

参 考 文 献

- [1] 潘令和等:《生理学报》, **34**, 49—54, 1982。
[2] 吴加金等:《核探测器和核电子学》(会议资料汇编), 459—464, 1979。

- [3] 吴加金:《生理科学进展》, **10**, 359—363, 1979。
[4] 李文彬等:《军事医学科学院院刊》, **5**, 555—561, 1982。

[本文于 1983 年 12 月 14 日收到]

等速电泳及其在生物医学中的应用

竺 安

(中国科学院化学研究所, 北京)

70 年代初发展起来的等速电泳技术^[1,2], 已广泛应用到生物医学领域中。1979 年第一次国际等速电泳会议的内容全部都是与生物、生化有关的。第二次国际会议(1980 年)上发表的论文有三分之二是生物医学方面的研究。

等速电泳的原理和装置可参考文献[2], 它的特点是分辨率高, 分析速度快, 并便于自动化。它既可分析蛋白质、核酸等生物大分子, 也适用于分析金属离子和无机阴离子。对于某些复杂的生物或临床样品, 可以不经预处理而直接分析。许多生化样品虽然也可用高效液相色谱分析, 但往往要预先净化, 以免玷污贵重的柱填料。

一、氨基酸、肽、蛋白质

等速电泳用于氨基酸分析的例子不太多^[3]。它可以用于肽水解后氨基酸的组成分析。代谢紊乱病人血清中酸性氨基酸用此法分析, 结果较离子交换色谱法稍高, 但分析时间短。Kodama^[4] 在分析先天性亮氨酸代谢紊乱病人尿中异戊酰甘氨酸时, 样品不经预处理, 进样量为 0.1 微升, 比气相、薄层色谱更快而且准确。

肽的分析也有报道, 如监测肽的合成和纯化^[5]; 结合离子交换色谱法对尿毒症患者体液中的肽类进行研究。有重要生理作用的激素肽, 与肝昏迷相关的肽, 也都有用等速电泳法进行分离、分析和鉴定的。

等速电泳主要还是用于蛋白质的分

析^[6-12], 近几年进展很快。以前多用 Tiselius 自由界面电泳, 区带电泳, 圆盘电泳和等电聚焦电泳。在等速电泳的技术发展中, 因为采用了合适的添加剂来增加粘度和减少电渗, 使用高灵敏度的紫外检测器, 才使之适合蛋白质的分析。分析的样品包括脑蛋白、血红蛋白、糖蛋白、凝集素、眼晶体蛋白和蛇毒等^[12]。特别是脑脊髓液的分析, 对多发性硬化症、脑膜炎、伽玛珠蛋

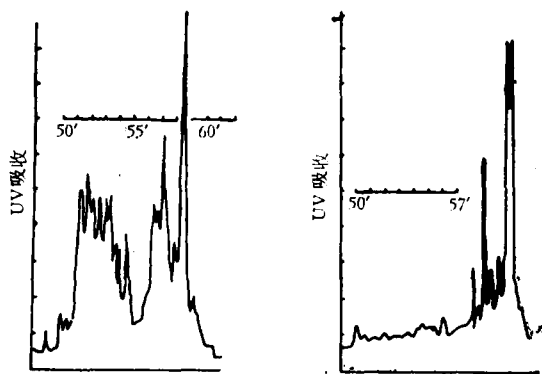


图 1^[6] 多发性硬化症患者和正常人脑脊髓液(CSF)中免疫球蛋白等速电泳图

阳离子体系, a) 10 μ l CSF 多发性硬化症患者患者 IgG 浓度高, 迁移速率快的组分(即 pI 值偏碱性)相应较多。b) 正常人对照。

白病等的临床研究是很重要的^[6,9,10-12]。

现已知道, 动物行为习惯或记忆一旦建立, 其脑蛋白的构成即发生变化, 其中尤以海马部分的可溶性蛋白的变化最为明显。等速电泳正好适合这种研究。通过训练将大鼠的惯用于取食的此一前肢改为另一前肢时, 海马中的蛋白

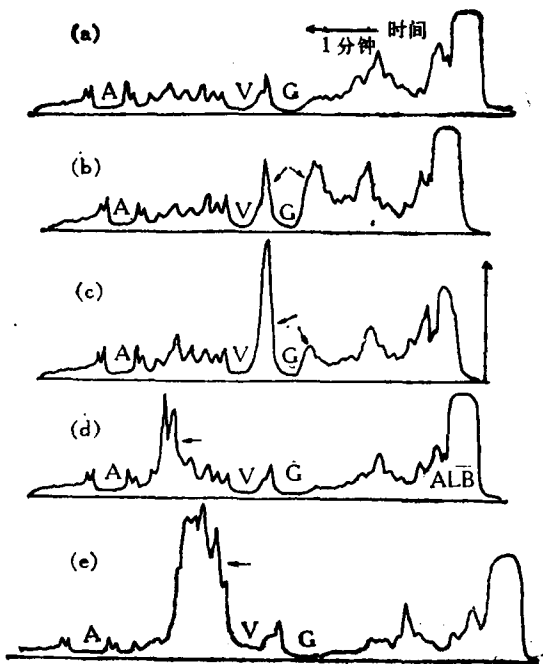


图 2^[7] 不同的病理血清与正常血清比较

a) 正常人血清 b,c) 伽玛 IgA 病人血清 d,e) 伽玛 IgG 病人血清。

A:β-丙氨酸; V: 缬氨酸 G: 甘氨酸

组成就发生变化,并且蛋白组分 B (见图 3) 的合成是在训练的最初几分钟即开始^[6]。

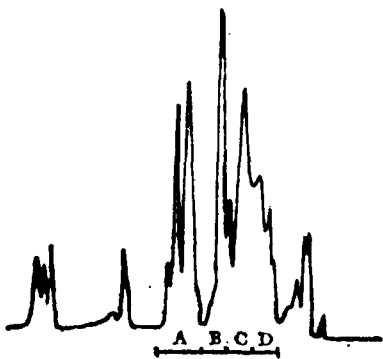


图 3 10 微升大鼠的海马可溶性蛋白等速电泳图

经训练的和未经训练的大鼠海马可溶性蛋白组分 A:B:C:D 分别为 1.00:0.94:0.89:0.30 和 1.00:0.64:0.85:0.32。

如果将此法与免疫法、放射法和酶学方法结合,可作进一步分析鉴定。

二、酶、抗原、细胞

等速电泳用于酶的活性测定和酶动力学研

究是一种较简易的方法。肝细胞微粒体中的 UDP-葡萄糖醛酸转移酶可将葡萄糖醛酸残基转移至毒素分子上,使之失去毒性,这是肝脏解毒机制之一。等速电泳法可以容易地同时测定此酶底物 UDP-α-D-葡萄糖醛酸-1-磷酸和 D-葡萄糖醛酸^[6,9,13]。也可用于甲酸脱氢酶的同功酶组成分析,并能观察酶失活时伴随的结构变化。尿激酶活性测定的变差系数小于 3.4%,并在 1—30 国际单位为线性^[14]。这是实用的范围,实际上方法的线性范围还更宽。用 NADPH/NADP, ATP/ADP 或 NADH/NAD 体系研究酶(例如乳酸脱氢酶)时,等速电泳也适用。此外还可测定脂肪过氧化酶、胆碱酯酶、碱性磷酸化酶、三磷酸腺苷酶。对于红细胞、白细胞、肝细胞或它们的抽提物^[15]、病毒^[16]和抗原^[17]、细胞膜上受体的端基如唾液酸^[18],等速电泳也是可用的。

三、核 酸

等速电泳能很好地分离核苷酸和碱基^[6,9],因此可以检验先天性嘌呤和嘧啶代谢失常^[19]。这种代谢失常往往是由于体内缺乏某种酶(或酶的活性太低)这对肿瘤的研究是有用的,例如自毁容貌综合症(Lesch-Nyhan Syndrome)是因为缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶,其表现是血中尿酸量显著增高^[6,9]。从图 4 可看到病人血清中代谢物种类和含量都大大增加^[6]。表 1 列出了酶活性缺乏与相应症状以及异常代谢物。

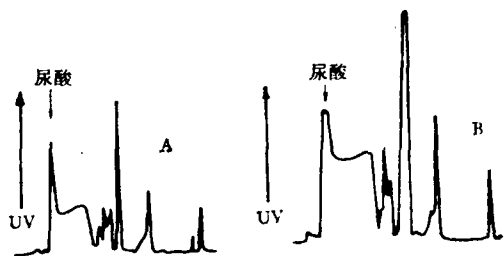


图 4 超过滤后的血清等速电泳图

A. 正常人(对照) B. 自毁容貌综合症病人

等速电泳能满意地分析血清中的嘌呤和嘧啶,尿酸的回收率在 $100 \pm 2\%$ 。在有其它代谢

表1 人酶活性降低或升高与相应症状以及异常代谢物

A. 酶活性降低	症 状	血或尿中异常代谢
次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶(EC2.4.2.8)		
a. 严重缺乏	自毁面貌	尿 酸
b. 部分缺乏	痛 风	尿 酸
腺嘌呤磷酸转移酶(EC2.4.2.7)	肾 结 石	2.8-二羟腺嘌呤
腺苷脱氨酶(EC3.5.4.4)	T-和 B-淋巴细胞功能降低	脱氧腺苷
嘌呤核苷磷酸化酶(EC2.4.2.1)	T-淋巴细胞功能降低	脱氧鸟苷脱氧肌苷
黄嘌呤氧化酶(EC1.2.3.2)	黄嘌呤尿	黄嘌呤 次黄嘌呤
B. 酶活性升高		
磷酸核糖合成酶(EC2.7.6.1)	痛 风	尿酸

产物及药物共存情况下也不影响测定结果。在合成 ATP 或 NAD 的衍生物时,等速电泳是一种好的监控方法^[9]。

四、代谢物、药物

给药剂量不应只根据病人的年龄和性别,因为各人的耐受量与代谢速度不一样。最好的办法是测出人血中药物的含量,从而知道剂量是否适度,以及药物在体内存留的时间。对于体液中药物及其代谢产物的分析,等速电泳是一种好方法^[9,20-23]。当然,它也适用于药剂中有效成分的分析,例如分析抗癫痫药 Valproate^[20]。对于氨基糖苷类抗菌素,如 Tobramycin Sisomicin、克林达霉素、林肯霉素及壮观霉素等,用等速电泳法分析较色谱法及微生物方法简便、经济、准确^[21]。分析血样中的抗癌药 5-氟尿嘧啶可精确到 100 微微克分子/毫升血浆或血清^[6]。对于细胞抑制药物[^] (Cytostatic Drugs) 如环磷酰胺、争光霉素、柔毛霉素等,可精确到 10—100 毫微克/毫升血浆^[9]。还可以测定尿中草酸及其它酸类以研究肾功能和肾结石^[6,9,21],并且都

不受以下诸酸干扰:苯二甲酸、羟乙酸、乳酸、色氨酸、马尿酸、琥珀酸、葡萄糖醛酸、丙二酸、反丁烯二酸、柠檬酸、糖质酸。此法也适用于分析尿毒症病人的代谢物^[6],其中的一些中分子量(500—5,000)物质可能有重要意义。等速电泳法能比 Sephadex G-25 凝胶过滤法分离出的组分多得多^[9],其中有一些已被确定为肽类^[6]。对于骨骼肌、心肌^[6,21]以及血^[23]和肝细胞中的代谢物如 ATP、ADP、AMP、UTP、GTP、IMP (肌苷酸)和磷酸肌酸等的分析也有报道。

表2 与疾病有关的等速电泳分析项目

分析项目	相关疾病
血中成分,糖蛋白与蛋白 ^[13]	贫血
血红蛋白及其它蛋白	镰刀形红细胞贫血症
尿中异常的紫外吸收性物质	类风湿关节炎
血清中尿酸	痛风
免疫球蛋白, IgG 亚类 ^[6]	骨髓瘤,肾病
蛋白-蛋白相互作用 ^[6]	全脑膜炎
尿中甲基丙二酸	维生素 B ₁₂ 缺乏症
腐胺,尸胺	多种癌症

上述分析往往可以用于诊断和观察疾病。除此之外,还有下述与疾病有关的分析项目。

五、有机及无机离子的测定

等速电泳尤其适用于同时测定多种离子。例如食品工业和临床生化样品中的羧酸、羟基酸(乳酸、羟基丁酸等)及二元酸的分析^[6]。磷酸酯的分析及其与钙离子的相互作用^[6],植物根中的氟、氯、溴、碘离子,硫酸盐,硝酸盐和磷酸盐的同时测定^[24],抗坏血酸代谢过程的跟踪^[9]等。此外还有金属离子的 EDTA 络合物^[9],胺类,脂肪酸氢过氧化物及荧光素等的测定。

六、制 备

目前的等速电泳装置适于分析而不适合于制备。LKB 公司虽然生产了制备型等速电泳仪——7900Uniphor,但不大好用。人们自行设计或改装制备用的等速电泳装置,用以分离和纯化抗原、抗体和免疫球蛋白等物质^[25]。制备

得到的量很少,只可供 GC-MS 作进一步的分离和定性鉴定之用^[9]。1976 年在美国爆发了一种新的疾病:军团肺炎 (Legionnaires Disease, 又叫蓬提克热 Pontiac Fever), 其细菌毒素纯品,就是用制备等速电泳获得的,并确定它为分子量 3,400 的蛋白质^[9]。

从等速电泳发展的历史看,它主要用途是在生化和医药方面,它的电解质体系没有多大的变化余地,有时对付组分复杂而性质相近的样品还有困难。它适合于分析检测,而不适于分离制备,这是它难以克服的缺点。使用这种技术时,我们应注意与其它技术相互配合。

参 考 文 献

- [1] Everaerts, F. M. et al.: *Isotachopheresis*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- [2] 竺安《化学通报》, 11, 665, 1980.
- [3] Sakagishi, Y.: *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, Special Issus, 161. 1980.
- [4] Kodama, H.: *J. Chromatog.*, 163, 300. 1979.
- [5] Pradayral, L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 701, 1978.
- [6] Adam, A. et al.: *Biochemical and Biological Applications of Isotachopheresis*, Elsevier, Amsterdam, 1980.
- [7] Delmotte, P.: *Science Tools*, 24, 33. 1977.

- [8] Hedlung, K. W. et al.: *Proceedings of Electrophoresis* 79, Walter de Gruyter and Co., Berlin, p. 765. 1980.
- [9] Everaerts, F. M.: *Analytical Isotachopheresis*, Elsevier Amsterdam, 1981.
- [10] Kjellin, K. G.: *J. Neurol.*, 221, 225, 1979.
- [11] Smuts, H. E. M.: *J. Neuro. Sci.*, 56, 283, 1982.
- [12] Hedlung, K. W. et al.: *J. Immunol. Methods*, 25, 43, 1979.
- [13] Holloway, C. J. et al.: *J. Chromatog.*, 188, 235, 1980.
- [14] Katoh, K. et al.: *ibid*, 188, 383. 1980.
- [15] Shimada, K., et al.: *Physiol. Plant*, 47, 173, 1979.
- [16] Hjerten, S.: *Peptides of Biological Fluids*, 22nd (Ed. Peeters, H.) Pergamon Press, New York, p. 669, 1975.
- [17] Hess, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 41, 1, 1974.
- [18] 竺安, 杨其民:《全国生物膜学术讨论会交流资料》, 1982.
- [19] Simmonds, H. A. et al.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 17, 441, 1979.
- [20] Tatsuhara, T. et al.: *Yakugaku Zasshi*, 102, 988, 1982.
- [21] Aomine, M. et al.: *JRN. J. Physiol.*, 32, 741, 1982.
- [22] Schwendtnner, N. et al.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 20, 833, 1982.
- [23] Talbot, A.: *Acta Med. Okayama*, 36, 431, 1982.
- [24] Kojima, K. et al.: *Shoyakugaku Zasshi*, 36, 280, 1982.
- [25] Battersby, R. V.: *Electrophoresis* (Weinheim, F. R. G.), 3, 275. 1982.

[本文于1983年7月20日收到]

抗人 IgG-Fab (λ 型)单克隆抗体和抗人 IgG 单克隆抗体的鉴定

谭瀟瀾* 林嘉友 邹明发 吴安然

(中国医学科学院基础医学研究所免疫室, 北京)

淋巴细胞杂交瘤技术,已成为生物学、医学领域中十分重要的研究方法。Lowe^[1]指出抗人免疫球蛋白(Ig)单克隆抗体(McAb)的建立,不仅为鉴定 Ig 的类、亚类、型、亚型、亚群和基因型等提供有价值的试剂,而且还可以在决定簇的水平上进一步研究 Ig 的结构和功能。Lowe 等^[1]曾对抗 K 和 λ 链的 McAb 性质进行了研究。李伟雄等建立了抗游离 λ 链的 McAb (待发表)。本文对抗人 IgG 的 Fab 和抗人 IgG

的 McAb 进行了研究和探讨。

一、材料和方法^[2-4]

1. 抗原动物及免疫 用人 IgG 经木瓜酶断链后提取的 Fab 片段蛋白作为免疫抗原。动物为 BALB/C 小鼠, 6—7 周龄。Fab 蛋白 300 μ g 加福氏完全佐剂制成乳剂、腹腔注射, 做

* 哈尔滨医科大学进修生。