

膜上的能力,从而使张力纤维丧失。对焦点粘着斑内的附加成分,对把细胞间质成分(胶原蛋白、粘连蛋白等)连到肌动蛋白上的跨膜成分,以及最重要的,对于把肌动蛋白纤维通过 **Vinculin** 和 **talin** 连接到膜上的跨膜蛋白的鉴定,对于细胞形状相关的生长控制之分子剖析是必要的。不断积累的证据表明,一些属于酪氨酸激酶的癌基因产物蛋白可以诱导细胞骨架的改变,后者是在由粘着斑成分磷酸化引起的转化之后发

生的。阐明癌基因蛋白作用的机制,对于理解恶性转化过程中导致正常生长调控的信号传递系统破坏的机制具有极大的重要性。

汪望仁 译自 *Biochimica et Biophysica*

Acta, 780, 197—212(1985)

何大澄校

(完)

(译文内参考文献可查原文)

组织培养次生代谢产物 VI. 甾类化合物 (放射免疫测定法 Radioimmunoassay)*

获森 学

在植物界中所发现的甾类化合物,除普遍存在的固醇外,也特异地存在于有限的植物种中,如椰子油中所含的雌酮,蕨类和罗汉松目植物中所含有昆虫蜕皮激素(ecdysones),马铃薯所含的茄碱(solanine),甾体激素合成的重要原料——薯蓣属植物的甾类化合物皂角苷(saponin),作为重要的心脏功能不全的特效药毛地黄属植物所含的强心配糖体[毛地黄毒苷(digitoxin)和地高辛(digoxin)]等都可作为代表。

灵敏度高、特异性好的 RIA(放射免疫法),用于少量植物培养细胞中微量甾类化合物的定量时十分有效。本文即介绍甾类化合物的 RIA。

1. RIA 的原理

RIA 是利用抗原抗体反应进行定量的方法,首先制备需定量物质的抗体,因甾类化合物这样的低分子化合物不具有抗原性,将其原样注射到动物体内不会产生抗体。但若将其与蛋白质结合而注射这一结合体,就可获得与这一化合物特异性结合的抗体。此时这一化合物称为这一抗体的半抗原或不完全抗原(hapten)。定量的抗体中加入定量的同位素标记的半抗原和含有未知量非标记的半抗原,由于抗原抗体反应,标记半抗原和非标记半抗原与抗体竞争性的结合。此后,将抗体·半抗原结合体和游离的半抗原进行分离,测定抗体·半抗原结合部分的放射能。试验材料中半抗原含量少时,抗体·半抗原结合体中标记半抗

原的比例高,反之则低。用已知量非标记半抗原作出标准曲线,便可确定试验材料中半抗原的数量(图 1)。

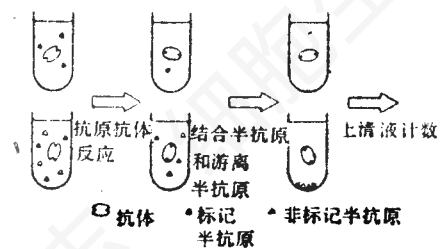


图 1 RIA 的原理

2. 测定方法

A. 抗原的制备

如上所述,为使甾类化合物具有抗原性须与蛋白质结合。作为载体蛋白质,最好用牛血清白蛋白。甾类化合物与蛋白质结合的有代表性的方法是利用甾类化合物的羰基或羟基作为与蛋白质结合的部位,在利用羟基时以半丁二酸盐(hemisuccinate)作中间体;用羰基时以肟(oxime)作为中间体。用氯甲酸异丁酯(isobutylchlorocarbonate)进行混合酐(mixed anhydride)反应,以此作为与蛋白质结合的方法^[1,2]。

* 本文摘释自山田康之编著“植物细胞培养マニエユル”一书的第78—84页

图2表示脱氢异雄甾酮(dehydroisoandrosterone)以此方法与蛋白质结合的例子。获得的甾类化合物·蛋白质结合体冰冻干燥后保存。

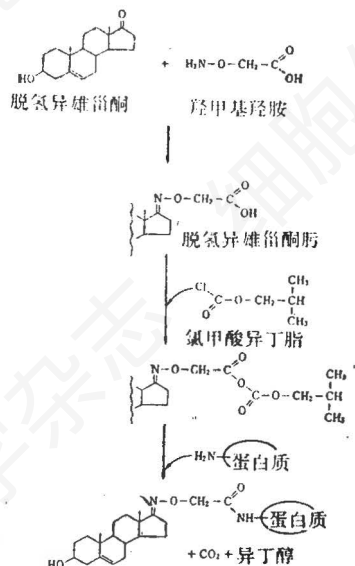


图2 脱氢异雄甾酮与载体——蛋白质的结合

B. 抗血清的制备

在1 ml的4 mg/ml甾类化合物·蛋白质结合体水溶液中,加入 Freund完全佐剂1.5 ml充分混合。将这一混合液注射到兔肌肉内,每次0.2 ml。因为动物产生抗血清的抗体效价和特异性有个体差异,所以从多个个体制备抗血清,从中选用最好的抗血清。每周一次经过十周反复注射后,从耳静脉试行采血,检查出抗体效价十分高者,进行全采血。所采血液在4℃下静置一夜后收集上清液。残余物在4℃,2000×g离心10分钟分离出上清液。将此上清液(血清)少量分装在安瓿瓶中,冷冻干燥后封口,于-20℃下保存。这样保存的抗血清,其活性可维持数年。

C. 测定

在水浴中,于离心管内加入磷酸缓冲液(0.01 mol/L Kpi, 0.15 M NaCl, pH 7.3)0.5 ml,牛血清白蛋白1%水溶液0.1 ml,标记半抗原水溶液(0.1 μci/ml)0.1 ml,试验材料溶液0.1 ml混合后,加入0.1 ml的抗血清稀释液,混合后在24℃下温育30分钟。此时由于抗原抗体反应,标记半抗原和试验材料中非标记半抗原与抗体结合,然后,反应液再用冰冷却,加入0.5 ml的冰冷的多缩葡萄糖(dextran)·木炭悬浊液互相混合,冰冷下放置10分钟后,在0℃,2000 rpm离

心10分钟进行分离,游离的半抗原被多缩葡萄糖吸附,因离心而与木炭一同沉淀;与抗体结合的半抗原不被吸附而保留在上清液中。取上清液0.5 ml放入测定专用的小瓶内,加入乳化的闪烁剂液,用液闪计数器测定放射能。多缩葡萄糖·木炭悬浊液是用上述缓冲液配制10 mg/ml的多缩葡萄糖T-70溶液和10 mg/ml的活性炭悬浊液,在使用前等量混合,置于冰冷处备用。标记半抗原的比活性高,则测定灵敏度增加。

3. 抗血清的抗体效价、灵敏度、特异性的探讨

A. 抗体效价

抗血清的抗体效价是将逐级稀释的血清分别和一定量的半抗原反应时,与半抗原结合50%的稀释度(通常从1/500至1/100,000之间)。选定RIA的条件时,首先应在达到抗体效价的稀释抗血清中确定以后最适的稀释度。

B. 灵敏度

测定灵敏度不依据抗体效价,而取决于抗体的对半抗原的结合常数。结合常数可用平衡透析法进行测定。用以半透膜分隔为I、II两室的容器,I室放入抗血清,II室放入半抗原溶液使之达到平衡。平衡后I室存在游离的半抗原与与抗体结合的半抗原。II室只有游离的半抗原,其浓度与I室的游离半抗原相同。分别测定两室的半抗原总量,从I室的数值减去II室数值,即能确定与抗体结合的半抗原浓度(B)及游离半抗原浓度(C),每一抗体分子的结合部数为n,抗血清中的抗体浓度为[Ab],抗体的结合常数为K,则成立下列方程式:

$$\frac{1}{B} = \frac{1}{n[Ab]k} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{n[Ab]}$$

1/B与1/C呈线性关系,由1/C→0可外推决定1/n[Ab]。n通常假定为2,因而可决定[Ab]。更进一步,若每一抗体分子的半抗原的平均结合常数为K₀,抗体的不均一指标不均一指数(heterogeneity index)为a时,下列关系成立:

$$\log\left(\frac{1}{n-r}\right) = a \log K_0 + a \log C$$

$\log\left(\frac{r}{n-r}\right)$ 对log C在Sips作图时(sips plot)呈直

线,a由斜率决定,K₀由Y截距决定。K₀通常约为10⁹ l/mol^[3]。测定的灵敏度是K₀倒数的1/10。图3示毛地黄毒苷的RIA标准曲线。

B₀是未加入非标记毛地黄毒苷时,与抗体结合的标记毛地黄毒苷的量。B是加入非标记毛地黄毒苷

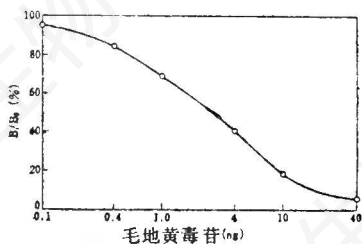


图3 毛地黄毒苷(digitoxin)RIA的标准曲线

时,与抗体结合的标记毛地黄毒苷的量。非标记毛地黄毒苷的添加量对 B/B_0 作图见图3。

C. 特异性

抗体对半抗原以外物质有结合能力,对这一物质的抗体交叉反应(Cross reactivity, CR)以下列方程式数值化。

$$CR\% = \frac{50\%B/B_0(\%) \text{ 需要的半抗原 Mol 数}}{50\%B/B_0(\%) \text{ 需要的该物质 Mol 数}} \times 100$$

各种甾类化合物对作者制备的抗毛地黄毒苷抗体的CR%是:地高辛(digoxin)等其他种类强心配糖体为1~10%,甾醇(sterol)类0%^[4]。毛地黄毒苷和地高辛不同之处仅是12位羟基的有无,抗体能充分识别这种差异。

4. 测试材料的准备

由于抗体的特异性很高,通常粗抽提物的稀释水溶液就可供RIA测定。但是在试验材料中预期存在交

叉反应性高的物质时,必须用薄层层析等方法将其除去。此外,有机溶剂也妨碍抗原抗体反应。作者进行毛地黄毒苷的RIA时,由于用了0.1 ml乙醇,便阻止反应60%。所以植物组织的乙醇提取液须用水稀释10倍以上,方能供RIA的测定。

与比色定量法和各种色层分析法(Chromatography)相比,RIA法是灵敏度和速度均优的方法,但必需用同位素是其缺点。近年来利用与RIA相同的原理,开发出酶代替同位素的酶标免疫测定法(Enzymeimmunoassay, EIA)正在普及^[5]。这一方法的灵敏度、特异性均和RIA相同。RIA与EIA正在被积极地研究应用于多种物质,研究对象的范围正日益扩大。

(周荣仁译,周郑校)

参 考 文 献

- [1] B. F. Erlanger., F. Borek, S. M. Beiser and S. Lieberman., 1957, *J. Biol. Chem.*, 228: 713.
- [2] F. G. Péron and B. V. Caldwell (ed.), 1970, *Immunologic Methods in Steroid Determination*. p 16.
- [3] 山村雄一ほか編, 1973, 改订新版免疫化学, p 481, 朝仓书店。
- [4] M. Hagimori, T. Matsumoto and T. Kikasaki, 1980, *Plant Cell Physiol.*, 21: 1391.
- [5] S. P. Colowick and N. O. Kaplan., 1980, *Methods in Enzymology*, 70: 419, Academic press.
- [15] Richardson, C. D., et al., 1983, *Virology*, 131(2): 518-532.
- [16] White, J., et al., 1982, *Nature*, 300 (5893): 658-659.
- [17] Wyke, A. M., et al., 1980, *Biochem. J.*, 190(3): 625-638.
- [18] Ahkong, Q. F., 1973, *Nature New Biol.*, 242: 215-217.
- [19] Martin, F. J., et al., 1976, *J. CELL Biol.*, 70: 506-514.
- [20] Maggio, B., et al., 1976, *Biochem. J.*, 158: 647-650.
- [21] Kao, K. N., et al., 1974, *Planta*, 115: 355-367.
- [22] Senda, M., et al., 1979, *Plant & Cell Physiol.*, 20: 1441-1443.
- [23] Zimmermann, U., 1982, *Biochim. Biophys. Acta.*, 694: 227-277.
- [24] Pohl, H. A., 1978, *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press, Cambridge.
- [25] Cohen, F. S., et al., 1980, *J. Gen. Physiol.* 75: 251-270.
- [26] Chaudhury, M. K., et al., 1981, *Biochim. Biophys. Acta.*, 694: 365-374.

(接第167页)

ted by E. D. Korn, Plenum Press.