

· 综述与编译 ·

放射免疫分析的方法学研究现状

同济医科大学核医学研究室(武汉, 430030) 叶维新综述

摘要:对近年来在放射免疫分析的方法学研究现状进行了回顾,并就放射性核素及其标记技术、抗原及抗体制备技术、分离试剂及分离技术、方法学设计的演变、数据处理及质量控制、放射免疫分析面临的挑战与前景等六个方面的现状作了介绍和分析。

关键词:放射免疫测定 方法学研究

自从 Yalow 及 Berson 创立放射免疫分析技术以来,经历了三十多年的发展,它不仅成为核医学的重要领域之一,而且在生物医学范围,在生物活性物质的超微量检测技术中,发挥日益重要的作用。现仅将九十年代在方法学研究的现状加以综述与分析。

1 放射性核素及其标记技术

在放射免疫分析中,对抗原或抗体进行放射性核素标记,其基本目的在于提高分析方法的灵敏度,而不影响其原有的性能。研究集中在核素的选择及标记方法的改进上,这是因为标记抗原或抗体质量的好坏,对检测方法的质量具有重要的影响。

1.1 放射性核素的选择

总的趋势是进一步向 ^{125}I 集中,采用 ^3H 者日趋减少。乐于采用 ^{125}I 的理由,看来主要是:①物理半衰期比较适中,商品试剂盒的使用期约1~2个月,能满足大多数用户的要求;② γ 射线的测量技术远较 ^3H 的低能 β 射线测量技术简单;③ γ 射线的能量较 ^{131}I 为低,有较高的计数效率;④生物样品的制备技术也较简单;⑤碘标记技术较为成熟而有效,既可由厂家提供标记品,也可自行标记。由上可见,在无更好的放射性核素取代 ^{125}I 以前,应用 ^{125}I 的趋势将会继续下去。

1.2 标记技术

在放射免疫分析中,对碘标记物的质量

有严格的要求,要求既能满足检测灵敏度的比活度,又不能因标记技术而影响其免疫活性。还有其他一些要求。而现用的一些标记技术,在不同程度上难以全面满足上述要求,虽然氯胺-T法仍被沿用,但采用其他方法者日益增多,例如:氯甘脲(Iodogen)法、乳过氧化物酶(LPO)法、联结标记法(Bolton-Hunter法)等。它们虽有类似的标记原理,但又各具特点,了解其共性与特性,有助于标记方法的选择及标记物质量的控制。

从标记原理看,氯胺-T法、氯甘脲法与联结标记法具有类似的基础,氯胺-T法及其类似物作为一类温和的氧化剂,先将I氧化成 I_2 ,然后再与蛋白质或肽分子上的酪氨酸残基发生取代反应而完成碘标记。不同之处在于氯胺-T法为液相标记而氯甘脲法为固相标记且更为温和,而联结标记法则是先将碘标记到酯分子上,然后再联结到蛋白质或多肽分子上。至于乳过氧化物酶法,则是在微量过氧化氢的催化下以产生温和的氧化环境来完成碘的氧化,进而达到碘标记。这四类方法都可获得高比活度的标记物。

从标记过程看,氯胺-T法的反应过程较快,要求严格控制反应条件;氯甘脲法的标记过程较易控制,氧化反应更为温和;联结标记法需分两步进行,较前者稍繁;乳过氧化物酶法的氧化环境既可通过加入适量过氧化氢达到,也可通过加入葡萄糖氧化酶(GO)对葡萄

糖的氧化作用而连续提供微量的 H_2O_2 , 供乳过氧化物酶利用, 反应过程较易控制。

从标记物质量看, 标记损伤是个严重问题, 活性的丧失或改变, 可导致分析的失败。在标记过程中导致标记损伤的因素很多, 例如: 碘原子的置换, 可在不同程度上改变标记物的分子结构; 碘原子置换的数目, 对标记物的活性具有重要影响, 采用单碘标记是合理的选择; 碘原子的置换位置如果位于功能基团附近, 也会对活性造成影响; 标记过程的化学环境, 特别是氧化环境, 有可能对蛋白质或多肽的分子结构, 如二硫键等造成损伤, 进而影响标记物的活性; 在标记完成后, 标记物分子上的放射性碘原子在其衰变过程中, 既可对标记物分子本身, 也可通过对介质水分子产生自由基间接对标记物产生损伤, 特别在比活度很高时, 这种效应更为明显。因此, 最大限度地减轻标记损伤, 也是近年来不断改进标记技术所追求的目标之一。采用更为温和的氧化剂、在能满足分析的灵敏度前提下不追求过高的比活度、标记完成后选择适当的保存环境等, 都能有效地减轻标记损伤。

2 抗原及抗体制备技术

在放免分析中, 抗原与抗体的质量对分析结果有关键性影响。采用传统免疫方法所获得的抗体, 本质上是多克隆抗体, 由于抗原制备技术不同, 纯化程度及免疫方法各异, 所得抗体很不一致, 难以标准化, 这对放射免疫分析带来难以解决的困难。自杂交瘤技术创立后, 单克隆抗体的制备并引入放射免疫分析系统作为特异性结合剂使用, 明显地改善了分析的质量, 主要表现在: 特异性进一步提高、可提供标准化的特异性结合试剂、改善了方法学设计等, 因而采用单克隆抗体作为特异性结合试剂者日益增多。可以预见, 这种趋势今后将继续存在, 它将与多克隆抗体达到合理的分工及占有。

获得更好的特异性结合试剂, 进一步改

善单克隆抗体的质量, 这是目前正在努力的领域之一。这包括对 IgG 的酶切片段。利用基因工程技术对单克隆抗体作进一步的结构改造, 使之与待检抗原具有更好的结合性能, 这可能是扩展放射免疫分析的检测领域、提高特异性的有效途径之一。

3 分离试剂与分离技术

在放射免疫分析中, 对分离的基本要求是: ①有效分离; ②经济实用。所谓有效分离, 是指对游离和结合部分能达到尽可能的完全分离, 以免造成对定量测量的干扰。所谓经济实用, 是指在满足有效分离的前提下, 能在时间、费用、物质条件及分离步骤等方面, 获得最优的组合, 以保证实验结果的重复性好。然而, 这种简单而明确的基本要求, 在不同的反应体系中却难以达到。例如, 从有效分离角度看, 不同的生物活性物质, 在不同的方法设计中所处的状态不尽相同, 因此, 用某一种分离技术难以适合所有分离的需要; 从经济实用角度看, 特别是常规使用时, 简便实用是重要的。为此, 近些年来, 人们仍在不懈追求更好的分离技术。传统的分离技术是液相分离, 它需要使用合理的离心条件, 以保证分离结果的稳定。为了便于自动化操作, 不同类型的固相分离技术有了较快的发展, 它涉及到固相材料的选择、抗体的包被技术和分离方法的选择等方面。从固相材料的选择看, 已报道的有: 聚氯乙烯、聚苯乙烯、纤维素、尼龙、多孔玻璃微球、凝胶颗粒、磁性微球等; 从材料的形状看, 有连续表面(如试管、微盘等)和分散表面(如球状体、微球体等)之分。选择固相材料的基本要求是①应能有效而牢固地吸附抗体分子而又不影响抗体原有的活性; ②非特异性结合低; ③固相材料的理化性能稳定、批间变异小、价廉易得。从现有资料来看, 固相材料已有不少改进, 但仍欠满意, 如材料性能欠稳定、单位面积结合抗体的量较少、活性经常受影响、非特异性结合偏高等。

应用固相分离技术的重要环节之一是抗体包被技术。Cause^[1]提出,将马来酸酐与苯乙烯先形成共聚体,然后涂管,可提高结合抗体浓度约400倍。汪寅章^[2]在此基础上加以改进,用以固化第二抗体,形成通用的分离技术,它既可以先将第一抗体结合到固相二抗上,然后在固相一抗进行反应,也可在固相二抗的试管内进行液相免疫反应,再采用固相分离。李振甲等^[3]推荐,采用pH 4.8柠檬酸缓冲液包被IgG较pH 7.8的磷酸缓冲液及pH 9.6的碳酸缓冲液更好。他们^[4]还推荐使用琼脂糖交联可磁化碳颗粒。李建华等^[5]则介绍先制备可磁化纤维素,经溴化氰活化后与第二抗体偶联,最后制成可磁化固相二抗颗粒用于分离。它既具有双抗法的通用性,又具有分离简便的优点。随着固相制备技术的不断完善,目前已有多种商品试剂盒采用磁化固相分离技术。

近几年来发展较快的另一类分离系统是生物素-亲和素分离系统,自1986年Odell^[6]提出后不少作者^[7]作了改进。生物素与亲和素间有很高的亲和力,较抗原与抗体间的亲和力更高,一旦结合便极为稳定。此外,通过生物素-亲和素系统的引入,尚可形成一个有效的放大系统,从而明显地提高了分析方法的灵敏度。

4 分析方法的演变

在放射免疫分析中,待测抗原、标记抗原与特异性抗体三者间的合理组合是获得良好结果的必要条件,不少作者做过大量研究。

4.1 按竞争原理与非竞争原理设计的比较

按竞争原理设计的典型方法是放射免疫分析。它采用标记抗原与待测抗原共同与有限的特异抗体产生竞争性免疫结合反应,在达到动态平衡状态时进行有效分离,藉助放射测定进行定量,进而对待测抗原物质得到超微量定量。这类设计方案在仅能获得多克隆抗体时是可行的,但有明显不足,通过杂

交瘤技术能获得单克隆抗体后,人们相继改用非竞争原理设计,代表性的方案是双位点夹心固相分离的免疫放射分析法,其优点有:①标记抗体时的标记损伤较轻,标记物较稳定;②免疫反应动力学不如放射免疫分析那么复杂,反应过程较快;③单克隆抗体的特异性更好;④非竞争原理设计方案可获得较好的灵敏度和较宽的可测范围;⑤由于使用单克隆抗体,能得到恒定的特异结合剂,具有较好的可比性。

可以预见,以上两类抗体及两类设计将会起到相互补充的作用。

4.2 生物素-亲和素系统引入分析设计

基于生物素与亲和素间所具有的特殊性能,它的引入能进一步改善分析方法的质量。例如,先将生物素化抗体及¹²⁵I标记抗体与待测抗原发生免疫反应,形成“生物素化抗体·抗原·¹²⁵I-抗体”三联复合物,然后再与固相链亲和素进行第二步反应,借助生物素与链亲和素间的高亲和力,进一步形成“固相链亲和素·生物素化抗体·抗原·¹²⁵I-抗体”复合物,及多余的¹²⁵I-抗体,通过移去后者,即可得到复合物的生成量,它与待测抗原量呈正比关系。在这一系统中,由于有效地利用了生物素-亲和素系统的高亲和力及放大效应,不仅具有更好的分离效果,而且有更好的灵敏度^[7]。

5 数据处理与质量控制

放射免疫分析是一类极为灵敏的超微量分析技术,极易受影响而使检测结果失真。对数据处理及质量控制的重要性,经历了一个认识过程。八十年代中期,世界卫生组织对放射免疫分析的质量控制提出了指导性建议,推动了我国放射免疫分析质量控制体系的建立和发展。1991年全国第四次放射免疫分析学术会议的主题思想就是抓好质量控制,反映了我国核医学界对这一问题的关注和重视^[8]。对于极为灵敏的超微量分析技术

来说,如果缺乏严格的质量控制体系,将难以确定其失真程序,从而其结果不仅是无价值的,甚至是有害的。因此,提高对质量控制的认识是重要的前提。

一个完整的质量控制体系应该包括生产及使用两个主要环节。作为生产厂家,应建立严格的质量检测程序,以保证进入市场的产品都符合质量要求,这是首要的环节;作为用户,则应建立严格的质量控制体系,以保证从收集样品开始到发出报告为止的全过程中能及时发现问题过程中出现的各种随机误差及系统误差,分析产生的原因,找出纠正的办法,以保证检测的质量达到认可的标准^[9]。

因此,一个合理的质量控制体系,应能满足不同类型的放射免疫分析方法;应能满足不同性质的检测项目;应能达到临床及科研所需要的质量要求;应能与国际上通用的质控体系“接轨”,便于比较与交流;应能适应我国国情并为用户所认可。显然,要做到这些不容易,但又须努力做到。

质量控制体系的基本内容,经过多年的实践与摸索,已经逐步完善起来。由世界卫生组织推荐的方案,比较集中地反映了这一领域的研究成果,大体分为:①标准曲线的拟合;②质量控制血清样品的使用;③质量管理。

5.1 标准曲线的拟合

标准曲线是用以度量样品中待测物质浓度的客观尺度,是质量控制体系中用以处理其他数据的基础。鉴于免疫反应体系中反应动力学的多样性及复杂性,制备标准曲线的主要目标是:既能最大限度地和如实地反映在免疫反应动力学中的量效之间的关系,又能有效地识别和排除在实验误差时所引入的误差对标准曲线的影响。在过去,曾提出过多种拟合方案,基本上都是从数学的角度来处理这群数据,实践证明不尽合理,其关键在于未能反映免疫反应动力学中的量效关系。随着认识的深入和计算机技术的引用,一些较

好的拟合模型相继诞生。

按照经典的放射免疫分析方法学设计时,目前仍在使用的拟合模型有以下几种。

5.1.1 Logit-log 转换并线性拟合

它先将结合率经 Logit 转换,剂量(标准品)对数经 log 转换,绘制在 Logit-log 坐标纸上,然后将这组数据经过最小二乘法进行回归处理,得到线性方程。这是一种以数学为基础的经验式,主要优点是拟合模型简单易行,如果实验误差不大,且选用拟合曲线的中间区段,对于大多数放射免疫分析项目来说,所得结果能满足质量的基本要求。本法的不足处在于:它是通过数学转换方法将剂量效应曲线改换成为一条貌似直线的曲线,以致造成标准曲线的两端出现较大的偏离现象,而且,对坏点的鉴别能力也较差。鉴于许多仪器中已配置这种拟合模式,可作为一种基本的拟合模型加以利用。

5.1.2 四、五参数 Logistic 模型

它是在 Logit-log 模型的基础上针对其缺点作出的改进方法,并为国际放射免疫分析专家所推荐。其主要改进有:对于对称性曲线,它采用四个参数;而对于非对称性曲线,采用五个参数。这种拟合模型的适应性更强,可适于绝大多数项目使用,是目前使用广泛的一类拟合模型。

5.1.3 单位点四参数质量作用模型

它是根据免疫反应动力学理论推导出来的模型,能较好地反映放射免疫分析的剂量-效应关系,对非特异性结合的数据处理更为合理,对于非对称性曲线也能适用,是一类通用性强的模型。但是,当采用一般方法拟合时,其拟合的收敛性较差,参数的稳定性也较差,从而影响其广泛采用。冯国平等^[10]采用稳健回归方法加以改进,消除了原方法的不足,对坏点的影响也有较好的耐受性。

按照通用的免疫放射分析设计方案时,虽然其本质仍属免疫反应,也遵循质量作用定律,但是由于系非竞争原理设计,且采用单

克隆抗体,其免疫反应动力学规律及剂量效应关系与放射免疫分析有所不同,采用放射免疫分析拟合模式仍欠满意。胡镇球等^[11]根据质量作用定律导出一个符合单位点免疫放射分析的三参数模型,它符合免疫放射分析时的量效关系,在无坏点存在时,可以得到覆盖整个剂量范围的标准曲线,而且对坏点有较高的识别能力。这一模型还可用于按非竞争原理设计的免疫分析及非平衡性免疫分析系统,具有较好的通用性能。

在计算机的参与下,标准曲线拟合模型将会逐步变得更合理和更方便,它为样品浓度的反查提供了可靠的基础。然而,应当指出的是,再好的拟合模型亦不能改善实验数据低劣所带来的影响。

5.2 质量控制血清样品

在放射免疫分析中,对质量控制血清样品的重要性经历了一个认识过程。在缺乏真值传递系统的情况下,目前试剂盒中所配置的质控血清样品,实质上是相对标准。虽然如此,由于质控血清样品与标准品所使用的溶液系统截然不同,两者在免疫反应中所处的环境也不同,而质控血清样品与待检血样具有更多的类似性,因此,采用质控血清样品作为质控指标的重要性是显而易见的。作为商品,应该配备合格的质控血清样品供用户使用;作为用户,应当采取具体技术措施,利用质控血清样品监测分析的质量。

5.3 质量管理及质量评价

放射免疫分析的实验误差通常由系统误差与随机误差所组成,两类误差的成因不同,定量方法各异。许多作者^[8-12]先后推荐过多种质量管理体系及质量评价建议,对完善管理体系及合理评价结果起了积极作用。吴德福^[12]利用多批复管计数的历史资料建立了样品计数误差与计数间的理论估算关系,并以此作为分析随机误差的起点,求出反应误差关系,进而推算出其他质量指标。

值得关注的是:自九十年代以来,在正式

刊物上发表有创见性的质量控制论文不多,而且在涉及放射免疫分析的学术论文中引用严格的质量控制的资料较少。为了促进放射免疫分析技术的发展,抓好质量控制是重要的基础性环节之一,应当予以必要的重视。

6 面临的挑战及其前景

自放射免疫分析技术建立以来的三十多年间,仅从方法学角度看,业已取得了巨大的进展,成为核医学及许多相关学科的重要技术手段之一,促进了医学进步。与此同时,非放射性免疫技术也有长足进步,共同构成了在体外分析技术中的“百花齐放”局面,各种体外分析技术都面临着严峻的挑战。近些年来,酶免疫分析技术致力于改善抗原抗体系统、抗原包被技术、降低非特异性结合等方面,已使其灵敏度逐步逼近放射免疫分析技术,由于它没有放射性物质的参与,方法又简便易行,可以预见,它在免疫分析领域内将继续扮演重要角色。化学发光免疫分析具有较好的灵敏度,也不用放射性物质,一度认为它具有良好的发展前景,但是,方法学上的重现性差、稳定性不好的缺点,在相当程度上制约了它的发展。目前发展很快的是时间分辨荧光免疫分析技术,这类技术的方法灵敏度与放射免疫分析不相上下,特异性也强,标记物稳定,实验周期短,应用范围广,是有发展前途的一类新技术,目前制约发展的因素在于所用的测量仪器尚需依赖进口,价格很贵,在国内同类仪器未能大量供应前,推广尚有暂时困难。

作为放射免疫分析技术本身,三十多年来,也在不断演变和发展,如同其他分析技术一样,也在吸取各方面的技术成果用以不断提高自身的质量与水平,单克隆抗体的引入、基因工程抗体的发展、生物素-亲和素系统的利用、方法学设计的改进、数据处理能力的增强、标记技术及放射测量技术的进步等,都从不同方面给放射免疫分析技术带来生机和活

力。作为自然科学技术的一般规律,我相信,在面临挑战与竞争中,放射免疫分析技术将会进步得更快、发展得更好,为繁荣体外分析技术作出应有的贡献。

参 考 文 献

1 Cause JE et al. Clin Chem, 1990; 36: 525
 2 汪寅章等. 中华核医学杂志, 1994; 14(3): 170
 3 李振甲等. 第四届全国核医学学术会议论文摘要汇编, 武汉, 1993; 94
 4 李振甲等. 中华核医学杂志, 1986; 6(3): 141

5 李建华等. 中华核医学杂志, 1988; 8(2): 104
 6 Odell WO et al. Clin Chem, 1986; 32: 1873
 7 Diamandis EP et al. Clin Chem, 1991; 37(5): 625
 8 朱承谟. 中华核医学杂志, 1991; 11(增刊): 1
 9 叶维新等. 实验核医学, 长春: 吉林科技出版社, 1990: 198
 10 冯国平等. 中华核医学杂志, 1990; 10(2): 98
 11 胡镇球等. 中华核医学杂志, 1992; 12(4): 226
 12 吴德福等. 中华核医学杂志, 1992; 12(4): 247

(收稿日期: 1994-11-16)

RIA 误差分析的理论估算系统

吴德福综述

摘 要:概述了 RIA 随机误差分析理论估算系统的实践、理论基础和有关数理统计学原理的应用,以及 RIA 各项质量指标的定义、检测评价方法,同时还推导出一些重要参数的函数表达式。这将为 RIA 质量的规范化管理提供一个必要的前提。

关键词:随机误差 反应误差关系 精密度 置信限

传统的 RIA 误差分析和质量评价,原则上都建立在样品实测值的基础上。这里包含样品计数和浓度的实测值。这种评价方法的明显缺陷是:RIA 常规检测样本含量小,复管数一般 ≤ 2 ,所以靠实测值统计计算得到的误差数据极不稳定;另外,由于误差没有通用的表达式,无法进入理论分析、函数计算、图像描述等这些深层次的领域,从而极大地妨碍了它在理论和实践方面的提高。

从七十年代中叶以来,专家门就致力于创建 RIA 误差分析的理论估算系统,迄今这一系统的总体结构已经完成。虽然在某些特定场合、某些细节上还有这样或那样的问题亟待解决,但从总体上看,RIA 的误差分析、质量评价已完全可转到理论估算系统上来了。这标志着 RIA 方法已逐步走上成熟的阶段。

1 建立反应误差关系函数

用多批复管计数的历史资料构成大样本(如含复管 200 对以上),统计建立样品计数误差 S_u 与其计数 u 之间的函数关系,称为反应误差关系(RER)。它是理论估算系统的基础和出发点,全部 RIA 误差分析就在这个基础上展开。

国际免疫分析专家们推荐 RER 的回归函数模型为下述表达式^[1]:

$$S_u^2 = \alpha \cdot u^\beta \tag{1}$$

式中, u 为样品计数,函数的自变量; S_u^2 为计数方差的期望值,函数的应变量, α 、 β 为回归常数。

当然,式(1)也可转换为计数误差的形式,即:

$$S_u = (\alpha \cdot u^\beta)^{1/2} \tag{2}$$