

## 放射免疫分析簡介

### 前言

醫事放射師法於 89 年 2 月公布實施，其中第二章第十二條：醫事放射師執業範圍，明定執業範包含核醫科體外檢查，意思就是放射免疫分析是醫事放射師的工作範圍之一，但因為大家對這份工作不是很熟悉，加上從事這個工作的醫事放射師人數較少，因此這方面的教材也比較缺乏。

有鑑於這個現象，中華民國醫事放射師全國聯合會當初制訂醫事放射師實習手冊及兩年期醫事放射師訓練課程，便將放射免疫分析課程納入訓練計畫中，就是希望由基本教育做起，讓醫事放射師們在投入職場前，可以對放射免疫分析有基本的認知及訓練，讓就職單位訓練新進人員時可減少訓練時間。

編寫放射免疫分析的課程講義及簡報，因為筆者從事核醫職場多年，除了核醫造影、正子造影檢查，也從事放射免疫分析工作及擔任品質主管工作，希望可以透過這些整理過的資料，協助線上忙碌的臨床教師們，可以輕鬆的以淺顯易懂的方式進行教學，減少臨床教師的負擔。

### 簡介

1959 年美國柏森醫師與生物物理學家蘿沙琳·耶魯博士兩人共同研製開發一項新的技術，這個方法方法利用生物體免疫中抗原、抗體反應為基礎加上數學公式導引分析，並且標記結合利用微量的放射性同位素，藉以偵檢人體組織液，體液、血清、血漿、尿等生物體微量濃度，作為疾病診斷的輔助工具。這個基本方法再加上嚴謹的品質管制，以品質保證為素求，這個新技術稱為”放射免疫分析”。之後世人與各大研究中心皆採用此技術，檢驗數據供臨床診斷參考，放射免疫分析方法學亦在 1977 年獲得諾貝爾獎。

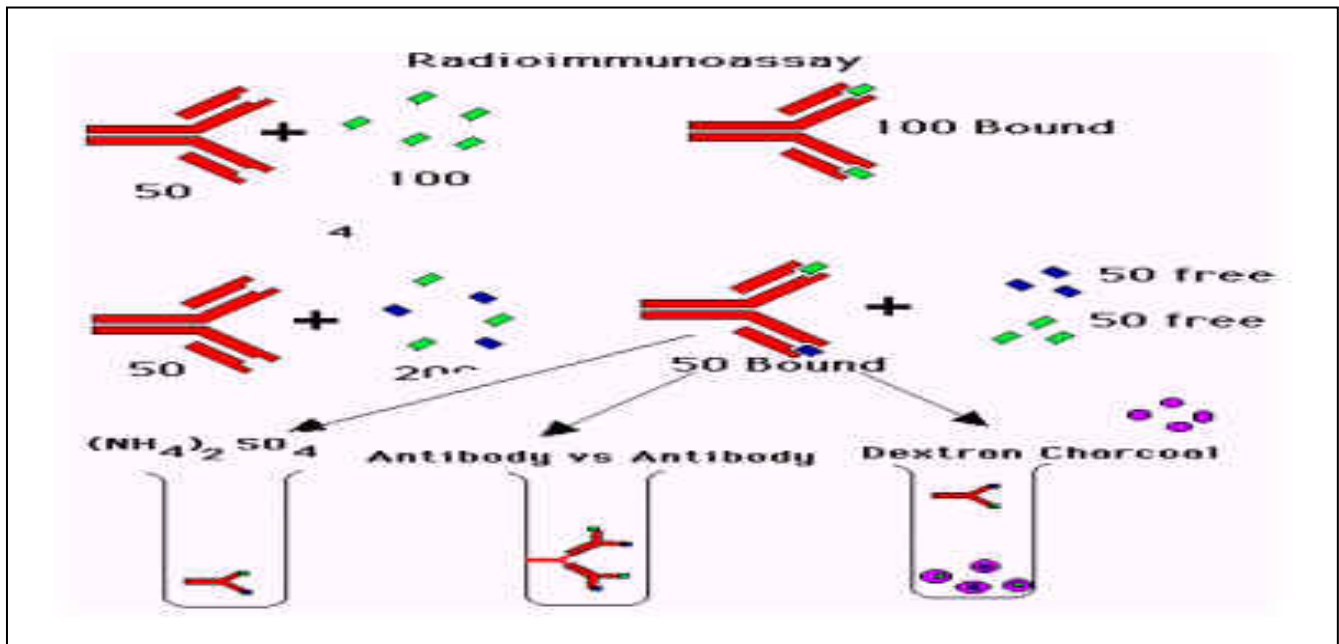
如同蘿沙琳·耶魯博士在她受獎演說中所言：「放射免疫分析可以很正確的測到半塊方糖溶入一個大湖中的濃度。」，可說明利用放射免疫分析法可測得極微量的物質，近來利用放射免疫分析原理為基本原理，但結合物質轉換成酵素或冷光標記的方法相繼開發出來並被臨床使用，但是這些方法對於極微量物質的測定仍仍難達到非常穩定。

體外放射配體結合分析方法簡稱為體外放射分析法(in vitro Radioassay)，是以類以放射性同位素標記的配體(Ligand)為示蹤劑，以結合反應為基礎，在體外完成的微量生物活性物質檢測技術的總稱。具有靈敏度高(可測量範圍約  $10^{-9}$ — $10^{-15}$ g)、特異性強(運用單株抗體等技術)、精密度和準確度高(運用內部及外部品管等方式)以及應用廣泛等特點，是疾病診斷和醫學研究的重要方法，利用本技術測定體內各種微量生物活性物質，如激素、蛋白質、抗體、免疫球蛋白、維生素和藥物等等項目開發已達 300 多種，在很多領域扮演重要的角色。Yalow 和 Berson 博士因在 1959 年創建本法而榮獲 1977 年諾貝爾醫學獎。在這類技術中，放射免疫分析最具代表性，應用也最為廣泛，本文將介紹放射免疫分析基本原理、標準曲線、實驗室設備、試劑、品管。

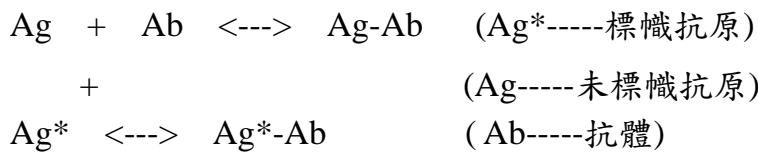
## 一、放射免疫分析的基本原理

放射免疫分析(Radioimmunoassay; RIA)的基礎是放射性標記的抗原和非標記抗原(標準抗原或被測抗原)同時與限量的特異性抗體進行競爭性免疫結合反應，這種競爭關係可用以下反應式來顯示：

### 競爭法

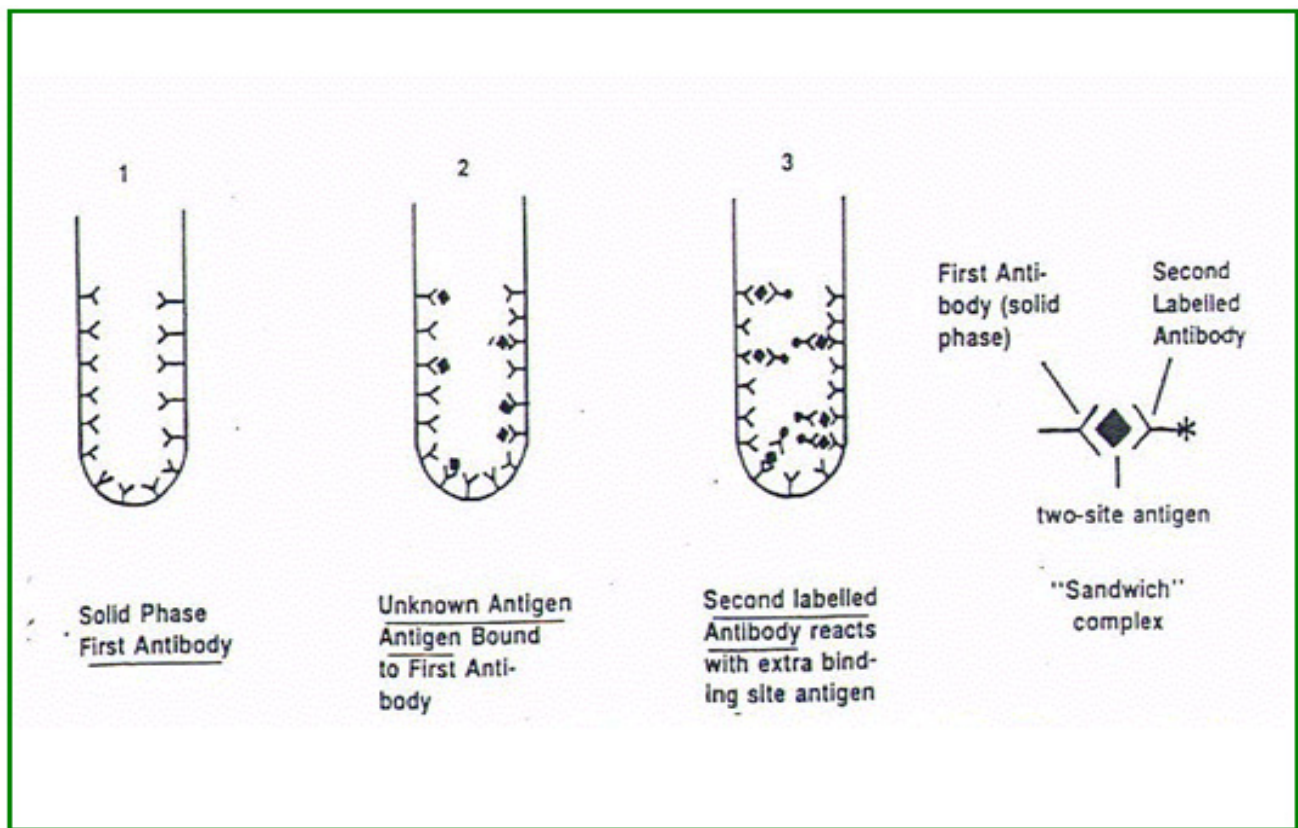


放射免疫測定法 (RIA) 原理，依 Yalow 及 Berson 的說明，為來自於抗原對抗體結合位置 (antibody binding sites) 之競爭，作用如下：



由於抗原、抗體之結合為可逆反應，因此標幟與未標幟抗原共同競爭抗體之結合位置；當未標幟抗原 (Ag) 量增加時，標幟抗原(Ag\*) 與抗體之結合量減少 (如圖)。因此分析系統中固定抗體及標幟抗原之濃度，未標幟抗原量變化於是可以顯現。當抗原、抗體反應達平衡時，移去游離態之標幟抗原 (free Ag\*)，再測各試管中放射活性 (radioactivity) 利用標準劑量反應曲線 (standard-dose response curve) 以內插法進行計算讀出未知樣品之含量。

### 三明治法



三明治法就是所謂的 IRMA(Immunoradiometric assay)，簡單來說就是先在試管上(或者是試管中加入的塑膠片，B 肝檢查則是球狀小顆粒)接合上抗體，然後加入待測物，因為待測物質會和抗體先結合在一起，因此在經過一段反應時間後可以將未結合的部分 Buffer solution(成分依照原廠說明書所示，包含純水、生理食鹽水、稀釋過的清潔劑、鹽類等等)沖乾淨以後，加入標幟放射性同位素的抗體(針對待測物的抗體)，等這 3 項物質結合完成後，將未作用的物質以 Buffer solution 沖洗乾淨，就完成了三明治  $Ab + Ag \rightarrow Ab-Ag \Rightarrow Ab-Ag + Ab^* \rightarrow Ab-Ag-Ab^*$ ，此時所計量得之放射性與欲測物質的濃度成正比，一樣的將已知濃度製作成標準曲線，待測物質再去比對標準曲線，就知道待測物的濃度了。

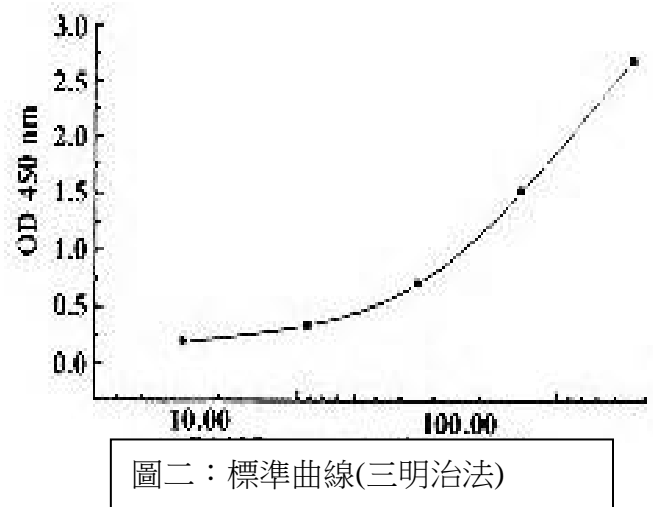
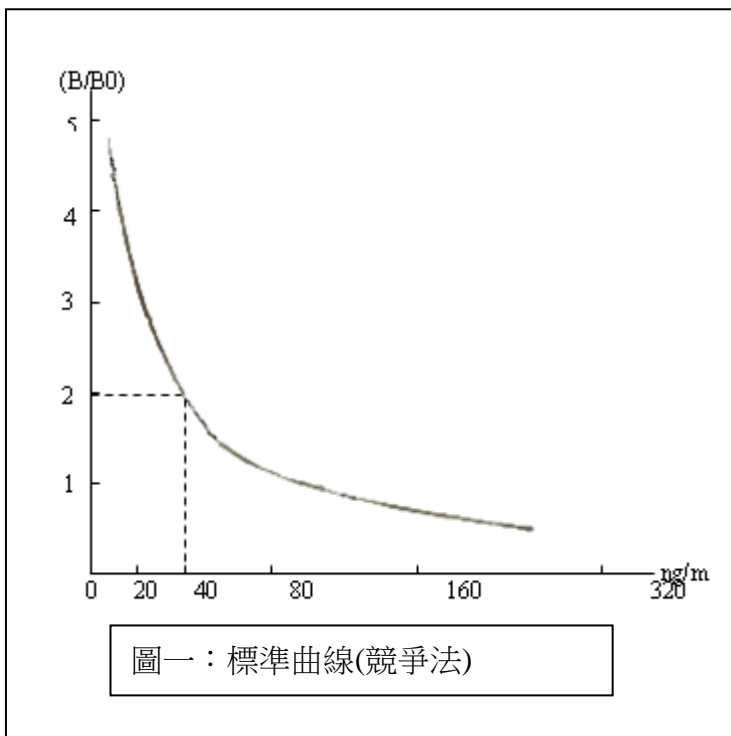
B 型肝炎檢查雖然也是利用這個三明治法來測得結果，但判讀方法有些不一樣，B 肝檢查的標準液會包含陰性與陽性的兩個部分，可以讓實驗值去比對，按照說明書的建議設定 Cutoff 值，以普生公司 B 肝抗原為例，Cutoff 為陰性品管的  $cpm \times 2$ ，然後要去計算陰性與陽性品管的比值，最主要是監測試劑執行檢驗的放射性同位素活性強度是否足夠。當待測物質的高於 Cutoff 值，結果即為陽性，低於 Cutoff 值結果即為陰性，但在 Cutoff 值上下 10% 的邊界值，則須再測一次以確認結果。

### 二、標準曲線(Standard Curve)

標準曲線的製作方法如下：以一系列已知濃度的標準抗原 Ag，然後分別向其中加入固定量的  $^*Ag$  和 Ab，待競爭結合反應平衡後，分離抗原的結合部分和游離部分，用加碼計數器測

得\*Ag-Ab 的放射性為 B(Bond)或游離\*Ag 的放射性為 F(Free)，計算出 B%  $[B/(B+F) \times 100\%$ ；稱結合率]，如 B/B0% [B0 即為不含非標記 Ag 之最大結合放射性]。以 B% 或 B/B0% 為縱座標，已知濃度標準抗原的濃度為橫座標，繪製出 B% 或 B/B0% 隨 Ag 量變化的曲線即為標準曲線 (圖 1)。同一批實驗的未知濃度待測物品，即可從此標準曲線上查出待測物品中被測抗原 (Ag) 濃度。圖二即為利用三明治法所繪得之標準曲線，因利用三明治法結合，大多數呈現的數據與濃度成正比，因此圖形顯示的曲線，恰巧與競爭法相反。

由此可見，標準曲線的精度直接影響測定結果的精度。因此，製作標準曲線的每一步驟都要嚴格和精確。標準曲線的最後繪製是以少數離散點為依據的，如何使得由這些少數離散點製成的標準曲線能儘量精確地反映 B% 或 B/B0% 與樣品抗原 (Ag) 濃度之間的真實函數關係是一個受到重視的研究課題。目前公認以結合率 (B%) 或其變化指標，如 B/B0% 等的 logit 值為縱座標，以標準 Ag 濃度的 log 或 ln 值為橫座標，用最小二乘法 (Least Square Method) 對各離散點進行直線回歸而得出標準曲線是較好的方法。當然，選用哪種指標、哪種座標系和哪種撮合方法還需根據不同檢測項目和不同的要求來決定。目前已普遍採用電腦進行數據處理、自動繪製標準曲線和打印顯示樣品抗原濃度，十分方便。



標準曲線的用途，就是要用已知的濃度去推算未知的濃度，至於 Curve 須使用哪一類的函數圖形，則可參考試劑說明書，說明書上都記載這一組試劑在實驗室做出來的數據，或是在剛開始使用試劑前，通常會進行已知濃度的再現性實驗(重複進行數次同一組樣本的測試)，可以利用這些數據，帶到  $\gamma$ -counter 中，測試每一種圖形，看看哪一個圖形帶出來的數據符合說明書上所示，若是重複進行數次的檢測，可將每一組的數據帶進去跑，看看同一組試劑，在這個實驗室做出來的數值是否穩定，經過一些步驟確認的標準曲線，才能確保樣本數據的準確性。

### 三、實驗室設備

通常在設立放射免疫分析實驗室，第一個步驟就是要先設計實驗室的動線、實驗設備會擺放的位置、放射性廢水設備的大小、放射性廢料儲存室、實驗桌、各項文件置放空間，這些基本的實驗室必備條件，如果完全無任何設置的經驗，可能要申請到其他等級相同的醫療院所放射免疫分析實驗室參觀，才會有一些基本概念。本人的經驗，實驗室的實驗桌最佳位置室位於房間中間，水槽位於實驗桌旁，周圍放置冰箱等其他物品，文書處理區與實驗區要確實的區隔，比較不會造成日後作業上的困擾。水浴器最好放置在水槽邊，避免清洗或換水造成人員不便，所有水龍頭需設置腳踏式或感應式開關，避免放射性物質汙染。

其他實驗室的設備則視需求購置，因為基本上會依照說明書需要的步驟，決定實驗室要購置的物品，最通常的設備如以下所示：



實驗室



廢水處理水槽



$\gamma$ -counter



藥品及檢體存放



水浴器及乾式孵育設備



離心機及震盪器



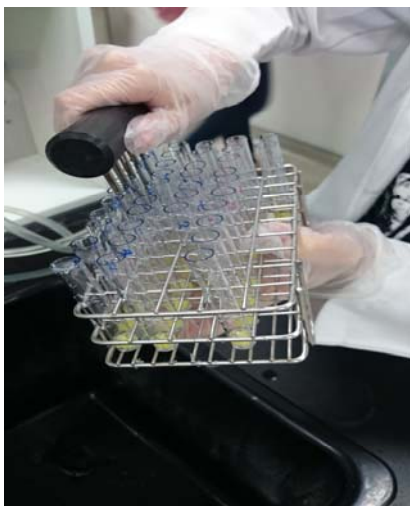
混合器



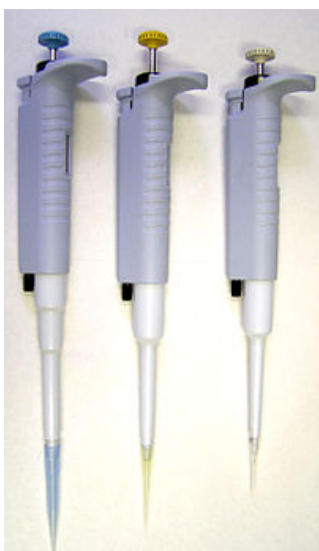
磁性攪拌加熱器



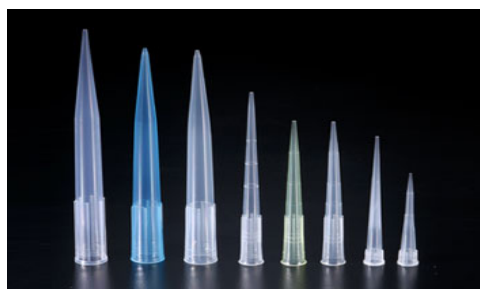
放射性廢水監測設備



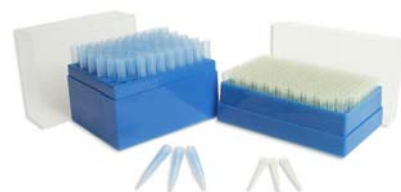
各項清洗設備



微量吸管



Tip



Tip 置放盒

#### 四、試劑：

每個廠牌試劑外觀及儲存容器都有各自的設計，但是試劑裡的內容物大致上都相同，試劑內都會有

1. 標記特殊抗體的試管
2. 已知濃度之標準液
3. 已知濃度品管液
4. 放射性示蹤劑

右圖為試劑範例



在實驗室要開發每項檢查前，通常會請每個廠商提供試劑，由已知濃度的檢體進行各項測試，完整的測試報告有助於日後開發這些項目，訂定各項流程，通常會經由會議或者小組共同討論測試結果，再決定使用的試劑。

考量的因素包含

1. 試劑的價格：價格不夠親民，成本會增加。
2. 實驗必需的設備：實驗室目前設備是否足夠，或是要另外添購(成本是否會增加)。
3. 實驗的步驟：過程過於繁雜，增加人員負擔，且出錯機率會增加。
4. 實驗花費的時間：要制定執行時間，以及發報告之頻率。

## 五、品管

品管的部分包含內部品管及外部品管，內部品管是各實驗室自定要進行品管的頻率及次數，品管液都是已知濃度，藉由長期內部品管來監測實驗值是否可信賴、是否達到允收標準、批次實驗值是否報告可發送，每月也會將內部品管繪製 L-V chart 監測是否在區間內。

外部品管通常是一些具有公信力的機構，製作只有機構自己知道濃度的品管液，寄送到各個實驗室。對每個參加外部品管的實驗室而言，這些品管液的濃度都是未知的，每月收集這些實驗室的結果值，進行比對。外部品管的目的，在監測實驗室的系統誤差，因為是全部參加的實驗室進行比對，就可以比出每個實驗室的差異，進而去討論可能的因素。