



● 林金明 赵利霞 王 栩 主编

化学发光免疫分析

CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY



化学工业出版社

林金明 赵利霞 王 栩 主编

化学发光免疫分析

CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY



化学工业出版社

· 北京 ·

本书主要分两大部分,第一部分1~9章介绍化学发光免疫分析的新方法和基础理论研究;第二部分10~18章侧重于化学发光免疫分析的应用,主要针对临床检测、环境分析以及食品安全三大应用领域。第19章简要介绍分析过程的质量管理与控制。附录收集了常用的化学发光免疫试剂盒和相关用语的中英文对照。书中每个章节既有独立性又有相互参考性,尽最大可能地收集与每一章节有关的参考文献。

本书可供从事临床分析、食品检测、环境监测等科研人员和分析工作者参考,也可作为大专院校和科研院所相关专业师生的教学参考书。

图书在版编目(CIP)数据

—化学发光免疫分析/林金明,赵利霞,王栩主编.—北京:
化学工业出版社,2008.3
ISBN 978-7-122-02251-6

I. 化… II. ①林…②赵…③王… III. 化学发光分析-
免疫测定 IV. 0657.39 R446.62

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第024791号

责任编辑:任惠敏
责任校对:洪雅姝

文字编辑:向东
装帧设计:于兵

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)
印 装:北京市彩桥印刷有限责任公司
720mm×1000mm 1/16 印张27¼ 字数577千字 2008年3月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址:<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:68.00元

版权所有 违者必究

前 言

笔者自 1984 年大学毕业以来，一直从事于化学发光的仪器研制和化学发光新体系的开发，对这一微弱光测试研究产生极大兴趣。20 世纪 80 年代也正是国际上对化学发光免疫分析研究达到最高潮的时期，笔者也与这一时期的大多数年轻人一样，怀着对新知识的追求，漂洋过海前往当时国际上最有名的分析化学家、化学发光免疫分析法创始人之一，日本昭和大学药学部 Akio Tsuji 教授的实验室从事一年化学发光免疫分析的访问研究，而后转入日本东京都立大学（现首都东京大学）攻读博士学位和留校工作近 10 年。当时的日本，先进的仪器设备、方便的试剂来源和大量可供参考的杂志与书籍，为笔者对化学发光反应的深入研究提供了重要的保证。20 多年来，在开展化学发光研究过程中，积累了大量的参考资料，仅仅 20 世纪的最后 10 年，涉及化学发光研究论文和综述文章多达数千篇。在大量参考资料的基础上，笔者已于 2004 年在国家自然科学基金委员会出版基金的资助下，编写了一部《化学发光基础理论与应用》，并由化学工业出版社出版，对我国化学发光基础理论研究起到了一定的促进作用。

化学发光免疫分析结合了化学发光的高灵敏度和免疫分析的高选择性，在临床检验、药物分析、环境监测等领域得到广泛的应用。但是在我国，由于化学发光免疫分析试剂昂贵，涉及临床分析研究的仪器大多依赖进口，限制了这一研究内容的开展。而化学发光免疫分析的诸多优点吸引了大量的用户，造成了研究成果不能很好地满足产业化以及临床检测需要之间的矛盾。在与企业进行长期合作研究过程中，我们深刻地体会到，要使化学发光免疫分析技术获得迅速推广，基础知识的普及显得十分重要。基于这一出发点以及对化学发光研究的极大兴趣，笔者从 2006 年初起着手准备编写一部《化学发光免疫分析》，但是由于平时大部分时间用于教学、科研以及研究生指导工作，无法像当初编写《化学发光基础理论与应用》一书时专心阅读参考文献和单独完成书稿工作，书稿进展十分缓慢。2007 年初，赵利霞、王栩两位博士的加入，使得参考资料的收集、整理以及书稿的编写得到顺利的进行，用了一年的时间，完成了全书 19 章内容的编写。我们希望通过本书的出版，结合本研究组的化学发光免疫分析基础理论研究，以及与北京科美东雅生物技术有限公司联合研究开发的化学发光免疫试剂盒和化学发光免疫分析仪器，推动我国化学发光免疫分析技术的产业化，应用于肿瘤、艾滋病、心血管等重大疾病的快速和早期诊断，提高人民群众的健康水平。

本书共有 19 章，分两大部分，第一部分 1~9 章主要介绍化学发光免疫分析的新方法和基础理论研究，主要包括化学发光免疫分析基本原理、电化学发光免疫分

析、流动注射化学发光免疫分析、高效液相色谱化学发光免疫分析、毛细管电泳化学发光免疫分析、微流控芯片化学发光免疫分析、纳米粒子及量子点标记化学发光免疫分析、化学发光免疫分析仪器和化学发光免疫分析技术发展趋势。第二部分的10~18章侧重于化学发光免疫分析的应用，主要针对临床检测、环境分析以及食品安全三大应用领域。第19章简要介绍分析过程的质量管理和控制。附录了常用的化学发光免疫试剂盒和相关用语的中英文对照。书中每个章节既有独立性又有相互参考性，以正在从事化学发光免疫分析的科研工作者以及开展博士论文和硕士论文研究的研究生为对象，尽最大可能地收集与每一章节有关的参考文献。

最后，笔者还要以最深切的心情感谢本书中所有被引用论文的作者，他们的原创性研究是推动化学发光免疫分析研究与应用发展的原动力。但是，由于笔者水平有限，编写此书的时间也很仓促，书中难免出现错误和引用不妥之处，望广大读者和被引用论文作者批评指正。

清华大学化学系 教授
林金明
2008年3月

目 录

第 1 章 基本原理	1
1.1 引言	1
1.2 化学发光	1
1.2.1 化学发光反应的基本原理	1
1.2.2 化学发光反应体系	2
1.2.3 化学发光的应用和最新进展	4
1.3 免疫技术	6
1.3.1 免疫的基本原理	6
1.3.2 抗原抗体反应	7
1.3.3 免疫测定的基本原理及其在临床检验中的应用	8
1.4 化学发光免疫分析技术	9
1.4.1 化学发光免疫分析方法的建立	9
1.4.2 化学发光免疫分析的主要类型	10
1.5 化学发光标记技术	12
1.6 化学发光免疫研究的新方法以及研究展望	15
参考文献	17
第 2 章 电化学发光免疫分析	20
2.1 引言	20
2.2 电化学发光免疫分析的基本原理和技术	21
2.2.1 电化学发光基本原理	21
2.2.2 电化学发光免疫分析基本原理	22
2.2.3 磁性微球技术	22
2.2.4 生物素-链霉亲和素技术	23
2.3 电化学发光免疫分析的标记物及其相关技术	25
2.3.1 联吡啶钌及其衍生物电化学发光免疫分析体系	25
2.3.2 鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物的电化学发光免疫分析体系	27
2.3.3 其他电化学发光免疫分析	27
2.3.4 电化学发光免疫分析方法的标记技术	27
2.4 电化学发光免疫分析新方法的发展	29
2.4.1 流动注射电化学发光免疫分析	29
2.4.2 液相色谱电化学发光免疫分析	31
2.4.3 毛细管电泳电化学发光免疫分析	31

2.5	电化学发光免疫分析的实际应用	32
2.6	结论与展望	33
	参考文献	33
第3章	流动注射化学发光免疫分析	38
3.1	引言	38
3.2	流动注射化学发光免疫分析主要模式	38
3.2.1	竞争法流动注射化学发光免疫分析	39
3.2.2	非竞争法流动注射化学发光免疫分析	39
3.2.3	夹心法流动注射化学发光免疫分析	41
3.2.4	顺序注射化学发光免疫分析	44
3.3	流动注射化学发光免疫分析中的关键技术	44
3.3.1	流动注射技术	44
3.3.2	免疫反应器制备技术	46
3.3.3	流动注射免疫分析化学发光标记技术	50
3.4	流动注射化学发光免疫分析的应用	52
3.5	结论与展望	55
	参考文献	55
第4章	高效液相色谱化学发光免疫分析	59
4.1	引言	59
4.2	高效液相色谱免疫分析基础	60
4.2.1	高效液相色谱的出现和发展	60
4.2.2	高效液相色谱的分离原理	60
4.2.3	免疫亲和色谱	61
4.2.4	免疫亲和色谱柱及其制备	62
4.2.5	免疫亲和色谱分离抗原抗体	64
4.2.6	亲和免疫固相萃取高效液相色谱联用	65
4.3	高效液相色谱化学发光联用技术	66
4.4	应用	68
4.5	展望	71
	参考文献	72
第5章	毛细管电泳化学发光免疫分析	75
5.1	引言	75
5.2	毛细管电泳免疫分析原理	75
5.3	CEIA 中的免疫分析模式	78
5.3.1	竞争 CEIA	78
5.3.2	非竞争 CEIA	80
5.3.3	CEIA 中的抗体	80
5.4	免疫毛细管电泳中常用的电泳分离模式	81

5.5 毛细管电泳化学发光接口技术	82
5.6 应用	85
5.6.1 血清免疫球蛋白的分析	85
5.6.2 α -甲胎球蛋白的分析	86
5.6.3 骨形成蛋白-2 的分析	86
5.6.4 癌抗原-125 蛋白的分析	88
5.6.5 乙肝表面抗原和抗体的分析	89
5.6.6 促卵成熟激素的分析	90
5.6.7 人工合成激素的分析	91
5.7 小结	91
参考文献	92
第 6 章 微流控芯片化学发光免疫分析	95
6.1 引言	95
6.2 芯片上的均相免疫分析	95
6.3 芯片上的非均相免疫分析概述	99
6.4 芯片上的抗体固定技术	100
6.4.1 在微珠表面进行抗体固定	100
6.4.2 在单一通道内部进行抗体固定	103
6.4.3 阵列式的抗体固定方式	105
6.5 芯片上的液体输送与控制	107
6.5.1 液流输送	108
6.5.2 液流控制	110
6.6 芯片上非均相免疫分析的检测方法	112
6.7 芯片上免疫分析特点	115
6.7.1 极小的试剂消耗	115
6.7.2 高灵敏度与富集作用	116
6.7.3 极短的分析时间	116
6.7.4 自动化	118
6.7.5 高通量	119
6.7.6 低成本	120
6.8 结论	120
参考文献	121
第 7 章 纳米粒子及量子点标记化学发光免疫分析	125
7.1 概述	125
7.2 纳米粒子与量子点的制备及光学性质	125
7.2.1 纳米粒子与量子点基本概念	125
7.2.2 纳米材料与量子点的制备方法	126
7.2.3 纳米粒子、量子点的光学特性	129
7.3 纳米粒子和量子点在标记免疫分析中的应用研究现状	130

7.3.1	纳米粒子在标记免疫分析中的应用研究现状	130
7.3.2	量子点在标记免疫分析中的应用	135
7.4	纳米材料和量子点化学发光免疫分析	138
7.4.1	纳米材料化学发光免疫分析	138
7.4.2	量子点化学发光免疫分析	140
	参考文献	141
第 8 章	化学发光免疫分析仪	145
8.1	引言	145
8.2	化学发光免疫分析仪的基本原理及分类	145
8.3	化学发光免疫分析仪的基本结构	147
8.4	常见商品化化学发光免疫分析仪	155
8.5	化学发光免疫分析仪的发展前景	161
	参考文献	163
第 9 章	化学发光免疫分析技术发展趋势	165
9.1	引言	165
9.2	基因工程试剂和模拟抗体的应用	165
9.2.1	基因工程抗体的应用	165
9.2.2	基因工程抗原的应用	166
9.2.3	基因工程酶及其融合蛋白的应用	167
9.2.4	模拟抗体的应用	168
9.3	CLIA 新用标记物及标记技术	168
9.3.1	标记酶和酶底物	169
9.3.2	新标记物及标记技术	171
9.4	新型固相材料的应用	176
9.4.1	微板式分析中的新固相材料	176
9.4.2	磁颗粒的应用	177
9.4.3	其他固相材料的应用	179
9.4.4	基于固相材料的流动注射免疫分析	181
9.5	CLIA 的联用检测技术	183
9.6	CLIA 的微型化、集成化与自动化	185
9.6.1	CLIA 的微型化与集成化	185
9.6.2	CLIA 的自动化仪器	188
9.7	展望	190
	参考文献	190
第 10 章	化学发光免疫诊断试剂	194
10.1	引言	194
10.2	诊断试剂的定义与分类	194
10.3	化学发光免疫诊断试剂	195

10.3.1	化学发光免疫诊断试剂的定义及特点	195
10.3.2	化学发光免疫诊断试剂盒的构成及常用反应模式	196
10.3.3	评价化学发光免疫分析试剂盒质量的技术参数	199
10.3.4	化学发光诊断试剂盒的研发流程	201
10.3.5	选购化学发光试剂盒的注意要点	201
10.4	国内外化学发光诊断试剂的技术现状	201
10.4.1	国外大型企业化学发光免疫诊断试剂的研制现状	202
10.4.2	国内化学发光免疫诊断试剂的研制现状	202
10.5	我国化学发光免疫诊断试剂的产业化现状及前景	203
10.5.1	化学发光免疫诊断试剂的产业化现状	203
10.5.2	化学发光免疫诊断试剂产业化的作用和影响	204
10.6	化学发光诊断试剂的注册与监督管理	206
10.7	我国化学发光免疫诊断试剂行业的发展趋势	207
10.7.1	化学发光免疫分析技术的发展趋势	207
10.7.2	化学发光免疫诊断试剂行业的发展趋势	207
	参考文献	209
第 11 章	肿瘤标志物	210
11.1	引言	210
11.2	肿瘤和肿瘤标志物	211
11.2.1	肿瘤	211
11.2.2	肿瘤标志物	213
11.3	肿瘤标志物的化学发光免疫分析检测应用实例	216
11.4	小结	224
	参考文献	225
第 12 章	内分泌疾病	228
12.1	引言	228
12.2	常见的内分泌疾病	228
12.3	内分泌疾病的早期诊断	232
12.4	免疫学检测技术在内分泌疾病早期诊断中的应用	233
12.5	化学发光免疫分析方法在内分泌疾病早期诊断中的应用	235
12.5.1	化学发光免疫分析在内分泌激素检测方面的应用历史	235
12.5.2	内分泌激素化学发光免疫分析常用检测模式	236
12.5.3	内分泌激素化学发光免疫分析检测应用实例	239
12.5.4	全自动化学发光免疫分析系统在内分泌激素检测方面的应用	245
12.6	CLIA 在内分泌疾病诊断方面的应用前景	247
	参考文献	248
第 13 章	激素与细胞因子	250
13.1	引言	250

13.2 激素	250
13.2.1 激素的生理作用及作用特点	251
13.2.2 激素的分类	251
13.2.3 激素的作用机理	253
13.2.4 激素的检测方法	253
13.2.5 激素的化学发光免疫分析	253
13.3 细胞因子	260
13.3.1 细胞因子的命名和分类	262
13.3.2 细胞因子的特性	263
13.3.3 细胞因子的生物学作用	264
13.3.4 细胞因子与某些病理过程的关系	265
13.3.5 细胞因子的化学发光免疫分析	266
13.4 展望	269
参考文献	269
第 14 章 血液和心血管疾病	271
14.1 引言	271
14.2 化学发光免疫分析检测血液病标志物	271
14.2.1 血管损伤标志物的检测	272
14.2.2 血小板激活标志物的检测	273
14.2.3 凝血因子活化标志物	274
14.2.4 抗凝系统激活标志物	274
14.2.5 纤溶系统激活标志物	275
14.2.6 分子标志物的联合检测	276
14.2.7 白血病病毒及其抗体的检测	276
14.3 化学发光免疫分析检测心血管疾病标志物	277
14.3.1 反映心肌损伤的标志物	278
14.3.2 反映心衰的标志物	279
14.3.3 反映心肌缺血的标志物	280
14.3.4 反映炎症的标志物	280
14.3.5 心血管疾病的独立危险因素	284
14.4 总结	285
参考文献	285
第 15 章 其他疾病	289
15.1 引言	289
15.2 病毒性肝炎与检测	289
15.2.1 甲型病毒性肝炎	289
15.2.2 乙型病毒性肝炎	291
15.2.3 丙型病毒性肝炎	293
15.3 呼吸道传染疾病与检测	294

15.3.1	急性呼吸综合征	294
15.3.2	肺结核	296
15.4	性传播疾病与检测	297
15.4.1	艾滋病	297
15.4.2	梅毒	300
15.5	消化道疾病与检测——幽门螺杆菌	302
15.5.1	概述	302
15.5.2	免疫学检测方法	303
15.6	出生缺陷产前诊断	303
15.6.1	唐氏综合征	303
15.6.2	TORCH 综合征	305
15.7	阿尔茨海默病	306
15.7.1	概述	306
15.7.2	免疫学检测方法	306
15.8	总结	307
	参考文献	307
第 16 章	治疗药物监测	310
16.1	引言	310
16.2	治疗药物监测背景	310
16.3	检测药物种类	312
16.4	样品前处理	313
16.5	化学发光免疫法在治疗药物监测中的应用	315
16.5.1	抗心律失常药物	315
16.5.2	抗生素类药物	315
16.5.3	抗癫痫药	316
16.5.4	抗抑郁药物	317
16.5.5	免疫抑制剂	317
16.6	治疗药物监测的其他方法	319
16.7	治疗药物监测新方法与发展	320
16.8	治疗药物监测应用实例	322
	参考文献	325
第 17 章	食品安全检测	329
17.1	引言	329
17.2	食品污染	330
17.2.1	食品污染的来源	330
17.2.2	微生物污染	330
17.2.3	化学性污染	331
17.2.4	食品的放射性污染	332
17.3	食品安全检测技术	333

17.3.1	食品安全检测的特点和复杂性	333
17.3.2	现代食品安全检测技术	334
17.3.3	化学发光免疫分析方法	334
17.4	化学发光免疫分析在食品安全检测中的应用	335
17.4.1	食品中微生物污染的安全检测	335
17.4.2	食品中化学性污染物的检测	339
17.5	目前食品安全存在的问题	344
17.6	研究展望	346
	参考文献	347
第 18 章	环境内分泌干扰物	349
18.1	引言	349
18.2	环境内分泌干扰物概述	350
18.2.1	内分泌干扰物定义及特点	350
18.2.2	环境内分泌干扰物的种类及来源	351
18.2.3	环境内分泌干扰物的危害	353
18.2.4	环境内分泌干扰物的作用机制	355
18.3	环境内分泌干扰物的传统检测方法	356
18.4	环境内分泌干扰物的免疫分析	357
18.4.1	化学发光免疫分析对性激素的研究	359
18.4.2	化学发光免疫分析在对其他环境内分泌干扰物检测中的应用	365
18.5	小结与展望	367
	参考文献	368
第 19 章	化学发光免疫分析的质量管理与控制	370
19.1	引言	370
19.2	质量管理与控制概述	371
19.2.1	质量的含义	371
19.2.2	质量管理的含义	371
19.2.3	质量控制的含义	373
19.2.4	影响质量的因素	374
19.2.5	质量控制方法	374
19.3	化学发光免疫分析技术的质量控制因素	374
19.3.1	人的因素	375
19.3.2	材料因素	375
19.3.3	机具因素	375
19.3.4	方法因素	376
19.3.5	环境因素	376
19.4	化学发光免疫分析的质量控制	377
19.4.1	抗体制备过程的质量控制	377
19.4.2	抗原或抗体标记的质量控制	382

19.4.3 化学发光免疫分析检测的质量控制	383
19.5 结论	387
参考文献	387
附录 I 常用化学发光免疫分析方法	388
I.1 夹心法	388
I.1.1 原理	388
I.1.2 操作流程	389
I.1.3 操作步骤	389
I.1.4 应用实例	390
I.2 竞争法	393
I.2.1 原理	393
I.2.2 操作流程	394
I.2.3 应用实例	395
I.3 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记物	398
I.3.1 简介	398
I.3.2 应用实例	399
I.4 碱性磷酸酶 (ALP) 标记物	401
I.4.1 简介	401
I.4.2 应用实例	402
I.5 鲁米诺、异鲁米诺类标记物	405
I.5.1 简介	405
I.5.2 应用实例	406
I.6 吖啶酯标记物	406
I.6.1 简介	406
I.6.2 应用实例	407
I.7 钉联吡啶 ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) 为主的电化学发光免疫分析	410
I.7.1 简介	410
I.7.2 应用实例	411
参考文献	413
附录 II 相关用语中英文对照	415

第 1 章 基本原理

1.1 引言

1977 年 Halman^[1]将化学反应系统与免疫系统相结合创建了化学发光免疫分析法 (chemiluminescence immunoassay, CLIA), 以检测抗原或抗体。它既有免疫反应的特异性, 又具有化学发光反应的高敏感性。以化学发光物质为示踪物, 简便、快速、重复性好, 无放射性污染, 30 年来得到广泛的应用。发光反应是一种物质在催化剂作用下, 经过氧化还原反应, 由基态跃迁到激发态, 而激发态不稳定再回到基态时释放出的能量所表现出的光的发射。在光致发光、生物发光和化学发光三种发光类型中, 化学发光在免疫学检验中应用最广, 化学发光免疫技术主要分为化学发光酶免疫分析、化学发光标记免疫分析和电化学发光免疫分析。化学发光免疫的主要优点是灵敏度高、标记物有效期长、检测范围宽, 可实现全自动化等, 用化学发光免疫标记物代替放射性同位素, 避免了使用放射性同位素的危害, 操作方法简便, 检测迅速。

1.2 化学发光

1.2.1 化学发光反应的基本原理

化学发光 (chemiluminescence) 是化学反应过程中产生的光。通常这个过程可以被描述为:



其中 $[I]^*$ 是由反应试剂 A 和 B 反应生成的激发态产物, 处于激发态的物质不稳定, 很快跃迁到较低的能量状态 (例如基态), 同时将能量以光 (通常为可见光) 的形式发射出来^[2]。

根据激发态物质产生的方式可以将化学发光反应分为两类: 一种是由体系中的反应物发生化学反应后直接生成激发态的产物; 另一种则是由体系内存在的易于接受能量的荧光物质, 获得化学反应释放的能量后转变为激发态。

化学发光之所以能够用于分析测定, 是因为化学发光强度与化学发光速率相关联, 因而一切影响反应速率的因素都可以作为建立测定方法的依据。即一个化学发

光过程也包括了一个化学发光反应的过程。所以化学发光强度 (I_{CL}) 取决于化学反应的速率、激发态产物的效率和激发态物质的发光效率。

$$I_{CL} = \Phi_{CL} dc/dt = \Phi_{EX} \Phi_{EM} dc/dt \quad (1-2)$$

式中 I_{CL} ——化学发光强度 (每秒发射的光子数);

dc/dt ——化学反应速率 (每秒的反应分子数);

Φ_{CL} ——化学发光量子产率 (每一个参加反应的分子发射的光子数);

Φ_{EX} ——激发态量子产率 (每一个参加反应的分子产生的激发态);

Φ_{EM} ——发光量子产率 (每一个激发态产生的光子数)。

对于一定的化学发光反应, Φ_{CL} 为一定值, 但化学发光测定易受化学反应条件, 如 pH 值、离子强度、溶液组成、温度等的影响, 影响反应速率或任意一个量子效率的因素都会改变发光强度。因此, 在一定化学反应条件下, 通过测定化学发光强度就可以测定反应体系中某种物质的浓度。因为将 $I_{CL} = \Phi_{CL} dc/dt$ 对时间积分, 即可得到 $I_{CL} = \Phi_{CL} c$, 发光强度与反应物或产物的浓度成正比。

1.2.2 化学发光反应体系

化学发光按其反应介质的状态主要可以分为气态和液态两大类, 通常称为气相化学发光和液相化学发光。气相化学发光反应体系大多应用于大气污染的测定; 而液相化学发光应用更广, 主要用于过氧化氢、金属离子以及大量的有机化合物测定, 所用的发光试剂有鲁米诺、光泽精、过氧化草酸酯等。表 1-1 给出了几种常用的化学发光体系。

表 1-1 一些常用的化学发光体系

状态	待测物	化学发光试剂
气相	O ₃	乙烯
气相	烃类化合物	O ₃
气相	硫化合物	O ₃ 氧化后氢焰反应
气相	硫化合物	氢焰
气相	NO	O ₃
气相	亚硝酸, 总氮	转换为氢氧化合物后与 O ₃ 反应
液相	过氧化氢	鲁米诺
液相	荧光性有机化合物	过氧化草酸酯
液相	可被氧化的有机化合物	KMnO ₄ 、Ce(SO ₄) ₂
液相	过氧化物酶	鲁米诺
液相	过渡金属离子	Ru(bpy) ₃ ³⁺
液相	α -氨基酸, 胺等化学发光试剂标记物	吖啶酯, 二氧杂环丁烷, 鲁米诺衍生物, Ru(bpy) ₃ ³⁺

与大量的气相和液相化学发光反应和应用相比, 固相发光体系的反应和作用非常有限, 固相发光体系检测高聚物时常用到氧气加热发光, 这里不做过多介绍。下面给出几种化学发光免疫中常用的发光体系。

1.2.2.1 鲁米诺化学发光体系

鲁米诺 (5-氨基-2,3-二氢-1,4-二杂氮萘二酮) 是一种易被氧化的化合物, 在碱性水溶液和非水溶液中都能被氧化并常伴随化学发光。目前国际上比较认可的鲁

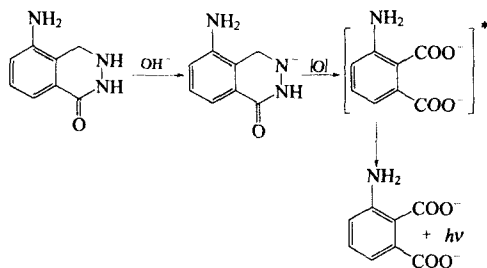


图 1-1 鲁米诺化学发光机理

米诺发光机理如图 1-1 所示。

鲁米诺在化学发光反应过程中发出蓝光，最大发光波长为 425nm。在通常情况下，鲁米诺与过氧化氢的化学发光反应相当缓慢，但是，当某些催化剂，如过渡金属离子 (Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 等)、棕榈酸盐或者某些金属复合物（如氯高铁血红素、血红蛋白、过氧化酶）等存在时，反应速率大大提高。 H_2O_2 的检测限大约为 $0.1\mu\text{mol/L}$ ，线性工作范围可达到 1mmol/L 。许多化学发光应用是通过氧化酶与合适的底物发生反应生成双氧水，再结合鲁米诺化学发光法来测定双氧水，通过这种方法可以测定葡萄糖、胆固醇、尿酸、葡糖苷代谢物等。如果使用鲁米诺和双氧水作为反应混合物，可以测定以上所列的各种催化剂。对酶免疫分析来说，过氧化物酶是常见的标记物，而鲁米诺化学发光反应对于痕量标记物的测定是最有效的方法。以鲁米诺的衍生物或者类似结构的化合物本身作为一种标记物在化学发光免疫分析中得到了广泛的应用。所以鲁米诺类化学发光的用途主要有四个方面：第一，由于某些过渡金属离子、金属配合物、酶、荧光试剂、表面活性剂等浓度与化学发光强度成正比，所以可以利用它们对于鲁米诺-过氧化氢反应的化学发光增强作用，进行该类物质的浓度分析；第二，利用化合物对鲁米诺化学发光反应的抑制作用，测定对化学发光产生猝灭作用的有机化合物；第三，通过偶合作用，间接测定有机或无机化合物；第四，将鲁米诺衍生物或类似化合物标记于羧酸和胺类化合物上，经色谱分离后，在碱性条件下进行化学发光测定，也可以作为化学发光免疫分析的标记物用于标记氨基酸和蛋白质等生命相关成分，用于化学发光免疫分析。

1.2.2.2 吡啶酯化合物

吡啶酯化学发光试剂以光泽精的研究和应用最有代表性，光泽精自身在碱性环境中产生微弱的化学发光，加入过氧化氢时化学发光强度大大增加，光泽精化学发光的机理如图 1-2 所示。

一些能够促进过氧化氢分解的催化剂，如过渡金属离子、酶等可以增强光泽精的化学发光强度，具有还原性的抗坏血酸等物质可以直接与光泽精反应产生微弱的化学发光，所以光泽精化学发光体系可以用于金属离子、还原性化合物，可以产生过氧化氢的基质或者相应的酶等，特别是在化学发光酶免疫分析中得到了实际应用。近十年来，使用吡啶酯作为标记物发展了各种不同分析物的竞争式和非竞争式免疫分析方法。如人生长激素、白细胞介素、干扰素及其有关化合物，胰岛素原，