放射免疫分析基本理论

邓尚平　周文碧　编著

四川科学技术出版社

放射免疫分析基本理论

邓尚平　周文碧　编著

四川科学技术出版社

一九八六年·成都

责任编辑：林思聪
封面设计：吕小晶
版面设计：解励诚

放射免疫分析基本理论
邓尚平　周文碧　编著

出版：	四川科学技术出版社
印刷：	四川新华印刷厂
发行：	四川省新华书店
开本：	787×1092毫米 1/32
印张：	5.5
字数：	110千
印数：	1—3,870
版次：	1986年一月第一版
印次：	1986年一月第一次印刷
书号：	14298·71
定价：	1.10元

前　言

近二十年来，放射免疫分析技术不仅应用范围日益广泛，而且其理论和实践经验也日趋丰富。Yalow氏等于五十年代后期至六十年代初期所创建的放射免疫经典理论，亦发生颇大变化。这种变化基于两个因素：其一，在基本理论中，已考虑到若干不确定因素引入的误差，采用了概率论和数理统计学的概念和分析方法；其二，电子计算机技术已大量应用于实际工作。

在放射免疫分析技术的发展过程中，测定结果的可比性则已成为突出的问题，日益引起人们的重视。特别是一项新的测定项目问世初期，同一实验室内部和不同实验室的测定值之间，往往存在相当大的差异。这一情况的出现，使人们更为重视质量控制问题。在近几年举行的有关国际学术会议上，这一问题虽然屡次被提出来，但是迄今尚未获得圆满的解决。

编写本书的目的，是介绍有关放射免疫分析的基本理论，其中包括经典理论和作者所能获得的有关新近资料。鉴于我国目前正在逐步采用电子计算机这一现实情况，本书将侧重于论述有关放射免疫分析的基本概念和方法，文字力

求深入浅出；为了便于读者实际应用，还结合作者的实践经验，辅以实例说明。

作者水平有限，恳切希望同行专家和广大读者对本书缺点提出批评指正。

编著者

于华西医科大学附属第一医院临床免疫中心

一九八五年四月

目　录

第一章　放射免疫分析的基本理论

第一节　基本原理

放射免疫分析法（及其他类似的方法）的基本原理是竞争性结合（Competitive binding）或竞争性抑制（Competitive inhibition），又称为置换。

免疫反应是可逆反应，能达到平衡。

$$Ag + Ab \rightleftharpoons Ag-Ab \cdots\cdots \quad (1)$$

〔注〕Ag，即Antigen，抗原；Ab，即Antibody，抗体；Ag--Ab为抗原抗体复合物。

如果在此系统中引入标记抗原（示踪物，一般微量），则标记抗原与未标记抗原均要与有限的抗体结合，相互竞争，故称为竞争性结合，见下式（2）。

$$\begin{matrix} Ag \\ Ag^{\bullet} \end{matrix} + Ab \rightleftharpoons \begin{matrix} Ag - Ab \\ Ag^{\bullet} - Ab \end{matrix} \cdots\cdots \quad (2)$$

〔注〕Ag•，即放射性核素标记的抗原、标记抗原、示踪物。

标记抗原与未标记抗原对于共同抗体的竞争力，决定于两者的相对浓度。未标记抗原（Ag）增多，则Ag—Ab将增多；同时，使标记抗原（Ag•）与抗体（Ab）的结合减少，即Ag•—Ab将减少。故Ag增多，即抑制Ag•与Ab结合。反之亦然，Ag•增多也抑制Ag与Ab的结合。故称为竞争

性抑制。也可以理解为，当一方抗原增多（如 Ag），置换了另一抗原（Ag*）与抗体结合的位置（Binding Site），故称为置换。

由图 1 可见，无论投入反应的未标记抗原与标记抗原之间的浓度比例如何，它们各自与抗体的结合率总是相同的。换言之，标记抗原的结合率（B/T，B/F或其它参数，能借放射性测定而测出的），即代表未标记抗原的结合率（不能测出的），也等于总的抗原（包括Ag及Ag*）与抗体的结合率。

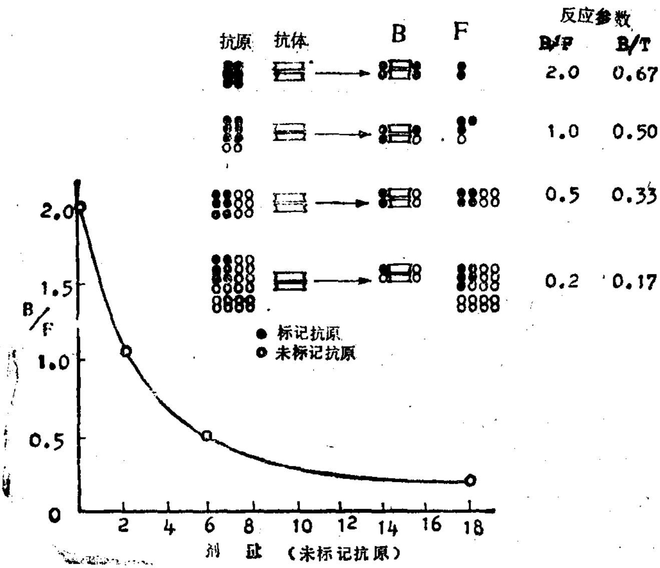

图 1　竞争结合原理和标准曲线

在此反应系统中，如果预先加入一系列已知量的未标记抗原，在反应平衡以后，将结合的与游离的抗原分离，分别测定放射性，计算后可得到相应的一系列递减的结合率。据此可绘制标准曲线。这时，在完全相同的实验条件下，反过来根据结合率，则可查出未知量的未标记抗原的浓度。故标准曲线又称为剂量反应曲线（Dose-response Curve）或标定曲线（Calibration Curve），乃是放射免疫分析的精髓。

第二节　亲和常数和灵敏度

为了便于理解，须从最简单的理想模式开始，来讨论放射免疫反应的定量关系。此模式以下面的条件为前提：

一、标记抗原与未标记抗原对于抗体具有完全相同的免疫活性（亲和力），参加反应。

二、抗体只有一种结合位置（Single order or class of binding sites）。一分子抗体上两个结合位置之间既无干扰也无协同作用，而是独立发挥作用。换言之，抗体只有一种同质的（Homogenous）抗原决定簇。（注：每分子抗体有两个结合位置，故结合位置＝抗体分子浓度×2，为方便起见，可视一分子抗体只有一个结合位置）。

三、反应符合质量作用定律，并且已经达到平衡。

四、分离结合和游离部分抗原的技术是完全的，并且不影响这种平衡。

这种模式可用下式代表：

$$[Ag] + [Ab] \underset{K'}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} [Ag\text{—}Ab] \quad \cdots\cdots\cdots \quad (3)$$

〔注〕$F=[Ag]$，代表平衡以后未被结合的（游离的）抗原的分子浓度。

$B=[Ag-Ab]$，代表平衡以后已被结合的（结合的）抗原或已结合的抗体的分子浓度。

$[Ab]$代表平衡以后未被结合的（游离的）抗体分子浓度。

K和K′为正逆反应的速度常数。

〔 〕代表克分子浓度（Mole）。

根据质量作用定律，反应平衡以后：

$$[Ag][Ab]\cdot K=[Ag-Ab]\cdot K'$$

平衡常数$Ka=K/K'$，故

$$Ka=\frac{K}{K'}=\frac{[Ag-Ab]}{[Ag][Ab]}\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（4）$$

平衡常数Ka又称为结合常数或亲和常数，是抗原-抗体反应系统中，正逆反应速度常数的比值，在特定的反应条件下，对特定的抗原-抗体系统是固有的，不变的。Ka的单位定为升/克分子（L/Mole或LM^{-1}）。亲和常数的倒值1/K是离解常数（Kd），单位为克分子/升，是浓度单位。因此，Ka的单位，可被看作稀释单位。故Ka的含义，是“需将1克分子抗体稀释到多少升，才能使抗原-抗体结合下降50%”（见下）。

从（4）式可见，Ka越大，平衡后抗原抗体复合物的相对浓度越大，即游离的抗原和剩余的游离抗体的相对浓度越小。说明Ka越大，抗原抗体的亲和力越大。由（4）式也可以说明，Ka值是抗原-抗体相互作用的产物，不可孤立地谈论某一抗体或某一抗原的K值（一般所指某一抗体的Ka，系指该抗体与原型抗原之间的K值）。

假如加入反应系统中的抗原浓度不变，同时充分稀释抗体，最后使结合率（B/T，以b表示）下降50%，则〔Ag〕=〔Ag－Ab〕，即B＝F，根据（4）

$$K=\frac{[Ag-Ab]}{[Ag][Ab]}=\frac{1}{[Ab]}\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\ (5)$$

〔注〕在下文的叙述中K即Ka。

设〔Ab°〕＝加入的总抗体浓度（一般是不变的）。

因〔Ab°〕＝〔Ab〕＋〔Ag－Ab〕

则〔Ab〕＝〔Ab°〕－〔Ag－Ab〕

根据（5）式

$$K=\frac{1}{[Ab]}=\frac{1}{[Ab^{\circ}]-[Ag-Ab]}\cdots\cdots\cdots\cdots\ (6)$$

（5）式和（6）式的意义在于，当Ka值愈大时，反应平衡以后，剩余的游离抗体浓度〔Ab〕将愈小，结合抗体浓度〔Ag－Ab〕亦将愈大。假如加入的抗体浓度〔Ab°〕等于加入的抗原浓度〔Ag°〕，则当B/F＝1时（B/T＝50%），抗体的结合率也将是50%，那么根据（5）式和（6）式，

$$K=\frac{1}{[Ab]}=\frac{1}{\frac{1}{2}[Ab^{\circ}]}=\frac{2}{[Ab^{\circ}]}\cdots\cdots\cdots\cdots\ (7)$$

由（7）式可见，在这种情况下可以看出，当Ka值减小为原来的十分之一时，加入抗体的浓度〔Ab°〕必须增加10倍，才能得到相同的结合率（B/T＝50%）。换言之，在相同结合率的前提下，Ka值大的抗体，加入反应的抗体量应减少，呈负相关。

从（4）式可以推导出以下公式：

$$K=\frac{〔Ag-Ab〕}{〔Ag〕〔Ab〕}=\frac{B}{F}\times\frac{1}{〔Ab〕}$$

$$\frac{B}{F}=K〔Ab〕 \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (8)$$

根据 〔Ab〕 = 〔Ab°〕 - 〔Ag-Ab〕

$$\frac{B}{F}=K(〔Ab°〕-B) \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (9)$$

因B = 〔Ag-Ab〕 = B/T× 〔Ag°〕 = b〔Ag°〕

$$故\frac{B}{F}=K(〔Ab°〕-b〔Ag°〕) \cdots\cdots\cdots\cdots (10)$$

〔注〕 式中b即结合率，B/T。

从以上公式可进一步推导出以下公式：

$$\left(\frac{B}{F}\right)^2+\frac{B}{F}(1+K〔Ag°〕-K〔Ab°〕)-K〔Ab°〕=0 \cdots\cdots\cdots\cdots (11)$$

$$b^2-b\left(1+\frac{〔Ab°〕}{〔Ag°〕}+\frac{1}{K〔Ag°〕}\right)+\frac{〔Ab°〕}{〔Ag°〕}=0 \cdots\cdots\cdots\cdots (12)$$

$$f^2-f\left(1-\frac{〔Ab°〕}{〔Ag°〕}-\frac{1}{K〔Ag°〕}\right)-K\frac{1}{〔Ag°〕}=0 \cdots\cdots\cdots\cdots (13)$$

〔注〕以上（11）、（12）和（13）三式的推导如下：

反应平衡后，b＝B／T（抗原的结合率）

f＝F／T（抗原的游离率）

T＝B＋F（抗原总量）

从（10）式开始演算。

$$\frac{B}{F}=K\left([Ab°]-b[Ag°]\right) \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots \quad (10)$$

$$\frac{B}{F}=K\left([Ab°]-\frac{B}{B+F}[Ag°]\right)$$

$$\frac{B}{F}=K[Ab°]-K\cdot\frac{B}{B+F}[Ag°]$$

两边乘以$\frac{B+F}{B}$得：

$$\frac{B}{F}\times\frac{B+F}{B}=K\cdot\frac{B+F}{B}[Ab°]-K\cdot\frac{B+F}{B}\cdot\frac{B}{B+F}[Ag°]$$

$$\frac{B+F}{F}=K\left(1+\frac{F}{B}\right)[Ab°]-K[Ag°]$$

$$\frac{B}{F}+1=K\cdot\frac{F}{B}[Ab°]+K[Ab°]-K[Ag°]$$

两边同乘以B／F得：

$$\frac{B}{F}\cdot\left(\frac{B}{F}+1\right)=K\cdot\frac{F}{B}\cdot\frac{B}{F}\cdot[Ab°]+K\cdot\frac{B}{F}[Ab°]$$

$$-K\cdot\frac{B}{F}[Ag°]$$

$$\left(\frac{B}{F}\right)^2+\frac{B}{F}=K[Ab°]+K\frac{B}{F}[Ab°]-K\frac{B}{F}[Ag°]$$

移项并合并同类项得：

$$\left(\frac{B}{F}\right)^2+\frac{B}{F}\left(1-K[Ab°]+K[Ag°]\right)-K[Ab°]=0 \cdots \quad (11)$$

$$\frac{B}{F}=K\left([Ab°]-b[Ag°]\right) \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots \quad (10)$$

$$\frac{B}{T-B}=K[Ab°]-K\frac{B}{T}[Ag°]$$

两边同乘以$\frac{T-B}{B}$得：

$$\frac{B}{T-B}\cdot\frac{T-B}{B}=K\cdot\frac{T-B}{B}[Ab^\circ]-K\cdot\frac{B}{T}\cdot\frac{T-B}{B}[Ag^\circ]$$

$$1=K\cdot\left(\frac{T}{B}-1\right)[Ab^\circ]-K\cdot\frac{T-B}{T}[Ag^\circ]$$

$$1=K\cdot\frac{T}{B}[Ab^\circ]-K[Ab^\circ]-K\left(1-\frac{B}{T}\right)[Ag^\circ]$$

$$1=K\cdot\frac{T}{B}[Ab^\circ]-K[Ab^\circ]-K[Ag^\circ]+K\frac{B}{T}[Ag^\circ]$$

两边同乘以B／T得：

$$\frac{B}{T}=K\cdot\frac{T}{B}\cdot\frac{B}{T}[Ab^\circ]-K\frac{B}{T}[Ab^\circ]-K\frac{B}{T}[Ag^\circ]+K\left(\frac{B}{T}\right)^2[Ag^\circ]$$

移项并合并同类项得：

$$\left(\frac{B}{T}\right)^2K[Ag^\circ]-\frac{B}{T}\left(1+K[Ab^\circ]+K[Ag^\circ]\right)+K[Ab^\circ]=0$$

两边同乘以$\frac{1}{K[Ag^\circ]}$得：

$$\left(\frac{B}{T}\right)^2-\frac{B}{T}\left(\frac{1}{K[Ag^\circ]}+\frac{[Ab^\circ]}{[Ag^\circ]}+1\right)+\frac{[Ab^\circ]}{[Ag^\circ]}=0\cdots\cdots(12)$$

$$\frac{B}{F}=K\left([Ab^\circ]-b[Ag^\circ]\right)\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots(10)$$

$$\frac{T-F}{F}=K[Ab^\circ]-K\cdot\frac{T-F}{T}[Ag^\circ]$$

$$\frac{T}{F}-1=K[Ab^\circ]-K\left(1-\frac{F}{T}\right)[Ag^\circ]$$

$$\frac{T}{F}-1=K[Ab^\circ]-K[Ag^\circ]+\frac{F}{T}[Ag^\circ]\cdot K$$

两边同乘以F／T得：

$$1-\frac{F}{T}=K\cdot\frac{F}{T}[Ab^\circ]-K\frac{F}{T}[Ag^\circ]+\left(\frac{F}{T}\right)^2[Ag^\circ]\cdot K$$

移项并合并同类项得：

$$\left(\frac{F}{T}\right)^2\cdot K[Ag^\circ]-\frac{F}{T}\left(K[Ag^\circ]-K[Ab^\circ]-1\right)-1=0$$

两边同乘以$\frac{1}{K[Ag^{\circ}]}$得：

$$\left(\frac{F}{T}\right)^2-\frac{F}{T}\left(1-\frac{[Ab^{\circ}]}{[Ag^{\circ}]}-\frac{1}{K[Ag^{\circ}]}\right)-\frac{1}{K[Ag^{\circ}]}=0\cdots\cdots \quad (13)$$

从以上三公式还可以推导出b、f和B／F各反应参数的倒数的公式。

以上各式中，〔Ab°〕和K是常数，〔Ag°〕是自变量，B/F、b、f等反应参数均为因变量。方程式均为二次函数，因此，在普通座标纸上作图均不是直线，而是曲线。

以上各公式都是一个自变量〔Ag°〕和一个因变量B/F（或b、f）之间的关系。这个关系体现了方法的灵敏度，即〔Ag°〕变化最小而同时反应参数变化最大时，方法最灵敏。Ekins对于灵敏度的定义是“能测出的最小抗原浓度”（Minimal detective dose），其着眼点是标准曲线的起始部分，因这部分〔Ag°〕变化最小，反应参数变化大。

Yalow认为“灵敏度体现于标准曲线的斜率”，因斜率大时，相同的〔Ag°〕变化可引起较大的反应参数变化。以上两概念是一致的，如将误差的因素考虑在内，则灵敏度乃是能推动反应参数发生有统计学意义变化的最小的抗原量变。故一般而言，方法最灵敏的部分是在标准曲线陡峭段的起始部分。

从公式（9）中可看出，K是不变的，实际上B/F决定于〔Ab°〕与B的差值。如果〔Ab°〕过大，则微小的B的变化，实际上不能引起明显的B/F发生改变。因此，必须使抗体稀释到〔Ab°〕比B（〔Ag－Ab〕，结合部分的抗原浓度）

大不了多少，才能使B/F发生明显变化。换言之，当K值不变时，加入抗体浓度应适当减少，才能使方法灵敏。灵敏至何种程度呢？假设B/F＝1，根据（10）式可得：

$$1=K\left(\left[Ab^{\circ}\right]-b\left[Ag^{\circ}\right]\right) \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (14)$$

根据微分原理，当加入的抗原量〔Ag°〕⟶0，同时抗体的量已减小至与〔Ag°〕几乎相等，则

$$1\leqslant K\left[Ab^{\circ}\right] \text{ 或 } 1\leqslant K\left[Ag^{\circ}\right]$$

$$\left[Ag^{\circ}\right]\geqslant\frac{1}{K} \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (15)$$

从（15）式中可见，在上述条件下，能测出的最小〔Ag°〕（若放射性示踪物的量忽略不计）将等于或大于K值的倒数。即〔Ag°〕只能小到以K值的倒数为极限。这也证明：灵敏度决定于K值。实际上由于必须加入一定量的示踪物，因此，最小能测出量总是大于1/K，否则将进一步降低B/F值至1以下，才能获得更高的灵敏度。

Yalow关于灵敏度的微分推导：

上面已提到方法的灵敏度体现于标准曲线的斜率，即代表反应参数b与〔Ag°〕之间的消长关系。那么当db/d〔Ag°〕最大时，将是最佳灵敏度。

根据（10）式进行微分可得以下公式：

$$\frac{db}{d\left[Ag^{\circ}\right]}=-\frac{Kb(1-b)^{2}}{1+K\left[Ag^{\circ}\right](1-b)^{2}} \cdots\cdots\cdots\cdots (16)$$

〔注〕（16）式的推导如下：

$$\frac{B}{F}=K\left(\left[Ab^{\circ}\right]-b\left[Ag^{\circ}\right]\right) \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (10)$$