

R.格拉巴 主编
P.勃尔丹

145444

免疫电泳分析

R371.2/GLB

科学出版社



免疫电泳分析

应用于人的体液

P. 格拉巴和 P. 勃尔丹 主编

潘家秀 译

科学出版社

1966

P. GRABAR et P. BURTIN
ANALYSE
IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE
SES APPLICATIONS
AUX LIQUIDES BIOLOGIQUES HUMAINS
Masson et Cie Éditeurs
1960

内 容 简 介

本书按法文版(1960)译出后,又根据重新修订的英文版(1964)作了修改,本书内容分为三个部分,一是技术部分。详尽地叙述了琼脂电泳和免疫电泳的操作、各个组成的检出方法和定量释意。对抗血清及其应用也作了讨论。

其次部分是关于免疫电泳应用于正常人血浆和病理血清的研究。后者包括对骨髓瘤蛋白、肝炎和弥散性红斑狼疮血清、白血球组织增生、肉瘤病、Waldenström 病等的血清的研究。

最后部分是关于人的其他体液的研究。包括蛋白尿、脑脊液、外淋巴液、滑液以及乳和初乳等的研究。

免 疫 电 泳 分 析

P. 格拉巴和 P. 勃尔丹 主编

潘 家 秀 译

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

北京市书刊出版业营业许可证出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1966 年 3 月第 一 版 开本:850×1168 1/32
1966 年 3 月第一次印刷 印张:8 3/8 插页:1
印数:0001—2,150 字数:222,000

统一书号:13031·2254

本社书号:3421·13—10

定价:[科七] 1.50 元

譯 者 序

Grabar 和 Burtin 主編的“免疫电泳分析”一書在 1960 年以法文出版, 1964 年又譯成英文, 並作了許多刪改和補充。作者們詳細介紹了免疫电泳技術及其在正常及病理人血漿和其他體液的分析方面的應用; 對於生化和臨床工作者來說是一本較有參考價值的書籍。本書初稿系根據法文版翻譯, 脫稿後才見到英文版; 便又根據英文版作了修改。書中涉及的專門名詞, 分別參考醫學名詞匯編(人民衛生出版社, 1960 年)和英漢化學化工詞匯(科學出版社, 1962 年)翻譯。其中有一些名詞, 目前尚無現成資料可查, 暫且意譯。限于水平, 譯文錯誤或不妥之處必很多, 請讀者指正。

本書譯稿承黃永安先生和曹天欽先生在百忙中校閱、修改, 謹此致以衷心的謝意。

譯 者

于上海, 1965 年勞動節

法文版序言

天然高分子物质,如蛋白质等,常是不稳定的,对它们的研究也就遇到许多困难。在近代的物理化学方法中,电泳可能是用得最多的,在很大程度上,它丰富了我们的知识。另一方面,抗原-抗体沉淀反应的特异性也早已为人所熟知,免疫化学家的工作更使之成为蛋白质的研究提供方便。

在建立免疫电泳分析法的时候,我们试图用下列两种方法提供的可能性,即利用电泳迁移率和免疫化学特异性来检定一个物质。这两种方法显然基于不同的性质,迁移率基于电化学而免疫化学反应基于结构。二者联合使用,可以用来检定一个蛋白质或检查一个制剂的纯度。这样要比单独应用其中任一方法要可靠得多。免疫电泳分析法是在一次操作中,给予一个物质二重、有时甚至至于三重检定;样品用量少,即使是很复杂的天然混合物也仅需少量样品即足以进行实验;此外,样品毋须经过可能使它变性的预先处理。这种方法已经在许多非常不同的研究工作中应用,其中最多的是人体液的分析。

实验结果的报告多分散在各种科学期刊中,因而在此专集把主要的事实组合起来,不无裨益。但我们没有企图把所有的1959年12月15日以前的结果和文献资料全部收集在内,因此请求工作没有被引入的作者原谅。

P. Grabar

巴黎, 1960.

目 录

译者序	iii
法文版序言	iv

第一部分 方 法

第 1 章 免疫电泳分析方法	1
第 2 章 琼脂电泳或免疫电泳蛋白质组分的鉴定反应	22
第 3 章 琼脂电泳和免疫电泳结果的定量解说	49
第 4 章 免疫血清及其利用	70

第二部分 应用于人血浆

第 5 章 正常人血浆蛋白	79
第 6 章 脐带血和婴儿血的免疫电泳分析	107
第 7 章 血浆分部的免疫电泳控制	118
第 8 章 病理血清研究的引言	131
第 9 章 缺 γ -球蛋白血症	133
第 10 章 骨髓瘤蛋白的免疫电泳研究	138
第 11 章 用免疫电泳方法研究 Waldenström 病的巨球蛋白	151
第 12 章 冷球蛋白血症	162
第 13 章 肝病	164
第 14 章 风湿病患者血清的免疫电泳研究	168
第 15 章 白血病和肉瘤病血清的免疫电泳分析	174
第 16 章 弥散性红斑狼疮血清的免疫电泳研究	182
第 17 章 各种疾病	187
第 18 章 用免疫电泳分析研究病理血清的结论	191

第三部分 人的其他介质的研究

第 19 章	人的其他介质的研究·····	197
第 20 章	蛋白尿的免疫电泳研究·····	199
第 21 章	脑脊液蛋白·····	212
第 22 章	外淋巴液·····	219
第 23 章	滑液蛋白的本质·····	223
第 24 章	人乳和初乳蛋白的免疫电泳研究·····	228
第 25 章	人的羊水、胎粪和婴儿粪便的免疫电泳研究·····	241
第 26 章	精浆·····	247
第 27 章	免疫电泳应用于血液有形成分的研究·····	252
内容索引	·····	259

第一部分 方 法

第 1 章

免疫电泳分析方法

P. Grabar

“免疫电泳分析法”的原理是先将一混合物在凝胶中电泳分离,而后把沉淀抗体加入凝胶,使之以垂直于电泳的方向扩散。

多年前 Tiselius 和 Kabat^[30] 曾将免疫反应应用于电泳分离物,近来其他作者更应用于淀粉或纸上电泳分离物,但是我们倾向于把这个名词局限于前节中所述的方法。免疫电泳中沉淀抗体与其相应的抗原在凝胶中结合,即形成特异沉淀弧。每一个抗原与其抗体沉淀时可产生一个独立的弧,因此可以计算一个混合物中抗原成分的数目,并可根据其迁移率以及和抗体的特异反应来鉴定。这种双重鉴定还可以用其他方法来补充,如酶反应,组织化学染色等。

甚至于在采用微量技术时,沉淀反应的特异性和灵敏度既可区别迁移率相同或相似的物质,也可显出含量很低的抗原。

这个方法虽然有几个实验室在细节上作了许多变更,但以下我们仍将首先对这个方法作一般性的叙述,并简单扼要地讨论我们实验室所用的技术、Scheidtger^[27] 的微量技术和 Blanc^[1] 的双向电泳法。

1. 凝胶中的电泳

我们对高分子化学和物理的认识有如此大的进展当部分地归功于各种电泳技术的发展。凝胶作为电泳介质有许多优点。

凝胶电泳的迁移率与液体介质电泳相似,但是凝胶的结构却

限制了对流的形成和速度,因此分子在电泳后位置几乎保持静止不动,然而分子运动所引起的自由扩散仍然发生,以致免疫反应仍可进行。在盐和水形成的凝胶特别适用于蛋白质、糖和脂蛋白等生物材料的研究,因为它们都能溶于液体,并且通常没有溶剂变性或非常小。

为获得满意的结果,凝胶的某些性质是重要的。凝胶必须保持一定的弹性,即使在为防止假象采用低浓度时也必须如此。此外,凝胶还必须以水为介质,尽可能用中性的物质制成,以限制电渗(见下)以及其他由于解离基团在电场中的作用所引起的效应。最后,为了使特异沉淀弧容易看到,凝胶应当是透明的。

在所试验过的几种物质中,只有琼脂和果胶是真正满意的。果胶甚至还有某些优点,但其凝胶的形成受许多因素影响,通常不易控制^[9]。新合成的“Cyano-gum”(Lederle & Co.)可制成透明的水凝胶,似乎也可用。淀粉凝胶^[29]可得到某些有趣的分离,可惜不透明,所观测的电泳迁移率也不同于在液体介质中者。

醋酸纤维薄膜可以代替凝胶^[18],可是从膜的结构来看,可能具有某些“过滤效应”,高分子物质电泳时可能被滞留。

在本专集中所提到的全部结果既然都是由琼脂凝胶所提供的,那么在此将只述及这种凝胶的应用。有人曾观察到“过滤效应”,然而这在琼脂凝胶似乎是不常见的,例如我们就从没有看到过高分子量的巨球蛋白迁移率有所减慢。可是在天然血纤维蛋白原^[28]和卵白溶菌酶^[15]这种滞留现象是有的。琼脂即使含液量高达99%,仍可制成相当坚固的凝胶。许多已知物质在琼脂凝胶中的迁移率和在液体介质中是一样的。这种凝胶又是完全透明的,并可制成有弹性的干膜,无限期地保存。

(a) 琼脂凝胶的制备

市售琼脂来源不一,纯度也有不同。某些净化得很好,可以买来就用,其他的必须经过补充净化才能使用。净化的方法有好几种(见下)。琼脂总是要加热融溶一次或一次以上;我们建议避免

不必要的加热,并利用水浴来限制水解和炭化。最好的凝胶通常是以高分子量的琼脂制成的。

根据经验,当采用不同来源的琼脂,甚至于采用同一牌号不同批号的琼脂,各种物质的电泳位移有所不同,因此我们建议使用同一批产品来作实验,当使用新的琼脂时,应作好对照,以资比较。

制备凝胶时,首先应当预试足以形成既有弹性而又牢固的凝胶所需的琼脂浓度,一般约为 1—1.5%。然后将一定量的琼脂溶于适当的缓冲液中(见后),如果所得的溶液不够清澈,迅速用铺有快速滤纸的布氏漏斗过滤。如此制成的溶液中所需量的抗菌剂(如 1:10,000 的硫柳汞)后,分装于小瓶。小瓶的体积相当于制备某定额琼脂板所需溶液的体积,这样可以避免全部溶液反复加热。

电泳在以玻璃板支持的凝胶中进行。玻璃最好用没有缺陷的照相底板,仔细洗净后,铺上一薄层融化的琼脂,而后,一如处理试管^[23], 80℃ 烘干,或简单地吹干,即可使琼脂与板牢固地粘附。

为了在玻璃板上形成一层均匀的琼脂层,必须把板放平;最简单的是把融化的 5% 琼脂倒在固定在桌子上的显影瓷盆里。盆的大小适合于同时放一定数量、一定大小的板。先把玻璃板放在盆的平面上,再在板的两端各放一条层析滤纸,长度相当于玻璃板的宽度,宽 4 厘米,其中 1 厘米留在玻璃板上(图 1)。这条滤纸将用来连接凝胶和电极槽。滤纸上盖上同样的凝胶,以防电流的损耗。然后将热的缓冲琼脂液倒在盆里,注意避免产生气泡。琼脂液的体积以在玻璃板和纸条上形成 4 毫米厚的凝胶为度。

板从支持物上取下来的办法是:待凝胶冷却后,沿着玻璃板和滤纸条用刮匙把凝胶划开,再在纸和板交界处(沿图 1, AA')轻轻切一刀,抬高玻璃板,把纸折成直角,再在划开的地方(图 2, A)倒上融化的琼脂,以保证凝胶的连续性。

电泳分析样品可加在一个接近板的中央、琼脂被挖去后所形成的孔中(图 1, R)。孔的大小、形状各有不同。大多数情况下,用垂直于电泳轴的长形孔。这种孔要比在这轴上同样宽度的圆或

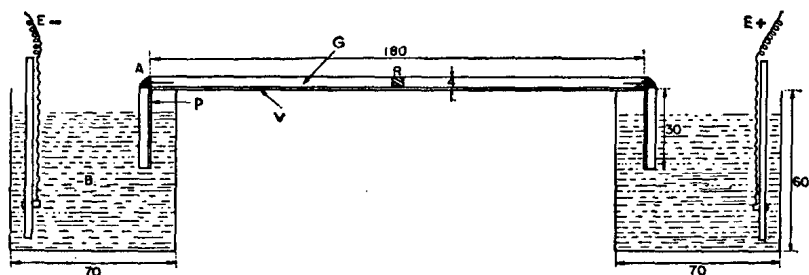
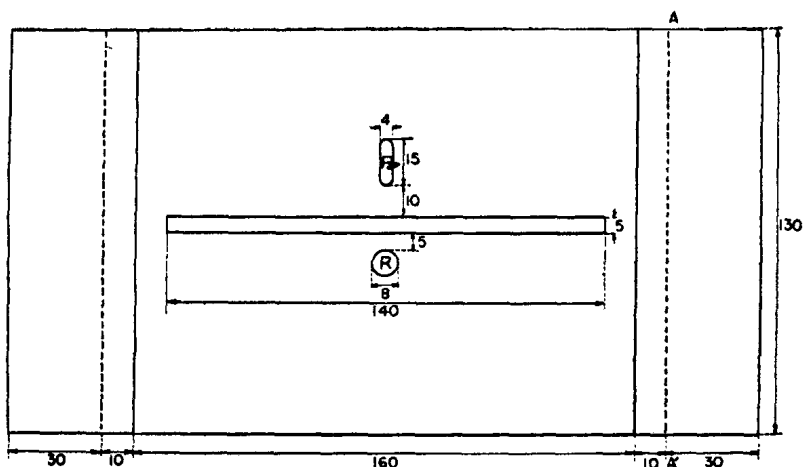


图 2. 琼脂凝胶电泳仪示意图。
B = 电极槽; E = 电极; V = 玻璃板; G = 凝胶; P = 覆有凝胶的滤纸, 用以连接琼脂板和电极槽; R = 加分析液的孔; A = 琼脂, 用以弥合滤纸弯折时所形成的空隙。

方孔容积大得多。利用黄铜管制成的小的打孔器,可以制得大小一律的孔。抗体加在槽中,槽是在电泳完毕后,用刀和齿科刮匙挖开,玻璃板面则以最少量的融溶凝胶使与板上凝胶封住。槽的长度通常接近板长,宽度一般为5毫米,并与孔有一适当的距离。此距离可预试,一般在5—10毫米之间。为便于挖孔或槽,可把板放在纸样上。

孔、槽之间的距离以能产生数目最多的独立弧的距离为准。此距离是抗体浓度的函数,并与抗原浓度呈反比。

为了避免抗原孔边缘的琼脂裂开和保证抗原有规律的位移,把离子强度接近于凝胶缓冲液的抗原溶液与等体积的融溶 2% 琼脂在 42—45°C 混合,加入孔中。待凝结后,面上加一滴琼脂液,以保证凝胶的连续性和高度。

经验证明,某些物质,特别是血清的成分(很可能是补体)^[35]与融溶的琼脂混合时,受短暂加热的影响可能改性。此时可把样品加在孔中,电泳进行一段时间以后再封闭之,或把样品与糊状琼脂低温混合,最后再加几滴琼脂盖上。Bustamente 和 Wunderly 把吸有样品的滤纸片与琼脂接触,一刻钟后再把琼脂面洗净^[3]。这种技术虽可避免加热,但由于各成分在琼脂中扩散速度不一定相同,可能会改变这些成分的浓度比。

电泳完毕后,将免疫血清倒在横槽中;通常所加的是液体,但有时为了减慢抗体扩散速度,我们曾用免疫血清与琼脂的混合液。

(b) 电 泳

多年以来,许多作者均描述过凝胶电泳法,例如 Gordon 及其同工作者^[6]曾使用琼脂凝胶。但我们把这些方法称为“简单电泳”(以下简称电泳),因为他们没有应用免疫反应。我们在此所描述的技术也可仅作“电泳”用,所得到的结果与纸电泳相似,而凝胶的透明性和制成透明薄膜的可能性,则又较滤纸优越。染色点还能定量地估计平行的免疫电泳实验中所研究的混合物的主要部分,这样也就可以得到更完整的知识^[31]。

为了得到混合物中各组分的最大分散度,显然最好用高电位差,这样可缩短电泳时间,从而减少所研究的混合物组分的自由扩散。但由于高电位差下通电,凝胶生热,电压不得不受一定限制。根据经验,选用颇低的盐浓度,可以用 3—6 伏/厘米¹⁾的电位差,在

1) 电位差应在凝胶内部进行测定,这样可以避免交界面电流损耗所造成的误差。

室温操作,无需特别注意冷却。通电时,凝胶微微变干,但并不改变结果的重复性。然而保护琼脂板不使它强烈地蒸发,例如用屏风,也还是有好处的。在某些情况下,特别在研究极不稳定的物质时,可在冷室进行或利用一个冷却系统(如 Frenz 所描述的仪器^[5])来作电泳。

如上所述,我们一般用盐浓度相当小的溶液以避免琼脂发热。如果要迁移率前后一致和保持琼脂内部 pH 值恒定,必须使用缓冲液。离子强度在 0.025—0.05 可以得到满意的结果。在常用条件下电泳进行 5 小时以上,电泳速度减慢,凝胶中电解质也减少(导电度降低)。此时,为了重建合宜的条件,把凝胶浸于缓冲液 15—20 分钟;凝胶即重新吸满盐液。如果觉得常用的离子强度太低,可以提高,以保证某些组分的溶解。这时最好适当地降低电压,当然电泳迁移率也随之降低,或放在冷室中电泳。

缓冲液的选择随实验条件而定。琼脂凝胶在 pH 5—9 都是稳定的。如果用磷酸缓冲液,对琼脂纯度的要求就要高些。一般多用硼酸或巴比妥缓冲液, pH 不超过 8.2,因为碱性太强能引起蛋白质某些基团不可逆地改变,以致与相应抗体起特异反应时,产生不良的后果。在某些特殊情况下,也有用其他缓冲液和不同 pH 者。

在建立技术的时候,我们试图使它尽可能地简单,必需的仪器可以很容易地在实验室里设置起来。但有许多厂商已经出售很合用的仪器。有的作者也曾设计了比我们所用的更为复杂的仪器。图 2 和 3 是仪器的主要轮廓和一架已经在实验室里装好的仪器。它包括(a)放两个白金电极的有机玻璃槽,边上放置覆有凝胶的玻璃板;(b)绕在有机玻璃上的白金电极(0.5 毫米直径);长度接近于槽的全长;(c)直流电源:足以提供如 110—120 伏,100—150 毫安的电流。在一般情况下,这样可以同时进行几个分析。每个板(13 × 18 厘米)用 40 毫安的电流。

电泳槽中应当盛有相当大量的缓冲液,以免通电时 pH 发生变化。缓冲液自贮液瓶滴入电极槽,又自电极槽流出,这样电极槽中的缓冲液也就不断更新。电极槽液面应当尽可能保持较高的水

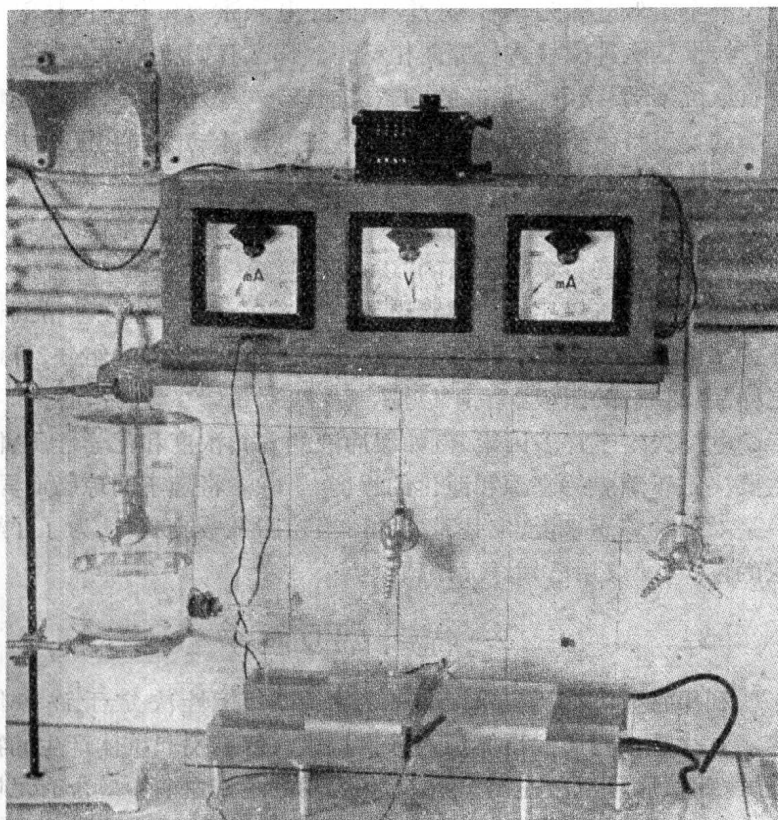


图 3. 琼脂电泳仪。

平，使通过连接槽和板的滤纸电流损耗最小。显然还可以用其他各式各样的装置，如不极化电极；棉花或琼脂代替滤纸，冷却系统等。但直到现在为止，我们所用的极为简单的仪器，还是足以得到满意的结果的。

由于琼脂不是绝对中性的，一种副作用——电渗——和电泳同时发生。电渗就是吸在琼脂中的全部液体朝电流相反的方向移动。这种移动是均匀的，并不干扰所研究的混合物各个组份相对电泳位移，只使凝胶失去其中一部分液体而已，但由于所失液体没有补充，也就使琼脂的一边变薄。

一个组分电泳完毕后的位置因此是电泳泳动和电渗位移的总和。如果这两种位移是相等而相反的，那么我们所得到的印象是物质原位不动；带电荷很高的物质表面迁移率似乎减小，而正迁移率小的物质将由于电渗使它朝着和真正电泳泳动方向相反的方向移动。最后，中性物质将只被电渗所带动，电泳完毕后，相当于电泳“零点”的位置。这一类的物质（如葡萄糖、葡聚糖、果聚糖）均可用以测定计算迁移率时所需的“零点”（见第3章）。

一般把分析样品加在琼脂板的中央，以免某些组分被带到板外去。但是，有时如果要特别研究移动较快的或较慢的组分，可以把样品加在板的阴极端或阳极端。

电渗决定于许多因素，例如缓冲液的pH、浓度和化学性质，但主要决定于琼脂的来源和净化的程度。电渗将随不同琼脂而异，但是对一种琼脂来说，它是稳定的。当琼脂批号改变时，为了了解它的性质，建议用已知样品作预试。

2. 特异沉淀反应

利用特异沉淀反应来证明一个物质的可能性决定于许多因素。首先是该物质的抗原性。只有抗原（即能引起抗体产生的物质）或半抗原可以被检出。第二，在所用的免疫血清中应含有足够浓度的沉淀该物质的抗体。第三个因素是在混合物中该物质的含量。

特异沉淀反应的原理是早已知道的。在此只着重叙述其特异性，换言之，即每一种抗原只与相应的抗体起反应。另一个值得注意的是灵敏度；几微克的物质即可在免疫电泳中显示出来。但是不要忘记不溶性的抗原—抗体络合物只有当抗原、抗体在一定比例范围内相遇时才是可见的。

在本专集中不叙述产生免疫沉淀血清的具体方法，其操作步骤还多是经验性的。所得到的结果又是如此多变，以致在使用前不得不对每一种免疫血清加以研究，以谙熟其免疫性质。

显然用作免疫电泳分析的血清，抗体含量越高越好，当研究抗

原混合物时,最好能用含有抗该混合物全部组分的抗体的免疫血清。要检出一个杂质,最好用含该杂质多的物质免疫动物所得的血清,而不是象某些作者那样,用有关杂质已被全部或部分除去了的纯品免疫动物,取其血清。

各种动物的免疫血清均可使用,但大多用兔、山羊和马的免疫血清。已知沉淀抗体有两种类型:一种是兔及大多数动物的,一种是马的。前者只在抗原过量时形成可溶性的络合物,而马的蛋白质抗体主要是絮状的,即只在相当有限的抗原—抗体比例范围内形成沉淀,在抗体过量时也形成可溶性络合物。因此,有时必须改变免疫血清的比例,以免由于形成可溶性络合物,在凝胶中无法检出。

电泳完毕后,各组分的点即分布于迁移轴上;把琼脂板染色如纸,即可使之成为可见。若在凝胶中切一个平行于迁移轴的贮液槽,倒入所需量的免疫血清,则此免疫血清的抗体和抗原一起在凝胶中扩散。当抗原抗体相遇,比例合适时,即形成不溶性络合物而下沉。这些沉淀多少呈弧状分布于凝胶中。

免疫血清和待分析样品之间的相对比例,及中央孔和边槽之间的距离都是很重要的,分析未知物时,应预测之并根据实验目的而有所不同。事实上,特异沉淀仅在抗原抗体最适比例范围内形成。一种抗原混合物和用这种混合物注射所获得的免疫血清,各组分间的相应最适比例不尽相同。因此,为了显出其中最大多数组分,常常必须用不同比例的反应物作平行试验。如果要检出一个浓度很低的组分,自然应当提高样品用量。结果含量高的主要组分由于过量而形成可溶性和不可见的络合物。在分析人血清时,血清白蛋白常是如此。反之,若要研究一种含量丰富的组分,如血清白蛋白,样品用量应减少,如此必然不利于次要组分的出现。最后,如果免疫血清中某一种抗体含量低,则需用大量抗血清,以便相应的抗原得以显出。

至于抗原抗体槽孔之间的距离,显然,如果太近或者如果抗原扩散快,抗体比例不足,很可能观察不到所形成的沉淀,那怕是昙

花一现;当距离较远时,即使以后沉淀可能被过量抗原所溶解,终究还有看到的机会。然而距离过分远是没有好处的,反应物用量大,产生沉淀弧所需的时间也长。为了得到反应物的用量和最适距离的准确概念,建议在琼脂板上不作电泳,先打不同距离的孔,加

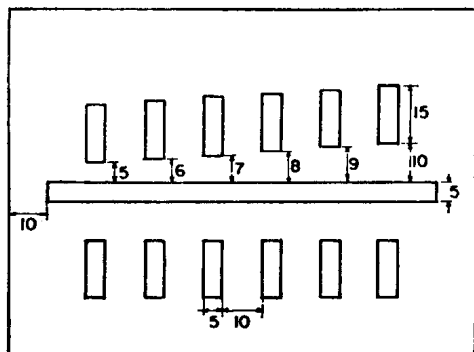


图 4. 预试时琼脂板的挖孔法。
上: 不同的距离。下: 不同的浓度。

不同浓度的样品,作预试实验(图 4)。

电泳完毕后,把免疫血清倒入边槽,将板置于 18℃ 的有盖盒子中,底上铺一层潮湿的含有少量硫酸铜水溶液的滤纸。硫酸铜作防菌用。保温,或者至少避免温度发生剧烈的变化。如所周知,大多数

特异沉淀反应 37℃ 比 0℃ 快,但不够完全。另一方面,37℃ 由于扩散快,沉淀弧的形成也较快。我们折中地选用中间温度,即在 18℃ 保温。

在凝胶中加硫柳汞 1:10,000 可以抑制细菌的繁殖。为此槽中加了抗体以后,在凝胶表面上涂上 1、2 滴 0.1% 硫柳汞。

通常特异沉淀的出现不是同时的。人血清和抗人血清第一批弧 24 小时可见到,有的却须经 5—7 天才显形完全。显形结果可根据需要,无论在显形过程中或在板干燥染色后,或简单地观察作图,或拍摄下来^[32,35](见第 2 章)。

沉淀弧摄影记录的方法,最简单的是把凝胶板放在反差强的印相纸(或底片)上,一并放在生理盐水中曝光,这样可使凝胶表面可能有的不规则翻印减少到最大限度。在微量或半微量技术中,也可以把凝胶板放在放大机里,直接得到大而清晰的象。图形也可在沉淀弧显形的过程中拍摄,以追随此过程并记录偶然发生的变化。操作过程应避免温度的剧烈波动和凝胶过长地浸于水中。