

人胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶的 ELISA 及用于肝癌的诊断

林 峰 陈惠黎*

(上海医科大学生物化学教研室, 上海 200032)

提 要

从人体胎盘提纯 GST- π , 制备免抗 GST- π 血清, 纯化其 IgG, 并降解成 Fab' 片断, 通过 SMCC 与 HRP 交联成 Fab'-HRP, 用于夹心 ELISA 以测定 GST- π , 灵敏度可达 11pg, 超过国外的放射免疫法。用此法测定正常人血清 GST- π 为 $1.06 \pm 0.94 \text{ ng/ml}$, 原发性肝癌血清较正常高 20 倍以上。阳性率达 90% 左右。

关键词 人胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶, 酶联免疫吸附测定 (ELISA), 肝癌

谷胱甘肽 S-转移酶(GST, EC2,5, 1,18) 是参与致癌剂代谢及色素结合反应的多功能蛋白, 有多种同工酶^[1]。人类的 GST 按其等电点不同可分成碱性(α - ϵ 型)、中性(μ)和酸性(π 及 ρ 型), 其中 π 型 (GST- π) 为胎盘 GST 的唯一形式。除和红细胞中的 ρ 型有相同免疫性外, 和其它各型均无交叉免疫。大鼠胎盘型 GST (称 GST-P) 是肝癌的早期指标已有不少报道^[2], 但对人 GST- π 作为肿瘤指标的研究不多, 将 GST- π 应用于诊断者更少。本文采用抗 GST- π 的 IgG, 制成 Fab' 片断与辣根过氧化物酶的交联物 Fab'-HRP, 建立了高灵敏的夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法, 获得 pg 级的灵敏度, 并初步发现该酶有希望成为肝癌诊断的新指标。

材 料 与 方 法

1. 材料 HRP, 胃蛋白酶, β -巯基乙胺为 Sigma 产品, N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (SMCC) 为日本 Zieben 公司产品, 4,4'-二硫双吡啶 (DTP) 为日本半井公司产品, 聚苯乙烯小珠 (3.2mm ϕ) 美国 Precision 塑料公司产品。3,3',5,5'-四基联苯胺 (TMB) 为瑞士 Fluke 产品。Sephe-

dex 25, DEAE-52 及 Ultrogel ACA 44 为 LKB 产品, 其余试剂为国产 GR 级。正常血清来自献血者, 肝癌(均经临床、手术或病理证实)血清由上海第八人民医院提供, 肝炎血清由中山医院传染病房提供。

2. GST- π 的提纯 按本实验室已发表的方法^[3]从正常足月人胎盘中提纯, 比活力为 75 单位/mg 纯化 1024 倍, SDS-PAGE 鉴定为均一条带, 亚基分子量为 23000。

3. 免抗人 GST- π 血清的制备 按本实验室常规^[4]。

4. IgG 提纯及 Fab' 制备 按余芒等方法^[5], 用 Na_2SO_4 盐析 IgG, DEAE-52 提纯, 再用胃蛋白酶切去 IgG 的 Fc 段, 生成的 F(ab')₂, 用 Ultrogel ACA 44 提纯再用 β -巯基乙胺还原成 Fab'。

5. Fab' 与 HRP 交联 按陈惠黎法^[6], 先将 HRP 与 SMCC 以 1:100 分子比反应, 将 SMCC 中 4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧基团(Mal)与 HRP 的氨基结合而形成 HRP-Mal, 再将等分子比的 HRP-Mal 与 Fab' 反应, 使 Fab' 绞链区的巯基与 Mal 中的马来酰

* 本文负责人

亚胺起加成反应而成交联物 Fab'-HRP, 后者经 Ultrogel ACA44 提纯。

6. 巯基的测定 按 Grasseti 的 4,4'-DTP 法^[7]

7. Mal 基团的测定 为了解每分子 HRP 中所标记的 Mal 基团数,采用测定剩余巯基的方法来间接定量 Mal^[6]。

8. 蛋白质测定 按 Bradford 法^[8],以 BSA 为标准蛋白。

9. F(ab')₂ 及 Fab'-HRP 分子量测定 用 Ultrogel ACA 44 凝胶过滤法,以乳酸脱氢酶(140000),BSA(66200),HRP(40000)及细胞色素 c(12400)为标准分子量蛋白质。

10. 夹心 ELISA 测定 GST- π 聚苯乙烯小珠经 3.8% NP-40 浸泡 30min,重蒸水洗至无泡,37℃ 烘干,用 IgG(0.8mg/ml 含 0.1% NaN₃ 的 pH7.5 0.1mol/L 磷酸缓冲液)包被三天,改用缓冲液 A (pH7.0 10mmol/L 磷酸缓冲液,0.1mol/L KCl,10mmol/L MgCl₂,1mg/ml BSA 及 0.002% 硫柳汞)浸泡,置 4℃ 备用。使用时将缓冲液 A 稀释的抗原液(制备标准曲线时为纯化 GST- π ,样品测定时为 20 μ l 入血清)150 μ l 加至试管(内含一颗小珠)中,20℃ 振荡 6h,4℃ 过夜。小珠用 2ml 无 BSA 的缓

冲液 A 洗两次,加入酶标抗体 Fab'-HRP(100ng 溶于缓冲液 A 中)150 μ l,20℃ 振荡 4h,用 2ml 1% TritonX-100 洗三次,转入装有 HRP 底物(0.42mol/L TMB 及 0.6mmol/L H₂O₂)的试管中,30℃ 反应 1h,加 0.2ml 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,450nm 比色,以测定固相于小珠上的 HRP 活力^[9]。在测定血清 GST- π 时,为了避免红细胞中 ρ 型 GST 对测定 GST- π 的干扰,标本不能溶血。且为了提高回收率^[4],需调正缓冲液 A 中 KCl 的浓度,使其终浓度为 0.4mol/L,以上各实验条件如抗原和包被抗体的反应温度、时间,Fab'-HRP 的用量等均经预实验确定。

结果与讨论

1. Fab'-HRP 制备各步的鉴定 从新西兰兔制得抗 GST- π 血清的效价为 1:32,从此血清 6ml 提取 IgG,得 24.6mg。将其体积调至原来的 6ml,再测定效价为 1:16。从纯化 IgG-一直制备到 Fab'-HRP 各步的回收率及产物鉴定的结果总结于表 1。

用凝胶过滤法测得 F(ab')₂ 的分子量为 92000,与文献报道相符^[10],Fab' 为分子量 46000,恰为 F(ab')₂ 的一半,而 Fab'-HRP 为

表 1 从抗 GST- π IgG 制备 Fab'-HRP 交联物各步的回收率及产物鉴定
Table 1 Recovery and Product Identification of Each step in the preparation of Fab'-HRP Conjugate from anti GST- π IgG

步 骤 Procedure	回收率 Recovery (%)	产 物 鉴 定 Identification of product
1 IgG→F(ab') ₂	92.2	Mr = 92000
2 F(ab') ₂ →Fab'	77.8	Mr = 46000 1.02 mol SH/mol Fab'
3 HRP→HRP-Mal	82.6	1mol Mal/mol HRP
4 Fab' + HRP-Mal→Fab'-HRP	56.7	Fab': HRP = 1.16 in conjugate

Mal: 4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基
Mal: 4-(N-maleimide-methyl)-cyclohexane-1-carboxyl group

86000,恰为 HRP (40000) 和 Fab' 分子量的总和,最终制得 Fab'-HRP 交联物 3.6mg,其中 Fab' 与 HRP 的分子比值接近 1。以上数据均说明 Fab'-HRP 是符合要求的。

2. GST- π 测定的标准曲线 纯化 GST- π 用缓冲液 A 稀释成不同的浓度 (0-10⁴pg) 作

为抗原液,按方法 10 操作,读取各管的 A₄₅₀ 对 GST- π 浓度作双对数图。发现从 5pg 至 2000pg 范围内 A₄₅₀ 基本上与 GST- π 含量成正比,如以空白读数 1.5 倍的 A₄₅₀ 作为样品最低限度可测值,则本法的灵敏度为 11pg/管或 73.3pg/ml,此灵敏度远高于 Niitsu^[11],报道

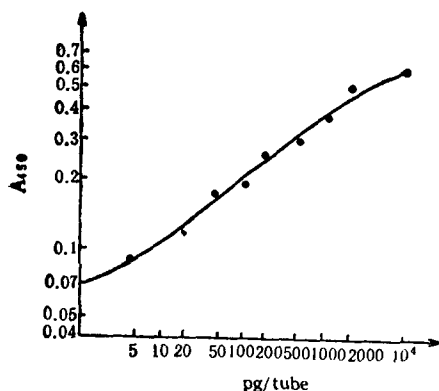


图1 GST- π 夹心 ELISA 测定的标准曲线
Fig 1 Standard curve for GST- π sandwich ELISA

的用放射免疫法测定 GST- π 的灵敏度 0.5ng/管,也高于 Beckett^[12]。用放射免疫法测定肝中碱性 GST 的灵敏度 30pg/管。

3. 正常人和肝病患者血清中 GST- π 的含量 41 例正常成人血清中 GST- π 的含量甚微,为 $1.06 \pm 0.94 \text{ ng/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 其中 78% (32/41) 介于 0.1—2.5ng/ml 之间。6 例为 0 (测不出),仅 3 例超过 2.5ng/ml,正常值的分布属非正态分布,中位数为 0.80ng/ml。如以正常值的 $\bar{x} \pm 1.64\text{SD}$ 作为非正态分布的上限,则正常上限可定为 2.60ng/ml。30 例原发性肝癌血清中 GST- π 水平为 $24.4 \pm 17.4 \text{ ng/ml}$ (表 2),与 Niitsu^[11] 报道的数值相近,此均值高出正常约 23 倍 ($P < 0.01$) 其中 73.3% (22/30) 在 10ng/ml 以上,只有 3 例 (2.4, 2.5, 2.5ng/ml) 处于正常上限,故阳性率为 90.0% (27/30),高于 Niitsu 报道的 64.7% (11/17),而 25 例作为对照的慢性肝炎患者血清 GST- π 为 $1.74 \pm 1.16 \text{ ng/ml}$,与正常值无统计性差异 ($p > 0.05$),仅 3 例 (3.3, 4.5, 5.0ng/ml) 超

表 2 正常人和肝病患者血清 GST- π 的免疫定量
Table 2 Immunoquantitative determination of Serum GST- π in normal adults and patients with liver disease

血清来源 Origin of serum	例数 No. of Cases	GST- π ng/ml ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	P 值 P value
正常成人 Normal adult	41	1.06 ± 0.94	
原发性肝癌 Primary hepatocarcinoma	30	24.4 ± 17.4	< 0.01
慢性肝炎 Chronic hepatitis	25	1.74 ± 1.16	> 0.05

过正常范围,假阳性率为 12.0% (3/25),低于 Niitsu 报道的 40% (6/15)。其中 1 例血清 GST- π 为 8.0ng/ml 的病例,后经甲胎蛋白及手术证明为早期肝癌,故 GST- π 很可能成为一个有希望的肝癌诊断新标志。已证明血清中 GST- π 的来源为肝癌组织(作者免疫组织化学研究资料),而肝癌中表达胎盘型 GST 的机理可能和癌细胞的反分化有关。

参 考 文 献

- 1 Mannervik B. *Adv in Enzymol*, 1988; **57**: 357
- 2 Sato K. *Jpn J Cancer Res (Gann)*, 1988; **79**: 556
- 3 夏初临,陈惠黎. 生物化学与生物物理学报, 1989; **21**: 58
- 4 郑榕岚,陈惠黎. 生物化学与生物物理学报, 1988; **20**: 198
- 5 余芒,陈惠黎. 上海免疫学杂志, 1986; **6**: 1
- 6 陈惠黎,余芒. 上海免疫学杂志, 1986; **6**: 65
- 7 Grassetti DR *et al. Arch Biochem Biophys*, 1967; **119**: 41
- 8 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; **72**: 248
- 9 陈惠黎等. 上海免疫学杂志, 1985; **5**: 100
- 10 Utsumi S *et al. Biochemistry*, 1965; **4**: 1766
- 11 Niitsu Y *et al. Cancer*, 1989; **63**: 317
- 12 Beckett G J *et al. Clin Chim Acta*, 1984; **141**: 267

[本文于 1989 年 8 月 19 日收到]

ELISA OF HUMAN PLACENTA TYPE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE AND ITS APPLICATION IN THE DIAGNOSIS OF HEPATOCARCINOMA

Lin Feng

Chen Hui-li

(Department of Biochemistry, Shanghai Medical University)

ABSTRACT

GST- π was purified from human placenta and its antiserum was raised in rabbits. The antibody IgG was purified and degraded into Fab' fragment which was conjugated with horseradish peroxidase (HRP) using N-succinimidyl-4-(N-maleimido-methyl) cyclohexane-carboxylate (SMCC) as crosslinking reagent to produce Fab'-HRP conjugate. A sandwich ELISA was established for the microquantitative determination of GST- π . The sensitivity was 11pg/tube, which was far more sensitive than the radioimmunoassay so far reported. Using this method, the serum GST- π of 41 cases of normal adult was found to be 1.06 ± 0.94 ng/ml. The upper limit of the normal value was 2.5ng/ml. In 30 cases of primary hepatocarcinoma, the level of serum GST- π was 24.4 ± 17.4 ng/ml, which was 23 times higher than the normal average value ($p < 0.01$). The positive rate was 90%. In contrast serum GST- π in 25 cases of chronic hepatitis was determined to be 1.74 ± 1.16 ng/ml, which was not significantly different from the normal value ($p > 0.05$). The pseudo-positive rate was 12.0%.

Key words human placenta type glutathione S-transferase (GST- π), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), hepatocarcinoma

科技消息

JYM-1 型激光荧光免疫分析仪通过鉴定

中科院安徽光学机械研究所研制的 JYM-1 型激光荧光免疫分析仪样机, 6 月 18 日在安徽省医药管理局主持的鉴定会中通过了鉴定, 该机在鉴定会之前由中国人民解放军 301 医院、第二军医大学、军科院二所作了测试, 并与瑞典 LKB 公司产的专利产品 Arcus 时间分辨荧光免疫分析仪作了对比, 鉴定会中又作了技术指标考核, 来自上海、北京、长春、西安、安徽的专家一致认为该机的主要性能指标已达到 LKB 产品的水平, 对 Eu^{3+} 的最低检测限为 10^{-16} mol/孔, 稳定度较好(变异系数 $<7\%$), 线性范围宽(横跨 5—6 个数量级)。对癌胚抗原(CEA)和新生儿促甲状腺素(hTSH)及铁蛋白抗原的测试表明, 它已基本上可满足临床检测的要求。该机用氮分子激光器作为激发光源(LKB

的为氙灯)有自己的特色, 手动控制 12 个样品位, 使机器体积较小, 成本较低, 在电脑控制自动化程度上与 LKB 产品还有较大的差距。该仪器填补了国内的空白, 鉴定小组充分肯定了这一成果, 并希望作进一步改进, 争取早日投产, 满足医学科研之急需。

时间分辨荧光免疫分析技术是世界上近十几年发展起来的新技术, 是当今最先进的微量激素、维生素、蛋白质、酶、核酸、药物的分析技术, 它的灵敏度、线性范围超过了放射免疫分析法, 而无放射性所带来的弊病。该仪器的研制成功, 加之第二军医大学、解放军总医院、华东师大试剂和仪器的配套研制, 必将会加速我国时间分辨荧光免疫分析技术的推广应用。

(胡天喜)