

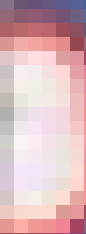
竞争放射分析

JING ZHENG FANG SHE FEN XI

原子能出版社

兒童戲劇分析

THE CHILDREN'S FAIRY STORY SERIES



0000000000

竞争放射分析

(1979年全国竞争放射分析技术
交流会议论文选编)

王世真 主编

原子能出版社

内 容 简 介

竞争放射分析是使用放射性核素的一种超微量体外分析技术, 其中放射免疫分析、竞争性蛋白质结合分析、放射免疫电泳自显影等测定方法均已广泛地应用于我国生物学、实验医学及临床医学等各个领域。本书介绍了1979年全国竞争放射分析技术交流会议学术交流的主要内容。

本书可供医用放射性核素专业工作者, 内分泌学、肿瘤学、生物化学、实验生物学、免疫学、药理学、微生物学、流行病学、毒理学、内科、外科、妇产科、儿科等方面的科研人员、医务人员和畜牧兽医工作者参考。

竞争放射分析

(1979年全国竞争放射分析技术交流会论文选编)

王世真 主编

原子能出版社出版

(北京2108信箱)

北京印刷一厂印刷

(北京市西便门)

新华书店北京发行所发行·新华书店经售

☆

开本 $787 \times 1092 \frac{1}{16}$ ·印张 $18\frac{1}{2}$ ·字数435千字

1981年9月第一版·1981年9月第一次印刷

印数001—1900·统一书号: 15175·345

定价: 2.25元

前 言

中国科学技术情报研究所于1979年9月在无锡市召开了全国竞争放射分析技术交流会。全国各地有关的科研及医务工作者参加了会议。会上总结了从1975年放射免疫分析座谈会以来我国在竞争放射分析方面所取得的成果。

竞争放射分析方法是近二十年来迅速发展起来的一种新技术。这类分析方法不但能够定量地分析血、尿及生物组织中过去难以测定的毫微克、微微克水平的微量物质，成为临床诊断工作的有力工具，而且在科研工作中，通过应用这种分析方法，解决了大量的过去长期未能解决的实际问题，推动了生物学和医学基础理论的研究，纠正了一些错误的认识。因此，其重要性已得到医学界的公认。这种分析方法的创始人R. S. 雅洛教授获得了1977年的诺贝尔医学奖金。

由于篇幅所限，本选编只全文刊登了这次交流会上宣读的部分论文，同时选登了一些论文摘要。其中全文刊登的，多半属于填补国内空白的工作，或多篇同类论文中较有代表性的作品。刊登的论文摘要也各有特色：有的在某些方法上有所改进或创新，有的则提供了有参考价值的数据或资料。书后附有略语词汇。

近年来，各国都极其重视生物学中的竞争分析工作。许多国家都建立了与这种技术有关的专业学会，创办了专门期刊，设置了专门奖金，开展了大量的学术活动，而且每年都有数次国际性的大型专业会议。在此领域中，新技术、新设备、新方法不断涌现，应用的范围也不断扩大。无性纯系抗体的生产、多种非同位素竞争分析方法的建立、快速分析、自动化分析、药物监测、新生儿甲状腺功能普查、传染病普查、亲肿瘤标记物与亲心肌标记物的寻找等，都是一些明显的例子。至于理论上的探讨与提高工作，也在逐步深入之中。

近几年来，我国的竞争放射分析工作亦发展得较快，截止1979年底共建立了43种不同物质的测定方法；但与技术先进国家相比，以及从实现四化的要求来看，还有相当大的差距。我们殷切希望本书有助于推广竞争放射分析方法在我国的应用，进而为提高与发展这项技术作出一点贡献。

参加本书编审工作的有：王世真、陆中定、刘景生、李振甲、夏宗勤、袁丽君和张书贤等同志。

由于我们的水平有限，错误在所难免，请读者批评指正。

编 者

目 录

第一部分 多肽、蛋白质及氨基酸衍生物的测定

全 文

脑啡肽的放射免疫测定	1
抗徐缓激肽血清的制备——三种免疫原的效果及被动血凝法检测效价	12
人血清肌红蛋白的放射免疫测定法及其在急性心肌梗死早期诊断中的应用	17
人血清生长激素的放射免疫测定法	25
用灵敏的血管紧张素 I 放射免疫分析法测定血浆肾素酶活性	34
血浆血管紧张素 II 的硫酸铵测定法	42
血清胃泌素的放射免疫测定法及国人正常值	43
血清胃泌素的放射免疫测定法	50
人绒毛膜促性腺激素放射免疫分析法临床试用概况	55
甲胎蛋白及乙型肝炎表面抗原、抗体的固相放射免疫测定技术	60
甲胎蛋白放射免疫测定试剂盒的制备	66
人血清促甲状腺激素的放射免疫测定	72
促甲状腺激素释放激素兴奋试验及人血清促甲状腺激素放射免疫测定的 临床应用	80
血清总 T ₄ 的竞争性蛋白质结合测定法——药箱的制备及应用	86
DNA 抗体的放射免疫分析法	91
分泌型免疫球蛋白 A 和血清型免疫球蛋白 A、G、D 的放射火箭 电泳自显影测定	94
人尿中白蛋白的放射免疫测定	99
应用阿片受体结合分析法测定针刺前后内啡肽含量的变化	103
免疫放射自显影法的建立及其在鼻咽癌诊断和普查中的应用	111
蛋白质的酶促放射性标记的初步研究	119

摘 要

肌红蛋白快速放射免疫测定法及其临床应用	125
用于放射免疫分析的胰岛素抗体的制备	127
微量蛋白激素的乳过氧化物酶 ¹²⁵ I 化法	128
血浆血管紧张素 II 及肾素活性放射免疫测定法的改进	129
以血管紧张素 I 产生速率测定血浆肾素活性	131
大鼠脑组织中血管紧张素 I 及 II 的放射免疫测定	132
兔血浆中肾素活性与血管紧张素 II 的放射免疫测定	134
正常人和胃肠道疾病病人空腹时血清胃泌素的含量及其临床意义	137
试用上海生物制品研究所生产的 HCG-LH 放射免疫分析试剂盒对 53 号避孕药机理的研究	138

上海生物制品研究所人绒毛膜促性腺激素试剂盒的方法学鉴定及临床试用情况	139
人绒毛膜促性腺激素放射免疫测定在恶性滋养细胞肿瘤中的应用	141
甲胎蛋白的纯化	142
几种检测血清甲胎蛋白方法的比较	143
甲胎蛋白放射免疫测定的临床应用及方法学讨论	144
固相放射免疫分析法检测乙型肝炎表面抗原的实验研究	145
应用放射对流免疫电泳自显影术测定血清甲胎蛋白	148
甲胎蛋白放射免疫分析法及肝脏扫描诊断原发性肝癌的结果分析	149
婴幼儿血清甲胎蛋白变化的观察	150
应用放射火箭电泳自显影法测定小儿甲胎蛋白的正常值	151
^{125}I -三碘甲腺原氨酸对树脂摄取比值(T_3RUR)测定的简化法	152
血清 T_4 蛋白竞争分析法的改进与临床的初步应用	153
血清总甲状腺素(T_4)竞争性蛋白质结合分析法的临床评价——776例总结	154
竞争蛋白结合分析法检测血清甲状腺素浓度	155
血清甲状腺素竞争性蛋白结合分析法的临床应用	156
天津市不同年龄正常人血清甲状腺激素(T_3 、 T_4)含量的测定	156
血清甲状腺素的竞争性蛋白质结合分析法——干扰试验及临床应用	157
甲亢手术前后血清总 T_4 浓度观察小结	158
树脂法测定 ^{125}I - T_3 血浆结合比值	159
^{125}I -补体第一成分第一亚单位结合实验法测定血清中免疫复合物的含量	160
分泌型免疫球蛋白A的放射免疫分析法及其在流感活疫苗气溶胶免疫测定 中的应用	161
放射免疫分析法测定疫苗中小牛血清含量	162

第二部分 类固醇的测定

全文

血浆雌二醇的放射免疫测定	164
11-去氧皮质酮的放射免疫测定	171
血浆皮质酮的放射免疫测定	176
不需层析的血浆醛固酮放射免疫测定法	181
高比放射性氚标记的甾族激素的制备研究	190
促肾上腺皮质激素的放射免疫测定法	194

摘要

血浆雌酮的放射免疫测定	199
灵芝浸膏对家兔血浆皮质醇含量的影响	203
血清雌三醇的放射免疫分析法	204

第三部分 核苷酸和脂肪酸的测定

全文

前列腺素的放射免疫测定及其应用	206
环一磷酸鸟苷抗原抗体的制备及放射免疫分析法的建立	219
环一磷酸鸟苷的放射免疫测定方法	229
黄芪对小白鼠血浆及组织内环核苷酸(cAMP、cGMP)含量的影响	236

摘 要

环一磷酸腺苷蛋白结合分析法的改进	239
蛋白结合法测定环一磷酸腺苷时影响因素的探讨	241
60例正常人脑脊液中环一磷酸腺苷浓度的测定	242
85例健康成年人血浆环一磷酸腺苷含量的测定	243
人胃液中环一磷酸腺苷的蛋白结合分析法及环一磷酸腺苷与人胃酸分泌的关系	244
家兔创伤及愈合过程中环一磷酸腺苷在血浆中浓度的变化	246
去甲肾上腺素对家兔心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -三磷酸腺苷酶活性和环一磷酸腺苷含量的影响以及胰岛素的拮抗效应	247

第四部分 药物的测定

全 文

人血浆强地松龙的竞争性蛋白质结合分析法	249
血清地高辛放射免疫分析及其在诊断毛地黄中毒中的价值	257

摘 要

人血清地高辛放射免疫测定中B、F分离方法的探讨	261
血清地高辛的放射免疫测定	262
血清地高辛放射免疫分析双抗体法和炭末吸附法的比较及临床应用	263
用放射免疫分析法测定95例人血清地高辛的浓度	264
血清地高辛放射免疫分析法的临床应用	265
血清地高辛放射免疫测定法的临床应用	266
血清地高辛放射免疫分析法临床应用的初步观察	267
放射免疫分析法测定血清地高辛浓度的临床应用	268

第五部分 寄生虫抗原抗体复合物的测定及其它

全 文

应用两种放射免疫检测技术诊断肺吸虫病的实验结果	269
应用放射免疫分析法检测血吸虫病患者和感染动物循环免疫复合物的初步研究	273
用电子计算机进行放射免疫分析的数据处理	278
一种简便而准确的自动加液装置及一种新的容量器皿校准方法	280

摘 要

结合标记抗原和游离标记抗原的聚乙二醇分离法	283
附录 略语词汇	285

第一部分 多肽、蛋白质及 氨基酸衍生物的测定

脑啡肽的放射免疫测定

陆以信 吴静波*

(上海市高血压研究所)

易庆成 汪范生 邹冈

(中国科学院上海药物研究所)

自1975年发现脑啡肽(EK)至今仅数年时间,由于它可能是一类新的神经传递物质或神经调节物质,因此引起了国内外学术界的高度重视^[1,2]。业已证明,吗啡受体拮抗剂纳洛酮可以对抗针刺镇痛^[3-6],由此提示内啡肽确实参与了针刺镇痛过程。为了促进脑啡肽的研究及进一步阐明针刺镇痛原理,很有必要建立一种测定脑啡肽的灵敏、特异的方法。常用的放射受体分析法可以测定各种内啡肽的总量,但不能区别是哪一种内啡肽。现知脑内各种内啡肽的分布和功能不尽相同^[1],因此有必要分别加以测定。放射免疫分析方法(RIA)可以达到这个目的^[7-13]。

我们采用国内合成的亮氨酸-及甲硫氨酸-脑啡肽(LEK及MEK)设计并建立了这两种五肽的两种放射免疫分析方法。它们在免疫原合成及¹²⁵I标记脑啡肽的制备等方面均有其特点,并经过了多方面的考验。实践证明,此法灵敏、简便、可靠、特异性强。本文较详细地介绍了这两种放射免疫分析方法。

实验与结果

一、脑啡肽标准品

标准品均为电泳、层析纯,经氨基酸组成分析合格。

(一) LEK($\text{H}_2\text{N-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH}$) 中国科学院生物化学研究所六室活性多肽组赠。固相法合成。

(二) MEK($\text{H}_2\text{N-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH}$) 中国科学院上海药物研究所合成室合成^[14]。经典液相法合成。

二、¹²⁵I标记脑啡肽(*EK)的制备

用改进的氯胺T氧化法标记。

(一) 低剂量法 方法与制备¹²⁵I-AT II法^[15,16]相同。用纸电泳测得碘源标记反应率^[15]分别为74%(*MEK)和92%(*LEK)。

* 进修医生(贵阳医学院附属医院)。

(二) 中剂量法 EK $2.5 \mu\text{g}$ (在 0.25M 、 $\text{pH}7.6$ 磷酸盐缓冲液 $25 \mu\text{l}$ 中), 加入 $800 \mu\text{Ci}$ Na^{125}I , 冰水浴中持续磁力搅拌, 滴加氯胺 T $50 \mu\text{g}$ (在 $25 \mu\text{l}$ 上述缓冲液中), 反应 $1.5-3$ 分钟后加偏焦亚硫酸钠 $100 \mu\text{g}$ (在 $50 \mu\text{l}$ 同样缓冲液中), 搅拌 1 分钟后加水到 $250 \mu\text{l}$ 。碘源标记反应率分别为 78% (*MEK) 和 66% (*LEK)。

(三) *EK 的纯化 标记反应液以 DEAE-Sephadex A-25 柱 ($1 \times 90 \text{cm}$) 层析纯化, 用 0.1M 、 $\text{pH}7.6$ 磷酸盐缓冲液平衡及洗脱, 流速约为 $5 \text{ml}/10 \text{分} \cdot \text{管}$ (图 1a, b)。

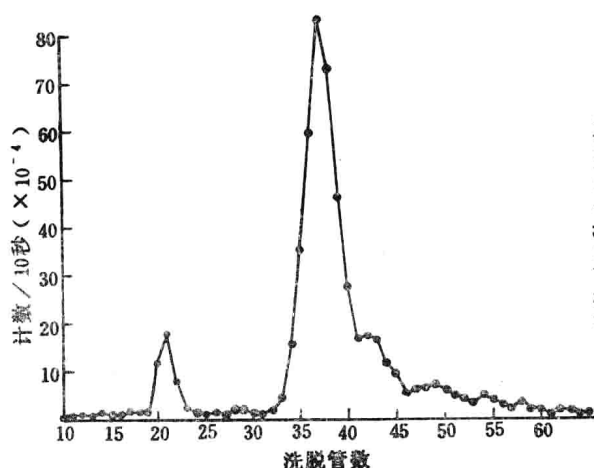


图 1a ^{125}I 标记 LEK 柱层析分离图

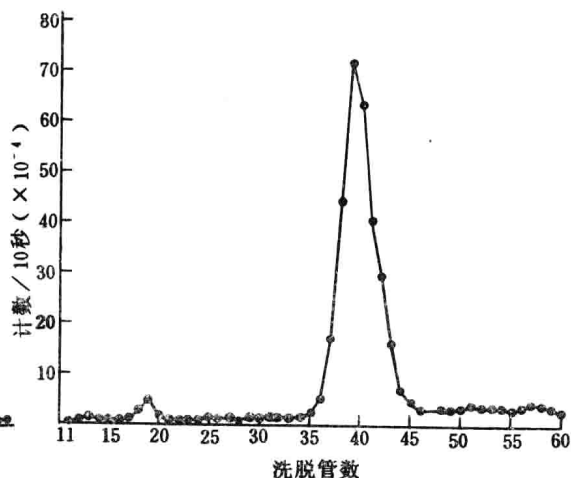


图 1b ^{125}I 标记 MEK 柱层析分离图

(四) *EK 的比放射性 比放射性用放射免疫自身取代法^[17]测得。结果, 低剂量法标记的 *MEK 的比放射性约为 $5 \times 10^2 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$; 中剂量法标记的 *LEK 约为 $17 \times 10^2 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, *MEK 约为 $16 \times 10^2 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。

(五) *EK 的贮存 将 *EK 保存于 -20°C 下, 一般可使用约 2 个月。*LEK 贮存 5 个月 (图 2a) 以及 *MEK 贮存近 3 个月 (图 2b), 均未见明显的游离碘脱落。

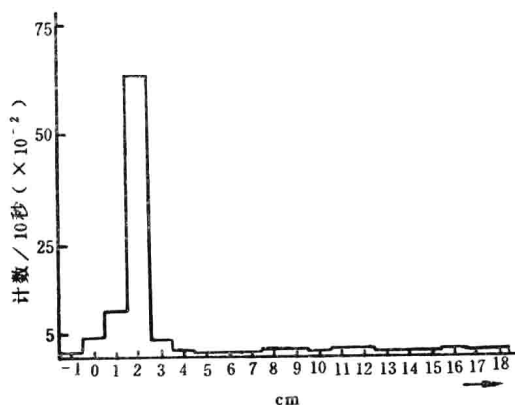


图 2a ^{125}I 标记 LEK 保存 5 个月后纸电泳图

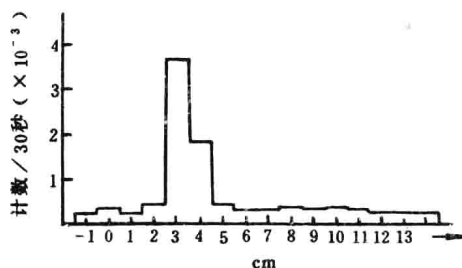


图 2b ^{125}I 标记 MEK 保存近 3 个月后纸电泳图

(六) *EK 的过量抗体结合率为 $76-88\%$ 。

三、抗 EK 血清 (AES) 的制备

(一) 免疫原的合成 免疫原合成方法借鉴 Haber 法^[18]而设计。

1. 多聚赖氨酸琥珀酰亮氨酸脑啡肽(PL-Succ-LEK)的合成 LEK 5 mg 溶于1.5 ml水中, 加入多聚赖氨酸半琥珀酸(PL-Succ) 6 mg, 磁力搅拌至溶解, 加*LEK 约 14×10^4 cpm, 滴加碳二亚胺(EDCI)水溶液0.5 ml (12 mg), 于20—30℃下反应1.5小时后, 再次加入EDCI 0.5 ml (10 mg), 继续反应半小时。然后装入透析袋, 于4℃下对 pH7.6、0.005M 磷酸盐缓冲液充分透析。从透析后反应液中的*LEK 剩留百分数测得的 LEK 结合率为90%, 即6 mg的PL-Succ 结合了4.5 mg LEK。计算表明, 平均每3.2个赖氨酸残基接上1个LEK分子。

2. 多聚赖氨酸琥珀酰甲硫氨酸脑啡肽(PL-Succ-MEK)的合成 将8 mg MEK 加1 ml水及5 N氢氧化钠半滴, 稍预温热至溶解。另将PL-Succ 6 mg溶于0.3 ml 0.1M 磷酸盐缓冲液中。将以上两溶液混合, 于室温下加入EDCI水溶液0.5 ml (12 mg), 磁力搅拌2小时后, 4℃下透析。根据外加的*MEK 剩留率(81%)换算得MEK的结合量为6.5 mg。计算表明, 平均每2.3个赖氨酸残基上接1个MEK分子。

(二) 兔抗EK血清(AES)的产生 采用背部皮内多点注射法^[19]免疫家兔。

1. 抗LEK血清(ALS) 首次免疫时, 每只兔注射约0.47 mg PL-Succ-LEK(相当于约200 μ g LEK)与等体积福氏完全佐剂的乳化液(背部皮内约40—50个点)。同时, 另行多点皮内加注百日咳疫苗0.5 ml。注后2.5月及5.5月以相同剂量强化注射(皮内、皮下多点), 2周后放血。血清中加入硫柳汞, 至浓度为0.02%时分装, 于-20℃下保存。作放射免疫测定的那只兔的抗血清最终工作浓度为1:5000, 结合*LEK 约40%, 用Scatchard法测得亲和常数^[20] $K = 4.0 \times 10^9 M^{-1}$ (图3a)。

2. 抗MEK血清(AMS) 首次免疫时, 每兔背部皮内多点注射0.77 mg PL-Succ-MEK(约相当于400 μ g MEK)和等体积福氏完全佐剂的乳化液, 并同时背部多点皮内注射百日咳疫苗0.5 ml。2个半月后, 皮内、皮下多点注射0.19 mg PL-Succ-MEK(相当于100 μ g MEK), 2周后放血。用于放射免疫测定的那只兔的AMS 最终工作浓度是1:5000, 结合*MEK 约44%, $K = 0.97 \times 10^9 M^{-1}$ (图3b)。

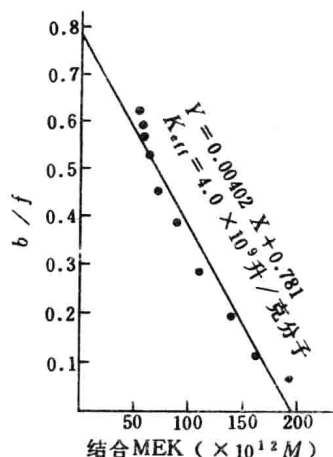


图 3a ALS 亲和常数实测值K的图解

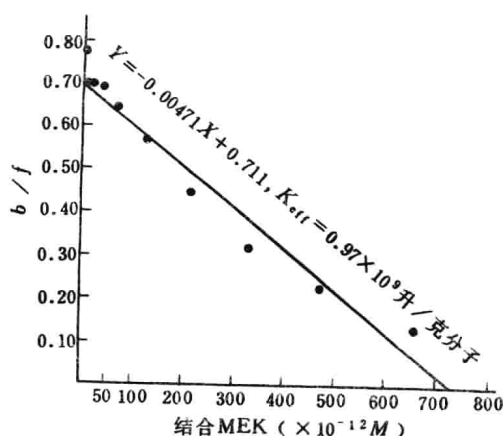


图 3b AMS 亲和常数实测值K的图解

四、竞争抑制曲线

(一) 稀释缓冲液 稀释缓冲液选用本所配方PELH^[15]。

(二) 放射免疫标准曲线的建立 本实验采用聚苯乙烯指形管作标准曲线管。在各种标准曲线管(St)中加入: ① PELH; ②标准品, LEK12.5—6400 pg/管或 MEK 12.5—25600 pg/管; ③*EK, 约6000—8000 cpm; ④抗EK血清, 使最终工作浓度为1:5000。总温育体积为2.05 ml。非特异性结合对照管(C)中不加 AES 和标准EK。另制备仅加入*EK的总计数管(T)。St、C、T管均做复管。St及C管于冰水浴中温育24小时后, 加入1:12稀释的正常兔血清30 μ l 及足量羊抗兔 γ 球蛋白血清(30—60 μ l), 继续于4 $^{\circ}$ C下温育20小时。然后进行冷离心, 吸去上清液, 用单道 γ 谱仪测沉淀的计数率(cpm)。计算各管的*EK结合率 $B_i/T\%$, 以 $(B_i/T/B_0/T)\%$ 对加入EK量的对数作竞争抑制曲线图(图4a, b)。

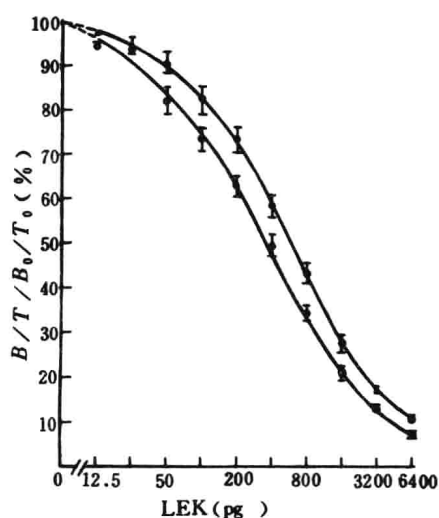


图 4a LEK RIA 标准曲线

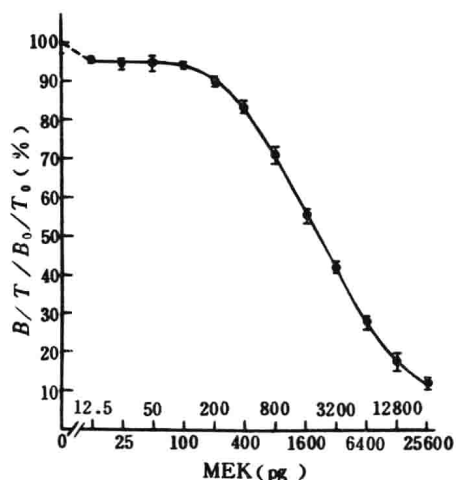


图 4b MEK RIA 标准曲线

(三) 温育 pH 及温育时间对抗体结合*EK的影响 图 5 表明, *EK 与抗体的结合在 pH7.5 时较适宜。图 6 表示, 温育时间20小时足以建立平衡, 温育时间再延长时 *EK 的结合率也不再明显增加。

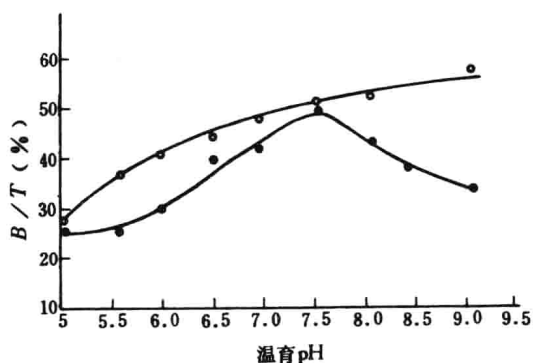


图 5 pH 对 *EK 结合率的影响

— — MEK + AMS;
— · — LEK + ALS。

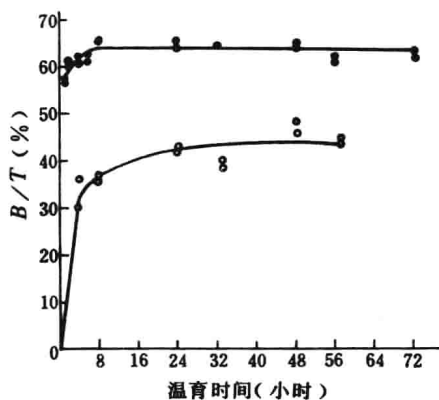


图 6 温育时间对 *EK 结合率的影响

— — *LEK + ALS;
— · — *MEK + AMS。

(四) 标准曲线的稳定性、灵敏度和精密度 我们统计^[21]了常规测定的连续多次标准曲线,并用 $(B_i/B_0)\%$ 的均数 $\pm$ 标准误作图(图4a, b),分析结果见表1。

表 1 EK放射免疫测定方法的评价

RIA	标准曲线										脑抽提液 测定正确性 $\frac{\sum X_i - \bar{X}_i }{\sum X_i} \%$	总分
	检测 时间 (天)	检测 批数	¹²⁵ I 标记 条件	灵 敏 度		“0”标准管B/T%			取 代 比	精 密 度 $\frac{\sum X_i - \bar{X}_i }{\sum X_i} \%$		
				$\Delta H \text{①,}$ EK pg	B_i/B_0 为 50%时 pg	$\bar{M}$	C.V.%					
							批间	批内				
LEK	12	5	低剂 量法	18 (4)	585	38.3 (3)	6.1	1.3	9.22 (8)	1.85 [1.25—2.70] (10)	7.46 (7)	32
	62	6	中剂 量法	10.9 (4)	361	37.0 (3)	11.5	1.14	14.3 (8)	1.83 [0.80—2.95] (10)	12.75 (4)	29
MEK	50	7	中剂 量法	132 (2)	2183	43.1 (3)	7.2	1.1	8.51 (8)	1.42 [1.01—1.94] (10)	4.36 (8)	31

括号内数字表示按Power-Point System评分法的计分数^[22]。

① 最小检出量 ΔH , 定义为能和“0”标准管相区别($P=0.05$)的未标记的最小激素量^[23]。

(五) 特异性

1. MEK对 ALS 及 LEK对 AMS 的交叉反应。从产生相当于50%抑制 ($B_i/B_0 = 50\%$) 的剂量换算, MEK对 ALS 的交叉反应率为3.3%(图7); 而 LEK加入量达205 ng时, *MEK的结合率没有可见的降低, 故交叉反应率小于0.1%。

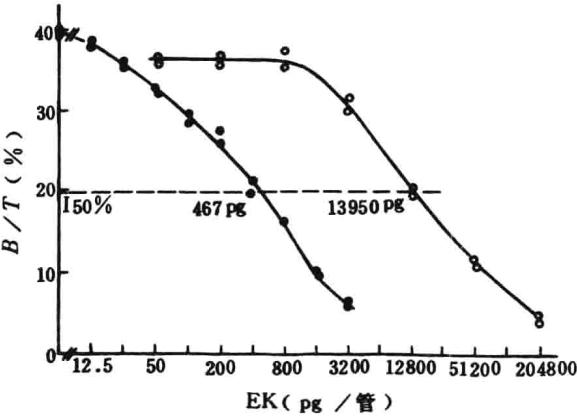


图 7 MEK对 LEK RIA 的交叉反应试验

— · — ALS + *LEK + LEK;

— ○ — ALS + *LEK + MEK。

LEK 0 pg 时, $(B_0/T)\% = 39.9\%$, 产生50%抑制时的 EK 量为: LEK = 467 pg,

MEK = 13950 pg, 故交叉反应率 = $\frac{467}{13950} \times 100\% = 3.27\%$ 。

2. 与 β 内啡肽的交叉反应仅约万分之一(图8)。

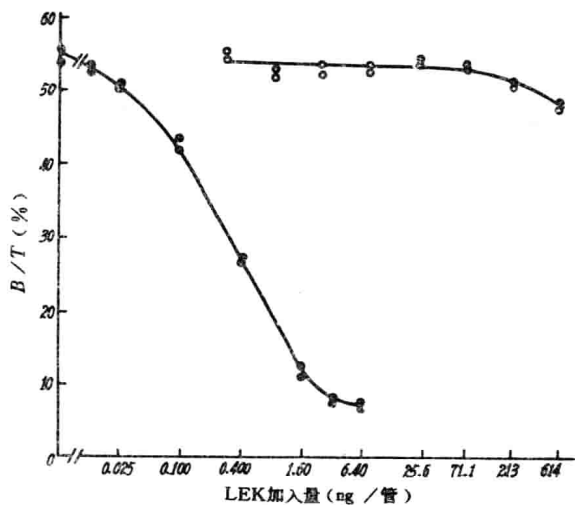


图 8a LEK RIA 中 β 内啡肽的交叉反应测定

— · — ALS + *LEK + 不同量 LEK;
 - ○ - ALS + *LEK + 不同量 β 内啡肽。

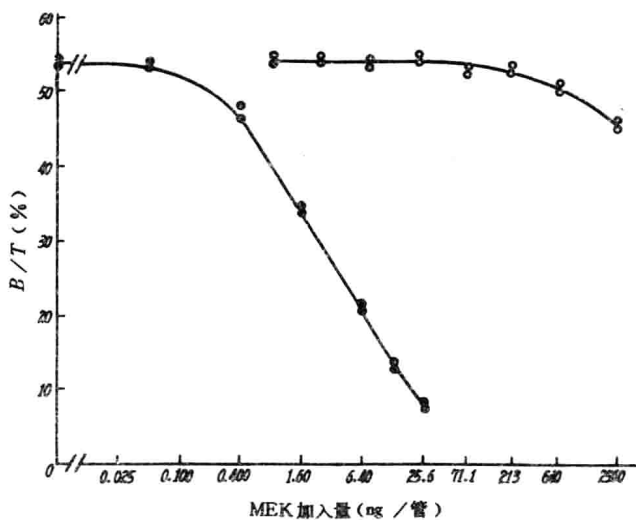


图 8b MEK RIA 中 β 内啡肽的交叉反应性测定

— · — AMS + *MEK + 不同量 MEK;
 - ○ - ASM + *MEK + 不同量 β 内啡肽。

3. 与八种肽类激素, 吗啡及纳洛酮没有明显的交叉反应(见表 2)。

五、脑组织抽提及 EK 测定法

(一) 方法 对兔(或大鼠)快速断头取脑, 置煮沸的生理盐水中加热 4 (或 2) 分钟。取出后, 分离各脑区, 称重, 并分别置于 3 ml 0.1N 盐酸中。用玻璃匀浆器匀浆后, 加入 0.3 ml 1N 氢氧化钠及 0.7 ml 0.5M、pH7.6 磷酸盐缓冲液, 最后加 PELH, 直至 5 ml。抽提大脑区时, 各溶液用量加倍。于 3.3×10^3 g 离心 20 分钟后, 取上清液 0.3—0.7 ml 直接作 RIA 测定。所用方法如关于标准曲线的建立中所述, 但以样品液代替标准溶液。从各测定

表 2 特异性试验

	测定交叉反应的物质 (10ng/管)											
	催产素	加压素	血管紧张素 II	血管紧张素 I	徐缓激肽	促黄体生成释放激素	胰岛素	促甲状腺素	吗啡	纳洛酮	MEK [△]	LEK
LEK RIA 测得相当于 LEK量(pg) (双管均数)	—	10 (0.1%)	—	—	—	—	—	—	—	—	354 (2.76%)	(100%)
MEK RIA 测得相当于 MEK量(pg) (双管均数)	—	—	—	—	—	—	<100 (<1%)	—	—	—	(100%)	—

“—”表示所测定的交叉反应物质在 LEK 或 MEK 的放射免疫分析的结合率(B/T)%与“0”标准管无显著差异。

“()”内表示交叉反应百分值。

“△”表示加入量为12.8ng。

管(B_i/T)%值查标准曲线, 得出EK的含量(pg)。再根据各脑区组织湿重, 换算出每mg脑组织的EK含量。

(二) 方法学考验

1. 脑组织匀浆化抽提*EK的效率。脑组织在抽提前注入*EK, 经匀浆、离心后, *LEK回收率为 $90.9 \pm 7.1\%$, C.V.=7.8% ($n=5$); *MEK回收率为 $97.0 \pm 4.4\%$, C.V.=4.5% ($n=7$)。

2. 脑组织中加入LEK 20 ng, 经过抽提、测定步骤, 总回收率为 $84.2 \pm 8.2\%$, C.V.=9.7% ($n=6$)。

3. 脑抽提液中加入MEK 0.20—3.2 ng/管, 经放射免疫分析测得的MEK量(Y)与加入的MEK量(X)间成线性关系。两次实验表明, $Y=1.11X+1.12$ 及 $Y'=1.08X'+1.90$, 回归系数显著性测验 $Sb=0.032$ 及 $Sb'=0.035$, $p<0.001$ (图9)。

4. 脑抽提液加入量的增加(25—800 μ l/管), 测得的EK量也相应地增加, $p<0.001$ (图10a、b)。

5. 各脑区抽提液在放射免疫测定中的非特异性结合率很低(0.4—1.8%), 且在各脑区的测定值间未见明显差异, $p>0.2$ 或0.5(表3)。

表 3 免脑抽提液的非特异性结合B/T(%)

RIA	下丘脑	大脑皮质	显著性测验
LEK	1.79 ± 0.80 ($n=10$)	1.82 ± 0.69 ($n=8$)	$t=0.10$, $p>0.5$
MEK	0.74 ± 0.92 ($n=11$)	0.39 ± 0.35 ($n=10$)	$t=1.11$, $p>0.2$

n 为所测的动物数。

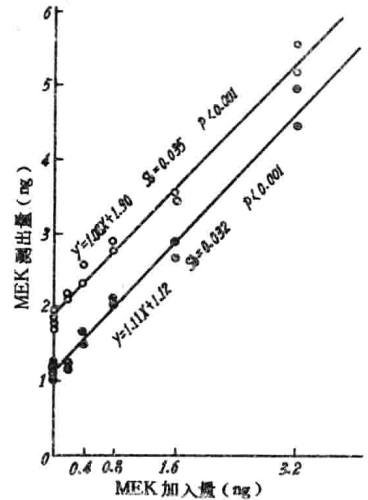


图 9 脑匀浆上清液中加入 MEK 的回收率

6. 批内及批间放射免疫分析的误差。脑抽提液分装后保存于 -20°C , 作为参比测样, 每批测定2—3管。对测定值进行统计分析^[21]的结果见表4。

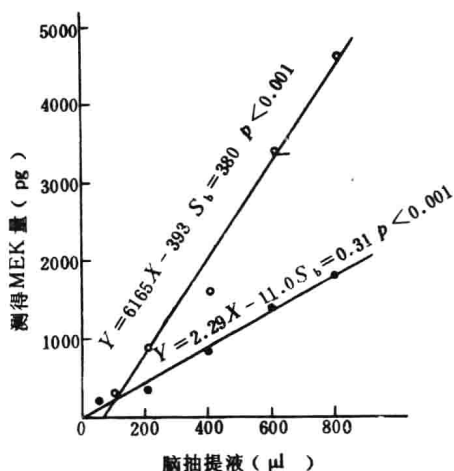


图 10a 脑匀浆抽提液LEK RIA:EK加入量与测得值之间呈线性关系

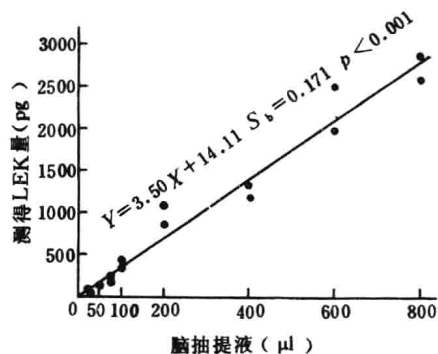


图 10b 脑匀浆抽提液MEK RIA:EK加入量与测得值之间呈线性关系

表 4 脑抽提液中EK RIA的批内和批间误差

	脑组织种属	测定体积 (μl/管)	测定批数 (期间)	测得量pg $M \pm S.E.$	批 内 ^①		批 间 ^①	
					S.D.	C.V. (%)	S.D.	C.V. (%)
LEK	大白鼠	50	5 (29天)	222 ± 19	13.7	6.2	43	19.3
	家 兔	300	6 (35天)	1372 ± 85	48.0	3.4	208	15.2
MEK	家 兔	500	4 (40天)	1926 ± 66	108	5.5	115	6.0

① 以每批作双管测定计算^[21]。

7. 分区测定大鼠脑中EK的浓度, 结果见表5。

表 5 大鼠脑中脑啡肽的分布(pg/mg, $M \pm S.E.$)

	下 丘 脑	尾 核	丘 脑	脑 干
被测动物数	5	6	6	6
MEK	288 ± 35	171 ± 32	80 ± 20	72 ± 12
LEK	202 ± 32	147 ± 14	54 ± 11	53 ± 7

六、本测定法的评价

(一) 按“效点系统”^[22]评分, 两种RIA均可得到约30分, 可评为优良的RIA法(见表1)。

(二) 此法与国外报道的EK的RIA相比, 可列为较优的方法(表6)。

讨 论

放射免疫测定法具有灵敏、特异和精确的特点, 因此它的应用日益广泛。然而, 在这种方法中, 也常常需要克服不少技术难关。创建一种新的放射免疫分析方法, 尤其是对于分子量小的小肽来说, 并非简单之事, 而且有必要进行多方面慎重的考验, 以便能灵敏和

可靠地测定所要求测定的物质^[24]。

EK的分子量不到600，它由5个氨基酸残基连接而成，而且仅由羧基端末位氨基酸的差别而分为LEK和MEK。高特异性的抗EK血清的获得，是建立EK的RIA中的首要而最困难的问题。

表 6 EK RIA 方法的 比较

作 者 (年 份)	免 疫 原	免疫 方案 (免)	AES 工 作 浓 度	标 记 同 位 素	交叉 反应		标准曲线灵敏度 ^①			
					MEK 对 ALS %	LEK 对 AMS %	最小检测量		$\frac{B_1}{B_0}$ %为50%时	
							LEK (pg)	MEK (pg)	LEK (ng)	MEK (ng)
本 组 (1978)	PL-Succ- $\xrightarrow{\text{EDCI}}$ -LEK	0.7mg皮内 多点，5个半 月中强化2次	5000	¹²⁵ I	3.3		11		0.36 0.58	
	PL-Succ- $\xrightarrow{\text{EDCI}}$ -MEK	0.77mg 皮 内多点，2个 半月强化1次	5000	¹²⁵ I		<0.1		130		2.18
Weissman, B. A.等 ^[7] (1976)	牛白蛋白- $\xrightarrow{\text{EDCI}}$ -LEK	1 mg, 皮内 多点，每日强 化1次	200 700	³ H			50		0.2 0.3	
Yang, H. Y.等 ^[8] (1977)	PL- $\xrightarrow{\text{EDCI}}$ { Succ-EK Succ-血蓝 蛋白	皮内多点每 月强化1次		³ H	10	10			2.2	11.4
Simantov, R.等 ^[9] (1977)	血蓝蛋白- $\xrightarrow{\text{EDCI}}$ -EK	每3—4周 强化1次	ALS 5000 AMS 500	³ H	1	20	2228	5740	4.41	11.4
Childers, S. R.等 ^[10] (1977)	血蓝蛋白- $\xrightarrow{\text{GDA}}$ -EK	1mg	250 500	³ H	2	1			8.24	162
Wesche, O. 等 ^[11] (1977)	甲球蛋白——EK			³ H	1	0.33	28	114		
Rossier, J. 等 ^[12] (1977)	牛白蛋白- $\xrightarrow{\text{BDB}}$ -LEK	2 mg, 皮内 多点，每月强 化1次	4900	¹²⁵ I	3.3					
Miller, R. J.等 ^[13] (1978)	牛白蛋白- $\xrightarrow{\text{GDA}}$ -EK	脚垫及皮下 多点，每月强 化1次		¹²⁵ I	0.54	0.07			0.10	0.23

① 根据文献报道或从标准曲线计算。

分子量小于1000的小分子(半抗原)不易引起抗体的产生，只有在与大分子载体复合后才可能成为有效的免疫原。连到每个载体分子上的半抗原的性质与数目、连接的位置和方法、载体的特性、免疫原的三级结构、免疫方法等等对于抗血清的产生和特性均可能有显著的影响^[25]。通常认为，抗体倾向于识别与载体连接的半抗原分子中离连接点较远的那部分结构^[26]。为了提高AES鉴别LEK和MEK的能力，我们设想，使EK的氨基端与载体相连接可能会得到较优良的免疫原。我们参照以往制备抗血管紧张素Ⅱ血清所得的经验^[27]，借鉴Haber等的合成路线^[18]，选用PL-Succ作为EK的载体，成功地制备了PL-