

proteins interaction of arabinose binding protein with cibacron blue 3G-A. J Mol Biol, 1979, **134**: 847~ 850

10 Edward J C, Jon D R, Mary L P *et al.* Primary amino acid sequence of α -trichosanthin and molecular models for abrin α chain and α -trichosanthin. J Biol Chem, 1990, **265**: 8665 ~ 8669

11 Easterday R L, Easterday I M. Affinity chromatography of kinases and dehydrogenases on sephadex and sepharose dye derivatives. Adv exptl Med Biol, 1974, **42**: 123~ 133

Rapid Purification of Trichosanthin by Blue Sepharose CL-6B. YUAN Huidong, XIA Qichang, ZHANG Zuchuan (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract It is revealed by difference spectra

that cibacron blue F3GA could bind specifically to Trichosanthin (TCS) . The spectral absorption maximum is on 690 nm with molar absorption coefficient of $2.6 \times 10^{-3} \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The dissociation constant is 1.8 $\mu\text{mol/L}$, and 0.5 mol/L NaCl could dissociate the complex. Based on these results, TCS is purified from the root tuber of *Trichosanthes Kirilowii* by Blue Sepharose CL-6B. This method is rapid, simple, efficient and could be applied in mass preparation of TCS.

Key words trichosanthin, cibacron blue F3GA, difference spectra, affinity chromatography

膜渗滤亲和层析法纯化腹水单克隆抗体

徐 兵 朱忠勇 唐玉钗 兰小鹏
(南京军区福州总医院实验科, 福州 350025)

摘要 用膜渗滤亲和层析法纯化腹水单克隆抗体 (McAb). 采用硝酸纤维素膜 (NCM) 作固相支持物吸附抗原, 用负压使小鼠腹水渗滤 NCM, 在滤过的同时腹水中的 McAb 不断结合于 NCM 上吸附的抗原, 再将 McAb 从 NCM 上解离, 从而得到高纯度的 McAb. 用此法纯化抗白蛋白 (Alb) McAb. 结果提纯的 Alb McAb 纯度达 PAGE 电泳单条带, 将此 McAb 点样 NCM 用于斑点免疫渗滤法 (DIFA) 检测 Alb, 其灵敏度比用腹水点样时高 20 倍. 该法快速简便, 可代替亲和层析柱用于纯化 McAb.

关键词 硝酸纤维素膜, 渗滤, 亲和层析, 纯化, 单克隆抗体

利用硝酸纤维素膜 (NCM) 免疫吸附一步法 (简称吸附法) 纯化 Ig^[1], 可直接将配体包被于 NCM, 省去了 BrCN 活化琼脂糖珠和制备亲和层析柱, 简化了亲和层析流程. 但该法仅将硝酸纤维素膜 (NCM) 浸入待提液中并不时摇动来使液体中 Ig 与 NCM 上的配体结合, 二者结合的几率较低, 提取率较低, 不适用于量大浓度低的待提液, 且反应时间长, 提纯的是总 IgG. 我们采用硝酸纤维素膜 (NCM) 作固相支持物吸附人血白蛋白, 用负压使 Alb McAb 腹水渗滤 NCM, 使腹水中 McAb 与 NCM 上包被的 Alb 充分结合, 再解

离下 McAb, 提高了抗原与抗体结合率 (免疫浓缩) 和提取效率, 现介绍如下.

1 材料和方法

1.1 材料

NCM: 孔径 0.65 μm (浙江台州生化材料厂). Alb McAb 杂交瘤及腹水 (本室自制). 人血白蛋白 (Alb) 纯品 (上海生物制品研究所). 抽滤器: 用塑料滤器改制, 将旋接的上盖换成由一圈环壁和一圈环底组成的“压环”,

收稿日期: 1996-11-15, 修回日期: 1996-12-12

压环的底将 NCM 周边压贴于滤器的筛网上; 将滤器的出液口延长并穿过套紧于橡胶塞中, 将橡胶塞塞入抽滤瓶的上口负压口接水抽滤泵. 解离液: 3 mol/L KCNS. 洗涤液: PBS (pH 7.4, 0.01 mol/L, 0.15 mol/L NaCl).

1.2 方法

将 NCM 用 PBS, 乙醇浸泡后, 室温晾干. 用纯化的 Alb 溶液 (蛋白质浓度 1 g/L) 浸透 (包被) NCM, 37℃ 烘干. 将 NCM 置于抽滤器的筛网上, 用压环将 NCM 周边压紧. 将适量 PBS 倒入压环中的 NCM 上, 打开抽滤泵, 用 PBS 滤洗 NCM, 液体滤净后再补加适量 PBS 滤洗. 将腹水用 PBS 适当稀释后, 倒入压环中, 用负压使其渗滤 NCM, 可重复渗滤. 用 PBS 负压滤洗 NCM 5 min. 用解离液慢速负压渗滤 NCM, 收集滤出的解离液. 滤出的解离液用蒸馏水和 PBS 透析, 再适当浓缩, 即为提取液. NCM 用蒸馏水和 PBS 负压充分滤洗后即可再生. 斑点免疫滤渗检测 (DIFA), 鉴定纯化的 McAb, 方法见文献 [2].

2 结 果

2.1 提纯的 McAb 鉴定

用 DIFA 法检测提取液, 呈 Alb McAb 强阳性. 经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 提取

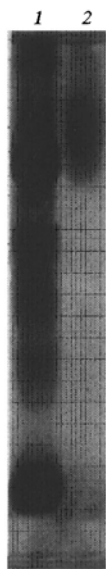


图 1 纯化的 McAb PAGE 图

液只出现一条蛋白带 (图 1).

2.2 提纯的 McAb 定量

用紫外光吸收法测定提取液蛋白质含量, 三张 20 cm² NCM 用本法可提取 McAb 2.25 mg; 同样三张 NCM 用吸附法 (将 NCM 浸入腹水中 2 h) 可提取 0.59 mg; 同样三张 NCM 但未经乙醇处理用本法可提取 McAb 1.13 mg.

2.3 McAb 回收率

各用三张 20 cm² NCM 分别滤过 20 ml 和 3 ml 腹水, McAb 回收率分别为 59% 和 90%.

2.4 提纯的 McAb 的应用

用 McAb 或腹水 (蛋白浓度均为 0.5 g/L) 0.001 ml 点样 (包被) 于 NCM, 晾干; 用 10 g/L BSA 封闭, 晾干; 将此 NCM 装入特制塑料小盒中的吸水垫上; 将 0.1 ml 不同浓度的 Alb 标准液加入小盒的进液孔中, 待渗净; 再加 0.1 ml 胶体金标记的 Alb 兔抗体于进液孔中, 渗净后观察 NCM 点样处, 出现红色圆点者为阳性. 结果表明 McAb 和腹水点样处最低可测 Alb 浓度分别 5 mg/L 和 100 mg/L.

3 讨 论

本法的原理与斑点免疫渗滤检测 (dot immunofiltration assay, DIFA) 相同, 结合于 NCM 微孔中的配体, 可捕捉从微孔渗滤的液体中对应的蛋白质. 液体滤过 NCM 上无数微孔, 可使抗原和抗体密切接触充分反应, 其反应是动态的, 相应物结合率比表面吸附法大为提高 (使 McAb 收获量提高近 4 倍), 而且反应速度快, 时间短, 20 cm² NCM 数分钟即滤过 50 ml 液体, 滤过液中的待提物不断结合积累于 NCM, 此即免疫浓缩. 本法提取的 McAb 纯度可达 PAGE 电泳单条带, 用此 McAb 点样 NCM 并用于 DIFA, 检测 Alb 的灵敏度比用腹水点样 NCM 用于 DIFA 的灵敏度高 20 倍. 本法的 McAb 回收率与腹水量 (ml) 和 NCM 面积 (cm²) 的比值有关, ml/cm² 越小, 回收率越高, 这是由于 NCM 上抗体数量相等时, 滤过的抗原量越少, 结合得越完全,

或者说增加 NCM 用量可提高回收率. NCM 带负电荷, 能以静电荷和疏水作用的方式吸附蛋白质, 我们用乙醇处理 NCM 后, 可提高 McAb 提取率近 40%, 这可能是由于乙醇增加了 NCM 的静电荷所至^[3]. 本法中的解离液需尽快用蒸馏水和 PBS 彻底透析, 以防蛋白质变性.

参 考 文 献

1 曾章新, 戚少然, 朱忠勇等. 硝酸纤维素膜免疫吸附一步法纯化人血清 IgG 的初步报告. 中华医学检验杂志, 1991, 14 (2): 96~ 98

2 徐 兵, 黄俏佳, 朱忠勇等. 批量渗滤斑点免疫结合法筛选杂交瘤培养上清. 单克隆抗体通讯, 1995, 11 (3~4): 94~ 96

3 Gunars E V, Richard B. Immunoconcentration: a new format for solid-phase immunoassay. Clin Chem, 1985, 31: 1427~ 1431

The Membrane Filtration Affinity Chromatography and Its Application in Purifying Monoclonal Antibody (McAb) in Ascites. XU Bing, ZHU Zhongyong, TANG Yuchai, LAN Xiaopeng (*Department of Laboratory, Fuzhou general hospital of PLA. Fuzhou 350025, China*).

Abstract A new way for affinity chromatography has been developed to purify the McAb in ascites. Using nitrocellulose membrane (NCM) as solid-phase to adsorb the antigen, filtrating the sample under negative pressure through the NCM which could bind the relevant antibody to the antigen adsorbed on, then dissociating the antibody from the NCM in the purified form, this is the process of the so called membrane filtration affinity chromatography (MFAC). The albumin (Alb) McAb in ascites has been purified with the MFAC. The purified McAb showed a single band in the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). While used in dot immunofiltration assay (DIFA) to detect Alb standard, the sensibility of the purified McAb was 20 times more than that of the ascites. The simple and effective MFAC can be used as a new affinity chromatography to purify antibodies in ascites.

Kew words nitrocellulose membrane, filtration, affinity chromatography, purify, monoclonal antibody

错配碱基 PCR-RFLP 检测
K-ras 癌基因点突变*

肖尚喜 吴 琳 王道斌¹⁾ 胡杰贵 刘华平 郑 冰 张 军
(安徽医科大学第一附属医院, 合肥 230022)

摘要 错配碱基套式 PCR-RFLP 检测 K-ras 癌基因第 12 位密码子点突变, 并与一步法 PCR-RFLP 作比较. 结果显示套式 PCR-RFLP 可检测出 500 细胞中的一个突变细胞, 比一步法 PCR-RFLP 分析的敏感性提高了 100 倍. 利用该方法检测纤维支气管镜收集的标本中的突变细胞, 结果发现 9 例肺腺癌中有 5 例发生了 K-ras 癌基因第 12 位密码子点突变. 提示该方法可行, 值得推广应用.

关键词 聚合酶链反应, Ras 基因, 突变

* 安徽省卫生厅医学科研基金资助项目 (94-04). ¹⁾ 安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230022.
收稿日期: 1996-11-12, 修回日期: 1997-05-15