

1968.

[14] 乔克强等:《聚丙烯酰胺凝胶电泳》,科学出版社,81,1975。

[15] Strauss, E. G. et al.: *Virology*, 42, 437, 1970.

[本文于1983年7月7日收到]

刀豆球蛋白 A 亲和双向免疫电泳对人体 α_1 -抗胰蛋白酶分子变异体的研究

关赛芳 徐世康 陈复华

(上海市肿瘤研究所)

α_1 -抗胰蛋白酶(AAT)是一种低分子量的血清糖蛋白,属于丝氨酸蛋白酶类的蛋白酶抑制剂。由于某些 AAT 遗传的分子变异体与肺退行性疾病、肝硬化、肝癌及其它炎症性疾病有关,因而受到人们的重视^[1]。现已发现 AAT 含有 40 多个等位基因^[2],因而所表达的基因产物往往是抗原性一致而分子构型不同的各种蛋白质分子。Fagerhol^[2] 等曾用酸性淀粉凝胶电泳, Teppsson^[3] 等曾用等电聚焦分离 AAT 不同基因表达的蛋白质变异体。近年来人们根据外源凝集素(Lectin)和糖蛋白相互作用不同,用它区分各种糖蛋白分子变异体。我们利用刀豆球蛋白 A(ConA)具有能与糖蛋白中某些糖基专一性结合的特点,建立了一种简便敏感的 ConA 亲和双向免疫电泳(Aff-DIEP)方法,分离血清 AAT 变异体,并初步观察正常人、肝、肺等疾病 AAT 分子变异体的变化,为临床诊断提供依据。

一、材料与方 法

1. AAT 血清 正常人血清(上海市中心血站供给),肝癌、肺癌、卵巢癌患者血清(上海第一医学院肿瘤医院提供),肝炎血清(闸北区传染病医院提供)。

2. 试剂 刀豆球蛋白 A(pharmacia 产品)。琼脂糖(BDH 产品 $M_r = 100,000$)。抗人 AAT 抗血清(自制)。用 ConA-Sepharose 4B 亲和柱层析分离人血清获得纯 AAT,经蛋白电泳及免疫电泳证实为免疫纯。再以纯化的

AAT 制备羊抗人 AAT 抗血清。

3. ConA 亲和双向免疫电泳 根据 Børg-Hansen^[4] 等方法进行 α_1 -抗胰蛋白酶分子变异体亲和免疫电泳。用电泳缓冲液(73mM Tris-24.5mM 巴比妥缓冲液, pH8.6)配制成 1% Agarose 5.5ml, 内含 1mM $MgCl_2$ 和 1mM $CaCl_2$ 及 ConA 2.8mg, 混合注入 4.5×7 cm 的玻璃片上,使其含 ConA $90 \mu g/cm^2$, 凝胶厚 2mm, 距阴极 1cm 玻片处打 6 个孔,每个孔分别加入 $2 \mu l$ 人血清作第一向电泳。电泳条件为 4V/cm, 2 小时, $25^\circ C$ 。电泳完毕后,将样品凝胶条移至 7×14 cm 大玻板一侧,并将含有 1.5% 的抗人 AAT 抗体的 1% 琼脂糖铺入玻板,冷却后走第二向电泳,条件为 2V/cm, 8 小时。AAT 总量用火箭免疫电泳测定。

二、结果与讨论

1. 刀豆球蛋白 A 亲和双向免疫电泳特性

采用双向免疫电泳时,通常含有某种蛋白质抗体的样品经第一向电泳后,再作第二向电泳,一种蛋白质仅呈现单一免疫沉淀峰。如果在第一向中加入一定量的凝集素,则糖蛋白中糖基与凝集素相互结合,从而部分地或完全地延缓了不同分子形式的糖蛋白泳动速度,于是含有不均匀性糖链的糖蛋白分子被区分开来。我们正是用这种方法分离 AAT 分子变异体的。

实验结果表明 AAT 分子变异体的数目是随第一向凝胶中加入 ConA 的量不同而变化。

图1(封3)是不加 ConA, AAT 蛋白质仅呈现均一的单一峰。而加入 $30\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ConA, 呈现结合型峰 III 和弱结合型峰 II, 当 ConA 增加到 $60\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 开始出现三个峰。加 $90\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时明显地呈现三个峰, 即结合型峰 III, 弱结合型峰 II 和弱结合型峰 I。ConA 浓度增至 $270\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 图谱不变。但当 ConA 达 $450\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 又减为二个峰(弱结合型峰 II 和 I)。这表明人体 AAT 在 ConA 作用下存在三种分子变异体, 即距白蛋白最远的 ConA 结合型峰 III, 中间的弱结合型峰 II, 靠近白蛋白的弱结合型峰 I。ConA 浓度与 AAT 分子变异体结合的程度、结合的位置与其在电场中移动的速度和距离密切相关。二者结合之分子含量越高, 则离白蛋白越远。但当 ConA 浓度达 $450\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上时, 则结合型峰 III 与峰 II 并合。这说明 ConA 用量过低或过高均不适合, 只有 ConA 浓度在 $90-270\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时能获最佳分离结果, 其中又以 $90\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 为最适量。以上结果与 Vaughan^[6] 及 Bauard^[7] 等人报道一致。他们的研究也表明人血清具有三类 AAT 分子变异体。通过对不同浓度 AAT 的检测, 发现该法的灵敏度为 $120\text{mg}/\text{dL}$ (图2见封3)。

1979 年 Chio 和 Oon^[8,9] 分别报道在肝癌高发危险人群中, 发现患者血清的 AAT 含量明显升高。我们用火箭免疫电泳法检测肝癌患者血清, 发现 AAT 可作为肝癌诊断指标之一, 特别是 AFP 阴性肝癌患者血清中 AAT 升高更有明显的临床诊断意义^[10]。

深入研究 AAT 基因表现型时, 我们发现用酸性电泳或等电聚焦电泳方法均可分出 6—

8 条区带, 其中尤其以 piz、pis、pip (分别表示蛋白酶抑制剂(pi)不同等位基因表现型 z. s. p)三个具有临床诊断意义^[3], 但这些方法偏重在鉴别 AAT 蛋白部分变异体, 操作比较复杂。(而 Aff-DIEP 方法是利用 ConA 能与甘露糖及葡萄糖残基特异性结合, 常用它做糖链变化分析)。我们用此法初步检测了正常人、肝癌、肝炎、肝硬化、肺癌、卵巢癌等患者血清 AAT 分子变异体, 图 3a (见封 3) 是正常人血清 AAT, 由二种变异体组成, 结合型 III 和弱结合型 II。图 3b.c.d.e 是肝炎、肝硬化、肝癌、肺癌、卵巢癌等患者血清 AAT, 均呈现三类变异体, 各个图形都不完全一样, 但弱结合型峰 II 均最高, 其次是结合型峰 III, 弱结合型峰 I 最低, 与 Bayard^[7] 报道结果类似。它们之间比例上的差异在生物学及临床上有何意义有待探讨。

参 考 文 献

- [1] Carrell, R. W. et al.: *Essays. Med. Biochem.*, 4, 83, 1979.
- [2] Fagerhol, M. K. et al.: *Ser. Haematol.*, 1, 153, 1968.
- [3] Jeppsson, J. O., et al.: *Clin. Chem.*, 28 (1), 219, 1982.
- [4] B g-Hansen, T. C. et al.: *Scand. J. Immunol. Supple*, 2, 141, 1975.
- [5] 关赛芳等《中华医学检验杂志》待发表。
- [6] Vaughan, L. et al.: *Biochemica et Biophysica Acta*. 701. 339, 1982.
- [7] Bayard, B. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 124, 371, 1982.
- [8] Chio, L. F. et al.: *Cancer*, 43, 596, 1979.
- [9] Oon, C. J. et al.: *Ann. Acad. Med. Singapore*, 9 (2), 240, 1980.
- [10] 关赛芳等:《肿瘤防治研究》, 10(3), 174, 1983.

[本文于1983年8月26日收到]

(上接第 87 页)

此工作得到刘新垣、陈农安、李世武、陆长德等同志的大力帮助, 在此致谢。

参 考 文 献

- [1] Goeddel, D. V. et al.: *Nature*, 290, 20, 1981.

- [2] Taniguchi T. et al.: *Gene*, 10. 11, 1980.

- [3] Gay. P. W. et al.: *Nature*, 295, 503—508, 1985.

[本文于1983年6月29日收到]

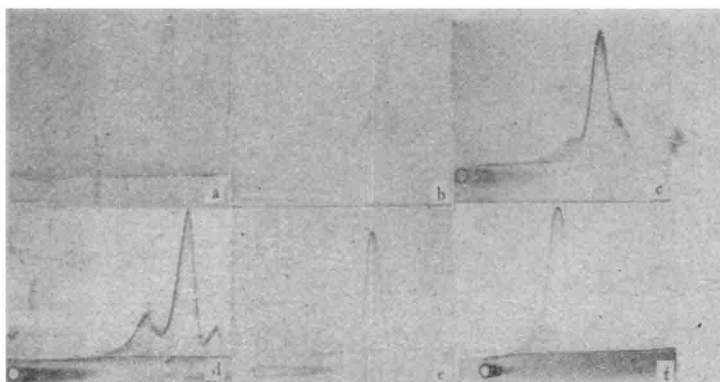


图 1 不同 ConA 浓度的 AAT 变异体 Aff-DIEP 图谱

a: $0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ b: $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ c: $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ d: $90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e: $270 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ f: $450 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

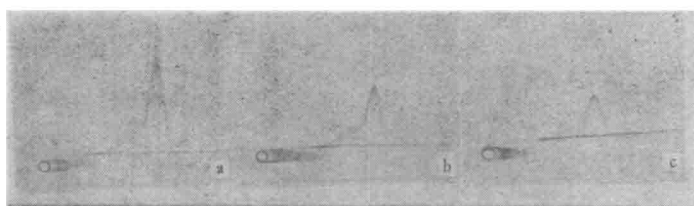


图 2 不同 AAT 浓度的 Aff-DIEP 图谱

a: $480 \text{mg}/\text{dL}$ b: $240 \text{mg}/\text{dL}$ c: $120 \text{mg}/\text{dL}$

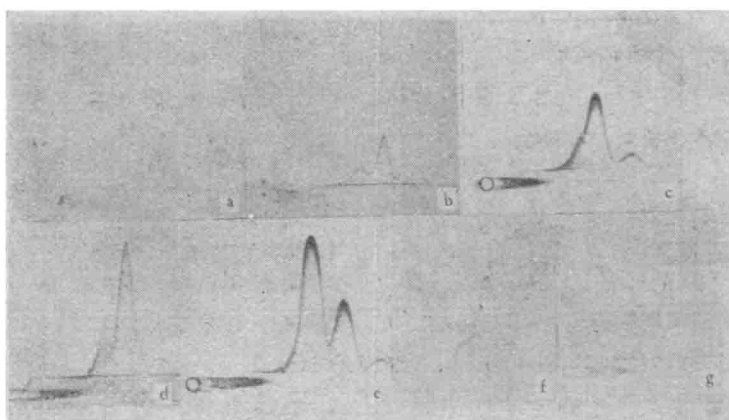


图 3 各种患者血清中 AAT 变异体 Aff-DIEP 图谱

a. 正常人 b. 肝炎 c. 肝硬化 d. 肝癌 e. 肝癌 f. 肺癌 g. 卵巢癌