

第三章 免疫學方法

| | | |
|------------|-----------------------|----|
| 3.1 | 抗血清之製備 | 77 |
| 3.1.1 | 抗原及動物免疫 | 77 |
| 3.1.2 | 抗血清之製備 | 77 |
| 3.2 | 免疫球蛋白之純化 | 78 |
| 3.2.1 | 硫酸銨鹽析法 | 78 |
| 3.2.2 | 膠體過濾法 | 79 |
| 3.2.3 | 離子交換法 | 79 |
| 3.2.4 | 親和層析法 | 79 |
| 3.3 | 一般免疫學檢定法 | 79 |
| 3.3.1 | 雙向免疫擴散法 | 79 |
| 3.3.2 | 免疫電泳法 | 80 |
| 3.4 | 酵素免疫分析法 | 81 |
| 3.4.1 | 準備工作 | 81 |
| 3.4.1.1 | 材料工具 | 81 |
| 3.4.1.2 | 免疫試劑 | 82 |
| 3.4.2 | 反應操作及條件 | 84 |
| 3.4.2.1 | 吸附 (coating) | 84 |
| 3.4.2.2 | 填塞 (blocking) | 84 |
| 3.4.2.3 | 抗原抗體反應 | 84 |
| 3.4.2.4 | 酵素 (HRP) 呈色反應 | 85 |
| 3.4.3 | 分析方法 | 85 |
| 3.4.3.1 | 棋盤滴定法 | 85 |
| 3.4.3.2 | ELISA 步驟一競爭法 | 85 |
| 3.4.3.3 | ELISA 步驟一間接法 | 85 |
| 3.5 | 胜肽免疫轉印法 | 86 |
| 3.5.1 | 蛋白質電泳轉印法 | 86 |
| 3.5.2 | 免疫染色法 | 87 |

本章敘述傳統免疫學的操作方法，包括血清之製備、免疫球蛋白之純化，及利用抗原抗體反應的各種檢定法。以細胞融合法生產單株抗體及其應用，則於下章詳述。

3.1 抗血清之製備

3.1.1 抗原及動物免疫：

植物蛋白質具相當強的抗原性，欲得到其抗體並不困難。若抗原為小分子，則必須先連結到攜帶蛋白質 (carrier protein)，可使用甲基化 BSA (Sigma, A-1009)。通常以紐西蘭白兔為免疫動物，但我們試用過全黑兔子，亦可產生高效價血清。最重要的是動物的健康情形要良好，生病的動物其免疫系統可能不甚健全。抗原得加入佐劑 (adjuvant) 做成乳劑後，才注射入動物體內。我們使用一種由油質 (Bayol F) 及界面活性劑混合成的佐劑，稱為 Freund 氏不完全佐劑；若再加上 *Mycobacterium tuberculosis* 菌體，則成為 Freund 氏完全佐劑。第一次注射時使用完全佐劑，以後的各次則用不完全佐劑。

[免疫方法]

A. 抗原乳劑處理：

1. 每隻兔子需 2 ml 抗原乳劑，含抗原蛋白質 0.2-2 mg，視其抗原性及純度而定；以 SS-5 為例，取 A^{280 nm} 為 0.5 之溶液 1 ml (最好先經 PBS 透析過)。另取佐劑 (若為 Freund 氏完全佐劑，則取用前必須振盪完全) 1 ml，置一小瓶 (或離心管)。
2. 以滴管取抗原溶液分次少量滴入佐劑中，每次並反覆抽上與射出，使成為白色乳劑。
3. 改用 5 ml 針筒 (21G 針頭)，再次反覆抽上與射出，乳劑黏稠度漸漸加大，直到抽取困難為止。
4. 取一小杯水，由針頭滴下乳劑，第一滴可能含有大量空氣，故易散去。若第二或三滴在水中久久不散，則表示乳劑已成。否則再繼續抽放。

5. 乳劑製造過程損失頗大，故最後若需 2 ml 乳劑，則須準備 3 ml 才够。免疫量越大，乳劑損失率越低。若在離心管中進行乳化，則完成後經低速離心可回收較多量的乳劑。
6. 一定要把抗原的水相加入佐劑的油相，才會成為油中水型的乳劑，其外觀為純白不透明。
7. 塑膠針筒較不易推送，建議使用玻璃針筒。注射前要換一隻新的針頭，並趕出氣泡。

B. 免疫：

8. 每隻兔子打 2 ml 抗原乳劑，在其背脊兩側分十處注射。可把兔背的毛剪短，但通常不甚必要。注射時左手捏起兔背表皮，使成一帳篷似的三角形 (圖 3.1a)，右手持針筒以大約水平的角度插入三角形中心 (圖 3.1b)。勿以太垂直的角度插入，針頭亦勿太深入，以免傷到兔子。推送乳劑可能相當費力，視其黏稠度而定。
9. 有人注射在腳掌上，並無此必要。除了更不易注射外，腳掌易發炎生病。
10. 第一次注射後，每隔 3~8 週追加注射一次，約繼續 2~6 個月。兩個月後可試採血，測抗體的效價。
11. 注射兔子背部時，並不需固定器，把兔子放在一適當大小的盒子中即可。

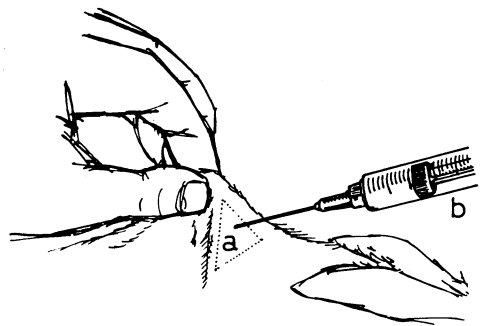


圖 3.1 兔背注射抗原乳劑：

左手捏起兔背表皮，使成一帳篷狀三角形(a)，右手持注射筒，以接近水平的角度插入(a)的中心，針頭勿太深入，(大約 1~2 cm 即可)。

3.1.2 抗血清之製備：

- #### A. 採血：
- 通常採血途徑可由耳動脈或心臟穿刺

3.2 免疫球蛋白之純化

採血，亦有人由頸動脈採血，但最方便的途徑還是由耳靜脈切割採血。

1. 兔子可用固定架固定，亦可用大毛巾或舊實驗衣包起其身體。處理動物應該溫和，勿使之驚嚇。兔子不可由耳朵抓提，應抓在背頸部的地方。
2. 兔子兩耳均可採血，其血管位置如圖 3.2 所示，靜脈(b)在外緣，呈紅紫色。
3. 使兔子耳朵血管舒張開的方法有：(-)拍打耳朵，或照以電燈，使之充血。(二)在欲採血那一面的反面塗一點 xylene 於動脈或上游靜脈，切勿直接塗在將採血的地方。
4. 欲採血處附近的毛要剃掉(d)，用酒精擦拭乾淨，待其揮發。
5. 俟血管舒張後，取一解剖刀(e) (用 11 號刀片及 3 號柄)，大約沿著血管的平行方向切一道約 2 mm 傷口，切勿橫切。血液立刻滴下，取一離心管收集之。最好用新的刀片，以手指墊在耳朵下面，對準血管，應可一刀完成。
6. 有時血流一陣後又慢下來，可稍候片刻，血液又源源湧出。等待的時候，可用刀背刮一

下傷口，防止凝血。

7. 不得已要再割第二刀時，應往上游割，即遠離心臟的地方。所以開始時，應儘量在靜脈接近耳根的地方下刀。
8. 視所要採血的量控制血流情形。若只是試探，則不要動傷口，讓血管自動凝固，即可得到所需的量。若要大量採血，則須不時以刀背清理傷口，防止凝血。
9. 流血不止時，以手指按住動脈或上游靜脈，並以棉花緊壓住傷口，大約 10 分鐘應可凝住。
10. 每隻兔子有其特異性質，有些兔子血管很細，又不易舒張，則採血相當不易。幸好大部分兔子均相當容易採血。

B. 血清製備：

11. 讓血液在離心管中凝固，可置 37°C 中 30 ~60 分鐘催化凝血，然後放在 4°C 中過夜，使凝血塊縮小。
12. 離心後上清應為澄清淡黃色，小心吸出上清。若呈紅色表示有溶血現象。
13. 血清可於 56°C 水浴處理 30 分鐘，使補體 (complement) 系統失去活性。
14. 抗血清可加 0.1% NaN₃ 防止微生物生長，或冷凍乾燥，或分裝置 -20°C 保存。

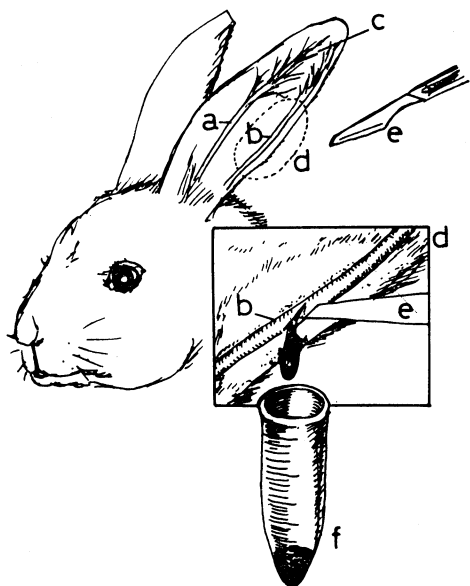


圖 3.2 由兔子耳朵採血法：

a：動脈，b：靜脈，c：微血管，d：剃毛區域，e：11 號解剖刀，f：收集用離心管。

3.2 免疫球蛋白之純化

抗血清可以進一步純化得免疫球蛋白 (Ig) 或專一性抗體。最初步的分離可以硫酸銨分劃進行，接著可用 DEAE 離子交換法 (純化 IgG) 或膠體過濾 (純化 IgM)。親和層析法可以分離得 Ig 中對抗原有專一性的抗體。就使用目的而言，純化到 Ig 已足以供許多試驗之用。

3.2.1 硫酸銨鹽析法：

免疫球蛋白可在 33% 飽和度的硫酸銨溶液中沉澱下來，但為增加回收率，通常提高到 40 或 50% 飽和度。邊加硫酸銨邊攪拌，加完後再攪拌 30 分鐘，離心 (日立，RPR-10，8,500 rpm，7,800×g) 20 分鐘取其沉澱。沉澱懸濁於

同上述百分比飽和度硫酸銨，再次離心下來。沉澱溶於適量 PBS 或直接置 -20°C 貯存。使用前視需要與否，對 PBS 透析，以除去硫酸銨。

3.2.2 膠體過濾法：

以 Sephacryl S-300 可以分離血清中各種蛋白質。其中 IgM 因分子量差異較大，在 V_0 (void volume) 溶離出來，較少有其他蛋白質雜夾。IgG 與白蛋白的溶離帶則有重疊，多改以 DEAE 離子交換法進行。

[色析條件]

1. 使用內徑 2.6 cm，長 100 cm 的管柱。
2. 緩衝液可用 0.1 M Tris-HCl，pH 8.0 含 0.5 M NaCl。
3. 膠體填充後須用高壓流洗，大約要 2 公尺水柱位差，或每小時 100 ml 流速進行，操作時則在 30~50 ml 之間。
4. 血清經 50% 硫酸銨沉澱後，以小量體積緩衝液溶之，直接進行膠體過濾，不需再透析，樣品體積約在 5~10 ml 之間。
5. 除了 S-300 外，S-500 或 Sepharose CL-6B 亦可使用。

3.2.3 離子交換法：

純化 IgG 以 DEAE 離子交換法較為理想。使用 DEAE-Sepharose CL-6B 或 DEAE-Sephacel 均可。

[方法]

1. 填充一隻 DEAE-Sepharose CL-6B 管柱 ($\phi 2.6 \times 35$ cm) 以 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液平衡。膠體在管柱外用玻璃濾器以緩衝液流洗，會較快達到平衡。
2. 注入樣品，其體積大小無關，但必須考慮交換介質的容量 (capacity)。一般 DEAE-Sepharose CL-6B 在 pH 8.0 下每 ml 約可吸附 100 mg 白蛋白，故上述管柱可供吸附 15 gm 白蛋白。但為求分離效果，我們一次只處理 5~10 ml 血清 (每 ml 約含

70 mg 蛋白質)。

3. 用上述緩衝液洗數個管柱體積，洗去未吸附上的蛋白質。
4. 拉 0~0.3 M NaCl 梯度，高低濃度各 200 ml，均溶於緩衝液中。
5. 第一個出現的蛋白質溶離尖峰即為 IgG，大約在 0.05 M NaCl 的地方，最後面的一個溶離尖峰為白蛋白。
6. DEAE 介質的再生法及注意事項如 2.2.3 小節所述。

3.2.4 親和層析法：

有兩種方式進行：(-)固定化 Protein A 可以吸附老鼠之 IgG1, IgG2 及 IgG3；(-)抗原經固定化成為親和吸著劑，可吸附 Ig 中所有的專一性抗體。前者為分離單株抗體最理想的方法，將於後述；後者方法則如 2.2.5 小節所述，惟溶離下來的是其專一性抗體，而非抗原。但一般試驗均不需如此高純度之抗體，且其溶離條件 (pH 2.05) 對抗體多少有不利影響，故較少應用之。

3.3 一般免疫學檢定法

以抗血清為工具，最常用的檢定法為雙向免疫擴散 (double diffusion) 及免疫電泳法。尤其前者在檢定兩種物質構造上的相關性，有極大的用處。

3.3.1 雙向免疫擴散法：

[試劑]

1. 洋菜：最好用 agarose (Sigma, A-6013, Low EEO)。
2. Barbitone 緩衝液：(2×)

| | |
|--|----------|
| (a) Barbitol (Na salt) | 12.0 gm |
| (b) Barbitol (acid) | 4.4 gm |
| <hr/> | |
| (a) 溶於 800 ml 水，(b) 溶於 150 ml 95°C 水中，混合後 pH 以 5 N NaOH 調到 8.2，加 0.15 克 merthiolate 後， | |
| 加水到 | 1,000 ml |

3.3.2 免疫電泳法

3. 洋菜溶液 (2%)：取洋菜 2 克加 50 ml Barbitone 緩衝液 (2×)，用藥匙攪拌均勻，再加入 50 ml 沸水，亦攪拌均勻。以微波爐加熱，使之溶解，勿過度沸騰以免溢出。完全溶解後，保持在 60°C 水浴備用，或 4°C 保存。

〔方法〕

1. 取洋菜溶液 (2%)，以沸水稀釋成 0.5%。
2. 以 5 ml 吸管吸取洋菜溶液 (0.5%)，在乾淨的載玻片上均勻塗佈，每片 2.5 ml，在烘箱中烘乾，成為預先打底 (precoated) 玻片。
3. 再取 2% 洋菜溶液 (60°C) 2.5 ml，均勻塗佈在上述載玻片，置室溫下俟其凝結。
4. 選取一支滴管，其開口必須平整，另一端接到一抽氣裝置。選擇合用的擴散圖型，如圖 3.3 之 a, b 或 c，先以白紙畫好。
5. 把畫好的擴散圖型墊在洋菜玻片之下，做為指引，以滴管照着圖型指示的位置垂直壓下，直達底部後很快抽回，可挖成直徑如滴管口大小的樣品槽，槽內的洋菜會被吸入滴管內，如圖 3.3 d~f。
6. 取抗原或抗體，以微量針筒注入樣品槽中，

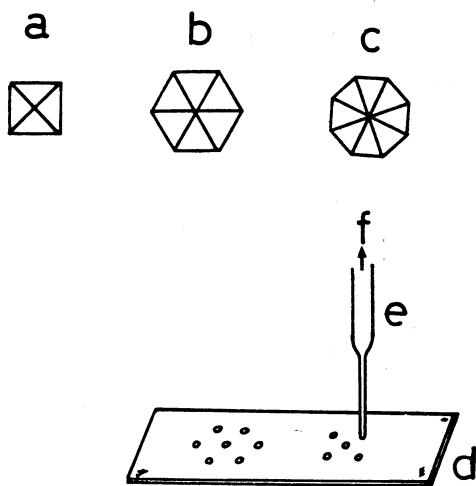


圖 3.3 雙向免疫擴散打槽模型：

a：四邊（五槽），b：六邊（七槽），c：八邊（九槽）。以普通滴管(e)即可在洋菜玻片(d)上打槽，滴管上方接一真空抽氣機(f)，可吸走槽內的洋菜。

每槽容量大約 2~3 μ l。濃度稀的樣品可以重複加入多次，每次要等上次樣品擴散入洋菜之後才加。注意這樣容易形成多餘的沉澱線，導致誤判，要特別小心。

7. 加完樣品後，放入一舖有濕衛生紙的培養皿中，加蓋後置於 37°C 中擴散，過夜後應可看到沉澱線。
8. 在 PBST 中洗 3~5 日，每日換 2~3 次 PBST。以 CBR 染液染 1 小時後脫色，方法同電泳者（見 2.3.1）。
9. 脫色完成後，置通風處，不數日即乾燥附於載玻片上。

〔註〕

1. 未知抗體應先測其效價，在中央槽置抗原，周圍各槽依序注入抗血清之系列稀釋液（如 1/2, 1/4, 1/8……等）。
2. 天氣冷時，洋菜的塗佈要快，以免過早凝固在吸管中或玻片上。最好吸管及載玻片均預先加熱。

3.3.2 免疫電泳法：

〔儀器〕

水平電泳槽（如圖 3.4 B）及供電器。

〔方法〕

1. 如上小節〔方法〕1~3 做成洋菜玻片。
2. 如圖 3.4 A，以刀片在洋菜玻片中央畫兩道平行線，間隔約 1~2 mm，要深至底部，暫勿挖去中央的洋菜。
3. 在平行線兩側對等的位置，各挖一個樣品槽，一般均偏向負極，因大部分蛋白質均往正極跑。樣品槽的挖法如上小節所述，距中央平行線大約 4~5 mm。
4. 把此玻片放入電泳槽中（圖 3.4 B），倒入 Barbitone 緩衝液 (1×) 於兩邊電極槽，蓋上濾紙鹽橋 (wick)，以緩衝液充分潤濕之。
5. 樣品溶液加上同體積追蹤染料（見 2.3.1）後，以微量針筒小心注入樣品槽，每槽 2~3 μ l。
6. 裝上電極，注意樣品槽偏向負極，以 8 mA

- (每片玻片)開始進行電泳。
- 俟染料到達正極那端時，停止電泳，取出玻片。挖出中央平行線內的膠體，成一槽溝，注入抗體溶液。
 - 放入裝有濕衛生紙或濾紙的培養皿中，37°C 擴散過夜。
 - 次日應可看到沉澱線，染色脫色如上小節所述。

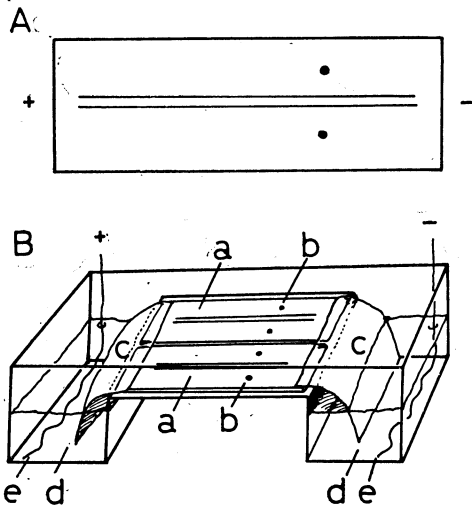


圖 3.4 免疫電泳系統：

- A：洋菜玻片的切割與挖槽圖型。
 B：電泳系統：兩片洋菜玻片(a)可同時進行，樣本槽(b)靠近負極，電極槽(d)內倒入緩衝液，以浸濕的濾紙(c)當鹽橋，(e)為白金電極線。

3.4 酵素免疫分析法

酵素免疫分析法 (enzyme immunoassay, EIA) 或酵素連結免疫吸着劑分析法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 均在 96 槽微量滴定盤 (96-well microtitration plate, 簡稱 EIA 盤) 中操作，可直接以專用的 EIA 光度計 (EIA reader) 測得每一樣品的呈色吸光度，非常方便而快速。雖其靈敏度稍遜於放射性免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA)，但在一般生化及免疫學檢定上，仍為一十分有用的分析法。其詳細原理在許多專書上均有記載^(10,11)

，本文則以對蔗糖合成酶的研究經驗，敘述本實驗室建立的 ELISA 系統。

一個 ELISA 系統或以偵測抗原為目的 (如測 SS 濃度)，或以偵測其抗體為目的 (如測血清中抗 SS 抗體之有無)。為了操作方便起見，我們一律把已知抗原 (SS) 固定在固相上，以競爭性抑制法 (competitive inhibition, 簡為競爭法) 來測定樣本中未知抗原量；而以間接標示法 (indirect labeling, 簡為間接法) 來測定未知抗體量。圖 3.5 A 及 B 說明了這兩個方法的反應過程。

3.4.1 準備工作：

ELISA 的特點在其快速、靈敏、操作方便。為達到這些目的，完善的工具及良好的試劑是最重要的。

3.4.1.1 材料工具：

A. 96 槽 EIA 盤 (8 橫列 × 12 直行)：

這是最重要的實驗材料之一。其材質有軟質的聚乙烯氯 (polyvinyl Cl) 或硬質的聚苯乙烯 (polystyrene)。出品廠牌很多，大多有專供做 ELISA 者，據稱其表面作了特殊處理。每槽可容納 0.3 ml 左右，分為 U 型底及平底兩種，平底可於 EIA 光度計中測定吸光度，不過近來的 EIA 光度計亦可測定 U 型底的 EIA 盤。

B. 添加及洗濯 EIA 盤工具：

ELISA 操作過程中，添加及洗濯的步驟很多，是最花時間人力的地方。商品有 8 或 12 管自動吸量管可同時加一行或一列樣品槽，加同一種溶液時非常快。洗濯 EIA 盤時，有人直接在洗濯液水柱下沖洗，但最好還是在槽內洗，勿溢出盤面。商品亦有同時可清洗一行或一列的裝置，但價格甚昂。可依圖 3.6 的設計自行組合，使用時一邊以重力注入洗濯液，一邊以抽氣吸出溢出的洗液。

C. EIA 光度計：

ELISA 專用的光度計可分為手動及自動兩種，手動要以人工一個一個樣本槽移動，讀出吸光值。自動則不需人工移動及讀數，可在 20 秒內讀完一片 EIA 盤，自動打出讀數。若在 20

3.4.1.2 免疫試劑

秒內讀完一片，則呈色可不加中止液。中止液加入後通常會使呈色改變，對吸光判讀不甚有利，故我們不加呈色中止液。

3.4.1.2 免疫試劑：

ELISA 所用的免疫試劑有右列三種：

A. 抗原：

抗原的純度越高越好，若有具強抗原性的物質污染，則結果可能造成誤判。抗原的成分將引導最後結果的方向。

B. 抗體：

一般應用均純化到 Ig，以親和層析法再進

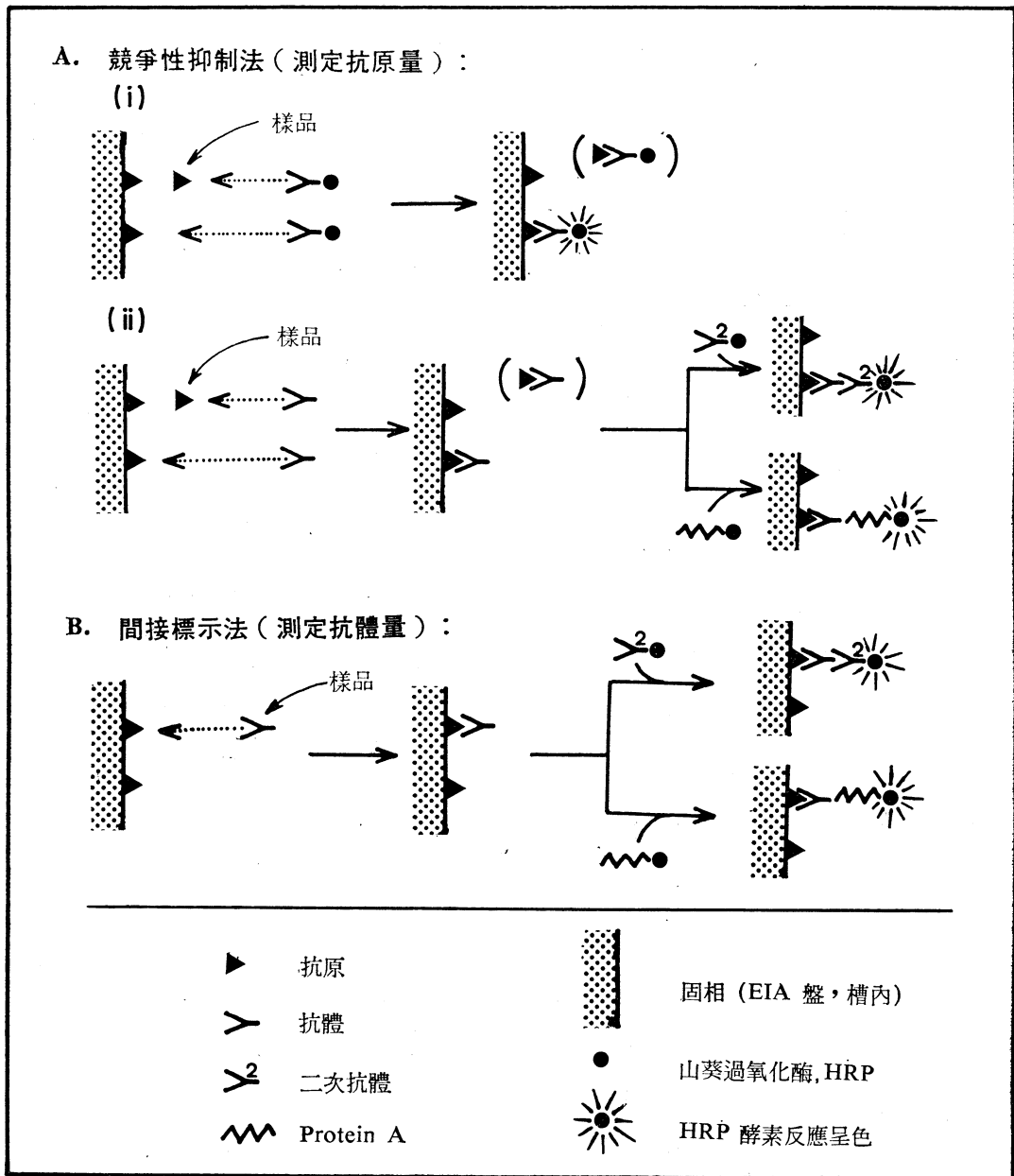


圖 3.5 ELISA 的方法及進行步驟

一步純化則無必要。以血清或培養液為樣品時，則不需經純化，直接分析。

C. 酵素連結體 (enzyme conjugate) :

通常使用山葵過氧化酶 (horse radish peroxidase, HRP) 或者鹼性磷酸酯酶 (alkaline phosphatase) 做為連結酵素，我們使用前者。如圖 3.5 A 及 B 所示，通常 HRP 連結在二次抗體 (second antibody)，成為 HRP-二次抗體的連結體 (略為 HRP-2nd Ab)；亦可連結在 Protein A 上成為 HRP-Protein A (略為

HRP-Pro A)。圖 3.5 A (i) 中的 HRP 直接連結在原来的抗體上，而非二次抗體，略為 HRP-Ab。HRP-Ab 可直接與固相上的抗原反應，較為方便，但需自行做耦合反應 (coupling reaction)。通常蛋白質間的耦合，可以 glutaraldehyde 連結兩蛋白質的胺基 (NH_2 端或離胺酸上的胺基)⁽¹²⁾。但 HRP 可能因為自由胺基太少而無法以 glutaraldehyde 進行耦合。幸而 HRP 上有相當的碳水化合物，可利用 NaIO_4 先把醣分子的相鄰醇基氧化成醛基後，醛基可以很快與蛋白質的胺基形成 Schiff 氏鹽基鍵結 ($\text{C}=\text{N}$ 雙鍵)，再以 NaBH_4 還原成單鍵。Nakane 等⁽¹³⁾做了一些這方面的研究，我們大體依其方法進行，但也有一些修改。以下是耦合反應的方法：

[試劑]

1. HRP (Sigma, P-8375, RZ=3.0) 每次反應需 4 mg。
2. NaIO_4 (Merck, GR, 6597) 很容易分解而失去氧化活性，使用前新鮮配成 0.1 M 水溶液，只需 0.2 ml。
3. 抗體：純化至 Ig，最好經脫鹽冷凍乾燥成固體，每次反應 8 mg。不可含有如 Tris 等具自由胺基的任何物質。
4. NaBH_4 ：每 ml 水中含 4 mg，使用前配好，每反應只需 0.1 ml。

[方法]

1. 取 HRP 4 mg 溶在 1 ml 水中，呈褐色。
2. 加入 NaIO_4 溶液 0.2 ml，一邊溫和攪拌，溶液很快變成暗綠色。
3. 在室溫反應 20 分鐘後，在 4°C 對醋酸緩衝液 (1 mM, pH 4.4) 透析過夜。換三次緩衝液，每次 1 l。
4. 取出 HRP，加入 10 μl 2 M 碳酸鈉 (pH 9.5)，把 pH 調到 9~9.5 之間。
5. 馬上加入 1 ml 抗體溶液 (8 mg 溶在 1 ml 0.01 M 碳酸鈉, pH 9.5)，溫和攪拌反應 2 小時，4°C 下進行。

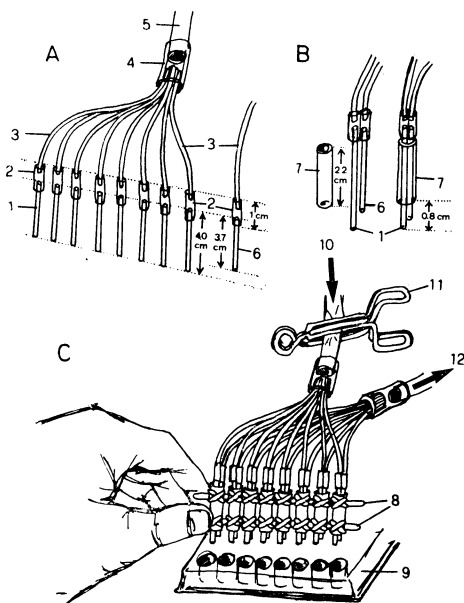


圖 3.6 自製 EIA 盤洗濯器：

做兩組如圖 A 的 8 管分注引流器，二者構造相同，只有末端不同。其中一組為硬塑膠管(1)，另一組為玻璃毛细管(6)，以一截 Tygon 管(2)連在一長條軟塑膠管(3)，八條軟塑膠管集中，插入一砂質膠管(4)，用強力膠水把管間空隙堵死，但勿黏到塑膠管開口，砂管再接一長條 Tygon 管(5)。然後兩組引流器合在一起，如圖 B，每隻硬塑膠管(1)與一隻毛细管(6)，用適當大小的 Tygon 管(7)套在一起，(1)的長度比(6)長些。然後取兩條鋼條或竹棒(8)，把圖 B 所組成的雙管組合，依 EIA 盤槽間的距離，以橡皮圈或鐵絲固定上去，如圖 C。引流器前端為硬塑膠管者接著洗濯液(10)，可加一夾子(11)控制水的出入，另一引流器接抽氣幫浦(12)。使用時先開幫浦，以左手持洗濯器，放入 EIA 盤(9)，右手控制夾子(11)。洗濯液沖入槽裡，到毛细管的高度即被吸走，故可循環洗濯。

3.4.2 反應操作及條件

6. 加入 0.1 ml 新鮮的 NaBH_4 (4 mg/ml), 繼續在 4°C 下反應 2~3 小時。
7. 反應液在真空中抽去氣體後, 以 S-200 管柱 (2.6×40 cm, 平衡於 PBS 含 0.5 M NaCl), 進行膠體過濾。
8. 收集前面 $A^{280\text{nm}}$ 及 $A^{403\text{nm}}$ 均有吸光的蛋白質尖峯, 經或不經濃縮, 加 BSA (10 mg/ml) 後分裝, 置 -20°C 保存。

[註]

1. NaIO_4 最易出問題。若在加入 HRP 後, 反應液顏色沒有變成暗綠色, 或只呈現半褐半綠, 表示 NaIO_4 已全部或部分分解, 應重做或追加 NaIO_4 。
2. 透析時, pH 為 4.4, 可防止 HRP 發生自體耦合反應成為多元體。
3. 透析後, pH 由 4.4 以碳酸鈉調到 9, 應事先取同體積 pH 4.4 的透析液在試管中測所需加入碳酸鈉的量。
4. 當 pH 調到 9~10 之間時, 耦合反應立刻開始, 要馬上加入抗體溶液。亦可先加入抗體溶液後, 再調 pH。
5. 通入 S-200 管柱前應先抽除 NaBH_4 所產生的氣體, 否則管柱上方的膠體將充滿氣泡。
6. $A^{403\text{nm}}$ 與 $A^{280\text{nm}}$ 的比例稱為 RZ (Reinheitzahl) 值, 其值越高表示 HRP 純度越高。以 RZ 值可以估計 HRP-Ab 連結體中 HRP 與抗體的分子比例。RZ 值為 0.3 表示為 1:1 的耦合, 0.6 則為 2:1 (HRP:抗體)。理想的耦合產物, 其 RZ 值應在 0.3~0.6 之間。

3.4.2 反應操作及條件:

ELISA 進行過程中, 有四種反應操作: (一) 在固相吸附 (coating) 抗原分子; (二) 填塞 (blocking) 未有抗原吸附的空白固相部分; (三) 抗原抗體反應; (四) 酵素呈色反應。

3.4.2.1 吸附 (coating):

溶液中的蛋白質會自動地吸附到固相表面, 溶液的 pH 影響吸附量的多寡及吸附以後蛋白質的構形或抗原性。可使用中性 pH (PBS, pH 7.0), 亦有人用 pH 9.7 (0.1 M Tris-HCl)。後者可能會使吸附量增加, 但蛋白質可能有某些程度的變性。

吸附反應進行時, 調好抗原溶液的 pH 及濃度, 每槽加入 0.1 ml 後, 以透明膠布把整個盤

面蓋上, 防止溶液自由蒸發。在 37°C 反應 30 min 後, 置 4°C 一至數小時。亦可不經 37°C 而置 4°C 過夜, 則抗原溶液可以重複用。我們用同一批 SS 溶液在兩週內連續進行 5 次吸附, 其前後結果沒有很大差別。吸附反應後吸去抗原液, EIA 盤以 PBST (PBS, pH 7.0 含 0.5% Tween-20) 洗過兩次, 準備做填塞。對照用的空白組在吸附反應時, 均空着不加, 等到填塞時才加入明膠 NET (見下述)。

若以抗體做吸附溶液, 則上述方法亦可適用。

3.4.2.2 填塞 (blocking):

以往均用 BSA 填塞固相上吸附抗原以外的空白地方, 但 BSA 本身對某些分子有吸附力, 不甚理想。雖有專供作 RIA 用的 BSA (Sigma, A-7888), 但我們常用的明膠 NET 溶液效果優於 BSA 甚多:

[明膠 NET 液 (Gelatin, NaCl, EDTA, Tris, Tween)]

| | |
|------------------------------|---------|
| Gelatin (Merck, 4070, 0.25%) | 5.0 gm |
| NaCl (0.15 M) | 17.5 gm |
| EDTA (5 mM) | 3.6 gm |
| Tween-20 (0.5%) | 1.0 ml |
| Tris (base, 50 mM) | 12.1 gm |

溶解於 1,800 ml 水後 pH 調到 8.0,

加水至 2,000 ml

[方法]

上述 EIA 盤洗淨後每槽加入 0.2 ml 明膠 NET 液, 膠布封口置室溫下 1 小時後洗去, 以 PBST 洗一或二次。然後可以繼續抗原抗體反應或收存。若欲保存則每槽加 0.2 ml 1 M NH_4Cl , 數分鐘後吸出, 不用洗濯, 裝在塑膠袋內置 4°C 乾燥器內, 可保存數個月之久, 視抗原穩定性而定。

3.4.2.3 抗原抗體反應:

所有抗原與抗體或酵素連結體的反應, 均依

如下的反應條件進行。免疫試劑均以明膠 NET 稀釋到適當濃度，每槽反應體積為 0.1 ml，盤面用膠布封好，先在 37°C 反應 30 分鐘後，再於 4°C 反應 1 小時。37°C 反應太久並無必要；而以膠布封住所有的 96 槽是極重要的操作，可防止周邊的樣本槽背景呈色太深。反應後每槽先分別吸出反應液後，再以 PBST 清洗。在酵素連結體反應後的清洗尤其要小心，這可能是呈色污染的來源。

3.4.2.4 酵素 (HRP) 呈色反應：

HRP 的反應基質為 H_2O_2 ，另需供氫體 (hydrogen donor) 參加反應。供氫體有很多，我們用 *o*-phenylenediamine (OPD, Sigma P-1526)。OPD 在釋出氫後，由無色變成黃色至褐色，視酵素活性而定。基質溶液在使用前新鮮配製，稱取 40 mg OPD 溶於 100 ml 0.1 M 磷酸鹽緩衝液，再加入 10 μ l H_2O_2 (30%)，儘量避光。每一樣本槽加入 0.15 ml，最好用 8 管自動吸量管快速添加完成，避光在室溫下反應，十分鐘內應可呈色；若室溫太低，可置 37°C 恆溫箱反應。呈色約在半小時後可達穩定，以 EIA 光度計 (405, 450 或 490 nm 波長) 讀出吸光度。基質液過夜後不可再用，配基質液最好有專用的褐色瓶，當天清洗乾淨，瓶蓋之清洗尤不可疏忽。OPD 及其他供氫體可能為致癌物質，注意勿吸入塵埃或直接接觸。

3.4.3 分析方法：

建立 ELISA 系統時，先要滴定各試劑的適用濃度，可以用棋盤滴定法 (chequerboard titration) 進行之。然後我們以競爭法測定抗原量，以間接測定抗體量。

3.4.3.1 棋盤滴定法：

抗原吸附溶液及酵素連結體的使用濃度均須以棋盤滴定法來決定。若抗原的純度高，則其吸附溶液的濃度均大約在 10 μ g/ml 左右，可在 1 與 100 μ g/ml 之間選數點進行測試。若抗原不純，則其吸附效率低，抗原抗體反應不佳，結果就不會太好。酵素連結體亦以系列稀釋液進行滴

定，一般商品的適用稀釋在 1:1,000 與 1:5,000 之間。在操作棋盤滴定时，可有二或三個可變因子，除了上述兩種溶液的濃度外還可加入各已知濃度的標準樣品，因此同時可以得到標準曲線 (Standard curve)。

3.4.3.2 ELISA 步驟—競爭法：

如圖 3.5 A，我們以(i)的方法進行，比較方便。樣品中的抗原競爭與 HRP-Ab 結合，因而抑制了 HRP-Ab 與固相抗原之間的結合。樣品抗原量越高，則 HRP-Ab 結合到固相的機會就越少。最後 HRP 呈色的強弱，與樣品中抗原量成反比。

[步驟]

1. 抗原吸附到固相 (EIA 盤) 上。每槽 0.1 ml (10 μ g 抗原/ml PBS)，4°C 過夜。
2. 吸出抗原吸附液，以 PBST 洗兩次。
3. 加入 0.2 ml 明膠 NET，室溫 1~2 小時後吸去。
4. 以 PBST 洗兩次。
5. 加入 50 μ l HRP-Ab，(濃度須以棋盤法滴定，約 1:3,000，溶在明膠 NET 液)。
6. 加入 50 μ l 樣品液 (由低濃度者開始加)。
7. 混合均勻，以膠帶封住盤面。
8. 37°C 反應 30 分鐘，4°C 30~60 分鐘。
9. 小心吸去反應混合液後，以 PBST 洗四次。
10. 加 0.15 ml OPD 基質液呈色。

[註]

1. 若以圖 3.5 A (ii) 的方法進行，則上述步驟 5 中的 HRP-Ab 改為抗體，然後以同法操作到步驟 9。接著加入酵素連結體 (HRP-2nd Ab 或 HRP-Pro A) 0.1 ml，封口反應後洗去，以 OPD 基質液呈色。
2. 洗 EIA 盤可用前述的洗濯器 (圖 3.6) 進行，每槽加滿 PBST 後，等約數分鐘，然後在水槽上空翻過盤面，用力甩下所有洗液。在衛生紙上擦乾盤面，繼續下一次清洗。

3.4.3.3 ELISA 步驟—間接法：

如圖 3.5 B 所示，樣品中所含抗體與固相上的抗原結合之後，再以 HRP-2nd Ab 或 HRP-

3.5 胜肽免疫轉印法

Pro A 與之反應。因此最後 HRP 呈色的強弱，與樣品中抗體量成正比。

[步驟]

1. 抗原吸附到固相 (EIA 盤) 上，每槽 0.1 ml (10 μ g 抗原/ml PBS)，4°C 過夜。
2. 吸出抗原吸附液後以 PBST 洗兩次。
3. 加入 0.2 ml 明膠 NET，室溫 1~2 小時後吸去。
4. 以 PBST 洗兩次。
5. 加入樣本 0.1 ml，膠布封口後 37°C 30 分鐘，然後置 4°C 30~60 分鐘。
6. 吸去樣本液，以 PBST 洗三次。
7. 加入 HRP-2nd Ab 或 HRP-Pro A (以明膠 NET 稀釋至適當濃度，一般在 1:2,000 左右)，每槽 0.1 ml。
8. 膠布封口，置 37°C 30 分鐘，4°C 30~60 分鐘。
9. 小心吸去酵素連結體溶液，以 PBST 洗四次。
10. 加 0.15 ml OPD 基質液呈色。

3.5 胜肽免疫轉印法

蛋白質經部分水解後以 SDS-PAGE 做成胜肽圖譜⁽³⁾，再以電泳轉印^(14,15)到硝化纖維紙 (nitrocellulose) 上，經尿素洗去 SDS，並使蛋白質回復抗原性後⁽¹⁶⁾，可以抗體進行免疫染色⁽¹⁷⁾(immunostaining)。SDS-PAGE 的胜肽圖譜製作法在上一章 (2.3.6 小節) 有詳細說明。在跑完電泳後，膠片立浸入轉印緩衝液 (下述)，準備進行轉印。

3.5.1 蛋白質電泳轉印法：

[儀器]

電泳轉印槽 (Hofer TE 52)，包括一個轉印槽及一個電源供應蓋。另有卡夾，用以夾住膠片及硝化纖維紙。

[溶液]

1. 轉印緩衝液 (Blotting buffer, 10 \times):
Tris (Sigma 7-9, 25 mM \times 10) 60.6 gm
甘胺酸 (0.192 M \times 10) 288 gm
加水 1,500 ml 溶之，pH 以 HCl 調到 8.3，加水至 2,000 ml。使用時取 500 ml 倒入一 5 l 大量杯中，加 500 ml 甲醇後，再加水到 5 l，均勻攪拌之。(如此配成者，含 10% 甲醇，視需要可提高到 20%)。
2. 尿素洗液 (6 M Urea-PBST):
取尿素 180 克溶在溫的 PBST 300 ml 中 (PBST 為 pH 7.0 的 PBS 含 0.5% Tween-20)，加溫攪拌溶解後，再加 PBST 至 500 ml。

[方法]

1. SDS-PAGE 膠片浸在轉印緩衝液 (1 \times) 中，洗 2~3 次，每次 10 分鐘。
2. 取硝化纖維紙 (S & S, Membrane Filter, BA 85, 0.45 μ M) 切成約如膠片大小，先浸入轉印緩衝液 (1 \times) 中 30 分鐘後使用。
3. 同時切兩張稍大的濾紙，同法浸潤後使用。取卡夾，先墊一張多孔性海棉，上舖一張濾紙，再小心舖上硝化纖維紙，勿陷入任何氣泡。硝化纖維紙上滴數滴緩衝液後，舖上膠片，再蓋一層濾紙，亦不可陷入氣泡。把整個膠片卡夾裝好。
4. 置入已放有約 5 l 轉印緩衝液 (1 \times) 的轉印槽中，注意硝化纖維紙那面向正極，膠片那面向負極。小心除去附在卡夾外面的氣泡，裝置好後靜置 30 分鐘。
5. 以 1.0 A 開始轉印，溫度漸漸上升，電流也會上升，要調回 1.0 A。在 1.0~1.2 A 之間轉印 1.5~2 小時後中止，取出硝化纖維紙，浸在尿素洗液中洗過夜，換三次尿素洗液。
6. 上述轉印條件會使溫度上升至 70~90°C 之間，對實驗沒有很大的影響。但若有冷卻系統，把溫度控制在 5°C 左右，則可以 0.5 A 轉印 6~8 小時會較完全。

7. 若不做免疫染色，則轉印後不用尿素洗液清洗，用水沖過後可以 Amido Black (1%，溶於 10% 甲酸) 染色 1 小時，以 10% 甲酸脫色，沖水後涼乾即可。

〔註〕

- 轉印時槽內的水溫並不均勻，液面的溫度比底部要高很多，電流也就不會均勻，應該注意轉印效果因此會有差異⁽¹⁸⁾。
- 膠片應做記號，以便分辨左右或正反面，以免硝化纖維紙呈色後分不清樣本的次序。
- 甲醇可提高到 20%，一般分子量越小，所用甲醇的含量越高。甲醇含量太高可能會使大分子量者不易泳離膠體。
- 轉印緩衝液 (1×) 通常可用 2~3 次，要蓋蓋保存以免甲醇揮發。若溶液顏色變黃，則勿再用。

3.5.2 免疫染色法：

轉印到硝化纖維紙上的抗原可以用抗體與之結合後，再以 HRP-2nd Ab 或 HRP-Pro A 使之呈色。

〔試劑〕

- 抗體：**可用抗血清或單株抗體，溶於明膠 NET 中，其最適稀釋濃度，隨抗體效價不同而異，以下為一般適用範圍：
 抗血清：1:100 到 1:1,000
 IgG (冷凍乾燥品)：10~50 $\mu\text{g/ml}$
 單株抗體 (腹水)：1:100 到 1:1,000
 單株抗體 (培養液)：原液或 1:10
- 酵素連結體：**可用 HRP-2nd Ab 或 HRP-Pro A，使用濃度與 ELISA 者相同，約為

1:1,000 到 1:3,000。

〔方法〕

- 尿素洗過硝化纖維紙再以 PBST 洗三次。
- 把硝化纖維紙放在抗體溶液中，置室溫反應 1 小時。一般可用一淺盤當容器，亦可裝入塑膠袋中反應，較省試劑用量。
- 上述反應後以 PBST 洗三次，改以酵素連結體反應，亦在室溫下反應 1 小時。
- 以 PBST 洗四至五次。
- 加入 diaminobenzidine (DAB) 呈色。取 DAB (Sigma, D-5637) 5 mg 溶於 100 ml PBS，再加 10 μl H_2O_2 ，避光貯存。DAB 疑為致癌物質，稱量時勿吸入 DAB 細塵，新鮮配製。
- 數分鐘內可呈色，在背景加深前倒去 DAB，以水沖過數次後涼乾。

〔註〕

- 非專一性呈色經常造成困擾：所有樣本胜肽或蛋白質，不論是否具抗原性，均出現呈色。這可能因為蛋白質上附有 SDS 的負電荷對 HRP 造成強吸引力；因為以不連續 PAGE 膠片進行時，則無此困擾。此問題可用尿素洗液解決，尿素可洗去 SDS 且使蛋白質或胜肽回復其抗原性⁽¹⁶⁾。
- 裝入塑膠袋反應時，不免會陷入許多小氣泡，只要硝化纖維紙確浸在溶液中，一般不會造成大問題。但最好不時在塑膠袋外面輕抹數下，使溶液分佈均勻。
- DAB 呈色時，最好有一不應呈色之負對照組當比較；故電泳時均加入標準分子量組合 (見 2.3.2)，其蛋白質不應呈色才對。