

从我们的工作中可以看出,免疫化学技术应用在固氮酶的研究中是可行的。纯化后的固氮酶组份 I 的抗血清,不仅可以检查出在大量氨和无氨条件下 AV230 生长的区别,而且也在今后在固氮酶的研究中,应用免疫化学技术开辟更广阔的途径。由于免疫化学高度的敏感性和专一性,也可以用它来筛选固氮生物,进行固氮遗传学研究,进而推动生物固氮研究工作的进展。

本工作曾得到宣武医院盛树力大夫和李天

佑大夫的协助与指导及本组同志们的大力帮助,特此致谢。

主要参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所七室:《植物学报》,1973年,第15卷,第2期,第281页。
- [2] Davis, L. C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 256, 1972.
- [3] Layne, E.: *Methods in Enzymology*. Vol. III (Eds. S. P. Colowick and N. O. Kaplan) 1957: Acad. Press, N. Y. P. 450.

[本文于 1978 年 11 月 27 日收到]

抗体的免疫荧光定量测定法

王征太 何赐科 欧阳恒静 李倩

(重庆医学院生化教研室)

随着免疫学理论与实验研究的迅速发展,在临床医学以及病因学、发病学的研究工作中都迫切要求建立灵敏、可靠的抗体检测法,特别是简易的定量测定法。检出抗体(Ab)的方法,是依赖于 Ab 与特定抗原(Ag)的特异的结合反应,生成抗体-抗原复合物(Ab-Ag)。这是最基本的反应,定为“一级”反应。此外,在“一级”反应的基础上亦即生成 Ab-Ag 后,在一定的条件下,在体外引发的现象如沉淀反应、凝集反应等称为“二级”反应;而在体内引发的现象称为“三级”反应,如被动皮肤过敏反应等^[1,2],也都可能为检出 Ab 的依据。

显然,由于“一级”反应是显示抗体的最本质的反应,是最可靠的依据。而“二级”、“三级”反应则是有条件性的,所以为了获得可靠结果,必须在采用的多种检出 Ab 的方法中至少有一种方法是基于“一级”反应的 Ab 检出法。不少材料指出,基于“一级”反应的方法能检出相当量的 Ab,而用基于“二级”或“三级”反应的方法有时不能获得阳性结果^[2]。

本方法是一种基于“一级反应”,利用荧光技术的 Ab 定量测定法。方法的原理是:首先

把可溶性 Ag 制成不溶性固态 Ag。通过与被测样品一起保温,使被测样品中的 Ab 与固态 Ag 进行“一级”反应。离心去除样品并洗净非特异地吸附于固态 Ag 上的多余样品后,加入定量的荧光素标记的抗免疫球蛋白 G(IgG) 抗体(FA),使与已特异地结合在固态 Ag 上的被测 Ab 再次进行“一级”反应。再次保温后,测定溶液中剩余的 FA,并以此表示被测样品中 Ab 的含量。在不溶性固态 Ag 上进行二次 Ab、Ag 的结合反应的间接法,不但比直接法有更高的灵敏度,而且只需制备一种 FA,选用不同的 Ag 可进行多种 Ab 的定量测定。例如利用抗人 IgG-FA,选用不同组织器官的提取物作 Ag,可进行多种自身抗体的定量测定。

材料与方 法

利用二种 Ab, Ag 系统:(1)人免疫球蛋白 G(HIgG) 与兔抗 HIgG(RAHlgG) 及(2)人心匀浆上清液(HHS) 与兔抗 HHS(RAHHS) 作方法学的研究,皆得较满意的结果。

1. HIgG 的提取与纯化

健康人血清(HS)经硫酸铵分段沉淀取得

40% 饱和的沉淀部分, 再经 DEAE-纤维素柱层析。所得 HIgG 在免疫电泳中呈现单一沉淀线。

2. HHS 的制备

取得因气管异物死亡, 4 岁儿童的心脏, 称重后以流水灌注冠血管洗去血液。剔除脂肪、大血管及心房后剪成小块。加入等量含 0.1M 氯化钠的 pH7.0, 0.005 M 磷酸缓冲液(PBS), 于组织搅碎器中制成匀浆。低温离心 3,600g, 20 分钟, 倾出上清液。同法再提取残渣一次, 合并二次上清液即为 HHS。测得 HHS 的蛋白质浓度为 17 毫克/毫升。

3. RAHIgG、RAHHS 及羊抗兔 IgG (SARIgG) 抗血清的制备

见另文报道。

4. SARIgG 荧光抗体 (SARIgG-FA) 的制备

从 SARIgG 抗血清中分离 IgG, 采用二种方法使 IgG 与异硫氰荧光素 (FITC) 缩合得 SARIgG-FA, F 与 P 的克分子比值 (F/P) 可控制在 1—2^[3] 或 3—4^[4]。

5. 不溶性固态 Ag 的制备

所用二个系统的 Ag(HIgG 及 HHS) 均需先制成不溶性的固态 Ag。在搅拌下于一份 HS (或 HHS) 中滴加 9 份 3% 磺柳酸溶液, 立即有沉淀生成。放置 15 分钟后离心, 弃去上清液。以 PBS 洗涤沉淀直至洗液与三氯化铁呈阴性反应。最后以蒸馏水洗涤沉淀。置沉淀物于真空干燥器中, 抽干后磨细, 备用。全部操作可在室温进行。

为了节省组织 Ag 的用量, 可用易得的蛋白质溶液如猪血清(PS)稀释 Ag 溶液后再制备不溶性固态 Ag。Ag:PS 为 1:5 (或 1:10) 的不溶性固态 Ag 的制法同上所述。在滴加 3% 磺柳酸溶液前, 按蛋白质含量计, 以 PS 稀释 HS (或 HHS) 1:5 (或 1:10)。

6. 荧光的测定

选用激发光波长 470 毫微米, OY₂ ($\lambda_{\max}$ = 565 毫微米) 为荧光滤片。SARIgG-FA 的标准曲线见图 1。如以二倍空白值为最小可信值

计, 在本实验条件下 FA 的最小可测浓度为 3×10^{-9} 毫克/毫升 (以 FITC 计)。

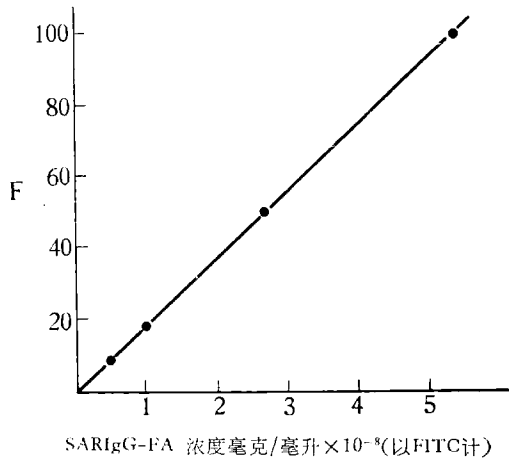


图 1 FA 的标准曲线

结 果

建立的 Ab 免疫荧光定量测定的操作步骤如下:

于 5 毫升离心管中称入 10 毫克不溶性固态 Ag。加入 0.2 毫升待测血清样品 (1:4 稀释)。置 37°C 水浴中保温, 时时摇匀之。保温 1 小时后离心, 倾去上清液。加入 2.5 毫升 PBS 摇匀, 放置 37°C 水浴中保温 10 分钟后离心, 倾去洗液。如此洗涤三次。倾去最后一次洗液

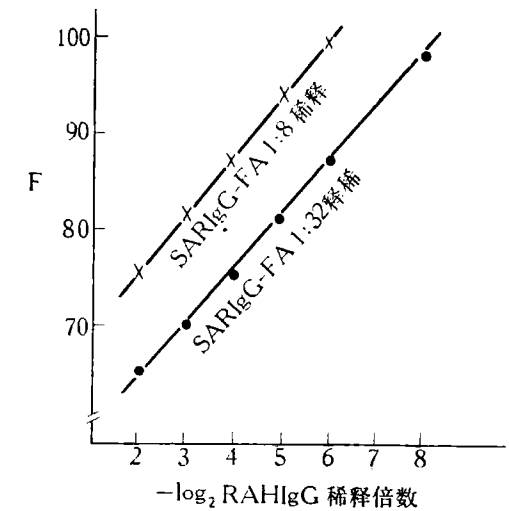


图 2 HIgG-RAHIgG 系统测定 Ab 的标准曲线
实验条件: SARIgG-FA: F/P = 1.02, IgG = 12 毫克/毫升

后,把试管倒立在滤纸上数分钟以去除残余洗液。置试管于真空干燥器中抽干 15—20 分钟。取出试管,加入 0.3 毫升FA,摇匀后再次于37℃水浴中保温 1 小时,离心后量取 0.175 毫升上清液至另一试管,加入 2.5 毫升 PBS 作荧光测定。

1. 按上述操作步骤所得 HIgG-RAHIgG 及 HHS-RAHHS 系统的测定 Ab 的标准曲线见图 2 及图 3。所测得的 F 值与抗血清的稀释倍数的负对数值呈良好的直线关系。

2. 实验结果的重复性

见表 1 及 2。定量测定 RAHIgG 及 RAHHS 的相对偏差各为 1.1% 及 1.3%,平均值的平均偏差各为 0.33% 及 0.36%。

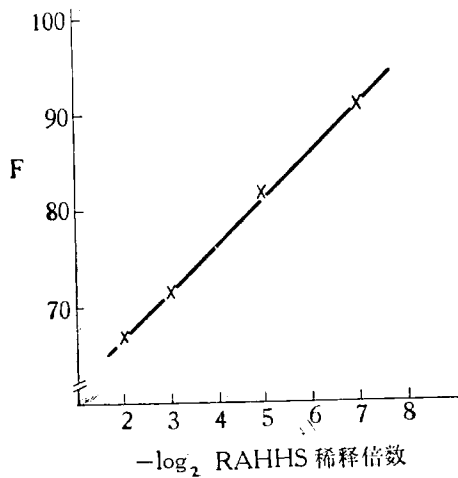


图 3 HHS-RAHHS 系统测定 Ab 的标准曲线

实验条件: SARIgG-FA; F/P = 1.02, IgG = 12 毫克/毫升, 1:35 稀释

表 1 定量测定 RAHIgG 的重复性

管号	测得 F 值	相对偏差 %	管号	测得 F 值	相对偏差 %
1	83.5	0.6	6	86.0	2.4
2	83.0	1.2	7	84.5	0.6
3	83.5	0.6	8	82.0	2.4
4	83.0	1.2	9	84.0	0
5	84.5	0.6	10	85.0	1.2
			平均	84.0	1.1

讨 论

从测定 Ab 的标准曲线及测定数据的重复

性来看,本方法是比较满意的。方法的关键是采用不溶性固态 Ag。这不仅满足了“一级”反应的要求,而且使 Ag 易于保存,更重要的是它

表 2 定量测定 RAHHS 的重复性

管号	测得 F 值	相对偏差 %	管号	测得 F 值	相对偏差 %
1	87.5	0.7	7	89.0	1.0
2	90.0	2.2	8	88.0	0.1
3	88.5	0.5	9	85.5	3.0
4	89.5	2.0	10	86.5	1.8
5	90.0	2.2	11	88.5	0.5
6	87.0	1.2	12	87.5	0.7
			平均	88.1	1.3

克服了微克或微克以下水平的 Ab-Ag 复合物沉淀不易分离,不易洗净的困难。从可溶性蛋白质 Ag 转变成不溶性固态 Ag 意味着蛋白质 Ag 的变性,但是同时需保持它原有的抗原性。为此,曾进行了多种条件的选择比较,有乙醇、酸性乙醇、甲醇、氯化高汞乙醇溶液、戊二醛、三氯醋酸、磺柳酸等,以磺柳酸与三氯醋酸比较理想。醋酸纤维薄膜电泳的结果表明 3% 磺柳酸能使血清或 HHS 中绝大部分蛋白质变成不再溶于水或 PBS 的固态蛋白质。醋酸纤维薄膜电泳辅以免疫荧光的点滴反应证明了 HIgG 及 HHS 仍保持了原有的抗原性。但是血清清蛋白是例外,3% 磺柳酸虽能使清蛋白沉淀,但生成的沉淀可再溶解于水或 PBS 中。

表 3 以 PS 稀释后制备的不溶性固态 Ag 与测定结果(F)的关系

管号	不溶性固态 Ag	被测样品	F 值	管号	不溶性固态 Ag	被测样品	F 值
1	PS	RAHIgG	80	7	PS	RAHIgG	97
2		(1:4)	82	8		(1:4)	97
3	HS:PS	RAHIgG	79	9	HS	PBS	100
4	= 1:5	(1:4)	81	10			96
5	HS:PS	RAHIgG	81	11	HS	正常免血清	100
6	= 1:10	(1:4)	82	12		(1:4)	96

所制得的不溶性固态 Ag 是稳定的,在干燥器中保存三个月不影响测定结果。应用不同批材料 (HS 或HHS) 制得的不溶性固态 Ag 可得相同的实验结果。不溶性固态 Ag 每次用量

以 10—15 毫克为宜。为了节省组织 Ag 蛋白质的用量,可以用其他容易获得的蛋白质溶液如 PS 稀释 Ag5 或 10 倍。然后加入 3% 磺柳酸制成不溶性固态 Ag,如此处理仍能得到同样的测定结果,见表 3。

在不溶性固态 Ag 上进行的二次 Ab-Ag 结合反应均需在 37℃ 保温 1 小时,实验证明其结果与在冰箱中放置 20 小时相同。以正常兔血清代替 RAHIgG 摸索洗涤条件,结果表明,温度稍高有利于洗涤,洗涤液中加入吐温-80 并不增加洗涤效果。确定的洗涤条件为 2.5 毫升 PBS, 37℃ 保温 10 分钟,共洗三次可得满意的结果,见表 3 中被测样品为正常兔血清项。

鉴于 Ab、Ag 结合反应是很复杂的反应,无论在 Ab-Ag 复合物的组织上或反应的亲和常数上都是不均一的。因此,与其他的免疫测定法一样,在测定中必须严格控制各种实验条件,并经常以测定的重复性及标准曲线检查数据的可靠性。

曾用本方法对 16 例克山病人的 20 份血清进行了抗心肌抗体的测定。所得结果与免疫荧光法测定结果完全相符,说明二者有类似的灵

敏度。免疫荧光的结果可与细胞形态相联系,而本方法可作定量比较。二者互相补充可得更完整的资料。

SARiG-FA 中除了有抗体活性的 FA 外,尚含有相当一部分荧光标记的非抗体的 IgG。这部分非抗体荧光量视不同批抗血清而异,按图 2 及 3 估计所用的 SARiG-FA 中非抗体荧光量约占总量的 60% 左右,此值稍低于文献报道值^[5]。由于测得的 Ab 量是基于反应前后荧光值的差异,故非抗体荧光量并不影响测定结果,但如进一步纯化有抗体活性的 IgG,去除非抗体 IgG,再以 FITC 标记之可得纯度更高的 SARiG-FA,则应能进一步提高方法的灵敏度。

参 考 文 献

- [1] Steward, M. W.: *Immunochemistry*, 1974.
- [2] Minden, P., et al.: *J. Immunol.*, **102**, 832, 1969.
- [3] Kawamura, A.: *Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications*, 1969.
- [4] Nairn, R. C.: *Fluorescent Protein Tracing* 3rd ed. 1969.
- [5] Tengerdy, R. P.: *Anal. Chem.*, **35**, 1084, 1963.

[本文于 1978 年 10 月 20 日收到]

γ-辐射聚合六甲基二硅氨烷于多孔 玻璃珠担体的填充柱用于毫微克 水平的前列腺素 F_{2α} 测定*

高 魁 雄 周 冠 中

(上海细胞生物学研究所)

前列腺素 (Prostaglandin, 简称 PG) 是一类环化的 20 碳不饱和脂肪酸的总称。业已知道 PG 广泛分布于动物界,又存在于各种组织之中,起着非常奇妙的,变化多端的生理功能。例如,对平滑肌的收缩,对血流、血压、炎症、神经传导以及激素对靶细胞的作用等都密切相关。

此外,PG 对肿瘤发生和控制生育等问题也有密切关系。近年来,国际上这方面的研究进展很快,并已有不少报道和综述^[1-5]。

从人和动物中分离得到的 PG 有 20 多种,

* 本工作得到上海药品检验所张叔良、宋增明、王仲山等同志的协助。