

## 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。

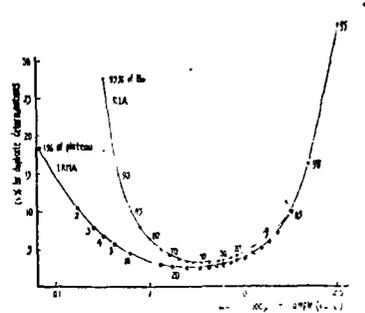
Köhler和Milstein于1975年用杂交瘤技术制备单克隆抗体(McAb)获得成功以来, 使生物科学和医学科学受到了一次革命性冲击。由于这种技术可使任何生物结构的探测、纯化和分析成为可能, 因此McAb日益成为临床医学诊断和治疗中有价值的试剂, 也是基础医学研究不可缺少的有力工具〔1~8〕。

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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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<sup>[10]</sup>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 $\alpha$ FP(麦茵乔)、CEA<sup>[11]</sup>、铁蛋白<sup>[12]</sup>、乙型肝炎表面抗原<sup>[13]</sup>、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 $\alpha$ 链, 三种激素的 $\alpha$ 链结构相似, 且无生理活性; 另一条稍长, 称为 $\beta$ 链, 三种激素的 $\beta$ 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。

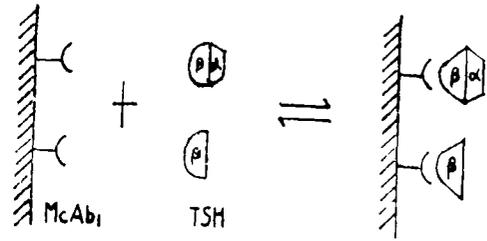
此外, 人绒毛膜促性腺激素(hCG), 也是一种由 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链两亚基组成的糖蛋白激素。其 $\alpha$ 链与前述三种激素的 $\alpha$ 链也相似, 而 $\beta$ 链则相差较多。分子中糖类占31%。

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<sup>[16]</sup>。

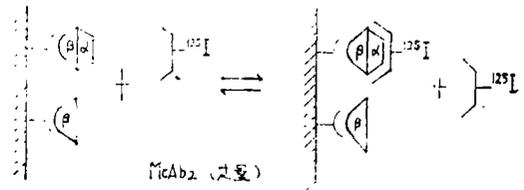
制备两种特异性不同的McAb, McAb<sub>1</sub>为针对TSH  $\beta$ 链特异的单抗, McAb<sub>2</sub>为针对

TSH  $\alpha$ 链的单抗。将McAb<sub>1</sub>固定于某种固相支持物, 用<sup>125</sup>I标记McAb<sub>2</sub>, 组成如下反应系统:

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



②加入<sup>125</sup>I标记的McAb<sub>2</sub>, 得到夹心复合物。洗去多余的<sup>125</sup>I-McAb<sub>2</sub>, 测复合物的放射性强度。注意: 游离的TSH $\beta$ 链不能被测量。



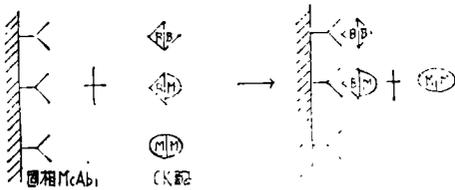
这种双位点免疫分析法不但特异性强, 而且快速、简便, 只需4~5小时, 如将两步反应合并成一步, 只需1~2小时。这种反应系统也可灵活运用, 如可将抗 $\alpha$ 亚基的McAb固相化, 而用<sup>125</sup>I标记的是对TSH  $\beta$ 链特异的单抗。

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<sup>[17]</sup>; 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

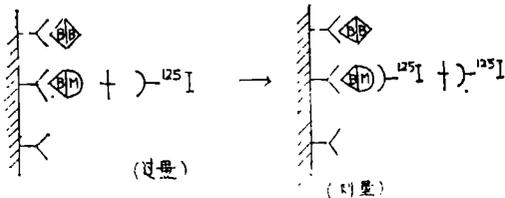
外，并特别具有CK-BM。因此，血清中CK-BM水平的变化，对急性心肌梗塞的诊断有重要意义。但传统的酶活性检测法不能特异地检出CK-BM的变化，凝胶电泳法又需较长时间，而利用McAb的双位点IRMA免疫分析法则可得到令人满意的结果。

首先制备抗B亚基的McAb<sub>1</sub>和抗M亚基的McAb<sub>2</sub>，再将McAb<sub>1</sub>固相化，用<sup>125</sup>I标记McAb<sub>2</sub>。其反应程序如下：

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



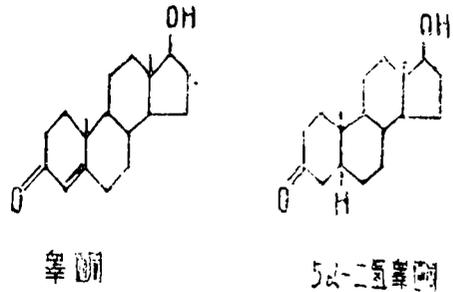
②加入过量<sup>125</sup>I标记的McAb<sub>2</sub>，反应一定时间后洗去过量的<sup>125</sup>I标记McAb<sub>2</sub>。



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McAb<sub>1</sub>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<sup>125</sup>I标记的抗M亚基的McAb<sub>2</sub>时，则标记McAb<sub>2</sub>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McAb<sub>2</sub>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McAb<sub>1</sub>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<sup>[14]</sup>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<sup>125</sup>I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，<sup>125</sup>I和其他非同位素标记物的比活性有着较大的差别：

<sup>125</sup>I比活性： $7.5 \times 10^6$  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<sup>125</sup>I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， $\beta$ -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<sup>[15、16]</sup>合成了一种新的化学发光物质——吖啶酯，并使用McAb建立了 $\alpha$ FP和TSH等的双位点免疫化学发光分析法(ICMA)。 $\alpha$ FP的测定系统包括：固相化的抗 $\alpha$ FP的羊IgG、用吖啶

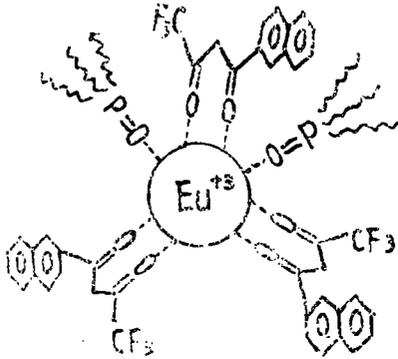
酯标记的抗 $\alpha$ FP McAb以及样品或标准 $\alpha$ FP。室温反应30分钟，洗去其他未反应物只剩下固相免疫复合物。用光度计(luminometer)测量发射光强度。这一方法的最小可测量值为 $8 \times 10^{-10}$  mol。

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<sup>[17、18]</sup>。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( $\text{Eu}^{+3}$ )或铽( $\text{Tb}^{+3}$ )。铕发射的荧光寿命为10~1000 $\mu$ 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 $\mu$ 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干扰；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 $\text{Eu}^{+3}$ 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 $\text{Eu}^{+3}$ 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)。

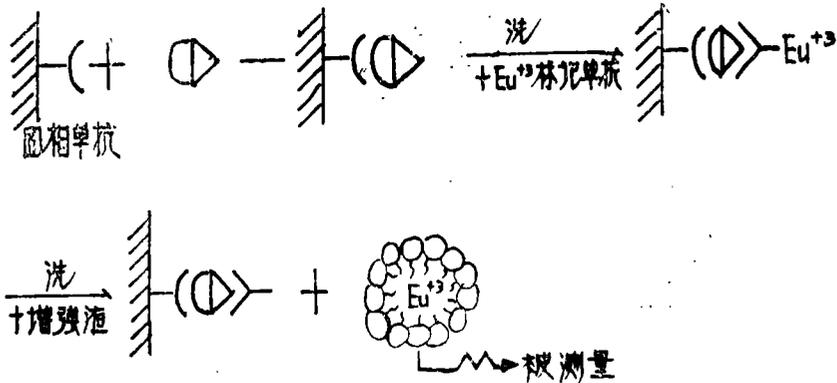
$\text{Eu}^{+3}$ 与抗体连接所使用的整合剂有

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



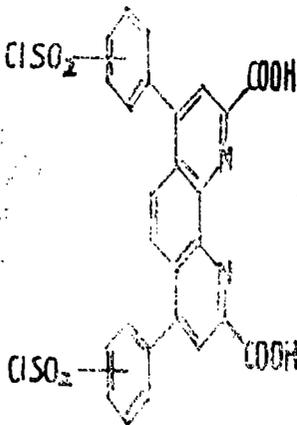
基苯，以易于与抗体连接。

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<sup>3+</sup>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



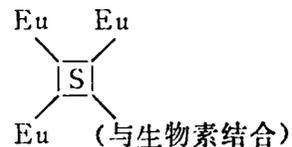
三氯丙酮)，每个Eu<sup>3+</sup>与3个β-双酮分子形成复合物，这样就有β-双酮的6个氧与Eu<sup>3+</sup>配位，但Eu<sup>3+</sup>需要8个氧来配位，因此还要在增强液中加入增效剂三辛烷氧化磷(trioctylphosphine oxide)来提供另两个配位用的氧。这一复合物的结构见左图。

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：

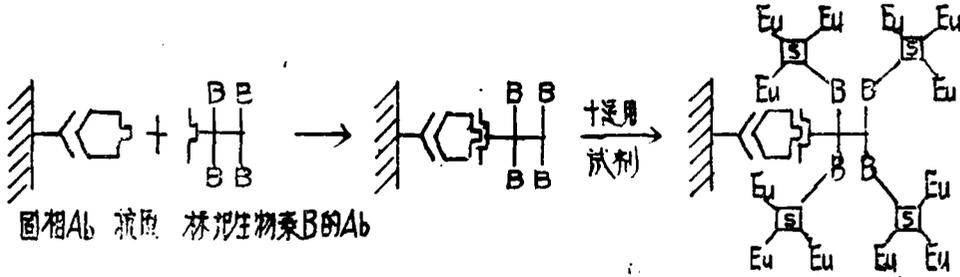
acid]，建立了Cyber Fluor系统。BCPDA的结构式见左下图。

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<sup>3+</sup>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，省去了解离与再整合的步骤；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<sup>[19]</sup>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<sup>[5]</sup>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<sup>137</sup>Cs从乳中排出，<sup>137</sup>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<sup>137</sup>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<sup>137</sup>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<sup>137</sup>Cs浓度的半减期，起初约为1天，以后约为4天。半长期摄入<sup>137</sup>Cs的情况下，每升乳中<sup>137</sup>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<sup>137</sup>Cs的含量分别为每日摄入量的5~15%和10~20%。

<sup>137</sup>Cs转移入卵的量相当大，鸡一次摄入<sup>137</sup>Cs饲料后2天所产的蛋中，<sup>137</sup>Cs含量约达摄入量的1%，摄入后3~30天，生下的蛋中<sup>137</sup>Cs约比上述值低2倍。在长期摄入<sup>137</sup>Cs的情况下，鸡蛋中<sup>137</sup>Cs含量出现平衡状态的时间在第6~7天，平衡后蛋中<sup>137</sup>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<sup>137</sup>Cs总量的1~2%。

人体对<sup>137</sup>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<sup>137</sup>Cs的80%贮存于肌肉中，8%贮存于骨中。体内<sup>137</sup>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，胎儿体中<sup>137</sup>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<sup>137</sup>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<sup>137</sup>Cs主要来源是蔬菜和谷物，海产品意义不大。<sup>137</sup>Cs的吸入量比食入量100小倍，经消化道摄入的<sup>137</sup>Cs对公众所致的预期照射剂量北半球为190μGy，南半球为47μGy，全球平均为170μGy；预期的集体剂量分别为6.7×10<sup>5</sup>、6.2×10<sup>5</sup>、6.9×10<sup>5</sup>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<sup>137</sup>Cs不良，植物吸收量加大，<sup>137</sup>Cs随动、植物食品进入体内的量均高于其它地区，因而这里公众受<sup>137</sup>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<sup>134</sup>Cs和<sup>137</sup>Cs的为0.4人·Sv。公众的年有效剂量当量1980年约为0.1μSv，到2000年它可升到1μSv，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。

[Гит и Сан 1989, 7:55~8 (俄文)  
刘成学节译 吕效瑞校]

(上接第264页)

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