

胃癌单克隆抗体MGcl相应抗原的初步研究

第四军医大学西京医院消化实验室 张积仁 张学庸 陈希陶 牟震光 胡家露

樊代明 陈宝军 乔太东

〔摘要〕 本文报告一株鼠抗人胃癌单克隆抗体MGcl相应抗原的纯化及分析。MGcl经50%饱和硫酸铵盐析, DEAE—52纤维素柱层析后, 获得纯化的IgG56.31mg与2g溴化氰活化的sepharose 4 B偶联, 制备免疫吸附剂。用MGcl免疫亲和层析的方法从胃癌组织中纯化出MGcl相应抗原, 经蛋白酶处理, 高碘酸氧化, 电泳脂蛋白染色, SDS—PAGE及Immunoblotting等实验分析证实MGcl相应抗原是一种低分子量的糖蛋白, 分子量为72Kd和52kd。

关键词 胃肿瘤 亲和层析 单克隆抗体 抗原

单克隆抗体技术的建立为肿瘤相关抗原的研究开辟了新的途径, 近年来应用单抗已发现了一些消化道肿瘤相关抗原, 但对胃癌的血清学诊断尚缺乏一定的特异性⁽¹⁾。为寻找新的具有临床诊断价值的胃癌相关抗原, 本文对一株特异性较好的鼠抗人胃癌单克隆抗体MGcl⁽²⁾的相应抗原进行纯化和分析。

材料与方法

1. 可溶性抗原提取液制备 取经免疫组化(ABC法)证实MGcl相应抗原表达阳性的胃癌组织50g, 去除正常粘膜坏死组织, 生理盐水洗净, 剪碎, 加入抽提缓冲液(10mM Tris-HCl, 2mM PMSF, 2mM EDTA, 0.25% Nonidet P40 PH8.0)匀浆, 4℃下离心100000xg 1小时, 取上清对0.01M PBS (PH 7.4)透析后, 离心20000xg 30分钟, 取上清备用。

2. MGcl的纯化及免疫吸附剂的制备, 取含MGcl的小鼠腹水8ml, 用50%饱和硫酸铵盐析沉淀, 透析后上DEAE-52纤维素柱(pharmacia产品)($\varnothing 2.5 \times 25\text{cm}$), 洗脱杂蛋白后用0—150mM NaCl梯度洗脱, 收集IgG峰⁽³⁾。纯化的MGcl对0.01M NaHCO₃缓冲液(含0.5M NaCl PH 8.3)充分透析后, 参照文献⁽³⁾与溴化氰活化的sepharose 4 B (pharmacia产品)偶联, 计算偶联率及预处理。

3. MGcl相应抗原的纯化 取可溶性抗原提取液30ml, 4℃下缓慢通过MGcl-sepharose 4 B免疫亲和层析柱($\varnothing 1.0 \times 10$), 3滴/分, 0.01M PBS (含0.5M NaCl PH 7.4)充分洗脱未吸附蛋白至OD_{280nm} < 0.01, 改用0.01M PBS-3M 硫

氰酸钾解离MGcl吸附的抗原, 收集抗原解离峰, 透析, 浓缩, 备检。

4. 抗原的蛋白酶处理和高碘酸氧化实验 取免疫亲和层析纯化的MGcl相应抗原, 包被于硝酸纤维素薄膜上, 每个斑点5ul, 经处理后, 分别将着斑的薄膜置于胰蛋白酶(国产)(5mg/ml), 链霉蛋白酶(Merk 公司)(0.6mg/ml)和NaIO₄(1mg/ml)溶液中, 分别于37℃和4℃作用1小时, 用MGcl单抗检测, 具体步骤参照文献⁽⁴⁾进行。用PBS代替蛋白酶及NaIO₄作阳性对照, 以正常小鼠血清代替MGcl作阴性对照。

5. 抗原的电泳脂蛋白染色分析, 取纯化抗原经乙酰苏丹黑10B预染后, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳。(分离胶浓度4%, 浓缩胶浓度2.5%), 对照用人血清, 具体步骤按常规方法进行。

6. SDS-PAGE和Immunoblotting分析, 取纯化的MGcl相应抗原(浓度1mg/ml), 低分子量标准蛋白(上海东风试剂厂), 在还原条件下行SDS-PAGE(分离胶浓度11%, 浓缩胶3.5%), 电泳后考马斯亮蓝染色⁽⁵⁾, 同样条件下, 电泳完毕后行转移电泳将凝胶中的抗原成份转移至硝酸纤维素薄膜上, 行免疫酶染色⁽⁴⁾。

结果

1. 共制备可溶性抗原提取液100ml。

2. 含MGcl小鼠腹水8ml, 获纯化的MGcl 56.31mg, 与2g溴化氰活化的sepharose 4 B偶联, 偶联率为98%。

3. MGcl-sepharose 4 B免疫亲和层析柱与可溶性抗原提取液反应后, 用0.01M PBS洗脱杂蛋白(图1峰1)后, 0.01M PBS-3M 硫氰酸钾

解离。与解离液OD 280nm自身吸收峰对照(图1峰3),可见有明显的抗原解离峰出现(图1峰2)。薄膜斑点实验检测证实为MGcl相应抗原。

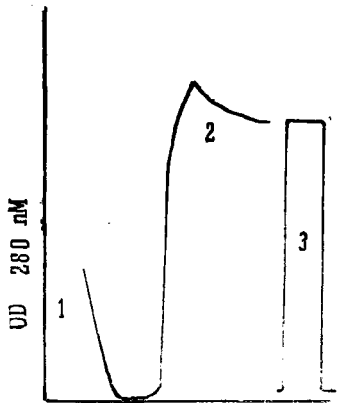


图1 MGcl免疫亲和层析记录曲线

4. 电泳乙酰苏丹黑10B染色人血清显示出明显的脂蛋白条带,而MGcl相应抗原则无脂蛋白条带出现(图略)。

5. 纯化的MGcl抗原能与MGcl特异性结合薄膜斑点检测阳性。MGcl相应抗原活性不受胰蛋白酶及链霉蛋白酶水解的影响,呈阳性斑点,但高碘酸钠氧化后则活性丢失,呈阴性斑点,阴性对照为阴性。

6. SDS-PAGE考马斯亮蓝染色MGcl相应抗原呈现二条带(图2带2),转移电泳后免疫酶染色二条带均能被MGcl识别(带3),与标准分子量蛋白对照(带1),MGcl相应抗原二条带分子量为72kd和52kd。

讨 论

MGcl相应抗原电泳乙酰苏丹黑10B脂蛋白染色阴性,考马斯亮蓝染色阳性,耐热⁽²⁾,抗原活性

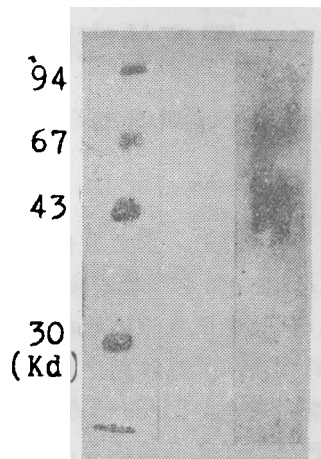


图2 SDS-PAGE和免疫印渍分析

不受胰蛋白酶,链霉蛋白酶水解的影响,但高碘酸钠氧化后则检测不出抗原活性,故认为MGcl相应抗原是一种胃癌相关糖蛋白抗原,其抗原决定簇存在于糖链上,与已报道的糖脂类抗原不同,如CA19-9。免疫组化染色证实MGcl能与82.4%的胃癌发生阳性反应,而与肝癌,胰腺癌,皮肤癌,卵巢癌等肿瘤呈阴性反应,对胃肠等多种正常组织及血细胞呈阴性反应⁽²⁾,不是CEA,AFP,X半抗原,Y半抗原及涎酸化的X抗原,Tn抗原⁽²⁾,故认为MGcl相应抗原是一种新的具有研究价值的胃癌相关抗原。

参 考 文 献

1. Hakomori S. Ann Rev Immunol 2:103 1984;
2. 樊代明等. 第四军医大学学报 9(4):230, 1988
3. Hissey PH, et al. J Immunol Methods 1985; 78(2):211
4. 董志伟等. 中华肿瘤杂志. 9(2):85 1987;
5. Laemmli UK. Nature 227(5260):680, 1970
6. Towbin H, et al. Proc Natl Sci USA. 76(3):1350. 1979

STUDY OF THE CORRESPONDING ANTIGEN OF A MONOCLONAL ANTIBODY (MGCl) AGAINST GASTRIC CANCER

Zhang Ji Ren et al

Laboratory of Gastroenterology, Xi'Jing Hospital, The Fourth Military Medical University(Xi'an)

The corresponding antigen of a monoclonal antibody (MGcl) against gastric cancer was purified and partially characterized. The MGcl was purified by passing through a DEAE-cellulose column and covalently coupled to CNBr-activated Sepharose 4B. By means of immunoaffinity chromatography, the corresponding antigen of MGcl was purified from gastric cancer tissue. The results of periodate oxidation, SDS-PAGE and Immunoblotting studies suggest that the corresponding antigen of MGcl is a glycoprotein with molecular weight of 72 KD and 52 KD.

Key words stomach neoplasms, affinity chromatography
monoclonal antibody, antigen,