

“桥形免疫定量电泳”测定甲胎蛋白 (AFP)

中国科学院上海生物化学研究所四室肿瘤组

目前检测肝癌患者血清中 AFP 浓度的方法很多,如普通火箭电泳、对流电泳及各种放射免疫测定等。这些方法由于受到加样量的限制,其灵敏度也有一定的限度,一般加样量为 10—30 微升,灵敏度分别为 500 毫微克/毫升,300 毫微克/毫升,50 毫微克/毫升左右。本文方法选用 0.5—2 毫升的桥形样品管,使样品体积大大增加,从而使灵敏度相应提高。AFP 浓度为 2—10 毫微克/毫升时即可检出,使普通免疫定量电泳的灵敏度达到了放射免疫测定水平。如果把“桥形免疫定量电泳”的技术和放射火箭电泳自显影原理结合起来,测定 AFP 的灵敏度可达 0.4 毫微克/毫升。

材料与 方法

板的制备 在 8×11 厘米玻璃板上(图 1)接触胶及抗体胶均用 0.02M、pH8.6 巴比妥钠-盐酸缓冲液配制的 1% 琼脂糖制备。抗体胶内抗血清浓度按普通火箭电泳法选择。在板上按样品管的孔间距离打孔,直径 8 毫米,用琼脂糖铺底备用。

样品管的制备 桥形的样品管,壁厚 1.5 毫米,出口内径 2 毫米,体积 0.5—2.0 毫升。样品管如右上图。



将用蒸馏水稀释好的或彻底透析的血清样品预温与 0.1 体积的 1% 琼脂糖混匀后加入到 0.5—2.0 毫升样品管中,为防止蛋白热变性,凝胶温度应控制在 45—55℃,出口用几滴琼脂糖封闭。静止倒置在水平槽内。

电泳条件 将样品管的 A'、B' 端放在板的 A、B 孔内,两端用琼脂糖封闭,电泳缓冲液为 pH8.6、0.02M 巴比妥钠-盐酸缓冲液。电泳时间 15—24 小时,电压降为 1.5—2 伏/厘米。电泳结束后可直接观察结果,也可经考马斯兰染色后观察结果。

结果与 讨论

一、灵敏度

选用 0.5 毫升样品管,肝癌腹水中 AFP 浓度为 2 毫微克/毫升时即可检出(见图版 III,图 1)。再结合放射火箭电泳自显影的原理,灵敏度可达 0.4 毫微克/毫升(见图版 III,图 2)。

二、影响电泳的几个因素

1. 样品的处理

在电泳过程中发现,病人血清必须对蒸馏



图 1 电泳板示意图

水彻底透析,直至透析液中用 AgNO_3 检验为阴性,才能得到令人满意的结果。对含 AFP 浓度较高的血清或腹水等,用蒸馏水稀释后即可电泳。表明盐浓度对电泳的影响是很大的(见图版 IV,图 3)。

图版 IV 图 3 结果表明,样品中盐的浓度较低时,结果较好。我们为了避免血清样品透析这一麻烦,也曾试用提高缓冲液的离子强度为 0.05、0.075、0.2,但均未得到好的结果,将血清直接通过 Sephadex G-25 柱,然后电泳,结果不如透析效果好。

2. 孔距的影响

表 1 比较了样品管在板上不同位置对灵敏

表 1 样品孔 A(图 1)与抗体胶距离对结果的影响

样品孔 A 距抗体胶 的距离(厘米)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
结 果	-	±	+	+	+	±	±

度的影响。

我们认为,为提高灵敏度,样品管应放在距交界处 1—1.5 厘米处。但由于电渗的影响,工作曲线线性不好,如图版 III,图 1B。样品管放

在交界线上,工作曲线较为理想。但灵敏度略低,看来两种办法各有利弊,可根据需要选择样品孔的位置。

3. 因电泳时间比一般电泳要长,所以电泳缓冲液要新鲜配制。

样品管中加入 0.1 体积的 1% 琼脂糖可以使电泳速度加快。

J. KRϕLL 曾采用 10 毫升的样品管测定人血清白蛋白,灵敏度可达 0.1 毫微克/毫升^[1]。在我们的实验中,由于考虑到要取数毫升的病人血清是很困难的,所以选用 0.5—2.0 毫升的样品管来检测,但其它的易得的样品,随体积增大,灵敏度也可能会进一步提高。

4. 如果在电泳板上分段制备不同的抗体胶(见图版 IV,图 4),则可以同时分析同一样品中的不同成份,此法有可能用于无细胞系统蛋白质合成产物分析。

参 考 文 献

[1] KRϕLL, J.: *J. Immunol. Methods*, 13, 333, 1976.

[本文于 1978 年 3 月 1 日收到]



环状 AMP 在蛙鼻中的作用

蛙的鼻子形式给人们提供了一个嗅觉机理的线索。蛙似乎是用受宠的生物分子之一环化 APM 来行使嗅觉的。

有关涉及环状 AMP 的设想,从理论上讲,可能说明嗅觉分子改变了靶细胞内环状 AMP 的浓度,或者这种分子能影响制作环状 AMP 的腺嘌呤环化酶的活性。由于嗅觉感受神经元分布在衬于鼻子内的复杂组织。因而直接对个别细胞进行工作很不可能。

有人用不很直接但是同样可靠的方法来证实,假如,一种气味的电反应是由于环状 AMP 含量内嗅觉诱导变化的结果,那么任何干扰环状 AMP 含量的因素,也将改变其电反应。

这个小组用这种方法做实验,他们研究了蛙经各种气味包括果味、花味或麝香味分子处理后反应的嗅电图。嗅电图记录了每股对照的单独气味反应。假如,蛙的嗅觉粘膜首先用抑制磷酸二酯酶的化合物溶液处理(磷酸二酯酶是分解环状 AMP 的酶),则嗅电图的指标下降。下降幅度与磷酸二酯酶抑制剂处理量相对应。用环状 AMP 类似物对粘膜进行处理也使嗅电图指标下降。这两种人工处理方法的结果,只是提高组织内环状 AMP 的有效浓度,同时也起到减弱对各种气味的电反应。

许多与环状 AMP 无关的对照组分子,对反应各种气味的嗅电图没有影响。看来,这些实验第一次阐明,一个气味分子与一个嗅觉感受神经元相结合时,环状 AMP 分子具体参与了产生电反应的过程。

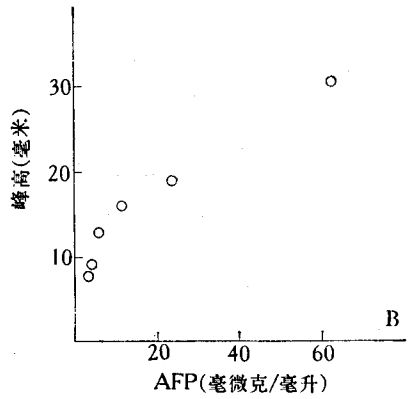
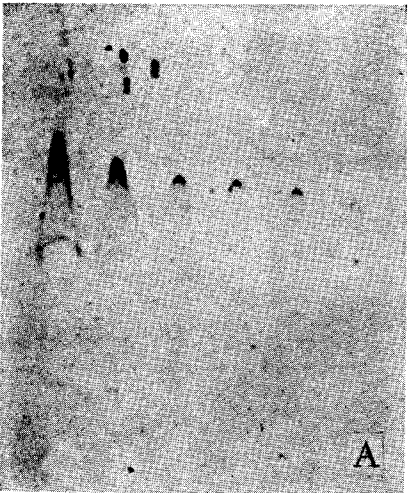


图 1 不同浓度 AFP 的桥形电泳图谱 A 和工作曲线 B

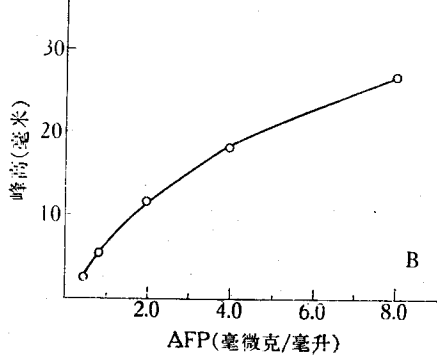
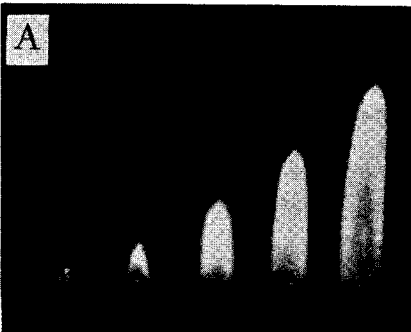


图 2 结合放射火箭原理,样品中加入 ^{131}I -AFP 后的桥形电泳放射自显影图谱 A 和工作曲线 B

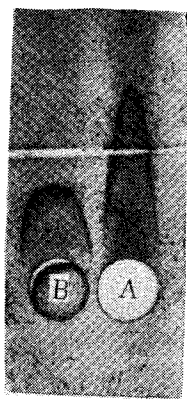
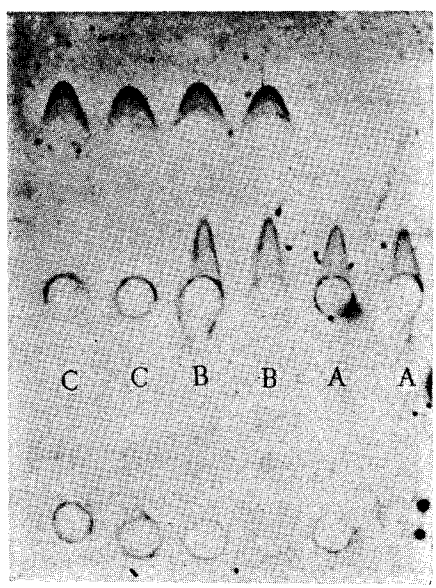


图 3 透析对结果的影响
A——透析完全
B——未透析



抗白蛋白胶
接触胶
抗 AFP 胶
接触胶

图 4 桥形电泳同时分析同一样品内不同组份的可能性
A 管——AFP;
B 管——AFP+白蛋白;
C 管——白蛋白;
条件——按文内所述电泳条件,电泳 24 小时,然后提高电压两倍,电泳 4 小时