

三碘甲状腺原氨酸(T_3)和甲状腺素 (T_4) 固相放射免疫联合测定法

连秉钧 张 杰 王明华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

提 要

三碘甲状腺原氨酸 (T_3)、甲状腺素 (T_4) 固相放射免疫联合测定法,是将 T_3 抗体涂布在塑料小球上,将 T_4 抗体涂布在塑料管上。这种联合测定主要解决了 T_3 抗体对 T_4 的交叉反应。本法能在同一试管内进行,只需 $50\mu\text{l}$ 血清样品,90 分钟反应,可同时精确地测出两种激素水平,它比以往单独测定 T_3 或 T_4 的 PEG 双抗法更精确、快速和简便。

T_3 和 T_4 固相放射免疫联合测定方法,是在原 T_4 固相放射免疫测定法的基础上建立的^[1]。在测定甲状腺功能以及了解甲状腺病治疗过程中的病情动态变化时, T_3 测定法并不能完全代

替 T_4 法,两者之间存在互补关系。一般情况下,当甲亢患者的 T_4 值高, T_3 值也高;但有时 T_3 值高, T_4 值正常,诊断为 T_3 型甲亢。因此,为了进一步确诊,就必须同时测定患者血清中的 T_3 和 T_4 的含量。过去虽有分别测定二者含量的方法,但因不是联合测定,因而就增加了重复操作的误差。而联合测定法能同时取得两项指标,提高了诊断的准确性,且方法简便,快速,很适用于地方甲状腺疾病的普查工作。

一、材料与方 法

1. T_3 和 T_4 抗体的固相载体

直径 6.35mm 的聚苯乙烯小球,涂布 T_3 抗体(图 1)即为 T_3 抗体固相。10 × 55mm 的聚甲基丙稀酸甲脂的塑料小管,涂布 T_4 抗体,即为 T_4 抗体固相。它们的非特异性结合率均小

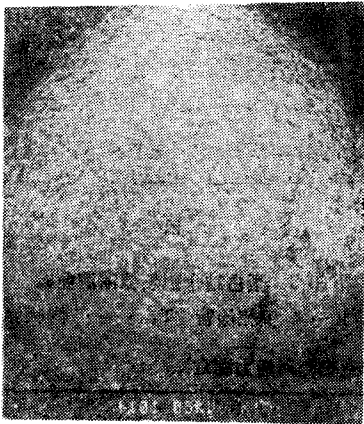


图 1 涂布 T_3 抗体的聚苯乙烯小球电镜扫描图 (1×95)

- [2] Shore, P. et al.: *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 127, 182, 1959.
- [3] Evans, D. P. et al.: *Life Science*, 12, PartII, 327, 1973.
- [4] Devalia, J. L. et al.: *J. Chromatogr.*, 343(2), 407, 1985.
- [5] Tadao Sakai et al.: *Analyst* (London), 109 (12), 1569, 1984.
- [6] Haimart, M. et al.: *Agents Actions*, 16(3—4), 71, 1985.
- [7] Hartley, B. S.: *Biochem. J.*, 119 (5), 805, 1970.
- [8] 武祥福等:《生物化学与生物物理进展》, 6, 68, 1979。

[本文于 1986 年 1 月 29 日收到]

于 0.7 %。

2. T₃ 和 T₄ 抗体的制备

经过纯化的 T₃ 和 T₄ 半抗原，先用甲醇酯化，封闭羧基端，然后在水溶性碳化二亚胺缩合剂作用下，使 T₃ 和 T₄ 半抗原中的氨基端与牛血清白蛋白联接^[2]，免疫家兔。经双抗体放射

免疫电泳自显影鉴定，特异性强；抗血清效价高^[3]。

3. T₃ 和 T₄ 混合标准液的配制

取纯的 T₃ 和 T₄ 抗原，在百万分之一天平上称量，按下列浓度混合：

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
T ₃	0ng/dL	50ng/dL	100ng/dL	200ng/dL	400ng/dL	800ng/dL
T ₄	0μg/dL	2μg/dL	4μg/dL	8μg/dL	16μg/dL	32μg/dL

标准液系用正常人血清(除去 T₃ T₄) 稀释配制而成，按 0.5 毫升分装，冰冻干燥保存。

4. 标记抗原的制备

采用氯胺-T 方法^[4]，进行 ¹²⁵I 标记。经葡聚糖凝胶 G-25 分离，分别得 ¹²⁵I-T₃ 和 ¹²⁵I-T₄ 标记抗原。比度约为每微克 160—200 微居里。

5. T₃ 和 T₄ 抗体的涂布

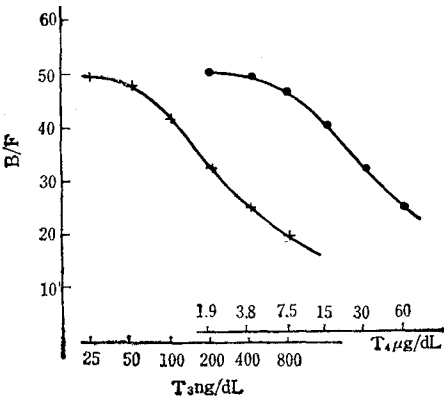


图 2 T₃ 兔抗体血清的标准曲线对 T₄ 交叉竞争曲线
(见文内说明)

选择交叉反应小的 T₃ 抗体 (图 2 和表 1)。并选用涂布固相抗体的滴度——T₃ 为 1:10000；T₄ 为 1:500，它们抑制曲线的斜率最好，抗体用量最少。抗体和固相载体联结的抗体结合剂最佳浓度为 2 % (图 3)；随着抗体结合剂浓度增加，结合率并没有明显提高。

6. 测定方法

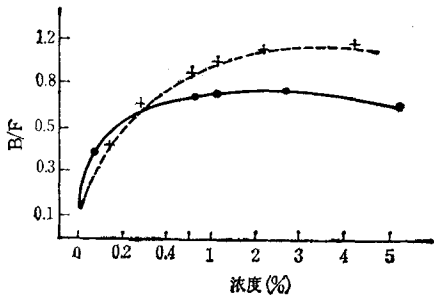


图 3 蛋白结合剂最佳浓度曲线
T₄ ×···× 固相涂管 T₃ ···· 固相涂球

表 1 T₃、T₄ 固相联合测定 T₃ 抗血清对其衍生物相对活力测定

化 合 物	加入量 μg/dL	T ₃ 测定值 ng/dL	相对于 T ₃ 活力百分比
三碘甲状腺原氨酸 (T ₃)		200	100
甲状腺素 (T ₄)	30	200	0.06
二碘酪氨酸	30	110	0.036
酪氨酸	30	82	0.027

T_3 和 T_4 固相联合测定的操作步骤如下:

1. 样品或 T_3 、 T_4 混合标准样品 50 微升, 加入涂有 T_4 抗体塑料小管。
2. 加 200 微升 $^{125}\text{I}-T_3$ 和 $^{125}\text{I}-T_4$ 混合标记抗原。
3. 加涂有 T_3 抗体塑料小球一粒, 放置上述小管内。
4. 37°C 振荡一小时半或 37°C 水浴手摇十分钟一次反应一小时半。
5. 吸去反应液用蒸馏水洗二次, 每次约 2ml。
6. 分别测定小球 (T_3) 和小管 (T_4) 的结合率。

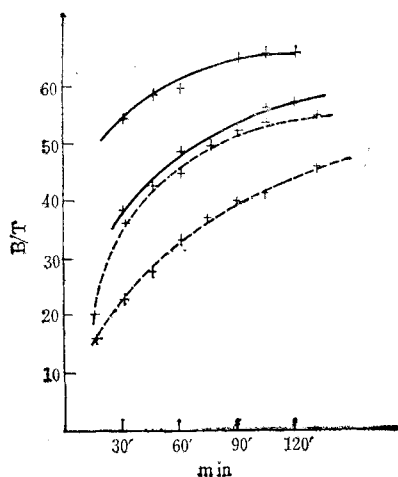


图 4 T_3 、 T_4 固相联合测定反应时曲线

—: 37°C 恒温振荡, 150/分
---: 37°C 水温箱 10 分钟一次

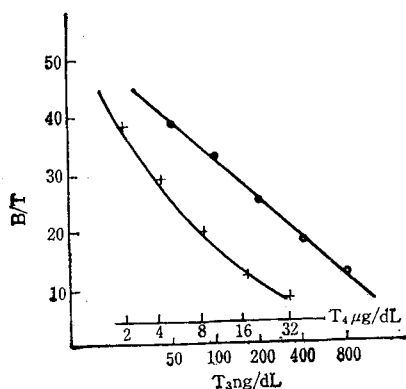


图 5 T_3 、 T_4 固相联合测定标准曲线

×—×—×: T_4 $\mu\text{g/dL}$ ○—○—○: T_3 ng/dL

7. 作半对数坐标的标准曲线, 查得测定结果。

每个测定管总的反应体积为 250 微升; 其中有 50 微升样品和 200 微升 Tris 缓冲液 (pH 8.6, 离子浓度为 0.02M, 内含 75 微克 8-苯胺基- i -萘磺酸和 T_3 、 T_4 混合标记抗原各 50 微克, 总计数 25000 CPM, 其中标记抗原 T_3 为 12000cpm, T_4 为 13000cpm), 届时的结合率最高。在 37°C 振荡一个半小时, 或水浴 37°C , 每 10 分钟手摇一次, 免疫竞争反应的效果一样。反应一个半小时后, 结合率趋向平稳 (图 4)。然后用蒸馏水洗两次, 水泵抽干。将 T_3 小球倒置在另一个干净的塑料管中, 分别测定 T_3 小球和涂有 T_4 抗体的塑料管的脉冲数。用 B/T 或 B/B_0 作纵坐标, 标准品的半对数量为横坐标, 得到 T_3 和 T_4 固相联合测定的标准曲线 (图 5)。

7. T_3 和 T_4 固相联合测定法的方法学鉴定

(1) 健全性试验: 取不同量的同一例甲亢患者血清 (其 T_3 和 T_4 含量分别为 840ng/dL 和 26 $\mu\text{g/dL}$): 并以除去 T_3 和 T_4 的血清补足体积, 然后进行放免测定。测定结果表明: 甲亢血清稀释曲线与标准曲线呈平行关系 (图 6)

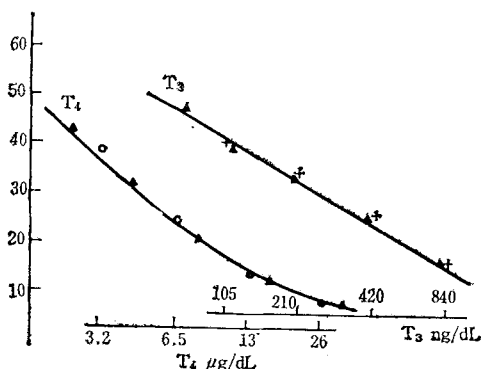


图 6 T_3 、 T_4 固相联合测定健全性试验

▲—▲ T_3 和 T_4 标准点; ×××: 甲亢血清 T_3 840ng/dL 稀释各点; ○—○: 甲亢血清 T_4 26 $\mu\text{g/dL}$ 稀释各点。

(2) 回收试验: 取正常人血清 (T_3 含量为 125ng/dL), 分别加入已知量的 T_3 抗原: 80ng/dL, 200ng/dL 和 500ng/dL, 然后进行回收测定。五次测定的平均回收率为 103.8%。同样, 取正常人血清 (T_4 含量为 7.5 $\mu\text{g/dL}$), 分别加

表2 T₃T₄固相联合测定T₃回收率

正常人血清含 T ₃ 量 (ng/dL)	加入 T ₃ 量 (ng/dL)	实测量 (ng/dL)	去本底回收量 (ng/dL)	回收率 %	平均回收率 %
125	80	200	75	93.8	103.8
125	200	330	205	102.5	
125	500	700	575	115	

T₃T₄固相联合测定T₄回收率

正常人血清含 T ₄ 量 (μg/dL)	加入 T ₄ 量 (μg/dL)	实测量 (μg/dL)	去本底回收量 (μg/dL)	回收率 %	平均回收率 %
7.5	2	9.8	2.3	115	105
7.5	8	16	8.5	106	
7.5	16	22.5	15	94	

表3 T₃T₄固相联合测定批内变异

T ₃	$\bar{X} \pm SD$	次数	CV%	平均值	T ₄	$\bar{X} \pm SD$	次数	CV%	平均值
A	63.4±3.1	5	4.9	4.3%	A	1.4±0.01	5	1	4.6%
B	132.8±9.6	5	7.3		B	7.12±0.3	5	4.3	
C	481±2.65	5	0.6		C	15.2±1.3	5	8.6	

T₃T₄固相联合测定批间变异

T ₃	$\bar{X} \pm SD$	次数	CV%	平均值	T ₄	$\bar{X} \pm SD$	次数	CV%	平均值
A	71.3±8.1	3	11.3	8.0%	A	2.1±0.2	3	9.5	10.6%
B	236.7±15.3	3	6.5		B	10.9±1.49	3	13.7	
C	563.3±35.1	3	6.2		C	20.2±1.76	3	8.7	

入已知量的T₄抗原: 2μg/dL, 8μg/dL和10 μg/dL, 经五次测定的平均回收率为105%, (表2)。

(3) 灵敏度:能使最高结合率B₀下降2SD的T₃最小检测量为30ng/dL, T₄量为0.2μg/

dL。(4) 重复性试验:取相同血清样品进行多次重复测定,分析其批内变异,结果T₃平均变异系数为4.3%,T₄为4.6%,不同批样间的重复变异系数,T₃平均值为8%,T₄为10.6%,

(表 3)。

(5) 稳定性: T_3 固相涂布小球放置在 4°C 60 天后, T_4 固相小管放置在 37°C 15 天后, 标准曲线的线态变化不大。

8. 结果与讨论

临床测定共 132 例, 其中正常人(献血员) 72 例, T_3 正常值测定范围 $68\text{--}250\text{ng/dL}$, 均

值 $132\pm 41\text{ng/dL}$; T_4 测定范围 $4.2\text{--}15\mu\text{g/dL}$, 均值 $9.8\pm 2.9\mu\text{g/dL}$ 。联合测定的结果与其它非联合测定方法的结果基本一致(表 4)。甲亢, 甲减, 甲肿病人测定的结果与临床其它指标检测的结果比符合率大于 91%(表 5)。

以联合测定 T_3 和 T_4 的标准曲线误差袋图象和各个剂量值所对应的变异系数(CV%)作

表 4 各种 T_3 和 T_4 测定方法对献血员(正常值)比较

各种方法	T_3 测定值			T_4 测定值		
	例 数	测定范围 ng/dL	均值±标准差 ng/dL	例数	测定范围 $\mu\text{g/dL}$	均值±标准差 $\mu\text{g/dL}$
T_3 和 T_4 固相联合测定	73	68~250	132±41	73	4.2~15	9.8±2.9
双抗法	82	50~260	140±40	75	5~12.5	9.23±1.75
双抗-PEG 法	60	60~215	128.3±39	60	4.2~15	9.4±2.3
固相 T_4 小球				38	3.8~13	8.53±2.2
固相 T_4 试管				28	5.2~12	9.33±1.89
蛋白竞争法				48		9.33±3.58

表 5 T_3 、 T_4 固相联合测定临床应用

内 容	类 别	例 数	测定范围 (ng/dL)	均值±标准差 (ng/dL)	临床符合率%
T_3	正常人	73	68~250	132±41	
	甲 减	—	—	—	—
	甲 亢	38	310~800	504.7±183.3	94.7
	甲 肿	12	140~290	169.3±36.2	91.7
内 容	类 别	例 数	测定范围 ($\mu\text{g/dL}$)	均值±标准差 ($\mu\text{g/dL}$)	临床符合率%
T_4	正常人	73	4.2~15	9.8±2.9	
	甲 减	7	0.1~2.5	1.2±1.1	100
	甲 亢	38	15~32	26.3±5.8	92
	甲 肿	12	4.6~13.5	9.4±3.7	91.7

• 65 •

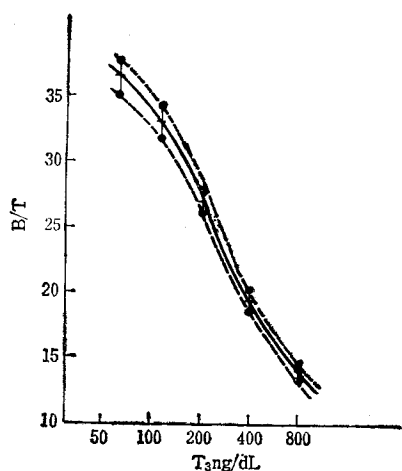


图7 T_3 、 T_4 固相联合测定 T_3 标准曲线
精密误差袋图象

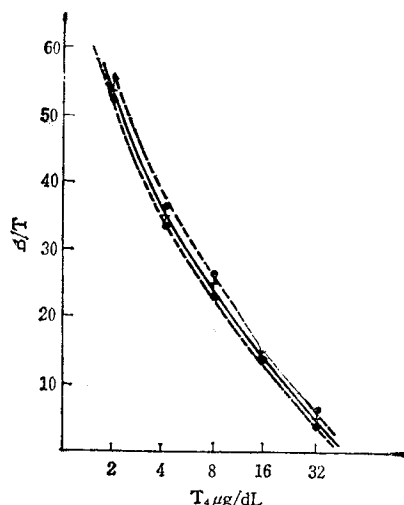


图8 T_3 、 T_4 固相联合测定 T_4 标准曲线
精密误差袋图象

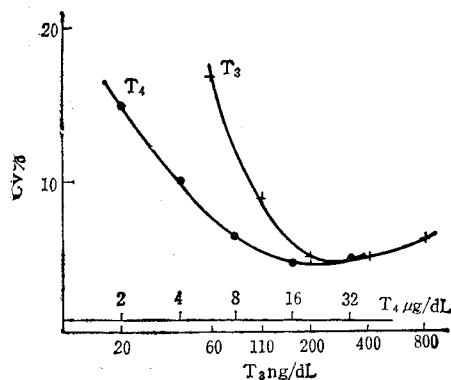


图9 T_3 、 T_4 固相联合测定标准曲线精密图

精密图 (图7、8、9) 均达到放免质量控制的要求。

欲取得固相放射免疫测定技术的成功, 其关键是选择合适的固相载体材料, 以及选择具有合适的几何形状的载体, 便于操作, 其次是选择合适的联结抗体和固相载体的技术。在 T_3 和 T_4 固相联合测定法中, 除了上述两个要求之外, 更重要的是选择合适的 T_3 抗血清, 要求它与 T_4 抗原的交叉反应极小^[5]。因为在测定过程中, T_3 和 T_4 抗体以及它们的标记抗原和非标记抗原, 都是混合在一起进行免疫竞争反应。然而在正常人的血清中, T_4 含量比 T_3 大 60—80 倍, 如果 T_3 抗体对 T_4 抗原的交叉率达 1%, 则 T_3 的测得值将要增加一倍。如此干扰后的数据在临床上没有应用的价值。

从图 10 可以看出, T_3 抗体与 T_4 抗原的交

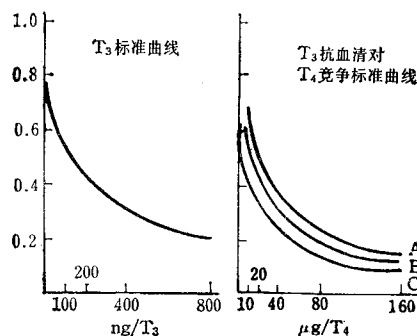


图10 各种 T_4 纯度对 T_3 抗血清交叉反应的比较

叉程度与 T_4 抗原的纯度有关, 如果不纯就会造成假象。曲线 A 为经过纯化一次的 T_4 抗原, B 为经过纯化后又存放一年后的 T_4 抗原, C 为未经纯化的 T_4 抗原, 分别对 T_3 抗体进行交叉反应, 其结果分别为 0.06%, 1% 和 2%。有人报道^[6], 如将 T_4 抗原反复纯化 5 次, 其交叉反应下降至 0.02%。

参 考 文 献

- [1] 连秉钧等: 《上海免疫学杂志》, 3(6), 321, 1983。
- [2] 连秉钧等: 《生物化学与生物物理进展》, 5, 60, 1979。
- [3] Churchill, W. H. et al.: *Nature*, 202, 29, 1964。
- [4] Kjeid, J. M. et al.: *Clinica Chimica Acta*, 61, 381, 1975。
- [5] 连秉钧等: 《生物化学与生物物理进展》, 1, 52, 1979。
- [6] Hesh, R. D. and Hüfner: *Acta Biologica et Medica, Germanica*, 28, 561, 1972。

[本文于 1986 年 3 月 10 日收到]