

下腺初提物不同浓度 2 个样品各作 10 次平行测定, 批内变异系数分别为 7.8% 和 6.8% ($16.47 \pm 1.28 \text{ ng/ml}$ 和 $10.41 \pm 0.71 \text{ ng/ml}$), 平均为 7.3%; 三个不同浓度的样品在 2—3 个月内测定 3—6 次, 其变异系数为: 高浓度 17%; 中浓度 8%; 低浓度 8%, 平均为 $11 \pm 5.2\%$ ($n=3$).

2.7 回收实验 样品中加入不同量 EGF ($12.5—3.2 \text{ ng/ml}$), 7 次测定, 回收率为 $105.8 \pm 9.2\%$ ($n=7$).

2.8 AE 及 AE 标记物的稳定性 AE 的稀 HCl 溶液无论在 4°C 或 -30°C 保存, 发光计数在 2—3 月内无明显变化. AE-IgG 中加入保护剂于零下低温保存 6 个月, 在测定 EGF 时, 其标准曲线的线性关系良好; 而不加保护剂在 4°C 保存的标记物, 3 个月以后其线性关系即变得较差.

3 讨 论

吖啶酯标记抗体的发光免疫法简便易行, 标记条件温和, 不易损伤被标物质, 且标记率高. 其次由于被标物质用量极少, 因此它可以用来标记不易获得的微量物质. 所以它的应用范围比 ABEI 更为广泛.

本文在 AE-IgG 保存方面也进行了初步尝试. AE-IgG 不稳定^[9], 在 37°C 放置 7d 后发光值即降到原来的 10%. 本文除在 AE-IgG 中加入 BSA 及异种 IgG 外, 另加入甘油, 于

-10°C 低温保存, 可将使用期延长至 6 个月.

标记物的保存期短是吖啶酯标记物的缺点, Law 等报道^[9], 二甲基 AE 的标记物可稳定保存一年以上. 由此可见, 合成吖啶酯的衍生物是一个理想的方向. 但在国内还无衍生物合成的情况下, 则研究 AE-IgG 的保存方法以延长其使用期限是另一重要的研究方向, 尤其是在国内已有 AE 生产的情况下, 研究 AE-IgG 的保存及推广标记物的应用显得更为重要.

参 考 文 献

- Hollenberg M P, Cuatrecasas P. Human fibroblast receptors related to deoxyribonucleic acid synthesis and amino aciduptake. *J Biol Chem*, 1975; 250: 3845
- Rose S P, Pruss R M, Herschman H R. Initiation of 3T3 fibroblast cell division by epidermal growth factor. *J Cell physiol*, 1975; 86: 593
- Carperter G, Cohen S. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *J Cell physiol*, 1976; 88: 227
- Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*, 1962; 237: 1555
- Hayashi T, Sakamoto S. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor-hEGF levels in human body fluids. *J Pharmacobio-Dyn*, 1988; 11: 146
- Hayashi K, Nomoto H, Kurobe M *et al.* A sensitive two-site enzyme immundassay for human epidermal growth factor (Urogastrone). *Biochem Intern*, 1985; 10: 839
- 蒋滋慧, 刘农乐, 王会信. 吖啶酯标记抗体应用于结核病抗体水平的测定. 军事医学科学院院刊, 1991; (5): 314
- 赵明, 邸宝成, 王会信. 小鼠颌下腺表皮生长因子的分离、纯化与鉴定. 生物化学杂志, 1992; 8: 70
- Law S J, Miller T, Piran U *et al.* Novel polysubstituted aryl acridinium esters and their use in immunoassay. *J Biolumin Chemilumin*, 1989; 4: 88

表皮生长因子受体的分离与纯化

刘以民 陆士新

(中国医学科学院肿瘤医院病室, 北京 100021)

提 要

建立了一种从胎盘合体滋养层微绒毛膜蛋白中简单迅速两步纯化 EGFR 蛋

白的方法。用 Triton X-100 抽提微绒毛膜蛋白，使之两次通过 FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography)系统的 Superose 6 色谱柱纯化。SDS 胶电泳后，得到单一的 170000 分子量 EGFR 蛋白带。纯化后的受体在 EGF, MnCl₂ 和 (γ-³²P)ATP 条件下，仍然保留胞内所具有的对 EGF 敏感的使受体自身磷酸化的蛋白激酶活性。

关键词 表皮生长因子受体, 分离, 纯化

表皮生长因子受体 (EGFR) 是一分子量为 170000 的原生质膜糖蛋白, 成熟的 EGFR 是由 1186 个氨基酸组成。它分为三个部分^[1]: 胞外部分即表皮生长因子 (EGF) 结合区域是由 621 个氨基酸组成, 并且是通过唯一跨膜的 23 个疏水氨基酸固定于质膜上。跨膜部分后面连接许多膜蛋白共同具有的最基本的氨基酸残基, 胞质部分含有 542 个氨基酸, 其中有大约 300 个氨基酸残基与 scr 相关的癌基因编码的酪氨酸蛋白激酶催化部分显示高度同源性。

表皮生长因子结合到其受体上导致该受体酪氨酸激酶的活化, 它使某些胞内蛋白以及其受体本身磷酸化。三个已知的自身磷酸化位点位于 EGF 受体的 C 末端^[2]。

最近 D. Veale 等人用抗 EGFR 的单克隆抗体, 采用间接免疫过氧化物酶技术, 检测非小细胞肺癌中 EGFR 的表达水平^[3], 发现癌组织的着色明显比正常肺组织深, 而鳞状细胞癌与其它类型癌组织染色相比又有显著差别。三期又较一期和二期的非小细胞肺癌要深, 这表明 EGFR 也许是非小细胞肺癌恶性程度的一个合适的指标。说明表皮生长因子受体在某些肿瘤的起始或促进阶段中起作用, 提示我们对受体高表达水平的分析可以对特定的肿瘤提供有用的诊断。因而分离与纯化表皮生长因子受体, 无论对进一步详细研究其结构和功能, 对改变这些分子在细胞上的作用, 还是对制备其单克隆抗体来取得肿瘤预后和诊断的资料都是相当有用和有意义的。

目前国际上主要采用免疫亲和层析来分离该受体, 我们用蛋白快速液相色谱仪从胎盘微绒毛膜蛋白中分离纯化了电泳纯的 EGFR 蛋白。对国内开展 EGFR 的研究工作提供了一

个较好的方法, 为今后我们制备 EGFR 的抗体奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本: 胎盘取自正常分娩或剖腹产胎儿, 由北京垂杨柳医院提供。

1.1.2 试剂: 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺从上海化学试剂商店进口分装。(γ-³²P)ATP (3000Ci/mmol) 进口自 AMERSHAM 公司。mEGF 自 SIGMA 进口。

1.2 方法

1.2.1 EGFR 的分离

1.2.1.1 从胎盘合体细胞滋养层中制备微绒毛膜蛋白 按 N.C. Smith^[4] 等方法。

1.2.1.2 鉴定膜蛋白上表皮生长因子受体 取上述微绒毛膜蛋白约 20mg 溶于 4ml 磷酸盐缓冲液 PBS, pH7.4 中, 再取之 22 μl 加入 3 μl EGF (4 μg/ml), 冰浴 20min, 加入反应缓冲液 (10 ×) 200mmol/L Hepes (pH7.4) 2 μl, 20mmol/L MnCl₂ 3 μl, 再加入 20 μCi [γ-³²P]ATP (3000Ci/mmol) 冰浴 25min。

以下按 Laemmli^[5] 系统进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 聚丙烯酰胺浓度为 5%。固定, 染色。干胶, 放射自显影。

1.2.1.3 EGFR 的分离 上述微绒毛膜蛋白溶液约 5ml 加入等体积的 100mmol/L Hepes pH7.4, 0.15mol/L NaCl 和 5% Triton X-100 的缓冲液, 100000g 离心 30min。取上清。EGFR 则从微绒毛膜蛋白中抽提出来。

1.2.2 EGFR 的纯化

1.2.2.1 FPLC 系统纯化 EGFR 用 100 mmol/L Hepes pH7.4, 0.02% NaN₃ 缓冲液平

衡 Superose 6 色谱柱, 流速为 0.2ml/min, 紫外监测为 280nm, 范围是 1.0AUFs。上样后, 用上述缓冲液洗脱。从 40min 开始收集, 每管收集 10min, 即 2ml。收集到 80min。样品用双蒸水 4℃ 透析 (18—24h)。冷冻干燥。

取上述 5 次纯化的蛋白样品, 溶解于 500 μ l PBS 中, 同样条件, 再过 Superose 6 柱。其中范围为 0.2AUFs。从 30min 开始收集, 每管收集 3min。双蒸水 4℃ 透析 (18—24h), 冷冻干燥。

1.2.2.2 EGFR 的活性鉴定 用 PBS 溶解上述第二次过柱后接收的分子量为 170000 蛋白样品, 进行鉴定。条件同膜蛋白上受体鉴定一样。

2 结 果

2.1 不同时间提取的胎盘膜蛋白, 在 EGF, MnCl₂, (γ -³²P)ATP (3000Ci/mmol) 存在下, 在冰浴中反应 25min, SDS 聚丙烯酰胺 (5%) 凝胶电泳, 放射自显影。放射自显影的片子上有一条分子量 (Mr) 约为 170000 左右的带型 (图 1)。

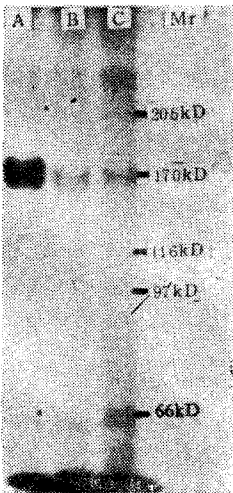


图 1 放射自显影分析

A: 实验前一周提取的胎盘膜蛋白 B: 实验前一个月提取的胎盘膜蛋白 C: 实验前二个月提取的胎盘膜蛋白在 EGF MnCl₂ 和 [γ -³²P] ATP (3000Ci/mmol) 存在下, 激酶反应在 0℃ 进行 25min, SDS 聚丙烯酰胺 (5%) 凝胶电泳, 放射自显影分析

依据表皮生长因子受体的 EGF 激活的酪氨酸激酶及其自身磷酸化的性质, 且分子量为 170000 的膜蛋白可以确定该条带即为表皮生长因子受体^[6]。

2.2 第一次过柱后, 170000 分子量的蛋白基本与其它小分子量的杂蛋白分开了, 但其间

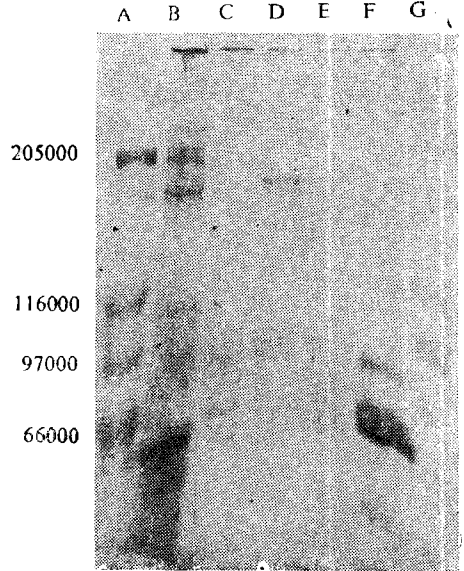


图 2 SDS 聚丙烯酰胺 (5%) 凝胶电泳

A and G: 蛋白分子量标准; B: 上柱前经 TritonX-100 抽提的膜蛋白; C: 40—50min 内洗脱的蛋白; D: 50—60min 内洗脱的蛋白; E: 60—70min 内洗脱的蛋白; F: 70—80min 内洗脱的蛋白

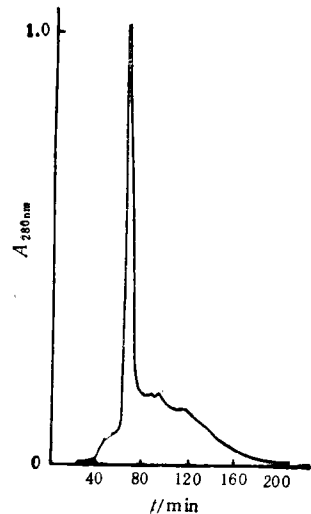


图 3 第一次过 Superose 6 柱的紫外监测曲线

还有部分小分子量的杂蛋白(图 2)。并且,紫外监测的洗脱曲线表明 170000 分子量 EGF 受体在整个杂蛋白中仅占有很小的比例(图 3)。它基本上在 40—70min 之间被洗脱下来。

2.3 第二次过柱后,把接收的蛋白样品进行电泳,在第 9,10 两管得到明显的一条 170000 分子量的蛋白带,并且与其它杂蛋白完全分开。紫外监测的洗脱曲线表明了这一点(图 4)。

2.4 活性鉴定得到一条分子量为 170000 左右带型,并且有较强的放射自显影(图5)。这

样我们分离纯化到了具有天然活性的电泳纯表皮生长因子受体蛋白。

3 讨 论

我们在提取 EGFR 蛋白中,没有采用通常的方法,把胎盘组织进行匀浆抽提,而是制备合胞体滋养层细胞的微绒毛膜蛋白,然后用非离子去污剂进行抽提受体蛋白。这主要是因为用组织匀浆的方法,在胎盘非离子去污剂溶解的组织中,有细胞溶酶体组释放的蛋白酶,这使 EGFR 蛋白很不稳定,有的甚至失去其识别配基的能力^[7]。我们制备合胞体滋养层微绒毛膜蛋白,就可克服此缺点,并获得部分程度的纯化。从图 1 可看出两个月前提取的膜蛋白中,仍有 EGFR 蛋白激酶活性,只是有些减弱而已。我们在以后制备的膜蛋白过程中,又加入了蛋白酶抑制剂(PMSF)。这样,EGFR 蛋白激酶活性可基本上不损失。最近有人已用免疫组织化学的方法定位了人胎盘组织中的 EGFR 蛋白^[8]。

我们所进行的从胎盘合胞体滋养层中分离纯化 EGFR 蛋白的过程中,主要纯化步骤涉及了 FPLC 系统,它给我们提供了一种获得纯化 EGFR 的快速方便的方法。其中我们所选用的 Superose 柱子是一种新设计的高效凝胶过滤柱子。这大大提高了实验的准确性和重复性。国外文献上也曾报道过分离纯化 EGFR 蛋白,但主要是采用亲和层析的方法,并大都是从 A₄₃₁ 细胞中来纯化 EGFR 的。所以,整个实验条件完全靠自己摸索。从结果中我们可看出 EGFR 激酶活力在整个纯化过程中并未丧失,说明了实验条件的可行性。由蛋白考马斯亮蓝染色扫描仪读数分析,以牛血清白蛋白为对照,估算每个胎盘用此方法提纯大约可纯化 EGF 受体 18μg。这与国外用亲和层析纯化受体(20μg/胎盘)相比,产率相当。表皮生长因子受体和癌基因 V-erbB 转化蛋白在氨基酸序列上的同源性从结构上说明了两者之间的内在联系;而 EGF 受体基因在绝大部分来自神经胶质的人脑肿瘤中被放大和重组^[9]。EGF 受体这种超表

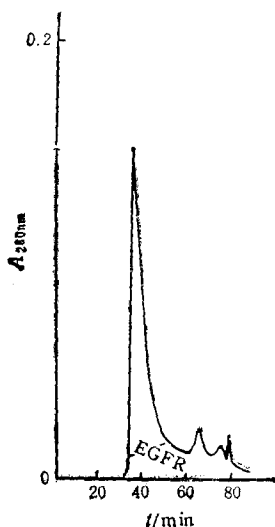


图 4 第二次过柱的紫外监测曲线

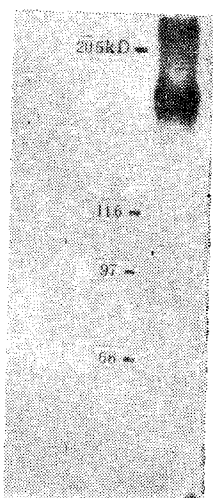


图 5 SDS 聚丙烯酰胺电泳和放射自显影分析

第二次过柱后的蛋白样品,在 EGF, MnCl₂ 及 [³²P] ATP 存在下,冰浴反应后,SDS 聚丙烯酰胺电泳,放射自显影

达的结果, 可能在这些肿瘤的发生和发展中起重要作用。从而能给正常细胞的生长控制和瘤形成的病因学方面的问题提供重要线索。随着对生长因子受体及其基因结构和功能的认识之深入, 有可能对其控制细胞生长、分化机制的研究取得更加令人鼓舞的进展。

本文中关于 FPLC 系统的工作得到本所细胞生物室冯璐同志的热情帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Hunter T. The epidermal growth factor gene and its product, *Nature*, 1984; 311: 414
- 2 Downward J, Parker P, Waterfield M D *et al.* Autophosphorylation sites in epidermal growth factor receptor. *Nature*, 1984; 311: 483
- 3 Veale D, Ashcroft T, Marsh C *et al.* Epidermal growth factor receptors in non-small cell Lung cancer. *Br J Cancer*, 1987; 55: 513
- 4 Smith N C, Brush M G, Luckett S. Preparation of human

- placenta villous surface membrane. *Nature*, 1974; 252: 302
- 5 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680
- 6 Buhrow S A, Cohn S, Staros J V. Affinity labeling of the protein kinase associated with the epidermal growth factor receptor in membrane vesicles from A431 cell. *J Biol Chem*, 1982; 257: 4019
- 7 Smith C H, Nelson D M, King B F *et al.* Characterization of a microvillous membrane preparation from human placental syncytiotrophoblast: A morphologic biochemical and physiologic study, *Am J Obstet Gynecol*, 1977; 128: 190
- 8 Maruo T, Mochizuki M. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor and *myc* oncogene product in human placenta: implication for trophoblast proliferation and differentiation. *Am J Obstet Gynecol*, 1987; 156(3): 721
- 9 Libermann T A, Nussbaum H R, Razon N *et al.* Amplification, enhanced expression, and possible rearrangement of the EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature*, 1985; 313: 144

激光陷阱在显微生物活体研究中的应用*

李银妹 高成岳 姚 焜 郭光灿

(中国科学技术大学物理系, 合肥 230026)

提 要

利用激光的力学效应设计三维的光学陷阱, 在显微镜下能成功地捕获和操纵活的生物体。这种激光光钳技术可为细胞学研究提供一种新的有效的实验手段。

关键词 激光陷阱、捕获、生物活体、显微观察

激光陷阱的形成是利用基模 (TEM₀₀) 高斯光束力学效应的原理。一旦微小的粒子 (如生物细胞或固体微粒) 落入阱中将会被束缚而难逃脱^[1-5]。

高斯光束在与光轴垂直的横截面上的光强分布为高斯函数。光束中心光强最大, 远离光束中心, 光强将迅速减弱。当位于光轴附近的微小粒子与高斯光束相互作用时, 就受到由于光强梯度分布而产生的力的作用。当透明粒子

的折射率大于周围介质的折射率时, 这个梯度力指向光轴, 于是便形成一个以光轴为中心的二维光学势阱, 粒子将被束缚在光轴上。

由于在光轴方向仍然存在轴向推力, 故二维势阱不能完全把粒子束缚在一个点上, 粒子在轴向力的作用下将沿着光轴传播的方向运动。在实验上采用强聚焦的高斯光束, 使得束

* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1991-09-25 修回日期: 1991-11-15