染性红细胞明显减少。如果这一减少是不平行的，那是因为有核的红细胞明显增加。图 5 表明了氨甲蝶呤的剂量特性曲线；在 24 小时时作用是最激烈的。

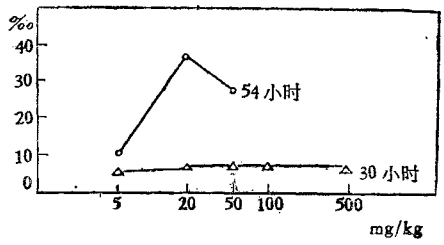

图 5　氨甲蝶呤的剂量特性曲线

△—△：常规给药法，每 6 小时给药一次。

○—○：第一次给药 24 小时后再给第二次药。

应着重指出：在微核试验中，某些化合物如果不能作用于细胞或者没有足够的浓度到达股骨骨髓的靶细胞，就不能诱发微核产生。这类化合物如特别的点突变剂和早期的抗生素以及甲基硝基亚硝基胍等。

效果与评价

微核试验作为一个染色体损伤的短期突变性方法，是评定药物毒性以及医源性致癌方法之一[3]。其实验结果可与 Ames 法相互印证，两者具有相同特性的数据约 80%，预计值 90%。

Ames 法反映了点突变的体外试验系统，而微核试验法则反映了染色体损伤细胞突变的体内系统。在进行致癌剂和突变剂的测定时，将它们的结果进行综合分析，可提高其可靠性。

参考文献

[1] ICPEM publication No.2; Mutation Res., 64, 155, 1979.

[2] A. Hollaender, *Chemical Mutagens principles and methods for their detection.* Vol. 4, 31.

[3] D. Jenssen et al.: Mutation Res., 75 191, 1980.

[本文于1981年9月10日收到]

用荧光偏振法比较两种不同抗体的亲和力

李 刚　杜国光　聂松青

（北 京 医 学 院）

影响抗体亲和力的因素很多。不同的抗原、不同的免疫时间等均可影响所产生抗体亲和力的大小。抗原性强弱的不同与其在体内诱发生成抗体的亲和力的大小有无一定的关系，一向为免疫学家所关注。用荧光偏振法测定抗体的亲和力，具有微量、准确等优点。本文以对兔抗原性较强的鸡蛋清蛋白的抗体和抗原性甚弱的狗血红蛋白的抗体为对象，用荧光偏振法分别测定它们的亲和力，并进行比较研究。

一、材料与方法

1. 抗原的制备

重结晶鸡蛋清蛋白（下简称 EA）的制备采用吴宪、周启源氏法[1]。

重结晶狗血红蛋白（下简称 Hb）的制备采用 Kabat 氏法[2]。

2. 抗 EA-IgG 及抗 Hb-IgG 的制备

取约 2.5 公斤青蓝色雄性家兔 6 只，编号。分别静脉注入 EA（2 只）和 Hb（4 只）各 30 毫克。一周后用间接血凝法检测抗体滴度。每 3—5 天测一次（见图 1）。分别在第 16 天和第 36 天，每兔再加注同一抗原 30 毫克强化之。于第 40 天取血，分离抗血清。（有 2 只注 Hb 的兔因未能检测出抗体，故未取血）。

将相应家兔的抗血清分别盐析，透析去盐经 DEAE-纤维素柱层析，收集 $OD_{280} > 0.3$ 的洗脱液，浓缩冷冻干燥后放冰箱保存备用[3]。此即为抗 EA-IgG 及抗 Hb-IgG。用时以 pH7.2

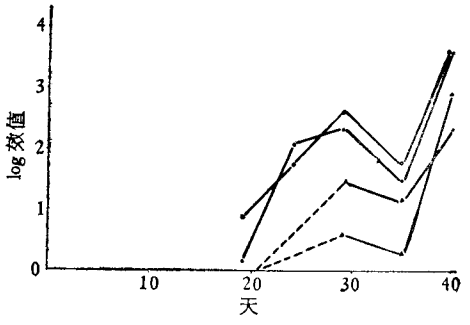

图 1 给兔静脉注射 30 毫克抗原 (EA 或 Hb) 在不同时间检测抗体的效价
●—● 1 号兔；○—○ 2 号兔；
▲—▲ 3 号兔； △—△ 4 号兔

磷酸盐缓冲液稀释之。

3. 抗原的荧光标记

基本按照 Akiyoshi 氏法[4]。取重结晶蛋白质 (EA 或 Hb) 约 100 毫克，加生理盐水 2 毫升溶于 10 毫升小锥瓶内。另取异硫氰酸荧光素 (FITC) 8 毫克 (FITC/抗原 ≈ 0.01—0.1 毫克/毫克抗原)。加 pH9.5，0.5*M* 碳酸盐缓冲液 1 毫升，使溶；在电磁搅拌下，慢慢滴入上述蛋白质溶液中。在 8±1℃ 避光搅拌 4 小时。然后经 Sephadex G-25 柱层析除去游离的荧光素分子；再经 Sephadex G-75 或 G-100 除去聚合的蛋白质。收集标记上荧光素的蛋白质溶液 (下简称 FEA 或 FHb)，用 Folin 酚法测蛋白质含量。分装小瓶。在 −20℃ 下避光保存备用。

4. 抗体含量的测定

取尖底离心管 10 支，编号 1—10。各管加一定量的抗 EA-IgG (或抗 Hb-IgG) 液 (可根据实际需要而定，本实验为 0.6—3.2 毫克/毫升)。其中第 1—8 管分别加入不同量的抗原，加入的抗原量应分布在该抗原抗体反应等当点的两侧 (用定性法实际估测)。混匀后放冰箱过夜。次日将第 1—9 管低温离心 (3500rpm，30 分钟)，(第 9 号管为对照，以排除非特异蛋白的可能沉淀)。去上清，倒置沥干，用 Folin 酚法测各管中蛋白含量，找出抗原抗体反应的最适比例 (等当点)，并算出抗 EA-IgG (或抗 Hb-IgG) 液中实际抗 EA (或抗 Hb) 占全部 IgG 的百分比，以便作为荧光偏振度测定时，决定抗原抗体相对含量值的依据。

5. FEA 和 FHb 激发光谱与荧光光谱的测定

FITC 的激发光谱与荧光光谱中，它们的激发峰与荧光峰分别为 495nm 和 520nm。EA 或 Hb 用 FITC 标记后，其激发光谱与荧光光谱的峰值与 FITC 完全相同。见图 2 和图 3。

6. 荧光偏振度的测定

仪器：MPF-4 型荧光分光光度计。激发波长 (λ_{ex})：495nm；发射波长 (λ_{em})：520nm，温度：21℃。

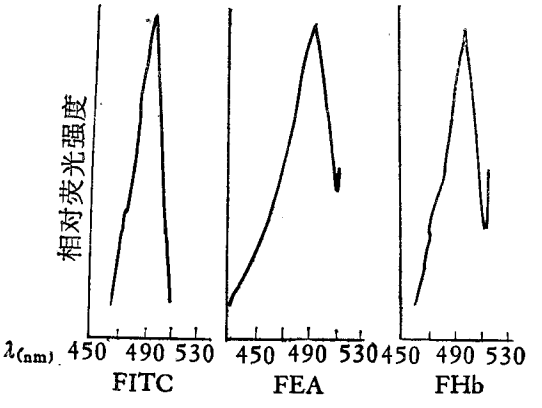

图 2 FITC、FEA 和 FHb 激发谱的比较

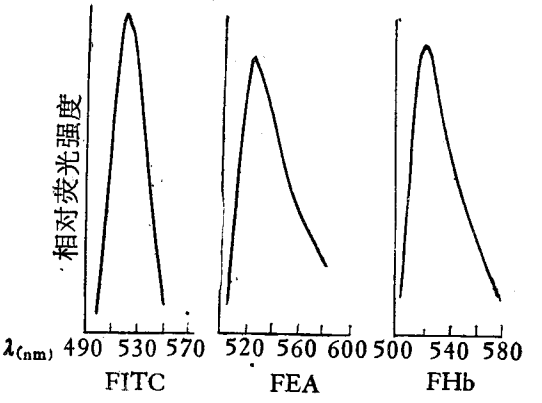

图 3 FITC、FEA 和 FHb 发射谱的比较

测量方法：按 Dandliker[5]氏法。于比色杯中先加入抗 EA-IgG (或抗 Hb-IgG) 液 2 毫升 (相当于抗体量 5—20 微克)。测其荧光偏振

度(本底)。加入 FEA (或 FHb) 液 5 微升(相当于抗原量约 1 微克),混匀,平衡 8 分钟后,再次读数。继之,依次滴加 FEA(或 FHb) 液。每次均在平衡 8 分钟后读数。连续滴加 10—15 次。按公式

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

其中

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

计算偏振度 P

式中 I_{VV}: 起偏器和检偏器光轴均为垂直方向时的荧光强度。I_{VH}:起偏器光轴为垂直方向检偏器光轴为水平方向时的荧光强度。I_{HV}:起偏器光轴为水平方向,检偏器光轴为垂直方向时的荧光强度。I_{HH}:起偏器和检偏器光轴均为水平方向时的荧光强度。G:校正因子。

二、抗体亲和力计算方程式

抗体亲和力是抗原-抗体相互作用强度的一种热力学量度。用平衡常数 K(单位为升/克分子) 表示之。抗体 (Ab) 与抗原 (Ag) 之间相互作用的定量关系可用下式表示:

$$Ab + Ag \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} Ab\text{-}Ag$$

k_a 和 k_d 分别代表结合常数和解离常数。

设自由抗原的浓度为 [Ag],抗体表面已被抗原分子结合的面积分数为 θ,未被结合的面积分数为$(1-\theta)$。显然,结合速率与尚未结合的抗体表面积及自由抗原的浓度 [Ag]成正比。即

$$\text{结合速率} = k_a(1-\theta)[Ag]$$

而解离速率是与已结合的抗体表面积 θ 成正比,即

$$\text{解离速率} = k_d\theta$$

平衡时,结合速率等于解离速率,即

$$k_a(1-\theta)[Ag] = k_d\theta$$

令 $\frac{k_a}{k_d} = K$, 则 $\frac{\theta}{(1-\theta)[Ag]} = \frac{k_a}{k_d} = K$

K即平衡常数,K值越大,表示抗体亲和力越大。

$$\theta = \frac{K[Ag]}{1 + K[Ag]} \quad (1)$$

若单位面积完全结合时,抗原量用 n 表示,只有 θ 部分结合时的抗原量用 γ 表示,则:

$$\gamma = n\theta \quad (2)$$

将(2)代入(1)式则

$$n\theta = \gamma = \frac{Kn[Ag]}{1 + K[Ag]} \quad (3)$$

此式即 Langmuir 吸附等温线形式,[Ag] 为结合达到平衡时的自由抗原浓度,γ 为每克分子抗体结合抗原的克分子数,n 为结合达到饱和时每克分子抗体结合抗原的克分子数,K 为平衡常数。

从式 (3) 可得

$$\frac{\gamma}{[Ag]} = nK - \gamma K \quad (4)$$

因此,当抗原处于一定浓度范围内时,以 $\gamma/[Ag]$ 对 γ 作图 (Scatchard 作图法)可求得 n 和 K。

本实验用荧光分光光度计分别测得抗原滴定抗体过程中偏振度 (P) 的改变。最初 Ag-Ab 结合形成较大体积的复合物,其活动度降低,而偏振度增高,P 值随抗原滴定呈指数曲线上升。当 P 值上升到一定程度后,即抗体与抗原的结合达到饱和时,虽增加抗原量,但 P 值也不再上

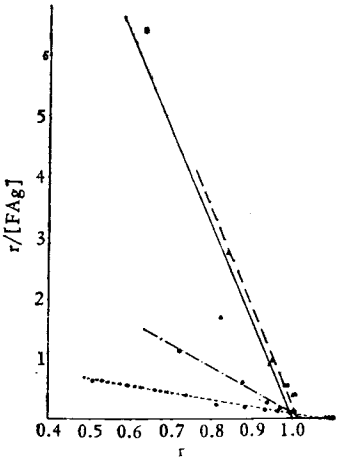

图 4 根据 Scatchard 图求抗原-抗体反应平衡常数 K

●——● 1 号 IgG; ○—·—○ 2 号 IgG; ▲—▲ 3 号 IgG △--△ 4 号 IgG

升，趋于稳定。此时抗原—抗体反应已达到平衡。以 P 值最高点为 100%，分别求出曲线上各点的抗体结合百分率 γ 及各点的抗原量 [Ag]（此 [Ag]实系自由 [FEA]或自由 [FHb]）。按公式(4)以 γ 对 $\gamma/[Ag]$ 作图（见图 4）。其斜率即为平衡常数 K。K 值越大，表示抗体的亲和力越大。

三、结果与讨论

我们实验室曾对 EA 和 Hb 的抗原性的强弱及其在体内的代谢进行了一些研究[6]。本文就这两种抗原性强弱相差悬殊的抗原，在同样剂量和同样免疫条件下，在兔体内所产生抗体的亲和力的大小进行了比较。而平衡常数 K 的数值则直接反映了抗体亲和力大小。实验结果表明，两只注 EA 家兔的抗体，其 K 值分别为 1.22×10^8 和 3.82×10^8，而注 Hb 家兔的抗体，其 K 值分别为 1.58×10^9 和 1.64×10^9（见表1）。经统计学处理，两组差别有极大的显著性（$P<0.01$）。说明抗 Hb 对 Hb 的亲和力大于抗 EA 对 EA 的亲和力。我们所测得的抗 EA 的 K 值在 10^8 范围内，这与原方法建立者 Dandliker 氏所测得的抗 EA 抗体的 K 值一致[5]，同在 10^8 数量级。而与用超离心法和电泳法得出的相应 K 值（$3.1\pm0.5\times10^4$）不同。这被认为可能是抗原与抗体的结合位点不均一性所造成。鸡蛋清蛋白分子中有许多不同的决定基，能产生多种不同结合位点的抗体。其中一些决定基可与高亲和力的抗体反应；另一些则与低亲和力的抗体反应。荧光偏振的方法主要侧重于与高亲和力抗体的反应。值得注意的是，EA 与 Hb 比较，前者对家兔是个强抗原，但同一时间(第 40 天)所产生的抗体亲和力却低于抗 Hb 抗体，这是耐人寻味的问题。根据无性繁殖系选择学说，我们可以推测，也许当抗原性较强的 EA 进入机体后，能调动亲和力范围较宽的 B 细胞，包括大量具有产生低亲和力抗体的 B 细胞也被刺激分化，并成为具有长寿命的记忆细胞，在体内维持较长时间。在这一阶段，产生抗体的亲和力较低(因抗体亲和力范围较宽)。而 Hb 是个弱抗原，在它进入机体后，只能与具有高亲和力受体的淋巴细胞结合，并刺激其分化产生高亲和力的抗体。当然，由于我们只比较了两种不同的抗原，还不能由此推论：弱抗原在同一时间内产生的抗体具有较强抗原更大的亲和力。但是，本实验结果将提示我们研究比较更广范围的强弱不同的抗原及其所产生抗体的亲和力的大小。这不仅有一定的理论意义，也具有现实的实际意义。例如，自家兔疫性疾病中，“自家”抗原的抗原性极弱，但一旦产生抗体时，也许由于其抗体的亲和力很高，可与相应组织(抗原)强烈结合，导致免疫病理变化。

表 1　不同抗体平衡常数 K 和 n 的比较

抗　体	K(升/克分子)	n
1号抗 EA 抗体	1.227×10^8	1.06
2号抗 EA 抗体	3.825×10^8	1.022
3号抗 Hb 抗体	1.584×10^9	1.000
4号抗 Hb 抗体	1.642×10^9	0.0120

参考文献

[1] 吴宪、周启源：《生物化学试验》，中华医学会编译部出版，1939年。

[2] Kabat, E. R.: *Experimental Immunochemistry*, 464, 1948.

[3] 王世中：《免疫化学技术》，科学出版社，1980年。

[4] Akiyoshi, K. Jr: *Flucrescenat antibody Techniques & Their Applications* (2nd ed.), 1977.

[5] Dandliker, W. B. et al.: Immunochemistry, **1**, 165, 1964.

[6] 李刚、杜国光、刘思职：《第四次中国生物化学学术会议论文摘要汇编》，1981年，第 179页。

[7] Burnet, F. M.: *Austr. J. Sci.*, **20**, 67, 1957.

[本文于1981年10月20日收到]