



# 免疫扩散和免疫电泳技术

孟 广 震

(中国科学院微生物研究所, 北京)

免疫化学分析是近代生化实验室不可缺少的一种实验技术。本文将概括介绍免疫化学分析方法的发展历史和基本原理,并结合本实验室的经验扼要说明有关实验技术。

1897年 Kraus<sup>[1]</sup>发现斑疹伤寒菌无细胞培养物和相应的抗体混合时发生沉淀反应。1905年 Bechhold<sup>[2]</sup>指出免疫沉淀反应可以在琼脂凝胶中进行。1946年 Oudin<sup>[3]</sup>奠定了在试管中进行琼脂免疫扩散的基本技术。1946年 Ouchterlony<sup>[4]</sup>发明了琼脂平板双向免疫扩散技术,可以在同一块透明凝胶平板上比较鉴别两个以上的抗原,但因各层免疫沉淀在同一轴线上形成,相互重叠,可能造成分辨上的困难。1953年 Grabar<sup>[5]</sup>进一步把琼脂凝胶电泳技术和免疫扩散相结合创造了免疫电泳技术,从而克服了免疫扩散的缺点,成为一个具有高度分辨力的分析技术。由于免疫分析技术设备简单、操作方便、特异性强、灵敏度高,目前已在生物化学、免疫学、微生物学、生物检定和临床诊断等方面得到广泛应用。我国谢毓晋等<sup>[6-8]</sup>对此技术曾作过一系列研究工作,并有许多很有价值的改进。这门技术发展至今,已积累了大量文献资料,其中也有一些专门的评论可供参考<sup>[9-10]</sup>。

## 一、抗血清的制备

许多大分子物质,如蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、核蛋白、多糖、脂多糖、核酸、病毒等都具有抗原性,它们在动物体内能刺激形成抗体。抗体是一种改变了的血清球蛋白,在抗原的刺激下由动物体的脾脏、肝脏、骨髓及淋巴结等器官产生,抗体有高度的特异性,只能与其结构上相对应的抗原结合,发生免疫沉淀等反应。

欲获得满意的免疫化学分析结果,制备效价高、抗体谱完整的抗血清是重要的前提条件。为此目的,需要认真选择实验动物,熟悉饲养和操作动物的方法,并设计正确的免疫方案。

### (一)实验动物

用于免疫学研究的实验动物有许多种,如家兔、豚鼠、马、羊等,其中以家兔最易繁殖、饲养。它们的抗血清量较多,而且价格便宜,故最常采用。实验用家兔最

好符合以下条件:年龄4—5个月、体重2—3公斤、健康、自然抗体阴性、未受过其他实验处理者。此外,耳朵大些对注射和采血操作均较方便,雄性比雌性较易产生抗体,雌性动物在实验期间如果受孕,也会对免疫分析工作带来干扰。

### (二)家兔的饲养

每只兔笼放进一只兔,兔笼大小以40×60×40厘米左右为适,如笼太小,兔不能自由活动,影响正常发育。饲养室温度调节在15—25℃之间,通风良好,并保持清洁。实验进行期间应适当注意兔的营养。除采用豆饼粉、骨粉、奶粉、肉粉等混合食物外,还应加喂萝卜叶、紫苜蓿叶和甘蓝等新鲜蔬菜,饮水必须保证。饲养期间如发现传染病应予隔离,严重者要及时处死。

### (三)家兔的标记

为避免因许多实验动物长时间放在一起而可能发生的混乱,应预先把动物标记编号。最简单的标记方法是在家兔身体不同部位上涂上不同颜色的墨水,但一周后这些标记会消失。第二种方法是在兔耳上拴上编有号码的小铝片,但可能会妨碍注射和采血等操作。一劳永逸的方法是“刺青法”,在耳朵内面先用墨汁写上号码,用细针头沾墨汁刺之,然后涂去多余的墨汁,即得永久性的标记。

### (四)免疫注射技术

1.耳静脉注射 选耳缘静脉注射,如果注射次数多,应从耳尖开始逐渐下移。注射前先用酒精消毒,并使血管扩张,针头刺入时应与血管平行,如仰角过大,很容易穿透血管壁,以致将药液推入血管下的组织中。

2.腹腔注射 左手握兔下肢,倒提,使腹腔内器官向胸部沉降,拔去腹部注射点的兔毛,以碘酒消毒,垂直进针,迅速推注药液。

3.足趾掌皮内注射 剪去足掌注射点周围兔毛,消毒,针头水平刺入皮内,缓缓推进药液。

### (五)免疫程序

免疫动物的方法很多,一般说来,单用静脉注射的

方法,抗原用量较大,免疫效果也差。1943年 Proom<sup>[17]</sup>用明矾作为肌肉注射的佐剂,效果很好。后来 Freund<sup>[18]</sup>报告的由羊毛脂液体石蜡和卡介苗等组成的佐剂更被广泛采用。一般认为佐剂有刺激网状内皮系统,增强免疫机能的效果。故目前常用的免疫程序为:先把抗原和佐剂混匀,进行四足掌和腹腔注射的基础免疫,继之用递增小剂量进行耳静脉注射的加强免疫,每周从耳静脉采血,用 Uhlenbuth<sup>[19]</sup>毛细管球状反应法测定抗体效价(方法见附录)。免疫五周后可得满意的免疫效果,最后一次注射一周之后,全采集全部抗血清。1964年作者<sup>[20]</sup>曾进行用微量猪血清抗原免疫家兔的研究,免疫程序如下表。免疫五周后,可获

免疫序号	周次	抗原量 (毫克)	佐剂	注射途径
1	1	2	Freund*	四足掌和腹腔
2	2	2	Freund	腹腔
3—6	3	1×4	—	耳静脉
7—10	4	2×4	—	耳静脉
11—14	5	4×4	—	耳静脉

\* 佐剂配方见附录。

得 30000 单位抗体效价,后来,本实验室用此方法又先后制备了白地霉木糖醇脱氢酶,甘露醇脱氢酶及大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶的抗血清,发现用无细胞提取物作抗原时抗体效价高达 1 亿单位,用提纯酶作抗原时抗体效价较低(500—1000 单位),但在免疫分析时均能获得良好结果<sup>[21-23]</sup>。

## (六)采血技术

1. 耳静脉采血 首先用蘸有二甲苯的脱脂棉球摩擦耳部,使血管充分扩张,然后用酒精棉涂去二甲苯,用针头刺入血管,或用刀片把血管切断 1/3—1/2,血即自然淌出,每秒 1—2 滴,很容易取得 5—10 毫升血液。如采血点选在靠近耳根处,可采血 30—50 毫升,采血结束后,用脱脂棉压迫采血点 2—3 分钟,即可止血。

2. 颈动脉全采 全采一般是在实验结束时,以最大量收集血清为目的之采血方法。采血前一天傍晚只给动物饮水,不给食物,否则血清呈乳状,不便使用。采血器具要经无菌处理,以免因污染而使血清不易保存。全采时先将家兔仰缚于解剖台上,固定四肢和上额,用乙醚麻醉后,将颈部兔毛用 3% 石炭酸润湿,于颈部剪开 4 厘米左右,剥离肌肉组织后,可见与食道和迷走神经平行的两根粗大的颈动脉。在一根颈动脉上,用三把止血钳顺序止住血流,然后切断中间的和远心端的两个止血钳之间的血管。再将近心端和中间的两个止血钳之间的血管纵剖开,操纵中间的止血钳,使其导向承接血液的大口试管。开启近心端的止血钳可控制血流。血流变慢时按抚心脏,将血液尽量排出。

全采在顺利情况下一般可获得动物体重的 1/30 血量。

## (七)抗血清的制备和保存

采集得来的血液于室温处摆成斜面,15—30 分钟后自然凝集,把析出的血清倾出,再用干燥的玻璃棒将血饼从玻璃壁上剥离下来,置冰箱中过夜,又析出血清。将抗体谱完整效价相近的各只动物血清合并,于 2000g 离心 10 分钟即得无红血球的澄明血清。按 1/5000 加入硫柳汞或 1/1000 叠氮钠等防腐剂,通过赛氏滤器(EKSI 或 KS 滤板)过滤除菌,在无菌室内分装,密封,于冷处可长期保存,若制成冷冻干粉可保存 5 年以上。如发现抗体效价偏低时,可用 2M 硫酸铵沉淀免疫球蛋白,然后将沉淀溶于小体积的 0.1M pH 6.8 的碳酸氢钠中,即可得到较高效价的抗血清,当然,用加压透析、真空透析及对高分子胶体溶液透析等方法同样也可以达到提高效价的目的。

## 二、免疫扩散技术

物质的自由运动形成扩散现象,扩散可以在各种介质中进行。琼脂凝胶的含水量极大(经常在 99 以上),允许分子量 20 万以下的大分子物质自由通过<sup>[24]</sup>。绝大多数抗原和抗体的分子量在 20 万以下,因此在琼脂凝胶中所受阻力甚小。在此条件下,抗原或抗体的扩散运动服从气体自由扩散定律,

$$dx/dt = D d^2c/dt^2$$

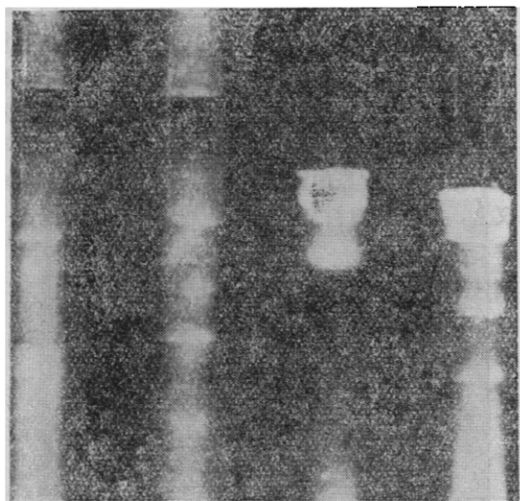
式中  $c$  代表扩散物质的浓度,  $t$  为扩散时间,  $x$  为扩散距离,  $D$  为扩散系数。

在扩散过程中,凝胶中形成扩散物的浓度梯度,在抗原/抗体最适比例处,形成肉眼可见的免疫沉淀;由于不同抗原物质的扩散系数不同,可以达到分离鉴定的目的。

免疫扩散的方法很多,大体可分为以下四种类型。

### (一)单向简单扩散(Simple diffusion in one dimension)

此法最初由 Oudion<sup>[25]</sup>建立,预先将抗体(少数情况或为抗原)混合在试管中的琼脂凝胶中,然后把过量的抗原(少数情况或为抗体)放在凝胶面上。抗原向凝胶扩散过程中不断被稀释,至最适抗原/抗体比例处形成免疫沉淀,继续扩散,最适比例的位置不断向前移动。多种复合抗原在相应的复合抗体中扩散,形成分层的免疫沉淀环(图 1)。这种方法可用于抗原混合物的分析。这种单向扩散技术,灵敏度较高,最常用在生物体液蛋白质抗原的定量测定方面<sup>[25-26]</sup>。按扩散定律,在一定时间,扩散的距离与抗原浓度的对数值成正比。在相同抗体的凝胶里,比较已知和未知浓度抗原的扩散距离,则可定量测定未知抗原的浓度。如果存在两个以上抗原,必须彼此互不影响,否则出现的情况



Oakley 法 Oudin 法  
图1 Oudin 和 Oakley 免疫扩散法的比较

则相当复杂<sup>[27]</sup>。

## (二)简单辐射扩散 (Sigle radial diffusion)

这一方法首先由 Petrie<sup>[28]</sup> 建立。首先把含有抗体的琼脂凝胶铺成平板,然后把凝胶打几个小洞,分别置入过量的不同抗原,在一定温度扩散一定时间,形成环状沉淀线。两个相邻的抗原物质相同时,沉淀线互相融合,不同时彼此独立,抗原性部分相同时,沉淀线相接,用此方法可以定性比较不同样品的抗原性。后来 Mancin<sup>[29]</sup> 等将其发展为定量的方法。作者证明:沉淀环所包括的面积或直径的平方与抗原浓度或线性关系。

$$S_W + S_F = S_0 + KC_{Ag}$$

式中  $S_W$  为抗原小洞的面积,  $S_F$  为免疫沉淀的面积,  $S_0$  为横断面的面积,  $K$  为常数,  $C_{Ag}$  为抗原浓度。根据一系列已知浓度抗原所作的标准曲线,可以判定未知抗原的浓度。这种定量方法常用于血清蛋白的测定方面<sup>[20]</sup>。

## (三)单向双扩散 (Double diffusion in one dimension)

这个方法是 Oakley<sup>[31]</sup> 在 Oudin<sup>[3]</sup> 单向扩散的基础上建立的。先把含有抗体的琼脂溶液加到试管底部,凝固后加第二层不含有抗体和抗原的琼脂溶液,凝固后再加第三层含抗原的琼脂溶液,凝固后抗原和抗体相对扩散,在抗原/抗体平衡点上形成沉淀(图1)。此法应用范围和 Oudin<sup>[3]</sup> 扩散法相同,但在同样条件下, Oudin 法扩散距离较大,比此法精密。

## (四)双向双扩散(Double diffusion in two dimensions)

这个方法首先由 Ouchterlony<sup>[4]</sup> 建立。该方法的要点是,利用一块琼脂凝胶平板,打几个小洞,分别置

入抗原和抗体。两个反应物分别向凝胶扩散,成对的抗原和抗体在最适的平衡点上形成免疫沉淀弧。如果加入的反应物比例适当,沉淀位置保持稳定,但沉淀弧以恒定的弧度向外延伸。如果某一反应物过量,可能发生沉淀交替溶解和再沉淀的现象。这个方法操作简便,广泛应用于未知样品抗原组成及不同样品的抗原性比较方面。抗原性相同的沉淀弧彼此融合,不同者相互交叉,部分相同者呈分枝状(图2)。又鉴于扩散距离和抗原浓度有关,可用于抗原的半定量分析。但由于扩散距离甚短,所以定量不够精确。

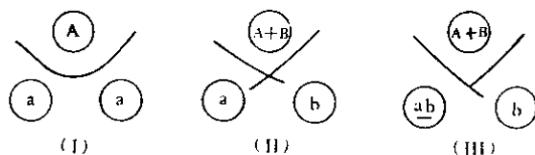


图2 两种抗原的性质和沉淀弧形态的关系  
(I)抗原相同; (II)抗原不同; (III)抗原部分相同。

双向双扩散在抗原的比较鉴别方面应用十分广泛,故下面将较详细介绍本实验室基本操作方法及注意事项。

取 90 × 90 毫米透明光洁的玻璃板,用洗液浸泡后,充分洗净,烘干后均匀涂以 0.4% 琼脂溶液,置 70℃ 烘干,形成一薄层透明的琼脂镀膜,用来防止后来的琼脂凝胶在玻板上滑动。将镀膜的玻璃板放在水平台面上,把直径 80 毫米的金属圈摆在玻板正中,然后向金属圈内均匀浇注 12—13 毫升 56℃ 的 0.8% 琼脂生理盐水溶液,凝固前按实验需要把各种类型的有机玻璃模型放进琼脂溶液,待琼脂凝固后,轻轻取下金属圈和有机玻璃模型,在玻板上即形成带有加样小洞的水平凝胶。然后在临近的小洞中加入适量待分析鉴定的抗原和抗体,在一定温度下令其扩散,不断观察并记录沉淀弧形成的情况(图3)。在以上操作中应注意:

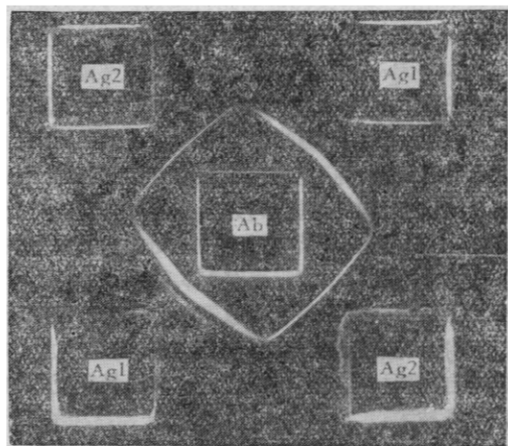


图3 琼脂凝胶双向双扩散法之一例  
Ab 为抗血清; Ag<sub>1</sub> 和 Ag<sub>2</sub> 分别为结晶前的 L-天门冬酰胺酶。

(1) 为使金属圈和有机玻璃模型较易同琼脂凝胶分离,应预先涂上一薄层硅油膏。

(2) 扩散的温度不能波动太大,否则扩散物形成不连续的浓度梯度。同一抗原也有产生多条继发性沉淀弧的可能,造成判断上的错误。

(3) 在使用家兔抗血清时,抗原如果过量,可能引起沉淀弧溶解;因此加入抗原的量要以形成最清晰而狭窄的沉淀弧为度。

(4) 为得到清楚的沉淀弧,还应注意根据抗原的扩散速度和种类多少适当调正抗原和抗体的距离。本实验室常用的有机玻璃模型有两种:七孔圆形模型和五孔方形模型(图4)。

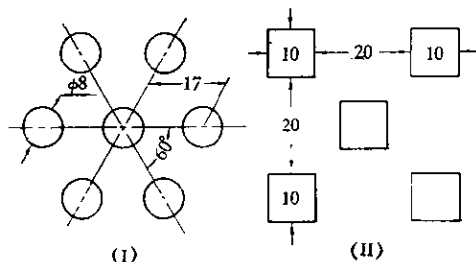


图4 有机玻璃模型  
(I) 圆形; (II) 方形。

(5) 因扩散距离较短,在用多种复合抗原实验的情况下,最后形成的沉淀弧数量很多,有互相重叠的可能性,因此它只代表样品中实际存在的抗原种类之最低数量。

(6) 为防止凝胶在扩散中生霉,预先应在凝胶中加入1/5000的疏柳汞为宜。为防止在扩散中水分蒸发,扩散应在用水蒸汽饱和的密闭的有机玻璃小盒中进行。

(7) 在必要时可以进行免疫沉淀弧的染色,方法将在下面的免疫电泳中叙述。

### 三、免疫电泳

1953年 Grabar<sup>[57]</sup>把 Ouchterlony<sup>[42]</sup>琼脂凝胶双扩散技术和 Gordon<sup>[32]</sup>等的琼脂电泳技术结合起来,发展为免疫电泳技术。先将样品在琼脂凝胶中进行电泳分离,然后再与电泳垂直的方向上进行双向扩散。1955年 Scheidegger<sup>[33]</sup>在载玻片上进行免疫电泳,创造了微量免疫电泳技术,可对1.5微升的样品进行抗原分析。这方法甚为简单灵敏,渐为许多研究者所接受,迅速推广应用,并由此派生了许多新型技术。本文在概述这些新技术时,将重点叙述应用最广泛的琼脂免疫电泳技术。

#### (一)微量琼脂凝胶免疫电泳技术

1. 操作程序 取75×105毫米透明光洁的玻板,

按前述扩散法清洗、烘干、镀膜,置于水平台面上,均匀浇注15毫升56℃0.8%琼脂/缓冲液,凝固前把加抗原的小孔和加抗体的小槽之模型放进琼脂溶液,凝固后小心取出模型,即形成带有加样孔槽的琼脂凝胶平板(图5)。抗原(2—3%)以同种缓冲液透析后,用毛细管取样1—3微升加到抗原孔中,把琼脂平板移至电泳仪上,用泡沫塑料与电极缓冲液紧密连接,在4—6

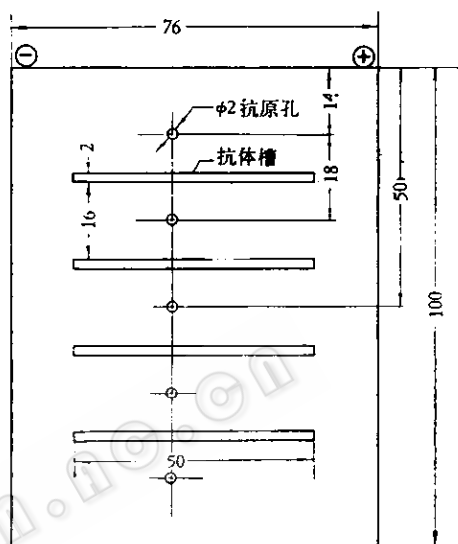


图5 微量免疫电泳琼脂凝胶板

伏特/厘米电位降条件下电泳45分钟左右。电泳毕,将0.2—0.25毫升抗血清加入抗体槽中,在一定温度下扩散,不断观察并记录沉淀弧形成的情况,也可在暗背景下照相(图6)。如需长期保存或作特殊抗原鉴别,可用适当方法染色。免疫电泳操作程序见图7。

2. 琼脂凝胶 琼脂是琼脂糖和琼脂胶的混合物,含有0.3—3.7%的硫酸根。如前所述,琼脂凝胶是免疫扩散的良好介质,同样对免疫电泳中也是一个合适的材料:持水量大,电泳迁移率与自由界面电泳相近;机械性能好,并有一定弹性;透明度高,免疫沉淀反应可以用肉眼直接观察或照相记录;凝胶干燥后可制成透明的有弹性的薄膜,可长期保存。但需指出天然琼脂杂质较多,重复性差,透明度也低,故需用适当方法精制(见附录)。

3. 缓冲液的选择 使用缓冲液的目的在于保持电泳过程凝胶pH的稳定,从这一角度来看,似乎浓度越大,缓冲能力越强。但高浓度缓冲液在电泳时生热多,蒸发快,并促使样品弥散,同时高浓度缓冲液,使电位降变小,电泳速度减慢,兼顾以上各因素,凝胶缓冲液的离子强度( $r/2$ )一般以0.025—0.05M为宜,电极缓冲液一般为0.05M。关于缓冲液的pH,因蛋白质抗原等电点多为酸性,故把缓冲液pH定为中性偏

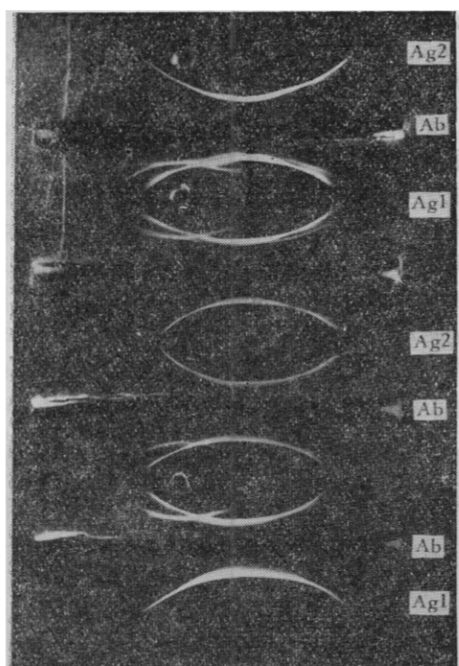


图6 微量免疫电泳之一例

Ab 为抗血清; Ag<sub>1</sub> 和 Ag<sub>2</sub> 分别为结晶前后的 L-天门冬酰胺酶。

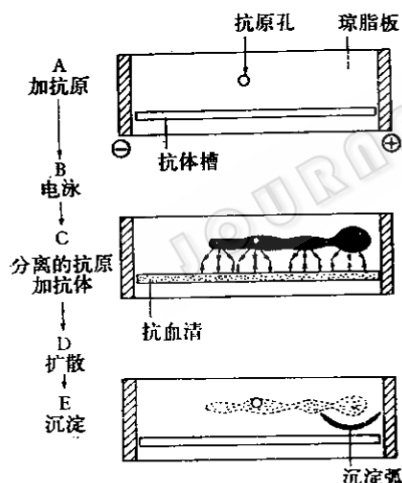


图7 免疫电泳程序

碱范围,这样可使蛋白质抗原荷负电荷,向阳极迁移速度较快。此外,在缓冲液的选择中还应注意到以下情况:磷酸缓冲液与琼脂中的钙离子结合形成不溶性磷酸钙,影响凝胶的透明度,而含有 EDTA 的 Tris 缓冲液,可螯合金属离子,克服金属离子的干扰,并保持凝胶的透明度。pH 8.0 以下的巴比妥缓冲液能与  $\beta$ -脂蛋白结合,不适用于该蛋白质的分离。在进行酶的电泳时,还得注意不要从缓冲液中引入酶的抑制剂。总之,在缓冲液的选择中要充分考虑可能干扰免疫电泳分析的各个方面。(常用的缓冲系统见附录)为避免

凝胶被微生物污染,还经常在缓冲液中加入 0.01—0.02% 的硫柳汞或 0.02% 叠氮钠。

4. 沉淀弧的识别和抗原组分的确定 免疫沉淀反应有高度的特异性,加之免疫电泳利用了电泳和扩散两种手段把不同抗原组分一一分开。实际上,两种不同的抗原经免疫电泳后两个沉淀弧完全重合的机率是极低的。

混合物的抗原组分由孤立的沉淀弧的数目来判断,但有时沉淀弧出现很微妙的形态,正确的判断则取决于实践的经验。图 8 列出较常见的沉淀弧的形态:

A. 两个成份电泳迁移率接近形成交叉的弧; B. 两个成份电泳迁移率相同,抗原性和扩散行为不同形成平行的弧线; C. 开始一条沉淀弧,继之弧顶不断加宽,最后形成两端相连的两个弧,为抗原过量所致; D. 情况与 C 相似,最后形成弧顶相连两端分叉的沉淀弧,为抗体过量所致,这种情况只有利用马 (H 型) 抗血清时才会出现; E. 沉淀线曲折不整,系抗体槽破裂或其他电泳错误所致; F. 沉淀线弧度大,抗原扩散率低所致; G. 沉淀线弧度小,抗原扩散率较高所致; H. 沉淀线漫长而不对称,抗原性相同,电泳迁移率不同的抗原物质所致如  $\gamma$  球蛋白。

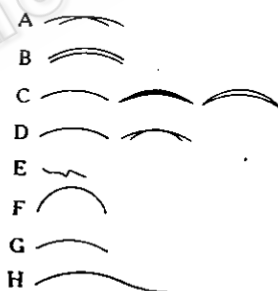


图8 沉淀弧的形态(解释见正文)

5. 染色 为使沉淀弧更易分开或为了鉴定某特异的抗原成分,可以进行沉淀弧的染色。先用生理盐水将凝胶板浸泡过夜,再用蒸馏水浸洗 4 天(每天换水),把未参与反应的多余抗原和抗体洗净。因为抗原-抗体形成沉淀复合物后,分子量常大于 20 万,不能从凝胶中洗脱。洗脱结束后,吸净抗体槽的水分,加入 0.8% 的琼脂溶液,使与原来的凝胶结成一体,避免干燥过程中从抗体槽处开裂,置 37℃ 烘干后,用适当染色剂着染一定时间,再用脱色溶液洗脱未着染的多余染料,晾干后即可。染料,原则上各种组织化学应用的染色剂都可应用。如蛋白质可采用氨基黑 10B (Amido Black 10B)<sup>[34]</sup>、丽丝胺绿 (Lissamine Green)<sup>[34]</sup>、噻嗪红 R (Thiazine Red R)<sup>[35]</sup>、偶氮胭脂红 B (Azocarmine B)<sup>[36]</sup> 和尼格洛辛 (Nigrosin)<sup>[37]</sup> 等。其中以氨基黑 10B 和偶氮胭脂红最为常用(见附录)。脂类可用苏丹黑 B (Sudan Black B)<sup>[38]</sup>、油红 O (Oil Red O)<sup>[39]</sup> 和尼罗蓝 A (Nile Blue A)<sup>[35]</sup> 染色。多糖类可用 Schiff-

过碘酸试剂<sup>[36]</sup>染色。此外,酶类还可依据酶所催化的特异反应进行染色,如乳酸脱氢酶的同功酶和其他依赖辅酶 I, 辅酶 II 的脱氢酶可以用含有四氮唑硝基蓝(p-Nitro-Blue-Tetrazolin)<sup>[39]</sup>的反应系统染色等等。

## (二) 醋酸纤维素膜免疫电泳

此方法由 Kohn<sup>[36, 40-41]</sup>发明。首先使抗原在醋酸纤维素膜上电泳, 然后把吸有抗体的滤纸条贴在离抗原一定距离的地方, 扩散后拿掉纸条, 用水冲洗未参与反应的抗原和抗体, 染色后可观察免疫沉淀弧。

## (三) 盘状免疫电泳<sup>[42-43]</sup>

首先使抗原在聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 然后把凝胶柱纵切成两半, 一半作通常的蛋白质染色, 另一半放在玻板上, 浇注约 2 毫米厚的琼脂凝胶, 距聚丙烯酰胺凝胶柱 3—4 毫米处, 开一平行的小槽, 置入抗血清, 令其扩散(扩散时间比琼脂凝胶长)。此方法充分发挥了聚丙烯酰胺凝胶的高度分辨力, 即使在琼脂免疫电泳中不易分辨的抗原物质, 也可用此方法分辨。

## (四) 淀粉凝胶免疫电泳

原理和盘状免疫电泳相似, 只是免疫扩散技术和 Smithies<sup>[44-45]</sup>的淀粉凝胶电泳相结合。先在淀粉凝胶中电泳分离, 然后将淀粉胶平分两半, 一半作蛋白质染色, 一半放在琼脂凝胶中扩散(同盘状免疫电泳操作), 在 8 M 尿素存在下, 这个方法曾用于蛋白质亚基的分析<sup>[46]</sup>。

## (五) 免疫电扩散

这一方法首先由 Laurell<sup>[47]</sup>于 1960 年建立。抗原在含有抗体的琼脂糖凝胶中电泳, 抗原和抗体按各自的迁移率运动形成火焰状沉淀线(图 9), 在电场作用下, 在火焰状沉淀线中间的抗原继续运动, 沉淀线被过量的抗原溶解, 新的沉淀线也相继向前推移, 最后抗

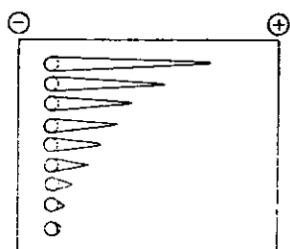


图 9 不同量血清蛋白的免疫电扩散沉淀图形  
自上而下: 5, 3.75, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25 和 0.125 微克。

原和抗体达到平衡后, 形成稳定的沉淀线。沉淀线的最后长度与抗原量有关, 因此可用于抗原的定量测定。在这个方法中, 免疫扩散和电泳是同时进行的, 比别的

方法的优越性就在于检定的速度较快。

## (六) 交叉免疫电泳 (Cross immunoelectrophoresis)

[48-51]

用琼脂糖作支持物, 先将抗原电泳展开, 然后在同一玻板上浇注含抗体的琼脂糖凝胶, 在后一个凝胶中进行第二次电泳(与第一次电泳的方向垂直)。这种方法实际上是在凝胶电泳后进行免疫电扩散。不同抗原形成互相独立的峰状免疫沉淀, 至最适抗原/抗体比值处停止运动, 沉淀峰的高度和面积与抗原量成比例关系, 用此方法可以同时进行各种抗原的定量测定(图 10)。

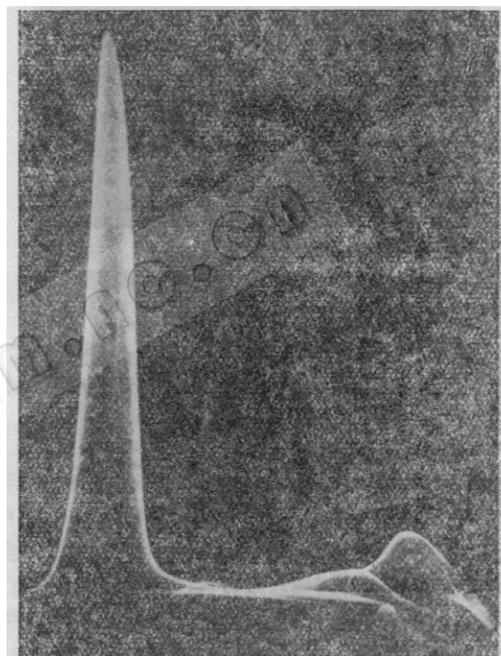


图 10 交叉免疫电泳沉淀图形

## (七) 逆流免疫电泳 (Counter immunoelectrophoresis)

[52]

这种分析方法称呼不一, 有的称之为电渗析法(Electroendosmophoresis)<sup>[53]</sup>, 有的称之为电交流法(Electrosyneresis)<sup>[54]</sup>, 实质上是一样的。在以琼脂凝胶为介质的情况下, 免疫球蛋白带有微弱的负电荷, 不能抵消电渗作用, 故在电泳时反而向负极迁移, 而一般的抗原蛋白质带有较强的负电, 抵消电渗作用后仍向正极迁移。依此原理设计的逆流免疫电泳是一个快速免疫分析方法。将抗原放在琼脂凝胶板靠阴极一侧, 抗体放在靠阳极一侧, 在直流电场中, 抗原和抗体相对迁移, 相遇后形成免疫沉淀。由于该方法相当简单迅速, 因此在临床医学上为一个有效的方法。

## (八)等电聚焦免疫电泳

在含有两性载体 Ampholine 的凝胶中电泳可以把等电点不同的各种蛋白质分离(等电聚焦技术)。Riley 等<sup>[52]</sup>把该技术和免疫扩散结合起来,就构成等电聚焦免疫电泳技术,方法大体和琼脂免疫电泳相似,只是把电泳介质改为含有 Ampholine 的琼脂糖。

## (九)放射免疫电泳法

由 Yagi 等<sup>[53]</sup>及 Morse<sup>[57]</sup>分别建立。先将抗原用  $I^{125}$  或  $I^{131}$  标记,再按一般免疫电泳法操作,干燥后以 X 光底片印相,此法为超微量的方法,能检出 0.1 微克/毫升的特异性抗体。

# 四、附 录

## (一) Freund 佐剂的制备<sup>[55]</sup>

1. 不完全 Freund 佐剂 3 份液体石蜡、1 份羊毛脂与 4 份磷酸缓冲液混合乳化。(注:磷酸缓冲液取 24 毫升 2.2% 磷酸二氢钾和 76 毫升 2.2% 磷酸氢二钠· $2H_2O$  混合即得)。

2. 每毫升不完全 Freund 佐剂加 10 毫克(湿重)卡介苗混合乳化。

3. 参照 Salk<sup>[58]</sup> 的报告,本实验室的配方为 9 份液体石蜡、1 份羊毛脂,每毫升 1 毫克卡介苗混合乳化。

## (二)抗体效价测定方法<sup>[59]</sup>

取若干支内径 4 毫米的毛细管,下口烧熔封闭,将少许抗血清用滴管加入毛细管底部,再把不同稀释度的抗原溶液沿毛细管壁仔细加到抗血清上(注意抗血清和抗原之间的界面不得紊乱),然后放在毛细管架上于 37℃ 保温 30 分钟,界面处形成白色沉淀环,在上述条件下,产生沉淀反应的最大稀释度定义为抗体的效价。(注:抗原稀释用 0.85% 生理盐水溶液)。

## (三)琼脂净化法

1. 加热洗涤精制法<sup>[10]</sup> 用纱布包住琼脂,用流水洗 24 小时,再用中性蒸馏水洗 24 小时(经常换水)。洗过的琼脂在适量的蒸馏水中熔化,使成 7% 浓度。完全熔化后,倾入搪瓷盘中,待凝固后切成 0.5—1 厘米立方小块,在蒸馏水浸洗 3 天,每天换水两次。最后把变成白色的琼脂凝胶加热熔化,分装于带塞的瓶子中,在冰箱中可保存 1—2 星期。以上操作应注意加热时间应尽可能缩短,并且应在水浴中进行,以防止琼脂水解或焦化。

2. 皂土(Bentonite)精制法<sup>[59]</sup> 取 100 克琼脂,先

用自来水洗 3 天,复用蒸馏水浸洗 3 次,拧干后补加蒸馏水至 3000 毫升。另取 60 克皂土悬浮于 1200 毫升蒸馏水中,用组织匀浆器搅拌均匀,补加蒸馏水到 3000 毫升。以上两个悬浮液分别加热至 100℃ 30 分钟,熔化的琼脂用玻璃棉过滤,滤液与等体积皂土悬浮液混合,于 56℃ 温箱中保温 3 天,不断摇动。然后静置令沉淀物自然沉降,虹吸上清液,测干重后备用。

## (四)免疫电泳常用缓冲液

1. pH 8.4, 0.05 M 巴比妥钠-盐酸缓冲液 取 42.5 克二乙基巴比妥钠,58.0 毫升 1 N 盐酸加水溶解,稀释到 5000 毫升。

2. pH 8.6, 0.05 M 硼酸-硼酸钠缓冲液 取 19.05 克硼酸钠,6.20 克硼酸加水溶解到 3000 毫升。

3. pH 7.4, 0.05 M 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液 取磷酸氢二钠 6.4 克,磷酸二氢钠· $H_2O$  1.3 克,加水溶解到 3000 毫升。

4. pH 8.62, 0.05 M Tris-盐酸缓冲液,取 0.02 M Tris 25 毫升、0.1 M 盐酸 12.5 毫升,用水稀释至 100 毫升。

## (五)蛋白质染色法

1. 氨基黑 10B 染色剂 取 2.7 毫升冰乙酸、12.24 克乙酸钠,用水溶解到 900 毫升,再溶入 1 克氨基黑 10B,最后加甘油 100 毫升即得。

2. 偶氮胭脂红染色剂 取 1 克偶氮胭脂红、2.7 毫升冰乙酸、12.24 克乙酸钠,加水溶解至 900 毫升,最后加入甘油 100 毫升即得。

3. 洗脱液 取冰乙酸 10 毫升,甘油 75 毫升用水稀释至 500 毫升即得。

4. 染色步骤 将干燥的琼脂板浸入染色液中(氨基黑 1 小时或偶氮胭脂红 3 小时)。然后移入洗脱液中 2 小时,脱去底色。用自来水冲洗后晾干即可。

## 参 考 资 料

- [1] Kraus, R. Wien. Klin. Wochschr., 10:736, 1897.
- [2] Beechhold, H.: Z. Physik. Chem., 52:185, 1905.
- [3] Oudin, J.: Compt. Rend., 222:115, 1946.
- [4] Ouchterlony, O.: Acta Pathol. Microbiol. Scand., 26:507, 1949.
- [5] Grabar, P.: Biochem. Biophys. Acta, 10:193, 1953.
- [6] 谢毓晋等:生物制品通讯, 5 (1): 1—12, 1964.
- [7] 谢毓晋等:生物制品通讯, 5 (4): 269—277, 1964.
- [8] 谢毓晋等:武汉医学杂志, 1: 1—7, 1964.
- [9] Grabar, P., et al.: Analyse Immunoelectrophoretique Application aux Liquides Biolog., Humains-Masson, Paris, 1960.

- [10] Grabar, P.: *Methods of Biochemical Analysis*, 7:1—38, 1959.
- [11] Clausen, J.: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 1:397—556, 1969.
- [12] Ouchterlony, O.: *Progress in Allergy*, 5:1, 1958.
- [13] 松桥直等: 化学と生物, 9 (1): 46—53, 1971.
- [14] 松桥直等: 化学と生物, 9 (2): 125—131, 1971.
- [15] 松桥直等: 化学と生物, 9 (3): 193—199, 1971.
- [16] 松桥直等: 化学と生物, 9 (4): 251—257, 1971.
- [17] Proom, H.: *J. Pathol. Bacteriol.*, 4:419, 1943.
- [18] Freund, J.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 1:291, 1947.
- [19] Uhlenhuth, P.: *Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen*, 3 Auflage, Bd 3:365—468, 1930.
- [20] 谢毓晋、孟广震: 未发表的材料, 1964.
- [21] 王惠莲、张树政: 生物化学与生物物理学报, 6: 633—645, 1965.
- [22] 黎青翔、张树政: 微生物学报, 13(1): 38—43, 1973.
- [23] 孟广震、钱卉钧: 待发表 1974.
- [24] Wieme, R. J.: *Rev. Belge Pathol. Med. Exptl.*, 25:62, 1957.
- [25] Oudin, J.: *Methods Med. Res.*, 5:335, 1952.
- [26] Störiko, K.: *Ärztl. Lab.*, 11:189, 1965.
- [27] Buchanan-Davidson, D. T. and Oudin, J.: *J. Immunol.*, 81:484, 1958.
- [28] Petrie, G. F.: *Brit. J. Exptl. Path.*, 13:38, 1932.
- [29] Muncini, G., et al.: *Protides of the Biological Fluid*, 11:370, 1964.
- [30] Schwich, H. G., et al.: *Proc. 10th Europ. Soc. Haemat.*, Strasbourg, Part, 2, 899, 1965.
- [31] Oakley, C. L., et al.: *J. Pathol. Bacteriol.*, 65: 49, 1953.
- [32] Gordon, A. H., et al.: *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 15:1, 1950.
- [33] Scheidegger, J. J.: *Intern. Arch Allergy Appl. Immunol.*, 7:103, 1955.
- [34] Wieme, R. J.: *Studies on Agar Gel Electrophoresis*, 1959.
- [35] Growle, A. J.: *Immunodiffusion*, Acad. Press, Inc. N. Y., 1961.
- [36] Kohn, J.: *Clin. Chim. Acta*, 3:450, 1958.
- [37] Kohn, J.: *Protides of the Biological Fluids*, 6:74, 1959.
- [38] Uriel, J., et al.: *Protides of the Biological Fluids*, 11:355, 1964.
- [39] Clausen, J., et al.: *Biochem. J.*, 97:518, 1965.
- [40] Kohn, J.: *Clin. Chim. Acta*, 2:297, 1957.
- [41] Kohn, J.: *Nature*, 217:1261, 1968.
- [42] Antoine, B.: *Science*, 138:977, 1962.
- [43] Keutel, H. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 484, 1964.
- [44] Smithies, O.: *Biochem. J.*, 61:629, 1955.
- [45] Smithies, O.: *Biochem. J.*, 71:585, 1959.
- [46] Poulik, M. D.: *Ann. N. Y. Med. Sci.*, 121:470, 1964.
- [47] Laurell, C. B.: *Anal. Biochem.*, 15:45, 1966.
- [48] Resslex, C. B.: *Clin. Chim. Acta*, 5:795, 1960.
- [49] Laurell, C. B.: *Anal. Biochem.*, 10:385, 1965.
- [50] Clark, H. G. M., et al.: *Clin. Sci.*, 35:403, 1968.
- [51] Clark, H. G. M., et al.: *Proteide of Biological Fluids*, 14(9):503, 1966.
- [52] Gocke, D. J., et al.: *J. Immunol.*, 104:1031, 1970.
- [53] Prince, A. M., et al.: *Science*, 169:595, 1970.
- [54] Bussard, A., et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 34:258, 1959.
- [55] Riley, R. F., et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, 72: 714, 1968.
- [56] Yagi, Y., et al.: *J. Immunol.*, 89:736, 1962.
- [57] Morse, J. H., et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, 59: 391, 1962.
- [58] Salk, J. E., et al.: *J. Exper. Med.*, 95:429—448, 1952.
- [59] Feinberg, J. H.: *Nature*, 178:1406, 1956.