

实用放射免疫学

李振甲 韩春生 王建勋 主编

科学技术文献出版社

90712

实用放射免疫学

主 编

李振甲 韩春生 王建勋

编 著 者

李振甲 韩春生 汤仲明 陈泮藻

杨梅芳 方永鑫 常愈明 刘成贵

严敏官 傅莉成

C0154396



科学技术文献出版社

1 9 8 9

内 容 简 介

本书是理论和实践相结合的一本专著。其内容包括总论、放射免疫分析的质量控制、前列腺素和环核苷酸测定、甾体和甲状腺激素测定、肽类激素测定、蛋白质和酶测定、血液药物测定、抗原和抗体测定、儿茶酚胺和胆汁酸测定、电子计算机的应用和数据处理等。

可供生物医学研究工作者、放射免疫和检验人员参考。

2182/11

实用放射免疫学

李振甲 韩春生 王建勋 主编

科学技术文献出版社出版

北京京辉印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

787×1092毫米 32开本 21印张 468千字

1989年5月北京第一版第一次印刷

印数：1—5200册

科技新书目：190—129

ISBN 7-5023-0773-7/R·124

定价：7.65元

前 言

近年来，放射免疫分析技术的研究和应用发展甚速，已成为基础医学研究和临床诊断疾病的常规方法。为适应当前放射免疫工作进一步发展的要求，我们在《放射免疫分析法手册》的基础上，重点补充了放射免疫的基本理论，质量控制，电子计算机的使用和数据处理，单克隆抗体的制备技术，以及近年来国内外文献报告的新技术和新方法。本书内容比较全面，可供生理、生化、免疫、药理、核医学和临床医师参考。

本书第一章和第十章分别经王仁芝教授和吴德福高级工程师审阅，在此深表谢意。

由于作者知识所限，书中缺点和不足在所难免，殷切希望读者批评指正。

编者

1988年3月于北京

目 录

第一章 总 论	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 放射免疫分析的基本原理	(12)
第三节 抗血清的制备及质量鉴定	(21)
第四节 标记抗原的制备	(41)
第五节 放射免疫分析中的分离技术	(58)
第六节 放射免疫分析方法的建立及有关问题	(67)
第七节 放射性测量技术	(79)
第八节 辐射防护和放射性污物处理	(97)
第九节 单克隆抗体技术	(112)
第二章 放射免疫分析的质量控制	(135)
第一节 放射免疫分析质量控制的内容和方法	(135)
第二节 放射免疫分析中的误差	(140)
第三节 放射免疫试剂及其运输贮存的质量控制	(149)
第四节 放射免疫测定结果的质量控制	(157)
第三章 前列腺素与环核苷酸的测定	(190)
第一节 前列腺素A、E、F的测定	(190)
第二节 血栓素B ₂ 的测定	(198)
第三节 6-酮-前列腺素F _{1α} 的测定	(211)
第四节 血浆bicyclo-PGEM的测定	(221)
第五节 13,14-二氢-15-酮-前列腺素F _{2α} 的测定	(226)
第六节 白三烯B ₄ 的测定	(231)
第七节 6-酮-前列腺素E ₁ 的测定	(236)

第八节	环一磷酸腺苷的测定	(240)
第九节	环一磷酸鸟苷的测定	(251)
第四章	甾体激素、甲状腺激素的测定	(262)
第一节	皮质醇的测定	(262)
第二节	醛固酮的测定	(269)
第三节	血浆雌二醇的测定	(278)
第四节	尿雌三醇的测定	(283)
第五节	血浆孕酮的测定	(287)
第六节	血浆睾酮的测定	(292)
第七节	血浆皮质酮的测定	(297)
第八节	血清甲状腺素的测定	(300)
第九节	血清3,3',5-三碘甲腺原氨酸的测定	(306)
第十节	血清3,3',5'-三碘甲腺原氨酸的测定	(311)
第十一节	血清游离甲状腺素的测定	(320)
第十二节	^{125}I -三碘甲腺原氨酸摄取率的测定	(326)
第五章	肽类激素的测定	(332)
第一节	血清胰岛素的测定	(332)
第二节	血浆胰高血糖素的测定	(337)
第三节	血清C肽的测定	(342)
第四节	特异性人绒毛膜促性腺激素的测定	(348)
第五节	血清降钙素的测定	(353)
第六节	血清胰多肽的测定	(358)
第七节	血清胃泌素的测定	(363)
第八节	血清生长激素的测定	(369)
第九节	血清促甲状腺激素的测定	(376)
第十节	血清促肾上腺皮质激素的测定	(382)
第十一节	血清催乳素的测定	(391)

第十二节	血清促性腺激素的测定	(398)
第十三节	心钠素的测定	(405)
第六章	蛋白质类的测定	(412)
第一节	血清铁蛋白的测定	(412)
第二节	血清 β_2 微球蛋白的测定	(421)
第三节	血清甲状腺素结合球蛋白的测定	(427)
第四节	β -血栓球蛋白的测定	(432)
第五节	血小板4因子的测定	(439)
第六节	免疫球蛋白E的测定	(443)
第七节	血清磷酸肌酸激酶同功酶的测定	(448)
第八节	腺苷酸环化酶的测定	(453)
第九节	血小板相关IgG的测定	(457)
第十节	尿白蛋白的测定	(460)
第十一节	血清肌红蛋白的测定	(466)
第十二节	甲胎蛋白的测定	(470)
第七章	血清中抗体、抗原的测定	(476)
第一节	血清抗甲状腺球蛋白抗体的测定	(476)
第二节	血清抗DNA抗体的测定	(482)
第三节	血清胰岛素抗体的测定	(486)
第四节	乙型肝炎表面抗原的测定	(489)
第五节	乙型肝炎核心抗体的测定	(494)
第六节	人血清中血吸虫病抗体及循环免疫复合物的测定	(499)
第七节	癌胚抗原的测定	(502)
第八章	血药物浓度的测定	(508)
第一节	博来霉素的测定	(508)
第二节	庆大霉素的测定	(513)

第三节	丁胺卡那霉素的测定	(517)
第四节	氯丙嗪的测定	(520)
第五节	血清苯妥英钠的测定	(524)
第六节	巴比妥的测定	(528)
第七节	吗啡的测定	(531)
第八节	阿托品的测定	(536)
第九节	地高辛的测定	(539)
第十节	心得安的测定	(542)
第十一节	氨甲喋呤的测定	(544)
第十二节	尼古丁的测定	(547)
第九章	儿茶酚胺、胆汁酸及其它的测定	(552)
第一节	儿茶酚胺的测定	(552)
第二节	胆汁酸的测定	(561)
第三节	血浆肾素活性的测定	(574)
第四节	血浆血管紧张素Ⅰ的测定	(582)
第十章	数据处理和电子计算机的应用	(587)
第一节	正确处理数据的重要性	(587)
第二节	基本定义和评价标准	(588)
第三节	数据处理的基本过程和内容	(591)
第四节	选择数据处理程序的原则	(606)
第五节	小结	(609)
第六节	计算器计算实例示范	(609)
第七节	原程序清单	(615)
第八节	计算程序说明和实例示范	(637)
附录		(649)
一、	激素的国际标准 (IS) 和国际参考制剂 (IRP)	(649)

二、离心力计算.....	(655)
三、 ^{125}I 放射性蜕变校正系数表	(656)
四、国际通用度量衡名称及符号.....	(657)
五、放射性单位对照.....	(659)

第一章 总 论

第一节 概 述

一、放射免疫分析技术发展简史

1950年美国免疫学家Pressmen和Eisen首先进行了将放射性核素标记物应用于免疫学抗原、抗体反应的研究。1953年美国学者Berson等用 ^{131}I 标记蛋白质,进行蛋白质代谢示踪研究。随后应用 ^{131}I 标记的胰岛素,在接受外源性胰岛素治疗的糖尿病患者血浆中,检出有胰岛素抗体的存在,并在研究中进一步证实,当同时向含有胰岛素抗体的血清中加入非标记和 ^{131}I 标记胰岛素时,发现非标记胰岛素能竞争抑制 ^{131}I 标记胰岛素和抗体的结合,这一事实奠定了以竞争抑制结合为原理作为定量分析的理论基础。1959年Yalow和Berson创建了放射免疫分析法(Radioimmunoassay,RIA)。

放射免疫分析法是将放射性核素示踪技术的高灵敏度和免疫学抗原、抗体结合的高特异性,两者相结合的产物。因其具有其它分析技术无可比拟的优点,被看作是在分析方法上的重大突破,从而受到生物医学研究工作者的高度评价。因这种分析方法不仅灵敏度高、特异性强,并且还具有操作简便,重复性好和准确性高,易于系列化、商品化和自动化等优点,故发展速度之快,应用范围之广,在定量分析技术研究史上是少见的。因此,1977年Yalow和Berson荣获诺贝

尔生物医学奖。

1960年Ekins利用人血清中的甲状腺素结合球蛋白(TB-G)和甲状腺素(T_4)具有特异性结合力的特点,建立了竞争蛋白结合分析法(competitive protein binding assay, CPBA),测定血清 T_4 。根据这一原理,Ekins提出了以不同类型的结合蛋白作为结合剂,可以测定生物样品中的微量活性物质的水平。1963年Murphy等进一步完善了这一分析技术。特别是对不同动物血浆中的类固醇结合球蛋白(CBG)对皮质激素结合能力的特异性,进行了深入系统地研究,建立了血浆皮质醇竞争蛋白结合分析法。随后,另一些作者相继建立了睾酮、孕酮、皮质酮、雌酮、环核苷酸和叶酸等的测定法。因此种分析方法不需制备抗体,取材容易,便于推广,故发展也很快。近10多年来,由于半抗原-蛋白质结合物合成方法取得新的进展,许多小分子的化合物都可通过免疫制备优质抗血清,又加之竞争蛋白结合分析法的灵敏度和特异性都不及放射免疫分析法高,故目前已逐渐被放射免疫分析法所取代。

1968年Miles和Hales首先建立了免疫放射分析法(immunosoradiometric assay, IRMA)。这种方法的主要特点是以放射性核素标记抗体,故测定的基本原理和放射免疫法有所不同。它是以过量标记抗体和待测物反应,待平衡后加入免疫吸附剂,吸附反应液中剩余游离标记抗体,经离心除去而分离;或者预先制备固相抗体,然后将待测样品加到过量固相抗体中,反应一定时间,再加标记抗体,生成固相抗体-抗原-标记抗体复合物,经洗涤除去剩余标记抗体。后一种方法称之为双位点夹心法(two site sandwich method)。免疫放射双位点夹心法操作简便,不需离心,灵敏度高,标

准曲线可用范围宽，近年来发展很快，国内外有些试剂盒采用了这一方法，特别是使用了磁化固相法，不仅简便快速，而且特别适合自动化测量。有关双位点免疫放射分析法和放射免疫分析法的比较如表1-1。

表 1-1 放射免疫和双位点夹心免疫放射分析方法比较

放射免疫分析	双位点夹心免疫放射分析
标记抗原	标记抗体
分离B和F抗原	分离B和F抗体
抗体、抗原结合反应为液相	抗体、抗原结合反应为固相
B的cpm和被测物浓度为反比	B的cpm和被测物浓度为正比
标记抗原及抗体是限量的	抗体和标记抗体均为过量的
抗体的质量影响方法的特异性	使用针对不定抗原决定簇的两种抗体，特异性好，灵敏度高
标准曲线可用范围小	标准曲线可用范围大
有些标记抗原不稳定或难以标记	标记IgG稳定性好
抗体的活性影响灵敏度	抗体的活性和比度对灵敏度影响不大
抗体稀释度大，故用量小	两种抗体的用量较大
抗体直接稀释后使用	供标记的抗体需要提取IgG
适合测一切半抗原及大分子化合物	仅适合测定蛋白质、酶等大分子化合物

1970年Lefkowitz根据竞争抑制结合反应的基本理论，利用激素受体与激素呈现特异结合的特性，以组织受体为结合剂，建立了放射受体分析法 (radioreceptor assay, RRA)。放射受体分析实际上也是竞争蛋白结合分析，只是以受体蛋白代替结合蛋白。在一定条件下，受体结合激素（介质或药物）能力的大小和受体对激素的亲和力成正比。放射受体测

定值代表具有生物活性物质的水平，而放射免疫分析法测定值代表有免疫活性物质的水平，故两种方法对同一样品所测定的值常有所差异。某激素可与不同种动物的组织受体结合，因此用动物的受体作结合剂可测定人的样品。许多研究结果表明，几乎所有激素和一些神经介质均可用放射受体法测定。但由于受体很不稳定，又加之提取纯化较困难，须保存在较低的冷冻条件下，也只能供短期内使用，因而限制了这一分析技术的广泛应用。

二、非放射性免疫分析

非放射性免疫分析是继放射免疫分析之后而发展起来的一类新的免疫分析方法。是以酶、荧光物质，或其它化学物质标记抗原或抗体作示踪剂。其原理和放射免疫法相同，灵敏度和特异性可达到放射免疫分析同等水平，且没有辐射防护和标记物衰变问题。近年来有关方法学的研究和应用发展也很快。目前常用的有下列三种：

(一) 酶免疫分析 1966年 Nakane 等首先将抗原抗体免疫反应和酶的高效催化作用相结合，建立了免疫酶法进行生物组织中抗原分布的研究。1971年 Engvall 等用酶标记抗原，建立了竞争性酶联免疫吸附分析法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定免疫球蛋白。同年 Weemen 用酶标记绒毛膜促性腺激素 (HCG) 建立了人 HCG 测定法。目前人们建议将以酶标记的分析技术称之为酶免疫分析法 (enzyme immunoassay, EIA)。酶标记物制备简便，稳定，有效期长。灵敏度可达到 $\text{ng} \sim \text{pg}$ 水平，应用范围广泛，可以测定蛋白质类等大分子化合物，也可用于测定小分子的半抗原。测定方法的类型有液相竞争法，双位点

固相法、双抗体双位点固相法和间接固相等。

(二) 荧光免疫分析 荧光免疫分析 (fluoroimmunoassay, FIA) 是以荧光物质标记抗原或抗体作示踪物的测定方法。荧光免疫分析具有和酶免疫分析法相似的优点, 但灵敏度低于酶免疫分析, 仅可达ng级水平。该法主要缺点是受非特异结合影响大, 有时重复性差。有人采用了磁化固相法, 降低了空白读数。方法的准确性和精密度有所提高。最近荧光免疫分析技术取得了新的进展, 例如荧光偏振免疫分析 (fluorescence polarization immunoassay) 和时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TR-FIA), 前者需要一台偏振荧光分光光度计, 在测量中消除样品中的非特异性荧光物质的干扰, 提高了分析方法的准确性。时间分辨荧光免疫分析是另一种类型新的分析方法, 它是利用一种新型稀土荧光物质 (多用稀土金属螯合物), 以脉冲光为激发光源, 再配合以时间分辨测量法, 非常显著地降低了本底, 甚至可以达到零, 尤其采用单克隆抗体建立双位点夹心法, 进一步提高了方法的灵敏度, 最小检出值可达 $10^{-12} \sim 10^{-17}$ mol。应用范围广泛, 是配基分析技术很有发展前途的方法。

(三) 发光免疫分析 发光免疫分析 (luminescent immunoassay, LIA) 是70年代末发展起来的另一种非放射性免疫分析技术。按其所用发光材料的不同, 可分为化学发光免疫分析 (chemiluminescence immunoassay, CIA) 和生物发光免疫分析 (bioluminescence immunoassay, BIA)。前者以氨基苯二酰肼 (luminol) 及其衍生物标记抗原或抗体, 后者是用从荧光虫、细菌等生物材料所提取的荧光素酶 (luciferase) 标记抗原或抗体。发光

免疫分析的灵敏度很高，最小检出值可达 $10^{-12} \sim 10^{-15}$ mol，应用范围也很广，可测定的物质包括蛋白质、激素、酶、脂肪酸、维生素、药物等。

三、有关名称问题

放射免疫分析、竞争蛋白结合分析、放射受体分析和免疫放射分析，其特点都是以放射性核素标记抗原或抗体，除固相非竞争法外，原理又完全相同，故人们建议用一个统称代表这类方法。如有人提出过同位素稀释法 (isotope dilution method)、置换分析法 (displacement analysis)、放射立体化学分析法 (radiostereoassay)、饱和分析法 (saturation analysis)、放射性体外分析 (radioassay *invitro*)，竞争放射分析法 (competitive radioassay) 等。多数学者同意用后两个名称。鉴于近年来免疫放射分析的应用日益普遍，竞争放射分析作为统称也不甚确切，故本书仍沿用放射免疫分析法一词。

酶免疫分析、荧光免疫分析、发光免疫分析的基本原理虽然和放射免疫分析完全相同，但因不以放射性核素作示踪物，故不应属于放射免疫分析范畴。近年来有的学者提出配基分析 (ligand assay) 或结合分析 (binding assay) 作为放射免疫和非放射免疫分析法的统称。此处配基指任何待测物，而抗体、特异性结合蛋白和受体称之为结合剂。依据标记物和分析方法的不同，配基分析方法的类型如图1-1。

四、应用

放射免疫分析问世20余年来，无论是方法学研究，还是试剂的研制和生产都取得了引人注目的进展。目前已广泛应

(A) 竞争配基分析 (标记配基)	(B) 竞争配基分析 (标记结合剂)	(C) 非竞争配基分析 (标记结合剂)
(a) 同时温育 $P + \begin{matrix} P^*Q \\ Q \\ P^*PQ \end{matrix}$ (b) 顺序温育 $P + Q \rightleftharpoons PQ$ $+ P^* \rightleftharpoons P^*Q$ (c) 置换反应 $P + P^*Q \rightleftharpoons P^* + PQ$	(a) 一步顺序温育分离法 $P + Q \rightleftharpoons PQ^* \rightleftharpoons [P]Q^* + [P]Q^*P^*$ (b) 二步顺序温育分离法 $P + Q \rightleftharpoons PQ$ $+ P^* \rightleftharpoons [P]Q + [P]Q^*P^*$	(a) 一步法 $P + [Q] + Q^* \rightleftharpoons [Q]PQ^*$ (b) 两步法 $P + [Q] \rightleftharpoons [Q]P$ $+ Q^* \rightleftharpoons [Q]PQ^*$ (c) 三步法 $P + [Q] \rightleftharpoons [Q]P$ $Q_2 \rightleftharpoons [Q]PQ_2$ $+ R^* \rightleftharpoons [Q]PQ_2R^*$

P = 配基 (分析物)
 Q = 结合剂
 $*$ = 标记
 R = 结合剂 (对 Q)
 $[P]$ = 固相配基
 $[Q]$ = 固相结合剂

图 1-1 配基分析原理及分类示意图

用于生物化学、分子生物学、生理学、免疫学、药代动力学、血液学、流行病学、寄生虫学、微生物学、细胞学、内分泌学、心脏病学、肿瘤学、老年病学、胃肠病学、妇产科学、祖国医药学和计划生育等的基础研究和临床疾病的诊断。测定物质有：蛋白质、酶、激素、环核苷酸、抗体、肿瘤相关抗原、微生物抗原以及其它微量活性物质。这一分析的广泛应用，提高了基础研究和临床诊疗水平，并且越来越显示其优点。目前放射免疫分析已成为一门新的独立学科。

五、展望

放射免疫分析技术的广泛应用，大大推动了生物医学理论研究的进程。并且已经阐明和解决了许多有关生理、生化代谢机制和临床诊断中重大课题，从而开阔了人们的眼界，丰富了对一些疾病本质的认识，为医学科学技术研究进入到分子水平作出了贡献。从分析技术的发展来看，虽然已日臻完善，而在我国目前尚处在方兴未艾阶段。从最近的资料表明，国内外学者继续在方法学上进行深入的研究，努力探索新材料，新方法，新技术，新工艺。在已取得新的成就的基础上，今后放射免疫分析技术主要发展方向，集中表现在以下几个方面。

（一）试剂盒的研制 试剂盒的研制和商品化对普及和推广这项超微量分析技术起到了积极作用。试剂盒中各组分经严格检验和标定，不但提高了产品质量，简化了操作手续，并且重复性好，给实验研究工作提供了很大方便。故试剂盒的生产发展甚速。目前国外试剂盒的生产已100余种，国内也已达50余种。在采用新的生产工艺和新材料的前提下，今后试剂盒的品种将继续增加，产品的数量和质量将大