

现代免疫化学技术

李成文 编著



上海科学技术出版社

现代免疫化学技术

李成文 编著

上海科学技术出版社

(沪)新登字 108 号

责任编辑 柯如仙
特约编辑 王国晨

现代免疫化学技术

李成文 编著

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所发行

北京军事医学科学院情报研究所印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 9.25 字数 204 000

1992 年 4 月第 1 版 1992 年 4 月第 1 次印刷

印数 1-3000

ISBN 7-5323-2660-8/R·801

定价: 4.75 元

2077/69

内 容 简 介

《现代免疫化学技术》是以作者从事 20 多年免疫化学研究和教学工作中所建立的免疫化学方法、技术为主，并结合免疫化学及有关学科的临床、教学、科研与生产开发的需要，系统编写的新技术和新方法的参考工具书。

全书按照免疫化学的研究周期和实验程序，介绍了各种常用的盐析、脱盐、稀蛋白液的浓缩和蛋白浓度测定技术；适合于免疫化学技术特点的各种离子交换层析、凝胶过滤层析及多种亲和层析技术，其中有作者建立的简便快速、效果满意的各种动物血清及单克隆抗体 IgG 的纯化技术；操作详细的免疫双向扩散、单向扩散及逆向扩散技术；广泛使用的微量免疫电泳、对流免疫电泳、火箭免疫电泳及作者首建的定量定性可同时完成的免疫火箭电泳；具有特异快速不需脱色的各种聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)、SDS-PAGE、等电点聚焦电泳及西方转移电泳等；并介绍由作者建立的各种免疫荧光标记、酶标记、生物素与亲和素标记及免疫金银标记等技术；人与各种医学实验动物血清 IgG、IgA、IgM 与相应的 Fab、F(ab)₂、Fc、重链与轻链的制备纯化与分析鉴定技术；抗血清的制备技术等。书末附有英汉名词对照。

本书内容新颖、实用，可供免疫学、免疫化学及医学生物学各学科中的教学、科研与临床工作者、学员使用。

序 言

早在 100 多年前，伟大的法国生理学家伯纳 (Claude Bernard) 就指出：“在实验科学中，一切进步都与研究手段的改进密不可分。整个实验医学的未来，决定于创立一种研究方法，这种方法既能对正常的，又能对异常的生命状态进行卓有成效的研究。……每当出现一种新的、可靠的实验分析技术，我们总会看到有关的科学取得进展。”本世纪生物医学的发展，有力地证实了伯纳的科学论断。如本世纪初开始建立随后又不断改进和发展的色谱（层析）技术，30 年代发展起来的电泳技术，使不同生物分子（特别是大分子）的分离纯化得以实现，从而使这些生物分子的结构和功能得以阐明，如血浆成分、免疫球蛋白成分等，使生物科学和医学的许多问题迎刃而解；50 年代发展起来的免疫电泳技术，将理化分离方法和免疫学方法结合为一体，使许多有关的免疫化学问题迅速得到解决；50 年代发展起来的免疫标记技术，促成了细胞免疫化学、免疫病理学、免疫测定等新分支学科的建立，并分别取得了一系列的重大成果。

免疫化学技术是一门内容十分丰富的现代技术学科，它是物理化学、生物化学和免疫学技术相互渗透和结合的产物，应用非常广泛，是现代生物医学研究和实际工作、特别是临床检验中不可缺少的工具。例如，一个临床检验实验室水平的高低，在一定程度上可从它使用的免疫化学技术的多少和掌握的熟练程度衡量出来。

近 20 年来，我国在免疫化学技术的发展和应用中已取

得了较大的成就，但和国外先进水平相比，在仪器设备、试剂品种质量等方面，仍有相当大的差距，亟待同行们急起直追，迎头赶上，尽快使我国的免疫化学技术水平跨入世界先进行列，为振兴中华贡献自己的力量。

为推动我国免疫化学技术的迅速发展，以及促进免疫、生化等学科的进步，本书作者总结了自己 20 多年来从事免疫化学科研与教学工作中丰富的实践经验，较系统地总结了具有独创性建立起来的方法和 80 年代新技术，编写了这本《现代免疫化学技术》。本书具有理论结合实践的实用性，内容全面系统和先进性，它可作为免疫、生物化学及免疫化学等学科工作者的一本较好的工具书。我们期待它在发展我国免疫学技术方面起到积极的促进作用。

黄 策

1990 年 5 月于北京

前 言

免疫化学是一门将免疫与生物化学相结合而发展起来的新兴边缘科学，也是一门为分子生物学和分子免疫学奠定基础的技术性很强的学科。在 1890 年，德国细菌学家埃利希在研究毒素与抗毒素反应中首创了免疫化学的课题；1907 年，由瑞典的物理化学家 Arrhenius 首先确定了“Immunochemistry”即“免疫化学”这一名词。在近代日本的书籍中，有的仍沿用免疫生物化学的概念，其实质与内容二者完全一致。

免疫化学研究的物质基础是抗原和抗体，近代的免疫化学中还扩展至补体系统各成分的研究。免疫化学研究的重要内容包括抗体的蛋白质化学本质，抗原与抗体反应的机理，以及抗体的制备、纯化、定量、鉴定和应用等方面的理论和技术。

免疫化学是一门实验技术很强的学科，它既保留与沿用着古老的免疫学方法，也大量地植入了先进的生物化学和生物物理等技术。继 1938 年 Tiselius 用电泳方法证明抗体是 γ -球蛋白之后，1959 年由生物化学家 Porter 和 Edelman 分别用酶与化学试剂开始研究了抗体分子的结构，迄今仅有 30 余年。免疫化学发展之快，不仅成为一门独立学科，而且成为医学与生物学基础学科中必修之课。自 70 年代以来，国外先后出版了全面系统的免疫化学技术专著，和单项技术的书籍。国内除在某些免疫学技术书中略有介绍，十年前有过一本免疫化学技术出版外，至今未有增补新版，在技术更新十分迅速的今天，远远不能满足我国医学基础学科的

工作需要。本人在总结 20 多年科研工作的基础上，以自己工作中建立并经过科研与临床应用的技术和方法为主，也编入了部分独创性的技术，如快速特异的蛋白染色方法，羊血清抗体的快速纯化技术等，编就了《现代免疫化学技术》一书，以供从事医学生物学工作者参考。

由于作者水平有限及免疫化学技术发展较快，书中不足之处在所难免，敬请读者批评指正。

李成文

1990 年 5 月于北京

目 录

第一章	蛋白溶液的盐析脱盐浓缩与定量	1
一、	蛋白质溶液的盐析技术	1
二、	含盐蛋白溶液的脱盐方法	3
三、	蛋白溶液的浓缩	6
四、	蛋白溶液浓度的定量测定	8
第二章	层析技术	13
一、	凝胶层析	13
二、	离子交换层析	25
三、	特异亲合层析	36
四、	特异吸附层析	44
第三章	电泳技术	52
一、	各种类型的免疫电泳	52
二、	三种聚丙烯酰胺凝胶电泳	62
三、	醋酸纤维素膜及琼脂糖凝胶电泳	81
四、	转移电泳及免疫印迹技术	83
第四章	免疫标记技术	87
一、	荧光素标记蛋白技术	87
二、	酶标记抗体	109
三、	亲合素与生物素标记技术	120
四、	同位素标记抗体技术	159
五、	化学发光免疫标记技术	162
六、	胶体金银免疫标记技术	165

第五章	免疫扩散技术	182
一、	双向免疫扩散技术	182
二、	单向免疫扩散技术	185
三、	逆向免疫扩散技术	187
第六章	血浆蛋白的纯化与鉴定技术	191
一、	免疫球蛋白(Ig)的分离纯化	191
二、	免疫球蛋白多肽链的制备与纯化	205
三、	免疫球蛋白多肽链碎片的制备与纯化	212
四、	单克隆抗体的纯化技术	217
五、	免疫球蛋白的分析与鉴定	231
第七章	抗血清的制备技术	235
一、	免疫原的制备	235
二、	动物免疫	236
三、	试血及效价测定	236
四、	免疫动物血液采集及抗血清分离	237
五、	抗血清的鉴定及分装保存	238
附录	239
一、	常用免疫化学器材和试剂的性能	239
二、	常用生化试剂的配制	254
三、	缓冲溶液的配制	259
四、	抗血清制备的免疫方案	268
五、	人血浆蛋白的分子参数	275
英汉名词对照	279

第一章 蛋白溶液的盐析脱盐 浓缩与定量

无论是经典的或是最新发展的免疫化学技术，都离不开某些常用的基本技术，像蛋白质溶液的盐析，脱盐，稀蛋白溶液的浓缩及蛋白浓度的定量等，这些技术虽沿用已久，但今天在各个领域中仍有不同程度的使用。技术虽还广泛应用，却没有详细的论述与介绍，经多年实践应用，现加以总结归纳如下。

一、蛋白质溶液的盐析技术

【基本原理】 蛋白质是一种高分子亲水胶体，当向蛋白质溶液中加入一定浓度的中性盐之后，作为脱水剂的盐离子可与大量的蛋白质分子外部水化层相结合，使亲水胶体的蛋白质与水化层解体，从而使失去水化层的蛋白彼此互相撞击，由于分子的内聚力及静电引力形成较大的聚集体，逐渐地浑浊而沉淀出来。从而改变了蛋白质分子的溶解性，破坏了蛋白质胶体溶液的平衡状态。这种通过加入不同浓度的中性盐而分别使蛋白质从溶液中沉淀出来的过程常称为盐析。

【盐析方法】 蛋白质溶液的盐析技术，根据盐析的对象不同，或盐析的盐种类和盐浓度不同而分成各种盐析方法。

1. 根据盐析时所使用的盐类别分为，中性盐盐析，如硫酸铵、硫酸钠和硫氰酸钾沉淀等；有机酸盐盐析，像利凡诺（Rivanol）沉淀，早在 1956 年就用于血浆蛋白的分级沉淀；其他还有聚乙二醇、辛酸等沉淀也都较为常用，可取得较好效果，这些多是以盐的名称命名的。

2. 根据盐析时使用盐浓度分为，单一的盐浓度盐析，多用于稀蛋白溶液的浓缩，像用 DEAE-纤维素(DE-32)吸附法纯化后兔 IgG，所得产品的 IgG 浓度较低，可用 50%饱和硫酸铵盐析沉淀 IgG 达到浓缩作用；另一种是不同浓度盐分段盐析制备较纯的蛋白，或者用不同饱和度盐制备不同的蛋白。例如可用 50%和 33%饱和硫酸铵溶液分段盐析四次而纯化人血清 IgG 和兔血清 IgG 等。具体操作方法详见第六章内容。

在上述盐析方法中，有用固体盐直接加入被盐析的样品，也有将盐配成一定饱和度后再加入样品进行盐析的。

【盐析技术的注意事项】

1. 被盐析的蛋白质分子最好要处于它的 pI 值附近，因为处于 pI 的蛋白质分子是电中性，正负电荷相等，此时最易沉淀，不仅回收量较高，且纯度较好，其他杂蛋白的共沉作用较少。

2. 严格控制盐析的盐浓度，操作中要防止局部盐浓度过高，使不希望的蛋白成分共沉下来，要在温和搅拌（不起泡沫）或均摇条件下逐滴加入。

3. 盐析时要根据样品不同，如不同的动物血清，沉淀同一类蛋白质分子时仍要有不同的条件。像沉淀人血清 IgG 可用 33%饱和度硫酸铵，而沉淀小鼠血清 IgG 要用 40%的饱和硫酸铵回收较高。

4. 要使盐析蛋白质回收量较高, 除上述三点外, 还要做到充分沉淀。第一步沉淀血清球蛋白时, 最好要做到 4℃ 过夜沉淀, 否则回收量明显减少。其次, 最好采用高速低温离心, 可省时又回收量大。如低速室温离心, 应延长离心时间, 并注意离心中的升温现象对蛋白活性的破坏作用。

二、含盐蛋白溶液的脱盐方法

采用盐析技术或离子交换层析等方法制备蛋白质样品时, 都会使蛋白质溶液中含有较高的盐离子, 须用各种脱盐方法除去。通常说的脱盐是指从高分子溶液中去掉其中的盐离子以及少量其他低分子量物质的过程。

目前常用的脱盐方法, 有半透膜透析法、凝胶过滤法和超过滤脱盐法等。

【半透膜透析脱盐法】 半透膜透析脱盐, 主要使用透析袋或玻璃纸。不同规格的透析袋都能阻止分子量 10 000 的物质通过。根据脱盐样品体积选择合适大小的透析袋, 检查是否漏液, 装样时要留有一定空体积并排出空气。透析时, 视情况可进行静止透析、流水透析或搅拌透析。透析液可先用自来水或蒸馏水, 再换成低渗缓冲液, 需要时最后可选用所希望的缓冲液透析, 以达到既脱盐又平衡其样品中的离子强度及 pH 值。

硫酸铵的脱盐效果检查, 当透析 IgG 类蛋白时, 最好用含有 NaCl 的 PB 透析, 用 BaCl₂ 检查 SO₄²⁻ 的有无, 用纳氏试剂检查 NH₄⁺ 离子的存在与否 (BaCl₂ 与 SO₄²⁻ 反应生成白色沉淀, 纳氏试剂同 NH₄⁺ 生成橘黄色沉淀)。

【凝胶过滤脱盐法】 凝胶过滤脱盐的基本原理和操作

技术可参考第二章凝胶层析部分，用于脱盐的技术关键有以下几点：

(一) 凝胶的选择 根据要脱盐样品中生物大分子物质的分子量，选择能够全排阻硬胶（交联度高），像中等粒度的葡聚糖凝胶（Sephadex）G-25、G-50 或生物凝胶（Bio-Gel）P-30 等。

(二) 装柱与加样 用于脱盐的凝胶柱的大小取决于要脱盐样品的体积，或者根据胶柱总体积的 15%~20% 以下加样，如加样大于 20% 则造成蛋白峰尾部和洗下的盐离子相混，即收集的样品脱盐不彻底。

(三) 蛋白样品的洗脱与监测 用于脱盐的层析柱洗脱液要求不严，一般多采用磷酸盐缓冲生理盐水，或根据下步实验对样品要求的溶液作为洗脱液。洗下的蛋白样品可用紫外监测仪 OD_{280nm} 监测，也可以用 20% 磺基水杨酸滴定，该试剂同蛋白溶液产生白色沉淀，灵敏度可到每毫升 500~1000 μ g 的蛋白。其盐离子的监测同半透膜透析脱盐对盐离子的测定。

(四) 凝胶柱的再生 收集完蛋白样品，或待 OD_{280nm} 约为 0.001 时，继续用洗脱液充分洗净柱中的盐离子后即为再生，加入少量 0.02% NaN_3 液平衡柱子后可保存备用。

【超过滤脱盐法】 超过滤是用一种高效分子滤膜过滤的新技术。目前国内外已有各种分子孔径的滤膜及各种类型的超滤器。超滤技术具有简便快速，不改变样品的理化及生物活性，较广泛地用于高分子物质的分离、纯化、浓缩与脱盐等方面。蛋白溶液的脱盐技术有以下几个步骤。

(一) 超滤膜的选择与鉴定 用于超滤脱盐的滤膜，应选择让盐离子通过，而阻留生物大分子物质的孔径的膜，可

根据蛋白质分子量大小而确定。对于只知道孔径而不知道分子量阻留范围的膜，应进一步作滤膜的鉴定。鉴定的内容和方法为：

1. 滤膜厚度 可用游标卡尺测量厚度。

2. 对水的流速测定 以 294.2kPa 氮气压力，分别测定对水和 0.1% 的不同分子量蛋白溶液的过滤速度，通常以 $\text{ml}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ 计算。

3. 不同分子量蛋白质截止率的测定 通常用 294.2kPa 氮气压力，测定不同分子量的 0.1% 蛋白溶液的截止率。再分别测定其超滤前后的 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 值，根据下式计算其超滤对某一蛋白的截止率。一般认为某一滤膜对某个蛋白质溶液的截止率 75% 左右即可用于对该蛋白溶液的脱盐和浓缩。

$$\text{蛋白质的截止率} = \frac{\text{样品OD}_{280\text{nm}} - \text{滤液OD}_{280\text{nm}}}{\text{样品OD}_{280\text{nm}}} \times 100\%$$

(二) 超滤器的构造及组装 超滤器可分为：①平板膜式超滤器，它有不锈钢制或有机玻璃制的滤室。②塑料（尼龙）材料制的超滤离心管。③中孔纤维超滤柱。其中，以膜式超滤器较为经济，目前使用广泛，在此作一介绍。

1. 膜式超滤器的构造及组装 超滤器的构造主要由三个部分组成。超滤器，纯氮供压系统（包括氮气钢瓶、减压阀、耐压管）及电磁搅拌器（见图 1-1）。根据脱盐样品的要求，可将超滤器装置在室温下操作，或置于 2~4℃ 条件下进行。

超滤器，有机玻璃滤室，均有不同规格，最大容量为 280ml，上有加样和压力进气嘴，下端有抽样孔，座上有螺母，用螺钉固定于滤器底盘上。滤器底盘为黄铜或不锈钢等

制成。边上有一滤液出嘴。在滤室与底盘之间有一尼龙筛板及橡皮垫圈。用时滤室装一个搅拌棒。

工作压力由压缩氮气钢瓶通过减压阀，自滤室上方进气管口维持 294.2kPa 左右，由减压阀控制氮气压力。(进气压力大小，可根据滤室材料要求而定。)

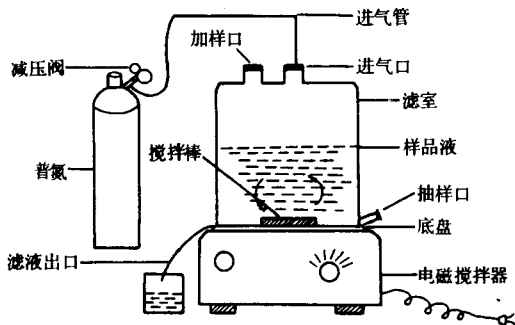


图 1-1 超滤浓缩装置图示

2. 组装超滤器的检查 组装好滤器、滤膜及压力装置，先加入少量水于滤器中。关闭气口，打开滤液嘴，未见有水流出现认为滤膜无漏孔即为可用。再打开进气孔，调至 294.2kPa 压力，同时观察滤器的螺钉等处有无漏水。如有应重新拧好螺钉，直到无漏水为止。

3. 含盐蛋白样品的超滤脱盐 当采用超滤法脱盐时，方法操作简便，一般可用蒸馏水或缓冲液在滤器中反复稀释浓缩数次，则可达到样品的脱盐效果。

三、蛋白溶液的浓缩

蛋白溶液的浓缩技术，目前常用的有化学吸水剂浓缩、

透析袋表面蒸发浓缩、超滤浓缩及冷冻干燥浓缩等方法。

【化学吸水剂浓缩法】 将浓缩前的蛋白液装入透析袋中，把透析袋外边覆盖上干的吸水剂，像聚乙二醇（PEG）或者聚乙烯吡咯烷酮（polyvinyl pyrrolidone, PVP）等。也可以将装有样品的透析袋浸于20%~30%PEG溶液中，浓缩至所需体积，即可将样品取出。

当要浓缩小体积的样品时，也可以用交联度高的凝胶颗粒，如Sephadex G-25，或干燥的聚丙烯酰胺凝胶条（T>10%以上）直接放到待浓缩的样品液中，当凝胶膨胀后即吸收部分水分以达到浓缩目的。

【蒸发浓缩法】 将待浓缩的溶液置于透析袋中，然后将透析袋挂在冰箱内，或用电扇吹风。水分通过半透膜扩散并蒸发。此法虽简便易行，但效率低。且浓缩后样品盐分高，适宜小体积、时间不紧迫的情况下采用。

【超过滤浓缩法】 超过滤法浓缩各种大分子溶液，具有速度快、不影响生物活性、不消耗任何试剂，同时还可以将脱盐和去除小分子杂质相结合等优点，它是当前免疫化学与生物化学采用浓缩技术中的最佳方法。操作步骤同脱盐。

【冷冻干燥浓缩法】 生物样品的冷冻干燥方法，既是制备永久或长期保存样品的手段，也是浓缩高分子溶液的较好方法，在具备冷冻设备的条件下都可以采用。其主要技术要点有：①样品的处理，如果干燥前样品浓度低于1mg/ml，或者冻干过程会破坏部分生物活性，需要预先加入一定浓度的蛋白保护剂。②预冷样品，常用乙醇干冰或低温冰箱预冻，将蛋白液薄薄地预冻在干燥的容器壁上。③低温干燥，因干燥机种类多，操作不一，不再赘述。