

放射对流免疫电泳自显影术 测定血清甲种胎儿蛋白

江苏省启东肝癌防治研究所
中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组
上海市肿瘤研究所诊断组
上海市华东医院同位素室

摘 要

本文介绍放射对流免疫电泳自显影术测定甲种胎儿蛋白(简称 AFP)。此方法具有快速、敏感、简易等特点,是一种比较适合农村的放射免疫测定方法。它的检测范围在 25 毫微克—25 微克/毫升之间, ^{131}I -AFP 的有效使用期限较长。用此方法进行普查得到了较为满意的结果。对偶尔发生的非特异性反应,可用放射免疫双向扩散自显影术鉴别。

近年来,放射免疫测定血清甲种胎儿蛋白已在临床上广泛应用^[1]。饱和分析^[2]和放射对流免疫电泳定量法^[3],虽可精确定量 10 毫微克/毫升左右,但操作过程较长,需要计数仪。为了更好地落实毛主席“把医疗卫生工作的重点放到农村去”的伟大号召,简化放射免疫测定是必要的。标记抗原参入火箭电泳自显影法(简称放射火箭自显影)的建立和应用,为普及放射免疫测定 AFP 开创了新的途径^[4],但建立多种敏感度高、特异性强、并适合于普查用的放射免疫测定法,仍是临床和研究的需要。本文介绍的放射对流免疫电泳自显影术(简称放射对流自显影),可能成为简单、易行,便于普及的放射免疫测定方法之一。

材 料

人 AFP 用亲和层析法提纯^[5]。

马抗人 AFP 抗血清由上海生物制品研究所生产。

^{131}I -AFP 用氯胺 T 法标记制备^[6],比放射性 200 微居/微克 AFP。

医用 4F X 光胶片由上海感光胶片厂生产。

巴比妥钠-盐酸缓冲液, pH8.6, 离子强度 0.05。

方 法 及 步 骤

1. 放射对流自显影

在 8 × 11 厘米的玻璃板上加 20 毫升 1% 的琼脂,按对流免疫电泳法打孔,孔径 3 毫米,孔间距 4 毫米。在抗原孔中加入 10 微升待测样品或标准 AFP,抗体孔中加入用缓冲液稀释成 1:100 浓度的抗血清。当被测样品充盈之际,迅速在抗原孔内加入 2,000—3,000 脉冲数/分(简称 cpm)的 ^{131}I -AFP。每板电流 25—30 毫安,游动 1.5 小时左右。烘干后,用 3 × 4 英寸 X 光胶片曝光 12 小时左右,再显影。

2. 放射免疫双向扩散自显影(简称放射扩散自显影)

上述琼脂板按双向扩散法打孔,孔径 4 毫米,孔距 4 毫米。抗原孔内加入样品和 5,000—10,000 cpm ^{131}I -AFP,抗体孔中加 1:2,000—1:4,000 稀释的抗血清。扩散 24 小时,用生理盐水漂洗过夜、干燥、自显影。

结 果

1. 抗血清稀释度的选择

用缓冲液稀释抗血清成不同浓度,对 10 毫微克—1,000 毫微克/毫升的各标准 AFP 进行放射对流自显影,结果表明该批抗血清以选用 1/50—1/100 的稀释度较为适宜。

2. 放射对流自显影的灵敏度和检测范围

电泳完毕后,用肉眼可观察到 1—25 微克/毫升范围的沉淀条纹。自显影后,则可读出 25 毫微克—25 微克/毫升的阳性结果(见图 1)。大于 25 微克/毫升则出现冲刷现象。

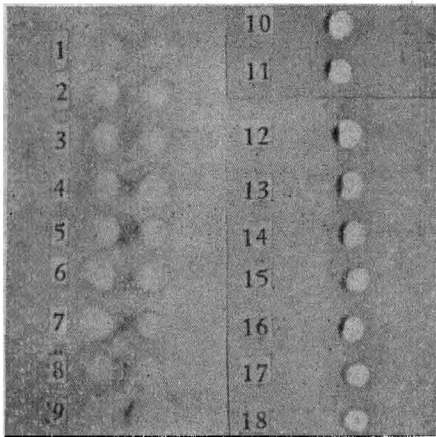


图 1 放射对流自显影检测范围

抗体为 1:100 稀释度;

孔 1—18 分别加入 10、20、25、30、40、50、100、300、500、1000、6000、9000、15000、20000、25000、50000、100000 毫微克/毫升的标准 AFP

因此,放射对流自显影在检测范围内,可半定量地估计出标本的含量。

3. 标准 AFP 浓度的鉴定

上述 AFP 标准样品用正常兔血清稀释,然后分别定量地加到正常献血员的血清中,使甲、乙、丙三个献血员每毫升血清中 AFP 的含量分别都增加 5、10、15 毫微克/毫升,再用放射对流自显影测定。结果当 AFP 浓度增加 5 毫微克/毫升后三个正常人标本仍小于 25 毫微克/毫升,呈阴性;增加 10 毫微克/毫升后,丙达到了 25 毫微克/毫升的水平,增加 15 毫微克/毫升后,则使乙、丙转为阳性,甲仍为阴性(见图 2)。

上述结果和我国正常人群 AFP 水平是一

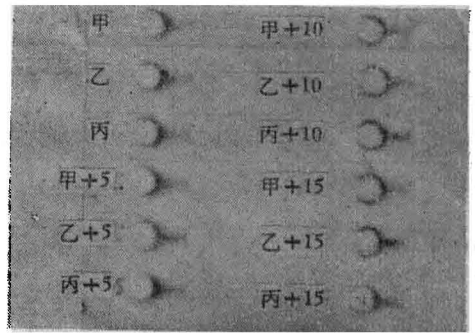


图 2 标准 AFP 的浓度鉴定

图中甲、甲+5、甲+10、甲+15 分别为甲的原血清,甲原血清增加 5 毫微克/毫升,甲原血清增加 10 毫微克/毫升,甲原血清增加 15 毫微克/毫升。乙、丙以此类推

致的^[7]。这就表明我们所采用的标准 AFP 其浓度误差在允许的范围之内。

4. 放射对流自显影的特异性

由于所用 ¹²⁵I-AFP 纯度约 90% 左右,且马抗人 AFP 抗血清也含有少量抗其它组份的抗体,因此偶尔会出现非特异性的沉淀条纹。这种条纹往往偏抗原孔呈棒状,经放射扩散自显影测定,证实这种电泳迁移在 β 区的抗原与 AFP 条纹交叉(见图 3)。

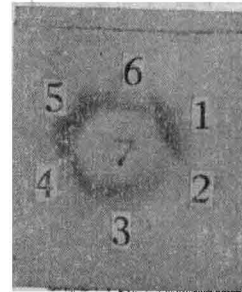


图 3 非特异性的鉴定

孔 1 为非特异性标本; 孔 2 为 AFP25—50 毫微克/毫升的阳性标本; 孔 3 为标准 AFP200 毫微克/毫升; 孔 4、5 分别为 AFP200、500 毫微克/毫升的标本; 孔 6 为 1/2500 稀释度抗血清

大量标本检测的结果表明,非特异性现象基本上可用目测鉴别,个别有疑问的沉淀条纹经放射扩散自显影也可加以鉴别。

5. 样品测定

我们用放射对流自显影对 150 例献血员、49 例肝炎患者、17 例肝癌患者、14 例其它肿瘤标本进行测定,结果和反向间接血凝法^[8]、放射火箭自显影基本一致(见表 1)。

表1 放射对流自显影对临床标本测定结果

对 象	例数	放射对流自显影		放射火箭自显影		反向间接血凝	
		阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%
正常献血员	150	0	0	0	0	0	0
肝炎患者 (sGPT>40)	49	7	14.3	7	14.3	7	14.3
*肝癌患者	**17	16	94.1	16	94.1	15	88.2
其它肿瘤患者	14	0	0	0	0	0	0

* 肝癌患者经临床、AFP、超声波或同位素扫描或病理证实

** 17 例肝癌患者中有 2 例是手术后的病人

表3 108例普查阳性病例复查结果

方 法 例 数 含 量	阳性总数	放射对流	放射火箭	反向间接	放射扩散自显影		
					检测数 ⁺	阳性数	%
<25 毫微克/毫升 或血凝(-)	—	75	73	81	60	0	0
25—50 毫微克/毫升 或 1/10 ⁺⁺ —1/40 ⁺⁺	23	19	21	13	20	10	50
50—300毫微克/毫升 或 1/40 ⁺⁺ —1/100 ⁺⁺	7	7	7	7	7	7	100
>20 毫微克/毫升 或>1/100 ⁺⁺	7	7	7	7	7	7	100

* 阳性总数指一种方法或多种方法阳性的总例数

+ 检测数指在阳性总数中进行放射扩散自显影的例数

1975 年 9 月我们用放射对流自显影、放射火箭自显影和反向间接血凝法同时对某公社 16 岁以上 13,224 人进行了普查,结果查出一种方法或多种方法阳性的病例共 115 人。结果见表 2。

表 2

方 法 阳 性 数 含 量	阳性总数	放射对流	放射火箭	反向间接	放射扩散自显影		
					检测数 ⁺	阳性数	%
25—50 毫微克/毫升 或 1/10 ⁺⁺ —1/40 ⁺⁺	60	32	36	17	13	7	54
50—300毫微克/毫升 或 1/40 ⁺⁺ —1/100 ⁺⁺	34	34	34	30	23	23	100
>380 毫微克/毫升 或>1/100 ⁺⁺	4	4	4	4	4	4	100
总 计	115	69	73	51	40	34	85
阳 性 率	—	60%	63.5%	44.4%	—	—	—

* 阳性总数指一种方法阳性或多种方法阳性的总例数

+ 检测数指在阳性总数中进行放射扩散自显影的例数

以上结果说明,在普查中放射对流自显影的敏感度大于血凝法,和放射火箭自显影相仿。当标本含量为 25—50 毫微克/毫升时,这三种方法可以互为补充;经放射扩散自显影对其中部分标本的测定,表明该组中除了部分含量小于 50 毫微克/毫升以外还存在着少量的假阳性病例(见表 2、表 3、图 3)。

1976 年 3 月我们对上述 115 例中的 108 例

又进行了一次血清 AFP 复查。结果见表 3。

由此可见,当标本含量大于 50 毫微克/毫升时,放射对流自显影的测定结果和其它测定方法一致。表 3 中大于 50 毫微克/毫升的 14 个病例,现已确诊为肝癌的有 9 例,2 例属高度怀疑肝癌,另 3 例目前诊断是肝炎。

讨 论

1. 本法的灵敏度达到 25 毫微克/毫升,操作也较简易。一般 2 天左右就可得出半定量的结果。因此能在临床或普查中广泛应用。

2. 当 ¹³¹I-AFP 的比放射性较低时(三个半衰期后),仍能进行放射对流自显影,这就比其它方法更适合在农村,甚至边远地区中推广应用。

3. 操作注意事项: 本法结合了放射免疫的敏感性、免疫沉淀的特异性和对流电泳的简易性。但在操作上比普通对流电泳为严。加样时要防止污染血样,电泳缓冲液宜经常更新。电泳条件也不宜变化过大。电流过高或时间过长时,近负极的一排孔会出现冲刷现象,电泳时间太短,则易出现假阳性。在加入 ¹³¹I-AFP 时,特别要注意使之与血清混合,若等血样干枯后再加,就会出现同位素滞留于二孔间的假阳性现象。琼脂板干燥时,温度不能过高,否则琼脂融化后,会严重影响实验结果。

4. 选用的抗原和抗血清最好是高纯度的

AFP 和单相特异性抗血清,这样可以增加结果的特异性。对首次阳性的标本,更应慎重,要仔细观察条纹的位置和形态。一般由 AFP 所形成的条纹位于二孔中间或偏抗体孔端,常呈直线形、弧形和尖角向负极的三角形。当浓度在 25—50 毫微克/毫升时,往往仅在孔间形成点状沉淀。这也许是条纹两端的抗原浓度较低,被抗体冲刷的缘故。对大于 50 毫微克/毫升的标本最好能用放射扩散自显影复检。

5. 在普查中为了扩大本法的量程范围,使大于 25 微克/毫升的血样不致漏检,在检测标本时每块琼脂板上测 30 个血样,和 1:30 混合血清,使量程上限达 750 微克/毫升。同时,使用阳性和阴性对照也可增加结果的可靠性。

附：标准 AFP 抗原活性的鉴定

取亲和层析法制备的 AFP 2 毫升,用 Folin 试剂定蛋白量为 1.2 毫克/毫升,300 微克的上述纯化 AFP,经 7% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,染色后得到一条区带(见图 4)。

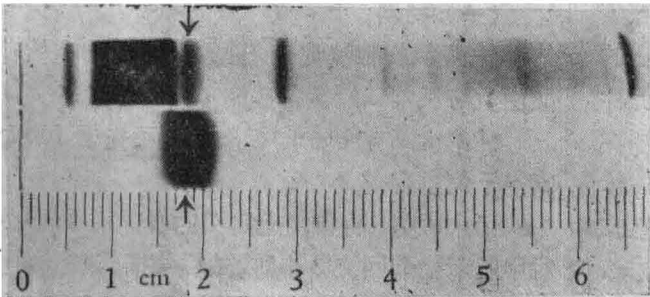


图 4 纯化 AFP 的聚丙烯酰胺电泳
上：胎儿血清； 下：纯化 AFP
图中箭头指处为 AFP 区带

参照中国医学科学院肿瘤研究所鉴定纯化 AFP 免疫活力的方法,取纯化 AFP10 微克用氯胺 T 法标记。电泳琼脂板按图 5 浇成。

A 部分为 1% 琼脂,内含马抗人 AFP 抗血清 1/600, B 部分为 1% 琼脂,内含马抗人 AFP 抗血清 1/3,500, C 部分为 1% 琼脂。按图 5 在孔₁、孔₂中先加入 20 微升浓度为 12 微克/毫升的纯化 AFP, 再在每一孔中加入 17,000cpm 的 ¹³¹I-AFP。电泳 25 毫安,5 小时,结束后按图 5 虚线切下孔₁和孔₄。余下的孔₂和孔₃部分干

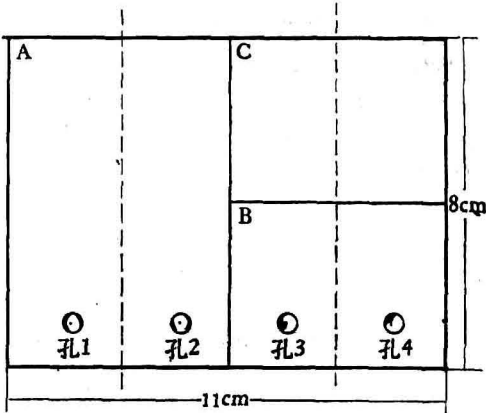


图 5 鉴定纯化 AFP 免疫活性的电泳琼脂板
然后按自显影图切下孔₁的火箭峰(图 6 A 部分中虚线所示)和 A 的其余部分各自计数。同时再把孔₄上半部分的 C 和下半部分的 B 切开(图 6 虚线所示)分别计数。计数结果见表 4。

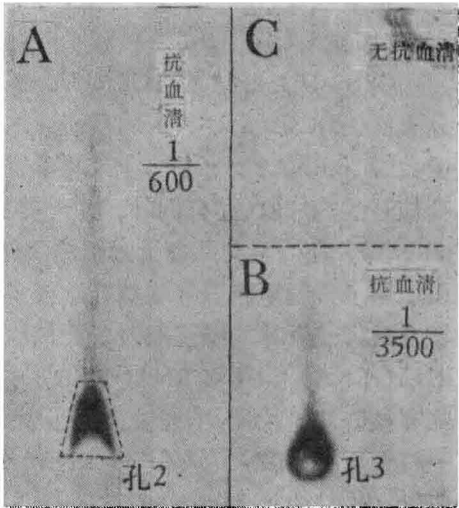


图 6 鉴定纯化 AFP 抗原活性的自显影图

表 4 ¹³¹ I-AFP 抗原活性的计数比值		
切割部分	计数	比值
孔 ₁ 火箭峰	13100	90.3%
孔 ₁ 其余部分	1400	9.7%
孔 ₄ 下半 B 部分	9094	88.6%
孔 ₄ 上半 C 部分	1173	11.4%

以上结果表明,亲和层析法制备的纯化 AFP,经过 ¹³¹I 标记后,它的抗原活性还有 90% 左右。用正常兔血清把纯化 AFP 稀释到 120

微克/毫升,分装入无菌安瓿瓶中, -20℃ 下保存备用。

参 考 资 料

- [1] 上海市科学技术交流站:《上海科研单位成果展览会技术资料》, 1974 年。
- [2] 上海实验生物研究所, 上海第二医学院附属瑞金医院:《中华医学杂志》, 1975 年, 第 8 期, 第 463 页。
- [3] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组, 上海市第六人民医院检验组, 上海第一医学院中山医院同位素室:《生物化学与生物物理学报》, 1975 年, 第 1 期, 第 53 页。

- [4] 中国医科院肿瘤研究所免疫室:《肿瘤防治研究》, 1975 年, 第 1 期, 第 12 页。
- [5] 张先扬等:《生物化学与生物物理进展》, 1974 年, 第 2 期, 第 26 页。
- [6] Greeneuood, F. C., Hunter, W. M.: *Biochemical J.*, **89**, 114, 1963.
- [7] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组:《生物化学与生物物理进展》, 1975 年, 第 3 期, 第 7 页。
- [8] 上海市肿瘤研究所, 上海市生物制品研究所:《1975 年上海市肿瘤防治研究资料选编》, 1976 年, 第 22 页。

[本文于 1976 年 8 月 27 日收到]

Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素的合成及其应用

上海实验生物研究所三室
上海试剂二厂核酸研究组

Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素具有分离信使 RNA(mRNA) 的功能。这是由于大多数的 mRNA 分子的 3'-末端含有多聚腺嘌呤核苷酸的片段(亦有例外, 如一类组蛋白的 mRNA), 在低温与高离子强度的条件下, 此片段能与多聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸或多聚尿嘧啶核苷酸形成互补的碱基配对, 而核糖核蛋白体 RNA(rRNA) 与转移 RNA(tRNA) 缺少多聚腺嘌呤核苷酸的片段, 不能被该树脂吸附, 利用这一特性可将 mRNA 与其它 RNA 分离开来。所以 Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素已成为分离 mRNA 的有效工具。近年来随着国内分子生物学研究的进展, 如遗传工程、基因表达的调节控制、体外蛋白质合成等一系列工作都需要分离纯化 mRNA, 对 Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素的需求更为迫切。为了填补我国这一空白, 我们与上海试剂二厂的工人同志一起试制了这两种树脂。产品经初步鉴定证明: 所合成的两种树脂都具有分离 mRNA 的功能, 分离所得的 mRNA 经麦胚无细胞体外合成蛋白质系统测定, 确实具有信使作用。

一、材料与方法

(一) 材料

5'-脱氧胸腺嘧啶核苷酸与 3'-尿嘧啶核苷酸由上海试剂二厂制备。

纤维素(Whatman 标准级), 预先于 100℃ 真空干燥过夜。

无水吡啶, 将市场上购买的吡啶用 3—5% 对甲基苯磺酸回流 2 小时, 然后蒸馏; 蒸馏液再加固体氢氧化钾(为吡啶量的 5—10%) 回流 2 小时, 再经蒸馏后用分子筛与氯化钙干燥备用。

(二) 合成方法

5'-脱氧胸腺嘧啶核苷酸吡啶盐或 3'-尿嘧啶核苷酸吡啶盐(2 毫克分子), 溶于吡啶中, 在真空泵下 30℃ 减压浓缩, 用无水吡啶脱水四

* 本文缩写:

Oligo(dT)	寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸
Oligo(U)	寡聚尿嘧啶核苷酸
Poly(A)	多聚腺嘌呤核苷酸
TMV-RNA	烟草花叶病毒的 RNA
PK	丙酮酸激酶
PEP	磷酸烯醇丙酮酸
S ₂₀	麦胚匀浆经 26,000g 离心的上清液
RNase	核糖核酸酶