

铁蛋白标记抗体技术及其对细胞表面抗原定位的应用

施渭康 卢延龄 许河生 葛锡锐

(上海实验生物研究所肿瘤研究室)

1956年 Coons, A. H. 建立的免疫荧光技术, 对医学、生物学中抗原定位的研究是一个极有价值的工具。在类似原理的基础上, 1959年 Singer^[1] 首先建立了马脾铁蛋白标记抗体的方法, 使人们在电镜下对细胞抗原可进行精确的定位。近十几年来, 利用铁蛋白标记抗体的方法, 在许多生物学及医学问题上有广泛的研究, Baxandall^[2] 及 Morgan^[3] 已有详尽的综述性报道。为了研究人体肿瘤细胞的表面抗原, 我们曾以小鼠肉瘤 180 (简称 S180) 细胞为材料, 对其表面抗原先作了初步的定位观察。现将铁蛋白的制备、标记抗体的方法以及 S180 细胞表面抗原定位的实验结果介绍如下。

一、铁蛋白的提取和纯化

1. 铁蛋白的性质和结构

铁蛋白是一种含铁的蛋白质, 存在于多种哺乳动物的脏器, 其中以脾、肝含量较多, 骨髓次之。因马脾含量最高, 故一般多自马脾提取; 同时, 对马脾铁蛋白的性质、结构、化学组成等也积累了较丰富的资料。马脾铁蛋白含铁约 20—23%。铁蛋白分子具有一蛋白质外壳——去铁铁蛋白 (Apoferritin), 一个内核; 后者由氢氧化铁磷酸盐 $((\text{FeOOH})_3 \cdot \text{FeO} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2)$ 组成, 约有 5,000 铁原子。铁蛋白分子及其内核的直径随材料制备方法的不同而略有差异, 分子直径 110—120 埃, 内核直径 50—75 埃。铁蛋白分子量 65—90 万, 其中蛋白质外壳的分子量占 43—48 万。铁蛋白分子因含铁丰富, 铁原子集中分布在四个区域, 在电镜下呈现方形或菱形排列的四个电子致密区, 易于辨认, 由于这一性质才被用为抗原定位的标记物。

2. 马脾铁蛋白的制备和纯化

我们基本上按 Granick, S. (1946) 的方法提取马脾铁蛋白粗制品, 并参照 Rifkind, R. A. 等 (1964) 和 Breese, S. S. 等 (1971) 的方法纯化。具体操作步骤如下:

(1) 新鲜脾脏去结缔组织, 剪碎后制成匀浆, 加蒸

馏水 (1,500 毫升/公斤组织), 置 3—4℃ 抽提约 20 小时。

(2) 将匀浆迅速加热至 78—80℃, 随即用每平方厘米有 16 目和 100 目的不锈钢网过滤, 或纱布绞挤过滤, 弃去渣滓; 滤液离心, 7,000 转/分, 15 分钟; 取深棕红色上清液, 加固体硫酸铵 $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 35 克/100 毫升, 置 4℃ 过夜; 离心, 3,000 转/分, 30 分钟, 取沉淀。

(3) 沉淀溶于少量蒸馏水, 4℃ 对水透析, 直至 SO_4^{2-} 完全去掉。

(4) 每 100 毫升透析液加 4 或 5 克硫酸铜 $(3 \text{ CdSO}_4 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O})$, 置 4℃ 过夜; 低倍显微镜检查, 可见小结晶颗粒形成, 40 小时后有肉眼可见的棕色结晶颗粒; 离心, 3,000 转/分, 15 分钟; 棕色结晶颗粒沉于底部, 刮去上层糊状物。

以下是纯化步骤:

(5) 铁蛋白晶粒溶于少量 2% 硫酸铵, pH 5.85—5.9, 使溶液的蛋白浓度约为 1%, 糊状物不溶或微溶于该溶液; 离心, 3,000 转/分, 15 分钟, 取棕红色上清液; 每 100 毫升铁蛋白溶液加 5 克硫酸铜, 使其重结晶, 置 4℃ 2—3 天; 离心, 3,000 转/分, 15 分钟, 取晶体沉淀。如此重复结晶 5—6 次, 可得到相当纯的铁蛋白晶粒。

(6) 铜离子在电镜下会产生电子染色, 将影响实验结果, 因此需去除铜离子。 Cd^{2+} 与 NH_4^+ 能形成可溶性复合物, 用硫酸铵反复沉淀铁蛋白即可去除 Cd^{2+} 。将第 (5) 步每 100 毫升铁蛋白溶液得到的重结晶, 溶于 75 毫升 2% 硫酸铵, pH 5.85—5.9, 再加等体积饱和硫酸铵, 4℃ 过夜; 离心, 3,000 转/分, 10 分钟, 取沉淀。这样重复三次以去除铜盐, 最后将硫酸铵沉淀物在 4℃ 保存。

(7) 使用前, 将硫酸铵沉淀的铁蛋白溶于少量蒸馏水, 4℃ 对蒸馏水透析; 待硫酸铵去除净尽, 再对 0.1 M 磷酸盐缓冲的生理盐水 (PBS), pH 7.2, 透析 6—8 小时。

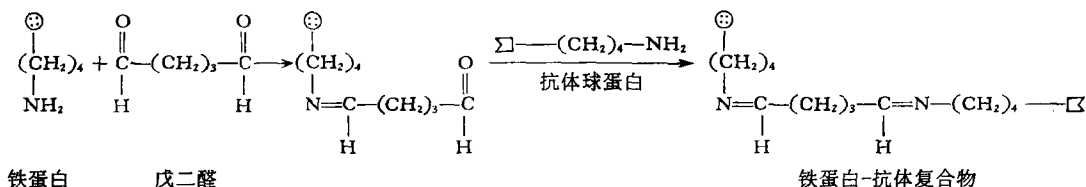
3. 马脾铁蛋白制品的鉴定

(1) 光学显微镜检查: 取最后一次结晶的少量晶体, 置载玻片上加盖片观察。铁蛋白晶粒呈金黄色或棕黄色的四面体或八面体 (图版 IV)。

(2) 电镜观察: 将浓度为 500 微克/毫升的铁蛋白水溶液, 直接涂在不喷碳的铜网上作观察, 铁蛋白分子内核直径为 68 埃 (图版 V)。

(3) 琼脂免疫电泳: 铁蛋白与兔抗铁蛋白抗血清在琼脂免疫电泳中, 仅出现一条沉淀弧 (图版 VII)。

(4) 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 纯化的马脾铁蛋白, 在 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示三条带, 与 Zamiri, I. 等 (1968) 的结果一致。Williams^[4] 电镜观察表明, 铁蛋白除单分子存在外, 尚有不同的聚合体。因此, 高度结晶的铁蛋白仍不是均质的。



本实验亦采用戊二醛作偶联剂, 按 Siess^[5] “一步法”进行标记。标记的抗体是间接法中的第二抗体, 即羊抗兔 γ 球蛋白抗体。

2. 免疫和标记方法

(1) 羊抗兔 γ 球蛋白抗体的制备: 正常兔血清用 50% 冷酒精沉淀 γ 球蛋白, 再经 DEAE 纤维素层析柱, 以 pH 6.3 的 0.0175 M 磷酸盐缓冲液洗脱, 收集蛋白峰。以纯化的兔 γ 球蛋白免疫绵羊。第一次 50 毫克, 溶于 5 毫升生理盐水, 1:1 全佐剂乳化, 多点注射于颈、背部皮下和腿部肌肉。以后每隔两周注射 50 毫克 γ 球蛋白, 不加佐剂, 共三次。测试效价后从颈动脉取血。同样用 50% 冷酒精沉淀法和 DEAE 纤维素柱层析, 从绵羊免疫血清中纯化羊抗兔 γ 球蛋白抗体。琼脂双向扩散试验和琼脂免疫电泳证明, 纯化的羊抗体具有良好的抗兔 γ 球蛋白活性, 在 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示一条 γ 区域的蛋白带。

(2) 兔抗马脾铁蛋白抗血清的制备: 免疫家兔的铁蛋白总剂量为 2.5 毫克左右。第一次 0.5 毫克铁蛋白溶液, 1:1 全佐剂混合, 直接注射于左、右腮淋巴结。以后每隔 7—10 天作一次追加免疫, 共三次; 每次注射约 0.6 毫克, 不加佐剂, 分别注射于腮淋巴结周围和眼睑结膜下。末次免疫一周后测试效价, 放血。

(3) 铁蛋白标记抗体, 纯化及鉴定:

① 标记: 硫酸铵沉淀的铁蛋白对水和 0.1 M PBS (pH 7.2) 透析后, 按 Lowry 法定蛋白含量, 使其浓度在 2.5% 左右; 羊抗兔 γ 球蛋白抗体的浓度为 4.5% 左右; 戊二醛 (经过重蒸) 为 1.2%。按蛋白质绝对量取铁蛋白 2 份, 并抗兔 γ 球蛋白抗体 1 份, 混匀; 然后

二、铁蛋白标记抗体的方法

1. 铁蛋白标记抗体的原理

铁蛋白标记抗体的制备, 早期多使用双功能的异氰酸盐类化合物或碱的衍生物作为偶联剂 (Singer, S. J., 1959; Breese, S. S. 等, 1971)。然而, 用这类偶联剂制备的铁蛋白抗体复合物, 往往显著地失去抗体活力 (Borek, F. 等, 1961; Vogt, A. 等, 1964; Gitzelmann, R. 等, 1970), 这可能与偶联剂的性质及某些作用条件有关。近几年来, 用戊二醛作铁蛋白标记抗体的偶联剂, 未见抗体活力降低, 标记抗体的产量也较高^[5,6]。戊二醛也是具有双功能基团的化合物, 通过共价键与铁蛋白和抗体结合, 其化学反应式可能是:

加入 1/20 份的 1.2% 戊二醛, 搅匀后在 37℃ 温浴 1 小时, 并不时摇动, 再置 4℃ 1 小时。

② 纯化: 经上述反应后的产物, 一般认为至少有三种成份, 一是铁蛋白标记的抗体, 另外两种是未被标记的抗体和游离的铁蛋白。后两者都会影响实验结果, 因而必须尽量除去。纯化操作均在 4℃ 进行。上述反应液缓慢加入 1/3 体积的饱和硫酸铵, 使成 25% 饱和度。此时, 棕黄色铁蛋白标记的抗体沉淀, 未被标记的抗体和游离的铁蛋白仍留在上清液^[5]。离心, 4,000 转/分, 15 分钟, 取沉淀。

沉淀物溶于少量 0.1 M PBS (pH 7.2) 中, 通过葡聚糖 G-25 柱以除去硫酸铵。用同一 PBS 洗脱, 流速 1 毫升/4 分钟, 收集含有棕黄色铁蛋白标记的抗体, 合并浓度较高的数管, 装入透析袋对多聚乙二醇透析浓缩。使用前测定蛋白质含量, 浓度范围为 1—1.8%。

③ 鉴定: 用琼脂双向扩散法鉴定标记抗体时, 以铁蛋白和羊抗兔 γ 球蛋白抗体 (按标记比例溶于 PBS) 的混合物作为对照。在琼脂扩散板上 (图版 VI), 铁蛋白标记的抗体与正常兔全血清反应, 产生的沉淀线呈棕黄色, 用生理盐水浸泡数天不能洗去。如以 2% 铁氰化钾酸性溶液染色, 沉淀线变为普鲁士蓝色, 这一结果显示铁蛋白与羊抗兔 γ 球蛋白抗体已被戊二醛偶联在一起。而铁蛋白与羊抗兔 γ 球蛋白抗体的混合物和正常兔全血清反应后, 虽因铁蛋白的扩散使沉淀线也呈黄色, 然而经生理盐水洗涤后, 棕黄色消失, 只留下白色沉淀线。后者实际上是羊抗兔 γ 球蛋白抗体和兔 γ 球蛋白产生的沉淀线, 离正常兔全血清孔穴略近些。

若将铁蛋白标记抗体,与铁蛋白和抗体的混合物的免疫电泳结果加以比较,可清楚地见到:铁蛋白标记的抗体与兔抗铁蛋白抗血清反应所产生的沉淀线,见图版 VII、弧 a,经生理盐水漂洗后不仅仍呈棕黄色,而且其位置趋向于正极。弧 b 表示杂有少量的游离铁蛋白。弧 a 和槽之间的微弱沉淀线,可能是铁蛋白分子的复合物。

三、小鼠 S180 细胞表面抗原定位实验

1. 兔抗小鼠 S180 细胞抗血清的制备

取接种一周左右的 S180 腹水细胞,用 0.1 M PBS (pH 7.2) 洗 6—8 次,免疫家兔(皮下和肌肉);每次约 1×10^8 细胞,不加佐剂,共七次,每次间隔一周。末次免疫一周后放血。抗血清加豚鼠补体后,对小鼠 S180 细胞表现明显的细胞毒性作用。抗血清用丙酮处理的正常小鼠肝组织干粉吸收二次:第一次,100 毫克/毫升;第二次,50 毫克/毫升。经吸收的兔抗 S180 抗血清称为第一抗体。铁蛋白标记的羊抗兔 γ 球蛋白抗体称为第二抗体。

在对照实验中,除应用前述铁蛋白和羊抗兔 γ 球蛋白抗体混合液外,我们还制备和应用了兔抗牛血清白蛋白(BSA)抗血清。

2. 定位实验和实验组别

(1) 取 0.1 M PBS (pH 7.2) 洗涤的 S180 细胞约 4×10^7 , 加 1 毫升第一抗体(PBS 稀释 10 倍), 37℃ 温浴 1 小时;离心,倒去第一抗体,以 PBS 洗 6—7 次。加 0.5—0.6 毫升第二抗体, 37℃ 温浴 1 小时;离心,倒去第二抗体。细胞以 PBS 洗 7—8 次,用 1.2% 戊二醛固定 10—15 分钟;PBS 洗三次,每次 10 分钟;2% 锇酸第二次固定 1.5—2 小时, PBS 洗二次;脱水,邻苯二甲酸二丙烯酯(polydiallylphthalate, 简称 PDAP) 包埋,制成超薄切片,用醋酸铀和柠檬酸铅复染;电镜观察。

(2) 实验组: S180 细胞 + 第一抗体 + 第二抗体。对照组 I: S180 细胞 + PBS + 第二抗体;对照组 II: S180 细胞 + 兔抗 BSA 抗血清(PBS 稀释 10 倍) + 第二抗体;对照组 III: S180 细胞 + 第一抗体 + 铁蛋白与羊抗兔 γ 球蛋白抗体的混合物。

3. 电镜观察

S180 细胞表面与其它许多肿瘤细胞一样,有许多不规则的绒毛状突起。在实验组细胞的表面突起与凹陷部位,经常观察到密集的铁蛋白颗粒(图版 VIII);而在细胞表面较平滑的部分不易见到,颗粒的数量也较少。在三个对照组细胞的表面,皆未见到铁蛋白颗粒(图版 IX, X, XI)。

四、讨 论

S180 细胞表面抗原定位初步实验表明,以戊二醛为偶联剂,用铁蛋白标记抗体的“一步法”,是一简便易

行、效果较理想的方法。用异氰酸盐类制备铁蛋白标记的抗体,反应需在碱性条件下进行,除导致抗体丧失大部分活力外,标记率仅为 10—20% (Vogt, A. 等, 1964)。戊二醛是在接近中性条件下将铁蛋白与抗体进行偶联,因而抗体活力不受影响,而且标记抗体的产量较高,可达 50%^[5]。我们也曾测定标记抗体的蛋白质总量,对得率作了三次抽样计算,约占投料量的 30—49%。产量不够稳定的原因,可能是由于实验过程中操作上的细微误差,诸如葡萄糖 G-25 柱去硫酸铵过程中,铁蛋白抗体复合物上柱的浓度、洗脱液的流速、收集液体积等因素。

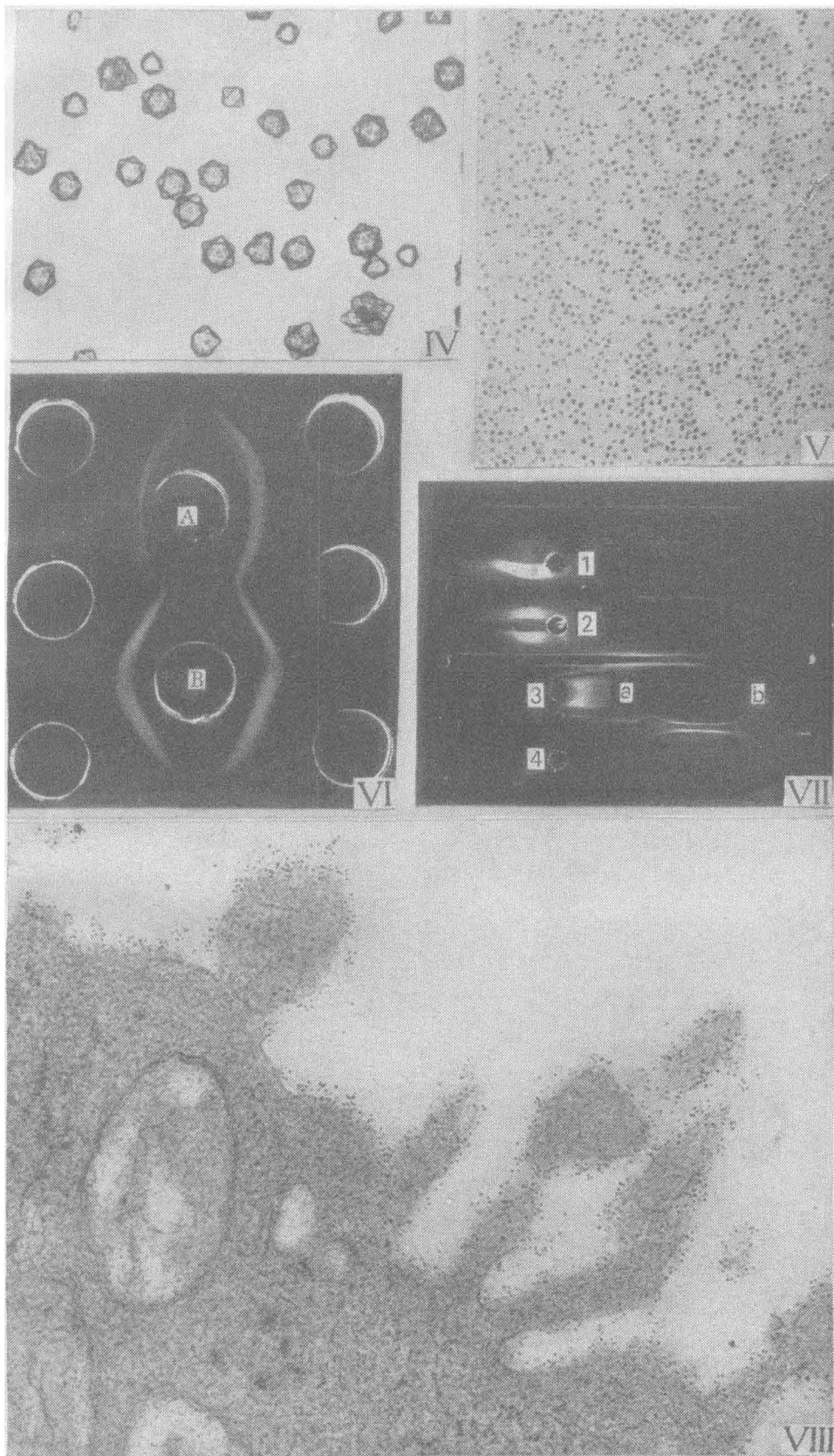
在免疫电镜工作中,纯化粗制的铁蛋白标记的抗体是一不可缺少的步骤。一般采取数次长时间的超高速离心来除去未被标记的抗体 (Rifkind, R. A. 等, 1964; Breese, S. S. 等, 1971),但游离的铁蛋白不能完全去掉。Borek, F. 等 (1961) 用连续电泳、Vogt, A. 等 (1964) 用琼脂电泳纯化标记的抗体,但手续烦琐,而且不能大量制备。本实验采用的硫酸铵沉淀法相当简便,无需大型仪器设备,并节约时间。我们制备的标记抗体,经免疫电泳鉴定,尚有少量游离的铁蛋白,另外还可能杂有铁蛋白分子的复合物;但在抗原定位实验中,细胞经反复洗涤,铁蛋白的非专一性吸附现象基本上可以排除,三组对照细胞的阴性反应也说明了这一点。此外,铁蛋白中尚有 20—25% 蛋白质外壳,我们在标记之前未用超高速离心去掉,但实验结果似乎说明它没有什么显著影响。

由于铁蛋白分子较大,用它定位细胞内抗原,困难较多;但用于对细胞表面抗原或病毒抗原的定位则是相当理想的,因为它含铁丰富,具有在电镜下电子散射力强、易于辨认、又能耐受电子轰击等优点。因此,铁蛋白至今仍是一相当有价值的标记物。Micheel, B. 等 (1971) 曾用铁蛋白、二茂铁 (Ferrocen)、过氧化物酶三种标记物,研究大鼠和小鼠白血病细胞的膜抗原,认为铁蛋白的反差最好。我们制备的铁蛋白抗体复合物,在多次 S180 细胞表面抗原定位实验中,皆能成功地看到铁蛋白颗粒在细胞表面的分布,也证实了这一方法的优越性。

考 考 资 料

- [1] Singer, S. J.: *Nature*, **183**, 1523, 1959.
- [2] Baxandall, J.: *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 730, 1966.
- [3] Morgan, C.: *Intern. Rev. Cytol.*, **32**, 291, 1972.
- [4] Williams, M. A.: *Biochem. J.*, **110**, 265, 1968.
- [5] Siess, E. et al: *Immunol.*, **20**, 659, 1971.
- [6] Otto, H. et al: *J. Immunol. Methods.*, **3**, 137, 1973.

[本文于 1975 年 6 月 15 日收到]



图版 IV 马脾铁蛋白颗粒

结晶六次，相差照象，320 倍

图版 V 铁蛋白水溶液涂片

铁蛋白分子内核直径为 68 埃，100,000 倍

图版 VI 铁蛋白标记羊抗兔 γ 球蛋白抗体的琼脂双向扩散法检验

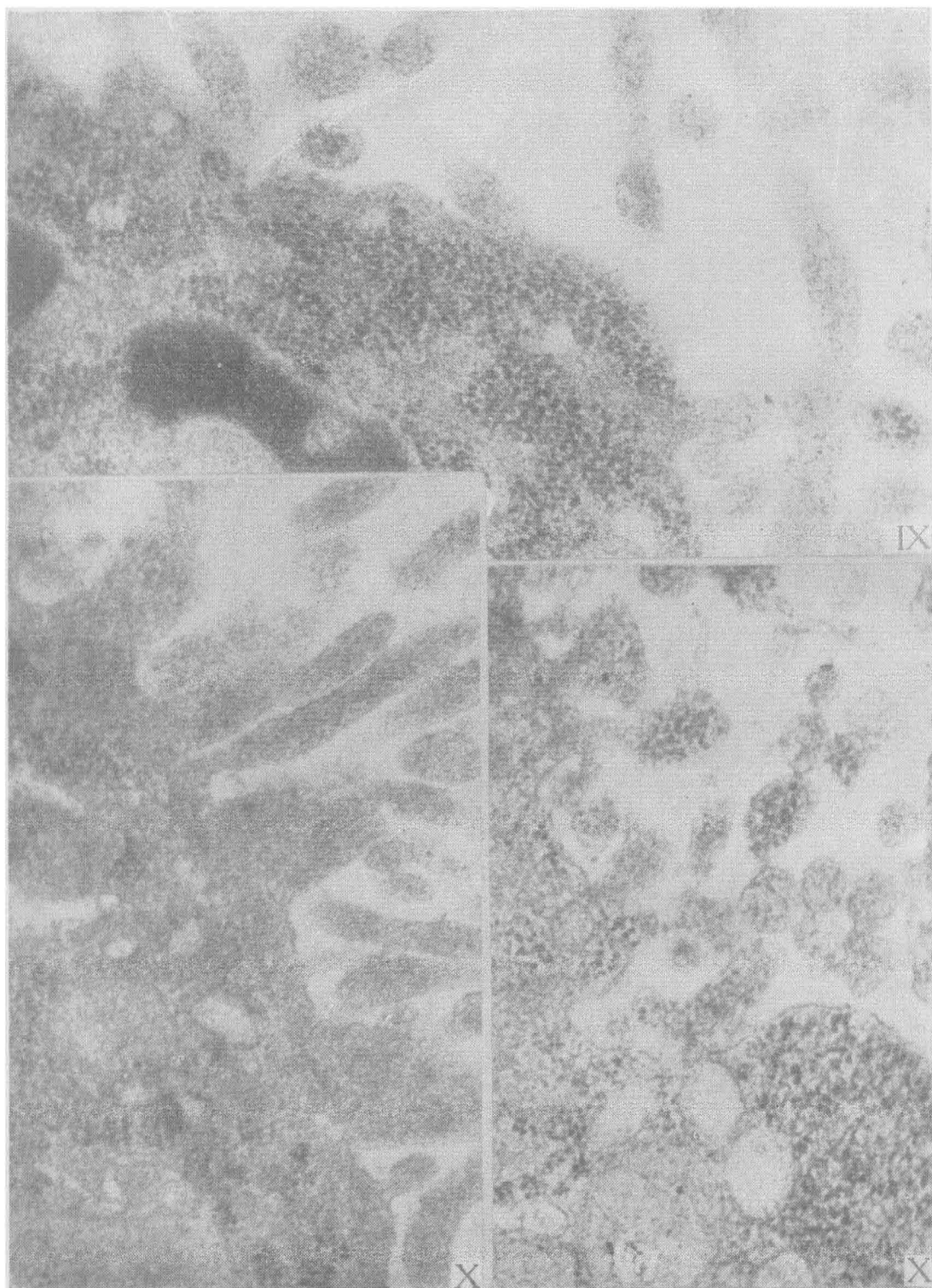
孔 A: 铁蛋白标记抗体; 孔 B: 铁蛋白、抗体混合物; 周围孔: 均为正常兔血清; 扩散沉淀线经漂洗后在孔 A 处呈棕黄色，在孔 B 处呈乳白色

图版 VII 铁蛋白标记羊抗兔 γ 球蛋白抗体的免疫电泳

孔 1: 羊抗兔 γ 球蛋白抗血清; 孔 2: 铁蛋白、羊抗兔 γ 球蛋白抗体混合物; 孔 3: 铁蛋白标记的抗体; 孔 4: 铁蛋白; 槽: 三条槽内部是兔抗铁蛋白抗血清; 弧 a: 铁蛋白标记的抗体; 弧 b: 游离铁蛋白; 弧 a 和槽之间的微弱沉淀线，可能是铁蛋白分子的复合物

图版 VIII 实验组——S180 细胞 + 第一抗体 + 第二抗体

醋酸铀、柠檬醋铅复染，60,000 倍; S180 细胞表面呈绒毛状突起，许多铁蛋白颗粒分布在细胞表面突起与凹陷的部位



图版 IX 对照组 I——PBS 代替第一抗体

醋酸铀、柠檬酸铅复染，80,000 倍；在 S180 细胞表面未见铁蛋白颗粒

图版 X 对照组 II——兔抗 BSA 抗血清代替第一抗体

醋酸铀、柠檬酸铅复染，60,000 倍；在 S180 细胞表面未见铁蛋白颗粒

图版 XI 对照组 III——铁蛋白、羊抗兔 γ 球蛋白抗体混合物代替第二抗体

醋酸铀、柠檬酸铅复染，60,000 倍；S180 细胞表面未显示铁蛋白颗粒