

综述

传染病诊断中Ig制剂的制备和应用

中国医学科学院流行病学微生物学研究所 李之桂

各种免疫诊断制剂的研究进展,很多取决于免疫球蛋白(简称Ig)的研究成果。在人类系统发生学、遗传学、人类学等领域中Ig同种异型(Allotype)的研究非常有价值。Ig分类结构的研究进展是近30年来免疫学范畴中,同淋巴细胞一起较为深入广泛的两大方面。它对临床医学的帮助很大。如对单克隆系蛋白血症(Monoclonal proteinemias)、免疫缺乏综合症(Immunodeficiency syndromes)、免疫学紊乱(Immunological disorders)等的诊断有极为重要的价值。

Ig研究成果应用于传染病方面的报导很多。多年来某些细菌性、病毒性、钩端螺旋体性传染病的免疫学诊断方法研究亦甚多。其中较为敏感迅速的新技术方法有免疫荧光法、免疫酶测定法及放射免疫测定法等[1, 3, 4, 5, 6, 35]。这些方法对疾病包括对传染病的诊断做出了巨大的贡献。它的核心问题之一是抗原、抗体及抗Ig抗体。后二者均属Ig。由于对Ig生物功能及化学结构的深刻了解,因此,对抗原抗体反应的认识已由过去多从免疫生物学角度去观察过渡到更多地从免疫化学或者结合免疫生物学角度来分析[2, 7]。

诊断试剂中,如荧光素、同位素、酶等是标记在抗原、抗体及抗Ig抗体上。抗体是提纯的,免疫用的抗原-Ig也是纯化的。并且是利用骨髓瘤病人血清中均一抗原结构的单克隆蛋白进行免疫而得到各类Ig特异性抗血清。

Ig由重(H)及轻(L)链构成,各自有可变区(V-region)和恒定区(C-region)。而且H-链还分成类及亚类, L-链还分成型及亚型。还有同种异型的差别。可变区则由不同抗体生成细胞产生的各类Ig之间各有不同的氨基酸排列。更确切地说,每类Ig都有成千上万的、在结构上不同的、既相似又有差别的混合物。因此用单克隆蛋白精制的Ig做为免疫原,所得到的抗血清中应包含有:①抗H-链和抗L-链恒定区抗血清(包括H-链的类、亚类的特异抗体, L-链的型及亚型的特异抗体以及同种异型抗体);②对可变区的抗血清(对个体基因型“Idiotypic”抗原的抗体);③对H-链及L-链结合而产生的对复杂结构的抗血清(包括对Fab片段、绞链区“hinge region”的抗体

等)[8, 9]。

为提高各种Ig及抗Ig血清的特异性及敏感性,近年来国外,作为商品已有各种Ig的亚成分抗血清。如:兔抗人IgG(γ -链特异性)血清,兔抗人IgG(F-ab, Fc, Fd片段特异性)血清,兔抗人IgA(α -链特异性)血清,兔抗人IgM(μ -链特异性)血清,兔抗人Ig(L-链特异性, K “Kappa” 或 λ “Lambda”)血清等等。还有各种抗动物Ig血清,如羊抗兔、兔抗豚鼠、兔抗马、兔抗小白鼠、兔抗山羊、兔抗狗Ig的血清等。有些也是抗链或抗片段的血清。将各种抗血清制成有荧光、过氧化物酶、铁蛋白等标记的结合物做为商品出售。

Ig制剂的制备和应用

利用物理化学特性来提取纯化Ig制剂 为分离血清中含有的各类抗体,一般先以盐析法提取其球蛋白部分,然后利用其分子大小及电荷差别进行组分。为了解持有特定抗体特性的各类抗体,可用沉淀、凝集、血凝等方法测定抗体的活性。如果提取与抗体活性无关的特定类别抗体,则以其免疫异种动物制成的特异抗体与其反应做为手段,边测量边进行组分[10]。

利用凝胶过滤或者密度梯度离心来使 γ -球蛋白分成各组分。可分成大分子量19S-IgM和小分子量IgG,以及中等分子量的IgA。凝胶过滤材料可用适当能力大小的交联葡聚糖凝胶(Sephadex)琼脂糖(Sepharose)及聚丙烯酰胺凝胶(Polyacrylamid gel),还有蔗糖密度梯度离心法[9, 18]。

以电荷差别分离血清或 γ -球蛋白,在适宜条件下做电泳,不同种类蛋白其电泳移动度不同。用淀粉、琼脂、凝胶等为支持物可将各种蛋白质分离开来。因各种Ig均包括种种个体基因型,其电荷有差别,所以同类Ig的电泳带不很集中,都有各自的幅度。

使用离子交换层析柱,如DEAE-纤维素(二乙基氨基乙基纤维素)是阴离子交换剂,CM-纤维素(羧甲基纤维素)是阳离子交换剂。可用做分离各类抗体。

关于抗体分子片段的提取,使用还原剂可将Ig分解成H-链和L-链。如去除还原剂巯基乙醇则两个肽链再度形成-S·S-结合,成为原来IgG和H-链L-链

的二量体—H₂, L₂, HL等。如果是IgA或IgM, 则除L、H链之外还游离出联接L、H链的J链。用木瓜蛋白酶(Papain)加入IgG之中可分成2分子Fab和一分子Fc片段。如将Fab还原则分成Fd片段和L-链。如果用胃蛋白酶(Pepsin)消化IgG, 则产生F(ab')₂片段, 而Fc片段消失。将一个分子F(ab')₂还原, 可得到2分子Fab'[11, 12]。

上述这些片段可使用交联葡聚糖凝胶过滤法进行分离。为检定肽链的大小, 可通过SDS圆盘电泳(SD S-polyacrylamide gels electrophoresis)法。由木瓜蛋白酶分解产生的Fab及Fc片段, 可以再用还原剂及表面活性剂将其分解成肽片段—Fd、L、CH₂、_s。能用这些片段来了解同种异型抗原决定簇存在于Ig分子的那部分。在精制成这些片段之后, 利用酶使之进一步分解, 就可用来研究这些肽链的氨基酸排列。例如用胃蛋白酶作用于Fab'则生成Fv片段。这个片段有吸收个体基因型抗体的能力, 所以能了解到有个体基因型抗原的存在。还有, 因为它还存在着结合于抗原的能力, 证明它是抗体的抗原结合部位[34]。

根据Ig在机体正常或病态下的特点制备Ig制剂

采取骨髓瘤病人血清可提取IgE、IgA、IgM[13]。从一般血清中分离一种Ig较为困难, 但从骨髓瘤病人血清分离该病人特定的Ig则较易。这是因为几乎每个骨髓瘤病人的Ig都属于特定种类的个体基因型。使用离子交换层析柱可得到骨髓瘤蛋白的狭窄范围的组分。用它免疫动物制备的抗血清不仅具有抗该类Ig H-链的特异性, 而且还具有该抗体Fab及F(ab')₂的特异性。所以为获得纯化的Ig并制备抗血清, 可以从人IgA骨髓瘤血清提取抗脂蛋白的IgA抗体。可以从IgG₁骨髓瘤血清中提取抗链球菌溶血素(Streptolysin)的IgG₁抗体[14, 15]。有时可以从溶血性贫血合并单克隆IgM病例中提取凝集价为10°的冷凝集素; 其中单克隆蛋白成分占20毫克/毫升[16]。用这些提取的Ig免疫家兔得到的抗血清, 再用人全血清吸收, 则可得到抗某种Ig的抗体。

人脐带血清中不含有IgM、IgA, 所以制备人血清IgG可用脐带血。先用硫酸胺沉淀γ-球蛋白, 再以DEAE纤维素过柱, 即可得到纯净IgG。

利用产妇初乳中IgA含量高的特点, 从初乳中提取S IgA, 含量可达10~15毫克/毫升。用脐带血清吸收抗人全血清抗体, 并用IgA吸收后可得到抗IgM血清; 用抗脐带血清抗体做亲和层析柱吸收人全血清, 可得到较纯的IgM。

遗传缺损病人如缺IgG、IgA, 用这种病人血清免

疫动物制成抗血清, 用以吸收正常人血清则可制成IgG或IgA。

利用同Ig的亲性和关系制备Ig制剂或检查Ig 为获得具有各类特异性的或具有抗体活性的Ig, 可用亲和层析法分离Ig或特异抗体。使琼脂糖凝胶(如Sephadex 4B)吸附的抗原或半抗原与相应抗体结合, 然后再改用酸性缓冲液, 使抗体解离, 进而精制成特异抗体, 这种抗体再用前述方法分离成较均一的Ig。还可以利用IgG的Fc部分能同葡萄球菌甲蛋白(SPA)相结合的特点分离纯化IgG₁、IgG₂、IgG₄或IgG₃。也可将Fab和Fc分离开[17, 19]。

利用同Ig的亲性和关系, 根据凝聚IgG与补体结合的特性制备加热凝聚IgG用以检查补体[20]。利用凝聚IgG为诊断试剂检查类风湿因子—RF。以人凝聚IgG可查因子I和因子II, 用兔凝聚IgG可查出因子I和因子III。利用抗凝聚IgG抗体检查凝聚IgG或抗原抗体复合物[21]。利用抗-抗体(Anti-Ab)来检查抗原抗体复合物, 这种抗-抗体不能被RF所抑制。它已被证明只同与抗原结合着的抗体IgG的F(ab')₂部分结合[22, 23]。利用Ig与细胞受体间的关系, 以细胞如Raji细胞等检查抗原抗体复合物中的Ig[24, 25]。RF是一种抗免疫复合物的抗体, 是抗凝聚IgG的Fc部分一种IgM抗体, 它也可用于检查免疫复合物(IC)[26, 27]。

使用Ig制剂或检查Ig时应注意的问题 按应用的目的可研制各种需要的Ig诊断试剂。

1. 测定人IgG全量, 则应以多数个体的血清合并来精制IgG, 以其重链或其Fc片段免疫动物制备抗血清, 再以人IgG的L-链及Fab片段来吸收。用这样吸收过的抗Fc特异抗血清来检查人血清中IgG全量, 能得到正确的测定结果。它可以排除抗Fab抗体, 抗L-链抗体非特异性干扰。

2. 如测定IgD、IgE及IgA全量则应制备抗IgD、IgE及IgA血清。但由于血清中IgD、IgE及IgA含量较少, 不易得到它的Fc片段, 所以只好用各类Ig骨髓瘤病人血清单克隆蛋白来精制, 再以提纯IgD、IgE及IgA全分子或其Fc片段进行免疫, 再加以适当吸收就制成了抗各类Ig的Fc的血清。但应注意, 为得到标准曲线, 做为竞争抑制剂使用的Ig标准品则必须使用不同个体单克隆蛋白得到的同类分子而结构不同的Ig。用这些Ig制备抗Fc特异性免疫血清。

3. 检查各类Ig, 要用抗H-链特异性血清(抗γ、抗μ、抗α、抗δ、抗ε等)。如打算弄清布氏菌病是否新患或近期感染, 则应检查血中特异性IgM抗体的

含量。风疹病人也需要查IgM抗体。用各类抗Fc血清可以用于检查各类抗体的存在,并可排除Fab部分等的非特异性干扰。

4.体外实验中,对同一克隆细胞所产生Ig进行定量时,及用异类Ig对带有相同可变区的不同Ig进行定量之时,反而应该使用抗个体基因型抗体,即由骨髓瘤单克隆蛋白精制出结构均一分子的Ig做为免疫原来免疫动物制成抗血清。

5.细胞内Ig(H₂L₂)及其中间体Ig(H₂L、H₂、HL、L₂等)的定量则不拘用那种标准品,其结果也不一致,所以只能以某一种为标准求其相对量。

6.由特定克隆细胞产生的单一克隆Ig,其成分均一,电泳中可出现锐利的蛋白峰。迄今已证实有IgG、IgA、IgM、IgD、IgE、Bence Jones(本周氏)蛋白、重链、半分子IgG等8种临床上称之为骨髓瘤的疾病[29, 30]。单克隆蛋白具有各自特有的抗原性,即其个体基因型特异性存在于抗原结合部位,即V₁、V_h的超可变区。用它免疫同种或异种动物均能制成抗血清[28]。现已证明人及动物的许多单克隆Ig均属于它所对应抗原的抗体。如沙门氏菌,大肠杆菌等的抗体。这是由于肠内细菌变性或老化的机体成分成为抗原,致使机体免疫细胞敏化而发生肿瘤[15]。

7.可以理解,使用某种单克隆Ig免疫动物制备抗血清,并未曾用Fc吸收,故仅能对相应Ig中Fc部位呈免疫反应。因它具有特有的个体基因型,对该种单克隆Ig以外的Ig的F(ab')₂部位则不发生反应。用这种单克隆Ig的抗血清做为第二抗体,可排除非特异干扰。

8.为了使诊断肝癌的抗甲胎蛋白(α-foeto-protein-AFP)致敏的血球敏感度更高,特异性更强,可以将甲胎蛋白抗体IgG降解成F(ab')₂,用以致敏血球。它可以排除Fc带来的干扰。

9.用ELISA法查AFP时,为排除待检血清中类风湿因子(RF)带来的干扰,将抗AFP抗体IgG分解成F(ab')₂,包被聚苯乙烯,做为诊断用品。以避免由于抗体IgG与聚苯乙烯连接而使Fc部分变构,并进而与被检材料中可能存在的RF相结合[31]。

ELISA系统中存在的问题之一,就是RF引起的干扰。一般认为RF是与各种被修饰的IgG相反应的一种IgM抗体,在ELISA中以夹心法查AFP抗原时发现RF的干扰。用胃蛋白酶处理之后使用抗体IgG的F(ab')₂部分做为抗体,则排除了RF的干扰。实际工作中,有人就是使用人γ-球蛋白复盖聚苯乙烯板孔加被检血清,再加抗μ-链特异性血清来检查RF[30]。

10.使用放射免疫测定法(RIA)查风疹血清中IgM抗体时也发现有RF的干扰,通过用凝聚人γ-球蛋白将RF吸收去掉的办法可以克服。而且吸收操作不影响真实的风疹IgM抗体效价,从而取得正确的结果[32]。RF在人群中存在数量不多,但既或是“正常”人也有少数有RF。在一些常见病人中,如慢性支气管炎,某些肝病等均有一定数量的阳性率[33]。只有排除RF干扰才能对所研究结果做出科学的分析。因为在传染病诊断中利用血凝、ELISA及放射免疫法等查抗体或抗原是常见的,所以是值得重视的问题。

上述一些问题,有些虽未以传染病为例,也未指出检查某种疾病。实际上在一些传染病诊断中同样存在。

结 语

本文简介了传染病诊断与Ig研究的关系,Ig研究的深入开展促进了传染病等疾病诊断的准确性。谈了Ig制剂提取精制的方法途径及利用同Ig的关系检查Ig。还讨论了使用Ig制剂及检查Ig时应注意的一些问题等。了解Ig的类型,组成的链、片段以及氨基酸组成结构等,尤其对Ig特异性与结构之间关系的了解,对制备更好的传染病诊断用品是非常有利的。

(本文承刘秉阳教授审阅,特此致谢)

参 考 文 献

- 1.张金桐等译:免疫诊断方法,136~176页,新疆流行病学研究所,1977。
- 2.水谷昭夫:临床病理,临增28号,63,1976。
- 3.濑户淑子他:Solid phase radioimmunoassay Immuno Advance, 3:12-16, 1973。
- 4.八仓隆保:RAST(Radio allergosorbent test) Immuno Advance, 5:197-208, 1975。
- 5.向岛达:临床トウイルス,4:38, 1977。
- 6.Malvano R: Immunoenzymatic Assay Techniques, P 184-196 Martinus nijhoff publishess, The Hague Boston London, 1980。
- 7.Weir DM: Handbook experimental Immunology Vol 1:13, 14, 15, Third edition Reprinted Blackwell scientific publications, Oxford London edinburgh melbourne, 1979。
- 8.渡边信一郎:综合临床,22(8):1580, 1973。
- 9.王世中:免疫球蛋白,内部资料,1974。
- 10.进藤宙二:免疫学アレルギー学实验法,143~209,文光堂,东京,1971。
- 11.Onone K et al: J Immunol, 98:303, 1967。
- 12.Onone K et al: J Immunol, 100:238, 1968。

13. Putnam FW et al: J Immunol Chem, 242: 2435, 1967.

14. Seligman M et al: Nature (London), 220: 711, 1968.

15. 坂井俊之助: 最新医学, 32(2): 551, 1977.

16. Haimouich J et al: Proc Natl Acad Sci 67: 1656, 1970.

17. 白井美津子: 临床检查, 7: 703, 1978.

18. Criepp LH et al: Allergy and Clinical Immunology, p 29-37, Grune & Stratton, New York, 1976.

19. Ceding JW: J Immunol Methods, 20: 241, 1978.

20. 稻井真弥: 最新医学, 32(3): 417, 1977.

21. 横张龙一: 最新医学, 33(7): 1336, 1978.

22. Kano K et al: Ted Proc Fed Am Soc exp, 36: 1213, 1977.

23. Kano K et al: Clin Immunol & Immunopath, 9(4): 425, 1978.

24. Theofilopoulos AN et al: J exp Med, 140: 877, 1974.

25. Theofilopoulos AN et al: J Clin Invest, 57: 169, 1979.

26. 畔柳武雄他: 免疫病(最近の进步)新免疫学丛书(8) 182~194, 医学书院, 东京, 1979.

27. Williams CA et al: Methods in Immunology and Immunochemistry, IV 117-121, Academic press New York, 1977.

28. 河合忠: 综合临床, 22(8): 1629, 1973.

29. 管井进: 最新医学, 32(3): 543, 1977.

30. Vejtorp M et al: Scand J Rheumatology, 8: 65, 1979.

31. Malvano R: Immunoenzymatic Assay Techniques, 207-215, Martinus nijhoff publishess, The Hague Boston London, 1980.

32. Mellrman OH et al: J Clin Path, 31: 483, 1978.

33. 中国医学科学院流研所第三室: 类风湿因子及其抗原——免疫复合物与慢性气管炎的可能关系, 内部资料, 1977.

34. 川上正也: 免疫应答(细胞カラ分子レベルへ) 34-69, 讲谈社, 东京, 1978.

35. Fritz HB et al: Clin Immunobiology, Vol.3, 1-19, Academic press, New York, 1976.

昭乌达盟人群沙门氏菌菌型分布

内蒙古昭乌达盟卫生防疫站 白玉龙 王国珍 王亚辉 付佩兰

为查明昭盟地区人群沙门氏菌属的菌型分布情况, 摸清其流行病学规律, 本站和各旗(县)市站, 于1975~80年3月, 进行了此项调查工作, 现将几年来检出的菌型分述如下:

菌株来源: 是从伤寒、副伤寒爆发流行地区的病人, 密切接触者, 不明原因的腹泻病人, 临床发热病例, 饮食、服务行业从业人员计16,442人的血液, 粪便标本中分离共得568株。

血清: 沙门氏菌属因子血清, 系成都生物制品研究所产品(53、142、144种)。

检验方法: 临床发热病例采血5毫升, 接种于胆汁葡萄糖肉汤、粪便标本接种于亚硝酸盐增菌液增菌培养, 再以SS和伊红美蓝培养基分离培养后接种于三糖铁琼脂斜面, 初步生化反应可疑者再进行血清学鉴定和系统生化反应(方法和判定标准, 均按1977年12月全国沙门氏菌属鉴定会议规定的程序进行)。

对无动力的菌株先用“U”形管半固体琼脂传代法, 经37℃培养24~48小时后, 不能游走另一端时, 再用半固体连续传代15~20次, 仍不出现动力者确定为“O”型菌。

菌型鉴定由全国沙门氏菌属调查第一协作组和辽

宁省沙门氏菌菌型鉴定组复核。

结果: 自1975~80年3月于我盟人群中共检出沙门氏菌568株。

分属于21个群, 34个型。属于A~E各O群的有17个型, 537株占94.6%, A~F各O群以外的有17个型, 31株占5.4%, 昭乌达盟人群沙门氏菌主要分布于A~E群。

其中有国内尚未见报导的12个群和22个菌型为C₁: 巴博科姆沙门氏菌(S.baiboukoum), C₃: 沙门氏菌D₁₁: 沙门氏菌亚属II(Salmonella II), D₂: 奥卡沙门氏菌(S.oka kam), E₄: 沙门氏菌, G₂: 大西洋城沙门氏菌(S.atlanea), 布拉克内尔沙门氏菌(S.bracknell), I: 瓦邦沙门氏菌(S.wa), 沙门氏菌, L: 沙门氏菌, M: 塞雷斯沙门氏菌(S.ceras), 沙门氏菌, N: 沙门氏菌, X: 沙门氏菌亚属III(Salmonella III), Y: 悉尼沙门氏菌(S.sydney), 57: 沙门氏菌, 58: 沙门氏菌, 60: 沙门氏菌III(Salmonella III), 61: 沙门氏菌III(Salmonella III), 62: 沙门氏菌III(Salmonella III), 沙门氏菌, 66: 沙门氏菌。