

$^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 放射性比活度测定

纪弟 贺佑丰

(中国原子能科学研究院, 北京)

本文介绍了应用自身置换法和放射免疫分析法测定 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的比活度, 获得了比较准确的结果。并研究了放射免疫分析中不同比活度的标记抗原对灵敏度的影响。

关键词 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$, $^{125}\text{I}-\text{T}_3$, 比活度, 灵敏度, 自身置换法, 放射免疫分析法。

前言

在放射免疫分析中, 标记抗原的比活度对方法的灵敏度、标记抗原的免疫活性及稳定性均有很大的影响^[1]。因此, 准确测定其比活度, 对建立放射免疫分析方法, 研究抗原与抗体的免疫反应均有很重要的意义。

用同位素交换法制备的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 可以直接用放射性层析图谱法粗略计算其比活度^[2, 3]。若以 T_3 为底物标记制备 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和以 T_2 为底物标记制备 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$, 其比活度就不能用上述方法测定; 我们采用自身置换法和放射免疫分析法测定并得到了比较准确的结果。虽然Mucha等^[4]用上述三种方法对用同位素交换法制备的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 比活度进行过测定, 但结果偏差较大。

自身置换法^[5, 6]是用抗原标准做标准曲线, 同时以不同放射性活度的标记抗原做自身置换曲线。将两条曲线绘在同一张半对数坐标纸上, 若标记抗原和未标记抗原与抗体结合的亲和力一样时, 则两条曲线有很好的平行关系。这样在两条曲线相平行的同一结合率水平 (B/B_0 或 B/T) 上, 用标准曲线测定相应活度的标记抗原中抗原含量, 从而求出其比活度。Morris^[7]在评价此法时指出: 直接从上述两条曲线中测定比活度的方法, 由于未考虑到标准曲线中加入的标记抗原量, 所以不够精确。在此基础上, Morris将两条曲线平行部分测定出的值, 在普通坐标纸上, 纵座标为抗原标准, 横座标用不同放射性活度的标记抗原, 绘制出一条直线, 此线不过原点。用线性回归法计算出斜率, 其斜率的倒数即为标记抗原的比活度。

放射免疫分析法^[8]首先要制备 $^{131}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{131}\text{I}-\text{T}_3$, 用抗原标准 T_4 或 T_3 与 $^{131}\text{I}-\text{T}_4$ 或 $^{131}\text{I}-\text{T}_3$ 做标准曲线。同时用不同活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 与 $^{131}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{131}\text{I}-\text{T}_3$ 做放射免疫分析曲线, 利用 ^{131}I 和 ^{125}I 放射出的射线能量不同, 控制单道 γ 谱仪的阈值, 使在测量 ^{131}I 时, ^{125}I 的影响不大。用标准曲线来测定一定活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 或 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 中抗原含量, 然后求出 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的比活度。

1987年3月1日收到。

实验部分

1、主要仪器 FT-1901单道 γ 谱仪, 北京核仪器厂产品; FT-356电位计, 西安核仪器厂产品。

2、主要试剂及配制 3,5-二碘甲状腺原氨酸 (T_2) (Fluka, 瑞士); 3,5,3'-三碘甲状腺原氨酸 (T_3) (上海淮海药厂); 甲状腺素 (T_4) (Sigma, 美国); $Na^{125}I$, $Na^{131}I$ 及 T_4 , T_3 抗体 (均为中国原子能科学研究院产品)。

T_4 及 T_3 标准溶液 精确称取 T_4 或 T_3 1-2mg, 用0.4mol/l NaOH数滴溶解, 然后用50%丙二醇溶液稀释到10ml。经紫外分光光度计在325nm(T_3 在320nm)处测定其OD值。根据其摩尔消光系数准确计算浓度。将配好的 T_4 和 T_3 标准溶液用巴比妥缓冲液(0.05mol/l, pH~8.6)分别稀释成20ng/ml和80ng/ml, 再进行倍比稀释。

取0.5ml ^{125}I - T_4 或 ^{125}I - T_3 在校准的4 π 电离室上准确测定其活度。用巴比妥缓冲液(同上)配成800kBq/ml和320kBq/ml, 然后倍比稀释。

3、自身置换法 按常规放射免疫分析法做 T_4 或 T_3 标准曲线。同时在相同的条件下做自身置换曲线, 即不加标准 T_4 或 T_3 , 依次加入同一比活度而不同活度的 ^{125}I - T_4 或 ^{125}I - T_3 100 μ l, 巴比妥缓冲液200 μ l, T_4 或 T_3 抗体100 μ l (非特异管不加抗体)。将各管置于37 $^{\circ}C$ 水浴中温育1小时, 再置于4 $^{\circ}C$ 冰箱内4小时。取出后加正常人血清50 μ l, 30%聚乙二醇500 μ l, 震荡均匀, 室温下以3500转/min离心20min, 测量各管的总放射性为 T (计数/min)。然后吸弃上清液, 测量沉淀部分的放射性为 B (计数/min)。在半对数座标纸上, 以 B/T 的结合百分数为纵坐标, 不同浓度的标准 T_4 或 T_3 和不同活度的 ^{125}I - T_4 或 ^{125}I - T_3 为横坐标。绘出标准曲线和自身置换曲线如图1, 图2所示。

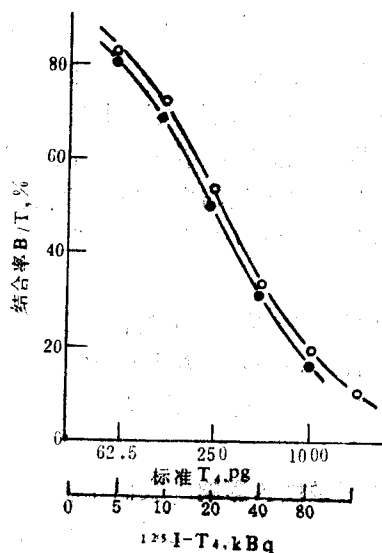


图1 自身置换法测定 ^{125}I - T_4 的比活度曲线

○——标准曲线; ●——自身置换曲线。

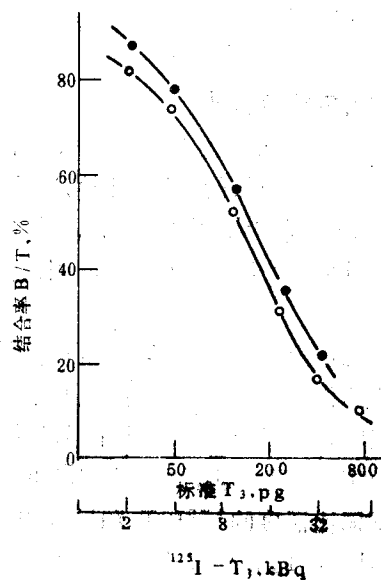


图2 自身置换法测定 ^{125}I - T_3 的比活度曲线

○——标准曲线; ●——自身置换曲线。

图中表明用 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 或 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 与标准 T_4 或 T_3 和同一抗体免疫反应的曲线是平行的,证明其免疫反应的平衡常数是一样的。因此在双曲线平行部分的同一结合率水平上,从标准曲线上测定出相应活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的抗原量是准确和可靠的。

将两条曲线平行部分测定的数据,用Morris的方法作图3,图4。其标准 T_4 或 T_3 与 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 或 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的活度呈直线相关。图中的直线不过原点,其截距 b (为负值)表示标准曲线中加入的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 或 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的抗原量。用线性回归法计算直线的斜率,其倒数即为所要测定的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的比活度。

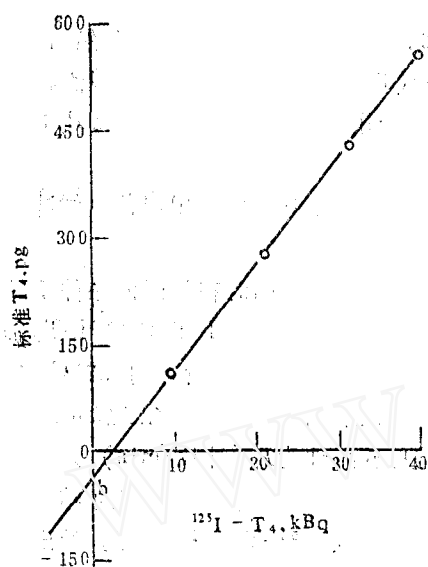


图3 标准 T_4 (pg)与 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ (kBq)的关系

b 为标准曲线中加入的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 的抗原量。

$$r=0.70.$$

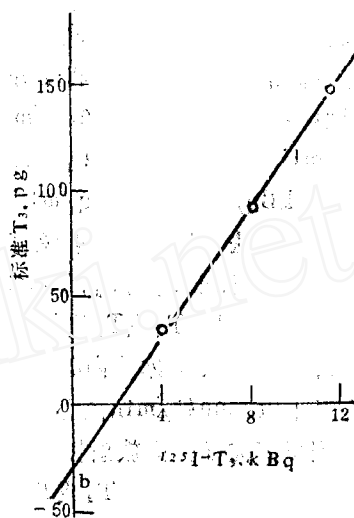


图4 标准 T_3 (pg)与 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ (kBq)的关系

b 为标准曲线中加入的 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的抗原量。

$$r=0.75.$$

4. 放射免疫分析法 用 $^{131}\text{I}-\text{T}_4$ 或 $^{131}\text{I}-\text{T}_3$ 做示踪剂,按常规放射免疫分析法做 T_4 或 T_3 标准曲线。同时在完全相同的条件下做放射免疫分析曲线,即依次加入 $^{131}\text{I}-\text{T}_4$ 或 $^{131}\text{I}-\text{T}_3$ 100 μl (与做标准曲线的作用相同),巴比妥缓冲液200 μl ,同一比活度而不同活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 或 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 100 μl (作为被测样品), T_4 或 T_3 抗体100 μl 。以下步骤均与自身置换法相同。我们在测量 ^{131}I 时,控制单道 γ 谱仪的阈值,使 ^{125}I 的影响 $<4\%$,以保证放射免疫分析法的准确性。

放射免疫分析法在计算上与自身置换法相同。标准曲线和放射免疫分析曲线如图5、图6所示。此法的优点在于避免了标准曲线中示踪物的影响。若按Morris的方法做图7、图8,可以清楚地表明直线过原点,消除了示踪物中抗原含量的影响。因而可直接测定出 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的抗原量,进而求出其比活度。

5. 不同比活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 对放射免疫分析灵敏度的影响 我们在制备出不同比活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的基础上,为了研究其对灵敏度的影响,在同一实验中,采用了相同稀释度的抗血清和相同浓度的标准。并且控制不同比活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 加到各测定管中活度是相同的。用反应曲线斜率的变化(图9及图10)和曲线可检测的最小下限

(表2) 来表明对灵敏度的影响。

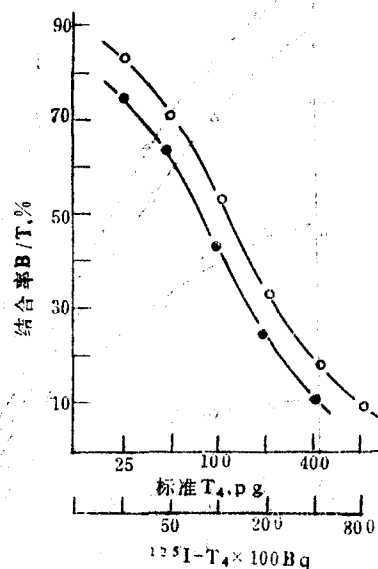


图5 用放射免疫分析法测定 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 比活度曲线

○——标准曲线；●——放射免疫分析曲线。

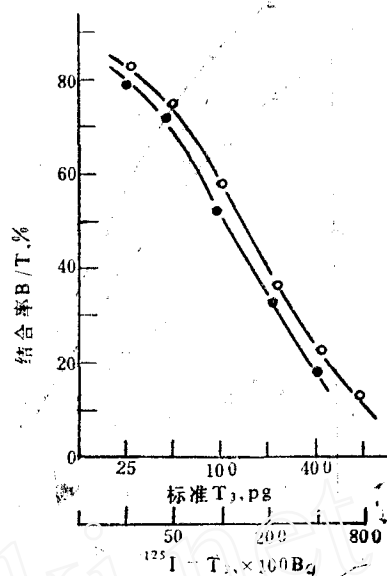


图6 用放射免疫分析法测定 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 比活度曲线

○——标准曲线；●——放射免疫分析曲线。

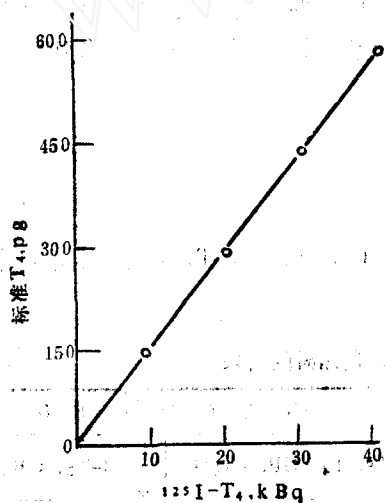


图7 放射免疫分析法标准 T_4 与 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 的关系

$r=0.83$ 。

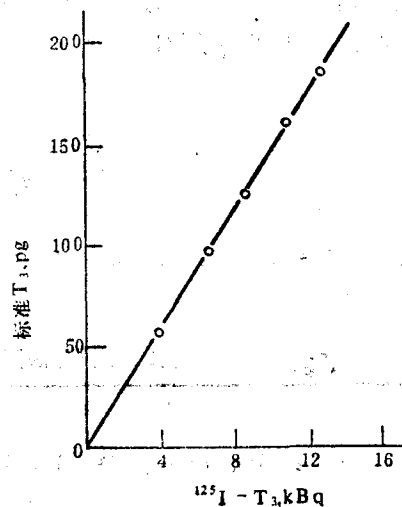


图8 放射免疫分析法标准 $\text{T}_3(\text{pg})$ 与 $^{125}\text{I}-\text{T}_3(\text{Bq})$ 的关系

$r=0.86$ 。

图9表明了标记抗原的比活度与灵敏度的关系，图中a, b, c, d反应曲线是在同一次实验中，用相同抗血清的同一滴度和同一标准浓度，并且是在同一台仪器上测量得到的，其比活度分别为55.5、27.75、11.1、5.5 $\text{GBq} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 。

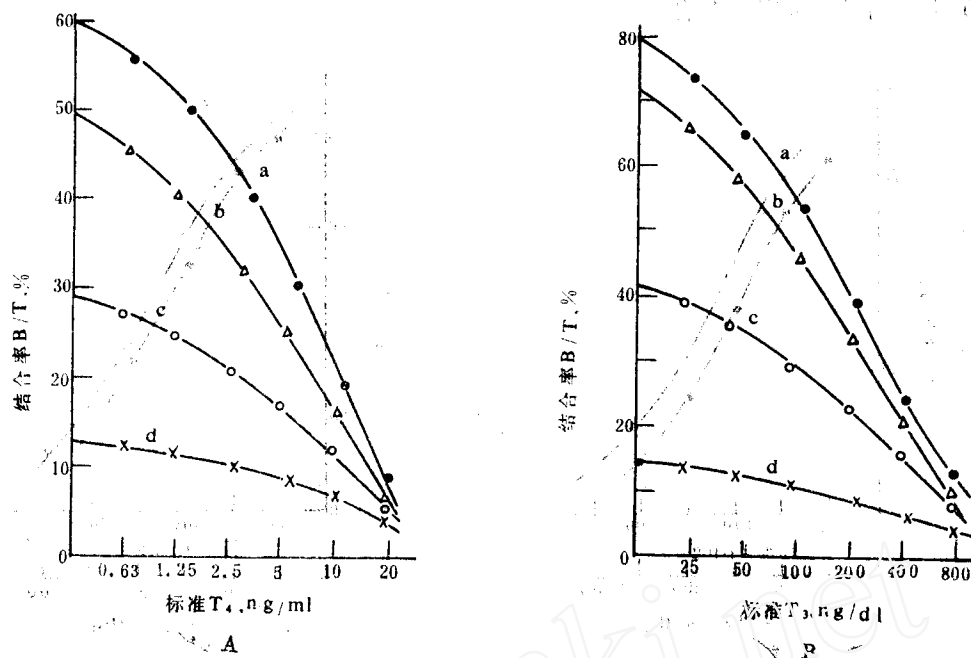


图9 用不同比活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ (A)和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ (B)标记抗原各自建立的反应曲线

由图9中反应曲线可见,标记抗原的比活度无疑对灵敏度有很大的影响。图中a反应曲线表明 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的比活度为 $55.5\text{GBq}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ 时,反应曲线斜率大,其下限检测值很小。而d反应曲线 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的比活度为 $5.5\text{GBq}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ 时,反应曲线的斜率很小而下限检测值很大。

结果与讨论

用自身置换法和放射免疫分析法对不同批号的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 的比活度进行了测定,其结果列于表1。

表1 不同方法测定 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 比活度结果

样品号	自身置换法		放射免疫分析法	
	$^{125}\text{I}-\text{T}_4, \text{GBq}\cdot\mu\text{g}^{-1}$	$^{125}\text{I}-\text{T}_3, \text{GBq}\cdot\mu\text{g}^{-1}$	$^{125}\text{I}-\text{T}_4, \text{GBq}\cdot\mu\text{g}^{-1}$	$^{125}\text{I}-\text{T}_3, \text{GBq}\cdot\mu\text{g}^{-1}$
1	60.7	68.5	59.6	56.6
2	60.3	67.1	58.3	55.1
3	56.1	61.4	60	59.2

表1中的结果表明,用两种不同的方法对同一样品测定所得到的结果相近,同时还表明不同批号的样品测定的结果差别不大。无论是 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 还是 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$,其实际测定的比活度均比理论比活度要低,这主要是由于国产 Na^{125}I 制剂中 ^{125}I 的丰度仅为50%所致^[9]。

表2列出了用不同比活度的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 作标准曲线时,可检测的最小下限。

表2 不同比活度 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 与被测物灵敏度的关系

$^{125}\text{I}-\text{T}_4$, $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 比活度, $\text{GBq} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	被测物质 T_4	被测物质 T_3
	测定的灵敏度, pg	测定的灵敏度, pg
55.5	15	10
27.75	25	15
11.1	50	40
5.55	100	70

从表2可见灵敏度与标记抗原的比活度有关。因而对要求灵敏度高的检测方法,就应制备高比活度的标记抗原。但高比活度的标记抗原易造成免疫活性损伤及自身的不稳定,并且测定方法的灵敏度还受到其它一些因素(如抗体质量、抗原的免疫活性等)的影响。因此标记抗原的比活度要由被测物质的实际测定范围来决定。

用自身置换法和放射免疫分析法测定标记抗原的比活度,其共同点都是建立在抗原与抗体免疫反应这个基础上的。所以,标记抗原和未标记抗原与抗体反应的亲和力要一样。用 ^{125}I 标记制备的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 与未标记的 T_4 和 T_3 在抗原分子的结构上没有改变,因而与抗体反应的亲和力不会改变。故用这两种方法测定其比活度是较为理想的方法。

参 考 文 献

- [1] Chevre, L. et al., *Semin. Nucl. Med.*, 5 (2), 157 (1975).
- [2] Verhoff, F. H. et al., *Clin. Chem.*, 26 (6), 718 (1980).
- [3] Caro, R. A. et al., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 26 (9), 527 (1975).
- [4] Mucha, S., *Radiochem. Radioanal.*, 41 (161), XX (1979).
- [5] 邓尚平, 四川医学院学报, 12 (1), 1 (1981).
- [6] Virasoro, E. A. et al., *Clin. Chem.*, 26 (2), 351 (1980).
- [7] Morris, B. J., *Clin. Chem. Acta*, 73, 213 (1976).
- [8] Thurlow, H. J. et al., *Ann. Clin. Biochem.*, 13, 364 (1976).
- [9] 贺佑丰等, 核化学与放射化学, 6 (2), 100 (1984).

DETERMINATION OF THE RADIOACTIVITY SPECIFIC ACTIVITY $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ AND $^{125}\text{I}-\text{T}_3$

JI DI HE YOUFENG

(Institute of Atomic Energy, P.O. Box 275, Beijing)

ABSTRACT

The present paper reports the measurement of $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ and $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ specific activity by radioimmunoassay and self-displacement methods. A more accurate result is obtained. The influence of specific activity of labeled antigen on the sensitivity of radioimmunoassay is also studied.

Key words $^{125}\text{I}-\text{T}_4$, $^{125}\text{I}-\text{T}_3$, Specific activity, Sensitivity, Self-displacement, Radioimmunoassay.