

醋纤膜原位免疫固定电泳技术及其应用

阎有功 范纯武*

(广州军区武汉总医院检验科)

提 要

本文介绍一种快速鉴定 M 蛋白的新方法——醋纤膜原位免疫固定电泳 (IFE)。对一例罕见的三 M 蛋白血症及一例良性的双 M 蛋白血症患者血清进行 IFE, 获得了清晰的免疫固定电泳谱。结果表明, IFE 具有操作简单, 省时, 抗血清用量小及易于判断结果等优点。宜于普遍开展。

凝胶内的免疫沉淀反应为研究血清、尿液等体液中可溶性蛋白混合物和精制物提供了强有力的手段^[1]。在此基础上发展起来的琼脂糖凝胶免疫电泳在 M 蛋白 (monoclonal immunoglobulin) 的免疫学分型中发挥了重要作用。但因其操作繁杂, 费时且抗血清用量大, 给普遍开展带来了一定困难。

1969 年 Alper 等^[2]首先应用淀粉胶免疫固定电泳 (immunofixation electrophoresis, IFE) 进行蛋白多态性的研究。1981 年 Merlin 等^[3]以醋纤膜为载体的 IFE 取得了成功。本文参照国外有关资料, 用醋纤膜 IFE 对一例罕见的三 M 蛋白血症及一例良性双 M 蛋白血症患者进行了鉴定。现将方法与结果介绍如下。

材 料 与 方 法

一、器具与材料 1. 电泳装置及电极缓冲液均按常规方法^[4]。2. 2×12 cm 的醋纤膜条 (预先浸泡于电极缓冲液中)。3. 抗人 IgG、IgA、IgM 及抗 K 轻链和抗人轻链单价血清 (均浓缩一倍)。为上海生物制品研究所提供。

二、醋纤膜 IFE 操作程序:

1. 样品准备: 取被检血清 0.1 ml 用生理盐水或电极缓冲液稀释 3—5 倍。

2. 点样: 在 2×12 cm 醋纤膜条上点样 3—4 μ l, 共做 6 条。稳定电压 120V, 电泳一小时。

3. 抗血清小条的准备: 电泳开始后, 将浸泡过缓冲液的 2×12 cm 醋纤膜条裁成 20×10 — 15 mm 的小条 (可根据 M 蛋白带分布的距离决定其长度), 共 5 条, 分别浸泡于各种单价抗血清中, 待用。

4. 免疫固定: 电泳完毕后, 先取下一条以 0.5% 的氨基黑 10B 染色, 观察 M 带的位置。将上述吸附过抗血清的小条 (用洁净滤纸沾去多余抗血清) 分别贴在其余电泳膜条的 M 带处, 做好标记, 避免气泡, 不要拖拉, 贴好后仍将膜条置于电泳槽架上, 室温下固定一小时。

5. 未反应蛋白的除去: 将上述固定后的膜条用生理盐水或 pH 7.4 的 PBS 反复漂洗五次, 每次 10 分钟。

6. 染色: 弃去漂洗盐水, 以 0.5% 的氨基黑 10B 染色, 漂洗, 透明后可长期保存。

结 果

一、一例三 M 蛋白血症患者的醋纤膜 IFE 谱 见图 1。图 1(1) 为正常人血清。(2) 为患

* 本院病理科。

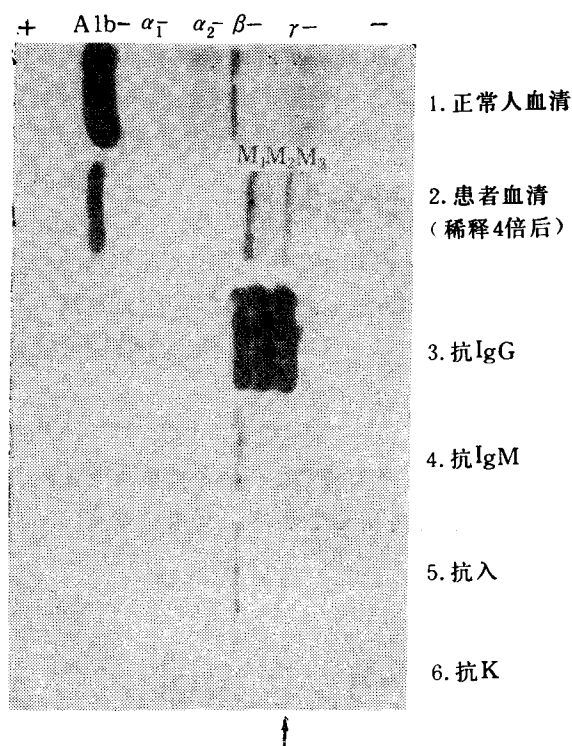


图 1 一例罕见的三M蛋白血症患者醋纤膜原位 IFE 谱
(3)、(4)、(5)、(6) 分别被四种抗血清固定后

者稀释血清,可见在 β — γ 区出现三条异常蛋白带。从阳极到阴极依次称为 M_1 、 M_2 、 M_3 。(3) 为被抗人 IgG 血清固定后,三条异常蛋白带均清晰可见,说明三条 M 成份中均有 IgG。(4) 被抗 IgM 固定后仅在 M_1 位显示一条带,证明 M_1 为 IgM 和 IgG 的重叠。(5) 被抗 λ 轻链血清固定后,在 IgM 对应处出现一条带, IgM 为 λ 型。(6) 为 κ 轻链,在 M_3 对应处显示一条微弱区带,琼脂糖凝胶免疫电泳与抗 κ 血清仅形成极微弱的沉淀线,可能是抗 κ 血清效价减低所致。三条异常蛋白带中无 IgA。

该患者男性,46 岁,因 HBsAg 持续阳性 10 年,以慢迁肝诊断住院检查。TP96g/L, Alb 35g/L, G 6.1 g/L。IgG46g/L, IgM23g/L, IgA 1.4g/L。尿液本周氏蛋白定性(—)。x 光检查,无骨质破坏,骨髓穿刺浆细胞 4%。体征无其它不良反应。初步认为,可能是由于 HBV 感染后引起细胞及体液免疫功能失调所致,实属罕见病例。

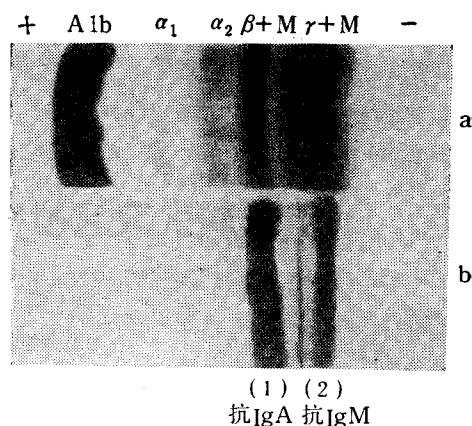


图 2 一例良性双 M 蛋白血症醋纤膜原位 IFE 谱
(1)、(2) 为患者血清蛋白电泳被抗 IgA 及抗 IgM 固定后

二、一例良性双 M 蛋白血症患者醋纤膜 IFE, 见图 2。

图 2 显示,在一张膜条上分别固定上了 IgA 和 IgM 两种 M 成份。根据实践经验, β 区的 M 成份往往为 IgA, 而 γ 位则多为 IgG 或 IgM。该患者血清 IgA 和 IgM 定量均明显升高, 所以进行 IFE 时, 在同一张膜条的 β 位贴上抗 IgA 小条, γ 区贴上抗 IgM 小条。得到了图 2b 结果。

此为一例 73 岁的男性患者,在正常体格检查时,发现双 M 蛋白带。血清 IgA 10.8g/L, IgM 10g/L, IgG 9.1g/L, 其它检查未发现异常,后追踪三年,无任何不良反应,故诊断为良性双 M 蛋白血症。

讨 论

IFE 抗原抗体反应时,不是扩散,而是在 M 蛋白带(抗原)上直接贴上抗血清膜条,使其在 M 蛋白处形成大分子抗原抗体复合物被固定在醋纤膜或凝胶的微孔内。因此,固定后漂洗时,只是脱去未反应蛋白带。

我们对 2 例 M 蛋白血症进行了醋纤膜 IFE, 获得了清晰的 IFE 谱。整个过程仅需三个小时,比普通凝胶免疫电泳提高效率近 10 倍。抗血清用量较小,一张小条仅吸附抗血清 0.1 ml 左右。被固定后的 M 带与对照电泳谱对应极易判断结果。在 M 蛋白的免疫学分型中醋纤膜原位 IFE 不失为一种简便,快速及敏感度较高的

旋转式双重搅拌透析器的设计与制作

刘建华 王曼莹

(江西中医学院生化教研室,南昌)

提 要

本文介绍了一种旋转式双重搅拌的透析装置,用它进行透析,不仅大大缩短了透析时间,而且有效地避免了蛋白质的变性失活。本透析器易于制作,实用于各种普通实验室。

在生化制备过程中,透析是必不可少的步骤,用以除去层析液的无机离子或更换所需的缓冲液^[1]。尤其是在蛋白质样品冷冻干燥之前,必须清除各种盐类,以免延长冷冻干燥时间或引起冻块的融化而导致蛋白质的变性失活。然而,要达到彻底透析,按常规一般需 48 小时,有时甚至需要 72 小时。如制备促卵泡激素^[2]。这不仅费时,而且更主要的是不利于在溶液状态下相当一部分不够稳定的活性物质的制备。本实验室根据科研工作的需要,参照 Feinstein 介绍的透析器的工作原理^[3],利用电动搅拌机设计制作了一台小型的旋转式双重搅拌透析器。经试用透析效果良好。如 0.5 mol/L NaCl 仅需透析 2—3 小时即达到平衡,比常规透析时间大大减少。不仅明显提高了工作效率,而且更主要的是有利于保存制备物的活性。

材 料 与 方 法

材料 电动搅拌机;万向杠杆;角度固定杆;透析袋固定架;透析袋;透析槽。装置如图

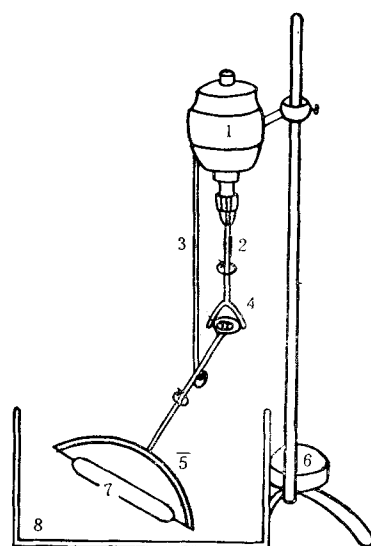


图 1 透析器装置示意图

1.电机 2.传动杆 3.可调角度固定杆 4.万向杠杆
5.透析袋固定架 6.调速器 7.透析袋 8.透析液槽

1。

检测方法 以银滴定法定时检测透析液中氯离子量以及透析终止时透析袋内液氯离子

鉴定方法。

参 考 文 献

[1] 金光房江:《临床病理》,特集 60 号,25,1984。

[2] Alper, C. A. et al.: *Vox Sang*, 17, 445, 1969

[3] Merlin, G. et al.: *Clin Chem*, 27, 1862, 1981.

[4] 上海医化所主编:《临床生化检验》,上册,上海科技出版社,50 页,1982。

[本文于 1987 年 1 月 12 日收到]