

S1 免疫電泳法

莊 榮 輝

抗體 是非常重要的生物化學工具，因為抗體與抗原之間有很強的專一性；而且可以針對某一特定目標抗原，產生其專一性抗體，因此應用上非常方便。

1.1 背景知識

脊椎動物體內擁有後天免疫系統，可對外來異物產生特定的 抗体，這些異物可為別種生物來源的大分子，稱之為 抗原。

1.1.1 抗體與其專一性

抗体與抗原之間的反應，有相當強的專一性 (specificity)。由 抗原甲 所誘導出來的 抗體甲，只能對 抗原甲 作用，對毫不相關的 抗原乙 沒有反應。但若某 抗原丙 的分子構造與 抗原甲 非常類似，則 抗體甲 可能與 抗原丙 有某些程度的反應，稱為 交叉反應性 (cross reactivity)。

外來蛋白質或多醣等大分子，可作為良好抗原；此分子上可被抗体確認的部位，僅有數個胺基酸或單醣，稱為 抗原決定基 (antigenic determinant) 或稱 epitope。在大分子抗原上，可能有數個抗原決定基，各誘導出專一性抗体；因此所產生的抗血清，含有對抗此大分子上，所有抗原決定基的抗体。

抗体是由淋巴球 (B 細胞) 所分泌，一個 B 細胞，只能分泌一種抗体，對抗專一性抗原。平常這些 B 細胞處於休眠狀態，當抗原入侵時，才活化起來，增生、成熟後開始分泌抗体。抗体是一種蛋白質，基本單體分子量約 160,000，分子形狀如 Y 字形 (圖 S1-1)。與抗原決定基結合的部分有兩處，此兩處的分子構造完全一樣，因此可與兩分子抗原結合。抗体分子中，有較具保守性的 C 區 (constant region)，及變異性較大的 V 區 (variable region)。C 區維持抗体分子的基本構形，V 區則造成抗体分子的多樣性，能對各種抗原產生專一性結合。

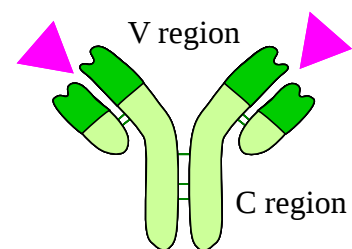


圖 S1-1 抗體分子構造
有兩個相同的抗原結合區。

抗体蛋白質一般稱為免疫球蛋白 (immunoglobulins)，簡稱 Ig；可再細分為 IgG, IgM, IgA, IgE 及 IgD 等；其中 IgA 為二元體，IgM 為五元體，其餘為單元體。各種 Ig 的分子構造在其 C 區有點差異，稱為 *isotypic variation*。免疫動物後，一般均能產生上述各種 Ig。但不同種動物的同一類 Ig，構造上會稍有差異；例如兔子的 IgG 與山羊的 IgG 就不完全相同。若把兔子的 IgG 打入山羊內，則山羊會產生抗兔子 IgG 的抗体，這種抗体的抗体稱為 二次抗体。在同一動物體內，其所含 IgG 分子也不盡相同，有無數群族以對付無數抗原。這種多樣性的成因，是由於 V 區的變異所造成，稱為 *idiotypic variation*。

1.1.2 免疫電泳

一個抗体可與兩個抗原結合，而每個抗原分子上，通常不只有一個抗原決定基，又可與若干抗体結合。如此，當許多抗原與許多抗体，互相結合在一起，會造成很大的連鎖複合體，並在溶液中沉澱下來，稱為 *precipitin*。但抗原-抗体反應若要造成沉澱晶格，必須兩者間的莫耳比例適中；抗原或抗体，若有一方濃度太高 (或太低)，都足以破壞晶格形成。

雙向免疫擴散 (double diffusion) 可方便地在洋菜凝膠 (agar) 上，測試抗原與抗体間的沉澱反應。圖 S1-2A 簡單說明其原理，虛線代表抗原或抗體的濃度，因擴散而向四周漸減；抗原與抗体的擴散範圍會重疊，在最適當濃度之重疊處產生沉澱線。免疫電泳則結合了雙向免疫擴散以及洋菜凝膠電泳，其作法如圖 S1-2B 所示，樣本先跑完電泳，然後再對其抗体進行免疫擴散 (注意箭頭指示方向)。

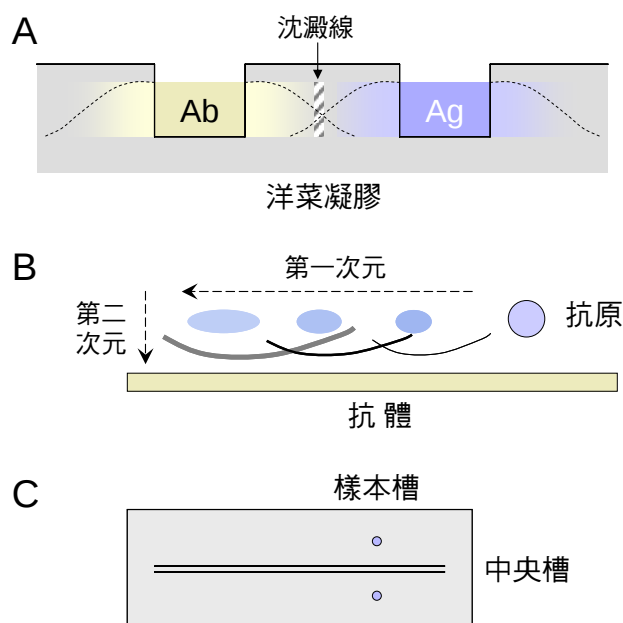


圖 S1-2 雙向免疫擴散及免疫電泳原理及設計

1.1.3 實驗大綱

S1 免疫電泳法

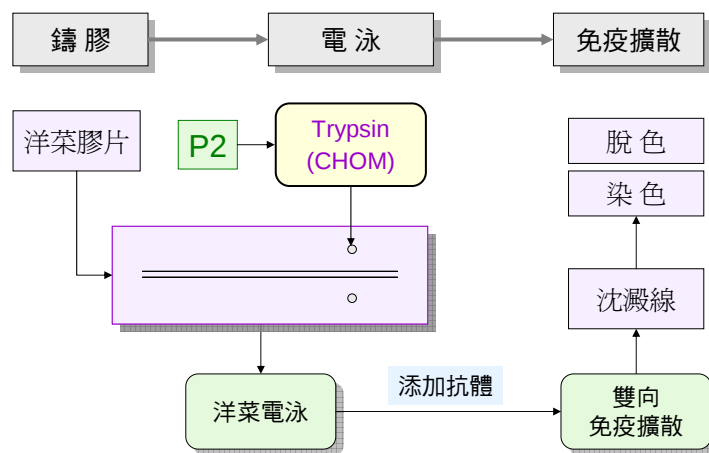


圖 S1-3 洋菜電泳與雙向免疫擴散流程

先在載玻片上鑄好洋菜膠體，並預先打好樣本槽，以便進行洋菜電泳。
電泳後中央槽挖出，注入抗體，進行雙向免疫擴散。

1.2 實驗操作

本實驗所用免疫電泳膠片如圖 S1-2C，有兩個樣本槽，一個中央槽 (長條形)。樣本槽分別注入 trypsin 與胰臟抽取液；跑完電泳後，中央槽加入 小白鼠抗 trypsin 抗血清，進行雙向擴散；由沉澱線的形成，可觀察抗原與抗体間的專一性現象。

1.2.1 儀器設備

- 載玻片 (每人一片)。
- 膠片打模工具：刀片、鐵尺 (15 cm)、滴管 (吸口須平整)。
- 水平電泳槽 (Mupid)、濾紙 (當鹽橋用)。
- 塑膠培養皿 (petri-dish) 及衛生紙。

1.2.2 藥品試劑

- Barbitone 緩衝液 (0.08 M, pH 8.2)。
- 洋菜溶液 (2%) 溶於 barbitone 緩衝液，煮沸溶解後，於 60°C 水浴保溫。
- 樣本：Trypsin 或胰臟抽取液，加有追蹤染料 (BPB)，裝在 1 mL 注射針筒內。
- 抗血清：小白鼠抗 trypsin 的抗血清或腹水，1~3 倍稀釋。

1.2.3 實驗步驟：

洋菜膠片製作

- 1) 載玻片預先打底 (若時間不夠可省略)：取 0.5% 洋菜溶液約 2.5 mL，均勻塗佈在載玻片上，凝固後放到烘箱內烘乾。
- 2) 取出載玻片，水平放好，有打底的那面朝上。
- 3) 準備 2% 洋菜溶液，置 60°C 水浴保溫；同時取一支 5 mL 吸管，天氣太冷時須以電爐或吹風機加溫，以便在吸取洋菜溶液時，洋菜不致凝固在吸管内。
- 4) 以此吸管吸取 2.5~3.0 mL 洋菜溶液，儘速依圖 S1-4A 的方式把洋菜溶液均勻塗佈到載玻片上。注意要馬上以吸管尖把洋菜表面整平，若有氣泡立刻除去。洋菜膠體開始凝固時，就不要再動它。
- 5) 數分鐘後，當膠體轉成白色，表示凝結完成。
- 6) 以刀片在膠體的中央，畫兩道平行線如圖 S1-4B。引導畫線的鐵尺，要架在膠體上方，但不可觸及膠面，可在載玻片兩頭用硬幣墊高，再把鐵尺架在上面；刀刻要深及底部，兩平行線間隔不可大於 2 mm，約一個硬幣的厚度，暫時不可挖掉膠體。
- 7) 取滴管在如圖 S1-4C 的位置打洞，此二洞位置要對稱。打洞時，先握住橡皮頭，在預定位置上垂直壓下，放開橡皮頭，同時快速往上移開滴管，要注意洞內的膠體有無挖出。
- 8) 畫線及打洞時，最好先在紙上畫好實際大小的模型，把玻片放在上面進行。每人製作一片，每組挑出一片進行電泳。

洋菜膠片電泳

- 9) 四組共用一個 Mupid 電泳槽，把四片載玻片並肩放到電泳槽中，正負極槽倒入 barbitone，放好濾紙鹽橋並潤溼之，注意濾紙與膠片要貼緊 (圖 S1-4D)。
- 10) 以微量注射針筒在兩個樣本槽分別注入 trypsin 及胰臟抽取液，小心勿溢出。
- 11) 裝好電極，注意樣本由負極 (黑色) 往正極 (紅色) 跑，以 16 mA 電流進行。

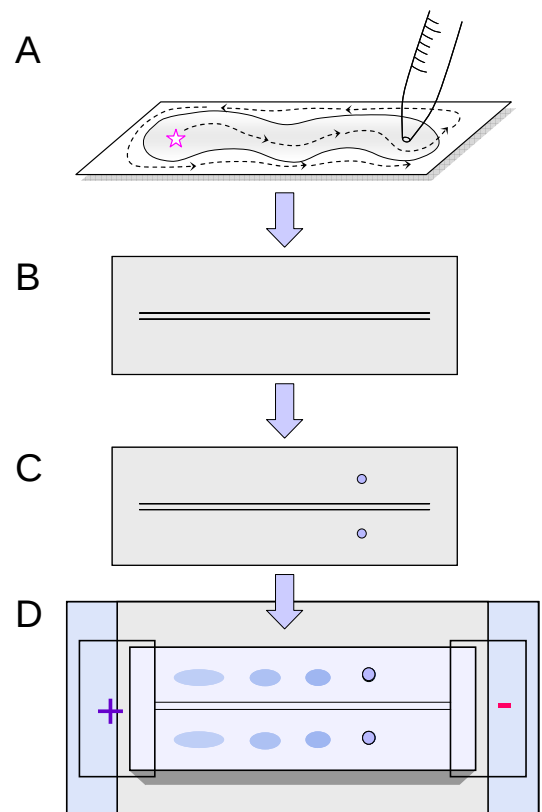


圖 S1-4 免疫電泳膠片製作

12) 樣本中有藍色染料，俟藍色點接近另一端時，終止電泳；小心取出載玻片。

◆ 注意：一定要確定電源已關，才可取出載玻片。

雙向免疫擴散

13) 取一只培養皿，鋪上一層衛生紙，以水潤溼之；把膠片上洋菜的中央槽挑空，然後將玻片置於培養皿內的衛生紙上。

14) 在中央槽內，加入 0.1 mL 小白鼠抗 trypsin 抗血清，並覆上蓋子；等到抗血清擴散進入洋菜之後，才可攜回；約一日後，可觀察到白色的沉澱線 (拿出載玻片對著日光燈看)。

15) 沉澱線可染色，但要先用 PBS (生理食鹽水) 浸洗 4~5 d，每天換 1~2 次 PBS；然後以 CBR 染色液 (同膠體電泳實驗所用者) 染色 1 h，再以脫色液脫色，每天至少換一次，持續數日，直到背景呈現透明。

1.3 結果與報告

1.3.1 實驗結果

- a) 進行電泳前，中央槽為何不先挖空？若先挖空可能會有那些問題？
- b) 洋菜電泳的條件如何？與聚丙烯醯胺電泳有何不同之處？
- c) 若沒有用 CBR 染色，請準確畫下沈澱線的形狀；若有染色，則可拍照。
- d) 討論沈澱線的形成，與抗原的種類有無關係？

1.3.2 討論問題

- a) 抗體與其抗原之間的親和力，由那些作用力構成？
- b) 抗體在生化分析或純化上，有何功能或用途？
- c) 本實驗技術可應用在什麼方面？

1.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 155, 205, 217

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.174-182

Roitt I, Brostoff J, Male D (2001) Immunology (6th ed) Chap. 4, 27