

梁业楷 编著

放射免疫分析 及其在微生物免疫学中的应用

人民卫生出版社

05411

放射免疫分析及其 在微生物免疫学中的应用

梁 业 楷 编 著

人 民 卫 生 出 版 社

内 容 提 要

本书分总论与各论两部分。总论部分叙述有关放射免疫分析的概念,免疫学方法,标记技术与辐射防护,分离方法,免疫放射测定分析及其有关技术等。各论部分分别介绍细菌、病毒、肿瘤等抗原或抗体的放射免疫分析方法,较详细地叙述其具体操作程序,并注意介绍我国放射免疫工作者在这方面的成就。

本书所述内容仅限于广义的微生物免疫学方面的放射分析,不涉及一些非微生物免疫学方面的其他物质的饱和分析。

本书可供从事放射免疫工作的科研人员,大专院校师生及实验室工作人员参考之用。

放射免疫分析及其在微生物免疫学中的应用

梁 业 楷 编 著

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北 京 通 县 印 刷 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

787×1092毫米 32开本 6印张 127千字

1982年8月第1版第1次印刷

印数: 1—5,700

统一书号: 14048·3990 定价: 0.63元

编 者 的 话

放射免疫分析是放射性示踪技术与免疫化学技术二者结合而建立起来的一种体外超微量分析方法。这种技术目前已广泛应用于各学科。凡有免疫原性、能产生抗体的物质，几乎都可以用这种方法测定。

本书所述内容仅限于广义的微生物免疫学方面（包括细菌、病毒、毒素、肿瘤、寄生物、抗菌素、血清学等）的放射分析，即分析系统中的结合剂为特异抗体，其反应为抗原抗体反应者。至于一些非微生物免疫学方面的其他物质的饱和和分析，均不在本书讨论之列。

本书分总论与各论两部分。总论部分叙述有关放射免疫分析的概念，免疫学方法，标记技术与辐射防护，分离方法，免疫放射测定分析及其有关技术等。此部分亦适用于其他物质的饱和和分析。各论部分分别介绍细菌、病毒、肿瘤等之抗原或抗体的放射免疫分析方法，较详细地叙述其具体操作程序，并注意介绍我国放射免疫工作者在这方面的成就。本书承吴安然、郑武飞同志审阅，提出了修改意见，谨此致谢。

由于编者水平所限，书中错误之处在所难免。请读者批评指正。

编 者

1980年于中国科学院武汉病毒研究所放射免疫组

目 录

总 论

第一章 放射免疫分析	(1)
一、导言	(1)
二、历史回顾与命名	(2)
三、基本原理	(4)
四、应用与展望	(6)
第二章 免疫学方法	(13)
一、抗原及抗体	(13)
二、沉淀反应	(13)
三、抗血清或抗体的制备及纯化	(15)
四、抗原的制备及纯化	(19)
五、免疫扩散与免疫电泳方法	(20)
第三章 标记技术与辐射防护	(26)
一、微生物抗原的体内标记	(26)
二、蛋白质的体外碘标记	(28)
三、进行放射免疫分析标记时的辐射防护	(41)
第四章 分离方法	(45)
一、理想的分离方法	(45)
二、各种分离方法	(45)
三、一些与分离方法有关的实际问题	(54)
四、小结	(55)
第五章 免疫放射测定分析及有关技术	(58)
一、导言	(58)
二、免疫放射测定分析	(60)
三、夹层免疫放射测定分析	(65)

四、应用碘标记抗免疫球蛋白作为通用试剂(88)

各 论

第六章 病毒抗原及抗体的放射免疫分析(71)

一、导言(71)

二、病毒感染细胞的放射免疫分析(72)

三、病毒性肝炎的抗原和抗体的放射免疫分析(76)

四、小结(95)

第七章 细菌毒素及抗毒素的放射免疫分析(98)

一、分析方法(98)

二、测定结果(101)

三、应用与限制(106)

第八章 细菌抗原、抗体及抗菌素的放射免疫分析

.....(108)

一、脑膜炎球菌抗体的放射免疫分析(108)

二、绿脓杆菌抗原在尿路感染时的放射免疫分析(112)

三、抗菌素的放射免疫分析(113)

第九章 免疫球蛋白及其他血清蛋白的放射免疫分析

.....(119)

一、IgG、IgA 及 IgM 的“夹层”放射免疫定量测定法

.....(119)

二、IgE 的放射免疫分析(122)

三、结合于组织中免疫复合物的微量免疫球蛋白放射测

定法(126)

四、血清蛋白的放射免疫扩散分析(127)

五、血红蛋白的双抗体-聚乙二醇放射免疫分析(129)

六、类风湿因子的间接固相微量放射免疫分析(132)

第十章 肿瘤相关抗原的放射免疫分析(137)

一、导言(137)

二、甲种胎儿蛋白 (AFP) 的放射免疫分析(137)

三、癌胚抗原的放射免疫分析	(163)
四、胃液中 α_1 酸性糖蛋白的电免疫扩散双抗体放射免疫 分析	(169)
第十一章 寄生虫抗原及抗体的放射免疫分析	(175)
一、血吸虫抗原及抗体的放射免疫分析	(175)
二、棘球虫抗体的放射免疫分析	(179)

总 论

第一章 放射免疫分析

一、导 言

科学的发展过程中,在某一历史阶段之所以能够取得重要成果,其原因之一,往往是由于研究方法有了重大的突破。作为一种生物物理化学实验手段,放射性同位素技术的应用,能大大加速生命科学研究的进展。

放射免疫分析(Radioimmunoassay, RIA)是六十年代初期创立的一种体外的超微量分析方法。它是将具有极高灵敏度的放射性同位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。

许多具有生物学重要性的复杂的化合物,在生物体液及组织中仅含有微量,用一般的方法难于甚至不可能检测出来。放射免疫分析技术的创立,使分析方法学发生了革命性的变化。本法目前已成为研究生物学与医学中不可缺少的有力的工具。

放射免疫分析最初是由 Yalow 与 Berson 等人在研究胰岛素时建立的。由于该法具备有灵敏度高、特异性强、精确度佳、重现性好等优点;而且分析是在体外进行,免除了对人体的辐射,受检者无痛苦;所用的样品试剂、抗体等量很少,操作尚称简便、迅速、安全可靠;应用范围广,可自动化及由计算机处理数据,一天之内一人可检测近千人的样

品。因此本法建立不过十余年，而发展非常迅速，可检测物质的种类不断增加，目前已达二三百种之多。其检测内容远远超出多肽及蛋白质激素之范畴，已渗透到生物化学、酶学、细菌学、病毒学、寄生物学、原生物学、药理学、抗菌素学、毒理学、流行病学、血液学、肿瘤学、内分泌学、妇产科学及法医学等领域中。

放射免疫分析极其灵敏，可检出 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ 克（即毫微克到微微克）痕量之物质，即含量在十亿分之一克甚至更少也能检出。其灵敏度比一般常用之分析方法高 2 个以上数量级。至于其特异性亦甚惊人。例如，人血清中有数百种不同种类的蛋白分子，其中生长激素仅能与抗生长激素抗体起反应而已，与其他蛋白分子并无交叉反应。

二、历史回顾与命名

放射免疫分析是体外放射测定方法的一种。由于所采用方法与检测对象之不同，在其发展过程中，各学者使用名称亦异。1955 年 Berson 与 Yalow 等人以碘标记胰岛素 (I^{131} -胰岛素) 注射两组试验人员，第一组为曾接受过胰岛素处理者，第二组为从未接受过外源性胰岛素者。然后在不同时间连续抽取血样，以三氯乙酸沉淀法进行分析，观察胰岛素之消失情况。结果发现：第一组血液中胰岛素之消失远比第二组者慢。电泳分离显示， I^{131} -胰岛素能与第一组者血中之一种球蛋白成分相结合。据此，他们应用抗胰岛素抗体作为分析系统中的主要试剂，进行免疫反应，首先创立了胰岛素的微量分析法，并于 1960 年发表了关于激素的经典的论文。由于采用了放射性同位素及抗体，故称“放射免疫分析”。这是放射性核素应用于分析方法的一个重要里程碑。同年

Ekins 描述了一种分析血清甲状腺素的方法，其原理与 Yalow 等测定胰岛素者相仿，但以一种天然存在的蛋白——甲状腺素结合蛋白作为分析系统之特异试剂。由于此法有普遍性，且特异结合剂之范围甚广，在英国则统称之为饱和分析 (Saturation analysis)，强调结合剂之饱和，但并未指出结合剂为何物。1964 年，Murphy 亦利用人血清中甲状腺素结合球蛋白的特殊亲和力作为甲状腺素结合剂。因该实验不需用特异性抗体，不存在抗原抗体反应，乃提出用竞争性蛋白结合分析 (Competitive protein binding analysis) 一词，指明其结合剂为蛋白。此名称多应用于非抗原性之激素。较早，Murphy 曾使用放射立体化学分析 (Radiostereo-assay) 命名。认为被检物有一定的空间立体结构，其结合位置是特异的。但因 stereo 易误为甾族化合物，故未被多数人采用。Robbin 等则用置换分析 (Displacement analysis) 一词，而 Korenman 则称之为放射配体结合分析 (Radio-ligand binding assay)，此名不含有饱和或特异之意。此外，如特异试剂为一种特异酶、微生物、组织受体 (细胞结合蛋白) 时，亦有分别称之为放射酶分析 (Radioenzymatic assay)，放射微生物学分析 (Radiomicrobiological assay) 及放射受体分析 (Radioreceptor assay) 者。

总之，目前在国际上，这类体外放射测定方法的命名，尚未统一。所谓“放射免疫分析”可有狭义与广义两种理解：前者专指应用特异抗原抗体反应者；后者含义相当于饱和分析，包括用其他试剂代替抗体作为结合剂的各种方法。此外，有人认为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，而且从字面上看似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。不过，现在有些体外放射测定已发展到不是应用竞争性原理的了，例如直接法固相放射免疫分析及免疫放射电泳自显影法（详见后乙型肝炎抗原的检测）。至于所谓免疫放射分析（Immunoradioassay, IRA），或称免疫放射测定分析（Immunoradiometric assay, IRMA）与放射免疫分析不同之处在于 RIA 系标记抗原，而 IRA 为标记抗体（有关此方面之叙述详见免疫放射测定分析及其有关技术一章）。

三、基本原理

放射免疫分析的原理是：在一溶液系统中，如存在有三种组分的混合物，即天然或非标记抗原、带有放射性元素的相同抗原及一定量的特异性抗体，因此抗体量并不足以与所有标记抗原和非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（图1-1）。

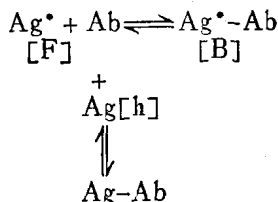


图 1-1 构成放射免疫分析基础的竞争性反应

Ag^{*}：标记抗原 Ag：非标记抗原（于已知标准溶液或未知样品中）

Ab：特异抗体 [F]：游离标记抗原浓度 [B]：与抗体结合的标记抗原浓度 [h]：非标记抗原浓度（h—字来自 hormone 抗原） [B]/[F] 与 [h] 成反比；当 [h] = 0 时，[B] / [F] 为最大

假若标记与非标记抗原的分子数目相同，则两者有同等机会与抗体结合，即抗体之一半与非标记抗原结合，另一半与标记抗原结合；如非标记抗原分子数目大于标记者时，则非标记抗原分子便与大部分抗体结合。由此可知，在混合液中，

非标记抗原分子越多，标记抗原与抗体的结合便越少。换言之，标记抗原与抗体复合物的形成量与非标记抗原的含量呈一定的函数关系。如先以各种不同浓度的非标记标准抗原与一定量的标记抗原及一定量的特异抗体作用，然后测定各种不同浓度标准抗原中的标记抗原-抗体复合物的结合率。以标准抗原的浓度为横座标，以不同的结合率为纵座标，绘出竞争性抑制标准曲线。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。图 1-2 示抗体（结合剂）在不

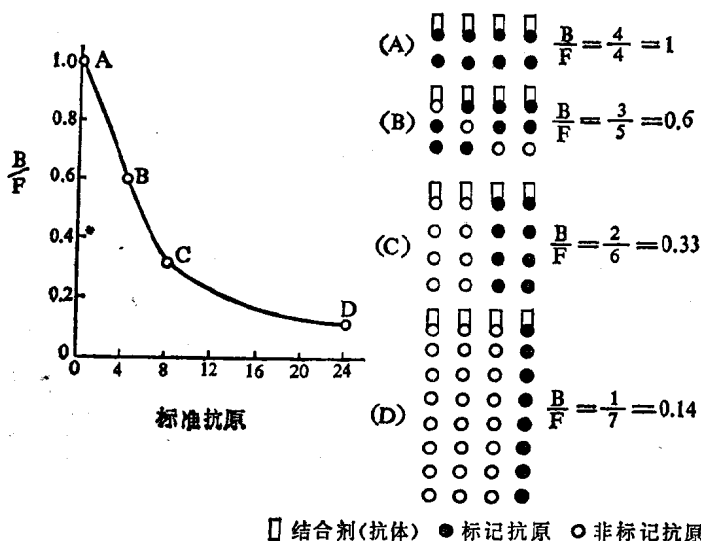


图 1-2 在不同浓度抗原存在时标记抗原与特异抗体结合之相互关系

同浓度的抗原存在时与标记抗原（放射性物质）的相互关系。（A）指无非标记抗原时，游离标记抗原之量等于与抗

体结合的标记抗原之量，即： $B/F = 4/4 = 1.0$ ；(B) 指若加入 4 单位之非标记抗原时（4 单位是为了说明方便起见而随意定者）即〔抗原〕 ≈ 4 ， $B/F = 0.6$ ；(C) 指〔抗原〕 $= 8$ 时，则 $B/F = 0.33$ ；(D) 指〔抗原〕 $= 24$ 时， $B/F = 0.14$ 。

在进行放射免疫分析时必须首先具备：①免疫反应性 (Immunoreactivity) 好，比放射性 (Specific activity) 高的纯化的标记抗原；②效价高，亲和力强的特异抗体；③游离抗原与抗原-抗体复合物的适当的分离方法。这是三个关键性的问题，都涉及免疫学与放射化学的原理与技术，将在下面数章分别作介绍。

四、应用与展望

放射免疫分析由于具有上述特点与优点，目前，已广泛应用于各学科中。可以认为，无论在生物学或医学方面，凡是具有免疫原性、能刺激机体产生抗体的物质，几乎都可以用这种方法测定。因此世界各国都十分重视这项技术的应用与发展。许多国家已生产成套放射免疫药箱，使用十分方便。对于过去用一般常规方法漏检的样品，用放射分析法已有可能准确地测出其中所含之微量物质，为一些疾病的早期诊断提供可靠的实验依据；并为疗效和预后的判断提供灵敏的指标。表 1-1 列出一些可用放射分析测定的物质，但此技术应用范围与日俱增，其测定的物质也随之增加。

为了表彰这项具有世界普遍意义的重要技术的创造者的功绩，1977 年的诺贝尔奖金授给了创造者之一，Yalow, R. S. (Berson, S. A 已于数年前逝世)。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。”

表 1-1 可用放射免疫分析的一些物质

(1) 多肽及蛋白质激素:

胰岛素	前胰岛素
生长激素 (GH)	黄体生长激素 (LH)
促肾上腺皮质激素 (ACTH)	促甲状腺激素 (TSH)
促卵泡成熟激素 (FSH)	人绒毛膜促性腺激素 (HCG)
甲状旁腺素 (PTH)	人胎盘催乳素 (HPL)
α 促黑色素细胞激素 (α MSH)	B 促黑色素细胞激素 (BMSH)
抗利尿素 (AVP)	制尿激素 (ADH)
黄体生成激素释放因子 (LRF)	抗酯素 (LPH)
α_1 酸性糖蛋白 (α_1 GP)	促性腺激素
促乳素	高血糖素
后叶加压素	血管紧张素 I
血管紧张素 II	缓激肽
胃素	分泌素
肾素	黄体生成激素释放激素 (LH-RH)
促胰酶素-促胆囊运动素 (PZ—CCK)	松弛激素
促甲状腺激素释放激素 (TRH)	羧基肽
胃抑制多肽	7S 神经生长因子
胃肠激素	高血压蛋白原酶
缩胆囊素	红细胞生成激素
促性腺激素释放激素 (GN-RH)	

(2) 非肽激素:

甲状腺素	三碘甲状腺原氨酸
孕酮	17-羟孕酮
甲孕酮	睾丸酮
2-羟睾丸酮	二氢睾丸酮
雌二醇	雌三醇
雌酮	2-羟雌酮

皮质醇	皮质酮
去氧皮质酮	18-羟皮质酮
18-羟11-脱氧皮质酮	可的松
11-脱氢可的松	雄固烷二酮
地塞米松	去氧表雄酮
前列腺素(PGE、PGE ₁ α、PGE ₂ α)	

(3) 维生素:

维生素 A	维生素 B ₆
维生素 B ₁₂	叶酸
维生素 D	1α-25-双羟维生素 D ₃
25-羟-沉钙固醇	

(4) 酶:

胰蛋白酶	糜蛋白酶
C ₁ -脂酶	羧肽酶 A
胶原酶	凝乳酶
凝乳酶原	胰凝乳蛋白酶
胰凝乳蛋白酶原	羧基酶
多巴脱羧酶	多巴胺-β-羟化酶
碳酸酐酶 I	碳酸酐酶 II
果糖-1, 6-二磷酸酶	辅酶
硷性磷酸酶	胶原脯氨酸羟化酶
胞浆素	胞浆素原

(5) 药物

阿斯匹林	吗啡
安非他明	地高辛
毛地黄毒素	毛地黄糖苷
巴比妥钠	戊巴比妥钠
人造麻黄素	乌亦盆
乌木箭毒素	南美防己碱

烟碱衍生物

麦角酸衍生物

大麻素

(6) 核酸衍生物

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)

信使核糖核酸 (mRNA)

(7) 血液:

白蛋白

血浆素

血浆素原

纤维蛋白

纤维蛋白原

铁蛋白

甲状腺素结合球蛋白

免疫球蛋白 IgA、IgD、IgE、

IgG、IgM

凝血酶原

维生素结合蛋白

内因子

红细胞生成素

淋巴细胞抗原

抗血友病因子

本周氏蛋白

备解素

反应素

Rh 因子

白血球趋化因子

(8) 肿瘤相关抗原:

癌胚抗原 (CEA)

甲种胎儿蛋白 (AFP)

“异位”激素

碱性磷酸酶同功酶

(9) 细菌抗原或抗体及抗菌素:

链球菌

葡萄球菌肠毒素

梭状杆菌毒素

结核杆菌

布氏杆菌

百日核杆菌

大肠杆菌

青霉素

链霉素

卡那霉素

庆大霉素

(10) 病毒抗原或抗体及其他致病因子:

续表

甲型肝炎抗原 (HA Ag)	乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 及其亚型
乙型肝炎核心抗原 (HBcAg)	乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg)
流感病毒	脊髓灰质炎病毒
腺病毒	疱疹病毒
牛痘病毒	狂犬病病毒
虫媒病毒	鸟 RNA 肿瘤病毒
肉瘤-白血病毒	Q 热
鹦鹉热-淋巴肉芽肿-沙眼病毒	肺炎支原体
(11) 寄生虫与原生虫:	
血吸虫抗原及抗体; 棘球虫抗体; 草履虫表面抗原	
(12) 其他:	
儿茶酚胺	5-羟色胺
吡哆醇	变态反应原
唾液素	网膜结合蛋白
胶原	过敏原
肌动素	核糖微粒
糖蛋白	乙酰胆碱
N-乙酰-5-甲氧色胺	

我国自 70 年代开展放射免疫分析工作以来进展很快, 国家已鉴定了一些分析药箱, 并已生产、供应有关单位使用, 而且, 在某些方面有所创造与发展。例如诊断肝癌的甲种胎儿蛋白的放射火箭电泳及诊断乙型肝炎抗原的免疫放射电泳自显影术, 改进了国外经典作法, 免除了使用价值昂贵的同位素测定仪器, 为此技术的推广使用, 创立了有利的条件。

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, 因此得到的数据常仅代表免疫学活性, 而不是生物学活性。因此, 可能将一些无生物学活性而