

当代放射免疫分析: 1988

Yalow RS

提 要: 重点讨论了自建RIA的使用问题。介绍了肽类激素抗原的 ^{125}I 标记及其纯化; 抗原-抗体反应的pH及缓冲液的选择; 结合的和游离的标记抗原的分离方法。

放射免疫分析(RIA)测量实质上是比较未知样品对标记抗原与抗体结合的抑制程度和非标记抗原标准液的抑制程度。RIA不同于传统的生物检测法, 前者是一种免疫化学方法, 它的测量只与依据质量作用定律的化学试剂的相互作用有关。不要求标记抗原和非标记抗原在化学和生物学上完全一致。因此, 免疫化学活性可以与生物活性一致, 也可以不一致。检验RIA的可靠性的一个必要的但不是充分的条件是: 未知样品的表观浓度不受测定时的稀释度的影响。然而, 在某些情况下, 即使因为标准和未知间存在免疫化学差异而可靠性不佳, 仍然可用于临床。

本文重点是讨论自建RIA的使用问题。日益增多的实验室依靠商品药盒。它的灵敏度、特异性和质量控制等细节应由供应者提供。然而, 当解释所用药盒的结果时, 通晓RIA方法学中的问题和易犯的错误是有意义的。

能获得一种适宜的抗体是RIA的先决条件。通常, 分子量大于2000的多肽当与Freund氏佐剂形成乳状液而注射给动物时, 则具有相当的免疫原性(并非总是如此)。药物、类固醇和别的低分子量物质, 可用种种方法把它们连接到一个大的蛋白质或肽分子上, 而成为抗原。常用方法有: 通过碳二亚胺连接到牛血清白蛋白上或通过戊二醛连接到甲状腺球蛋白上。对于一个半抗原来说, 连接到那种蛋白质上或用那一种连接剂最好, 还没有统一看法。

单克隆抗体现在已应用于RIA方法中。

这类抗体的开发确能提供一种针对特异抗原决定簇的、大量的均一抗体。然而, 这些抗体与抗原的反应能通常为免疫动物产生的非均一抗体的平均反应能。当把一种非均一抗血清使用于RIA中时, 传统的作法是充分稀释抗血清, 因此, 仅仅一小部分具有最高反应能的抗体与抗原结合。因此, 非均一抗体有可能提供比单克隆抗体更高的灵敏度。但是单克隆抗体具有更高的特异性。因此, 选择抗体来源时, 主要看方法的限制因子是灵敏度还是特异性。对于只需要有限数量抗血清的研究室, 必须比较动物产生抗体的简易性与产生单克隆抗体需付出的代价。

RIA首先被应用于肽类激素的测量, 而多数肽类激素含有容易碘化的酪氨酸残基或组氨酸残基。通常使用氧化放射性碘化物的氯胺-T技术。20多年来, 已经选用了 ^{125}I ($T_{1/2} = 60$ 天)。若每个分子上的 ^{125}I 原子不多于1个的话, 则这种制品就像非碘化制品一样稳定。贮存在有机溶剂中的单碘标记的甲状腺素和三碘甲状腺素, 在三个月内, 未见比放射性变化。而到三个月末, ^{125}I 的放射性却减少到约为初始放射性的1/3。比放射性不变化的可能原因是: 当 ^{125}I 衰变时, ^{125}I 结合的分子也被破坏了。所以甲状腺素的化学量的减少与放射性的衰变相平行。若每个甲状腺原氨酸分子含两个 ^{125}I 原子, 则首次衰变释放游离放射性碘。这些考虑可应用于所有放射性碘化合物。对于比甲状腺原氨酸大的多碘标记分子, 这些多余的放射性碘仍旧可以附着在由于首次 ^{125}I 衰变而产生的其它分子

碎片上。

必须明了,按每个分子平均标记上一个放射性碘原子并不意味着全部或大部放射性参入到只含一个放射性原子的分子上。比如,水溶液中胰岛素的碘化导致碘原子的均匀分布,这与实验方法无关,只与平均碘原子数有关。

如果我们假设:当每个分子上平均标记上一个碘原子或更少时,碘化将只发生在两个 A-链酪氨酸残基上;碘化每个残基的几率相等;一个碘原子标记到一个酪氨酸残基不是定向的。我们用蒙特卡罗(Monte Carlo)模拟来计算平均只含一个或更少碘原子的标记胰岛素制剂中的碘原子的理论分布。理论分析表明,当每个分子上平均标记 9.8 个放射性碘原子时,约一半放射性是在非单碘胰岛素中。因此,就需要把未碘化和多碘化物质与单碘化物分离开的纯化方法,以确保获得高比活性的最稳定产品。

对于通常在血浆中浓度十分高的类固醇、药物和其它物质的分析测定,不一定需要高比活性的标记示踪物。起初 ^3H 标记示踪物用于许多这样的分析。为避免使用液体闪烁测量和涉及长寿命核素处理的有关问题,现在的多数商品药盒用 ^{125}I 标记示踪物。

在一般的抗原-抗体反应中, $\text{pH} 6.5 \sim 8.5$ 是适宜的。但是我们已证明,对有些抗血清和硷性肽(如胰岛素)示踪物的最大结合发生在 pH 为 5 甚至为 4 时,示踪物的结合与 pH 为 7 时的也十分相近。我们还证明,虽然标记胰岛素和一种抗血清的反应与缓冲液及 pH 值($6.5 \sim 8.5$)无关,但是标记胰岛素与另外的抗血清的反应却强烈依赖缓冲液和 pH 值。一般情况下,当缓冲液的离子强度增加时,抗原与抗体的结合随着减少,当然也有例外。在 RIA 中,我们不能事先预言要用的最佳 pH 或缓冲液,对每种物质和每种抗血清都要确定这些条件。

分离结合的和游离的标记抗原最常用的

方法有:(1)用第二抗体沉淀抗原-抗体复合物;(2)使用有机溶剂或盐析法沉淀复合物;(3)抗体吸附或结合于固相材料;(4)游离抗原吸附到像纤维素、活性碳、硅酸盐或离子交换树脂等固相材料。

双抗体法在开发新的 RIA 方法中是常用方法。但是,当分析数以千计的样品时,第二抗体的花费使得本法十分昂贵。

聚乙二醇法已被广泛用于沉淀抗原-抗体复合物。把抗体固相化具有通用性优点,而且常用于商品药盒。但是也有缺点,由于连接方法本身引起的抗体分子中的化学变化,或者说由于空间位阻,导致固相分析法的灵敏度可能比未被固相化的同样抗血清的灵敏度略低。

对于常规程序,我们一般更喜欢把游离抗原吸附到固相材料的方法,它最便宜而且适用。

分离抗体结合的和游离的标记激素之所以有许多不同的方法,是因为现在数以百计的用 RIA 的物质的化学性质不同,当然也与开展 RIA 的各实验室的实验习惯有关。

RIA 不同于传统的生物检测方法,前者是一种免疫化学过程,它不受试验系统的生物可变性的影响,也不受系统中存在的可抑制或增强生物作用的其它物质的影响。这种测量只与依质量作用定律进行的化学试剂的反应有关。但是,非特异因素在化学反应中起干扰作用。

肽类激素的非均一性已经引出一个重要的问题。在血浆中及腺体组织和其它组织的提取物中,许多肽以一种以上形式存在。这些形式可以具有或不具有生物活性,而且它们可能是已知的生物活性激素的前体或者代谢产物。这些非均一性导致对 RIA 测定的激素浓度的解释的复杂化。但是,在我们了解肽类激素的合成和代谢途径方面,他们却展现了新的前景。

值得庆幸的是第一个 RIA 就是测定胰岛

素的。具有最大生物活性的分子量为6000道尔顿的肽是处于兴奋状态的所有患者的血中的主要形式。仅仅在胰腺癌患者或阻止C-肽断裂的少见的遗传异常患者中,胰岛素原才占优势。然而,在几种分析测定中,一般有生物活性的那种形式并不是最多的,现在我们考虑其中的两种:甲状旁腺激素(PTH)的分析常为一种无生物活性的代谢片段所干扰;胃泌素分析则由于一种有生物活性的前体的存在而复杂化了。

免疫化学的非均一性在甲状旁腺激素分析中第一次显现出来,两种抗血清的实验结果:可以利用一个常数,使一条血浆稀释曲线与一条标准曲线重合(标准物分离自正常甲状旁腺腺体)。但是当用第三种抗血清时,这个常数引起了不一致的结果。因此,当用抗血清C329进行测定时,在切除甲状旁腺后血浆免疫反应的消失率是非常快的。随后阐明了使血浆和组织PTH不均一的激素的性质。抗血清273对完整的PTH和一种没有生物活性的C-端肽段都可结合;抗血清C329是一种N-端抗血清,它主要与血浆中完整的PTH有交叉反应,因为没有报告证实血浆中大量存在一种有生物活性的N-端肽段。由于C-端肽段的代谢转换时间比完整甲状旁腺激素长,所以血浆中C-端肽段浓度通常比完整的甲状旁腺激素的高。据此,大多数实验室使用C-端肽段分析法诊断原发性甲状旁腺机能亢进,因为C-端肽段分析法允许使用灵敏度较低的抗血清进行病症鉴别诊断。然而,在尿毒症情况下,C-端肽段的代谢转换时间延长了,达到正常值的50倍。因此,当用C-端肽段分析时,免疫反应显著升高,甚至在没有继发性甲状旁腺机能亢进情况下,也是如此。

自第一次进行PTH分析以来,25年间,这种分析的可靠性仍然不佳,因为标准和未

知存在差异,当然也难于解释。所以,对送到不同实验室的同样的样品,出现不同的结果并不奇怪。近来,报告了用于人PTH分析的一种高灵敏度、双位点免疫放射测量分析(IRMA)方法,它对完整的(1-84)肽是特异的。这种分析法决定于山羊抗PTH抗血清的制备及其后用亲和柱纯化抗血清。于是有了现成的纯化抗血清,一种针对PTH1-34,而另一种针对PTH39-84。为进行这种分析,把抗PTH39-84抗体固定在塑料珠上。然后加入未知或用无激素血浆配制的PTH(1-84)标准。接着加入 ^{124}I -抗PTH(1-34)抗体。因此,在这种分析中,完整的PTH先结合到固相抗C-端抗体上,然后又捕捉住针对N-端PTH的 ^{125}I -抗体。这种分析法具有区别原发性甲状旁腺机能亢进、正常功能和恶性高钙血症的灵敏性。许多PTH肽段(1-34、39-68、53-84、44-68和39-84)并不干扰这种分析。近来我们用Allegro药盒与我们的抗N-端肽段抗血清同时测定了正在透析中的尿毒症患者的PTH,结果非常一致,这证实了尿毒症患者血浆中没有干扰分析的肽段。这种双位点IRMA似乎比以前的方法更适于测定血清中完整的PTH。

我们曾简单综述了RIA的某些技术方面的问题,其中特别强调了一些缺点。这些问题对使用自制试剂或使用商品试剂(分别购入或以药盒形式购入)的实验室都是适用的。当可能时,质量控制问题最好由临床控制而不是由化学控制来解决,也就是用适当的兴奋或抑制试验来解决。虽然RIA可以简单、快速地测定健康和疾病的许多临床指标,但是如果在使用时漫不经心,不注意它的缺点,则将破坏其在临床医学中的重要作用。

[ISNM'88 Beijing 赵启仁节译
林 汉校]