# 聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳*

陈振国 施渭康

（中国科学院上海细胞生物学研究所）

聚丙烯酰胺凝胶—琼脂糖凝胶交叉免疫电泳具有设备简单，操作方便和分辨力高等优点，为分析鉴定抗原，抗体以及它们之间的相互关系提供了较灵敏的手段[1 2]。Van Der Riet 和Viljoen[3]报告了另一种简便的免疫电泳法，从杂有多种抗原的混合物中检出特异性抗原：混合抗原在含有相应抗体的凝胶中电泳时产生免疫沉淀物，游离抗原继续自由地“滤过”该抗体凝胶，到达相邻的另一块空白凝胶，进而在该空白凝胶上进行普通免疫电泳，达到分离和检测特异性抗原的目的。

本文根据上述两法的原理，发展了聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳法。先用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离抗原混合物，接着在与第一向电泳成垂直方向走第二向免疫电泳，抗原成份在电场作用下进入第一块抗体凝胶，抗原与其相应抗体起反应而形成峰形沉淀物。未遇相应抗体而形成沉淀的抗原在电场中继续泳动，进入相邻的另一块抗体凝胶，其中若有相应抗体同样产生沉淀峰。因此，在同一块玻璃板上相邻地浇制两种或两种以上的不同抗血清，形成并列抗体凝胶，就可以用于分离和分析各种抗原以及鉴定抗血清的性质。本文对这一方法及其初步实验结果作一简述。

## 材料和方法

### 一、抗原和抗血清

抗原 4—6个月胎儿的胎血清；马脾铁蛋白[4]。

抗血清 兔抗胎儿全血清抗血清；兔抗人甲胎蛋白抗血清；兔抗铁蛋白抗血清[4]；兔抗正常人全血清抗血清。抗血清制备除注有参考资料的以外均按常规方法。

### 二、抗体琼脂糖凝胶板的制备

在60毫米×90毫米清洁玻璃板的背面按比例以红腊笔划线分区（图1）。在玻璃板正面

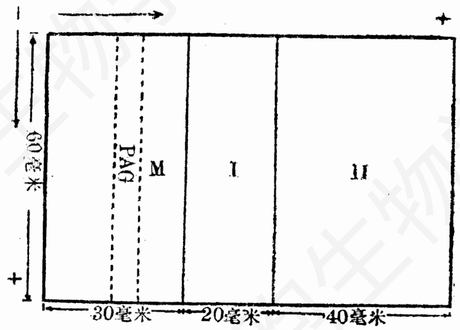


图1. 聚丙烯酰胺凝胶—並列抗体凝胶交叉免疫电泳示意图
M.中介凝胶。I.II.……並列抗体凝胶。
PAG.聚丙烯酰胺凝胶条。

依宽度30毫米处的红笔划线放一根有机玻璃条作栅栏，挡住浇在上面的热溶1％（W/V，配置于巴比妥缓冲液，pH8.2，离子强度0.05）空白琼脂糖凝胶（约3.5毫升）。冷凝后，以刀片将栅栏边缘的凝胶切割整齐，移去有机玻璃条。按同法在玻璃板的Ⅰ、Ⅱ区依次浇上3毫升和4毫升含不同抗体的琼脂糖凝胶：2％琼脂糖和用盐水适当稀释的抗血清分别在50℃温育后，等体积趁热混匀浇制而成。

### 三、聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考Maizel方法[5]，采用不连续碱性系统。以10％过硫酸铵催化聚合。在内径为5毫米，长度为100毫米的直立玻璃管中，浇2毫升

* 田林同志参加部分实验技术工作。

7.5%浓度的分离胶（pH8.9）。水层封面，待聚合后半小时以滤纸条吸去水层。再加约0.5毫升的间隔胶（pH6.7），同样水层封面，聚合后吸去水层。样品与等量的40%蔗糖溶液混合后加样。0.05%溴酚兰做指示剂。电极缓冲液为三羟甲基氨基甲烷（Tris）—甘氨酸溶液（pH8.3）。起始电流每管1毫安，待指示剂进入分离胶后，每管电流增至2毫安。电泳近3小时。泳毕，取出凝胶条放入切割槽（图版，图1）中，纵剖为二。一半固定染色作对照用，另一半浸于20倍以上体积的巴比妥缓冲液（pH8.6）中搅拌洗涤15分钟。

**四、交叉免疫电泳**

将洗涤好的半条聚丙烯酰胺凝胶条的扁平面向下，平躺于距抗体凝胶10毫米处的空白凝胶上（图1，位第二向电泳的阴极端）。放凝胶条时，需注意凝胶条与琼脂糖凝胶接触面间不能有气泡，如有气泡可将凝胶条沾少许电泳缓冲液赶走。该板置于有盖的含pH8.6，离子强度为0.075巴比妥缓冲液的电泳槽中，在抗体琼脂糖凝胶阳极端一侧复盖一狭条玻璃纸，避免蛋白污染电极液。以Whatman 3号滤纸或厚滤纸作桥。电泳时在距凝胶板上方约2—3毫米处复盖一相同大小的玻璃片以防止凝胶因失水而干裂。低压电泳（2—3伏/厘米）16小时后，取出凝胶板以生理盐水漂洗多次后烘干，以0.25%Coomassie亮兰染色，乙醇：水：冰醋酸＝45：45：10的脱色剂脱色后保存。

## 结果和讨论

**一、分析抗血清的特异性的几个例子**

以人胎血清作为抗原经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，再以兔抗正常人全血清和兔抗人甲胎蛋白抗血清作并列抗体凝胶交叉免疫电泳。无论兔抗甲胎蛋白抗血清作为第二块抗体凝胶板（图版，图2a）或第一块凝胶板（图版，图2b），均显示一个对称的峰形。然而，把兔抗人甲胎蛋白的抗血清作为第一块并列抗体凝胶似乎更好，这样在交叉免疫电泳时，聚丙烯酰胺凝胶条中所有胎血清的抗原成份均要通过该抗血清凝胶，若其中杂有其它抗原的抗体时，应在该抗体凝胶中留下抗原—抗体沉淀物的痕迹。实验结果说明兔抗甲胎蛋白抗血清是单相特异性的抗血清。

同样，我们将人胎血清和马脾铁蛋白混合物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后对兔抗人甲胎蛋白和兔抗马脾铁蛋白抗血清进行并列交叉免疫电泳。虽则由于铁蛋白分子不均一性使其沉淀峰稍呈有不对称性，但这两块相邻的抗体凝胶中均各呈现单一的峰，这说明这两种抗血清都是单相的特异性抗血清。同时，抗体在并列凝胶中的位置对电泳的结果没有明显的影响（图版，图3）。

为了分析比较不同抗血清中所含抗体性质的异同，胎血清经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，对含兔抗人胎全血清，抗正常人全血清和抗甲胎蛋白抗血清的并列抗体凝胶进行交叉免疫电泳。（图版，图4）即为同一块板上相邻浇有这三种不同抗血清的交叉免疫电泳结果。甲胎蛋白沉淀峰出现在含抗甲胎蛋白和抗胎全血清的抗体凝胶上，且这两块抗体凝胶的沉淀峰互相衔接；白蛋白沉淀峰出现在含抗正常人全血清和抗胎血清的抗体凝胶中，沉淀峰也互相衔接。结果说明Ⅰ，Ⅱ和Ⅱ，Ⅲ并列抗体凝胶中分别存在着免疫学性质完全相同的抗体。然而，由于抗原和其抗体的比例不适以及电泳条件的影响，白蛋白沉淀峰顶有时会稍冲入抗甲胎蛋白抗体凝胶层（图版，图4），因此寻找一个合适的抗原抗体反应比例和电泳条件乃是相当重要的。

反之，抗原在已知抗体性质的凝胶板上进行交叉免疫电泳，根据其沉淀峰位置也可鉴定聚丙烯酰胺凝胶条上抗原成份的性质。

**二、某些抗原的特异性抗血清的制备**

分离和纯化抗原的目的之一是要制备其特异性抗血清。反之，有了纯抗体，抗原的纯化也就比较容易解决。聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳方法可以用以制备某些抗原

的特异性抗血清。胎血清经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，分成近二十条蛋白带，白蛋白和甲胎蛋白在凝胶条的前沿，彼此紧靠相邻，普通电泳难以分开。经过兔抗正常人全血清和兔抗甲胎蛋白的并列抗体凝胶交叉免疫电泳后，白蛋白和甲胎蛋白分别在相应的抗体凝胶上形成免疫复合物沉淀峰（图版，图2）。电泳凝胶板经充分漂洗后，连同琼脂糖凝胶切割免疫复合物沉淀峰，混入福氏完全佐剂，经腘淋巴结免疫家兔，可得到单相特异性兔抗人白蛋白和抗人甲胎蛋白抗血清(图版，图5)。看来这是一种制备特异性抗血清简便易行的有效方法之一。

**三、影响聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳结果的因素**

影响上述免疫电泳结果的因素，除了常规电泳中的那些因素以外，主要有下列二方面。

1．凝胶的电渗作用 所谓电渗是指电场中的液体对于一个固定固体的相对移动。电渗决定于许多因素，包括缓冲液pH，离子强度和化学性质，但主要决定于凝胶的性质。本文报告的方法整个过程包括两个电泳系统，即聚丙烯酰胺凝胶电泳系统和免疫电泳系统。使用了两种不同性质的凝胶，因而必须考虑凝胶的电渗作用。如果聚丙烯酰胺凝胶条在电泳后直接放在空白的琼脂糖凝胶上进行第二向电泳，由于凝胶条在缓冲液离子浓度较高的条件时，带有较高的电导，会使水积聚在凝胶条周围，加强电渗作用而干扰蛋白质的迁移，造成沉淀线模糊不清。不设法降低离子浓度，显然会影响第二向电泳结果。为消除这两种凝胶之间的电渗差异，最近 Ekwall 等[6]报道用蒸馏水洗涤聚丙烯酰胺凝胶并结合平躺于琼脂糖凝胶的方法，以此平衡凝胶条的电导，降低电渗作用，取得较好的效果。

我们比较了聚丙烯酰胺凝胶条分别用蒸馏水和第二向电泳缓冲液洗涤不同时间对其免疫电泳结果的影响。发现经缓冲液洗涤的凝胶条同样能降低电渗作用，洗涤时间对沉淀峰形状影响不大；而在蒸馏水中洗涤时间超过45分钟后，有些蛋白沉淀峰形明显降低，甚至消失（图版，图6），说明凝胶条用缓冲液洗涤可能效果较好。当然，蛋白质的损失与聚丙烯酰胺凝胶的孔径大小，蛋白质分子大小和洗涤条件也有关。

2．凝胶板的抗原—抗体比例 要获得清晰而满意的免疫电泳沉淀物图谱，除了电泳条件外，还必须考虑抗原—抗体反应的最适比例。抗原或抗体比例不当均会使沉淀峰形特别是峰顶模糊不清，或峰内部沉淀物太强，或冲入相邻的抗体凝胶。一般应采用尽可能低的抗体浓度，但抗体量太少，又会使形成的沉淀峰太弱。在抗原量与电泳条件不变的情况下，我们比较了抗体凝胶纵向宽度和抗体浓度对沉淀峰的影响。如果图1中并列抗体凝胶Ⅰ的宽度过大，抗体浓度偏高，则会使应在抗体凝胶Ⅱ中产生沉淀峰的抗原不易“滤过”，结果在抗体凝胶Ⅱ中无沉淀峰出现，特别当样品中抗原浓度过低时更是如此；反之，抗体凝胶Ⅰ的宽度过狭，抗体浓度偏低，则又会使应在这部分沉淀的抗原“过滤”不清，沉淀峰冲向抗体凝胶Ⅱ(图版，图4)，影响电泳结果。因此，一般采用抗体凝胶Ⅰ的宽度比凝胶Ⅱ宽度为狭。在60毫米×90毫米玻璃板上，凝胶Ⅰ的纵向宽度为20毫米，恰好是凝胶Ⅱ的一半。如用三种以上的抗血清则宽度视具体情况相应缩小。

至于抗体浓度对沉淀峰的影响，以180微克胎血清为抗原，抗体凝胶Ⅱ中抗血清用量为4微升/平方厘米，而凝胶Ⅰ中的抗血清用量是它的一倍，即8微升/平方厘米。如果抗原量减至90微克，则抗体凝胶Ⅱ和凝胶Ⅰ的抗血清用量分别是2微升/平方厘米和4微升/平方厘米，仍能得到满意的结果（图版，图2），产生的沉淀峰清晰而又无干扰。然而不同的抗原—抗体系统，比例应有所差别，需经过摸索决定。

最后，在聚丙烯酰胺凝胶条和第二向交叉电泳的抗体凝胶之间留有10毫米宽的不含抗体的中介凝胶，并不是作对照凝胶用的，而用作

抗原进入抗体凝胶前的缓冲区域。这种排列有助于使沉淀峰的起底线清晰，特别有利于分析交互重叠的沉淀峰。

## 小 结

本文介绍一种简便的聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳方法，使在聚丙烯酰胺凝胶上分离的抗原成份与并列的不同的抗体凝胶层发生沉淀反应而被分开。该法可用以分析抗血清的特异性和抗原的免疫学性质，其形成的抗原—抗体复合物沉淀可用以制备特异性抗血清。

## 参 考 文 献


[1] Johansson, B. G. and Stenflo, J., 1971. *Anal. Biochem.* 40：232—236

[2] 陈振国，施渭康，1979. 上海医学，2(5)：52—53

[3] F.dest. J. Van Der Riet and M. Viljoen, 1973. *J. Immunol. Methods* 3：105—106

[4] 施渭康、卢延龄、许河生、和葛锡锐，1975，生物化学与生物物理进展，第4期8—10

[5] Maizel, J. V.,1971, *Methods in Virology* 5：179—245

[6] Ekwall, K., Soderholm, J. and Wadstrom. T., 1976. J. Immunol. *Methods*. 12：103—115


施渭康等图版

## 图 版 说 明

图1 凝胶条切割槽：由有机玻璃制成的槽和不锈钢刀二部分组成。

图2 聚丙烯酰胺凝胶—並列抗体凝胶交叉免疫电泳：a.抗原为胎血清90微克；第一块抗体凝胶：兔抗正常人全血清20微升/平方厘米；第二块抗体凝胶：兔抗人甲胎蛋白抗血清2微升/平方厘米。b.抗原为胎血清180微克；第一块抗体凝胶：兔抗人甲胎蛋白抗血清20微升/平方厘米；第二块抗体凝胶：兔抗正常人全血清10微升/平方厘米。图中AFP示甲胎蛋白；Alb示白蛋白(下同)。

图3 聚丙烯酰胺凝胶—並列抗体凝胶交叉免疫电泳：抗原为90微克人胎血清和38微克马脾铁蛋白混合物。a.第一块抗体凝胶：兔抗马脾铁蛋白8微升/平方厘米；第二块抗体凝胶：兔抗人甲胎蛋白4微升/平方厘米。b.第一块抗体凝胶：兔抗人甲胎蛋白8微升/平方厘米；第二块抗体凝胶：兔抗马脾铁蛋白4微升/平方厘米。图中Fer示铁蛋白。

图4 三种不同抗血清的並列抗体凝胶交叉免疫电泳：抗原为人胎血清90微克。抗体凝胶层自下而上分别为兔抗正常人全血清40微升/平方厘米，兔抗人胎血清8微升/平方厘米和兔抗人甲胎蛋白2微升/平方厘米。

图5 单相特异性兔抗白蛋白和抗甲胎蛋白抗血清的免疫电泳分析：抗原孔：均为胎血清；抗血清槽：1.聚丙烯酰胺凝胶—並列抗体凝胶交叉免疫电泳甲胎蛋白免疫复合物制备的抗血清；2.抗人胎血全血清抗血清；3.聚丙烯酰胺凝胶—並列抗体凝胶电泳白蛋白免疫复合物制备的抗血清。

图6 聚丙烯酰胺凝胶条的洗涤对电泳结果的影响：抗原：正常人全血清180微克：抗体：兔抗正常人全血清7微升/平方厘米。a.聚丙烯酰胺凝胶条在蒸馏水中洗涤45分钟的电泳图谱；b.聚丙烯酰胺凝胶条在蒸馏水中洗涤60分钟的电泳图谱。箭头和数字表示明显低于图6a中相对应的峰，峰3近乎消失。(经固定染色后的另一半聚丙烯酰胺凝胶条在照相时置于凝胶板上，以示相对应的免疫电泳沉淀峰)。

上接32页


mistry, Theory, Practice and Bibliography. 19-22. Harper and Row Publishers, Inc.

[4] Hoshino, M., and H.Kobayashi,1971 J.Histochem. cytochem. 19:575-577.

[5] Glauert, A. M. 1974 Embedding. In "Practical Method in Electron Microscopy" 3:159-160. North-Holland Publishing Co., Amsterdam and Oxford.

[6] Hoshino,M., and H.Kobayashi, 1972 J.Histochem. cytochem. 20:743-745.

[7] Kushida, H., and K. Fujita 1975 J. Electron microsc. 24:175-176.

[8] Spaur, R.C.and G. C. Moriarty,1977 J. Histochem cytochem. 25:163-174.

[9] 北京动物研究所内分泌研究室细胞组、湖北省长江水产研究所养殖研究室生殖组. 中国科学 1977. 6: 594—602。