

放射免疫分析测定法的 基本知识及测定方法讲义

湖南医学院附一院中医基础理论研究室编

一九八六年十月

第一章 概 说

放射免疫分析测定法是国际上六十年代发展起来的一种超微量分析技术。五十年代初期 Berson·S·A 和 Yalow·R·A 开始合作研究，到 1959 年首先由 Yalow 和 Berson 发表了胰岛素的放射免疫测定技术，同时并建立放射免疫法（竞争性蛋白结合方法）的理论依据。1977 年 Yalow 获得了诺贝尔奖金，奖金评选委员会认为该项试验是“通过免疫学，同位素，数学和物理学的规模宏大的研究而完成的”是一种“先驱性研究的成就”。

放射免疫分析方法，^①灵敏度高（可达到 10^{-9} — 10^{-12} 克水平），^②特异性强（即专一性），^③精确性好，标本用量少，试剂用量少，对人体不会引起放射性损伤。因此应用范围广，便于规格化及比较简单易行。对现代实验室工作的发展起着深远的影响，大大推动了医学科研工作的深化。

五十年代时期临床实验室所采用的测定方法只限于测定生物体液中 所含的克，或毫克量，偶可测出微克（ 10^{-6} 克）量的物质。

例如常用的测定微量激素和药物的方法如化学测定法，常用分光光度计，较难于精确的测出低于毫克量的激素。用较灵敏的荧光分光光度法可测出微克量的浓度，但又限于测定仅能产生荧光的物质或测定能与荧光引发剂起反应的物质。另较灵敏的化学测定法如

气液色谱法。技术上过于复杂，临床实验室应用更为困难。

又如生物测定是测量微量激素的唯一灵敏的方法，它需要活的动物或活组织，并且方法复杂，耗时，特异性差，较为浪费。

放射免疫测定法，近年来由于能制备高比度标记化合物，检测的灵敏度向毫微微克级（ 10^{-15} 克）发展，这比一般生化分析的灵敏度提高 $1000 - 1000,000$ 倍。并且特异性强，随着单克隆抗体的产生及应用，将会更加提高方法的特异性。这种方法操作起来比耗时的化学和生物学测定方法快得多，又比较容易掌握。

以上简介放射免疫分析测定法的优越性，因此受到生物学、医学各科研究工作者的普遍重视，目前已成为基础医学理论研究和临床诊断疾病不可少的重要手段，特别是在分子生物学，分子药理学，免疫学，生物化学，微生物学，流行病学、寄生虫学、毒理学，临床内分泌学，妇产科学，肿瘤学，以及祖国医学等学科内广泛应用。例如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，对生命科学中很多悬而未决的问题获得了新的线索，解释和发现，对临床疾病的早期诊断、疗效、和预后分析资料。

放射免疫分析法自六十年代建立后，国外国内（我国1975年第一次全国放射免疫会议）在此超微量分析新技术上都取得了非常大的进展，并在放射免疫分析法的基本理论依据上延伸的许多分析方法相继建立起来。这些分析方法的基本原理与放射免疫分析测定方法相同，只是不利用免疫反应，而使用其他的特异结合蛋白质，

其中比较重要的有：

(1) 竞争性蛋白质结合分析 (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和甲状腺素结合球蛋白等，前者可用来测定各种类固醇激素，后者可用来测定 T_4 和 T_3 。

(2) 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cAMP (环一磷酸腺甙)，cGMP (环一磷酸鸟甙) 的测定也可以利用它们的受体蛋白如磷酸二酯酶。

(3) 其他：放射酶分析 (Radioenzymatic assay) 酶标免疫分析 (Enzyme-linked Immunoassay) 还有病毒免疫测定法 (标记病毒作示踪物，以抗体作结合剂)。

上述几种类似的分析方法，理论依据相同，故有人总称为“饱和分析法”或放射配基 (Ligand) 结合测定法。

当然放射免疫分析也有其不足之处，首先由于各种反应剂是免疫学特异的。因此，所得到数据常仅代表免疫学活性，而不是生物学活性，故可能将一些无生物活性而只有免疫学活性的物质也一起测定了。其次使用放射性同位素，对操作者有一定的危害，不过此法所使用的放射性同位素操作量仅有允许剂量的千分之一左右，还是相当安全，但不可忽视相应的防护设备与严格遵守放射性同位素操作规程和注意事项。尽管存在一定的缺点，但在分析方法学上发生了革命性的变革，将有更大的发展前途。

第二章 放射免疫分析测定法的一般原理

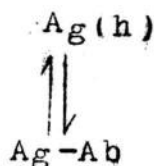
(Radioimmunoassay RIA)

第一节 放射免疫分析法的基本理论

放射免疫分析法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。也可以说是采用高度灵敏度的放射性示踪技术与高度特异性的免疫化学技术二者结合起来的测定方法。

放射免疫的基本理论是在一溶液系统中，存在有天然或未标记抗原；标记的相同抗原及一定量的特异性抗体三种组成的混合溶液。其未标记抗原与标记抗原量之和大于特异性抗体量，因此由于抗体量不足以与所有标记抗原和未标记抗原分子相结合。所以，这两种抗原便对该抗体进行竞争性结合而直达到平衡状态。故亦称为竞争性放射分析法。

拟用模式图说明放射免疫分析法的基本理论依据。



$*Ag$ 为标记抗原, Ag 为未标记抗原 (被测定物质或已知的标准品) Ab 为特异性抗体。

$*Ag-Ab$ 结合的复合物, $Ag-Ab$ 为未标记的结合的复合物

F 代表游离标记抗原浓度, B 代表标记抗原与抗体结合的复合物

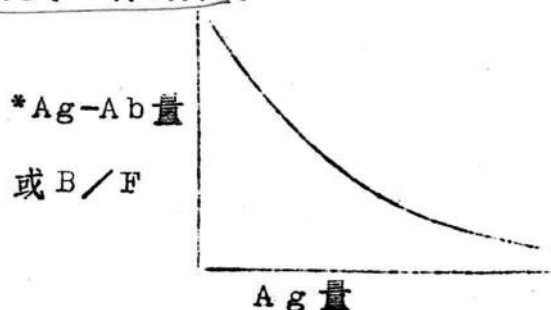
浓度, h 代表未标记抗原的浓度, B/F 与 h 成反比, 当 $h =$

0 则 B/F 为最大。

当标记抗原 $*Ag$ 和特异性抗体 Ab 的量保持恒定时, 而加入的被测物 Ag (或标准品) 与标记物 $*Ag$ 的量之和, 大于特异性 Ab 的有效结合的数目时, 在这样的条件下, 被测物或标准物 (Ag) 和标记物 ($*Ag$) — 特异性 (Ab) 结合的复合物 ($*Ag-Ab$) 之间呈现一种函数关系。

随着被测物或标准物的量 (自变量) 增加, 则标记物的被稀释程度也就越大, 使标记物——特异性结合物结合的复合物 ($*Ag-Ab$) 的量 (应变变量) 逐渐减少, 放射性强度测定就越低。亦即 B/F 与 h 之间形成反比关系, 当 $h = 0$ 时, 则 B/F 为最大。

由于标记抗原对抗体的结合被未标记抗原的竞争结合所抑制, 于是产生一条竞争性抑制曲线



从图中可反映出 $*Ag-Ab$ (或 B/F) 与 Ag 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, 这条曲线就是对样品进行定量的依据, 因而亦称为标准曲线。

在检测样品时, 以样品代替标准抗原, 测定出样品中的结合率与标准曲线相比较即可折算出样品中抗原的含量。

为了进一步阐明竞争性放射免疫分析的原理再用以下模式图说明之。(图见第7页)

测定管 A、B、C、D, 所含标记 $*Ag$ 的分子数均为 8 个不变的而每管含 Ab 数均为 4 个 (有效结合点数目), 测定管 A 没有加未标记 Ag , 故结合的放射性强度最大 B_{max} 或 B_0 表示。

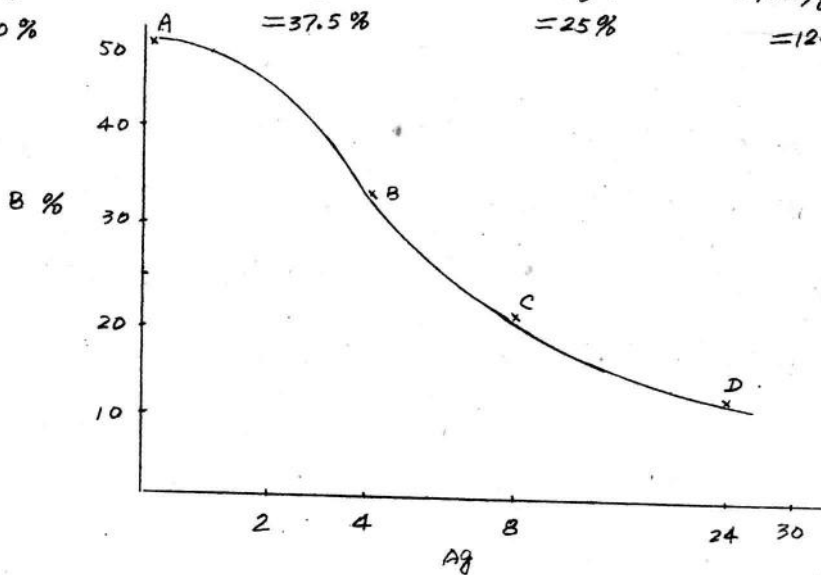
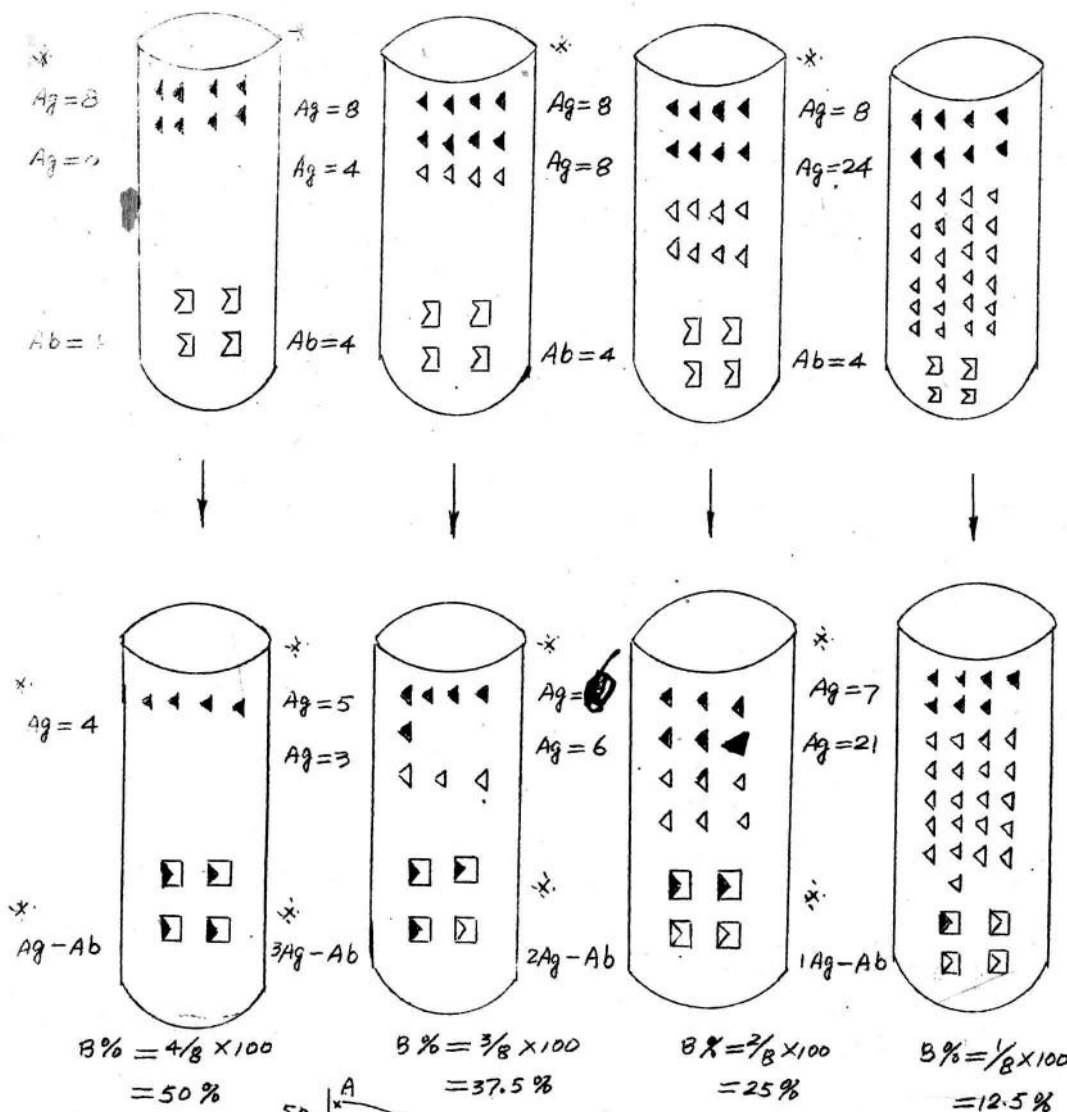
A 测定管 $B\%$ (百分结合率) = 50.0 在下图的 A 点。

B 测定管中, 当反应系统加入 4 个未标记 Ag 时, 反应达到平衡时, $B/F = 3/5 = 0.6$

C 测定管中, 加入 8 个未标记 Ag 时, 即反应系统中所含抗原有 50% 是被标记, 因此, 有 50% 的 Ab (有效结合点) 要被放射性标记 $*Ag$ 所占据, 此时 $B/F = 2/6 = 0.33$ 。

D 测定管中, 加入 24 个未标记的 Ag 时, 即 4 个抗原中有一个是被标记, 因此, $B/F = 1/7 = 0.14$, 亦即 4 个 Ab (结合点中) 只有 1 个被标记者所占据。

请计算图中 A、B、C、D 的 B/T 、 B/F 和 $B\%$ (对 B_0)



	B / T	B / F	B % / B ₀
A	0.5	1.0	100%
B	_____	_____	_____
C	_____	_____	_____
D	_____	_____	_____

$$\frac{B}{F} = \frac{\text{分离后结合部份的 cpm}}{\text{分离后游离部份的 cpm}}$$

cpm 即为液体闪烁计数器每分钟的计数 (counts per minute)

$$\frac{B}{T} = \frac{\text{结合的 cpm}}{\text{每管中加入的总计数 cpm}}$$

$$\text{百分结合} = B \% = B / T \times 100$$

$$\text{最大结合的百分结合} = B \% (\text{最大结合 } B_0 \text{ 的百分比})$$

$$= B / B_0 \times 100$$

从上述反应系统中，可以看出：

抗原和抗体的反应过程很复杂，受许多因素的影响，最主要的因素是抗原抗体的结合能力，常以抗原—抗体反应的平衡常数来表示，即：通常所称亲和常数在鉴定抗体质量的条件中讨论之。

第二节 放射配基测定法的基本理论

1960年 Ekin 根据放射免疫分析法的基本理论延伸, 不需要制备抗体, 而利用具有特殊结合蛋白, 建立了竞争性蛋白结合分析法 (Competitive Protein binding assay) 等。使这类分析方法得到了很大的发展。概论已略加论及。

现基于放射免疫分析法基本理论的基础上所发展的各种放射配基结合测定法, 现用一简图说明之。其特点即每种测定法的结合剂, 示踪物和反应条件有各自不同。



+

L

↓

L-Bp

* L —— 标记配基或示踪物 }
L —— 未标记配基 } 激素、药物、维生素, 抗原

Bp —— 结合剂或结合性蛋白—机体, 血浆中结合蛋白

本节仅提供今后研究工作中的参考, 本课不加重点讨论。

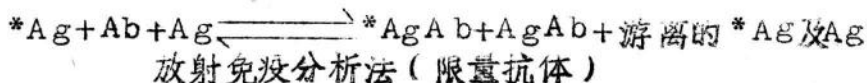
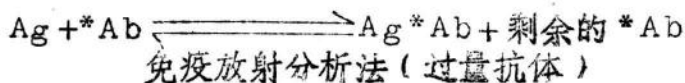
第三节 免疫放射分析法的基本原理

前面所介绍的放射免疫分析的基本原理是为竞争性结合分析法。

Miles 和 Hales 于 1968 年首先又建立一种非竞争性的放射免疫分析法称为免疫放射分析法 (Immunoradiometric Assay 简称 IRMA) 以后, 使用范围更加扩大。IRMA 已经用于不少种抗原的分析, 并扩展应用于其他的结合分析法, 如非竞争性的酶联免疫分析法。

两种分析法主要的区别点:

(1) RIA 所用抗体是限量的而 IRMA 则是用过量的抗体, 机体能与抗原全部结合而有剩余, 其区别可用下式说明。



(2) 从上式中亦可知 RIA 是标记抗原而 IRMA 则是标记纯化的抗体。

为 Addison 等于 1971 年首次建立双点免疫放射分析法, 本课程授课时间受限, 请参阅专著。

现在已有不少的抗原和多种激素可用 IRMA 测定。根据文献资料, 认为 IRMA 是比 RIA 要灵敏度高, 不过目前对这两类方法

还缺乏用同一抗血清和抗原标准物进行严格比较的资料，而文献报导用IRMA测定胰岛素及铁蛋白，检出值分别可达 3×10^{-17} moles 及 2.4×10^{-17} moles。因此对测定小分子的半抗原，IRMA法可能优于RIA法，由于得到一个较稳定的标记抗体常比制备一个特异性强的标记半抗原要容易；但总起来看，可能IRMA需要较多的抗体，则不如RIA经济等因素，现在使用RIA法较IMRA普遍。

第四节 放射免疫分析测定法中试剂的制备（简介）

放射免疫分析时必需首先具备：(1)免疫反应性好，比放射性(Specific Activity)高的纯化的标记抗原；(2)效价高，亲和力的特异的抗体；(3)游离抗原与抗原-抗体复合物的适当分离方法，这是三个关键性的问题，都涉及免疫学与放射化学的原理和技术，将在下面分别讨论。

一、抗原纯化

抗原的纯化在免疫学中均已详细讨论，一般分为三类：(一)物理化学方法如盐析法，抽提法，各种电泳分离法，各种层析法，离子交换分离法，凝胶过滤分离法等；(二)免疫方法：抗原抗体复合物解离法，亲和层析法等；(三)物理化学法与免疫法结合应用。

在竞争性放射分析方法中，诱发抗体产生，必需注意下列情况，

本法大部份所检测的物质如多肽激素，类固醇、激素、环核苷酸和前列腺素等，均多为小分子生物活性物质，分子量小于1000。

一般讲，分子量小于1000的无抗原性，不易诱发抗体产生，还有一部份生物活性物质，虽然分子量大于1000，但抗原性甚弱，如17肽的胃泌素，29肽的高血糖素等，也不能诱发高滴度的抗体。但将它们和蛋白质或其他适当的载体（牛血清白蛋白（BSA）、兔血清白蛋白（RSA）、人血清白蛋白（HSA）以共价键（蛋白质载体的氨基、羧基和酚基、硫基相结合）结合后具有了抗原性，就可诱发动物产生高滴度特异性抗体，此类物质称为半抗原。

半抗原和载体蛋白结合，常使用各种蛋白缩合剂，如目前采用最多的是用碳化二亚胺法，将半抗原和载体相结合法。后面举例说明放射免疫分析具体的测定法，环核苷酸，为半抗原常采用此法。

详细内容和步骤请参阅免疫学专辑。放射免疫法一定要求抗原纯化，否则影响本方法的灵敏度和特异性，此是分析法中重要条件之一。

二、抗血清（抗体）的制备

建立放射免疫分析的另一重要条件，是需要有一个滴度高，亲和力和特异性强的抗体。

免疫动物的选择；主要根据免疫原的性质、来源，以及所需抗体的量而定。一般实验室中，制备抗血清选用的动物有家兔、豚鼠、山羊和绵羊，最多是家兔可能诱发产生体液免疫反应和细胞免疫反

应的敏感性较强有关。

由于同种动物对注射抗原时，其机体的反应也有较大的差异。因此，常常同批动物应有足够量的动物，以便选择高质量的抗体。

免疫方法，为着提高动物对免疫原的灵敏度，并保证在体内的持续刺激作用，基础免疫需将免疫原和一定比例的福氏完全佐剂混合（石蜡油、羊毛脂以及灭活或者活的卡介苗组成）研磨成均匀乳剂，再注射于动物皮下，皮肉（多点微量注射）。脚垫和淋巴结处，剂量每只 $0.5 - 1.0$ 毫克，一般每两周或一个月一次，几个月即能得到满意的抗体。

下面将分别讨论有关鉴定抗体质量的几个重要条件。

(1) 滴度：即表示抗体的最适稀释度，也就用于测定的抗体的最后稀释度。

在放射免疫分析实际工作中，常要求抗血清（抗体）应有的最适稀释度是在固定量（标准量）的放射性标记抗原与抗血清（抗体）结合率达到特定的百分比 50% ，则为最适稀释度。过高过低均影响方法的灵敏度。

因此，如何对滴度的选择还取决于所测定的灵敏度和精确度。灵敏度即表示理论上最小可测量，精确度即对待测定配基（Ag）浓度所得结果的重复性。常用于表示精确度的标准指数为变异系数（CV）即用待测定样品的标准差（SD），除以均数，再乘以 100 。

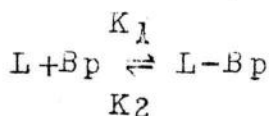
$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum X^2 - n(\sum X / n)^2}{n-1}}$$

(2) 亲和力：抗体的质量是否达到要求的标准，滴度的高低并不是最重要，更主要决定于它的亲和力与特异性。

抗体的亲和力的大小，表现在抗体和抗原结合的牢固程度，亲和力大者，在反应中结合速度快，而解离小，反之在反应中结合速度慢，不牢固，易解离。

由于抗原——抗体反应是十分复杂的过程，拟再用一简单反应式用亲和常数（平衡常数）来说明其亲和力的重要性



L 代表配基 (Ligand) 包括抗原，待测物等。

Bp 代表特异结合蛋白 (Binding Protein) 包括抗体。

L—BP 代表结合的复合物

K_1 代表结合速度常数， K_2 是解离速度常数，根据质量作用定律，如 K_a 等于平衡常数（或称亲和常数）即

$$K_a = \frac{K_1}{K_2} \text{ 故可写成}$$

$$\frac{[L - B_p]}{[L][B_p]} = \frac{K_1}{K_2} = K_a = \text{平衡或亲和力常数} (L/M)$$

或 $(M/L)^{-1}$ 即克分子浓度

平衡常数的定义：将 1 克分子的蛋白质，稀释成能使小量的示踪配基结合 50% 的容量（以升为表示），因此，抗体平衡常数 K_a 值显著影响灵敏度，故不同批抗血清中的抗体具有不同的结合量，于是就产生不同的剂量——反应曲线。这对为什么选择抗体时，不仅要考虑滴度，还要考虑抗体的结合力强度 (avidity)，滴度反应抗体的稀释度，结合力强度反应标准曲线的斜率上，这样才可能得到理想的灵敏度。

放射免疫分析测定法中，还应当对于抗体的滴度与浓度的概念与两者之间的关系理解清楚。

滴度并不是等于抗体浓度，滴度是 $[Ab]$ 和亲和力常数的函数，因此滴度与 $K_a[Ab]$ 成正比。可从下反应式中去理解。

$$\frac{[L - B_p]}{[L][B_p]} = K_a \quad \frac{[L - B_p]}{[L]} = [B_p] K_a$$

$$\frac{B}{F} = K_2[B_p] \quad ([B_p] \text{ 即 } [Ab])$$

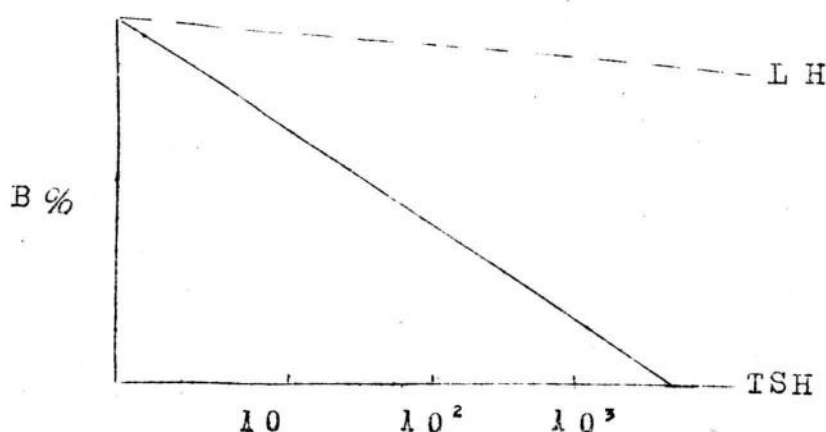
再举一例说明其关系。

两种抗血清 a、b 结合的特性。

	Ka	$[Ab]$
a	$1 \times 10^{-7} L/M$	$3 \times 10^{-7} M/L$
b	$1 \times 10^{-10} L/M$	$3 \times 10^{-9} M/L$

b、抗血清具有较高的滴度，但其浓度则是抗血清a的 $1/100$ 。

(3) 特异性：系指抗原和抗体结合能力与其他类似物结合能力之比。如抗体和抗原结合能力很强，而对其他类似物结合力很弱，甚至无结合力，则表示抗体特异性很强，否则抗体的特异性就差，亦即测定方法不受非测定物质干扰的程度。



TSH（促甲状腺激素）产生的抗血清，虽然TSH与LH（促黄体生存激素）不出现明显的生物学交叉活性，但此抗血清仍能与LH产生一定程度的交叉反应。

这表明LH能与TSH的同一抗血清结反应，但具有不同的结合亲和力。为何出现此现象，主要为抗血清具有不均匀性，它含有多种与抗原结合程度不同的抗体。