

白被适当地还原后，反应性硫化基团被亲和力低于锝的金属离子（如钙、铜）保护起来，这样便可得到高亲和的锝标记蛋白。这种反应不论是测亲和力，还是测免疫活性分数，都不影响抗体的免疫活性。

副反应可致纯化纯度下降，其中包括低亲和力的结合锝、锝胶体、锝标多肽及抗体聚合，或锝复合物。如果加入到还原抗体中的 $\text{NaTcO}_4$ 溶液未被充分还原， $\text{TcO}_4^-$ 离子也是不纯的因素。然而很显然，标记前适当地还原蛋白，并且彻底地去除还原剂，特别是其中含有反应性硫化基团或有毒性时，这

些措施就更为重要。

一步或二步法制备锝标记抗体或抗体片段的药盒在核医学临床应用研究中发展很快。这些直接标记法，尽管用于还原抗体或 $\text{TcO}_4^-$ 的还原剂可能不同，但它们的化学反应顺序是一样的。 $^{99m}\text{Tc}$ 转移试剂可能不同，但所用的转移试剂都有一个共同的特点，即能与还原锝快速形成弱的或中等强度的复合物。尽管也有用其他还原剂的，但锝的还原剂绝大多数用 $\text{Sn(II)}$ 。

[Nucl Med Biol 1991; 18(7): 667~676  
(英文)张裕民节译 陆毅校]

### 多分析物微点免疫分析

Ekins RP and Chu FW

摘要：高比活性的标记物使发展超灵敏的多分析物免疫分析系统成为可能，以实现对小量生物样品中的千百种物质同时测量的目的。这种可能性依赖于简单但全新的理论概念：①所有的免疫分析都依赖于分析物对抗体占位的测量；②若使用的抗体浓度很小，抗体占位分数与抗体浓度和样品体积无关。方法涉及对两种标记抗体释放信号比值的测量。

#### 免疫分析的灵敏度：一些基本概念

六十年代初，Yalow和Berson以及Ekins等人分别创建了免疫分析设计的基本数学理论。遗憾的是，这些理论研究带来了旷日持久的争论，这主要起因于两组人员所采用的灵敏度概念相互对立(见图1)。Yalow和Berson定义A分析更灵敏，原因是反应曲线的斜率更陡；Ekins等则定义B分析更灵敏，原因是0剂量测量的不精密度更小。如果以log剂量作图，Yalow和Berson同样定义具较陡的反应曲线的分析系统更精密。简言之，Berson和Yalow定义灵敏度为反应曲线的斜率；相反，Ekins定义灵敏度为0剂量测量的精密度，基本等同于最低可测限。

很明显，这两种定义的主要分歧是分析的可测量限值对反应变量测量误差的依赖性。由于忽视了这一主要因素，“反应曲线

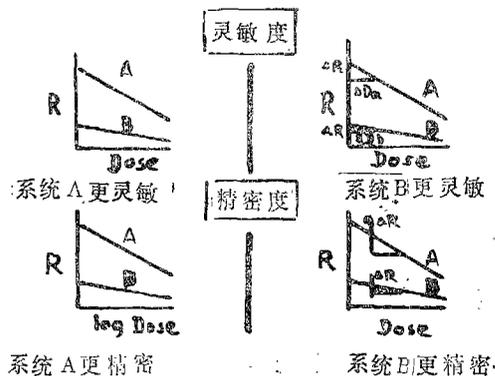


图1 Yalow和Berson(左边)以及Ekins等(右边)建立的放免分析设计理论在灵敏度、精密度方面的不同

斜率”论导致许多明显的混乱。比如，以反应参数B/F对常规RIA数据作图时发现，系统中抗体增加时，分析的灵敏度也增加。然

而,若以F/B对同一数据作图时,则得出相反的结论。没有详细的误差分析,仅仅观察反应曲线的斜率和形状,对最佳的免疫方法设计会产生错误的指导作用。比如,对质量作用定律的思考揭示,以b对[H]绘制不同抗体浓度对应的反应曲线,当抗体浓度为0.5/k时可得到剂量的最大斜率(k为亲和常数),而此时0剂量的反应( $b_0$ )是33%。这种结论导致Berson和Yalow著名论说的发表,即在无有非标记抗原存在时,加入能结合33%标记抗原的抗体量,可使RIA灵敏度最大。

灵敏度概念的分歧不可避免地导致有关免疫方法设计的长期争论,但分析的可测界限,现在已被作为唯一有效地反映灵敏度的指标而被广泛接受。

#### 基本的免疫分析方法设计

放射免疫分析和类似的蛋白结合分析技术最初被Yalow和Berson用来测定胰岛素,被Ekins和Barakat用于测定甲状腺素和维生素B<sub>12</sub>,他们都是使用标记的分析物来显示分析物与结合剂间的结合反应,通常被称为竞争性的。后来,瑞典的wide及其随后的英国人Miles和Hales发展了标记抗体的方法,这是“标记试剂”法的扩展。1973年,Rodbard和Weiss指出,详细的理论研究证实标记分析物和标记抗体的方法具有基本相同的灵敏度。

在这个问题上造成混乱的原因是:某种分析的较大潜在灵敏度根本不是标记抗体或标记分析物造成的;标记分析物和标记抗体方法间表面的差别确实使人容易不去注意寻找某种方法设计的高灵敏度的原因。理论分析表明,如果结合反应的产物能够完全分离,那么不管是测量游离的还是结合的标记分析物部分,获得标记分析物方法最大灵敏度的最佳抗体浓度必趋于零;而在标记抗体方法中,最佳抗体浓度取决于哪一部分标记

抗体被测量。如果测量游离的抗体部分,最佳抗体浓度也趋于零;相反,如测定与分析物结合的部分,浓度趋于无穷大。总之,在四种可行的基本测量方式中,实际应用时仅一种是使用无穷大的抗体浓度。这种方法被描述为非竞争性的分析。竞争性的或非竞争性的免疫分析和其它结合分析都依赖于产生最大分析灵敏度的结合试剂的浓度,所以,这些分析的分类本身掩盖了方法设计上存在差异的原因。

#### 免疫分析的抗体占位原理

当一种感受器抗体\*(Sensor antibody)被引入含有分析物的介质时,抗体上的结合位置被分析物分子占位,而占位的多少取决于结合反应的平衡常数和介质中存在的游离分析物的最终浓度。这种推论源于质量作用定律,可写成:

$$[AbAg]/[fAb] = K[fAg] \quad (1)$$

或以抗体结合位置的占位分数表示如下:

$$[AbAg]/[Ab] = K[fAg]/(1 + K[fAg]) \quad (2)$$

这里,[AbAg]、[Ab]、[fAb]和[fAg]分别代表平衡时结合的抗体、总的抗体、游离抗体和游离抗原(分析物)的浓度,K是平衡常数。游离分析物的最终浓度一般取决于总的分析物和抗体的浓度。不过,当总抗体浓度接近或低于0.05/K时,游离的和总的抗原浓度相差并不太大,且抗体的占位分数可通过下式得到:

$$[AgAb]/[Ab] = K[Ag]/(1 + K[Ag]) \quad (3)$$

使用这种概念的分析方法称为“周围分析物免疫分析”(Ambient Analyte Immunoassay),其中,抗体的占位分数与样品体积和抗体的浓度无关。

所有的免疫分析基本上都是测量抗体与分析物反应后感受器抗体上的占位分数。

\* 感受器抗体相当于单位点放免分析中的第一抗体或夹心法放免分析中与固相相连的抗体——译者注

(见图2)

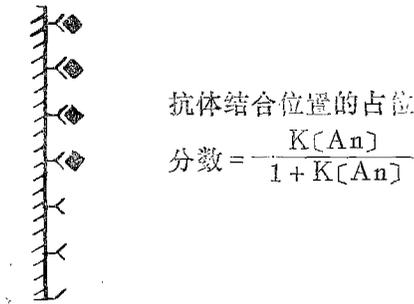


图2 免疫分析中抗体结合位点的占位原理

为了获得最大的灵敏度，依赖于测量未占位的抗体结合位点的技术要求感受器抗体的浓度趋于零，所以，这些分析归入竞争性的范畴；相反，直接测量占位的抗体技术可以使用较高浓度的感受器抗体，因此可被归入非竞争性的范畴。方法设计上的这种差异，简单地反映了下面的观念，即为了减小测量误差，一般不要求用估价两个大量间差异的方法来分析一个小量。常规RIA和其它类似的标记分析技术都是基于对未占据的结合位点的测量；不过，抗独特型抗体（仅与感受器抗体上的未占据的位置反应）可用于同样的目的。比如，在单位点标记抗体分析中，标记的抗体本身构成感受器抗体，与分析物反应后，这种感受器抗体可被分成被抗原占据的和未被抗原（分析物）占据的两部分，通过使用免疫吸附剂将它们彼此分开（免疫吸附剂包括连在固相支持物上的抗原、抗原类似物或抗独特型抗体）。如果分离后直接测定与分析物结合的标记抗体上发射的信号，那么这种分析归为非竞争性的分析；相反，如果测定的是未与分析物结合的标记抗体上的信号（附着在免疫吸附剂上），那么这种分析是竞争性的。双位点“夹心”分析明显地更加复杂，因为它们是用两种抗体建立的。固相抗体可以被认为是感受器抗体，标记的抗体使得被占据的感受器抗体的

结合位置能够被区分开来。从这种意义上看，双位点分析可被归为“非竞争性的”分析。

“竞争性”和“非竞争性”仅反映测量抗体结合位点占位数的两种方法，并导致为减少随机误差所需最适抗体浓度方面的差别。

竞争性和非竞争性分析在许多反应特征包括灵敏度上彼此相差很大。这两类分析中，抗体的亲合常数和标记物的比活性在决定灵敏度方面有重要作用。不过，实际上竞争性分析的灵敏度主要受到抗体亲合常数的限制，而标记物的比活性在非竞争性分析中更重要。在这两类分析中，零剂量反应〔 $R_0$ 〕测量的实验误差或操作误差（即来自加样器和其他操作的相对误差 $\delta_{R_0}/R_0$ ，不包括统计学信号测量误差本身）在决定分析的潜在灵敏度（即假若比活性无穷大时测得的灵敏度，亦即信号测量误差为零）中具关键性意义。因此，竞争性分析的潜在灵敏度是 $\delta_{R_0}/KR_0$ ，而非竞争性分析是 $R_0\delta_{R_0}/[Ab]KR_0$ 。后者中的 $R_0$ 代表被错分为结合部分的标记抗体（〔 $bAb$ 〕<sub>0</sub>），即通常所说的非特异性结合的抗体。所以， $R_0/[Ab]=f$ ，即标记抗体的非特异性结合分数。这样， $R_0\delta_{R_0}/[Ab]KR_0=f\delta_{R_0}/KR_0$ 。如零剂量反应测量的相对误差 $\delta_{R_0}/R_0$ 在竞争和非竞争分析中近乎相同，非竞争分析方法的潜在灵敏度比竞争性分析大 $f$ 倍，相当于标记抗体的非特异性结合分数。比如，若非特导结合分数是0.01%，而其它的因素相同，则非竞争性分析的灵敏度比竞争性分析大10000倍。

图3（右）表明在最佳化竞争分析中，灵敏度（分子/ml）与抗体亲合力的关系。假定①使用无穷大比活性的标记物；②使用 $^{125}I$ 作为标记，测样品一分钟的放射性，理论上计算最佳化试剂浓度基于更进一步的假设，即③测量与抗体结合的标记分析物的放射性；并且④在测量结合部分（ $\delta_b/b$ ）时的实验误差是1%，在这种情况下，可达到的潜

在灵敏度是 $\delta_b/Kb$ ，其中 $k$ 是抗体的亲合常数。例如， $K$ 是 $10^{12}L/mol$ ， $\delta_b/b$ 是 $0.01$ ，则最大灵敏度是 $10^{-14}mol/L$ ，或 $\sim 6 \times 10^6$ 分子/ml。在测量放射性样品过程中产生的额外信号测量误差暗示分析灵敏度有损失，如图3(左)上面的一条曲线。不过，这种灵敏度的损失对小于 $10^{12}/mol$ 亲合力的抗体来说是比较小的，对小于 $10^{11}L/mol$ 的抗体则可忽略。换言之，如果分析者让样品测1~5分钟，通过使用比 $^{125}I$ 更高比活性的其它标记物不会使灵敏度有多少改进。类似的考虑提示，比 $^{125}I$ 比活性低很多的放射性标记，如 $^3H$ ，可以限制分析的灵敏度，不论测量时间的样品多长。

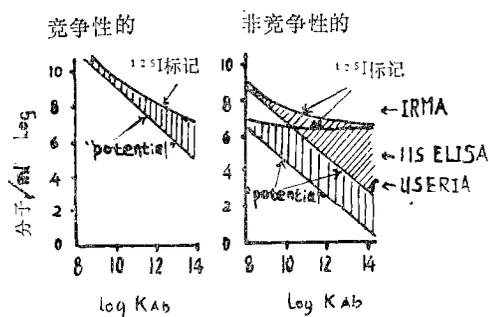


图3 竞争性和非竞争性分析方法的理论上预测的灵敏度与抗体亲合常数的关系(纵坐标为0剂量分析物测得的SD,单位:分子/ml;横坐标为K的常用对数)

源于以上分析的其它主要结论也是重要的,即降低操作误差和应用高亲合力的抗体。比如 $\delta_b/b$ 增加到3%,暗示灵敏度约损失3倍,而不管补救措施如何。不过,从以上分析得到的最重要的结论是,如果假定抗体亲合力的上限在 $10^{12}L/mol$ 的数量级,那么,不论使用的标记物的性质如何,实际上竞争性分析要达到高于 $10^7$ 分子/ml的分析灵敏度,近乎是不可能的。

对双位点非竞争分析的灵敏度进行类似的分析,结果如图3(右)的两套曲线,它

们分别对应于假定的1%和0.01%的标记抗体的非特异性结合。这样的分析得出了与分析的方法设计有关的重要结论,即把标记抗体的非特异性结合降到最低值具有极为重要的意义,并且若非特异性结合降到0.01%左右,在最佳化的非竞争性免疫分析中用 $K = 10^8L/mol$ 的抗体能获得的高灵敏度与使用 $K = 10^{12}L/mol$ 的抗体得到的灵敏度相同。最重要的结论是用高亲合力抗体( $K > 10^{10}L/mol$ )获得的潜在灵敏度是不能通过以同位素为基础的方法来达到的,这是因为同位素本身具有相对低的比活性。当与高亲合力抗体联合应用时,这些标记物的优势更加明显。可是,即使应用亲合力约 $10^8 \sim 10^9L/mol$ 的抗体,非同位素标记物也可以较大地改善灵敏度。DEL FIA是迄今建立起来的第一个超灵敏的非同位素免疫分析。随后有许多不同种类的高比性活的标记物得到了应用(见表1)。

表1 不同类型标记物的探测界限

标记物	比活性
$^{125}I$	每 $7.5 \times 10^6$ 个标记分子每秒种一个可测信号
酶标记物	由反应产物的可测性与酶放大因子决定
化学发光标记物	每个标记分子一个可测信号
荧光标记物	每个标记分子许多可测信号

### 抗体微点免疫分析: 基本概念和理论

周围分析物免疫分析需要特别注意一个似是而非的概念,即常规的标记分析物分析中使用的抗体浓度为 $0.5/K$ 时,灵敏度最大。这种说法无疑已被微点免疫分析的发展所推翻。预料后者是新一代结合分析方法的基础。

免疫分析基本上都依赖于对抗体占位的测量,这种认识导致周围分析物免疫分析的诞生。周围分析物免疫分析是测量介质中能被某一抗体接触的分析物浓度,与样品的体

积及存在的抗体量无关。下列方程代表平衡时抗体结合位点上分析物的占位分数(F):

$$F^2 - F\left\{\frac{1}{[Ab]} + \left(\frac{[An]}{[Ab]} + 1\right) + \frac{[An]}{[Ab]} = 0 \quad (4)\right.$$

式中[An]=分析浓度, [Ab]=抗体浓度(二者的单位以1/K表示)。从该方程很容易看出, 当抗体浓度趋近0时,  $F \approx \frac{[An]}{(1+[An])}$ 。结论如图4所示, 当多种分析物存在时, 以单克隆抗体结合位点的占位分数对抗体浓度作图。当含有分析物介质中的抗体(尽可能用固相抗体)浓度低于0.01/K时, 最终抗体结合位点的占位数仅反映周围的分析物浓度, 且与此时系统中的抗体点量无关(比如, 若 $K = 10^{11} L/mol$ , 抗体结合位点的浓度 $0.01/K$ , 则代表 $0.01 \times 10^{-11} mol/L$ 或 $0.02 \times 10^7$ 结合位点/ml)。分析物与抗体结合会导致介质中未结合的分析物减少, 但由于结合的量很小, 结果, 周围分析物浓度减少并不显著。

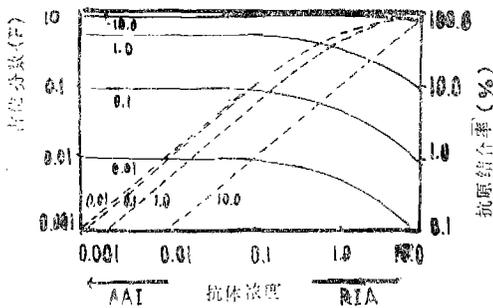


图4 抗体结合位点的占位分数与不同浓度分析物存在时抗体结合位点的浓度关系(一)以及与分析物和抗体结合百分率的关系(---)

这些结论又导致两个新概念的产生, ①抗体可以被限制在固相支持物上的一个微点上, 使微点内抗体结合位点的点数小于 $v/K \times 10^{-5} \times N$ 。这里v是暴露于微点的样品体积(ml), N是阿佛加德罗常数( $6 \times 10^{23}$ ); ②被占位点与总的结合位点的比仅仅依赖于周围分析物浓度, 导致双标记“比度量的”

微点免疫分析的产生。

### 双标记微点免疫分析 (Dual-Label Microspot Immunoassay)

当定位于一适当探针上的抗体微点暴露到含有分析物的液体中后, 可移去探针再暴露到高浓度“显示”抗体的溶液中。“显示”抗体或是针对分析物分子上的另一个抗原表位(假如分析物是大分子), 或是针对抗体上未被占领的结合位点(假如是小分子分析物), 这样感受器抗体的占位分数可通过测量感受器抗体和“显示”抗体的比例估算出来。用不同的标记物标记感受器抗体和“显示”抗体的方法很容易实现, 因此, 荧光标记可能特别有用, 因为通过光学扫描技术, 荧光标记可扫描分布于表面上的大量抗体微点(每个微点针对一个不同的分析物), 这样便可实现在一份样品上同时对多种分析物进行分析。采用双重荧光标记有诸多优点, 如探测视野中感受器抗体的量和分布都不重要, 原因是发出荧光信号的比例未受影响。

### 微点免疫分析的灵敏度

微点免疫分析与大量抗体为基础的常规免疫分析具有同样的灵敏度很易通过模型的分析得到证实。假定感受器抗体被联结在固相支持物的表面以使它们的结合位点朝向分析物, 并且对分析物的亲和力不改变(系统中的抗体浓度——支持物上抗体结合位点数目/温育体积, 不因抗体附着在支持物上而受影响, 平衡时分析物对抗体的占位数与抗体均匀地分布于整个温育介质的情况完全相同), 再让我们假定抗体分子在固相支持物上以具有最大表面密度的均匀单分子层存在, 并且未被标记, 因此感受器抗体的浓度变化提示抗体分布的表面积发生了改变。例如, 若抗体亲和力是 $10^{11} L/mol$ , 总温育体积是1 ml, 且抗体表面密度是6000结合位点/ $\mu m^2$ , 则 $10^5 \mu m^2$ (即 $0.1 mm^2$ )的面积可容纳相应于 $0.1/k$ 浓度的抗体结合位点。进

一步假设,当感受器抗体暴露到含有浓度为 $0.01/K$ 分析物的介质中后,以非竞争方法测定最终的抗体占位(即暴露到另一个针对分析物的标记的“显示”抗体,构成典型的抗体夹心)。最后假定所有被占领的位点都与“显示”抗体反应,后者在表面密度为1分子/ $\mu\text{m}^2$ 时,本身也可非特异地结合到固相支持物上。

抗体包被的面积从 $1\text{mm}^2$ 到 $0.1\text{mm}^2$ 再到 $0.01\text{mm}^2$ 逐渐减少的效应。根据方程(4), $1\text{mm}^2$ 面积的F值是 $4.98 \times 10^{-3}$ 。平衡时分析物和标记抗体分子特异性结合数为 $2.99 \times 10^7$ (即存在约50%的总分析物分子),而标记抗体非特异性结合数是 $10^9$ 。假定探测仪器的视野只限于观察感受器抗体存在的区域(见图5a),设仪器本身的本底(或噪音为零(即本底的唯一来源是视野内标记抗体的非特异性结合),则 $1\text{mm}^2$ 面积的信/噪比约为30。类似地, $0.1\text{mm}^2$ 的F值是 $9.02 \times 10^{-3}$ ,标记抗体特异性结合数是 $5.41 \times 10^6$ ,非特异性结合数是 $10^9$ ,信/噪比为54。随着抗体包被面积的降低,信/噪比升高,直到最大值50,此时感受器抗体的包被面积降到 $0.01\text{mm}^2$ 以下,趋向于零。

如包被抗体面积的减少不伴随仪器探测视野的相应减小,则最终信号的减少并不导致由非特异性结合“显示”抗体而致的本底的降低(见图5b)。所以,尽管包被面积的减少可能会增加感受器抗体的占位分数,但信/噪比或者保持恒定或者下降。这时,增加包被面积可能是有益的,假如感受器抗体的表面密度降低(包被区域可以不变),也能得到类似的结论(见图5c)。

同样,如果仪器产生的本底不是零。且不论仪器的视野如何改变,本底总是恒值,那么,在包被抗体的某个最佳值下仍可得到最大的信/噪比,低于最佳值,则信/噪比下降。假如信/噪比是反映抗体占位测量精密度的指标,则提示减小抗体的包被面积甚至

趋向零是有益的。

一旦抗体包被面积真的减小到零,信号和噪音也都同样地降到零(不过二者的比值仍维持恒定),表示没有任何种类的信号可被测到。包被抗体面积减少而使可测信号损失到足以影响抗体占位测量精密度的程度明显地依赖于用来测定被占领的结合位点的标记抗体的比活性,比活性越高,允许的抗体包被面积越小。有了非常高的比活性,我们可以正视一切情况,即使在非竞争性系统,感受器抗体的最佳浓度可以非常低。各种因子包括用于测量标记抗体(或标记分析物)的仪器特征会影响免疫分析的设计。应用非同位素方法时,来自RIA和IRMA的一些结论可能是错误的,应当予以注意。关于微点免疫分析的灵敏度,更具体的理论研究揭示:

$$C_{\min} = D^*_{\min} \times \left[ \left( 6 \times 10^{20} \right) \left( 1 + \frac{[Ab^*]}{DK} \right) \right] \quad (5)$$

式中, $D$ 是感受器抗体的表面密度(结合位点/ $\mu\text{m}^2$ ), $K$ 是感受器抗体的亲和力(L/mol), $[Ab^*]$ 是“显示”溶液中的标记抗体浓度(单位以 $1/K^*$ 表示, $K^*$ 是标记抗体的亲和力), $D^*_{\min}$ 是标记抗体的最小可测表面密度(分子/ $\mu\text{m}^2$ ), $C_{\min}$ 是分析的可测界限(分子/ml)。若 $[Ab^*] = 1$ , $D = 10^5$ 分子/ $\mu\text{m}^2$ , $K = 10^{11}$ L/mol, $D^*_{\min} = 20$ 分子/ $\mu\text{m}^2$ ,则 $C_{\min} = 2.4 \times 10^6$ 分子/ml或 $4 \times 10^{-11}$ mol/L,感受器抗体的结合位点被最小可测浓度的分析物所占位的分数是0.04%。图6是以几种不同亲和常数的感受器抗体得到的理论上灵敏度对 $D^*_{\min}$ 作图。

上面的分析揭示:①比以同位素为基础的常规免疫方法高许多的微点免疫分析的灵敏度是可以获得的;②如有高比活性的标记物,微点分析的灵敏度就不可能低,且可能优于常规设计的大范围免疫分析所获得的灵敏度(取决于用来测量的仪器特征)。

微点免疫分析的动力学特征有两点需要说明:(1)包被感受器抗体的微点越小,对

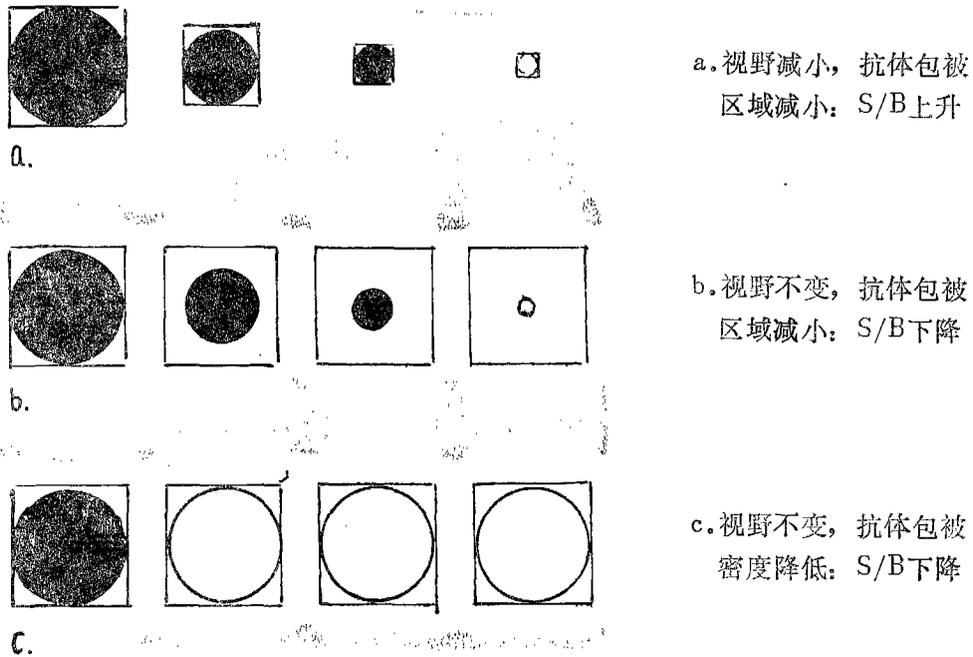


图5 “捕捉”抗体 (CaptureAb) 被包被在圆形区域内, 信号测量仪器的视野是方形区域, a、b、c三种情况下的信/噪比 (S/B) 变化。

抗体与分析物结合反应速度扩散限制也越小, 在极限情况下 (即位于微点内的抗体量趋于零), 反应动力学近似于均一的液相系统中所观察到的反应动力学; (2) 尽管温育介质中感受器抗体的有效浓度很低, 但微点内感受器抗体的结合位点被占领的速率必定高于使用较高浓度抗体的分析 (如在常规免疫分析特别是常规非竞争性免疫的设计)。所以, 如仪器的视野限制在微点区, 当系统中感受器抗体的浓度小于  $0.01/K$  时, 信/噪比最高 (在任何温育时间后)。

### 微点免疫分析: 一些切实的考虑

微点免疫分析需使用激光扫描共焦荧光显微镜。为了得到最高的分析灵敏度, 由光电倍增管自发放出的电子所产生的仪器本底信号必须降到最小。由于这种仪器的光阳极设计得很小, 若将光电倍增管作进一步的改进, 预期可使这一来源的本底降得更低。若感受器抗体的亲合常数为  $10^{12} \text{L/mol}$ , 则理

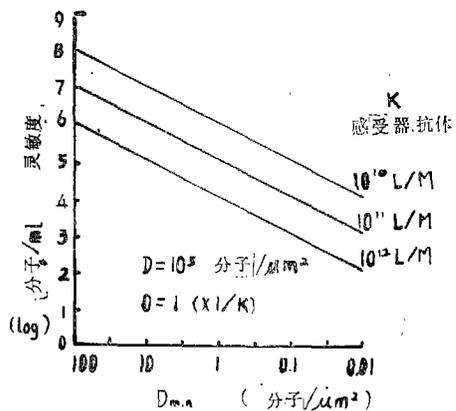


图6 非竞争性微点免疫分析理论预测的灵敏度与微点区可测的最小“显示”抗体密度的关系

论灵敏度为  $2.3 \times 10^4$  分子/ml。很明显, 抗体上直接或间接所荷的荧光越多, 灵敏度也越高。

我们最初研究所使用的显微镜不太敏感, 但仍能进行双重荧光的测量, 其中氩激 (下转第12页)

后时间的延长, 排卵前卵母细胞最敏感, 且不分离率有降低的趋势<sup>[15, 16]</sup>。Russo等<sup>[17]</sup>的实验表明: 雄性生殖细胞减数分裂前期是较敏感的, 尤以终变期最敏感, 而这一期和雌性的排卵前期相对应。

用染色体畸变评价辐射的遗传危险度, 其主要优点是较显性基因突变, 特别是隐性基因突变更容易评价辐射遗传效应。而通过对生殖细胞染色体畸变的观察, 对监测辐射所造成的遗传危害提供了直接观察的手段, 使细胞遗传学研究进入新的阶段。

参 考 文 献

- 1 Preston RJ et al. *Mutat Res*, 1973; 19: 215-223
- 2 蔡露等. 中华放射医学与防护杂志, 1988; 8(3):191-195
- 3 Matsuda Y et al. *Mutat Res*, 1984; 129 (3):373-380
- 4 Matsuda Y et al. *Muttat Res*, 1985; 151 (1):121-127
- 5 Bayrakova A et al. *Mutat Res*, 1976;

- 34:159-162
- 6 Bayrakova A et al. *Mutat Res*, 1987; 176(1):53-58
- 7 Preston RJ et al. *Mutat Res*, 1976; 36: 333-344
- 8 Buul PPV et al. *Mutat Res*, 1974; 25: 361-365
- 9 Buul PPV et al. *Mutat Res*, 1980; 70 (1):95-101
- 10 Buul PPV et al. *Mutat Res*, 1984; 127 (1):65-72
- 11 于文儒. 国外医学放射医学核医学分册, 1989; 13(3):110-113
- 12 Generoso WM et al. *Mutat Res*, 1985; 152(2/3):217-223
- 13 Buul PPV et al. *Mutat Res*, 1986; 173 (1):41-43
- 14 Cattanaach BM et al. *Mutat Res*, 1987; 176(1):69-71
- 15 Tease C. *Mutat Res*, 1982; 105(1/2): 95-100
- 16 Tease C. *Mutat Res*, 1985; 151(1): 109-119
- 17 Russo A. *Mutat Res*, 1983; 108(1/3): 359-372

(上接第44页)

光能发射488nm和514nm两种激发光线, 所以在激发兰/绿荧光体如FITC(最大激发波长492nm)时效率很差。不过, 比值测定法的原则允许两种标记的测量效率存在较大的差异, 这是因为可以通过选择标记抗体的比活性使产生的信号比近乎一致。所以, 从这个意义上讲, 氩源激光激活Texas Red的低效率并不是主要的障碍。最初的研究表明, 在非最佳条件下, 当扫描区域为50 $\mu\text{m}^2$ 时, 这种仪器能测到每 $\mu\text{m}^2$ 约25个FITC标记的和/或Texas Red标记的IgG分子。

微点免疫分析还需研究抗体偶联到固相支持物上的机制。通过比较一些以微点方式设计和以常规方法设计时分析的表现, 证实了上面叙述的理论概念。尽管非最佳化, 但比值测定微点分析显示的灵敏度很接近常规的最佳化的IRMA的灵敏度。

总 结 与 结 论

由于过去在精密度、灵敏度、精确度等概念上的混乱, 一些错误的概念目前已掺入到一些公认的免疫方法设计的规则中, 特别是习惯上使用超过需要的较大的抗体浓度以获取高的分析灵敏度。

原则上限制在非常小区域上(以微点的形式)的小量感受器抗体分子, 结合使用非常高比活性的“显示”抗体探针来测量感受器抗体上被分析物占据数目的方法, 可获得高的灵敏度。相信微型化的抗体微点分析是下一代分析技术的基础, 对于应用结合分析的所有领域可能具有革命性的效应。

[*Clin Chem* 1991; 37(11): 1955~1967

(英文)秦秋平译 林 汉校]