

单克隆抗体在体外免疫分析中的应用*

中国医学科学院放射医学研究所 林汉

提 要: 主要介绍了单克隆抗体在核医学体外免疫分析中的应用及其前景, 叙述了单克隆抗体应用于IRMA的历史发展过程并用实例强调了这种方法的突出优点。还介绍了酶免疫分析、免疫化学发光分析和时间分辨荧光免疫分析的现状和发展前景。最后介绍了对临床和基础都有重要意义的预定特异性单克隆抗体的制备原理和应用实例。

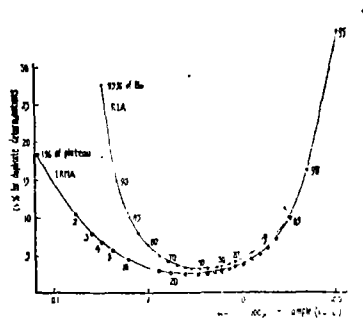
Köhler和Milstein于1975年用杂交瘤技术制备单克隆抗体(McAb)获得成功以来, 使生物科学和医学科学受到了一次革命性冲击。由于这种技术可使任何生物结构的探测、纯化和分析成为可能, 因此McAb日益成为临床医学诊断和治疗中有价值的试剂, 也是基础医学研究不可缺少的有力工具〔1~8〕。

从核医学角度来看, McAb的应用主要有三个方面: ①用放射性核素标记的McAb进行放射免疫显像, 以确定病变的存在和位置。如利用对肿瘤细胞表面相关抗原特异的McAb进行肿瘤诊断; 利用抗心肌肌凝蛋白的McAb进行急性心肌梗塞的诊断〔4〕; 利用抗纤维蛋白的McAb进行深部静脉血栓的定位〔5〕等。②用McAb作为导向试剂, 将放射性核素或药物导向病变部位进行治疗。③利用McAb建立多种生物活性物质和标志物的免疫分析法, 用于多种疾病的体外诊断。

本文只着重对第三个方面作一些介绍。

单克隆抗体在核医学体外诊断中的重要地位, 自然与杂交瘤技术的问世有关, 但也与放射免疫分析的发展的历史渊源关系密切。在Yalow和Berson创建了放射免疫分析约10年之后, 即1968年, Miles和Hales〔6〕提出改标记抗原为标记抗体的新的免疫分析法, 并预想这种新的免疫分析系统的灵敏度和精密度都将比RIA为好。这种方法被命名

为“免疫放射分析法(IRMA)”。1975年, Miles〔7〕建立了HGH的双位点IRMA, 从实践上证明了以标记抗体为特征的IRMA比RIA的灵敏度高, 工作范围宽。1981年, Hunter〔8〕进一步比较了 α FP的IRMA法和RIA法, 证明IRMA的灵敏度为RIA的10倍, 工作范围为RIA的3倍。他所绘制的精密密度图至今仍不断为人们所引用(见下图)。



但是, IRMA的最大缺点是标记抗体用量大, 而且要经过纯化(因为是多克隆抗血清)。因而在1968~1981年的十余年间不见广泛的推广应用。

McAb则正好使解决这一问题成为可能。McAb的特点之一就是可大量生产, 而且纯化方法简便。1982年, Hunter〔9〕使用 α FP的单抗建立了新的IRMA方法, 除继续证明IRMA的灵敏度、工作范围上的优点外, 还证明其精密度、回收率和特异性均超过RIA。自此, 以标记抗体为特征的IRMA便成为单抗用于体外分析的基本方法。在以

McAb为基础的双位点IRMA不断被应用的基础上, Baker等^[10]总结了它优于RIA之处有: ①易于进行放射标记; ②反应速率快; ③灵敏度高; ④工作范围宽; ⑤特异性强。

在整个80年代, 以单抗为基础的双位点IRMA发展很快, 用于这种方法的生物活性物质也很多, 其中有: 肿瘤细胞表面相关抗原和多种肿瘤标志物; 各种免疫球蛋白及免疫活性物质; 蛋白质和肽类以及类固醇激素; 多种神经肽; 酶类; 各类白细胞表面抗原; 受体; 其他生物活性物质等等。我国科学工作者于1985年前后相继建立了 α FP(麦茵乔)、CEA^[11]、铁蛋白^[12]、乙型肝炎表面抗原^[13]、CA50(范振符)等的单抗双位点IRMA, 有的已达到世界先进水平。

为了更好地了解McAb双位点IRMA的独特之处, 现举几个例子如下。

首先是糖蛋白激素。已知, 促甲状腺激素(TSH)、促黄体激素(LH)和促卵泡激素(FSH)都是腺垂体分泌的糖蛋白激素。它们都是由两条肽链组成: 一条稍短, 称为 α 链, 三种激素的 α 链结构相似, 且无生理活性; 另一条稍长, 称为 β 链, 三种激素的 β 链结构各不相同, 具有不同的生理活性。两条肽链由非共价键连接在一起, 完整的激素糖蛋白分子含糖约15~31%。三种激素分子的四级结构也是相似的。

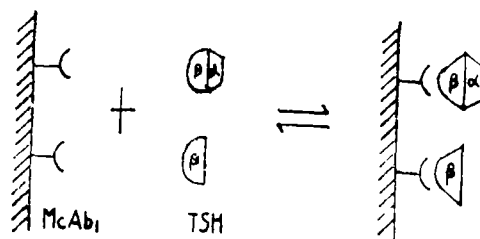
此外, 人绒毛膜促性腺激素(hCG), 也是一种由 α 链和 β 链两亚基组成的糖蛋白激素。其 α 链与前述三种激素的 α 链也相似, 而 β 链则相差较多。分子中糖类占31%。

可见, 如果用传统的多克隆抗体方法建立起上述四种激素的放免分析法, 则方法的特异性很难保证。而利用McAb则可以建立起特异性强的免疫分析法。现以TSH为例说明如下^[16]。

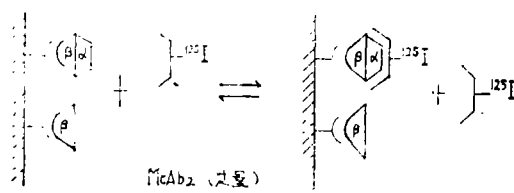
制备两种特异性不同的McAb₁, McAb₁为针对TSH β 链特异的单抗, McAb₂为针对

TSH α 链的单抗。将McAb₁固定于某种固相支持物, 用¹²⁵I标记McAb₂, 组成如下反应系统:

①固相McAb可与TSH的 β 亚基部分结合, 也可与游离的TSH β 亚基结合, 但不能与其他三种激素的 β 亚基部分结合。样品中的其他物质均被洗去。



②加入¹²⁵I标记的McAb₂, 得到夹心复合物。洗去多余的¹²⁵I-McAb₂, 测复合物的放射性强度。注意: 游离的TSH β 链不能被测量。



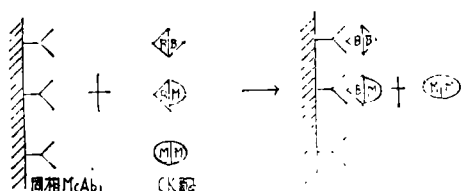
这种双位点免疫分析法不但特异性强, 而且快速、简便, 只需4~5小时, 如将两步反应合并成一步, 只需1~2小时。这种反应系统也可灵活运用, 如可将抗 α 亚基的McAb固相化, 而用¹²⁵I标记的是对TSH β 链特异的单抗。

至于同功酶, 它们是催化活性相同而分子结构与理化性质有差异的酶。几乎有一百多种酶有同功酶。根据这种结构差异, 现在有可能制备不同特异性的McAb, 建立特异的分析方法。现以磷酸肌酸激酶(CK或CPK)为例^[17]; CK有三种同功酶, 分别由M和B两种亚基组成。脑组织中含CK-BB, 即由两个B亚基组成; 骨骼肌中含CK-MM, 即由两个M亚基组成; 心肌中除了CK-MM

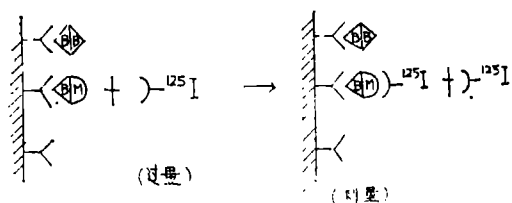
外,并特别具有CK-BM。因此,血清中CK-BM水平的变化,对急性心肌梗塞的诊断有重要意义。但传统的酶活性检测法不能特异地检出CK-BM的变化,凝胶电泳法又需较长时间,而利用McAb的双位点IRMA免疫分析法则可得到令人满意的结果。

首先制备抗B亚基的McAb₁和抗M亚基的McAb₂,再将McAb₁固相化,用¹²⁵I标记McAb₂。其反应程序如下:

①固相单抗McAb₁与样品(或标准)CK酶反应,然后洗去未能与McAb₁结合的样品中其他物质。



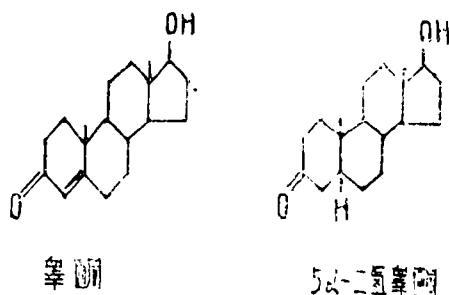
②加入过量¹²⁵I标记的McAb₂,反应一定时间后洗去过量的¹²⁵I标记McAb₂。



可见,样品中存在的三种CK同功酶,在第一步反应中,只有CK-BB和CK-BM能与固相单抗McAb₁反应,因为它们都有B亚基,而CK-MM则从反应体系中被洗去。当向反应系统中加入¹²⁵I标记的抗M亚基的McAb₂时,则标记McAb₂只能与固相上的CK-BM的M亚基结合。因此,只有CK-BM被测量。同样,如果将McAb₂固相化,在第一步反应中被结合的有CK-MM和CK-BM;在第二步中也只有CK-BM的B亚基能与标记的McAb₁相结合,结果也是只有CK-BM被测量。

类固醇激素都是环戊烷多氢菲的衍生

物,某一类类固醇激素除具有共同的功能团外,还有不同的功能基团。无论是采取生化方法还是一般的放免方法,仅仅根据某个C原子连接的不同功能团来区别一类激素的每个成员,实际上是很困难的。杂交瘤技术兴起之后,自然会使人想到利用特异性强的McAb组成的免疫分析法来解决多年来困扰检验人员的这一课题。1982年,Fantl等^[14]成功地制备了高亲和力的抗孕酮的单抗。随后,又有人制备了能够区别孕酮与5α-二氢孕酮(DHT)的McAb。已知,孕酮在进入靶细胞后本身可直接作用于靶细胞;但在另一些细胞中,其代谢产物5α-二氢孕酮才是对细胞起作用的激素。因此,在研究工作中区别分析孕酮和5α-二氢孕酮是非常有必要的。



二者结构的不同在:



同样,能分别测定雄酮与脱氢表雄酮的McAb也制备出来了。

可见用这种McAb组成的双位点IRMA可以分别测出两种结构相近的类固醇激素。

放射免疫分析创建三十年来,虽然已经产生了非常有益的效果,但有些人仍然对“放射”持有恐惧心理。另一方面,以¹²⁵I为标记核素的RIA,其灵敏度已不可能再有改进。因此,一些放射免疫专家于80年代初在

英国开会讨论了非同位素标记的免疫分析法的前景。根据著名学者Ekins的比较,¹²⁵I和其他非同位素标记物的比活性有着较大的差别:

¹²⁵I比活性: 7.5×10^6 标记分子可提供一个CPS。

酶标记物的比活性: 由酶的放大倍数和反应产物的可测性决定。

化学发光标记物的比活性: 每个标记分子可提供一个测量信号。

荧光标记物的比活性: 每个标记分子可提供许多测量信号。

由于当抗体亲和常数和其他条件都相同时, 标记比活性对灵敏度有重要作用, 因此, 改用非同位素标记物可以提高免疫分析的灵敏度。

非同位素免疫分析法一般多指酶标免疫分析、化学发光免疫分析和荧光免疫分析。虽然在70年代就有这些非同位素标记的免疫分析法, 但那是标记抗原的方法。进入80年代后, 由于McAb的广泛应用, 这些免疫分析法多进展为标记抗体的免疫分析法, 与上述例子类似, 只是用酶、化学发光物质或荧光物质标记的单抗代替¹²⁵I标记的单抗。

标记抗体的酶免疫分析法, 目前应用非常广泛。其最简单的反应系统包括一个固相化的单抗、抗原(样品中的被测物)与另一个酶标记的单抗(过氧化物酶, β -半乳糖苷酶或碱性磷酸酶等), 形成夹心后, 加入酶的底物, 测定有颜色的产物。酶免疫分析法的原理是利用酶分子的放大作用, 即一个酶分子可以使许多分子的底物转变为产物。由于此法已很普遍, 这里不过多述及。

用化学发光物质作为标记物的免疫分析法是很有前途的。近年来Weeks等^[15, 16]合成了一种新的化学发光物质——吖啶酯, 并使用McAb建立了 α FP和TSH等的双位点免疫化学发光分析法(ICMA)。 α FP的测定系统包括: 固相化的抗 α FP的羊IgG、用吖啶

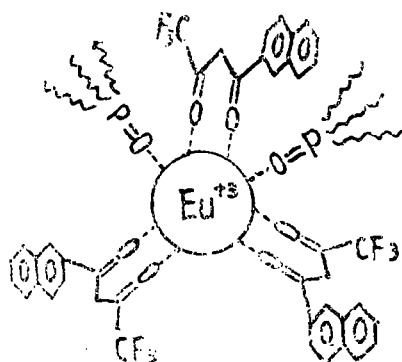
酯标记的抗 α FP McAb以及样品或标准 α FP。室温反应30分钟, 洗去其他未反应物只剩下固相免疫复合物。用光度计(luminometer)测量发射光强度。这一方法的最小可测量值为 8×10^{-10} mol。

我们以吖啶酯为标记物, 建立了CEA的McAb双位点ICMA。灵敏度与同样实验条件的CEA IRMA在同一数量级。但吖啶酯标记的抗体的稳定性还不理想。国外某些工作者亦遇到同样情况。

近年来由于仪器的改进, 以发射荧光物质为标记的荧光免疫分析法进展很大^[17, 18]。较新的成就便是LKB公司用时间分辨仪器建立的“时间分辨荧光免疫分析法(TR-FIA)”。这一方法的特点是: ①使用发射长寿命荧光的镧系金属离子为荧光标记物, 常用的是铕(Eu^{+3})或铽(Tb^{+3})。铕发射的荧光寿命为10~1000 μ s, 异硫氰荧光素仅为4.5ns。一般生物样品本身发射的荧光及散射光的寿命一般为1~20ns。利用特殊部件在激发后400~800 μ s之间测量铕被激发而产生的荧光, 则可基本上消除短寿命荧光的影响; ②仪器的激发光波长为300~600nm(其峰值为340nm, 与铕的吸收波长相吻合), 而铕的发射光波段很窄(峰位为613nm), 因此, Stokes迁移很大, 减少了本底荧光的干扰。这两个特点, 有效地提高了信/噪比, 灵敏度可达 10^{-17} mol; ③由于铕通过整合剂与抗体连接后并不因受激发而发射荧光, 因此在形成免疫复合物之后, 另于反应系统中加入增强液(enhancement solution), 其中含有另一整合剂使已整合的 Eu^{+3} 自免疫复合物解离下来并与这第二个整合剂整合, 在液体中测量 Eu^{+3} 被激发后产生的荧光。这就是为什么TR-FIA也叫做DEL FIA(Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay, 解离增强镧系离子荧光免疫分析)。

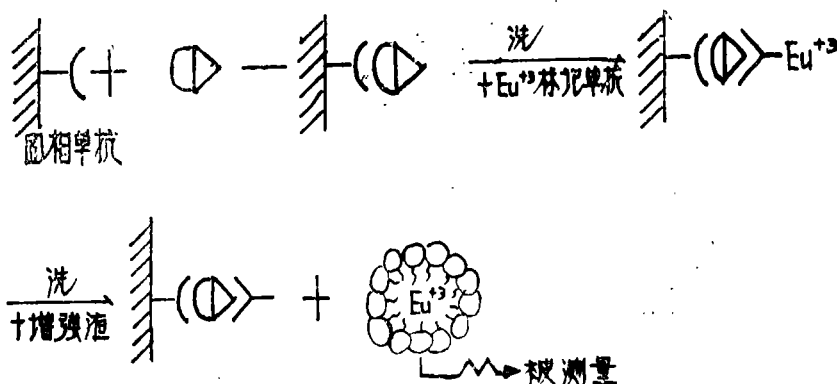
Eu^{+3} 与抗体连接所使用的整合剂有

DTPA、EDTA、EGTA等，近年来多于EDTA和EGTA分子上接上异硫氰基或氨基



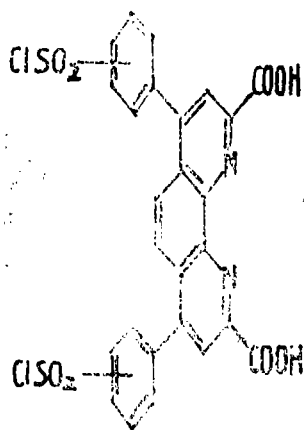
基苯，以易于与抗体连接。

增强液中的整合剂为β-双酮（2-萘甲酰



其竞争性结合法的反应系统则有些不同。此处不赘述。

由于β-双酮不能与 Eu^{+3} 形成稳定的复合物，加拿大一些科学家使用一种新的整合剂BCPDA〔4,7-bis(chlorosulphophenyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic



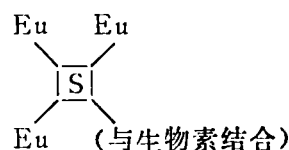
三氯丙酮)，每个 Eu^{+3} 与3个β-双酮分子形成复合物，这样就有β-双酮的6个氧与 Eu^{+3} 配位，但 Eu^{+3} 需要8个氧来配位，因此还要在增强液中加入增效剂三辛烷氧化膦（trioctylphosphine oxide）来提供另两个配位用的氧。这一复合物的结构见左图。

为了防止水对荧光的淬灭，再加入Triton X-100，为复合物形成一个很好的隔水层。

LKB公司提供的DEL FIA药盒有TSH、αFP、CEA、铁蛋白、hCG和LH等，大多使用McAb。其双位点法的反应系统图示如下：

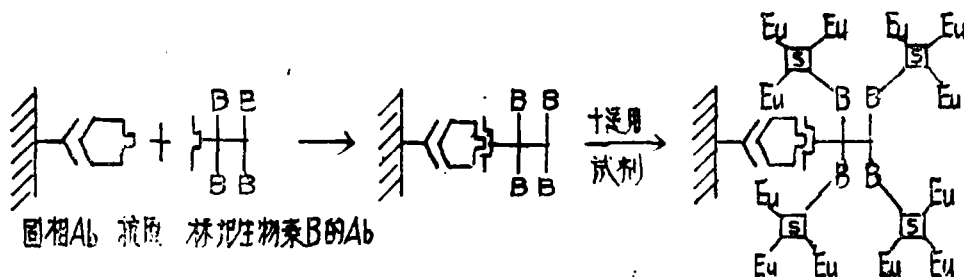
acid〕，建立了Cyber Fluor系统。BCPDA的结构式见左下图。

BCPDA的氯磺酰原子团可与链霉抗生物素蛋白的氨基共价结合，而与 Eu^{+3} 整合的部位则为两个杂环氮和两个羧基。如以S代表用BCPDA标记的链霉抗生物素蛋白，则通用试剂可表示为：



这一系统不需要两种整合剂，省去了分离与再整合的步骤；在固体状态下测量，亦不需加Triton之类的乳化剂。利用这一系统已建立了αFP、hCG和皮质醇的药盒。其非竞争性双位点免疫分析的步骤*如下：

*图中的“通用试剂”应改为“通用试剂”



前面介绍的一些分析方法与RIA比较究竟孰优孰劣?现以血清TSH测定的灵敏度为例,各种方法的灵敏度如下表:

附表. 各种方法测定血清TSH的灵敏度

方 法	灵敏度 (mIU/L)
TR-FIA	0.02
ELIA*	0.04
EIA	0.1
IRMA	0.02~0.1
IRMA	0.07~0.25
RIA	0.7

* ELIA, enhanced luminescence immunoassay

可见, TR-FIA、ELIA和IRMA法较好。

最后简要介绍一下预定(Predetermined)抗原决定簇的单抗的制备和应用的问题,因为在不少情况下都能碰到这个问题。现举两个例子来说明其意义。

在正常人和糖尿病人的尿和血浆中,都有糖化白蛋白(GA)存在。在糖尿病患者,尿GA/血浆GA的比值降低,这一比值与血浆GA和尿中微量白蛋白均成反比。因此,测量GA对糖尿病的诊断有一定意义。已知,白蛋白分子中的一段七肽Lys-Gln-Thr-Ala-Leu-Tyr-Tyr的赖氨酸残基与一个分子的葡萄糖连接之后,便成为糖化白蛋白。Knowles等^[19]于1986年人工合成了此七肽,并于70℃用葡萄糖的饱和溶液使之糖化。将糖化七肽与钥孔蠔血兰蛋白结合,给动物免疫,制得抗糖化七肽的单抗,利用此单抗来测量血或尿中的糖化白蛋白。

血浆纤维蛋白原与血凝块的纤维蛋白在结构上非常相近,二者表面的抗原决定簇有98%是共同的,因此很难筛选出对某一方特异的McAb。但是,从化学结构上得知:当凝血酶作用于纤维蛋白原后,β链断裂后其氨基端新露出一段七肽Gly-His-Arg-pro-Leu-Asp-Lys,同时α链的氨基端也露出一段七肽Gly-Pro-Arg-Val-Val-Glu-Arg。Hui等^[5]利用此单抗对纤维蛋白的免疫特异性,用标记的单抗成功地进行了深部静脉血栓的定位,并于其后以单抗为导向试剂,将t-PA导向至血栓,进行溶血治疗。

由此可见,根据大分子蛋白质表面特有抗原决定簇,用人工合成方法合成一个与该抗原决定簇相同的小肽,可以制备出抗小肽的单抗,而后者对完整的蛋白质大分子同样有免疫反应。利用这种单抗可以建立免疫分析法,也可以用来进行放免显像或导向治疗。

参 考 文 献

1. Kaplan HS, et al; in "Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine" (McMichael AJ & Fabre JW eds), Academic Press, London, PP.17~35, 1982
2. Milstein C; ibid PP.3~16
3. Eilat D; Molec Immunol 1982, 19: 943
4. Khaw BA, et al; J Clin Invest 1976, 58: 439
5. Hui KY, et al; Science 1983, 222: 1129

(下转第252页)

(%)，而在它们的肝中则分别依次为6、19、10、和150(%)。

泌乳动物有相当大量的 ^{137}Cs 从乳中排出， ^{137}Cs 被摄入体内后10分钟就可发现乳中有铯的排出，其中，牛奶中 ^{137}Cs 浓度的峰值出现于摄入后24~28小时，为每升含摄入量的0.2~0.3%，山羊奶中 ^{137}Cs 的浓度峰值出现于摄入后9~48小时，每升约含摄入量的5~10%。牛奶中 ^{137}Cs 浓度的半减期，起初约为1天，以后约为4天。半长期摄入 ^{137}Cs 的情况下，每升乳中 ^{137}Cs 含量可达每日摄入量的1.1%，也有人认为是0.8~1.2%，而每升绵羊奶和山羊奶中 ^{137}Cs 的含量分别为每日摄入量的5~15%和10~20%。

^{137}Cs 转移入卵的量相当大，鸡一次摄入 ^{137}Cs 饲料后2天所产的蛋中， ^{137}Cs 含量约达摄入量的1%，摄入后3~30天，生下的蛋中 ^{137}Cs 约比上述值低2倍。在长期摄入 ^{137}Cs 的情况下，鸡蛋中 ^{137}Cs 含量出现平衡状态的时间在第6~7天，平衡后蛋中 ^{137}Cs 含量为每日摄入量的2.3~3.3%。蛋白中铯的浓度为蛋黄中的2倍，蛋壳中的含量为蛋中 ^{137}Cs 总量的1~2%。

人体对 ^{137}Cs 可溶性化合物的吸收率，无论从哪个途径入体，均可达100%。人体中 ^{137}Cs 的80%贮存于肌肉中，8%贮存于骨中。体内 ^{137}Cs 的10%以2天的半减期排出，90%以110天的半减期排出。

实验表明，大量的铯从母体经胎盘转移到胎儿，经乳汁转移给新生儿，胎儿体内 ^{137}Cs 浓度平均比母体低5倍，其差异是由于胎盘的屏障功能和胎儿代谢速度高所致。

欧洲和美国人体内全球性沉降 ^{137}Cs 的主要来源是奶和肉食品，小部分是谷物和蔬菜；在肉食和乳食少的国家，人体 ^{137}Cs 主要来源是蔬菜和谷物，海产品意义不大。 ^{137}Cs 的吸入量比食入量100小倍，经消化道摄入的 ^{137}Cs 对公众所致的预期照射剂量北半球为190 μGy ，南半球为47 μGy ，全球平均为170 μGy ，预期的集体剂量分别为 6.7×10^5 、 6.2×10^5 、 6.9×10^5 人·Gy。在个别地区，如亚北极带、乌克兰-白俄罗斯沼泽群地区，由于土壤吸收全球性沉降的 ^{137}Cs 不良，植物吸收量加大， ^{137}Cs 随动物、植物食品进入体内的量均高于其它地区，因而这里公众受 ^{137}Cs 照射的剂量大于各地平均值。

核一燃料循环企业废物排放物对公众所致照射不大，在正常生产条件下的预期集体有效剂量当量为5.7人·Sv/GWe·a，其中来自 ^{134}Cs 和 ^{137}Cs 的为0.4人·Sv。公众的年有效剂量当量1980年约为0.1 μSv ，到2000年它可升到1 μSv ，仅为天然源照射均值的0.005%和0.05%，1980年公众的年集体有效剂量当量为500人·Sv。

[Гут и Сан 1989, 7:55~8 (俄文)]

刘成学节译 吕效珊校

(上接第264页)

6. Miles LEM, et al; Nature 1968, 219:186
7. Miles LEM; Ric Clin Lab 1975, 5:59
8. Hunter WM, et al; J Immunol Meth 1981, 45:255
9. Hunter WM et al; J Immunol Meth 1982, 50:133
10. Baker TS, et al; in "Alternative Immunoassays" (Collins WP ed) John Wiley & Sons 1985, PP59~76
11. 林汉, 等; 中华核医学杂志 1986, 6 (3):137
12. 乔宏庆, 等; 中华核医学杂志 1986, 6 (3):131
13. 马学严, 等; 中华核医学杂志 1986, 6 (3):129
14. Fantl A, et al; J Clin Endocrinol 1982, 54:205
15. Weeks I, et al; Clin Chem 1983, 29:1480
16. Weeks I, et al; Clin Endocrinol 1984, 20:489
17. Soini E; in "Monoclonal Antibodies and New Trends in Immunoassays" (Bizollow, CA ed.) Elsevier, Amsterdam, PP.197~210, 1984
18. Diamandis, EP; Clin Biochem 1988, 21:139
19. Knowles WJ, et al; Eur Pat Appl EP257, 421 (Cl.C12P21/00), O2 Mar, 1988
US Appl 899, 456, 22 Aug 1986, 23PP