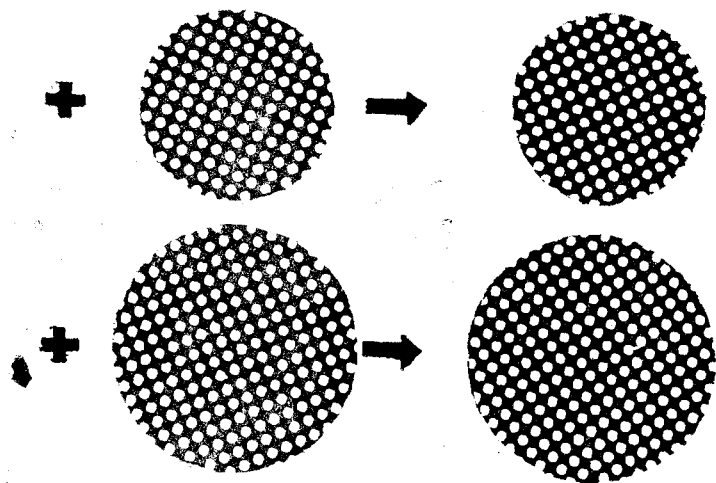


[英]T.查德 著



放射免疫分析及其 有关技术入门



**An Introduction to Radioimmunoassay and
Related Techniques**

T. Chard

North-Holland Publishing Company

放射免疫分析及其有关技术入门

〔英〕T. 查 德 著

叶维新 译

刘秀杰 校

原子能出版社出版

(北京2108信箱)

原子能出版社印刷厂印刷

新华书店总店科技发行所发行·新华书店经售

☆

开本787×1092_{1/32}·印张7.625·字数160千字

1988年9月北京第一版·1988年9月北京第一次印刷

印数 1—1300

统一书号: 15175·869 定价: 2.45元

ISBN 7-5022-0015-0/R·3

内 容 提 要

本书深入浅出地介绍了放射免疫分析及其有关技术各主要方面的基本理论和基本概念。内容包括：纯化配体，示踪配体，结合剂，分离技术，生物样品的制备，结果的计算，灵敏度，特异性，精密度，结合分析的自动化等。着重介绍了这些方面中的共性问题。本书对于系统地认识放射免疫分析及其有关技术的理论有很大帮助。

本书对医学科学研究人员，临床医学的实验人员，医学研究生等有较强的参考价值。特别是对开始从事放射免疫分析工作以及已有一定实践经验但缺乏系统理论知识的人员，可以起到入门的作用。

译 者 的 话

放射免疫分析及其有关技术，在近二十多年来，得到了迅速的发展，并渗透到医学各学科，在不同程度上促进了各有关学科的发展，成为现代医学中不可缺少的应用技术。

近些年来，关于这类技术的专著、论文在迅速增多，反映了这类技术的发展趋势及社会需要。但仍感缺少比较系统介绍这类技术的基本理论及基本概念的书，供初学者参考及学习。T. Chard所著的《放射免疫分析及其有关技术入门》一书，以深入浅出方式，比较系统地介绍了这类技术主要方面的基本理论及基本概念，并以较多的篇幅，介绍了这类方法的灵敏度、特异性及精密度等方面的内容，因此，本书不仅对开始从事放射免疫分析工作以及已有一定实践经验但还缺乏系统理论知识的人员有很大的帮助，而且对于医学科学研究人员，临床医学的实验人员，医学研究生，本科生，也都有较大的参考价值。译者希望，这本书的出版，将有助于这类技术的普及和发展。

本书译出初稿后，承中国医学科学院阜外医院核医学科主任刘秀杰教授仔细校阅，在此深表感谢。

译文中不妥之处，在所难免，请读者指正。

1985年于武汉同济医科大学

略 语 表

RIA = radioimmunoassay	放射免疫分析
EIA = enzymeimmunoassay	酶免疫分析
FIA = fluoroimmunoassay	荧光免疫分析
CPB = competitive protien binding assay	竞争性蛋白质结合分析
RRA = radioreceptor assay	放射受体分析
AG = antigen	抗原
Ab = antibody	抗体
AgAb = antigen-antibody complex	抗原-抗体复合物
k_1 = forward association constant	正向结合常数
k_2 = reverse association constant	逆向结合常数
K = affinity constant	亲和常数
B = bound fraction	结合分数
F = free fraction	游离分数
b = proportion of tracer bound as % of that in zero standard	示踪剂结合率与零标准结合率比值
μg = microgram	微克
ng = nanogram	(10^{-9} 克)
pg = picogram	(10^{-12} 克)
fg = femtogram	(10^{-15} 克)
hPL = human placental lactogen	人胎盘催乳素
hGH = human growth hormone	人生长激素

ACTH = adreno corti cotrophic hormone	促肾上腺皮质激素
LH = luteinizing hormone	促黄体激素
FSH = follicle-stimulating hormone	促卵泡激素
TSH = thyroid-stimulating hormone	促甲状腺激素
AVP = arginine-vasopresin	精氨酸(后叶)加压素
LVP = lysine-vasopresin	亮氨酸(后叶)加压素
hCG = human chorionic gonadotrophin	人绒毛膜促性腺激素
AFP = α -fetoprotein	甲胎球蛋白
CEA = carcinoembryonic antigen	癌胚性抗原
T ₃ = triiodothyronine	三碘甲腺原氨酸
T ₄ = thyroxine	甲状腺素
CBG = cortisol-binding globulin	皮质醇结合球蛋白
TBG = thyroxine-binding globulin	甲状腺素结合球蛋白
SHBG = sex hormone-binding globulin	性激素结合球蛋白
LATS = long-acting thyroid stimulator	长效甲状腺刺激素
AMP = adenosine monophosphate	腺苷一磷酸
PGF _{2α} = prostaglandin F _{2α}	前列腺素F _{2α}
FgD = fragment D of fibrinogen	纤维蛋白原碎片D
μ l = microliter	微升
μ m = micron	微米
mol = mole	摩尔
M = molar	克分子
mM = millimolar	毫克分子
Ci = Curie	居里

^3H = tritium	氚
^{14}C = carbon-14	碳-14
^{125}I = iodine-125	碘-125
^{131}I = iodine-131	碘-131
cpm = count per minute	每分钟计数
PPO = 2,5-diphenyloxazole	2,5-二苯基噁唑
POPOP = 1,4-di-2 (5-phenyloxaly) benzene	1,4-双-2-(5-苯基噁唑基)苯
V = volt	伏特
MW = molecular weight	分子量
log. = natural logarithm	自然对数
v/v = volume by volume	体积/体积
w/v = weight by volume	重量/体积
FgE = fragment E of fibrinogen	纤维蛋白原碎片E
IgG = immunoglobulin G	免疫球蛋白G
BSA = bovine serum albumen	牛血清白蛋白
2nd IRP-HMG = second international reference preparation of human menopausal gonadotrophins	人绝经期促性腺激素第二国际参考制剂
DNP = dinitrophenol	二硝基苯
WHO = world Health Organisation	世界卫生组织
RSO = radiation safety officer	辐射安全员

目 录

略语表

第一章 放射免疫分析的背景	(1)
1.1. 引言	(1)
1.2. 术语	(2)
1.3. 放射免疫分析的早期发展	(3)
1.4. 结合分析的基本原理	(5)
1.5. 结合剂稀释曲线和标准曲线	(10)
1.6. 标准曲线的制图方法	(17)
1.7. K 值的重要性	(22)
1.8. K 值的测量	(23)
1.9. 结合分析的模型系统	(25)
1.10. 模型系统的某些含义	(26)
第二章 结合分析的要求——纯化配体	(30)
2.1. 结合分析的要求	(30)
2.2. 纯化配体的需要	(30)
2.3. 纯化配体的可用性	(33)
2.3.1. 大分子蛋白质激素	(34)
2.3.2. 癌胚性抗原	(35)
2.3.3. 类固醇激素和药物	(35)
2.3.4. 小肽激素	(36)
2.4. 纯化配体与内源性配体间的差异	(36)
2.5. 标准品	(38)
2.6. 物质的贮存	(42)
第三章 结合分析的要求——示踪配体	(44)
3.1. 放射性同位素	(44)

3.2.放射性同位素的计数.....	(46)
3.3.计数器的选择.....	(49)
3.4.同位素计数的某些实际问题.....	(50)
3.5.示踪剂的基本特性.....	(52)
3.6.示踪剂的制备.....	(52)
3.7.碘化示踪剂.....	(54)
3.7.1.碘化方法.....	(54)
3.7.2.碘化的实际问题.....	(59)
3.7.3.碘化损伤.....	(62)
3.7.4.碘化示踪剂的纯化.....	(66)
3.7.5.示踪剂的化学评价.....	(71)
3.8.用于示踪剂的其他标记物.....	(75)
3.8.1.荧光标记物.....	(75)
3.8.2.酶标记物.....	(75)
3.8.3.自由基标记物.....	(77)
3.8.4.噬菌体标记物.....	(77)
第四章 结合分析的要求——结合剂	(78)
4.1.结合剂的特性要求.....	(78)
4.2.抗体.....	(79)
4.2.1.抗体的化学.....	(80)
4.2.2.抗原的化学.....	(82)
4.2.3.免疫反应的细胞学基础.....	(83)
4.2.4.免疫反应的生理学.....	(84)
4.2.5.与结合分析有关的抗体特性.....	(85)
4.2.6.抗体的产生.....	(86)
4.2.7.免疫原的性质和剂量.....	(87)
4.2.8.作为免疫原的半抗原的制备.....	(89)
4.2.9.佐剂的应用.....	(91)
4.2.10.动物的种属.....	(92)

4.2.11.免疫途径	(93)
4.2.12.注射时间和抗血清的收集	(94)
4.2.13.用于放射免疫分析的抗血清的选择	(95)
4.2.14.抗血清的贮存	(96)
4.3.细胞受体	(96)
4.4.循环结合蛋白质	(98)
4.5.用于内源性抗体和循环结合蛋白质 检测的放射分析	(99)
第五章 结合分析的要求——结合配体与 游离配体的分离	(101)
5.1.分离方法的效率	(101)
5.2.分离方法的实用性	(103)
5.3.结合配体与游离配体的分离方法	(105)
5.3.1.电泳	(105)
5.3.2.凝胶过滤	(106)
5.3.3.吸附法	(107)
5.3.3.1.活性炭	(108)
5.3.3.2.硅酸盐	(110)
5.3.3.3.羟基磷灰石	(110)
5.3.4.分部沉淀	(110)
5.3.5.双抗体法	(114)
5.3.5.1.双抗体或第二抗体	(114)
5.3.5.2.双抗体固相	(117)
5.3.6.固相系统	(118)
5.3.6.1.结合剂附着于盘及管	(118)
5.3.6.2.结合剂附着于颗粒状固相	(119)
5.3.7.结论:分离方法的选择	(121)
5.4.免疫放射分析技术	(122)
5.4.1.免疫放射分析的优缺点	(125)

第六章 结合分析的要求——从生物体液

中提取配体..... (127)

6.1. 用于配体浓缩的提取..... (127)

6.1.1. 应用颗粒吸附剂的提取和浓缩的步骤..... (129)

6.2. 用于配体纯化的提取..... (133)

6.2.1. 用以改善特异性的提取..... (134)

6.2.2. 从轭合物或复合物中提取游离配体..... (136)

6.3. 提取步骤的一般概念..... (139)

第七章 结合分析的要求——结果的计算..... (140)

7.1. 用简单的手工外推法计算结果..... (140)

7.2. 标准曲线的线性化..... (141)

7.3. 用电子计算机计算结果..... (143)

7.4. 结果的可信限估价..... (145)

第八章 结合分析的特性——灵敏度..... (146)

8.1. 灵敏度的定义..... (146)

8.2. 提高结合分析灵敏度的方法..... (148)

8.2.1. 减少示踪剂的用量..... (148)

8.2.2. 减少结合剂的用量..... (150)

8.2.3. 延长培育时间..... (152)

8.2.4. 缩短培育时间——非平衡分析..... (153)

8.2.5. 试剂加入的顺序..... (153)

8.2.6. 结合剂的纯化..... (154)

8.2.7. 增加样品容量..... (155)

8.2.8. 培育的温度..... (156)

8.2.9. 增加样品管的数目..... (156)

8.2.10. 提取和浓缩..... (157)

8.3. 降低分析灵敏度的方法..... (157)

8.4. 结合分析的目标——范围的重要性..... (159)

8.5. 分析方法理论上的最佳化.....	(161)
8.6. 结论.....	(161)
第九章 结合分析的特性——特异性	(163)
9.1. 特异性的定义.....	(163)
9.2. 特异的非特异性.....	(163)
9.2.1. 特异的非特异性的基础.....	(164)
9.2.2. 特异的非特异性的评价.....	(166)
9.2.3. 提高特异性的方法.....	(169)
9.3. 非特异的非特异性.....	(172)
9.3.1. 干扰结合剂与配体反应的物质的存在.....	(173)
9.3.2. 样品中空白值的变化.....	(173)
9.3.3. 结合剂或示踪剂的破坏或隐匿.....	(174)
9.3.4. 未标记配体的破坏或隐匿.....	(175)
9.3.5. 非特异的非特异性的检出和排除.....	(175)
第十章 结合分析的特性——精密度	(179)
10.1. 定义.....	(179)
10.2. 影响精密度的因素.....	(180)
10.2.1. 试剂及分析方法设计上的误差.....	(180)
10.2.1.1. 主要试剂的误差.....	(180)
10.2.1.2. 分离步骤引起的误差.....	(180)
10.2.1.3. 不平衡引起的误差.....	(182)
10.2.1.4. 标准品引起的误差.....	(182)
10.2.1.5. 在标准曲线上不同点处的误差.....	(184)
10.2.1.6. 计数误差.....	(185)
10.2.2. 分析技术操作上的误差.....	(186)
10.3. 监测结合分析精密度的方法.....	(188)
10.3.1. 监测精密度用的质量控制物质的制备.....	(188)
10.3.2. 应用质量控制物质检验精密度的方法.....	(189)
10.3.3. 监测精密度的其他方法.....	(192)

10.4.用于结合分析精密度最佳化的方法.....	(193)
第十一章 结合分析的特性——与其他种类分析方法的关系.....	(195)
11.1.定义.....	(195)
11.2.受体分析.....	(196)
11.3.使用循环结合蛋白质的分析法.....	(196)
11.4.免疫分析.....	(197)
11.5.结论.....	(203)
第十二章 结合分析的自动化.....	(204)
12.1.概述.....	(204)
12.2.样品的标识和分样.....	(205)
12.3.试剂的加入.....	(206)
12.4.培育.....	(205)
12.5.结合配体与游离配体的分离.....	(207)
12.6.放射性计数.....	(208)
12.7.结果的计算.....	(208)
12.8.结论.....	(209)
第十三章 分析服务的机构.....	(210)
13.1.谁进行放射免疫分析.....	(210)
13.2.分析实验室的机构.....	(211)
13.3.分析服务的机构.....	(215)
附录一 设备的生产和供应者(略).....	(217)
附录二 特殊试剂和药品的供应者(略).....	(217)
附录三 一般试剂和物质的供应者(略).....	(217)
附录四 放射免疫分析及有关技术试剂盒的生产(略).....	(127)
附录五 操作放射性同位素的安全防护.....	(217)
参考文献.....	(222)

第一章 放射免疫分析的背景

1.1. 引言

放射免疫分析的建立 (Yalow 和 Berson, 1960) 可能代表了过去二十年来在生物学测定的最重要的进展。它与在原理上相似而使用除抗体外的结合剂的有关技术一起, 已经革新了一个较大的学科——内分泌学。现在, 它在其他的领域, 特别是在血液学、药理学和肿瘤的检测上, 发挥着类似的影响。这些成就归功于三个因素。第一, 与以前经典的生物学方法相比, 它有许多优点, 以激素测定为例, 灵敏度和特异性都有了改进, 操作方法也简便。第二, 能应用于那些以前还没有方法测定的物质。最后, 也可能是最重要的一点, 放射免疫分析及其有关技术提供了一个通用的系统, 用以测定非常广泛的物质。对一个在蛋白质如生长激素的放射免疫分析比较熟练的技术员来说, 在建立类似的分析方法方面, 诸如类固醇激素中的皮质醇、药物中的地高辛、癌肿产物中的癌胚性抗原, 无论在概念上或所需要的设备上, 都没有很大的困难。

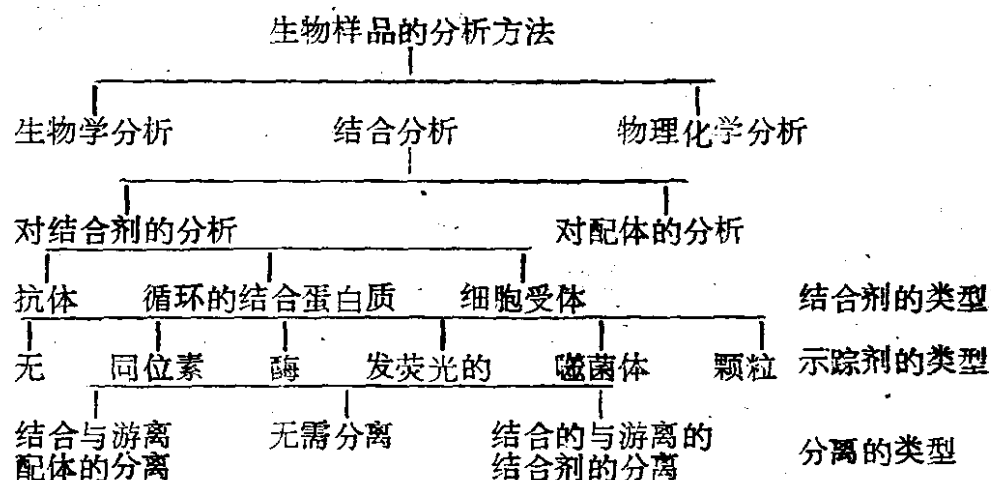
本书的目的在于阐述放射免疫分析及其有关技术的基本原理, 借以帮助那些初次从事这一学科或已有某些实践经验的人得到基本的知识并扩大其知识领域。由于本学科范围很广, 并在迅速发展, 本书不可能对各方面都详尽描述, 同样也不可能对每一种分析方法加以详述。因此, 一种变通的办法, 不论是试剂的制备、使用, 以及结果的解释, 我们要

强调的是这类分析的共同基础，即便列举一些特殊的例子，也是为了阐述它的共性而不是个性。

1.2. 术语

首先对全书经常出现的某些专门名词给出定义是必要的。讨论到的技术都涉及到两种物质的结合，其一称为“结合剂”，其二则是要测量的物质，称为“配体”。使用这些非专门化的术语是有价值的，因为放射免疫分析仅是这类技术中的一种，尽管其应用最广并且为大家所熟知。最能概括整个领域的术语是“结合分析”。它是指任何一种方法，即某一物质的定量取决于该物质与特异性结合剂的进行性饱和，然后测定它在“结合”相和“游离”相之间的分配。因此，结合分析代表一种通用的原理，它包括许多有关的技术，但它并不特指结合剂的性质，而是测量某物质在“结合”相和“游离”相之间的分配所用的方法（见表1.1）。结合分析最常用的更细分类是基于所用结合剂的性质，在“免疫分析”时它是抗体，在“竞争性蛋白质结合分析”时它是循环系统中天然存在的结合蛋白质，而在“受体分析”时它是天然存在的细胞受体。结合相与游离相之间分配的测量，通常依赖于这些相的物理化学分配，这种分配常伴随有包括放射性同位素标记的小量配体的示踪剂的掺入。然而这些特点在结合分析的定义中都不是绝对的。例如，可以使用标记的结合剂作为示踪剂，而不用标记的配体作为示踪剂，这就是“免疫放射分析”。标记物也可以不一定是放射性同位素而是任何一种物质，只要它能在极微量时精确地测量出来，例如荧光化合物（荧光免疫分析）或者酶（酶免疫分

**表1.1 放射免疫分析及有关技术在生物样品的
所有分析方法中的位置**



三种基本的方法是生物学的、物理化学的和结合分析。结合分析可对结合剂或配体进行测量。在配体分析时，有三种不同类型的结合剂可供使用，原则上，它可用所示的六种类型示踪剂中的任何一种。在它们之间任一组合后，最后一步可以是分离结合的与游离的配体，或者是结合的与游离的结合剂，或者不需要任何分离。

析），最后，相的分离并不总是必要的，假若示踪剂在结合相和游离相中的性质有明显区别的话，那么，分离是不必要的。

1.3. 放射免疫分析的早期发展

目前，有关结合分析历史的讨论已被发展这一技术优先权的要求和反要求而遭到影响。这是可以预言的：任何一个课题，都远远地超过了它的创始人的期望，争论的细节不拟在此描述。但有一点必须指出的是：用抗体作为结合剂的技术（即放射免疫分析），首先由美国的 Yalow 及 Berson(1960) 所提出；而应用天然存在的结合蛋白质的技术（即竞争性蛋

白质结合分析) 则为联合王国的Ekins(1960) 所提出。

从完整的历史观看, 我们必须回顾到比个别方法的原始描述更早一些, 值得注意的是, 最早的技术是在核医学实验室发展起来的。共同的线索是处理放射性同位素的能力, 它作为发展核武器的副产品本身又可用于常规生物医学。许多放射性同位素的惊人性质是它的辐射能很大, 以致使用比较简单的设备就可能探测到甚至几个的原子。当这些原子附着于其他分子上时, 那么, 后者同样少的数目也能被探测到。实际上, 很可能是出于能测量非常微量的示踪物, 而不是出于对高亲和力的抗体或其他结合剂的可能应用的认识, 才导致了放射免疫分析的最初发展。这种技术概念独创性的所有权还必须追溯到更早, 因为在本质上说, 它是阿基米德原理与质量作用定律的结合。

Yalow 及 Berson 的工作开始于对 ^{131}I 标记的蛋白质在生物体内行为的早期研究。在那时(1950年初期), 这种方法是研究蛋白质代谢的较新颖而又非常有效的途径。被研究的物质之一就是 ^{131}I 标记的胰岛素, 由此证实: 接受胰岛素治疗的糖尿病患者, 在循环血液中总是有胰岛素-结合蛋白质的存在(Berson等, 1956年)。Yalow 及 Berson 在使科学界信服这种结合蛋白就是抗体这一论点上遇到了相当的困难, 而这个结论现在已反复证明是正确的。在进行论证 ^{131}I -胰岛素结合的同时, 他们也指出示踪剂能被加入的大量未标记的胰岛素从结合剂上取代下来, 并且证实示踪剂被结合的程度与存在的胰岛素总量有定量关系, 这个观察形成了测定胰岛素最早的放射免疫分析的基础。此法曾用来在家兔身上测量给予的外源性牛胰岛素(Yalow 及 Berson, 1971)。然而, 从接受胰岛素治疗的糖尿病患者血清中获得