

线 免 疫 电 泳

潘芝芳 杨庆有 季坤元

(南京医学院生化教研组)

免疫电泳自 1953 年由 Grabar 和 Williams 建立以来,经过不断地改进,目前已成为免疫学研究的重要方法之一。1972 年 Axelsen 首先建立的线免疫电泳,至今尚未普遍应用,但它在抗体抗原的比较鉴定工作方面有以下优点:在一定浓度范围内,可以明确地鉴定不同样品中混合多价的抗原和抗体成份,且可以断定检样中是否含有特异性抗原或抗体成份。本文报道我们建立的这一方法及初步应用情况。

一、方 法

1. 试剂

(1) 巴比妥盐酸缓冲液贮备液 (pH8.6, 离子强度 0.05): 巴比妥钠 10.3 克, 0.25 NHCl 38.2 毫升,加水至 1000 毫升。

应用时将上述贮备液用蒸馏水稀释 (贮备液: 水 = 4:6), 即成为 pH 8.6, 离子强度 0.02 的巴比妥缓冲液 (简称工作液)。

(2) 2 % 琼脂糖: 用工作液配制, 置三角烧瓶中水浴煮沸, 待呈均匀透明状, 将 2 % 琼脂糖用工作液稀释一倍, 即成 1 % 琼脂糖。

(3) 7 % 醋酸

(4) 0.5 % 氨基黑 10 B 染色液。用 7 % 醋酸配制。

(5) 抗体

(6) 待测样品 (抗原)

2. 操作

(1) 制板 选择长 8 厘米和适宜宽度的玻璃板, 冬季置 37°—60℃ 的温箱中预热 10 分钟, 放在水平桌面上, 迅速将抗体琼脂 (先将 1 % 琼脂糖加热熔融并保持 60℃, 后加入抗体。抗体量视抗血清效价而异, 一般为琼脂体积的 5 %), 倒在玻璃板上约 0.15 毫升/平方厘米, 使琼脂

均匀铺满全板。待凝结后, 用检样槽刀在板的一端距边缘 3 厘米处与边平行切开琼脂, 两侧各留 0.5 厘米, 然后按检样个数等分琼脂细条 (每段长不短于 1.2 厘米, 宽 0.2 厘米) 再用挖槽铲间隔挖出琼脂细条, 先挖出 1.3 琼脂细条 (见图 1a)。

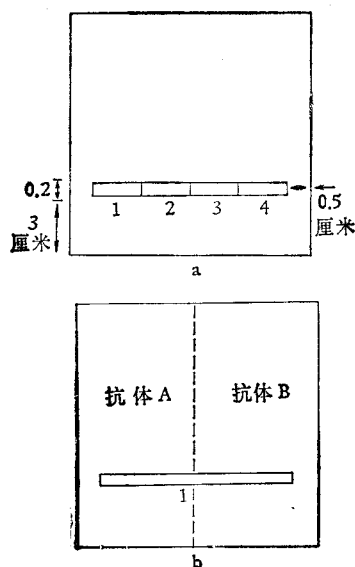


图 1

a: 全板铺同一种抗体琼脂 1, 2, 3, 4 为四份检样槽
b: 左侧铺抗体 A 琼脂, 右侧铺抗体 B 琼脂, 1 为检样槽

为了比较不同抗体, 可将板面用琼脂条隔开, 分别浇灌待试抗体, 左侧先浇含抗体 A 琼脂, 待凝结后切去全部隔离琼脂条, 再于右侧浇含抗体 B 琼脂, 使 A、B 二抗体紧密相连 (图 2a, b)。

(2) 加样 将被检抗原与等量 60℃ 的 2 % 琼脂糖在小试管内混合, 用微量滴管取适量混合物迅速滴注于检样槽内, 至液面与抗体琼脂面相平 (操作要迅速, 以防琼脂糖凝结, 使表面

不平而影响电泳图像)。琼脂凝结后,再挖出相邻检样槽内的2、4琼脂细条(图1a)再按上述步骤加入其他样品或标准抗原。

(3) 电泳 电泳槽中置工作液,平衡二侧液面。将琼脂板置电泳槽内。检样置阴极端,电压2伏/厘米。电泳16小时后取出。

(4) 漂洗 初步观察沉淀线后,将标本浸泡于生理盐水中3—4天,每天换水1—2次。

(5) 干燥 另取一块玻璃板,浸湿,上面贴一张玻璃纸,四边翻转折至反面,包紧玻璃板。将上述漂洗好的标本转移到玻璃纸上,贴平、上面覆盖一层滤纸;小心去除滤纸和琼脂之间的气泡;平放待干。

(6) 染色 待标本干燥后,扬去滤纸,板面上滴满一薄层0.5%氨基黑10B染色液,染色15分钟。

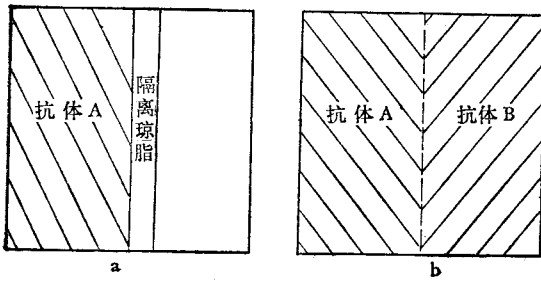


图2 铺浇两种抗体琼脂示意图

(7) 漂洗 用7%醋酸漂洗至底色脱清为止。

(8) 干燥 取出后用毛笔蘸水刷去表面污物,再覆盖一层玻璃纸、抹干,去气泡,置室温待干。

(9) 标本干燥后,切除四周多余的玻璃纸,即可长期保存。

二、操作注意事项

1. 样品槽 0.2 厘米宽,分离效果最佳,槽边要整齐。

2. 如在同一块抗体琼脂板上检测二个以上的标本,要使二个标本互相紧密连接,电泳后二标本即可出现明显的融合线或交叉线。

3. 加样后需立即电泳,放置过久样品扩散,

影响图形。

4. 抗原与抗体的泳动,缓冲液离子强度0.02、电势梯度2伏/厘米、电泳时间16小时以上最为适宜。

三、结果与应用

1. 抗原抗体相互检测 图3(见图版III)是三份人血清(抗原)对抗正常人血清(兔抗体)的线电泳,检样槽中2为正常人血清,1.3为白血病患者血清。由于琼脂板中仅含有抗正常人血清成份的抗体,因此沉淀线均为正常成份,组间均为融合的沉淀线。根据沉淀线条的多少及清晰度,可以判断抗原、抗体的强弱,从而选择合适的抗原或抗体。

2. 特异性抗原或抗体的鉴定 图4(见图版III)是用兔抗人胎儿血清检测甲(腹水)、乙(血清)、丙(部分提纯的 α FP)三份样品,可以观察到三份标本中有a、b、c三种共同抗原,其沉淀线均为融合的连线。另外有d、e、f三种抗原为甲、乙标本所共有,而为丙标本中所没有或含量甚微,但丙标本中含独有的g(α FP)抗原。

为了检查多价抗血清中某一特定成份是否存在,可用已知抗血清与之对比。例如在检查兔抗人血清中有无抗IgM的抗体时,可将单价的抗IgM血清与全抗平行浇板,用含IgM的正常人血清与之作线电泳,结果见图5(见图版III)。版面左侧为抗IgM的单价抗体,右侧为被检的兔抗人血清,槽中为正常人血清(含IgM)左右有一条融合的连线,即为抗IgM和IgM结合的沉淀线,也可以看到由于IgM的单价抗血清中没有其他不纯抗体,因此全抗中所形成的其他沉淀在抗体交界处直线上升。

3. 抗原、抗体浓度之间的比例关系 当抗原含量固定时,抗体浓度越低其沉淀线越高,反之则低,如图6(见图版III)左边的抗体浓度比右边高一倍。当抗体浓度固定时,抗原含量越高,则泳动距离越远,因此可做定量测定,如图7(见图版III)。

4. 敏感性试验 取足月产胎盘血清和四个月胎儿血清作抗原,用抗 α FP(抗体)测定其

α FP。我们的实验证明,当 α FP 浓度大于 9 毫克/毫升,对流法检测即出现假阴性(前带现象),而线电泳法无此弊病,不论抗原含量多少,只要达到可检测浓度(300 毫微克/毫升),均可出现明显的沉淀线。

5. 寻找特异性抗原和抗体 用抗正常组织的抗血清和抗癌组织的抗血清与正常组织和癌组织抽出液作线电泳,见图 8(见图版 III),在抗癌组织的抗血清和癌组织抽出液之间形成一条沉淀线(如箭头所示),而在与正常组织抽出液的界面处沉淀线急剧下降,与抗原槽呈封闭线。说明正常组织抽出液无此抗原成份。而在抗正常组织的抗血清交界处此沉淀线急剧上升,说明抗正常组织血清中无此抗体。

四、讨 论

1. 线电泳的优越性是可检测混合多价抗

原、抗体中的特异性成分。用参考抗原或抗体作比较,可以检测出相同或相异成分,并能粗略地定量。

2. 线电泳法也有不足之处。当几个组分的抗原抗体浓度比例近似时,因沉淀线条间隔很小(甚至重叠),彼此难以分清。这时可配合免疫电泳,交叉免疫电泳等方法,加以验证。

参 考 文 献

- [1] Axelsen, N. H. et al.: *J. Immunol. Methods*, **1**, 109, 1972.
- [2] Ouchterlony, O. et al.: *Handbook of Exp. Immunol.*, Vol. 1, Chapter 19, 23, 1978, 3rd ed (Weir, D. M.) Blackwell Scientific Publications.

[本文于 1980 年 11 月 18 日收到]

氯间隙法测算细胞内离子浓度

许 焯 钱 绍 祯

(南京药物研究所)

机体离子代谢有障碍时,往往首先表现在细胞内离子浓度的改变,这对于钾、镁离子特别显著。有些药物,如棉酚,在一定条件下仅影响细胞内钾、镁浓度而不明显影响血清中浓度^[1]。因此,在研究离子代谢的问题上,不应忽视细胞内离子的观察。

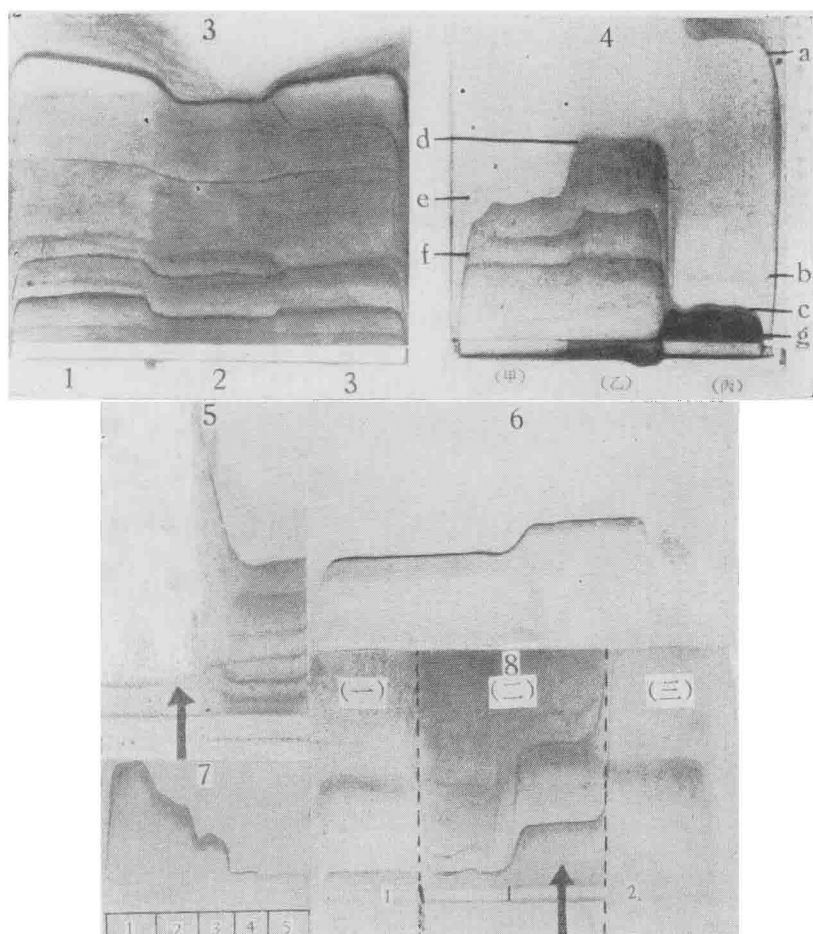
测算细胞内离子浓度,以氯间隙法比较简便,一般实验室均可进行,而且也相当准确,因氯间隙与菊粉间隙基本一致^[2]。对于用氯间隙法测算骨骼肌细胞内离子浓度,国内未见介绍,国外亦未见系统叙述,仅散见于有关文献[3—10],且计算公式也不够完整。本文系统介绍此法的具体步骤,以及我们在方法上的小改进并补充了必要的计算公式(公式 2、3)。

一、方 法

1. 主要材料 0.050 N 氯化钠标准溶液、

0.025 N 硝酸银、50% 冰醋酸、1.5N 氢氧化钾、35% 硝酸、高硼酸钠,以及 10 ml 离心管(标定 1 ml)、标定吸管、1 ml 滴定管(连电极)、电位差计、电磁搅拌器等。所用试剂中,氯化钠为 GR 级,其余均为 AR 级。

2. 取血及骨骼肌 动物(以大鼠为例)用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后打开腹腔,用注射器自腹主动脉取血 5 ml,1 小时内离心得血清。采血后立即将大鼠断头放血至尽,迅速剖取双侧后肢的对应肌肉,如伸趾长肌、比目鱼肌等,分别称湿重后于 105℃ 干燥 48 小时^[3,4]或 60℃ 真空干燥 24 小时^[5],再移至干燥器中冷却后称干重。将两侧对应肌的平均湿重减去干重即得该肌的组织含水量。一侧干肌用来测氯化物,对侧测钾、钠、钙、镁等阳离子。大鼠上述肌肉湿重多在 100mg 左右,以下有关试剂均按此重量要求加用。



- 图 3** 抗体: 抗正常人血清
抗原: 2 为正常人血清; 1, 3 是白血病人血清
- 图 4** 抗体: 兔-抗人胎儿血清
抗原: 甲(腹水), 乙(人血清), 丙(部份提纯的 α FP)
- 图 5** 抗体: 左为抗 IgM, 右为抗人血清
抗原: 人血清
- 图 6** 抗体: 抗 α FP, 浓度: 左: 右 = 2:1
抗原: 人胎盘血清
- 图 7** 抗体: 抗 α FP
抗原: 人胎盘血清, 浓度: 样品 1, 2, 3, 4, 5 分别为 1 (原液), $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$
- 图 8** 抗体: 一、二为抗正常组织血清, 二为抗癌组织血清(抗体三区, 加二种抗原, 配搭成四个区)
抗原: 1 是正常组织抽出液, 2 癌组织抽出液