

有可能取代价格昂贵的 ^{201}Tl 。尽管目前所用的含 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的药物的动力学与 ^{201}Tl 完全不同,但所获得的资料证明是有用的。

另一个活跃的研究领域是门控心血池研究(放射性核素心室造影),这个方法可以用计算机获得有关功能时相和大小的显象,这些图象是由心室造影的各个影片式平面的所有空间和时间信息转换而来。这种非损伤性技术提高了我们探测过去不明显的心脏功能细微变化的能力,例如在冠心病的检查中对Wolff-Parkinson-White综合征(预激综合征)旁路的定位和预防doxorubicin的心脏毒性反应。当前,使用这种技术作心舒张期功能研究可能产生与心收缩期功能射血分数测量有同样重要意义的资料。

四十年前最早使用的一种放射性核素,使内分泌学受益非浅,即用 ^{131}I (最近用 ^{123}I)作定量放射性碘吸收试验。现在核内分泌学正在为肾上腺和甲状旁腺疾病提供新见解。几年来多用碘甲基降胆固醇对肾上腺皮质机能疾患显象。当前使用一种儿茶酚氨类似物—— ^{131}I -间碘苄胍探查可疑的嗜铬细胞瘤,特别是那些占10%的转移恶性肿瘤。间碘苄胍还可以成功地探查成神经细胞瘤、副神经节瘤和类癌瘤等。

早些时候甲状旁腺核素显象由于缺乏适当的放射性药物已废弃不用。然而,静脉注射 ^{201}Tl 能较好地集中于甲状旁腺(及甲状腺),因此用计算机减去 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 过锝酸盐的甲状腺影象

后,在颈部和胸腔纵隔甲状旁腺瘤的术前定位检查中其灵敏度至少可达80%。

一种新的测定骨密度的技术是应用 ^{153}Gd ,这对诊断骨质疏松症是一大贡献。迄今为止,测定骨的无机物的有效技术是应用单光子(^{125}I)密度测量法,这种方法只能测腕关节皮层的骨质,而骨质疏松症主要发生于脊椎骨。实际上,65岁以上妇女1/3有脊椎骨压缩性骨折,下腹部和腰椎部分的软组织和骨骼导致的发射双光子 ^{153}Gd 的衰减(作为一种外放射源)可以被准确计算出来。这种技术对骨髓的辐射剂量仅为脊椎骨计算机断层时剂量的2%。从而可以预期,双光子吸收剂量在诊断骨质疏松症和监护这种疾病的治疗中将成为广泛应用的技术。目前,这一技术正扩大应用于髓骨无机物的评价。

用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N-乙酰苯胺-亚氨基二乙酸作肝胆疾病研究,其特异性之高已得到越来越多的公认。因而假如用于胆囊显影,则有97%的急性胆囊炎可以排除。这种放射性药物在总胆管吻合术检查中,在决定扩张输胆管的功能意义中,以及在胆汁漏出的探测方面均显示有较大的价值。

食管能动性的定量、应力骨折的高灵敏探测、低剂量直接膀胱造影、在各种疾病中支气管对吸入气溶胶的渗透性研究,以及胃肠道出血位置的定位等,是核医学新诊断方法的其他几个重要的应用例子。

[何宗秀 节译 林 汉校]

免疫放射分析法

Baker TS et al; In "Alternative Immunoassays" p59~76, 1985(英文)

一、引言

1968年, Miles和Hales提出了免疫放射分析法(Immunoradiometric assay, IRMA),他们从理论上阐述了IRMA优于放射免疫分析法(Radioimmunoassay, RIA)。近年来, IRMA

的优点被一一证实,并开始用于常规分析。

1. RIA与IRMA的不同

在RIA中[图1(a)],待测物与放射性标记待测物(示踪物)竞争有限的抗体结合位点,故抗体结合的示踪物量与待测物浓度呈反比关系。在IRMA中[图1(b)],抗体是过量的,并

带标记同位素,故结合的标记抗体量与待测物浓度呈正比关系。Miles和Hales提出的IRMA〔图1(b)〕用加入过量固相待测物(免疫吸附剂)的办法除掉剩余的标记抗体,含结合抗体的上清液用于计数。

待测物 + 示踪物* + 抗体 → 待测物 - 抗体
+ 示踪物* - 抗体 + 待测物 + 示踪物*

(a)

待测物 + 标记抗体* → 待测物 - 标记抗体*
+ 标记抗体*

(b)

图1 RIA(a)和IRMA(b)的原理

后来,Addison和Hales(1971)提出了两位点IRMA。该法用偶联于固相的第一抗体从溶液中“萃取”待测物,再加入带放射性标记并能识别待测物上另一个抗原决定簇的第二抗体,故结合到固相上的标记物与待测物浓度呈正比关系(图2)。因结合复合物是固相,剩余的游离标记物很容易除掉。两位点IRMA显然只能测定在不同位点上能同时结合两个抗体的大分子物质。在实际应用中,它也出现了“混加”法(Inclusive assay,即两种抗体同时加入)及“反加”法(Reverse assay,即待测物先与标记抗体反应,后加固相抗体)等其它形式。

固相 - 抗体1 + 待测物 → 固相 - 抗体1 · 待测物

固相 - 抗体1 · 待测物 + 标记抗体2* →
固相 - 抗体1 · 待测物 · 标记抗体2* + 标记抗体2*

图2 两位点IRMA

2. 限制IRMA推广的因素

IRMA迟迟没有推广的主要原因是标记抗体制备在未采用单克隆抗体(Monoclonal antibody, McAb)前较困难。IRMA使用过量抗体,对纯抗体的需要量很大,如采用多克隆抗血清,则需经免疫纯化,其难度较大。

3. McAb的作用

McAb解除了多克隆抗血清对IRMA的约束,为放射性标记及固相制备提供了可靠的、

无限的物质来源。从腹水或组织培养中可获得毫克级的纯化McAb。

二、IRMA的优点

采用McAb的两位点IRMA较RIA有许多突出的优点:(1)标记容易;(2)反应速率较快;(3)灵敏度提高;(4)工作范围扩大;(5)特异性较高;(6)稳定性提高。现详述如下:

1. 放射性标记

RIA抗原的放射性标记困难较多。它需要纯的均一抗原,而生物物质常常本来就不均一,纯化及贮存条件也会影响抗原的均一性。有了合适的抗原后,标记时应不损失其免疫活性。由于化学及放射损伤,碘化时可能增加不均一性而损害方法的灵敏度。因此,就纯化材料及实验时间来说,RIA抗原的放射性标记代价较高。

IRMA标记抗体,超免疫动物血清中特异性抗体占免疫球蛋白部分的比例小于5%,故多克隆抗血清需经亲和纯化后才能用于制备纯标记抗体。

McAb可用标准方法进行纯化,如DEAE离子交换纤维素层析、A蛋白-琼脂糖亲和层析及高效液相层析(HPLC)等。并非用了McAb就能保证纯度。实际上,腹水中常含很多非特异的小鼠免疫球蛋白及转铁蛋白(它们较易除掉)。除非用全合成培养基,否则杂交瘤组织培养上清液中也会含一些反刍免疫球蛋白。杂质标记对IRMA的非特异结合(NSB)影响较大,当标记物的总量增加时,NSB就会增加。为了使信号噪声比达到最大,应使用高度纯化的标记物。

McAb可用氯胺T等碘化而不损失免疫活性,产物也较稳定。提高标记抗体的比活性可提高灵敏度,但当每个IgG分子上引入的¹²⁵I原子数超过两个时,其免疫活性会迅速下降,因此两者应该兼顾。

2. 反应动力学

根据质量作用定律,过量抗体可使抗体-抗

原结合反应迅速完成。采用多克隆抗血清的RIA及IRMA的反应较复杂,而McAb-单个抗原决定簇的反应动力学较简单。采用过量McAb的IRMA其反应时间为2~3小时,而采用多克隆抗体的RIA则需1~3天保温才能达到平衡,故IRMA可在一天内处理完样品,便于临床常规使用。

IRMA采用过量抗体还有别的优点,有时用较低亲和力的McAb就能获得满意的结果,而它在相应的RIA中只能得到中等结果。

3. 方法灵敏度

RIA的灵敏度取决于实验误差及抗体结合亲和力的倒数。两位点IRMA的灵敏度则取决于标记抗体的比活性、亲和力(较小程度取决于固相抗体亲和力)及NSB。标记抗体的亲和力主要决定剂量反应曲线的位置,亲和常数越高,曲线越移向低浓度待测物。

(1)信号噪声比:信号(由待测物决定的计数率)是标记抗体比活性和 γ 计数器效率的函数。噪声(与待测物无关的计数率)取决于计数器的本底信号及标记抗体的NSB。

RIA使用有限量抗体,因此只有一小部分待测物参加反应。IRMA使用过量抗体,故全部待测物都参加信号发生。这一点在待测物浓度较低时很重要,它对提高IRMA的灵敏度有一定作用。当参加保温的标记抗体量增加时,灵敏度也增加。如果NSB能减到零,则用极大量标记抗体就能获得最佳灵敏度。但增加抗体量也会使NSB增加,故最佳条件须经实验权衡两者后确定。

RIA的NSB高,损害其工作范围高限;IRMA的NSB高,影响其工作范围低限,故降低NSB可改善IRMA的信号噪声比及灵敏度。根据此特性,设计者可用有效的分离方法提高灵敏度。

(2)对分离方法的要求:分离手段的效率是影响非均相分析结果的重要因素。这对IRMA尤其重要,它使用过量标记抗体,标记物分得不清会增加其NSB,从而降低其灵敏度。

(3)固相:两位点IRMA把一种抗体联接于固相,经洗涤后,即可除掉游离标记物。可用的固相种类很多,较普通的是塑料(试管、微量滴定板、蘸棒及单个聚苯乙烯珠),抗体通过非共价结合粘附其表面。但它们的结合容量有限,批间变异较大,非共价键不稳定,涂敷抗体易脱落。分散的细颗粒,如微晶纤维素、玻璃等也可作为固相,它们的结合容量较大,使用共价联接后,与抗体结合较稳定。

介于上述两者间的是中等大小颗粒,如Sephadex、Sephrose及Sephacryl。它们为多孔物质,共价联接抗体的容量较大,但沉降较快,在保温时需搅动。

(4)分离方法:游离及固相结合部分的分离方法随所用材料而不同。涂抗体的试管、小珠或微量滴定板用反复洗涤的办法,当样品多时它们较麻烦。细颗粒需反复离心及在洗涤液中悬浮,也相当麻烦。最近使用了磁性颗粒,它在外加磁场内能沉降,但仍需洗涤固相。

蔗糖分层法可克服上述困难。该方法用的固相其颗粒及密度为中等大小(如Sephacryl),它们在重力作用下能较快沉降而不需离心。该法在反应保温液下加入一层密度较高的蔗糖溶液,使固相连同保温液上浮。15分钟后,固相穿过蔗糖溶液沉降而达到充分洗涤,含游离标记物的保温液仍浮在上层。将保温液和大部分蔗糖溶液吸去,全部固相留在试管底部。上述过程重复一次后,两位点IRMA的NSB能减小到0.1~0.2%,该方法不丢失固相,故灵敏度、精密度均高,操作亦方便,适用于大批量样品。

(5)IRMA灵敏度提高的临床意义:灵敏度是限制许多免疫分析法在临床化学上应用的一个因素。人促甲状腺激素(TSH)免疫分析法就是明显的例子。TSH正常血液循环含量很低,RIA不能测出其全范围,只能区分正常及增高值。采用McAb及有效分离方法的TSH IRMA的灵敏度比目前的RIA提高约一个数量级。使用灵敏的TSH IRMA意在把TSH测定的应用扩大到鉴别甲状腺机能亢进及正常甲状腺。

4. 工作范围

一种免疫分析法的工作范围规定为批内变异系数在10%以下的待测物浓度范围。RIA的工作范围狭窄,一般只含两至三个数量级浓度。因许多血清待测物的病理生理范围在三个数量级以上,故RIA常需将样品稀释一次以上。IRMA的工作范围一般含三至四个数量级,故样品不需稀释。

(1)精密度图:精密度图是表示批内、批间精密度的有效方法,它把反应的变异系数和待测物浓度联系起来,图呈U形。IRMA的精密度图比相应的RIA更宽(工作范围更宽),最低点更低(精密度提高)。

(2)“高剂量钩回”效应:“高剂量钩回”效应即混加型或反加型两位点IRMA的剂量反应曲线在待测物剂量很高时发生反向的一种现象,它是限制IRMA工作范围的一个因素,RIA中未见有此效应。待测物浓度很高时,固相抗体达到极限,游离待测物开始与待测物——标记抗体复合物竞争固相,这就发生了“高剂量钩回”效应。增加固相抗体浓度可调整高浓度待测物时发生的“高剂量钩回区”,在最佳IRMA中,它仅出现病理生理范围外。测定多次稀释的样品可避免待测物浓度极高时引起的混乱。

5. 特异性

RIA的特异性为交叉反应物的单一作用。交叉反应物与标记抗原竞争结合抗体,故标记抗原结合减少,结果使待测物偏高。交叉反应一般表示为产生一定示踪物取代所需交叉反应物的量比产生同样取代所需待测物的量。

两位点IRMA使用两种抗体,每一种都有其特性,故它的特异性反映两种现象,即交叉反应和干扰现象。由于IRMA的抗体过量,因此任何非特异作用都应重视。

(1)干扰现象:有的物质能与两位点IRMA的一种抗体结合,但不能与另一种抗体结合。当这种干扰物浓度增加时,结合的标记抗体量就要减少。这种干扰现象导致结果偏小。测定高浓度干扰物存在时待测物的回收可检验

IRMA的干扰现象。

(2)交叉反应:有的物质能同时与IRMA的标记抗体和固相抗体结合,故在无待测物时两种抗体也能联接,此现象称交叉反应,它导致结果偏大。测定无待测物时对递增交叉反应物剂量的反应,可估计IRMA的交叉反应。

(3)McAb选择和抗原决定簇分析:建立两位点IRMA时,常根据McAb在RIA中的特异性来选择。选好一组合适的抗体后,再进行抗原决定簇分析,以决定哪几对McAb能用于标记抗体和制备固相。一对能显示较好剂量反应特性的McAb必能识别在待测物分子上处于不同空间位置的抗原决定簇。

(4)分子结构分析:利用McAb精确的特异性可详细探查抗原分子结构。如人黄体生成素(LH)IRMA只与完整LH反应,而与各亚单位不发生反应,因而表明被所选抗体识别的抗原决定簇合用了 α 和 β 亚单位上的结构。

(5)“过分特异”问题:有时两位点IRMA的特异性可能过窄,为了使它放宽,可把几种McAb混合起来,这时应注意各抗体动力学的不同。

如果参考标准含很多分子种类或片段,则绘制特异性McAb IRMA的标准曲线可能较困难。当然,随着高特异性McAb IRMA的应用,某些参考标准的有效性将受到研究。

(6)两位点IRMA应用的限制:一般认为,一个抗原决定簇相当于五至六个氨基酸,因此能被两位点IRMA测出的最小分子理论上约含10~12个氨基酸。但考虑到同时与这样小的肽结合的两个抗体的结构及可能的空间位阻,抗原可能要稍大些。

6. 稳定性

免疫分析的稳定性表示其对操作及局部环境改变的耐受能力。IRMA的稳定性高是其最显著优点之一。下面分几个方面来论述。

(1)温度:RIA反应的平衡取决于抗体的亲和常数,故其受到严格的热力学约束,对温度改变很敏感。IRMA的过量抗体驱使反应完成,故其对温度改变不敏感。设计好的IRMA

常能在4℃或37℃这样完全不同的温度下进行而无明显影响。

(2)pH和离子强度:McAb的pH及离子强度适应范围较多克隆抗体狭窄。建立两位点IRMA时,应仔细研究这些特性。如要保证其稳定性,应采用适合于两种McAb的缓冲液。

(3)基质影响:血清或血浆样品是复杂的生物混合物,但可简单地看作待测物及基质两部分。基质的某些成分可能非特异地干扰免疫分析的结合反应,对它们有很多还不清楚,但可肯定包括循环蛋白质及类脂质。采用McAb的IRMA比RIA较少强调基质影响,这可能是前者只要求简单的双分子反应,不象多克隆抗血清要形成复杂的晶格之故。为了补偿基质影响,一般用混合起来的无待测物的生物液配制标准溶液,以便使之与被测液相同。

检验基质影响的办法是测定加入一组样品中的外源性待测物的回收,平均回收100%左右表示样品和标准液的基质等价。如果该外源性待测物是参考标准,且定量地加到被测血清中,则回收试验也可表示该方法的准确性。

两位点IRMA中,尤其在采用McAb时,由于某些个体血清含抗免疫球蛋白抗体,它们与小鼠抗体可能发生交叉反应,把固相抗体和标记抗体联接起来而导致结果偏大。在反应中加入适当的动物血清可消除此假象。

(4)加样精确性:RIA至少有三步关键的加样(样品、抗体及标记物),其中任何一次加样不精确都会增加变异。IRMA的标记抗体和固相抗体都是过量的,故其只有一步关键的加样,即样品加样。

三、IRMA在临床化学中的前景

1. 数据处理

IRMA要发挥更好的潜力需要在能适合一般微机应用的统计分析及曲线拟合法上下功夫。为了最好地利用IRMA数据,应兼顾到曲线拟合法的灵活性和极端数的挑选剔除。样条函数曲线拟合法太灵活,而线性Logit-Log转换法又太僵硬。四参数Log-Logistic模式是较满意的折中办法(尽管它较复杂),但该法仅限于拐点左右对称的剂量反应曲线。若IRMA的分离方法好,其反应曲线实际上是不对称的,故用四参数Logistic模式处理IRMA数据会导致不定向的结果偏差。五参数Logistic模式可解决上述问题,其第五个参数是衡量反应曲线不对称程度的。

2. 自动化

固相IRMA比RIA更适合于自动化,其快速动力学允许用非平衡反应而不产生明显的结果漂移,再配以非离心分离技术,就可建立能处理大批量样品、使用也方便的自动化系统。

3. 灵敏度

IRMA的灵敏度在某种程度上是由所选抗体的亲和常数决定的。目前用于两位点IRMA的McAb的亲合常数为 $10^9 \sim 10^{11} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。选择较高亲和力(至 $10^{12} \cdot \text{mol}^{-1}$)的抗体可进一步提高灵敏度。但即使所选抗体很好,由于放射性标记物比活性的约束,灵敏度最终是有限的。如果这种限制在某些情况下变得很重要,则再想提高灵敏度也许要靠非同位素免疫分析法。

4. 对非同位素免疫分析法的挑战

在非同位素免疫分析法成为常规方法之前,IRMA的优点至少与它不相上下。因此,在今后若干年中,两位点IRMA仍将是临床化学实验室可选择的实用的分析方法,它还将为评价新方法提供较高的标准。

(王博诚节译 林汉校)

欢迎订阅《国外医学呼吸系统分册》

本刊自1987年开始恢复邮局发行。欢迎订阅。本刊为季刊,每期56页,每册(暂)定价0.62元。

订阅处:全国各地邮局

《国外医学呼吸系统分册》编辑部