

实用放射免疫分析及其临床意义

肖祥熊 邹颂海 沈德恩 连秉钧
宓志钧 黄有达 张光正 陈四传 编 著
费荣棠 蒋庆礼 徐宝钢 戴蔼善

赵惠扬 朱承谟 吴继琮 审校
陶义训 马宝骊

同 济 大 学 出 版 社

内 容 简 介

本书分二篇。第一篇共分十五章：引言；放射免疫分析的基本原理、基本条件及其影响因素；抗原的纯化、鉴定及标准品；抗血清的制备及其鉴定；半抗原及其抗体的制备；单克隆抗体的制备；抗原的标记及其纯化；放射免疫分析中的分离技术；影响标准曲线建立的一些因素和异常标准曲线的原因分析；固相放射免疫测定；放射免疫分析中的数据处理方法；放射免疫分析中的质量控制；放射免疫测量仪器；放射免疫分析中的一些问题讨论；放射免疫分析展望。第二篇共分七章：血液中的非激素蛋白质分析；血清中抗体分析；血清中激素类分析；血液中的细胞内信使分析；血液中的药物浓度的分析；血液中的病原体的分析；其它。附录：核素衰变表；酸碱性指示剂；缓冲溶液配制；常量、微量和超微量度、量、衡单位名称；常用术语注释；常用略语词汇及词头；商品化放射免疫分析药盒表；放射免疫分析常用试剂等。

本书可供从事放射免疫分析的科技人员、临床医师和医学院校师生参考。

实用放射免疫分析及其临床意义

肖祥熊 等编著

同济大学出版社出版

(上海市四平路 1239 号)

新华书店上海发行所发行 常熟市信谊印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 15.5 字数 397千字

1985 年 11 月第 1 版 1985 年 11 月第 1 次印刷

印数 1—10,000

统一书号：14335·001 定价：2.60 元

前 言

放射免疫分析是六十年代初建立起来的一项免疫学新技术, 经过二十余年的实践证明, 它具有灵敏度高、特异性强、精确度佳、重复性好等优点。因此, 它已引起基础医学、临床医学和生物学研究工作者的高度重视, 并已广泛应用于临床、教学和科研中。目前国外已能应用此法检测近 300 种物质, 如激素类、酶、细胞内信使、血中非激素蛋白质、病原体、抗体、药物、维生素类等。我国放射免疫分析起步不算很晚, 但由于文化大革命的干扰, 在一个时期停滞不前, 三中全会以后进展较快。为了能使放射免疫分析迅速在我国普及, 上海免疫学杂志编辑部和中国人民解放军第四〇九医院于 1984 年 10 月份在青岛联合举办“放射免疫分析及其临床意义”提高班, 然后各省市的同志回去又举办县一级医务人员参加的普及班。相信经过 1~2 年时间, 全国就能普及放射免疫分析技术。为了适应这方面教学的需要, 我们将工作中的一些肤浅体会编写成讲义, 供从事放射免疫分析的医务人员、临床医师和医学院校师生参考。为了满足广大读者的需要, 现决定在原讲义基础上再充实内容并作了必要的修改, 由同济大学出版社出版。

本书在编写出版过程中得到全国各地同行们的热情鼓励和帮助, 上海放射免疫分析技术研究所全体同志给予了大力支持, 使我们能完成此书的编写任务, 特别是同济大学医院副院长王祖德、威墅堰机车车辆厂医院李玉林、广州海军第四二一医院王莉如、旅顺海军第四〇六医院贾中清、贵州凯里州人民医院方由仁等医师, 为了能使本书早日与读者见面, 化了很多时间和精力协助我们工作, 在此一并致谢。

我们希望本书在普及放射免疫分析中能起到一点交流和促进的作用。由于我们业务水平有限, 实践经验又不足, 在编写中一定存在不少缺点和错误, 恳请读者批评指正。

编 者

1985 年 5 月于上海

目 录

第一篇 总 论

第一章 引 言.....(1)

第二章 放射免疫分析的基本原理、 基本条件及其影响因素.....(4)

第一节 基本原理.....(4)

第二节 基本条件及其影响因素.....(6)

第三章 抗原的纯化、鉴定及标准 品.....(9)

第一节 抗原的分类.....(9)

第二节 抗原分离纯化的方法.....(9)

第三节 抗原纯化后的鉴定.....(10)

第四节 盐析法分离.....(10)

第五节 凝胶过滤.....(10)

第六节 葡聚糖凝胶的使用.....(11)

第七节 亲和层析.....(12)

第八节 戊二醛偶联吸附法.....(13)

第九节 琼脂双扩散法.....(13)

第十节 琼脂免疫电泳.....(13)

第十一节 圆盘电泳.....(14)

第十二节 等电聚焦电泳.....(15)

第十三节 高效液相色谱分离法.....(16)

第十四节 标准品.....(16)

第四章 抗血清的制备及其鉴定.....(18)

第一节 抗原的选择.....(18)

第二节 动物的选择.....(18)

第三节 免疫方法.....(18)

第四节 抗血清的鉴定.....(20)

第五节 抗血清滴度的测定.....(21)

第六节 抗血清的保存.....(21)

第五章 半抗原及其抗体的制备.....(23)

第一节 载体选择.....(23)

第二节 偶合方法.....(23)

第三节 常用几种偶合载体操作

法.....(24)

第四节 偶合物的鉴定.....(27)

第五节 免疫.....(28)

第六节 抗体的鉴定.....(28)

第七节 注意点.....(28)

第六章 单克隆抗体的制备.....(29)

第一节 杂交瘤技术的基本原理.....(29)

第二节 杂交瘤技术需用的器材.....(29)

第三节 杂交瘤技术需用的试剂.....(30)

第四节 动物的选择与免疫.....(32)

第五节 巨噬细胞饲养层的制备.....(33)

第六节 小鼠脾细胞的制备.....(33)

第七节 骨髓瘤细胞的制备.....(34)

第八节 细胞融合步骤.....(34)

第九节 骨髓瘤细胞和杂交瘤细胞 的克隆化.....(34)

第十节 液相有限稀释法.....(35)

第十一节 阳性杂交瘤细胞株的保 存.....(35)

第十二节 杂交瘤技术操作步骤.....(37)

第十三节 建立杂交瘤细胞株的标 准.....(37)

第十四节 单克隆抗体在放射免疫 分析中的应用.....(37)

第七章 抗原的标记及其纯化.....(39)

第一节 放射性碘标记法.....(39)

第二节 ^{125}I 标记化合物的制备.....(39)

第三节 利用率、标记率和比放射 性.....(42)

第四节 碘标记化合物的纯化方 法.....(42)

第五节 氟标记化合物的制备.....(44)

第八章 放射免疫分析中的分离技术.....(46)

第九章 影响标准曲线建立的一些因

素和异常标准曲线的原因

分析.....(49)

第一节 影响准标曲线建立的一些

因素.....(49)

第二节 异常准标曲线的原因分

析.....(58)

第十章 固相放射免疫分析.....(60)

第一节 固相放射免疫原理.....(60)

第二节 固相放射免疫方法的主要

类型.....(60)

第三节 固相载体材料.....(61)

第十一章 放射免疫分析中的数据处

理方法.....(62)

第十二章 放射免疫分析中的质量控

制.....(65)

第一节 质量控制的目的与意义.....(65)

第二节 质量控制类别.....(65)

第三节 质量控制指标.....(65)

第四节 放射免疫分析中的误差来

源.....(69)

第五节 批内误差的评价.....(73)

第六节 批间重现性的评价.....(78)

第七节 放射免疫分析质量控制方

法.....(80)

第十三章 放射免疫分析测量仪器.....(82)

第一节 γ 计数器的基本原理.....(82)

第二节 手动换样 ^{125}I 放射免疫测

量仪.....(82)

第三节 自动换样 γ 计数器.....(83)

第四节 液体闪烁计数器.....(85)

第十四章 放射免疫分析中的一些问

题讨论.....(86)

第一节 放射火箭电泳自显影中的

若干技术问题.....(86)

第二节 双抗体法中的若干技术问

题.....(87)

第三节 放射免疫试剂盒常易遇到

的一些问题.....(89)

第十五章 放射免疫分析展望.....(91)

第二篇 各 论

第一章 血液中非激素蛋白质分析.....(95)

第一节 血清型免疫球蛋白A(IgA)

和分泌型免疫球蛋白

A(SIgA) 放射免疫(双

抗体-PEG 法) 测定.....(95)

第二节 血清免疫球蛋白G放射

火箭电泳自显影测定.....(97)

第三节 血清免疫球蛋白M放射

火箭电泳自显影测定.....(98)

第四节 血清免疫球蛋白D放射火

箭电泳自显影测定.....(98)

第五节 血清免疫球蛋白E放射免

疫(单扩散二步法) 测

定.....(99)

第六节 甲胎蛋白放射火箭电泳自

显影测定(100)

第七节 甲胎蛋白放射免疫(双抗

体法)测定.....(102)

第八节 铁蛋白放射免疫(双抗

体法)测定.....(103)

第九节 人肌红蛋白放射免疫(双

抗体法)测定.....(105)

第十节 癌胚抗原放射免疫(双抗

体法)测定.....(107)

第十一节 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)

放射免疫(PEG 法) 测

定(109)

第十二节 人血清甲状腺激素结合

球蛋白(TBG)放射免

疫(双抗体法)测定(110)

第二章 血清中抗体分析(113)

第一节 血清甲状腺微粒体(TM)

抗体放射免疫(双抗体

法)测定.....(113)

第二节 血清甲状腺球蛋白(TG)

抗体放射免疫(双抗体

法)测定.....(114)

第三节	血清 DNA 抗体放射免疫 (双抗体法)测定	(115)
第三章 血清中激素类分析		
第一节 血清 T_3、T_4 放射免疫(双 抗体-PEG 法)快速测 定		
		(124)
第二节	血清 T_3 放射免疫(双抗 体法)测定	(125)
第三节	T_4 固相放射免疫(涂管 法)测定	(126)
第四节	T_3 、 T_4 联合固相放射免 疫测定	(127)
第五节	血清 T_3 摄取(MAA)放 射免疫测定	(127)
第六节	血清 T_4 放射免疫(PEG 法)测定	(128)
第七节	^{125}I - T_4 蛋白竞争结合试 验	(129)
第八节	促甲状腺素(TSH)放射 免疫(双抗体法)测定	(130)
第九节	促甲状腺激素释放激素放 射免疫(双抗体法)测 定	(131)
第十节	胰岛素放射免疫(双抗体 法)测定	(133)
第十一节	血浆胰高糖素(Gluca- gon)放射免疫(双抗 体法)测定	(134)
第十二节	胃泌素放射免疫(双抗 体法)测定	(136)
第十三节	皮质醇(Cortisol)放 射免疫(双抗体法) 测定	(137)
第十四节	HCG 放射免疫(双抗 体法)测定	(141)
第十五节	HCG- β 放射免疫(双 抗体法)测定	(144)
第十六节	人促黄体生成激素(LH) 放射免疫(双抗体法)	

	测定	(145)
第十七节	人胎盘泌乳素(HPL) 放射免疫(双抗体法) 测定	(146)
第十八节	泌乳激素(Prolactin) 放射免疫(双抗体法) 测定	(148)
第十九节	血清游离甲状腺激素(FT_3 和 FT_4)放射免疫测 定	(149)
第 廿 节	3, 3', 5' 三碘甲腺原氨 酸放射免疫(双抗体法) 测定	(150)
第 廿 一 节	促卵泡成熟激素放射免 疫(双抗体法)测定	(151)
第 廿 二 节	人降钙素放射免疫(双 抗体法)测定	(153)
第 廿 三 节	人尿中徐缓激肽放射免 疫测定	(154)
第 廿 四 节	亮氨酸脑啡肽放射免疫 测定	(156)
第 廿 五 节	血浆亮氨酸脑啡肽放射 免疫测定	(157)
第 廿 六 节	甲硫氨酸脑啡肽放射免 疫测定	(159)
第 廿 七 节	血管紧张素 I 放射免疫 测定	(160)
第 廿 八 节	血管紧张素 II 放射免疫 测定	(163)
第 廿 九 节	醛固酮放射免疫(^3H) 测定	(165)
第 卅 节	血浆睾酮放射免疫(^3H) 测定	(168)
第 卅 一 节	血浆雌酮放射免疫(^3H) 测定	(169)
第 卅 二 节	血浆雌二醇放射免疫 (^3H)测定	(171)
第 卅 三 节	血浆雌三醇放射免疫 (^3H)测定	(172)

第卅四节	血浆孕酮放射免疫(^3H)测定	(173)
第卅五节	人血清生长激素放射免疫(双抗体法)测定	(174)
第卅六节	前列腺素放射免疫(^3H)测定	(175)
第卅七节	血浆 18-羟-11-去氧皮质酮放射免疫测定	(179)
第四章	血液中细胞内信使分析	(180)
第一节	^3H -TdR(胸腺嘧啶核苷)掺入法测定淋巴细 胞转化	(180)
第二节	^3H -TdR 4 小时 掺入试 验	(181)
第三节	^3H -TdR 掺入法测定人混 合淋巴细胞反应	(182)
第四节	环磷酸腺苷(cAMP)放射 免疫测定	(183)
第五节	环磷酸鸟苷(cGMP)放射 免疫测定	(185)
第五章	血液中药浓度的分析	(188)
第一节	地高辛(Digoxin)放射免 疫(双抗体法)测定	(188)
第二节	苯妥英钠放射免疫(PEG 法)测定	(189)
第三节	苯巴比妥(Luminal)放射 免疫(双抗体法)测定	(191)
第四节	氯丙嗪放射免疫(^3H)测 定	(192)
第六章	血液中病原体的分析	(194)
第一节	甲型肝炎抗原固相放射免 疫测定	(194)
第二节	乙型肝炎表面抗原放射对 流免疫电泳自显影测 定	(194)
第三节	乙型肝炎表面抗原放射免 疫(双抗体法)测定	(195)
第四节	乙型肝炎表面抗体放射免 疫(双抗体法)测定	(195)
第五节	乙型肝炎表面抗体固相放 射免疫测定	(196)
第六节	乙型肝炎核心抗原及抗体 固相放射免疫测定	(196)
第七节	乙型肝炎抗原及抗体测定 的临床意义	(197)
第七章	其它	(200)
第一节	血清胆酸放射免疫(PEG 法)测定	(200)
附录一	核素衰变表	(202)
附录二	酸碱度指示剂	(222)
附录三	缓冲溶液配制	(223)
附录四	常量、微量和超微量度、量、 衡单位名称	(227)
附录五	常用术语注释	(228)
附录六	常用略语词汇及词头	(233)
附录七	商品化放射免疫分析药盒 表	(236)
附录八	放射免疫分析常用试剂	(238)

第一篇 总 论

第一章 引 言

放射免疫分析(Radioimmunoassay, 简称RIA)是1960年首先由Yalow和Berson创立的一种体外超微量分析方法,它是将具有高灵敏度的放射性核素示踪技术与高度特异性的免疫化学技术二者结合而建立起来的新的分析方法。几乎一切具有活性的物质都可用这种方法进行测定。由于它具有灵敏度高、特异性强、精确度佳、重复性好等优点,且在人体外进行,操作简便、应用范围广,因此目前已在基础医学、临床医学和生物科学研究工作中日益获得重视,发展迅速,展现了广阔的前景。

1960年Ekins利用血浆中一种天然存在的蛋白—甲状腺结合球蛋白(Thyroxine binding globulin)作为试剂,进行甲状腺素的测定。由于此法有普遍性,且特异结合性之范围甚广,在英国则统称为饱和分析法(Saturation analysis),强调结合剂之饱和,但未指出结合物为何物。尔后,1964年Murphy利用血浆中皮质类固醇结合球蛋白(Corticosteroid binding globulin)测定皮质类固醇激素,把这种测定方法称做竞争性蛋白结合分析法(Competitive protein binding assay, CPBA),指明其结合剂为蛋白。此名称多应用于非抗原性之激

素。后来由于范围扩大,以酶作为反应试剂的,称为放射酶分析法(Radioenzymatic assay, REA);而采用激素的靶细胞特异的受体蛋白作为结合试剂的,称为放射受体分析法(Radioreceptor assay, RRA);如特异试剂为一种微生物则称为放射微生物学分析(Radiomicrobiological assay)。尽管名称很多,方法学上也有不同,但是它们有一个共同的特点,就是以竞争抑制反应为基本原理,目前这类体外放射测定方法的命名尚未统一。放射免疫分析,狭义的是指特异抗原抗体反应;广义即指相当于饱和分析。所以有人认为采用竞争性放射分析一词较妥。因为它所包括的范围与饱和分析相同,而且在含义上更能说明这类方法的特征,包括了凡是应用竞争性原理的各种放射分析法。但是,有些体外放射测定,如直接法固相放射免疫分析及免疫放射电泳自显影法已不是应用竞争性原理了。至于所谓免疫放射分析(Immunoradiometric assay, IRMA)与放射免疫不同之处在于RIA系核素标记抗原,而IRMA系核素标记抗体。

各种体外分析法的名称、反应物及被测物质如表1。目前已能应用体外竞争性放射分析的一些物质见表2。

表1 体外竞争分析的类型

名 称	反 应 物	被 测 物 质
放射免疫分析法	特异抗体	多肽激素、小肽激素、甲状腺激素、类固醇、氨基酸和蛋白激素、药物、病毒抗原、肿瘤相关抗原
竞争蛋白结合分析法	组织或血清中的特异结合蛋白质或其它物质	多肽、类固醇氨基酸激素、维生素、环核苷酸、微量元素
放射酶分析法	特异酶	叶酸、环核苷酸等
放射受体分析法	受体	类固醇、蛋白激素等
放射微生物分析法	微生物	叶酸等
亚化学量度分析法	无机试剂	金属
免疫放射分析法	待测物质与过量标记抗体相结合的直接测量	多肽、类固醇等激素、免疫球蛋白

表 2 目前已能应用体外竞争性放射分析的一些物质

类别	测定的物质	类别	测定的物质
激素类	下丘脑 促甲状腺激素释放激素 (TRH) 促黄体生成激素释放激素 (LHRH) 又称促性腺激素释放激素 (GnRH) 抗利尿素(加压素) (ADH) 催产素 (Pitocin, Oxytocin) 神经垂体素 (Neurophysin)	激素类	胎盘 人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 人胎盘催乳素 (HPL) 人绒毛膜促性腺激素β亚单位(HCG-β亚单位)
	垂体前叶 生长激素 (GH) 泌乳激素 (PRL) 促甲状腺激素 (TSH) 促肾上腺皮质激素 (ACTH) 黑素细胞刺激素 (MSH) 促黄体生成激素 (LH) 促卵泡成熟激素 (FSH) 促性腺激素 (Gn)		血管活性 徐缓激肽 (Bradykinin) 肾素 (Renin) 血管紧张素 I, II (Ang I, II)
	甲状腺旁腺 甲状腺素 (T ₄) 三碘甲状腺原氨酸 (T ₃) 3, 3', 5' 三碘甲状腺原氨酸 (r-T ₃) 甲状旁腺素 (PTH) 降钙素 (hCT)		儿茶酚胺 (Catecholamine) 包括: 肾上腺素 (Epinephrine) 去甲肾上腺素 (NE) 3-0-甲氧基肾上腺素 (Metanephrin) 内因子 (Intrinsic factor) 松驰激素 羧基肽 向脂激素 (Lipotrophin) 1, 25-二羟胆骨化醇 表皮生长因子 (Epidermal growth factor) 7S 神经生长因子 (7S Nerve growth factor) 红细胞生成激素
	消化道及胰腺 胰岛素 (Insulin) 胰岛素原 (Proinsulin) C-肽 (c-peptide) 胰高糖素 (Glucagon) 胃泌素 (Gastrin) 四肽胃泌素 (Gastrin tetra-peptide) 胰泌素 (Secretin) 胆囊收缩素-促胰酶素 (CCK-PZ) 抑胃肽 (GIP) 舒血管肠肽 (VIP) 肠降血糖素 (GLI) 胃动素 (Motilin)		细胞内信使 环磷酸腺苷 (cAMP) 环磷酸鸟苷 (cGMP) 环磷酸次黄苷 (cIMP) 环磷酸尿苷 (cUMP) 去氧核糖核酸 (DNA) 信使核糖核酸 (mRNA) 前列腺素 (Prostaglandin)
	性及肾上腺 雌二醇 (E ₂) 雌三醇 (E ₃) 雌酮 (E ₁) 孕酮 (Progesterone) 睾丸酮 (T) 双氢睾丸酮 (Dihydrotestosterone) 17-乙炔睾丸酮 2-羟睾丸酮 (2-hydroxy testosterone) 2-羟雌酮 (2-hydroxy estrone) 17α-羟孕酮 (17α-hydroxyprogesterone) 皮质酮 (Cortisone) 皮质醇 (Cortisol) 11-去氧皮质醇 (11-Deoxycortisol) 皮质甾酮 (Corticosterone) 去氢皮质酮 (11-Dehydro-Corticosterone) 去氧皮质酮 (DOCA) 18-羟皮质酮 (18-Hydroxycorticosterone) 18-羟 11-去氧皮质酮 雄固烷二酮 雄烯二酮 (Δ ⁴ -Androstenedione) 原胆烷醇酮 (Et) 去氧异雄酮 (DHA) 醛固酮 (Aldosterone)	酶	胃蛋白酶原 (Pepsinogen) 胰蛋白酶 (Trypsin) 糜蛋白酶 C ₁ -脂酶 高血压蛋白酶 羧肽酶 A 胶原酶 (Collagenase) 凝乳酶 (Rennin) 凝乳酶原 (Renninogen) 胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) 胰凝乳蛋白酶原 (Chymotrypsinogen) 羧基酶 多巴胺羧酶 (Dopa decarboxylase) 多巴胺-β-羟化酶 (Dopamine-β-hydroxylase) 碳酸酐酶 I, II 果糖-1, 6-二磷酸酶 (Fructose-1, 6-diphosphatase) 辅酶 (Co-Enzyme) 碱性磷酸酶 (AKP) 胶原脯氨酸羟化酶 (Collagen Proline hydroxylase) 胞浆素原及胞浆素 (Plasmin) 淀粉酶 (Amylase) 碱性磷酸酶同工酶 (AKP isoenzymes)
		血液中非蛋白质	肌红蛋白 (Myoglobin) 清蛋白 (Albumin) 纤维蛋白 (Fibrin) 纤维蛋白原 (Fibrinogen) 铁蛋白 (Ferritin) 甲状腺激素结合球蛋白 (TBG)

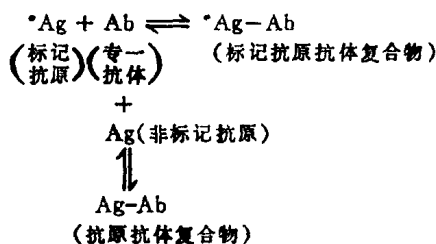
(续表)

类别	测定的物质	类别	测定的物质
血液中非激素蛋白质	SIgA IgA IgD IgE IgG IgM 凝血酶原 (Prothrombin) 维生素结合蛋白 (Vitamin-binding Protein) 淋巴细胞抗原 (Lymphocyte antigen) 凝溶蛋白 (Bence Jones Protein) 备解素 (Properdin) 反应素 (Reagin) Rh 因子 (Rh factor) 糖蛋白 (Glycoprotein) 白细胞趋化因子 (NCF) 风湿因子 (Rheumatic factor) 癌胚抗原 (CEA) 甲胎蛋白 (AFP) β -血栓球蛋白 (β -TG) β_2 -微球蛋白 (β_2 -m) β_{1c} -球蛋白 (β_{1c} -globulin) 人脑 S ₁₀₀ 蛋白 孕 β 结合糖蛋白 视黄醇结合蛋白	药	消炎痛 (Antifan) 麦散痛 (Methadon) 氯硝基 青霉素 (Penicillin) 庆大霉素, 链霉素 β -内毒素 A. B 阿霉素 (Adriamycin) 柔红霉素 (Rubidomycin) 麻黄素 (Ephedrine) 阿斯匹林 (Aspirin) 氟林可霉素 博来霉素 (Bleomycin) 大分霉素 托普霉素 脑啡肽 (EK) 麦角酸衍生物 (Lysergic acid derivatives) 筒箭毒 (Tubocurarine) 大麻素 (Marihuana) 氨茶碱 (Aminophylline) 噻嗪 (Debrisoquinum) 地高辛 (Digoxin) 洋地黄毒苷 (Digitoxin) 哇巴因 (Quabain) 快诺酮 (ANT) 18-甲快诺酮 苯丙胺 (Amphetamine) 苯酰胺子碱 氨基嘌呤 (Adenine) 阿糖胞苷 (Ara-c) 烟碱衍生物 烟碱拮抗剂 强地松 (Prednisone) 强地松龙 (Prednisolone) 地塞米松 (Dexamethasone)
	乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 甲型肝炎相关性抗原 哺乳 C 型病毒蛋白 梭状杆菌 A 型内毒素 葡萄球菌内毒素 血吸虫微沉淀素抗原 (RAMP) 乌 RNA 肿瘤病毒特异抗原 肉瘤-白血病病毒特异抗原 牛痘抗原 (Cowpox antigen)		25-羟 Vit D ₃ Vit A Vit B ₁₂ Vit B ₆ 叶酸 25-羟 Vit D ₂
抗体	抗-HBs 抗 D 免疫球蛋白 (Anti-D immunoglobulin) 抗反应素抗体 (Anti-reaginic antibody) 抗 Rh 抗体 (Anti-Rh antibody) 抗 DNA 抗体 (Anti-DNA antibody) 抗真球类病毒抗体 抗地高辛抗体 抗细菌球基底膜抗体 抗细胞表面抗原抗体 抗百日咳免疫球蛋白 抗血友病因子 (Anti-hemophilic factor) 甲状腺球蛋白 (TG) 抗体 甲状腺微粒体 (TM) 抗体 狂犬病结合抗体 抗大肠杆菌抗体 (Anti-colibacillus antibody)	其他	变态反应原 (Allergen) 唾液酸 (Sialic acid) 网膜结合蛋白 胶原 (Collagen) 过敏原 (Anaphylactogen) 肌动素 (Actin) 核糖微粒 (Ribosome) 胆酸 N-乙酰-5-甲氧-色胺 尿清蛋白 (Urine albumin) P 物质 虎蛇及褐蛇蛇毒 (Venom) 5-羟色胺 (5-HT) 吡哆醇 (Serotonin) 丙咪嗪 γ -氨基丁酸
	吗啡 (Morphine) 咖啡因 (Caffeine) 巴比妥 (Barbital) 苯妥英钠 (DPH) 苯巴比妥 (Luminal) 尼古丁 (Nicotin) Cotinine 氯丙嗪 (Chlorpromazine) 利血平 (Reserpine) 纳洛酮 (Naloxane) 镇痛新 (Prazocin)		

第二章 放射免疫分析的基本原理、 基本条件及其影响因素

第一节 基本原理

放射免疫分析的基础是标记抗原 *Ag 和未标记抗原 Ag 对专一抗体 Ab 的竞争性抑制反应, 以下式表示之:



在上述反应系统中, 当 *Ag 和 Ab 的量保持恒定, 则 $^*Ag-Ab$ 复合物的形成是受 Ag 含量所制约的。如样品中的 Ag 含量高, 则 Ag 对专一抗体 Ab 的竞争能力强, $Ag-Ab$ 复合物的形成量就增多, $^*Ag-Ab$ 复合物的形成量相对减少; 反之, 如 Ag 的含量低, 则 Ag 对专一抗体 Ab 的竞争能力弱, $Ag-Ab$ 复合物的形成量就减少, $^*Ag-Ab$ 复合物的形成量与 Ag 的含量呈一定的逆相关函数关系。通常先以各种已知浓度的抗原和一定量的标记抗原及其抗体作用, 即可测得在各种标准浓度下标记抗原抗体复合物的放射性结合率, 以此绘成标准竞争抑制曲线(图 1)。根据被测抗原的放射性结合率, 就可得出相

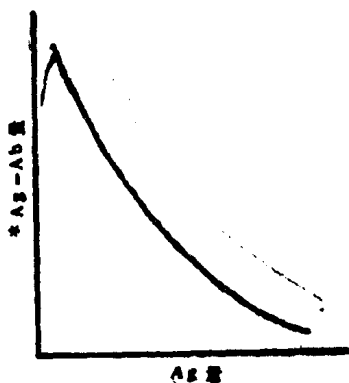


图 1 竞争结合抑制曲线示意图

应的该抗原含量。为了进一步阐明这种关系可用图 2 示意。

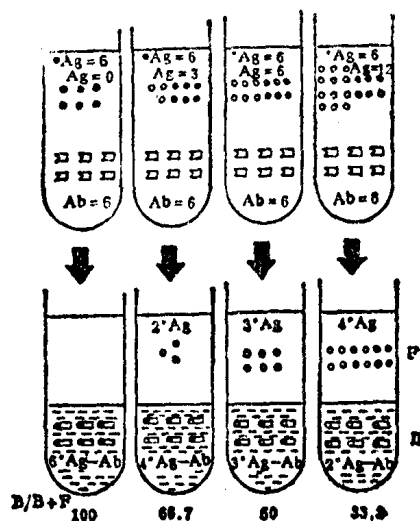


图 2 放射免疫测定原理的定量示意图

*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
 $F(o)$ ——游离抗原 $B(o)$ ——结合抗原

放射免疫分析法所得到的标准曲线是一条曲线而不是直线, 可以应用免疫反应动力学来解释, 反应式如下:



$$\text{反应达到平衡时} \quad K = \frac{k_1}{k_2}$$

$$K = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]} \quad (2)$$

式中 $[Ag]$, $[Ab]$, $[AgAb]$ 分别为抗原、抗体、抗原-抗体复合物的克分子浓度。反应平衡时, 结合抗原 B 与游离抗原 F 比为:

$$B/F = [AgAb]/[Ag] \quad (3)$$

由于只有一部分 $[Ag]$ 与 $[Ab]$ 参与结合, 所以若设 $[Agi]$ = 参加反应时抗原的初始浓度, $[Abi]$ = 参加反应时抗体的初始浓度。则反应后游离抗原、抗体的浓度为:

$$[Ag] = [Agi - AgAb] \quad (4)$$

$$[Ab] = [Abi - AgAb] \quad (5)$$

因此, 反应后结合抗原 B 与游离抗原 F 之比为:

$$B/F = [AgAb]/[Agi - AgAb]$$

移项后得:

$$\begin{aligned}
 [AgAb] &= [Agi - AgAb] \times \frac{B}{F} \\
 &= Agi \times \frac{B}{F} - AgAb \times \frac{B}{F}
 \end{aligned}$$

$$[AgAb] + AgAb \times \frac{B}{F} = Agi \times \frac{B}{F}$$

$$[AgAb] \times \left[1 + \frac{B}{F} \right] = Agi \times \frac{B}{F}$$

$$[AgAb] = \frac{Agi \times \frac{B}{F}}{\left(\frac{B}{F} + 1 \right)} \quad (6)$$

合并方程式 (2) (4) (5) 和 (6) 得出

因为方程 (2) 为

$$\left[K = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]} \right], \text{ 将方程 (4) (5) 代入得}$$

$$K = \frac{AgAb}{[Agi - AgAb][Abi - AgAb]} \quad \text{再将方程 (6) 代入得}$$

$$\begin{aligned} K &= \frac{\frac{[Agi] \times \frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1}}{\left(Agi - \frac{[Agi] \times \frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1} \right) \left(Abi - \frac{[Agi] \times \frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1} \right)} \\ &= \frac{\frac{[Agi] \times \frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1}}{\frac{(Agi) \left(\frac{B}{F} + 1 \right) - Agi \times \frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1} \times \frac{(Abi) \left(\frac{B}{F} + 1 \right) - (Agi) \times \frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1}} \\ &= \frac{(Agi) \times \frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1} \times \frac{\left(\frac{B}{F} + 1 \right) \times \left(\frac{B}{F} + 1 \right)}{\left[(Agi) \times \frac{B}{F} + Agi - Agi \times \frac{B}{F} \right] \times \left[Abi \times \frac{B}{F} + Abi - (Agi) \times \frac{B}{F} \right]} \\ &= \frac{[Agi] \times \frac{B}{F} \times \left[\frac{B}{F} + 1 \right]}{[Agi] \times \left[Abi \times \frac{B}{F} + Abi - Agi \times \frac{B}{F} \right]} = \frac{\left[\frac{B}{F} \right]^2 + \frac{B}{F}}{Abi \times \frac{B}{F} + Abi - Agi \times \frac{B}{F}} \\ \text{即 } K &= \frac{\left[\frac{B}{F} \right]^2 + \frac{B}{F}}{[Abi] \times \frac{B}{F} + Abi - [Agi] \times \frac{B}{F}} \end{aligned}$$

移项,

$$K \left[[Abi] \times \frac{B}{F} + Abi - (Agi) \times \frac{B}{F} \right] - \left[\frac{B}{F} \right]^2 + \frac{B}{F}$$

$$\left[\frac{B}{F} \right]^2 + \frac{B}{F} - K \left[(Abi) \times \frac{B}{F} + Abi - (Agi) \times \frac{B}{F} \right] = 0$$

$$\left[\frac{B}{F} \right]^2 + \frac{B}{F} - K(Abi) \times \frac{B}{F} - K[Abi] + K(Agi) \times \frac{B}{F} = 0$$

$$\left[\frac{B}{F} \right]^2 + \frac{B}{F} [1 + K(Agi) - K(Abi)] - K(Abi) = 0 \quad \text{成为一元二次方程坐标纸上的几何图形为双曲线}$$

这样就导出了一个双曲线方程, 图 3 所得到的 B/F 间关系, 以及抗原的浓度近乎于 PQR, 在它的上端是渐近线 STU, B/F 比值改变是由于结合抗原浓度的比例改变所致。当抗体结合 (B) 与游离标记抗原的比例 (即 B/F) 减低, 而未标记抗原浓度 (Ag) 增加, 此时, B/F 变化最大, 抗原含量与抗体浓度比较是小的, 则 Q, $B/F = K[A_{bi}]$ 和 T, $B/F = (K A_{bi} - 1)$ 。

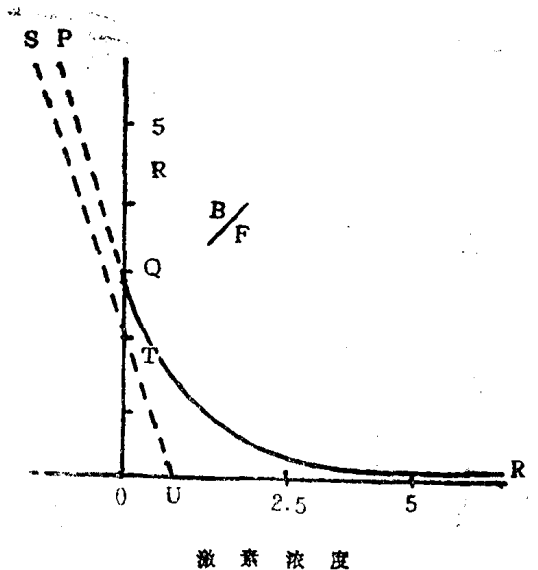


图 3 R B/F 和激素含量的关系

抗体平衡常数 K 的改变可明显地影响测定的灵敏度, 如图 4 所示。当低浓度时 B/F 曲线率增加, 灵敏度也显著增加。常数 K 越

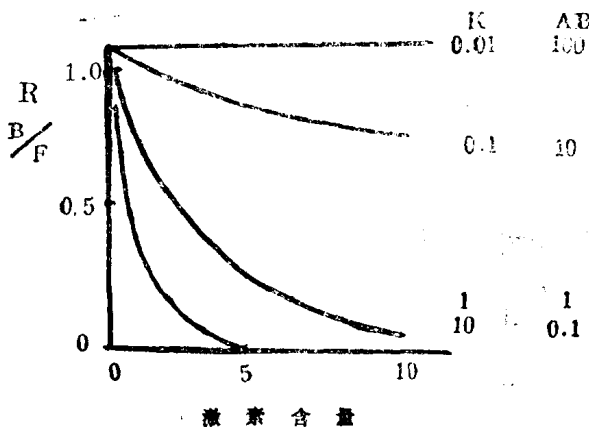


图 4 抗体平衡常数 K 对放射免疫分析的影响——理论曲线与随意常数

小曲线斜率越不明显, 灵敏度也就下降, 所以要选抗体平衡常数大, B/F 曲线斜率明显的作为标准曲线。

第二节 基本条件及其影响因素

一、放射免疫分析必须具备的基本条件:

(一) 抗原: 要有高纯度的抗原, 以作标准品、标记抗原及制备抗血清之用。

抗原要稳定, 能保持一定的免疫活性, 不易失活。

标记抗原比放射性要高, 标记过程简便。

(二) 抗体: 必须是特异性和亲和力强的, 滴度高的抗血清。

抗体的特异性决定于抗原的纯度。

抗体的亲和力决定于产生抗体宿主动物的品种及免疫反应的本性。

抗血清溶液一般保存在 $-80 \sim -20^{\circ}\text{C}$; 冻干品溶解后保持在 4°C 备用, 反复冻溶会使效价下降; 冻干品一般保存在 $-20 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 。

理想的抗血清要求亲和常数大。

1. 抗体滴度(效价)的选择:

抗体工作液的稀释度, B/T 为 33%~50%。

理论根据 $P + Q \rightleftharpoons PQ$

亲和常数 $K = \frac{[PQ]}{[P][Q-PQ]}$

$[PQ] = P \times B\%$

$$B^2 - B \left(1 + \frac{Q}{P} + \frac{1}{KP}\right) + \frac{Q}{P} = 0$$

$$\text{积分得出: } \frac{dB}{dP} = \frac{-B(1-B)^2}{\frac{1}{k} + P(1-B)^2}$$

$\frac{dB}{dP}$ 表示抗原浓度变化时, 结合百分率的亲和率。其值愈大, 说明抗原浓度的变化能引起结合百分率的显著变化, 反映在标准曲线上的斜率大, 灵敏度则高。

由上式可以看出:

① P 愈小(即 *Ag 的化学量小, 比放射性高)时, dB/dP 越大。

② K 愈大, dB/dP 越大。

由此可见, 方法的灵敏度($\frac{dB}{dP}$) 取决于抗体的亲和力和标记抗原的比放射性。当 *Ag $\rightarrow$ 0, B 为 33%, $\frac{dB}{dP}$ 最大, 灵敏度最好; 当 B 为 50% 时, $\frac{dB}{dP}$ 也最大, 33~50% 最理想。

2. 亲和力: 指抗原抗体结合的能力, 以亲和常数 (K) 表示, $K = \frac{1}{[H]}$ 。[H] 表示最小可测浓度(即灵敏度), 故亲和力, 直接影响方法的灵敏度。

3. 特异性: 与被测物质相类似物的交叉反应的程度, 一般交叉反应 $< 5\%$ 。

(三) 抗原的放射性核素标记: ^{125}I 、 ^{131}I 为目前所常用; 此外有 ^3H 、 ^{14}C 等。标记抗原比放射性要高, 标记过程简便。

(四) 游离标记抗原和结合标记抗原的分离技术。

1. B 与 F 的分离快速且完全。

2. 操作简单, 试剂来源容易, 价格低, 便于推广。

3. 不受其它试剂干扰, 重复性好。

(五) 测定放射性强度仪器。

二、放射免疫分析时的主要影响因素:

误差——包括系统误差和随机误差。

系统误差——仪器不准, 试剂不纯, 标准品不稳定。

随机误差——测量过程中各种偶然因素所造成。

误差的可能来源:

(一) 各种仪器、设备的准确性、稳定性、效率以及被污染等情况带来的误差。

1. 放射性测量仪器的稳定性、效率; 样

品、试管材料的均匀性; 被测物的放射性; 抗原抗体温育时的温度等原因。

2. 由于样品的自吸收、本底校正、测定时间、可能的污染等原因。

3. 在实验室中所用的移液管、微量取样器以及天平的精密度、标准品的标准程度和使用方法等原因。

4. 由于反应试管、移液管以及测定用试管等表面清洁度和所引起的不同吸附等原因都可以对测定结果带来误差。

(二) 试剂的纯度、质量和稳定性的影响也是造成误差的重要因素, 如标记抗原的比度、纯度、辐射自分解; 抗体的稳定性; 分离剂、阻断剂及缓冲液等试剂的纯度等。

(三) 在放射免疫分析中一些基本操作, 如取样、提取、沉淀、分离以及保温条件不当等造成的误差。由于工作人员熟练程度不同也常常带来误差, 如操作移液管垂直程度、下流速度、吹气与不吹气等。工作人员草率、不按规程操作等也都可造成误差。

(四) 样品误差, 如样品的收集方法、贮存温度、放置条件、微量样品取样的准确度、样品可能造成的污染以及样品的变性(如免疫反应活性的降低、蛋白质的变性等)也都能造成测量的误差。

(五) 提取层析分离过程中的丢失。

误差的控制:

(一) 选择准确性高的方法, 对各种方法进行比较, 淘汰粗糙及难以重复的方法。

(二) 建立方法对比, 用相同的测量方法和不同的测量方法在同一实验室和不同实验室; 在同一地区 and 不同地区; 在同一时间和不同时间, 对同一样品进行对比, 检查产生误差的原因。

(三) 建立不同类型的标准, 对标准品应规定纯度及制备方法, 使用年限及贮存条件。

(四) 建立操作规程, 按章操作。对使用的试剂、仪器设备要经常检查其有效性, 更换

试剂时应进行必要的鉴定，必要时对测定方法要做重复性试验和回收试验。

(五)建立可靠的核查制度，经常对测定

结果进行核查，利用控制血清、标准血清核查每批结果的准确性。

第三章 抗原的纯化、鉴定及标准品

抗原(Antigen)在适当的条件下,能激发动物产生相应的抗体,并能与该抗体专一地结合。

抗原分子量愈大抗原性愈强,分子量 $>10,000$ 者有抗原性;分子量 $<5,000$ 者一般无抗原性;分子量介于 $5,000\sim 10,000$ 者为弱抗原。但抗原有无抗原性并非单靠分子量大小而定,如明胶的分子量高达 $100,000$,并无抗原性,这是因为它缺少化学活性基团。

第一节 抗原的分类

一、全抗原(Complete antigen):能激发免疫活性细胞产生抗体或生成致敏的淋巴细胞,能与相应的抗体或致敏的淋巴细胞相结合而出现体液或细胞免疫反应。属于全抗原的都是异种蛋白质及复杂结构的大分子多糖质或糖脂蛋白复合物,能在体内久留,发挥异物的免疫刺激作用。

二、半抗原(Hapten):本身无免疫原性,只有与大分子胶体物质(如蛋白质)或不溶性颗粒(如聚苯乙烯胶乳颗粒)结合后才具免疫原性。半抗原能与由它引起的相对应的抗体或致敏的淋巴细胞相结合而出现免疫反应。

此外,根据抗原物质的来源可分为外源性抗原(如微生物、动植物机体成分、药物及化学品);内源性抗原(如自体内的成分变性或与外来异物结合而成,可引起自身免疫性疾病)。根据抗原的属性可分为天然抗原和人工合成抗原两类。前者在医学上具有重要价值。

第二节 抗原分离纯化的方法

一、理化方法:

(一)盐析法;(二)无机或有机溶剂抽提法;(三)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);(四)各种层析法(纸层析、薄板层析、滤纸粉层析等);(五)离子交换分离法;(六)凝胶过滤分离法;(七)等电聚焦法。

二、免疫法:

(一)解离法:将抗原先和特异性抗体结合形成抗原抗体复合物,离心后取沉淀,弃上清液,再用某些化学试剂将抗原抗体复合物解离,最后用葡聚糖凝胶分离抗原和抗体。

(二)亲和层析法:先将特异的抗体交联到琼脂糖珠上去,然后装入柱层析管内,成免疫吸附柱。当抗原通过柱时就与柱上的抗体结合,最后用化学试剂将抗原和抗体解离、洗脱下来。

(三)戊二醛固相吸附: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,作为免疫吸附柱。

三、理化法与免疫法结合:是最常用的方法,效果较好。一般是将提取物先用理化法初步提纯,然后再用免疫法纯化。

抗原的纯化不外乎以上三种方法,现以SIgA为例简述如下:

(一)SIgA的提取:取人的初乳 20 ml ,离心($1,400\text{ g}$) 30 分钟,吸出下层乳清液吹风浓缩。将浓缩液加入经 $\text{pH } 6.8$ 、 0.1 M PBS平衡的Sephadex G-200柱($2.5\times 100\text{ cm}$)。然后用 $\text{pH } 6.8$ 、 0.1 M PBS洗脱,流速每分钟 0.2 ml ,将收集之第一峰在 $\text{pH } 7.4$ 0.01 M PBS中透析,浓缩至 20 ml 。

取浓缩液 10 ml ,加入经 $\text{pH } 7.4$ 、 0.01 M PBS平衡的DEAE-纤维素柱($2\times 25\text{ cm}$),用 $\text{pH } 7.4$ 、 0.01 M PBS洗脱IgG,再用 $\text{pH } 6.2$ 、 0.1 M PBS洗脱。收集之第一峰则为SIgA粗制品。

(二)SIgA的纯化:将上述SIgA粗制品通过经抗正常人全血清交联的Sephrose-

4B 免疫吸附柱, 以每分钟 0.25ml 流速洗脱, 合并流出液蛋白峰, 即为纯化之 SIgA。

第三节 抗原纯化后的鉴定

放射免疫分析中抗原纯度至少达 90% 以上, 即所谓“免疫纯”。在免疫电泳鉴定时, 仅见一条抗原抗体结合的沉淀线。采用聚丙烯酰胺凝胶(SDS)电泳只见一条区带或使用放射免疫电泳自显影等方法予以鉴定。

应用高纯度的抗原进行核素标记, 不致于直接影响方法的特异性和灵敏度。否则在抗原标记时会连同杂质一起被标记, 这样不仅影响抗原的比放射性, 而且还会影响抗原抗体反应的特异性。因此, 对已经提取的抗原进行纯度鉴定是很重要的步骤。鉴定方法见本章后几节。

第四节 盐析法分离

利用中性盐 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 Na_2SO_4 等可将血清蛋白分成若干主要组分, 如白蛋白、球蛋白、纤维蛋白元等。一般认为用 45% 硫酸铵饱和度, 在 pH7.0 时, 可将五种免疫球蛋白沉淀下来, 在 4~6℃ 内进行, 可保持免疫球蛋白的免疫活性。硫酸铵饱和度达 20% 时(80ml 标本+20ml 饱和硫酸铵)可使纤维蛋白元大部分沉淀; 硫酸铵饱和度达 33% 时(80ml 标本+40ml 饱和硫酸铵)可使 IgG 大部分沉淀; 硫酸铵饱和度达 43% 时(80ml 标本+60ml 饱和硫酸铵)可使 IgM 完全沉淀; 硫酸铵饱和度达 50% 时(80ml 标本+80ml 饱和硫酸铵)可使全部蛋白沉淀。

采用中性盐提取免疫球蛋白, 尚难获得纯净的免疫球蛋白, 必须与区带电泳、离子交换、凝胶过滤、亲和层析等结合起来使用方能奏效。

在使用中性盐分离和提取蛋白质后, 还常需去盐、浓缩等步骤才能得到所需的蛋白质。

去盐通常采用透析袋法, 此法简便易行,

但速度慢。将蛋白溶液装入透析袋中, 袋口扎紧, 尽量少留空隙, 以防透析液进入太多而致蛋白稀释。开始先用自来水流水透析 2 小时, 然后移入生理盐水或缓冲液中, 4℃ 过夜。翌日再换 1~2 次水, 同时用 1% BaCl_2 检查有无 SO_4^{++} , 如出现白色雾状即表示透析未完成。亦可采用纳氏试剂检查 NH_4^+ 的存在。

蛋白质溶液一般采用透析袋浓缩法, 此法利用透析袋的半透膜性质, 膜内装入欲浓缩之蛋白质溶液, 袋外放上吸水剂, 如 PEG (分子量 20,000)、蔗糖等。吸水剂可配成 20% 以上的高浓度溶液, 亦可将粉直接撒在袋外。浓缩过程中要经常搅拌袋内溶液(放玻璃珠), 以防蛋白质堵塞膜孔, 甚至使蛋白质吸出膜外。蛋白质溶液不宜在浓缩剂中存留时间过长, 因此浓缩剂(尤以蔗糖)极易进入袋内。浓缩剂使用后可用反透析除去盐类。

另外, 将蛋白质溶液装入透析袋内, 挂起来用电风扇吹而达到浓缩目的。该法效果亦可, 简便易行, 但速度慢, 室温在 15℃ 以下使用此法较好, 以免蛋白变性。

蛋白质浓缩至最终浓度以 20~30mg/ml 为宜, 加入叠氮钠(1:10,000)防腐, 然后冻存。

第五节 凝胶过滤

凝胶过滤系利用凝胶把分子大小不同的物质进行分离的一种方法。凝胶是有机物制成, 可用于蛋白质、多糖及其它一些较大分子物质的分离, 须在液相中进行操作。

凝胶过滤是一种分离抗原、抗体等蛋白质的重要手段。此外, 亦可用于肽类、酶、核酸、激素、脂类、碳水化合物的提纯。

凝胶层析的优点在于设备简单, 洗脱剂来源方便、价廉; 工作范围较宽; 凝胶为不带电的惰性载体, 不与溶质相互作用, 分离效果好, 重复性佳。缺点是仅限于分子的大小把蛋白质溶液分开, 纯化程度不高。