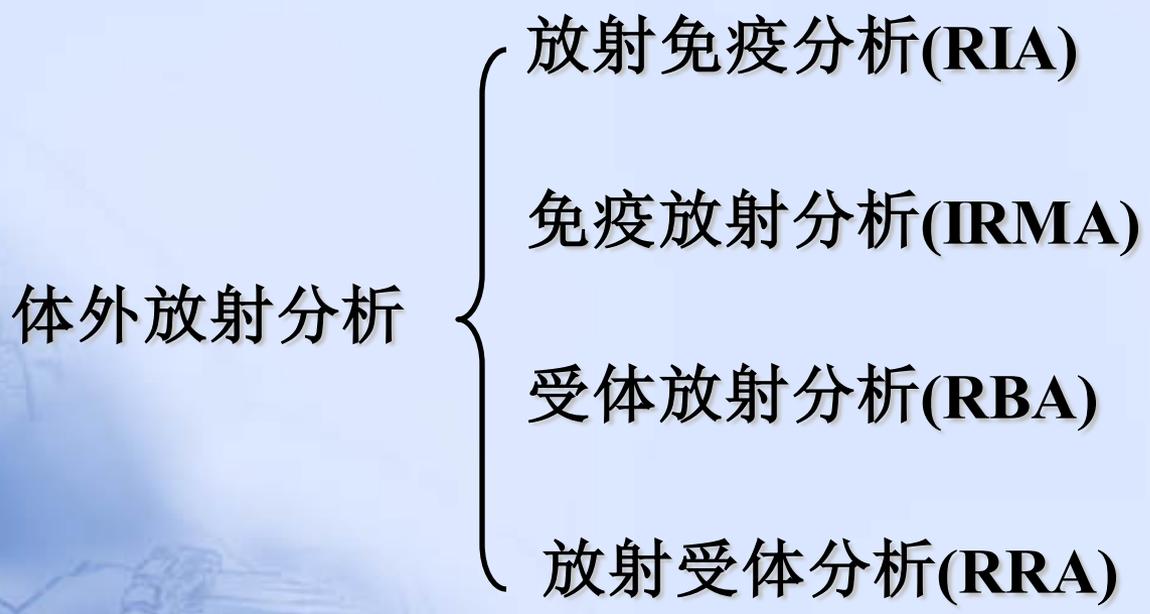


第七章 体外放射分析技术

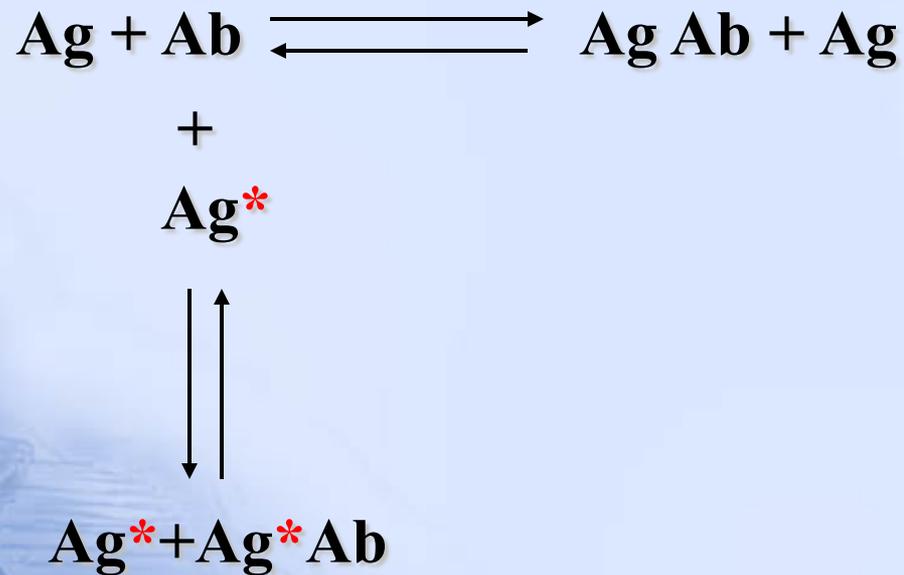
标记分析技术是一组超微量体外分析技术的总称。它是利用某种特异性结合剂与被测物质和标记物进行结合反应，从而对超微量物质进行定量的分析技术。如标记物为放射性核素则称为**体外放射分析**。



一、放射免疫分析(RIA)

原理

放射性标记抗原与非标记抗原(包括标准抗原或待测抗原)与有限量的特异性抗体发生可逆性竞争结合。



↘ RIA的基本步骤

1. 加样

2. 孵育

3. 分离结合和游离部分

4. 测放射性

5. 数据处理

基本试剂

(一) 特异性结合剂

特异性结合剂包括抗体、血浆结合球蛋白和受体

1. 抗体

抗体的制备是用适宜的纯化的免疫原在动物身上人工免疫，分子量 >5000 的蛋白多肽类物质具有较好的免疫原性。

抗血清质量鉴定的检测指标是滴度、亲和力和特异性。

抗体应具备三个条件：高亲和力、高特异性和高滴度。

2. 标记抗原

高比活度和高放化纯度是保证分析灵敏度的前提；

半衰期不能太短，以保证整个分析过程的完成；

不改变原有抗原的特性。

↘ 复合物和游离抗原的分离

抗原抗体在液相环境中反应：

1) 双抗法

2) 聚乙二醇法

3) 葡萄球菌蛋白沉淀法

4) 活性炭吸附法

5) 微孔滤膜法

抗体吸附于固体支持物上：

1) 吸附牢固而且抗体量足够；

2) 不影响抗体的免疫活性；

3) 非特异性结合低；

4) 吸附材料理化性质稳定；

5) 吸附材料价廉易得。

方法包括:

1. 试管固相法;
2. 微粒固相法;
3. 微球固相法。

↘ RIA系统的分析性能及实验设计

分析性能是指一个分析系统总的性能，而不是指个别测定结果的可信度，因此通常都需有较多的测定结果，并用统计学的方法作出判断。

精密度

灵敏度

准确度

精密度是指同一样品重复测定的实测量的离散程度。离散程度越小，则能区分的样品量差别越小，也就是分析系统的精密度越高。

灵敏度就是统计上能与零剂量相区别的最小值。

准确度是指样品的测定值偏离真值的程度，由于实际样品的真值是未知的，常用估计准确度的方法是测量实际样品外加标准品的回收率。理论上回收率一般以90%-110%之间。

$$\text{回收率} = \frac{\text{回收管测得值} - \text{对照管测得值}}{\text{回收管内加入的已知量}}$$

RIA的实验设计

1. 尽可能提高灵敏度 先选定尽可能少又能满足控制测量误差要求的标记抗原用量，然后选合适的抗体浓度，要求标准曲线起始段的斜率最高。

2. 提高精密度图的使用范围 应当在上述第一种方案的基础上，适当增加抗体用量，使标准曲线下降不要太快，并在随后的区段有较好的斜率。

↘ 放射免疫分析的数据处理

数据处理的基本步骤

选择函数式

对标准管的实测
数据进行拟合

求出函数式的各系数

代入待测样品的实测
数据

求含量



各种模型

Logit-Log 模型

$$\text{Logit}(Bx) = \text{Log} \frac{Bx}{Bo - Bx} = a - b \times \text{Log}X$$

四参数Logistic模型

$$Y = \frac{a - d}{1 + (X / c)^b} + d$$

四参数质量作用定律模型

$$R^2 [b(c + p^* + X) + q] + R[c(b - 1) + q - p^* - X] - c = 0$$

放射免疫分析的质量控制

质量控制之目的

质量控制就是对分析工作的误差进行经常性的检查，遇有质量异常则及时采取对策，以保证分析误差控制在可接受的范围内。

放射免疫分析的质量控制

实验室内部质控

实验间质控

实验室内部质控的主要内容

实验误差包括两大类：随机误差和系统误差。

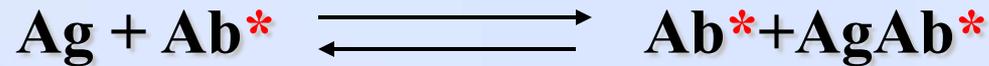
实验误差监控的主要内容：

- 1、标准曲线的质量；
- 2、精密度；
- 3、整批实验的偏差；
- 4、漂移；
- 5、批间质控。

二、免疫放射分析(IRMA)

↘ IRMA的基本原理

放射性核素标记在抗体上，然后以过量标记抗体与抗原结合，多余的抗体通过一定手段除去，测定复合物的放射性，其活度与待测抗原的量呈正相关。



↘ IRMA和RIA的主要区别:

1. 反应的机制不同: RIA是竞争性反应, IRMA是非竞争性反应, 所以, IRMA的灵敏度高于RIA;

2. 反应试剂：RIA的主要反应试剂需三种，IRMA只有二种；而且标记的试剂不同：RIA标记抗原，IRMA标记抗体；

3. 分离方法：IRMA一般都需用单克隆抗体作分离剂，所以其抗原需2个或2个以上抗原决定簇，RIA的抗原则只需一个抗原决定簇；

4. 待测抗原复合物的反射性：在RIA中与待测抗原呈负相关，而在IRMA中与待测抗原浓度呈正相关；

5. 反应系统中非特异性结合在RIA中主要影响高剂量反应，在IRMA主要影响低剂量反应。

↘ IRMA的基本方法:

1. 双抗夹心法

2. 标记第三抗体法

3. 生物素-亲和素系统

↘ 数据处理

1. 平滑样条函数

2. 五参数Logistic模型

$$Y = \frac{a - d}{[1 + (X / c)^b]^e} + d$$

2. 三参数质量作用定律模型

$$R^2[b(c + q) + X] + R[c(b - 1) + X - q] - c = 0$$

序号	疾病名称	检查项目	准确性
01	稳定性（不稳定性）心绞痛	运动负荷心肌灌注显像	90%
02	急性心肌梗塞	静息心肌灌注显像	可达 100%
03	血管再通术前心肌存活性估测	^{18}F -FDG正电子PET断层显像	97%
04	心肌病	运动负荷心肌灌注显像	75%
05	短暂脑缺血发作（TIA）脑梗塞	局部脑血流断层（rCBF）显像	90%
06	癫痫灶定位、脑瘤复发、精神和情感障碍性疾病	^{18}F -FDG正电子PET断层显像或脑血流灌注显像	90%
07	肺栓塞	肺灌注和肺通气显像	85%
08	下肢血栓性静脉炎	核素下肢静脉造影	90%
09	肝血管瘤	肝血池断层显像	90%
10	急性胆囊炎、新生儿黄疸与先天性胆道闭锁鉴别	肝胆造影	95%
11	单侧肾动脉狭窄性高血压	Captopril介入肾动态显像	90%
12	无尿路梗阻的肾功能判断、移植肾监测	肾动态显像	85%
13	尿路梗阻和与单纯尿路扩张的鉴别	肾动态显像 + 利尿试验	85%
14	急性阴囊疼痛（急性睾丸扭转和急性副睾睾丸炎鉴别）	阴囊显像	95%
15	恶性转移性骨肿瘤	全身骨显像	85%
16	骨折，移植骨监测、股骨头缺血性坏死、假体（Prosthesis）合并症	三相局部骨显像	90%左右
17	肺癌，乳腺癌，肝癌，结肠癌等各类恶性肿瘤及其转移灶	^{18}F -FDG正电子（PET）全身或局部断层显像	90%左右
18	甲状腺机能亢进症（甲亢）、甲状腺功能低下（甲低）、亚急性甲状腺炎、弥漫性或结节性甲状腺肿、甲状腺瘤	甲状腺显像	90%左右
19	异位甲状腺	^{131}I 碘甲状腺显像	90%
20	嗜铬细胞瘤和其他神经内分泌肿瘤	^{131}I -MIBG肾上腺髓质显像	90%以上
21	骨质疏松症	骨密度测定	90%

第八章 分子核医学概论

前言

从20世纪30年代开始，人们对生命现象的认识、疾病和衰老的原因、药物的作用原理等一系列重大问题，已取得令人惊喜的突破。突破的关键，就是归功于发明和采用了同位素示踪技术。

分子核医学中的经典研究实例

- ❁ 证明DNA是重要的遗传物质
 - ❁ 验证半保留复制假说
 - ❁ 观察到mRNA信息来自DNA
 - ❁ 遗传密码的研究

第一节 分子核医学的理论基础

❁ 分子核医学的特点

■ 分子核医学

分子核医学是根据当代分子生物学的理论研究成果，利用放射性核素标记的示踪剂，从分子水平上去认识生命现象以及疾病发生、发展及其变化规律，从而进行疾病的诊断、治疗的一门综合性边缘学科。

■ 特点

- 分子核医学不再从器官定向的角度认识疾病，而是从问题定向，即从生理、生化的角度，并深入至分子水平去认识疾病，包括细胞信号转导、基因表达以及生化代谢等方面。
- 通过利用特定的放射性示踪剂，分子核医学可提供一个观察体内特定病变部位生化过程变化的窗口。

❁ 分子核医学的基础

■ 分子生物学的研究成果与发展是分子核医学理论的源泉

■ 分子识别是分子核医学理论的基石

■ 生化代谢评价是分子生物学理论的重要组成部分

第二节 分子核医学的发展方向

放射受体显像和受体介导的放射配基治疗

放射受体显像

肿瘤受体显像

在肿瘤细胞表面常有一些受体表达过高，利用放射性配体与肿瘤表面高表达的特异性受体相结合，是一种敏感性和特异性均较高的检测方法，同时对于指导治疗和进行疗效评价具有重要价值。

实例： somatostatin, vasoactive intestinal peptide, aquadiol 等。

✦ 脑受体的研究

脑受体显像可在人体正常生理和病理状态下，从体外显示脑受体的数目、活性和密度，并对受体的空间分布进行定位和定量分析，从而有助于揭示脑的多种功能活动机制和一些与受体有关的神经精神疾病的发病机理，并对相应的疾病作出诊断。

实例：Parkinson's disease , nicotine等。

■ 放射受体治疗

◆ 基本原理

配体与膜受体结合，除进行细胞信号转导外，还可通过胞吞的内在化过程，进入细胞内。用放射性核素标记的特异性配体可在细胞内浓聚，杀伤细胞。

实例： $^{111}\text{In-OCT}$, $^{90}\text{Y-OCT}$

放射免疫显像和放射免疫治疗

放射免疫显像

以放射性核素标记的单克隆抗体(McAb)进行的放射免疫显像(RII)一直是核医学研究的热点，除了肿瘤方面的研究外，在心肌坏死灶的定位诊断、检测动静脉血栓的形成、炎症病灶的探测等方面也取得了一定的进展。

实例： radioimmunoguided surgery

■ 放射免疫治疗

放射免疫治疗的问题：

- ✦ 肿瘤对标记单抗的摄取率不高
 - ✦ 肿瘤细胞难以获得致死性的照射剂量
 - ✦ RIT所需的用量较RII为大，且需反复注射，HAMA成为制约RIT的一个突出问题。

放射基因显像和基因的放射治疗

反义技术的概念

反义技术是近年来在癌基因研究基础上发展起来的基因治疗新技术，它利用人工合成或生物合成的反义寡聚核苷酸链通过碱基互补的原理特异地结合到靶基因上，抑制基因的转录和翻译而达到治疗肿瘤等疾病的目的。

目前最常用的是ODN。

■ 放射基因显像与治疗的基本原理

将放射性核素标记的反义寡核苷酸注入受试者体内，通过体内核酸分子杂交而与相应的靶基因结合，放射性核素发出的射线一方面可用作显像，以定位和定量显示特异性靶基因。另一方面，核素衰变时所发出的射线，能量沉积于靶基因的局部，引起DNA链的断裂和损伤，破坏致病基因。

■ 放射性标记寡核苷酸的基本要求

✦ 放射性核素的选择

✦ 放射性标记寡核苷酸的基本要求

- 必须易于大量合成

- 在体内必须稳定

- 必须能够进入靶细胞

- 必须能被靶细胞截留

- 必须能与靶序列特异结合

- 不能与其他大分子物质发生非序列和非特异性结合。

- ^{125}I 放射性标记寡核苷酸的实例

- 代谢显像

第三节 分子生物学中核素示踪技术的应用

- 核酸和蛋白质的标记技术
- 核酸和蛋白质的体内标记
 - ✦ ^3H -DNA标记
 - ✦ ^3H -RNA标记
 - ✦ ^{32}P 标记DNA或RNA
 - ✦ 蛋白质的标记
 - ✦ 脉冲标记

■ 核酸的体外标记

✦ 探针的种类

基因组DNA探针

cDNA探针

RNA探针

寡核苷酸探针

✦ 各种标记物及其选择

核酸分子杂交技术

- 基因组DNA的Southern杂交分析
- 基因组RNA的Northern杂交分析
- 斑点杂交
- 原位杂交

❁ 放射性核素研究DNA与蛋白质相互作用

■ 凝胶阻滞分析

判定能够与DNA进行结合的蛋白质，用于评价蛋白与DNA结合的特异性。