

放射免疫测定法的过去现在和将来

Ekins R

本文系Ekins在“第三届国际核医学会和核生物学大会”(1982年8月29日~9月2日在巴黎召开)上的演讲稿,因篇幅较长,仅节译其要点供读者参考。

第二次世界大战以后,放射性同位素在生物学重要物质的微量分析中的应用已成为核医学的重要发展之一。内分泌学是受到放射分析法影响最早和最深的医学分枝,但十年来这些技术已扩展到医学的其他方面,如病毒学、血液学、免疫学、肿瘤学等。后来又扩展到农业等其他领域,现在已建立了几百种生物学重要物质的放射性同位素测定法。

继血清胰岛素和甲状腺素的放射测定方法被采用之后,饱和分析技术在方法学和测定范围方面都取得了新的进展。许多实验室都努力改进“分离步骤”,验证生产优质抗血清的有关免疫技术以及建立数据处理所需的计算机程序等等。这些方法学的改进构成了一个巨大的文献宝库,其中许多方法在为常规诊断实验室提供技术方面具有很大的实际意义。

然而,有关饱和分析法设计的基本原理多年来一直争论不休,这种争论已成了医生们着手改进实验室日常工作以及发展放射免疫测定法的主要障碍。

【放射免疫测定法设计】误差可分为系统误差(偏差)和随机误差(不精密性)。偏差的典型原因是使用未正确校准的“标准”和“非特异性”抗体。而不

精密性则为吸取试剂时的随机变异或放射性样品测量误差所造成。

Berson和Yalow与我们的主要分歧就在于有关“灵敏度”和“精密性”的定义不同。Berson和Yalow主要考虑试剂浓度、试剂质量和理化特性等(如平衡常数、抗体纯度和标记物比活性等)对剂量反应曲线的影响。所以Berson和Yalow关于灵敏度的定义是:如果反应曲线的斜率大,该系统就更灵敏。如以R为反应变数(通常以结合分数b或B/F表示),以D代表剂量变数,则曲线斜率为 dR/dD 。对“精密性”的定义是: $db/a [H] / [H] ([H] \text{ 为被测物浓度})$,也可以表示为 $d(B/F)/a [H]/[H]$ 、 $db/d \log [H]$ 或 $d(B/F)/d \log [H]$ 等。而我们关于灵敏度的定义则为:如果某系统的检测下限小,该系统就更灵敏。换句话说,如果某系统的零剂量测量精密性越高,则该系统就更灵敏,因为测量下限主要决定于零剂量测量的精密性高低。我们的精密性定义是:测量反应变数为R时,“剂量”的估计“误差”便代表精密性,以 σ_D 表示之。这一物理量决定于剂量反应曲线和“误差”(如标准差)。

为7居里)。加速器生产的短半衰期核素如 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{18}F 、 ^{15}O 等,日本制钢所(JSW)、放医所、中野病院、东北大均做了许多工作。医学-物理研究所(Medical Physics Institute)有二台TCC-CS30加速器,为专门生产医用放射性核素用,生产的 ^{67}Ga 、 ^{201}Tl 、 ^{111}In 及 ^{123}I 定期发送全国各地,保证医院及时应用。放射免疫试剂盒(Kit)全国约有50余种,有些垂体前叶蛋白激素与国外公司(RCC、Abbott公司等)合作联营,以保证配套供应。Dainabot公司松户第二工场,系专门生产RIA试剂盒,目前经营19种(其中6种与美国Abbott公司联营),工场中配有医学专家、对质量有较严格要求,每批产品的质控数据经微处理

机储存,随时可以检索。日本全国有13家厂家经营放射性药品,其中5家属制造商。放射性药品的研制与开发受到重视,其研究方向如下:①血液成分的标记;②人体成分(酶、细胞膜、细胞内成分,血中某些代谢产物等);③人体代谢过程研究, ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 标记物制备(精神病生化-核医学分支);④单克隆抗体标记CTG、黑色素瘤、CEA、AFP、胰胚抗原;⑤受体标记与某些物质(药物)标记;⑥特定脏器显象剂的研究(脑、心、胆、胰腺)等。总之,日本放射性药品的研制和生产是和核子仪器的发展相适应的,这就有可能为日本临床核医学向新的世界先进水平迈进,创造了必要的条件。

我们将测量的随机误差概念引入了实验设计。不引入这种误差,任何有关实验设计和操作的结论几乎都是没有意义的。例如在RIA系统中,抗体最适浓度应为多少才能获得最大的测量灵敏度呢?图1和图2是在一典型的RIA系统中使用不同浓度抗体所得的理论剂量反应曲线,从图1看出,当使用能结合35%标记抗原的抗体浓度时,得到最大斜率(零剂量)的曲线。根据Berson和Yalow的定义,这一抗体稀释度必然会产生“最大灵敏度”。但也应看到,若假定反应变数的“误差”(变异系数)恒定,当抗体浓度接近零时,探测下限降低。

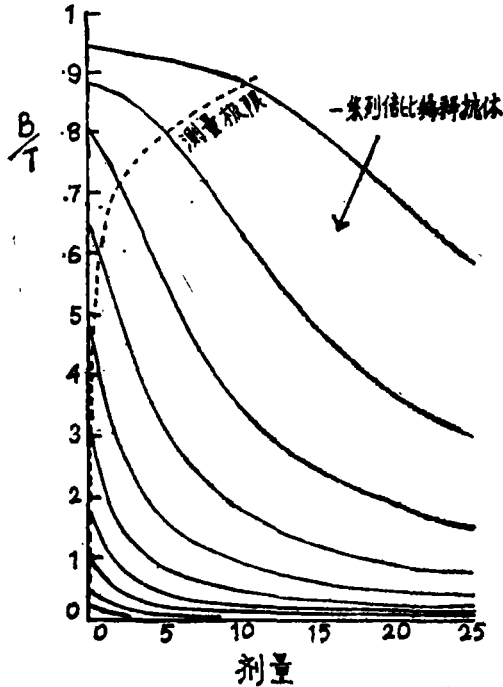


图1 利用一系列倍比稀释抗体做的“结合分数”对被测量剂的剂量反应曲线

另一方面,如果将完全相同的数据绘制成反应变数 $1/b$ (即 T/B) 或 F/B 的图(即图2),就会得到完全不同的结论。可以看到,当抗体浓度接近零时,反应曲线的斜率增加。

因此,如果不用统计学检查方法学变化对于测量误差的影响,将无法确定方法学变化的意义;如果不知道测量反应变数时统计误差,就不能评价何种抗体浓度可使测量下限最小。例如,假定测量结合分数时的误差(变异系数)保持在10%不变,图1和2图的虚线则表示抗体浓度变化引起的测量下限的变化。此时必然得出这样的结论:当抗体浓度接近零时,测定系统最灵敏(Ekins等定义)。况且,这一结论完全与剂量反应曲线的绘制方法无关。

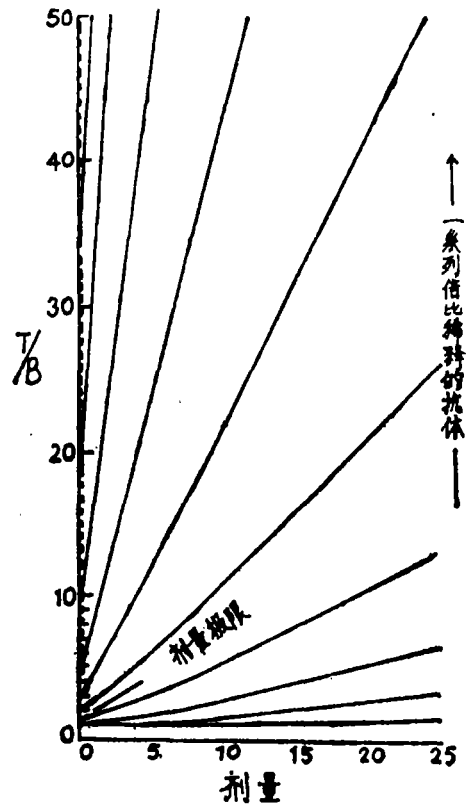


图2 此图数据与图1相同,但纵轴为结合分数的倒数 T/B

自然,这种结论实际上是不现实的。当 $[Ab] \rightarrow 0$ 时,结合分数必然也趋近于零,因此结合分数的变异系数必定增加。这再一次指出,必须确实知道测量系统的误差特点,否则,科学地选择一个产生最大灵敏度的抗体浓度是完全不可能的。

最近有一篇文献报道不同的缓冲液引起了灵敏度的变化,作者根据图3的结果宣称pH7.5的巴比妥缓冲液最好(就灵敏度而言)。如果将相同数据改绘成图4,纵轴变成 F/B ,则依靠曲线斜率得出的结论与原作者的结论就完全相反。当然,两种结论都是不恰当的。只有提供了不同实验系统的“误差结构”的统计数据,才可能达到完整的、科学的结论,即什么缓冲液,什么pH值可产生最大灵敏度,因而也最适用。

为了避免类似错误,数年前我引入了“精密度分布”(Precision Profile)这一概念。也就是说,把统计学概念体现在一个简单的、非数学的图示中(如图5)。图中零剂量测量的标准差(SD_0)可定义为测量下限(灵敏度)。变异系数(c.v.)“分布图”可用来规定测量的“工作范围”,在这个范围内,剂量测量的变异系数是可接受的。

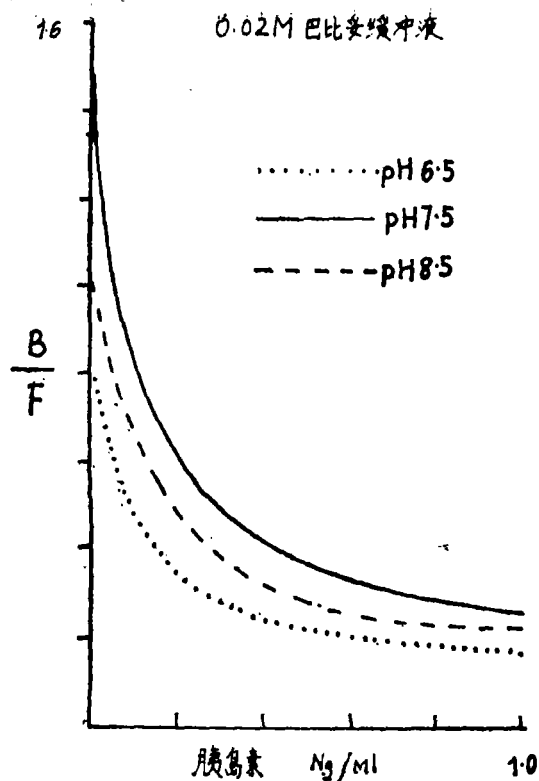


图3 pH值对剂量反应曲线的影响

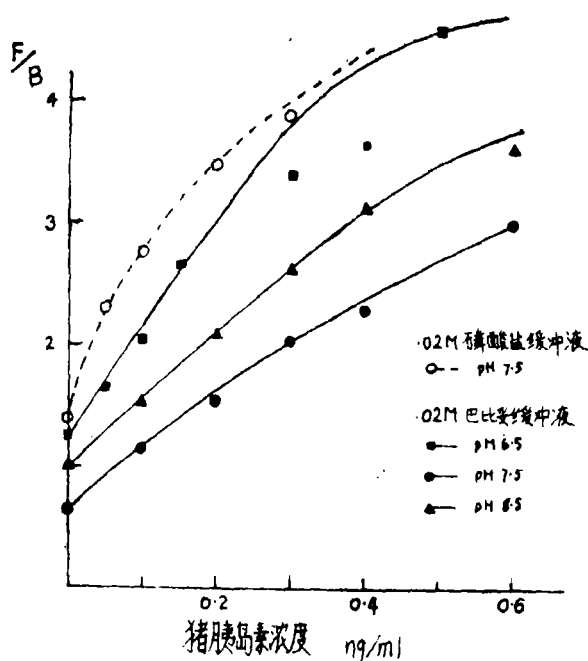


图4 此图数据与图3相同，但将B/F换成了F/B

图6为促甲状腺激素两种商品药盒的精密分布图，药盒C在0~16mU/L范围内较精密，药盒D在16 mU/L以上范围内精密好。根据精密分布图完全有

理由说药盒C比药盒D更灵敏(即测量下限较小)但是人们关心的是正常人和甲低病人的鉴别阈值。假定两个药盒的其它效果特点相同，人们将根据正常与甲低两组分界值(5 mU/L)左右的良好精密度来选定药盒。

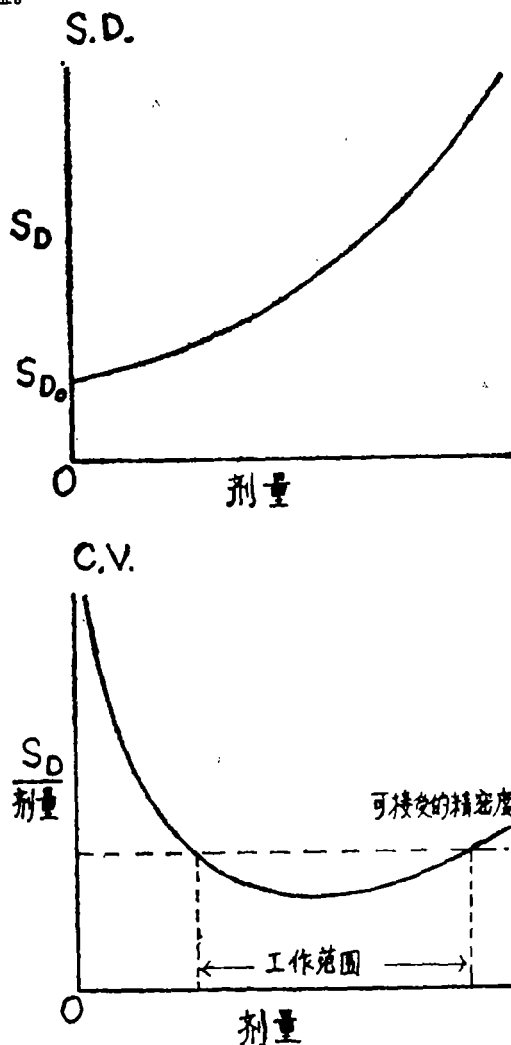


图5 精密度分布图

【目前的发展】前面介绍了过去20年影响放射免疫测定领域的某些误解和争论。需要了解免疫测定技术的理论和统计学基础的原因有两个：第一，没有这种了解，医生们则用那些没有正确逻辑基础的教条来指导他们的实验工作。其结果，实验室工作的质量必受损害。每一个实际的免疫测定工作者都是实验的“设计者”，他们的每一项决定必然影响分析结果的“准确性”。第二个原因是，只有清楚地理解这些分析技术的理论基础，才能正确地评价这一领域中现在和将来的发展。现以免疫测定法领域中最近的三项发展来说明掌握放射免疫分析技术的理论基础的重要性。这

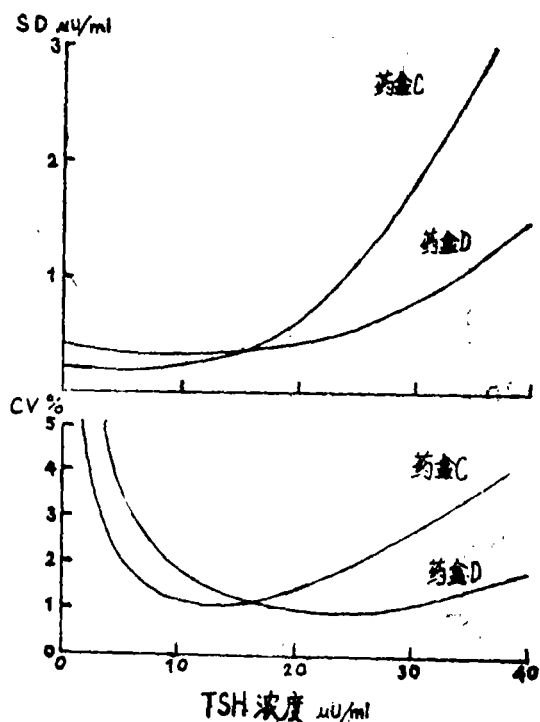


图6 两种TSH商品药盒的精密性分布

三项发展是:

1. Kohler和Milstein 首创杂交瘤单克隆抗体制备法的问世。
2. 非同位素免疫测定法的继续探索。
3. 直接“游离激素”免疫测定法的建立。

从单克隆抗体到非同位素免疫测定法:

放射测定法基本上有两种分析原则:(1)观察标记被测物在“游离的”与“抗体结合的”两部分间分布的技术,叫做标记被测物法,也叫做“饱和分析法”、“竞争放射分析”、“放射免疫测定法”和“竞争性蛋白质结合分析法”等等。(2)观察标记试剂在“游离的”和“被测物结合的”两部分间分布的技术,一般名之为“标记试剂法”、“标记抗体法”,或“免疫放射测定法”(IRMA)。用标记抗体做为标记试剂,始于60年代末Miles和Hales,以及Wide等。

关于两类方法的相对分析效能(灵敏度、精密度和交叉反应等)的理论分析,基本上要考虑两点,即被测物(抗原)和特异试剂(抗体)间的质量作用定律和每类方法常见的统计误差。现在虽然不可能从整体上描述质量作用定律和每种方法“误差结构”的相互关系,但还是要适当谈谈某些一般结论,以证明单克隆抗体制备方法和各种非同位素标记法的重要性。

简言之,在两类方法中,假如测量的是结合在抗

体上的标记抗原(RIA法)或结合在抗原上的标记抗体(IRMA法),则达到最大灵敏度的最适抗体浓度,在RIA法趋近于零,在IRMA法趋近于无穷大。这种一般性结论在固相RIA法和“夹心法”IRMA中非常明显。但这只是在假定标记物的比活性为无穷大以及非特异结合为零时才是如此。实际上这种假定永远不能成立。

这一概括性结论指出了可能达到的最大灵敏度和达到最大灵敏度所需要的温育时间。在标记抗原法中,温育时间必定向无限长方向延伸,可达到的最大灵敏度(最小测量下限)为 e/K (e 为测量结合标记抗原时的相对误差, K 抗原-抗体反应的平衡常数)。在标记抗体法中,由于抗体浓度趋向无穷大,温育时间则趋近于零,其灵敏度极限在很大程度上决定于非特异结合($n.s.b.$, 抗原为零时结合的标记抗体量)的大小,当 $n.s.b.$ 为零时,此类方法的最大灵敏度可接近一个分子。

因为抗原-抗体反应的平衡常数很少超过 $10^{12}L/M$,假定RIA的 e 不小于1%(即 $e=0.01$),则RIA的最大灵敏度永不会小于 $10^{-14}M/L$ (即约 10^7 分子/ml)。也就是说IRMA法理论上灵敏度为RIA的7个数量级。

图7指出了有关两法相对灵敏度的几点重要结论。第一,使用比活性为无穷大的标记物时所能达到的“潜在”灵敏度与所用抗体的平衡常数有关。利用平衡常数并给实验误差 e 和非特异结合,假定两个合理的数值而形成两个最佳化的测定系统,这样就可分别推算出RIA和IRMA的“潜在”灵敏度曲线。显然,标记抗体法的“潜在”灵敏度较标记抗原法高很多。图中曲线表明,当所用抗体的平衡常数为 $10^{12}L/M$ 时,RIA法的极限灵敏度为 10^7 分子/ml,而IRMA法为 10^3 分子/ml(从图中看是 10^5 分子/ml——译者)。

第二,图7还绘出了在测量时间合理(1~10分/样品)时,使用 ^{125}I 标记物所得到的灵敏度曲线。显然,由于比活性的限制,“实际”灵敏度与“潜在”灵敏度之间有一个“差距”(即阴影部分)。差距的大小决定于抗体平衡常数和所用的方法(RIA或IRMA)。若所用抗体的 K 值小于 $10^{12}L/M$,当使用 ^{125}I 标记物于RIA时,灵敏度损失不大(与潜在灵敏度比较)。当使用 ^{125}I 标记物于IRMA时,若抗体 K 值为 $10^{12}L/M$,可看到灵敏度较潜在者减少很多。当抗体 K 值大于 $10^{12}L/M$ 时,若使用 ^{125}I 标记物于IRMA,可见灵敏度改善很少。

从图8(e 和 $n.s.b.$ 的设定值均与图7相同)可以看到,当所用抗体 K 值在 $10^{10} \sim 10^{12}L/M$ 之间时,IRMA

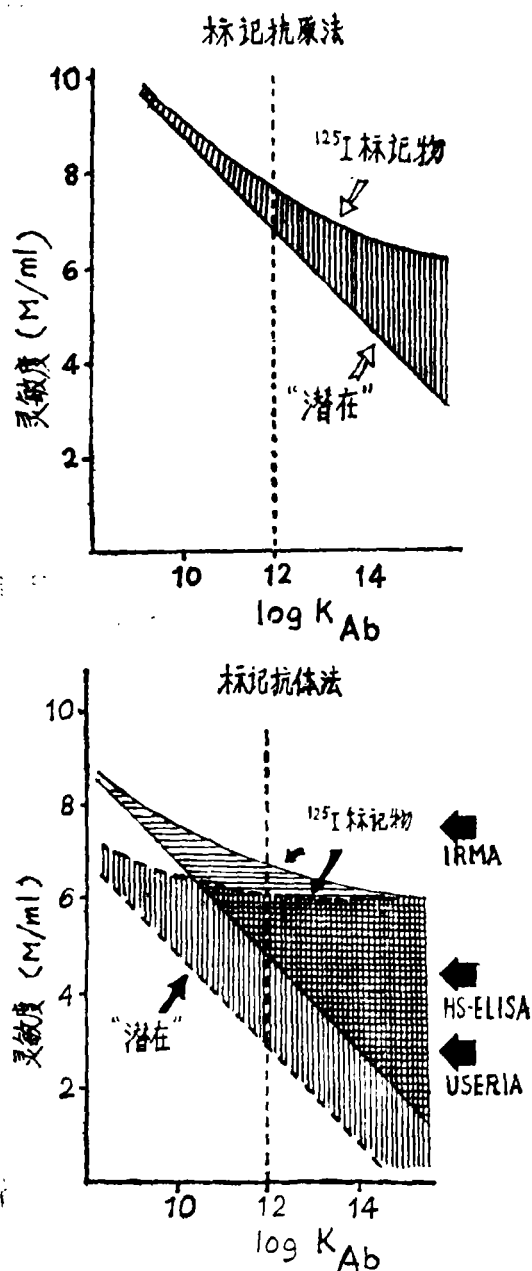


图7 HS-ELISA——高灵敏度酶联免疫吸附测定法，此处具体指利用产生荧光底物的一种酶标抗体法

USERIA——超灵敏度酶标放射免疫测定法，此处具体指利用放射性同位素标记底物的一种酶标抗体法

的灵敏度大致为相应RIA的10~20倍，使用低亲和力（K值低）抗体于IRMA时，其灵敏度与使用亲和力高2~3个数量级的抗体于RIA时的灵敏度相当。

这些理论推论虽然是建立在控制探测极限的某

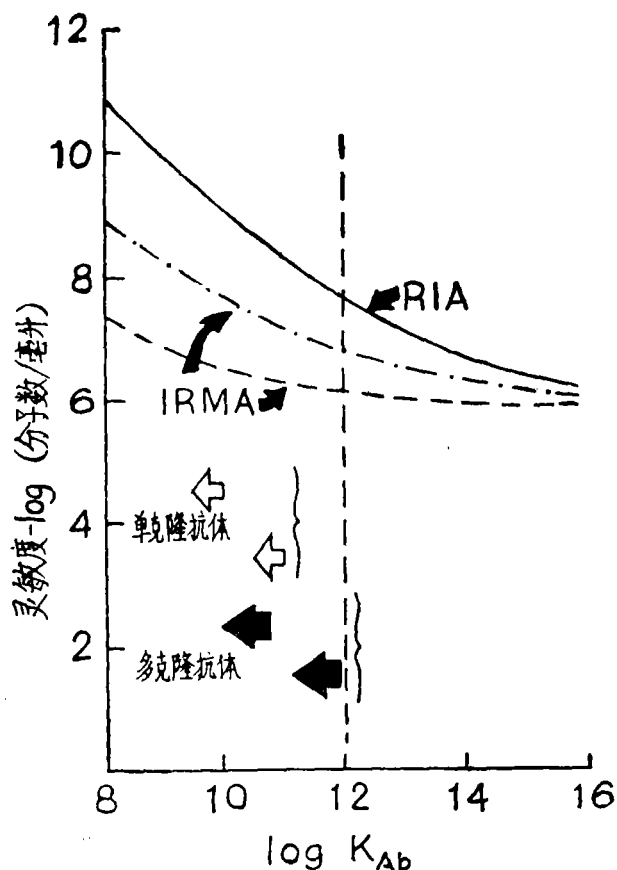


图8 宽箭头表示最好的多克隆抗体和单克隆抗体的平衡常数的大小

些假定参数值上的，而且图7也仅仅表示灵敏度和平衡常数间的定性关系，但世界许多实验室的实验结果都支持上述图解概念的正确性。例如，已经报告过的RIA和IRMA的灵敏度，都未超过图中所示限度。以非同位素标记的标记抗体法（如HS-ELISA和USERIA），据称都比通常的RIA和IRMA法的灵敏度高很多。共同的经验还表明，以 ^{125}I 为基础的IRMA的灵敏度约为相应RIA的10倍左右。最近有报告指出，用同一单克隆抗体比较了两法，指出IRMA的灵敏度较高，但此文的数据还不足以确证图7的理论预测。

图7还说明了其他重要结论，第一、要想超过目前RIA和IRMA的灵敏度，唯一途径是使用比 ^{125}I 有更高比活性的标记物。第二、利用高效“分离系统”可降低标记抗体的n.s.b.,从而提高IRMA的灵敏度。

单克隆抗体制备技术的一个特殊优点是这种技术可以制备相当大量的抗体，而且抗体较纯、质量相同（特异性），为发展标记抗体技术提供了理论基础。

抗体不受限制的供应,在这一技术中特别重要,因为每一样品都要用较大量抗体。标记抗体的纯度在这一技术中也很重要,因为标记杂质可使n.s.b.增加,从而损害测定的灵敏度和特异性。总之,不管是否还有其他优点和不足之处,单克隆抗体为建立在灵敏度和操作速度上超过RIA的新一代免疫测定法提供了基础。

然而,依赖放射性同位素标记物是无法实现标记抗体法的全部潜力的。图7中所以有较宽的灵敏度“差距”,是因为 ^{125}I 的衰变率低。若假定每个抗体分子只标记一个原子碘,那么欲产生与本底有明显差别的计数,标记抗体的最小分子数为 $10^6 \sim 10^7$ 之间,这也就是放射性同位素标记抗体法的最小可测量。

有许多办法可以克服比活性对测定灵敏度的束缚。首先是使用酶标记物,它有“分子放大器”的功能,因为一个酶分子可以催化适当的底物转变为成千成万的产物分子,这等于使标记试剂的比活性极大地增加了。图7介绍的两个高灵敏度测定系统中,那个名为USERIA的放射标记系统便是一个非常简便易懂的例子。

其他标记物也可能产生比放射性同位素高得多的有效比活性。例如化学发光标记物在进行化学反应后可发射光子。若适当调节反应条件,可使化学发光标记抗体分子在一定时间内全部进行反应,即每一个标记抗体分子都发出一个信号(量子效率暂不计)。

在所有非同位素标记物中,荧光标记物是最有希望的,可使测定系统的灵敏度和其他效能特点超过放射性同位素的免疫测定方法。其基本的物理说明是:荧光分子当对外部能量输入有反应时,产生许多个别“信号”(光子),比活性值(即单位时间内单位重量的标记物产生的可测信号的数目)较 ^{125}I 大数百倍或数千倍。

本实验室正与仪器制造厂商合作,开发一种使用螯合稀土金属荧光体的新方法,螯合物分子吸收入射光的光子,经过内部能量转移,由被螯合的稀土金属原子发出荧光光子,后者为探测器所收集,测量一定时间。

游离激素的测定法:

已知生物体液中存在着许多激素和其他物质,它们多与蛋白质结合,仅有一小部分是游离的。一般认为游离部分是有生物活性的,因此游离部分理应成为分析家的目标。这种新技术反映一种全新的分析概念,它可以被描述为一种“环境被测物浓度”的直接测定。这种技术的一个主要特点是测定与样品体积无关,也就是与已知体积样品中的被测物总量无关,而主要与被检体液中被测物的浓度有关。

这种新型免疫测定法的理论基础可能是:如果将微量固相化抗体加入到生物体液中,并假定抗体结合力与样品中被测物总量相比是很小的(即只有微不足道的一小部分被测物可结合到抗体分子上),此时样品中被测物浓度不会发生显著改变。容易证明,抗体结合部位的被占程度为样品环境被测物浓度的函数,即:

$$\frac{Ab}{Ab_0} = \frac{[H] K_{Ab}}{1 + [H] K_{Ab}} \quad (1)$$

其中, $\frac{Ab}{Ab_0}$ 表示抗体结合部位被占分数
 K_{Ab} 表示抗体结合部位平衡常数

这与使用温度计测量室温的基本概念非常相似。比如,放一温度计于室内,温度计吸热,因而干扰了室内原有温度。假定房子的热容量和热含量与温度计者相比很大,那么温度计记录的温度基本上反映了原来的室温。同理,放入体液的抗体探针的结合部位的被占程度,在某种条件下也反映体液中原有被测物的浓度。

本实验室于1978年最早建立了血清中游离激素浓度的直接测定法,并独立地使用了商品游离 T_4 测定箱。

游离激素直接测定法的理论基础可表述如下:

在平衡未被干扰条件下,血清中游离激素浓度为:

$$[fH]_e = [H] - [fH]_b \sum_i^n \frac{K_i [P_i]}{1 + K_i [fH]_b} \quad (2)$$

$[fH]_e$ = 平衡状态下的游离激素浓度

$[H]$ = 激素的总浓度

K_i = 第i个结合部位的平衡常数

$[P_i]$ = 第i个结合部位的浓度

在将特异抗体直接加入血清中之后,建立了新的平衡,此时游离激素浓度为:

$$[fH]_{Ab} = [H] - [fH]_{Ab} \sum_i^n \frac{K_i [P_i]}{1 + K_i [fH]_{Ab}} - \frac{[Ab]_0 [fH]_{Ab} K_{Ab}}{1 + K_{Ab} [fH]_{Ab}} \quad (3)$$

$[Ab]_0$ = 抗体总浓度

假定结合于抗体部位的激素量与 $[H]$ 比较很小(即约1%以下),则

$$[fH]_e = [fH]_{Ab} \quad (\text{近似}) \quad (4)$$

因此,平衡建立后抗体结合部位的被占分数为:

$$\frac{Ab}{Ab_0} = \frac{[fH]_{Ab} K_{Ab}}{1 + K_{Ab} [fH]_{Ab}}$$

抗体结合部位的被占分数可用不同方法测定之。下面仅介绍“两步被测物反滴定”技术。抗体可连接在纤维素,葡聚糖凝胶或塑料管上。

方法中所用抗体应具有与被测物的“最适”亲和

力(平衡常数)。亲和力太高,意味着全部结合部位被占,而谈不到环境激素浓度。亲和力太低,导致灵敏度和精密度降低。这种技术绝对需要非常高比活性的标记物,因为可用的抗体其结合部位的浓度一般都比较低。然而,由于此处无暇谈及的原因,血清游离甲状腺素的测量并不迫切需要非常高比活性的标记物,这是个特例。

游离激素测定法很可能在内分泌疾病(如甲状腺和类固醇激素的疾病)的临床诊断中起重要作用。这一新技术也可能用于检查血清和其他体液中蛋白激素和有关结合蛋白的相互作用。这些发展可能随之又使人们特别注意于激素运输和转递的机制上,这一争论已久的问题再一次在内分泌学家中引起相当的兴趣和讨论热潮。

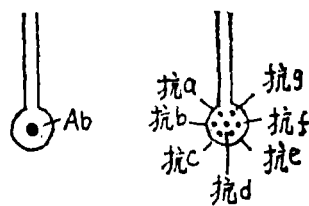
【将来】

单克隆抗体生产技术的问世表明,抗体将逐步取得标准化学试剂的地位,如有必要还可能进一步进行化学改造以应某种测定法之所需。单克隆抗体除了可提供高特异性外,还可成为20年来已大大减色的“标记试剂法”复苏的基础。

非同位素标记物的开发导致了所谓无分离测定法

(或均相测定法)的出现,后者的灵敏度虽不算高,但用来测定体液中高浓度物质时有许多优点。在一个适当的塑料表面上“打印”不同的抗体,然后放入含有许多被测物的液体中,每种抗体部位的被占分数便反映液体混合物中某种被测物的浓度。这种技术所用的标记荧光物具有非常高的比活性。探针表面上与不同抗体相对应的荧光的分布,可用一种脉冲激光荧光计来扫描。为了同时监测血中各种物质,对这种分析手段的需要将日益迫切,而荧光免疫测定法必将使这种想法成为现实。

简单免疫计



多种激素测定免疫计

图9 未来的免疫测定法?

(林 汉节译)

诊断核医学中辐射吸收剂量的计算

Robertson JS; Int J Appl Radiat Isot 33: 981~990, 1982 (英文)

本文扼要的评述了核医学中放射性药物的应用,概述了MJRD(医学内照射剂量)法计算体内分布的放射性核素的辐射吸收剂量。从文献中摘录出与现行核医学检查有关的剂量估算方法和计算结果。

引言

在诊断核医学中使用了各种放射性药物,尤其是 ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{123}I , ^{131}I , ^{127}Xe , ^{133}Xe , ^{111}In 和 ^{201}Tl 的一些标记化合物,目前正广泛地用于扫描或闪烁照相。用现代的探测仪器,使用安全吸收剂量的放射性量便能得到满意的图象,且有好的计数统计结果和空间分辨率。核医学中常见的辐射剂量,与普遍认为安全的X射线拍片检查相比较,其大小在同

一数量级上。在核医学中,辐射剂量几乎总是根据测量结果或其他放射性分布的估计而计算出来的。

放射性药物

辐射剂量除了与所使用的放射性核素有明显的关系外,还和标记物的药物代谢动力学,患者的病理生理状况有着密切的关系。例如,甲状腺摄取放射性碘就受到排泄碘的肾功能的影响。 ^{99m}Tc 已是核医学领域内应用最广泛的放射性核素。它的140KeV γ 射线,使