

在对 118, 138 人普查 AFP 阴性人群的八个月随访中, 又陆续发现了 9 例血清 AFP 阳性的肝癌患者, 其中的一部份也可视为血清 AFP 普查的“假阴性”病例。推测可能与当时 AFP 含量较低有关, 提高检测的敏感度有可能减少这种“假阴性”的情况。目前, 我国部份地区已开始采用间接反向血凝试验、放射火箭电泳自显术等较为敏感的检测方法进行血清 AFP 的肝癌普查工作, 相信可以进一步提高血清 AFP 普查原发性肝癌的价值。

参 考 文 献

- [1] Abelev.G.I Adv. Cancer Res. 1971, 14, 295.
- [2] 上海市肿瘤防治研究协作组, 中华医学杂志, 第 8 期, 454 页, 1973 年。
- [3] 中国肝癌研究协作组, 第二届国际肿瘤预防和早期诊断会议资料。意大利, 1973 年 4 月。

II. 放射火箭电泳自显影术和放射对流免疫 电泳测定人体血清甲种胎儿蛋白

摘 要

本文介绍两种测定甲种胎儿蛋白的新技术——放射火箭电泳自显影术和放射对流免疫电泳。前法系根据标记抗原特异性参入的原理结合放射自显影术和火箭电泳的条件而建立的定量测定法, 后法系根据放射免疫的原理结合对流免疫电泳的条件而建立的定量测定法。此二方法具有简便、稳定、特异性强和灵敏度较高以及快速等优点。

近几年来, 我国血清甲种胎儿蛋白 (AFP) 研究的快速进展, 促进了 AFP 检测技术的发展^[1~3]。琼脂扩散、对流免疫电泳、火箭电泳^[1], 补体结合试验^[4], 放射免疫测定^[5]等检测技术已广泛应用于原发性肝细胞癌的临床诊断、血清学普查和研究工作。为了找寻快速、简便、可靠的灵敏测定方法, 我们又建立了放射火箭电泳自显影术和放射对流免疫电泳测定技术, 它们具有简便、稳定、特异性强和灵敏度较高以及快速等优点。

材 料 和 方 法

1. 材料: 纯化 AFP。抗 AFP 抗血清。放射性碘标记 AFP。

2. 方法:

放射火箭电泳自显影术的抗体琼脂板及其电泳条件: 在 6 cm×10 cm 的玻璃板上,

浇 1% 琼脂 20 mL，内含抗 AFP 抗血清 0.1—0.25% V/V。样品孔排列如图 1 所示。每孔加样品 20 μ L 和 131 I-AFP 0.5 μ L，新鲜标记的 131 I-AFP 用量为 0.1ng, \sim 4,000 cpm。电泳介质巴比妥钠-巴比妥酸缓冲液 (pH 8.6, 0.04 M) 电场强度 5v/cm。电泳 2 小时后，用生理盐水洗去未结合蛋白，干燥琼脂层，用 X 光底片通过放射自显影，显示抗原-抗体复合物的沉淀峰。实验测得峰的高度与被测抗原量呈现特定函数关系。

放射对流免疫电泳的琼脂板及其电泳条件：在 6.5 cm \times 13.5 cm 的玻璃板上，浇 1% 琼

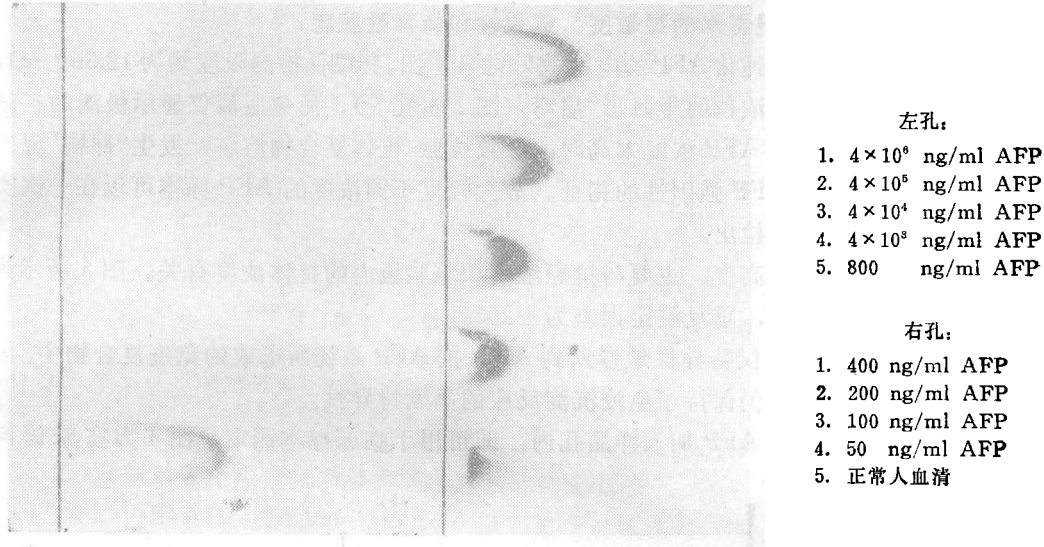


图 1 不同标准浓度AFP和正常人血清的放射火箭电泳自显影图

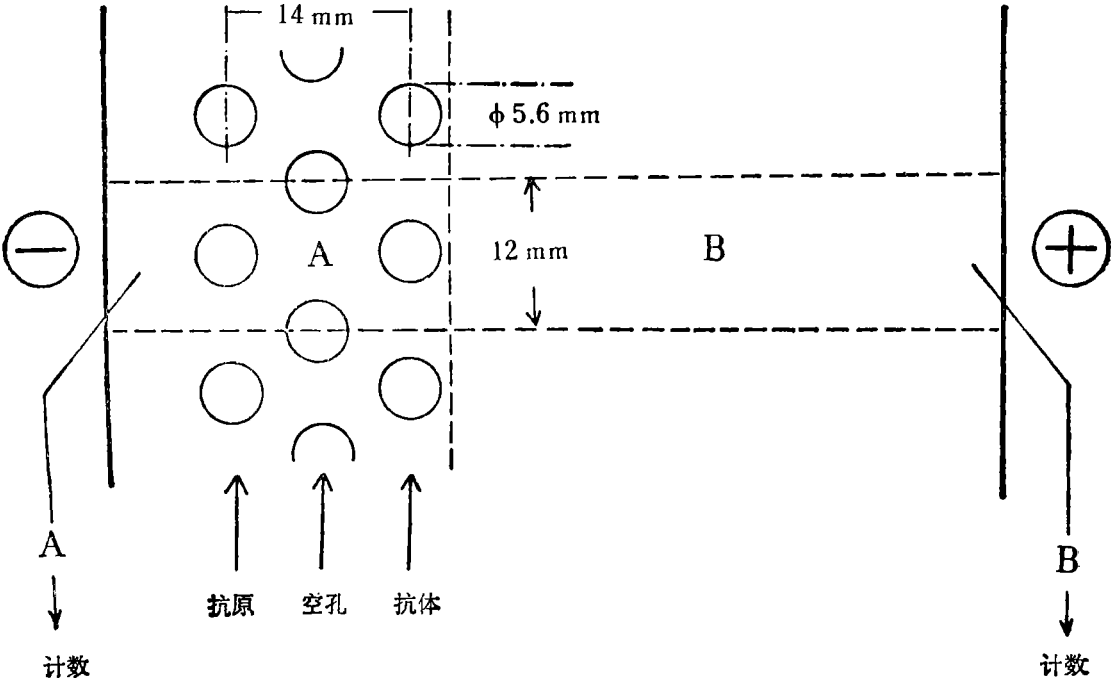


图 2 放射对流免疫电泳琼脂凝胶板及其切割示意图

脂 40 mI。琼脂板上孔的排列如图 2 所示。电泳介质巴比妥钠-盐酸缓冲液(pH 8.6,0.05M), 电场强度 3-4 v/cm。电泳完毕后, 按图 2 虚线所示, 沿抗原-抗体电泳方向, 将每一对抗原-抗体琼脂条切成琼脂段 A 和 B, 用 γ 射线计数器分别测定 A 段和 B 段的放射性。

结 果 与 讨 论

1. 放射火箭电泳自显影术的灵敏度、重复性和特异性鉴定。

图 1 所示为不同浓度纯化 AFP 的电泳放射自显影图。其最低检测限度约为 12.5ng/ml, 正常人血清标本均显示一浓稠的半月形“眉弯”(图 1 右孔 5), 而兔血清仅显示极淡的扩散阴影, 两者极易区分。当 AFP 浓度太高时, 导致抗原-抗体复合物溶解, 发生“冲刷”现象(图 1 左孔 1-4), 这是 AFP 强阳性的指征。故大幅度不同浓度的 AFP 标本可以在一次实验的同一块琼脂板上直接检出。

免疫沉淀物显影峰的高度, 主要与抗原浓度和琼脂板内的抗体浓度有关。图 3 所示为临床诊断上所用标准曲线, 重复测定误差为 $\pm 20\%$ 。

实验表明, ^{131}I -AFP 仅特异性地参入到 AFP-抗 AFP 系统所形成的免疫复合物中, 因此放射火箭电泳自显影术仍保持了免疫沉淀反应的高度特异性。

用血清标本代替纯化 AFP 加入样品孔内, 即可用于临床标本测定, 图 4 为临床诊断上的血清放射自显影图。

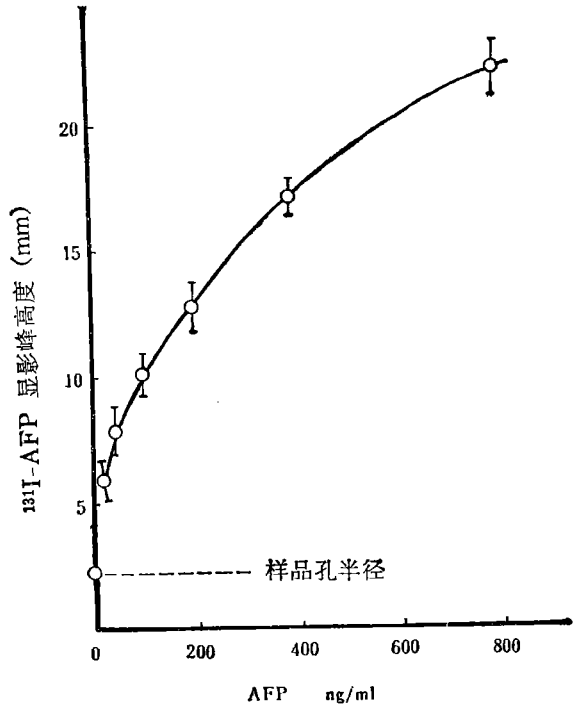


图 3 临床诊断中应用的 AFP 放射火箭电泳自显影标准曲线

○ 五次实验平均值

I 标准差

抗体浓度 0.25% (V/V)

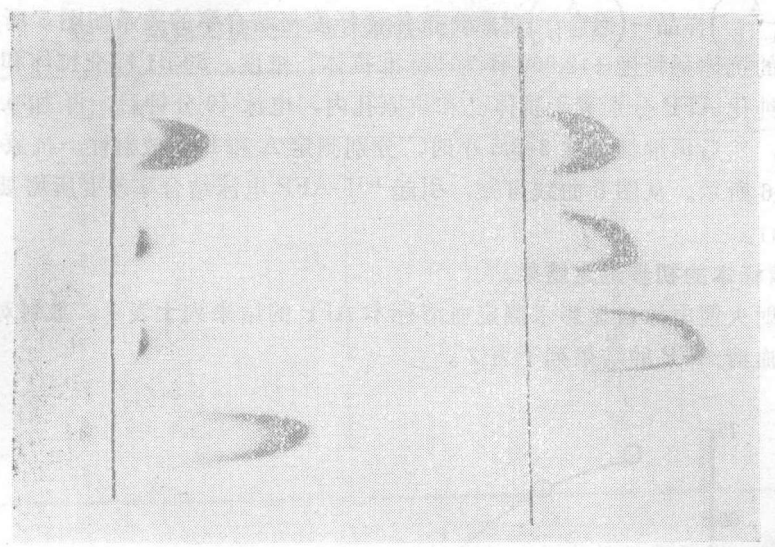


图4 血清标本的放射火箭电泳自显影图

左孔: 1. 标准抗原(100 ng/ml)
2. 某正常人血清(<20 ng/ml)
3. 某肝炎血清(<20ng/ml)
4. 肝癌血清(600 ng/ml)

右孔: 1. 标准抗原(100 ng/ml)
2. 肝癌血清(130 ng/ml)
3. 肝癌血清(520 ng/ml)
4. 肝癌血清(>1000 ng/ml)

2. 放射对流免疫电泳的结合率和标准抑制曲线。

0.5 ng ^{131}I -AFP (20,000—40,000 cpm) 置于抗原孔内, 50 μl 不同稀释度抗体置于抗体孔内。对照孔不加抗体。电泳 3.5 小时后, 分别计数 A 和 B 的放射性。

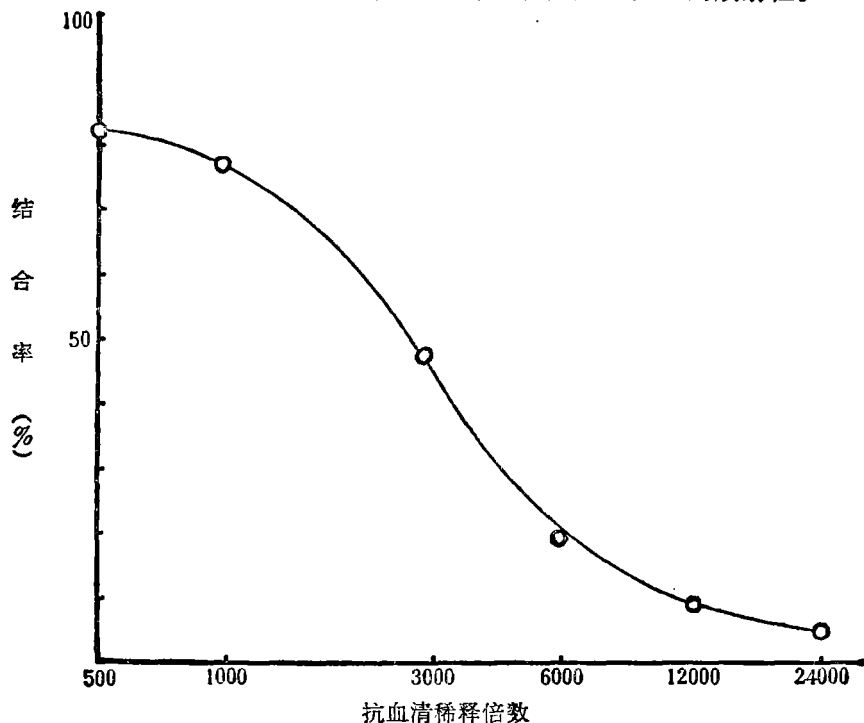


图5 放射对流免疫电泳的抗血清稀释度与电泳结合率的关系

结合率= $\left(\frac{A}{A+B}\right)$ 样品- $\left(\frac{A}{A+B}\right)$ 对照。抗体稀释度与结合率的关系如图 5 所示, 选用结合率约为60%的抗体稀释度 1:2,000 作为“标准抗体”浓度。50 μ l 标准抗体和 50 μ l 不同浓度的非标记纯化 AFP 分别置于抗体孔和抗原孔内, 电泳 40 分钟后, 再加 0.5 ng 131 I-AFP 于抗原孔内, 然后再继续电泳 3-3.5 小时, 分别测定 A 和 B 的放射性。抗原浓度与结合率的关系如图 6 所示。从图 6 曲线可知, 引起 131 I-AFP 电泳结合率改变所需要的 AFP 浓度约为 5 ng/ml。

3. 血清标本的初步测定结果。

应用放射火箭电泳自显影术测定血清标本 AFP 的结果列于表 1。放射对流免疫电泳测定正常人血清 AFP 的结果列于表 2。

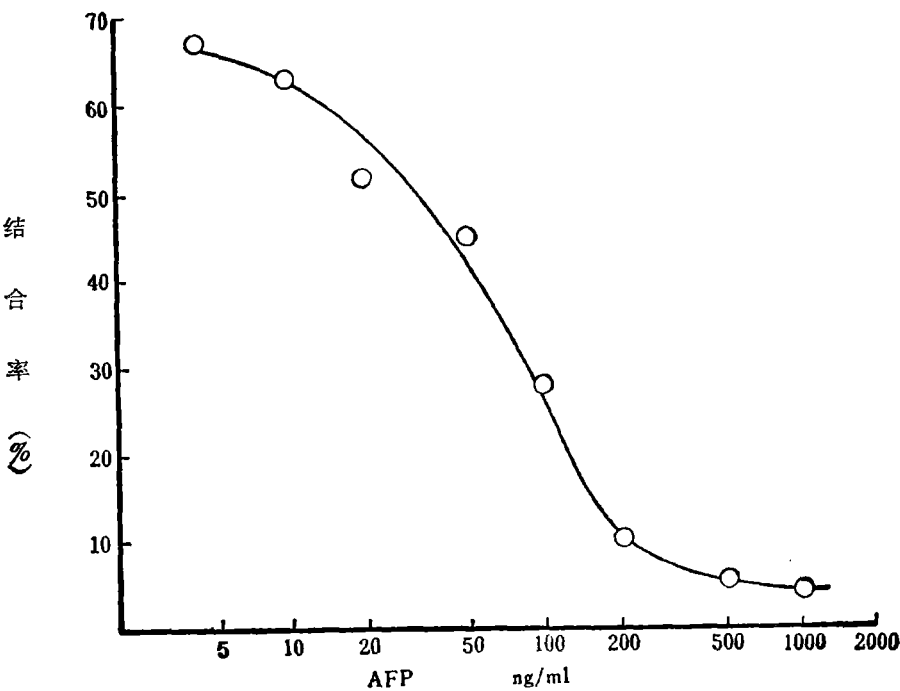


图 6 放射对流免疫电泳的标准抑制曲线

表 1, 放射火箭电泳自显影术测定血清标本 AFP 结果

	总 数	<20 ng/ml	20-300 ng/ml	>300 ng/ml
正常人	200	200	0	0
病理证实肝细胞型肝癌	30	4	1	25
转移性肝癌	41	37	4	0
慢性肝病	50	全部低于 300 ng/ml		

表 2, 放射对流免疫电泳测定正常人血清结果

健康献血员血清	ng/ml
1	24
2	9
3	7
4	7
5	13
6	11
7	13
8	12

上述两种方法具有简便、稳定、特异性强和灵敏度较高以及快速等优点。放射火箭电泳自显影术, 不需要射线计数器, 目前已应用于农村肝癌普查。

参 考 文 献

- [1] 中国肝癌研究协作组。第二届国际肿瘤预防和早期诊断会议资料。意大利, 1973年4月。
- [2] 上海市肿瘤防治研究协作组。中华医学杂志, 1973年第8期454页。
- [3] 本文第1部分。
- [4] 北京生物制品研究所肿瘤免疫组。中华医学杂志, 1973年第8期460页。
- [5] 上海实验生物研究所, 上海第二医学院瑞金医院。中华医学杂志, 1973年第8期463页。