫碳酸	16
铕的螯合物	$10^8 \sim 10^6$

品中蛋白质类的自然本底荧光衰变时间约为 1~10ns，蛋白质和荧光体的荧光衰变时间见表 4-1，而 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 荧光衰变时间为 $430\mu\text{s}$ 和 $41\mu\text{s}$ 。因此利用延缓测量时间，待样品中短半衰期的自然荧光完全衰变后，再测稀土元素的荧光，从而消除了来自样品、试剂及其他非特异荧光干扰，提高检测特异性和灵敏度。

3. 标记物比较稳定 同位素标记受半衰期和自身辐射分解的影响，而使试剂盒只有较短的货架寿命，多次标记造成批间误差、废物处理等问题。而酶标记则因酶的纯度和反应过程易受种种因素的干扰，而不易标准化。荧光标记则因检测灵敏度低、测定过程因荧光本底高而不易排除，结果准确性差。三价稀土离子，可以被二乙胺四乙酸（EDTA）等螯合剂螯合，形成稳定的螯合物，同时制备稀土元素标记物操作也比较简便。一旦将铕标记在抗体或抗原分子上，这种标记物可以经受洗涤等处理，而不脱落。铕三价离子在有酸性的增强溶液环境中，受到激发就能产生强烈荧光信号。标记一次，可供 1~2 年使用。

三、稀土元素螯合物标记抗体的制备^[5, 6]

标记物的质量是建立 TrFIA 分析法的关键，优质的 Eu^{3+} 标记物必须具有高比活性，又不损伤抗体或抗原的免疫活性。标记方法是利用双功能基团螯合物。它既可以标记抗体又可以标记抗原。然而标记抗体有它的优点，尤其在固相夹心法中，这是因为纯化抗体要比纯化抗原更容易，标记抗体也容易进行。因抗体 IgG 上具有可供标记试剂偶联的酪氨酸和组氨酸残基，标记方法操作简便，容易掌握。如采用标记第二抗体或标记链亲合素的方法，还可以作为通用试剂，并且具有放大作用，有利于提高分析方法的灵敏度。

（一）试剂

1. 抗体

1) 多克隆抗血清，经饱和硫酸铵分级提纯，再经过亲和层析，获得具有抗体活性的 IgG (或者 IgG 片段)。

2) 单克隆抗体，也要经过硫酸铵提取，离子交换柱层析，并防止复溶后 IgG 沉淀。

2. 稀土元素 选择铕或铽较为理想，取三氯化铕 (EuCl_3) 或三氯化铽 (TbCl_3)，用 50mmol/L , $\text{pH}6.0$ 柠檬酸缓冲液配成 33mmol/L 应用液。

3. 双功能基团螯合剂 双功能基团螯合剂可通过人工合成，其作用在于，它一端能和稀土元素联接（或称螯合），而另一端则能和抗体或抗原分子上的氨基（酪氨酸、组氨酸）相联接，形成稀土元素三价离子标记的螯合物。

常用双功能螯合剂有：异硫氰酸-苯基-二乙胺四乙酸 (EDTA)；二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)； N -[异硫氰酸-苯基]-二乙烯三胺四乙酸 (DTTA)；氨基-苯基-EDTA； $1-(p\text{-苯偶氮})\text{-EDTA}$ 等等。EDTA 是一类具有溶解度高和稳定性强的螯合剂。

4. 双功能基团螯合剂对抗体免疫活性的影响 采用重氮化氨基苯基 EDTA 作为螯合剂时，当每克分子抗体 IgG 标记上 5 个以上的 Eu^{3+} 时，会引起标记抗体的凝集，使 IgG 自身免疫活性下降。若用异硫氰基 EDTA 代替氨基苯基 EDTA 时，即使每克分

子的 IgG 标记上 $15\sim20$ Eu³⁺，也不会降低抗体的免疫活性和溶解度。值得指出：具有 7 个配位基的 *p*-(异硫氰酸-苯基)-DTTA 的 N1-异构体，当与 Eu³⁺螯合时，会形成比相应 EDTA 衍生物更稳定的 Eu³⁺螯合物。而且在酸性增强溶液中，很快分解出 Eu³⁺来。令人惊奇的是这种分解速度甚至比 EDTA 或 DTTA 衍生物更快。因此后来的 TrFIA 几乎都利用 N₁-(*p*-异硫氰酸-苯基)-DTTA 来制备 Eu³⁺标记物。

(二) 标记化合物的制备^[4]

上述双功能鳌合剂的共同特点，就是分子内或带氨基多羧酸，或带芳香胺多羧酸，或带异硫氰酸基多羧酸等活性联接基团。这些鳌合剂与 Eu³⁺鳌合的能力很强，因而标记共轭物比度也很高（高于 RIA 所用标记物的比度），这样有利于提高分析的灵敏度。

稀土元素通过鳌合的方法标记抗体，主要是与抗体中个别基团结合，而对抗体免疫活性、溶解度、稳定性、亲和力及特异性等方面不会引起改变，采用温和联接方法和水溶液环境体系，可提高联接率。

1. 双功能基团与抗体联接的方法 重氮化法；碳二亚胺缩合法；异硫氰酸法。

标记抗体的方法可分为一步标记法（或直接标记法）和二步标记法（或间接标记法）两种：

2. 一步标记法 取 1mg 纯化的单克隆抗体 IgG(1mg/ml)，加入 250~350μg 的 Eu³⁺-(异硫氰酸-苯基)-二乙基三胺四乙酸，用稀 NaOH 调 pH 至 9.5，置 4℃ 反应过夜。反应液经柱层析 (Trisacryl GF₂₀₀₀) 分离，用 50mmol/L, pH7.75 Tris-HCl 缓冲液淋洗，收集 OD_{280nm} 部分的洗脱液，加入 1ml BSA (1mg/ml)，置 4℃ 保存。并测定 Eu³⁺ 浓度，计算出每个分子 IgG 掺入 Eu³⁺的摩尔数和计算标记率。采用重氮化的氨基苯基 EDTA 时，克分子标记率 (Eu³⁺/IgG 分子) 仅达 5。用异硫氰酸苯基 EDTA 时，不但标记率可大大提高，达 15~20Eu³⁺/IgG 分子，而且不降低标记复合物的免疫活性。

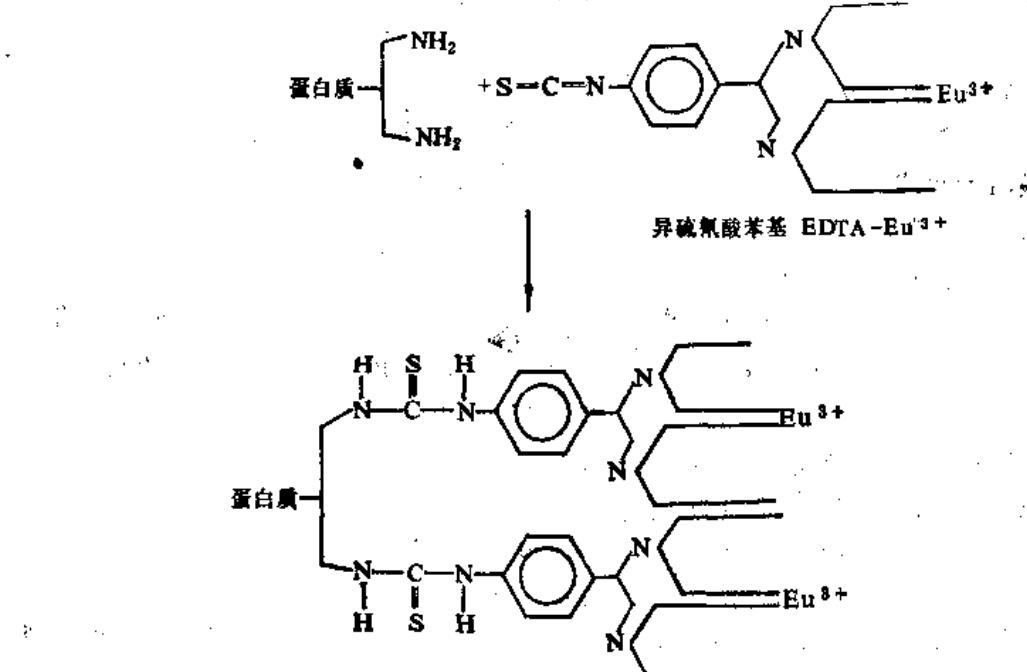


图 4-3 异硫氰酸苯基 EDTA-Eu³⁺标记蛋白质示意图

和溶解度。图 4-3 表示异硫氰酸苯基 EDTA-Eu³⁺标记蛋白质原理示意图。

3. 二步标记法

将抗体 IgG 先和螯合剂结合，再和稀土离子 (Eu³⁺) 融合。

取 100μl 纯化单克隆抗体 IgG(10mg/ml)，加入 260μg 二乙烯三胺五乙酸(DTPA)，两者的克分子比 (IgG/DTPA 值为 1/200)。立即磁力搅拌混匀，1 分钟后，用 NaOH 调 pH 至 7.0，再继续反应 30 分钟。反应液对 50mmol/L, pH6.0 柠檬酸缓冲液透析 24 小时以上，除去多余 DTPA。

另取 25~50μl 的 EuCl₃(33mmol/L) 加至经透析的 IgG-DTPA 中，室温下，搅拌 30 分钟。

取出反应液加至 Sephadex G₆₀ 柱中，收集 OD_{280nm} 蛋白部分，放置 4℃ 保存。并测定 Eu³⁺ 或 Tb³⁺ 含量，计算标记的克分子比值。用本法平均每个 IgG 分子结合 3 个 Eu³⁺ 或 Tb³⁺ 离子。

四、稀土元素螯合物标记抗原的制备^[7]

稀土元素螯合物既可以标记抗体，也可以标记蛋白质抗原，建立液相或固相竞争结合 TrFIA 分析法。下面以白蛋白 (Alb) 抗原为例：

(一) 试剂和材料

1. 三氯化铕 (EuCl₃) 溶液 称取 58.08mg Eu₂O₃ (美国 Johnson Matthey Chemical) 用 1N HCl 搅拌至溶解，用 1.0N NaOH 调 pH 至 4.0，再加蒸馏水，配成 33mmol/L 应用液，4℃ 放置备用。

2. 三氯化铽 (TbCl₃) 溶液 称取一定量的七氧化二铽 (Tb₂O₇) 用 1N HCl 搅拌至溶，用 1N NaOH 调 pH 至 4，再用双蒸水，配成需要的浓度，4℃ 备用。

3. Alb 抗原 采用美国 Sigma 公司人 Alb 结晶冻干粉。

4. Alb 抗血清 按常规方法，将 Alb 免疫家兔，经多次加强免疫制备。

5. 柠檬酸缓冲液。

6. Sephadex G₆₀。

7. 塑料微清定板条。

8. 增强溶液 68mmol/L 邻苯二甲酸氢钾 (1.39g); 50μmol/L 辛烷基磷酸化氢的氧化物 (19.675g) (TOPO) (Fluka 公司); 15μmol/L β-萘酰三氟丙酮 (3.990mg) (β-NTA) (人工合成); 1ml Triton X-100，加高纯度去离子水至 700ml。

磁力搅拌 (可加热) 至完全溶解，加入 100mmol/L 冰醋酸 (5.9ml)，补足高纯度去离子水，定容至 1000ml，测得 pH 值为 3.2，4℃ 冰箱避光保存。

注：β-NTA 的制备：取 0.25g 金属钠 (Na) 于 0.35ml 无水甲醇，生成 0.54g 甲醇钠。再加无水乙醚成悬浮液，搅拌下，加入 0.01mmol/L 三氟乙酸甲酯 (干燥)，然后加入 β-萘乙酰酐，搅拌 5 小时，室温放置过夜。次日将反应混合物减压浓缩至干。加入 10% 的 H₂SO₄，使 β-NTA 沉淀析出，用 95% 乙醇重结晶，得到 β-NTA 纯品。

9. Arcus 1230 荧光计 (Pharmacia LKB 公司)。

10. 紫外分光光度计。

11. 分析振荡器。

(二) 标记方法

1. EuCl_3 标准曲线制备 将 EuCl_3 应用液，用 50mmol/L, pH7.0 柠檬酸缓冲液稀释成 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} 、 10^{-15} mol/L，各取 50μl，于 12 孔的塑料微滴定板条孔中，加入 200μl 增强溶液，置于分析振荡器上，振荡 20 分钟，室温放置 5 分钟。用 Arcus 1230 荧光计，测量荧光强度 (CPS)，绘制不同浓度 EuCl_3 溶液与相应的荧光强度的标准曲线 (图 4-4)。

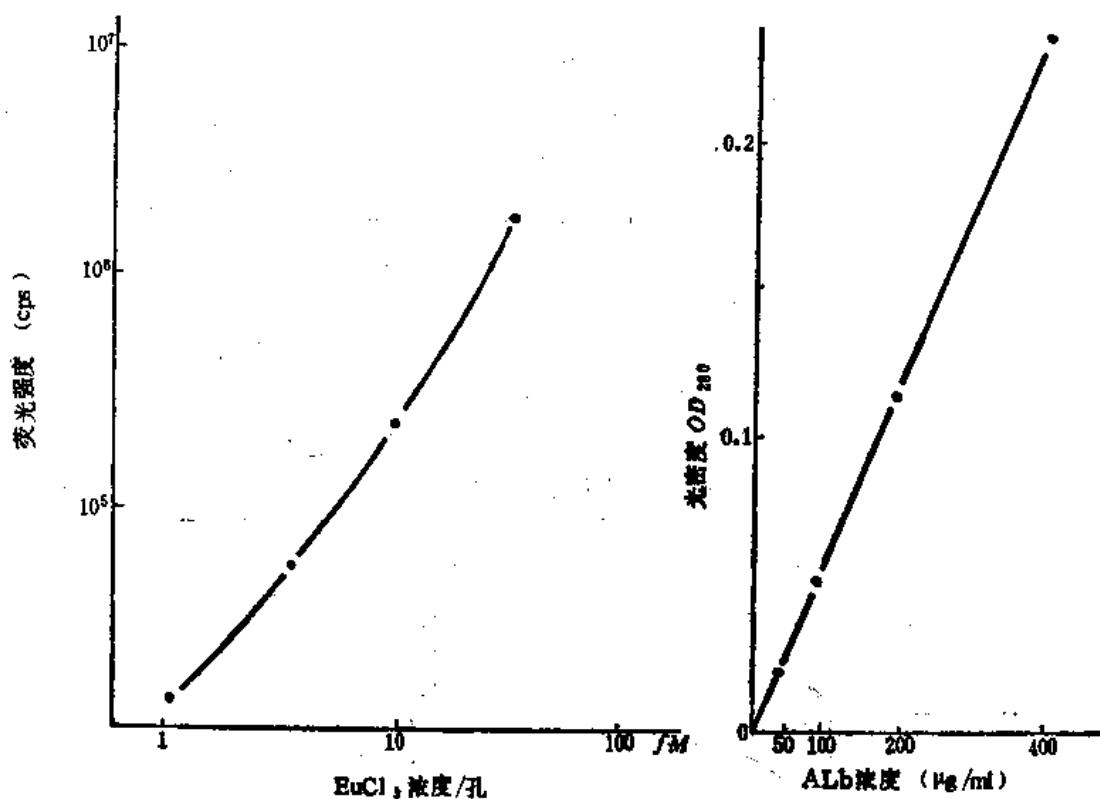


图 4-4 EuCl_3 标准曲线

图 4-5 白蛋白标准曲线

2. 人 Alb 标准曲线制备 称取 2.0mg 人 Alb 标准品，用生理盐水溶解，再稀释成 25、50、100、200、400μg/ml。用紫外分光光度计测 $OD_{280\text{nm}}$ ，与相应的蛋白质浓度绘制 Alb 标准曲线 (图 4-5)。铕 Eu^{3+} 聚合物标记后的样品中蛋白质含量，可以从标准曲线上查出。

3. Alb 抗原 Eu^{3+} 标记物的制备

1) 称取 0.5mg 人 Alb 溶于 100μl pH7.5 生理盐水中，加入 0.5mg 人工合成的二乙烯三胺五醋酸酐 (DTPA 酸)，立即混匀，室温反应 40 分钟，不时振摇。

2) 随后加入 100μl EuCl_3 ，混匀后，放置室温反应 40 分钟，间隔混匀数次。4℃ 放置 3 小时。

3) 将反应液小心加至平衡的 Sephadex G₆₀ (1×30cm) 层析柱上，用缓冲液淋洗，

流速 1ml/10 分钟，每 0.5 或 1.0ml 收集一管。经 Unican SP₁₈₀ 紫外分光光度计检测蛋白浓度，收集有 OD_{280nm} 值的蛋白样品，4℃保存。尚若不用层析柱分离，还可以改用对 pH7.4 的生理盐水透析 3 天，间隔更换透析液多次。以除去游离的 Eu³⁺ 离子。

4. Eu³⁺-Alb 标记物中荧光强度测定 将含有蛋白的淋洗液，用 50mmol/L, pH7.4 Tris-HCl 缓冲液稀释成 1:100, 1:1000, 1:10000 的不同稀释度，各取 50μl 于 12 孔微量滴定条孔中，并于每孔中加入 200μl 增强溶液，振荡 20 分钟，放置 5 分钟。于 Arcus₁₂₃₀ 荧光计上，测量反应液中 Eu³⁺ 离子的荧光强度。

Eu³⁺-Alb 标记物的标记率计算：由人 Alb 标准曲线查出的 Eu³⁺ 标记物中 Alb 含量，从 EuCl₃ 标准曲线上，查出标记物中 Eu³⁺ 含量，并计算 Eu³⁺ 利用率。按克分子浓度比，经计算 Eu³⁺/Alb 的标记率为 10。表明获得 Eu³⁺-Alb 标记物具有较高的比活性。

5. 用 Eu³⁺-Alb 标记物测 Alb 抗体的滴度 取 100μl 不同稀释度的 Alb 抗体于试管中，加入 100μl Eu³⁺-Alb 稀释液（1:10）和 100μl Tris-HCl 缓冲液，混匀 4℃ 放置加入 100μl 的二抗纤维素固相，混匀 4℃ 放置 2 小时，间隔摇动数次，离心分离，去上清，沉淀物用洗涤缓冲液洗 3 次。向沉淀物中加入 250μl 增强溶液，置于分析振荡器上，振摇数分钟，放置室温 20 分钟，离心，移出 200μl 上清液，加至塑料微量滴定条孔中，用 Arcus 荧光计测量荧光强度 (CPS)。结果见表 4-2。可见当抗体稀释度为 1:5 × 10³ 时，能结合 Eu³⁺-Alb 的鳌合物的荧光强度可达 158 万 CPS，比增强溶液本底荧光高近 150 倍。表明 Eu³⁺-Alb 标记物的比活性和免疫活性，均已达到 TrFIA 免疫分析所要求的指标。为建立蛋白质抗原的 TrFIA 分析方法奠定了基础。

表 4-2 Alb 抗体滴度测定

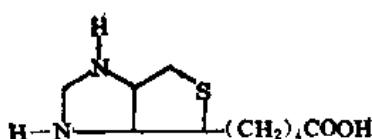
抗体稀释度	荧光强度(CPS)
1:5 × 10 ³	1,586,100
1:1 × 10 ⁴	1,117,050
1:5 × 10 ³	1,105,860
1:1 × 10 ⁵	982,255
1:1 × 10 ⁶	687,845
1:1 × 10 ⁷	293,734

(三) 稀土元素铽鳌合物标记白蛋白的制备

用过量稀土元素 Tb³⁺ 离子标记白蛋白，经 Sephadex G₅₀ (1 × 25cm) 柱层析，分离，除去未标记的游离 Tb³⁺ 鳌合物。用缓冲液淋洗柱时，在第 8 至 11ml 处，出现第 1 峰，与 Alb 在 OD_{273nm} 处的吸收峰的位置完全吻合，此峰属于已标记的 Alb-Tb³⁺ 鳌合物的荧光峰。在第 20 至 25ml 处出现第 2 峰，属于游离的 Tb³⁺ 的荧光峰。通过测定 Tb³⁺ 标记 Alb 中 Tb 含量，每个白蛋白分子上标记上 4 个 Tb 离子。

五、稀土元素鳌合物标记亲合素的制备^[8]

生物素 (Biotin) 是动植物体内广泛存在的一种维生素 H，结构如下图：



亲合素 (Avidin) 或称抗生物素, 是一种碱性的卵清糖蛋白, 含有四个相同的亚基, 每个亲合素可同时结合 4 个生物素分子。故亲和素是一个多价分子, 具有放大作用。

链亲合素 (Streptavidin 简称 SA) 是一种特殊的亲合素, 可从链霉菌属蛋白肉汤培养物中提取, 分子量为 60,000 的大分子蛋白, 与从蛋白中提取的亲合素一样, 具有 4 个高亲和力的生物素结合部位, 却很少有低聚糖糖基成分, 可保持中性等电点, 避免组织非特异性吸附。这一点有别于亲和素。

Eu^{3+} 融合亲合素或链亲合素, 可作为通用示踪剂, 也可用于多种生物活性物质的测定, 对大量样品的检测提供了方便, 可成为 90 年代一项有发展前途的标记技术。

亲合素对生物素有很强的亲和力, 亲和常数高达 10^{15}M^{-1} , 比抗原对抗体的亲和力高百万倍。两者结合极其稳定, 不易解离。80 年代发展起来的生物素-亲合素系统 (BAS) 和有关技术, 推动和发展了原有几项标记技术, 初步形成了更灵敏的新标记方法, 近些年来 BAS 在 TrFIA 和 TrIFMA 中得到广泛应用。

(一) 活化生物素的制备

1. 试剂和仪器 生物素 (Biotin); 双环己基碳化二亚胺 (DCCI); *N*-羟基琥珀酰亚胺酯 (NHS); 二甲基甲酰胺 (DMF); 乙醚; 异丙醇; 五氧化二磷 (P_2O_5); 磁力搅拌器; 减压过滤装置。

2. 操作程序

- (1) 取 2.5 g 生物素, 溶于 30 ml DMF 溶液中, 依次加入 1.5 g NHS 和 2.0 g DCCI。置于室温, 密闭磁力搅拌 20~24 h, 使双环己基脲沉淀析出;
- (2) 减压过滤, 除去白色沉淀物。再滴加 DMF, 洗涤沉淀物多次;
- (3) 滤液置 4℃ 过夜。若析出白色沉淀, 再重复 (2)、(3) 步骤一次;
- (4) 滤液加热 100℃, 减压抽去 DMF 溶剂;
- (5) 得固体产物, 用少量乙醚洗涤数次, 除去 DCCI。减压除去 DMF, 最后获得白色的活化生物素纯品。放 P_2O_5 干燥器, 充分干燥;
- (6) 干燥后活化生物素 (Biotin-NHS), 用异丙醇再重结晶 2 次。

(二) 生物素化抗体的制备

1. 试剂和仪器 抗体免疫球蛋白 (IgG); 硫酸铵: 0.01 mol/L, pH 8.0, 磷酸缓冲液; 1 mol/L HCl, DE₅₂ 纤维素 (Whatman 产品); 活化生物素 (Biotin-NHS); 二甲基甲酰胺 (DMF); 0.25 mol/L NaHCO₃; 磁力搅拌器; 冰冻干燥机; 离心机。

2. 操作程序

- (1) 硫酸铵提取抗体 IgG 用 2 ml 抗血清加入 8 ml 生理盐水 (1:5), 慢慢加入 10 ml 饱和硫酸铵, 边滴加边搅拌, 放置 60 分钟。于 10,000 转/分钟离心 15 分钟。沉淀物溶于 5 ml 生理盐水中, 慢慢加入 2.5 ml 饱和硫酸铵溶液, 边加边拌, 达饱和度, 放置 60

分钟，离心 15 分钟，全部操作在 4℃ 条件下进行。沉淀物溶于少量生理盐水中，对水透析 48 小时，以除去硫酸铵。收集透析袋内 IgG，4℃ 保存。

(2) DE₅₂ 纤维素提取抗体 IgG 取 50g DE₅₂，加 250ml 0.01mol/L pH8.0 PB，用 1NHCl 调 pH8.0；置室温 30 分钟，倾去上清液，再加 500ml PB，反复 3 次。将 DE₅₂ 于玻璃器 G-4，抽干。可获得 96% 纯度 IgG。

取 2ml 抗血清 IgG，加 6ml 生理盐水稀释后，慢慢滴入预处理 DE₅₂，按抗血清 IgG，湿重 DE₅₂=1:5(w/w)，边加边搅拌(4℃)，每 10 分钟搅拌一次。

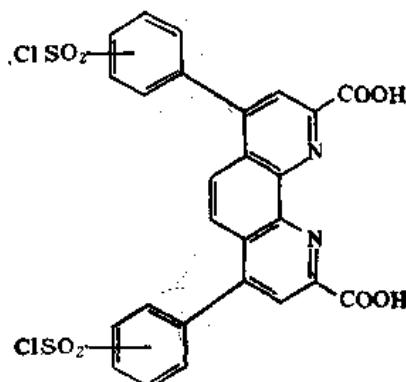
将吸附 IgG 的 DE₅₂ 纤维素，倾于玻璃滤器 G-4，抽滤，用 0.01mol/L pH8.0 PB 洗 3 次。合并 IgG 滤液，用 PEG(MW20,000) 浓缩，测定 IgG 蛋白量和活性，冻干，4℃ 保存。

(3) 活化生物素偶联抗体制备 各种动物抗血清 IgG、SPA (葡萄球菌 A 蛋白) 均可与活化生物素偶联。偶联步骤如下：

- ① 取 1.0mg 经 DE₅₂ 纯化抗体 IgG 溶于 0.1ml 新配制的 0.25mol/L NaHCO₃ 中，
- ② 取 1.0mg 活化生物素溶于 100μl DMF 中，
- ③ 取 50μl 生物素 DMF 溶液，慢慢滴加到 IgG 溶液中，室温下，磁力搅拌反应 4 小时，4℃ 过夜。对 0.01mol/L pH7.2 PBS 或 NS 透析 24 小时。取出反应液。
- ④ 在上述反应液中，加入 NaN₃，使最终浓度达 0.1%，并加入等量的 AR 级甘油，置 -20℃，可长期保存。

(三) 稀土元素螯合物标记链亲和素制备

稀土元素螯合物标记链亲和素的方法^[8]，是采用加拿大多伦多大学推出的 TrFIA 分析系统，又称为 Cyber Fluor 系统。这个分析系统不同于 LKB 公司的 DELFIA 系统。尽管这两个系统的基本原理是相同的，但在螯合剂、荧光测量方式、采用测量仪器等方面又有差异。Cyber Fluor 系统，引用一种新型的螯合剂：4,7-双氯苯酚磺酸基-1,10-菲洛林-2,9-二羧酸 [4,7-bis-(chlorosulfophenyl)-1,10-phenanthroline-2, 9-dicarboxylic acid]，简称为 BCPDA。BCPDA 分子结构式见下图。这种系统的特点是：既可以消除外源性稀土元素的污染，又可以简化分析步骤，是目前较先进的一种分析方法。



具体标记方法如下：取 5mg 链亲合素溶于 33ml 0.1mol/L pH9.1 碳酸盐缓冲液中，为 A 液，另取 7mg BCPDAEu³⁺ 融合物将它溶于 200μl DMF 中为 B 液。将 A 液置于磁力搅拌器上，缓慢滴加 B 液。室温下磁力搅拌反应 1 小时，用 5L, 0.1mol/L NaHCO₃

透析 3 次，或过 Sephadex G₅₀ 柱。临用前，用 50mmol/L, pH7.8 Tris-HCl 缓冲液（含 0.1% BSA, 0.09% NaCl, 0.01% NaN₃, 0.01% 柳硫汞），按 1:50 稀释 Eu³⁺ 标记物，使最终浓度达 10μmol/L。收集反应液，0~4℃ 保存备用。

(四) DNA 探针中的稀土元素螯合物标记链亲合素的制备^[8]

采用 DELFIA 系统，主要包括下列三个内容：

1. 经亲和层析获得链亲合素 (SA);

2. 合成异硫氰酸苯基 EDTA-Eu³⁺ 融合物；

3. 标记步骤 取 1.0mg 链亲合素，溶于 500μl 50mmol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液，加入相当于 100 个摩尔当量的过量异硫氰酸苯基 EDTA-Eu³⁺ 融合物，混匀，4℃ 反应过夜，反应液经 Sephadex G₅₀ 柱 (1×30cm)，纯化链亲合素-Eu³⁺，再用 50mmol/L, pH7.75 Tris-HCl 缓冲液（含 0.9% NaCl）淋洗，以除去未标记的 Eu³⁺。测定与链亲合素联接的 Eu³⁺ 荧光强度，从 Eu³⁺ 标准曲线中查出偶联的 Eu³⁺ 浓度，从而计算出 Eu³⁺/SA 比值。

用 Eu³⁺ 标记的链亲合素来测定生物素化 DNA 时，发现 Eu³⁺/SA 比值非常重要。当 Eu³⁺/SA 比值等于 10 时，信号/噪音为 25，是最适宜的；而当 Eu³⁺/SA 比值大于 10 时，信号/噪音比值反而降至 18。本底噪音增加，信号没有增加或无明显增加，从而降低检测灵敏度。此外，Eu³⁺/SA 比值增大，还会影响生物素与标记的链亲合素的亲和反应。

六、稀土元素螯合物标记小分子半抗原的制备

稀土元素螯合物在标记小分子半抗原之前，小分子半抗原需经过一定化学修饰，再与载体蛋白偶联。最后通过双功能螯合剂的基团与载体蛋白上游离氨基以共价键结合。同时双功能螯合剂又与稀土离子 (Eu³⁺) 以非共价键螯合。常用的载体蛋白有：牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白、辣根过氧化物酶、多聚赖氨酸等。采用的双功能基团螯合剂有：DTPA 酚、异硫氰酸苯基-EDTA、异硫氰酸苯基-DTTA。稀土元素螯合物标记小分子半抗原的方法有下述几种^[9,10]。

1. 标记链亲合素 (SA) 法 具体方法参见第 5 部分。若采用 BCPDA-Eu³⁺ 融合物时，标记率 (BCPDA-Eu³⁺/SA) 克分子比值，控制在 15 为最佳；比值高于 15 以上，可能会导致 SA 的生物活性降低，甚至明显地降低。

2. 多荧光标记法 将甲状腺球蛋白 TG 首先与 BCPDA 标记，再与 SA 相偶联，测得标记化合物 SA-TG-BCPDA 中各成分构成比例为 1:1:160。即 1 个 TG 分子结合 160 个 BCPDA 分子，在过量 Eu³⁺ 存在的情况下，1 个标记复合物产生的荧光强度，相当于 900 个 BCPDA-Eu³⁺ 融合物。因此多荧光标记融合物的荧光信号可以增强 6 倍。

3. 标记半抗原蛋白质载体法 小分子半抗原时间分辨荧光免疫分析，可以将 Eu³⁺ 融合物标记在与半抗原偶联的蛋白质载体上。详见稀土元素螯合物标记白蛋白部分。此类方法往往需要将抗原抗体复合物与游离融合物分离，故又称为非均相法。

4. 直接标记小分子半抗原法 Eu³⁺ 融合物直接标记在小分子半抗原上，标记方法常

因半抗原种类不同而不同。所以应用受到限制。测定时，将第一抗体包被于固相材料上，加入标准抗原，此标记抗原与非标记抗原，共同与固相抗体产生竞争结合反应。也可以包被第二抗体（或 SPA）。先加入第一抗体，与固相二抗产生免疫反应后，经洗涤；再加入标准（或待测）抗原、 Eu^{3+} 标记抗原，产生免疫反应。因包被第二抗体，有利于测定不同的抗原，具有通用性等优点。上述测定均采用瑞典 Pharmacia-LKB 公司的 ARCUS 时间分辨荧光计。

5. Eu^{3+} -W1174 融合物标记小分子抗原法 用 Eu^{3+} -W1174 融合物直接标记小分子抗原，关键试剂为 W1174 融合剂，是由芬兰 Wallac 有机化学实验室合成的。W1174 融合剂特点是，分子中既含有可联接小分子的功能基团，又含有能吸收激发光并传递光能给 Eu^{3+} 的芳香基结构。因此， Eu^{3+} -W1174 融合物标记小分子半抗原就显得容易和简便。但 W1174 融合剂中芳香基团能量吸收和传递特性，常受免疫反应体系的影响。当它在含白蛋白弱酸性反应体系中， Eu^{3+} -W1174 小分子半抗原的荧光信号得以增强，但是，一旦与相应抗体结合，即刻发生荧光淬灭反应，降低了检测荧光信号的强度，在完成免疫反应后，不需要离心分离结合部分与游离部分，简化操作步骤。这种标记免疫分析法，又称为均相时间荧光免疫分析法。将标准的小分子半抗原（或待测样品）、 Eu^{3+} -W1174 标记的半抗原和抗体一起，在室温下，振荡反应 10 分钟，便可直接测定液相中荧光强度。省去洗涤、分离、加增强溶液等繁琐步骤，又具有省时、快速、便于自动化测定等特点，非常适合于临床检验工作。利用上述结合反应，发生荧光淬灭的原理，将 Eu^{3+} -W1174 直接标记 L-甲状腺素和雌酮-3-葡萄糖醛酸化合物（E-3-G），先后建立了血清甲状腺素、尿雌酮-3-葡萄糖醛酸等均相时间分辨荧光免疫分析法。

七、时间分辨荧光免疫分析的影响因素^[11]

（一）影响稀土元素标记物质量的因素

稀土元素标记物的质量是建立时间分辨荧光免疫分析成功的关键，主要影响因素有以下两点。

1. 标记物的比活性 即标记到抗体或抗原上的 Eu^{3+} 克分子数。抗体上标记的 Eu^{3+} 太少，必将降低分析方法的灵敏度；但标记的 Eu^{3+} 过多，又不可避免地损伤标记物的免疫活性。

不同类型的融合剂，其标记率和对产物的免疫活性的损伤程度有明显差别。如用二步法制备白蛋白抗原融合物，采用 DTDA 酞， $\text{Eu}^{3+}/\text{Alb}$ 克分子比为 10:1，比较适宜。用 DTPA 酞标记链亲合素克分子比为 1.6:1，比较低；而用异硫氰酸苯基 EDTA 标记链亲合素，克分子比为 10:1，比较适宜，并能体现放大作用，明显提高了检测的灵敏度。

2. 标记体系酸碱度和反应时间 双功能融合剂与蛋白质反应过程中，反应体系的 pH 值变化，对所制备的 Eu^{3+} 标记物免疫活性的影响较大。为防止加入 DTPA 酞后，使 pH 值偏低，导致蛋白体变性，往往预先加入一定量 NaHCO_3 ，使 pH 至 8.9，确保标记物的免疫活性，并将反应时间由 30 分钟适当延长至 1 小时，加入 EuCl_3 后，调 pH 至 6.0，也将室温反应的时间由 30 分钟增加到 2 小时。这样可以提高标记率。

(二) 影响免疫反应及测量的因素

在时间分辨荧光免疫分析中，通常采用固相分析方法。即将抗原或抗体包被在塑料微量滴定条孔壁上，采用双位点夹心法或液相竞争抑制法，整个免疫反应和最后荧光信号的测量，均在同一孔中完成。故滴定板条孔壁的吸附能力和透明度对实验影响甚大，除要求它对蛋白质具有高吸附能力外，还必须具有高透明度。实验器皿清洁度和试剂纯度也直接影响实验测定结果。因此，实验用品除按常规方法洗涤外，须再经1%EDTA-Na₂或1%DTPA浸泡。最后，用重蒸馏水洗涤。须严格控制自然本底荧光对测量的干扰；对各种使用试剂，配制后，均须进行本底荧光的检测，符合要求才能使用。

(三) 影响增强溶液质量的因素

稀土元素分子或离子体本身的荧光信号是很弱的，而TrFIA技术，所以能使稀土元素离子螯合物检测灵敏度达到10⁻¹⁸mol/L，除了特制的测量仪器外，荧光增强效率也是一个重要因素。这个因素主要依赖增强溶液中的β-二酮体(螯合剂)，当Eu³⁺从免疫复合物上，解离下来后，与β-二酮体螯合，形成新的螯合物，而使荧光强度增强近100万倍。不同增强溶液体系对稀土离子的相对荧光强度影响是不同的，见表4-3。

表 4-3 不同β-二酮体对稀土离子相对荧光强度影响

稀土离子	β-二酮体	最大激发光(nm)	最大发射光(nm)	衰减时间(μs)	相对荧光强度
Eu ³⁺	β-NTA	340	613	714	100.0
Eu ³⁺	PTA	295	613	925	36.0
Sm ³⁺	β-NTA	340	600/643	65	1.5
Sm ³⁺	PTA	295	600/643	60	0.3
Tb ³⁺	PTA	295	490/543	96	8.0

注：β-NTA：β-巯基三氯丙酮；PTA：三甲蔡乙酰三氯丙酮

此外适当的荧光增强协同剂(TOPO)的参与，也可减少Eu³⁺螯合物中荧光的猝灭，

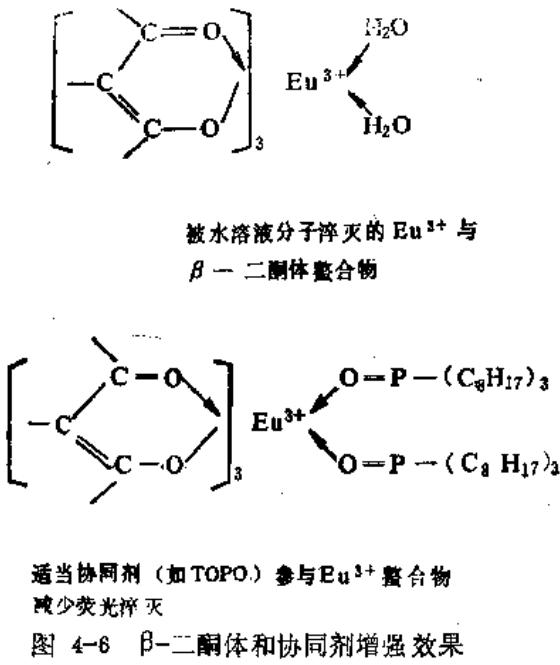


图 4-6 β-二酮体和协同剂增强效果

见图4-6。当增强溶液中的 β -二酮体(配位体),接受波长为340nm光的激发后,由基态 S_0 跃迁到单线态 S_1 ,再由 S_1 转到三线态(T_1)。然后,光子能量由 T_1 传给铕离子(Eu^{3+}) $^6\text{D}_0$ 能级,受能级激发的 Eu^{3+} 由 $^6\text{D}_0$ 回到能量基态时,发射荧光信号,以波长为613nm的荧光信号为最强,传能机理见图4-7。但是,当 Eu^{3+} 的能量,向水作非辐射传能时,水成为荧光信号的淬灭剂。所以须使用非离子型的表面活性剂Triton X-100去形成疏水型的微胶囊。有了微胶囊结构,用时间分辨荧光免疫分析法,才能获得很高的测定灵敏度。

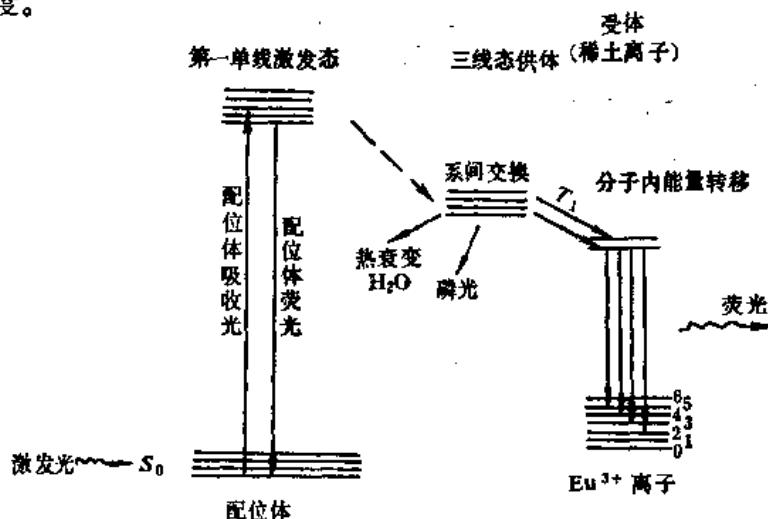


图 4-7 配位体受激发到 Eu^{3+} 离子发射荧光的能量传递示意图

至于 α -萘酰三氟丙酮或 α -和 β -萘酰三氟丙酮的混合体均不适宜作增强剂。每次配制增强溶液时,应对荧光本底和增强效率进行鉴定,选择出荧光本底低,增强效率最高的增强溶液。

八、时间分辨荧光免疫分析的测量技术

时间分辨荧光免疫分析是以稀土元素标记生物活性物质为特点的。因此检测技术主要是采用时间分辨荧光计(或荧光仪)。目前世界上已有两种测量系统:

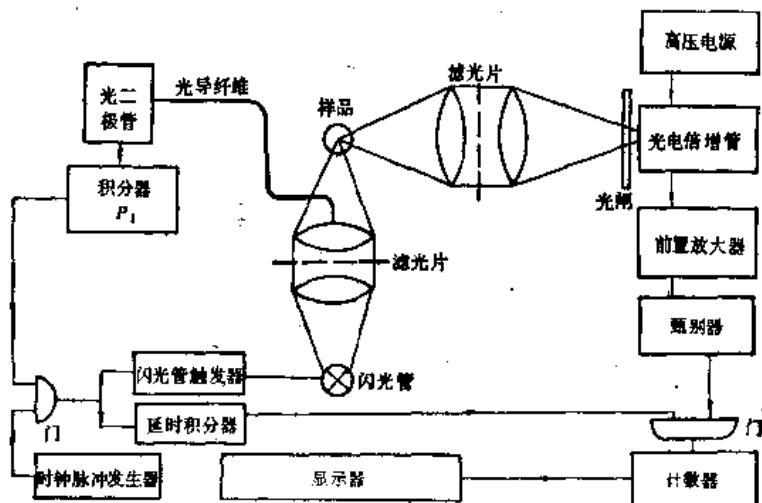


图 4-8 时间分辨荧光计原理示意图^[13]

1. 芬兰 LKB 公司的 Wallac 实验室推出的 Arcus 1230 时间分辨荧光计 一次可以测量 300 个样品，每个样品荧光信号测量只 1 秒钟，1 小时内可测 1500 个样品。测定的动态范围达 4 个数量级，灵敏度为 10^{-18} mol/L。该仪器的原理示意方框图如图 4-8 所示。主要通过改进显示系统增加检测的灵敏度。

2. 加拿大 Cyber-Fluor 公司生产的 Cyber-Fluor 615 免疫分析计 测定以白色不透明微量滴定条，作为固相包被材料，用双功能螯合剂 BCPDA 作为分子桥，使标记成分与稀土元素离子的连接在一起。测量时不需要加入增强溶液，而是直接测定固相结合部分的荧光强度。测定后微量滴定条板还可以长期保存。表 4-4 列举两种测量计性能的比较。

表 4-4 两种时间分辨荧光计测量性能比较

名称	型号	光源	激发波长 (nm)	延缓时间 (μs)	测量时间 (μs)	发光波长 (nm)	测试条件	优缺点	厂家
荧光分析计	Arcus 1230 型	氘灯	340	400	400	613	液相荧光，需增强溶液	灵敏度高 10^{-18} mol/L，操作复杂，易受污染	Pharmacia-KLB 公司(瑞典芬兰)
免疫分析计	Cyber Fluor 615 型	氮激光	337.1	200	400	613	固相荧光，不需增强溶液	用 BCPDA 融合剂，样品可长期保存	Cyber Fluor 公司(加拿大)

九、时间分辨荧光免疫分析和时间分辨免疫

荧光分析技术的应用^[13~15]

1983 年首先报道，以稀土元素螯合物标记抗原或抗体，建立一种新型的时间分辨荧光免疫分析法。这种无放射性的免疫分析，因具有灵敏度高、标记物稳定、标准曲线量程宽、不受样品自然荧光干扰等特点，博得科学界和医学界的关注。国外已报道了 TrFIA 的方法学研究和临床应用，并研制了包括激素、药物、蛋白质、肿瘤标志物、乙型肝炎病毒等测定的试剂盒，见表 4-5。

表 4-5 用 TrFIA 检测有关物质一览表

测定物质	最小检出值	标准曲线范围	测定方法
促甲状腺激素(TSH)	0.03mIU/L	0.25~324mIU/L	单克隆抗体双位点夹心法
甲状腺素(T ₄)	1.0nmol/L	10~300nmol/L	竞争法
游离T ₄ (F-T ₄)	2.0pmol/L		
三碘甲状腺原氨酸(T ₃)	0.08nmol/L	0.5~10nmol/L	竞争法
孕酮	1.0nmol/L	1~400nmol/L	多克隆抗体夹心法
皮质醇	5nmol/L	100~2000nmol/L	多克隆抗体竞争法
雌二醇(E ₂)	50pg/L	0.05~15nmol/L	竞争法
睾丸酮	15fmol/L		
胰岛素	0.05μIU/孔	1.25~320mIU/L	多克隆抗体双位点夹心法
催乳素(PRL)	0.04μg/L	0.25~250μg/L	二种单克隆抗体双位点夹心法
卵泡刺激素(FSH)	0.95IU/L	1~256IU/L	双位点夹心法
人绒毛膜促性腺激素(HCG)	0.5IU/L	2~10 ⁴ IU/L	二种单克隆抗体双位点夹心法
促黄体生成激素(LH)	0.05IU/L	0.6~250IU/L	单克隆抗体双位点夹心法

续表

测定物质	最小检出值	标准曲线范围	测定方法
地高辛	0.26nmol/L	0.3~5nmol/L	多克隆抗体竞争法
癌胚抗原(CEA)	0.2μg/L	1~500μg/L	双单克隆抗体夹心法
CA-50	0.2μg/L	1~500μg/L	双位点夹心法
甲胎蛋白(AFP)	1.0μg/L	1~400μg/L	多克隆抗体双位点夹心法
铁蛋白	2.0μg/L	2~1,500μg/L	多克隆抗体双位点夹心法
免疫球蛋白E(IgE)	0.25ku/L	1~1,000ku/L	双位点夹心法
性激素结合球蛋白(SHBG)	0.8nmol/L	6.25~200nmol/L	双位点夹心法
先天性梅毒	0.125IU/L	1~250IU/L	
乙型肝炎表面抗原(HBsAg)	0.12ng/样	0.03~2.1μg/L	二步法
乙型肝炎表面抗体(HBsAb)	0.2μg/L		

TrFIA 和 TrIFMA 还可以用来测定病毒抗原如粪便中的腺病毒; 呼吸道的融合细胞病毒 A、B 型, 流感病毒, 副流感病毒; 还有抗病毒抗体如风疹病毒抗体、破伤风病毒抗体; 酶类如人胰磷脂酶 A₂。下面就其临床应用举例说明。

(一) TrFIA 在药物检测中的应用

多数药物属于无免疫原性的小分子半抗原, 可采用 TrFIA 竞争法进行测定。简要原理是: 先将药物小分子以共价键和蛋白质大分子偶联, 制成固相抗原。待测样品或标准品加至固相抗原中, 随后加入 Eu³⁺标记抗体。上述两种抗原与抗体发生竞争性结合免疫反应。经洗涤后, 测定结合到固相抗原上的荧光强度, 从标准曲线上查出待测样品的浓度。现以测量血清中地高辛的浓度为例, 介绍如下。

1. 地高辛抗体的纯化和 Eu³⁺标记物制备 取适当稀释的地高辛抗血清, 加等量饱和硫酸铵液, 混匀后, 4℃放置 1 小时, 离心 20 分钟, 沉淀物, 经 Sephadex G₅₀ 柱 (1×30cm) 层析去盐或透析去盐。再取 Eu³⁺螯合物, 按一步法进行标记, 经荧光测定, 每个分子 IgG 结合 5~12 个 Eu³⁺离子。

2. 地高辛-兔血清白蛋白结合物制备 取 25mg 地高辛加到 5ml 无水乙醇中, 放置磁力搅拌器上, 滴加 2ml 0.1mol/L 偏过碘酸。30 分钟后再加 100μl 乙二醇。

另取 10mg 兔血清白蛋白溶于 2ml 蒸馏水中, 滴加到地高辛溶液中, 用 0.5% Na₂CO₃ 液。将反应液的 pH 调至 9.3~9.5 维持约 30 分钟。然后加 16mg(1ml) 新配硼氢化钠, 室温下反应过夜。次日, 用 1N HCl 调反应液 pH 4~5。室温放置 1 小时, 再移至 4℃ 3 小时, 离心, 倾去上清, 沉淀物溶于 1ml 15mmol/L NaHCO₃ 缓冲液中。经 Sephadex G₅₀ 柱层析分离, 即得地高辛-兔血清白蛋白结合物。

3. 固相半抗原制备 包被缓冲液: 50mmol/L KHCO₃, 含 0.9% NaCl, 0.1% Gem-all-II, 0.2mg% 兔血清白蛋白。

取地高辛-兔血清白蛋白, 用包被缓冲液配成 0.1μg/ml。

每个微量滴定板孔中, 加入 100μl 地高辛-兔血清白蛋白液, 室温放置过夜, 倾上清, 洗涤后, 加入乙醇脱水干燥, 4℃ 保存。

4. 测定步骤

- (1) 取 20 μ l 地高辛标准液或样品至包被微孔中;
- (2) 每孔加入 100 μ l (含 100 μ g IgG) Eu³⁺标记抗体液, 于振动下反应 30 分钟;
- (3) 倾去反应液, 用洗涤液洗 6 次;
- (4) 每孔加入 200 μ l 增强溶液, 振动 5 分钟, 放 10 分钟后, 用 Arcus 1230型时间分辨荧光计测定荧光强度。

(二) TrIFMA 在蛋白质或大分子激素测定的应用

许多大分子生物活性物质具有多个位点决定簇, 可以产生多个结合位点的多克隆抗体或获得一株以上单克隆抗体, 这样的抗体不仅可以作为固相包被材料, 而且可用作标记稀土元素的抗体 IgG。测定时, 通常建立双位点夹心固相免疫分析法, 又称时间分辨免疫荧光测量法 (TrIMFA)。以测定甲胎蛋白 (AFP) 为例。

1. 生物素化的抗 AFP 抗体 IgG 制备 取羊抗人 AFP 多克隆抗体, 经亲和层析纯化, 用 0.1mol/L, pH9.0 碳酸盐缓冲液配成 500mg/L。取出 1ml 此抗体溶液, 加入 500 倍克分子浓度量 (按 AFP 计) 的硫代琥珀酰亚胺-6-生物素酰胺己酸盐 (NHS-LC-Biotin), 溶于 100 μ l 二甲基亚砜中。当两液混合后, 室温反应 1 小时, 反应液对 5L 的 0.1mol/L, pH8.3 碳酸盐缓冲液透析。4℃保存。临用时, 生物素化的抗体溶液, 用 10mmol/L, pH7.8 Tris-HCl 缓冲液, 按 300 倍稀释。

2. 稀土元素标记亲合素的制备 见本章稀土元素标记亲和素部分。

3. 操作步骤 取 20 μ l 标准液或待测样品于包被 AFP 抗体的微孔板中, 加入 100 μ l 标准稀释液, 37℃温育 45 分钟, 用洗涤缓冲液洗二次, 加入 100 μ l (1:300) 稀释生物素抗 AFP 抗体, 37℃温育 45 分钟, 再洗二次, 加入 100 μ l/孔 Eu³⁺标记的链亲合素, 于 37℃温育 30 分钟以上, 洗二次, 用压缩空气吹干, 经 Cyber Fluor 615 免疫分析计测量微孔中固相物的荧光强度 (激发波长 337.1nm, 发射波长 615±5nm)。

(三) TrF 在分子生物学中的应用

随着分子生物学的发展, 核酸分子杂交技术, 在基础医学和临床医学的应用, 已深入到包括艾滋病在内的传染病, 肿瘤以及其他疾病的诊断、治疗和预测等领域。采用标记的核酸 DNA 作为探针, 已引起人们的高度重视, 先后出现有同位素标记DNA探针; 生物素或荧光素等化学基团标记的非放射性 DNA 探针。但在实际应用中, 都存在不足之处。最近用稀土元素标记 DNA 探针, 建立时间分辨荧光分析法 (TrF), 来测定核酸杂交体, 是分子生物学中一种新的检测技术。

目前, 核酸杂交体检测技术中, 稀土元素螯合物标记核酸探针技术有: ① 稀土元素螯合物标记抗体, 检测半抗原修饰的核酸探针; ② 稀土元素螯合物标记链亲和素检测生物素化的核酸探针; 或将生物素分子通过一个长臂分子桥接到核酸嘧啶环上的生物素化 DNA 探针; ③ 稀土元素螯合物直接标记在 DNA 分子上或寡核苷上, 制成 DNA 探针; ④ 通过一种特殊螯合剂 W2014(LKB 公司研制) 直接将Eu³⁺标记的 DNA 探针, 稳定性好, 可以长期保存, 无同位素危害, 又可以耐受分子杂交。方法灵敏度与 ³²P 缺口标记 DNA 探针不相上下。所以 TrF 可用于直接的、快速的分子生物学分析, 也是一种有潜力的 DNA 探针检测方法。

(四) TrF 在细胞学中的应用

稀土元素可以代替同位素作为细胞的标记物，在细胞学上得到应用。例如在测定天然杀伤 (Natural Kill，简称 NK) 细胞中，人们用三价铕离子螯合物代替同位素⁶⁵Cr 或³H-TbR 标记 K₅₆₂ 细胞素 (即 NK 细胞的靶细胞)。当 NK 细胞遇到 Eu³⁺-K₅₆₂ 细胞时，K₅₆₂ 细胞会裂解并释放出 Eu³⁺ 融合物，后者在增强溶液的协同下，可发出极强荧光信号，由时间分辨荧光计记录下来。从而确定 NK 细胞杀伤活力。由于方法简便、快速，灵敏度可检测到单个靶细胞水平，颇受人们关注。

十、时间分辨荧光免疫分析的发展前景

时间分辨荧光免疫分析和时间分辨免疫荧光分析，是 80 年代初问世的一种新型的标记免疫检测技术，也是当今微量分析中最有发展前途的一项技术，由于它不使用放射性同位素，标记物制备简易，可长期稳定，无辐射防护和废物处理等问题；测定时不受样品和自然荧光的干扰，整个操作时间短，测定速度快（1 秒钟测一个样品，10 分钟内能完成 96 个样品测量），应用范围相当广泛，已为科学的研究和临床疾病的诊断，提供了一种简便快速准确而又灵敏的分析方法，故深受生物医学工作者的青睐。

大量的研究结果表明，时间分辨荧光免疫分析和目前应用最广泛的放射免疫分析相比，具有完全相同的特异性，而且最小检出值和标准曲线量程又大大超过放射免疫分析，加之最近又将生物素-亲合素放大系统 (BAS) 引入时间分辨荧光免疫分析中，使检测的灵敏度更进一步提高。本世纪内，将有可能逐渐取代放射免疫分析。与此同时，也展现了时间分辨荧光分析在细胞学和分子生物学中的应用前景。

该分析技术自问世不到 10 年，在方法研究，分析药盒的研制发展甚速，测量仪器自动化程度日新月异。国外已有 30 多种商品化的分析药盒，向用户提供使用。在我国，有关时间分辨荧光免疫分析的研究已取得重大进展。试剂合成、分析药盒的组装，仪器设备的研制已日渐成熟。据不完全统计，我国已先后建立了乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝 e 抗原(HEe-Ag)、乙肝核心抗体(HBcAb)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、胰岛素、孕酮、甲状腺素(T₄)、三碘甲腺原氨酸(T₃) 和铁蛋白等 10 多项时间分辨荧光免疫检测方法。时间分辨荧光计国产化的研究，已取得进展，其中中国科学院、核工业总公司、机电部等有关单位研制了以氘灯为光源的国产化测量仪，中科院安光所研制了以氦激光为光源的国产测量计。相信在短期内，这一崭新的配基分析技术，将会在我国得到广泛地发展和普及应用。

参 考 文 献

1. Soini E, et al. Fluoroimmunoassay, Present status and key problems Clin Chem 1979; 25(3):353
2. 李振甲, 等. 时间分辨荧光免疫分析技术原理和方法 中华医学检验杂志 1988; 11(6):363
3. 陈泮藻, 等. 稀土元素标记技术及在免疫分析中的应用 生物化学与生物物理进展 1990; 17(4):260

4. Hemmila I, et al. Europium as a label in time resolved immunofluorometric assay Anal Biochem 1984; 137:335
5. Pettersson K, et al. Time resolved fluoroimmunoassay of HCG Clin Chem 1983; 29:60
6. Soini E, et al. Pulsed light, time resolved immunofluorometric assay, Monoclonal antibodies and new trends in immunoassay 1984; P197-208
7. 陈泮藻, 等. 在时间分辨荧光免疫分析中铕标记技术的初步探讨 免疫学杂志 1990; 6(1): 54
8. Dahlen P, et al. Detection of biotinylated DNA Probes by using Eu-labeled streptavidin and time resolved fluorometry Anal Biochem 1987; 164:78
9. Joronen I, et al. Detection of low molecular weight cysteine proteinase inhibitors by TrFIA J. Immu Meth 1986; 86:243
10. Lovgren, T, et al. Determination of hormones by time resolved fluoroimmunoassay Talanta 1984; 31:909
11. 李振甲, 等. 时间分辨荧光免疫分析技术研究中有关问题的探讨 中国免疫学杂志 1990; 6 (5):315
12. 徐永源. 一种新的超微量免疫分析技术 上海免疫学杂志 1989; 9(4):211
13. Dechaud, H, et al. Laser excited immunofluorometric assay of prolactin with use of antibodies coupled to lanthanide labeled diethylenetriamine pentaacetic acid Chin Chem 1986; 32(7):1323
14. Khosravl M, I, et al. Immunofluorometry of choriogonadotropin by TrFIA spectroscopy with a new europium chelate as label Chin Chem 1987; 33(11): 1994
- 15 Chan MA, et al. TrIFMA of alpha-fetoprotein in serum and amniotic fluid with a novel detection system Clin Chem 1989; 33:2000

第五章 胶体金标记技术及其应用

李春海 卢秀桂

(军事医学科学院基础医学研究所)

Feldherr 和 Marshall (1962 年)首先报道胶体金可作为电子显微镜的示踪标志物。1971 年 Faulk 和 Taylor 将其与抗体结合成一种特异性的标志物应用于电镜水平的免疫细胞化学研究。1974 年 Romano 等将其标记在第二抗体(马抗人 IgG)上, 建立间接免疫金染色法。此后, 胶体金标记技术发展较快, 广泛地用于各种生物大分子在细胞表面和细胞内部的定位、定性、形态发生和抗原特性等研究。1978 年 Geoghegan 等又将胶体金探针用于光镜水平测定细胞表面标志。但光镜下观察胶体金标记物, 所需金颗粒必须大于 20nm, 标记物浓度要高, 才能获得阳性结果, 这样就限制了免疫金染色法(Immunogold Staining, IGS) 在光镜水平推广应用。1981 年 Danscher^[1]用银显影方法增强金颗粒的可见度, 并提高了灵敏度。后来, Holgate 及其同事^[2]根据 Danscher 的方法将免疫金染色与银显影联合测定技术称为免疫金银染色法(Immunogold Silver Staining, IGSS), 从而使胶体金成为重要的探针, 被广泛地应用于生物学和医学诸领域, 是目前免疫细胞化学和免疫组织化学中较敏感的方法之一。

前已提及, Geohegan 及其同事首先在光镜水平用 IGS 来测定 B 细胞表面免疫球蛋白, 后来又有人将其用于测定细胞内抗原定位。1983 年 Waele 等^[3]首先用单克隆抗体与 IGS 结合, 在光镜下来观察细胞表面相应抗原。1986 年^[4]他们又用 IGSS 法来研究淋巴细胞亚群的表面标志, 因此胶体金探针是研究细胞增殖分化、成熟程度、功能和代谢变化的一个重要工具, 并在临床实际应用中, 对检测免疫细胞亚群的计数、白血病分型、肿瘤细胞表面标志等是一种既简便又灵敏的方法。

一、免疫金银染色的原理与特点

(一) 原理

IGS 和 IGSS 是将血清学方法和显微镜示踪方法结合起来的一种新的免疫细胞化学和免疫组织化学技术。其中示踪标志物是胶体金, 它是由氯化金在还原剂(如白磷、乙醇、过氧化氢、硼氢化钠、抗坏血酸、枸橼酸钠和鞣酸等)作用下聚合成特定大小的金颗粒, 由于静电作用而使其成为一个稳定的胶体状态, 故称为胶体金(Colloidal gold)。它可与多种生物大分子, 如免疫球蛋白、葡萄球菌 A 蛋白、植物凝血素(PHA)、刀豆素蛋白 A(ConA)结合。利用胶体金的一些物理特性如: 颗粒大小、形状、高电子密度及颜色反应, 加上标记生物大分子所具有的生物学特性, 使其在细胞生物学标记研究工作中应用更为广泛。

用 IGSS 测定细胞表面抗原过程中, 首先是用特异性第一抗体(如单克隆抗体)与

细胞表面相应的抗原进行特异性结合，再与胶体金标记的第二抗体反应，于抗原存在部位呈现金颗粒本身颜色（淡红色），但在光镜下不易观察，经银显影液处理后，使金颗粒周围吸附大量银颗粒，光镜下就可在抗原和抗体反应阳性部位呈现银的黑褐色（图5-1）。

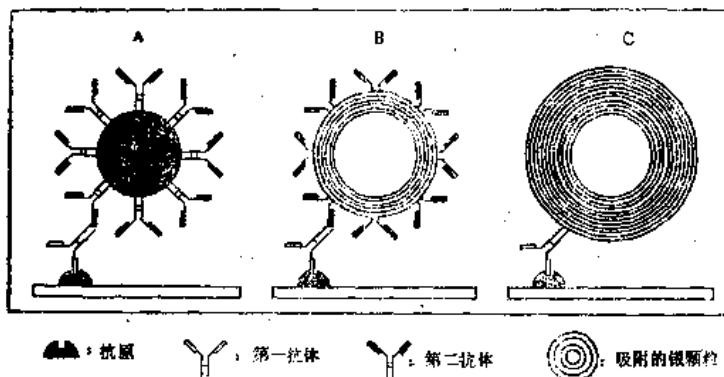


图 5-1 免疫金银染色法的原理

图中A为抗原与特异性第一抗体结合后，再与胶体金标记的第二抗体结合；B为金颗粒周围吸附银颗粒；C为金颗粒周围吸附的银颗粒，增强金颗粒在光镜下的可见度。

（二）标记类型

细胞表面标记可用于细胞抗原物质的定性、定位和定量的研究，实验标记方法有以下几种。

1. **直接法** 特异性强，但应用范围局限，仅限于标记抗原和抗体。
2. **间接法** 敏感性高，应用范围广，其特异性取决于第一抗体。
3. **单标记法** 是指用一种特定大小胶体金进行标记实验。
4. **多标记法** 利用几种不同大小的金颗粒（每一种金颗粒结合一种特定的生物大分子）同时显示细胞表面不同的抗原成分，以观察多种抗原物质的分布状态和相互关系。

（三）特点

IGS 和 IGSS 主要是以金颗粒作为特异细胞成分的标记物，所以胶体金探针在免疫组织化学和免疫细胞化学等领域的应用中，与现有其他标记方法和标记物（如酶标记、铁蛋白、葡萄糖亚铁和荧光标记等）相比，有以下一些特点。

- 1) 胶体金容易制备，价格低廉。
- 2) 几乎不出现非特异性吸附。
- 3) 金颗粒大小可以控制，颗粒均匀，易于与酶标记物和其他标记物进行双重和多重标记。
- 4) 可以标记多种生物大分子物质，如抗体、葡萄球菌蛋白 A(SPA)、凝集素、多糖、多肽及其他蛋白质而不影响生物活性。
- 5) 由于胶体金本身有鲜艳的桔红色，可用光镜或肉眼观察实验结果，也可用分光光度计测定光吸收，进行定量分析。
- 6) 金颗粒有较强的折光性，可用作流式细胞仪的标记物。

二、胶体金制备和胶体金标记蛋白质方法

(一) 胶体金制备

胶体金为金的水溶液，在四氯化金（或称氯化金酸， HAuCl_4 ）水溶液中加入还原剂，形成一种带负电荷的疏水胶体溶液。靠静电相互排斥作用来维持胶体体系的稳定性，利用不同的还原剂可制出大小不同直径的金颗粒。常用三种还原剂（柠檬酸、抗坏血酸和白磷）可分别制备出大、中、小三种不同粒径的胶体金。近来有许多实验室仅以柠檬酸为还原剂制成大小不同的金颗粒。有人认为所得到的胶体金颗粒的均一性和分散性均优于抗坏血酸法和白磷法。

制备高质量的胶体金需要注意以下几点：

- 1. 玻璃器皿必须严格清洗** 否则影响生物大分子与金颗粒结合，及活化后胶体金颗粒的稳定性，不能获得预期大小的金颗粒。
- 2. 试剂配制必须严格保持纯净** 如有条件，所有试剂的配制均应使用双蒸水或三蒸去离子水或将配好的试剂在临用时经超滤处理，以除去其中的分子聚合物和其他可能混入杂质。
- 3. 胶体金溶液制备的pH以中性（pH7.2）较好。**

(二) 胶体金标记蛋白质

在胶体金标记蛋白质的过程中，蛋白质与胶体金的吸附受许多因素影响，其中金颗粒的大小、离子浓度、缓冲液的 pH 和蛋白浓度的选择较为重要。

在选定金颗粒的粒径大小后，要考虑金—蛋白质相互作用的稳定性，其中，盐的成分与浓度可影响胶体金的吸附能力，过量的盐会使金颗粒发生凝集，因此被标记的生物大分子物质应溶解在较低盐浓度的缓冲液中。所以在被标记前对被标记物应选用相应的透析液，如 0.005mol/L NaCl 或乙二醇溶液进行透析。此外，在标记前还需对生物大分子进行高速离心或超滤，除去其中的聚合体，以避免大分子同团块吸附到金颗粒表面造成胶体金不稳定。

在一般情况下，蛋白质对胶体金吸附的最适 pH 与蛋白质等电点有关，而在低盐溶液和 pH 接近等电点条件下，蛋白质所处溶解状态最适于偶联，可产生较稳定的金标记物。因此在标记过程中，将胶体金溶液的 pH 用 $0.1\text{mol/L K}_2\text{CO}_3$ 调至所标记蛋白质的等电点（PI）或略偏碱性较好。

金颗粒与生物大分子标记中，两者的比例很重要，其中最佳结合比，可通过预试验得到，即一定量的胶体金加到不同稀释度的大分子溶液中，吸附后再加入 10% NaCl 视其颜色或紫外线吸收峰的改变进行定量测定，然后计算结果以 10~20% 过量蛋白，使其达到饱和结合浓度。

胶体金与蛋白质偶联后，加入稳定剂，以避免产生聚集，增强其稳定性。一般选用 PEG（分子量为 20000）和牛血清白蛋白（BSA）作稳定剂。在应用胶体金探针做切片和完整细胞免疫反应时，一般多用 BSA 作稳定剂，超速离心可使胶体金浓缩，并可除

去其中未结合的生物大分子。

对于标记的胶体金大分子生物活性物质还需进行鉴定，一般用透射电镜测定胶体金颗粒的直径以及用滤纸膜或硝酸纤维膜免疫细胞化学染色来测定标记物的免疫特性。

胶体金标记物的稳定性和保存：当在胶体金探针中加入一定量的聚乙二醇（PEG）后在无菌条件下，于4℃可保存数月至一年以上。

三、微孔滤膜免疫金银染色分析⁽⁵⁾

Wang (1985)等⁽⁴⁾首先介绍胶体金探针的细胞化学纸膜法，此法可鉴定胶体金探针的效价，还可代替免疫金银染色法测定抗体的敏感性和特异性，用以筛选第一抗体和标记抗体（第二抗体）的最佳工作浓度。我们在上述纸膜法基础上加以改进，发展为微孔滤膜免疫金银染色分析（Millipore Filter Immunogold Silver Staining Assay，简称MF-IGSSA），其原理与酶联吸附试验（ELISA）相同，将可溶性抗原或抗体吸附在固相载体上，用胶体金标记的抗体或抗原，检测相应的抗体或抗原。

（一）原理

(MF-IGSSA) 法与 ELISA 法相似，以微孔滤膜为载体，以抗原和抗体反应为基础，其显色系统为胶体金探针并通过银显影使显色反应加强，所以其特异性取决于第一抗体与待测抗原的特异性反应，而灵敏度与显色系统胶体金探针及银显色密切相关。它可分为直接法（图5-2）和夹心法（图5-3）。

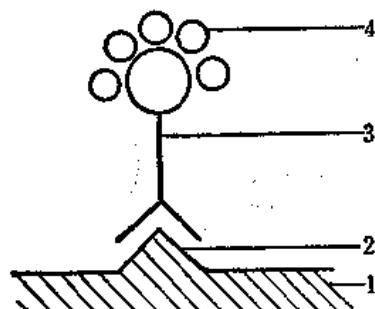


图 5-2 微孔滤膜免疫金银染色直接法
1. 固相——微孔滤膜 2. 待测抗体 3. 胶体金
探针 4. 银颗粒

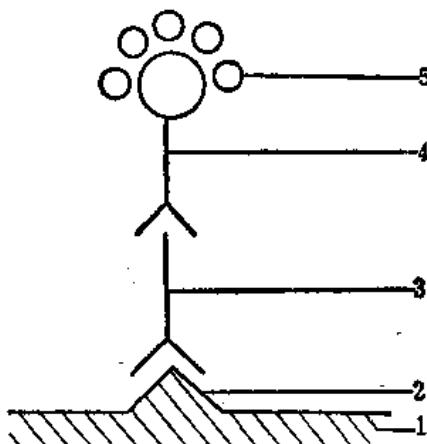


图 5-3 微孔滤膜免疫金银染色夹心法
1. 固相——微孔滤膜 2. 抗体 3. 待测抗原
4. 胶体金探针 5. 银颗粒

（二）测定中的几个问题

1. 固相载体 可溶性抗体、抗原或蛋白质通过物理吸附，可吸附于塑料、玻璃或金属上，也能通过共价结合在纤维素、琼脂糖、葡聚糖和聚丙烯酰胺等物质上。这些物质均可作固相载体。其中以塑料聚苯乙烯用得较多。而目前点免疫结合试验（Dot Immunoassay）所用的硝酸纤维素膜多为国外进口，价格昂贵，而国内产品质量一般

难以保证，因此我们用国产微孔滤膜为载体代替硝酸纤维素膜及 Wang 等在细胞化学纸膜法中所用的滤纸，效果较好。微孔滤膜实质是醋酸-硝酸混合纤维素膜，国内已批量生产，价格便宜。

2. 洗涤 在 MF-IGSSA 整个操作过程中要进行多次洗涤，目的是防止重叠反应，避免非特异性吸附，并使所用免疫试剂维持在一定 pH 值，如：胶体金探针 pH 是 8.2，所以在临加入胶体金探针之前，或加入胶体金探针孵育之后都要用 pH8.2 的洗涤液充分洗涤。洗涤时还要考虑排除有害化学反应，如 MF-IGSSA 最后一步所用的显影液含有硝酸银，而洗涤液中都含有氯离子，因此必须用蒸馏水或双蒸水将洗涤液中的氯离子彻底洗掉方能显影。洗涤液中所加的去除非特异的物质以及保护性阻断剂则根据具体实验进行选择。

3. 胶体金探针 胶体金及其大分子标记物的制备已有介绍，而用于 MF-IGSSA 的胶体金探针之粒径 5~20nm 都得到满意的结果。胶体金探针实际上就是带有活性蛋白的金颗粒。蛋白质分子吸附到胶体金颗粒表面，其结合主要靠表面电荷的吸引，因此很少引起蛋白活性的改变。但要得到高效的胶体金探针，蛋白质的纯度和生物活性都是十分重要的。

4. 结果判断 MF-IGSSA 阳性反应是形成灰黑色或棕黄色的色点。由于结合到微孔滤膜上的胶体金探针的量与待测的相应抗原或抗体的量成正比，所以，阳性反应色点的颜色深浅即反映了结合到抗原或抗体上胶体金探针的量的差别。也即反映了固定在微孔滤膜上的抗原或抗体量的差别。通过被检标本与标准抗原或抗体反应强度的系列比较，便可计算出被测标本中抗原或抗体的含量；每批实验均设阴性和阳性对照，色点颜色明显超过阴性对照者就是阳性结果。

四、免疫金银染法与其他免疫组织化学的比较

免疫组织化学是利用抗体与抗原的特异性结合，通过标记的抗体或抗原来鉴定组织或细胞表面及细胞内某些物质的分布和表达。自 1941 年 Coons 等建立荧光抗体法以来，相继出现了铁蛋白标记抗体、免疫酶技术 PAP 法、生物素和亲和素标记系统，免疫金银染色法及以单克隆抗体 APAAP 复合物建立起相应的 APAAP 法，这些方法在应用中各有其特点。酶免疫测定技术具有敏感、快速、操作简便，无需特殊仪器，在一般实

表 5-1 几种免疫标记技术的比较

	酶免疫标记	免疫荧光技术	放射免疫技术	免疫金银染色法
敏感性	较高	一般	高	高
特异性	强	强	强	强
标记物保存时间	1年多	半年	有半衰期器	半年~1年
操作要求	简便易行	需荧光显微镜	需放射性测定仪及防护措施	简便易行
样本量	大量	适量	大量	大量
缺点	易出现假阳性，标记抗体要求纯度高	暗视野观察组织结构不清，标本难以保存，观察仪器昂贵	需放射防护设备，样本不能长期保存，仪器设备昂贵	本底普遍较高，阳性组织形态难辨

验室中均能推广应用。而免疫金银染法除具有酶免疫法优点外，据 Moeremans 等报告，比间接过氧化物酶染色更为敏感。用这两种方法染色其最低抗原检出量分别为 0.1ng 和 1.5ng。

五、免疫金银染色法的应用

(一) 在测定白细胞分化抗原中的应用^[6,7]

1. 原理 免疫细胞和血液细胞膜表面分化抗原是细胞表面标志之一，对于研究细胞亚群、分化成熟及其功能都有重要意义，而且对临床免疫性疾病的诊断和治疗也有实用价值。尤其是单克隆抗体问世以后，使人们对细胞表面分化抗原的研究取得飞速进展。

近年来用免疫学技术对白细胞表面标志进行研究，主要是用单克隆抗体通过间接免疫荧光方法来实现。用此方法制成样品后必须立即观察，标本无法长期保存，还需用荧光显微镜。而 IGSS 可以克服上述不足之处。

在 IGSS 测定细胞表面分化抗原中。以相应的特异性单克隆抗体作为第一抗体，这是识别表面抗原的基本条件。以胶体金标记羊抗鼠或其他抗鼠的抗体为第二抗体，从而测定细胞表面相应的分化抗原的表达，所以其特异性取决于第一抗体，即单克隆抗体。目前已发现针对各种免疫细胞和血液细胞表面抗原的单克隆抗体已有数百种，由于各家命名繁杂，自 1982 年至 1989 年先后已有 4 次国际会讨论白细胞分化抗原的问题，并在 1983 年日本京都第五届国际免疫学会期间，由 WHO 命名委员会通过对各类分化抗原的命名原则，同意使用“分化群”(Cluster of Differentiation)。

新的命名法采用一个简单、明确和容易使用系统，避免了过去给交流造成困难的各种混乱。现介绍如下：

格式 CD. NO. (Cell. M.W.) Name of Monoclonal Antibody.

CD：分化群缩写 (Cluster of Differentiation)；

NO：分化群规定的编号。

括号内的 Cell：指分化群的定型细胞，或用以测定原分子量的细胞类型；M. W. 分子量或特定细胞型表面抗原的相对分子量，标本是经降解后测定的。分子量前面用 gp 表示糖蛋白；gl：醣脂类；Cho：碳水化合物；不知分子量时，用字母“U”表示。

括号后的名称是特定的单克隆抗体的原来名称。例如：用单克隆抗体 J5 在非 T、非 B 白血病细胞上测定的 CALLA 抗原正式的命名是：CD10 (nT-nB, gp100)J5 一般口头表示是 CD10。

人白细胞抗原分化群：见表 5-2。

2. 主要试剂 在 IGSS 测定细胞表面分化抗原的实验中，以上述各种单克隆抗体为第一抗体，其质量和效价与测定效果密切有关，因此在使用前需测定其效价，以倍比稀释测定其滴度，以抗原标本上显示的最佳染色为最适工作浓度，但稀释后的单抗经 2~4 周保存后仍需重新测定效价。

胶体金标记的第二抗体，一般为抗鼠类 IgG 抗体，也需在测定其效价和纯化后，才能标记。具体标记方法前面已作介绍。本实验室制备的胶体金标记羊抗鼠 IgG，其金颗粒

表 5-2 人白细胞抗原分化群

群名称	抗体	正常白细胞亚群	白血病细胞
CD1(Thy, gp45, 12)	NA1/34, T6, M241, D47	皮质胸腺细胞	少数T-ALL和T-LL
CD2(T, gp50)	9.6, T11, 35.1	全部形成E玫瑰花结细胞	大多数T恶性细胞
CD3(T, gp19-29)	T3, UCHT1, 89bI, 38.1	成熟T细胞	大多数T-CLL和CTCL, 少数T-ALL和T-LL
CD4(T, gp56-62)	T4, Leu3a, 91D6	辅助T细胞	少数T-ALL, T-CLL多數CTCL
CD5(T, gp67)	A50.10.2, T1, UCHT2, SCI, AMG4, T101, CrisI, H66, HH9	全部T和B细胞	大多数T恶性细胞和一些B-CLL
CD6(T, gp120)	12.1, T411, B614, WT31, MBG5	成熟T+B细胞亚群	少数T-ALL, 大多数T-CLL和CTCL, 一些B-CLL
CD7(T, gp41)	3A1, 4A1, CL1.3	全部T细胞	大多数T-ALL, 一些T-CLL, 少数CTCL
CD8(T, gp32-33)	Leu22, T8, M236, 51.1, UCHT4, 2D2, B9.4.1, B9.3.1, B9.7.6, B9.2.4, B9.8.5, B9.11.10.1, B9.1.1, C10, T811.	T亚群, 大多数细胞毒性T细胞, 抑制T细胞	少数T-ALL和T-CLL
CD9(nT-nB, gp24)	BA2, DU-ALL-1, FMC8, SJ, A-4, W83.	单核细胞	大多数非T非B ALL 少数B-CLL
CD10(nT-nB, gp100)	J5, BA3, NL-1, 24.1, VII-A,	前B, 多形核	大多数非T非B ALL
CD11(M.G.U.)	Mol, B2.12, M522	单核和粒细胞, 一些骨髓细胞	一些M4和大多数M5阶段的AML 一些CML
CDw12(M.G.U)	20.2, M67	单核和粒细胞	少数M4和M5阶段AML
CDw13(M.G.U)	MY7, DUHL60-4, MCS.2	单核和粒细胞	多数M1和少数M4和M5阶段AML, 一些CML
CDw14(M.U)	20.3, 5F1, MoP15, Mo2, MOS1, MY4 MOS39, TM18, MOP9, FMC17	单核细胞	少数M4和一些M5 AML
CDw15(G.U)	80H3, B13.9, MCS1., 32H7, FMC12, FMC13, WM37, DU-HL60-1, FMC10, WM27, WM30, G1120, TG8, WM38, TG1, DU-HL60-3, G2, B4.3, VIMD5, WM41, IG10	粒细胞, 一些骨髓细胞	大多数M4和一些M5 AML, 一些CML.

* 缩写说明:

① ALL: 急性淋巴细胞白血病; LL: 原淋巴细胞淋巴瘤; CLL: 慢性淋巴细胞白血病; CTCL: 皮肤性T细胞淋巴瘤; AML: 急性粒细胞白血病; CML: 慢性粒细胞白血病

② 阳性频率表示法: “少数”为10~30%; “一些”为40~70%; “大多数">>70%;

直径分别为15nm(GAMG 15) 和5nm(GAMG 6) 两种, 蛋白浓度为50μg/ml, 实验时将其工作浓度稀释10~20倍为5μg/ml或0.5μg/ml。

3. 操作流程

(1) 细胞悬液制备、涂片及保存

A. 单个核细胞制备: 用Ficoll-Hypaque淋巴分离液分离外周血及骨髓单个核细胞, 并根据各类细胞比重不同分层提取。

先将淋巴细胞分离液(比重1.077±0.001)放入试管内, 然后将肝素抗凝血经Hank's

液或PBS液以1:3稀释，轻轻缓慢地沿管壁加入，使稀释的被分离液重叠于淋巴细胞分离液上，稀释血样品与分离液体积为3:1为宜，加样品时勿冲乱两液间之界面。

在400×g离心20分钟后可见试管内液体分4层，底层为红细胞，其上为白色粒细胞层，此上层为细胞分离液，最上层为血细胞稀释液与血浆层。在细胞分离液与最上层之间为单个核细胞层。用滴管或毛细吸管插入此层，沿管壁周缘吸取此界面层细胞，将其放入装有Hank's液或PBS液中的试管中，充分摇匀，用200×g，离心5~10分钟后，去上清液。再向试管内加入Hank's液或PBS液，摇匀。这样反复将细胞洗2~3次，然后根据需要，调整细胞悬液的浓度，一般为 1×10^6 个细胞/ml。

B. 细胞悬液涂片和保存：细胞悬液涂片是IGSS中重要一环，涂片好坏影响IGSS的结果，一般要求涂片上的细胞在镜下观察要均匀分布，不成堆，不重叠，细胞展开好，并要求细胞形态完整。

电动离心涂片机涂片法：

- ① 取特制离心管，将有圆孔的滤纸对准紧贴在离心管下侧的圆孔中，用小量的PBS液湿孔边的滤纸，并压一张洁净的玻片。
- ② 左手轻压钢片夹，右手将离心管连同玻片一起插入槽内。
- ③ 取洗涤好的细胞悬液(1×10^6 /ml)3滴，滴入离心管底部。
- ④ 将离心机的速度调到2的刻度(相当于500转/分)，时间定在2分钟。
- ⑤ 先开电源开关，再开定时开关，离心机转动到时自动停下。
- ⑥ 同样用左手压钢片夹，右手将离心管连同玻片取出。
- ⑦ 取出的玻片可见象离心管大小的圆形细胞涂片，立即用吹风机吹干，固定染色或用塑料薄膜包裹好置-20℃以下低温保存备用。

人工涂片法：

- ① 将洗涤好的细胞悬液调整浓度为 1×10^6 /ml。
- ② 用吸样器头或毛细管吸取细胞悬液，由里向外将细胞以圆形均匀地将细胞涂在玻片上，立即吹干防止细胞缩少变形。
- ③ 根据实验要求进行固定，一般用95%乙醇或丙酮在-20℃固定30分钟即可，不固定的标本待彻底干燥后用塑料薄膜包好置-20℃以下保存备用。

(2) 抗原与抗体反应

A. 取新鲜的细胞涂片或-20℃保存的涂片(-20℃保存的涂片取出后必须恢复至室温)，用95%乙醇固定30分钟。

B. 固定后的涂片用含5%小牛血清，含0.02%NaN₃的0.01mol/L pH7.2 PBS缓冲液洗一次。

C. 将血膜周围的液体擦干，滴加20μl第一抗体在血膜上，在室温下放30分钟。

D. 用上述PBS缓冲液洗3次后，加胶体金标记的羊抗鼠IgG稀释液10μl，室温下30分钟。

E. 再用同样PBS液洗2~3次后，用自来水流水缓慢冲洗，用蒸馏水再洗一次，最后用无离子水洗一次。

(3) 银显影操作步骤 将上述已与第一抗体和第二抗体反应的标本，经无离子水漂洗后，放入硝酸银显影液中(避光)，一般反应时间为20~30分钟，在此期间最好摇动

几次。

(4) 瑞氏染液复染 瑞氏染色法是一种常用的染色法，染色效果较稳定，方法如下：

A. 用蜡笔圈好血膜。

B. 将玻片水平放置，加瑞氏染液数滴覆盖全部血膜（如染液不可太多，亦不可太少，太多易外流，太少易干）待1~2分钟后加双倍于染色液的缓冲液或蒸馏水。轻轻摇动玻片，或用口吹气使染液混匀。

C. 染色15~20分钟（染色时间长短与染料性质、室温及细胞多少有关，夏天可短些，冬天可长些）后用自来水冲片，在冲片开始时要平持玻片，使水自玻片边缘流出，沉淀从液面流出，切勿先将染液倾去以免沉淀物附于血片上，涂片冲洗后，斜立在空气中自然凉干或吹干。备检查观察。在显微镜下染色好的片子，红细胞呈粉红色，白细胞核山染色质多少而异，显深浅不同的紫蓝色。中性颗粒呈浅紫红色，嗜酸性颗粒呈鲜红色。嗜碱细胞呈暗紫蓝色。淋巴细胞呈浅蓝色，单核细胞呈淡灰蓝色。

(5) 阳性细胞的判断标准

A. 细胞周围有棕黑色（或黑褐色）的颗粒或核上也有少量的黑褐色的颗粒者为阳性细胞。

B. 细胞周围无棕黑色颗粒为阴性细胞。

C. 如果细胞外周核有散在的少量颗粒，及细胞空隙间或无细胞区也有少量黑色颗粒，这可能是由于片子冲洗不干净或显影过深之故，这些仍为阴性细胞。

(二) 在免疫组织化学中的应用

1. 原理 目前认为免疫金银染色法是免疫组织化学中最敏感方法之一，以特异性第一抗体与相应待测抗原反应，再标记胶体金的第二抗体显色以银显影加强显色效果，使其可在光镜水平上进行观察，可用于石蜡切片、冰冻切片、细胞涂片或甩片。而切片染色结果可以长期保存。

2. 操作步骤

(1) 石蜡切片，按常规脱蜡；

(2) 经含汞固定液的组织，用芦戈氏碘液或0.5%的碘酒，10分钟脱水，再用0.5%硫代硫酸钠水溶液脱碘后，水洗；

(3) 对于含弱抗原组织，经0.1%胰蛋白酶或胃蛋白酶消化，使抗原充分暴露；

(4) 蒸馏水洗10分钟；

(5) 用正常羊血清或马血清封闭，20分钟。如用SPA-金作为第二抗体，可用3% BSA或1%卵蛋白进行封闭；

(6) 加适当稀释的特异性第一抗体室温或37℃2小时或4℃过夜；

(7) 将4℃过夜的切片置室温半小时复温，以0.001mol/L PBS pH7.4 (1% Triton X-100) 漂洗3次，5分钟/次（含0.1% BSA+0.05% Triton X-100）；

(8) 加适当稀释的第二抗体室温孵育一小时；

(9) 0.01mol/L PBS (1% Triton X-100) pH7.2~7.4漂洗3次，每次5分钟，蒸馏水漂洗一次，5分钟，去离子水漂洗2次，每次5分钟；

(10) 银显影，20~26℃避光8~15分钟；

- (11) 蒸馏水洗，自来水冲洗；
- (12) 苏木素衬染 10 秒钟，自来水漂洗；
- (13) 乙醇脱水，二甲苯透明、封片、镜下观察，阳性部位为黑褐色。

本实验室应用 IGSS 成功地测定人肝脏碱性谷胱甘肽 S-转移酶在肝癌组织中和胎盘性谷胱甘肽 S-转移酶在肺癌组织中的分布和定位。

同时免疫金银染色法也可与免疫酶技术作光镜水平的双重标记。

六、微孔滤膜免疫金银染色法的应用

(一) 胶体金探针生物活性的鉴定

胶体金探针除用透射电镜和分光光度计测定其粒径大小，还需测定其活性，一般用滤纸膜或硝酸纤维纸膜免疫细胞化学染色鉴定其活性。我们建立的微孔滤膜免疫金银染色法可进行胶体金探针活性测定。其灵敏度比上述两种方法高，阴阳性结果易辨，阳性结果所显示的灰黑色圆斑点界限清楚，无扩散现象，背景染色不明显，分辨力高。

1. 试剂和器材

- (1) 微孔滤膜 ($0.45\mu\text{m}$) 购自北京化工学校；
- (2) 正常人 IgG，羊抗人 IgG 和羊抗鼠 IgG 本实验室按常规法，用 DEAE-Sephadex A-50 提取；小鼠丙球用硫酸铵沉淀法得到。

胶体金探针：胶体金标记羊抗人 IgG (SAHG) 胶体金标记羊抗鼠 IgG (SAMG) 和胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白 (SPA-G)，根据 Wang 等^[4] 报道的方法制备。

2. 操作步骤

- (1) 剪膜及预处理：根据需要将微孔滤膜剪成一定大小，并用软铅笔划成 $1\times 1\text{cm}$ 小格，放在无离子水中浸泡 5~10 分钟，取出用滤纸吸干。
- (2) 点样：将不同稀释度 (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) 的抗原(如正常人 IgG，或小鼠丙球) 按由稀到浓的梯度，滴加在微孔滤膜的小格中央，每格 $2\mu\text{l}$ 。以抗原稀释液为阴性，对照也点 3 个格 ($2\mu\text{l}/\text{格}$)。在 37°C 温箱内放一小时。取出后用 0.05mol/L TBS pH7.4 (含 1% Triton X-100) 洗 2 次，再用 pH8.2 0.02mol/L TBS 含 (0.5% Tween-20 和 0.5% 明胶) 洗一次。
- (3) 去除非特异性物质：将上述滤膜用滤纸吸干后，加 pH8.2 Quench 液 (pH8.2, 0.2mol/L TBS , 0.5% Tween-20, 0.5% 明胶和 10% 马血清) 室温放置 20 分钟。
- (4) 与胶体金探针反应：将上述滤膜用滤纸吸干后，分别与不同浓度 (1:10, 1:20, 1:40) 的 SAHG, SAMG 或 SPA-G，室温下反应 2 小时，然后用 pH8.2, 0.02mol/L TBS 洗 3 次，pH7.40, 0.05MTBS 洗 3 次，并用蒸馏水和双蒸水再继续漂洗 2 次。
- (5) 银显影和定影：将上述滤膜放入银显影液中 (银显影液配制见附录) 25 分钟，取出后用蒸馏水和自来水洗，然后将其放入定影液中一分钟，取出用自来水洗，空气干燥。

实验结果表明，在微孔滤膜上进行免疫金银染色，阴性对照不显色，与白色的膜背景差别极小与阳性结果却成明显对照。此外，抗原—抗体反应在载体上呈现灰黑色圆形

斑点，边界清晰，着色较深（与Whatman 1号滤纸为载体相比）并随抗原和抗体稀释度的变化，所显示阳性结果着色也由深变浅。说明MF-IGSSA不仅可用于鉴定胶体金探针的生物活性，而且也可高效率地检测样品。

（二）测定抗原的量

MF-IGSSA检测纯化抗原，有直接法和夹心法两类。直接法测抗原是将待测抗原直接点在预处理的微孔滤膜上，加胶体金标记的抗体，然后进行银染色，夹心法测抗原是将合适稀释度的抗体点在微孔滤膜上；加待测抗原，孵育后，再加工作浓度胶体金探针，最后进行银染色。我们曾在微孔滤膜上做了免疫金银染色直接法和夹心法测抗原，也做了ELISA（即点免疫试验），结果表明MF-IGSSA直接法测抗原最低可检出7.8ng/点，夹心法最低可检出3ng/点，其灵敏度比在同一种载体上做的ELISA高2~4倍。并有较好的特异性和重复性。

（三）测定人血清IgG含量

IgG是血清中主要的免疫球蛋白成分。当机体产生感染或患有某些疾病时，血清中IgG的数量将出现异常。目前临幊上大多利用双向扩散试验测定其含量，但此法误差较大，重复性较差。因此选取一个稳定而简便的IgG检测方法，供临幊检验应用是有意义的。

用MF-IGSSA直接法和夹心法两种方法测定正常人血清IgG，前者最大血清稀释度为1:10⁴，后者（夹心法）可达1:10⁷。在同一固相载体上用ELISA夹心法测定同一份血清，最大稀释度为1:10⁷呈阳性反应。直接为1:10⁵，用40孔酶联极的传统ELISA夹心法测定该血清IgG为1:10⁶，与Pruslin等1986年的报道一致，表5-3列入两种方法测定正常人IgG的结果。

表 5-3 MF-IGSSA法和ELISA法测定人血清IgG的比较(夹心法)

测定方法	载体	测定结果(最大稀释度)
ELISA	酶联用塑料40孔板	1:10 ⁴
	微孔滤膜	1:10 ⁶ ~1:10 ⁷
MF-IGSSA	微孔滤膜	1:10 ⁷

从表5-3可知微孔滤膜免疫金银染色法的灵敏度最高，可达1:10⁷。

【附录】几种缓冲液的配制

① 包被液 (0.05mol/L, pH9.6 碳酸盐缓冲液)

Na₂CO₃ 1.60 g
NaHCO₃ 2.90 g
双蒸水 1000ml

② 0.05mol/L pH7.4 TBS (含1% Triton X-100)

Tris. 21.10 g
NaCl 17.50 g

双蒸水	1500ml
Triton X-100	20ml
③ 0.02mol/L TBS pH8.2	
Tris.	4.84 g
NaCl	17.5 g
双蒸水	1500ml

磁力搅拌下滴加浓HCl使pH至7.4，再加蒸馏水至2000ml。若配制含0.5%Tween-20及0.5%明胶的上述溶液时：取5g白明胶加800ml 0.02mol/L pH8.2TBS加热溶解后，放冷，加入5ml Tween-20，加pH8.2 0.02mol/L TBS母液至1000ml。

④ 0.05mol/L, pH7.4 TBS缓冲液(Quench液) 取1ml小牛血清，加0.05mol/L, pH7.4 TBS(含1% Triton X-100) 19ml，即可配成。

⑤ 0.02mol/L, pH8.2TBS缓冲液(Quench液) 取2ml马血清，加0.02mol/L, pH8.2 TBS(含0.5% Tween-20, 0.5%明胶) 18ml即可配成。

⑥ 柠檬酸缓冲液(pH3.5)

柠檬酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	25.5 g
柠檬酸三钠 ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	23.5 g
双蒸水	100ml

溶解后即可用。

⑦ 0.01mol/L, pH7.2 磷酸盐缓冲液(贮存液)

NaCl	100 g
KCl	2.5 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	36.3 g
KH_2PO_4	2.5 g
加双蒸水至	1000ml

临用时稀释10倍，并加0.02% NaN_3 。

⑧ 硝酸银显影液的配制

1%明胶	10ml
双蒸水	15ml
柠檬酸冲液	5ml
1%对苯二酚	15ml(临用配)

上述溶液混合后，临用时加10%硝酸钠溶液0.05ml，混匀后即可。

参 考 文 献

1. Danscher G, Histochemistry 1981; 71:81.
2. Holgate CS and Jackson P, J Histochem Cytochem 1983; 31:938.
3. De Waele M, Haematological electron immunocytochemistry, Detection of cell surface antigens with monoclonal antibodies, In, JM Polak and JM Varndelli (Eds). Immunolabelling for electron microscopy, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984; p. 267-288,

4. Wang BL, et al. Histochemistry 1985; 83:109.
5. 卢秀桂, 李春海等. 军事医学科学院刊 1988; 12:135.
6. 李春海等. 中华血液学杂志 1988; 6:746.
7. De Waele M and De Mey J. Histochem Cytochem 1986; 34:935.

第六章 蛋白质及多肽的放射性同位素标记

孙曼霏 梁雄麒

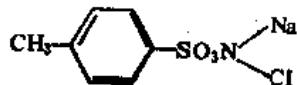
(军事医学科学院毒物药物研究所)

在生命科学中常常需要用放射性同位素标记蛋白质及多肽分子以达到识别或追踪的目的。在实验室研究中多采用在完整的蛋白质或多肽分子的适宜基团上连接放射性同位素的方法。此法可用于多种生物材料的标记,如单克隆抗体、酶、受体、肽类激素、活性肽及其它蛋白质,甚至血球、细胞及生物膜等材料。应用最多的核素是放射性碘(^{125}I 及 ^{131}I)和氚。由于标记技术的日趋完善及测量仪器的不断更新,蛋白质及多肽的放射性标记已经可以在实验室里方便地进行了。

一、放射性碘标记

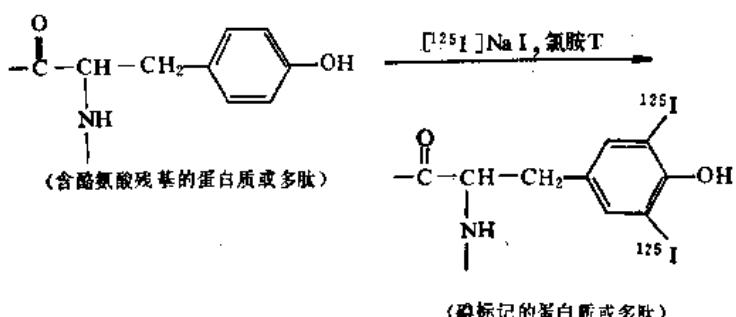
(一) 化学氧化法

1. 氯胺T法 氯胺T是氯代酰胺类氧化剂,在水中不稳定,产生的氯离子将放射性碘离子($^*{\text{I}}^-$)氧化成放射性单质碘($^*{\text{I}_2}$)。单质碘与蛋白质或多肽中苯丙氨酸及酪氨酸残基的苯环或组氨酸残基的咪唑环共价相连,使蛋白质或多肽发生碘化反应。

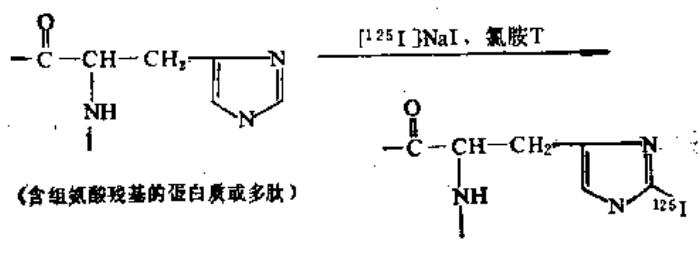


氯胺 T

残基的苯环或组氨酸残基的咪唑环共价相连,使蛋白质或多肽发生碘化反应。



(碘标记的蛋白质或多肽)



(碘标记的蛋白质或多肽)

此法标记率高^[1,2]，可在室温中进行。标记时，依次加入蛋白质或多肽溶液、放射性碘溶液及氯胺T。反应数秒至数分钟后，加入偏重亚硫酸钠终止反应，而后将游离的放射性碘除去。实验条件对标记率影响很大，氯胺T用量过少时标记率低，过高又可能损害蛋白质或多肽的生物活性^[3]。

下面举一个眼镜蛇神经毒素放射性碘标记的例子：取50μl (3.8mg/ml) α-神经毒素于小反应瓶中，加[¹²⁵I]NaI溶液(2~3mCi)。磁力搅拌混匀后，加50μl 氯胺T溶液(10mg/ml，新鲜配制)，反应1分钟后，加50μl 偏重亚硫酸钠溶液(30mg/ml)终止反应。再加1~2滴10%的KI溶液，若无黄色显现，表明反应终止完全。取Sephadex G-10柱(1.2×16cm)用0.14mol/L NaCl-0.05mol/L磷酸缓冲液(pH7.5)平衡。先通过0.2ml牛血清白蛋白溶液(10mg/ml)以封闭凝胶可能与蛋白质产生吸附的活性部位。而后加标记样品反应液，并用缓冲液洗脱。分段收集，每管1ml。碘标记α-神经毒素(峰1)与游离放射性碘试剂等小分子物质(峰2)清晰地分离(图6-1)。

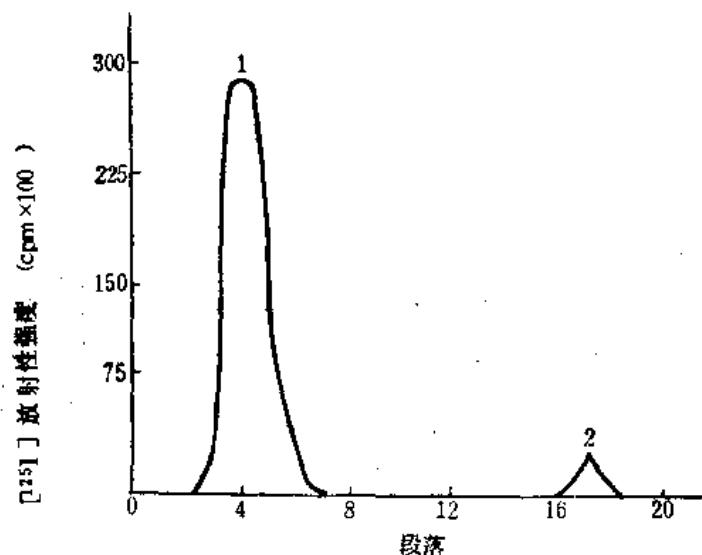
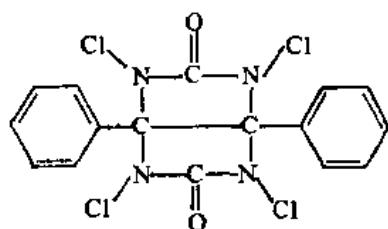


图 6-1 眼镜蛇神经毒素的放射性碘标记

2. Iodogen法 Iodogen(1,3,4,6-四氯-3α,6α-二苯基脲)也是氯代酰胺类氧化剂，不溶于水，反应温和。操作简便，标记效率高，对蛋白质及多肽的损伤小。是一种理想的固相碘化试剂。



Iodogen

1) 涂布试管：将0.02% Todogen的二氯甲烷或氯仿溶液100μl加至玻璃或塑料反应管底部。用空气流吹干，使Iodogen在管底形成薄膜，而后存放在-20℃的干燥器中，可长期保存。

2) 缓冲系统：缓冲液的选择主要依蛋白质或多肽的性质及需要而定。以能最大限度地保护蛋白质或多肽的生物活性为原则。

3) 碘标记反应：先用少许选定的缓冲液洗涤有 Iodogen 涂布的反应管数次，洗出未粘附在管壁上的试剂。将蛋白质或多肽溶液及 [^{125}I] NaI 溶液加入反应管中，在室温或水浴中反应 5~30 分钟。不时摇动或用磁力搅拌。倾出反应液，碘化反应即可终止。而后同上用凝胶过滤法除去游离的 [^{125}I] NaI，即获放射性碘标记的蛋白质或多肽。

下面举一个用 Iodogen 固相试剂标记牛血清白蛋白 (BSA) 的例子，说明反应条件的选择。

表 6-1 实验设计

Iodogen (μg)	0.3M PB (pH7.4) (μl)	1% BSA (μl)	70 μCi [^{125}I] NaI (μl)	取反应液 (μl)	人血清 (μl)	10% KI (μl)	0.05M PB pH7.4 (μl)	20% TCA (μl)
0	20	2	1 室温 反应	10	20	200	300	500
3	20	2	1 10~30 分钟	10	20	200	300	500
6	20	2	1 分钟	10	20	200	300	500
9	20	2	1 倾出 反应液	10	20	200	300	500
12	20	2	1	10	20	200	300	500

测量总放射性强度及经 3000rpm 5 分钟离心所得沉淀的放射性强度。计算标记率：

$$\text{标记率} (\%) = \frac{\text{沉淀的放射性计数}}{\text{总放射性计数}} \times 100\%$$

表 6-2 实验结果

Iodogen (μg)	反应不同时间后的标记率 (%)			
	10	15	20	30 分钟
3	83	87	91	89
6	83	85	84	92
9	82	82	86	97
12	91	86	93	93

从表 6-2 实验结果可以看出。20 μg 牛血清白蛋白用 3 μg Iodogen 及 70 μCi [^{125}I]NaI 在室温反应 30 分钟，放射性碘标记率高达 90%。

每种蛋白质或多肽的标记率可能不一样，可参照上述条件设计类似实验，求得最高标记率。但若所用蛋白质或多肽为活性物质，则还要测量其标记后的生物活性，而后权衡利害，选择标记率尽可能高，保留生物活性又尽可能多的最佳标记条件。

化学氧化法中除氯胺 T 法和 Iodogen 法外，还有氯气法^[4]、次氯酸钠法^[5]及溴代琥珀酰亚胺法^[6]，但都不如上述方法方便。

(二) 酶促氧化法

酶促氧化法的原理是利用过氧化物酶的催化作用，在有过氧化氢存在的条件下，使

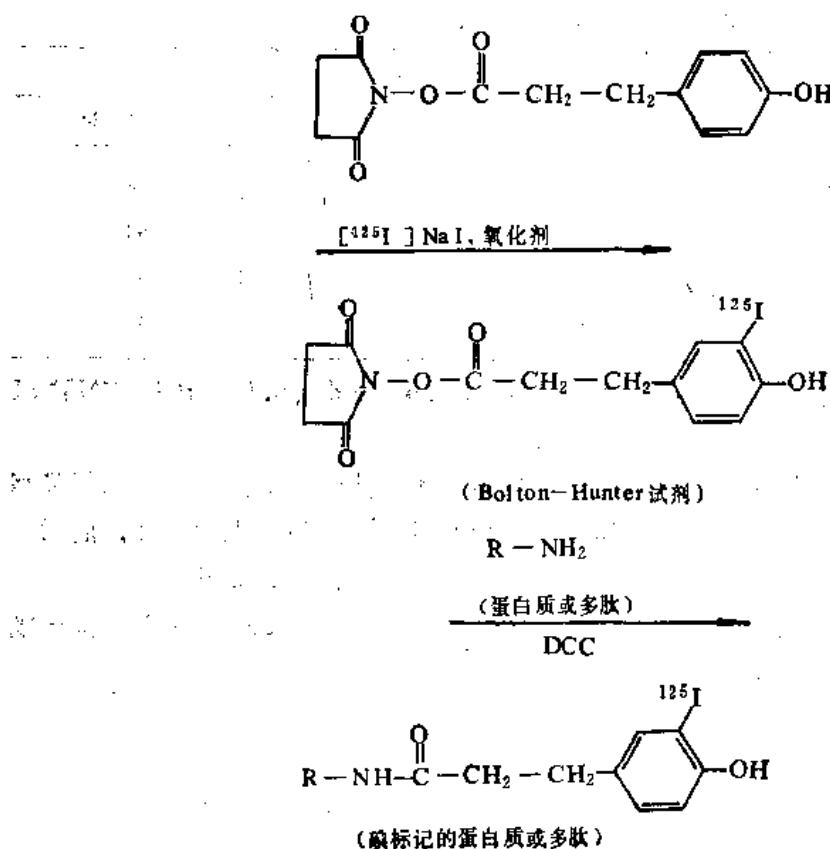
放射性标记的碘试剂与蛋白质或多肽发生碘化反应。反应条件温和，可在室温中 pH 4~8.5 范围内进行。标记实验时，依次加入缓冲液，放射性碘化物溶液、欲标记的蛋白质或多肽、乳过氧化物酶及过氧化氢，反应中每分钟加一次过氧化氢，反应 5 分钟后以缓冲液稀释或加叠氮化钠、半胱氨酸终止反应。再同上用凝胶柱去除游离的放射性碘化物及其他小分子物质^[2,7]。此法的缺点是标记蛋白质溶液中引入了另一种蛋白质乳过氧化物酶，此酶本身也可能发生碘化反应。

（三）间接氧化法

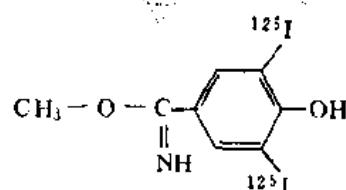
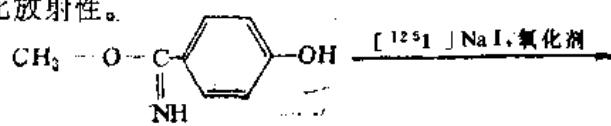
上述直接氧化法中氧化剂的氧化作用可能损伤蛋白质或多肽中的蛋氨酸和色氨酸残基及半胱氨酸残基间的二硫键，导致结构改变或丧失生物活性。因此提出间接标记法，即先用放射性碘标记一个预先选好的带有可与蛋白质或多肽交联的活性基团的小分子上，而后将之与蛋白质或多肽交联。此法适用于那些对氧化敏感的蛋白质或多肽，缺点是添加基团可能改变被标记蛋白质或多肽的某些性质。

1. Bolton-Hunter 试剂 $[^{125}\text{I}]$ 或 $[^{131}\text{I}]3-(4\text{-羟基}-5\text{-碘代苯})$ 丙酸琥珀酰亚胺酯即 Bolton-Hunter 试剂。是依氧化法用放射性碘标记 3-(4-羟基苯) 丙酸琥珀酰亚胺酯制得。Bolton-Hunter 试剂在温和条件下（如 0℃, pH 8.5）即可与蛋白质或多肽的氨基交联^[8]。

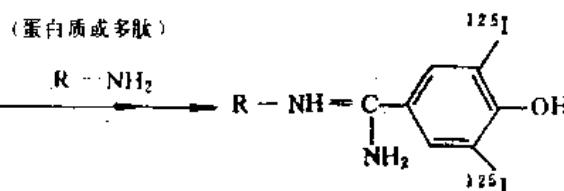
实验时取 $[^{125}\text{I}]$ Bolton-Hunter 试剂的苯-0.2% 二甲基甲酰胺溶液 0.2mCi 于试管中，用气流吹干之。加 100μl 蛋白质 (0.5mg/ml)。在室温反应 15 分钟，不时摇动。再加 100μl 甘氨酸 (1mg/ml) 继续保温 30 分钟。反应毕。以 Sephadex G-25 柱 (1.5×30cm) 层析分离。



2. 3, 5-二碘-4-羟基苯甲亚氨基碘酸甲酯试剂 此碘标记试剂可与蛋白质或多肽的氨基交联^[9], 获很高的比放射性。

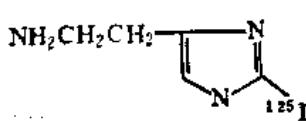
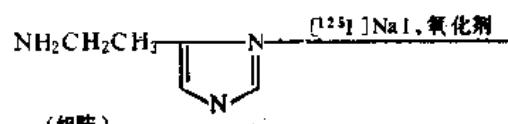


(碘标记 3, 5-二碘-4-羟基
苯甲亚氨基碘酸-甲酯试剂)

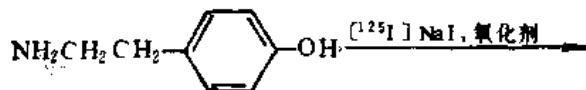


(碘标记的蛋白质或多肽)

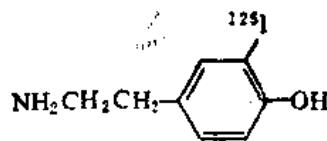
3. 组胺及酪胺试剂 先依氧化法用^{[125]I}或^{[131]I} NaI 标记组胺或酪胺制成试剂。蛋白质或多肽的羧基经混合酸酐法活化后与试剂反应^[10]。



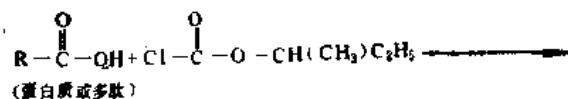
(碘标记的组胺试剂)



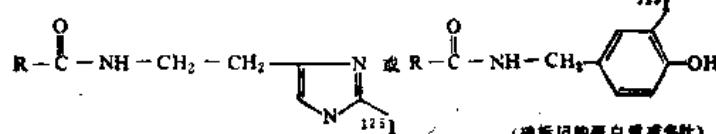
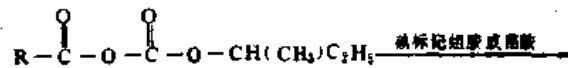
(酪胺)



(碘标记酪胺试剂)

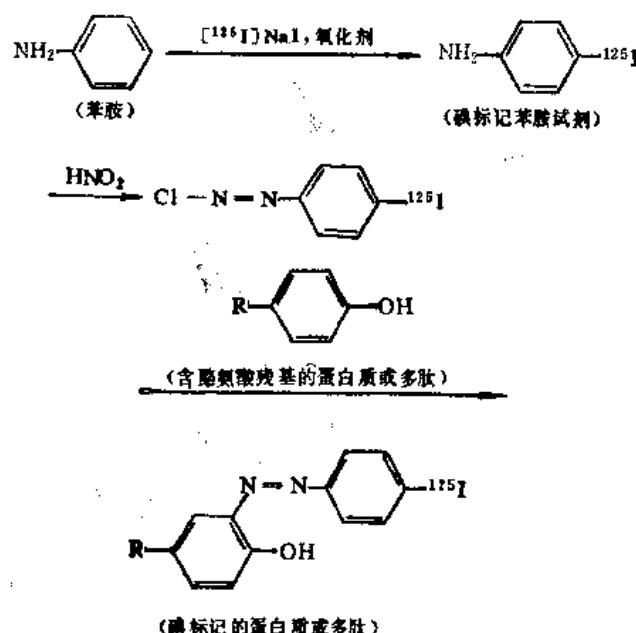


(蛋白质或多肽)

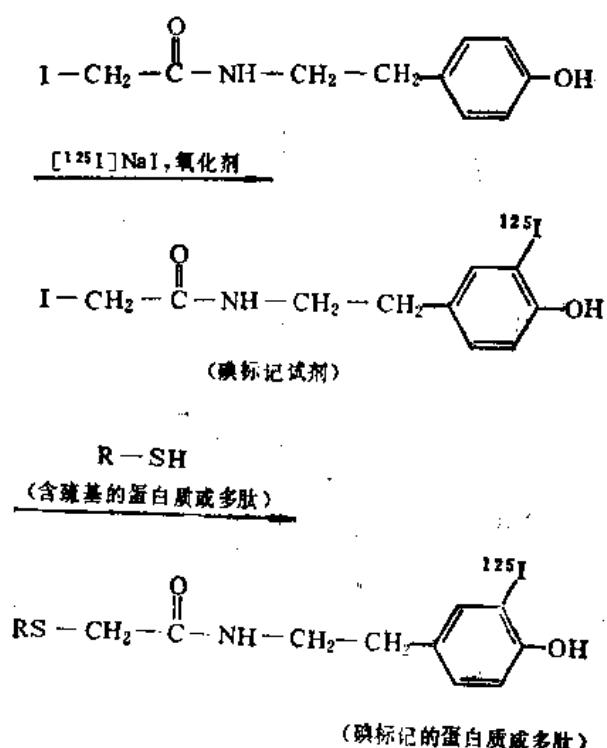


(碘标记的蛋白质或多肽)

4. 芳胺试剂 依氧化法用 $[^{125}\text{I}]$ 或 $[^{131}\text{I}] \text{NaI}$ 标记苯胺制成试剂。试剂经重氮化反应后再与蛋白质或多肽反应。偶联在酪氨酸酚羟基的邻位上^[11]。



5. N-[2-(3-碘-4-羟基苯)乙基]-2-碘乙酰胺试剂 依氧化法用 $[^{125}\text{I}]$ 或 $[^{131}\text{I}] \text{NaI}$ 标记 N-[2-(4-羟基苯)乙基]-2-碘乙酰胺制试剂^[12]。试剂可通过形成二硫键与蛋白质或多肽中的半胱氨酸残基偶联。



二、放射性氟标记

虽然放射性碘标记蛋白质或多肽已取得很大成功，并曾广泛应用于实验室及临床研

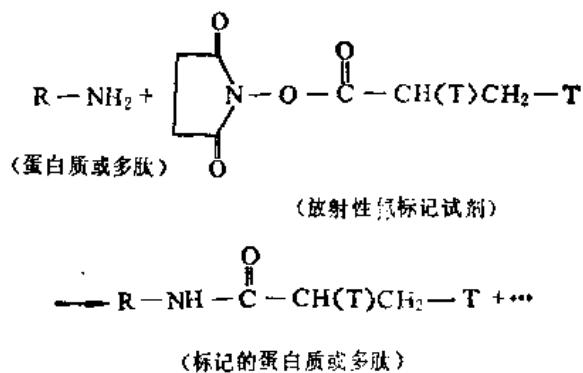
究，但放射性碘也带有一些严重的缺点：① ^{125}I 发射 γ 射线 (0.035 meV)， ^{131}I 不仅发射硬 β 射线 (0.608 meV) 而且也有 γ 射线 (0.36 meV)。均需在专门隔离的实验室内进行操作。放射性碘对人体可能产生的损伤显然高于放射性氟 (软 β 射线 0.0185 meV)。氟示踪实验甚至可在一般实验室内进行。② 放射性碘半衰期短 (^{131}I , 8.04 天; ^{125}I , 60 天)。因而需要经常地分批地标记以满足延续开展的示踪实验。放射性氟半衰期长 (12.26 年)，一次标记后可长期使用。③ ^{125}I 及 ^{131}I 的物理半衰期虽然比氟短，但其生物半衰期比氟长，属中等毒性放射性同位素；氟的物理半衰期长而生物半衰期短，比较安全。属低毒性放射性同位素。基于上述原因，以及氟标记技术和液体闪烁测量软 β 射线技术的发展，氟标记化合物愈来愈多地被采用于示踪试验。

(一) 微波激活法

微波激活法是 60 年代发展起来的氟标记技术。其反应原理是氟分子在微波催化下，部分地被激发成热氟原子 (T) 及激发分子 (T_2)。热氟原子是主要的氟化试剂，可和蛋白质、多肽、氨基酸或药物等分子中的苯环、咪唑环、羧基及羧基 α 位等活泼位置上的氢原子进行交换，其它位置的氢也可进行不同程度的交换。标记时先将样品吸附于微波反应膜上，而后将膜放入微波反应瓶中。抽真空后，通入氟气 (氟压 0.67 kPa)，置微波发生器中用微波激发 1~5 分钟反应即可完成^[13]。微波激发产生的 T 等离子体寿命较短，故样品距放电中心愈近，标记效率愈高。一般置于距放电中心 4 cm 内可获较高的氟化效率^[14]。微波氟化法的缺点是标记产物的比放射性不会太高。

(二) 琥珀酰亚胺丙酸酯法

1981 年 Dolly 等^[15]报道用 N -琥珀酰亚胺 [2,3- ^3H] 丙酸酯标记银环蛇毒素成功。此试剂带有放射性氟及能与蛋白质或多肽的游离氨基反应的活泼酯基。反应时把带有氟的丙酰基引入蛋白质或多肽分子中，是一种非常有效的放射性氟标记试剂。



下面举一个羊抗小鼠 IgG 放射性氟标记的例子^[16]。 N -琥珀酰亚胺 (2,3- ^3H) 丙酸酯的无水甲苯或甲醇溶液安瓿 (1 mg/ml，比放射性 14.2 Ci/mmol，纯度 >98%)，实验时取 24 μl 于试管中，以空气流吹之使干。加羊抗鼠 IgG 的 1/15 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 溶液 (蛋白浓度 1.85 mg/ml) 5 ml，在室温中翻转混合 2 小时后，加到缓冲液平衡的 Sephadex G-25 柱 (1.5 × 28 cm) 上，并用缓冲液洗脱。紫外监测，分段收集，每管 2 ml。而后逐管测量蛋白浓度及放射性强度。如图 6-2 所示，得到两个放射性峰，第 1 峰与蛋白质峰

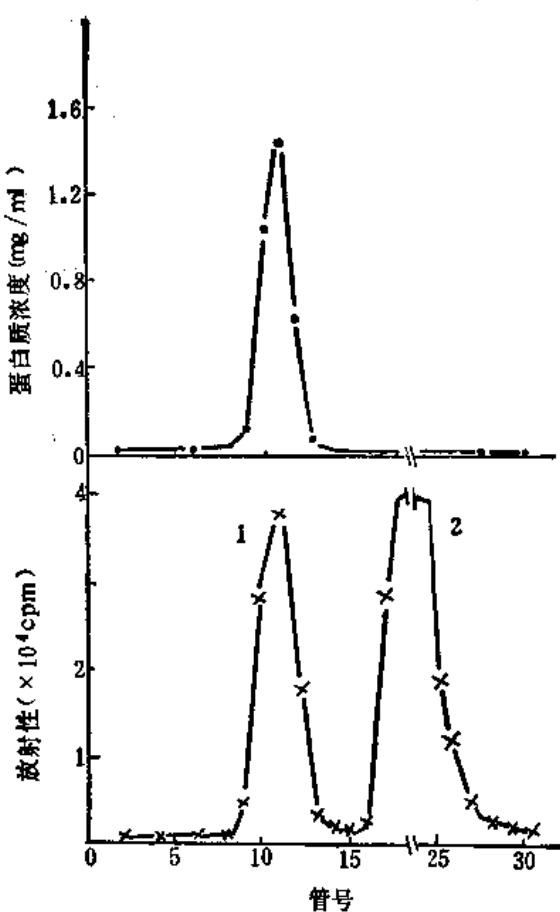


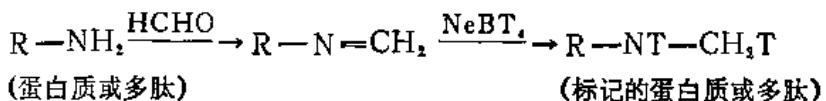
图 6-2 氟标记羊抗小鼠 IgG 的 Sephadex G-25 柱层析

重叠良好，第 1 峰与第 2 峰分离清楚，表明羊抗鼠 IgG 已被氟标记，并与游离的放射性标记试剂分离。

此法还成功地用于乙酰胆碱酯酶^[16]、过氧化氢酶^[18]及眼镜蛇毒突触后神经毒素^[17]的放射性氟标记。

(三) 硼氢化钠法

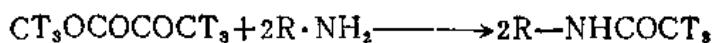
蛋白质或多肽与甲醛可生成席夫碱，氟标记的硼氢化钠试剂使之还原生成氟标记的蛋白质或多肽。



实验时取 0.5ml 甲醛(3.7%)，加 1ml 蛋白质或多肽(10mg/ml)，再加 [³H]NaBH₄，混匀后在 4℃ 反应 30 分钟。而后上 Sephadex G-25 柱 (1.5×25cm)，缓冲液洗脱并收集如前。

(四) 乙酸酐法

[³H] 乙酸酐可用于氟标记实验，使蛋白质或多肽的游离氨基乙酰化，其反应式如下：



(氚标记乙酸酐) (蛋白质或多肽) (标记的蛋白质或多肽)

实验时取 0.5ml 蛋白质或多肽 (1% 缓冲液溶液), 加 25mCi (³H) 乙酸酐, 室温中反应 2 小时, 上 Sephadex G-25 柱 (1.5×25cm), 用 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2) 洗脱, 分段收集如前。

三、标记蛋白质或多肽的分离

放射性碘或放射性氚标记蛋白质或多肽反应完成后, 如上述诸例中所述, 还需进行标记样品的分离工作, 以除去未反应的放射性标记试剂及其它试剂和产物。一般说来, 生化实验常用方法都可用来进行这种分离, 如电泳、沉淀、离子交换层析、高压液相层析、超速离心等, 但最方便的是凝胶过滤、透析及超滤。

(一) 凝胶过滤法

凝胶是具有微孔的亲水性多聚物颗粒, 如葡聚糖凝胶。微孔有多种规格, 去除小分子物质选用孔径小的凝胶, 常用的是 Sephadex G-10、G-15、G-25。经膨化装柱后, 以选用的缓冲液平衡凝胶柱并洗脱样品。当蛋白质或多肽溶液通过凝胶柱时, 由于其分子大, 不能进入胶孔内, 先从柱内流出, 而放射性标记试剂等小分子物质由于能进入胶孔被滞留在后面, 达到了被去除的目的。柱大小视样品量而定, 一般柱床容积要大于样品容积 10 倍。洗脱时分段收集, 每管 1~2ml, 而后逐管测量放射性强度及蛋白质或多肽浓度。洗脱过程中若用 280nm 监测, 则可自动绘出蛋白质及多肽 (含芳香族氨基酸) 浓度曲线。对有活性的蛋白质及多肽还需测量其生物活性。放射性峰、蛋白质或多肽峰及生物活性峰相重叠的第 1 个洗脱峰, 即所需的标记蛋白质或多肽。

(二) 透析法

半透膜有一定大小的微孔, 可阻挡蛋白质或多肽大分子而让小分子或离子通过, 故适用于将同位素标记蛋白质或多肽与游离标记试剂等小分子物质分离的目的。一般采用透析袋, 也可用玻璃纸扎成袋状代替之。其截留分子量约 11000 道尔顿, 故小肽不宜用此法。透析时, 把标记反应液置入袋内, 浸入蒸馏水或所选用的缓冲液中, 在 0℃ 透析。加电磁搅拌可加快透析速度。小量多次换液, 至透析外液中的放射性强度达到本底值时止, 一般需 24 小时以上。透析袋中可放一小玻璃珠或留一小气泡便于不时翻转混匀袋中液。蛋白质或多肽溶液较透析外液渗透压大, 在透析过程中水将进入袋中, 不可避免地造成程度不同的稀释, 故空泡不可留得太大, 以免样品过于稀释。

透析袋使用前有几种处理方法, 可依实验要求选择之: ① 在蒸馏水中洗净; ② 先浸入 0.01mol/L 盐酸或 1mmol/L EDTA 溶液中数小时, 再用蒸馏水洗净; ③ 先用 50% 乙醇浸泡 2 小时, 分别再在 10mmol/L NaHCO₃ 及 1mmol/L EDTA 溶液中各浸 1 小时, 最后用蒸馏水洗净。

透析袋可反复使用, 洗净后置入 50% 甘油中, 加 0.02% NaN₃ 或数滴氯仿防腐, 在 0~4℃ 保存。

透析完毕，往往需要浓缩。简便的方法是将透析袋悬挂在0~4℃冰箱中，使水分穿过半透膜自然蒸发。若悬在抽滤瓶或小干燥器中，抽成负压，则可加快浓缩过程。

(三) 超滤法

超滤膜是一种小分子物质能通过而大分子蛋白质不能通过的多孔滤膜。根据样品多少选用不同大小的超滤器。在样品侧加压，或在滤液侧减压条件下超滤。每次超滤不要使样品全干，而后往滤器中加入所选用的溶剂使蛋白质溶解，再次超滤，如此反复5次以上至滤液的放射性为本底值时止，达到除净游离的放射性物质及其它小分子的目的。

四、标记蛋白质或多肽的保存^[18]

同位素标记的蛋白质或多肽自然仍具有原来蛋白质或多肽的性质，所以首先要依照其原有性质选用保护蛋白质及多肽的适宜方法保存。其次要考虑放射性带来的特殊问题。放射性同位素发出的射线可对标记化合物自身产生电离辐射分解作用，称做辐射自分解效应。 γ 射线及硬 β 射线的能量大射程长，标记化合物吸收的能量小。而软 β 射线(如 ^3H)的能量小射程短(在水中的最大射程仅5μm)，则可被标记化合物自身大量地甚至几乎是全部地吸收。故氟标记蛋白质及多肽的辐射自分解效应特别值得注意。

辐射自分解效应有三种：① 衰变分解：标记蛋白质或多肽中的放射性同位素因物理衰变而引起的变化。这种效应是无法控制的；② 射线分解：标记蛋白质或多肽中放射性同位素发出的射线直接作用在蛋白质或多肽分子上，引起化学键的断裂，产生带放射性的和不带放射性的裂解产物。比放射性愈高表明标记分子密度愈大，其分子间相互辐射的强度就愈烈，辐射自分解效应也愈严重；③ 次级分解：标记蛋白质或多肽发出的射线(尤其是 β 射线)作用在溶剂分子上，使之产生激活物质，如自由基等。这种自由基反过来又使标记蛋白质或多肽发生变化或裂解。这种分解效应危害最大，常使标记化合物变得严重不纯。标记化合物在不适宜的保存条件下久置就会发生这种现象。

防止和控制辐射自分解效应的方法是：① 降低比放射性：即依实验允许的最低比放射性用同种蛋白质或多肽稀释标记蛋白质或多肽；② 分散标记分子：实验有时要求高比放射性，不能采用降低比放射性的方法，则可加入乳糖、水、乙醇、10%血清、2mg/ml牛血清白蛋白、纸、纤维素粉、玻璃粉、苯、苯骈蒽等物质以起到分散和隔离标记分子的作用；③ 清除自由基：巯基乙醇、低浓度(1~3%)乙醇及苯甲醇是有效的自由基清除剂，能快速地与自由基反应，从而阻止自由基对标记蛋白质或多肽的作用；④ 冷却：低温环境不仅可减少蛋白质或多肽的变性、抑制细菌生长及蛋白水解酶的作用，也能大大减慢自由基的反应速率。但是，一般缓慢的冻结往往形成溶质在水晶中的浓集，反而增大了标记化合物的密度，增加了辐射分解的机率，故不可取。特别对氟标记化合物是这样。只有在-140℃以下温度中快速冷冻时，才能得到分散的均相状态。

碘标记蛋白质或多肽受日光照射后可产生游离碘，造成对蛋白质或多肽的继发损伤。避光保存可以减少这种化学作用。

参 考 文 献

1. McConahey PJ. Methods Enzymol 1980; 70:210.
2. 胡明. 国外医学, 放射医学分册 1986; 3:168.
3. Eckelman WC et al. Cancer Res 1980; 40:3036.
4. Butt WR. Clin Biochem Anal 1984; 14:19.
5. Redshaw MR and Lynch SS. J Endocrinol 1974; 60:527.
6. Reay P. Ann Clin Biochem 1982; 19:129.
7. 林祥通等. 核技术 1983; 1:28.
8. Roberts R et al. Clinica Chimica 1979; 83:141.
9. Praissman M et al. Anal Biochem 1981; 115:287.
10. Stanczyk F et al. J Steroid Biochem 1981; 14:53.
11. Hayes CE et al. Anal Biochem 1975; 67:580.
12. Wyeth P et al. 50th Int Conf Radiopharm Chem (Tokyo). Abstract 1981, p. 100.
13. 李德友等. 全国第三届放射性药物和标记化合物会议论文摘要, 1987.
14. 丁绍凤等. 同上 1987.
15. Dolly JO et al. Biochem J 1981; 193:913.
16. 张翰、刘昌玲、李凤珍、孙曼霁. 军事医学科学院院刊 1990; 14:138.
17. 王家蓓、孙曼霁. 军事医学科学院院刊 1992; 16:61.
18. 范国平等. 标记化合物 1979. 原子能出版社.

第七章 酶的固定化技术

洪孝庄 何云汉

(军事医学科学院毒物药物研究所)

目前，固定化技术主要用于或包括固定化酶和固定化细胞技术。当然，除此之外，可以说凡是需要通过物理或化学手段，将研究目的物结合于固相载体或生物大分子聚合物的过程或方法，皆可归属于固定化技术，象在亲和层析的亲和吸附剂的制备中，将配体(或称配基)结合在琼脂糖凝胶载体上的固相技术，以及在非均相(或固相)酶免疫分析(EIA)和固相放射免疫分析(RIA)中，对抗原或抗体的固相化(或称包被)，凡此等等，皆属固定化技术，只不过所使用的方法类型和难易程度不同罢了。在阅读本书前面几章时，可以发现，如果仅从化学角度来看，固定化技术基本上就是蛋白质连接技术，也可以说，固定化技术实质上就是蛋白质连接技术在不同领域的具体应用和扩展。所以，蛋白质连接技术可作为此类技术的总称。虽然，由于研究的具体对象不同，该技术在各个研究领域的实际应用各有其特点，但是，将固定化技术概括归属于蛋白质连接技术是可以认同的。更具体地说，也可将固定化技术称为蛋白质固定化技术。因此，尽管有关固定化技术的著述已经很多，我们在编写本书时，仍将该技术作为其中一章，给以简要介绍，以使读者对蛋白质连接技术及其进展有较为全面的了解，也有助于在实践中灵活应用。

本章以酶的固定化技术为代表，简要介绍固定化技术的主要类型、固定化方法及应用实例。酶固定化技术的理论问题，可参阅有关专著^[1,2]。

众所周知，酶是一种生物催化剂，其本质是蛋白质，它参与生物体内的多种生化变化过程，它与一般的化学催化剂不同，酶具有高度的催化专一性和催化活性。随着对酶结构与功能研究的不断深入，酶催化作用的这些特性显得更为突出和重要。然而，对于工农业和生物医学及理论研究来说，酶并非是理想的催化剂，为了研制并获得一种更为实用的催化剂，人们试图并成功地通过物理或化学合成的途径，制备了一大类能满足实践需要的、比天然酶更为稳定的生物催化剂——固定化酶。

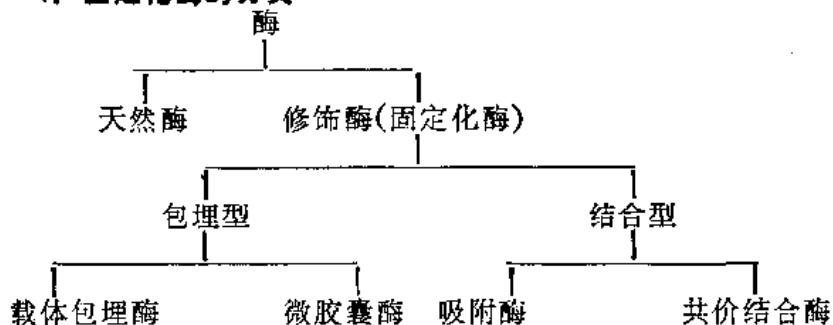
酶的固定化技术是将溶液化的酶分子通过物理或化学方法，结合在不溶于水的固相载体上，这种固定化酶应具有与溶液酶相同的性质，即在温和(常温常压)条件下，对底物的高度专一性和高度催化活性，以及易被抑制剂作用而失活等。在实际应用中，固定化酶则具有易于从反应系统中分离、再生和重复使用的优点，同时也简化了在酶催化后对产物的分离纯化，特别是利用这种固定化酶技术，通过制备专一性强、灵敏度高的酶电极，有利于各种高效、稳定的自动化测定技术的开发和应用。

由上可知，固定化酶技术是对生物学系统非均相催化作用的应用。以往，大多数通用的生化过程或有关技术，都是应用可溶性酶(溶液化酶)或分裂细胞培养物将底物经催化转化为产物，而固定化酶的作用则是包括能够反复不断地处理新鲜加入反应溶液(底物)，并有效地限制(或控制)反应系统的催化作用。

当前，固定化酶已经成为非常重要的技术和工具，无论在工农业生产和医学实践中，还是在生命科学的研究中，将会起到愈来愈重要的作用。

一、固定化酶及固定化方法分类

1. 固定化酶的分类



2. 固定化方法类型 酶的固定化方法可以分为三类：

- 1) 载体结合法：将酶结合于不溶性载体，此类方法又包括物理吸附法、离子结合法和共价结合法三种；
- 2) 交联法：将酶通过双功能或多功能试剂进行分子间的交联；
- 3) 包埋法：将酶结合到半透性凝胶晶格中，称为晶格法；或将酶包裹到半透性多聚物的胶囊膜中，称为微胶囊法。



3. 固定化酶的性质（见表7-1）

表 7-1 固定化酶的性质

性 质	载体结合法			交 联 法	包 埋 法
	物理吸附	离 子 结 合	共 价 结 合		
制备	容易	容易	困难	困难	困难
酶活性	低	高	高	中等	高
底物专一性	未改变	未改变	易改变	易改变	未改变
结合力	弱	中等	强	强	强
再生	可能	可能	不可能	不可能	不可能
通用性	低	中等	中等	低	高
成本	低	低	高	中等	低

4. 固相载体及其选择 可用作固相载体的材料有琼脂糖、交联葡聚糖、聚丙烯酰胺、硝酸纤维素膜、壳多糖、硅胶、活性碳及尼龙等；在制备固定化酶时，要根据具体需要进行选择。

二、固定化技术中的化学方法

1. 共价键法 ① 重氮化法；② 异硫氰酸法；③ 叠氮化法；④ EDC法；⑤ SESA法；⑥ 酰氯法；⑦ 活化酯法；⑧ 琥珀酸酐法；⑨ 溴化氰法；⑩ 烷化法；⑪ 疏基-二硫交换法；⑫ 高碘酸钠氧化法；⑬ 金属盐螯合法；⑭ 硅烷化法；⑮ 聚丙烯腈活化法；⑯ 尼龙活化法；⑰ 活泼双键法（双乙烯砜法、苯醌法和双环氧乙烷法）；⑱ 直接共价法（仅适用于含酸酐载体和含活泼卤素载体），等等。

2. 交联法 主要包括双功能试剂和多功能试剂交联法。

固定化技术中的化学方法类型很多，在前面几章已有详细介绍，此处不再重复。

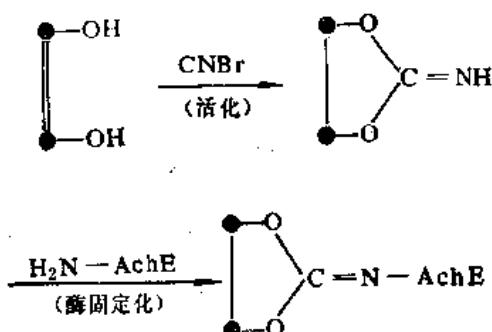
三、固定化酶的制备

以乙酰胆碱酯酶（AchE）的固定化方法为例具体介绍。

1. 载体活化与酶的固定化 在制备固定化酶之前，必需首先选择适当的载体并将其活化，同时对欲固定化的酶也要进行分离纯化（酶的纯化在后面介绍）。对不同的载体活化处理的方法也不尽相同，所制成的固定化酶的性质也不一样。将酶固定结合于载体的方法类型也较多，难易程度各异，一般要根据实际情况加以选用。以下简介几种常用的载体活化方法。

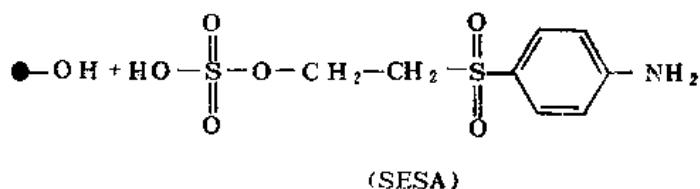
(1) 琼脂糖类载体

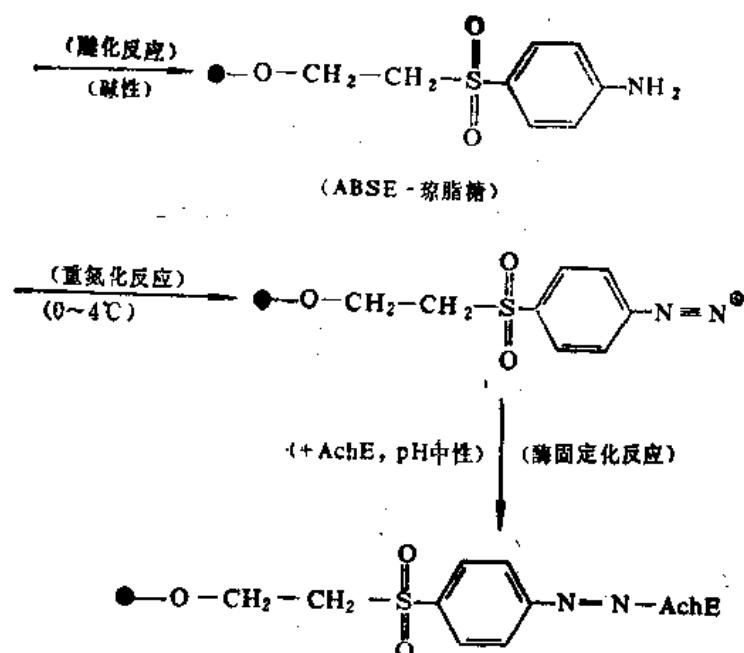
① 溴化氰活化法



溴化氰活化法比较简便，在许多实验室已普遍采用，现在已有溴化氰活化的琼脂糖商品出售，使用更为方便，由于文献报道很多，不再赘述。在此应该指出，如自行制备活化载体时，在对载体活化之后，过量的溴化氰及其分解产物必需在与酶交联之前经洗涤彻底清除，以免影响酶活性。此外，由于溴化氰为剧毒品，使用时要特别注意人身安全防护。

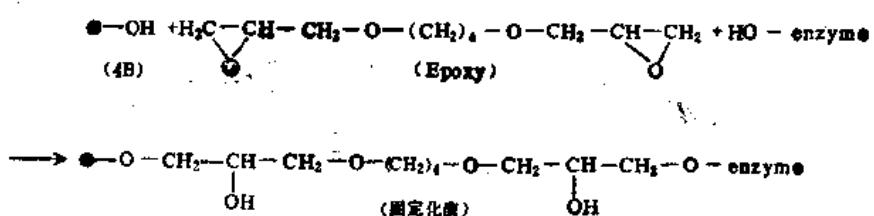
② 对-β-硫酸酯乙砜基苯胺 (SESA) 法^[8]





首先将多糖类载体（如琼脂糖、纤维素、淀粉、葡聚糖凝胶等）与 SESA 混合，调 pH 至 13，在 85℃ 左右反应 30 分钟，经过洗涤即可得到对-氨基苯乙砜基 (ABSE) 多糖。然后再与亚硝酸在 0~4℃ 反应 30 分钟，得到重氮盐衍生物。最后，将其与酶混合，在中性 pH 反应 2 小时，就得到固定化酶。SESA 是我国首创用于固定化技术的一种双功能试剂，已用于多种酶的固定化，并取得满意的结果。其中固定化核酸酶 PI (5'-磷酸二酯酶) 已于 1978 年用于生产 5'-核苷酸的生产，这是我国第一个用于工业生产的固定化酶。此外，还成功地制备了固定化 3'-核糖核酸酶、蛇毒 5'-磷酸二酯酶、胰蛋白酶、青霉素酰胺酶、碱性磷酸单酯酶、枯草杆菌蛋白酶、琥珀酸脱氢酶、糖化酶及多核苷酸磷酸化酶等。

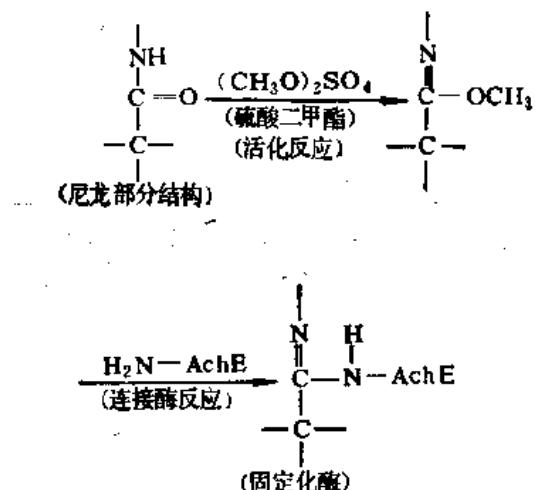
③ 双环氧乙烷 (Epoxy) 活化法^[4]



环氧乙烷活化琼脂糖的制备步骤：将 7ml 洗涤过的 Sepharose 4B 悬浮于 5ml 含 10mg 硼氢化钠的 1N NaOH 溶液中，再加入 1ml 双环氧乙烷 (1,4-丁二醇-二缩水甘油醚，又称 1,4 双-(2,3-环氧丙氧基-丁烷))。在 25℃ 下缓慢搅拌 5 小时以上使其反应完全，然后用蒸馏水充分洗涤活化 4B，活化琼脂糖在 4℃ 的中性溶液中至少可保存一周。据报道，瑞典 Pharmacia 公司已有环氧活化的 Sepharose 6B 产品，但价格昂贵。用上述活化载体制备固定化酶时，即将欲固定的酶溶液与活化 4B 或 6B 混合，在低温条件下，缓缓震荡 20 小时进行交联。使用本法制备固定化酶时，所用之酶需在偏碱性条件下稳定为好。

(2) 尼龙载体 采用尼龙作为固相载体有许多优点，如尼龙材料性质稳定，来源丰富易得，可以根据实用需要制成多种形状，活化处理及保存皆比较方便等。

下图以硫酸二甲酯活化法为例，介绍固定化反应。



尼龙与硫酸二甲酯作用的条件，可以在室温反应50分钟，也可在沸水浴中放置4分钟，但多用后者。此法简便易行，可在一般检定工作中推广使用。

从化学角度来看，凡载体上含有氨基、酰基、甲氧基或可用亚硝酸重氮化的基团，均可通过活化处理，将酶连接在载体上而成为固定化酶。可以设想，将含有苯环的塑料片、网、丝，首先用硝酸硝化，而后经还原或重氮化等步骤，从理论上讲，也可与酶进行偶联。由此，可以制成比较理想的固定化酶。

用尼龙网作为固相载体，其表面积增大，所结合的酶量也多，因此，制得的固定化酶的酶活力显然会比尼龙管大得多。尼龙不耐酸，在处理过程中，往往会因为酸度不当而破坏了尼龙的结构；若用4N HCl处理时，尼龙虽然部分破坏，但仍然可与酶连接；如果酸度继续增大，尼龙的结构会被全部破坏，便不能再用作固相载体。因此，在对载体进行活化处理时，严格控制有关条件是十分重要的。

(3) 聚丙烯酰胺凝胶载体 当在高分子聚合物如丙烯酰胺中加入交联剂 N, N' -甲撑双丙烯酰胺、聚合促进剂(β -二甲氨基丙腈和四甲基乙二胺)及聚合引发剂(过硫酸钾或核黄素等)后，便可发生交联结合形成凝胶。这种凝胶具有规律性格子型排列结构。在其聚合之前即将酶预先加入，并混合均匀，聚合后便将欲固定化的酶包埋在凝胶晶格之中，从而形成包埋型固定化酶。

由于酶的分子比晶格大，被包埋而固定的酶不会被水溶液所冲洗掉，而固定的酶在水溶液环境中，可对能够进入晶格中的小分子底物发挥酶催化作用。但是，这种类型的固定化酶，其酶活力不会很高，这是因为，只有能够进入晶格的底物，才能够与固定化的酶接触，进而被酶催化水解。此外，由于凝胶中含有大量水分，酶在凝胶中是很不稳定的。

(4) 纸片或其它纤维素膜作为载体 将酶液、淀粉浆和缓冲剂混合后吸附在 Whatman 滤纸、或含有阴离子树脂的纸片、或玻璃纤维纸、或硝酸纤维膜等固相载体上，经干燥后可以长期保存。由于在这类薄膜状固相载体上，可以较多地吸附或交联结合酶分子，故其总的固定化酶活力较高。

总之，酶的固定化方法很多，可根据固相载体及酶所具有的可反应基团选择适当的活化剂及交联剂；至于固相载体，除了上面介绍的几种外，也可选用硅胶及活性碳等，

随着固定化技术的不断发展与开拓，新的载体会应运而生。

2. 酶的分离纯化 制备固定化酶所用的酶制剂必需纯化，否则，所制得的固定化酶之活力不会太高。由于酶的蛋白质性质，来源于各种生物体内酶的粗制品往往与其它蛋白质、糖类等混杂在一起，这些非酶成分多半也含有与酶相同的可反应回团，如氨基、羧基或羟基等，它们也会象酶分子中的相应基团一样与活化载体发生交联反应，从而与酶分子竞争结合固相载体的活化部位，部分地占据有效位点，减少了酶分子的固相结合数量，导致酶活性降低，影响固定化效率。因此，为获得高质量的固定化酶，对欲固定化的粗酶制品进一步纯化是不可缺少的。

通常，要获得纯度很高的酶是极其不容易的，一方面，是因为绝大多数酶蛋白的性质很不稳定，极易失活；另一方面，则是由于酶的分离纯化步骤繁杂，周期也较长，更易引起酶变性而失活。因此，在对酶进行纯化时，要严格控制有关条件，以期获得纯度好，活性高的优质酶制品。由于酶的种类很多，因而对不同酶的纯化方法也有差异；同时，对酶纯度的要求，也要从实际需要出发，既不能用极粗的酶制品，也不得要求极高的纯品。酶提纯的程度要视所制备的固定化酶之活力能否满足实际需要而定。因为在制备固定化酶时，总酶活力并不会因酶纯度高而成倍地增加。由于酶的多样性及其纯化方法的复杂性，所以，在纯化或选用酶时，要从多方面考虑。

本章所采用的 AchE，是由电鳗电器官中提纯得到的，该酶源富含 AchE，取材方便，分离纯化也较容易，所获得的酶制品之纯度，可满足实际之需要。

3. 固定化酶的评价 对固定化酶的评价主要包括酶活力的大小和酶的稳定性，由酶活力的测定来进行评估。

(1) 酶活力的测定方法

1) AchE活力测定方法原理：AchE可水解硫代乙酰胆碱生成胆碱与醋酸，胆碱还原二氯靛酚使其蓝色退去。蓝色退去愈多，说明酶活力愈高。以能水解硫代乙酰胆碱的 μmol 数作为判断酶活力大小的标准。规定1个酶活力单位，为在30分钟25℃时，能水解 $1\mu\text{mol}$ 硫代乙酰胆碱。将样品测定值与在相同条件下制备的标准曲线比较，以确定酶活力的大小。对 AchE 活力的测定还可使用羟胺法或 DTNB 法。

2) 溶液 AchE活力测定：取一定量的酶液（如酶活性较高，可先行稀释），加过量硫代乙酰胆碱及2,6-二氯靛酚，总体积与制定标准曲线条件相同。在反应30分钟后，通过比色计测定蓝色变化程度。由标准曲线查出相应的酶活力。

酶溶液浓度由酶蛋白含量来表示，以下式进行计算：

$$1.45 \times \text{OD}_{280\text{nm}} - 0.74 \times \text{OD}_{410\text{nm}} = \text{mg} \text{ (酶蛋白含量)}$$

酶的质量规定用比活性表示，即每毫克酶蛋白在一定时间内分解底物的微克分子数，以此为标准判断酶的好坏。

3) 固定化 AchE活力测定：取一定量的固定化酶，测定其比活性，比较使用前后比活性的变化。

(2) 固定化酶的稳定性测定 固定化酶的稳定性，通常是指在其存放过程中酶活力的变化情况。一般地说，固定化酶要比溶液酶稳定，但温度对其稳定性影响较大。固定化酶的稳定性可用化学动力学方法预测。

四、固定化酶的应用

固定化酶的出现使酶的应用达到了新的水平，并开拓了酶的应用范围，固定化酶不仅具有广阔的实际价值，而且在理论研究中对阐明酶的作用机制提供了有效的工具和途径。同时，固定化技术及固定化酶，在现代分子生物学及生物高技术中也已显示出它的重要作用。

(1) 固定化AchE的应用：固定化AchE对AchE作用机制的研究，对有机磷抑制剂存在的检定，以及对AchE重活化剂的筛选等，是一个重要的工具，如将AchE的特异结合配体固定化，则可用于AchE的分离纯化。

(2) 酶电极及其应用^[6]：酶电极是任何类型的电化学感应器与测定底物浓度的固定化酶的结合体。通常是由离子选择性电极与一层固定化酶结合而成的。要制备一个好的酶电极，首先要选择一个专一性强，来源丰富的酶；其次是与之相配合的电极，要灵敏，干扰要小；再者便是酶的固定化，如先制成固定化酶膜，然后再将它固着在电极上。

由于酶电极具有灵敏、专一、快速，所需样品量少，测定是非破坏性的，样品还可用于其它成分的分析，有颜色的样品也能测定，价格低廉等优点，目前，在临床分析及发酵工业中已得到广泛地应用（表7-2）。

表 7-2 酶电极在临床分析中的应用

酶电极	固定化酶	固相载体	所用电极	测定项目
葡萄糖电极	葡萄糖氧化酶	聚丙烯酰胺	铂电极	葡萄糖
尿素电极	脲酶	聚丙烯酰胺	铵离子电极	尿素
蔗糖电极*	蔗糖酶	胶原	氧电极	蔗糖
	葡萄糖变旋酶			
	葡萄糖氧化酶			
胆固醇电极	胆固醇氧化酶	胶原	氧电极	胆固醇

* 将三种酶同时固相包埋在胶原中与氧电极结合，形成偶联酶电极

除上述的酶电极之外，还出现了一些新的生物电极，如免疫电极、酶免疫电极和微生物电极等，也在临床、科研、轻工、食品、环境保护等方面得到应用。

(3) 固定化酶技术在生物工程中已用于氨基酸等物质的工业生产(表7-3)^[6]

表 7-3 固定化酶在生物工程中的应用

应 用	固 定 化 酶	应 用 时 间
D,L-氨基酸分离	乙酰化酶	1969
L-天冬氨酸生产	大肠杆菌门冬氨酸酶	1973
6-氨基青霉烷酸生产	青霉素酰化酶	1974
甜味高果糖浆制造	葡萄糖异构化酶	1974
L-苹果酸制造	丁烯二酸水合酶	1974
低乳糖牛奶	半乳糖苷酶	1977
5'-核苷酸	5'-磷酸二酯酶	1978
L-丙氨酸	L-天冬氨酸β-脱羧酶	1982

(4) 亲和层析与固定化技术 利用固定化配体分子对欲分离物质分子所具有的生物化学或免疫学特异性所进行的生物专一性亲和层析，是近些年来在生物化学、免疫化学、分子生物学、药理学及医学等科研领域和生产实践中最常用的有效分离手段之一。亲和层析技术中的关键所在，是将配体分子与某种固相载体共价结合使之固定化，以制备亲和吸附剂（即亲和凝胶），这种亲和吸附剂的制备方法，是固定化技术应用的一个重要领域。由于亲和层析的独特优点，使其应用相当广泛，用于分离纯化的物质也是多种多样的，例如酶、蛋白质、核酸、多糖类、激素、抗原、抗体及其它生物大分子；近几年来，也有用于药物、毒物等多种小分子物质的纯化。为此目的，必需将上述各种物质的相应配体分子通过固定化技术固定结合于载体之上，制成多种亲和吸附剂。目前，亲和层析技术已在普通生物及医学实验室广为应用，有关文献及专著也很多，以下简要介绍该技术的新进展。

① 假配体亲和层析^[7]：前已提及，亲和层析技术中最重要也是最困难的环节是配体分子的固定化，这就要求在常规实验室进行专一亲和吸附剂的固定化制备。这一技术通常是较为复杂的，条件不易控制，重复性也不好，固定化制备结果往往不能令人满意。除此之外，由于欲以纯化的物质种类很多，在对不同物质进行亲和层析纯化时，必须将相应的配体分子引入载体使之固定化，制备各自的亲和吸附剂，这就为此类分离工作带来诸多困难和不便。为克服这一困难，曾有人利用一种能与多种酶蛋白及非酶蛋白有亲和结合作用的蓝色染料（称为 cibacron blue）作为配体，将其固定化于载体。利用这种具有通用性配体的亲和吸附剂，可分离纯化多种蛋白质。目前，在国外，这种通用而非专一性配体亲和吸附剂已有商品销售，并已广泛应用于多种激酶、脱氢酶、干扰素及血清白蛋白等的分离纯化。

Cibacron blue通用性配体的化学性质是一类多聚芳香族磺酸化染料，称为三氯杂苯，其主要代表是假配体F3GA，可与琼脂糖或交联葡聚糖凝胶经化学交联生成固定化配体结合物。在这类亲和凝胶衍生物中，最常用的是蓝色-琼脂糖。这种通用性配体 cibacron blue 是一种人工合成的化合物，它作为配体在与之相结合的蛋白质之间无任何生物学亲和关系。因此，为与众所周知的仅对某一种特定物质分子发生特异结合的专一性配体相区别，而将其定名为“假配体” (pseudo ligand)，在亲和层析中，它可代替某些天然配体（如 (NAD)，作为以 NAD 为辅基的多种酶的人工通用配体。所以，人们将以假配体作为亲和配体的层析技术称为“假配体亲和层析”。利用这种假配体的专一性结合，可分离纯化需要 NAD 为辅基的一大类酶，如 LDH、MDH、乙醇脱氢酶、甘油醛-磷酸脱氢酶、腺苷酸激酶、葡萄糖磷酸变位酶、磷酸化酶、丙酮酸激酶、磷酸果糖激酶、蛋白激酶、DNA 聚合酶和 AchE 等等。

除上述广泛专一性结合外，cibacron blue 还具有非专一性结合的性质，利用这种性质，可对人及多种哺乳动物来源的血清白蛋白、干扰素、凝血因子 X、RNase、胃蛋白酶、细胞色素C及人白细胞介素进行分离纯化。

② 亲和超滤技术及其在生物工程中的应用^[8]：基因工程和细胞工程技术的最新进展，促进了多种生物制品的研究和生产。这些制品，象酶、抗原、抗体及受体等，都是从发酵液或天然产物中提取的。这些工作，皆属于生物工程的下游工程，通常采用一系列分离纯化手段，包括盐析沉淀、离心、浓缩、离子交换、电泳、亲和层析及超滤膜分

离技术等。为了满足生物工程研究的需要，新近又开发研制了高选择性，高回收率，经济有效，易于大规模生产采用的提纯技术，亲和超滤技术即是其一。

亲和超滤技术是把亲和层析的高选择性和超滤技术的高处理能力相结合的一种新技术。为了有效地提纯某种分子量较小的物质(称为亲和体)，首先需要将亲和体与具有亲和结合能力的大分子配体相混合，以形成“亲和体-大分子配体复合物”，该复合物之分子量远远大于超滤膜的截留分子量，在进行超滤时则被截留，而其它未结合的混杂组分则可通过超滤膜，对被截留的复合物，选用适当的洗脱缓冲液处理，使亲和体从大分子配体上解析下来，再通过超滤膜，亲和体便与大分子配体分开，从而达到分离纯化的目的。此即亲和超滤技术的基本原理和主要操作过程。

表 7-4 亲和超滤纯化蛋白质常用的亲和配体及载体^[1]

载体类型	配体	纯化蛋白质(亲和体)
淀粉球(5~10nm)	cibacron blue	ADH
酵母热杀细胞	细胞表面的羟基	伴刀豆球蛋白
硅石微粒(7nm)	PBA	胰凝乳蛋白酶
琼脂糖珠(50~200nm)	PABTG	β -半乳糖苷酶
葡聚糖(MW 2,000,000)	Protein A	IgG
葡聚糖(MW 2,000,000)	对-氨基苯甲脒	胰蛋白酶
葡聚糖(MW 2,000,000)	对-氨基苯甲脒+STI	胰蛋白酶
聚丙烯酰胺(MW 100,000)	对-氨基苯甲脒	胰蛋白酶
硅石微粒(12nm)	cibacron blue	ADH, LDH
脂质体(25~70nm)	Biotin	Avidin
单层脂质体(25~70nm)	对-氨基苯甲脒	胰蛋白酶
水溶性聚合物	间-氨基苯甲脒	尿激酶

注：PBA：4-苯基丁胺；ADH：乙醇脱氢酶；LDH：乳酸脱氢酶；PABTG：对-氨基苯-1-硫代-β-D-半乳糖吡喃糖昔琼脂糖；STI：大豆胰蛋白酶抑制剂

如果亲和体的配体也是小分子物质，那么，则需要通过固定化技术把该小分子配体与适当的载体相结合，制成固定化配体，然后再按上述步骤进行之。表 7-4 简要列出亲和超滤技术中可选用的载体，配体及纯化的相关蛋白质。

亲和超滤是一种新技术，对它的研究和应用仍处于起步阶段，在实际应用过程中，还有许多问题需要解决，如配体、载体及超滤的选择，配体与载体的固定化结合等，都需要给以十分重视。

参 考 文 献

- Carr PW, Bowers LD. Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical. John Wiley & Sons, Inc. New York/Chichester/Brisbane/Toronto 1980.
- Rosevear A, Kennedy JF, Cabral JMS. Immobilised Enzymes and Cells. Adam Hilger, Bristol and Philadelphia 1987.
- 刘树煌. 生命的化学 1982; 2(1):46
- Lowe CR. An Introduction to Affinity Chromatography. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979; 361~364

5. 吉鑫松. 生命的化学 1984; 4(4):9
6. 孙玉昆. 生命的化学 1985; 5(4):2
7. 洪孝庄. 国外医学《军事医学分册》1989; 2:75
8. 曹宪放. 生命的化学 1991; 11(6):27