

小体积样品电泳浓缩法

许多生化实验,样品需要浓缩。电泳提供了带电生物大分子最温和的浓缩方法。但已有的电泳法只能浓缩大体积(10—100ml)样品。一些特殊实验目的需要的微量样品,用这些方法浓缩是无能为力的。这里介绍一种小体积样品的电泳浓缩法,它可以把2ml稀的样品液浓缩至10—50 μ l。这种方法除需常规电泳仪、电泳槽外,需制备电泳浓缩管。制备方法如下:把内径5mm,长13.5cm的玻管截成1.5cm和12cm两段,浸于硝酸-硫酸(1:3)混酸中过夜;用大量蒸馏水洗涤后烘干。烘干短管用塑料薄膜封底,加满30%丙烯酰胺凝胶溶液(内含双丙烯酰胺,TEMED,过硫酸铵),立即用镊子向管中加一个铝质或有机玻璃的锥形钉。凝胶液聚合后,细心刮掉管外凝胶,取出锥形钉,形成漏斗穴。用一弹性塑料管(长1.5cm)把带漏斗穴的短胶管和12cm长的玻管联在一起,即成电泳浓缩管(见图1)。把此管安装在电泳槽中,加满待浓缩的稀样品液,向上、下槽中加适量电极缓冲液即可电泳。每管电流1—3mA,电热功小于0.5W,于4 $^{\circ}$ C过夜。电流不宜过大,过大时样品液会出现对流。电泳完毕后,吸去上槽中缓冲液,将浓缩管中液面细心吸至穴口,约剩50 μ l。如果是易观察的有色样品,可进一步吸至剩10 μ l。至此即达到浓缩目的。

微量样品浓缩的倍数可达70—100倍,得率大于70%,与常量电泳浓缩法相匹敌,而且浓缩后样品的完整性经酶活检验得到完好的保证。带电大分子的浓缩时间与电极缓冲液的种类、浓度及酸度有关,还与分子本身的荷电性质有关。当蛋白等电点远离电极缓冲液pH时,电泳只几小时即可。离子强度与浓缩效果关系

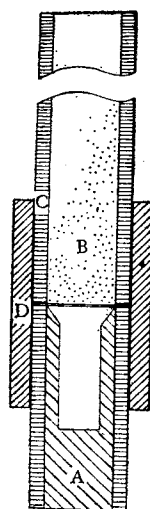


图1 电泳浓缩管剖面图

- A. 聚丙烯酰胺凝胶,浓缩后样品集中于漏斗穴中;
- B. 待浓缩稀样品溶液,
- C. 玻璃管壁,
- D. 弹性塑料管。

密切,一般低离子强度效果较好。浓缩样品分子较小时可以向凝胶介质中引入电荷,借同电相斥阻止样品分子进胶。常用引入电荷试剂有正电荷试剂——溴化烯丙基三乙基铵(1%),负电荷试剂——丙烯酸等,将其掺入丙烯酰胺溶液与其聚合而达到引入电荷的目的。

[Anal. Biochem., Vol. 116(2), 379—382, 1982.]

中国农业科学院畜牧所 吕俊宣摘

单克隆抗体在免疫测定中应用的前景

放射免疫测定法(RIA)是近年来临床生化中最常用的鉴定激素和药物的手段,由于某些抗原难于标记,60年代后期又引进了利用标记抗体进行免疫测定的免疫放射计数法(IRMA)作为RIA的补充。单克隆抗体问世以来,提供了高专一性抗体的充分来源。大量单克隆抗体的涌现,促进了几种比较新的、利用标记

抗体的免疫测定法的改进,使它们有可能逐渐取代经典的RIA,得到广泛应用。

RIA是根据一种抗原与放射性标记的抗原竞争结合于一定数量抗体的能力测定其浓度的方法。为取得灵敏的结果,所用的特异抗体必需有很高的亲合力。一般多肽激素分析中,样品内抗原浓度很低(相当于

pgml⁻¹ 数量级), 特异的抗体也要经过高度稀释(常用的稀释度可及 1:100,000), 有灵敏和消耗抗血清少的优点。但是由于分析过程中, 往往需要连续保温过夜, 而且需要用一定手段把未反应的抗原与结合于抗体的抗原分开, 因此需要较长时间, 另外, 采用多克隆抗血清有时可能和样品中存在的激素残片, 或免疫上与待测抗原完全不同的其它抗原发生交叉反应而干扰分析结果。单克隆抗体的使用, 可提高 RIA 的特异性, 一个明显的实例是用 RIA 测定人体中四种 α 亚基相同、 β 亚基各不相同的激素, 绒毛膜促性腺激素、催乳激素, 促卵泡激素和促甲状腺激素 (TSH) 时, 往往受到交叉反应的困扰。现在制成了只对其中一种激素(如 TSH)特异而不能识别其它三种激素的单克隆抗体, 就顺利的解决了交叉反应的问题。然而采用单克隆抗体进行 RIA, 也带来新的问题: 首先由于多数已分离的单克隆抗体亲和力较低, 对灵敏度有所限制; 其次是单克隆抗体专一性太强, 假如贮存的血清样品中, 可被单克隆抗体专一识别的抗原决定基本身不稳定, 或在碘化反应等标记步骤中特别容易损坏, 都将影响测定效果。还有, 如果样品中一种与抗原无关的蛋白质上也带有这种由少数氨基酸或碳水化合物残基组成的抗原决定基, 那末仍然难免造成干扰。除此以外, 个别的单克隆抗体还可能因对 pH 或温度敏感而影响使用, 这种情况在多克隆抗血清中不多见。因此经典的 RIA 中, 单克隆抗体的应用价值尚待证实。

利用放射性标记抗体进行免疫测定的 IRMA 技术与 RIA 完全不同, 它不是根据未知抗原竞争结合有限抗体的能力, 而是令未知抗原与标记抗体结合形成抗原-抗体复合物, 然后根据分离所得复合物的放射性计数来测定未知抗原的量。IRMA 在使用中很快被发展成“两点结合”IRMA, 就是说, 在抗原的两个不同结合位置上, 分别与第一个连接在固体支持物上的抗体和第二个标记抗体相结合, 以利于抗原-抗体复合物的分离和计数。虽然 IRMA 和“两点结合”IRMA 对于测

定那些因标记困难而不能用 RIA 分析的抗原非常有用, 但是由于操作麻烦, 而且需要浪费大量抗原去提纯标记抗体, 实践中很少应用。单克隆抗体的出现, 简化了标记抗体的提纯步骤, 促进了利用标记抗体的免疫测定技术的发展。

单克隆抗体可以有几种不同方式应用于利用标记抗体的免疫测定方法: 第一种方式是可以象“两点结合”IRMA 法一样, 令抗原先与连接在固体支持物上的第一种单克隆抗体结合, 然后加进第二种标记的单克隆抗体; 另一种方式是令抗原先与一种标记的单克隆抗体结合, 然后再与另一种固定化的单克隆抗体结合; 第三种方式是把标记抗体和固定化抗体同时与抗原加在一起。虽然这几种方式也同样适用于多克隆抗血清, 但是单克隆抗体具有可把两个结合位置之间的竞争限制到最低限度的优点, 此外, 由于可以使用过量的标记抗体, 单克隆抗体亲和力低已不再是主要问题, 而且可以大大缩短分析时间。

上述几种方法, 都需要经过分离步骤以去除未反应的标记抗体。在测定药物水平时还有一种无需分离步骤的均相免疫测定法也是特别有用的方法, 如果把抗体结合在酶与药物结合体中的药物部分上, 那么酶的活力就将受到制约(通常是受到抑制)。但是这样的分析方法很难适用于大分子。引用单克隆抗体使开拓“邻近键合”均相分析成为可能。把分别针对抗原上两个相邻部位的不同抗原决定基的单克隆抗体, 各自用不同试剂标记, 并使这两种标记抗体只有当结合于抗原上邻近的位置时才能给出信号, 在溶液中游离存在时不发生信号。在这里采用的标记试剂可以是两种酶, 其中一种酶的反应产物是另一种酶的作用底物; 也可以是通过某种方式的能量传递, 例如荧光淬灭, 或者生物发光或化学发光给出测定信号。随着这些新技术的相继出现, 经典的 RIA 看来无疑地会逐渐过时。

[TIBS. Vol. 7. No. 2, 1982, 12. 刘 蓉摘]

[1983年2月3日收到]

科技消息

类病毒的研究进展 ——介绍类病毒的利用和壳内类病毒的发现

类病毒是已知高等生物中最小的致病生物因子, 有 RNA 型类病毒和 DNA 型类病毒。RNA 型类病毒指

的是植物类病毒, 对它的研究较为深入, 本文介绍它的类病毒弱毒株的利用和壳内类病毒的发现。