

刀豆球蛋白 A 亲和双向放射免疫电泳 对人体甲胎蛋白变种的研究

许凯黎 周瑾

(上海市肿瘤研究所)

甲胎蛋白 (AFP) 是与癌有关的胚胎性糖蛋白, 它由各种分子组成, 尽管其抗原性相同, 但随分子量大小、等电点不同及含糖基的多少, 呈现不均一性的分子类型^[1]。这种不均一性表现在 AFP 与植物凝集素结合能力的差异, 因此可根据这种差异把 AFP 分成不同的蛋白变种^[2]。

现可把 AFP 分成与 Con-A 结合型和与 Con-A 非结合型二种变种类型^[3]。Mackiewicz 等^[4]曾用 Con-A 亲和双向免疫电泳 (Aff-DIEP) 检测各种人体胚胎组织体外合成 AFP 的变种类型, 他们发现非结合型 AFP 变种是由卵黄囊、胚肾及胚胎细胞合成, 而结合型 AFP 变种由胚肝细胞合成, 由此可见 AFP 变种类型与胚胎组织关系密切。但关于体内各种癌组织合成的并进入血清中的 AFP 变种类型尚未见研究报道。我们建立了一种高灵敏的刀豆球蛋白 A 亲和双向放射免疫电泳 (Aff-RDIEP), 拟通过分析不同肿瘤患者血清中各种 AFP 变种间之比值, 进一步研究癌组织与 AFP 变种的关系。

材料和方法

一、AFP 标本

1. 纯化 AFP 采用抗 AFP 抗体交联 Sepharose 4B 亲和层析柱, 分离 3—5 个月流产胎儿浸出液, 获得纯化的 AFP。其纯度经聚丙烯酰胺电泳及免疫电泳证实。

2. AFP 阳性血清 肝硬化、肝癌、胃癌肝转移和畸胎瘤患者血清标本 (AFP 浓度均高于 50ng/ml), 由上海第一医学院肿瘤医院、上海市静安区中心医院提供。

3. 标准 AFP 样品 系上海市生物制品所制品。

二、试剂

1. 刀豆球蛋白 A (Con-A), 系 Pharmacia 药厂产品。用缓冲液配成各种不同浓度的溶液。

2. 琼脂糖 (Agarose), 系 B. D. H 药厂生产的低电渗凝胶 ($M_r = -0.13$)。

3. AFP- I^{125} , 采用氯胺 T 法, 用 I^{125} (北京原子能所产品) 标记纯化的 AFP。

4. 抗 AFP 抗体 系上海市生物制品所产品。

三、刀豆球蛋白 A 亲和双向放射免疫电泳:

根据 Bog-Hansen^[5] 原理, 再添加放射性标记物而建立。用电泳缓冲液 (0.1M 巴比妥缓冲液, pH = 8.6) 配制成 1% 琼脂糖, 并与不同浓度的 Con-A 混和后注入 $9 \times 3\text{cm}$ 玻片中, 冷却凝固后, 于靠近阴极 $1/3$ 玻片处打孔, 孔内加入 $10-20\mu\text{l}$ 样品及标记 AFP- $I^{125} 1\mu\text{l}$ (约为 $0.003\mu\text{Ci}$) 作第一向电泳。电泳条件为 10V/cm , 1.5 小时。温度保持在 4°C 。电泳完毕后凝胶移至 $9 \times 13\text{cm}$ 大玻板一侧, 并用含有 1:500 至 1:10000 抗 AFP 抗体浓度的琼脂糖铺入玻板, 冷却后作第二向电泳, 条件为 2V/cm , 18 小时。电泳结束后浸泡入生理盐水中 2 小时; 换水多次; 经 $70-80^\circ\text{C}$ 烘干; 暗室内将 X 光胶片覆盖, 曝光 48 小时, 冲晒后观察实验结果。

结果与讨论

一、刀豆球蛋白 A 亲和双向放射免疫电泳特点

在双向免疫电泳条件下, 一种蛋白质通常

仅呈现单一免疫沉淀峰。但因糖蛋白中某些碳水化合物基团能与植物凝集素特异性结合，一旦第一向电泳时加入游离植物凝集素，某些糖蛋白分子中糖基即与其相结合，并按结合强弱形成强、弱及不结合型等各类分子。各类分子在同一电场条件下迁移率不同。再用含有抗体的凝胶作第二向电泳后，即可表现为抗原性一致的各种变种蛋白沉淀峰。这类植物凝集素亲和双向免疫电泳（Aff-DIEP）是近年来发展的一种适宜于研究糖蛋白分子结构异同的技术^[6]。

甲胎蛋白与其它糖蛋白一样，随其含不同糖基在与 Con-A 特异性结合时，在 Aff-DIEP 中呈现若干变种。实验表明 AFP 变种在电泳中的表现往往随第一向中添加游离 Con-A 的含量多少而改变。图 1 中显示 Con-A 浓度在超过 $100\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时可呈现双峰，而 $50\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 仅为单峰。这表明人体 AFP 中存在二类变种，一种为 Con-A 亲和型，另一种为非亲和型。电泳中



图 1 不同 Con-A 浓度的 AFP 变种之 Aff-RDIEP 图谱
a: 0 Con-A/ cm^2 b: $50\mu\text{g}$ Con-A/ cm^2 c: $75\mu\text{g}$ Con-A/ cm^2
d: $100\mu\text{g}$ Con-A/ cm^2 e: $150\mu\text{g}$ Con-A/ cm^2

远离白蛋白移动位置为 Con-A 结合型，近白蛋白位置为不结合型。因为 Con-A 浓度与 AFP 变种的分离有关（图 1）。因而二者结合的程度、结合的位置与其在电场中移动的速度、各蛋白变种间的分离的距离有关，AFP 与 Con-A 结合的分子含量越高，则离白蛋白位置越远，而且与非结合型变种分离间距越大。

体外培养的器官、组织或细胞，分泌 AFP 量极微，某些实验动物及人体血清中 AFP 含量也较低，常规 Aff-DIEP 难于检测。如采用同位素技术，可提高其检测灵敏度。但标记同位素氨基酸渗入 AFP，再作自显影观察手续繁琐，不适用人体血清检测。考虑到我们所用的纯化的 AFP 是取自胚胎组织混合浸出液，其中必含有各类 AFP 变种，标记后放射性 AFP，同样可渗入到二类 AFP 变种（Con-A 结合型及 Con-A 非结合型）中，因而可建立另一种更灵敏的方法，使常用的 Aff-DIEP 改良成 Aff-RDIEP。通过不同的标准 AFP 稀释浓度的检测，该方法灵敏度可达 $50\text{ng}/\text{ml}$ （图 2）。这一高灵敏度的检测方法，也可做为研究其它微量糖蛋白变种一个有效方法。

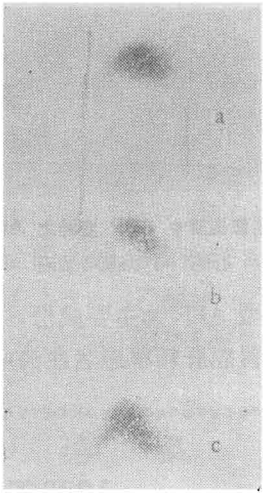


图 2 各种不同 AFP 浓度的 Aff-RDIEP 图谱
a: 50ng AFP/ ml b: 100ng AFP/ ml c: 200ng AFP/ ml

二、癌组织与 AFP 变种

通过 Con-A 亲和层析柱及 Aff-DIEP 的研究均表明人体 AFP 具有二类 AFP 变种。另

外,体外培养中也发现人体 AFP 变种与器官分泌合成有关^[4]。由此可推测血清中 AFP 可能混有各种不同器官合成的 AFP 变种。为了研究人体血清中各种变种的分布及与癌组织分泌合成的关系,我们分别选择了含有 AFP 的肝癌、肝硬化、畸胎瘤及胃癌肝转移患者血清,分别作 Aff-RDIEP 分析观察。

图 3 表明肝硬化和肝癌患者血清中均以结合 Con-A 之 AFP 为主,在肝癌血清中非结合型 AFP 仅占较小的部分,相反,畸胎瘤患者中



图 3 不同来源血清中 AFP 变种之 Aff-RDIEP 图谱

a. 肝硬化 b. 肝癌 c. 卵巢畸胎瘤 d. 胃癌肝转移

却以非结合型 AFP 为主要成份,结合型仅占小部分。然而,胃癌肝转移患者血清中结合型与非

结合型二者比较接近。上述结果表明 (1) 癌组织与相对应的胚胎组织在体内或体外均合成相同的 AFP 变种类型,例如: 体外胚肝组织溶液中呈现的 AFP 变种类型与肝硬化及肝癌患者血清中 AFP 变种类型相一致,同样卵黄囊与畸胎瘤也有类似的情况。至于胃癌肝转移患者血清中,AFP 二种类型比值接近,可能是肝癌及胃癌组织分别合成及分泌进入血清之故。(2) 人体血清中异常升高的 AFP 为各类 AFP 变种混合之总含量,因此总含量并不能反映出各类器官合成 AFP 的情况。显然如果分析血清中各种 AFP 变种的分布,就能阐明各种组织合成及分泌 AFP 的规律。

总之,Aff-RDIEP 方法的建立和对 AFP 变种的研究,除在临床上可对某些 AFP 异常升高的阳性患者作出及时的诊断,还可通过分析 AFP 各类变种在体内及体外的表现,深入了解肿瘤演变及胚胎发育时 AFP 的基因表达。同时为其它糖蛋白亚型的研究也提供了一种灵敏而有效的技术。此项研究的进一步工作目前仍在进行。

参 考 文 献

- [1] Ruoslahti, E.: *Adv. Cancer Res.*, **29**, 275, 1979.
- [2] Kerckaert, Jean-pierre, et al.: *B. B. A.*, **576**, 99, 1979.
- [3] Smith, C. J. et al.: *Br. Med. J.*, **1**, 920, 1979.
- [4] Mackiewicz, A.: *Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **1**, 251, 1980.
- [5] Bog-Hansen, T. C.: *Analyt. Biochem.*, **56**, 480, 1973.
- [6] Bog-Hansen, T. C.: *Scand. J. Immunol Supplement*, **2**, 135, 1975.

[本文于1982年2月20日收到]

1983年将召开全国工业生化学术会议

我国第一次工业生物化学学术会议将于1983年9月至10月召开。这是今年8月在河北承德召开的全国工业生化学术会议筹备会议做出的决定。

为做好这次学术会议的准备工作,决定从即日起征集论文。征集论文的范围是: 生化制药、食品工业

生化、工业酶制剂、生化试剂的有关的专题研究或应用研究论文和综述。论文征集的截止日期为1983年6月底。论文的寄送地点为河北省石家庄市华北制药厂生化药厂收。

[本刊编]