

竞争放射分析

- 放射免疫分析

(Radio Immuno Assay, RIA)

- 竞争性蛋白结合分析

(Competitive Protein Binding Assay, CPBA)

- 放射受体分析

(Radio Receptor Assay, RRA)

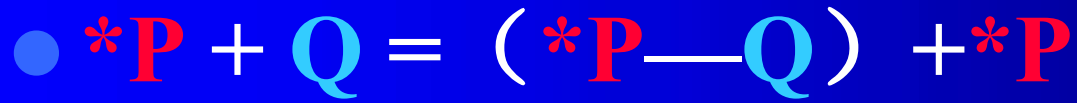
优点:

- 1、灵敏度高
- 2、特异性强
- 3、应用范围广
- 4、操作简单

缺点:

- 1、生物试剂，稳定性受多因素影响
- 2、灵敏度难以超过 μg 水平

竞争放射分析的原理



+



$*P$: 标记物

P : 未标记物

Q : 特异性结合剂

放射免疫分析原理

$$\bullet \quad *Ag + Ag + Ab = (*Ag - Ab) + (Ag - Ab) + *Ag + Ag$$

0 Max Min

↑ ↓ ↑

- 条件：1、 *Ag定量、足量
2、 Ab限量 *Ag > Ab

专用符号：

- 1、 T 加入的*Ag的放射性计数
- 2、 B *Ag—Ab免疫复合物的放射性计数
- 3、 B₀ Ag=0时*Ag—Ab放射性计数
- 4、 F 游离的*Ag的放射性计数 T=B+F
- 5、 NSB 非特异性结合产生的放射性计数
- 6、 结合率： B/T、 B/B₀、 B/F

竞争放射分析的三种基本试剂

- 标准品
- 标记物
- 特异性结合剂

标 准 品

- **化学结构：**

应与被测物具有相同的化学结构

- **化学纯度：**

纯品

- **化学度量：**

准确

- **稳定性：**

保持生物活性不变

标记物

- **要求：**

- 1、较高的比活度
- 2、生物活性与免疫活性：与标记前一致
- 3、放射化学纯度：>95%
- 4、稳定性

- **鉴定：**

- 1、最大结合率
- 2、标准曲线比较法
- 3、稀释曲线比较法

特异性结合剂

● 要求:

- 1、亲和力
- 2、高滴度
- 3、特异性
- 4、可长期保存

三和常用特异性结合剂的比较

| | 抗 体 | 血浆特异结合蛋白 | 受体蛋白 |
|-----------|----------------------|-------------------|------|
| 亲和常数 | $10^9—10^{11}$ L/mol | $10^8—10^9$ L/mol | 二者之间 |
| 特异性 | 较高 | 交叉反应明显 | 高 |
| 制备 | 复杂、周期长 | 简单 | 高 |
| 稳定性 | 好 | 好 | 好 |
| 结果与生物活性关系 | 免疫活性 | 平行 | 平行 |

抗 血 清

- 抗原
- 动物选择
- 佐剂
- 免疫动物、收获鉴定抗体

抗血清的鉴定

- 亲和力:

指抗体与抗原的结合能力，常用平衡亲和常数 K_A 表示。

- 特异性:

抗体与相应抗原的结合能力与其它类似物结合能力的比较，常用交叉反应率（Cross Reaction）表示

交叉反应率= $Y/Z \times 100\%$

Y: 标准抗原取代50%结合率所对应的浓度

Z: 类似物取代50%结合率所对应的浓度

交叉反应率测定：以比正常生理浓度高100倍以上的类似物为测定物进行测定，同时观察置换0标准管50时所对应的化学量

- 滴度:

结合50%标记抗原时血清的稀释度

单克隆抗体

●特点：

特异性高

抗体成分专一

可反复制备

●制备：

- 1、免疫小鼠，制备脾细胞悬液
- 2、选择培养，用HAT培养基筛选杂交瘤细胞
- 3、检测抗体
- 4、克隆化

其它特异性结合剂

- 血浆结合球蛋白
- 受体蛋白

放射性标记 T_4 与不同特异性结合剂

| 方 法 | 特异性结合剂 | 待测物 |
|------------------|------------|--------------|
| 放射免疫分析 (RIA) | T_4 抗血清 | T_4 (免疫活性) |
| 竞争性蛋白结合分析 (CPBA) | TBG | T_4 (生物活性) |
| 放射受体分析 (RRA) | T_4 受体蛋白 | T_4 受体结合位点 |

结合与游离部分的分离

- 分离方法的要求

- 1、使结合部分与游离部分尽可能完全分开
- 2、分得的成分便于作放射性操作
- 3、分离效果不受外界干扰因素影响
- 4、操作简便、分离迅速、重复性好
- 5、试剂来源广泛、价廉易得

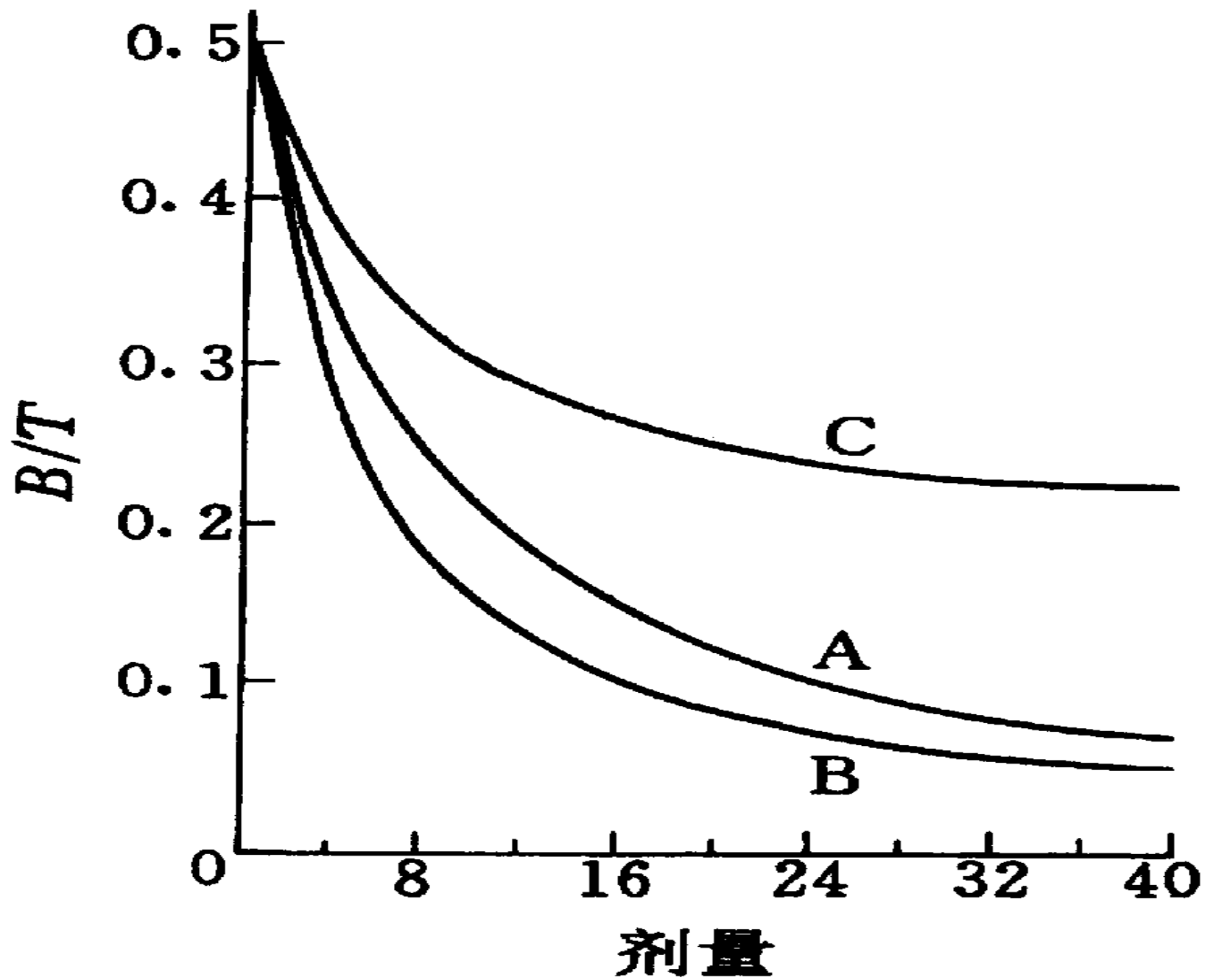
常用的分离方法

- 双抗体法
- 聚乙二醇法（PEG）
- 活性炭吸附法
- 盐析法
- 微孔滤膜法
- SPA法
- 固相抗体法：塑料、纤维素、凝胶颗粒、多孔玻璃微球
- 磁化颗粒法
- 屏蔽计数法

竞争放射分析方法的建立

反应方式

- 平衡法
- 顺序加样法
- STAT法



试剂用量

- 高含量样品：
灵敏度高， B_0/T 在30—50%
- 低含量样品：
高剂量斜率好， B_0/T 在50—70%

反应介质

- pH和离子强度
- 反应体积
- 添加剂
- 样品处理

加样程序

- 实验设计、
- 配制试剂
- 加未标记物（标准品或待测样品）
- 加标记物
- 加特异性结合剂
- 混匀、温育
- 加分离剂、分离B与F
- 测量各管放射性计数，绘制标准曲线
- 由标准曲线反求出样品浓度

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：
<https://d.book118.com/708101125042006124>