

Labeled Immunoassays and Clinical Medicine

● 主编 尹伯元

标记免疫分析与临床



原子能出版社

标记免疫分析与临床

Labeled Immunoassays and Clinical Medicine

(1)

主编 尹伯元

原子能出版社

Atomic Energy Press

京新登字 007 号

内 容 简 介

本书为《标记免疫分析与临床》系列书的第一辑,主要内容有:时间分辨荧光免疫分析人血清总甲状腺素及总三碘甲腺原氨酸、放射免疫和免疫放射分析中硅烷化磁性抗体悬液的研制、肺癌标志物——血清神经元特异性烯醇化酶的放射免疫分析法、肿瘤标志物 CA-50 和 CA-242 免疫放射分析在肿瘤诊断中的应用、精胺单克隆抗体固相放射免疫分析方法的建立及其临床应用的初步研究、人绒毛膜促性腺激素(HCG)放射受体分析法的建立及初步临床应用、非同位素标记 pAW101 探针作人流胚胎组织的亲权鉴定等。其中有些文章介绍了较新的方法和技术,资料翔实,其结果在国内属首次报道或详情报道。

本书对于广大标记免疫分析工作者和临床医师了解国内外标记免疫分析的进展,掌握该新技术的方法及其临床应用,有较大实用价值。

Brief Introduction

《Labeled Immunoassays and Clinical Medicine》is a series of books. In this volume a number of articles such as "Time-resolved Fluoroimmunoassay of Total Thyroxine and Total Triiodothyronine in Human Serum", "Preparation of Silanized Magnetic Particles Antibody Suspension for RIA and IRMA", "Radioimmunoassay of Serum NSE, a Marker for Carcinoma of the Lung", "Application of Immunoradiometric Assays of CA-50 and CA-242 in Tumor Diagnosis", "Establishment and Preliminary Application of Spermine Radioimmunoassay with ^{125}I -labeled Monoclonal Antibody and Solid Phase Antigen", "Development of a Radioreceptor Assay for Human Chorionic Gonadotropin and Its Preliminary Application" and "Paternity Determination of Aborted Fetus by Non-radiolabeled pAW101 Probe" are included. Techniques and methods presented in these articles are up-to-date, and data are full and accurate. The results are reported for the first time in China or presented in detail. This volume may be of great value in practice for physicians and those engaged in labeled immunoassay study to keep abreast of recent advances in the field of labeled immunoassay at home and abroad, and to master newer techniques or methods and their clinical application.

主编 尹伯元

· 原子能出版社出版

(北京 2108 信箱)

国防科工委印刷厂印刷

新华书店总店科技发行所发行·新华书店经售

☆

开本 787×1092 1/16·印张 7.75·字数 193 千字

1992 年 6 月北京第一版·1992 年 6 月北京第一次印刷

印数 1—4000

ISBN7-5022-0729-5

R·23 定价:5.00 元

《标记免疫分析与临床》

编委会名单

主 编：尹伯元

副主编：（按姓氏笔划排列）

王仁芝	王浩丹	朱承谟	刘景生	麦荫桥
李振甲	李鹤强	吴 企	吴继琮	邵惠训
邵鹤生	范振符	周甲贤	赵惠扬	莫启忠
徐浩樑	黄 焘	曾熙兰	解汝泰	

编 委：（按姓氏笔划排列）

马祥瑞	王金良	任占征	刘用华	刘鸿义
刘殿文	许元初	许曼音	孙述强	孙恒德
李中华	李美颖	杨永青	杨春森	肖凤云
何静娟	陈智周	邵力正	周志才	郑妙蓉
赵夏令	袁济民	顾维正	徐汇义	徐钟源
郭肖南	黄耀章	梁成章	彭立义	瞿光耀

序

中国同位素公司主持编纂的《标记免疫分析与临床》系列书的问世，实为我国临床医学界的一大幸事。

标记免疫分析技术是 60 年代兴起的一门新技术，它包括放射免疫分析、放射受体分析、酶联免疫分析、发光免疫分析、荧光免疫分析和 DNA 探针等。如今已广泛应用于临床医学的各个领域的这些先进技术，是疾病的诊断、临床医学检测、疗效观察以及基础医学研究中不可缺少的手段之一。

近十几年来，我国标记免疫分析工作发展迅速，理论水平逐渐提高，技术方法日臻完善，实践经验不断丰富。据不完全统计，国内市场上已有近 70 种放射免疫分析试剂盒，销售量以每年百分之二十五的速度增长，质量稳步提高，每年约有几千万人次接受放射免疫分析的检查。由于单克隆抗体的应用，一批高灵敏度的放射免疫分析试剂盒相继研究成功，不断投入临床使用。时间分辨荧光仪和试剂盒正在国产化，酶联免疫分析应用范围不断扩大。

从 1986 年开始，中国同位素公司选择了放射免疫分析这个高科技项目与各地医院合办医学放免检测中心，取得了较好的社会效益与经济效益，获得了各界的好评。该公司已决定把这项技术推广到全国，在“八五”期间，由已经建立的 20 个医学放免检测中心将发展到 50 个。该公司还将与美国合资共建“特殊参考实验中心”(SRL)，作为示范中心，然后带动其它中心，尽快接近或达到美国现有的水平。

所有这些都将使标记免疫分析成为我国发展前景广阔的一门分析技术。因此，广大标记免疫分析工作者和临床医师迫切希望有专业性书刊来总结、交流经验，提高理论水平，《标记免疫分析与临床》系列书就是顺应这种要求而创立的。

《标记免疫分析与临床》是综合性的系列书，内容比较广，它登载我国医学领域内标记免疫分析技术和理论方面的论文、工作报告和综合评论，汇集临床应用经验，报道国内同行们的新成就、新动态，同时也将不断地介绍国际上标记免疫分析方面的新理论、新进展、新技术方法和临床应用经验，以达到国内外相互交流、共同提高的目的。《标记免疫分析与临床》将成为全国标记免疫分析工作者、临床医生和基础医学研究人员发表科研成果、探讨学术问题、交流信息和总结临床经验的百家争鸣的园地。

本系列书在筹备过程中，得到了有关领导和广大标记免疫分析工作者的大力支持和帮助。我深信，在今后的发展过程中将会继续得到大家的支持和帮助，愿我们共同努力，力争在最短时间内使《标记免疫分析与临床》成为具有一定水平、质量和特色的系列书，以饕读者。

中国科学院学部委员王世真教授在本系列书的编写过程中给予了热忱的关心与具体的指导，特此表示衷心的感谢。

周甲贤

1992 年 5 月

目 录

· 论 文 ·

时间分辨荧光免疫分析人血清总甲状腺素 (T_4) 及 总三碘甲腺原氨酸 (T_3)	魏文清 王仁芝 蒋中华 (1)
放射免疫和免疫放射分析中硅烷化磁性抗体悬液的 研制	沈德存 孙家秀 廖 莎等 (7)
肺癌标志物——血清神经元特异性烯醇化酶的放射免 疫分析法	沈志红 孙志贤 王仁芝等 (13)
肿瘤标志物 CA-50 和 CA-242 免疫 放射分析在肿瘤诊断中的应用	陈智周 范振符 朱争艳等 (18)
精胺单克隆抗体固相放射免疫分析方法的建立及其临床应用 的初步研究	倪 莉 范振符 陈智周等 (23)
人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 放射受体分析法的建立 及初步临床应用	张 敏 雷幼导 李 秉 (26)
非同位素标记 pAW101 探针作人流胚胎组织的 亲权鉴定	杨英浩 刘 超 罗超权等 (32)
内皮素的放射免疫分析	曾 强 李振甲 余霞君等 (36)
原发性高血压患者血浆脑钠素水平变化的临床意义	石湘芸 赵云涛 杨 晔等 (40)
糖尿病患者胰岛 A、B 细胞功能的分析	王家驰 于德民 尹伯元等 (43)
慢性肾衰尿毒症及肾病综合征患者血浆的血栓素 B_2 及 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 含量的观察	翟德佩 尹伯元 孙恒德等 (48)
组织匀浆鸟苷酸环化酶活力测定	汪雪兰 曾熙兰 (51)
非胰岛素依赖性糖尿病患者血清 LPO, SOD 与 $TXB_2/6$ -酮-PGF $_{1\alpha}$ 比值的相关性	张华媛 (55)
血清维生素 B_{12} 及叶酸放射免疫测定的临床 应用	金稚奎 潘秀英 田兆嵩等 (58)

· 工作报告 ·

胃液中胃动素测定的临床研究	黄裕新 许才斌 冯英明等 (62)
癌胚抗原 (CEA) 对结-直肠癌诊断和随访的意义 及国内外 CEA 试剂盒性能的比较	金稚奎 张 强 翟仁光等 (64)
急性脑卒中血 T_3 (T_4) 测定结果分析	刘新亮 周绍才 李 珊等 (68)
血清 FT_3 和 FT_4 放射免疫测定的临床意义	王泽津 (70)

非甲状腺疾病患者的甲状腺功能	许丽丽	李宝山	宋兰萍	(72)
男性前列腺病变性激素测定的临床意义	方振羊	杨永青	(74)	
原发性肝癌肝动脉超选择性插管栓塞血清甲胎蛋白的动态观察 (附 20 例分析)	杨春森	郭爱琴	常锦滨	(76)
RIA 法测定 AFP 对内胚窦瘤及恶性畸胎瘤预后的估计	夏淑君	刘中良	王东方	(78)
胃十二指肠疾患的胃液表皮生长因子水平	蔡立勉	吴芳	潘秀珍	(79)
肿瘤相关抗原 CA-50 IRMA 临床应用分析	邵鹤生	尤海清	张载璋	(81)
慢性肺心病患者血清超氧化物歧化酶测定的临床意义 ...	陆惠仙	江渔	魏福强等	(83)
钙拮抗剂对高血压病患者肾素-血管紧张素系统的影响	李智培	李中华	王乐信等	(85)
高血压病及冠心病血中血栓素 B ₂ 和 6-酮-前列腺素 F _{1α} 浓度改变的研究	高宝华	(88)		
血清 CA19-9 水平和 CA19-9/CEA 比值在胰腺癌诊断中的应用	王自正	陆雪龙	时宏珍等	(90)
1 例医源性骨质疏松症的研讨	国遇忠	贾政敏	王家驰等	(92)

· 论文摘要 ·

278 例血清载脂蛋白 (APOB) 的结果分析	丁垂德	王景田	王梦俊等	(94)
血清 TMA、TGA 测定对几种常见甲状腺疾病诊断意义的观察	周海中	孙龙安	(95)	
CA-50 IRMA 对结核性胸水与恶性胸水的鉴别诊断	陶光州	郑绍同	(96)	
乳铁蛋白测定对肺癌与肺结核鉴别诊断的临床意义	叶一秀	孙利群	侯春元等	(96)
急性脑血管病血浆肾素-血管紧张素 II 放免测定结果分析	王洪	黄本友	赵文洲	(97)
兰州地区 352 例老年人血清 T ₃ 、T ₄ 含量测定	高丽菊	李琳	韩成仁等	(98)
垂体性侏儒症患者血清生长激素水平的观察	吴澄	何浩明	苏彩女等	(99)
血清 TSH-RIA 测定的临床应用	罗春苏	鲍晓力	(99)	
放射免疫分析甲状腺激素在临床疾病鉴别诊断中的价值	周正伏	魏维周	(100)	
健康成年人、老年人血清 β ₂ -M 水平调查分析	纪成斌	李心强	李风度	(101)

· 综 述 ·

标记免疫分析技术的研究现状	李振甲	(102)
---------------------	-----	-------

论文英文文摘	(107)
论文英文目录	(116)

时间分辨荧光免疫分析人血清 总甲状腺素 (T_4) 及总三碘甲腺原氨酸 (T_3)

魏文清 王仁芝 蒋中华

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 本文用一种新型非放射免疫分析——时间分辨荧光分析测定了血清总 T_4 (T_3) 含量。方法简便快速, 灵敏度高, 非放射性标记物保存期长。与相应的放射免疫分析比较, 相关性良好。

主题词 时间分辨荧光免疫分析 非放射免疫分析 甲状腺素 三碘甲腺原氨酸

T_4 、 T_3 是甲状腺分泌的两种主要的有生理活性的激素, 是人体重要的内分泌调节激素。甲状腺功能失调 (亢进或低下) 是人体正常生理功能紊乱的原因之一。血清总 T_4 、 T_3 值是检查甲状腺功能状态的指标。目前临床常用的检测手段为放射免疫分析 (RIA), 方法测定值准确, 灵敏度高。但存在使用放射性物质, ^{125}I 标记物半衰期短, 需经常标记等不利因素。相应的, 非放射免疫分析日益受到人们重视。在原有荧光免疫分析 (FIA) 基础上, 利用某些镧系元素 (如铕, Eu^{3+}) 独特的荧光性质以及荧光的时间分辨技术, 建立了一种新型非放射免疫分析——时间分辨荧光免疫分析 (Time-resolved Fluoroimmunoassay, TrFIA)^[1,2]。

本文用 TrFIA 分析血清总 T_4 、 T_3 含量。采用铕标记的甲状腺球蛋白中 T_4 (T_3) 残基和血清中总 T_4 (T_3) 与固相抗体竞争性结合的方法 (见图 1)。

材料和方法

一、材料

1. 仪器与设备

- (1) ARCUS-1230 时间分辨荧光仪 (LKB Pharmacia) 及配套设备: 包括 Wallac 1296-001 型振荡器 (分快、慢速两挡) 和 12 孔快速手动洗涤器。
- (2) 紫外分光光度计 (Varian 100 型)。
- (3) 12 孔聚苯乙烯微量免疫测量杯 (芬兰 Helsinki)。
- (4) Sephadex G-50 (1.1cm×45cm) 层析柱。

2. 试剂

- (1) 分析缓冲液: 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH7.75, 含 0.3mol/L 三氯醋酸钠 (TCA-

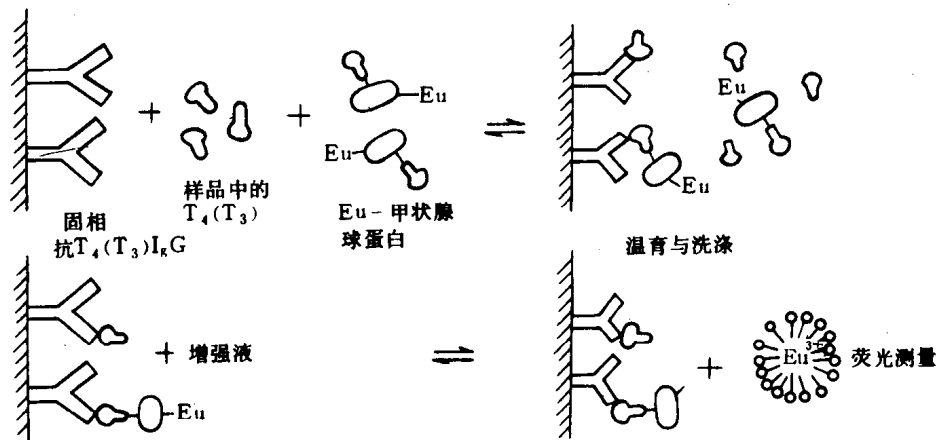


图1 TrFIA T₄ (T₃) 原理示意图 (固相抗体法)

Na), 0.1%BSA, 0.02%NaN₃, 用于稀释抗原标记物。其中三氯醋酸钠作为甲状腺素结合球蛋白 (TBG) 的阻断剂。根据 RIA 中所用 TCA-Na 浓度及 LKB DELFIA T₄-kit 中 TCA-Na 浓度, 经实验选用 0.3mol/L TCA-Na。

(2) 抗体: T₄-甲酯-BSA (T₃-甲酯-BSA) 常规免疫家兔, 得兔抗人 T₄ (T₃) 血清, 经辛酸沉淀-DEAE 纤维素离子交换树脂法提取得纯化 IgG。

(3) 标准物: T₄ 标准物用无激素血清稀释成浓度分别为 2、4、8、16、32μg/dl 剂量点; T₃ 标准物用无激素血清稀释成 50、100、200、400、800ng/dl 剂量点。

(4) 三氯化铕 (EuCl₃), Fluka 产。用 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH6.0) 配成浓度为 1.2mmol/L 的 EuCl₃ 溶液。

(5) 环二乙烯三胺五醋酸酐 (cDTPA-anhydride), 自制。

(6) 洗涤液: 含 0.9%NaCl, 0.1%Tween 20 的高纯度去离子水。

(7) 甲状腺球蛋白 (Tg), SIGMA 产。

(8) 荧光增强液: β-萘酰三氟丙酮 (自制) 3.990mg, 三辛基氧化膦 (Fluka) 19.675mg, Triton X-100 (Farco) 1ml, 邻苯二甲酸氢钾 (北京化工厂 GR 级) 1.39g, 冰醋酸 (北京化工厂, GR 级) 5.9ml, 溶于 1000ml 去离子水中。4℃避光存放。

二、方法

(1) 铕标记 Tg。称 1mgTg 和 1mlcDTPA 溶于 0.5ml0.1mol/L 碳酸盐缓冲液中, 室温搅拌 10 分钟, 用 1mol/LNa₂CO₃ 酸碱度调至 pH9.0。滴加 0.5ml 饱和硫酸铵, 按每分钟 2100 转速离心 15 分钟。沉淀溶于 0.5ml 1.2mmol/LEuCl₃ 溶液中, 室温反应 40 分钟。样品用 Sephadex G-50 柱层析分离。洗脱液为 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH7.75 (含 0.9%NaCl), 流速为 10ml/h。每管收集洗脱液约 0.5ml。从各管洗脱液中分别取 10μl, 测荧光强度。计数呈两个峰。将两峰的洗脱液分别混合, 测 OD_{280nm}, 第一峰为 Eu-Tg, 第二峰为游离铕峰。

Eu-Tg 混合液加入终浓度为 50%的甘油和 1mg/mlBSA (SIGMA, 95%纯), -20℃至少可保存 3 个月。使用时, 用分析液稀释到使用浓度。

(2) T₄ (T₃) 抗体固相包被聚苯乙烯滴定杯。用 0.1mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液将 T₄ (T₃) 抗体稀释到 10μg/ml。取 100μl 加入杯孔中, 置振荡器慢速振荡 10 分钟, 室温放置 20 小

时。用洗涤液洗 1 次。4℃湿润密封存放。

(3) 时间分辨荧光免疫分析 T_4 (T_3): 步骤见图 2。

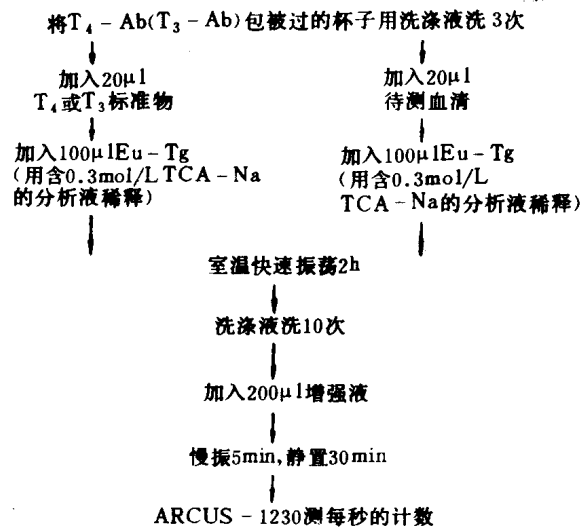


图 2 T_4 (T_3) -TrFIA 的方法和步骤示意图

结 果

(1) 标准曲线。 T_4 标准曲线可测范围 25.74~408.96nmol/L (2~32μg/dl)。标准抑制曲线 ($\bar{X} \pm SD$, $n=5$) (图 3)。

T_3 标准曲线可测范围 0.758~12.288nmol/L (50~800ng/dl)。 T_3 标准抑制曲线 ($\bar{X} \pm SD$, $n=5$) (图 4)。

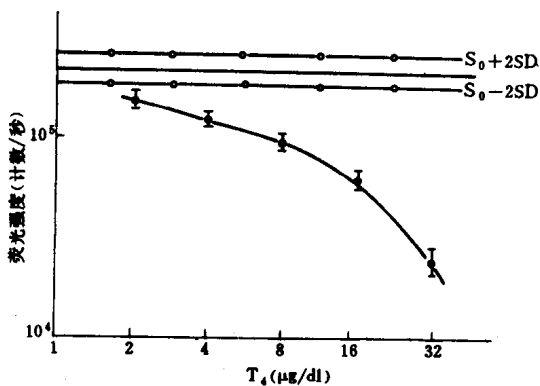


图 3 T_4 -FIA 标准曲线

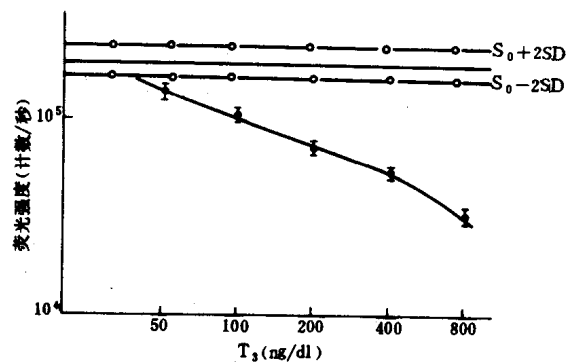


图 4 T_3 -FIA 标准曲线

(2) 方法灵敏度。以 10 次零标准测量值的均值减去两倍的标准差 ($S_0 - 2SD$) 分别从 T_4 及 T_3 标准曲线得出方法的灵敏度。 T_4 -TrFIA 为 6.435nmol/L (0.5μg/dl); T_3 -FIA 为 0.384nmol/L (25ng/dl)。

(3) 方法的准确性、精密度和健全性。用回收实验验证方法的准确性。向一已知 T_4 (T_3)

浓度的血清中分别加入低、中、高三种浓度的 T_4 (T_3) 标准物, 测定回收率分别为 $102.6\% \pm 3.4\%$ 及 $101.4\% \pm 2.5\%$ ($\bar{X} \pm SD$) (表 1, 表 2)。

表 1 T_4 -TrFIA 回收实验 ($\mu\text{g/dl}$, $n=5$)

原血清	加入值	期望值	实测值	回收率, %
1.9	2	3.9	4.0	102.6
1.9	10	11.9	11.8	99.2
1.9	20	21.9	23.2	105.9
				$\bar{X} \pm SD 102.6 \pm 3.4$

表 2 T_3 -TrFIA 回收实验 (ng/dl , $n=4$)

原血清	加入值	期望值	实测值	回收率, %
50	50	100	102	102.0
50	100	150	148	98.7
50	200	250	259	103.6
				$\bar{X} \pm SD 101.4 \pm 2.5$

T_4 的批内、批间变异系数分别为 $6.4 \pm 1.0\%$ 、 $9.1 \pm 4.0\%$ ($\bar{X} \pm SD$); T_3 批内、批间变异系数分别为 $6.9 \pm 1.2\%$ 、 $7.4 \pm 2.6\%$ ($\bar{X} \pm SD$) (见表 3, 表 4)。

表 3 T_4 -TrFIA ($\mu\text{g/dl}$, $n=10$) 的批内、批间变异系数

平均值	标准差	批内 CV, %	平均值	标准差	批间 CV, %
2.9	0.2	6.9	2.3	0.3	13.0
11.4	0.8	7.0	11.9	1.1	9.2
20.8	1.1	5.3	25.3	1.3	5.1
$\bar{X} \pm SD 6.4 \pm 1.0$			$\bar{X} \pm SD 9.1 \pm 4.0$		

表 4 T_3 -TrFIA ng/dl 的批内 ($n=10$)、批间 ($n=8$) 变异系数

平均值	标准差	批内 CV, %	平均值	标准差	批间 CV, %
56	4	7.1	50	3	6.0
108	6	5.6	104	6	5.8
236	19	8.0	239	25	10.5
$\bar{X} \pm SD 6.9 \pm 1.2$			$\bar{X} \pm SD 7.4 \pm 2.6$		

健全性用样品稀释倍数与测定值的线性关系检验。将两个样品分别用无激素血清稀释成原浓度的 $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ 及 $\frac{1}{32}$, 再分别测出相应的 T_4 (T_3) 值。测定值与稀释度间有良好的直线关系 (图 5、图 6), 说明健全性好。

(4) 正常值和异常值测定。用 TrFIA 测定精确选择的甲状腺功能正常及异常的血清。结果如下:

T_4 -TrFIA: 测定 80 例正常血清 T_4 值, 平均值为 $135.1 \pm 25.7 \text{ nmol/L}$ ($10.5 \pm 2.0 \mu\text{g/dl}$) ($\bar{X} \pm SD$), 实测范围为 $59.2 \sim 171.2 \text{ nmol/L}$ ($4.6 \sim 13.3 \mu\text{g/dl}$)。测定甲亢 21 例, 平均值为 307.

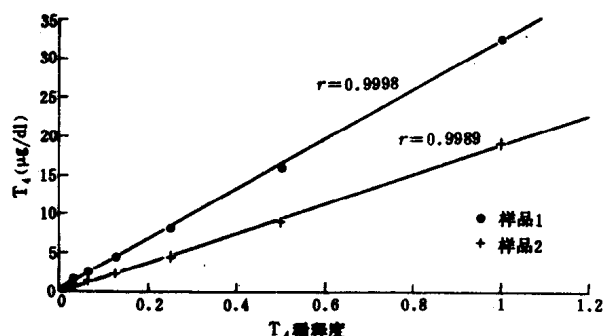


图5 T_4 -FIA 稀释度曲线

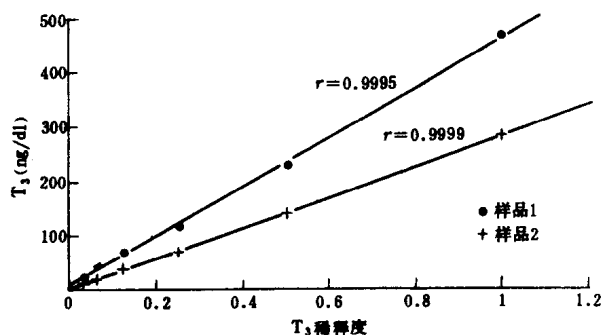


图6 T_3 -FIA 稀释度曲线

$6 \pm 84.9 \text{ nmol/L}$ ($23.9 \pm 6.6 \mu\text{g/dl}$), 实测范围为 $176.3 \sim 477.5 \text{ nmol/L}$ ($13.7 \sim 37.1 \mu\text{g/dl}$)。测定甲低 12 例, 平均值为 $41.2 \pm 7.7 \text{ nmol/L}$ ($3.2 \pm 0.6 \mu\text{g/dl}$), 实测范围为 $21.9 \sim 56.6 \text{ nmol/L}$ ($1.7 \sim 4.4 \mu\text{g/dl}$)。

T_3 -TrFIA: 测定 80 例正常血清 T_3 值, 平均值为 $2.5 \pm 0.6 \text{ nmol/L}$ ($162 \pm 36 \text{ ng/dl}$) ($\bar{X} \pm \text{SD}$), 实测范围为 $1.4 \sim 3.6 \text{ nmol/L}$ ($93 \sim 233 \text{ ng/dl}$)。测定甲亢 27 例, 平均值为 $8.3 \pm 3.4 \text{ nmol/L}$ ($539 \pm 221 \text{ ng/dl}$), 实测范围为 $3.5 \sim 15.9 \text{ nmol/L}$ ($255 \sim 1040 \text{ ng/dl}$)。甲低 12 例, 平均值为 $0.6 \pm 0.1 \text{ nmol/L}$ ($42 \pm 4 \text{ ng/dl}$), 实测范围为 $0.5 \sim 0.8 \text{ nmol/L}$ ($35 \sim 50 \text{ ng/dl}$)。

(5) TrFIA 与 RIA 测定 T_4 (T_3) 值相关性比较。50 例样品分别用 TrFIA 和 RIA 分析 T_4 (T_3) 值, 测定结果进行相关性比较, 相关性均良好 ($P < 0.01$) (见图 7, 图 8)。

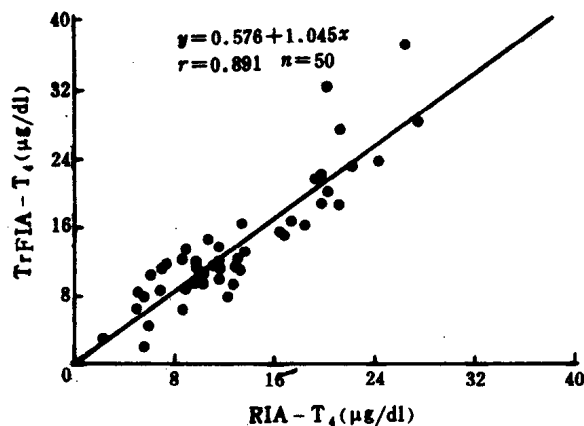


图7 TrFIA 与 RIA 测定 T_4 值相关性比较

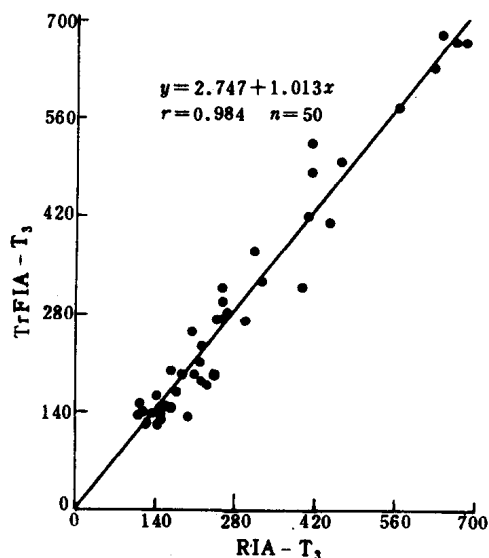


图8 TrFIA 与 RIA 测定 T_3 值相关性比较

讨 论

(1) 本文以 Eu-Tg 作为标记抗原, 可以竞争法分别测定血清中总 T_4 、 T_3 值, 一物两用, 具有一定的通用性。Eu-Tg 在一定条件下, 至少可稳定保存 3 个月。

(2)本文以三氯醋酸钠为阻断剂去除 TBG 对分析的影响。经实验,选用 0.3mol/L、pH7.75 的 TCA-Na,可以阻断 TBG 与 T_4 (T_3) 的结合。

(3) TrFIA 测定血清 T_4 、 T_3 ,与 RIA 进行相关性比较,相关性良好。TrFIA 灵敏度达到 RIA 水平。各项测量指标符合质量控制要求。正常值与 RIA 是吻合的(表 5,表 6)。

表 5 几种 T_4 分析方法的正常值

方法	例数	血清 T_4 正常值, $\mu\text{g/dl}$	
		$\bar{X} \pm \text{SD}$	实测范围
(1) ⁽³⁾	129	8.2 ± 1.6	4.2~14.2
(2) ⁽⁴⁾	75	9.2 ± 1.8	5.0~12.4
RIA (3)	169		5.3~12.4 ^①
(4)	51	7.8 ± 1.6	5.0~13.3 ^②
TrFIA LKB	108	9.2	5.5~12.5 ^③
本文	80	10.5 ± 2.0	4.6~13.3

①, ②, ③分别引自美国 Amesham 放射化学中心 T_4 RIA 试剂盒, 法国 Tetrak T_4 RIA 试剂盒及 LKB Pharmacia T_4 时间分辨荧光免疫分析盒所列出的数值。

表 6 几种 T_3 分析方法的正常值

方法	例数	血清 T_3 正常值, ng/dl	
		$\bar{X} \pm \text{SD}$	实测范围
(1) ⁽⁵⁾	129	141.7 ± 25.6	71~230
RIA (2) ⁽⁶⁾	191	140 ± 28	
(3)		150 ± 36	75~230 ^①
TrFIA 本文	80	162 ± 36	93~233

①引自法国 Tetrak T_4 RIA 试剂盒所列出的数值。

(4) TrFIA 是一种新型非放射免疫分析,方法灵敏度高,特异性强,稳定性好,快速简便,测量范围宽。TrFIA 目前在我国仍处于实验阶段,随着国产测量仪器的即将出现及标记率更高的双功能络合剂的使用,此方法具有很高的实验研究和临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] Hemmila I, et al. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assay. Anal Biochem 1984; 137: 335.
- [2] Soini E, et al. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates——A new generation of non-isotopic immunoassays. Clin Chem 1983; 29: 65.
- [3] 王仁芝,等. 血清甲状腺素放射免疫分析. 中华核医学杂志 1981; 1: 26.
- [4] 连秉钧,等. 血清甲状腺素放射免疫测定及其临床初步应用. 生物化学与生物物理进展 1979; 5: 60.
- [5] 王仁芝,等. 血清三碘甲腺原氨酸 (T_3) 的放射免疫分析法. 见: 李振甲,王仁芝主编. 激素的放射免疫分析. 北京: 科学技术文献出版社, 1980: 259.
- [6] 天津医学院. 血清三碘甲腺原氨酸的放射免疫测定. 天津医学院学报 1977; 19—29.

放射免疫和免疫放射分析中硅烷化磁性抗体悬液的研制

沈德存 孙家秀 廖 莎 王玉肖 成慧娟 孙志伟

(中国原子能科学研究院, 北京 102413)

摘要 本文介绍了硅烷化磁性抗体悬液的研制及其在放射免疫和免疫放射分析中的初步应用。它采用了以硅烷聚合物包被磁性氧化铁粒子的方案。首先用二价及三价铁盐在碱溶液中沉淀的方法, 制备了超顺磁性氧化铁粒子。再以亚磷酸和痕量水为催化剂, 将氧化铁粒子经有机酸催化硅烷化反应, 与带有氨基末端的硅烷, 如氨基丙基三甲氧基硅烷作用, 形成以磁性氧化铁粒子为核心, 包被有硅烷外层的硅烷化磁性粒子。以戊二醛、碳二亚胺法可实现硅烷化磁性粒子与高亲和性的 T_3 、 T_4 和 TSH 抗体的偶联, 制备出磁性 T_3 、 T_4 和 TSH 抗体悬液。

所研制的硅烷化磁性粒子在水溶液中具有好的悬浮性和磁响应性质, 具有足够大的表面积以偶联抗体, 非特异结合低, 符合磁性放射免疫分析的要求。本文研究了各种实验条件对硅烷化磁性粒子制备及其与抗体偶联的影响, 并将制备的有关磁性抗体悬液, 在 T_3 、 T_4 、 FT_3 、 FT_4 、纸片法 T_4 放射免疫分析及 TSH 免疫放射分析中应用近 3 年, 取得了较好结果。磁性抗体悬液制备工艺简单、造价低廉、不需离心, 有利于推广应用。

主题词 硅烷化磁性抗体悬液 硅烷 硅烷化作用 放射免疫分析 免疫放射分析

抗体固定化技术与磁性粒子分离技术相结合, 并应用于放射免疫分析作为分离方法, 产生了一代新产品——磁性放射免疫分析药盒。

磁性放射免疫分析使用固相磁性抗体, 免疫反应发生在固相表面, 从而能使抗原、抗体的竞争性或非竞争性反应与 B、F 的分离同时进行。最后利用磁场吸引已固定在磁性粒子上的抗原、抗体复合物来完成 B、F 的分离。不需使用离心机、不需移动测定管、不需吸取上清液就能完成全部分析程序。它操作简便, 节省时间, 并能减少错分误差, 提高分析灵敏度, 因此适用于基层单位大量样品的测量。

磁性放射免疫分析的关键技术是磁性抗体悬液的制备, 也就是制备性能良好的磁性粒子, 并在其表面偶联高亲和性的抗血清。较早发展的磁性粒子是一种低密度磁性纤维素, 它已在磁性放射免疫和免疫放射分析中得到较广泛的应用。磁性纤维素采用纤维素包埋不定量磁性粒子的方案, 粒度较大, 故在缓冲溶液中悬浮性能不好, 温育时反应管要求不断搅动, 给操作带来麻烦。此外, 它的磁响应性能也不佳, 非特异结合偏高, 为此, 近年来各国都在研究和发性能更优越的磁性粒子, 本文介绍的硅烷化磁性粒子就是其中的一种。

材料和方法

一、材料

3-氨基丙基三甲氧基硅烷、N-2-氨基乙基-3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (Petrarch Systems INC)、戊二醛 (25%) (Merck 产品)、戊二酸酐 (Fluka 产品)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺 (Merck 产品)、2-N-吗啡啉乙磺酸 (MES)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸 (HEPES)、其他化学试剂均为化学纯、T₃ 单克隆抗体 (南京铁路医院提供)、T₃、T₄ 抗体 (本所自产) TSH 抗体 (BMS 澳大利亚)、TSH 单克隆抗体 (Medix Biochemica 芬兰)。

二、方法

1. 超顺磁性氧化铁粒子的制备

将 0.5mol/L 的 FeCl₂、0.25mol/L 的 FeCl₃ 混合液与等体积的 5mol/L NaOH 溶液在磁性粒子制备装置的反应槽中迅速混合,并搅拌 2~5 分钟,即生成黑色的超顺磁性氧化铁结晶形沉淀,称磁性粒子。借助磁性分离法用蒸馏水反复洗涤沉淀,直至达到中性。磁性粒子再用 0.2mol/L NaCl 溶液洗涤 1~2 次。

2. 磁性粒子的硅烷化

上述磁性粒子上清液用无水甲醇替代三次,控制甲醇磁性粒子泥浆约含 1% 的水,泥浆浓度约为 40mg/ml,将其倒入 Virtis “23” 匀浆机的反应槽中,加入亚磷酸及氨基丙基三甲氧基硅烷或 N-2-氨基乙基-3-氨基丙基三甲氧基硅烷,每 100ml 泥浆加 80mg 亚磷酸,5ml 硅烷,混合物在大于每分钟 20000 转的转速下匀化 15 分钟,然后在每分钟 10000 转的转速下继续匀化 120 分钟。内容物倒入缔合装置内含有甘油的圆底烧瓶中,并在加热台上升温至 160~170℃,再自然冷却至室温。整个过程中内容物需由氮气保护,并在不断搅拌下进行。反应完毕后甘油粒子浆倒入蒸馏水中,用蒸馏水彻底清洗,再用 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (PB, pH 7.4) 清洗,即为硅烷化磁性粒子。

3. 硅烷化磁性粒子与抗体的偶联

(1) 戊二醛法偶联 T₃ 抗体 0.5g 硅烷化磁性粒子,用蒸馏水洗一次,0.1mol/L PB (pH 7.4) 洗两次,粒子悬浮在 15ml PB 中,加入 15ml 5% 戊二醛溶液,混合物在室温下缓慢地匀化 3 小时。未反应的戊二醛用 0.1mol/L PB 洗 5 次。戊二醛活化的粒子悬浮在 15ml PB 中,加入 0.25ml T₃ 抗血清,在室温下匀化 16~24 小时。产物用 0.1mol/L PB 洗一次,无水乙醇洗一次, PBS 洗两次, PBS (含 0.1% BSA) 洗两次, 4℃ 储存待用。

(2) 戊二酸酐法将硅烷化磁性粒子表面氨基转变为羧基 1g 氨基丙基硅烷化磁性粒子悬浮于蒸馏水中,用 0.1mol/L NaHCO₃ 溶液洗 4 次。加入约 0.6g 戊二酸酐,反应片刻,同法洗磁性粒子两次,重复与戊二酸酐的反应,所得羧基末端的磁性粒子用蒸馏水洗 5 次,待用碳二亚胺法偶联抗体。

(3) 碳二亚胺法偶联 T₄ 抗体 0.5g 羧基末端磁性粒子悬浮在蒸馏水中,加入 100mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,用手轻摇 2 分钟。加入 0.5ml T₄ 抗体,调混合物 pH 值为 5.6,混合物在室温下匀化 16~24 小时。偶联后的磁性粒子用 PBS (含 0.1% BSA) 洗 3 次,蒸馏水洗一次,再用 PBS 洗 5 次并储存在 4℃ 待用。

(4) 碳二亚胺法偶联 TSH 抗体 1g 氨基乙基-3-氨基丙基硅烷化磁性粒子用 PBS (含

0.1%BSA 和 0.1%Tween-20) 洗 3 次, 再用 0.05mol/L MES 溶液 (pH5.5) 洗一次。粒子悬浮在约 60mlMES 溶液中, 加入 10ml 用辛酸提纯的 TSH 抗体 (相当 3ml 未纯化 TSH 抗体), 混合物匀化 30 分钟。加入 100mg 碳二亚胺, 在室温下偶联反应进行 4 小时后, 再加入 100mg 碳二亚胺。总偶联反应持续 24 小时。用磁性分离法保留上清, 待下一次偶联时重复使用。偶联好的磁性粒子用 PBS (含 0.1%BSA 和 1%Tween20) 洗 5 次, 再用 PBS (含 0.1%BSA 和 0.1% Tween20) 洗 5 次, 4℃ 储存待用。

结果与讨论

(1) 磁性放射免疫分析对磁性粒子的粒度和均匀度有一定要求。所制备的磁性抗体悬液要具有良好的悬浮性, 在温育过程中沉降不明显, 而当 B、F 分离时, 磁性粒子要对磁场有良好的响应, 实现快速有效的分离。本文所研制磁性粒子符合此要求, 利用分光光变计测定的硅烷化磁性粒子 (IAE-M) 沉降曲线如图 1 所示。当使用介质为蒸馏水时, 在没有磁场作用下, 磁性粒子悬液 30 分钟内浊度下降不到 10%, 而在有磁场作用时, 在 4 分钟左右, 悬液浊度较起始值已下降 95%。同时也测定了英国 Amerlex-M 和澳大利亚磁性纤维素 BMS-M 的沉降曲线作为对照。

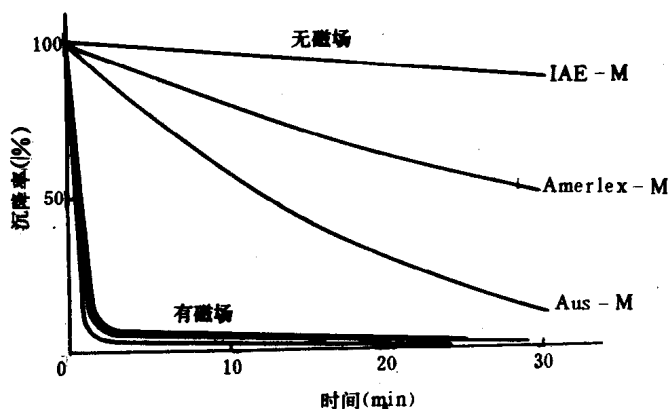


图 1 磁性粒子的沉降曲线

影响磁性粒子粒度和均匀度的因素很多, 反应时间、反应温度、搅拌速度、原料浓度及比例、加料程序和速率等都是比较重要的。采用改变反应时间和搅拌速度等条件, 可以制备出均匀度良好, 粒度不同的磁性粒子。如反应时间在 2~5 分钟变化, 所制备出的磁性粒子的湿密度可在 50~20mg/cm³ 之间变化。相应的沉降时间 (浊度下降 50% 的时间) 也从约 60 分钟提高到 150 分钟。我们主要制备了两种粒度的磁性粒子, 一种粗粒子, 用于偶联 T₃、T₄ 抗体, 在 T₃、T₄、FT₃、FT₄ 放免分析中使用, 通常调节每管粒子用量为 40~100μg; 一种为细粒子, 偶联 TSH 抗体用于 TSH 免疫放射分析, 每管粒子用量 250~300μg。

(2) 使用酸催化有机硅烷化反应制备的两种硅烷化磁性粒子, 用浓盐酸处理后, 在显微镜下可观察到硅烷聚合物的残留, 没包被硅烷的氧化铁粒子在酸处理后则无残留物。硅烷磁粒子偶联抗体后, 经 1mol/L NaCl、甲醇、乙醇反复洗涤, 37℃ 温度考验抗体均无明显脱落, 证明所制备的磁性抗体悬液是稳定的。例如, 在 4℃ 下保存的磁性 T₃、磁性 T₄ 抗体悬液可稳定使用 12 个月和 9 个月, 零管结合率无明显变化。磁性 TSH 抗体悬液也可基本稳定使用 6 个月。在 37℃ 考验时, 磁性 T₃、磁性 T₄ 抗体悬液两周内零管结合率和标准曲线均无明显变化。

(3) 使用戊二醛法和碳二亚胺法偶联抗体, 由于多种原因, 抗体免疫活性会受到损伤。

有报道,认为抗体偶联前后亲和常数可能下降一个数量级。本文所介绍的磁性 T₃、磁性 T₄ 抗体悬液,经测定并用 Scatchard 方法计算,有关抗体偶联前后其亲和常数值如表 1。

表 1 偶联前后抗体的亲和常数

抗体	编号	偶联前亲和常数,L/mol	偶联后亲和常数,L/mol
T ₃	80-11-6	2.0×10^{10}	2.7×10^9
T ₄	87-3-2	4.4×10^8	1.8×10^8

(4) 偶联抗体条件实验

1) 偶联时间的影响:利用戊二醛法在硅烷化磁性粒子上偶联 T₃ 抗体,偶联时间对偶联的影响如表 2 所示。由表可见,在所选用的偶联条件下,偶联率均大于 50%,并在偶联进行 3 小时以后已无明显变化。故偶联时间无需选择太长,一般 6~10 小时即可。

表 2 偶联时间对偶联的影响

序号	抗体用量,ml	粒子用量,mg	偶联时间,h	偶联率,%	过量抗体结合率,%
1	0.1	100	3	51.8	83.8
2	0.1	100	6	51.8	85.4
3	0.1	100	9	53.6	85.4
4	0.1	100	12	53.1	86.4
5	0.1	100	15	51.8	86.7
6	0.1	100	18	53.6	86.2
7	0.1	100	21	53.6	88.1

2) 抗体和磁性粒子用量的影响:利用戊二醛法在硅烷化磁性粒子上偶联 T₃ 抗体,当抗体量相同,而磁性粒子用量不同时所得偶联结果如表 3 所示。由表可见,磁性粒子增加或抗体减少有利于偶联率的提高。

表 3 抗体与磁性粒子用量对偶联的影响

序号	抗体用量,ml	磁粒子用量,mg	偶联时间,h	偶联率,%	过量抗体结合率,%
8	0.1	100	20	39.3	89.2
9	0.1	180	20	58.9	91.7
10	0.1	230	20	66.1	88.0

为了提高在 TSH 免疫放射分析中的最大结合率,必须增加偶联时 TSH 抗体的用量,但为提高抗体利用率,又要求增加磁性粒子用量,减少抗体用量。偶联实验表明,当用 1g 磁性粒子与 10ml 纯化 TSH 抗体相偶联,制备的磁性 TSH 抗体悬液用于 TSH 免疫放射分析时,所得最大结合率约为 20%~30%,偶联率略大于 30%。如抗体用量再增加,最大结合率并无明显变化,偶联率反而明显下降。

3) 抗体纯化的影响:图 2 为两条磁性 T₃ 抗体的稀释曲线,一条 (MT₃2[#]) 偶联时使用未纯化 T₃ 抗体,一条 (MT₃3[#]) 使用了纯化 T₃ 抗体。所得两个磁性 T₃ 抗体悬液在磁性 T₃ 放射