

免疫微球在放射免疫分析及细胞识别中的应用

沈荣森 王仁芝 宋家云 刘桂波

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

提 要

用 ^{60}Co 辐照法聚合了直径1微米、大小均匀的羟基微球。用羟基微球制备了固相二抗,并成功地应用于 T_3 、 T_4 、 TSH 、 $\beta_2\text{-MG}$ 和地高辛的RIA中。观察了用固相二抗识别人辅助T淋巴细胞的效果,结果与荧光标记二抗法的结果相符。

在多种免疫分析中,分离结合部分(B)与游离部分(F)是不可少的步骤。在现有的方法中,固相法简便、快速、分离效果好和影响因素少,是首选的分离手段和发展的方向。其中,应用高分子免疫微球是近年发展的新技术^[1]。因微球能制成规则的形状、所需的大小和很高的单分散度,并可用带有的官能团与免疫配基化学偶联,故具有更多的优越性。

国外已应用免疫微球,但制备方法多属保密或专利。近年国内也进行了羧化聚苯乙烯免疫微球应用于免疫反应的研究工作^[2]。本文报告亲水性的免疫微球固相二抗的制备、性质和在血清3,5,3'-三碘甲腺原氨酸(T_3)、甲状腺素(T_4)、促甲状腺激素(TSH)、 β_2 -微球蛋白($\beta_2\text{-MG}$)和地高辛(Digoxin)等的放射免疫分析(RIA)中的应用,并初步观察了用于细胞识别中的效果。

有的随着存放时间的延长也经常在变化,再加上操作技术、试剂、测量仪器也都会给整个实验带来误差。它们都直接影响测定结果准确性和可靠性的因素。因此,提高生产药盒的质量,保证实验室测定结果的准确性,都有必要确定商品药盒的标准化和质量控制。这样,既有利于控制操作误差和监督测定结果,又有利于提高临床诊断符合率和对患者疗效的观察。

材 料 和 方 法

一、免疫微球固相二抗的制备

1. 羟基微球的制备

聚合单体为甲基丙烯酸-2-羟基乙酯(2-Hydroxyethyl methacrylate)和少量N,N'-亚甲基双丙烯酸酰胺(N,N'-Methylene bisacrylamide)。用 ^{60}Co 辐照法聚合^[3]。将产物离心分离,沉淀用蒸馏水洗涤,并悬浮于蒸馏水中,4℃贮存。

取悬液烘干,称重,计算聚合物浓度和聚合率;取悬液制样,在电镜下观测,统计微球的计数平均直径($\bar{d}$)及其相对标准偏差(SD)。

2. 羟基微球的活化

羟基微球用CNBr法活化^[4]。活化后离心分出沉淀,用冷的0.1mol/L NaHCO_3 溶液洗涤,然后立即与第二抗体偶联。

参 考 文 献

- [1] 陈泮藻等:《生物化学与生物物理进展》,1985,(3),76.
- [2] 李振甲等:《激素的放射免疫分析》,科学技术文献出版社,1985,127—129.
- [3] 吴德福等:《微机多探头 ^{125}I 碘放免测定仪FT-630的数据处理》,北京核仪器厂资料,北京,1985.

[本文于1987年3月9日收到]

3. 活化微球偶联第二抗体

自羊(或驴)抗兔 IgG 的血清中,用硫酸铵沉淀法得到粗提的 IgG,再经 DEAE 纤维素柱纯化,得到纯的 IgG。

活化微球加纯化或粗提 IgG 的 0.1mol/L NaHCO₃ 溶液成悬液,在室温下翻转搅拌 24 小时。离心,沉淀经 0.1mol/L NaHCO₃ 洗涤后,加 0.1mol/L 醋酸缓冲液 (pH4.0),在室温下翻转搅拌 20 小时。离心,沉淀用免疫反应待用的缓冲液洗涤。最后,用该缓冲液稀释成免疫微球固相二抗悬液,浓度为 10mg/ml,4℃ 贮存。

用上述同样方法制备偶联羊抗小鼠 IgG 的免疫微球固相二抗。

二、RIA 程序

T₃、T₄、TSH、 β_2 -MG 和 Digoxin 的 RIA 试剂盒由北京北方免疫试剂研究所提供。用羊(或驴)抗兔 IgG 免疫微球固相二抗代替原试剂盒的 B、F 分离剂,用量为每个样品 1.5mg。分析试剂和程序除本文指明者外,均与原试剂盒规定的相同。

三、细胞识别程序

实验分两组。第一组识别鸡红细胞(CRBC)与人红细胞(HRBC),作为预备实验。取 CRBC 和 HRBC 各 5×10^6 个,加滴度为 1:2000 的兔抗 CRBC 抗血清 200 μ l,37℃ 温育 1 小时。洗涤、离心后,向细胞中加羊抗兔 IgG 免疫微球固相二抗稀释液 100 μ l (含微球 1×10^9 个),37℃ 温育半小时。最后,取悬液制样,在光学显微镜的油镜下观测。以未包被抗血清的 CRBC 为对照。

第二组识别人辅助 T 淋巴细胞(T_H)。用小鼠抗人 T_H 的单克隆抗体 (OKT-4, 滴度 1:50) 包被正常人淋巴细胞;用羊抗小鼠 IgG 免疫微球固相二抗。其它条件和方法均与第一组实验相同。

实验结果

一、羟基微球的理化性质

辐照聚合产物呈乳状悬液。悬液静置 2 小时无可见沉降物,但在离心力为 1000g、离心 10

分钟,可得到坚实的沉淀。聚合粒子呈形状规则的圆球, $\bar{d}$ 和 SD 分别为 1.1 μ m 和 $\pm 5\%$ (见图 1)。微球在蒸馏水、缓冲液和丙酮中不溶,聚合率大于 90%;羟基官能团含量为 6.9mmol/g。

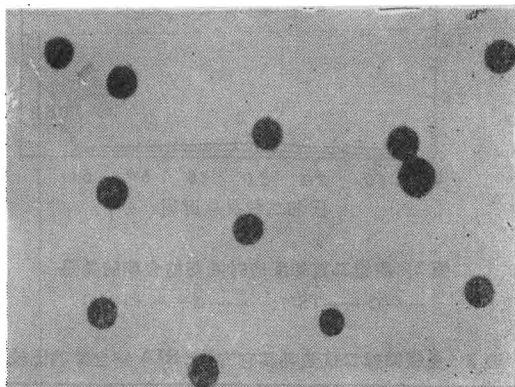


图 1 羟基微球的透射电镜照片

二、免疫微球二抗在 RIA 中的应用

1. RIA 程序

五个分析项目用免疫微球固相二抗作 B、F 分离剂的分析程序列于表 1。从表 1 可见,有些项目固相二抗可与其它分析试剂同时加入实验管,从而简化了程序,缩短了时间。其它项目固相二抗需后加,也只需温育 10—15 分钟。实际上反应 5 分钟就已达到了平衡(见图 2)。这充分显示了免疫微球固相二抗反应快速的优点。

表 1 RIA 程序

分析项目	RIA 程序
T ₃ 、T ₄ 和 Digoxin	固相二抗与其它试剂同时加入,37℃ 静置温育 1 小时 (T ₃ 和 T ₄) 或半小时 (Digoxin)
TSH 和 β_2 -MG	一抗反应完全后,加入固相二抗,37℃ 静置温育 10—15 分钟
	加 2ml 洗涤液后,立即离心(1000g, 10 分钟),测量沉淀的 γ 放射性

2. 特异性和非特异性结合率

用免疫微球二抗法和北方免疫试剂研究所生产的 RIA 试剂盒的方法(后者以下称原用方法^[5]),同时测定五个项目的零标准管结合率(B₀)和非特异结合率(NSB),结果列于表 2。结果表明,有些项目免疫微球二抗法的 B₀ 值虽较低,但仍完全符合 RIA 方法的要求;而在所有项目中,免疫微球二抗法的 NSB 值均低于原用

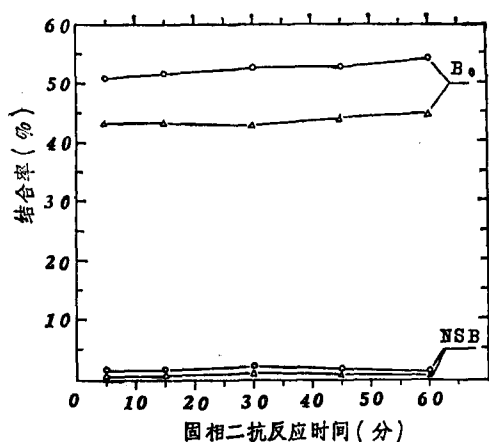


图2 固相二抗的反应时间与结合率的关系

—○—TSH; —△— β_2 -MG

表2 免疫微球二抗法与其它方法*RIA结合率的比较

分析项目	B.F.分离方法	结合率, %	
		B_0	NSB
T_3	PEG 法	47.3	10.1
	免疫微球二抗法	39.8	4.0
T_4	PEG 法	65.9	11.0
	免疫微球二抗法	47.8	1.5
TSH	液相双抗-PEG 法	47.9	4.2
	免疫微球二抗法	50.3	1.3
β_2 -MG	PEG 法	35.3	9.0
	免疫微球二抗法	41.3	1.9
Digoxin	活性炭法	46.4	2.6
	免疫微球二抗法	49.6	1.7

* 为北京北方免疫试剂研究所生产的 RIA 试剂盒各分析项目的原用方法^[13]

方法。这是免疫微球二抗法的另一突出优点。

3. 标准曲线

图3给出了五个 RIA 项目的免疫微球二抗法标准曲线。结果表明, T_3 、 T_4 、TSH、 β_2 -MG 和 Digoxin 标准曲线的线性关系良好, 相关系数 r 分别为 -0.998 、 -0.998 、 -0.994 、 -0.998 和 -0.999 ; $\text{Logit } B/B_0 = 0$ 时的相应标准物浓度 ED_{50} 分别为 197ng/dl 、 $6.6\mu\text{g/dl}$ 、 $10.7\mu\text{IU/ml}$ 、 $1.2\mu\text{g/dl}$ 和 114ng/dl ; 以及曲线的斜率等有关指标, 均符合 RIA 质量控制的要

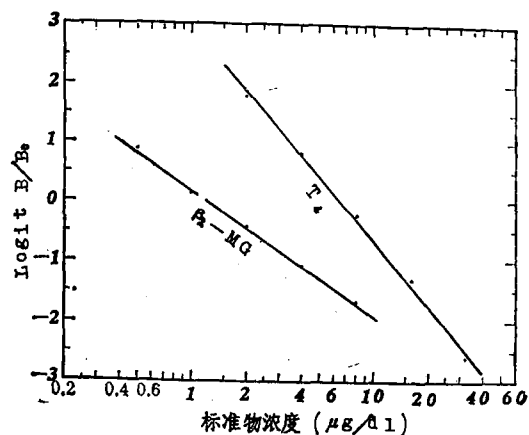
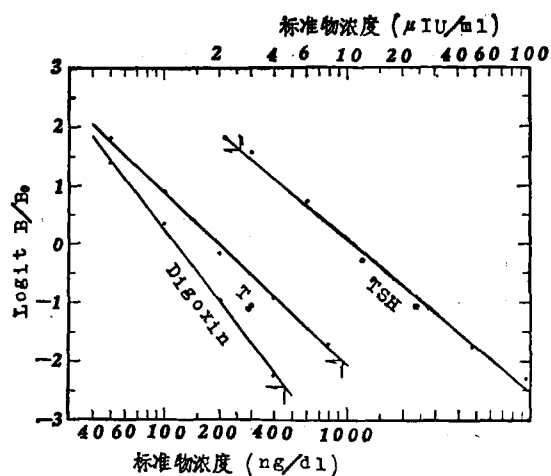


图3 免疫微球二抗法的 RIA 标准曲线

求。

4. 血清样品的测定结果

用免疫微球二抗法测定了我国成年人血清总 T_3 的浓度, 正常值为 $158 \pm 18\text{ng/dl}$ ($n=30$), 与国内外用非固相方法的 RIA 结果^[6]符合。甲亢患者为 $252-1049\text{ng/dl}$ ($n=14$), 甲低患者为 44 和 57ng/dl , 分别高于或低于正常值的上限或下限。

测定了 10 例正常人血清 T_4 、TSH 和 β_2 -MG 的正常值, 分别为 $9.2 \pm 0.8\mu\text{g/dl}$ 、 $5.1 \pm 1.6\mu\text{IU/ml}$ 和 $3.0 \pm 0.2\mu\text{g/ml}$ 。这些结果亦与许多作者测得的结果符合。

5. 重复性和免疫微球二抗的贮存稳定性

以血清总 T_3 的 RIA 结果为例。同批实验分析 10 个平行样品, T_3 平均值为 $129 \pm 7\text{ng/dl}$, 变异系数 (CV) 为 5.5% 。用不同批次制备

的免疫微球二抗,在两个月内分析同一血清共6次, T_2 平均值为 $137 \pm 10 \text{ ng/dl}$,CV为7.7%。

一份免疫微球二抗悬液(10 mg/ml)在 4°C 贮存,连续观测169天,测得血清总 T_2 结合率的平均值($n=21$) B_0 为 $43.9 \pm 3.0\%$ NSB为 $3.3 \pm 1.4\%$;在约 30°C 放置1周, B_0 值未变;放置两周, B_0 值降低原值的10%。上述结果表明,免疫微球二抗的贮存稳定性很好。

三、免疫微球二抗用于细胞识别的效果

若干种细胞形态十分相似,但功能不同。因此,识别这些细胞在细胞学研究和临床医学应用中有重要意义^[7]。

偶联了羊抗兔 IgG 抗体的免疫微球,对包被了兔抗 CRBC 抗体的 CRBC 有亲和作用,从而与该细胞联接形成花环。相反,对未包被抗体的 CRBC 无亲和作用,不能与其联接。而 HRBC 与兔抗 CRBC 抗体无特异结合能力,故也不能联接免疫微球二抗。实验结果如图4所示。

免疫微球二抗与 HRBC 或未被包被抗体的 CRBC 也存在非特异吸附;此外,未联接的微球在细胞照片的图象上也可能形成二者已联接的假象。观测 CRBC 对照样品表明,联接球数 ≥ 5 个/细胞的现象在油镜下已很少看到。以此值作为判断阳性细胞的下限,在 CRBC 与 HRBC 识别实验中,阳性率: CRBC 为93%,HRBC 为零。

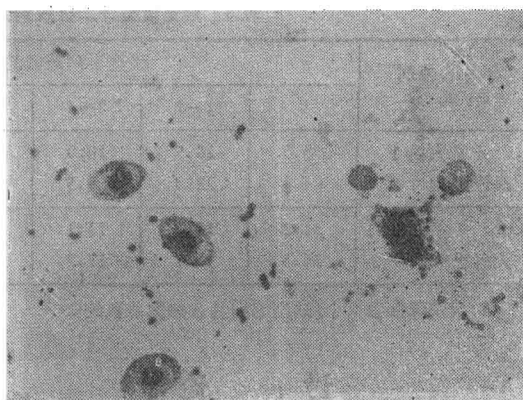


图4 CRBC 对照样品(左)和 CRBC 与 HRBC 识别样品(右)的照片

CRBC 与 HRBC 形态上差别很大,在油镜下容易识别,从而直观地证实了免疫微球二抗的识别效果。

同理,人淋巴细胞用 OKT-4 抗体包被,则用偶联了兔抗小鼠 IgG 抗体的免疫微球,也能识别形态同其它淋巴细胞相同的 T_H 亚群。实验结果如图5和表3所示。

从表3可见,正常人淋巴细胞的联球数 $\geq 5-6$ 个/细胞者,各档次的%很少,两个平行样品分别总计为5.6%和4.8%。若以联球数 ≥ 5 个/细胞为判断阳性细胞的下限,则包被 OKT-4 抗体的人淋巴细胞的阳性率分别为46.2%和43.1%,平均为44.6%,与荧光标记二抗法测得的正常人辅助T淋巴细胞占总淋巴细胞数的份额^[8]相符。

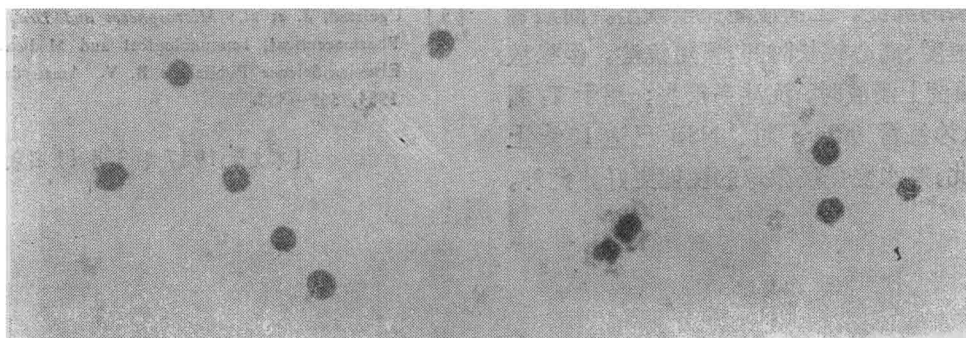


图5 正常人淋巴细胞(左)和包被 OKT-4 抗体的人淋巴细胞(右)与免疫微球二抗反应后的照片

表3 用免疫微球二抗识别辅助T淋巴细胞(T_H)的实验结果

样品的类别 和 编 号	联接下列球数的细胞占细胞总数的%							细胞总数 个	阳性率* %
	0	1~2	3~4	5~6	7~8	9~10	>10		
正常人的1 淋巴细胞 2	58.5	25.9	10.0	2.5	0.6	0.4	2.1	528	5.6
	64.3	22.3	8.5	0.9	0.6	1.8	1.5	457	4.8
OKT-4 包被的1 人淋巴细胞 2	31.2	11.5	11.1	9.6	10.5	7.0	19.1	314	46.2
	25.5	18.2	12.7	8.4	7.8	8.0	18.9	487	43.1

* 指联球数 ≥ 5 个/细胞的细胞占细胞总数的%

讨 论

一、在 RIA 中用第二抗体分离 B、F 比其它方法影响因素少,非特异结合率低,且有通用性好的优点。但是,用液体二抗有反应时间过长,抗体用量较大,需用载带血清和离心沉淀性能较差等缺点。固相二抗可避免这些缺点。其中,免疫微球二抗因具有高分散性和单分散度的特点,故悬浮性好,反应过程中无需搅动;它与一抗接触的充分程度近似于液体二抗,但与一抗的结合反应比分解反应速度快得多,故效果好、速度快(如仅 5 分钟即达反应平衡,见图 2);它的贮存稳定性高,这也是稀的液体二抗达不到的指标。

目前制备的免疫微球二抗,相应的液体二抗的用量与液体二抗法大致相当,但液体二抗与微球偶联后可回收再用。如能减小球径、增加比表面积,可望提高免疫微球二抗的结合能力,降低用量。

二、用羟基微球制备的固相二抗与本实验室用羧化聚苯乙烯微球制备的固相二抗比较,前者亲水性强,非特异结合率低,低速离心即可得到坚实的沉淀,上清液能完全倾出。而后者用较高速度、离心较长时间,虽可沉淀,但松散不牢,倾倒上清液时,沉淀易损失;用于 T_3 测定,用量为每管 0.5mg 时、NSB 已达 10% 上下。因此,亲水性免疫微球的性能更好。此外,

它的低非特异结合,也是用于细胞识别的必备性能。

三、用免疫微球法识别细胞,不需目前应用的荧光标记二抗法必须的荧光显微镜,故易推广普及。初步实验表明,为得到代表性好的观测样品,在应用该方法中选择合适的微球与细胞数的比例和掌握良好的制样技术十分重要。目前,国外已应用磁性免疫微球,从而省去了 RIA 中的离心步骤,并可用于细胞分离^[9]。这是有待我们发展的技术。

参 考 文 献

- [1] 马立人等:《上海免疫学杂志》,1982,2(1),59.
- [2] 陶义训等:《中华医学杂志》,1982,6(12),706.
- [3] Rembaum, A. et al.: *Macromolecules*, 1976, 9(2), 325.
- [4] Johansen, L. et al.: *J. Immunol. Methods*, 1983, 59(2), 255.
- [5] 放射免疫分析试剂盒说明书 (T_3 、 T_4 、 TSH 、 β_2 -MG 和 Digoxin), 中国同位素公司北方免疫试剂研究所, 1987.
- [6] 王仁芝:《激素的放射免疫分析》,科学技术文献出版社,北京,1985,259—269.
- [7] Yen, S. P. S. et al.: *Emulsion Polymerization*, ACS Symp. Ser. 24, American Chemical Society, Washington, D. C., 1976, 236—257.
- [8] Ruiz-Argüelles, G. J. et al.: *Am. J. Hematology*, 1984, 16(3), 267.
- [9] Ugelstad, J. et al.: *Microspheres and Drug Therapy: Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Neth., 1984, 365—382.

【本文于 1987 年 3 月 11 日收到】