

血清 3,3',5-三碘甲腺原氨酸 (T_3) 的固相放射免疫分析

宋兰芝 华陵 严敏官

(中国科学院生物物理研究所,北京)

提 要

三碘甲腺原氨酸固相放射免疫分析 (T_3 -SPRIA) 是一种新的放射免疫分析技术。本工作是用纯化的兔抗三碘甲腺原氨酸免疫球蛋白 (T_3 -IgG), 与聚苯乙烯小球偶联, 制成 T_3 -固相抗体 (T_3 -SP-Ab)。 T_3 -SPRIA 方法简便、灵敏、快速和稳定。试验内、试验间及批间的变异系数分别为: 11.6%、4.1% 和 5.4%。

固相放射免疫分析 (Solid Phase Radioimmunoassay, 简称 SPRIA), 是将抗体(或抗原)以物理或化学方法使其与固相载体物质吸附或联结, 形成固相抗体(或抗原)吸附剂, 再与相应的抗原(或抗体)反应, 结合形成固相的抗体-抗原复合物, 从而能与游离的抗原(或抗体)分离, 简化了离心分离程序。自 1967 年 Catt^[1]建立涂管固相法及 Wide^[2] 等建立共价键结合的 SPRIA 以来, 从方法学上不断地改进并日趋完善。涉及到的关键技术^[3]: (1) 固相载体的选择; (2) 抗体(或抗原)与固相载体联结方式的选择; (3) 偶联剂的选择, 视抗体(抗原)本身的种类、免疫活性基团在分子结构中的部位, 来选择蛋白质偶联剂, 如溴化氰, 过碘酸钠, 戊二醛等; (4) 测定方式的选择。目前, 固相 RIA 作为一种新的分离技术已被广泛地应用。

本文用聚苯乙烯小球作为固相载体, 采取物理-化学法与 T_3 -IgG 偶联, 得到的 T_3 固相抗体吸附剂稳定性高, 非特异性低, 制备方法及 RIA 测定方法均较简便, 适合临床检验与科研工作。

材 料 与 方 法

一、 T_3 -IgG 的制备

(一) T_3 抗体的制备:

1. T_3 免疫原的制备 L - T_3 在通入氯化氢气的催化下, T_3 与甲醇作用生成 T_3 -甲酯以封闭羧基端。在水溶性碳化二亚胺作用下使 T_3 -甲酯的氨基端与牛血清白蛋白结合, 制成 T_3 -甲酯-BSA, 经紫外鉴定做为免疫原。

2. 免疫动物 第一、二次免疫家兔用 T_3 -甲酯-BSA 的福氏完全佐剂, 剂量为 2 mg/只, 皮内多点注射, 相隔两周。以后每月一次加强免疫, 剂量为 1—1.5 mg/只。

3. 抗体鉴定 抗体的使用滴度可达 1:100,000, 经计算亲和常数, K_a 值近于 1×10^9 L/mol 与 T_4 无交叉反应。

(二) 从 T_3 抗体中提纯 T_3 - γ 球蛋白 (T_3 -IgG):

1. 粗提 T_3 -IgG 采用不同饱和度硫酸铵沉淀法, 从 T_3 抗血清得到粗制 T_3 -IgG 沉淀物。

2. 纯化 T_3 -IgG 粗制沉淀物溶解于 0.01 mol/L, pH7.0 的磷酸盐缓冲液中并透析。透析液经 DEAE-Cellulose-52 柱层析, 收集所需洗脱液, 用蒸馏水透析, 冷冻干燥, T_3 -IgG 干粉置 4℃ 保存。检测 K_a 值, 未变。

二、固相载体小球的包被方法

(一) 固相载体的选择:采用上海塑料研究所及美国 Precision Plastic Ball Co. 生产的聚苯乙烯小球两种产品。小球直径 6.6 mm。小球经蒸馏水浸泡,漂洗 2—3 次,无水乙醇浸洗 1 次,真空干燥或自然风干,保存待用。

(二) T₃-固相抗体吸附剂的制备 (T₃-IgG 固相): T₃-IgG 溶解于 pH 9.8, 0.01 mol/L 的碳酸盐缓冲液,根据放射免疫制作的滴度曲线,选择结合度为 30—50% 的滴度,并经 280nm 吸收光下蛋白质定量,控制 T₃-IgG 包被载体的浓度。

包被过程 将固相小球置于 T₃-IgG 溶液中,4℃下 24 小时,轻微搅拌两次,换入戊二醛溶液,4℃浸泡 2—3 小时,倾出液体,小球用 Tween 20-巴比妥缓冲液 (含 0.1% BSA) 4℃浸泡 1.5—2 小时,倾出溶液并用重蒸水洗 2 次。真空干燥,4℃保存。

三、T₃-固相 RIA 测定方法(T₃-SPRIA):

(一) 无 T₃ 血清的制备: 正常人混合血清加入 10% 活性碳,连续搅拌 6—8 小时,置 4℃ 24 小时,离心取上清液,即得无 T₃ 人血清。(由卫生部药品生物制品检定所提供)

(二) T₃ 标准物的配制

1. T₃ 母液精确称量 L-T₃(sigma) 溶于 80 mmol/L NaOH 溶液,经 320 nm 下测定 O. D 值并校正实际浓度,分装,冻结保存。

2. T₃ 贮存液 由 T₃ 母液用含 20% 丙二醇的巴比妥缓冲液稀释为 800 ng/ml 的 T₃ 贮液。

3. T₃ 工作液 将 T₃ 贮存液用无 T₃ 血清稀释成: 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 和

1600 ng/dl 的 T₃ 标准工作液。并用质量控制血清 (QC 为参考血清) 作 RIA 分析校正。

(三) ¹²⁵I-T₃-ANS 溶液: ¹²⁵I-T₃ 由北京原子能所提供,比放射性为 1000 μCi/μg。用含 0.2% ANS 的巴比妥缓冲液稀释。

(四) T₃-SPRIA 的操作步骤: 如表 1 所示

37℃或室温下温育 1.5 小时,吸弃液体,用 0.5ml 生理盐水洗 1—2 次,吸干后,小球连同反应管进行放射活度测量,并计算 $\frac{B}{B_0}\%$ 。绘制标准抑制曲线及查出样品的 T₃ 值。

结 果

一、标准曲线及质量控制:以不同浓度 T₃ 标准物为横坐标,以 T₃-IgG 包被的美国和国产小球的两种 T₃ 固相抗体对 T₃ 标准物的结合率 $\frac{B}{B_0}\%$ 值为纵坐标,获得 T₃ 标准抑制曲线 (图 1)。

用 T₃ QC 血清检测 T₃ 标准物,各点基本符合。

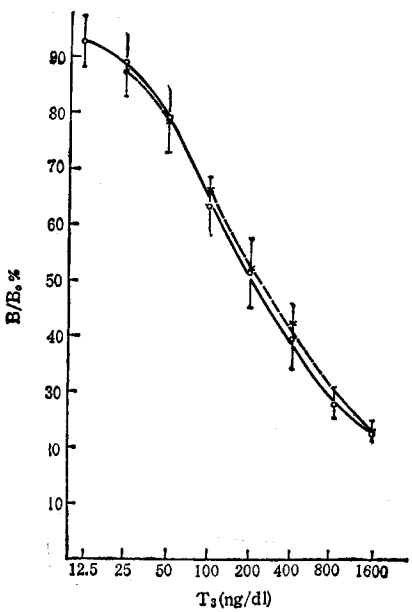


图 1 T₃-SPRIA 标准抑制曲线
—○—: 进口球 ---×---: 国产球

表 1 T₃-SPRIA 的步骤和方法(μl)

	零标准管(B ₀)	标准管 (12.5—1600 ng/dl)	样品管
无 T ₃ 血清	50	—	—
T ₃ 标准液	—	50	—
待测血清	—	—	50
¹²⁵ I-T ₃ -ANS 液	100	100	100
巴比妥缓冲液	300	300	300
T ₃ -固相 IgG 球	1(个)	1(个)	1(个)

表2 人血清 T_3 正常值

例 数	血清 T_3 正常值 T_3 (ng/dl)	
	$\bar{x} \pm SD$	实测范围
62	148.1 $\pm$ 32.5	82—220

二、血清 T_3 正常值: 用 T_3 -SPRIA 测定 62 例正常人血清 T_3 值(解放军总医院供血)。列于表 2 中。

三、 T_3 -SPRIA 的方法学检验

(一) 重复性(见表 3)

表3 重复性实验

种类	n	$\bar{x} \pm SD$ (ng/dl)	变异系数 (范围)(%)	变异系数 (%)
试验内	12	124.2 $\pm$ 14.5	10.3—13.8	11.6
试验间	7	136.4 $\pm$ 5.6	3.7—4.3	4.1
批 间	4	130.0 $\pm$ 7.1	5.2—5.9	5.4

1. 试验内变异系数 用同一血清样品, 在一次试验内平行 12 管, 其变异系数为 11.6%。

2. 试验间变异系数 选用同一批 T_3 -IgG 包被的固相小球, 以同一混合血清样品, 间隔半个月, 1 个月, 2 个月, 测定其 T_3 值, 变异系数为 4.1%。

3. 各批包被小球之间的变异系数 以 4 种不同批号的 T_3 -IgG 包被固相小球, 在同一次试验内, 测定同一混合血清样品的 T_3 值, 变异系数为 5.4%。

(二) 灵敏度: 根据标准抑制曲线(图 1) 可见, 最低检出值可达 12.5ng/dl, 与 0ng/dl 有显著差异($P < 0.05$)。最高检出值可达 1600 ng/dl。

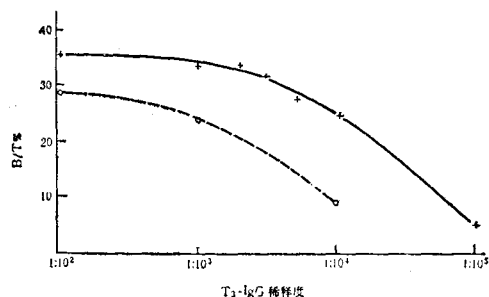
表4 回收实验

项 目	T_3 ng/dl		回收率(%)
	理论值	测定值	
血	—	145	—
$\frac{1}{2}$ 血	—	75	—
$\frac{1}{2}$ 血+25 ng/dl	100	92	92
$\frac{1}{2}$ 血+50 ng/dl	125	145	116
$\frac{1}{2}$ 血+100ng/dl	175	170	97
$\frac{1}{2}$ 血+400ng/dl	475	550	115
平 均			105

(三) 回收实验: 将一正常混合血清稀释一倍后, 再分别追加不同浓度的 T_3 标准物, 用 T_3 -SPRIA 测定 T_3 值, 将测定值与理论值相比, 得到回收率(%), 如表 4 所示。回收率范围为 92%—116%, 平均回收率为 105%。

讨 论

一、 T_3 -IgG 的质量

图2 T_3 -IgG 滴度曲线

—X—: 固相抗体经戊二醛偶联
—O—: 未经偶联的固相抗体(U.S.A 球)

T_3 -IgG 包被固相小球的滴度曲线如图 2 所示。 T_3 -IgG 原液的浓度为 0.7 mg/ml。

不同浓度 T_3 -IgG 包被的固相小球, 对标准抑制曲线的形状(斜率与截距)有一定影响。故应从滴度曲线与标准抑制曲线选择最佳的 T_3 -IgG 浓度包被小球。经试验, 一次包被液可重复用于包被小球, 其结合质量不变。

T_3 -IgG 的活度, 经测定与计算, 其亲和常数 K_a 值约 2.18×10^8 L/mol, 与包被前的 K_a 值基本一致。

由 T_3 -IgG 包被固相小球的滴度与活度两方面可见, 从 T_3 抗血清中分离纯化的 T_3 -IgG 既保持了分子原有的免疫基团; 又去掉了不起免疫作用的多余蛋白质, 使之更充分地占据固相载体的有效接触面, 保证抗体-抗原特异结合反应更完全, 从而提高了 T_3 -SPRIA 的灵敏度。

二、物理化学包被的固相小球: 本工作中所采用的 T_3 -IgG 包被固相小球, 经蛋白质偶联剂(戊二醛)的化学作用, 因此属于物理-化学包被法。 T_3 -IgG 首先被小球的表面所吸附, 再加入乳化剂 Tween-20 与保护蛋白 BSA, 使之

填充小球表面的空白位置。然后加入戊二醛，其分子为一种双功能基团试剂，具有两个醛基，与 IgG 分子的游离氨基形成分子交联，在小球的外部形成具微孔的网状结构，将 IgG 牢固地固定在小球的表面，这样，既不影响 IgG 分子免疫基团的活力；又能增加小球对 IgG 的吸附作用，使之增加了包被效果。由图 2 可见，在包被过程中，蛋白质偶联剂的存在与否，将影响 IgG 包被小球的程度，从而直接反映其结合度的变化。经这种物理-化学方法包被的固相小球，在 RIA 反应中，用水或生理盐水反复洗涤，分别测其放射性强度，所得到的标准抑制曲线基本重合， $B_0\%$ 及血样 T_3 测定值基本相同(见表 5)。说明这种包被方法很理想。

三、小球再生： 本工作中采用了国产与美国生产的聚苯乙烯小球，从二者的标准抑制曲线(见图 1)及测定的混合血清 T_3 值可见，其包被效果无明显差别。

固相小球的成本目前仍较高，为充分利用它，我们作了“小球再生”试验，即经过 RIA 测定用过的小球，经超声波处理和洗涤，并经仪器检测已无放射性，将处理过的小球再重新包被 T_3 -IgG，其结合效果与第一次包被的小球相同，即测定的标准抑制曲线及同一血清 T_3 值相近。使用这种“再生小球”可以大大地节约原材料，降低成本，有利于 SPRIA 的推广。

四、 T_3 -SPRIA 温育条件的选择： 温育的温度与时间直接影响固相抗体的结合能力。增加温育的温度，结合反应较迅速。随着温育时间的延长，结合反应的程度趋于平衡(见图 3)。

本方法选用 37°C 温育 1.5 小时，与降低温度，延长温育时间(4°C ，24 小时)效果相近。

表 5 小球洗涤次数对结合度的影响

洗涤次数	$B_0\%$	血样 T_3 值 (ng/dl)
0	21	80
1	22	78
2	23	84
3	24	89

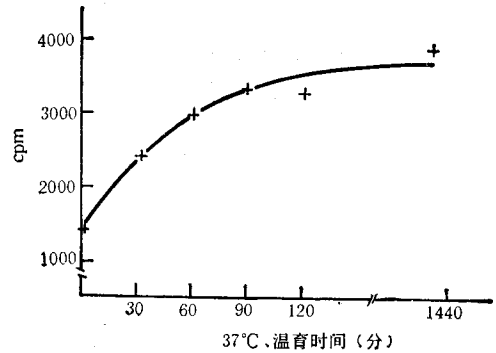


图 3 温育时间的影响

五、关于 T_3 -SPRIA 测定的血清 T_3 正常值： 将本方法测定的 T_3 正常值与国内外几种 RIA 方法所获得的 T_3 正常值相比较(见表 6)，其结果很相近。

本方法与法国 T_3 均相 RIA Kit 比较。用相同的血清样品 45 例，测得血清 T_3 值，两组数据 P 值 >0.05 ，故无明显差异(见表 7)。

表 6 T_3 -RIA 几种方法比较

	PEG 法 T_3 -RIA ^[4]	Amerlex T_3 -RIA Kit ^[5]	本文 T_3 -SPRIA
正常血清 T_3 值 (ng/dl)	141 ± 25 (71—230)	140 ± 29	148.1 ± 32.5 (82—220)
标准曲线可测范围	25—800 (ng/dl)	25—800 (ng/dl)	12.5—1600 (ng/dl)
特殊试剂与条件	PEG 为分离剂 需离心分离	抗体包被固相载体较繁杂，需离心分离	抗体包被固相小球较容易
操作步骤	加 8 种试剂，温育 2 次，离心，测量	加 4 种试剂，温育，离心、测量	加 3 种试剂，温育、洗涤、测量
成本	低	高	较高 PEG 法略高

六、固相 RIA 是近年发展起来的一种新的放射免疫技术，此法具有较高的稳定性，操作简便、快速，由几种 T_3 -RIA 方法的比较可见(表 6)。同时，固相 RIA 做为一种分离技术，在 RIA 方法学的发展中起很重要作用，如“RIA 磁化微粒法^[6]”，即将磁铁粉与固相支持物结合，然后制备成固相抗体(或抗原)，参予 RIA 反应，温育后将试管置于磁铁板上，联结有磁铁粉的固相抗体-抗原复合物，受磁场作用沉淀至管底，倾出清液即可进行放射性测量。近年很多

表7 T₃ 固相 RIA 与法国均相 RIA Kit 比对

例数	均值 $\pm$ S $\bar{x}$ (ng/dl)		P 值
	T ₃ 固相 RIA	法国 T ₃ RIA Kit	
45	148.1 $\pm$ 36.2	135.0 $\pm$ 44.5	>0.05

作者^[7,8]提出的“RIA 样品内衰变剂计数法”(Internal Sample Atlonuator Counting, 简称 ISAC)。首先将衰变剂氧化铊与固相载体结合,然后经戊二醛与抗体偶联,制成具有衰变(屏蔽)作用的固相抗体,参予 RIA 反应,能将放射性标记的抗体-抗原复合物的放射性衰变,然后即可直接测量游离部分。这些 RIA 新技术,在很大程度上是以固相 RIA 为基础发展起来的。

参 考 文 献

- [1] Catt, K. J.: *Science*, **158**, 1570, 1967.
- [2] Wide, L. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **130**, 257, 1966.
- [3] 麦荫乔等:《竞争放射免疫分析》, P. 60, 原子能出版社, 1981.
- [4] 李振甲等:《激素的放射免疫分析》, P. 259, 科学技术文献出版社, 1985.
- [5] Amerlex T₃RIA Kit, The Radiochemical Centre Amersham England, 1980.
- [6] Forrest, G. C. et al.: *Clinical Immunochemistry in Immunoassay*, P. 147, 1983.
- [7] Thorell, JI.: *Clin. Chem.*, **27**, 1969, 1981.
- [8] Holub WR, et al.: *Clin. Chem.*, **28**, 1555, 1982.

[本文于 1986 年 12 月 24 日收到]

书评

《生物大分子晶体结构研究》介绍

由李家瑶同志撰写的我国第一本关于生物大分子晶体学专著“生物大分子晶体结构研究”即将由四川教育出版社出版。生物大分子晶体学是蓬勃发展的生命科学的一个前沿,她曾经并继续对生命科学的发展起重大推动作用。这门学科的研究方法和内容可概括为用 X 射线衍射等方法研究生物大分子空间结构及其与功能的关系。生物大分子晶体结构测定经历了漫长的创业的历史,于五十年代末取得了突破性进展,卅年来已取得了为世人所瞩目的成就,从分子结构水平回答了当今生物学中许多重要问题。近年国内虽出现了一些好的综述论文,但多是报道这门学科某些方面的进展。“生物大分子晶体结构研究”一书在国内首次对这门学科及其所取得的成就及最新进展进行比较系统、全面的介绍,这无疑是十分有意义的,是广大生物学领域及其他对生命科学有兴趣的读者盼望已久的。

本书是吴大诚先生主编“现代高分子科学丛书”的一个组成部分。作者李家瑶同志从事生物大分子晶体结构研究多年,有较丰富的研究与教学经验。全书分七章,共 227 页,前四章分别介绍生物大分子晶体学的学科简介,历史发展、X 射线衍射基本原理和实验技术。由于大分子晶体学所采用的基本研究方法属于比较专门的 X 射线晶体学范畴,为了使广大生物学读者易于了解,作者对有关研究方法采用尽可能少的数学语言,简明扼要、深入浅出地予以介绍。同时注意到保持科学的严谨性,这将为广大生物学领域读者所欢迎。作者在附

录中还较深入地讨论了方法细节,并给出了大量文献,这对于那些准备从事该领域研究的学生将可提供具体帮助和深入钻研的方向。第五章用很长的篇幅介绍了生物大分子晶体学的成就,内容相当丰富,还包括了许多最新的重要进展,例如:复杂的病毒、核糖体、核小体和膜蛋白的结构分析,蛋白质结构运动性的研究以及蛋白质工程等。读了这一章之后,读者将不仅对已有成就获得较系统全面了解,而且将体会到这门学科的发展趋势、它的最活跃的研究课题以及 X 射线衍射方法在研究这些问题中的巨大威力。第六章介绍了其它几种重要的结构分析方法如中子衍射、纤维衍射、小角散射、电镜与显微图象的三维重组、核磁共振等。文笔简练、概念清晰。这些方法已经成为 X 射线衍射方法的重要补充。因此,这一章是全面了解目前结构分析方法现状所不可缺少的。

评论者认为全书有一、二处叙述略嫌不足。如书中对核酸的二级结构的交待似乎过于简略。此外,在附录的衍射实验部分,似乎应增加重要四园衍射技术的介绍。尽管如此,读者仍可通过阅读书中所列的有关参考文献来补充这些知识。

本书在写作上的特点是叙述生动、文笔流畅,特别是穿插了一些有趣的历史事件的描写,读起来引人入胜,并会使人从中得到启迪。

[林政炯]