

免疫印染法在单克隆抗体鉴定中的应用

罗玉芳 范春荣 黄劲松 杨 力

(中国药品生产制品检定所, 北京)

提 要

应用免疫印染法对单克隆抗体 (McAb) 进行鉴定的结果证明: 1.4 份精制破伤风类毒素的 McAb 为抗破伤风类毒素有效成分的抗体; 2.6 份 LT McAb 皆为抗 LT 中相当 B 亚单位的抗体; 3. 提纯的 HB_sAg McAb IgG 为 IgG₁ 亚类, 不含 IgM 杂质; 提纯的 HB_sAg McAb IgM 进一步确证为 IgM, 未检出常见的 IgG 杂质。

免疫印染法 (Immunoblotting 或 Western blotting) 是 Towbin 等(1979)^[1]根据 Southern 氏(1975)^[2]检测 DNA 片断的印染法(Southern blotting) 扩展用于蛋白质检测的方法。是一种凝胶电泳和抗原抗体反应相结合的新技术, 具有灵敏度高, 特异性强的优点, 可检出 10—100 ng 的蛋白质区带, 适于检测微量抗原或抗体, 我们用于单克隆抗体 (McAb) 的鉴定, 获得较满意的结果。本文介绍对精制破伤风类毒素(精破类)和大肠杆菌不耐热毒素 (LT) 的 McAb, 以及提纯的 HB_sAg McAb IgG 和 IgM 的鉴定结果。

材 料 和 方 法

1. 各种 McAb 精破类 McAb 系本实验室研制; LT McAb 为本所菌苗二室研制; 提纯的 HB_sAg McAb IgG 和 IgM 皆系本实验室从 HB_sAg McAb 小鼠腹水中提取。

2. 精破类 我国各生物制品研究所的产品。

3. LT 本实验室从产毒性大肠杆菌培养物中提取^[3]

4. 小鼠血清 IgG 从昆明种小鼠血清中提取。

5. 抗血清 兔抗鼠 IgG₁ 和兔抗鼠 IgM 血清皆为本实验室自制。

6. 酶标记第二抗体 辣根过氧化物酶标记兔抗鼠 IgG 为美国 Sigma 产品; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 系丹麦 Kem-En-Tec 产品。

7. 化学试剂 一般为分析纯级。

8. 硝酸纤维 (NC) 膜 进口膜为德国 Zebra-Brechlich-Fragile 产品, 孔径 0.45 μm; 国产膜为浙江黄岩人民化工厂产品。

9. 电转移仪 瑞典 LKB 2005 Transphor。

10. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和 SDS-PAGE (还原或非还原) 参照 Laemmli 法(1970)^[4], 应用国产垂直板型电泳仪进行。

11. 免疫印染法 参照 Towbin 等(1979)^[1]和 Kyhse-Andersen (1984)^[5]方法并作一些改进。抗原先经 PAGE 或 SDS-PAGE (还原或非还原)分离, 用一张与凝胶大小相同并用转移液 (25mmol/L Tris-192mmol/L 甘氨酸-20% 甲醇) 浸泡 20 分钟以上的 NC 膜覆盖在凝胶上, 排净气泡, 同夹于两层浸湿的滤纸间, 置转移夹中, 插入盛有转移液的电转移槽, NC 膜朝向正极, 在电压 80—90V 下转移 1.5—2 小时, 通自来水冷却取出 NC 膜于封闭液 (50mmol/L Tris-150mmol/L NaCl-2% 吐温 20) 中浸泡 2—5 分钟, 用洗涤液 (50mmol/L Tris-150mmol/L NaCl-0.05% 吐温 20) 洗 5 分钟, 加入第一抗体 (视滴度高低稀释 100—1000 倍), 放

冰箱内结合过夜,次日用洗涤液洗5次,每次5分钟,再加酶标记第二抗体(稀释500—1,000倍),室温温育1—2小时,如前洗涤4次,第5次用pH5.5的50mmol/L醋酸钠缓冲液洗5分钟,加底物(3-3'-二氨基联苯胺盐酸盐20mg,0.1mol/L Tris-HCl pH7.5 2.5ml,蒸馏水50ml,双氧水18 μ l,临用新配),暗处显色10分钟,用蒸馏水洗涤终止反应,观察结果。

结果和讨论

一、实验条件的选择

1. 抗原的分离 虽皆采用分辨率高的PAGE进行分离,但具体条件需视待分离抗原分子大小和实验要求而定。经试验精破类采用分离胶浓度为10%的PAGE分离,LT采用分离胶浓度13%的SDS-PAGE,而McAb IgG和McAb IgM以分离胶浓度为10%的SDS-PAGE(还原)进行分离,可得区带清晰可辨和适于检测的图谱。

2. 电转移条件 获得良好免疫印染结果的关键之一是凝胶电泳分离的抗原区带能否全部和清晰的转移至NC膜上。我们用LKB转移仪以80—90V转移1.5—2小时的条件试验转移了鼠血清、精破类、卡介苗、结核菌可溶抗原和标准分子量蛋白质等,结果满意。

3. NC膜的试验 曾用进口膜和国产膜同时进行对比,证明二者无明显区别,故本实验采用价廉易得的国产膜进行。

4. 酶底物的选择 经试用三种酶底物:卡巴唑(Carbozole)、4-氯萘酚(4-chloro-naphthol)及3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine),结果二胺基联苯胺最灵敏,反应迅速,本实验以二氨基联苯胺为酶底物。

二、精破类 McAb 的特异性鉴定

将北京、上海、兰州、成都及武汉生物制品研究所生产的精破类同时经PAGE分离,一式四份,并转移至NC膜上,分别加精破类McAb(小鼠腹水)A₂(1—8)、A₂(9—11)、F₉和C11—9与之结合,再加酶标记抗鼠IgG温育后,加酶底物显色。结果参看图1a和b(见封

3),图1a为各所精破类的PAGE,各所精破类的电泳分离区带有一定的差异。根据我们过去对精破类抗原成分的研究^[6,7]证明其中大分子部分是破类的有效成分,而小分子部分属制品中的杂质。图1b为McAb F₉与各所精破类结合后的显色图谱,由图1b看出McAb F₉对小分子部分无作用,仅与精破类有效成分结合,显示F₉为抗破类有效成分的抗体。其他三份McAb的免疫印染图谱与F₉完全一致,由此表明4份精破类McAb皆为抗精破类中有效成分的抗体。

三、LT McAb 的抗原定位

提纯的LT采用非还原条件下的SDS-PAGE电泳,可分为相当A亚单位(分子量30kD)和相当B亚单位(14kD)的两条区带(见图2a,见封3)。对LT McAb进行定位,即以非还原的SDS-PAGE分离LT,并同时电泳标准分子量蛋白,转移至NC膜上后,剪下标准分子量蛋白膜条,用考马斯亮蓝染色作对照,转移有抗原LT的膜,剪成3—5mm宽的条,分别与待检LT McAb(小鼠腹水)A₁、A₂、A₁-B₂、A₁-G₅、A₁₀-G₆和A₁₀-F₇结合、显色。结果见图2b,(见封3)。可看出6份LT McAb皆与LT的14kD(相当B亚单位)和25kD两条区带起作用,而与30kD(相当A亚单位)的区带无反应。初步证明此6份LT McAb皆为相当B亚单位的抗体,至于检出25kD区带的问题,我们认为此区带可能是14kD(相当B亚单位)区带的二聚体,或至少是含与相当B亚单位相同抗原成分的蛋白;另外此区带SDS-PAGE未检出,而免疫印染显色,是由于后者的灵敏度更高。

四、McAb IgG 和 McAb IgM 的鉴定

IgG和IgM分子用还原条件下的SDS-PAGE分离,可解离成各自的重链和轻链,鼠IgG的重链(γ 链)分子量54kD,轻链25kD;鼠IgM的重链(μ 链)80kD,轻链与IgG相近。鉴定McAb IgG和McAb IgM是将二者与鼠血清IgG(对照)在同一凝胶板上电泳,一式四份,电泳后切下一份用考马斯亮蓝染色(图

紫外法直接测定维生素 C

彭玉麟 史延茂

(河北省科学院生物研究所, 石家庄)

提 要

利用维生素 C 在波长 267nm 处有较大吸收值这一特点, 用铜离子氧化破坏溶液中的维生素 C 为对照, 可以有效地消除测定中的背景误差, 因此可以用来直接测定一些样品中的维生素 C 的含量, 而无需进行前处理。本文并对此测试方法的一些条件进行了摸索和比较。

维生素 C (又叫抗坏血酸) 是人类营养中最重要的维生素之一。在很多工作中, 特别是对一些饮料和食品都需要测定它的含量。各种测定

维生素 C 的方法都有一定的缺陷, 如滴定法, 虽然简单快速, 但试剂不稳定, 并且不适于测定有色样品^[1]。荧光法测定较为麻烦费时^[2], 抗坏血

3a, 见封 3), 其余转移至 NC 膜上, 一份考马斯亮蓝染色作对照, 另两份, 一份加兔抗鼠 IgG₁ 血清结合、显色(图 3b, 见封 3), 一份加兔抗鼠 IgM 血清结合、显色(图 3c, 见封 3), 鉴定结果如下:

1. McAb IgG 的 γ 链和轻链与抗鼠 IgG₁ 血清作用后, 显色都很深, 表明此份 McAb 为 IgG₁ 亚类, (见图 3b.1)。除此尚有分子量小于 γ 链的 8—9 条区带 (因含量较低, 图 3a 未染出) 也显色, 这可能是抗体不够稳定, 在贮存过程发生部分降解形成碎片所致; 从图 3c.1 看到, 其与抗鼠 IgM 血清作用后, 除轻链弱显色, 显示与之有交叉反应外, 未检出相当 μ 链的区带, 表明该抗体不含 IgM 杂质。

2. McAb IgM 与抗鼠 IgM 血清作用后, μ 链与轻链显色很深, 确证该抗体为 IgM 类。(见图 3c.2) 尚有两条区带 (图 3a 未染出) 也显色的问题, 我们过去的实验曾发现此二区带, 可能是 IgM 分子在贮存过程形成的降解产物。由图 3b.2 看出, McAb IgM 与抗鼠 IgG₁ 作用的结果, 仅轻链与之显色, 显示有交叉反应外, 未检出相当 γ 链的区带, 证明该抗体不含鼠血清

IgG 中的主要成分 IgG₁ 亚类。

3. 对照鼠血清 IgG 与抗鼠 IgG₁ 血清作用, 仅 γ 链显色, 且较弱 (见图 3b.3)。原因是鼠血清 IgG 中, IgG₁ 仅是其成分之一, 其余为其他 IgG 亚类。虽然加样量与 McAb IgG 相近 (皆约 1.5 μ g), 而显色远比 McAb IgG 浅, 至于轻链未显色, 可能是非同种之故; 由图 3c.3 (见封 3)。看出, 其与抗鼠 IgM 血清未显色, 无作用, 证明此鼠血清 IgG 中不含 IgM 杂质。

参 考 文 献

- [1] Towbin, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 4350.
- [2] Walker, J. M. et al.: *Technique in molecular biology*, Groom Helm LTd, 1983, 273—285, 287—307.
- [3] 罗玉芳等: 中国人兽共患病杂志 1987, **4**(3), 19.
- [4] Laemmli, U. K.: *Nature (London)* 1970, **227**, 680.
- [5] Andersen, K.: *J. Biophys. Biochem. Methods*, 1984, **10**, 203.
- [6] 卫生部药品生物制品检定所血清生化室: 生物制品通讯, 1976, **2**(1), 134.
- [7] 罗玉芳等: 生物制品通讯 1979, **8**(6), 286.

[本文于 1988 年 4 月 1 日收到]

罗玉芳等：“免疫印染法在单克隆抗体鉴定中的应用”一文的图 1—3

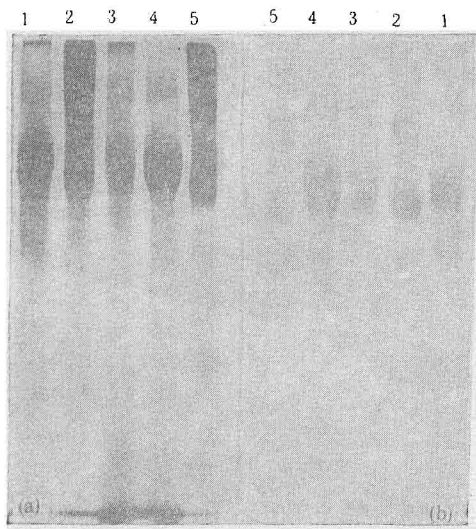


图 1 精破类 McAb 的免疫印染

(a) 各生物制品研究所精破类的 PAGE 1.兰州所 2.武汉所 3.上海所 4.北京所 5.成都所
(b) 精破类 McAb F₁ 的特性, NC 膜上抗原精破类的编号同 (a)

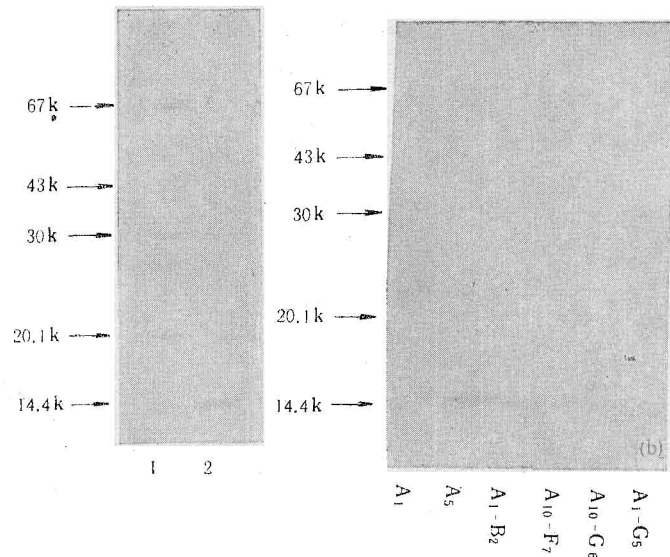


图 2 LTMcAb 的免疫印染

(a) LT 的 SDS-PAGE 1.标准分子量蛋白:牛血清白蛋白 67 kD,卵清蛋白 43kD,碳酸酐酶 30kD,豆胰酶抑制剂 20.1kD, α -乳白蛋白 14.4kD 2. LT. (b) 6 份 LTMcAb 的抗原定位, NC 膜上的标记为 LTMcAb 的编号,图左的数字示标准分子量蛋白的位置

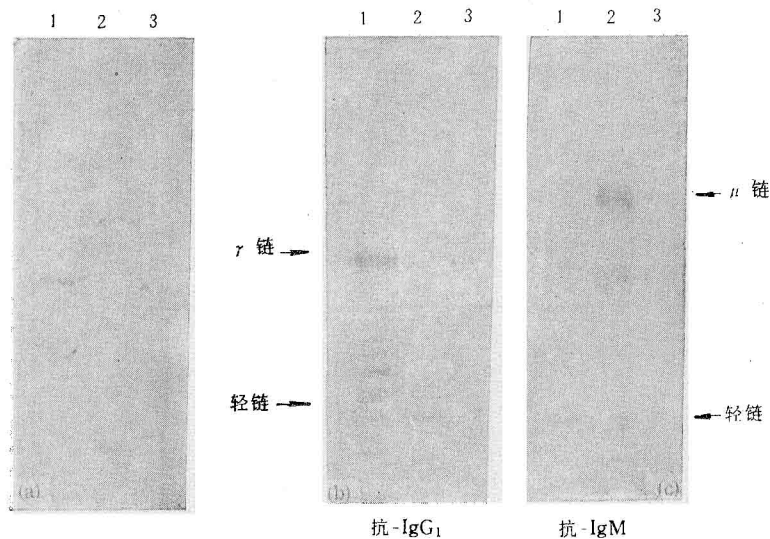


图 3 McAb IgG 和 McAb IgM 的免疫印染

(a) 三种样品的 SDS-PAGE (还原) 1. McAb IgG, 2. McAb IgM, 3.鼠血清 IgG (b) 抗鼠 IgG1 血清检测三种样品的 NC 膜图谱, 样品编号同 (a) (c) 抗鼠 IgM 血清检测三种样品的 NC 膜图谱, 样品编号同 (a)