

高分辨率电泳和 免疫球蛋白一元论学说

THE HIGH RESOLUTION ELECTROPHORESIS AND MONOPHYLETIC THEORY OF IMMUNOGLOBULINS

蒋登洲 著

62



贵州科技出版社

GUIZHOU SCIENCE & TECHNOLOGY PUBLISHING HOUSE

高分辨率电泳和 免疫球蛋白一元论学说

The High Resolution Electrophoresis and
Monophyletic Theory of Immunoglobulins

贵州科技出版社

·贵阳·

图书在版编目(CIP)数据

高分辨率电泳和免疫球蛋白一元论学说/蒋登洲著
贵阳:贵州科技出版社,2000.5

ISBN 7-80584-368-6

I.高… II.蒋… III.①高分辨率-免疫电泳-研究②免疫球蛋白-免疫测定-研究 IV.R446.62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 19310 号

贵州科技出版社出版发行

(贵阳市中华北路 289 号 邮政编码 550004)

出版人:丁 聪

贵州新华印刷厂印刷 贵州省新华书店经销

850 毫米×1168 毫米 32 开本 10.75 印张 270 千字

2000 年 8 月第 1 版 2000 年 8 月第 1 次印刷

印数 1—1060

定价:24.00 元

前 言

本书旨在对作者从 1987 年至 2000 年, 历时 13 年的时间所从事的高分辨率血清蛋白琼脂糖凝胶电泳(HR - AGE)、高分辨率琼脂糖等电聚焦(HR - AIF)和在此基础上所进行的“免疫球蛋白一元论学说”等免疫学理论的系列性研究进行一次比较全面的科学的总结。

这些研究在电泳和等电聚焦等方面形成了自己的新的方法学体系和理论体系; 应用这些新方法、新理论对血清蛋白、免疫球蛋白(包括骨髓瘤蛋白)、血红蛋白、脂蛋白和若干种酶的同工酶等生物大分子进行了长时间的、系统性的研究, 均取得奇特的结果; 在研究上述优秀结果的基础上, 进行了深入而系统性的理论探索 and 理论研究, 创立了“免疫球蛋白一元论学说”(The Monophyletic Theory of Immunoglobulins)等免疫学理论。这些研究形成了一个巨大的系统工程, 并具有广阔的发展空间, 这对我国医学生物学的发展将产生积极的和深远的影响, 在医学生物学领域将发生一场重大的变革。

一、本系列性研究在科学上所获得的进步

(一) 创立了新型的电泳和等电聚焦的方法学体系和理论体系

1. 创立了新的电泳和等电聚焦的加样法(简称新加样法)并连续达到“四个高度”

新加样法的“第一高度”——直接插入加样法(第三章)。这种

加样法就是利用 X 线胶片剪成的加样器蘸取少量样品直插入到凝胶床的适当部位,随即进行电泳的方法。这种方法简单、明快,提高了电泳的分辨率,具有广阔的发展空间,并且很可能适合于电泳的自动化系统。

新加样法的“第二高度”——“一开一合”加样法(第一、二章和第七章)。这种加样法的要点是在开槽-加样之后,用手指在凝胶床的负极侧向加样槽的方向推挤,直至形成更窄的窄缝、样品满槽而不溢出为止。这种加样法具有极大的优越性,在样品槽容量的范围之内,可以任意选择所加的样品量,使“死凝胶”变成“活凝胶”,使“死槽”变成“活槽”。所有这一切给电泳带来了极大的灵活性和机动性。这种技术与下面将要谈到的样品宽度“临界点”结合起来应用,使电泳获得了非常高的分辨率,就正常血清免疫球蛋白的分离而言达到了“准克隆型”(quasi-clonotypes)水平。

新加样法的“第三高度”——“双开双合”加样法(第四章和第七章)。这种加样法的要点是在“一开一合”加样法的基础上进行电泳或等电聚焦,过程中利用制板时留下的凝胶溶液进行“封槽”,这就是“双开双合”加样技术。这种加样技术使电泳获得了更高的分辨率。更重要的是,这种加样技术适合于琼脂糖等电聚焦并获得了令人震惊的结果——待分离成分的区带数成倍或成几倍地增加。就正常血清免疫球蛋白的分离而言达到了“克隆型”(clonotypes)水平,而且,多克隆、寡克隆、单克隆丙种球蛋白的分离同样达到了“克隆型”水平,并与正常免疫球蛋白(带)相对应。这种研究水平和获得的优秀结果达到了理论创造的高度,为“免疫球蛋白一元论学说”的建立奠定了实验基础和理论基础。

新加样法的“第四高度”——凝胶条加样法(第五章和第七章)。这种加样法的要点是在制板时另外制作一个像“加样箔”那样的凝胶条并在上面开槽,然后将其转移到凝胶床上的适当部位,整理之后加样,随即进行等电聚焦。这种加样法达到了“登峰造

极”的地步,将失去效力的 ampholine(两性电解质)起死回生,恢复活力,获得了与未失效的 ampholine 相似的或相同的优秀结果。

2. 电泳样品宽度“临界点”的发现

几乎在创立“一开一合”加样技术的同时,探索出了样品宽度的“临界点”。电泳样品在这种“临界点”上就能获得非常高的分辨率。就血清蛋白琼脂糖凝胶电泳而言,其“临界点”为 0.25mm 左右。在这种“临界点”状态之下,血清中的许多成分都得到了分离,甚至在条件组合比较好的时候,正常克隆型免疫球蛋白也可以显示若干条区带。

3. 电泳样品线长度的“雁行理论”

在作者的系列性研究,尤其是“高分辨率‘四合一’血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳”(第一章第四节和第七章)的研究中,经过反复研究和探索,认为电泳样品线也有一个最适长度,这个长度在 1.4cm 左右。在这种状态下可以取得较好的分辨率。作者将这种现象形象地称之为“雁行理论”。

除此之外,作者还强调电泳或等电聚焦的“全程最优化”,比如说,电泳或等电聚焦过程中温度的控制、电极缓冲液和凝胶缓冲液的优选、染色液和染色方法的优化等等。这就是说,电泳和等电聚焦的每一环节都要采取最优化措施。在这种条件下所进行的电泳和等电聚焦分辨率提高,待分离的物质基本上都形成了区带,背景几乎不着色或根本就不着色,这样,脱色就变得很简单,或不脱色也可以。比如说,高分辨率血清蛋白琼脂糖等电聚焦显示 60~70 条区带的这样复杂的实验,也只是在脱色液中晃几下即可,没有任何背景着色,脱色时间长了还会造成区带的过度褪色。

(二)应用这些新方法和新理论对生物大分子的具体研究

在上述新方法和新理论的引导之下,作者对血清蛋白、免疫球蛋白(包括 M 成分)、脂蛋白、血红蛋白和若干种酶的同工酶等生物大分子进行了广泛而系统性的研究,均取得了空前高的分辨率

和奇特的结果。第一章至第五章描述的就是这方面的内容,第六章至第十章也是这一总原则总思路的延伸。作者所进行的这些研究也只是“举例”和“浏览”性质的,有的还处于实验阶段,但是,这些研究所展示的前景是非常光明的。

(三)深入的理论探索和理论研究

在研究上述大量的优秀的实验结果的基础上,进行了深入的理论探索和理论研究,提出了“免疫球蛋白一元论学说”等免疫学理论。“免疫球蛋白一元论学说”认为,免疫系统由统一的克隆世界所组成,并将这种观点贯穿于该学说的始终。在这里我提请大家注意,正常免疫球蛋白的分离达到“克隆型”水平,多克隆、寡克隆、单克隆三种球蛋白的分离同样达到克隆型水平,并与正常免疫球蛋白(带)相对应;而且推测,特异性抗体也应当与正常免疫球蛋白带相对应,对这些现象本质的认识在科学上是一个非常大的进步,是非常重大的科学发现。这些问题的显现,揭示了事物的某些本质性的问题,从而提高了研究者的洞察力。如果研究者有足够的敏锐性,“免疫球蛋白一元论学说”的核心就包含其中。但是,这个时候离真正的“免疫球蛋白一元论学说”的建立还有一大段距离。在这个时候研究者就处于严峻的十字路口。进一步地进行理论创造,“免疫球蛋白一元论学说”就有可能被提出来,否则它只能是一个重大的方法学改进和取得了良好的结果而已。好在作者从一开始就敏锐地觉察到并紧紧地抓住了这个问题,经过艰苦的理论创造,最终建立了“免疫球蛋白一元论学说”。

二、我亲历研究工作现场的感受

(一)“免疫球蛋白一元论学说”的创立如履薄冰

尽管如上所述,“免疫球蛋白一元论学说”的建立是以上述相关科学实验所获得的优秀结果为基础的,并经过长时期的研究才建立起来的,但是,心里还是有些不踏实,尤其在讨论中又触及到了现存的免疫学理论,所以如临深渊,如履薄冰——怕出错。作者

认为,对于新的免疫学理论的创立是需要勇气的,而且经过长时期的科学实验、观察到许多优秀结果以及对这些结果的科学分析,使作者获得了足够的洞察力和智慧,因而确信“免疫球蛋白一元论学说”的基本思路是正确的。如果研究工作的层次达到了这一步而提不出新的免疫学理论反而是不正确的;要不就是没有达到这种认识和创造水平。对于现存的免疫学理论以讨论的方式进行探讨或商榷并不是多余的。万一错了怎么办?! 对的就坚持,错了就改。我在一次全国性学术会议上提出过这种观点(针对“免疫球蛋白一元论学说”),赢得了与会者的掌声和称赞。

(二)“双开双合”建立之后的两次思维定势

第一次,就是在“双开双合”加样技术建立之后没有很快投入正式研究,而是等到两年之后才进行。我考虑主要有以下几点:第一,这个时候(1989年春节前后)高分辨率琼脂糖凝胶电泳的研究“余兴未尽”,在此时虽然该研究达到了最高峰,但是还想进一步提高其分辨率,直到现在还想用更好的条件继续做这项研究;第二,在作者的脑海里这是大研究,不能用“插空”的方式对待之,加之当时 γ GT等研究正在紧张进行,似乎也安排不上;第三,可能未估计到会出现那么好的结果,使惊喜迟到两年。

第二次,在我的脑海里,“一开一合”加样技术就是做琼脂糖凝胶电泳用的,而“双开双合”加样技术则是做琼脂糖等电聚焦用的。这样,就形成了强烈的思维定势。到1991年的下半年,作者进行的系列性研究的最重要的课题——高分辨率琼脂糖凝胶电泳和高分辨率琼脂糖等电聚焦都已经很好地完成(尤其就血清蛋白而言),就想集中精力,集中时间,一举将其他的研究,如脂蛋白电泳、数种酶的同工酶电泳等等研究拿下来。用的仍然是“一开一合”加样技术,这些课题久攻不下,不能取得实质性进展。但是,一旦采用了“双开双合”加样技术,这些课题终于一个一个地被攻克。

这告诉我们一个道理,就是有时候在科研工作中问题是“明摆

着”的,但就是看不见。这与细心不细心似乎是无关的,往往是吃尽了苦头之后才“恍然大悟”。这并不是说这类问题是不可以认识的,做研究工作还是多想想,否则会耽误大事。

(三)假如新的电泳加样法停留在直接插入加样法和“一开一合”加样法将是一个什么样子?

假如新的电泳加样法停留在直接插入加样法和“一开一合”加样法,这最多是一个重大的技术革新,但它(们)所显示的结果不能达到现在这样进行理论创造的水平。作为一项系列性的研究,如果只做到这一步就太可惜了。在现实的研究工作中,这种不能再前进的情况可能是不会太少的。但是,“一开一合”加样技术是基础,如果没有“一开一合”加样技术是绝对不会发明出“双开双合”加样技术来的。因此,“一开一合”和“双开双合”加样技术是新的电泳和等电聚焦技术中的两颗璀璨的明珠。若想让后面这颗明珠亮起来,发出灿烂的光辉,需要更多的聪明才智和做更多艰苦的工作。

(四)利用“双开双合”加样技术取得的优秀的结果是否就意味着“免疫球蛋白一元论学说”的建立?

在高分辨率琼脂糖等电聚焦(利用“双开双合”加样技术)的研究过程中,如上所述,正常免疫球蛋白的分离达到了“克隆型”水平,多克隆、寡克隆、单克隆三种球蛋白的分离同样达到了“克隆型”水平,并与正常免疫球蛋白(带)相对应。这样系列性现象的出现,“免疫球蛋白一元论学说”便隐约可见,但不是“免疫球蛋白一元论学说”本身,而只是达到了“试解多、寡、单克隆三种球蛋白与正常免疫球蛋白之间关系的奥秘”(第十一章)的程度,真正的“免疫球蛋白一元论学说”还需要更深层次的发明和创造。

(五)艰苦的研究历程

我从事的研究工作坎坷然而令人振奋。其中一个最重要的现

象是用刚刚能进行实验的仪器和试剂,却取了令人振奋、影响重大的优秀结果,而且步步深入,直到“免疫球蛋白一元论学说”这种重大的免疫学理论的发现。我在上面说的实验研究“全程最优化”也只是就方法学而言,而就仪器和试剂而言都是最低水平的。

我的研究走到这一步可真不容易。在这漫长的马拉松长跑式的研究工作中,孤军奋战,日夜兼程,身体、精神和经济都严重“透支”,又加上其他的艰难和困苦,几乎很难将研究工作坚持下来。虽然遇到了许多的艰难和坎坷,但是,在这新世纪来临之时,体现我的辛勤劳动和智慧的著作终于付梓,和大家见面了,确实令人感到欣慰,感到自豪。我深信,将这些宝贵的结果带进光辉的 21 世纪,对于我国医学生物学的发展将起到积极的推动作用。

限于作者的水平,书中不免会有缺点和错误,欢迎各方面的专家和广大读者给予批评指正。

蒋登洲
2000 年 4 月

目 录

第一章 高分辨率琼脂糖凝胶电泳——蛋白质部分	(1)
第一节 引 言	(1)
第二节 高分辨率血清蛋白琼脂糖凝胶电泳	(2)
第三节 高分辨率正常血红蛋白琼脂糖凝胶电泳	(18)
第四节 高分辨率“四合一”血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(22)
第五节 关于波形带系低密度脂蛋白的研究	(40)
第六节 十二烷基硫酸钠—琼脂糖凝胶电泳初探	(45)
第二章 高分辨率琼脂糖凝胶电泳——同工酶部分	(57)
第一节 引 言	(57)
第二节 高分辨率血清 γ -谷氨酰转移酶同工酶琼脂糖凝胶电泳	(58)
第三节 乳酸脱氢酶同工酶琼脂糖凝胶电泳研究报告	(66)

第四节	肌酸激酶同工酶琼脂糖凝胶电泳实验 报告	(75)
第三章	直接插入加样法琼脂(糖)凝胶电泳	(84)
第一节	引 言	(84)
第二节	直接插入加样法血清蛋白琼脂凝胶 电泳	(85)
第三节	直接插入加样法糖化血红蛋白琼脂凝胶 电泳	(89)
第四节	直接插入加样法血红蛋白琼脂糖凝胶 电泳	(92)
第四章	高分辨率琼脂糖等电聚焦	(94)
第一节	引 言	(94)
第二节	高分辨率血清蛋白琼脂糖等电聚焦	(95)
第三节	高分辨率正常人血红蛋白琼脂糖等电 聚焦	(105)
第四节	高分辨率血清脂蛋白琼脂糖等电聚焦 ...	(112)
第五节	正常血清免疫球蛋白(带)在 HR - AIF 上显示范围的研究	(117)
第六节	肌酸激酶同工酶琼脂糖等电聚焦初探 ...	(121)
第七节	血红蛋白电泳分离物的琼脂糖等电 聚焦	(125)
第八节	“老化”血红蛋白琼脂糖等电聚焦	(128)
第九节	搭条法血清蛋白国产琼脂糖等电聚焦 ...	(130)
第十节	电泳分离 β_1 、 γ 和 Alb 带提取物的琼脂 糖等电聚焦	(135)
第五章	凝胶条加样法琼脂糖等电聚焦	(139)
第一节	引 言	(139)

第二节	凝胶条加样法血清蛋白琼脂糖等电聚焦…	(140)
第三节	正常血清免疫球蛋白凝胶条加样法 HR-AIF 显示区带的免疫固定 ……	(147)
第四节	分离提纯正常免疫球蛋白凝胶条加样法 AIF-免疫固定 ……	(151)
第六章	生物大分子电泳进化论 ……	(155)
第一节	引言 ……	(155)
第二节	从脊椎动物血清蛋白(Ig)的电泳行为看 免疫球蛋白的种系发生 ……	(156)
第三节	从脊椎动物血清蛋白(Ig)等电聚焦行为 看免疫球蛋白的种系发生 ……	(162)
第四节	从脊椎动物(鸡)胚胎血清蛋白(Ig)电泳 行为看免疫球蛋白的个体发生 ……	(167)
第五节	从脊椎动物(鸡)胚胎血清蛋白(Ig)等电 聚焦行为看免疫球蛋白的个体发生 ……	(170)
第六节	从脊椎动物血红蛋白电泳行为看血红蛋 白的种系发生 ……	(173)
第七节	从脊椎动物血红蛋白等电聚焦行为看血 红蛋白的种系发生 ……	(176)
第八节	从脊椎动物(鸡)胚胎血红蛋白电泳行为 看血红蛋白的个体发生 ……	(180)
第九节	从脊椎动物(鸡)胚胎血红蛋白等电聚焦 行为看血红蛋白的个体发生 ……	(182)
第十节	总结和展望 ……	(185)
第七章	高分辨率电泳和高分辨率等电聚焦新方法学 概论 ……	(188)
第一节	引言 ……	(188)

第二节	论电泳和等电聚焦的加样法	(189)
第三节	多用途电泳凝胶干燥法	(201)
第四节	垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳灌胶二步 防漏法	(206)
第五节	血清蛋白圆盘聚丙烯酰胺凝胶电泳标本 干燥和复原法	(208)
第八章	M 蛋白病的电泳、免疫化学研究	(210)
第一节	引 言	(210)
第二节	M 蛋白异质性分析	(211)
第三节	一例多 M 蛋白病患者的电泳和免疫化学 分析	(224)
第九章	M 蛋白病的调查	(229)
第一节	引 言	(229)
第二节	用同工酶琼脂糖凝胶电泳废片蛋白染色过 筛 M 蛋白病	(229)
第三节	利用血液流变学检查后废血浆电泳过筛 M 蛋白病	(233)
第十章	M 蛋白病的诊断战略和免疫球蛋白系列 研究的发展战略	(236)
第一节	引 言	(236)
第二节	M 蛋白病诊断的基础战略	(238)
第三节	M 蛋白病诊断的高级战略	(245)
第四节	论我国免疫球蛋白系列研究的发展战略 ——从我对免疫球蛋白的研究看我国免疫球蛋白 研究的发展	(252)
第十一章	免疫学的理论研究	(263)
第一节	引 言	(263)

第二节	免疫球蛋白一元论学说·····	(265)
第三节	天然免疫球蛋白 - 抗体 - 天然免疫球蛋白 转换规律·····	(291)
第四节	破解多、寡、单克隆丙种球蛋白与正常免疫 球蛋白之间关系的奥秘·····	(297)
第五节	用免疫球蛋白一元论观点试解免疫记忆·····	(302)
第六节	关于正常克隆型免疫球蛋白的排位、编号 和命名的主张·····	(309)
第七节	以免疫球蛋白一元论的观点看免疫耐受·····	(313)
参考文献·····		(317)

第一章 高分辨率琼脂糖凝胶电泳——蛋白质部分

第一节 引言

在这一章介绍作者建立的高分辨率琼脂糖凝胶电泳——蛋白质部分。实际上这一章蛋白质部分与第二章同工酶部分都属于高分辨率琼脂糖凝胶电泳,只是为了讨论方便才人为地将它们分成两章的。本章第二节“高分辨率血清蛋白琼脂糖凝胶电泳”(HR-AGE)是本章、也是本书讨论的重点,因为在这一章中最重要的是“一开一合”加样技术的建立和对于样品宽度“临界点”的认识。随着研究工作的进展,又创立了“双开双合”加样技术和建立了样品线长度的“雁行理论”。这样,就比较好地发掘出了作为电泳介质琼脂糖的巨大潜力,使琼脂糖凝胶电泳获得了空前高的分辨率,并显示出许多优异的特性。HR-AGE 研究的成功,极大地鼓舞了作者向更高目标攀登的信心和决心。在琼脂糖凝胶电泳和琼脂糖等电聚焦方法学上

连续达到了“四个高度”,即直接插入加样法、“一开一合”加样法、“双开双合”加样法和凝胶条加样法。这些方法是一层一层深入的,在各个研究课题中灵活运用而不生搬硬套,均获得极为优秀的结果。就本章而言,“一开一合”和“双开双合”加样技术得到了充分的应用和发挥,从而在各项研究中又有不少的发明和创造。对于“临界点”的灵活运用就更为突出,如血清蛋白的“临界点”为 0.25mm,而肌酸激酶的“临界点”竟然为 1.9mm,二者相差 7.6 倍,而认识这个问题花了很多的时间。

这些研究所获得的优秀结果给人以很大的启示。在 HR - AGE,正常血清在 γ 区显示数条免疫球蛋白区带,这些区带是“比较活跃的”或“非常活跃的”B 淋巴细胞克隆分泌的免疫球蛋白形成的。作者将此称为“准克隆型”(quasi-clonotypes)分离水平。高丙种球蛋白血症病人的血清显示数条至 10 条左右的寡克隆带。M 蛋白得到很好地分离,并容易显示异质性。这些研究结果提高了研究者观察问题的洞察力。本研究和后面将要讨论的高分辨率琼脂糖等电聚焦(HR - AIF)所获得的优秀结果一起达到了进行免疫学理论创造的水平。

本章列出的研究内容仍然是举例性质的,因为这些方法具有广阔的发展空间,可以在许多领域应用。

第二节 高分辨率血清蛋白琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖是区带电泳的一种良好的介质,琼脂糖凝胶电泳具有许多用途。但在以往的研究中,由于一些关键性问题没有得到很好的解决,琼脂糖凝胶电泳的分辨率并不算太高,使这项技术在临床和科研上的应用受到了限制,这主要是由于琼脂糖