

经验交流

人肝脏特异的 F 抗原分离纯化及其抗血清制备

汪俊军 赵仲农* 庄一义 邱廷刚* 陆 炜*

(南京军区南京总医院生化科, 南京 210002)

摘要 取新鲜的人肝脏, 充分洗涤, 制备匀浆, 上清液经 Sephadex-G200、DE52 层析, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 得到电泳纯 F 抗原, 并免疫制备抗血清。

关键词 F 抗原, 人肝脏, 分离纯化, 抗血清

Fravi 等^[1]于 1968 年从小鼠的肝组织提取物中首次分离得到 F 抗原(亦称 F 蛋白), Sugamura 等^[2]纯化了人肝脏中的 F 抗原, 分子量为 7500, 是一种主要存在于哺乳动物肝细胞浆中的蛋白质成分, 除肾脏外其他器官含量均极微^[3], 人 F 抗原分子上存在一种人特异性的抗原决定簇, 还有种属非特异性的抗体结合位点^[4], 正常人血清 F 抗原水平极低, 肝细胞损伤时血清 F 抗原水平升高, 是一种灵敏而特异的肝功能试验指标^[4,5], 本文从人肝脏中纯化了 F 抗原, 并制备了抗血清。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝脏取自车祸致死的正常人。Sephadex-G200, DE52, 为 Pharmacia 公司产品, 进口分装, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人肝匀浆上清液制备 取新鲜的人肝脏, 切成小碎块, 在冷生理盐水下反复洗涤, 直至上清液中无红细胞, 除去结缔组织后, 用匀浆器制备匀浆, 然后 2000g 离心 20min, 除去细胞核和线粒体, 最后在 Beckman L8-80M 型超速离心机上 100 000g 60min, 取上清液。

1.2.2 肝匀浆上清液用 55% 饱和硫酸铵溶液沉淀, 取沉淀复溶, 透析。

1.2.3 Sephadex-G200 凝胶 (1.8cm×40cm)

过滤, 洗脱液为 pH8.0, 0.2mol/L NaCl, 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液, 流速 20ml/h。

1.2.4 DE52 离子交换层析 (1.2cm×20cm)。 经 Sephadex-G200 得到的样品, 经 pH8.0, 0.005mol/L 磷酸盐缓冲液透析, 用 pH8.0 0.005mol/L 磷酸盐, 0—1.0mol/L NaCl 梯度洗脱。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 含 SDS 与不含 SDS 两种。浓缩胶缓冲液: pH6.8 0.1mol/L Tris-HCl; 分离胶缓冲液: pH8.6 0.4mol/L Tris-HCl; 电极缓冲液: pH8.6 0.02mol/L Tris-0.19mol/L 甘氨酸; 浓缩胶浓度: 3.5%; 分离胶浓度: 10%; 电泳: 1mA/gel 30min 后, 2.5mA/gel 300min, 电泳完毕后, 氨基黑 10-B 染色。SDS 电泳中, 样本经 β -巯基乙醇处理。

1.2.6 蛋白质测定 采用 Lowry 氏法, 人血清白蛋白为标准。

1.2.7 F 抗原 ELISA 检测法 由 School of Clinical Medicine, University of Cambridge, D. B. G. Oliveira 馈赠的鼠抗人 F 抗原单克隆抗体建立的双抗体夹心酶联免疫吸附检测法 (ELISA), 监测每一步提制过程中 F 抗原。

* 进修人员。

收稿日期: 1994-02-15, 修回日期: 1994-05-21

1.2.8 抗血清制备 纯化的 F 抗原免疫豚鼠, 每次 0.3mg, 首次用福氏完全佐剂, 共 3 次, 得到免疫抗血清。

2 结果与讨论

2.1 肝匀浆上清液经 55% 饱和硫酸铵处理后上 Sephadex-G200 层析柱, 洗脱峰见图 1。共出现四个峰, 经 ELISA 检测第二峰含有 F 抗原, 收集第二峰 (28—35ml) 浓缩。

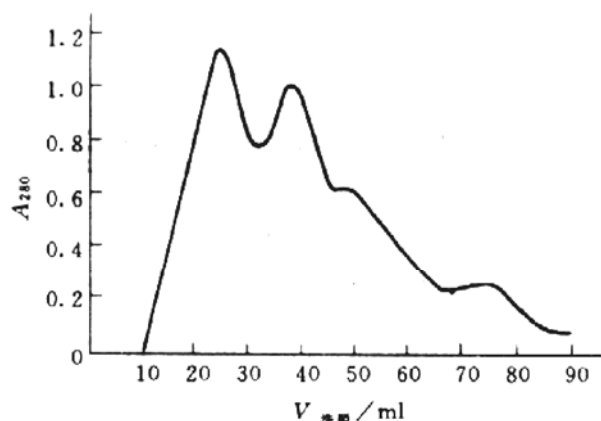


图 1 55% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀的人肝上清液 Sephadex-G200 洗脱曲线

2.2 DE52 离子交换层析洗脱峰见图 2。经检测第二峰含 F 抗原, NaCl 的浓度为 0.25mol/L。

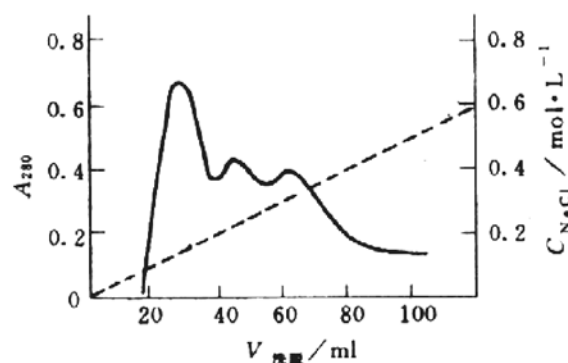


图 2 Sephadex G200 第二峰经 DE52 洗脱曲线

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 DE52 层析第二峰, 慢带为 F 抗原, 切碎溶解, 冰箱过夜, 离心取上清液, 透析浓缩。

2.4 SDS-PAGE 电泳结果见图 3。所示分离 F 抗原为纯品, 同国外馈赠的人 F 抗原电泳位置

相同。

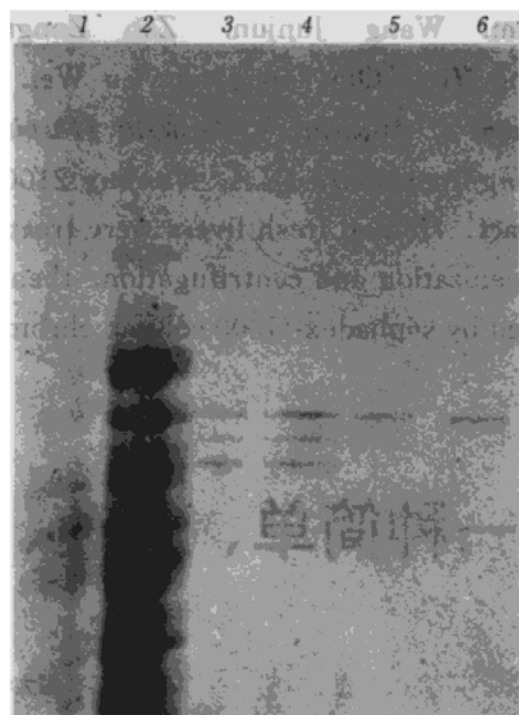


图 3 SDS-PAGE 电泳图谱

1: Sephadex G200 第二峰; 2: 人肝匀浆上清液; 3, 4: DE52 第二峰; 5: 提纯的 F 抗原; 6: 国外 F 抗原。

2.5 抗血清制备 免疫豚鼠, 达到效价后, 心脏采血, 分离血清, 得到抗血清, 由正常人血清、A 和 B 型红细胞匀浆液建立的 Sepharose-4B 建立的亲和层析柱吸收纯化, 得到特异性抗血清, 同国外提供的 F 抗原有沉淀线, 同正常人血清无沉淀线出现。

本研究为 F 抗原的检测和临床应用研究建立了基础。

参 考 文 献

- 1 Fravi G, Lndenman J. *Nature*, 1968; **218**: 141
- 2 Sugamura K, Smith J B. *Clin Exp Immunol*, 1976; **26**: 28
- 3 Grewal G K, Oliveira D B. *Clin Chim Acta*, 1990; **191**: 93
- 4 Foster G R, Goldin R D, Oliveira D B. *Clin Chim Acta*, 1989; **184**: 85
- 5 Beckett G J, Foster G R, Hussey A J *et al*. *Clin Chim Acta*, 1989; **35**: 2186

Isolation and Purification of Human Liver-Specific F Antigen and Preparation of Its Antiserum. Wang Junjun, Zao Zongnong, Zhuang Yiyi, Qiu Tinggang, Lu Wei. (*Department of Laboratory, General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing 210002*).

Abstract Human fresh livers were treated by homogenization and centrifugation, then were purified by sephadex-G200 column chromatog-

raphy. DEAE cellulose column chromatography, and polyacrylamide gel electrophoresis, pure human liver F antigen was obtained. Specific antisera were prepared by immunizing guinea pigs with the purified human F antigen.

Key words F antigen, human liver disease, isolation and purification, antiserum

一种简单、快速、经济的 mRNA 分离方法

王易伦 戴建新 郭瀛军 陆德如

(第二军医大学分子遗传教研室, 上海 200433)

摘要 对 oligo (dT) 纤维素纯化 poly (A) RNA 的方法进行了改良, 缩小了层析柱床的体积, 使填料用量仅为常规量的 1/50—1/100, 即在移液器尖嘴中进行层析, 与常规方法相比, 它具有实验时间短、洗脱的 mRNA 可直接合成 cDNA 和得率较高等优点.

关键词 mRNA, oligo (dT), 纤维素, 纯化

鉴于大多数真核生物的 mRNA 具有 3' 端 poly (A) 的特征, 目前, 分离 mRNA 广泛采用 oligo (dT) 纤维素层析法. 尽管这一方法成熟可行, 但仍存在以下问题: 层析流速较慢; 柱床易发生堵塞; 操作费时; 洗脱体积较大, 常需先沉淀浓缩后才能进行后续实验 (如 cDNA 合成); 在制备少量 mRNA 时, 回收率较低等. 据此, 我们对 mRNA 分离方法作了改良, 利用 oligo (dT) 纤维素吸附 mRNA 容量大的特点, 尽可能缩小层析柱床体积, 用移液器尖嘴 (tip) 作为层析柱, 对层析洗脱条件作了适当修改, 建立了微量 mRNA 半定量法与之配套. 我们把这一方法称为 Tip column 法. 现介绍如下.

1 材料与方法

1.1 RNA 提取

按改良酸性胍一步法^[1].

1.2 mRNA 分离

参照文献 [2] 作以下修改.

1.2.1 装柱 用高盐 STE (0.5mol/L NaCl; 20mol/L Tris-HCl, pH 7.5; 1mmol/L EDTA) 悬浮 oligo (dT) 纤维素 (Pharmacia 或 Sigma 产品), 去除沉降慢的细颗粒, 按柱床体积为 20 μ l (约 5—10mg) 的 oligo (dT) 纤维素最大载样量为 1mg 总 RNA 装柱. 层析柱为填有玻璃棉 (预先 200 $^{\circ}$ C 烤 4h 和硅化) 的微量加样器的黄色尖嘴 (Gilson 公司产品). 装好的 Tip 层析柱在 8lbf/in² 的压力下高压蒸气灭菌 20min 备用.

1.2.2 层析分离 总 RNA 溶于水中 ($\leq$ 1g/L), 65 $^{\circ}$ C 变性 5min, 冰浴骤冷, 加等体积 2 $\times$ 高盐 STE, 按流速为 0.2ml/min 上样层析 (可用洗耳球挤吹加压), 用 5 倍柱床体积的