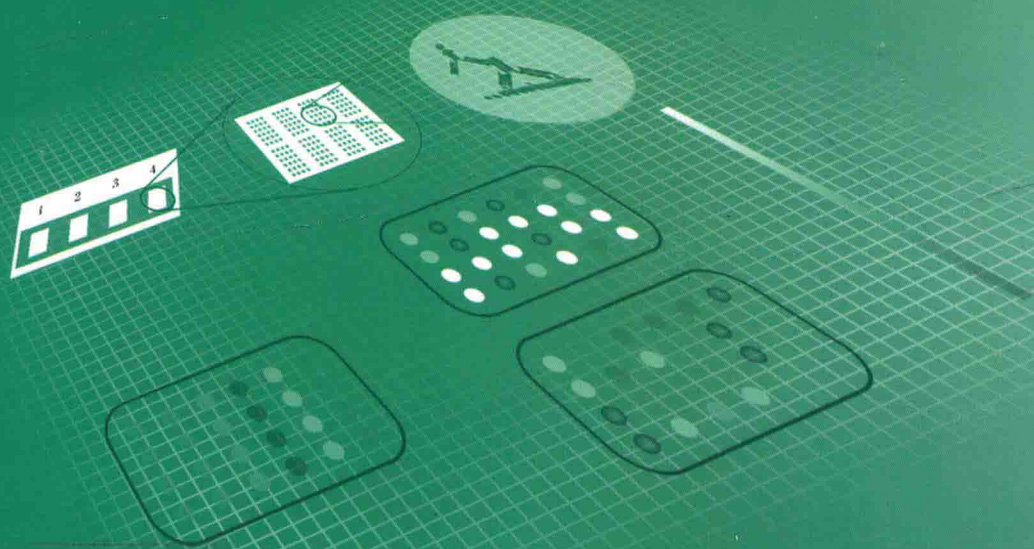


 全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

临床免疫学检验 实验指导

（第3版）

主编 曾常茜



中国医药科技出版社

· 全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材 ·

临床免疫学检验实验指导

(第3版)

主 审 吕世静

主 编 曾常茜

副主编 李 妍 蒋红梅 李 丽 吕小华

编 者 (以姓氏笔画为序)

方 芳 (吉林医药学院)

邓念华 (成都医学院)

吕小华 (广东医学院)

朱浩稳 (湖南中医药大学)

伊正君 (潍坊医学院)

杜晶春 (广州医科大学)

李 丽 (东南大学附属中大医院)

李 妍 (吉林医药学院)

李 波 (佛山科学技术学院)

李 章 (武警后勤学院临床医学系)

李广华 (广东省人民医院)

李会强 (天津医科大学)

李海侠 (南方医科大学)

杨 旭 (昆明医科大学)

谷俊莹 (贵州医科大学)

汪光蓉 (川北医学院)

陈志坚 (广西医科大学)

赵彩红 (大连大学医学院)

蒋红梅 (贵州医科大学)

曾常茜 (大连大学医学院)

燕学强 (长治医学院)

中国医药科技出版社

内 容 提 要

全书包括抗原和抗体制备技术、非标记免疫技术、标记免疫技术、免疫细胞的分离与功能测定、临床免疫学检验五个单元,共计43个实验项目。各实验项目附有思考题,以帮助学生更好地学习、理解和掌握临床免疫学实验技术的原理、技术要点和临床应用,提高学习效果。

本教材除适用于医学检验技术、临床医学类专业本科及专科的临床免疫学检验、医学免疫学实验教学以外,也是教师、医学类研究生、科研人员及检验科相关人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

临床免疫学检验实验指导/曾常茜主编. —3版. —北京:中国医药科技出版社,2015.7
全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材
ISBN 978-7-5067-7593-9

I. ①临… II. ①曾… III. ①免疫学-医学检验-实验-医学院校-教学参考资料
IV. ①R446.6-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第174247号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 889×1194mm^{1/16}

印张 7^{1/2}

字数 174千字

初版 2004年9月第1版

版次 2015年8月第3版

印次 2015年8月第1次印刷

印刷 北京九天众诚印刷有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-7593-9

定价 18.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

建设委员会

主任委员 丛玉隆（中国人民解放军总医院）

副主任委员（以汉语拼音为序）

樊绮诗（上海交通大学医学院）

胡丽华（华中科技大学同济医学院）

刘新光（广东医学院）

吕建新（温州医学院）

王 前（南方医科大学）

吴忠道（中山大学中山医学院）

姚 智（天津医科大学）

尹一兵（重庆医科大学）

委 员（以汉语拼音为序）

陈育民（河北工程大学医学院）

洪秀华（上海交通大学医学院）

胡建达（福建医科大学）

胡翊群（上海交通大学医学院）

李咏梅（北华大学医学部）

刘 辉（大连医科大学）

刘成玉（青岛大学医学院）

吕世静（广东医学院）

王 辉（新乡医学院）

徐克前（中南大学湘雅医学院）

姚群峰（湖北中医药大学）

张进顺（河北北方学院）

吴俊英（蚌埠医学院）

郑铁生（江苏大学医学院）

秘 书 长 匡罗均（中国医药科技出版社）

办 公 室 罗万杰（中国医药科技出版社）

尚亭华（中国医药科技出版社）

全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材

出版说明

全国高等医药院校医学检验专业规划教材,于20世纪90年代开始启动建设。是在教育部、原国家食品药品监督管理局的领导和指导下,在广泛调研和充分论证基础上,由中国医药科技出版社组织牵头江苏大学、温州医科大学、中山大学、华中科技大学同济医学院、中南大学湘雅医学院、广东医学院、上海交通大学医学院、青岛大学医学院、广西医科大学、南方医科大学、301医院等全国20多所医药院校和部分医疗单位的领导和专家成立教材建设委员会共同规划下,编写出版的一套供全国医学检验专业教学使用的本科规划教材。

本套教材坚持“紧扣医学检验专业本科教育培养目标,以临床实际需求为指导,强调培养目标与用人需求相结合”的原则,10余年来历经二轮编写修订,逐渐形成了一套行业特色鲜明、课程门类齐全、学科系统优化、内容衔接合理的高质量精品教材,深受广大师生的欢迎,为医学检验专业本科教育做出了积极贡献。

本套教材的第三轮修订,是在我国高等教育教学改革的新形势和医学检验专业更名为医学检验技术、学制由5年缩短至4年、学位授予由医学学士变为理学学士的新背景下,为更好地适应新要求,服务于各院校教学改革和新时期培养医学检验专门人才需求,在2010年出版的第二轮规划教材的基础上,由中国医药科技出版社于2014年组织全国40余所本科院校300余名教学经验丰富的专家教师不辞辛劳、精心编撰而成。

本轮教材含理论课程教材10门、实验课教材8门,供全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业教学使用。具有以下特点:

1. 适应学制的转变 第三轮教材修订符合四年制医学检验技术专业教学的学制要求,为目前的教学提供更好的支撑。

2. 坚持“培养目标”与“用人需求”相结合 紧扣医学检验技术专业本科教育培养目标,以医学检验技术专业教育纲要为基础,以国家医学检验技术专业资格准入为指导,将先进的理论与行业实践结合起来,实现教育培养和临床实际需求相结合,做到教师好“教”、学生好“学”、学了好“用”,使学生能够成为临床工作需要的人才。

3. 充实完善内容,打造教材精品 专家们在上一轮教材基础上进一步优化、精炼和充实内容。坚持“三基、五性、三特定”,注重整套教材的系统科学性、学科的衔接性。进

一步精简教材字数，突出重点，强调理论与实际需求相结合，进一步提高教材质量。

编写出版本套高质量的全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材，得到了相关专家的精心指导，以及全国各有关院校领导和编者的大力支持，在此一并表示衷心感谢。希望本套教材的出版，能受到全国本科医学检验技术（医学检验）专业广大师生的欢迎，对促进我国医学检验技术（医学检验）专业教育教学改革和人才培养做出积极贡献。希望广大师生在教学中积极使用本套教材，并提出宝贵意见，以便修订完善，共同打造精品教材。

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材建设委员会

中国医药科技出版社

2015年7月

前言

为贯彻落实教育部关于“教材建设精品化，教材要适应多样化教学需要”的精神，来自全国十九所高等医学院校，从事教学、临床与科研第一线的教授、专家一致认为作为《临床免疫学检验》配套实验教材，编写的原则应与规划理论教材保持原则上的一致性，反映临床免疫学新技术和发展的趋势。全书系统、规范、科学，体现了“精、新、实”的特点，并能充分体现现代教育理念，通过实验培养学生的实践能力和创新能力。

全书实验内容的编排与理论衔接一致，按技术特点分为抗原和抗体制备技术、非标记免疫技术、标记免疫技术、免疫细胞的分离与功能测定、临床免疫学检验五个单元，共计 43 个实验项目。实验项目较全面，不同专业、不同层次的临床免疫学实验教学可根据教学需求选择相关实验内容。各院校也可结合自身条件，组合成不同层次的综合性实验和设计性实验。实验方法尽量详尽，并设常用实验动物的注射和采血方法、免疫学实验常用试剂配制等附录，以便于学生和教师使用。每个实验项目附有思考题，以帮助学生更好地学习、理解和掌握免疫学实验技术的原理、技术要点和临床应用，提高学习效果。

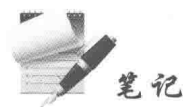
与上版教材相比，无论免疫技术，还是检测项目均有创新，本书增编了酶联免疫斑点试验、B 细胞分泌抗体能力检测、多种细胞因子联合检测、检出限评价实验、符合率评价实验、血清总 IgE 含量测定、食物过敏血清特异性 IgE 的检测、外周血特异性过敏原嗜碱粒细胞激活试验、抗中性粒细胞胞浆抗体的检测、抗环瓜氨酸肽抗体的检测、血清游离轻链的检测、HIV 抗体初筛检测、可溶性白细胞介素 -2 受体测定等新的实验，体现了本书的先进性，这也是本书的特色之处。

本书除适用于医学检验技术、临床医学类专业本科及专科的临床免疫学、医学免疫学实验教学以外，也是教师、医学类研究生、科研人员及检验科相关人员的参考书。

作者在编写本教材过程中得到各编者单位领导和同行们的大力支持，本版教材是在上版作者的基础上修订而来，因此仍包含了上版作者的辛勤劳动。本书全体编者向各位领导、同志表示衷心的感谢！

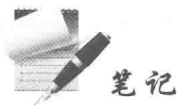
免疫学理论和免疫学技术的发展日新月异，医学教育教学改革正在逐步深入，而编者的认识水平所限，书中难免会有不妥或不足。恳请广大师生和同仁在使用过程中对本书提出宝贵的意见和建议，以便不断完善和提高。

编者
2015 年 4 月



目录

第一单元 抗原和抗体制备技术	(1)
实验一 多克隆抗体的制备	(1)
实验二 多克隆抗体的鉴定	(2)
实验三 IgG 类多克隆抗体的纯化	(4)
实验四 单克隆抗体的制备	(6)
第二单元 非标记免疫技术	(10)
实验五 直接凝集试验	(10)
实验六 间接凝集试验	(13)
实验七 抗人球蛋白试验	(14)
实验八 双向免疫扩散试验	(18)
实验九 免疫电泳	(20)
实验十 免疫固定电泳	(21)
实验十一 免疫比浊测定	(24)
实验十二 血清总补体溶血活性测定	(25)
第三单元 标记免疫技术	(28)
实验十三 荧光标记抗体的制备	(28)
实验十四 荧光抗体技术	(30)
实验十五 酶联免疫吸附试验	(33)
实验十六 免疫印迹试验	(36)
实验十七 酶联免疫斑点试验	(38)
实验十八 酶免疫组织化学技术	(40)
实验十九 荧光偏振免疫分析	(42)
实验二十 直接化学发光免疫分析	(44)
实验二十一 胶体金免疫层析试验	(46)
实验二十二 检出限评价实验	(48)
实验二十三 符合率评价实验	(50)
第四单元 免疫细胞的分离与功能测定	(52)
实验二十四 外周血单个核细胞的分离	(52)
实验二十五 T 细胞及其亚群的分离	(53)
实验二十六 T 细胞的分类计数	(56)
实验二十七 T 细胞增殖试验	(59)
实验二十八 B 细胞分泌抗体能力检测	(62)



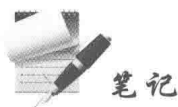
实验二十九 NK 细胞功能测定	(64)
实验三十 吞噬细胞功能检测	(65)
实验三十一 多种细胞因子联合检测	(67)

第五单元 临床免疫学检验 (69)

实验三十二 血清总 IgE 含量测定	(69)
实验三十三 食物过敏血清特异性 IgE 的检测	(71)
实验三十四 外周血特异性过敏原嗜碱粒细胞激活试验	(72)
实验三十五 循环免疫复合物的检测	(75)
实验三十六 抗中性粒细胞胞浆抗体的检测	(76)
实验三十七 抗环瓜氨酸肽抗体的检测	(78)
实验三十八 血清游离轻链的检测	(79)
实验三十九 HIV 抗体初筛检测	(80)
实验四十 血清癌胚抗原的检测	(82)
实验四十一 HLA 的检测	(84)
实验四十二 群体反应性抗体的检测	(86)
实验四十三 可溶性白细胞介素 -2 受体测定	(88)

附录 (90)

附录 I 免疫学实验常用试剂的配制	(90)
附录 II 常用实验动物注射和采血方法	(100)
附录 III 常用玻璃器皿的洗涤方法	(103)
附录 IV 微量加样器的使用与校准	(105)
附录 V 离心速度、相对离心力和离心时间的计算	(107)



第一单元 抗原和抗体制备技术

临床免疫学检验主要以抗原抗体反应为基础，抗原和抗体是临床免疫学检验中最主要的试剂，也是生产各种商品化免疫诊断试剂重要的上游生物原料，其质量直接关系到检测方法的特异性和敏感性。本单元主要介绍多克隆抗体和单克隆抗体的制备、纯化和鉴定。

实验一 多克隆抗体的制备

多克隆抗体是动物（如家兔）在抗原刺激下合成并分泌的一组能与抗原特异性结合的免疫球蛋白，又称抗血清。本实验以制备溶血素为例介绍多克隆抗体的制备。

【实验原理】

将绵羊红细胞（sheep red blood cell, SRBC）按照一定的程序免疫家兔，绵羊红细胞带有多个不同表位，可刺激家兔体内携带相应受体 B 细胞克隆，而产生针对不同抗原表位的特异性抗体，收集并分离血清即可获得相应的多克隆抗体，因其与 SRBC 结合后可激活补体，导致 SRBC 破裂溶解，因此又称为溶血素。

【主要试剂与器材】

1. 体重 3kg 左右健康雄性家兔。
2. 市售肝素抗凝绵羊全血。
3. 无菌生理盐水（或 PBS）、2% 碘酒、75% 乙醇。
4. 0.10g/L 硫酸镁溶液 0.01g 硫酸镁加入生理盐水 100ml。
5. 台式离心机、5ml 一次性注射器、一次性移液管、15ml 无菌离心管。

【操作方法】

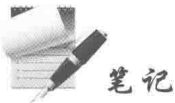
1. 取 2~3ml 无菌肝素抗凝绵羊全血于离心管中，加等量生理盐水，2000 转/分钟离心 5 分钟，吸去上层血浆和白细胞层。
2. 用 2~3ml 生理盐水重悬 SRBC，2000 转/分钟离心 5 分钟后吸弃上清液，重复洗涤一次。
3. 根据红细胞比容，用 0.10g/L 硫酸镁溶液稀释成 10% SRBC 悬液。
4. 将家兔做好标记，从耳缘静脉采血 2~3ml，分离并收集血清，储存于 -20℃ 备用（作为抗体鉴定阴性对照）。
5. 采取耳缘静脉免疫家兔，具体免疫剂量和免疫程序见表 1-1。

表 1-1 抗绵羊红细胞多克隆抗体制备免疫程序

免疫时间（天）	1	7	14	21	28
10% SRBC（ml）	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

6. 末次免疫后第 7~10 天，从耳缘静脉采血，分离血清，用玻片法做红细胞凝集试验检测效价。若效价不理想，可再次加强免疫，再试血，直至达到要求。

7. 将家兔仰面，固定四肢于动物架上（或由人抓住四肢固定），剪去左胸部兔毛，用碘酒、酒精消毒其暴露出来的皮肤，在胸骨左缘外 3mm 左右第 3~4 肋间，选心脏搏动最明显处



笔记

进针，将抽取到的家兔血液注入无菌烧瓶中，室温放置 1 小时，凝固后再放置于 4℃ 冰箱过夜，待血清充分析出后吸取血清，3000 转/分钟离心 15 分钟，收集上清液，经 56℃ 30 分钟灭活补体，4℃ 保存备用。

【结果判定】

获得的抗血清应无溶血、无污染。

【注意事项】

1. 实验动物的免疫反应性有个体差异，因此免疫时应选用两只或两只以上的动物，免疫过程中应注意无菌操作，以防动物发生感染。

2. 用颗粒性抗原制备抗体时，多选用静脉注射途径。制定免疫方案时应以注射次数少、免疫时间短、获得的抗体效价高为原则，具体的免疫次数、间隔时间和试血时间可根据具体情况进行调整。

3. 收集的免疫血清，4℃ 条件下一般可保存一个月左右，有条件的实验室可适量分装后 -20℃ 或 -70℃ 长期保存，但需避免因反复冻融而导致的抗体效价降低。

【方法评价】

由于动物个体间差异较大，同一批次或不同批次制备的抗血清质量均有差异，尽管多克隆抗体的均一性较差，但由于其能结合抗原多个不同表位，故亲和力高，尤其适用于沉淀反应及免疫印迹试验，而且其制备方法相对简单，周期较短，因此在临床和科研中仍具有广泛的应用价值。



思考题

1. 在制备绵羊红细胞过程中为什么要洗涤并吸去红细胞表面的白细胞层？
2. 制备的溶血素血清为什么要 56℃ 灭活 30 分钟？
3. 制备抗血清时如何选择免疫动物和设计免疫方案？

(杜晶春)

实验二 多克隆抗体的鉴定

多克隆抗体的鉴定主要包括抗体效价的鉴定、抗体特异性的鉴定、抗体纯度的鉴定和抗体亲和力的鉴定。本实验主要以溶血素为例介绍抗体的特异性和效价的鉴定。

【实验原理】

根据凝集反应的原理，用玻片法直接观察待检溶血素能否与 SRBC 形成肉眼可见的凝集物，可以对待检溶血素的特异性做出初步判断。如果需要对其效价做出更准确的判断，则可以借助补体参与的溶血试验。SRBC 作为颗粒性抗原在试管中与其相应溶血素结合后，在补体作用下，将导致 SRBC 裂解，发生溶血反应。当反应体系中的 SRBC 和补体量一定时，其溶血程度与溶血素的效价呈正比，由此可判定溶血素的效价。

【主要试剂与器材】

1. 溶血素。
2. 1% SRBC 悬液、生理盐水。
3. 补体 豚鼠新鲜血清。



4. 载玻片、试管、吸管、试管架、恒温水浴箱。

【操作方法】

1. 取干燥洁净载玻片一张，在两端分别加生理盐水和免疫血清各一滴，然后各加入一滴 SRBC 悬液，轻摇玻片，经 1~2 分钟，若生理盐水侧 SRBC 仍均匀浑浊，而在免疫血清侧 SRBC 凝聚成团，出现小颗粒，即为凝集试验阳性，说明免疫血清中含有抗 SRBC 抗体。

2. 在玻片凝集试验阳性基础上，用补体溶血试验测定免疫血清的效价。

(1) 取 10 支小试管，编好号后置于试管架上，按第 1 号管 0.5ml，第 2 号管 0.75ml，第 3 号管 1ml，第 4~9 号管分别 0.25ml 的标准依次加入生理盐水。

(2) 用生理盐水先将溶血素稀释 100 倍，再依次向第 1、2、3 号管分别加入稀释了 100 倍的溶血素 0.25ml，即得到 1:300、1:400、1:500 稀释的溶血素，然后再按 1→4→7；2→5→8；3→6→9 的组合方式进行倍比稀释，使第 4 至 9 号管中溶血素的稀释度依次为 1:600、1:800、1:1000、1:1200、1:1600 和 1:2000。

(3) 将新鲜豚鼠血清用生理盐水按 1:30 比例稀释备用。

(4) 另外再取 10 支试管并编号，按表 2-1 顺序依次加入各成分，第 10 号管为绵羊红细胞对照管。

表 2-1 溶血素效价测定方案

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
生理盐水 (ml)				1~9 号管加入 0.25, 10 号管加入 0.5						
1% SRBC (ml)				每管加入 0.25						
溶血素 (0.25ml)	1:300	1:400	1:500	1:600	1:800	1:1000	1:1200	1:1600	1:2000	0
充分混匀，静置 15 分钟										
1:30 稀释补体 (ml)				每管加入 0.25						
充分混匀，37℃ 水浴箱，静置 30 分钟										
结果观察										

【结果判定】

观察溶血现象，以呈现完全溶血的血清最高稀释度为溶血素效价。

【注意事项】

1. 本实验所用补体应采用豚鼠新鲜血清。
2. 待检溶血素应事先进行补体灭活处理。
3. 补体性质极不稳定，易受实验器材洁净度，反应时间、温度、电解质及 pH 等因素影响，所以需对实验条件和各个环节加以严格控制。

【方法评价】

溶血素的活性鉴定可以采用直接凝集法及补体参与的溶血试验方法，前者操作简便，但敏感性较低，后者具有较高的特异性和敏感性，可用于定量测定，但是操作相对繁琐，同时由于补体活性不稳定易影响实验结果。



如何利用绵羊红细胞与溶血素组成的指示系统，通过补体结合试验检测未知抗体或抗原？

(杜晶春)



实验三 IgG 类多克隆抗体的纯化

免疫血清由于成分复杂，在某些情况下往往不能直接作为检测试剂使用，对其进一步纯化是开展标记免疫测定的必要途径，抗体的纯化方法主要有盐析法、凝胶过滤法、离子交换层析法、亲和层析法等。本实验介绍盐析法和亲和层析法分离纯化兔抗绵羊红细胞 IgG。

一、盐析法

【实验原理】

加入蛋白质溶液中的高浓度中性盐可与蛋白质争夺水分子，使蛋白质分子表面的电荷被大量中和，周围的水化膜减弱甚至消失，导致蛋白质的溶解度降低并从溶液中沉淀析出。不同蛋白质在不同浓度的盐溶液中具有不同的相对溶解度，血清中免疫球蛋白主要为 γ 球蛋白，可先用 50% 饱和硫酸铵将 γ 球蛋白沉淀出来，再用 33% 饱和硫酸铵将大部分 IgG 沉淀出来。

【主要试剂与器材】

1. 兔抗绵羊红细胞免疫血清、灭菌生理盐水、0.02 mol/L PBS 缓冲液 (pH7.4)。
2. 饱和硫酸铵 取硫酸铵 400g，加入蒸馏水 500ml，加热 50 ~ 60℃，充分搅拌 10 分钟，趁热过滤，冷却后以浓氨水调 pH 至 7.2。
3. 纳氏试剂 HgI 11.5g，KI 8g，加蒸馏水至 50 ml，搅拌溶解后，加入 20% NaOH 50 ml。
4. 紫外分光光度计、磁力搅拌器、离心机、吸管、滴管、试管、透析袋等。

【操作方法】

1. 取免疫血清 10ml 加入等体积生理盐水混匀，置磁力搅拌器上，逐滴加入饱和硫酸铵 20ml，至 50% 饱和度。室温静置 30 分钟或置 4℃ 冰箱过夜。
2. 4℃ 10000 转/分钟离心 15 分钟，弃去上清液 (含白蛋白)，沉淀物 (主要是 γ 球蛋白) 溶于 20ml 生理盐水中。
3. 于上述提取物中，搅拌下逐滴加入饱和硫酸铵 10ml，至 33% 饱和度，静置 30 分钟后 4℃ 10000 转/分钟离心 15 分钟，弃去上清液。
4. 将沉淀溶于 20ml 生理盐水中，并重复步骤 3。
5. 将沉淀物用 2 ~ 3ml PBS 溶解，转入透析袋中，置入 0.02mol/L PBS 缓冲液中 4℃ 条件下透析 12 小时，透析过程应重复进行 2 ~ 3 次，直至纳氏试剂测得透析外液无黄色，既无 NH_4^+ 为止。
6. 蛋白含量测定 取少量透析袋内样品做适当稀释后，用紫外分光光度计测定蛋白含量，其余分装后置 -20℃ 冰箱保存备用。

$$\text{蛋白含量 (mg/ml)} = (1.45 \times A_{280\text{nm}} - 0.74 \times A_{260\text{nm}}) \times \text{样品稀释倍数}$$

【结果判定】

可将抗绵羊红细胞免疫血清中大部分 IgG 类抗体粗提出来，对其活性和效价的鉴定可参考本单元实验二，对其纯度的鉴定则可考虑用蛋白质电泳法检测。

【注意事项】

1. 盐析时若溶液内蛋白质浓度过高，可引起非目的蛋白质的共沉淀效应，故通常将免疫血清用生理盐水倍比稀释后再进行盐析纯化。
2. 加饱和硫酸铵溶液时，一定要边搅拌边逐滴加入，以减少其他杂蛋白质的共沉。
3. 盐析后一般需至少放置 30 分钟，待沉淀完全后再进行离心，过早离心将会影响抗体的

纯化效率。

4. 硫酸铵是盐析法中最常使用的中性盐，其溶解度高、受温度影响小、不易引起蛋白质变性，但硫酸铵中含有氮，会干扰抗体浓度测定，需透析去除。

【方法评价】

盐析法主要用于对免疫球蛋白进行初步提取，硫酸铵盐析法操作简单，但是整个流程相对耗时；获得的免疫球蛋白为 IgG 类粗制品，可用于一般实验，如 ELISA 和抗体封闭试验，但若要进行化学标记如荧光素和生物素标记，则还需进一步采用凝胶过滤、离子交换层析或亲和层析等方法纯化。



思考题

1. 盐析法提取免疫球蛋白的原理是什么？
2. 影响盐析法纯化抗体效率的主要因素有哪些？

二、亲和层析法

【实验原理】

葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 具有与多种哺乳动物 IgG 分子 Fc 段结合的能力。当抗绵羊红细胞免疫血清或其粗提物通过 SPA - Sepharose 亲和层析柱时，IgG 可通过 Fc 段与柱上的 SPA 结合，其他蛋白成分不能与之结合而被直接洗脱。再通过改变洗脱液的离子强度及 pH，使已结合到层析柱上的 IgG 与 SPA 发生解离而洗脱下来，即可达到纯化的目的。

【主要试剂与器材】

1. 兔抗绵羊红细胞免疫血清、灭菌生理盐水。
2. 水化的 SPA - Sepharose CL - 4B、0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 8.0、pH 7.4)、0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0、pH 4.0、pH 3.0)、3mol/L 硫氰酸钾溶液 (过滤后使用)。
3. 1.5 × 10cm 层析柱、紫外分光光度计/紫外分光光度检测仪。

【操作方法】

1. 准备样品 抗血清按 10000 转/分钟离心 10 分钟后，上清再通过 0.22μm 滤膜过滤除去杂质，滤液用 10 倍体积的 PBS (pH 8.0) 稀释。

2. 装柱 向柱内加入 1/2 体积的缓冲液，然后将处理好的凝胶悬液缓缓地匀速加到柱内，以 pH 8.0 的 PBS 缓冲液平衡，层析柱出水口一端与紫外分光光度检测仪连接。

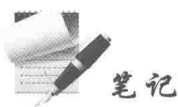
3. 上样 一般按每克湿胶加 25 ~ 30mg 样品的比例上样，室温作用 15 ~ 30 分钟后，用 pH 8.0 的 PBS 缓冲液充分洗脱，直至洗脱液 $A_{280\text{nm}}$ 值低于 0.02 为止 (有条件的实验室可以用蠕动泵上样)。

4. 分别用 pH 6.0、4.0、3.0 的枸橼酸缓冲液洗脱层析柱，并分别收集各洗脱条件下高紫外吸收峰值出现时的洗脱液。

5. 用 2 ~ 3 倍柱床体积的 3mol/L 硫氰酸钾溶液清洗层析柱后，PBS 缓冲液 (pH 7.4) 重新平衡层析柱，4℃ 储存备用。将含抗体成分的洗脱液用 1L PBS (pH 7.4)，4℃ 条件下透析 12 小时，反复 2 ~ 3 次。

6. 抗体含量测定 取少量透析袋内样品做适当稀释后，用紫外分光光度计测定蛋白含量，其余分装后置 -20℃ 冰箱保存备用。

$$\text{蛋白含量 (mg/ml)} = (1.45 \times A_{280\text{nm}} - 0.74 \times A_{260\text{nm}}) \times \text{样品稀释倍数}$$



笔记



笔记

【结果判定】

本实验可特异性收集抗绵羊红细胞免疫血清中 IgG 类抗体，对其活性和效价的鉴定可参考本单元实验二，对其纯度的鉴定则可考虑用蛋白质电泳法检测。

【注意事项】

1. SPA - Sepharose CL - 4B 凝胶价格较高，可反复使用 10 ~ 20 次，为提高凝胶的使用寿命，样品上样前最好先经过 0.22 μ m 滤膜过滤，以除去不溶性沉淀物或颗粒物质，再生后凝胶应 4 $^{\circ}$ C 低温保存，不可冰冻，同时应注意防腐。

2. 装柱时应注意防止柱床中产生气泡及断层，这些将影响 SPA 的结合效率及洗脱液的洗脱效果。

3. 为防止洗脱液过低的 pH 影响 IgG 抗体活性，可及时调整含有抗体的洗脱液 pH，另外也可以考虑用高离子强度的 PBS 缓冲液或者 3mol/L 的硫氰酸钾溶液将结合在 SPA 上的 IgG 抗体洗脱下来。

【方法评价】

与盐析法相比，SPA - Sepharose 亲和层析法能够快速获得高纯度的 IgG 抗体，能够满足于后续标记免疫技术需要，但是由于洗脱液 pH 偏低，有可能会对抗体的活性造成一定影响。



思考题

1. 亲和层析法纯化 IgG 的原理是什么？
2. 以鸡卵黄蛋白为免疫原，试设计制备、纯化抗鸡卵黄蛋白免疫血清的方案。

(杜晶春)

实验四 单克隆抗体的制备

单克隆抗体 (monoclonal Antibody, McAb) 是由一个 B 细胞杂交瘤克隆产生的针对单一抗原表位、结构均一的抗体。McAb 具有特异性强、纯度高、生物活性单一等优点。本实验介绍可溶性抗原甲胎蛋白 (alpha - fetoprotein, AFP) 鼠源 McAb 的制备方法。

【实验原理】

利用聚乙二醇作为细胞融合剂，使免疫小鼠的脾细胞与具有在体外不断增殖能力的小鼠骨髓瘤细胞融合，在次黄嘌呤氨基蝶呤胸腺嘧啶核苷 (HAT) 培养液的作用下，只有融合成功的杂交瘤细胞生长。经过反复筛选和克隆化培养，最终获得既能产生所需 McAb、又能在体外不断繁殖的杂交瘤细胞。将这种杂交瘤细胞扩大培养收集上清液，或接种于小鼠腹腔后收集腹水，均可得到单克隆抗体。

【主要试剂与器材】

1. 实验动物 Balb/c 小鼠，鼠龄 6 ~ 8 周。
2. 骨髓瘤细胞系 Sp2/0 细胞。
3. RPMI - 1640 培养液 按商品试剂说明书配制。
4. 胎牛血清 (FCS)。
5. HAT 培养液 按说明书配制为 50 \times 储存液，使用时用 RPMI - 1640 培养液稀释为工作液，另加入 20% (V/V) FCS。



6. 次黄嘌呤胸腺嘧啶核苷 (HT) 培养液 按说明书配制为 $50 \times$ 储存液, 使用时用 RPMI - 1640 培养液稀释为工作液, 另加入 20% (V/V) FCS。

7. 融合剂 聚乙二醇 1500 (PEG1500)。

8. 抗原 纯化的 AFP。

9. 福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂、降植烷 (pristane)、AFP 包被的 96 孔酶标反应板、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体、ELISA 底物液 (含有邻苯二胺和 H_2O_2) 和终止液。

10. 仪器设备 CO_2 培养箱、96 孔细胞培养板、24 孔细胞培养板, 倒置生物显微镜、注射器、剪刀、200 目钢网等。

【操作方法】

1. 小鼠免疫 免疫方案与多克隆抗体制备时动物免疫方案基本相同。首次用福氏完全佐剂与 AFP 乳化后腹腔和皮内多点注射, $100 \mu g$ /只; 2 周后, 用福氏不完全佐剂与抗原乳化后腹腔和皮内多点注射, $100 \mu g$ /只; 2 周后断尾采血测抗体效价, 选择抗体效价高的 Balb/c 小鼠用于融合。融合前 3 天, 以不加佐剂的抗原通过腹腔加强免疫注射 1 次, $100 \mu g$ /只。末次免疫后 3~4 天, 分离脾细胞。

2. 细胞融合

(1) 制备饲养细胞 ① Balb/c 小鼠拉颈处死, 浸泡于 75% 酒精内 3~5 分钟; ② 用无菌剪刀剪开小鼠腹部皮肤, 暴露腹膜; ③ 将 5~6ml 预冷的 RPMI - 1640 培养液注入腹腔, 反复抽吸吹打腹腔, 吸出冲洗液, 放入 10ml 离心管, 1500 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清; 将沉淀用约 10ml 的新鲜 RPMI - 1640 培养液悬浮, 1500 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清; ④ 沉淀以 HAT 选择培养液调整细胞数至 1×10^5 /ml, 加入 96 孔细胞培养板, $100 \mu l$ /孔, 置于 CO_2 培养箱培养。

(2) 准备骨髓瘤细胞 取培养的对数生长期骨髓瘤细胞, 1500 转/分钟离心 10 分钟。沉淀用 RPMI - 1640 培养液洗涤 2 次, 调整细胞浓度为 1×10^7 /ml 备用。

(3) 制备免疫脾细胞 ① 拉颈处死小鼠并放于 75% 乙醇中浸泡消毒, 无菌条件下取出脾脏, 并用 RPMI - 1640 培养液轻轻洗去组织外的血液; ② 将脾脏放入 200 目钢网中, 用注射器针芯研磨, 制成脾细胞悬液, 用吸管将细胞悬液移入 10ml 离心管中; ③ 将离心管直立, 放置 3~5 分钟, 使大块的结缔组织下沉。将细胞悬液移入 10ml 离心管中, 加入 RPMI - 1640 不完全培养基至 10ml, 1500 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清; ④ 沉淀用约 10ml 的新鲜 RPMI - 1640 培养液再悬浮, 重复步骤③; ⑤ 台盼蓝染色计算活细胞数, 以高于 80% 为合格, 用 RPMI - 1640 培养液调整为 1×10^7 /ml 的脾细胞悬液。

(4) 融合细胞 ① 将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:10 比例混合 (按每只小鼠获取的脾细胞数, 计算所需要的骨髓瘤细胞), 在 50ml 离心管内用 RPMI - 1640 培养液洗 2 次, 1500 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清, 留取 0.1ml, 轻轻弹击离心管底, 使细胞沉淀混合成糊状; ② 60 秒内加入 $37^\circ C$ 预热的 1.0ml PEG, 边加液边旋转试管, 作用 90 秒后用 1ml 吸管将细胞悬液轻轻吹入离心管, 立即加入 $37^\circ C$ 预热的 RPMI - 1640 培养液 1ml, 然后 2 分钟内加入 5ml, 接着在 5 分钟内加入 15ml, 继续边摇动边加入培养液 (总体积为 50ml) 以终止 PEG 作用, 1000 转/分钟离心 5 分钟; ③ 弃上清, 用含 20% 小牛血清 HAT 培养液重悬; ④ 将融合后细胞悬液加入含有饲养细胞的 96 孔细胞培养板 (每孔 $100 \mu l$), $37^\circ C$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

3. 选择杂交瘤细胞及抗体检测 ① HAT 选择杂交瘤细胞: 每日观察细胞克隆生长情况。在用 HAT 培养液培养 1~2 天内, 将有大量瘤细胞死亡, 3~4 天后瘤细胞消失, 杂交细胞形成小集落。HAT 培养液维持 7~10 天后应换用 HT 培养液, 再维持 2 周, 改用一般培养液。在选择培养期间, 一般每 2~3 天换 1/2 培养液。当杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时, 即可开始检测特异性抗体, 筛选出所需要的杂交瘤细胞系; ② 抗体的检测: 吸取杂交瘤细胞上清, 用 PBS



稀释后, 采用 ELISA 检测抗体分泌。将稀释的培养上清加入 AFP 包被 96 孔酶标反应板, 37℃ 反应 1 小时; PBS 洗涤 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37℃ 反应 1 小时; PBS 洗涤 3 次后加入 ELISA 底物液反应 30 分钟, 加入终止液。检测 495nm 的吸光度值 (A 值), 以 A 值 ≥ 0.2 为阳性, 即被检测孔内含有分泌抗 AFP 的杂交瘤细胞。

4. 抗体阳性孔杂交瘤克隆化

常用的是有限稀释法: ①克隆前 1 天制备饲养细胞层 (同细胞融合); ②将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹开, 计数; ③调整细胞为 3~10 个细胞/ml; ④取前一天准备的含饲养细胞层的 96 孔细胞培养板, 每孔加入稀释的细胞悬液 100 μ l。孵育于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中; ⑤在第 7 天换液, 以后每 2~3 天换液 1 次; ⑥8~9 天可见细胞克隆形成, 及时检测抗体活性。⑦将阳性孔的细胞移至 24 孔细胞培养板中扩大培养并应尽快冻存。

5. 单克隆抗体的制备 大量制备单克隆抗体的方法主要有两种。

(1) 体外大量培养杂交瘤细胞, 从上清液中获取单克隆抗体。此方法产量低, 一般培养液内抗体含量为 10~60 μ g/ml, 如果大量生产, 费用较高。

(2) 体内接种杂交瘤细胞, 制备腹水或血清。①实体瘤法: 对数生长期的杂交瘤细胞按 (1~3) $\times 10^7$ /ml 接种于小鼠背部皮下, 每处注射 0.2ml, 共 2~4 点。待肿瘤达到一定大小后 (一般 10~20 天) 则可采血, 血清单克隆抗体的含量可达到 1~10mg/ml, 但采血量有限; ②腹水的制备: 先腹腔注射 0.5ml 降植烷 (或液体石蜡) 于 Balb/c 鼠; 1~2 周再腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞。接种细胞 7~10 天后可产生腹水, 密切观察动物的健康状况与腹水征象, 待腹水尽可能多, 小鼠濒于死亡之前处死小鼠, 用滴管将腹水吸入试管中, 一般一只小鼠可获 5~10ml 腹水, 腹水中单克隆抗体含量可达到 5~10mg/ml。

6. 单克隆抗体的鉴定

(1) 抗体特异性的鉴定 除用免疫原 (抗原) 进行抗体的检测外, 还应该用与其抗原成分相关的其他抗原进行交叉试验, 方法可用 ELISA、IFA 法。

(2) 效价测定 可以采用 ELISA 法。

(3) McAb 的 Ig 类与亚类的鉴定 一般在用酶标或荧光素标记的第二抗体进行筛选时已经基本上确定了抗体的 Ig 类型。如果用的是酶标或荧光素标记的兔抗鼠 IgG 或 IgM, 则检测出来的抗体一般是 IgG 类或 IgM 类。至于亚类则需要用标准抗亚类血清系统作双扩或夹心 ELISA 确定。

(4) McAb 识别抗原表位的鉴定 采用竞争结合试验测定相加指数的方法, 测定 McAb 所识别抗原位点, 以确定 McAb 的识别的表位是否相同。

(5) 亲和力的鉴定 用 ELISA 或 RIA 竞争结合试验确定 McAb 与相应抗原结合的亲和力。

(6) 其他 McAb 的相对分子质量以及杂交瘤细胞染色体测定等, 可根据需要选择测定。

7. 单克隆抗体的纯化 方法参考本单元实验三。

【结果判定】

McAb 应是一个 B 细胞杂交瘤克隆产生的针对单一抗原表位、特异性强、纯度高的抗体。

【方法评价】

作为临床检验诊断试剂, McAb 具有特异性强、纯度高、均一性好等优点, 缺点是制备 McAb 技术复杂、周期长。

【临床应用】

McAb 广泛应用于标记免疫技术、流式细胞术、蛋白芯片技术等。McAb 在病原微生物诊断、肿瘤标志物检测、免疫细胞及其亚群分析、细胞因子和激素测定等方面应用广泛, 也可用于免疫治疗。