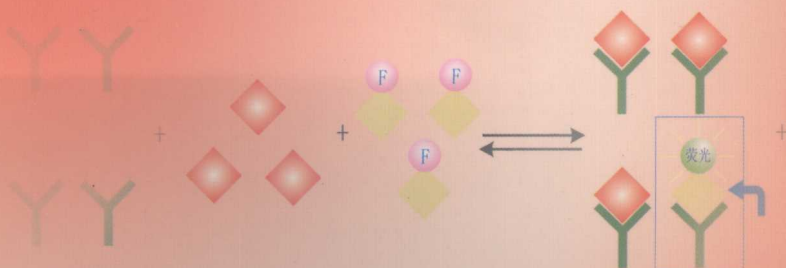


借



全国高等医药院校规划教材编辑委员会  
全国高等医药院校规划教材 (供医学检验、临床医学专业用)

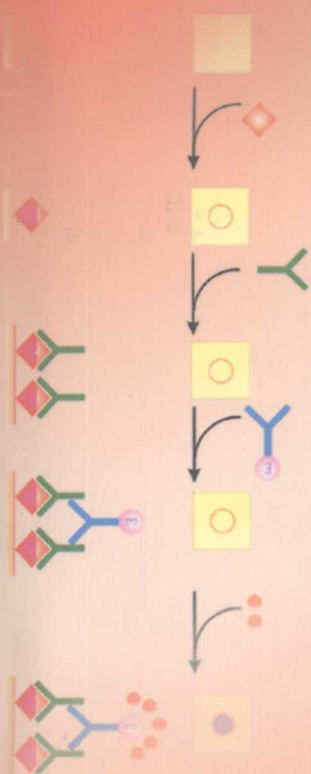


# 临床 免疫学检验 实验指导

主编 吕世静

LINCHUANG  
MIANYIXUE JIANYAN  
SHIYAN ZHIDAO

中国医药科技出版社



全国高等医药院校规划教材编辑委员会  
全国高等医药院校规划教材

# 临床免疫学检验实验指导

(供医学检验、临床医学专业用)

主 编 吕世静

中国医药科技出版社

## 内 容 提 要

《临床免疫学检验实验指导》是与高等医药院校医学检验专业理论教材相配套的实验教材。全书共 41 个实验项目, 内容涉及免疫学检验的各个方面, 实验方法尽量详尽, 并设常用试剂附录, 以便于学生、教师和实验技术人员操作和应用。各实验项目附有思考题, 可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。

本书体现了精、新、实用的特点。全书内容完整、系统、科学。实验技术和方法的编写注意规范性、实用性及先进性, 可操作性强。

本书除适用于医学检验、临床医学类专业本科、专科的免疫学实验教学以外, 也可供教师、医学类的硕士研究生、医院检验科、防疫站、科研人员及有关从事免疫学及相关专业实际工作的技术人员作为参考。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

临床免疫学检验实验指导/吕世静主编. —北京: 中国医药科技出版社, 2004.8

全国高等医药院校规划教材. 供医学检验、临床医学专业用  
ISBN 7-5067-3046-4

I. 临... II. 吕... III. 免疫学-医学检验-医学  
院校-教材 IV. R446.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 091581 号

美术编辑 陈君杞

责任校对 张学军

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 100088

电话 010-62244206

网址 www.mpsky.com.cn

规格 787×1092mm<sup>1</sup>/<sub>16</sub>

印张 8<sup>1</sup>/<sub>4</sub>

字数 167 千字

印数 1—5000

版次 2004 年 9 月第 1 版

印次 2004 年 9 月第 1 次印刷

印刷 北京艺辉印刷有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 7-5067-3046-4/G·0399

定价 14.00 元

本社图书如存在印装质量问题, 请与本社联系调换

## 编委会名单

主 编 吕世静

副主编 曾常茜

编 者 (以姓氏笔画为序)

王露楠 卫生部临床检验中心

吕世静 广东医学院

刘若英 贵阳医学院

宋文刚 泰山医学院

李会强 天津医科大学

张学宁 昆明医学院

吴俊英 蚌埠医学院

陈 敏 福建医科大学

秦东春 郑州大学

陶志华 温州医学院

高荣升 佳木斯大学

徐 霞 广州医学院

曾常茜 北华大学

蒋黎华 上海第二医科大学

翟登高 河北北方学院

## 编写说明

根据教育部关于“教材建设精品化,教材要适应多样化教学需要”的精神,为适应我国检验专业教育发展和改革的需要,培养面向 21 世纪医学检验专业的新型人才,适应整个社会对临床检验人才的需要,特编写了本套教材。参编单位有卫生部临床检验中心以及多家设有检验系的知名医学院校,如上海第二医科大学、华中科技大学同济医学院、中南大学、江苏大学、天津医科大学、广东医学院、重庆医科大学、青岛大学医学院、温州医学院、中山大学等,参编人员均为长期从事临床一线工作并同时担任教学任务的知名教授。

本套教材在注重体现“三基”(基础理论、基本知识和基本技能)、“五性”(思想性、科学性、先进性、启发性和适用性),保持传统教材优势的基础上,还具有如下特色:①编排设计新颖独到,每章附有学习要点,书后附有中英、英中索引(或对照)。②书中配有大量彩色插图,图文并茂,形象生动。③内容求新、求精,系统全面,并着重突出临床实用性,使教学与临床实际紧密结合。

全套教材共有如下 9 种,并有部分实验指导、习题集及 Powerpoint 同期推出。

- |              |            |
|--------------|------------|
| 1.《临床检验基础》   | 主编:刘成玉     |
| 2.《临床生物化学检验》 | 主编:郑铁生     |
| 3.《临床血液学检验》  | 主编:胡翊群     |
| 4.《临床微生物学检验》 | 主编:洪秀华     |
| 5.《临床免疫学检验》  | 主编:吕世静     |
| 6.《临床寄生虫学检验》 | 主编:吴忠道     |
| 7.《分子诊断学》    | 主编:吕建新 尹一兵 |
| 8.《临床实验室管理》  | 主编:丛玉隆     |
| 9.《临床输血检验》   | 主编:胡丽华     |

# 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”（教高〔2001〕1号）的精神，来自全国十多所高等医学院校，从事教学、科研第一线的教授、专家一致认为作为配套实验教材，编写的原则是既与规划理论教材保持原则上的一致性，又要反映免疫学的新技术、新发展趋势，培养学生独立思考、独立实验的能力。虽然目前在临床实验领域各种新的实验方法、技术层出不穷，实验操作向着快速、敏感以及全自动化发展，但各种技术的实验原理基本不变，各种新技术几乎也都要以基本技术为依托，只有掌握这些基本的实验技术，才有可能改进、发展和完善新技术。

本书是与《临床免疫学检验》配套的规划实验教材，体现精、新、实用的特点。全书力求内容完整、系统、科学。实验技术和方法的编写注意规范、实用性及先进性，以利于培养学生严谨的科学态度、创新意识和实际操作能力。全书共41个实验项目，实验内容编排与理论教材保持一致，实验方法尽量详尽，并设附录，以便于学生、实验技术人员和教师操作和应用。各实验项目有中英文对照，并附有思考题，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。各院校、不同专业、不同层次可根据教学需求选择相关实验内容。

本书除适用于检验、临床医学类专业本科、专科的免疫学实验教学以外，也可供教师、医学类的硕士研究生、医院检验科、防疫站、科研人员及从事免疫学及相关专业实际工作的技术人员作为参考。

本教材在编写过程中得到了各编写院校和同行们的大力支持，参加编写的人员除了署名的编者以外，还有贵阳医学院朱树珍和费樱、天津医科大学包乐媛和蚌埠医学院李柏青等老师，他们分别参加了实验三和实验四、实验四十、实验二十八的编写工作。对编者们的辛勤劳动，在此一并表示衷心的感谢！

免疫学和免疫学技术的发展日新月异，医学教育及教学改革正在逐步深入，而因编者的认识水平所限，书中难免会有不足之处，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。

吕世静  
2004年7月

# 目 录

<b>I 固有免疫功能检测 (Assays for Innate Immunity)</b> .....	( 1 )
实验一 血脑屏障作用 (Function of Blood - brain Barrier) .....	( 1 )
实验二 溶菌酶测定 (Assay for Lysozyme) .....	( 2 )
<b>II 免疫血清的制备及纯化 (Preparation and Purification of Immunoserum)</b> ...	( 4 )
实验三 抗体的制备 (Preparation of Antibody) .....	( 4 )
实验四 抗血清的纯化 (Purification of Antiserum) .....	( 7 )
附 单克隆抗体制备简介 .....	( 11 )
<b>III 免疫凝集类实验 (Assays for Agglutination)</b> .....	( 13 )
实验五 直接凝集试验 (Direct Agglutination) .....	( 13 )
附 诊断菌液的制备 .....	( 16 )
实验六 间接凝集试验 (Indirect Agglutination) .....	( 16 )
实验七 间接凝集抑制试验 (Indirect Agglutination Inhibition Assay) .....	( 23 )
实验八 协同凝集试验 (Coagglutination Assay) .....	( 24 )
<b>IV 免疫沉淀类实验 (Assays for Precipitation)</b> .....	( 27 )
实验九 双向免疫扩散试验 (Double Immunodiffusion Test) .....	( 27 )
实验十 单向免疫扩散试验 (Single Immunodiffusion Test) .....	( 28 )
实验十一 对流免疫电泳试验 (Counter Immunoelectrophoresis Test) .....	( 30 )
实验十二 免疫电泳试验 (Immunoelectrophoresis Test) .....	( 31 )
实验十三 火箭免疫电泳 (Rocket Immunoelectrophoresis) .....	( 33 )
实验十四 免疫浊度测定 (Immunoturbidimetry) .....	( 35 )
附 速率散射比浊分析仪简介 .....	( 36 )
<b>V 补体参与的实验 (Immunoassays Involving Complement)</b> .....	( 38 )
实验十五 补体结合试验 (Complement Fixation Test) .....	( 38 )
实验十六 血清总补体溶血活性测定 (Assay for Seral Total Complement Activity)	
.....	( 41 )

## 2 目 录

VI 标记免疫技术 (Immunoassays Using Labelled Reagents) .....	( 44 )
实验十七 荧光抗体的制备 (Preparation of Fluoresceinated Antibody) .....	( 44 )
实验十八 荧光抗体染色技术 (Fluoresceinated Antibody Staining Technique) ...	( 46 )
附 荧光显微镜简介 .....	( 48 )
实验十九 酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	( 49 )
附 酶联免疫检测仪简介 .....	( 54 )
实验二十 酶免疫组化技术 (Enzyme Immunohistochemistry Technique) .....	( 55 )
实验二十一 免疫印迹技术 (Immunoblotting Technique) .....	( 57 )
实验二十二 斑点金免疫渗滤试验 (Dot Immunogold Filtration Assay) .....	( 59 )
实验二十三 斑点免疫层析试验 (Dot Immunogold Chromatographic Assay) .....	( 60 )
附 全自动微粒子化学发光免疫分析仪简介 .....	( 62 )
VII 免疫细胞功能的检测技术 (Assays for Immunocytes) .....	( 67 )
实验二十四 外周血单个核细胞的分离 (Separation of Mononuclear Cell in Peripheral Blood) .....	( 67 )
实验二十五 E 花环形成试验 (E Rosette Test) .....	( 69 )
实验二十六 T 淋巴细胞转化试验 (T Lymphocyte Transformation Test) .....	( 71 )
实验二十七 细胞毒性 T 细胞功能测定 (Assay for Function Cytotoxic T Lymphocyte) .....	( 75 )
实验二十八 细胞因子的测定 (Assay for Cytokine) .....	( 76 )
附 细胞因子检测试剂盒简介 .....	( 79 )
实验二十九 T 细胞亚群的测定 (Assay for T Cell Subpopulations) .....	( 81 )
附 流式细胞仪简介 .....	( 84 )
实验三十 溶血空斑形成试验 (Hemolytic Plaque Formation Test) .....	( 85 )
实验三十一 NK 细胞功能测定 (Assay for Function of NK Cell) .....	( 87 )
实验三十二 吞噬细胞吞噬功能测定 (Assay for Phagocytosis of Phagocyte) .....	( 89 )
实验三十三 白细胞杀菌功能测定 (Assay for Bactericidal Function of White Blood Cell) .....	( 92 )
实验三十四 硝基四氮唑蓝还原试验 (Nitroblue Tetrazolium Reduction Test) ...	( 94 )
VIII 超敏反应的免疫学检测 (Immunoassays for Hypersensitivity) .....	( 96 )
实验三十五 豚鼠过敏反应观察 (Observation of Guinea Pig Anaphylaxis) .....	( 96 )
实验三十六 皮肤过敏反应试验 (Skin Anaphylaxis Test) .....	( 97 )
实验三十七 皮肤迟发型超敏反应试验 (Skin Delayed Hypersensitivity Test) ...	( 99 )
实验三十八 血清总 IgE 测定 (Assay for Seral Total IgE) .....	( 100 )



<b>IX 器官移植的免疫学检测 (Immunoassays for Organ Transplantation)</b> .....	(102)
实验三十九 补体依赖的微量细胞毒试验 (Micro - complement Dependent Cytotoxic Test) .....	(102)
附 HLA 分型血清板简介 .....	(103)
实验四十 淋巴细胞交叉配合试验 (Lymphocyte Cross Matching Test) .....	(104)
<b>X 其他免疫学实验 (Other Immunological Tests)</b> .....	(106)
实验四十一 循环免疫复合物测定 (Assay for Circulating Immune Complex) .....	(106)
<b>附录</b> .....	(108)
附录一 常用实验动物的接种和采血方法 .....	(108)
附录二 免疫学实验常用试剂的配制 .....	(110)
附录三 离心速度、相对离心力和离心时间的计算 .....	(119)
附录四 加样器的校准 .....	(120)

# I 固有免疫功能检测

## (Assays for Innate Immunity)

### 实验一 血脑屏障作用

#### (Function of Blood - brain Barrier)

机体的屏障机构是生物体在长期种系发育和进化过程中逐渐形成的一系列防御结构。血脑屏障是机体的屏障结构的重要组成部分，此屏障能阻止病原体及大分子物质通过，对中枢神经系统起保护作用。

#### 【实验原理】

血脑屏障主要由致密的脑毛细血管内皮层、基底膜和围绕在血管壁外的星状胶质细胞形成的胶质膜所构成。这些组织结构致密，能阻挡病原体和大分子物质从血液进入脑脊液或脑组织，故能保护中枢神经系统。婴幼儿因其血脑屏障结构发育尚未完善，故易发生脑膜炎等中枢神经系统感染。

#### 【主要试剂与器材】

1. 1% 锥蓝 锥蓝粉研磨细，用 0.85% NaCl 配制，80℃ 加热 30min，完全溶解后，过滤除去颗粒。
2. 1ml 注射器、4.5 ~ 5 号针头（皮试用针头）。
3. 成年小白鼠。

#### 【操作方法】

1. 取小白鼠观察其皮肤颜色，然后从小白鼠尾静脉注射 1% 锥蓝 0.3 ~ 0.6ml，2h 后观察小白鼠皮肤颜色的变化。
2. 摘除眼球放血致死并进行解剖。自背部由头部到尾沿中线剪开皮肤，分离肌肉，将头颅骨成块及椎骨小心剖开，注意切勿损伤脑组织及脊髓。剥离完毕，暴露出脑膜及脊髓膜，并切开脑髓，观察脑膜、脑髓、脊髓的颜色。注意与皮下组织、肌肉及内脏的颜色加以比较。同时解剖另一只正常的小白鼠，观察脑膜、脑髓、脊髓的颜色。

#### 【结果判断】

观察注射 1% 锥蓝的小白鼠，其皮下组织、肌肉及内脏均呈蓝色。而脊髓、脑髓为白色，与正常小白鼠脊髓、脑髓的颜色一致。

## 2 I 固有免疫功能检测

### 【注意事项】

确保全部锥蓝从静脉注入。

### 【应用与评价】

本实验可用于验证小白鼠血脑屏障结构对病原体和大分子物质的阻挡作用。

### 【思考题】

人群中儿童期为什么容易发生脑膜炎等中枢神经系统感染？

(吕世静)

## 实验二 溶菌酶测定 ( Assay for Lysozyme )

溶菌酶存在于机体的泪液、唾液、痰、鼻涕及白细胞和血清中。体液或分泌物中溶菌酶活性，可通过检查其对指定敏感菌株的裂解作用来进行测定。测定方法有平板打孔测定法和光学测定法两种。光学测定法只适用于测定较窄范围浓度的溶菌酶，因此常需将待检品的浓度预先作适当的调整，使之适合于限定范围之内。平板打孔法可在一个较宽的浓度范围内获得满意的结果。本实验以琼脂平板打孔法为例。

### 【实验原理】

溶菌酶是一种小分子蛋白，分子量约 14 000，由 129 个氨基酸组成，属于一种碱性蛋白质。它能与细菌牢固结合，并通过水解革兰阳性菌细胞壁中的黏肽成分，而致细菌溶解。革兰阴性菌的细胞壁黏肽层的外面含有脂多糖和脂蛋白，在一般情况下不受溶菌酶的影响。

### 【主要试剂与器材】

1. 溶壁微球菌 溶壁微球菌是从空气中分离出的一种革兰阳性球菌，其对营养要求不高，在普通培养基上生长良好，菌落呈黄色，1 个月传代 1 次或冻干保存。
2. 琼脂粉（优质） 溶于 1/15mol/L pH6.4PBS。
3. 溶菌酶标准品。
4. 新鲜鸡蛋清、唾液、人血清。
5. 无菌打孔器（孔径 5mm 左右）、毛细滴管。

### 【操作方法】

1. 溶壁微球菌平板的制备 溶壁微球菌在使用前于琼脂斜面培养基上传代一次，然后再接用于普通琼脂平板 37℃ 培养 24h。用无菌蒸馏水洗下菌苔，2000r/min 离心 30min，弃上清。再加蒸馏水轻轻混匀，2000r/min 离心 30min，弃上清，称沉淀物湿重，用无菌

蒸馏水配成 100g/L 的浓菌液（菌液应在临用前配制，不宜存放过久），加热杀死，备用。

2. 称琼脂粉 1g，加入 1/15mol/L pH6.4PBS 100ml，即成 1% 琼脂。
3. 取溶菌酶标准品，用 1/15mol/L pH6.4PBS 制成 5、25、100mg/L 稀释液。
4. 取已配制好的菌液 1ml，加到 50 ~ 60℃ 已溶化的 1% 琼脂中，摇匀，倾注平板（直径 7 ~ 9cm 平板加 1% 琼脂 15ml），待冷凝。
5. 用打孔器在溶壁微球菌琼脂平板上打孔，孔间距 18 ~ 20mm，用牙签挑去孔内琼脂。
6. 用毛细吸管取唾液（新鲜收集，盛于洁净平皿内，取上层清液）或血清，加入琼脂孔内。同时在另一孔内加满标准溶菌酶作为阳性对照。
7. 置 25 ~ 30℃ 18 ~ 24h，观察结果。
8. 在每批测定同时，将各种浓度的溶菌酶标准液加入小孔中，同法测定溶菌环直径，用半对数纸，以溶菌酶浓度为纵坐标（对数坐标），溶菌环直径为横坐标，绘制标准曲线。从曲线上查出每毫升待检品所含溶菌酶的微克数。

### 【结果判断】

加唾液孔和标准溶菌酶孔周围的溶壁微球菌被溶解，可见圆形透亮区，即溶菌环。溶菌环的大小与溶菌酶的含量成正比。

### 【注意事项】

测量标准样品与待检样品溶菌现象的间隔时间应尽量缩短，最好能在同一块板上备有标准样品的对照，便于比较。

### 【应用与评价】

测定体液、分泌液中溶菌酶的含量及其变动情况，可以作为了解机体防御功能的一个侧面指标。正常人血清溶菌酶的含量不超过 5 ~ 10mg/L，通常尿中查不出。各种类型白血病，特别是单核细胞性白血病时，血清溶菌酶含量升高尤为明显。

该方法简便，不需特殊设备。

### 【思考题】

当体液或分泌液中溶菌酶减少或缺乏时，临床常易引起哪些部位感染和哪类病原感染？

（吕世静）

## II 免疫血清的制备及纯化 (Preparation and Purification of Immunoserum)

### 实验三 抗体的制备 (Preparation of Antibody)

抗体是抗原刺激机体产生的并能和相应抗原发生特异性结合的球蛋白。抗原和抗体是免疫学检测的两个重要指标，也是体外抗原抗体反应即血清学反应中最基本的试剂。基于抗原抗体反应的高度特异性，有了已知抗体可以识别抗原，而有了已知抗原就可检测抗体或作为免疫原制备抗体。

制备高效价和高特异性的抗体是免疫学基本技术。制备抗体的质量受多种因素影响，如免疫原、动物的种类和免疫流程等。一般情况下，细胞性抗原的抗体易于制备，可溶性抗原的抗体制备时，常需加入佐剂。

#### (一) 溶血素的制备 (Preparation of Hemolysin)

##### 【实验原理】

用绵羊红细胞 (SRBC) 免疫家兔，可获得抗绵羊红细胞抗体 (抗 SRBC)。SRBC 与抗 SRBC 抗体结合，有补体存在时，可出现红细胞溶解，因此抗 SRBC 抗体又称为溶血素。

##### 【主要试剂与器材】

1. 健康家兔 (2~3kg)、健康绵羊。
2. 碘酒、75% 酒精、无菌生理盐水。
3. 无菌三角瓶 (内装玻璃珠或玻璃渣)、离心管、吸管、注射器。
4. 离心机。

##### 【操作方法】

###### 1. 抗原制备

(1) 用碘酒、75% 酒精消毒绵羊皮肤，从颈静脉抽血，注入含有玻璃珠的三角瓶内，摇动三角瓶，脱纤维抗凝。绵羊血也可用 Alsever 液抗凝保存。

(2) 无菌取绵羊血于离心管中，加适量生理盐水，2000r/min 离心 5min，吸去上清液和白细胞层，再用较多的无菌盐水与红细胞混匀，离心再弃上清，重复 3 次，最后一次离

心 10min。

(3) 根据红细胞压积, 用生理盐水配成 10% SRBC 悬液。

## 2. 免疫动物

(1) 取健康雄性家兔若干只 (根据需要而定), 通过耳静脉免疫, 免疫程序见表 3-1。

表 3-1 绵羊红细胞免疫家兔程序

免疫日期 (天)	1	2	3	4	5
10% SRBC 剂量 (ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

(2) 试血: 末次免疫后第七天试血。从耳静脉或心脏采血, 分离血清, 做免疫溶血试验, 滴定溶血素效价。若效价不理想, 可再注射抗原, 再试血, 直至达到要求。

3. 收获血清 无菌采血, 分离血清。将抗血清 (可加 0.1%  $\text{NaN}_3$ ) 小量分装,  $-20^\circ\text{C}$  以下冻存。

### 【结果判断】

收获的抗血清应是无菌、无溶血的, 其溶血效价应高于 1:2000。

### 【注意事项】

1. 注意无菌操作, 并尽可能多的采集血清。
2. 实验室制备抗体时, 血清需要量不大, 宜选择小动物免疫, 便于管理。
3. 用细胞性抗原制备抗体时, 多选用静脉注射途径。免疫的次数、间隔时间以及试血时间均可随实验安排适当调整。

### 【应用与评价】

溶血素可用于补体参与的溶血反应, 如  $\text{CH}_{50}$  测定和 C4 溶血活性测定。用溶血素和 SRBC 做指示系统, 可进行补体结合试验和抗补体试验。

### 【思考题】

1. 为什么要洗涤绵羊红细胞? 为什么在洗涤过程中要吸去红细胞表面的白细胞层?
2. 为什么要多次免疫动物?

(朱树珍 刘若英)

## (二) 兔抗人血清的制备 (Preparation of Rabbit Anti-human Serum)

### 【实验原理】

用混合人血清免疫家兔, 可获得兔抗人血清抗体。为提高抗体的效价, 需在混合人血清中加入佐剂, 以增强其免疫原性。

## 6 II 免疫血清的制备及纯化

### 【主要试剂与器材】

1. 健康家兔 (2.5 ~ 3kg)。
2. 混合人血清。
3. 福氏完全佐剂 石蜡油、羊毛脂、卡介菌。
3. 碘酒、75%酒精、青霉素。
4. 无菌乳钵、试管、毛细吸管、注射器。

### 【操作方法】

1. 抗原制备 将石蜡油和羊毛脂加热倾入乳钵中，待冷却后加入卡介菌 (10mg/ml) 和青霉素 (100U/ml)，研磨。研磨中逐滴加入等量混合人血清，直至完全磨成乳剂。用毛细吸管将其吸入试管中，置4℃冰箱保存。

#### 2. 免疫动物

(1) 取健康雄性家兔若干只 (根据需要而定)，注射方法和免疫程序见表3-2。

表3-2 人血清免疫注射程序

日期 (天)	1	7	14	21
抗原-福氏完全佐剂量 (ml)	0.5	0.5	1	2
免疫部位及途径	双后足掌皮下	腋窝淋巴结	背部皮内5~10点	背部皮下5~10点

(2) 试血：末次注射免疫原后7天试血。从耳静脉或心脏采血，分离血清。通过双向免疫扩散试验测定抗体效价。若抗体效价不理想，可再次注射抗原，再试血，直至达到要求。

3. 采血 从心脏采血，分离血清，小量分装，-20℃以下保存。

### 【结果判断】

收获的抗血清应是无菌、无溶血的，其效价应高于1:16。

### 【注意事项】

1. 注意无菌操作，尽量多采血清。
2. 可溶性抗原制备抗体时多选用皮内注射途径，因加有佐剂，注射不太容易。
3. 免疫的次数、间隔时间及试血时间可随实验安排调整。
4. 再次注射抗原时，要防止过敏反应发生。

### 【应用与评价】

临床上可用于检测和分析相应的抗原。

### 【思考题】

1. 制备抗血清时为什么要用混合血清作免疫原？

## 2. 为什么不同性质的抗原免疫动物的途径和程序不同?

(朱树珍 刘若英)

## 实验四 抗血清的纯化

### (Purification of Antiserum)

抗血清纯化的目的是尽量除去抗血清中与目的抗体不相关的成分,以防止抗体外的其他血清成分对试验结果产生影响。因此只能根据不同目的的要求,从抗血清中除去容易干扰的有关成分,或提取相应的免疫球蛋白。

抗血清纯化的方法主要有粗提法和精制法两个过程。粗提法主要常用硫酸铵盐析法,精制法分非特异性和特异性两种类型。非特异性方法如葡聚糖凝胶过滤法、离子交换层析法,其方法均系基于蛋白质分子的物理性质。特异性方法如免疫吸附法,其方法基于抗原抗体的特异性反应。

#### (一) 盐析法 (Salt Fractionation)

##### 【实验原理】

蛋白质在不同浓度的盐溶液中相对溶解度不同,血清 $\gamma$ -球蛋白在一定浓度盐溶液中易于沉淀,而白蛋白则不易沉淀,据此可将两者分离。

##### 【主要试剂与器材】

1. 饱和硫酸铵溶液 取500ml蒸馏水加热至70~80℃,将400g硫酸铵溶于其中,搅拌20min,冷却。待硫酸铵结晶沉于瓶底,其上清即为饱和硫酸铵。在使用前用28%氨水调pH7.0。

2. 兔血清(含抗体)。

3. 透析袋、离心机等。

##### 【操作方法】

1. 用55%饱和硫酸铵提取血清中 $\beta$ -球蛋白、 $\gamma$ -球蛋白

(1) 血清1份加生理盐水1份混匀,然后逐滴加入饱和硫酸铵2份中,边加边搅拌,防止形成团块降低沉淀物的特异性。混匀后静置30min或置4℃冰箱过夜。

(2) 低温高速10 000/min离心10min,将上清液(含白蛋白)弃去,取沉淀物(含球蛋白)溶于少量生理盐水中。

2. 用33%饱和硫酸铵提取 $\gamma$ -球蛋白 将上述提取物生理盐水溶液2份加1份饱和硫酸铵。然后再10 000r/min离心,其余操作同上。

3. 按同样方法用33%饱和硫酸铵再提取1次。

4. 将提取物装入透析袋,在生理盐水中透析,以除去其中所含的硫酸铵。放-20℃冰箱保存。



## 8 II 免疫血清的制备及纯化

### 【结果判断】

用双向免疫扩散法和免疫电泳法检测抗体活性、效价和纯度。

### 【注意事项】

1. 用于盐析的中性盐有硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁、氯化钠、磷酸盐等，最常用的是硫酸铵，因为硫酸铵饱和溶液所含盐浓度很高，溶解度受温度影响小，一般不引起蛋白质变性，但不纯的硫酸铵含重金属，会影响蛋白质生物活性，故应用分析纯试剂。

2. 中性盐浓度 不同浓度硫酸铵，当达到 20% 饱和度时，可沉淀血浆中纤维蛋白原，增加饱和度至 28% ~ 33%，可使球蛋白析出，当饱和度大于 50% 则可析出白蛋白。

3. pH 当溶液 pH 调至蛋白质的等电点，使所带阳电荷与阴电荷相等时，易使蛋白析出。球蛋白等电点为 pH5 ~ 8。

4. 蛋白质浓度 如血清蛋白的浓度自 0.5% 递增至 3% 时，所需中性盐饱和度的最低限度可从 29% 递减至 24%，但当蛋白质浓度增高后，蛋白质的共沉作用也增加，影响蛋白质纯化，故当溶液内蛋白质浓度过高，可做适当稀释，一般认为 2.5% ~ 3.0% 的蛋白浓度较好。

5. 温度 盐析蛋白时温度要求并不严格，一般在室温（25℃）比在 0℃ 时更易析出，除非盐析对温度敏感的蛋白质（如抗体）要求在 4℃ 进行。

6. 透析除盐 透析液内  $\text{NH}_4^+$  的检测可用纳氏试剂，如产生黄色沉淀证明  $\text{NH}_4^+$  的存在。

### 【应用与评价】

经盐析法提取的蛋白质为粗提的免疫球蛋白，若要获得纯化的免疫球蛋白，必须经凝胶过滤或离子交换层析提纯。

### 【思考题】

1. 盐析法粗提免疫球蛋白的原理是什么？
2. 盐析法粗提免疫球蛋白有哪些注意事项？

(曾常菑)

## (二) 凝胶过滤法 (Gel Filtration)

### 【实验原理】

利用具有分子筛效应的多孔网状凝胶作为介质，可分离提纯分子量不同的大分子物质。在凝胶过滤过程中，分子量大的物质因不能进入凝胶网孔而沿凝胶颗粒间空隙先流出凝胶柱外；分子量小的物质因能进入凝胶网孔而受阻滞，流速缓慢而最后流出柱外，这样就能将分子量不同的物质分离。