

放射免疫分析及其它放射体外测定方法

放射免疫分析 及其它放射体外测定方法

原子能出版社

R392-33/FS

放射免疫分析 及其它放射体外测定方法

(1975年会议资料选编)

《放射免疫分析及其它放射体外测定方法》编辑组

原子能出版社

内 容 简 介

放射免疫分析是使用放射性同位素的一种超微量分析新技术,这种分析及有关的放射体外测定方法已广泛应用于生物学、实验医学和临床医学的各个领域。本选编基本反映了这类分析方法的特点、应用范围及发展前景。为了帮助读者更好地了解本选编的内容,还简要介绍了方法原理及某些应用例子。

本选编可供医用同位素专业工作者、内分泌学、肿瘤学、生物化学、实验生物学、免疫学、药理学、微生物学、流行病学、毒理学、胸科、妇产科、兽医学等科技工作者及医务工作者参考。

放射免疫分析 及其它放射体外测定方法 (1975年会议资料选编)

《放射免疫分析及其它放射体外测定方法》编辑组

原子能出版社出版
北京印刷三厂印刷
新华书店北京发行所发行·新华书店经售
(限国内发行)

☆

开本787×1092¹/16·印张 16·字数 370 千字
1976年7月北京第一版·1976年7月北京第一次印刷
印数001——9000·定价: 1.30元
统一书号: 15175·058

2187/13

前 言

中国科学院和卫生部于1975年6月在北京召开了放射免疫分析座谈会。北京、上海、天津等地有关科研和医务工作者参加了会议。到会同志认真学习了毛主席关于无产阶级专政的理论,以阶级斗争为纲,总结了无产阶级文化大革命和批林批孔运动以来,各单位贯彻执行“**独立自主、自力更生**”的方针,开展社会主义大协作,在放射免疫分析及有关放射体外测定方法方面所取得的成果。通过经验交流,到会同志重温了毛主席“**把医疗卫生工作的重点放到农村去**”这一光辉指示,更加明确了科学研究必须“为无产阶级政治服务,为工农兵服务,与生产劳动相结合”。

放射免疫分析是六十年代初期发展起来的一种新技术。它与其他放射体外测定方法一样,近十年来获得了迅速的发展。

所有放射体外测定方法,包括放射免疫分析在内,一般都具有专一、灵敏、精确等特点,而且简单易行,避免了放射性体内照射的副作用。这类方法目前已在许多领域中得到广泛应用。被测物质达二、三百种之多,诸如体液中的激素、维生素、药物、酶、无机物、肿瘤相关抗原、血液成分,环状核苷酸以及包括病毒、细菌、寄生虫在内的病原体等,都曾用它来测量,而且测量品种还在不断增加。甚至在农村和边远地区,也可用这种方法进行某些项目的大规模普查。因此这类分析方法值得大力普及、推广和提高。

为了进一步交流情况,有利于工作的开展和提高,我们选编了本次座谈会资料。本选编分为两部分:(1)基本原理;(2)会议资料。由于我们的水平有限,错误之处请读者批评指正。

编 者

1975年8月

目 录

在毛主席革命路线指引下开展放射免疫分析工作.....	(1)
----------------------------	-------

第一部分 基 本 原 理

放射免疫分析的一般原理.....	(7)
抗原的纯化及标准品.....	(10)
抗血清(抗体)的制备.....	(12)
半抗原及其抗体的制备.....	(14)
放射性 ^{131}I (^{125}I) 标记.....	(18)
分离技术.....	(20)
免疫放射分析和有关的技术.....	(23)
激素的放射受体分析法.....	(27)
放射自显影在放射免疫测定中的应用.....	(29)
竞争性蛋白质结合分析法.....	(31)
饱和和分析法的应用.....	(34)

第二部分 会 议 资 料

^{131}I -甲胎蛋白试制小结.....	(39)
放射火箭电泳自显影术测定甲胎蛋白的临床意义.....	(43)
人体甲胎蛋白的分离和提纯.....	(49)
甲胎蛋白放射免疫测定法.....	(55)
甲胎蛋白放射免疫测定在肝病中的临床应用	
——双抗体法和硫酸铵法的对比研究.....	(66)
甲胎蛋白放射免疫测定在原发性肝癌诊断中的应用价值.....	(71)
甲胎蛋白的放射免疫测定法(双抗体法)的临床应用.....	(75)
人及大白鼠甲胎蛋白放射对流免疫电泳的定量测定.....	(79)
高纯度抗乙型肝炎抗原(HB _s Ag)的抗体的制备(摘要).....	(84)
乙型肝炎抗原免疫放射电泳自显影法的进一步研究.....	(85)
乙型肝炎抗原免疫放射自显影法及其应用.....	(87)
乙型肝炎抗原放射免疫双扩散自显影术及其在胎盘球蛋白检查中的应用...	(95)
乙型肝炎抗原(HB _s Ag)的放射免疫测定法(双抗体法和放射对流免疫 电泳自显影法).....	(102)
HCG放射免疫测定(双抗体快速法)的临床应用.....	(109)
绒毛膜促性腺激素(HCG)放射免疫测定应用于前列腺素(PG)E ₂ 抗早孕的 初步观察.....	(113)
天花粉引产前后血清 HCG 含量的变化.....	(117)
HCG放射免疫测定法应用于中期妊娠引产的观察.....	(123)
黄体生成激素(LH)放射免疫测定在妇产科临床上的应用.....	(126)

HCG放射免疫测定应用于滋养层细胞肿瘤的诊断和疗效观察·····	(133)
HCG放射免疫测定应用于滋养叶细胞肿瘤的初步小结·····	(137)
促黄体生成素释放激素兴奋试验的初步临床观察·····	(140)
人绒毛膜促性腺激素(HCG)的快速放射免疫测定法·····	(147)
人血浆胰岛素放射免疫测定及其在临床上的初步应用·····	(152)
胰岛素固相放射免疫测定方法及其在生产上的初步应用·····	(162)
反向滴定——一种新的放射免疫测定系统·····	(167)
血浆肾素活性的放射免疫分析·····	(176)
血浆总皮质醇及尿中游离皮质醇的竞争性蛋白质结合分析法·····	(186)
人血浆皮质醇的放射免疫测定·····	(205)
血浆睾丸酮的蛋白质竞争结合分析法·····	(213)
凝胶法测定血清游离 T_3 率及其临床应用 ·····	(220)
环磷酸腺苷的蛋白质结合测定法·····	(228)
冠心Ⅱ号对血小板内环磷酸腺苷含量的影响·····	(235)
饱和分析法测定3,5-环磷酸腺苷(cAMP) ·····	(240)
附录一 名词解释·····	(244)
附录二 略语词汇·····	(246)

在毛主席革命路线指引下 开展放射免疫分析工作

上海实验生物研究所第二研究室

上海第一医学院华山医院同位素实验室

在无产阶级文化大革命和批林批孔运动大好形势的推动下，我们上海实验生物研究所第二研究室、华山医院同位素实验室和妇产科医院等单位协同作战，开展了放射免疫分析方法及其应用于临床诊断的研究。1972年10月我们建立了人绒毛膜促性腺激素的放射免疫分析技术，并应用于计划生育的研究及临床诊断。最近学习毛主席关于理论问题的重要指示以后，回顾三年来的战斗历程，使我们深刻体会到，搞科研工作必须以阶级斗争为纲，坚持党的基本路线，贯彻执行“独立自主、自力更生”的方针，坚持科研工作“为无产阶级政治服务，为工农兵服务，与生产劳动相结合”的方向。

一、坚持“独立自主、自力更生”的方针

放射免疫分析是国际上六十年代发展起来的一种超微量分析技术。1972年初，我们为了开展计划生育的工作，决定采用人绒毛膜促性腺激素等放射免疫分析新技术。放射免疫分析要上马，但当时我们既缺少免疫用的高纯度抗原、测定用的高比度抗原、专一性的抗血清，又无有效的分离结合和游离抗原所必需的仪器和试剂。怎么办？是依靠外援，向国外定货；还是自力更生，自己动手。我们重温了毛主席关于“自力更生为主，争取外援为辅”的教导，回顾了过去的教训。那时，社会帝国主义利用我国暂时的困难，竟以次充好，将过期的、质劣的同位素卖给我们，给我们工作带来了极大的困难。这次如果依靠国外进口，研究工作还可能受到影响，甚至半途而废。难道还要让人家卡我们的脖子吗？不！“人是要有一点精神的”，我们决心以阶级斗争为纲，发扬只争朝夕的革命精神，自己动手，尽快把放射免疫工作搞上去，为祖国争气。

人绒毛膜促性腺激素放射免疫分析工作胜利上马了，我们满怀革命豪情，迎接这场战斗。缺乏仪器设备，我们就因陋就简，在干中逐步摸索，逐步创造，逐步完善。搞放射性标记，微量注射器是最基本的操作工具，手头没有，我们就用0.25毫升注射器，后来为了提高精确度，又改用了微量移液管，同样解决了问题。标记抗原要纯化，但没有接收洗脱液的自动部分收集器，我们就守着层析柱一滴一滴地数，一管一管地收，……就这样，碰到一个难题，解决一个难题，不断向前迈进。经过六个月的战斗，我们的人绒毛膜促性腺激素的放射免疫分析技术，很快地应用于临床，直接为工农兵病员服务。

二、坚持无产阶级政治挂帅

毛主席教导我们“思想和政治又是统帅，是灵魂。只要我们的思想工作和政治工作稍为一放松，经济工作和技术工作就一定会走到邪路上去。”通过无产阶级专政理论的学习，我们认识到资产阶级法权在人们的相互关系中还存在，只有使我们的生活和知识摆脱资产阶级的束缚，才能跳出资产阶级法权的小圈子，把工农兵给我们的知识和技术，全心全意为无产阶级政治服务，为工农兵服务。在这种思想指导下，我们协作组内的一些老同志热情帮助青年同志，手把手地教操作，传授实验技术和理论知识。有的青年同志缺乏放射免疫分析的知识，但是他们狠批了林彪、孔老二“上智下愚”的谬论，激发了革命的雄心壮志，敢于冲破“只有高等学府出来的人才能搞高、难、深科研工作”的资产阶级法权思想的束缚，遵循毛主席“一切真知都是从直接经验发源的”教导，坚持干中学，学中干，经过艰苦努力，不仅学会了实验操作，还能进行数据处理，提高了分析问题和解决问题的能力，成为推广这一新技术的有实践经验的战士。

在科研工作繁忙的时候，党组织及时提醒我们，不能只注意埋头看标准曲线，更重要的是抬头看党的基本路线；不能只注意体内超微量激素的变化，更要注意社会上阶级斗争的尖锐复杂。从而使我们的同志都认识到坚持无产阶级政治统帅业务的重要性，明确了科研工作的目的性，在工作中处处想到工农兵。过去搞一个研究课题，只要拿出了数据写出论文，就算大功告成。这次，建立这种放射免疫分析技术的初期，从给病员抽血到出结果报告，至少三天，不能适应早期妊娠及时诊断的要求。我们考虑到工农兵的迫切要求，就大胆改革，用免疫吸附法代替双抗体法，使测定过程从三天缩短到几个小时。灿烂的思想之花，终于结出了丰硕的科研之果。事实证明，路线对了头，技术上才能精益求精。

三、坚持社会主义大协作

无产阶级文化大革命前，在修正主义路线的干扰和影响下，科研和医疗单位中存在的资产阶级的偏见、旧习惯势力和资产阶级法权思想是比较严重的，突出表现在为个人或小单位争名抢功，不顾大局，搞技术封锁、技术垄断，缺乏协作精神。通过无产阶级文化大革命，我们狠抓了政治思想工作，联系科研领域中两条路线、两种思想斗争的实际，狠批了资产阶级成名成家思想和资产阶级法权思想，发扬了相互学习团结协作的社会主义新风尚。在工作过程中，医院的同志医疗业务繁忙，他们发扬艰苦奋斗的精神，积极开展科研工作，并且把放射性同位素的标记和操作技术教给研究所的同志。研究所的同志在免疫学方面积累了一些经验，他们也毫无保留地传授给医院的同志。正因为双方密切配合，取长补短，集思广益，才顺利地完成了这项新技术的研究工作。

在共同战斗中，同志们经常琢磨这样一个问题：我们今天在毛主席革命路线指引下搞科研，同过去有什么区别呢？同志们从自己切身经验，认为主要的差别，就是经过无产阶级文化大革命，特别是经过学习毛主席关于理论问题的重要指示，觉悟提高了，不再把科研成果看作是商品，是个人、小团体的私有财产，科研成果是在毛主席革命路线指引下，集体劳动的结晶，是为无产阶级政治服务、为工农兵服务的工具。因此，这些科研成果不但上马快，进展快，而且推广应用也快。为了推广新技术，在接待外单位参观时，不仅让他们看操作技术，

而且还要让他们直接参加实验，不厌其烦地介绍原理、方法，介绍在工作中碰到过的问题和解决困难的办法。有的单位实验室设备不全，我们就主动上门，帮助一起建立设备，创造条件。外单位在实验操作中遇到了困难，我们及时登门“会诊”。我们想的就是多传经验，让兄弟单位的工作尽快上去，使这项新技术在实际应用中发挥作用，更多地为工农兵服务。

三年来，在毛主席革命路线指引下，我们协作组开展了人绒毛膜促性腺激素的放射免疫分析工作，建立了方法，并应用于天花粉中期引产机理的研究、滋养叶细胞肿瘤早期诊断、早孕诊断、黄体生成激素的间接测定等工作中，为计划生育和妇产科临床应用作出了一定的贡献。同时，我们研究试制了放射免疫分析的成套试剂，供上海市六个医院使用。此外，还着手开展黄体生成激素、促甲状腺激素、促肾上腺皮质素、促卵泡激素、生长激素以及人体绒毛膜生长泌乳素等的放射免疫测定工作。但是，我们的工作与形势对我们的要求还有差距，我们决心进一步学习毛主席关于无产阶级专政的理论，以阶级斗争为纲，在改造客观世界的同时，努力改造主观世界，坚持无产阶级专政下继续革命，“保持过去革命战争时期的那么一股劲，那么一股革命热情，那么一种拼命精神，把革命工作做到底。”力争在放射免疫分析工作中取得更大的成绩。

第 一 部 分

基 本 原 理

放射免疫分析、竞争性蛋白质结合分析、放射受体分析及其它放射体外测定方法的共同特点是：灵敏度高、特异性（即专一性）强、精确性好、标本用量少、试剂用量少、应用范围广、便于规格化与自动化、不会引起对人体的辐射损伤，以及比较简单易行。这类方法，能定量分析毫微克—微微克水平的微量物质，对于测量血清激素之类的低浓度代谢物，是过去采用的任何生物测定法所无法比拟的。

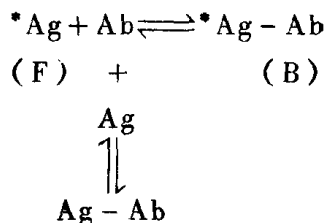
上述几种类似的分析方法，有人总称之为“饱和分析法”。这一名称是否最恰当，尚无定论；但迄今为止，它已被广泛采用。

放射免疫分析等微量分析法，为研究许多重要生物活性物质的含量、分布、代谢、作用原理等提供了新的手段，使不少长期悬而未决的生命科学问题获得了新的线索、解释或发现；也为一些疑难病症提供了早期诊断、疗效和预后分析的可能。

为了使读者对放射免疫分析等微量分析法有一个概括的了解，由上海市九个单位和中国科学院北京动物研究所、中国医学科学院首都医院的一些同志，从一般原理入手，分工编写了下列十一个专题。

放射免疫分析的一般原理

放射免疫分析是根据同位素分析的灵敏性和抗原-抗体反应的特异性这两大特点而综合起来的一种测定技术。它是饱和分析法的一种。饱和分析是基于相同分子的两类型（一种是未标记的，一种是标记的）对第二种浓度较低的分子所形成的竞争作用。对于放射免疫测定来讲，就是标记抗原（*Ag）与非标记抗原（Ag）对特异抗体（Ab）的竞争结合，这种竞争作用构成了放射免疫分析的基础：



当 *Ag 和 Ab 的量保持恒定，而且 Ag 与 *Ag 之和大于 Ab 上有效结合点的数目时，满足了这两个条件，则 Ag 和 *Ag - Ab 之间存在着函数关系：随着 Ag（自变量）浓度的增加，*Ag - Ab 复合物（应变变量）的数量逐渐减少（见图 1）。因为标记抗原对抗体的结合被未标记抗原的竞争结合所抑制，于是产生一条抑制曲线（见图 2）。它反映了标记抗原结合程度（或游离程度或二者之比）与未标记抗原的函数关系，这种关系就表现在放射免疫测定的剂量反应曲线上。这一条曲线就是对样品进行定量的依据。因此，未知样品中抗原浓度的测定可以根据样品管中所观察到的标记抗原的结合量与一系列标准管的标记抗原的结合量进行比较。

抗原-抗体复合物的形成对放射免疫分析非常重要。但抗原-抗体反应是十分复杂的过程，为了便于分析，我们仍可以用一个简单的模式表示，这个模式也适用于其它的饱和分析。假设抗原和抗体为均一的和单价的，则



式中 P 代表抗原，Q 代表抗体，PQ 代表抗原-抗体复合物，k 是结合速度常数， k_1 是解离速度常数。根据质量作用定律，如 K 等于平衡常数（或称亲和常数），即 $K = \frac{k}{k_1}$ ，

则

$$K[P][Q] = [PQ] \quad (2)$$

在平衡时，结合在抗体上的抗原（B）对游离抗原（F）含量之比为：

$$B/F = [PQ]/[P] \quad (3)$$

由于只有一部分 P 和 Q 参与结合，所以

$$[P] = [P_i - PQ] \quad (4)$$

$$[Q] = [Q_i - PQ] \quad (5)$$

在以上二式中 P_i 和 Q_i 分别代表抗原和抗体的初始浓度。因此，结合与游离抗原之比

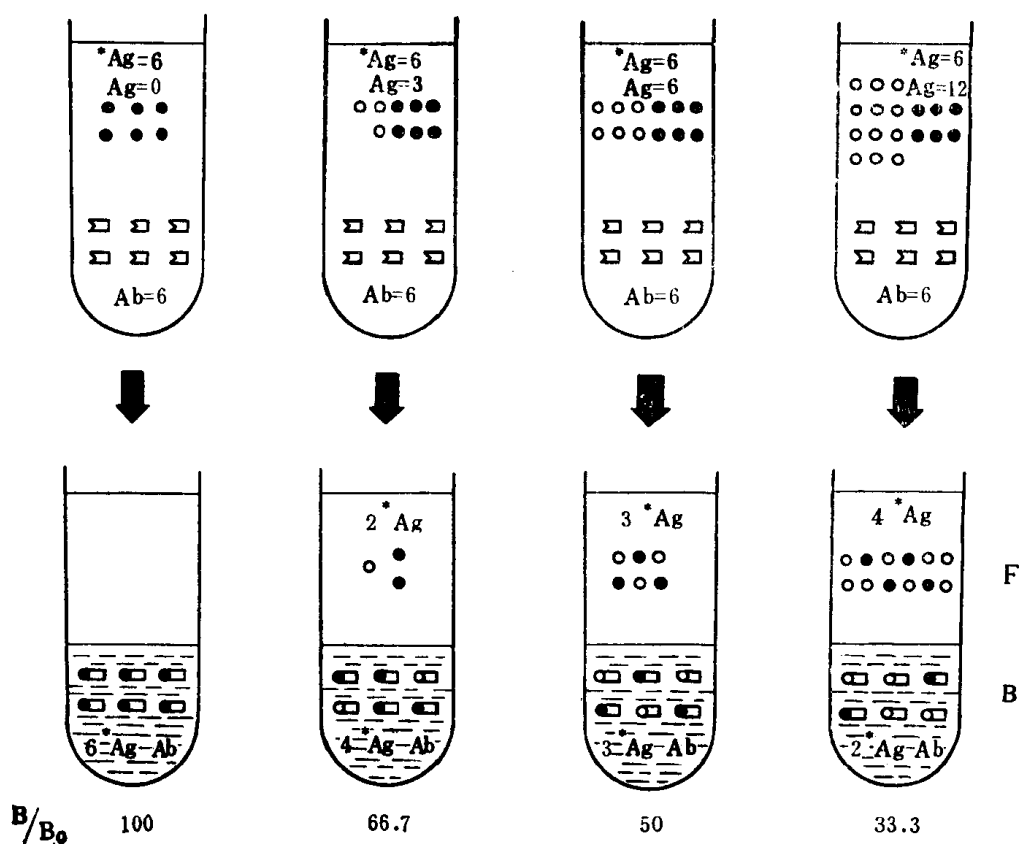


图1 放射免疫测定原理的定量示意图

*Ag—标记抗原；Ag—非标记抗原；Ab—抗体；*Ag-Ab—标记抗原-抗体复合物。

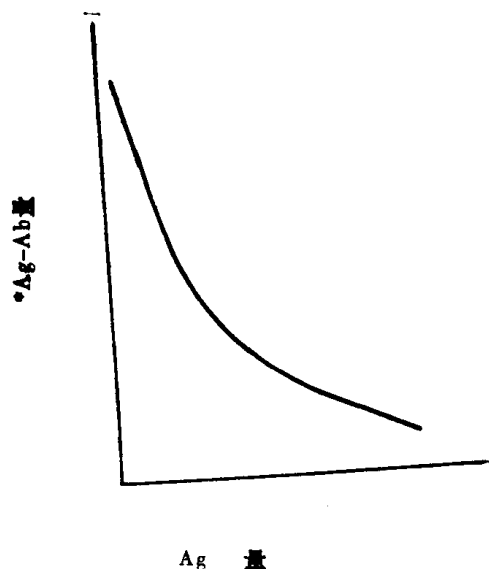


图2 竞争结合抑制曲线示意图

它们既不能叠加，也不平行。这就是为什么在选择抗体时不仅要考虑滴度，还要考虑抗体的结合力强度 (avidity)，前者表现在抗体的稀释度上，后者表现在曲线的斜率上。只有通过这样的选择，才可望获得理想的灵敏度。

应为：

$$B/F = [PQ]/[Pi - PQ]$$

经移项后

$$[PQ] = [Pi]B/F/(B/F + 1) \quad (6)$$

合并方程式 (2)、(4)、(5) 和 (6)，得出

$$(B/F)^2 + B/F[1 + KPi - KQi] - KQi = 0$$

这就推导出一个双曲线方程。所以放射免疫分析的剂量反应曲线并不是一根直线。此外，抗体平衡常数 K 值显著影响灵敏度，因不同批抗血清中的抗体具有不同的结合能量，于是就产生不同的剂量-反应曲线。当用对数作图时，

六十年代初建立了放射免疫分析方法，此后十余年来应用益加广泛，方法也日臻完善。除此以外，根据放射免疫分析原理所延伸的许多分析方法相继建立起来，大大丰富了饱和分析法的内容。这些分析方法的基本原理与放射免疫分析相同，只是不利用免疫反应，而是使用其它的特异结合蛋白质。其中比较重要的饱和分析法有以下几种：

1. 竞争蛋白质结合分析(Competitive protein-binding assay) 特异结合蛋白用血浆或组织中存在的一类蛋白质，如皮质类固醇结合球蛋白(CBG)和甲状腺素结合球蛋白(TBG)等，前者用来测定各种类固醇激素，后者用来测定 T_4 和 T_3 。

2. 放射酶分析(Radioenzymatic assay) 以酶作反应试剂，如叶酸还原酶用来测定叶酸。

3. 放射受体分析(Radioreceptor assay) 利用激素的靶细胞特异的受体蛋白作结合试剂，例如子宫细胞质受体(测定雌激素)、肝细胞膜受体(测定胰岛素)等。第二信息系统的 cAMP 和 cGMP 的测定也可以用它们的受体蛋白如磷酸二酯酶。

4. 酶标免疫分析(Enzyme-linked immunoassay) 利用酶代替同位素进行免疫测定，最后用紫外吸收光谱测酶活性。此法原理完全同于放射免疫分析，但不用同位素操作，灵敏度较差。

抗原的纯化及标准品

一、放射免疫分析中对抗原的要求

在放射免疫分析中，影响测定的主要因素有三个：(1) 抗原的纯度和标记抗原的比放射性；(2) 抗血清的质量；(3) 游离抗原和抗原抗体复合物的分离方法。

放射免疫分析中需要纯度高的抗原，抗原的浓度至少在90%以上。有人认为抗原要达到“免疫纯”，即在免疫电泳鉴定时，仅见一条抗原抗体结合的沉淀线。但实际上，由于免疫电泳的检出灵敏度较低，单用免疫电泳来鉴定纯度往往还不够，而须用比免疫电泳灵敏度更高的方法来鉴定，例如采用聚丙烯酰胺电泳或放射免疫电泳自显影等方法。

供标记用的抗原纯度直接影响方法的特异性和灵敏度。其道理很简单，即不纯的抗原经同位素标记后，杂质也随同抗原一起被标记。这样就不仅影响了抗原的比放射性，而且在反应时还直接影响抗原和抗体反应的特异性。

二、抗原分离纯化方法

抗原分离纯化方法一般分三类：

第一类是物理化学方法，如盐析法；无机或有机溶剂抽提法；各种电泳分离法（琼脂板电泳，琼脂柱电泳、淀粉电泳、葡聚糖电泳、聚丙烯酰胺电泳等等）；各种层析法（纸层析、薄板层析、滤纸粉层析等等）；离子交换分离法；凝胶过滤分离法和等电点聚焦法等。本选编中报道的关于人绒毛膜促性腺激素的提纯，就是采用物理化学方法来进行的。

第二类是免疫方法。一般可分两种：一种是抗原抗体复合物解离法，即将抗原先和特异抗体结合形成抗原抗体复合物，离心后取沉淀，弃去上清液杂质，再用某些化学试剂将抗原抗体复合物解离，最后用葡聚糖凝胶来分离抗原和抗体。本选编中介绍的上海实验生物研究所提纯 AFP 的方法，就是这种解离法。另一种是亲和层析法，即先将特异的抗体交联到琼脂糖珠上去，然后将接上抗体的琼脂糖珠装入柱层析管内，制成一根免疫吸附柱。当抗原通过柱时就与柱上的抗体结合，而杂质是不被吸附在柱上，最后用化学试剂将抗原和抗体解离、洗脱下来。本选编中介绍的中国科学院上海生物化学研究所提纯 AFP 的方法就是采用亲和层析法。此外尚可采用戊二醛将特异抗血清缩合成凝胶，再将此凝胶捣碎后装入层析柱内，作为一种免疫吸附柱。

第三类是将物理化学法和免疫法互相结合，这是最常用的方法。一般是将提取物先用物理化学方法进行纯化，然后用免疫吸附方法再纯化。这类方法效果较好。

三、标准品

放射免疫定量法不同于直接称量法，它是根据反应的强度来估量被测物的浓度。既然是按反应来估量，则必须事先掌握剂量（标准品量）与反应（标记物的结合率）之间的固有函

数关系，即建立标准曲线。有了标准曲线才能度量。

凡度量都涉及到标准化的问题，以确保各实验室和不同时间进行计量的一致性。为实现标准化，除采用一套质量控制的办法，限制测定内和测定间变差，还应选择适当的标准品。

标准品或为生物制品（蛋白质），或为人工合成（短肽和甾体等等），这些产品的免疫活性不均一，且易变。任何改变都影响了它们和抗体结合点之间的空间合适度，使两者结合的牢固度不同程度地降低，反应的强度亦是不等地减弱，变化不一。因此，作为标准品，应该是选择来源方便、存货充裕、供应有余、贮藏稳定，以及免疫活性与欲测样品相当，而且其中不含放射免疫反应干扰物的“纯”抗原。所谓“纯”不是指化学纯，它可以含杂质，但对放射免疫反应无干扰作用，故与标记抗原不同，因为对标记抗原的要求是免疫纯。