

第三章

蔗糖合成酶之免疫學研究

蔗糖合成酶對兔子進行免疫，可很快得到抗血清。以抗血清進行一般免疫學檢定，其中最重要的是建立酵素免疫分析法（EIA 或 ELISA）及免疫轉印法。前者為融合瘤技術的重要檢定技術，後者則在闡明不同植物來源 SS 的構造關係上有極重要貢獻，將於第五章中詳述。

第一節 抗血清之製備與純化

抗血清（方法 3.1 節）：本實驗所用抗原 SS 為植物蛋白質，對兔子有極強的抗原性，每兩週注射一次抗原，大約在一個半月即可得到相當強的抗血清。圖 13 顯示以抗血清做雙向擴散（圖 13A）及酵素免疫分析（圖 13B）以滴定其效價。抗血清一直稀釋到 1/64 仍出現沉澱線；EIA 結果顯示，抗血清的 1/5⁷ 稀釋仍有呈色，此點的抗體濃度約等於 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

IgG 純化（方法 3.2 節）：抗血清以硫酸銨分劃，對緩衝液透析後，進行 DEAE-Sephacel 離子交換層析，以 0~0.3 M NaCl 梯度溶離之，可得到相當純的免疫球蛋白 (IgG)，如圖 14 所示。EIA 實驗中的酵素連結體，或親和吸著劑的製備，均可用此純度的 IgG。我們試過以固相抗原進行專一性抗體的純化，發現所得抗體的效價下降，比

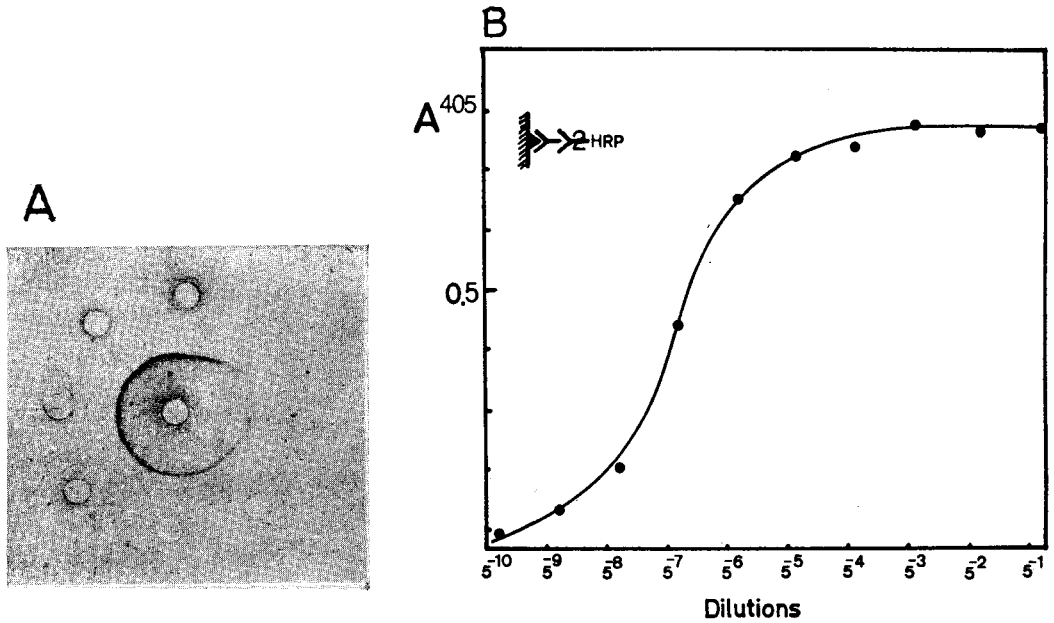


圖13 兔子抗 SS 血清的效價滴定：
 A：雙向擴散：中央槽為 SS-5，週圍各槽由 12 點鐘位置開始逆時針方向依次為原抗血清及其 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 等各稀釋液。
 B：酵素免疫分析：抗血清對固相 SS 做結合反應後，以酵素二次抗體的結合體呈色，抗血清一直稀釋到 1/5⁷ 上還有呈色。

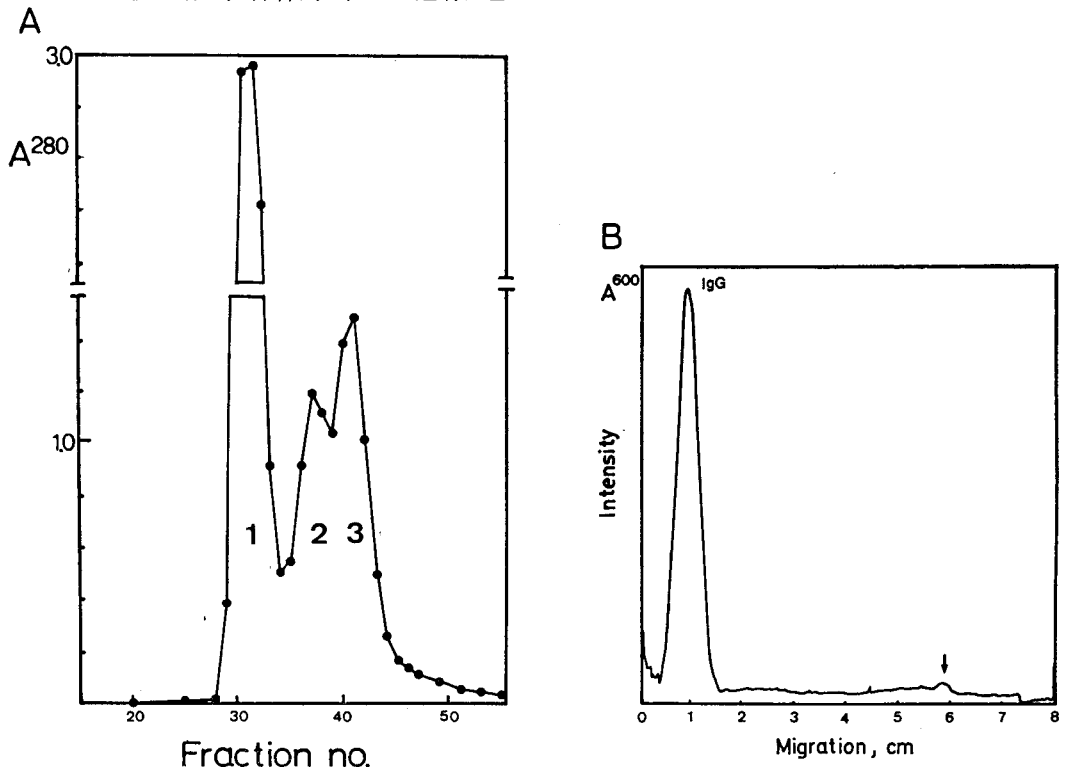


圖14 以 DEAE 離子交換法純化 IgG，可得到三個蛋白質尖峰（圖 A），第一個尖峰即為 IgG，第三個尖峰為白蛋白。所得到 IgG 以不連續膠體電泳（7.5%）檢示，純度相當高（圖 B），只有一點白蛋白的夾雜（箭頭處）。

活性與未經純化的 IgG 差不多（結果未表）。可能在作甲酸 (pH 2.05) 溶離時，低 pH 破壞了部分抗體活性，而使比活性下降。

第二節 免疫學檢定

抗血清與 SS-5 的雙向擴散如圖 13A，通常均只出現一條沉澱線，但有時會有另一較淡的沉澱線出現（如圖 15）。後來得知是一種具有很強抗原性的未知蛋白質，稱為 P56，將於第五章討論。

酵素免疫分析法（方法 3.4 節）： 我們以過碘酸氧化法把山葵過氧化酶 (Horse radish peroxidase, HRP) 連結到抗體或抗原上，反應後以膠體過濾法純化連結體（如圖 16）。前面的大尖峯同時具有 280 nm 及 403 nm 波長的吸光，為酵素與抗體的連

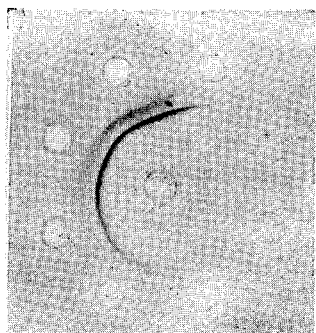


圖15 抗血清與一種未知蛋白質(P56)的沉澱線：中央槽為 SS-5，外圍由 11 點鐘以逆時針方向開始加入抗血清及其 1/2 系列稀釋液。圖中的主要沉澱線為 SS 與抗血清所形成，較淡的一條則為抗血清與未知蛋白質所形成。

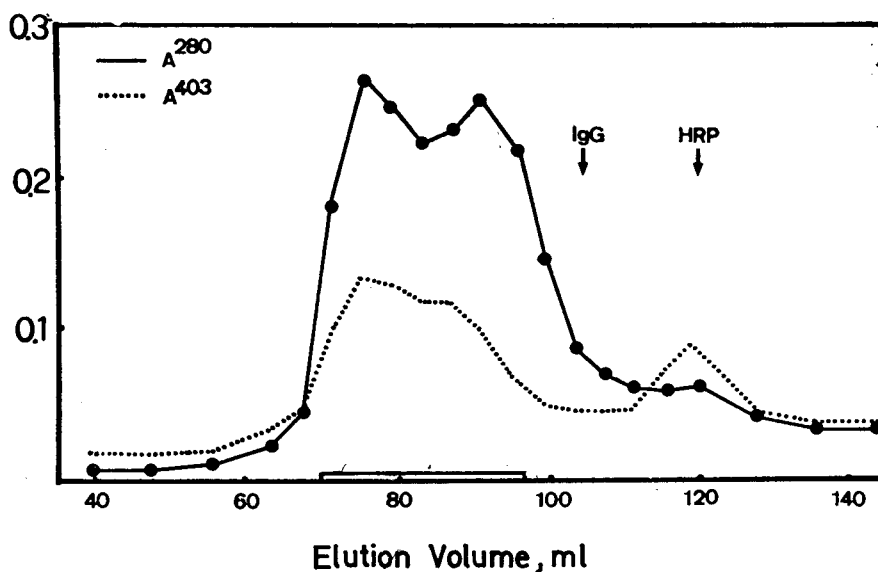


圖16 山葵過氧化酶 (Horse radish peroxidase) 與 IgG 連結反應後，以 S-200 進行分離純化。

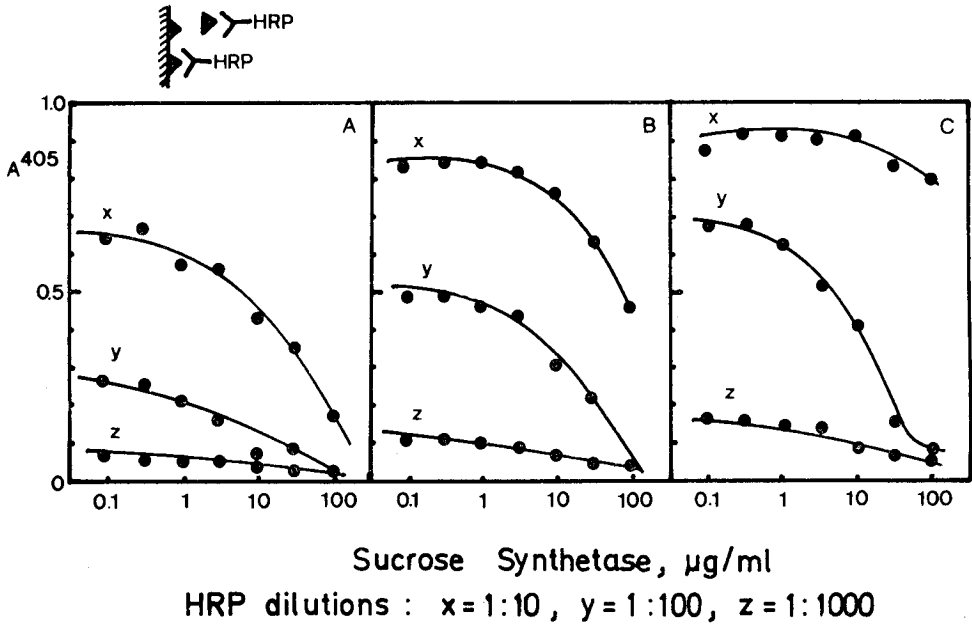


圖17 競爭性棋盤滴定法：

吸附到固相上的 SS 有三個濃度：A ($2\mu\text{g/ml}$)，B ($10\mu\text{g/ml}$)，C ($50\mu\text{g/ml}$)；加入競爭的游離 SS 為由 0.1 到 $100\mu\text{g/ml}$ 的系列稀釋；HRP-IgG（抗體與酵素結合體）則為：x (1:10)，y (1:100) 及 z (1:1000) 三種稀釋度，原連結反應液通過 S-200 後的收集液定為 (1:1)。

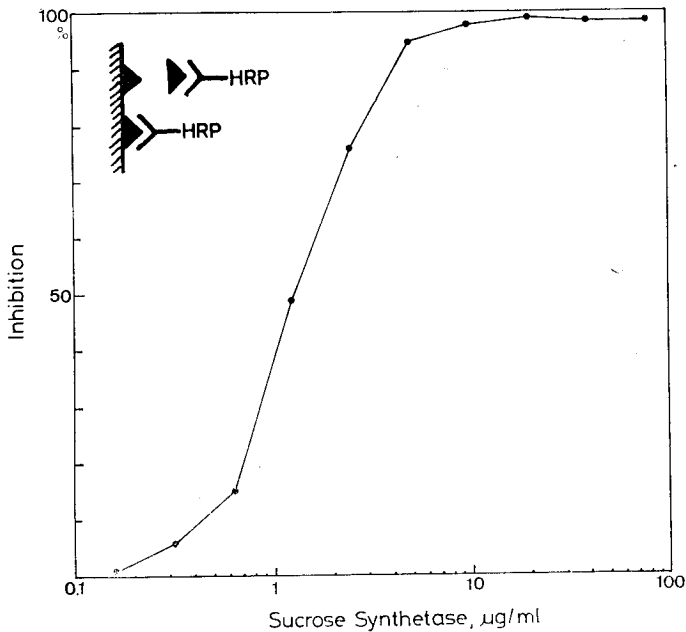


圖18 以競爭法測定 SS 量的標準曲線圖。

結體。此大尖峯又可分為兩個尖峯，一個在大約 V_0 (void volume) 處出現，RZ (Reinheitzahl) 值為 0.5；另一較後，值約為 0.3~0.4。前者為 2:1 (HRP:IgG) 的連結體，分子量較大；後者則為 1:1 的連結體，分子量約為 200,000。二者對抗原均有結合能力，一起收集之，進行競爭性棋盤滴定法。將三種濃度 SS 吸附在 EIA 盤後，以系列濃度的游離 SS 與上述 HRP-IgG 連結體競爭結合，最後呈色強度與游離 SS 量成反比。結果如圖 17，除了定出最適的 SS 吸附濃度(約 $20 \mu\text{g/ml}$)以及 HRP-IgG 濃度(1:100)外，尚得到初步的標準曲線；不過一般均要以滴定出來的最適濃度重新做一條標準曲線(圖 18)。其分析範圍大約在 $0.5 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ SS 之間，亦即每槽樣本量在 $0.1 \sim 1.2 \text{ pmole}$ 之間。另外以間接法進行對兔子抗血清中抗體含量的分析，結果如圖 19

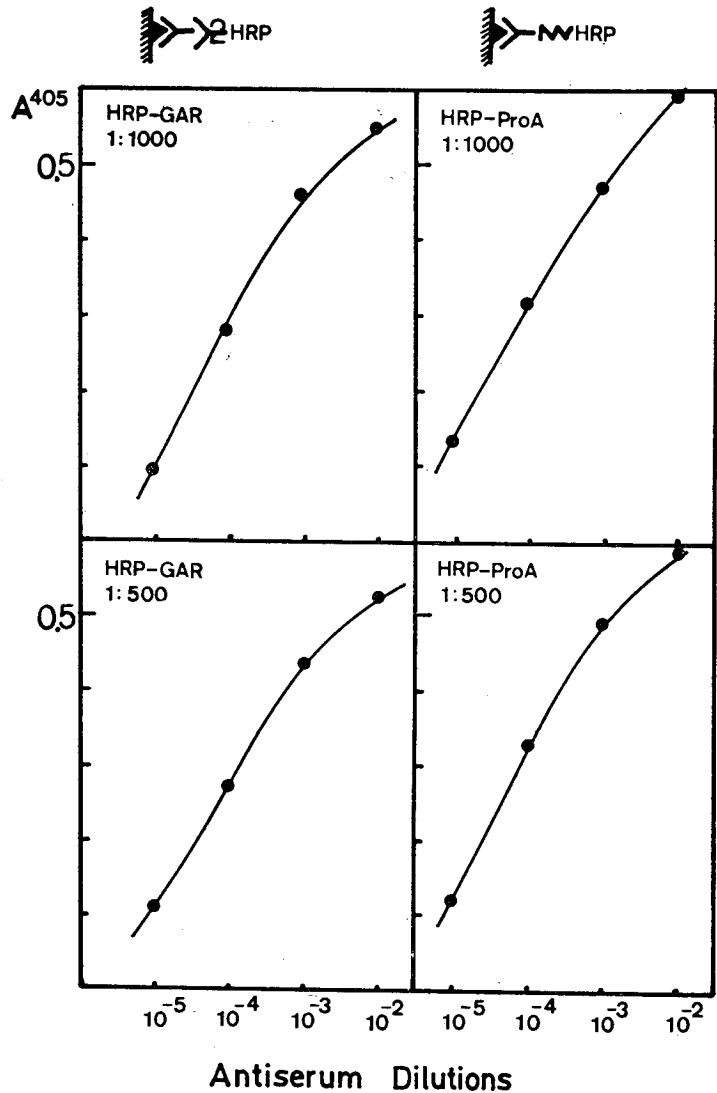


圖19 以間接法測定抗體的量，酵素連結體可使用二次抗體 (HRP-2nd Ab) 或 Protein A (HRP-Pro A)。

。其分析範圍為抗血清的 $1/10^2 \sim 1/10^5$ 稀釋度之間，酵素連結體則使用商品 HRP-GAR (goat anti-rabbit，二次抗體) 或 HRP-Protein A，均以 (1:1,000) 稀釋液進行 (原商品濃度定為 1:1)。