

一种新的甲胎蛋白放射免疫测定——顺序饱和微量法

袁振铎 任淑卿 杨宝华 余永光 李丽娟

(北京友谊医院、北京市临床医学研究所生化研究室)

检测甲胎蛋白(AFP),是诊断原发性肝癌比较可靠的手段之一。为了更适合临床及大面积普查,许多人对此方法进行了探讨。我们在以前工作^[1,2]的基础上,又摸索出一种新方法——顺序饱和法。此法操作更简便,节省血清标本、同位素及其它试剂。

一、测定原理

利用同位素的灵敏性和抗原抗体反应的特性设计了一种新型的超微量分析技术。它首先是用过量的抗体与抗原充分反应(第一反应),然后再用过量的标记抗原与未被抗原结合的多余抗体反应(第二反应),剩余抗体越多,与标记抗原结合也越多,将这种抗原抗体复合物,用分离剂沉淀分离。再测定沉淀中被标记的抗原与抗体复合物的放射性数值,该值越大则待测标本抗原越少。依不同浓度的已知未标记抗原作剂量反应曲线,即为标准曲线。未知样品值可从曲线上查出。

二、试剂

1. 放射碘化 AFP 的制备——氯胺 T 氧化法

取一瓶纯化 AFP 干粉(约含 AFP35 微克),加入新鲜 Na^{125}I 4mci 后进行电磁搅拌,加新配制氯胺 T 一滴(含 500 微克)搅拌 5 分钟。立即加新配制偏重亚硫酸钠一滴(含 1mg)终止反应。将标记好的反应液移入葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)柱中,然后用 0.01M PBS 溶液淋洗,并开始用万能辐射仪收集第一峰值的溶液即为已标记的 AFP 溶液,然后加稍过量的兔抗正常人血清,于 4℃ 下混合搅拌 4 小时。

将 4℃ 下碘化 AFP 取出,放置室温平衡,加入饱和硫酸铵达到 35% 饱和度,混和均匀后放置 10 分钟,8000 转/分冷冻离心分离 30 分钟,弃去沉淀(这部分为含有杂蛋白的抗原-抗体复合物)。取离心后透明上清液(要求溶液清晰不能有一点沉淀,否则影响产品质量)。加入固体硫酸铵,使最终达到 70% 饱和度,混匀,冷冻离心(8000 转/分)30 分钟,弃上清;所得沉淀即纯化的标记 AFP。将沉淀溶解,并加一定量的 NaN_3 及水解明胶,测其总放射量。按每瓶 $2\mu\text{Ci}$ 分装,并进行冷冻干燥封口,经放射免疫法鉴定合格即为成品。

取 ^{125}I -AFP 一瓶以蒸馏水溶解成 $2\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 。取 $20\mu\text{l}$ 放在小试管内,在 γ -井型探测器内测定脉冲数。然后按每管 $20\mu\text{l}$ 中 cpm/分为本底的 25—50 倍,以 0.05M PBS 稀释至要求数值。临用前配制。

2. 0.05 M pH 7.4 磷酸缓冲液生理盐水(PBS),其中含 1:10000 NaN_3 作防腐剂,贮于 4℃ 冰箱备用。

3. 甲胎蛋白第二标准: 取纯化的 AFP 依第一标准确定其浓度,并以 1200ng/ml 浓度,每瓶 1.0ml,真空冷冻干燥。用时以 0.05M PBS 1 ml 加至标准瓶内即为 1200 ng/ml,再依需要进行各级稀释,通常浓度为 400 ng/ml, 200 ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml。

4. 马抗人 AFP 血清为北京生物制品研究所生产,以 0.05 M pH7.4 PBS 配成 1:10 浓度,冰箱保存待用。依需要稀释成各不同浓度,本工作中常用稀释度为 1:5000。

5. 正常兔新鲜血清

6. 15% 聚乙二醇(PEG)溶液: 称取分子

量为 12,000 的 PEG 15 克,以 0.05M pH7.4 PBS 溶至 100ml。

三、操作步骤

1. 抗血清稀释度的选择 如前所述^[3]只是每管加入 20 μ l 含 400ng/ml AFP 的血清样品及不同稀释度的抗血清 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟后,加 20 μ l¹²⁵I-AFP, 再保温 10 分钟。其结果见图 1。选 1:5000 稀释度。

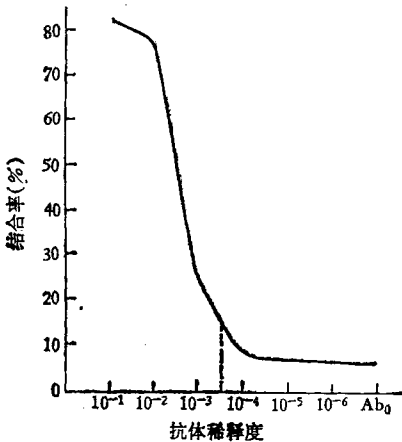


图1 抗血清稀释度的选择

2. PEG 浓度的选定,与我们以前报告^[4]的相同,PEG 最终浓度为 7.5%。

3. 标准曲线制备 取尖底小离心管,双行排在试管架上,平行标号,每管分别加入 20 μ l 正常兔血清, 20 μ l 不同稀释度的 AFP 血清第二标准(如 20 或 25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、400ng/ml),1:5000 马抗人 AFP 血清 20 μ l。摇匀后放 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟。取出后加 ¹²⁵I-AFP 20 μ l (其放射量相当于本底的 50 倍左右),摇匀后继续保温 10 分钟,取出放 4 $^{\circ}$ C 冰箱 5 分钟后,加 15%PEG 80 μ l,分离与抗体结合和未与抗体结合的 ¹²⁵I-AFP。测总放射量后,再 3000 转/分离心 10 分钟,电动负压抽去上清液,在 γ -能谱仪上记录沉淀中的放射量。以沉淀中 ¹²⁵I-AFP 与抗体结合百分率为纵坐标,不同浓度标准的 AFP 为横坐标绘图(图2)。[各点都是减去非特异结合(Abo)的值]。

4. 样品测定 取待测血清 20 μ l,加 PBS

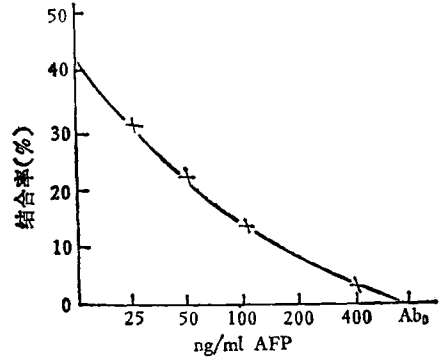


图2 AFP 标准曲线

20 μ l, 抗血清 20 μ l, 摇匀后放 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟。以后操作如同标准曲线的制备。由所得的结合率,在标准曲线上查出相对应的 AFP 值,即为待测样品数值。

5. 重复性试验 用 4 种不同浓度的血清(一份标准 AFP 血清倍比稀释)各做 14 或 15 次试验,观察其重复性,见图 3。

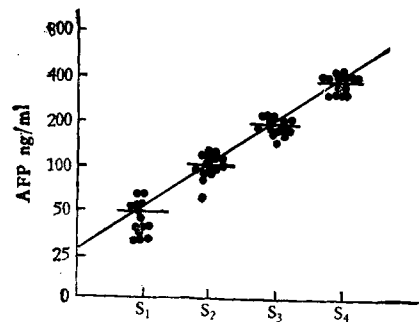


图3 AFP 重复性测定

四、结果与讨论

1. 选择过量抗 AFP 血清时,选用常规测定中最高量抗原 400ng/ml, 这样,当它与抗体等当量结合时,抗体量若无剩余,加入标记抗原后,结合率应与 Abo 管相同,图 1 中抗体稀释 1:1 万之后是一平直线。在 1:1 万之前的抗体稀释度则与 Abo 管有明显差异,其结合率 1:1 万时为 8%;1:5000 时为 14%,1:1000 时为 24%。又因为应用抗体稀释度越大,方法的灵敏性越高。考虑抗体过量及方法的灵敏性两个

因素,所用的抗体稀释度必须为 1:5000。

此外,由图 1 可见,1:10 抗体稀释度时,抗体与 ^{125}I -AFP 结合率达 82%,说明在实验条件下,所用标记抗原量,确实是过量的。(即完全可以将 1:5000 抗体结合成复合物而被沉淀。

2. 在此条件下,每次制备标准曲线均能获得满意结果。经我们一年多的研究及临床应用,证明这种新的 AFP 简易微量方法稳定可靠,值得推广。

3. 用 4 个不同浓度的标准血清各做 14 或 15 次重复性研究,结果良好。若将各血清平均值按图 3 作图可获一条直线。这也说明一个标本或标准倍比稀释时,可得到良好的稀释曲线。本直线延长,相交于纵轴处,正好也是下一个稀释度 (25ng/ml)。

4. 与竞争法做相关性测验 用 24 个不同浓度样品,同时用本法及竞争法测定。结果见图 4。两法的相关系数 $r = 0.91$, 回归方程式是: $\bar{y} = 15.1 + 1.1x$ 。说明两法用结合百分率表示的相关性密切。由此结合率绘制剂量反应曲线后二者结果完全相同有 18 个样品,4 个相差在 20ng/ml 以内,2 个在 50ng/ml 以内。

5. 此法比原法^[5]节省试剂 5 倍,一个人半日可完成 50 份标本。本法还可用于监测胎儿的生长是否正常。本法也同样可用于羊水、腹

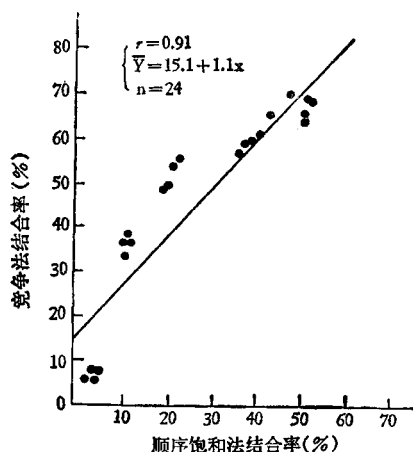


图 4 竞争与顺序饱和法相关性测验

水、尿等其它体液的监测。经实验证明,只要 ^{125}I -AFP 符合要求 (与抗体结合率大于 40%,而非特异结合小于 10%),不论上海生物制品研究所生产的,还是北京化工厂或北京 401 所生产的 AFP 试剂盒,都能获得满意结果。它是目前 AFP 放射免疫检测肝癌最新的方法。

参 考 文 献

- [1] Brummund, W. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 105, 25, 1980.
- [2] 袁振铎等:《北京医学》, 3, 6, 1981.
- [3] 袁振铎等:《肿瘤防治研究》, 9, 11, 1982.
- [4] 袁振铎等:《生物化学与生物物理进展》, 1, 52, 1983.
- [5] Brack, D. J. H. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 82, 101 (No. 1/2), 1978.

(本文于1983年2月23日收到)

高效液相色谱分离多肽

郑如玉 刘锦慧

(中国科学院动物研究所)

生物活性多肽的结构、性能和生理作用是当代生物化学研究活跃的领域之一。从生物材料或合成多肽中分离出纯的多肽就愈来愈显得重要。

过去一般都用柱层(包括离子交换、凝胶色谱等),纸层和电泳等技术分离多肽,但这些方法分离效果不高,速度慢,灵敏度低、回收率也较低。近年来,离子对反相高效液相色谱被成