

269, 1975。

41. Zizkovsky, Gann 65:193,1974。

42. Kurata K等: Radioimmunoassay of alpha-Fetoprotein. Radioimmu-

assay and Related Procedures in Medicine. Proceeding of A Symposium, 1973, Vol. 2, P. 299~313。

[上海中山医院同位素室 赵惠扬综述]

利用放射免疫分析法分析前列腺素的 125 碘衍生物的新途径

引言

在前列腺素领域中的定量方法要很灵敏, 因为已证明这些化合物是在很低浓度时起作用。目前, 前列腺素的测定有两个准确的方法: 气液相层析结合质谱, 此法特异性高, 但不灵敏(测出限量: 80微微克); 另一为放射免疫分析, 此法特异性差, 但更灵敏。最近, 我们用抗前列腺素 E_2 血清 A/93709 ($K_a 1.8 \times 10^{10} M^{-1}$) 和 3H 前列腺素 E_2 (121居里/毫克分子) 做示踪剂成功地测出前列腺素 E_2 3微微克。

为了进一步提高滴度, 我们应用噬菌体与半抗原结合的精巧技术作为免疫反应的指标, 可以测定出低于1微微克的量。但此免疫分析不能用在稀释的生物样品或由于非特异性结合的干扰, 而需要提取或层析精制的样品。因此, 我们考虑制备高比放射性的前列腺素的碘化衍生物。我们报告用 ^{125}I 标记的组织胺(或酪胺)前列腺素做示踪剂进行前列腺素的放射免疫分析的结果, 并与 3H 前列腺素的放射免疫系统做了比较。用前者时灵敏度提高了10倍, 而二者分析的重复性是一致的。而且, 这种方法也可扩大到前列腺素的代谢物。

氟化和碘化前列腺素 E_1 和 E_2 的剂量反应曲线的比较, 能够鉴别前列腺素 E_1 中羧基团用肽或酯键保护后在构象上的改变, 而前列腺素 E_2 并不发生这些变化。

方法

前列腺素与组织胺或酪胺的结合。前列

腺素与组织胺或酪胺的结合是用碳二亚胺法。在试管中加500微升溶于水中的组胺(90微克分子), 1-乙基-3(3-二甲基氨基)-碳二亚胺盐酸盐(52微克分子), 500微升溶于乙醇水溶液(50% V/V)中的前列腺素(28.6微克分子), pH调到5; 加入 3H 组织胺做为示踪剂进行结合测定。在室温保温过夜以后, 在正丁醇/醋酸/水系统(75:10:25 V/V)进行薄层层析分离, 切出薄层上结合的前列腺素(R_f 0.50), 用含水甲醇(90% V/V)提取两次, 使用前在 $-20^\circ C$ 时储存。

碘化, 用氯胺T法进行碘化。将 $Na^{125}I$, 2微升(200微居里)转移到一塑料管中; 加前列腺素组胺或酪胺(7毫微克分子)的pH7.4的0.5M磷酸钾缓冲液, 再加入溶于2微升磷酸钾缓冲液的氯胺T(5微克), 加入溶于2微升磷酸钾缓冲液的偏亚硫酸氢钠(32微克)后, 反应立即停止。

反应后立即用薄层层析法精制产品(溶剂系统: 氯仿/甲醇/水, 60:30:5 V/V), 放射性点用放射自显影及其免疫活性试验加以鉴定。

甲基化, 用重氮甲烷制备前列腺素甲酯的方法见其他的文献。产品用薄层层析法精制, 氯仿/甲醇/水(50:10:0.5 V/V), $R_f=0.80$ 。

酯化以后, 产品用薄层层析法精制, 放射性 3H 再分配的研究表明有97%以上的 3H 前列腺素E转变为 3H 前列腺素E甲酯。

放射免疫分析。用氚标记前列腺素的测

定以前已有报导。现用碘标记的前列腺素的测定如下：稀释的抗血清 0.1 毫升与碘标记的前列腺素 0.1 毫升 (≈ 60000 次/分) 以及 0.1 毫升未知样品或标准品前列腺素一起在 4°C 保温过夜。为了将游离部分与结合部分分离，加 1 毫升冷却的涂葡聚糖的炭粒，在 0°C 保持 15 分钟，然后试管在 4°C ， $2000 \times g$ 离心 15 分钟，除去上清液，炭用 γ 谱仪计数。

结 果

精制和比活性。碘化以后，为了从非标记产物和其它没有免疫反应的放射性化合物中分离出碘化前列腺素，需应用精制操作。对所有 ^{125}I 组胺与前列腺素来说其层析的情况是相似的，由于碘化后，从原来的前列腺素转化成其它的前列腺素没有发生化学变化。这就不需要将产品中的各个前列腺素进行分离，例如 ^{125}I 标记的组胺前列腺素 E_2 的最主要的免疫反应点： $R_f=0.80$ 可从非标记组胺前列腺素 E_2 ： $R_f=0.70$ 和碘： $R_f=0.45$ 中分离开。从放射性物质中完全清除非标记的结合物就可使示踪物的比放射性接近理论值，与 Na^{125}I 一致 (≈ 2000 居里/毫克分子)。

示踪物与抗血清的结合。当抗血清过量（最后稀释度 1/400）存在时，用免疫活性点 $R_f=0.80$ 进行试验，表明在所有情况下结合率（结合/总活性）超过 80%。将碘标记物和氚前列腺素进行抗血清稀释度的比较，在结合率为 40% 时，碘示踪物的稀释度较氚标记物大 5~10 倍，即前列腺素 E_1 ， E_2 和 $\text{F}_{2\alpha}$ 抗血清，最后的稀释度依次为：1/450000，1/150000 和 1/210000，而 ^3H 前列腺素是 1/40000，1/21000 和 1/30000。

灵敏度。用 ^{125}I 标记的组胺前列腺素得到的灵敏度有所提高，可测出低于 0.5 微微克的水平。用结合率为 50% 时所需要的前列腺素量做指标，表明 ^{125}I 标记组胺前列腺素比 ^3H 标记的用量少 5~10 倍。 ^{125}I 酪胺前列腺素（本文不叙述）较组胺前列腺素所得的反

应曲线大致要升高。

交叉反应。用 ^3H 或 ^{125}I 标记的示踪物做了抗前列腺素 E 血清与各种抑制剂的相应交叉反应性比较。用 ^3H 前列腺素 E_1 系列与前列腺素 E_2 所得交叉反应是 12%，而 ^{125}I 组胺前列腺素 E_1 的交叉反应是 2.6%。对于其它的前列腺素交叉反应的百分率没有改变。抗前列腺素 E_2 血清与这两示踪物的交叉反应是相同的。

生物样品中前列腺素 E_2 浓度。用碘标记或氚标记的示踪物对精制后的同一生物样品（淋巴细胞和羊膜水）进行前列腺素测定的比较，说明碘标记的组胺衍生物测定法的灵敏度高，所以实践中所需的样品体积小。

讨 论

用放射免疫分析法测定生物液样中低浓度的化合物时，主要取决于抗血清的亲力和示踪物的比放射性。用碘示踪物代替氚示踪物可能带来另外的因素：碘化合物的免疫反应性能。在这些条件下，过去在开展用碘化衍生物作前列腺素的放射免疫分析时，之所以不能得到满意的结果，可能是由于一种或多种的因素：选用的抗血清亲和力低 ($K_a < 10^9 \text{M}^{-1}$)，被结合的化合物的性质，结合时的条件，碘化方法或示踪物的精制程度。

在本实验中，我们用组织胺或酪胺衍生物研究了三种类型（前列腺素 E_1 ， E_2 和 $\text{F}_{2\alpha}$ ），其碘化组胺前列腺素与同类氚化前列腺素比较，表明灵敏度可提高 5~10 倍。此高灵敏度能测定限量的生物材料中（人外周血浆，组织碎片，细胞培养液，分娩前的羊膜水……）很低浓度的样品。测定的可靠性与用氚标记的示踪物是一致的。在每种情况下，非特异性结合低于 10%。

用氚化前列腺素或碘化前列腺素 E_2 和抗前列腺素 E_2 血清及前列腺素 E_1 的交叉反应的百分率是一致的。而用抗前列腺素 E_1 血

清与前列腺素 E_2 及氟化或碘化前列腺素 E_1 的交叉反应百分率是不同的。在剂量反应曲线的斜率也是有差别的。对前列腺素 E_1 和 E_2 系统的分析说明, 如与氟化衍生物比较则本实验的前列腺素 E_1 分析中曲线的斜率是有改进的(即剂量反应曲线中分布在2.5对数剂量而不是2); 用碘或氚标记的示踪物对前列腺素 E_2 系列的曲线研究没有见到这种差别。

碘标记的组胺前列腺素和氚标记前列腺素的甲酯所得的抑制曲线的研究告诉我们不存在碘和载体的影响。在前列腺素 E_1 的情况下, 用碘标记的衍生物或 3H 前列腺素甲酯得到平行的抑制曲线, 但 3H 前列腺素 E_1 的抑制曲线有差别。在前列腺素 E_2 系统中这三个示踪物得到相似的曲线斜率。

因为前列腺素 E_1 和 E_2 仅是在 $C_1 \sim C_7$ 的

烷基链有所不同, 保护羧基后就可以改变前列腺素 E_1 分子中这部位的立体化学结构。交叉反应研究有力地支持了这一看法, 也就是说改变环戊烷的环状结构, 例如前列腺素 A_1 对抗前列腺素 E_1 血清的交叉反应的百分率都没有改变, 与所用示踪物无关。

通过以上研究初步表明在前列腺素 E_1 中羧基受保护后, 只改变这部份的结构。而在前列腺素 E_2 中有 $C_5 \sim C_6$ 顺式双键, 妨碍了这部份结构的改变。而导致三种示踪物的性质是一样的。由于前列腺素甲基化物在水溶液中的情况在以前没有见到报告, 我们只能通过免疫反应的研究假定这些变化, 进一步的研究可能会证实这些结果。

(P. Nilsson-Ehle等: Biochim Biophys Acta 413(1): 139~146, 1976)

王海青译 田淑浩校

用 ^{99m}Tc 标记红血球的亚锡化物新药箱及其临床应用

脾脏扫描, 胎盘显象和红血球容量测定, 大多数是应用 ^{51}Cr 标记红血球, 近来则用 ^{99m}Tc 标记红血球来完成。 ^{99m}Tc 核子特点适宜于闪烁照像, 同时给病人的辐射剂量低, 因此可以进行反复的观察。

根据产额, 标记红血球的方法可分为三种: (1) Fischer 的方法(Fischer 等1967)是不使用任何还原剂; (2) 在加入 ^{99m}Tc 后加入还原剂(Eckelman等1971); (3) 预先处理的方法, 即在加入 ^{99m}Tc 之前加入还原剂(Berger和Tohannssen 1969; Nouel 和 Brunelle, 1970)。第三种方法产额最高, 超过95%。

我们描述的这个简单的方法属于第三种, 应用一种曾有人用过的(Bardy等1975)新的含亚锡还原剂-焦磷酸锡。

由于焦磷酸亚锡特别是在 pH 中性, 甚至在低浓度时的化学稳定性, 它比通常应用

的化合物(二氯化亚锡或枸橼酸亚锡)要优越, 为保持其优点, 它必须在氮存在下, 冰冻干燥贮存。

1975年, Bardy 等报导过红血球标记率与锡含量之间的关系: 在还原剂的量很小(<0.1 微克/2毫升血)时则标记率很低, 当还原剂的量很大时(1微克/2毫克), 需在加入放射性之前三次洗涤红血球以除去过多的锡。

红血球对锡的摄取必然是很低的, 小于0.5微克/2毫升血。在我们的实验中, 锡的需用量是0.3微克/2毫升。95次试验得到的标记率是96.5% (91~99%)

材料和方法

体外

还原剂由 C.I.S 的 Tck-11 号药箱供给。焦磷酸亚锡、焦磷酸钠和氯化钠的冰冻干燥