

聚乙二醇分离血浆中循环免疫复合物的几种放射分析法

苏州医学院附属第一医院 杨永青综述

江一民**审 刘文*

近几年来,由于免疫病理学的飞速发展,人们已经发现循环免疫复合物(Circulate Immune Complex,简称CIC)在许多良性和恶性疾病的发病机制中起着重要作用^(1,2)。CIC是抗原与抗体发生正常应答反应的结果。测定CIC的方法甚多。例如血小板凝集、冷沉淀、超速离心、抗补活性测定、光密度测定、单无性繁殖系类风湿因子固定、补体消耗分析、电子显微镜、免疫荧光、胶固素法、Raji细胞C₃受体测定和Raji细胞放射免疫分析法等18种方法⁽³⁾。现将利用聚乙二醇(Polyethylene Glycol,简称PEG)分离循环免疫复合物的几种放射分析法综述于后。

一、PEG的物理性质⁽⁴⁾

PEG是一种属多糖的棒状高分子,无电荷和中性的水溶性聚合物,分子式:HO(C-H₂CHO)nH。不同分子量的PEG其物理性质略有差异(详见表1)。

表1 不同分子量PEG的物理性质

分子量	外观	比重	熔点(℃)
190~200	液体	1.12	-25以下
300	白色粘稠体	1.12~1.13	-15~+6
400	白色粘稠体	1.13	4~15
600	半固体	1.13	15~25
1000	白色软质蜡状固体	1.15	35~40
3000~6000	乳白色酪状固体	1.19	53~56
5000~7000	乳白色酪状固体	1.19	58~62
9000以上	乳白色酪状固体	1.19	65~68

PEG溶于芳香族碳氢类有机溶剂,不溶

于脂肪族碳氢类有机溶剂,加热至300℃以上,聚合物即可分解,具有良好的化学药品耐药性;极易潮解且有较强的张力。

普通使用的分子量为6,000和12,000的PEG是乳白色酪状固体。Laurent等^(5,6)指出溶液中的蛋白质受PEG的空间排斥,使蛋白质的溶解度达到饱和或降低,从而使排斥的大分子蛋白质的量超过小分子蛋白质的量易于沉淀,并且这种分子量的PEG的沉淀指数与分子量呈反函数关系⁽⁷⁾,故不同分子量和浓度的PEG能够沉淀不同的蛋白质。最近Johansen等认为PEG具有抑制IC解离的作用,促使IC聚集成为更大的凝集物,从而发生沉淀⁽⁷⁾。

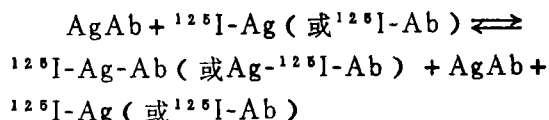
二、放射-聚乙二醇分析法检测CIC

(一)放射免疫沉淀——聚乙二醇分析法(Radio Immuno precipitation polyethylene Glycol Assay,简称RIPEGA)⁽⁸⁾。

RIPEGA是一种“多功能”的免疫分析方法,不仅可以检测抗原(Ag)和抗体(Ab),更可以检测CIC,且具特异性。

Santoro改进了Creighton和Lambert等人的方法,建立了RIPEGA。首先以3%PEG(w/v,分子量6,000,溶于0.1M pH8.4硼酸缓冲溶液中)沉淀血清中的CIC,再以放射性¹²⁵I标记抗原(¹²⁵I-Ag)或抗体(¹²⁵I-Ab)使之反应,形成¹²⁵I-Ag-Ab或Ag-¹²⁵I-Ab复合物,检测PEG沉淀的沉淀物中放射性,即得知特异性CIC的存在。以下列简式表示之:

*华北七所 **苏州医学院附一院



具体方法如下：经0.1 M pH8.4硼酸缓冲液稀释5、25倍的患者血清0.2ml与等量6% PEG充分摇匀后，离心（1,500g，20分钟，4℃）沉淀血清中CIC，尽量弃去上清液，3% PEG离心（1,500g，20分钟，4℃，洗涤沉淀两次，加入0.2ml¹²⁵I标记抗原或¹²⁵I标记抗体，25℃孵育4小时，然后加入7% PEG3ml 4℃过夜，离心（1,500g，25分钟，4℃），7% PEG，离心（1,500g，25分钟，4℃），洗涤沉淀一次，井型闪烁计数器测定放射性。结果以被沉淀的¹²⁵I标记抗原抗体（或抗原¹²⁵I标记抗体）复合物的百分数表示。且与三氯醋酸对照管进行校正。

三氯醋酸对照管的操作步骤：3ml 20%三氯醋酸中加入经0.1 M pH8.4硼酸缓冲液稀释5倍的正常人血清0.2ml，然后与0.2ml¹²⁵I标记抗原或¹²⁵I标记抗体（约1,000 cpm）混和，室温放置15~20分钟，离心（4,000转/分，30分钟，室温），测定总放射性和沉淀放射性。

患者血清最终结合率（%）

$$= \frac{\text{CIC沉淀结合率}(\%) }{{}^{125}\text{I标记抗原或}{}^{125}\text{I标记抗体标记率}(\%) } \times 100$$

RIPEGA具有方法简单、灵敏度好、快

速（PEG沉淀CIC，2小时后沉淀量即达高峰）、血液用量少和毋须特殊试剂等优点。

（二）¹²⁵I补体（C₁q）结合试验（¹²⁵I-Complement-C₁q-Binding Test，简称¹²⁵I-C₁q-BT）^{〔9〕}。

免疫复合物主要由IgG和IgM构成，这些抗体的Fc段上的补体结合部位都极易固定补体，且首先固定补体系统的识别单位C₁q^{〔10〕}。如果补体C₁q以放射性同位素¹²⁵I标记，则产生了¹²⁵I-C₁q-BT。

补体的合成部位尚不清楚，以C₁q的分子量为最大（410,000），电泳区域（r₂），碳水化合物（15%）。人血清中浓度100~200 r/ml，沉降系数范围9.5~10.7S（取决于离子强度、pH和温度），分子由三个共价和非共价结合的特殊链组成，如以0.1 M Tris、0.1 M NaCl、0.05 MEDTA、10%蔗糖、0.02%NaN₃（pH 8.6）缓冲液-40℃贮存1年，没有聚合的现象。据研究证明C₁在肠上皮合成，C₁q可能在脾脏、肝、肺和淋巴结中产生。电泳迁移率分析C₁q为r₂球蛋白。

1. C₁q的纯化^{〔11、12〕}

C₁q的纯化方法甚多，现将主要的一些方法列于表2。

一般来说，C₁q的纯度鉴定使用C₁q血清和抗人全血清进行免疫电泳。即使C₁q的溶血活性完全丧失，C₁q的免疫电泳特性仍不改

表 2

C₁q 分离和纯化的方法

具 体 方 法	作 者	C ₁ q回收率
1. 可逆结合至可溶性聚合人γ-球蛋白	Müller-Eberhard和Kunkel, 1961	
2. 可逆结合至固相人γ-球蛋白	Bing, 1971	不低于90%
3. 可逆结合至凝胶渗透和/或离子交换层析固相人γ-球蛋白	Assimeh et al, 1974 Lin和Fletcher, 1978 Kolb et al, 1979	57% 15~20% 25~40%
4. 优球蛋白沉淀	Yonemasu, 1971; Volanakis, 1972	68%, 40~45%
5. 优球蛋白沉淀、离子交换和凝胶渗透层析	Faul和Liberit, 1978	20~30%
6. DNA沉淀	Agnello et al, 1970	
7. 电泳、离子交换和渗透层析	Calcott和Müller-Eberhard, 1972	3~12%

变。 C_{1q} 的活性鉴定主要观察与凝集IgG致敏胶乳的能力。

2. C_{1q} 的放射性碘化^[13]

经修改后的Morrison^[14]方法,放射性碘化一般在0℃pH7.4等渗巴比妥缓冲液中进行,不出现叠氮化合物,全部试剂以等渗巴比妥缓冲液配制和冰冻条件下贮存, H_2O_2 使用时新鲜配制, $Na^{125}I$ 配制成0.1~0.4 $\mu Ci/\mu l$,为了保护试剂的活性,以BSA代替 C_{1q} 进行试剂分子比例的实验性碘化。在0.1M pH 7.0磷酸盐的条件下,改进的McConahey和Dixon方法^[15],碘化时氧化剂使用氯胺T, γ 闪烁计数谱仪测定 ^{125}I 或 ^{131}I 标记样品的放射性。

免疫电泳和自显影或蔗糖密度梯度超速离心和聚丙烯酰胺凝胶电泳测定标记物的纯度,通过特异性溶血活性和不溶性抗原-抗体复合物的结合能力决定生物活性。

具体方法如下:500~800 $\mu l C_{1q}$ (含200 $\mu g C_{1q}$),然后依次加入如下物质,5 $\mu l Na^{125}I$ (约500 μCi),5 $\mu l NaI$ (0.006mg/ml),5 μl 乳过氧化物酶(1mg/ml),5 $\mu l H_2O_2$ 3 $\times 10^{-3}\%$ (1:10,000)。冰浴中电磁搅拌15分钟,再加上10 $\mu l NaI$ (6mg/ml),10 $\mu l Na_2S_2O_3$ (0.03mg/ml)和2ml巴比妥缓冲液,而停止反应。4℃巴比妥缓冲液中透析20小时(4小时换一次巴比妥缓冲液)。纸层析和测定 ^{125}I 的利用率,适量巴比妥缓冲液稀释,分装,贮存于-70℃备用。

3. $^{125}I-C_{1q}$ -BT^[15]

首先将实验中使用的各种浓度的免疫反应剂0.2ml,加入0.2ml正常免血清,然后稀释至免疫反应剂浓度的1/20。0.2ml患者血清和0.2ml等渗巴比妥-盐缓冲溶液混和,随后各管加入50 $\mu l ^{125}I-C_{1q}$ (其中1 $\mu g C_{1q}/ml$),所有试验应作双份。然后25℃孵育60分钟和4℃孵育60分钟,再加入3ml PEG使最终浓度为2.5%。4℃放置2h。1,000g离心20分钟,弃去上清液,测量沉淀的放射性,PEG离心洗涤沉淀,非特异性沉淀不显著减少为准,以 $^{125}I-C_{1q}$ 沉淀的百分数表示结果。15~20%

三氯醋酸或聚合人IgG标准曲线进行校正。

实践证明此法具有敏感、微量、快速和重复性好之特点。国外已应用于血清免疫复合物的诊断,1977年世界卫生组织进行了推广,对免疫复合物疾病的研究起了很大的推动作用。局限性是保存血清和实验过程对温度的要求太严格,实验须在4℃下进行, $^{125}I-C_{1q}$ 非特异性地与变性IgG和其它IC结合,有可能增加 $^{125}I-C_{1q}$ -BT的沉淀率。这些有待今后进一步改进。

(三)解离-再合法(以血吸虫病循环免疫复合物为例)^[15]

解离-再合法检测血吸虫病循环免疫复合物中抗体的步骤如下:0.2ml血清的PEG沉淀,经3%PEG洗涤三次,蒸馏水中透析且冷冻干燥之,加入 ^{125}I 标记的血吸虫特异性抗原(10 μl ,10,000cpm),随后加入1ml 0.1M pH 2.8甘氨酸-HCl缓冲液,连续振荡15分钟,在加入0.1M pH 8.4的磷酸缓冲溶液之后,经pH8.0的硼酸缓冲生理盐水透析24h,以最终浓度为3%PEG沉淀,洗涤三次之后,并型闪烁计数器测定沉淀的放射性。

表3 ^{125}I -标记曼氏血吸虫抗原存在时,PEG沉淀CIC解离-再合法测定抗体的结果

组别	解离-再合法PEG沉淀的放射性(%)
对照组	
1	4.4
2	6
血吸虫病	
1	15.5
2	10.6
3	9.2
4	8

该法首先解离然后再合,可以消除各种干扰因素,避免了非特异性CIC的结合,增加了方法的特异性、可靠性和重复性。

三、结 语

PFG沉淀技术分离免疫复合物,具有方法

简单、选择性佳和不损伤蛋白质活性等优点，与放射免疫分析的某些步骤相结合，更增添了方法的灵敏度和特异性，为检测人体体液和组织中的免疫复合物开辟了一条新的途径。PEG沉淀的作用机理有待进一步研究阐明。

参 考 文 献

1. Barkas T :J Clin Lab Immunol 5:59, 1981.
2. Siag WM et al:Clin Immunol Immunopathol 24:186, 1982.
3. Lambert PH et al:J Clin Lab Immunol 1:1, 1978.
4. Staudinger H:Die Hochmolekularen Organischen Verbindungen, 287~332, Springer, 1960.
5. Laurent AC:Biochem J, 89:253, 1963.
6. Digeon M et al:J Immunol Meth 16:165,

- 1977.
7. Johansen AS et al :Immunology 41:695, 1980.
8. Santoro F et al:J Immunol Methods 15 :201, 1977.
9. 杨永青等:中华核医学杂志3:60, 1983.
10. Secombes CJ et al:Immunology 42:101, 1982.
11. Calcott MA et al:Biochemistry 11:3443, 1972.
12. Pohl DA et al:J Immunol Methods 36:31, 1980.
13. Heusser C et al : J Immunol 110: 820, 1973.
14. Morrison M: Immunochemistry 82:89, 1971.
15. Bout D:Immunology 33:17, 1977.
16. McConahey PJ et al:Int Arch Allergy Appl Immunol 29:185, 1966.

超声波、镓扫描和CT在诊断腹腔内脓肿中的作用

Moir C et al, Am J Surg 143 (5):582, 1982 (英文)

直到现在，外科医师在腹腔内脓肿的早期诊断中经常是有困难的。对症状和临床表现的估价极其重要。有时可从X线检查中获得脓肿的一些间接证据，如横膈的位置或运动有异常、或在钡剂检查时有胃肠道外形变形。早期诊断在降低发病率及死亡率方面极为重要，而以往的研究提示延误诊断伴有死亡率的增高。三种新的研究方法已变为可行，并对腹腔内脓肿的存在提供了更为直接的证据。本研究估价了超声波、镓扫描和电子计算机X线断层照相(CT)在诊断这些脓肿中的有关价值。

材料与方 法

对75例疑有腹腔内脓肿患者的病史作了回顾性复习。其中50例患者在近30天内有腹腔内的手术史，余25例中的大部份患者因炎症性肠病，少数因腹痛或不明原因的发热而入院。其潜在性疾病为消化性溃疡、穿透性损伤、阑尾炎、胃肠道恶性肿瘤、克隆氏病、溃疡性结肠炎、结肠憩室、肝胆疾患、胰腺炎、肾盂肾炎、及感染的血管移植。最常见的细菌为大肠杆菌、变形杆菌、肠球菌、脆弱类杆菌、克雷白氏杆菌、全葡萄菌及厌氧性链球菌。

患者的平均年龄是48岁、男/女为1.3/1。所有患者在临床上有对腹腔内脓肿进行研究的充分证据。在50例手术后患者中，42例有脓肿。平均于首次手术后的11天诊断出脓肿，早于以往通常对脓肿的检出天数。在未作手术的25例患者中仅6例有脓肿。

纵然有新的诊断和早期诊断方法，腹腔内脓肿仍然是一个有高发病率及死亡率的疾病。这些患者的平均住院天数为72天。23%的患者因脓肿而死亡。

除对所有的患者作了临床及实验室检查外，还单独或联合应用超声波、镓扫描或CT作了研究。有些患者作了多次检查。

结 果

在75例患者中共作了184次检查。大部份患者至少为2次，15例为3次。这些研究中的阳性及阴性结果和其它诊断见表1。三种检查都是可信的，尽管它们各自有着明显的不足。超声波为假阴性结果，可用镓扫描再次核对。镓扫描为假阳性试验的患者可进一步用超声波来作出评定。

敏感性及特异性见表2。超声波评定的敏感性提示有18%的脓肿患者可被遗漏，但其特异性表明只有