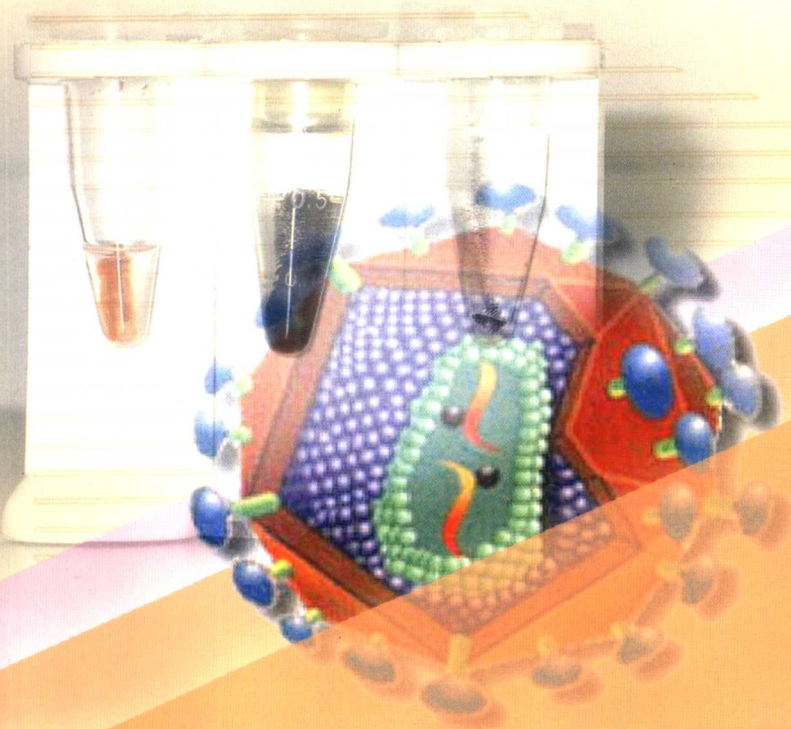




普通高等教育“十一五”国家级规划教材

动物免疫学实验教程

郭鑫 主编



中国农业大学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

动物免疫学实验教程

郭 鑫 主编

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

动物免疫学实验教程/郭鑫主编. —北京:中国农业大学出版社,2007.3

ISBN 978-7-81117-170-9

I. 动… II. 郭… III. 动物学-免疫学-实验-高等学校-教材 IV. S852.4-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 025598 号

书 名 动物免疫学实验教程

作 者 郭 鑫 主编

策划编辑 潘晓丽

责任编辑 张苏明

封面设计 郑 川

责任校对 王晓凤 陈 莹

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100094

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

e-mail cbsszs@cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2007年3月第1版 2007年3月第1次印刷

规 格 787×1092 16开本 11印张 269千字

印 数 1~3050

定 价 15.50元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

主 编 郭 鑫 (中国农业大学)

副 主 编 廖 明 (华南农业大学)

彭远义 (西南大学)

编写人员 (以姓氏拼音为序)

陈金顶 (华南农业大学)

陈艳红 (中国农业大学)

盖新娜 (中国农业大学)

郭 鑫 (中国农业大学)

姜世金 (山东农业大学)

刘大程 (内蒙古农业大学)

李 影 (吉林农业大学)

廖 明 (华南农业大学)

潘树德 (沈阳农业大学)

彭远义 (西南大学)

单 虎 (莱阳农学院)

石得时 (华中农业大学)

闫 芳 (山西农业大学)

主 审 杨汉春 (中国农业大学)

前 言

《动物免疫学实验教程》是面向兽医专业专科生、本科生和研究生的实验参考书,是在学生已初步掌握兽医免疫学基础理论知识后,进一步指导学生学习和应用免疫学实验技术的一门实验课程教学用书。本实验教程通过详细介绍各类免疫学实验操作,使学生加深对免疫学基本理论的理解,培养学生正确掌握免疫学常用实验技术,使学生学会正确记录、处理和分析实验数据,培养实事求是、严肃认真的科学作风和认真细致整洁的实验习惯,为今后从事兽医学和免疫学相关工作打下良好基础。

本书涉及的内容与《动物免疫学》教材相匹配,由全国 10 所农业高等院校多名从事兽医免疫学教学的教师参与编写。本书的编写大纲是在对全国主要农业高等院校动物医学专业研究生和本科生的兽医免疫学实践教学进行调研的基础上制定的,编写内容涵盖面广、重点突出、实用性强。为了使理论与实验内容衔接一致,本书编写时的实验顺序是按照实验技术的性质进行分类和排列的,全书共分为 7 章 36 个实验,既包含传统的动物免疫学实验技术,又突出了新的免疫学检测方法。每类实验技术包括若干实验项目,便于各层次的学生选用。由于各项实验之间存在内在联系,故教学组织者可将相关实验组合成一个综合性实验进行教学。编写过程中有意识地突出了实验原理和注意事项的分量,强调了关键技术及操作中可能引起失败的原因,便于学生独立完成实验和更好地对结果进行科学分析,也有利于学生自行设计实验,发挥能动性和创造性,满足教学改革的要求。

本书编写过程中,在中国农业大学出版社的组织下申报了教育部“十一五”规划教材,并喜获批准。全书定稿后,承蒙中国农业大学杨汉春教授审阅,杨教授提出了非常中肯的意见,在此深表谢意。

由于编写时间较为仓促,加之能力有限,书中定有不妥之处,真诚希望广大读者给予批评指正。

编 者

2006 年 12 月

目 录

动物免疫学实验目的和要求.....	(1)
实验室规则.....	(2)
实验记录与实验报告撰写要求.....	(3)

第一章 免疫制备技术

概述.....	(6)
实验一 抗原的制备.....	(7)
实验二 多克隆抗体的制备.....	(12)
实验三 单克隆抗体的制备.....	(17)
实验四 抗体的纯化.....	(25)
实验五 荧光抗体的制备.....	(31)
实验六 酶标抗体的制备.....	(36)
实验七 淋巴细胞的制备.....	(42)

第二章 凝集实验

概述.....	(46)
实验八 直接凝集实验.....	(47)
实验九 间接凝集实验.....	(53)
实验十 乳胶凝集实验.....	(58)
实验十一 血凝和血凝抑制实验.....	(61)

第三章 沉淀实验

概述.....	(66)
实验十二 环状沉淀实验.....	(67)
实验十三 絮状沉淀实验.....	(69)
实验十四 琼脂免疫扩散实验.....	(71)
实验十五 免疫电泳实验.....	(75)
实验十六 对流免疫电泳实验.....	(79)
实验十七 火箭免疫电泳实验.....	(81)

第四章 免疫标记技术

概述.....	(84)
实验十八 免疫荧光抗体技术.....	(85)
实验十九 酶联免疫吸附实验.....	(89)

实验二十	斑点-酶联免疫吸附实验	(92)
实验二十一	免疫酶组化实验	(95)
实验二十二	放射免疫技术	(98)
实验二十三	化学发光免疫分析	(105)
实验二十四	免疫胶体金标记技术	(108)
实验二十五	生物素-亲和素免疫检测技术	(113)
实验二十六	免疫印迹技术	(116)

第五章 补体参与的实验

概述	(124)	
实验二十七	补体结合实验	(125)
实验二十八	溶血空斑实验	(132)

第六章 中和实验

概述	(136)	
实验二十九	终点法中和实验	(137)
实验三十	空斑减少法中和实验	(140)

第七章 细胞免疫检测技术

概述	(144)	
实验三十一	E玫瑰花环形成实验	(145)
实验三十二	T淋巴细胞亚群检测技术	(148)
实验三十三	淋巴细胞转化实验	(152)
实验三十四	酸性 α -醋酸萘酯酶测定	(157)
实验三十五	细胞毒性T淋巴细胞活性测定	(160)
实验三十六	细胞凋亡的DNA琼脂糖凝胶电泳分析	(163)
参考文献	(166)	

动物免疫学实验目的和要求

动物免疫学实验课的目的是训练学生掌握免疫学最基本的操作技能,加强和巩固免疫学的基本知识,加深对课堂讲授的基本理论的理解和体会。通过实验培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力,树立实事求是、严肃认真的科学态度以及勤俭节约、爱护公物的良好作风,为今后的实际工作和科学研究打下基础。为上好动物免疫学实验课,要求同学们做到如下各点:

(1)在实验课前应对实验内容进行充分预习,明确实验目的、内容,了解实验原理,熟悉所要使用的仪器、药品的性质及操作程序,做到心中有数。

(2)在实验进程中认真听讲,仔细观察教师演示,严格按照实验规定步骤和要求进行操作,坚持实验的严肃性、严格性、严密性,积极思考实验中的每一环节。

(3)真实地记录实验结果,在认真观察并分析实验结果的基础上得出结论,努力训练自己的科学思维能力。实验完成后,及时写出实验报告并交给老师批改。

(4)实验中既要独立操作又要与同学互相配合,不得随意挪用他人的实验材料。

(5)严格遵守实验室规则,防止各种事故发生。

实验室规则

免疫学实验所用到的材料有可能含有病原微生物,在实验中操作不慎和防护不善便有发生人身感染或环境污染的可能,所以要求同学们进入实验室后必须遵守以下规则:

(1)进入实验室先把个人书包放到指定地点,穿好工作服,实验台上只放实验指导、记录本和文具。

(2)实验室内严禁吸烟,不允许吃食品、饮水,不用手指或他物接触面部,不用嘴接触吸管及湿润标签,以防感染。

(3)实验室内必须安静、遵守纪律,不得大声喧哗、随便走动、拆卸仪器。

(4)实验须按老师要求操作,发生割破皮肤、被动物咬伤或抓破及实验材料破损等意外事故时,应立即报告老师,进行紧急处理。皮肤破伤可用2%红汞或2%碘酒消毒,污染的桌面、地面和物品可用3%来苏儿来消毒。

(5)爱护公共财物,节约试剂材料,不得将实验室内物品私自带走。如有仪器、用品损坏,应及时报告老师并按规定处理。

(6)一切易燃物品(酒精、二甲苯等)不准接近火源,如遇火险,先关掉电源,再用湿布、防火砂袋或灭火器灭火。

(7)实验结束后,整理实验用品并清理台面,实验废弃物(如实验动物尸体等)应放入或倒入指定的地点,需冲洗者按要求冲洗,需收回者按要求收回并摆放整齐。实验操作者需洗手、消毒后离去。

(8)服从卫生值日安排,认真负责地做好清洁卫生工作。离开前仔细检查水、电、门、窗等是否关好,防止发生安全事故。

实验记录与实验报告撰写要求

(一) 实验记录

对于实验过程中原始数据和现象的记录是写好实验报告的前提和保证,在做实验记录时应做到以下几点:

(1)实验记录应及时、准确、真实、详细、清楚。回顾性的记录容易造成无意或有意的失真,故实验中应及时将观察到的现象、结果等记录在笔记本或实验指导的合适位置上。

(2)完整的实验记录应包括题目、日期、主要操作步骤、实验现象及结果。使用特殊仪器时还应该记录仪器的型号。

(3)实验结果的记录不可掺杂任何主观因素,不能受现成资料或他人实验结果的影响。若出现与预期不符的现象或结果,更应如实详细记录。

(4)表格式的记录方式简练而清楚,值得提倡使用。

(5)记录时字迹必须清楚,最好用钢笔或签字笔记录,不建议用铅笔、圆珠笔等记录。

(6)实验结束后应及时整理实验记录,对实验结果进行分析和总结,撰写实验报告。

(二) 实验报告格式

实验(编号) (实验名称)

1. 实验目的和要求
2. 实验原理
3. 实验操作方法或步骤
4. 实验结果
5. 分析与讨论

(三) 实验报告撰写要求

(1)实验目的和要求:要按照本次实验的实际操作内容和授课老师的要求填写。

(2)实验原理:要根据自己的理解用简单的语言描述本次实验的基本原理。

(3)实验操作方法或步骤:要按照本次实验的实际操作过程,不能盲目抄书。

(4)实验结果:根据实验记录真实填写本次实验所得结果。

(5)分析与讨论:包括对实验方法、操作注意事项等问题的小结、对实验结果的分析与讨论、对思考题的回答、对实验中遇到的问题的描述及思考以及对实验课改进的建议等。

实验报告必须独立完成,严禁抄袭。

第一章

免疫制备技术

概 述

免疫制备技术是指制备与免疫检测有关制剂的各种技术,包括有抗原制备、抗体制备、抗体纯化及抗体标记等技术。免疫制备技术是免疫检测技术的第一步,正是由于免疫制备技术的发展,才使免疫检测技术日新月异,层出不穷,因此免疫制备技术是免疫技术不可缺少的一部分。

在免疫制备技术中,最为主要的是单克隆抗体制备技术,它大大提高了免疫检测技术的特异性和敏感性,推动了免疫检测试剂的标准化,使免疫检测技术进入了一个新的时代。

实验一 抗原的制备

【实验目的和要求】

熟悉颗粒性抗原、可溶性抗原及半抗原的制备方法和基本思路。

【实验原理】

能刺激机体免疫系统使之产生特异性免疫应答,并能与相应免疫应答产物,即抗体和致敏淋巴细胞,在体内外发生特异性反应的物质称为抗原或免疫原。前一种性能称为免疫原性,后一种性能称为反应原性。凡是具有这两种性质的物质称为完全抗原,如大多数蛋白质、细菌、病毒等。只具备反应原性而无免疫原性的物质称为半抗原或不完全抗原,如大多数多糖、类脂和某些药物。抗原按其来源可分为外源性抗原和内源性抗原,外源性抗原又可分为天然抗原、人工抗原、合成抗原与基因工程重组抗原。绝大多数天然抗原不是单一成分,在制备抗体时可按需要进行纯化。将半抗原或合成肽通过与载体蛋白连接制备成的具有免疫原性的化合物,分别称为人工抗原和合成抗原。

抗原的制备包括完全抗原的制备和人工抗原的制备,主要用于制造免疫用疫苗或进行抗体的检测。针对不同的抗原特性可以选择不同的制备方法。抗原的制备工作涉及物理学、化学和生理学等许多领域的知识。根据物理或化学特性建立起来的分离、纯化方法的主要原理不外乎2个方面:①利用混合物中几个组分分配率的差别将它们分配到可用机械方法分离的2个或几个物相中,如盐析、有机溶剂抽提、层析和结晶等;②把混合物置于单一物相中,通过物理力场的作用使各组分分配于不同的区域而达到分离的目的,如电泳、超速离心和超滤等。由于组织细胞内存在着许多分子结构和理化性质不同的抗原物质,其分离方法也不一样,就是同一类大分子物质,因选材不同,所使用的方法也有很大差别。因此很难有一个通用的标准方法供提取所有生物活性物质使用,所以在提取前必须针对所欲提取的物质,充分查阅文献资料,选用合适的方法。如果要提取一个结构及性质未知的抗原物质,更需要经过各种方法的比较探索,才能找到一些工作规律和获得预期的效果。

下面仅以点带面地介绍一些常用抗原的制备过程。

【操作方法】

(一) 颗粒性抗原的制备

颗粒性抗原主要包括各种动物细胞抗原以及各种细菌抗原,有些细胞膜亦可制成颗粒性抗原。通常颗粒性抗原悬液呈混浊状或乳浊状。

1. 绵羊红细胞抗原的制备

(1)取抗凝或脱纤维蛋白的绵羊血液加倍量生理盐水,以2 000 r/min离心5 min,吸弃上清液。

(2)再加2~3倍生理盐水,用毛细滴管反复吹吸混匀,以2 000 r/min离心5 min,吸弃上清液。如此一共连续洗涤3次。

(3)最后一次可离心10 min,红细胞密集管底,上清液呈无色透明。

(4)弃去上清液,管底即为洗涤过的红细胞,再根据需要配成不同浓度的红细胞悬液。

2. 伤寒杆菌菌体抗原的制备

(1)取伤寒杆菌标准菌株的光滑型菌落,接种于普通琼脂培养基(或SS琼脂平板培养基),均匀涂布,37℃温箱培养24h后取出。

(2)用适量生理盐水洗下菌苔,移入含无菌玻璃珠的三角烧瓶中,充分振摇使菌体均匀分布,置100℃水浴2~2.5h杀菌及破坏鞭毛抗原。

(3)把菌悬液移入离心管,以4000 r/min离心10 min,弃去上清液。

(4)菌体再用无菌生理盐水洗涤,以4000 r/min离心10 min,弃去上清液。

(5)沉淀做无活菌检测,合格后再用无菌生理盐水稀释成含细菌10亿个/mL的菌悬液,加5%石炭酸,即成菌体抗原,置冰箱中于4℃保存备用。

3. 伤寒杆菌鞭毛抗原的制备

(1)在鞭毛典型的伤寒杆菌标准菌株划线接种培养的平板上,挑选典型的光滑型菌落接种于普通培养基,均匀涂布,置37℃温箱培养24h后取出。

(2)用适量含0.4%甲醛的生理盐水洗下菌苔,移入无菌三角烧瓶中,置37℃水浴24h(或4℃3~5h固定杀菌)。

(3)将处理过的菌液进行无活菌检验,证实无活菌存在。

(4)用生理盐水稀释成含细菌10亿个/mL的菌悬液,即成鞭毛抗原,置冰箱中于4℃保存备用。

4. 大肠杆菌菌毛抗原的制备

(1)将可产生肠毒素的大肠杆菌K88标准菌株先接种于酪蛋白胰酶水解物大豆胨汤内,37℃培养18h。

(2)取上述培养物再接种于装有胰蛋白酶解酪蛋白大豆胨琼脂(TSA)的容器中,37℃培养18h。

(3)用0.1 mol/L pH7.0~7.2的PBS将菌苔洗下,制成较浓的菌液。

(4)62℃水浴中加热20~30 min,不时振荡,使K88菌毛从菌细胞上脱落。

(5)以8000 r/min离心20~25 min,取上清置4℃保存2 d。

(6)再以8000 r/min离心20~25 min,去除沉淀,上清液在搅拌下逐步滴加10%醋酸溶液,将pH值调至4.5,此时可见液体呈一致混浊。

(7)4℃下静置过夜,使K88菌毛呈絮状沉淀。

(8)次日,以8000 r/min离心30 min,取沉淀物用pH4.5生理盐水离心洗涤2~3次,最后一次离心沉淀物用少量0.01 mol/L pH7.0的PBS溶解。

(9)以8000 r/min离心20~25 min后,取出上清液即为粗制的K88抗原液。

(10)将粗制抗原液经预先用0.01 mol/L pH7.0的PBS平衡的Sephadex G200柱进一步层析纯化,用平衡柱床的PBS作为洗脱液,流速为1 mL/min,以紫外吸收仪及自动电位差记录仪检测并记录洗脱的蛋白质峰。将第一峰的各管蛋白洗脱液合并,即为纯化的K88抗原。

(二)可溶性抗原的制备

糖蛋白、酶类、脂蛋白、脂多糖、细菌外毒素、补体等可溶性抗原大部分来自于组织和细胞,其成分比较复杂,通常需要将组织和细胞破碎,再经过一定的方法纯化,才能获得所需的可溶性抗原。

1. 组织和细胞粗抗原的制备 如抗原来源于动物的组织或细胞,则这些材料在提取可溶

性抗原之前,必须先进行预处理,以适合于进一步纯化。

(1)组织细胞抗原的制备:所用组织必须是新鲜的或低温保存的。器官或组织材料取得后应立即去除表面的包膜或结缔组织以及一些大血管。脏器应用生理盐水进行灌洗,以去除血管内残留的血液及有形成分,再用 0.5 g/L NaN_3 生理盐水洗去血迹及污染物。在冰浴中将洗净的组织剪成小块,然后进行粉碎。粉碎的方法有如下两种:

①高速组织捣碎机法:将小块组织加一定量的生理盐水(约 1/2)装入捣碎机内,以 1 000 r/min 间断进行破碎,每次 30~60 s,时间过长会导致产热。

②研磨法:用玻璃匀浆器或乳钵研磨,主要经过旋转、挤压将组织粉碎。该方法可用于韧性较大的组织,如空腔器官、皮肤等。有时在研磨时加入淘洗过的海砂能更有效地研磨组织。

(2)组织匀浆液以 2 000~3 000 r/min 离心 10 min 后可分为 2 个部分,沉淀物内含有大量的组织细胞和碎片,上清液可用于提取可溶性抗原。

(3)上清液在提取前还必须以 10 000~20 000 r/min 离心 20~30 min,以去除微小的细胞碎片及微小组织,使上清液澄清透明。

2. 组织细胞或培养细胞可溶性抗原的制备 制备抗原的细胞包括正常细胞、传代细胞或病理细胞(如肿瘤细胞)。组织细胞的制备一般通过上述机械捣碎后获取,也可通过胃蛋白酶或胰酶消化细胞间质蛋白,获取游离的单个细胞。细胞抗原一般分为 3 种组分:膜蛋白抗原、细胞质抗原(主要为细胞器)、细胞核与核膜抗原。3 种抗原的制备均需要将细胞破碎,其基本方法有如下几种:

(1)酶处理法:可用溶菌酶、纤维素酶、蜗牛酶等,在一定条件下能消化细菌和组织细胞,如溶菌酶在碱性条件下对革兰氏阳性菌细胞壁有溶解作用。酶破坏细胞具有作用条件温和,细胞壁破坏的程度可以控制,内含物成分不易受到破坏等特点。该法适用于多种微生物。

(2)反复冻融法:将细胞或整块组织置冰箱内冻结,然后置室温融化,如此反复两三次,大部分组织细胞及细胞内的颗粒可冻融、破碎,原因是细胞突然冷冻,使细胞内水分结晶以及细胞内外溶剂浓度突然改变而导致细胞膜和颗粒破坏。该法适用于对组织细胞的处理。如要提取病毒蛋白质或核酸,可用类似的冷热交替法,先将待破碎物投入沸水中,约在 90 °C 维持数分钟后,立即移至冰浴迅速冷却,同样可使大部分微生物细胞破坏。

(3)超声破碎法:是利用超声波的机械振动而使细胞破碎的一种方法。由于超声波发生的空化作用,使得液体形成局部减压引起液体的内部发生流动,漩涡生成与消失时,产生很大的压力使细胞破碎。超声波所使用的频率 1~20 kHz 不等,应间歇进行,避免因长时间处理导致温度升高而破坏抗原。通常一次超声 1~2 min,总时间为 10~15 min,该法具有操作简单、重复性较好的特点,常用于处理微生物和组织细胞。

(4)表面活性剂处理法:在适当的温度、pH 值及低离子强度的条件下,表面活性剂能与脂蛋白形成微泡,使膜溶解或渗透性改变。常用的表面活性剂有十二烷基磺酸钠(SDS 阴离子型)、二乙胺十六烷基溴(阳离子型)、聚山梨酯(非阳离子型)、苯扎溴铵等。此法常用于破碎细菌,且作用比较温和,在提取核酸时也常用此法破碎细胞。

(5)自溶法:利用组织和微生物自身的酶系统,在一定的 pH 值和温度下,使其细胞裂解。自溶的温度,对动物组织常选 0~4 °C,而对待微生物常选室温(22~25 °C)。自溶时常需要加入少量防腐剂,如甲苯或氯仿等,因 NaN_3 抑制酶的活力,故本法中不宜使用。

3. 病毒衣壳蛋白抗原的制备 在没有囊膜的病毒中,衣壳就是病毒粒子的外壳,衣壳蛋

白抗原即为纯化的病毒粒子,方法可参照病毒提纯。在有囊膜的病毒中,只有通过理化方法使囊膜蛋白和衣壳蛋白分开,才能得到衣壳蛋白抗原。下面以传染性牛鼻气管炎病毒为例介绍衣壳蛋白抗原的制备。

(1)将病毒接种于敏感细胞单层(如 MDBK 细胞),在 37 °C 吸附 1 h,然后倾去含毒液,加入含 2% 犊牛血清的 MEM 培养液。

(2)37 °C 培养 24~48 h,待细胞单层 80%~90% 出现细胞病变时,将培养瓶置于 -70 °C 冻融 3 次,或经超声波裂解等使病毒从感染细胞中释放出来。

(3)再经 6 000~8 000 r/min 离心 30 min,除去细胞碎片。

(4)上清液经 30% 蔗糖垫底以 25 000 r/min 离心 90 min,收集沉淀再经 20%~45% 线性蔗糖梯度 25 000 r/min 离心 14 h。

(5)收集病毒带加少量 0.01 mol/L pH7.2 的 PBS 稀释,再以 25 000 r/min 离心 90 min,病毒沉淀悬浮于 PBS 中,即为纯化的病毒粒子。

(6)病毒粒子经 NP-40(最终浓度为 1%)45 °C 作用 20 min,即可得到除去囊膜的衣壳蛋白抗原。

4. 类脂多糖抗原的制备 类脂多糖如细菌脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的重要成分,有多种生物学效应,通常采用苯酚法提取 LPS。

(1)将干燥的菌体在水中混匀,加热后加入同温的苯酚,激烈搅匀,再加热 5 min,立即用冰水急剧冷却至 10 °C 以下。

(2)经离心使其分为上层的水层和下层的酚层,菌体残渣沉于底部。

(3)吸取水层(含 LPS),经透析除酚、浓缩、超速离心后,LPS 即停留在沉淀的透明胶状部分中。把它分离出来并重悬于水中,再进行离心即可获得纯化的 LPS 样品。

(三)半抗原性免疫原的制备

半抗原是低分子量的化学物质,例如多糖、多肽、脂肪胺、核苷、某些药物以及其他化学物品等。这些小分子物质无免疫原性,只有把这些半抗原与蛋白质载体或与高分子聚合物连接在一起后,才能刺激机体产生特异性抗体或致敏淋巴细胞。载体有蛋白质类、多肽聚合物、大分子聚合物和某些颗粒。半抗原-载体的连接方法有碳化二亚胺法、戊二醛法、氯甲酸异丁酯法、琥珀酸酐法等。下面以盐酸克仑特罗人工抗原为例来介绍半抗原性免疫原的制备。

(1)称取已纯化的盐酸克仑特罗 100 mg,加 1.0 mol/L HCl 2.0 mL 溶解,再加双蒸水 5 mL。

(2)在 4 °C 下连续向盐酸克仑特罗溶液中加入亚硝酸钠(60 mg NaNO₂溶于 0.5 mL 水中),每次加 100 μL,间隔约为 15 s。保持 4 °C 恒定搅拌 1 h。

(3)滴加氨基磺酸铵溶液(100 mg 溶于 0.5 mL 水中),每次加 100 μL,直至不产生氨气气泡,溶液 4 °C 下过夜。

(4)将偶氮化的克仑特罗溶液慢慢加入牛血清白蛋白中,期间 pH 值保持在 7.5~8.0 之间(1.0 mol/L NaOH 调节),反应过夜(要求搅拌)。

(5)反应过夜的偶联物用 pH7.4 的 PBS 透析 24 h 后再用双蒸水透析 48 h。

(6)透析好的偶联蛋白冷冻干燥,存放于 4 °C 备用。

【注意事项】

1. 载体的选择 载体有蛋白质类、多肽聚合物、大分子聚合物和某些颗粒,在实际应用