

发光免疫分析——现状与未来

杨 晓 林

北京大学医学部研究员

中国生物物理学会光生物学专业委员会副主任委员

国际生物发光和化学发光学会 (ISBC) 学术理事

Council member of scientific advisory board of
International Society on Bioluminescence & Chemiluminescence

发光 (Luminescence)

化学发光 (Chemiluminescence)

生物发光 (Bioluminescence)

- ◆ 由于化学反应（通常是氧化）或生物化学反应产生电子能级处于激发态的物质，后者通过跃迁释放能量并产生光子，从而导致的发光现象。与荧光最大的区别在于无需激发光，因此后者也被称为光致发光。
- ◆ 生物发光和化学发光均属于冷光，即发光不是由于发光体温度升高所致，因此其反应能量绝大部分用于发光而不是发热，发射波长也与温度无关。
- ◆ 发光测定属发射光谱分析，多采用动力/速率法或积分法，无需终止反应，也不受朗伯-比尔定律限制；而酶标显色测定属吸收光谱分析，多采用终点法，需终止反应，并受朗伯-比尔定律限制。

化学发光的分类

按化学反应类型

◆ 酶促化学发光:

辣根过氧化物酶系统

碱性磷酸酶系统

黄嘌呤氧化酶系统

◆ 非酶促化学发光:

吖啶酯系统

草酸酯系统

三价铁-鲁米诺系统

按发光持续时间

◆ 闪光 (Flash):

发光时间在数秒内, 如吖啶酯

以原位进样 (In Situ Injector) 和时间积分法测量

◆ 辉光 (Glow):

发光时间在数十分钟以上, 如:

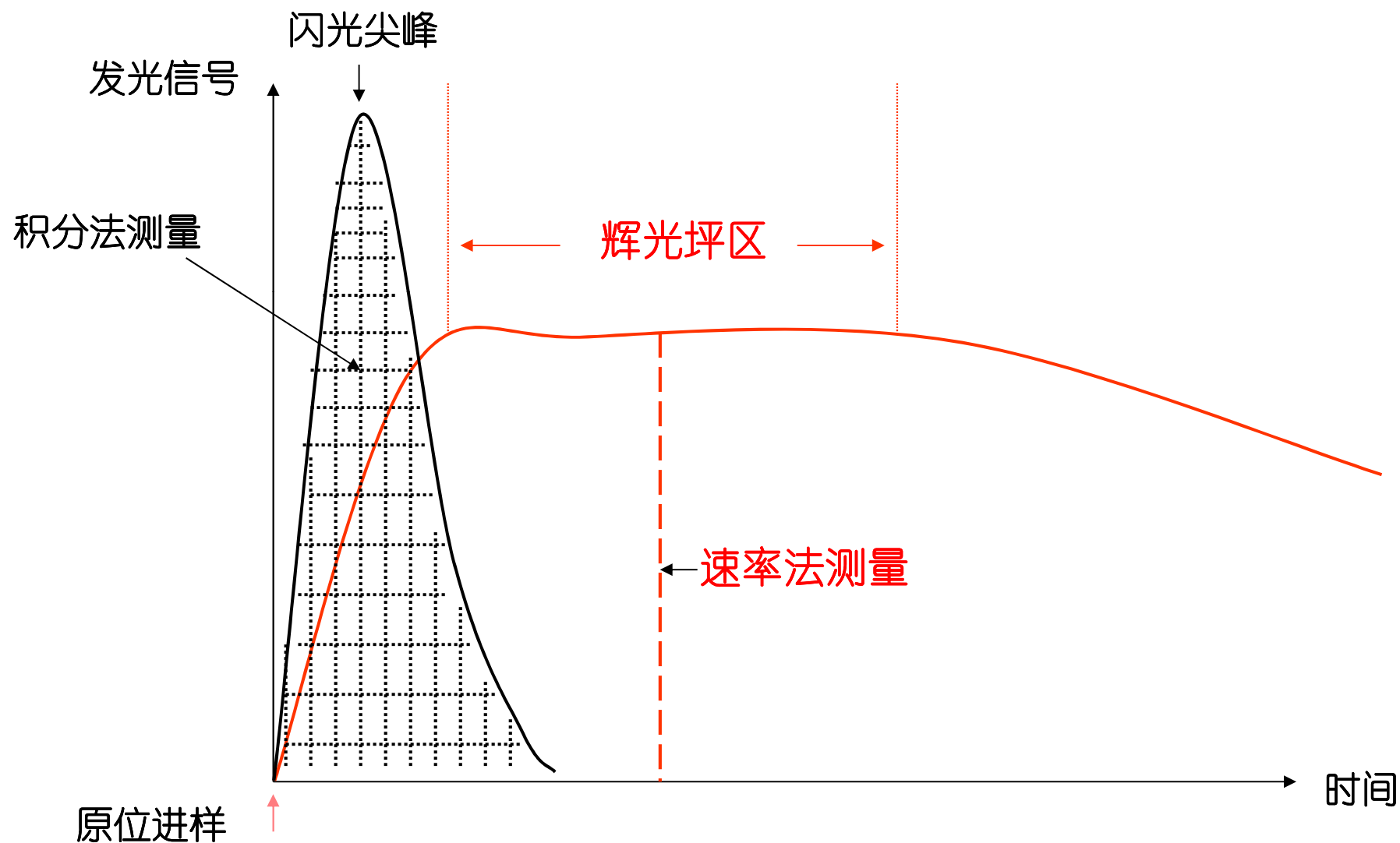
HRP-Luminol系统

AP-AMPPD系统

黄嘌呤氧化酶系统

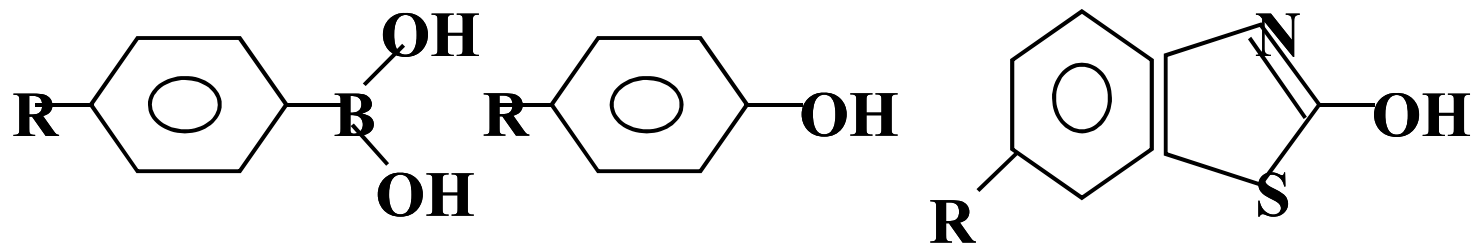
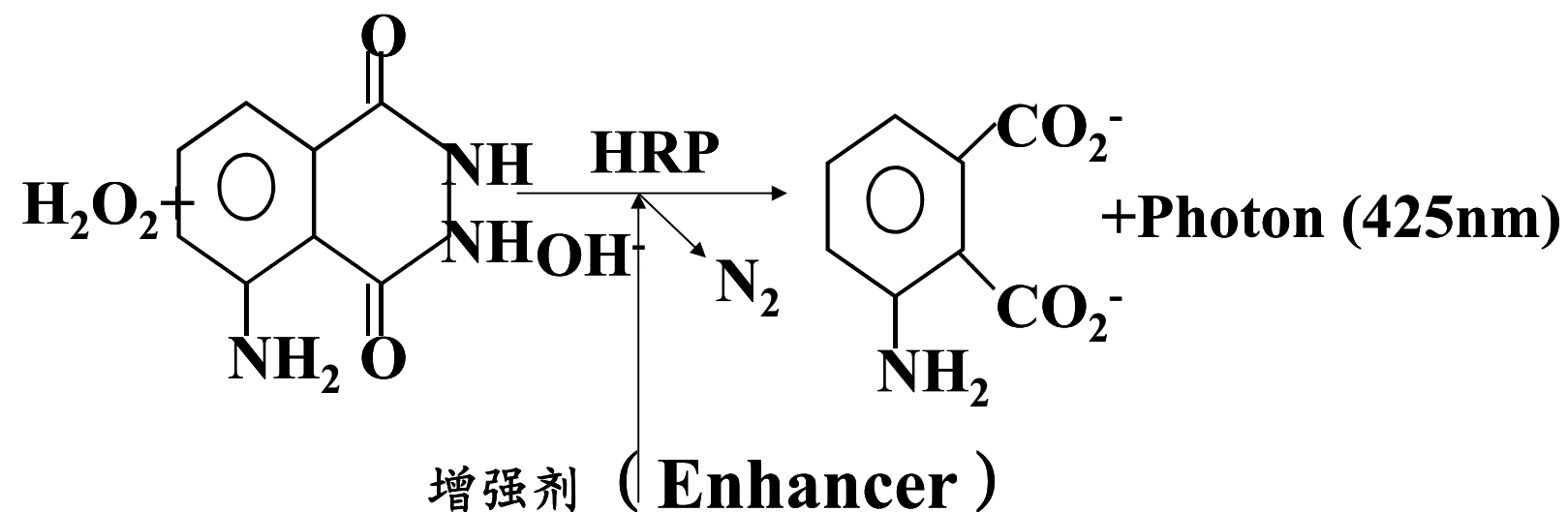
无须原位进样、以速率法测量。

闪光与辉光及其测量方式的差别

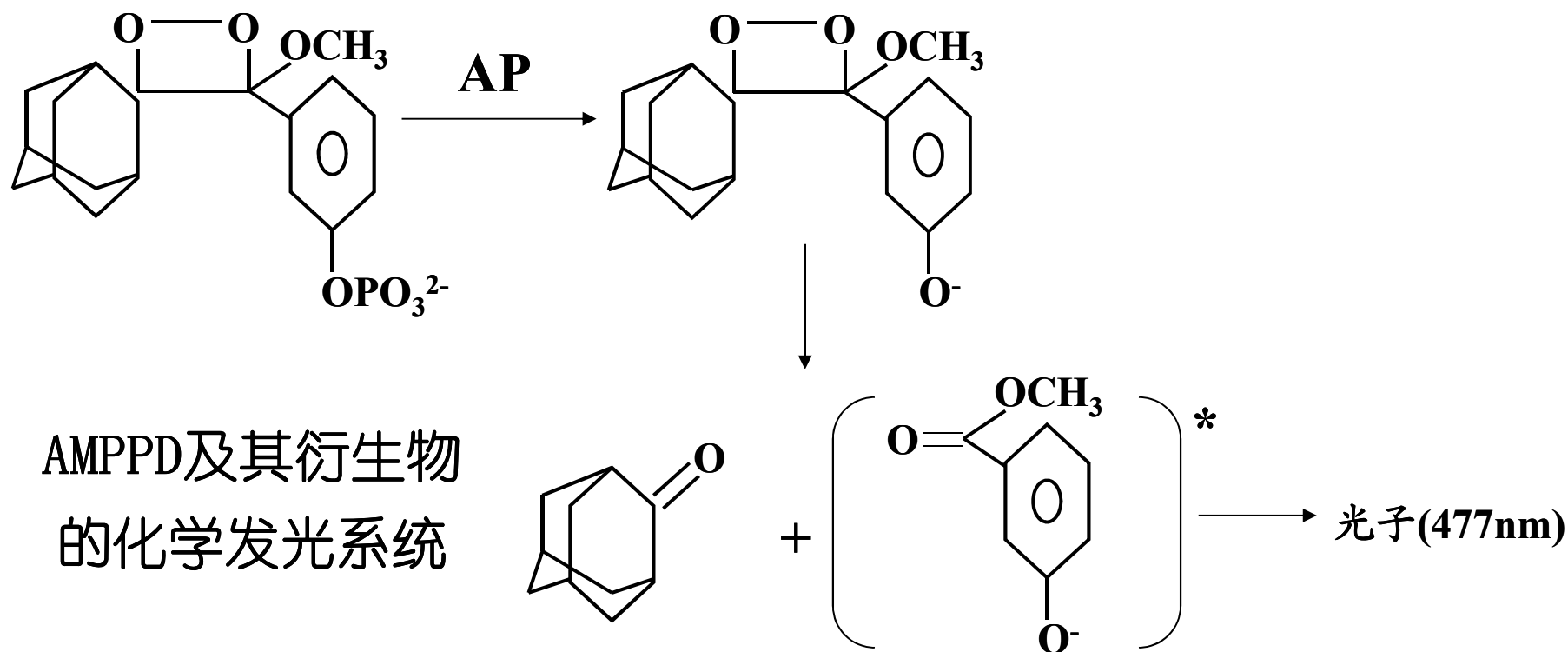


商业化产品中常见的化学发光系统（一）

鲁米诺及其衍生物的增敏化学发光系统

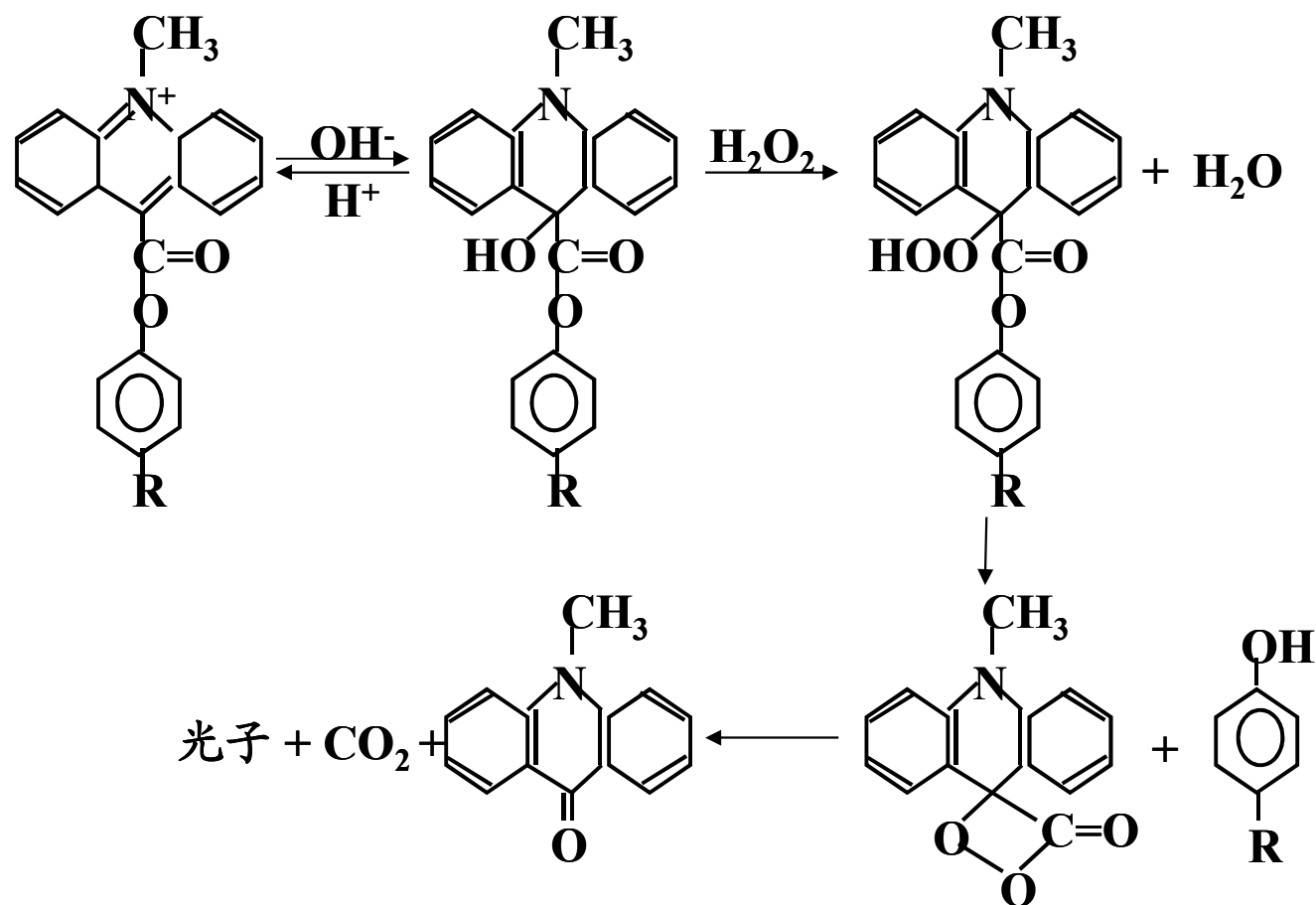


商业化产品中常见的化学发光系统（二）



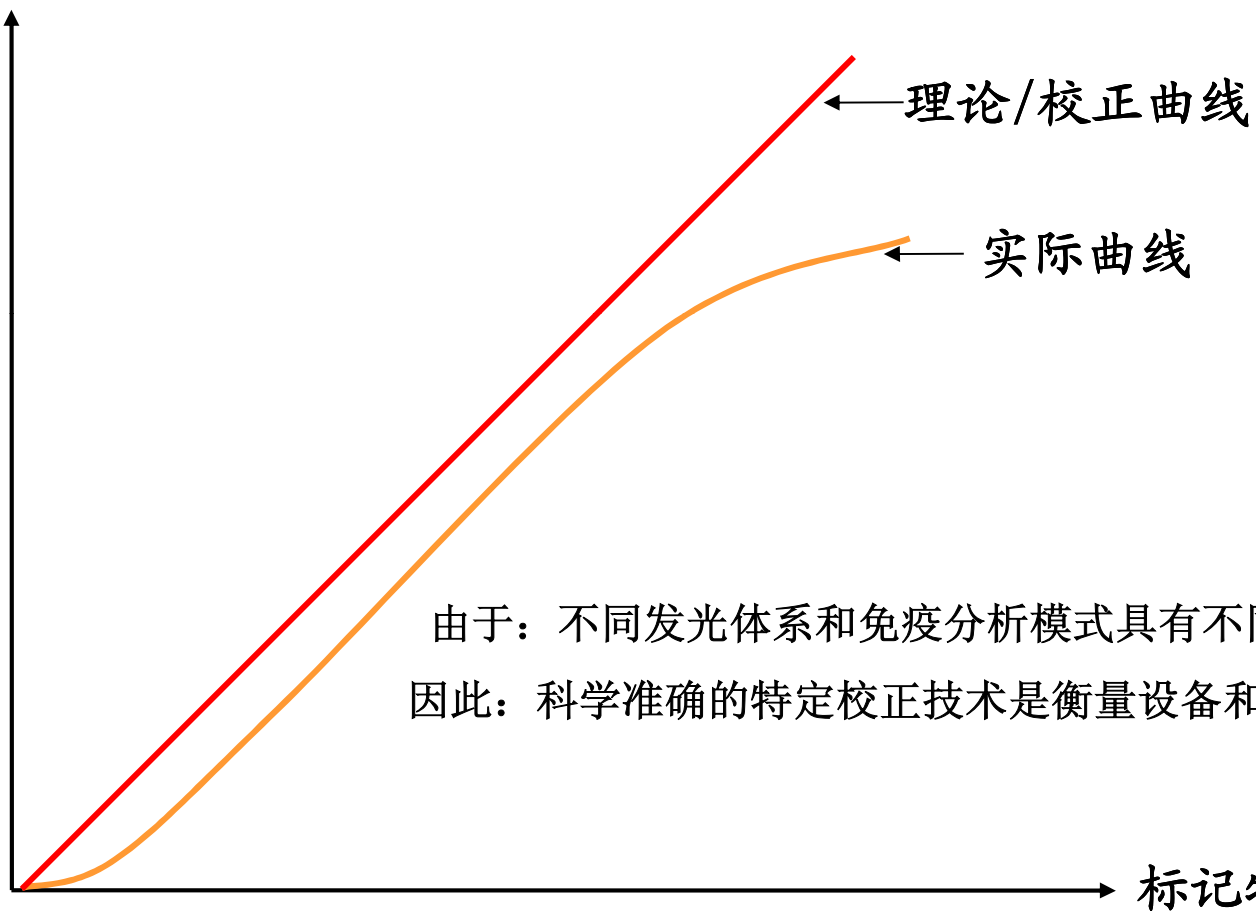
商业化产品中常见的化学发光系统 (三)

吡啶酯化学发光系统



发光检测的剂量--反应关系曲线

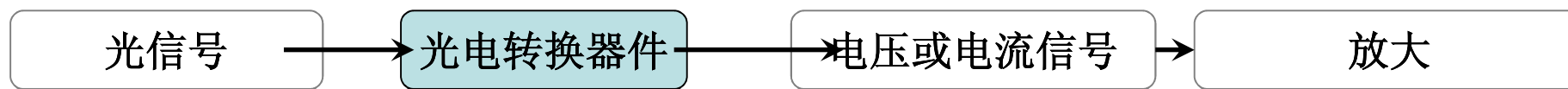
信号强度 (Y)



发光信号检测

光敏二极管、光敏电池、光电耦合器 (CCD)

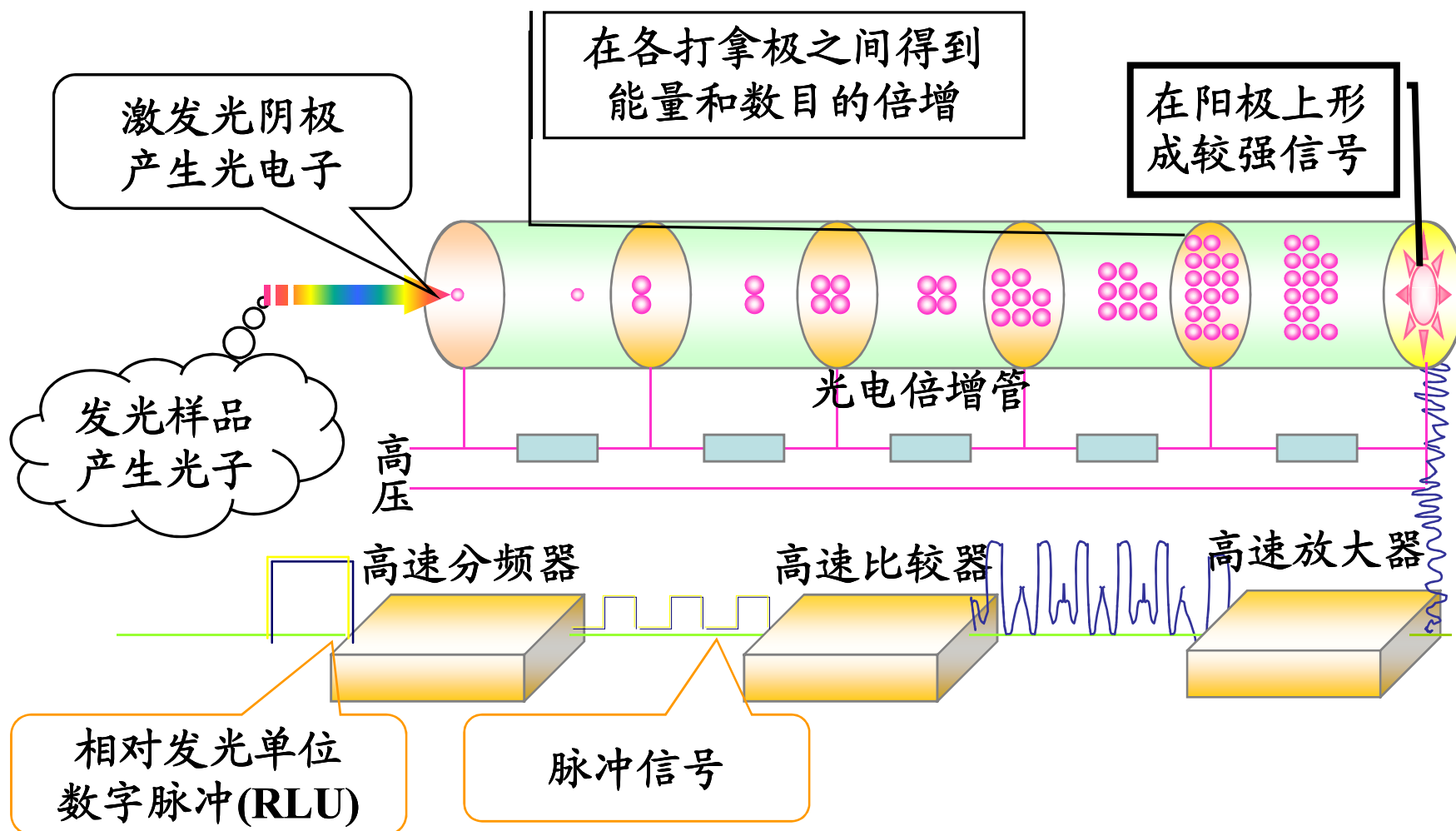
原理：



主要特点

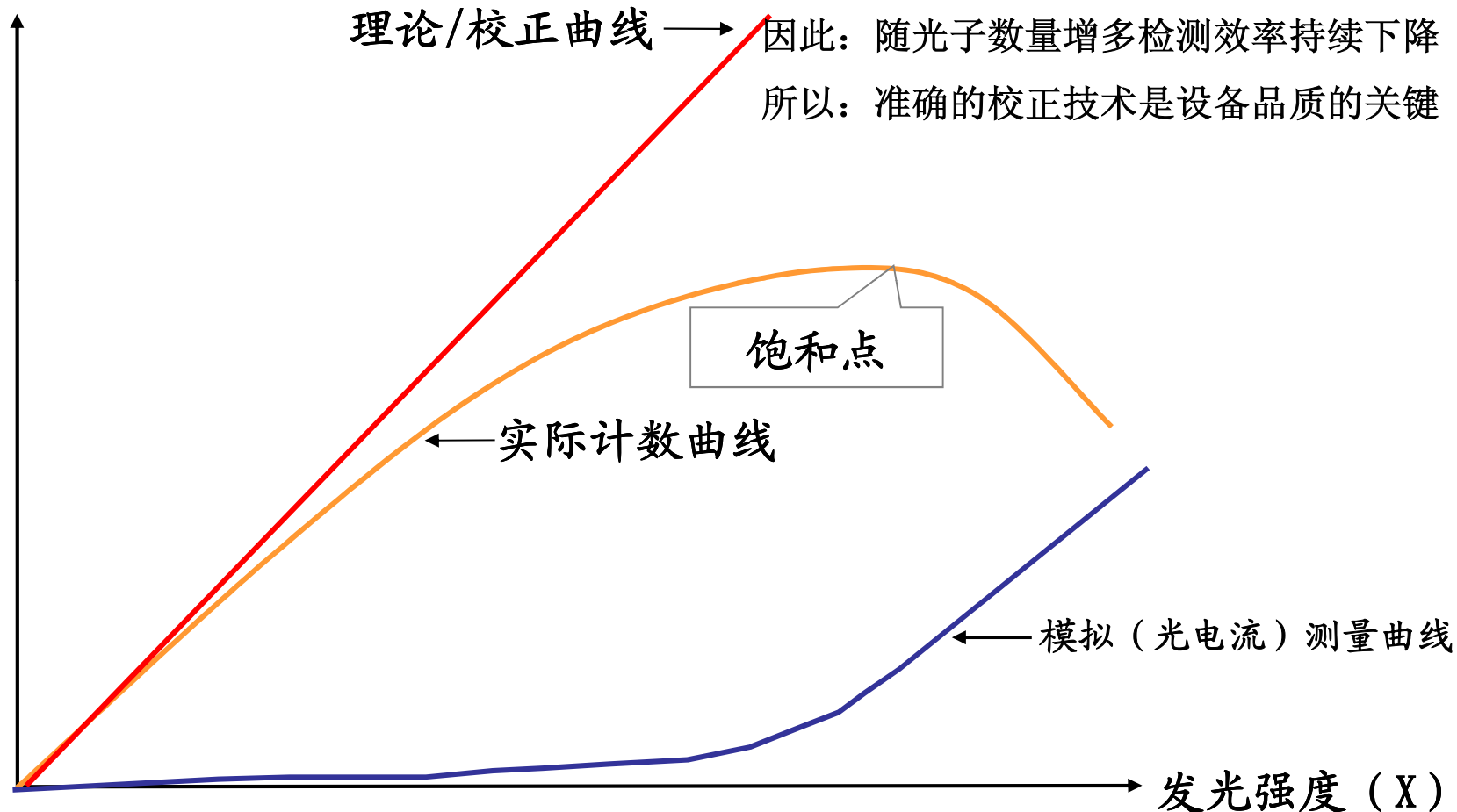
- ◇ 结构简单、性能稳定
- ◇ 但灵敏度低、线性范围较窄。

单光子计数器是目前高灵敏度 发光分析仪的核心部件

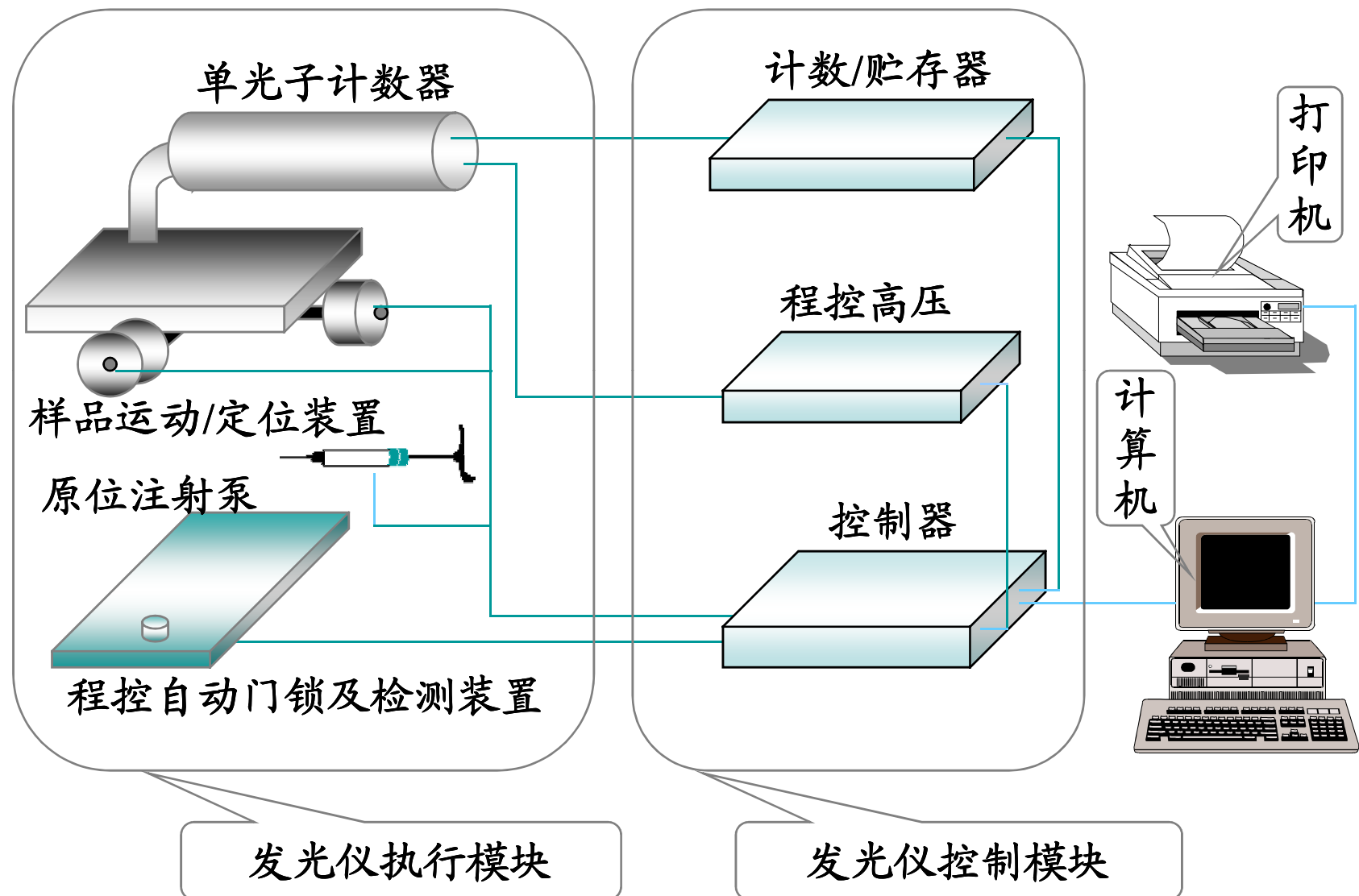


单光子计数器的特性

光子计数 (Y)



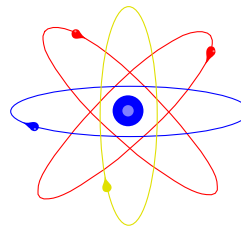
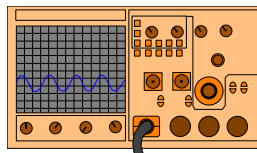
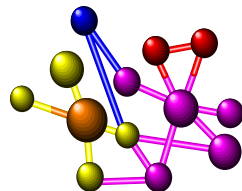
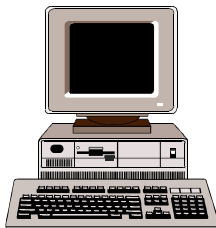
单光子计数式发光检测仪



光生物学技术的应用范围

- ◆ 军事侦测
- ◆ 公安稽查
- ◆ 卫生检疫
- ◆ 药物筛查
- ◆ 医学诊断
- ◆ 环境检测
- ◆ 航天遥感
- ◆ 生命科学
- ◆

已成为现代生物技术最活跃的领域之一

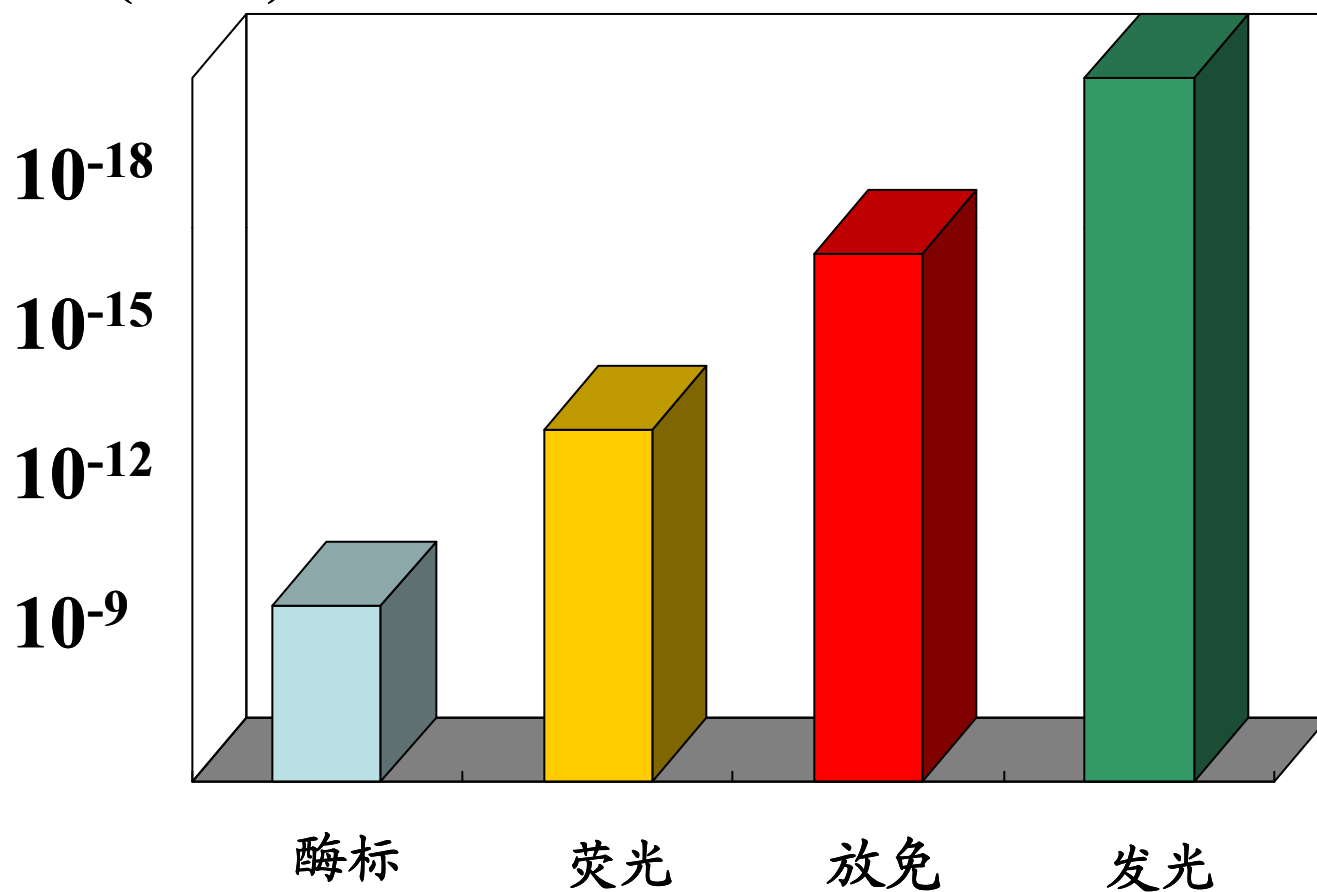


光生物学检测技术的优越性

- ◆ 彻底消除了放射性危害
- ◆ 无半衰期限制，试剂稳定性和有效期大大延长
- ◆ 容易实现连续、动态、重复测定
- ◆ 适合于复合标记系统进行多指标并行测定
- ◆ 操作简单，反应速度快，容易实现自动化
- ◆ 灵敏度和线性范围超过以往技术

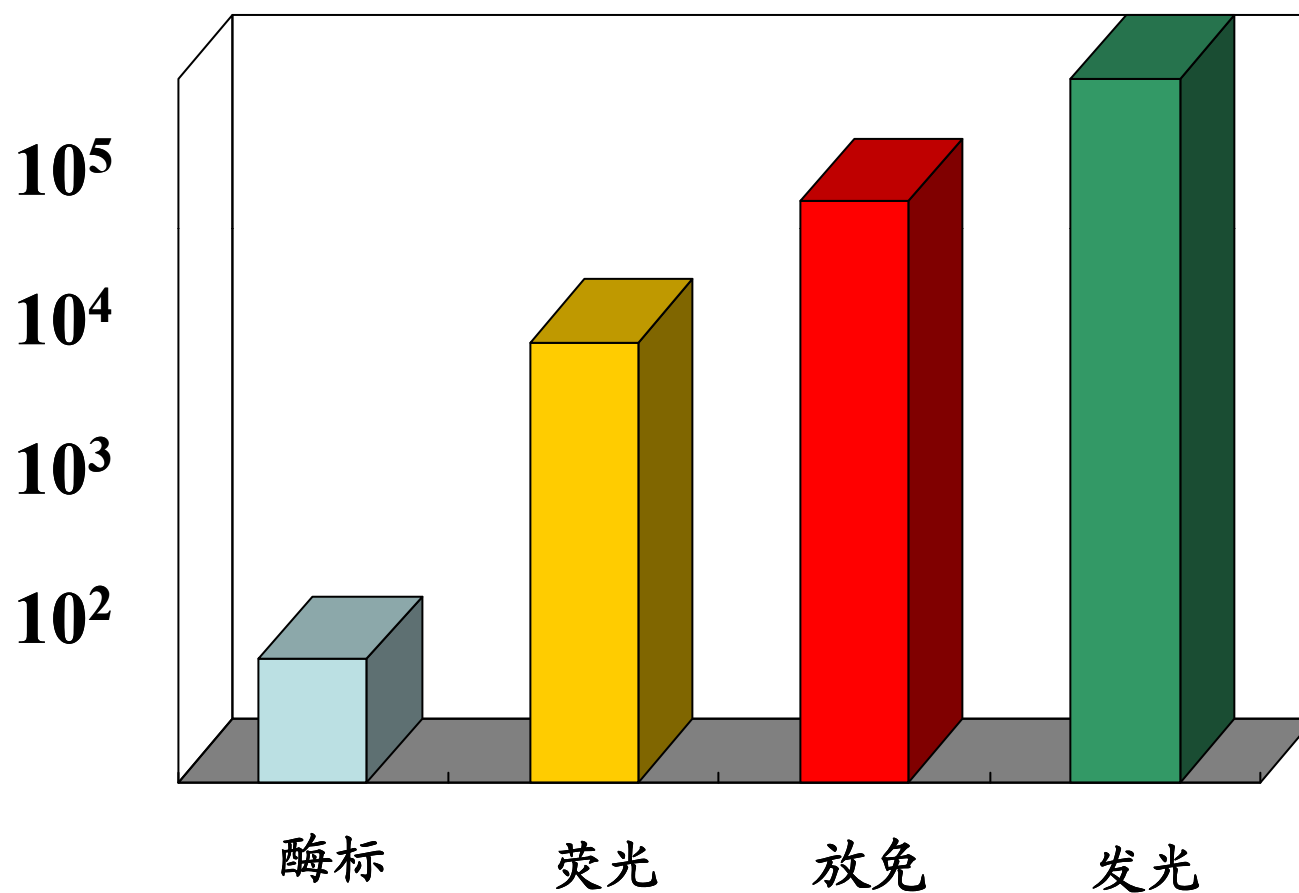
几种标记/检测技术理论极限灵敏度的比较

灵敏度(mol/L)



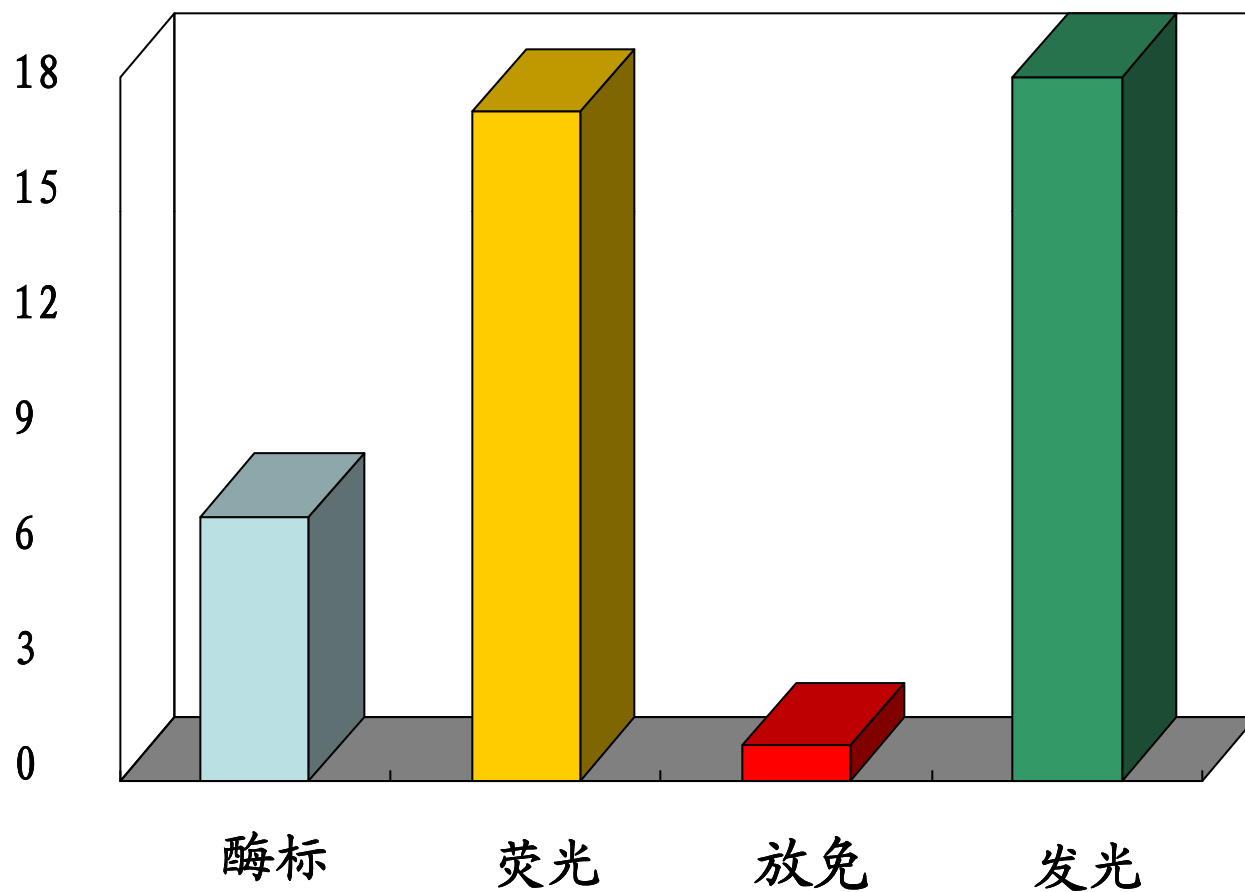
几种标记/检测技术理论线性范围的比较

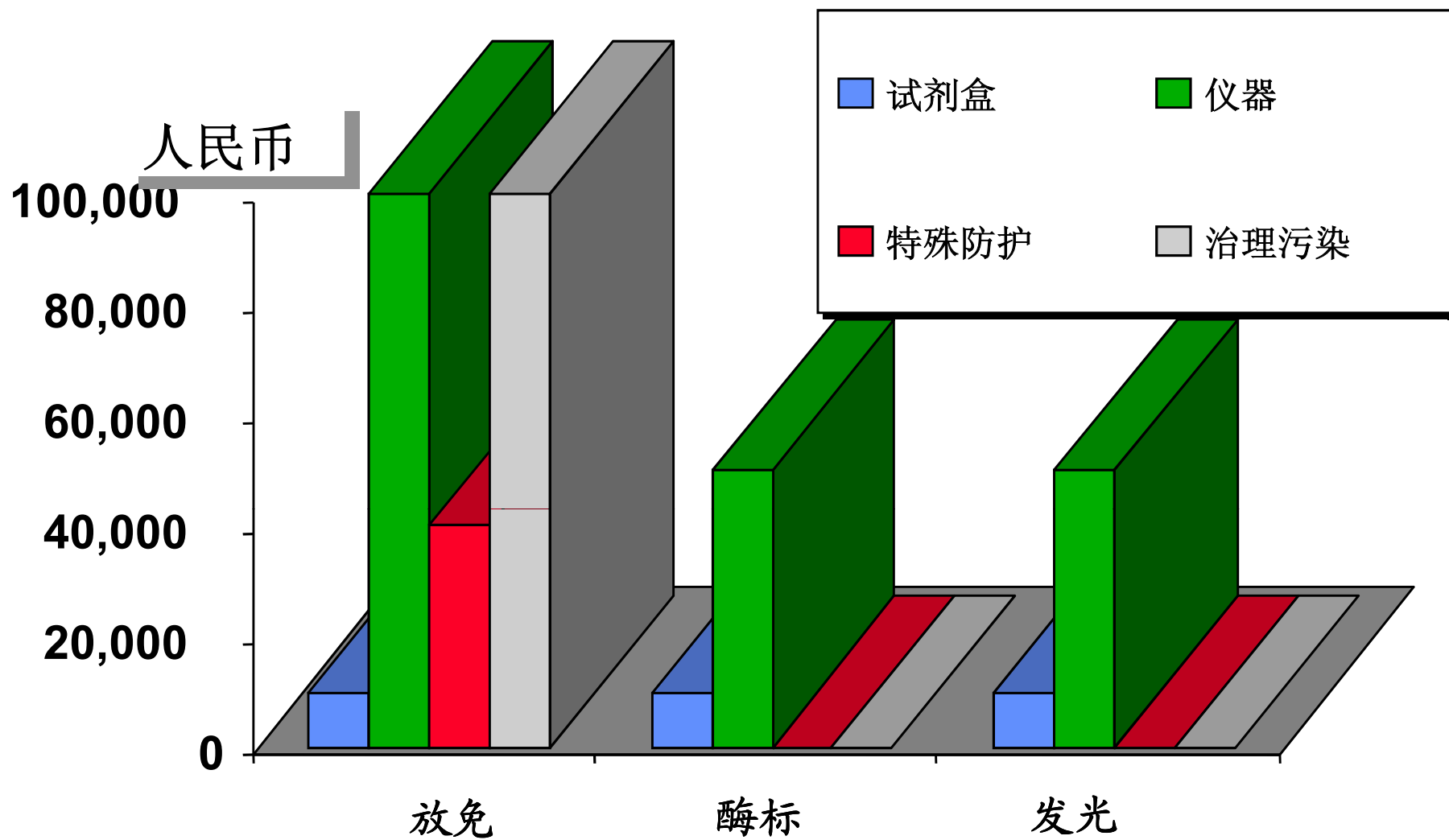
线性范围



几种标记/检测试剂的有效期比较

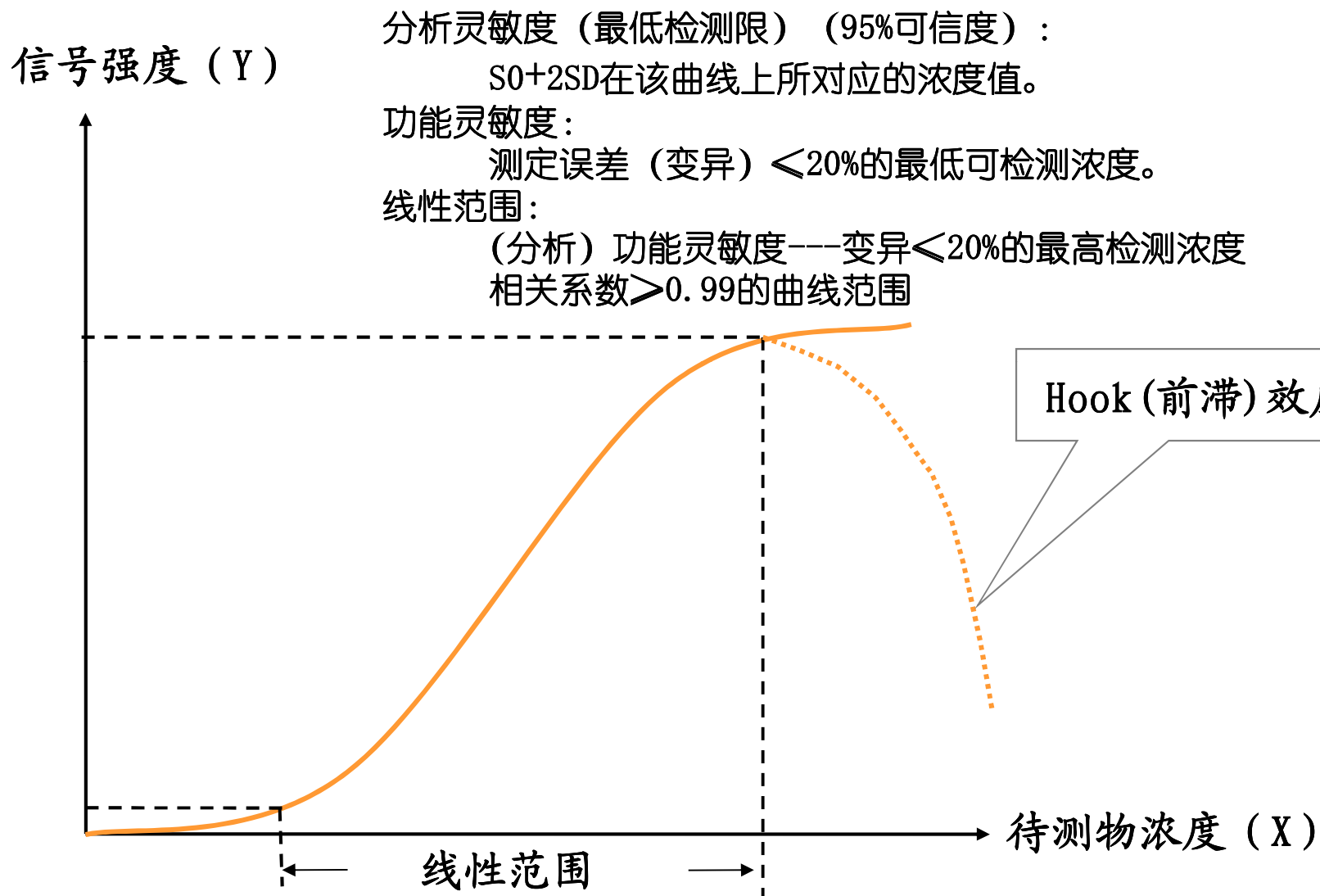
有效期（月）





三种免疫测定技术的成本及费用

夹心法的剂量--反应关系曲线



竞争法的剂量--反应关系曲线

信号强度 (Y)

分析灵敏度（最低检测限）（95%可信度）：

S0-2SD在该曲线上所对应的浓度值

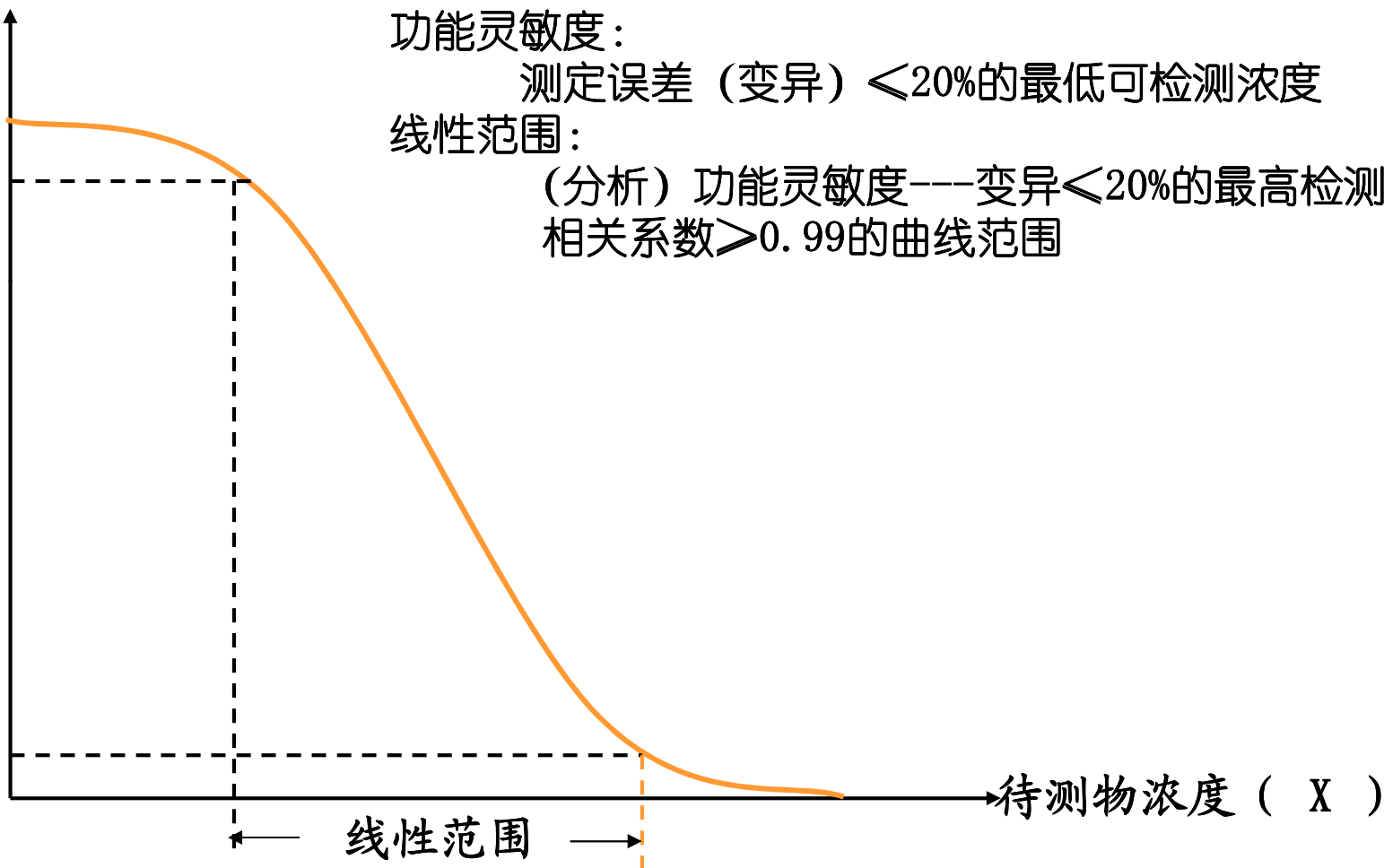
功能灵敏度：

测定误差 (变异) $\leq 20\%$ 的最低可检测浓度

线性范围:

(分析) 功能灵敏度——变异 $\leq 20\%$ 的最高检测浓度

相关系数 ≥ 0.99 的曲线范围



发光免疫分析技术 的现状及应注意的问题

商品化光生物学标记检测技术性能比较

技术类型	标记、反应体系		主要优点	主要不足
化学发光	酶促	过氧化物酶、鲁米诺、氧化剂、增强剂等	测量方式简单（速率法）成本较低、灵敏度较高	工作曲线随时间漂移低端斜率呈非线性下移
		螺旋金刚烷环氧化物、碱性磷酸酶	测量方式简单（速率法）灵敏度较高	
	非酶促	吖啶酯、过氧化氢	灵敏度较高	试剂成本高、发光时间短测量方式复杂（积分法）需原位进样(In Situ Injector)仪器成本及维护费用较高试剂成本较高
时间分辨荧光	铕（Eu）、镝(Dy)、钐（Sm）、铽（Tb）、等络合物脉冲光源激发		灵敏度较高、试剂较稳定	测量方式复杂（脉冲激发、间歇式测量、流动池）仪器成本及维护费用高环境及样品中同类元素可导致本底干扰
电化学发光	钌(Ru)的络合物脉冲电场激发			

- 化学发光: Chemiluminescence
- 时间分辨荧光（也称时间延迟光致发光）Time Resolved Fluorescence (Time Delayed Photoluminescence)
标记物为稀土元素络合物，通常采用解离增强荧光免疫分析 (DEFIA)
- 电化学发光（也称场致发光）Electrochemiluminescence (Electroluminescence) 标记物为稀土元素络合物

商品化发光免疫分析产品的某些宣传误区

某些产品宣称的灵敏度远超过免疫反应的理论极限—— 10^{-19}mol/L
即：六个待测物分子/ 100ul样品

所以，片面宣扬检测技术灵敏度和线性范围的强弱，不仅毫无意义，而且也是荒谬的。

就发光分析而言，制约灵敏度的瓶颈在于抗体亲合力和干扰因素，而不是检测技术。

抗体筛选、干扰屏蔽，生产工艺、管理水平和技术服务是决定产品性能的关键

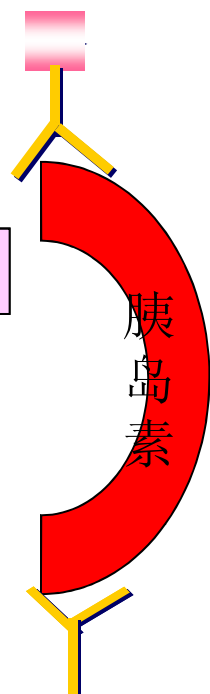
例如：电化学发光TSH检测试剂的分析灵敏度为0.005mIU/L

第四代化学发光TSH检测试剂的分析灵敏度为0.001mIU/L

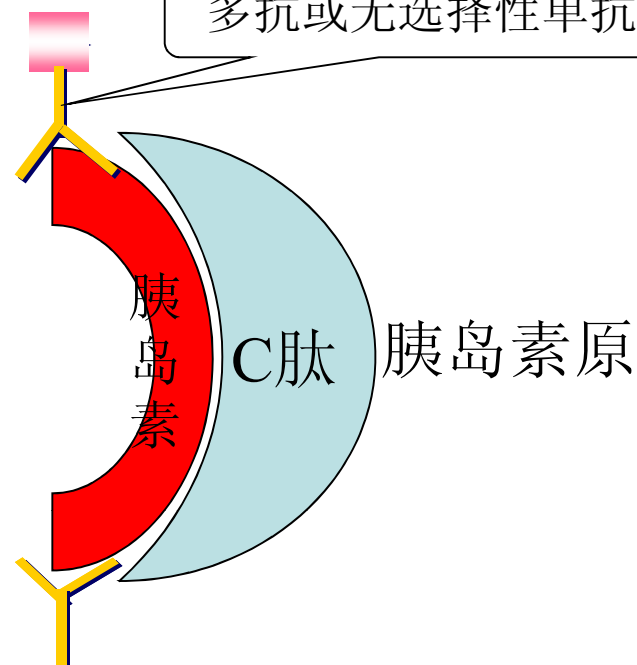
原因在于抗体的亲合力，而不是检测技术。

抗体选择——胰岛素

免疫源性胰岛素

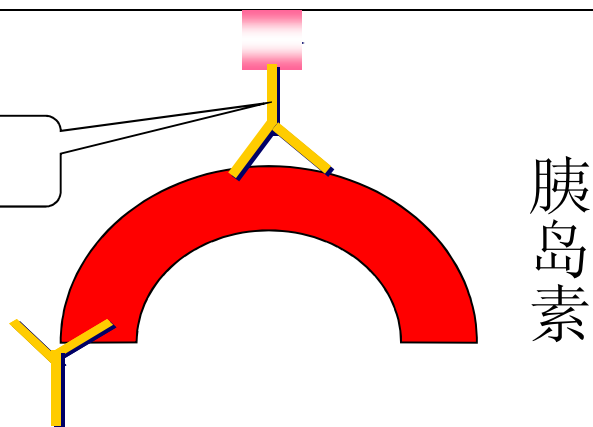


多抗或无选择性单抗



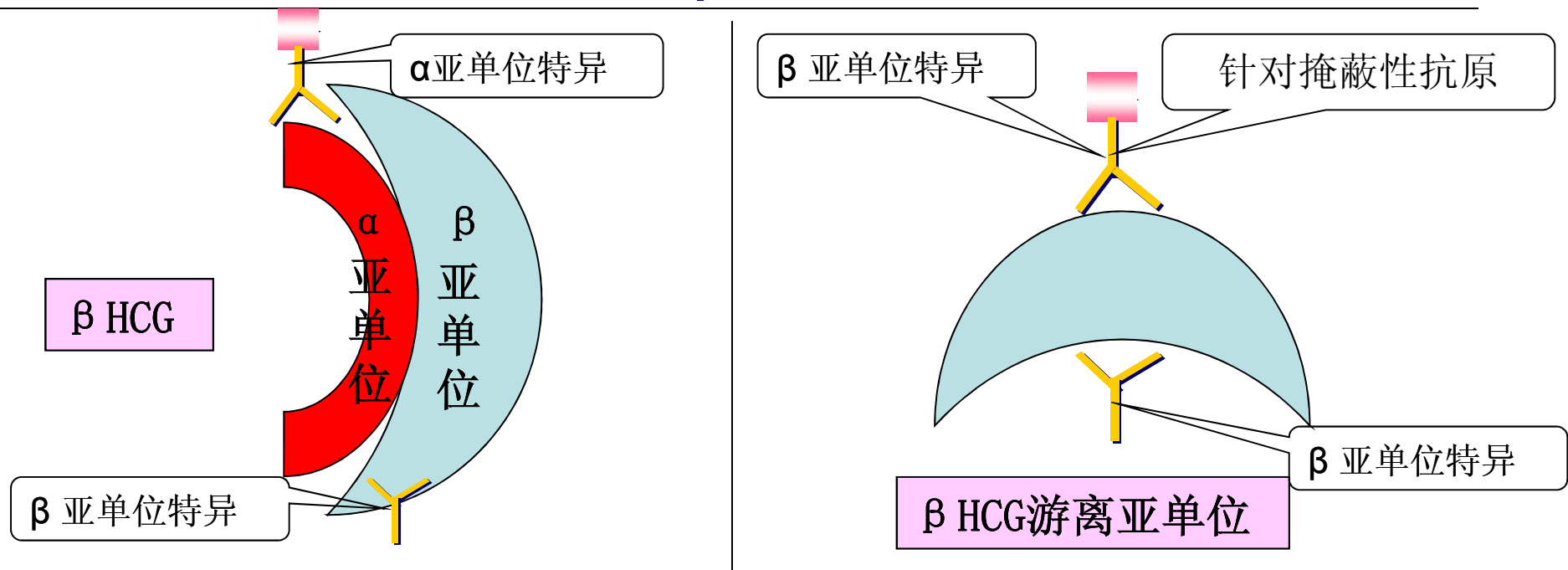
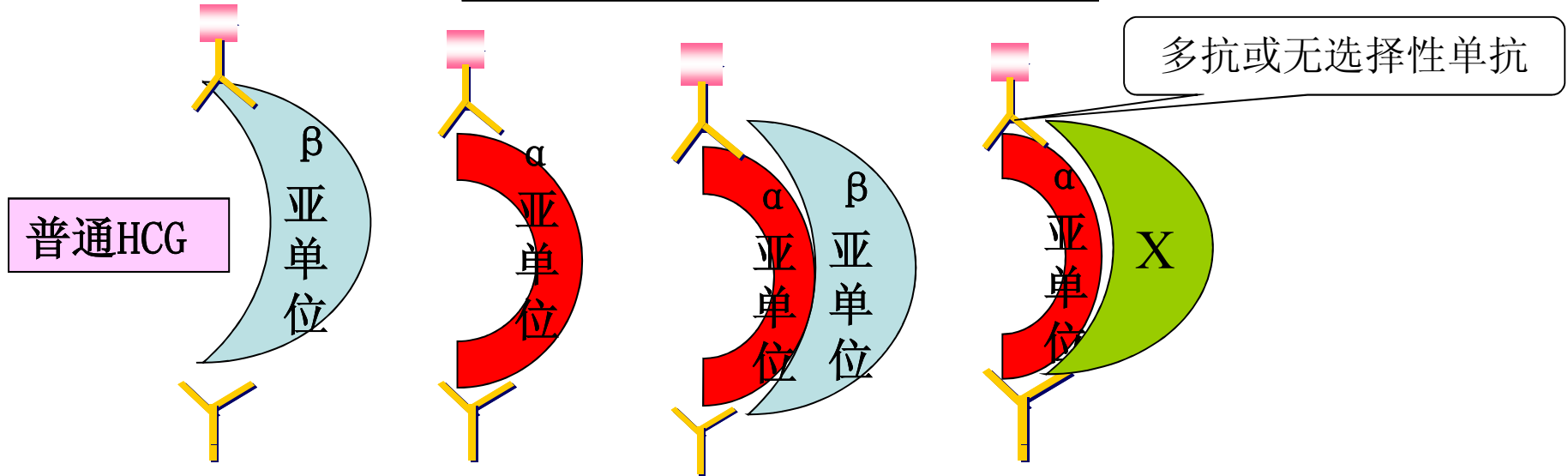
针对掩蔽性抗原

真胰岛素

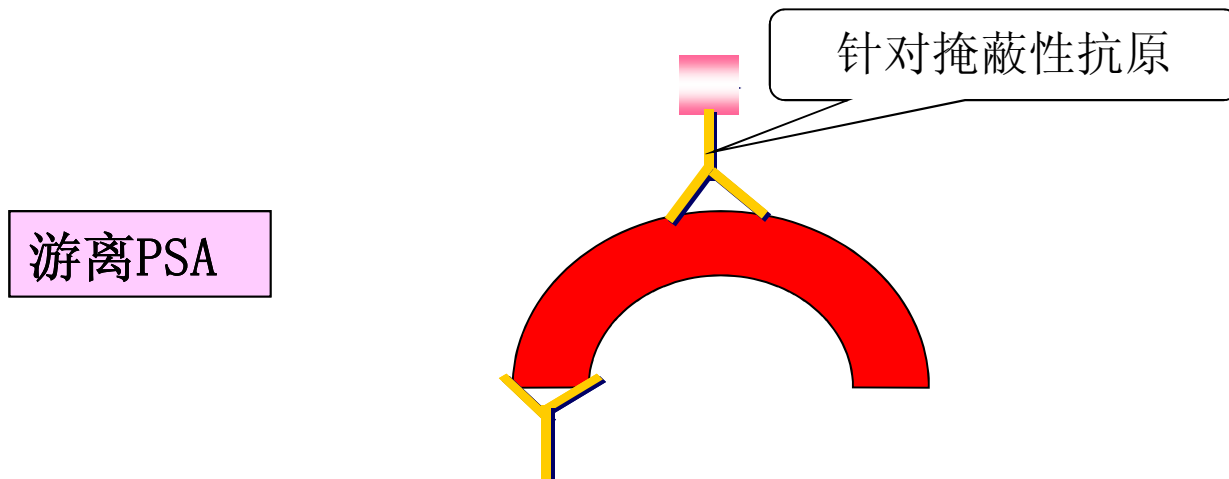
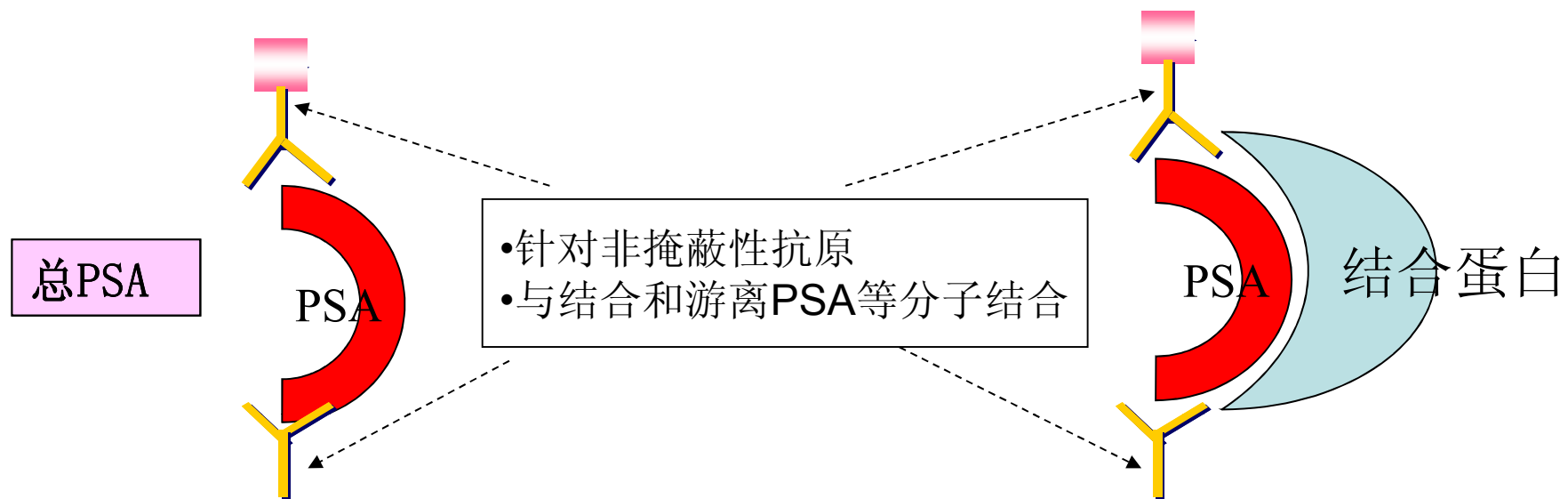


胰岛素

抗体选择——HCG (TSH、PRL、LH、FSH类似)



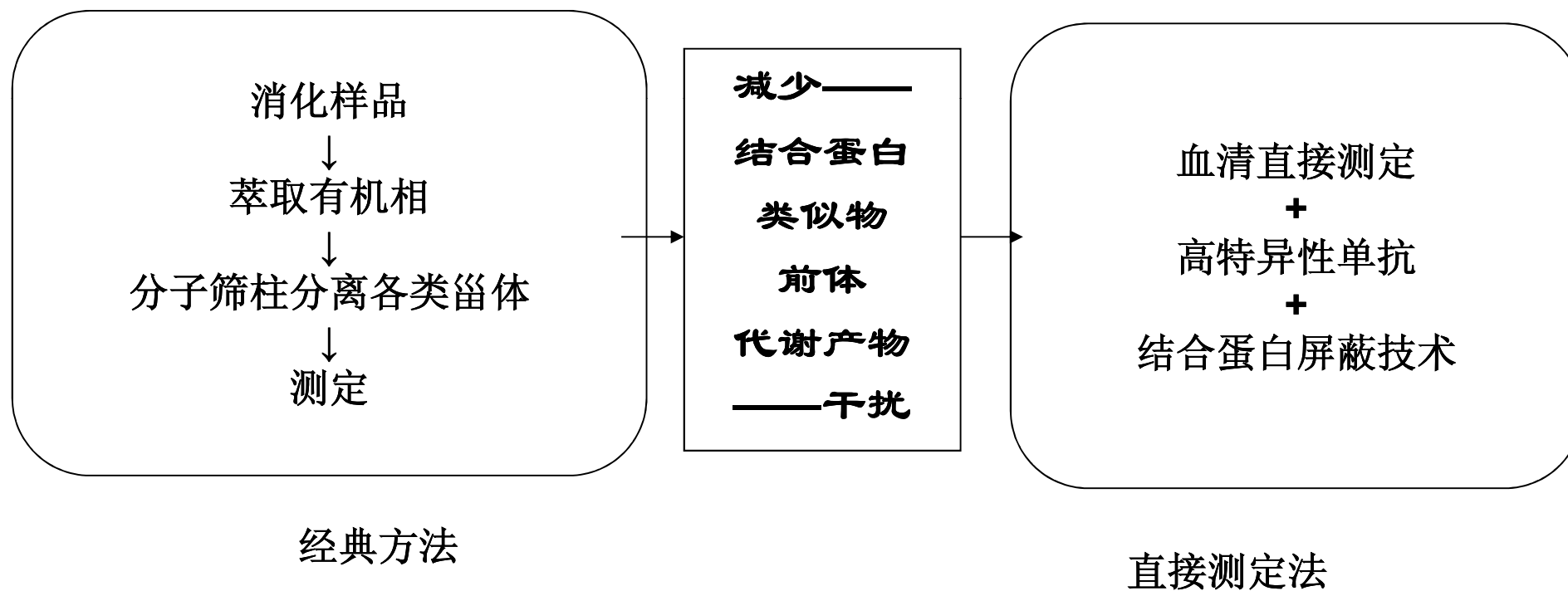
抗体选择——游离PSA



小分子性激素测定方法的进展

男女性激素和皮质激素均来源于共同的前体和合成、代谢途径，其结构也非常相似；而且普遍与血清中的某些蛋白结合。

因此，皮质功能紊乱、肝肾功能紊乱、某些遗传缺陷、血清蛋白异常、服用类固醇药物等均可造成这些激素测定结果的异常。



游离甲状腺激素测定方法的进展

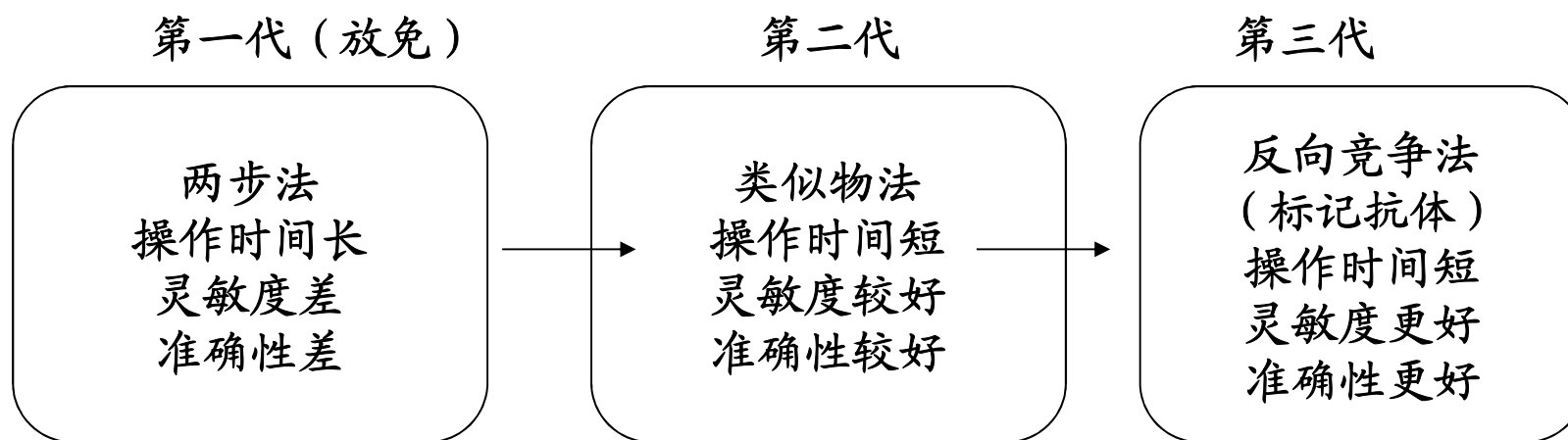
常见甲功指标：TSH、FT₃、FT₄、TT₃、TT₄

对甲亢的诊断价值依次为：TSH=FT₃>FT₄>TT₃>TT₄

对甲低的诊断价值依次为：FT₄=TSH>TT₄>FT₃>TT₃

但FT₃、FT₄灵敏度要求高，且易受干扰

发光法提高了灵敏度，使得其临床应用普遍性超过TT₄和TT₃



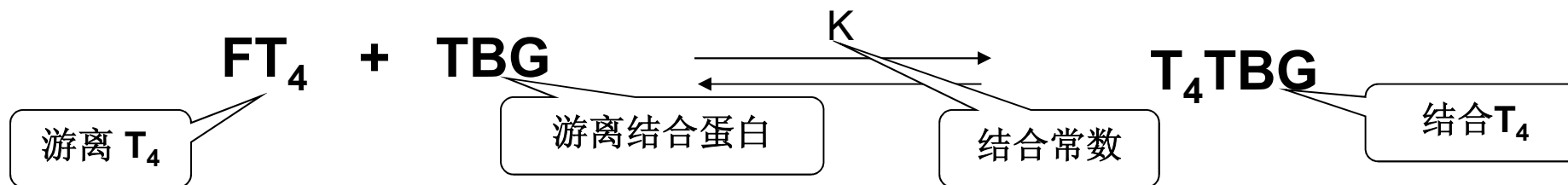
血清FT₃、FT₄试剂盒的发展
(消除结合蛋白对测定的影响)

测定游离激素的参考方法 (“金”标准)：平衡透析法 (透析液过多可导致测值偏高)
操作复杂、采样量大，不适于临床常规

游离激素测定法的试金石——稀释实验

以游离 T_4 为例, 样品稀释20倍以内测值无明显变化

(应扣除实验本身对样品的稀释度并注意基质效应, 建议用6-8%BSA稀释)



其中: $K = \frac{[T_4TBG]}{[FT_4][TBG]}$ (固定常数, 不变)

由于绝大部分 T_4 呈结合状态, 因此: $[T_4TBG] \approx [TT_4]$ (总 T_4); $[TBG] \approx [\text{总TBG}] - [TT_4]$

故, $K \approx \frac{[TT_4]}{[FT_4]([\text{总TBG}] - [TT_4])}$

即, $[FT_4] \approx$

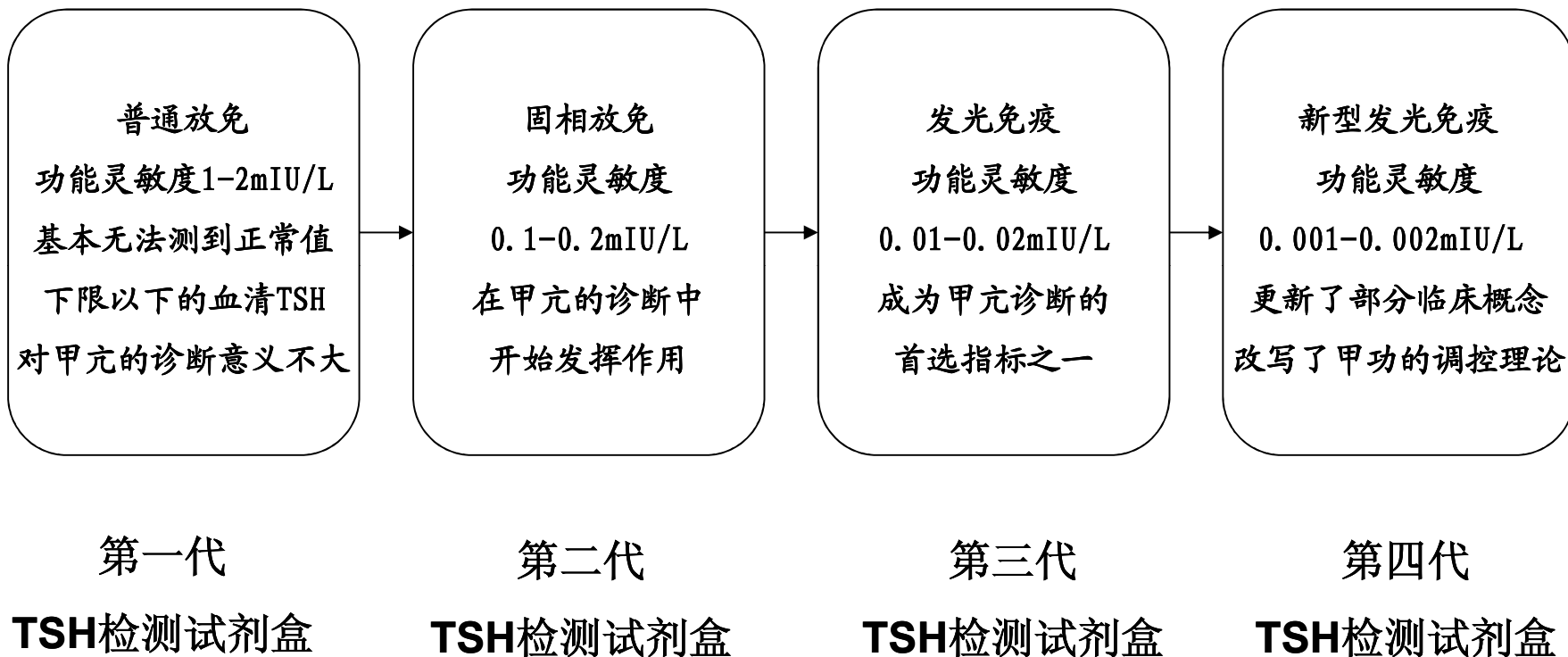
$$\frac{[TT_4]}{K([\text{总TBG}] - [TT_4])}$$

所以, 样品被稀释 N 倍后,

$$[FT_4] \approx \frac{[TT_4]/N}{K([\text{总TBG}]/N - [TT_4]/N)} = \frac{[TT_4]/N}{K([\text{总TBG}] - [TT_4])/N} = \frac{[TT_4]}{K([\text{总TBG}] - [TT_4])}$$

相 ↑ 同

发光技术—— 临床免疫分析划时代的进步

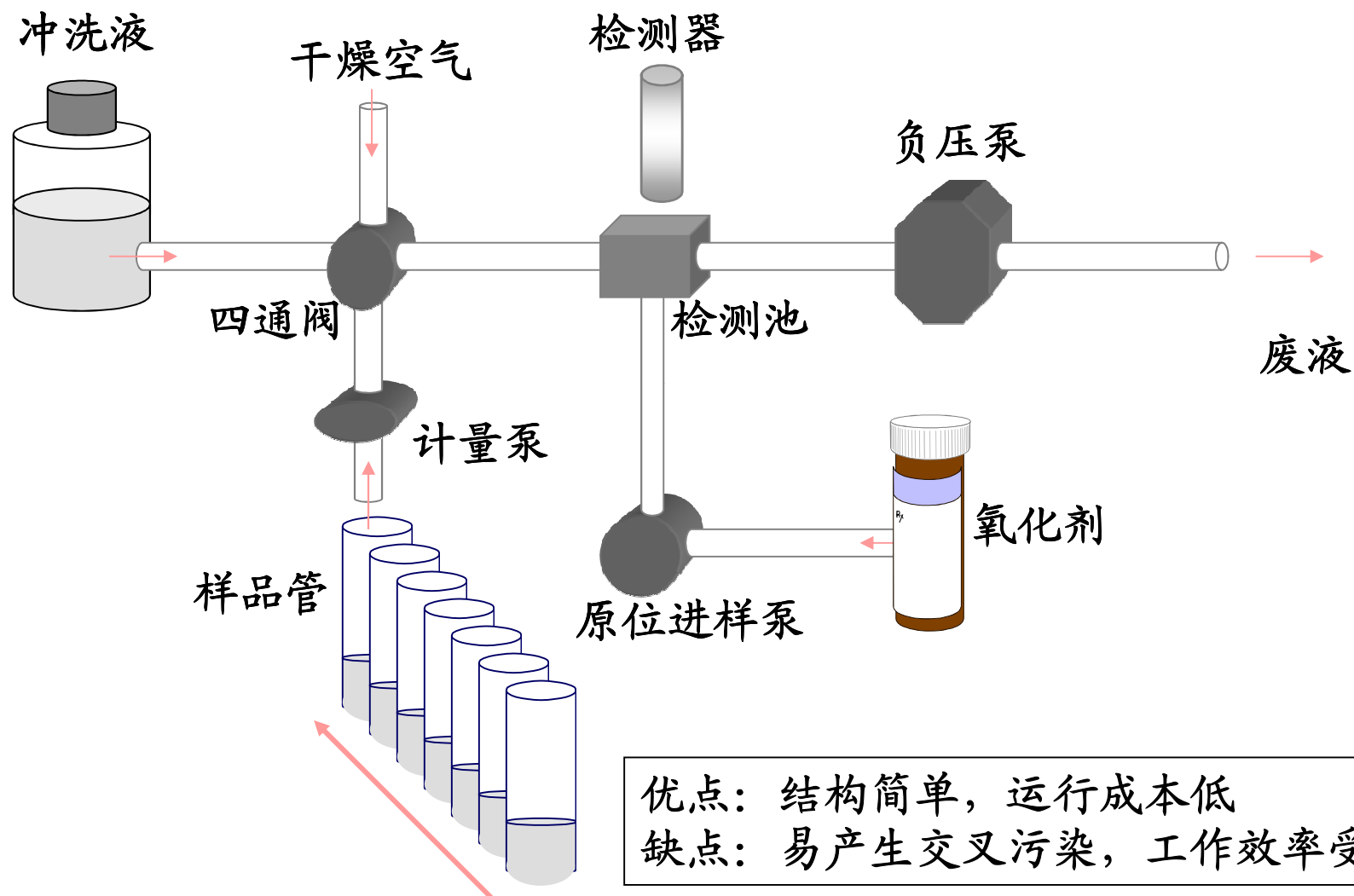


以TSH(促甲状腺素)为例

目前商品化发光免疫分析产品的几个特点

- ◆ 大多采用全自动工作方式，部分采用微孔板半自动方式
- ◆ 多采用磁性或非磁性微粒包被，以增加表面积，使反应时间缩短
- ◆ 使用内建标准曲线加校正的办法产生工作曲线
- ◆ 部分产品采用流动池测定方式(适合于闪光型发光或电化学发光)

流动池检测方式示意图



标准化——自动化免疫分析系统对试剂盒的技术要求

- 对仪器的要求：结构简单、运行效率高、故障率低、维护费用少
- 对试剂盒的相应要求：标准化、成套化、简单化，具体为：

反应/洗涤/测定条件一致；操作步骤少且趋于一致

反应时间短；

通用成分多、专用成分少

措施

- 统一标记/检测系统
- 重新优化并统一反应/洗涤/测定条件和操作步骤
- 改变包被模式：

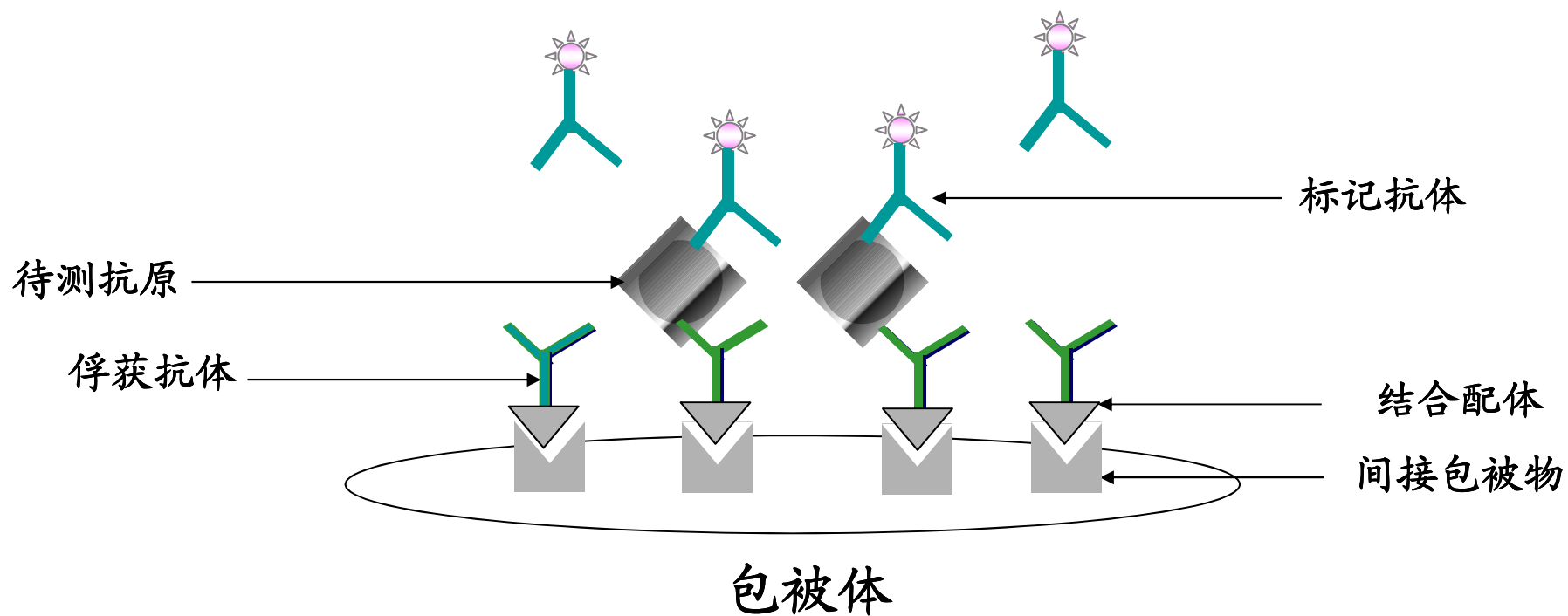
微粒包被：反应效率↑，反应时间↓；散射干扰↑、离子干扰↑（磁珠）

间接包被：反应效率↓，反应时间↑；散射干扰↓、检测效率↑

注意内源性物质干扰！（生物素-亲和素系统）

微粒+间接包被：

间接包被夹心法原理

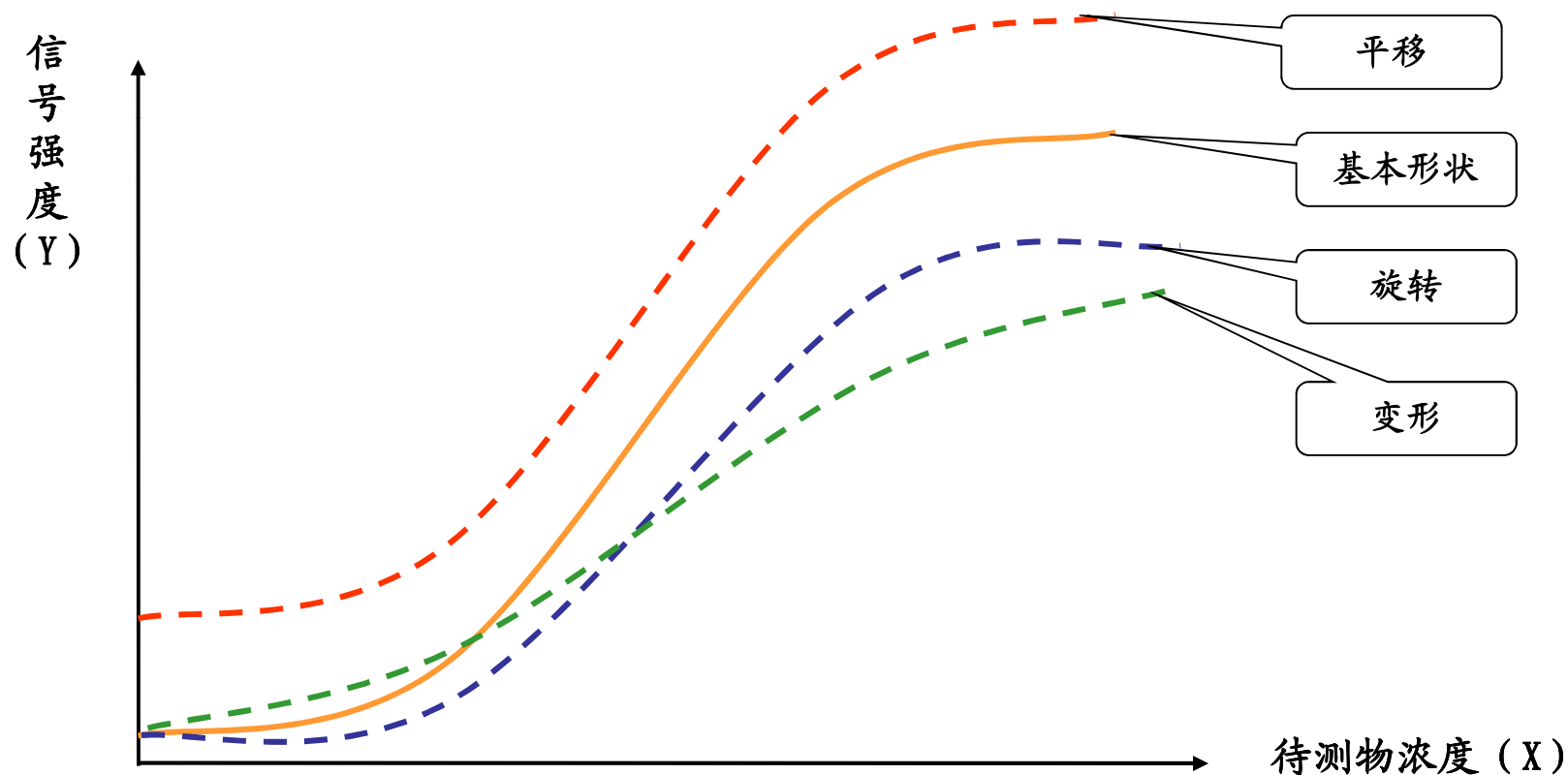


特点：所有试剂盒均采用同一包被物和结合配体

工作曲线的特点与校正原理

工作曲线四要素

- 拟合方式：描述曲线基本形状，取决于实验模式和剂量-效应关系走向。
- 截距：描述曲线位置，修正依据为本底信号和系统误差，修正后导致曲线平移。
- 斜率：描述曲线俯仰角度，修正依据为结合/反应/检测效率。修正后导致曲线旋转。
- 变形因子：调整曲线形状（取决于抗体活性和特异干扰因素变化）



常见拟合方式的性质及其参数的含义

拟合方式	拟合方程	剂量-反应关系	性质	斜率	截距	变形
线性	$Y=A*X+B$	$Y=A*X+B$	直线	A	B	/
对数	$\text{Log}[(Y-N)/(Y_0-N)]$ $=A*\log X+B$	$Y=(Y_0-N) * 10^{B*X^A} + N$	A=1 直线 A≠1 曲线	$(Y_0-N) * 10^B$	N	A
log-Logit	$\ln[P/(1-P)] = A*\ln X+B$ $P=(Y-N)/(Y_0-N)$	$Y=(Y_0-N) * e^{B*X^A} / (1 + e^{B*X^A}) + N$	曲线	Y_0-N	N	A B
四参数	$Y=(D-C)/[1+(X/A)^B]+C$	$Y=(D-C)/[1+(X/A)^B]+C$	曲线	D-C	C	A B
三次曲线	$Y=A*X^3+B*X^2+C*X+D$	$Y=A*[X^3+(B/A)*X^2+(C/A)*X]+D$	曲线	A	D	B/A C/A

X: 待测物浓度;

Y: 信号强度;

Y₀: 零浓度样品信号强度;

N: 非特异结合信号强度 (**NSB**)

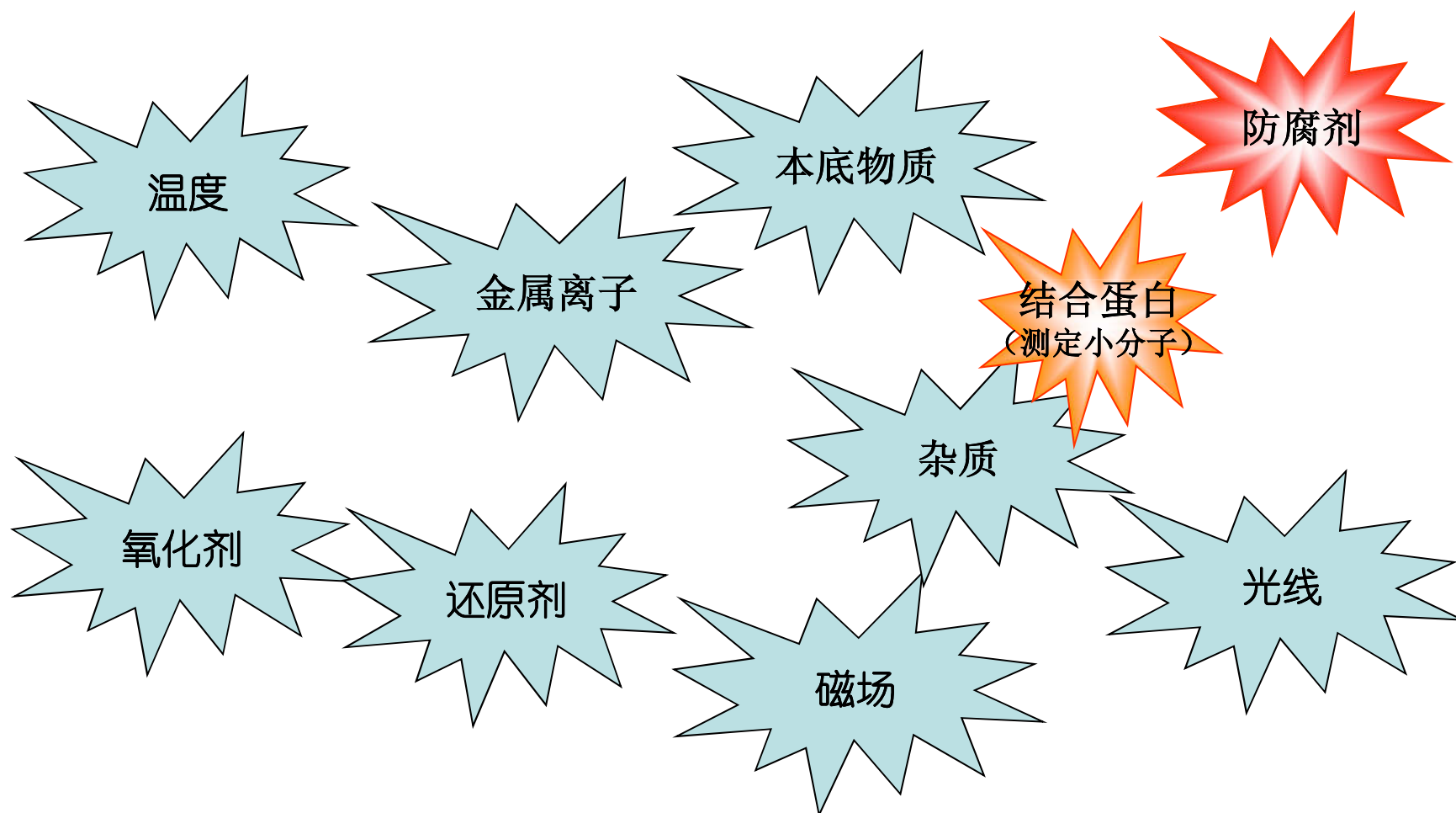
漂亮的拟合曲线决不是实验结果准确的唯一保证!!!

定值/非定值质控血清才是监控数据可靠性的主要手段! (谨防作弊软件)

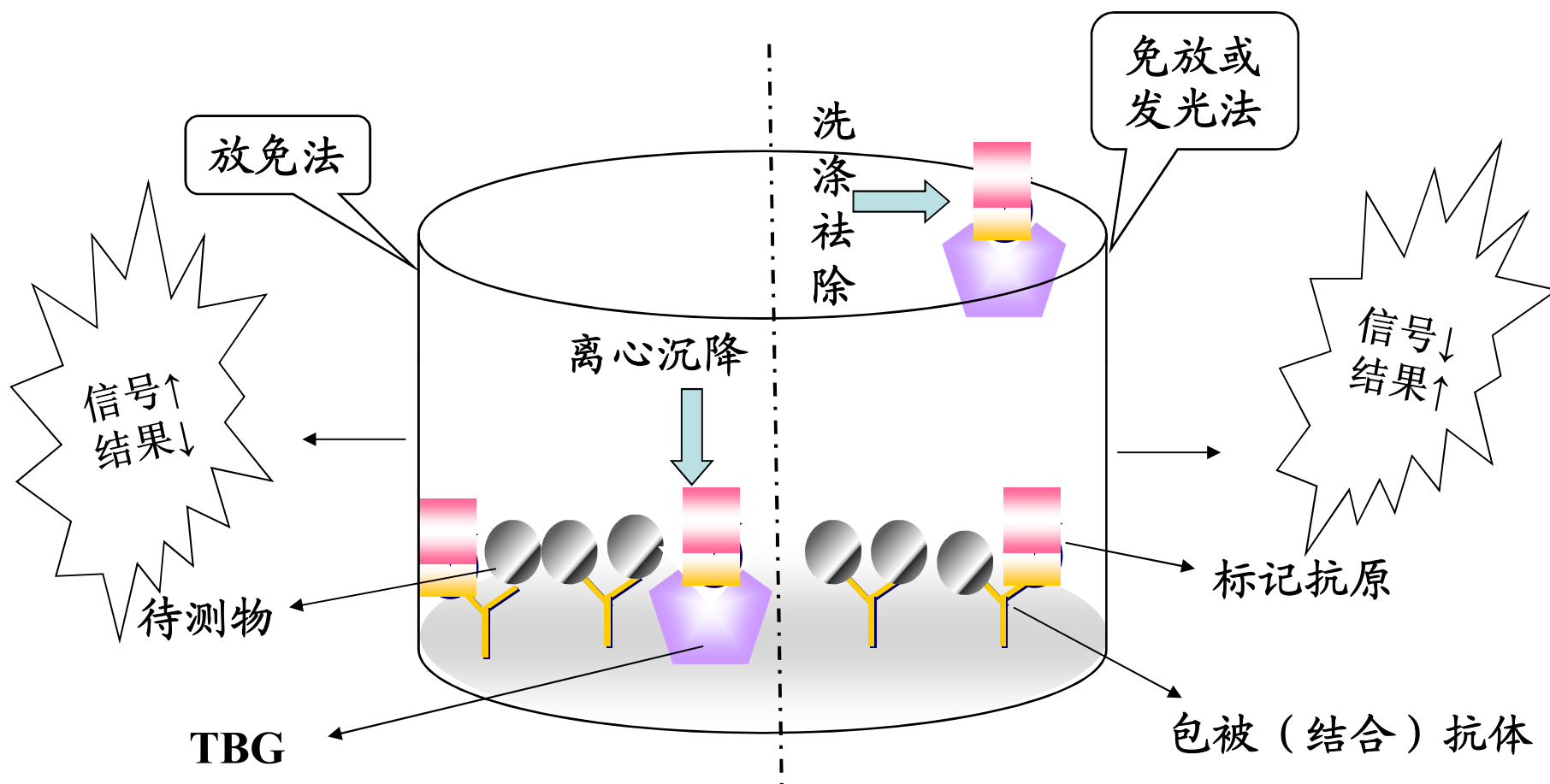
使用商品化发光免疫分析产品 可能遇到的几个问题

- ◆ 与以往方法（放免等）在检测指标的正常值及临床意义上的差异。
如：免疫源性胰岛素与真胰岛素、HCG、性激素等
- ◆ 采用不同的单抗或多抗时检测结果也有较大差异。
（单抗特异性好，受干扰小，因此测值低）
- ◆ 不同厂家产品测定结果之间一致性差（未与国家标准品比对）。
- ◆ 所使用的内建标准曲线结合校正的方法不尽完善。
- ◆ 部分产品不显示原始数据，无法监控其准确性。

免疫分析结果的干扰因素



同一干扰因素对不同检测方法的不同影响



以甲状腺素结合蛋白 (TBG) 干扰竞争法测定T3为例

使用商品化发光免疫分析产品 必须做好的几个工作

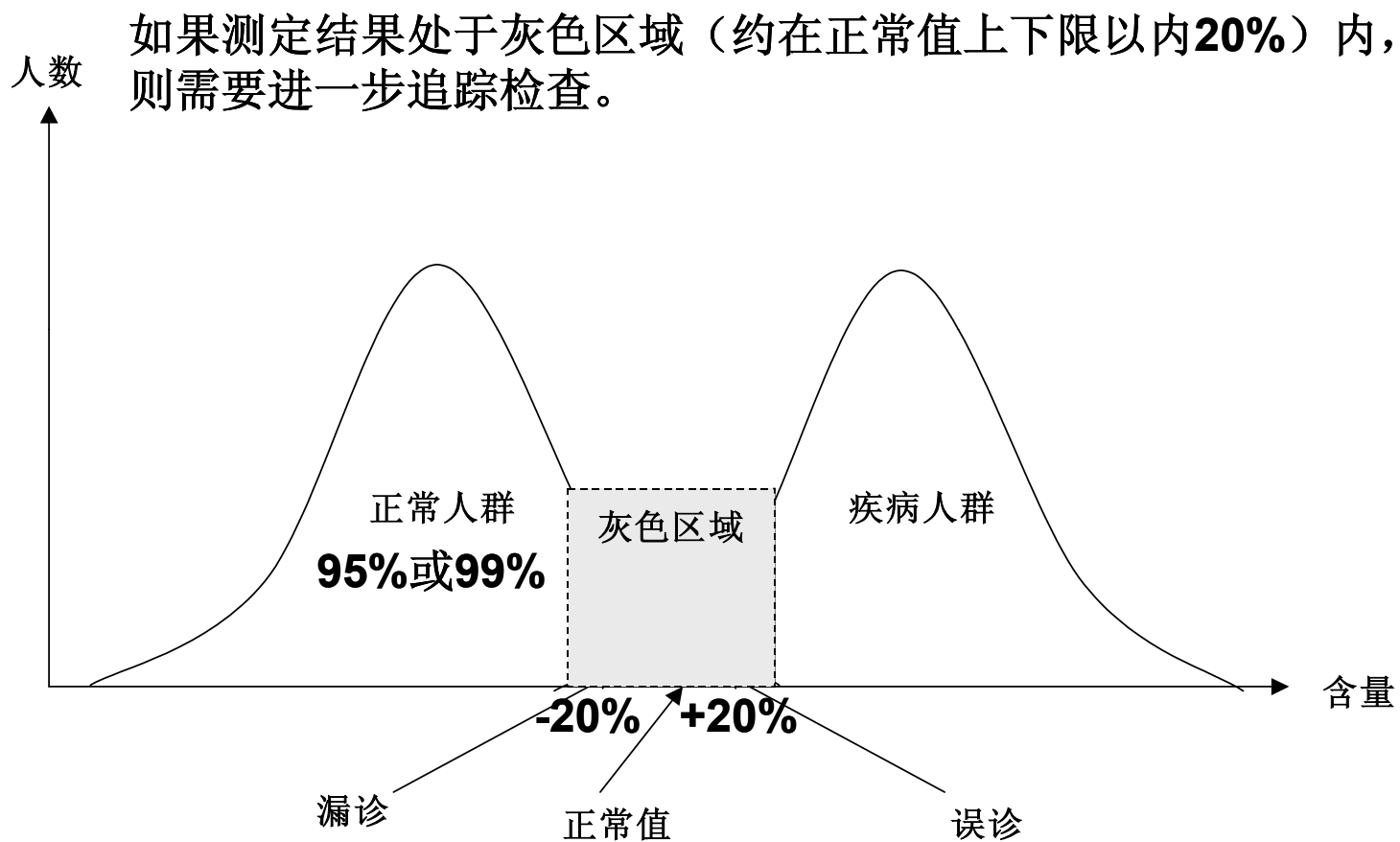
- ◆ 在厂家提供的数据库基础上，自行建立正常参考值系统。
- ◆ 明确各个试剂盒的特异性及交叉反应情况
 如：小分子激素之间，以及与自身前体或代谢物之间的交叉
 胰岛素与C-肽、胰岛素原之间的交叉
 FSH、LH、HCG之间的交叉。
- ◆ 充分利用现有国标参考品校正结果（注意防腐剂干扰）
 （可以从国家药品生物制品检定所或临床检验中心得到）
- ◆ 自行建立多点质控（2-3点）监控每次实验的准确性。

尽可能避免干扰因素

采样：清洁样品管（防止还原剂干扰）、不使用酶抑制剂、及时送检

实验室：恒温、避免强光和强磁场、严格操作规程、及时维护、报修

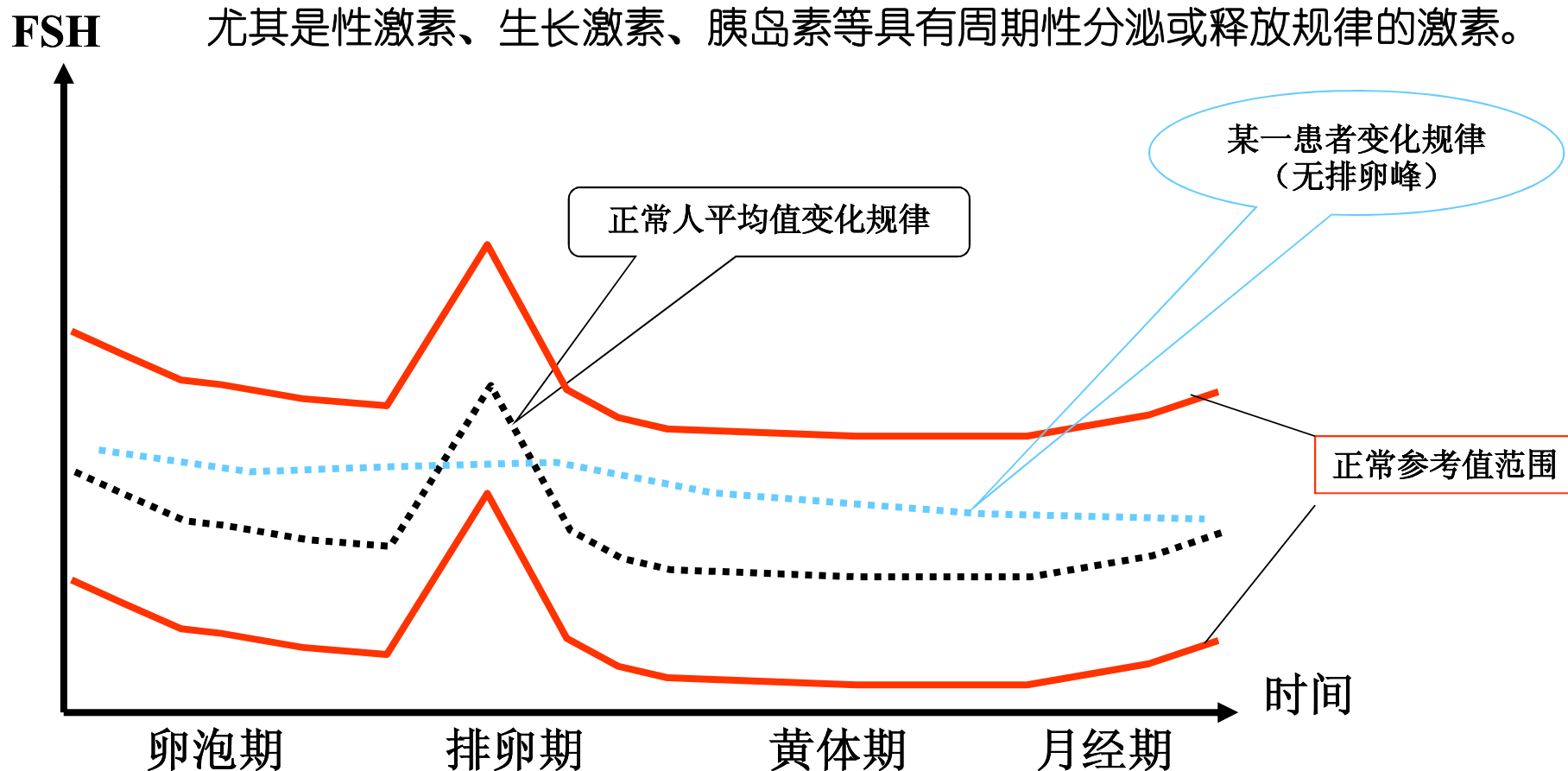
正常值参考的意义及灰色区域的存在



自身基础数据 ——最佳“正常参考值”

对于患者来讲，最佳的参考值是自己以往的测定数据，即自身对照；
因此积累病人的基础数据非常重要。

尤其是性激素、生长激素、胰岛素等具有周期性分泌或释放规律的激素。



低发病率疾病的筛查指标用于普通人群 产生的巨大“困惑”

灵敏度（真阳性率）：对真阳性病例的检出率，即=检出阳性病例数/总受检阳性病例数

特异度（真阴性率）：对真阴性病例报阴性的比率，即=报阴性结果数/总受检正常人数

若某肿瘤筛查法的指标达到理论极限，即灵敏度**100%**，特异度**99%**（正常值为**99%**可信限）而肿瘤的发病率多在十万分之三十以下，因此其应用于正常人群体检时，总阳性病例可能为：

$$30 + (100,000 - 30) \times (1 - 99\%) = 30 + 999.7 \approx 1030;$$

其中，假阳性率= $999.7 / 1030 \times 100\% = 97\%$

绝大部分为假阳性！！！！

因此，筛查指标的意义在于高危人群的早期预警，而决不是疾病确诊！

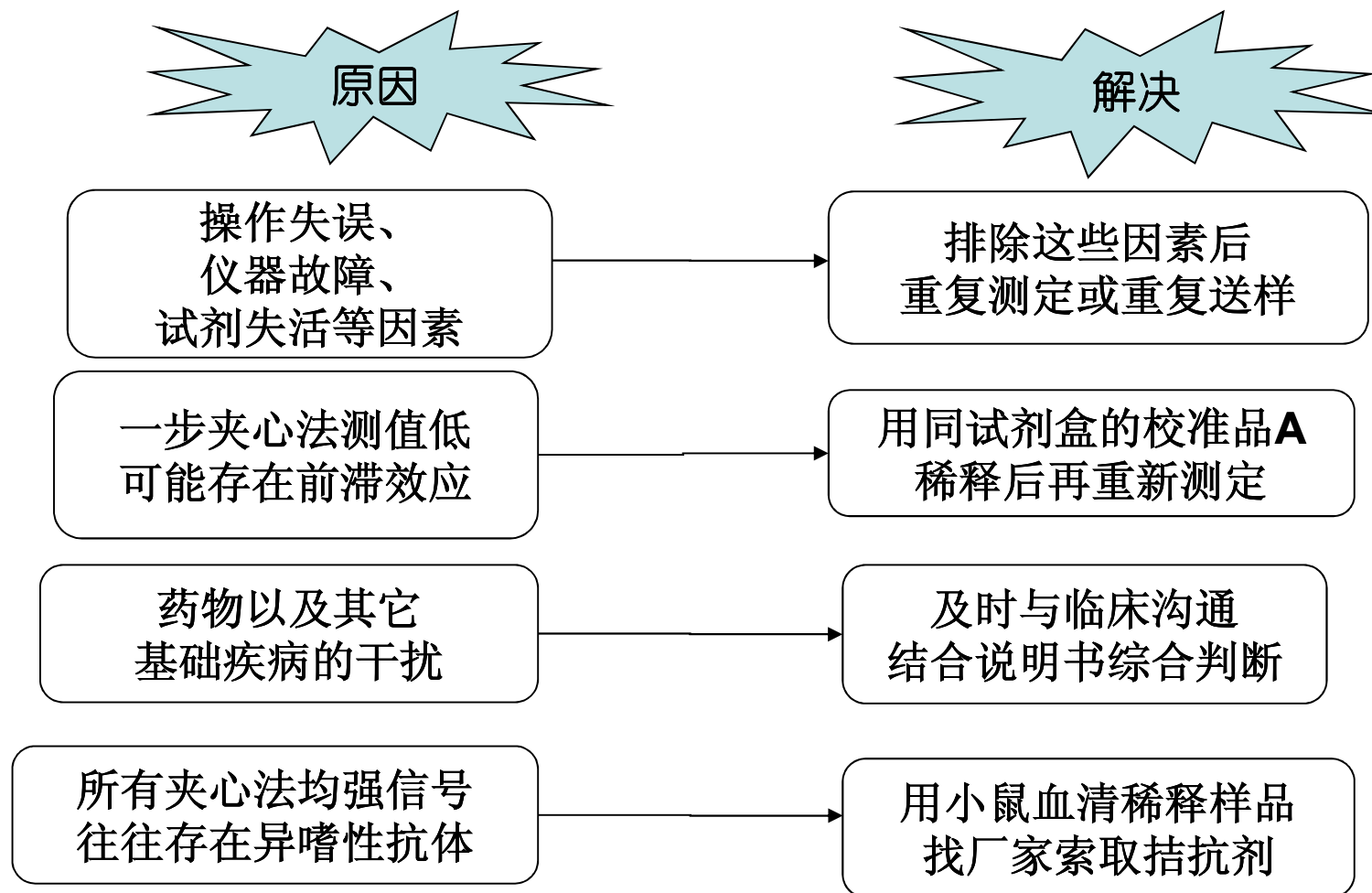
改进办法：采用多个厂家的产品或多指标联合测定（艾滋、肿瘤）

串联实验：多个检测均阳性才定为阳性，假阳性（误诊）↓，假阴性（漏诊）↑

并联实验：一个指标阳性就定为阳性，假阳性（误诊）↑，假阴性（漏诊）↓

取舍原则：分别对误诊和漏诊带来的医学、经济、社会、伦理风险综合分析平衡

化验结果与临床不符的原因



由于个体差异或不明干扰因素的存在，总有少数病例的化验结果与其临床表现不符

不同实验方法，
或同一方法的不同厂家产品之间，
其测定结果和临床正常值都会有所差异



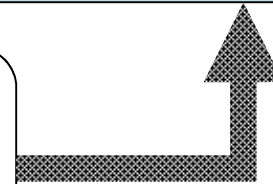
在厂家提供的正常参考值基础上
建立自己的正常参考系统

不同实验室环境和不同人群条件下，
其测定结果和临床正常值也会有所不同



及时采样、送检，
实验室及时完成化验，
严格按照试剂盒说明书要求存放

待测物的降解及其与血清蛋白结合状态的改变
检测结果受标本存放时间及条件的影响

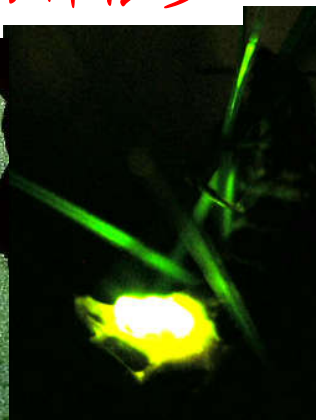
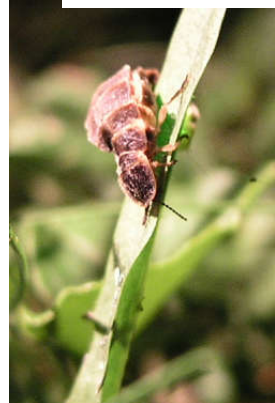
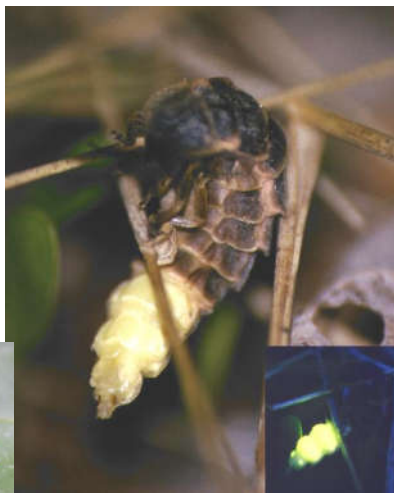
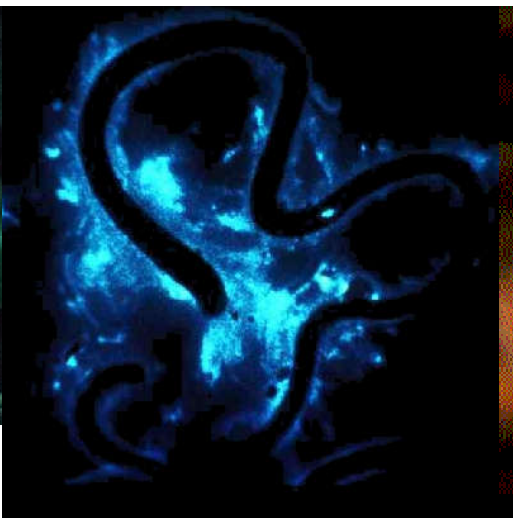
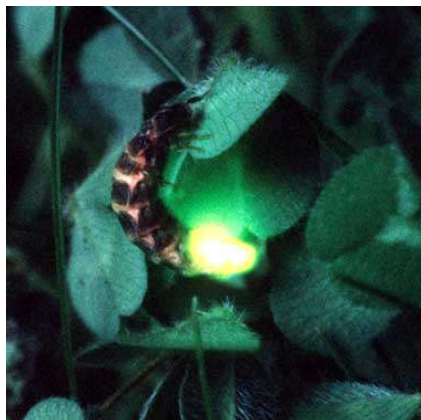


**ATP生物发光测定——
临床微生物快速分析的一场革命**



萤火虫发光现象最为人熟知

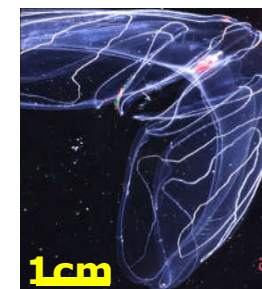
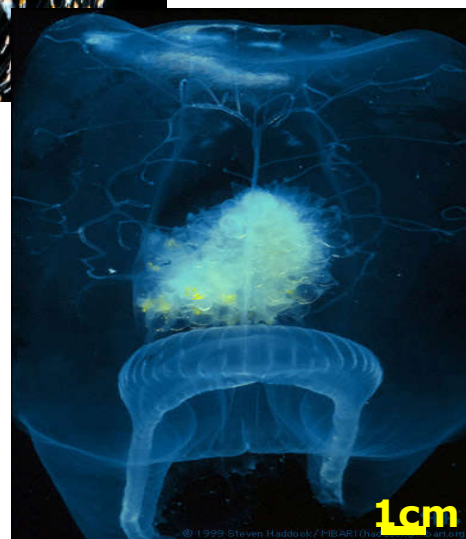
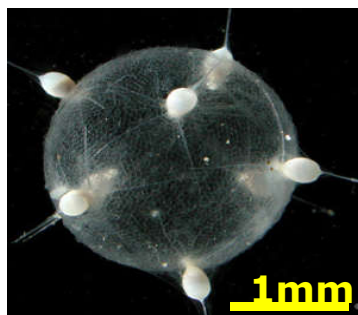
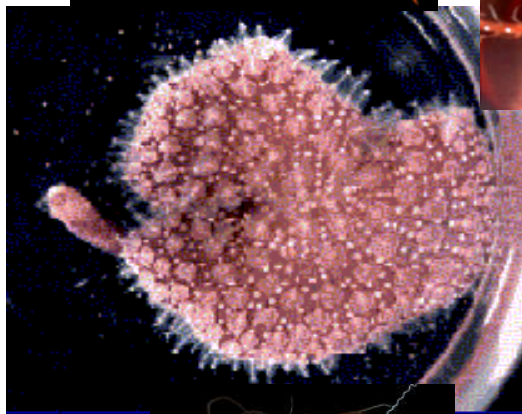




其实，陆生发光物种很多



海洋中的发光物种更是不胜枚举



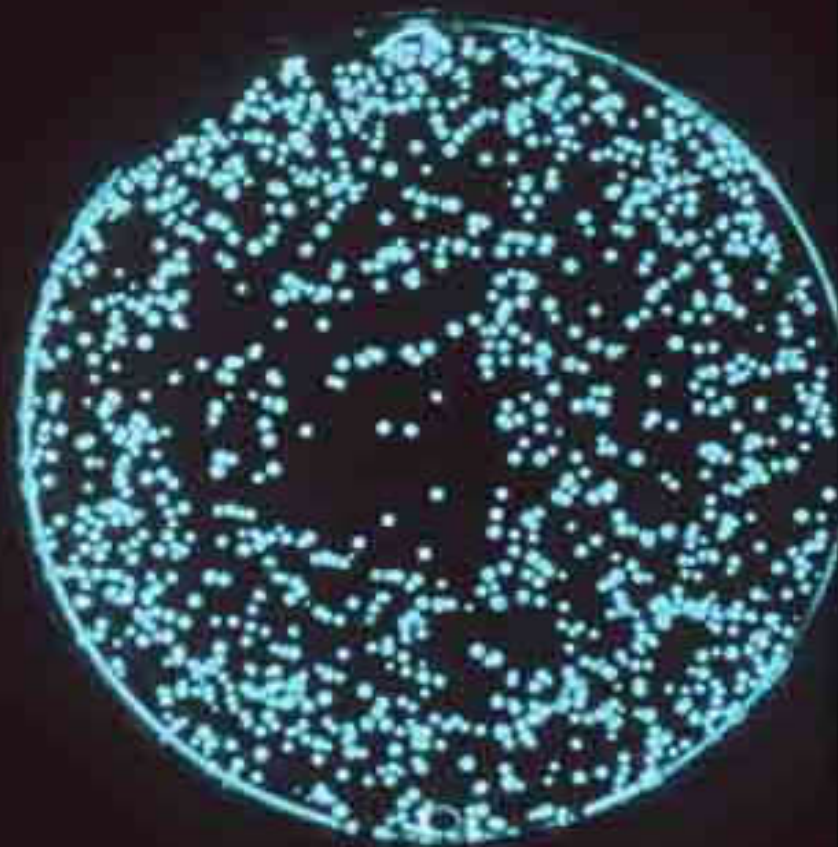
发光鱼类



A photograph of a dark, rocky coastline at night. The sky is a deep, dark blue, and the water is black. Several bright, glowing blue patches are visible on the water's surface, indicating bioluminescent organisms. The rocks in the foreground are dark and silhouetted against the lighter sky. The overall scene is mysterious and serene.

发光浮游生物



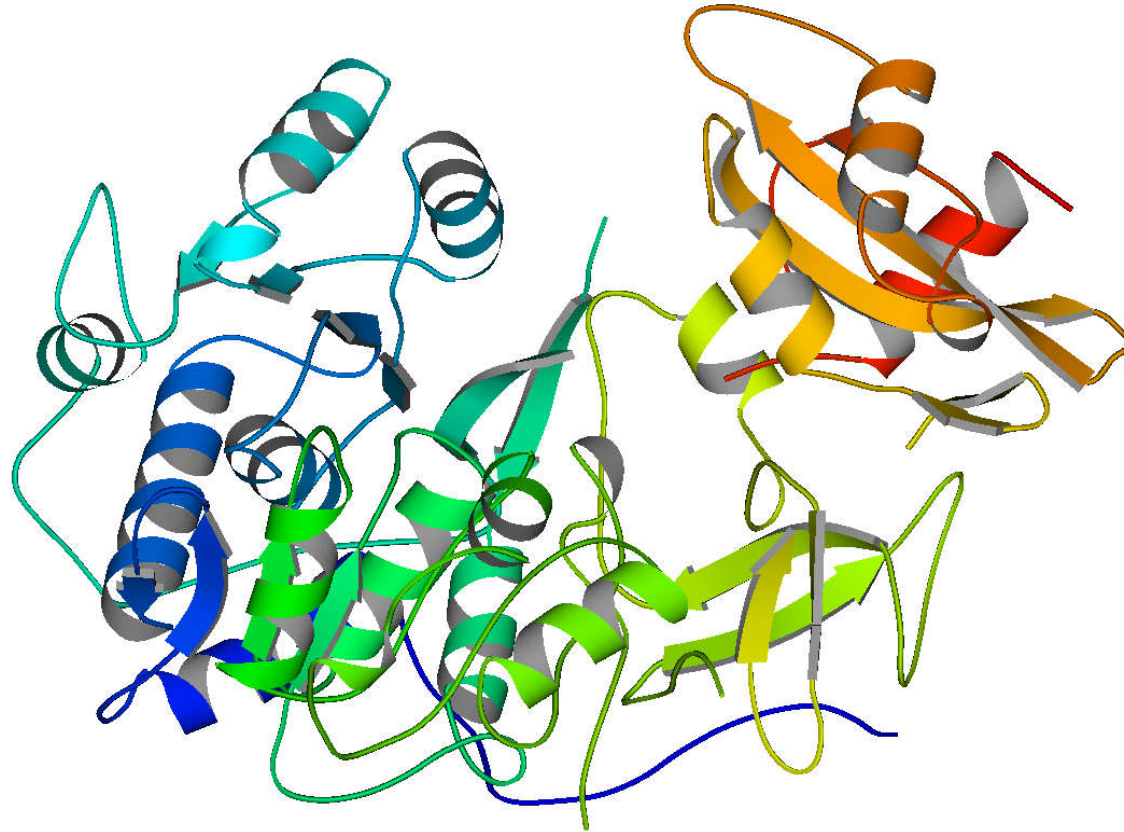
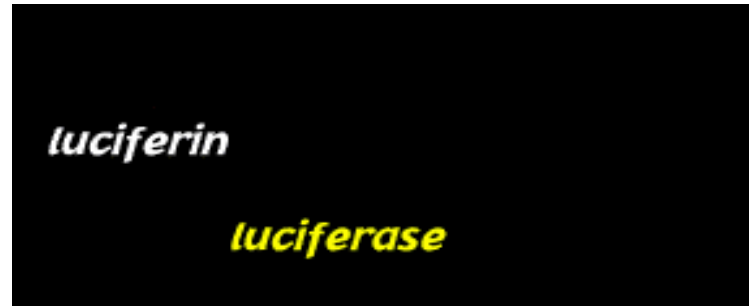


发光微生物



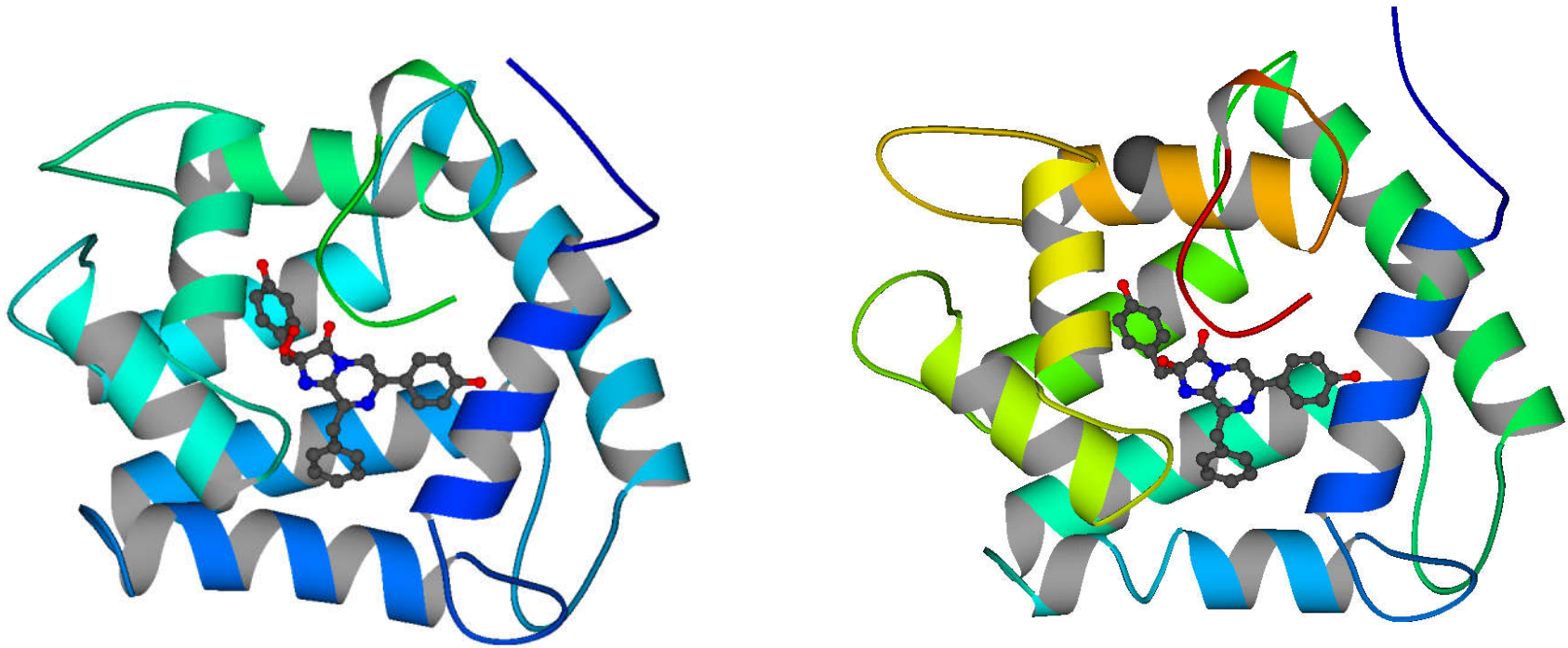
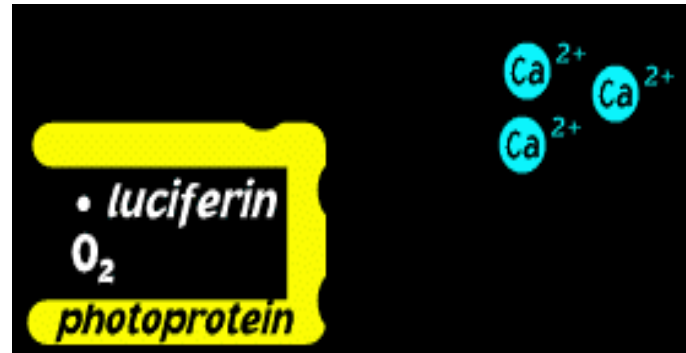
虫荧光素酶（LUC）

活性位点在两个结构域（domain）之间，底物为虫荧光素（Luciferin）及ATP, 并需要 Mg^{2+} 参与



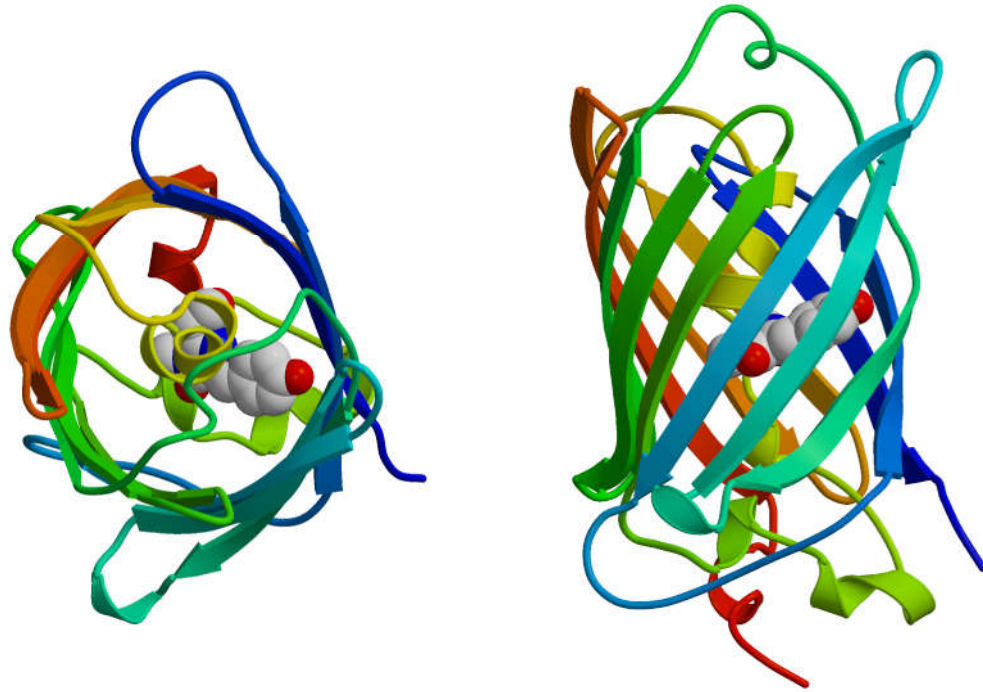
水母素 (Aequorin) 及奥贝林 (Obelin)

含腔肠素 (Coelenterazine) 过氧化物生色团, 因此只需要 Ca^{2+} 激活



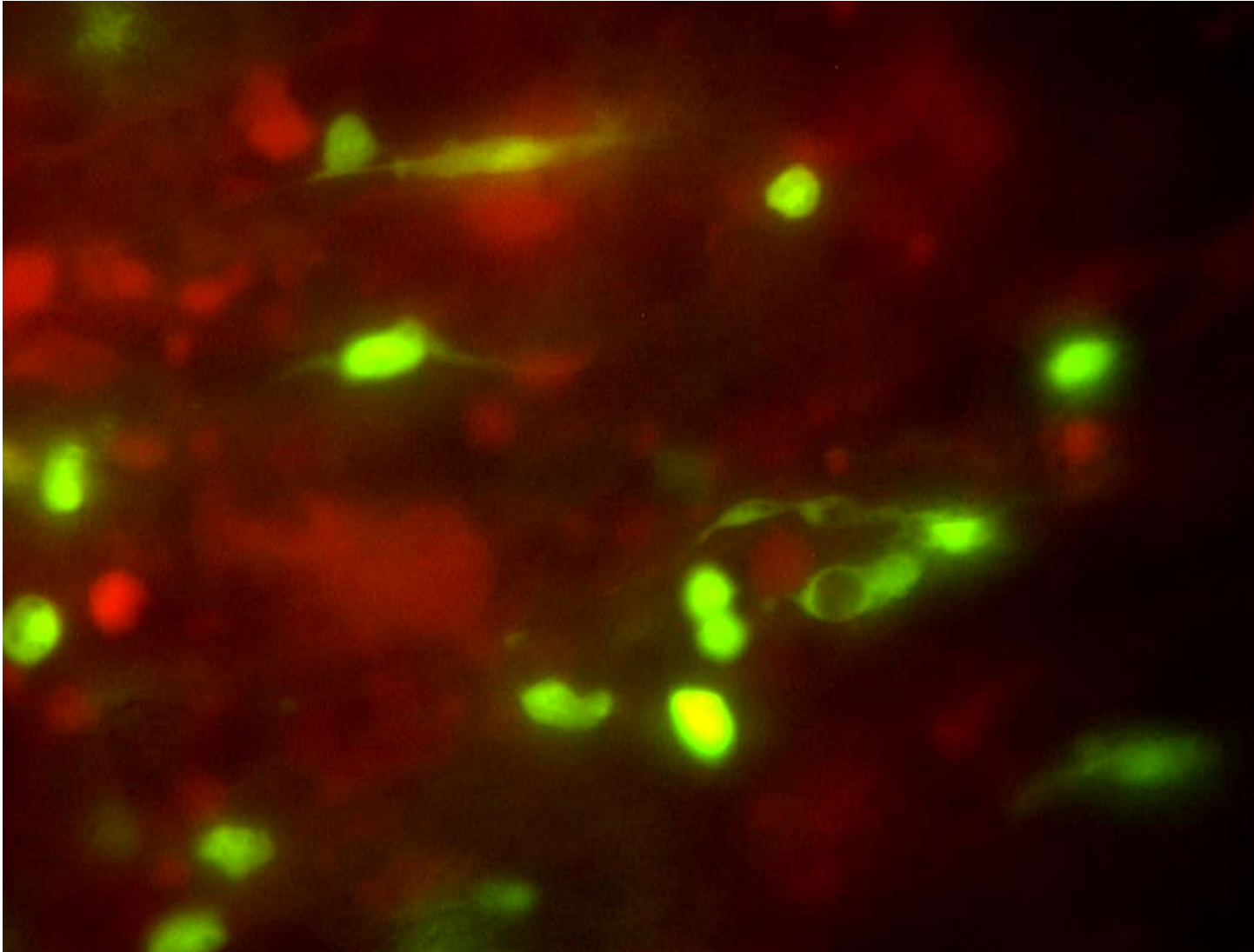
绿色荧光蛋白（GFP）

来自水母，以共价结合自催化方式形成发色团，通过接受其它分子提供的能量产生荧光，其机理被称为生物发光共振能量转移（**Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BRET**），类似的荧光蛋白还有橙色荧光蛋白（**OFP**）、黄色荧光蛋白（**YFP**）、红色荧光蛋白（**RFP**）、蓝绿荧光蛋白（**CFP**）等



生物发光技术在生物医学领域内的应用

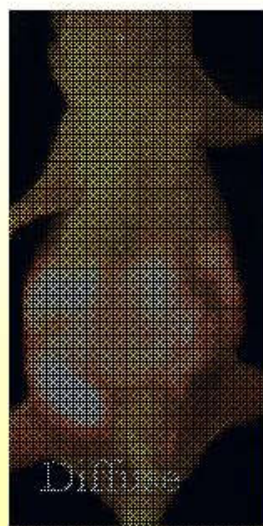
（一）组织内部特定物质的成像



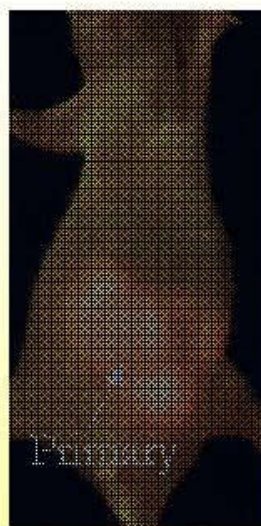
（双色荧光蛋白成像：红色显示肿瘤细胞、绿色显示新生血管内皮细胞）

新型肿瘤辅助化疗药物——口服胞嘧啶类似物（CS-682）疗效观察 裸鼠肿瘤接种实验

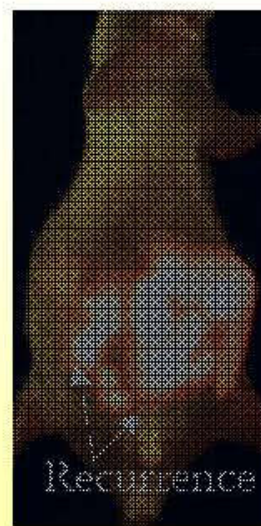
Day 45



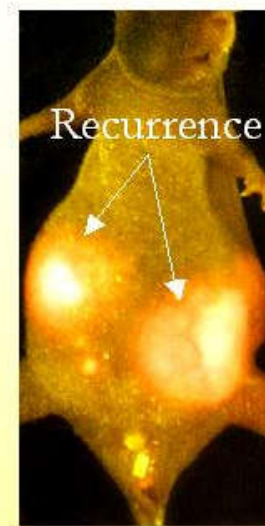
对照组



CS-682
50mg/kg

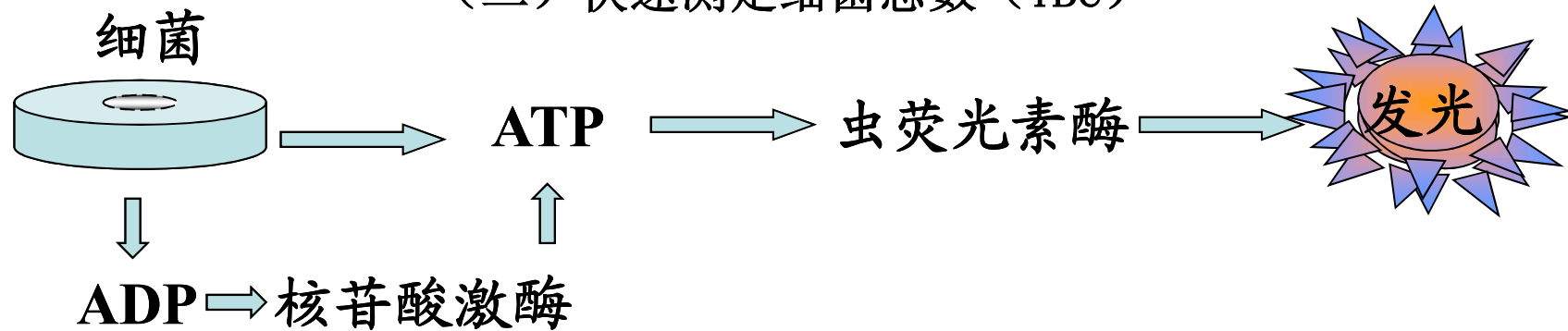


肿瘤
切除



肿瘤切除
+CS-682

(二) 快速测定细菌总数 (TBC)



目前的主要进展如下：

- 解决了新鲜食品，如肉、蛋、奶及蔬菜水果的检测问题；方法是用滤膜或特殊试剂去除标本中天然存在的内源性ATP，然后使用裂解剂释放细菌内部的ATP并测定发光。
- 建立了稳定的液态ATP标准，生产出了可抵抗细胞裂解液中表面活性剂的荧光素酶。
- 用滤膜浓缩法和免疫捕获法进一步提高检测灵敏度和特异性。
- 派生出一些可进一步提高灵敏度和抗干扰性的变型技术：

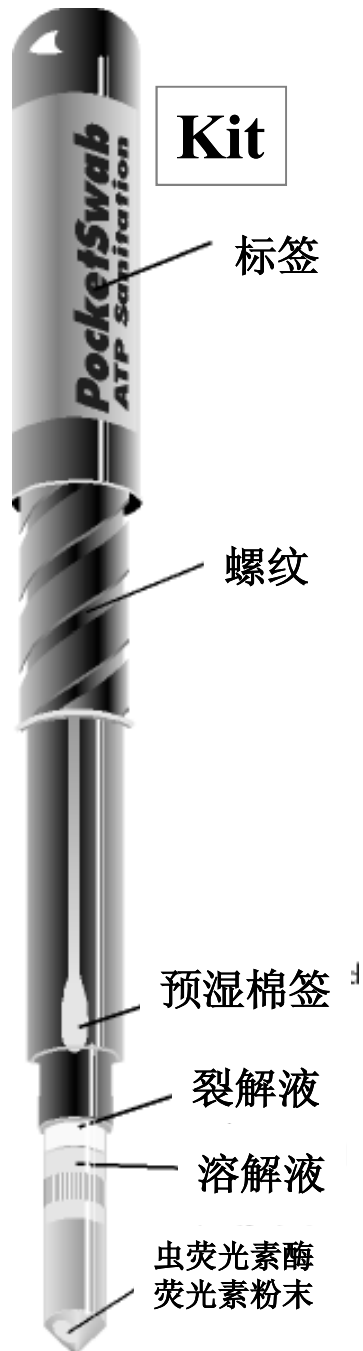
加入腺苷激酶和丙酮酸激酶后测定发光达到最高峰的半数时间；

同时测定AMP+ATP总量；

测定腺苷激酶。

*美国国家航天局已经利用该技术研发出检测航天设备及其安装车间内地球微生物污染的方法。

便携式细菌总数快速测定设备



操作过程



棉签擦拭检测物



棉签插入kit并拧紧



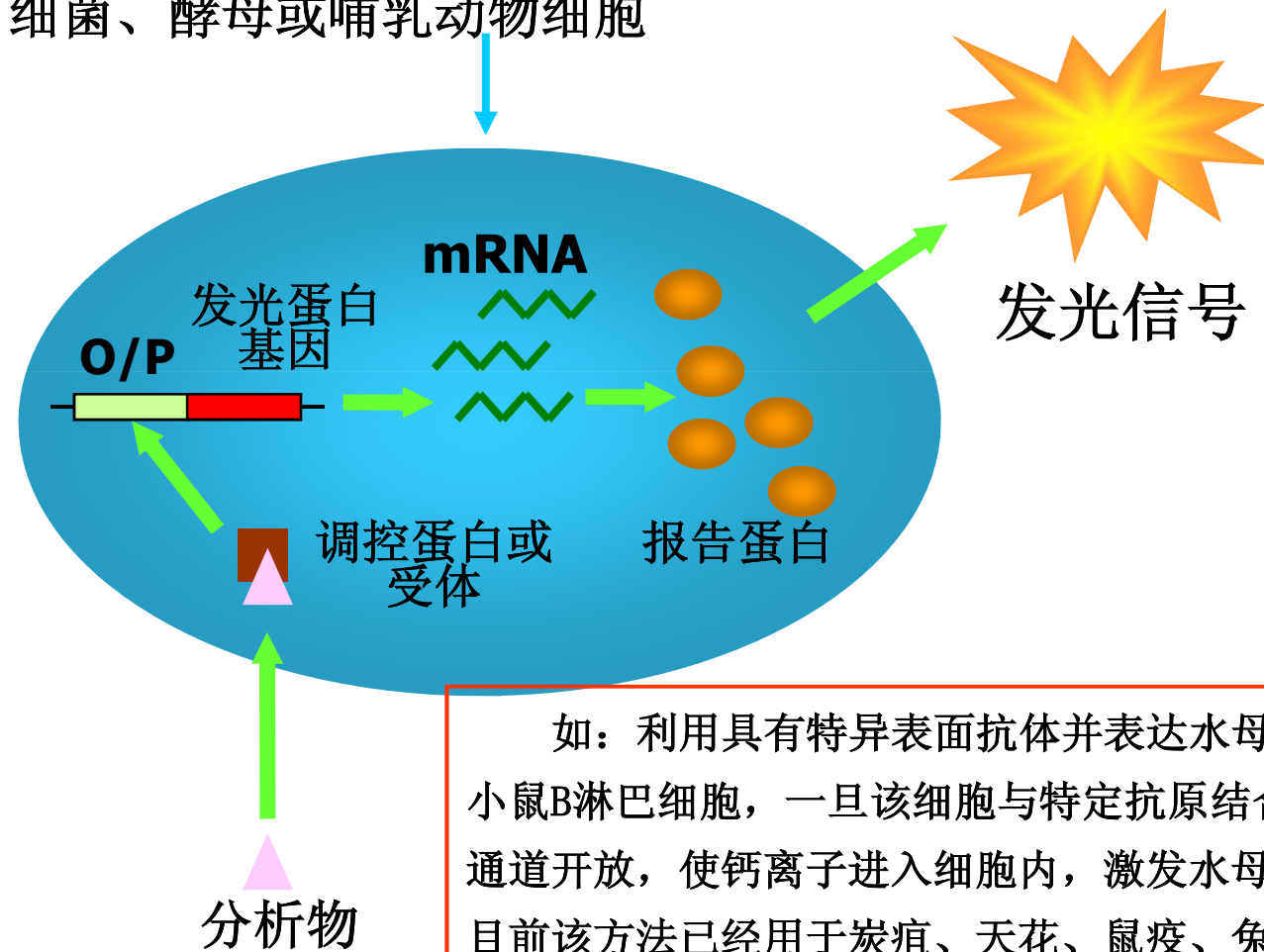
放入仪器读数

30秒钟得到结果

(三) 生物传感器

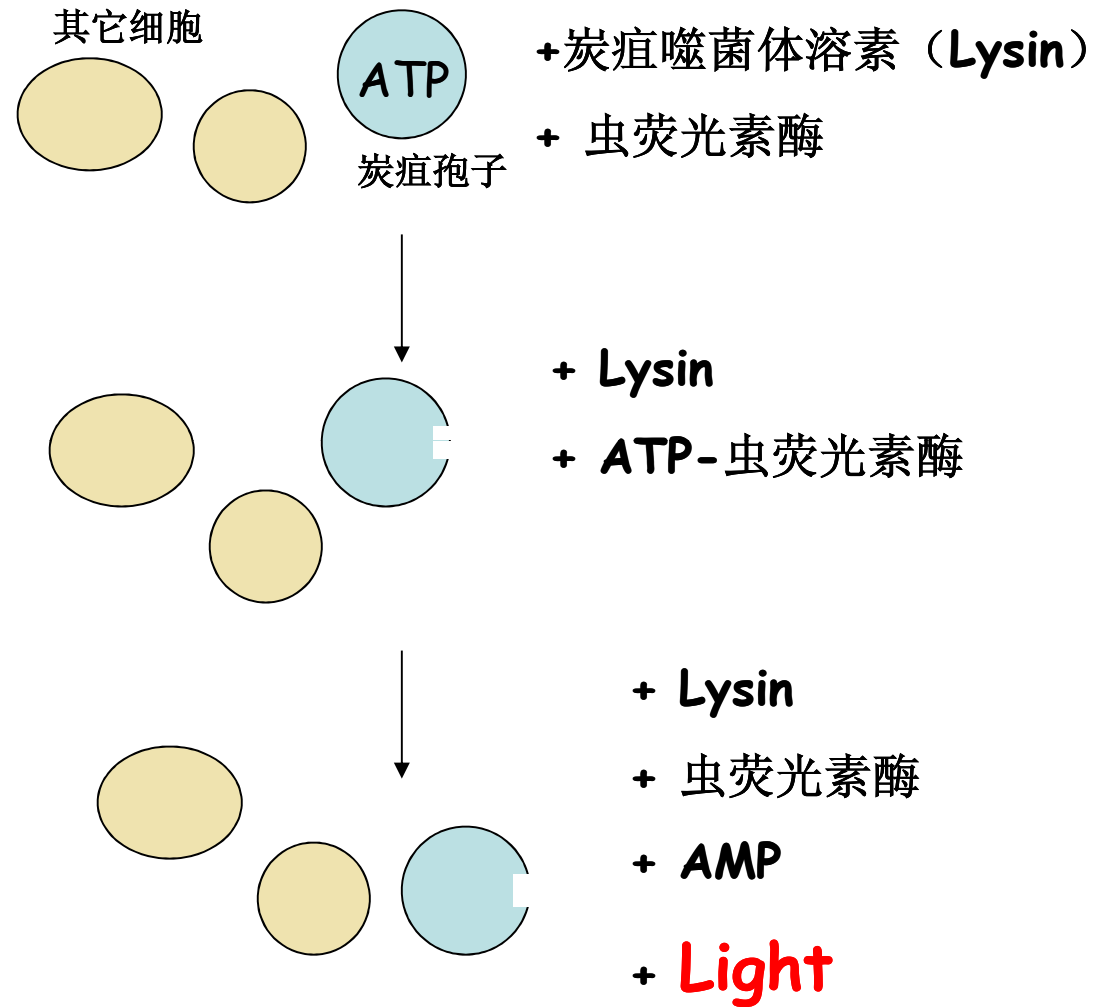
常用于检测环境中的特定物质及其含量变化，做法是建立特异启动子诱导的发光基因重组菌株，如果环境中存在特定污染物，则上述细菌就被诱导表达发光蛋白，并产生生物发光。

细菌、酵母或哺乳动物细胞

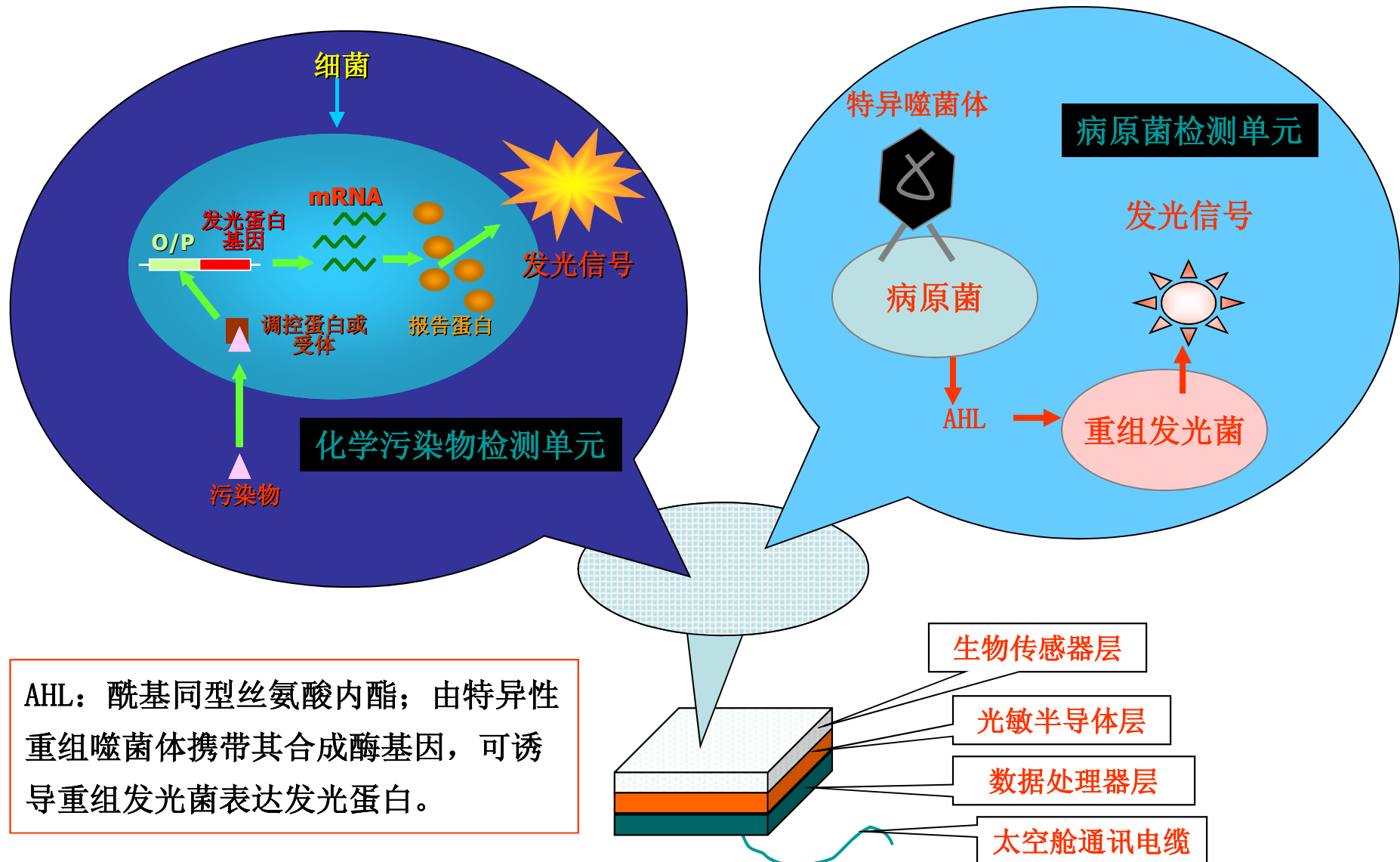


如：利用具有特异表面抗体并表达水母素的重组小鼠B淋巴细胞，一旦该细胞与特定抗原结合，则离子通道开放，使钙离子进入细胞内，激发水母素发光，目前该方法已经用于炭疽、天花、鼠疫、兔热病（Tularemia）等病原体的检测。

炭疽孢子的快速检测

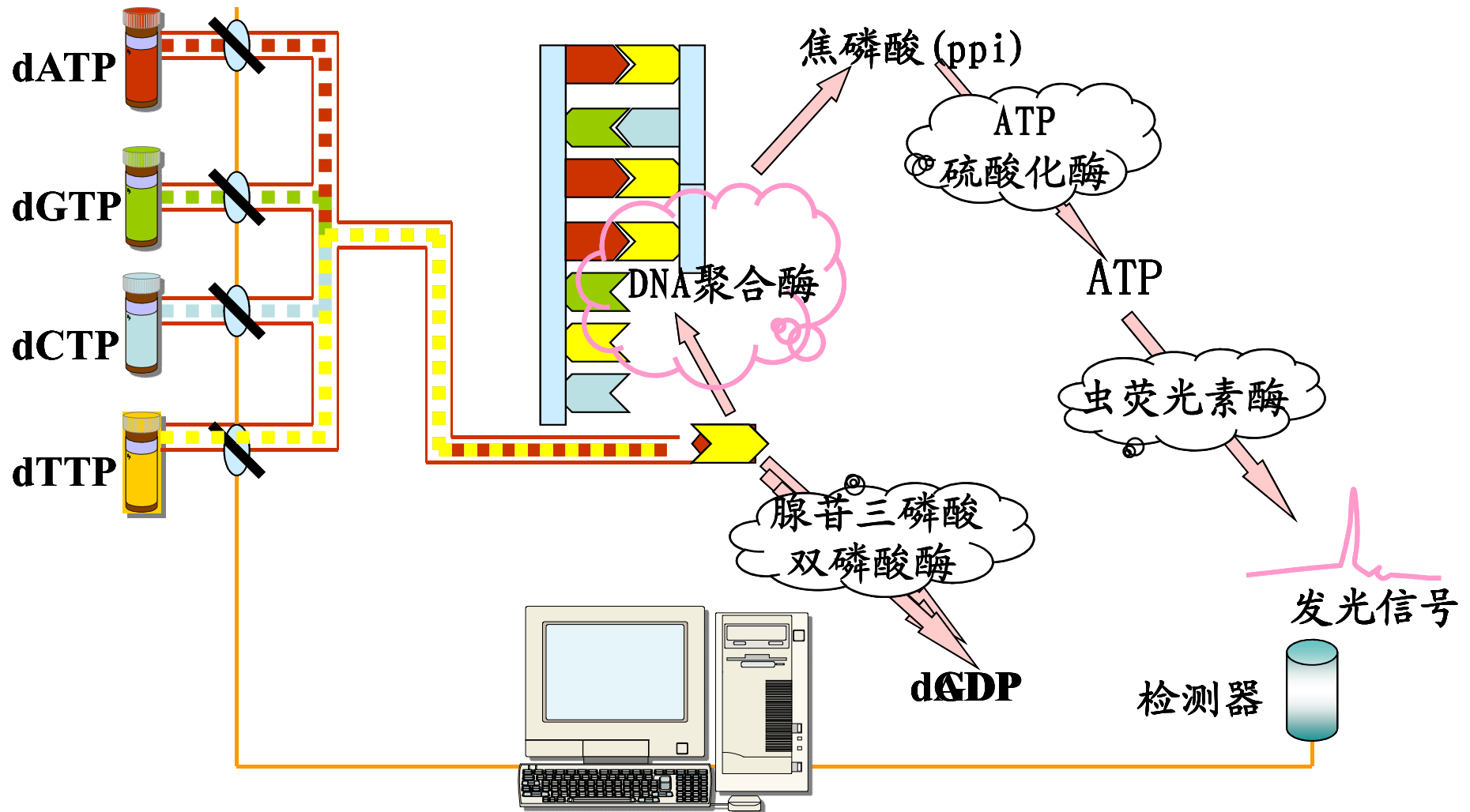


美国国家航天局（NASA）以生物发光生物检测集成电路（BBIC）作为太空舱环境的连续动态检测设备。该检测系统的响应时间小于30分钟，检测限达到十亿分之一（ppb）级, 且实现低能耗、低质量、低维护和无线遥控的目标。



(四) 生物发光实时基因分析技术 (PPi Assay)

其原理是利用ATP硫酸化酶将DNA聚合反应中产生的焦磷酸转化为ATP，并用虫荧光素酶发光系统检测其发光信号，从而实现快速多序列并行基因测序；该技术已经实现商业化。



**感谢各位捧场！
欢迎批评指正！**



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE