

在很多应用中有代替常规抗血清的趋势。已经采用杂交瘤技术制备了针对人体多种血清成分、血型抗原、移植抗原、激素受体、神经介质、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)及各种微生物的单克隆抗体,且部分已经商品化。这些单克隆抗体的应用提高了检测方法的灵敏度及特异性,且不必顾虑抗血清批号的不同。如采用单克隆抗体检测肝炎B抗原,其最低限可达0.1 ng。

杂交瘤技术的另一个优点是可以从复杂的抗原系统中得到针对单一抗原的单克隆抗体,因此被广泛地用于细胞分化抗原及肿瘤表面抗原的研究。如 Schlossman 等制备的单克隆抗体可用以鉴别T细胞及B细胞,以及T细胞的亚群、T抑制细胞及T辅助细胞。Levy 等制备的单克隆抗体可以鉴别外周循环及骨髓中急性淋巴性白血病的恶性细胞。此外在病毒和寄生虫的研究中单克隆抗体的应用也很活跃。这对诊断方法的改进以及新的更有效的疫苗的制备都将是很有益的。

针对白血病、淋巴瘤表面抗原的单克隆抗体已被用于这些恶性疾病的治疗,但目前仅能使病情暂时缓解,而且反复应用后失效。单克

隆抗体还被用做特异的导向载体,如使之与植物毒素相结合,以期运载这些毒素到达特定部位杀伤肿瘤;标记用同位素,辅之以体外扫描技术,以期确定肿瘤的部位及大小或发现转移灶。如能制备人体来源的单克隆抗体,被动免疫必将得到更广泛的应用。这方面,Olsson 和 Kaplan 已经取得了初步成功。

杂交瘤技术应用的一个新方向是建立单克隆的功能细胞株。一些实验室已经获得了产生抑制因子的T细胞杂交瘤,以及具有巨噬细胞样性质的杂交瘤株。功能细胞株的建立可能导致采用B细胞,T细胞及巨噬细胞的均一群体进行细胞免疫重建,也可能获得分泌生长因子、激素,细胞分化产物的各种单克隆细胞株。

五、结 语

无疑,杂交瘤技术的应用已经改变了血清学分析和免疫化学技术的面貌,它对免疫学的深入研究是一个无比犀利的武器,对其他学科的研究也起着积极的推动作用。积极研究和应用这项技术对我国生物学和医学的发展是非常重要的。

甲胎蛋白放射免疫简易快速微量测定法

袁振铎 余永光 任淑卿 李丽娟

(北京市临床医学研究所生化研究室)

甲胎蛋白(AFP)是诊断原发性肝癌的比較可靠指标之一,而且也可参照它预测异常胎儿。为了简化测定手续,我们对放射免疫AFP硫酸铵沉淀法做了改进^[1],改进的方法具有简易、快速、微量的优点,更适于临床检测和大面积普查。

一、试 剂

1. 放射碘化甲胎蛋白的制备 用伊文氏兰作清蛋白区域指示剂,将胎儿心血清经聚丙烯

酰胺凝胶电泳分离得AFP初制品。其中含有清蛋白, α_1 -球蛋白等杂质。将初制品进行放射碘化(氯胺T氧化法),然后与兔抗正常人血清共同保温4小时,使被标记的清蛋白等杂质与相应抗体结合成复合物,最后用硫酸铵分部沉淀除去杂质,获得高纯度的放射碘化的AFP。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离AFP比亲和层析法温和,易得到高活性AFP抗原。在碘化过程中需注意保证最小体积反应物,最适pH,并要充分搅拌,方能获得高标记率及高产量。

2. 标记 AFP 工作液制备 取 ^{125}I -AFP 包装瓶,用蒸馏水溶解成 $2\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 。取 $50\mu\text{l}$ 放在小试管内,于 γ -井型探测器内测定脉冲数。然后以 0.05MPBS 稀释到每管含 $5000\text{cpm}/\text{分}$ 。临用前配制。

3. $0.05\text{M pH}7.4$ 磷酸缓冲液生理盐水 (PBS) 其中含 $1:10,000\text{NaN}_3$ 作防腐剂,贮于 4°C 冰箱备用。

4. 标准 AFP 采用北京化工厂生产的 AFP 放射自显影火箭电泳、放射免疫测定双用药合中标准。 0.05MPBS 1ml 加至标准瓶内,使成 $1200\text{ng}/\text{ml}$ 。再依需要进行稀释,通常浓度为 $400\text{ng}/\text{ml}$ 、 $200\text{ng}/\text{ml}$ 、 $100\text{ng}/\text{ml}$ 、 $50\text{ng}/\text{ml}$ 、 $25\text{ng}/\text{ml}$ 。

5. 北京化工厂 AFP 药合中马抗人 AFP 血清瓶,以 $0.05\text{M pH}7.4\text{PBS}$ 配成 $1:10$ 浓度,冰箱保存,需要时稀释至各不同浓度。

6. 正常兔新鲜血清。

7. 22.5% 聚乙二醇 (PEG) 溶液 称取 22.5g 其分子量为 12000 的 PEG,以 $0.05\text{M pH}7.4\text{PBS}$ 溶解稀释至 100ml 。

二、实验方法与结果

1. PEG浓度的选定 PEG用做分离剂^[3-5],分离结合态的 AFP,即把抗原抗体复合物与游离态的 AFP 分离开。用不同最终浓度的 PEG 分别沉淀 ^{125}I -AFP 及过量马抗人 AFP 抗体 ($1:1000$ 稀释与 ^{125}I -AFP 的复合物)。在 37°C 保温 15 分钟的体系中,含有 $50\mu\text{l}$ 正常兔血清、 $1:1000$ 马抗人 AFP 血清 $50\mu\text{l}$ 、 ^{125}I -AFP $50\mu\text{l}$, PBS 的体积随 PEG 浓度不同而改变。保温后取出,放 4°C 冰箱 5 分钟,再分别加入不同体积的 PEG。同时做无抗体各管。摇匀测总 CPM, 3000 转/分离心 15 分钟,吸去上清,测沉淀的 CPM。以沉淀百分率为纵坐标,用不同浓度 PEG 为横坐标绘图,选择 PEG 最适最终浓度,即在此浓度下, ^{125}I -AFP-Ab 的沉淀率最高,而 ^{125}I -AFP 沉淀率不高,而且是二者相差最大之点,见图 1。本实验选 7.5% PEG 为最终浓度。

2. 抗血清稀释度的选定 依照我们已报告

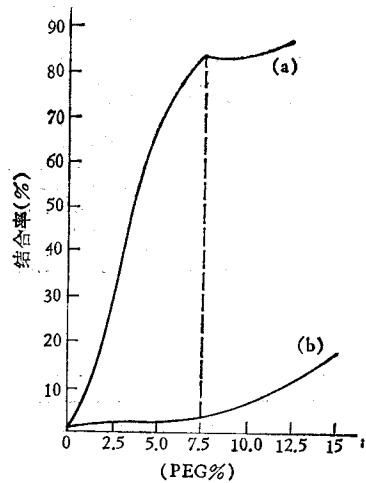


图 1 PEG 浓度的选择曲线

a: $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ 结合曲线 b: 自由 Ag^* 沉淀曲线

的方法^[1],选择适宜的抗体工作液浓度。本实验只将其体积改为 $50\mu\text{l}$, 37°C 保温 15 分钟分离剂是 22.5% PEG (分子量 1200) $100\mu\text{l}$ (PEG 最终浓度为 7.5%)。结果与前相同,抗体工作液为 $1:5000$ 稀释度。

3. 保温时间的选择 取尖底小离心试管分别加入 $50\mu\text{l}$ 正常兔血清, $50\mu\text{l}$ 不同浓度的 AFP 标准液, $50\mu\text{l}$ $1:5000$ 马抗人 AFP 血清及 $50\mu\text{l}$ ^{125}I -AFP 混匀。于 37°C 水浴中分别保温 15 、 30 、 45 、 60 、 120 、 180 分钟。再分别加入 22.5% PEG $100\mu\text{l}$, 摇匀,测各管总放射记数, 3000 转/分离心 15 分钟,电动负压抽去上清液,测沉淀计数率,计算结合率。结果绘于图 2。统计分析 6 种保温时间不同浓度 AFP 值均在 $M \pm 2\text{SD}$ 范围内,平均变异系数为 8.88% 。

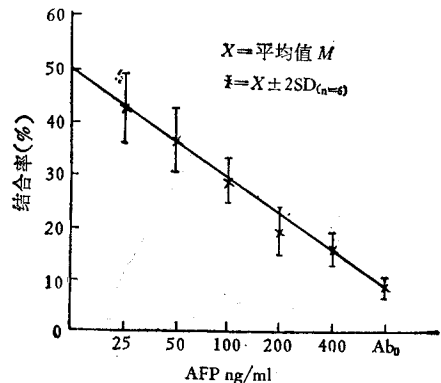


图 2 保温时间的选择

4. 标准曲线的制备 在固定上述条件后, 将已知浓度的 AFP 样品 (1200ng/ml) 逐渐倍比稀释。其他操作如上述, 计算不同浓度 AFP 形成的结合率, 绘于图 3。从图 3 选择出 AFP 浓度在 25—400ng/ml。此法灵敏度高, 小于 3.125ng/ml, 浓度再倍比稀释仍能与之区别。

标准曲线范围被确定后, 就可依照下式:

$$\frac{B - N}{B_0 - N} (\%)$$

$$= \frac{\text{AFP 标准计数率} - \text{非特异结合计数率}}{\text{AFP 零管计数率} - \text{非特异结合计数率}} \times 100$$

计算各管沉淀的结合率。图 4 即是常规标准曲线一例。

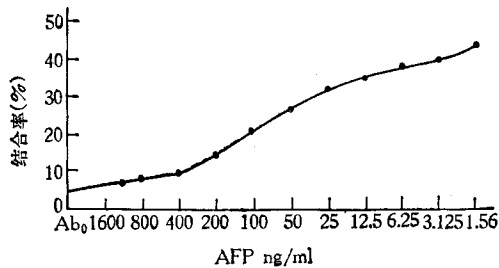


图 3 标准曲线适宜范围的选定

5. 样品测定 以 AFP 血凝法作初筛试验, 血凝阴性者用原浓度血清 (包括 1:10 血凝阳性)。阳性者, 选合适稀释度。取血清或稀释血清 (羊水和尿也同样) 50μl 代替标准。其它步

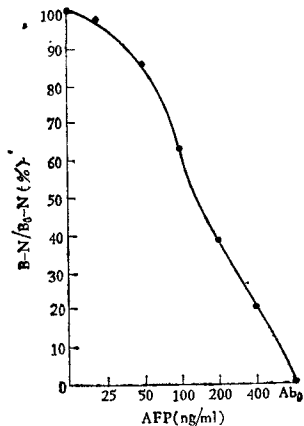


图 4 AFP 标准曲线

37℃, 15 分, 22.5%PEG 100μl

骤与制备标准曲线相同。查曲线上对应的 ng/ml 数即是所求。

6. 重复性测定 每种血清各做 11 次测定的结果, 数据列于表 1。S₁、S₂、S₃、S₄ 代表 4 种血清样品, 结果表明, 重复尚好, 统计学分析, 除 S₁ 外, 其余三个样品的变异系数 (C.V%) 均在 10% 以内。

表 1 AFP 重复性测定

标 本	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
测定次数	11	11	11	11
$\bar{X}$	42.5	102.1	210.5	420
S.D	7.5	4.3	17.2	23.7
C.V(%)	17.6	4.2	8.2	5.6
S.E	2.3	1.3	5.2	7.1

小 结

我们选用 PEG 做为分离剂, 其最终浓度是 7.5%。它是一种快速简易分离效果好的沉淀剂。我们实验了不同的保温时间, 结果证明选用 37℃15 分钟最合适。不仅获得结果迅速, 而且非特异性结合也低 (6.95%)。用双抗体法及硫酸铵沉淀法则非特异结合分别为 9.4% 和 10.6%。

由图 3 AFP 浓度倍比稀释曲线证实了此法灵敏度高, 浓度小到 3.125ng/ml 时, 再倍比稀释, 还能与之区别。

本法所用样品量少 (50μl), 测定中又免去了各管总放射计数, 只测定沉淀计数, 节约一半时间, 一个人半天可做 100 份样品。

由于本法所用抗原抗体复合物含量极小, 需要一定量的共沉蛋白质做载体, 否则沉淀不完全。

用此法临床测定达半年之久, 证明此法稳定可靠。实验中如遇高脂血症患者, 由于血中脂类增多, 影响沉淀作用, 当吸去上清时, 沉淀中记数率低, 有可能出现假阳性, 需在今后研究解决。

参 考 文 献

- [1] 袁振铎等:《北京医学》,1981年,第3卷,第1期,第6页。
[2] Blank-liss, W. E. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **86**, 67, 1978.
[3] Brack, D. J. H. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **82**,

101 (No 1/2). 1978.

- [4] Hönig, W. and Kula. M. R.: *Anal. Biochem.*, **72**, 502, 1976.
[5] Polson, A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **82**, 463, 1964.

[本文于1981年10月28日收到]

凝集素的分离纯化方法

孙 册

(中国科学院上海生物化学研究所)

凝集素是一类与糖专一结合的蛋白质或糖蛋白,广泛存在于自然界,最小的生物体,如病毒乃至人体细胞都含有它。可分为水溶性的和膜上的凝集素两类。它们具有许多重要的生物学特性,如血型专一性,促使淋巴细胞有丝分裂、介导细胞与细胞的粘着和细胞识别外界物质等,都是基于凝集素具有糖专一性这一点。凝集素的这一特性成为探查细胞表面含糖高分子结构、组成和功能,以及研究细胞生长和恶变过程中的变化的有用试剂。凝集素在机体内的功能正逐渐被发现。为了深入研究它的性质,须要将它分离纯化。依靠凝集素专一地和可逆地结合糖的性能,再用固定化的糖衍生物作亲和剂可以纯化凝集素。

通常先用生理盐水或缓冲液抽提磨碎的种子粉。含脂质较多的种子如花生、芝麻、大豆等,先用有机溶剂(甲醇或石油醚)预抽提,除去脂质和其它脂溶性杂质。在亲和层析技术建立以前均采用分部分离蛋白质的方法,纯化凝集素,如硫酸铵分级沉淀、离子交换层析、分子筛凝胶过滤、超离心等。现在则多根据凝集素的糖结合专一性采用相应的亲和层析法。其原理与其它具有专一结合位置的生物聚合物如酶等相似。由于凝集素不修饰与它作用的化合物,反应更为简单。凝集素与糖的相互亲和不强(与单糖的结合常数 K_a 通常为 10^2-10^4)^[1,2],因此大多数凝集素在亲和柱上很容易被专一的糖

取代。用单糖和凝集素的粗制品通过血凝作用的半抗原抑制或凝集素与聚糖的双扩散反应,很容易确定凝集素的糖专一性,然后可根据其糖专一性设计合适的纯化方法。纯化凝集素的亲和柱主要有三种:(1)天然的或修饰的聚糖,(2)结合载体的糖蛋白或糖肽,(3)结合载体的单糖或双糖(表1)^[3,4]。第一类中用得最广的是 Sephadex 和 Sepharose。因 Sephadex 是交联葡聚糖,适于纯化对葡萄糖专一的凝集素,如伴刀豆凝集素,扁豆凝集素。Sepharose 可用于半乳糖结合的凝集素,如蓖麻和相思豆凝集素等。但不是所有与半乳糖结合的凝集素都能吸附于 Sepharose,对 α -半乳糖苷专一的,如槐凝集素等就不能吸附于 Sepharose,因为 Sepharose 是 β -糖苷键连接的聚糖。有的凝集素虽无异头专一性,不仅与 α -半乳糖结合,却不吸附于 Sepharose,可能由于这些凝集素不与直链聚半乳糖的链内半乳糖基作用,如果用酸温和地水解聚半乳糖,使链的若干处切开,暴露出半乳糖基,而不使网络完全降解^[5],如大豆、花生凝集素不吸附于 Sepharose,但可与酸化的 Sepharose 作用。通过环氧氯丙烷或丁二烯砜交联天然的含半乳糖的聚糖,如阿拉伯半乳聚糖^[6]、Guaran^[7]、半乳糖甘露聚糖等,可获得对半乳糖专一的凝集素的高容量的亲和剂。Guaran 含 α -半乳糖基,交联的 guaran 可用于纯化对 α -半乳糖专一的凝集素。甲壳素是天然的水溶性的聚