

放射免疫测定和饱和分析法的类型及其基本概念

放射免疫测定和饱和分析法是近十几年来发展迅速的检测微量物质的放射性核素分析新技术。因最初系利用免疫反应的原理和放射性测量技术检测血浆中胰岛素的含量,故称为放射免疫测定。后来由于这种方法发展到可以不用抗原和抗体,而利用被测物质和相应能与之结合的物质结合作为测定的基础,不涉及免疫反应的问题,故又称为饱和分析。饱和分析这一名称也未必确切,其含义过于广泛,甚至不应用放射性核素的一些类似分析技术也包括在内。

此类测定法的类型甚多,名称也很不统一,有根据标记抗原抑或标记抗体而命名的;有按照游离抗原与抗原抗体复合物的分离法而命名的;有的则依据不同特异性试剂而命名,本文主要介绍几种常用的测定法类型、及其基本原理、方法和应用情况等。

一、放射免疫测定

(Radioimmunoassay 简称RIA)

放射免疫测定的基本原理是通过用放射性核素标记的抗原和未标记的抗原共同与抗体的竞争作用。即:若将未标记的抗原和标记抗原与它们相应的特异性抗体混合在一起时,由于标记抗原与未标记抗原均能与抗体相结合,故于抗体量有限时,则标记抗原与未标记抗原势必共同地竞争特异性抗体。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,于是产生一条抑制曲线。这就反映了标记抗原结合程度与未标记抗原量的函数关系,这种关系就表现在放射免疫测定的剂量反映曲线上。这一条曲线就是对样品进行定量测定的依据。因此,未知样品中抗原浓度的测定可以根据样品中所观察到的标记抗原的结合量与一系列标准管的标记抗原的结合量进行比较。

根据放射免疫测定的原理与测定的比法,必需具备的条件有:纯化的抗原、高比

度的放射性标记的抗原、高效价特异性的抗血清。纯化抗原的纯度至少在90%以上,或达到免疫纯,即在免疫电泳测定时,仅见一条抗原抗体结合的沉淀线。用来标记抗原的放射性核素对于蛋白质通常使用 ^{125}I 和 ^{131}I ,对于非蛋白质主要使用 ^3H 和 ^{14}C ,于特殊情况下则使用其他放射性核素。但非蛋白质类如甲状腺素亦可用放射性碘标记。大分子的物质制备抗血清通常是不太困难,可是对于小分子的物质因不具有免疫原性,故常人工地连接一个半抗原结合的载体,这些载体往往是某些动物的白蛋白。

放射免疫测定是一种超微量测定法,它能正确地测定含量仅为 $10^{-9}\sim 10^{-12}$ 克的物质,且特异性强、重演性好。因此,它已广泛地被应用于内分泌学范畴,毫不夸张地说激素的测定已进入放射免疫时代。肿瘤相关抗原如甲胎蛋白、癌胚抗原以及绒毛膜促性腺激素等放射免疫测定对肿瘤的诊断、病程经过以及疗效估价等提供了一个观察指标。由于在乙型肝炎中的应用,放射免疫测定对病毒性疾病的诊断提供了可能性。最突出的进展是该技术被应用到环状核苷酸、前列腺素、药物和一些不具有免疫原性的小分子半抗原物质,大大地扩大了这种方法的应用范围,对基础医学、临床诊断以及药物在血中的浓度、代谢和药物中毒的诊断等起着十分重要的作用。

虽然,一般说在放射免疫测定中抗体具有高度特异性,但于某些场合仍有交叉反应,如绒毛膜促性腺激素和黄体生成素、高血糖素和肠高血糖素之间等。目前已清楚地了解在血循环中还存在着一种生物学失活的激素碎片,它在放射免疫测定中如同完整的激素一样,以同样的方式与抗体结合。另外还有一种激素的前驱物,亦可与抗体反应,但其生物学活性较低。

二、竞争性蛋白结合分析

(Competitive Protein binding assay
简称CPBA)

此技术系以血浆中天然存在的一种蛋白作为结合试剂的微量分析法。其原理以皮质醇竞争性蛋白结合分析为例，系被测皮质醇和一定量的标记皮质醇互相竞争地与有限的皮质醇结合球蛋白结合。非标记皮质醇越多，则标记皮质醇与皮质醇结合球蛋白的结合率就越小。反之，非标记皮质醇越少，其结合率就越大。以皮质醇的含量为横坐标，标记皮质醇与皮质醇结合球蛋白的结合率为纵坐标，绘制其标准曲线；根据被测标本的标记皮质醇与皮质醇结合球蛋白的结合率，即可从标准曲线中读出皮质醇的含量。

竞争性蛋白结合分析的概念目前甚为混乱，最初仅系指使用血浆中的结合蛋白为特异试剂而言，可是后来把组织内存在的结合蛋白为特异试剂的测定也包括在内。

自1963年 Murphy 报导使用血中皮质类固醇结合蛋白检测类固醇激素的测定法以来，目前用这种方法亦可检测甲状腺激素、维生素、金属等（见表1）：

表1 应用竞争性蛋白结合分析测定的物质和所使用的结合蛋白

被测物质	结合蛋白
氢化可的松	血浆皮质类固醇结合球蛋白
11-去氧皮质酮	
皮质酮	
可的松	
孕酮	
17-羟孕酮	血浆甲状腺激素结合球蛋白
甲状腺素	
三碘甲状腺原氨酸	
维生素B12	内因子
维生素D	大白鼠血中维生素D结合蛋白
25-羟维生素D	
叶酸	叶酸还原酶
铁	转铁蛋白

竞争性蛋白结合分析和放射免疫测定有同样的精确度和稳定性，但其灵敏度和特异性通常逊于放射免疫测定。故目前常用放射免疫测定（由于小分子放射免疫测定技术的发展）来代替竞争性蛋白结合分析，但血浆中浓度高的物质（如氢化可的松和甲状腺素）或应用放射免疫测定有困难的物质（如维生素等）可使用此技术。

三、放射受体分析 (Radioreceptor-assay 简称RRA)

放射受体分析的原理与竞争性蛋白结合分析相同，仅在于所用的特异试剂彼此不同而已。放射受体分析所应用的特异试剂为组织受容体。受容体从存在的部位来看可分为两类：一类是存在于细胞膜的受容体，含有蛋白性激素的受容体。另一类是存在于细胞质和细胞核的受容体，含有类固醇激素、甲状腺激素、药物受容体。

此技术必须具备的条件有：纯化的被测物质（激素）、放射性核素标记的被测物质、受容体。在被测物质的标记中要注意生物活性的失活问题，为此通常采用较温和的条件进行碘化，即降低氯胺T的用量，然而最近更多地采用乳过氧化物酶碘化法，将来亦可考虑使用³H进行标记。各种激素都有特异的受容体，具有多功能的激素往往有种种受容体。测定时应从实际出发，选用受容体含量多，取材方便的组织来制备受容体。受容体的特异性不高，因此在测定时不一定用同种动物的受容体。

应用放射受体分析进行测定的物质和已被确认的受容体组织见表2：

表 2 应用放射受体分析测定的一些物质及其受容体组织

激 素	组 织
细胞膜受容体	
促甲状腺素释放激素	脑垂体
黄体生成素——释放激素	脑垂体
促甲状腺激素	甲状腺 Harderian腺
催乳素	乳腺、卵巢、肝、肾上腺、精囊、肾
促肾上腺皮质激素	肾上腺
生长激素	淋巴球、肝
黄体生成素	睾丸、卵巢
卵泡刺激素	睾丸、卵巢
促黑色素细胞激素	黑色素瘤
加压素	肾
后叶催产素	子宫、乳腺、膀胱
促甲状腺素	肾
降钙素	肾
胰岛素	肝、脂肪、肌肉、淋巴球、软骨、纤维母细胞、胎盘
高血糖素	肝、 β 细胞、脂肪、心肌
儿茶酚胺	心肌、肝、红血球、子宫、脾
血管紧张素	血管
前列腺素	子宫
Somafomedin	胎盘、软骨、肝、脂肪细胞
血管活性肽	肝
人绒毛促性腺激素	睾丸、卵巢
绒毛生长泌乳素	黄体
细胞内受容体	
葡萄糖皮质激素	肝、肺、脑、脑垂体、造血组织、心、子宫、其他组织
醛固酮	肾、膀胱
雄性素	前列腺、脑、肾、付睾、睾丸、脑垂体
雌性素	子宫、睾丸、脑、脑垂体、胰、乳腺
助孕酮	卵巢、子宫、乳腺
1, 25-二羟基胆钙固醇	脑
甲状腺素	肝
环核苷酸	肝、肌肉等组织
环状核苷酸	蚕蛹、虾肉、哺乳动物的脑、其他组织

放射受体分析的灵敏度与放射免疫测定相近。但放射免疫测定的结果是表示免疫活性，而放射受体分析的结果则表示生物活性。实际应用中，血浆中常有非特异性的抑制现象，使灵敏度明显下降，因此在测定体系中，必需予以注意。

放射受体分析的应用，不仅对某些激素特别对尚未有很好生物活性测定方法的激素可作定量测定，且可发现某些激素的新作用。激素与受容体反应机制的分析，有助于了解激素与受容体的反应特异性，与其他激素的交叉反应性，受容体存在于组织的部位，以及受容体的浓度和结合常数。

四、免疫放射分析(Immunoradiometric assay 简称IRA)

免疫放射分析的原理系先以过量标记抗体直接与被测抗原反应，形成抗原标记抗体的复合物和游离的标记抗体。用下式表示：

未知浓度的抗原 + 标记抗体

↓
抗原标记抗体复合物 + 过量的标记抗体

再以吸附抗原的免疫吸附剂作为分离手段将两者予以分离，测其上清液与沉淀物的放射性。若被测抗原含量多，上清液的计数率就

高；反之，被测抗原含量少，上清液的计数率就低。根据上清液的计数率就能推算出抗原的含量。

免疫放射分析必需具备的条件有：纯化的抗原、标记的抗体、对抗原结合力强、且具有高度分散性的免疫吸附剂。纯化抗体的方法常采取免疫法，即先将纯化的抗原连接到免疫吸附剂上去，然后再将接合后的抗原免疫吸附剂投入抗血清中，保温后就可把高亲和力的抗体吸附上。亦可先使抗原与抗体形成不溶性抗原抗体复合物，然后再应用化学法与物理法使之解离分开。标记的抗体常采用 Greenwood 等(1963)碘化法制备之。免疫吸附剂通常使用的是重氮化的纤维素、溴化氢激活的纤维素或琼脂糖珠、以及聚丙烯酰胺凝胶颗粒。

免疫放射分析已应用于胰岛素、人生长激素、促滤泡激素、促黄体生成素、付甲状腺素、免疫球蛋白G、猪降钙素、血管紧张素I、铁蛋白及人降钙素的测定。对乙型肝炎表面抗原和甲胎蛋白定量分析，从理论上讲，在某些方面免疫分析法较放射免疫测定为佳。

免疫放射分析的优点是：抗体分子大、含有很多酪氨酸残基，因此易于进行放射性核素的标记，易于获得高比度的标记抗体。特别在抗原不易标记或标记抗原不稳定的情况下，这种改良法显然是有优点的。

五、反向滴定 (Back-titration)

反向滴定技术系利用过量的抗体与抗原充分反应，形成抗原抗体复合物与剩余的抗体。用下式表示：

抗原 + 过量抗体

↓
抗原抗体复合物 + 剩余的抗体

剩余的抗体再以放射性核素标记的抗原滴定。其标记的抗原与抗体的结合率和非标记抗原（或所测标本中的抗原）的量成特定的线性关系。

此技术用来测定血浆胰岛素含量。必需具备的条件同经典放射免疫测定。反向滴定技术的关键是选择适当的过量抗体的浓度。因为用过量的抗体与抗原反应，剩余的抗体用过量标记抗原滴定，所以抗原、抗体和标记抗原三者的数量就其免疫反应性质而言，应为 1 : 2 : 3。选取这样的配比，剂量反应曲线呈一直线。

反向滴定具有快速、灵敏、直线性较好、无抗原种属特异性，且能防止样品溶血所造成的干扰，这种种特点，无疑对放射免疫测定有重要的实际价值，应用到其他抗原物质的放射免疫测定应该是可能的。

六、放射过敏原吸附试验 (Radioallergosorbent 简称 RAST)

此技术系用来测定免疫球蛋白E含量的微量测定法。其依据是：①过敏原与免疫吸附剂结合；②结合物与免疫球蛋白E结合形成过敏原-免疫吸附剂-免疫球蛋白E复合物；③复合物与抗免疫球蛋白E抗体反应而结合，形成过敏原-免疫吸附剂-免疫球蛋白E-抗免疫球蛋白E抗体复合物；④抗免疫球蛋白E能纯化和进行放射性标记；⑤其所产生的复合物的放射性与免疫球蛋白E的含量成线性关系。

放射过敏原吸附试验必需具备的条件是：特异性过敏原、性能良好不溶性的免疫吸附剂、纯化的免疫球蛋白E、标记的抗免疫球蛋白E抗体。免疫吸附剂Mide系采用溴化氢激活的不溶性葡聚糖。标记抗免疫球蛋白E系采用 ^{125}I ，应用 Hunter 等氯胺T法进行碘化。

放射过敏原吸附试验是体外诊断超敏反应的有用方法，它可测定对过敏原的特异免疫球蛋白E，有利于病因的诊断。

七、放射性抗原微量沉淀试验 (Radioactive antigen microprecipitin 简称 RAMP)

此技术是检测抗体的一种微量测定法。其依据是：①抗原可用放射性核素进行标记；②某疾病的患者体内具有与病原抗原起特异性反应的抗体存在；③标记抗原能与抗体反应而结合；④测定抗原抗体复合物的放射性有无，即知有否特异性抗体的存在。以下式表示：

标记抗原 + 抗体

↓
游离标记抗原 + 标记抗原抗体复合物

本试验的具体操作步骤可分：第一步将标记抗原与被测样品于4°C进行保温18~24小时；第二步游离标记抗原与标记抗原抗体复合物的分离。Williams在对曼氏血吸虫病的诊断研究中采用高速离心进行分离，而本文作者在对日本血吸虫病的诊断研究中采用羊抗人球蛋白抗体作为双抗体进行分离，效果良好。

目前应用此试验作诊断性研究的疾病有曼氏血吸虫病、旋毛线虫病、日本血吸虫病等。其阳性检出率均较满意，但尚需进一步深入地研究。

八、结语

本文介绍了放射免疫测定、竞争性蛋白结合分析、放射受体分析、免疫放射分析、反向滴定、放射过敏原吸附试验以及放射性抗原微量沉淀试验等几种常见的饱和分析法的类型及其基本概念。它们的共同特点是：灵敏度高、特异性强、精确性好、应用范围广等。为研究许多重要生物活性物质的含量、分布、代谢、作用机理等提供了一个新的手段；为很多生命科学问题获得了新的认识；为一些疾病早期诊断、疗效观察以及预后分析等提供了可能性。

参 考 资 料

1、Yalow RS等：Nature 184：1648，1959

2、Ekin RP：Practitioner 207：312，1971

3、Nabarro JDN：Brit Med Bull 30(1)：1，1974

4、井村裕夫：最新医学 30(4)：544，1975

5、《放射免疫分析及其它放射体外测定方法》编辑组：放射免疫分析及其它放射体外测定方法（1975年会议资料选编），原子能出版社，P.7，1976

6、Felber JP等：J Nucl Biol Med 13：1，1969

7、Ekin RP：Brit Med Bull 30(1)：3，1974

8、Burke CW，et al：Brit Med Bull 30(1)：93，1974

9、木幡阳：最新医学30(12)：2074，1975

10、丸茂文昭：最新医学30(12)：2119，1975

11、Woodhead JS，et al：Brit Med Bull 30(1)：44，1974

12、Addisson GM：Radioimmunoassay and related Procedures in medicine Vol.1：131，1974

13、Ziegler M，et al：J Clin Endocrinol Metab 35：317，1972

14、Wright PH，et al：Diabetes 20：33，1971

15、Wide L，et al：Lancet，11：1105，1967

16、Bennich H，et al：Adv Immunol 13：1，1971

17、四宫敬介：最新医学30(12)：2213，1975

18、Williams JS，et al：J Parasitol 57：220，1971

19、Williams JS，et al：Exper Parasitol 31：299，1972

甲胎蛋白放射免疫分析法的临床应用价值

甲胎蛋白 (Alpha-1-Fetoprotein简称AFP)是一种正常的胎儿血清蛋白〔1〕。1944年Pederson等氏〔2〕首先在小牛血清中发现，但未引起重视。1966年Berstrand等氏〔1〕用电泳法在人血清中查到有甲胎蛋白存在。1963年Abelev等氏〔3〕在小鼠移植性肝细胞瘤中找到甲胎蛋白，它是正常小鼠肝组织中所没有的成份。1964年Tatarinov氏〔4〕证实肝癌患者血清中存在着甲胎蛋白。

甲胎蛋白大量由胚胎肝细胞所合成，小量由胎儿卵黄囊细胞及胎儿胃肠道所合成〔5〕，它分泌至血清中，存在于全部体液内。出生后，血清甲胎蛋白浓度迅速下降至仅数毫微克/毫升水平，半减期为3.5天〔6〕此种浓度水平仅可用放射免疫分析法或酶免疫分析法等检测出。成年人血清AFP浓度的检测最初只限于诊断原发性肝细胞癌之用，但后来发现多种疾病及临床情况血清AFP浓度皆可增高，因此，血清AFP浓度的检测在临床上除可诊断原发性肝细胞癌外，对其他疾病的诊断和鉴别诊断亦有重要的价值。现分别介绍于下。

甲胎蛋白的生物化学

电泳时AFP移动于 α_1 区内，紧跟在白蛋白后面，它的分子量为70,000稍高于白蛋白。用丙烯酰胺凝胶电泳时，可以检测出一种分子异质性。这两种分子构型虽具有不同的电泳流动性，但是具有共同抗原部位。人体AFP亦观察到此微小的异质性。虽然，肽链尚不清楚，但是氨基酸的分析证明，胎儿AFP和肝癌AFP间没有任何区别〔6〕〔7〕。

动物实验证明，CCl₄中毒或肝切除术后，肝再生时可诱致产生AFP，因此，在血清中AFP可再出现。AFP和白蛋白一样，合成后消失亦很迅速，在人体内其半减期为4~6天。CCl₄中毒后血清中AFP的浓度水平与肝再生的细胞分裂活性有关。但是，AFP再出现和肝再生之间的关系尚未得到最后证实。

甲胎蛋白的生理学

在高敏感的检测方法如放射免疫分析法应用以前，一般认为胎儿可以检测出AFP，但是出生后即消失，正常人血清内未发现有AFP。实际上，AFP存在于成年人血清内，其浓度甚低，用一般的方法如免疫扩散法检测不出来。

在早期妊娠期间，AFP和白蛋白是胎儿的主要血清蛋白〔8〕。在正常妊娠过程中，小量甲胎蛋白可通过胎盘膜进入母体内，使母体血清AFP浓度逐渐增高。在妊娠前三个月，AFP浓度即高于基础水平，妊娠后三个月，正常母体血清内的AFP浓度可达最高水平，有时第32周可达400~500毫微克/毫升，然后下降。羊水内检测的水平更具有特征性。脐带血清水平易受个体差异性的影响，因此，意义较小。

当胎儿低氧症、胎儿危急或死亡时，在少数情况下，母体血清AFP浓度可高达1000毫微克/毫升，用简单的琼脂凝胶扩散法亦可检测出来〔9〕。绒毛膜激素分析可以测知母体的激素状态，血清AFP分析可以反映胎儿的状态，因此，定量检测母体血清AFP浓度，目前多用于生前期诊断胎儿有无死亡及