

刘彦仿 主编

# 免疫组织化学

• 人民卫生出版社 •



# 免疫组织化学

刘彦仿 主编

人民卫生出版社

*Contraction*

免疫组织化学  
刘彦仿 主编

人民卫生出版社出版  
(北京市崇文区天坛西里10号)  
河北永清第一胶印厂印刷  
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 22印张 4插页 511千字

1980年4月第1版 1988年4月第1版第1次印刷

印数: 00,001—5,010

ISBN / 117-01118-1 / R · 1119 定价: 11.50元

[科技新书目209—153]

## 编 者

王文亮	第四军医大学	张月娥	上海医科大学
王伯法	第四军医大学	张华忠	上海医科大学
王宝美	上海第二医科大学	侯健存	中国医学科学院基础所
王保乐	陕西省中医药研究院	洪松芳	军事医学科学院五所
刘季和	中国医学科学院皮肤病研究所	胡瑞德	中山医科大学
刘尚廉	上海医科大学	贾心善	中国医科大学
刘彦仿	第四军医大学	郭慕依	上海医科大学
艾民康	同济医科大学	隋延仿	第四军医大学
司履生	西安医科大学	梁英锐	湖南医科大学
朱长庚	同济医科大学	黄高昇	第四军医大学
严庆汉	北京铁路中心医院	龚伊红	中国医学科学院基础所
苏勤	第四军医大学	谭郁彬	天津医科大学
杨景山	北京医科大学	戴益民	第二军医大学

2077/18

## 序 言

免疫组织化学或免疫细胞化学，是组织化学的一种，是在组织及细胞上进行的一种化学反应。目的在于利用化学反应所呈现的颜色变化，在原位上确定组织、细胞结构的化学成分或化学性质。但是，免疫细胞化学与一般组织化学不同，是用免疫学的方法，更确切地说，用抗原抗体反应来实现上述目的，因而被称为免疫细胞化学。本来抗原抗体反应在显微镜下是很难直接看到的。但是若能在抗体上标记可以呈色的物质，就能使抗体抗原反应清晰可见。所以免疫组织化学的概念和本质就是用标记的抗体追踪抗原，以确定组织和细胞中的某种化学物质。当然有时也可用标记的抗原寻找抗体。因此标记是关键。目前一致公认Coons是免疫细胞化学的奠基人或创始人，他通过几年的努力，终于在1950年用荧光素标记抗体获得成功，开创了免疫细胞化学这一新的领域。组织化学一般有很大的局限性，一种方法只能解决一种或一类成分的定位问题。由于组织化学成分种类繁多，其检出方法及条件各异，因而普遍掌握极其困难。Coons氏开拓的方法，虽然手续繁杂，但却有“一通百通”的优点，即用一种基本方法能定位许多组织成分，只要这种成分是蛋白或复杂的脂质及糖类，甚至小肽，在理论上都可以被用作抗原，制出相应抗体，来进行其定位或示踪。

如前所述，免疫组织化学是用特殊标记物标记抗体或抗原，通过抗原抗体反应来检测组织细胞中化学物质的，所以应是标记组织化学。但标记组织化学并非一定是免疫组织化学，10多年来又陆续发现了许多有双价或多价结合能力的物质，如植物凝血素等。它们一方面能与荧光素、酶等标记物结合，一方面又可以与组织细胞某种成分结合。这种利用一种物质对某一组织成分的亲合能力发展起来的细胞、组织化学，称之为亲合组织化学。虽有人认为它们是免疫组织化学的进一步发展，但亲合物质之间的反应并不是抗原与抗体的反应。从抗原与抗体互相亲合来看，免疫组织化学反倒应包括在亲合组织化学之中。随着亲合组织化学的发展，一些亲合物质又被引入免疫细胞化学，使两种细胞化学技术融合为一种方法，明显提高了细胞化学定位的准确性。不过在理论及方法上，也带来了某种混乱，应予注意。

目前，许多人把免疫细胞化学与免疫病理等同起来。认为免疫细胞化学就是免疫病理，实际上二者是有区别的。狭义的免疫病理学是指研究异常免疫反应，如变态反应所引起的疾病的病理。也包括自身免疫病及免疫缺陷。广义的免疫病理学则研究所有疾病及病变发展中的免疫学机理问题。免疫病理的研究中，免疫细胞化学技术的确占重要位置，它可以确定组织内抗体、补体、抗原，并识别淋巴细胞亚群，但免疫病理的研究方法则包括其它免疫学方法及一些非免疫学方法。另一方面，免疫细胞化学也可以识别与免疫病理无关的其它许多抗原如病毒、酶、激素等等，可见免疫组织化学与免疫病理既有密切联系，又有明显区别，既有交叉又有独立的内容。

免疫细胞化学最突出的优点是：它在更广阔的范围内，把结构与功能及代谢结合了起来。能在微观世界原位地确定组织及细胞结构的化学成分，达到了方法统一，定性可靠，定位准确，定量可能的境界。从而使形态学不再是静止的形态描述，而被赋予了功

能及代谢的含意。它的微细、原位而又方法统一的优点是任何一种化学所不能替代的。愈来愈显示了它强大的生命力，在生物学、医学的各个领域中得到了日益广泛的应用。结合其它方法正为分子水平的形态学研究开拓了道路，展开了广阔的前景。

免疫细胞化学的全过程包括抗原提取、抗体制备、抗体标记、染色反应、呈色观察、细胞分析等过程。由于国际、国内市场上标记的单价或多价抗体种类日益增多，许多实验室应用现成的抗体从染色起步，可以收到事半功倍的效果。但要定位一种新的物质，发展我国自己的试剂生产，则需要更多人掌握免疫细胞化学的全部过程。

目前免疫细胞化学，不论在国内外，已发展至高潮。在抗原鉴别上有人认为可达到单个氨基酸的差别。在一定意义上，DNA原位分子杂交也应该包括在亲合细胞化学之中。免疫及亲合细胞化学正继续向着更微细、更精确的方向发展。它将通过抗原分析及合成、单克隆抗体的应用，DNA原位分子杂交以及更高倍数放大的电镜技术等，向着分子病理学的领域迈进。

为了适应免疫组织化学的发展，促进其在国内诊断病理学及其它各项研究中的应用，我们编辑了《免疫组织化学》一书。其中缺点和错误在所难免。希望广大读者批评指正。

刘彦仿

# 目 录

序 言	
✓第一章 抗原提取	1
第一节 组织、细胞抗原	1
第二节 可溶性抗原	2
第三节 颗粒性抗原	10
✓第二章 抗体制备	13
第一节 多克隆抗体的制备	13
第二节 单克隆抗体的制备	17
第三节 抗体之纯化	21
✓第三章 抗体标记	27
第一节 荧光素标记	27
第二节 酶标记抗体	33
第三节 胶体金标记	40
第四节 铁蛋白标记	44
第五节 其他标记物	45
✓第四章 细胞组织准备	47
第一节 标本取材与贮存	47
第二节 固定	49
第三节 组织脱水、渗蜡和包埋	51
第四节 切片	53
✓第五章 染色原理和方法	56
第一节 免疫荧光组织化学染色法	56
第二节 免疫酶组织化学染色的原理和方法	62
第三节 免疫金-银染色方法	70
第四节 抗原或抗体体内示踪	74
第五节 免疫组织化学的定量法	76
✓第六章 染色对照及非特异染色	80
第一节 染色对照	80
第二节 非特异性染色及其清除方法	82
第七章 亲合免疫细胞化学	90
第一节 葡萄球菌 A 蛋白	90
第二节 卵白素和生物素	92
第三节 植物凝血素	98
第四节 其它亲合细胞化学	104
第八章 免疫电镜	108

第一节	免疫电镜的概况及基本方法	108
第二节	透射免疫电镜	113
第三节	扫描及冷冻蚀刻免疫电镜	120
<b>第九章</b>	<b>双重和多重免疫标记</b>	<b>128</b>
<b>第十章</b>	<b>神经免疫细胞化学</b>	<b>143</b>
第一节	神经细胞和神经胶质细胞的特异性抗原	143
第二节	胆碱能神经元系统	143
第三节	胺能神经元系统	144
第四节	氨基酸能神经元	147
第五节	肽能神经元	148
第六节	神经递质共存及其意义	159
第七节	神经递质的临床意义	161
<b>第十一章</b>	<b>细胞内分泌学</b>	<b>165</b>
<b>第十二章</b>	<b>细胞受体及其形态定位</b>	<b>181</b>
<b>第十三章</b>	<b>基质的免疫组织化学</b>	<b>196</b>
第一节	基质的分子生物学及其功能	196
第二节	基质的免疫组织化学方法	202
第三节	基质免疫组织化学研究的病理学意义	207
<b>第十四章</b>	<b>免疫活性细胞及其肿瘤</b>	<b>214</b>
第一节	淋巴细胞的发生和分化	215
第二节	鉴别淋巴细胞亚群的McAb	217
第三节	原位识别免疫活性细胞亚群的实际应用	223
第四节	恶性淋巴瘤	230
<b>第十五章</b>	<b>肿瘤免疫组化诊断</b>	<b>239</b>
第一节	引言	239
第二节	肿瘤细胞的细胞骨架抗原	240
第三节	癌胚胎抗原	250
第四节	组织相关性抗原	254
第五节	其它抗原	265
<b>第十六章</b>	<b>自身免疫反应与疾病</b>	<b>282</b>
第一节	自身免疫病的发生机制	282
第二节	自身免疫病举例	284
第三节	免疫组化在自身免疫病时的应用	288
<b>第十七章</b>	<b>肾小球病变及其诊断</b>	<b>296</b>
第一节	肾穿刺组织的处理和检查	296
第二节	免疫荧光在肾组织内的分布	298
第三节	肾小球病变的类型及其诊断	301
<b>第十八章</b>	<b>皮肤病免疫组织化学研究</b>	<b>313</b>



第一节	皮肤病损浸润中淋巴细胞亚群及皮肤郎格罕氏细胞 .....	313
第二节	皮肤内抗体、补体等沉积 .....	315
第三节	皮肤肿瘤的免疫组化特点 .....	319
<b>第十九章</b>	<b>组织内病源体 .....</b>	<b>323</b>
第一节	病毒定位 .....	323
第二节	细菌部分 .....	337
第三节	寄生虫与霉菌 .....	339

# 第一章 抗原提取

为了用免疫组织、细胞化学方法显示组织结构的某种化学成分，或组织中的某种外来物质，必须制备抗该种物质的抗体。欲达此目的，须首先从组织、细胞中，将这种物质提取出来作为抗原，进而制备抗体，然后才可能在组织、细胞中定位这种抗原

## 第一节 组织、细胞抗原

### 一、组织、细胞抗原的类型

1. 组织、细胞结构抗原 组织、细胞的结构抗原，是从组织细胞结构成分提取的抗原。各种组织及细胞结构，都有其自身的化学组成及抗原性，有些是不同结构所共有的，即共同抗原；也有些是这种结构为主的，即该结构的相关抗原。如细胞膜抗原，其中主要是一些脂蛋白、糖蛋白及糖脂，少量为其它蛋白质。又如各种类型细胞的中丝蛋白，在化学组成上各有不同。中丝蛋白的异质性是使用中丝蛋白抗体进行肿瘤鉴别诊断的理论基础<sup>9</sup>。人们总是希望从某种细胞或某种细胞结构中提取一种特异性抗原，所谓特异性抗原是指只存在于某种细胞及结构，而不存在于其它细胞及结构的特有抗原。即指抗原质的不同，但是这种特异性往往也只是相对的。如目前所知道的许多肿瘤抗原即使不存在于人体其它细胞，有时也存在于胚胎组织，或者存在于其它种属的组织，因而称为肿瘤相关抗原。绝对特异的肿瘤抗原或其它抗原至今尚未发现。但是只要这种特异性限定在一定范畴之内，只存在于某种肿瘤细胞，而不存在于其它细胞，那么从医学的观点，从诊断、治疗病人的观点应该算是“特异性”的，也就很有用了。

所谓相关性抗原，指的是抗原量的差别。某种抗原大量存在于某种细胞，但也少量或微量存在于其它细胞。如甲胎蛋白本身是一种胚胎蛋白，不仅存在于肝细胞性肝癌及内胚窦瘤中，也微量存在于增生的肝细胞及其它细胞中。

在病理情况下，细胞结构发生变化，结构抗原也可能发生改变，如肝细胞中的中丝抗原，在酒精等中毒情况下，可以变性积聚成 Mallory小体<sup>2</sup>。其抗原性也有一定改变。

2. 分泌抗原 有分泌功能的细胞，往往在其内质网中能合成分泌抗原的前身物质。经过在高尔基体内组装，以分泌颗粒的形式存在于胞浆中，并随着细胞的分泌功能排出细胞外。如腺泡上皮的酶原颗粒、粘液细胞的粘液颗粒以及内分泌及神经细胞内的神经内分泌颗粒。以上颗粒都有其独特的分泌物，都有其独特的化学组成。如正常胃腺粘液细胞中含有中性粘液，肠化生后含有酸性粘多糖颗粒，其中含有硫酸粘液及氧乙酰化唾液酸粘液<sup>(7)</sup>。这些虽然都是粘液，其化学组成及分子结构就不完全一样。根据分泌物的不同，提取后都可能制备抗体，进行免疫细胞化学定位。各种酶类、不同激素、各种粘蛋白等都是如此。

3. 沉积抗原 这种抗原既非某一组织、细胞的结构抗原，又非分泌抗原，而是从其它部位运来，在局部沉积。有时沉积在细胞内，有时沉积在基底膜上，有时沉积在间质中。例如Ig、补体、抗原抗体复合物都容易通过血管及毛细血管沉积在肾小球基底膜、

血管以及结缔组织。在病理情况下形成的类淀粉物质，也经常沉积在基膜、Disse腔或间质之中。因而，在用免疫组织化学的方法观察组织成分时，要区别哪些是原来的组织结构，哪些是由其它部位转运来的沉积物。

4. 入侵抗原 由于感染、注入和接种等，非机体的成分也能进入组织内，并不是机体本身的抗原。属于这一类抗原的主要有各种病原体，如病毒、细菌、真菌及寄生虫等。这些病原体也可用各自的特异性标记抗体进行识别。但由于它们侵入机体组织或细胞，所以进行免疫组织化学观察时，除了涉及特异性抗体的一些问题外，还会遇到组织切片及细胞涂片标本的制备、熟悉组织及细胞特点以及消除非特异染色等问题。识别组织内病原体是免疫组织化学的重要内容之一，特别关系到传染病的发病机理及快速诊断等问题。

第二类入侵抗原是其它可能进入机体的物质。如各种粉尘、炭末、矽、石棉以及各种金属在组织内的沉积等。在动物的免疫学实验中，给动物注入人工抗原并观察其在体内的过程及免疫反应。给动物注入其它蛋白、药物以研究其在体内的分布、代谢及排泄等动力学及作用，都可以用标记物直接在活体内追踪，或者用相应抗体在体外进行染色追踪。

## 二、纯化抗原的必要性

上述抗原按其能否溶解分为两大类。一类是可溶于水及其它物质的可溶性抗原，一类是不溶解的颗粒性抗原，如细胞、细胞器、病原体等。不论是哪一种抗原，用作免疫组织化学反应时，都应纯化，以排除杂质。有时微量的杂质会诱导大量抗体，所以用纯化抗原制备抗体，才能容易得到纯的特异性抗体。用这种抗体进行免疫组织化学染色，才能排除其它成分的抗原抗体反应所造成的非特异染色，增强特异性染色。当然，即使用高特异性抗体进行免疫组织化学染色，仍然还有共同抗原决定簇所造成的非特异染色问题。一种抗原往往有许多抗原决定簇。有些决定簇是该物质所特有的或特异的，有些决定簇是相关的，与其它抗原共有的，称作共同抗原决定簇。用传统免疫动物方法所得的多克隆抗体（PCAb）必然也含有针对这种相关的和共同抗原决定簇的成分。用这种抗体染色时，自然会与这种相关或共同抗原决定簇反应。克服这种非特异性染色的方法是使用针对单一决定簇的单克隆抗体（McAb），用有关抗原或肝粉吸收抗体也是一个可以试用的办法。

一般认为（McAb）是针对单一抗原决定簇的 McAb的制备方法不同于传统方法，在制备时，即使使用了不纯的抗原，仍然有可能选出特异性的抗体。但这样会给克隆筛选带来许多困难，而且也会降低融合成功率，所以即使在制备单克隆抗体时，也需要纯化抗原。

总之，提纯抗原的目的是为了制备理想的抗体，以期在组织、细胞内定位该物质时，可能达到定性可靠、定量可能、定位确切的目的。

## 第二节 可溶性抗原

可溶性抗原包括蛋白质、多肽、糖蛋白、脂蛋白、铁蛋白、多糖及类脂质等，可以是激素、酶、毒素、粘液、受体等。要从成分复杂的组织中提取、纯化、鉴定这些抗原，方法各不相同，但也有一些共同的常用手段。兹以铁蛋白为例介绍如下。

## 一、粉 碎

从组织及细胞成分中提取可溶性抗原，首先必须把完整的组织细胞粉碎，以使其中可溶性物质溶解于水或缓冲液中。组织在粉碎前必须充分洗涤，然后剪成碎块。使用培养细胞时要经过反复离心洗涤，以除去培养液中的蛋白质成分。粉碎的方法很多，可以用组织研磨器，用手工或马达旋转研磨。组织粉碎机是一种专为粉碎组织而设计的仪器，其中机械粉碎机有外切割机，即用马达带动向外的刀片切割；及内切割机，刀片在球及管状结构内部。有时要对样品预冷，以免温度上升过高。将富含铁蛋白的肝、脾、心及肝癌组织，经洗涤后先剪成碎块，再加4倍（V/V）的蒸馏水于粉碎机中，粉碎成组织匀浆。

目前最常用超声粉碎机粉碎组织细胞。超声波在溶液中产生空化作用，使溶液中溶解的空气发生突然膨胀和剧烈收缩，引起溶液中的分子产生磨擦，在局部产生热。通过这些物理效应使细胞膜解聚，细胞破碎、细胞内非共价键断裂（如蛋白质分子的氢键及盐键），继而再用高速离心，除去细胞核及细胞器成分，收集上清中的可溶性抗原<sup>(5)</sup>。

用高渗及低渗方法也能使细胞破碎。低渗改变细胞膜的稳定性，促使抗原从细胞膜上脱落并发生破裂。高渗法如用3 mol/L氯化钾，可能激活水解酶，导致自溶作用<sup>(6)</sup>，使膜抗原释放，这是提取膜抗原的重要步骤。此外，去污剂，水解酶以及液氮减压等都是粉碎细胞的办法。

细胞粉碎的程度与外力作用强弱及作用时间有密切关系，因而最好在显微镜下对细胞粉碎度进行检测及控制。

## 二、沉 淀

用沉淀的方法析出抗原，或保留在上清中是最常用的步骤。物理方法如加热可使蛋白质变性，化学方法如改变pH使蛋白质处在等电点状态以及不同浓度的硫酸铵或三氯醋酸的水溶液都可沉淀蛋白质。1%热醋酸可沉淀脂质。蛋白质及脂类沉淀后，糖及糖蛋白常留在上清液中，加热而不被破坏是糖的特点。提取铁蛋白时，首先加热稀释的匀浆至80℃两分钟，使血红蛋白等沉淀，然后调整pH至5，再使其它蛋白沉淀。经过 $10^5 \times g$ 离心除去细胞器保证上清中没有颗粒性物质。这时在上清中加硫酸铵盐析，使粗制的铁蛋白沉淀，沉淀物经蒸馏水溶解后加硫酸镉使铁蛋白结晶纯化，每100 ml溶液中加20%的硫酸镉25 ml放置1~2天即可在显微镜下见到结晶，如此重复结晶三次，最后经葡聚糖凝胶G-200层析<sup>(3,4)</sup>。

## 三、层 析

层析（chromatography）是分离纯化大分子物质的一种方法，利用蛋白质及其它大分子物质的不同理化特性以不同固相介质装柱进行过滤。最常应用的层析方法是凝胶过滤及离子交换层析等。

### （一）凝胶过滤

凝胶颗粒吸水后形成多孔胶粒。当蛋白质溶液加在凝胶柱上，用洗脱液洗脱时，大分子蛋白不能穿过凝胶网孔而在胶粒之间的液体中首先流下。小分子的蛋白经过胶粒网

孔，因而行程长，向下移动较慢，这样蛋白质可分离的目的。一般加样为凝胶柱总体积的10~20%。柱的内径，h为柱高。则 $V_t = \frac{1}{4} \pi D^2 h$ 。凝胶粒

分子大小不同依次洗下来而达到分离。以 $V_t$ 代表凝胶床总体积，D为层析柱的空隙，又称外水体积约为总体积

1. 葡聚糖凝胶 葡聚糖凝胶 (sephadex) 型号有G-10、G-15、G-25、G-50、G-75、G-100及G-200。后面的数字代表吸水量，G-200是指每克干胶吸水量为20g，G-25是指每克干胶吸水2.5g，以此类推。随着型号的增加，分离蛋白质的分子量也逐渐增加，G-200可分离物质的分子量是5000~50万。以G-200的应用为例。

(1) 称取G-200，如20g加蒸馏水浸泡或用水浴煮沸的办法浸泡，使之充分膨胀。漂洗5~6次(重量按柱的体积决定)。

(2) 以洗脱用的缓冲液漂洗数次。

(3) 装柱：柱底放一尼龙滤膜，柱内预先装有缓冲液，将稠的G-200缓缓沿柱壁注入柱中(注意不能有分层、断裂、气泡及不均匀等)。静止，下沉，过夜，经充分平衡后备用(图1-1)。

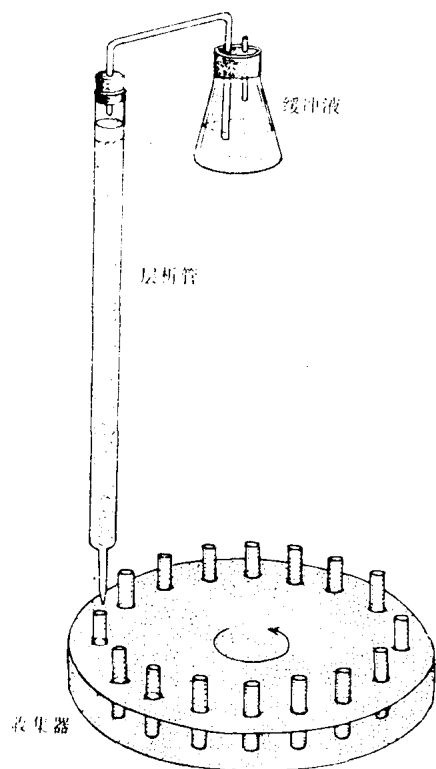


图1-1 常用层析示意图

(4) 加样：使用前应充分平衡至进柱和流出的缓冲液pH相同。待缓冲液完全进入胶中，关闭出口，缓缓沿壁加样，放开下口，待样品进入胶中，再加缓冲液洗柱内壁2~3次，加满缓冲液开始洗脱。

(5) 洗脱：利用虹吸作用或灌流泵，使洗脱液边出边进，流速一般在0.5ml/分，大分子蛋白将在外水体积流出。

(6) 收集、定量：用分部收集器或小试管收集蛋白液，在分光光度计或监测仪下定量，用冷冻干燥或硅胶等浓缩备用。

(7) 用缓冲液充分洗涤(2~3天)凝胶，以备再用，或加防腐剂后，置瓶内放冰箱备用，或用乙醇、丙酮脱水干燥。

2. 琼脂糖凝胶 琼脂糖凝胶一般保存在湿态，脱水、冰冻、40℃以上易破坏。其分离蛋白质的分子量范围大于葡聚糖凝胶。按其含琼脂糖的百分数分为三种型号：6B含琼脂糖6%，分离蛋白分子量为10万~200万；4B含琼脂糖4%，分离蛋白分子量为30万~300万；2B含琼脂糖2%，分离蛋白分子量为200万~2500万。

3. 聚丙烯酰胺凝胶(acrylamide)为一种合成凝胶，既用作分子筛，又用作电泳。sephacryl为聚丙烯酰胺与葡聚糖凝胶相结合的新层析剂，有S-100、S-1000等多种型号，可将小分子量的物质与大分子量的物质分开。

## (二) 离子交换剂 (ion-exchange) 层析

阴离子交换剂有二乙氨乙基纤维素 (DEAE-Cellulose) 可与带有负电荷的阴离子蛋白质结合。阳离子交换剂有羧甲基纤维素 (CM-cellulose) 可与带正电荷的阳离子蛋白质结合。蛋白质先通过电荷吸附在柱子上, 再增加洗脱剂的盐浓度或改变 pH, 蛋白质则被洗脱下来, 达到分离的目的。

如 DEAE-纤维素含有碱基, 与  $H^+$  结合可成为阳离子, 而成为阴离子的交换剂。蛋白质是两性电解质, 在其等电点时为中性, 当溶液  $pH <$  等电点, 则蛋白质与  $H^+$  结成阳离子。当  $pH >$  等电点时, 则蛋白质失去  $H^+$ , 羧基离解成阴离子。当溶液的 pH 及离子强度合适时, 蛋白质与离子交换剂间形成的静电键数目多, 则他们紧密吸附, 留在柱顶部不随洗涤液向下移动。当缓冲液中盐离子浓度增加, 后者与蛋白质竞争, 使蛋白质与离子交换剂之间的静电结合减少而发生解离。此时蛋白质即随洗脱液下移。若缓冲液的 pH 与蛋白质的等电点相似, 蛋白质为中性, 不被吸附, 可随缓冲液迅速流出。这也是用  $pH 7.2$   $0.1 \text{ mol/L PB}$  及  $pH 8.0$ ,  $0.005 \text{ mol/L Tris HCl}$  缓冲液可以把血清中的两种球蛋白洗下的原因。

离子交换剂还可以与葡聚糖凝胶及琼脂糖凝胶结合在一起。如二乙氨乙基葡聚糖 A50 (DEAE-sephadex A50), 季氨乙基葡聚糖 A50 (QAE-sephadex A50) 等, 可在分子筛中发生离子交换的作用。用以上二者提取 IgG 的效果较好。

## (三) 亲和层析

亲和层析的方法 (affinity chromatography) 主要是利用两种物质之间的特异性结合能力建立起来的, 如抗原与抗体、葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 与 IgG、植物凝血素与糖等。它是一种分离、提纯相应大分子物质的方法。用抗原、抗体建立亲和层析时, 将抗体 (或抗原) 用化学方法 (如用溴化氰) 偶联到固相载体或固体支持物上装柱, 再用层析法吸附液相中的抗原 (或抗体), 使结合成抗原-抗体复合物, 然后改变通过亲和柱的溶液, 使抗原-抗体复合物解离, 欲提纯之抗原 (或抗体) 即被洗脱下来。亲和层析最大的优点是特异性强, 提取物纯度高。免疫吸附亲和层析的步骤如下:

1. 抗体的纯化 抗体在偶联到琼脂糖珠上之前, 应进行纯化并测定免疫球蛋白 (IgG) 的含量。

2. 载体活化 用作亲和层析的固相载体, 应具备亲水性高, 具有相当数量可供活化的化学基团, 物理化学稳定性好, 并具有良好的多孔结构及机械性能, 这样才能使层析柱吸附效率高, 不同分子量的大分子自由通过, 不易变形, 经得起各种条件变化的改变。一般亲和层析使用琼脂糖珠 (sepharose) 2B、4B 或 6B。

取琼脂糖珠, 置布氏漏斗上, 蒸馏水洗去  $NaN_3$  后转入烧杯中, 加入  $1/10$  琼脂糖珠体积的  $5 \text{ mol/L PB}$  (每升含  $3.33 \text{ mol/L } K_3PO_4$  和  $1.67 \text{ mol/L } K_2HPO_4$ ) 混匀。再在冰浴中预冷, 按每 ml 琼脂糖珠  $0.1 \text{ g CNBr}$  称取固体  $CNBr$ , 在电磁搅拌下溶于少量蒸馏水, 随即在冰浴电磁搅拌下, 向琼脂糖珠中加  $CNBr$  液, 两分钟内加完, 继续搅拌 8 分钟 (维持 pH 在 11~12 之间), 将琼脂糖珠倾倒在布氏漏斗上抽滤, 并迅速用预冷的 ( $2 \sim 4^\circ C$ ) 10 倍蒸馏水及 5 倍  $0.1 \text{ mol/L NaHCO}_3$  洗涤。 $CNBr$  是剧毒药, 应在通风橱中操作。

3. 配基交联 琼脂糖珠经活化及洗涤后立即全部转入盛有预冷的抗血清球蛋白中,

从洗涤到加入I<sub>g</sub>要在两分钟内完成。以免活化琼脂糖珠失活。琼脂糖珠与抗血清蛋白混匀后，在冰浴中缓慢颠倒或搅拌6~12小时，要防止琼脂糖珠破碎及蛋白变性。然后在4℃下过夜，使反应充分。

4. 装柱 静止后倾出上清液，交联I<sub>g</sub>的琼脂糖珠用0.9% NaCl悬浮洗涤，倾去上清，再洗涤一次，合并倾出上清液后，将琼脂糖珠装柱。柱的内径与长度之比为1:10。柱之大小根据琼脂糖珠多少而定。装柱后依次用0.9% NaCl(10倍柱体积)，0.1 mol/L pH2.4 甘氨酸-HCl缓冲液(5倍柱体积)，7 mol/L尿素(3倍柱体积)洗涤。三次倾出的上清液分别用Lowry氏法测定蛋白量(为未交联的球蛋白量)，用下式求出琼脂糖珠交联蛋白量及交联率。

$$\text{交联量 (mg蛋白质/ml 琼脂糖珠)} = \frac{\text{加入I}_g\text{量(mg)} - \text{未交联I}_g\text{的量(mg)}}{\text{琼脂糖珠 4 B 的总体积}}$$

$$\text{交联率 (\%)} = \frac{\text{加入I}_g\text{量 (mg)} - \text{未交联的 I}_g\text{量(mg)}}{\text{加入I}_g\text{的量(mg)}}$$

一般CNBr<sub>1</sub>用量为100mg/ml琼脂糖珠，I<sub>g</sub>量为25mg/ml琼脂糖珠，交联量23~21mg蛋白质/ml琼脂糖珠，交联率约为90%。

制成的免疫吸附柱应在0~4℃的冷环境中保存，低于0℃琼脂糖珠会破裂，可加防腐剂0.02% NaN<sub>3</sub>。

5. 抗原的吸附 亲和层析的目的是抗原纯化，抗原的纯化须经吸附、解吸附两个步骤：

(1) 吸附：被分离的抗原与吸附柱的结合可能存在三种情况：①无效吸附，载体未交联抗体，抗原随杂蛋白一起流出；②弱吸附，因配基与抗体亲合力不大，杂蛋白流出后即出现抗原高峰；③强吸附，4℃下，抗原被强力吸附在柱上，要改变条件后，抗原才能洗下来。

(2) 解吸附：解吸附是要使已形成的抗原-抗体复合物解离。解离的手段很多，如洗脱HAA可用5mol/L碘化钠，洗脱甲胎蛋白用0.1mol/L pH2.4 甘氨酸-HCl缓冲液。抗原吸附后可用0.9% NaCl充分洗涤，直至280nm光密度少于0.02为止。然后改用解离的系统，若用酸性液解离，抗原流出后应立即矫正pH，加固体NaHCO<sub>3</sub>到收集管中改变pH，并进行透析去盐，鉴定后，冷冻干燥备用。

#### 四、离 心

利用蛋白质及细胞形状、大小、重量的差别，可以用离心法进行分离沉淀。一般离心机在5000 rpm以下，多无需冷冻及低温条件，它可以分离水介质中的一般沉淀物，如蛋白质、细胞核及细胞成分。细胞在水缓冲液中，可以用较低速度较短时间(1000rpm, 2~5分钟)沉淀。5000~20000 rpm速度的离心机称为高速离心机。用高速离心机时多需低温条件，避免在高速离心下产热过多使蛋白质变性，细胞死亡。一些较轻的蛋白质如细胞膜蛋白需高速离心才能沉淀。提取可溶性抗原时，一般需要20000 rpm的高速离心，以保证无细胞器等颗粒成分。超速离心机(20000rpm以上)不但可低温冰冻，而且能抽真空，在真空中旋转没有空气阻力，可达到较高速度，不产生高热。超速离心机按

重力加速度 (g) 计算转速。

在超速离心时, 若将一般均匀的介质, 换上不同密度的按一定梯度分布的介质, 使分离的物质分布在一定密度的介质中, 称密度梯度离心。梯度离心用的产生梯度的物质有蔗糖 (Ficoll) 及蔗糖。

## 五、电 泳

电泳既可用于抗原的制备, 也可用于抗原性质的鉴定。但电泳分带后蛋白含量甚少, 分离毫克级的蛋白质比较困难。

根据电泳的支持物不同, 可将电泳分为纸上电泳、醋酸纤维膜电泳、琼脂 (糖) 凝胶电泳及聚丙烯酰胺凝胶电泳等。根据所用方法的差别又可分为免疫电泳、对流电泳、火箭电泳、双向电泳等。较常用免疫电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳。

### (一) 琼脂 (糖) 免疫电泳

琼脂糖免疫电泳 (agorose immuno-electrophoresis) 是以琼脂糖凝胶作为支持物。蛋白质先在琼脂糖中进行区带电泳, 再在其旁进行免疫双向扩散, 称为免疫电泳, 用于分析抗原或抗体, 用途较为广泛。方法是先在琼脂板上打孔, 孔中加入分析抗原, 两端在电泳槽上用双层滤纸搭桥后通电进行区带电泳。电泳后在区带旁再挖出一长形槽, 加入相应抗血清, 置湿盒内  $37^{\circ}\text{C}$  扩散 24 小时, 与抗原起反应的抗体在区带与槽之间出现沉淀弧。为了长远保存标本, 可用考马斯亮蓝 (coomassie brilliant blue) 等染料染色, 制成永久标本。具体工作条件是: 琼脂板电势梯度为  $5 \sim 6 \text{ V/cm}$ , 或电流强度为  $2 \sim 3 \text{ mA/cm}$ , 电泳  $1.5 \sim 2$  小时。

### (二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳法和分析蛋白质及核酸等大分子化合物的常用的方法。它不但能利用组分的自由泳动率的差别进行区带电泳, 而且具有分子筛的作用。它是一种人工合成凝胶, 是丙烯酰胺和交联剂甲叉双丙烯酰胺在催化剂作用下聚合并交联而成。它具有纯度高、均一、孔洞大小可以按浓度调节、弹性大、利于电泳后各种处理、设备简单、分辨率较高等许多优点, 所以用途极为广泛<sup>(12a-15)</sup>。

圆盘电泳 (disc electrophoresis): 将凝胶放在直立的玻璃管内 ( $0.5 \times 6 \text{ cm}$ ), 在不连续的缓冲系统中电泳, 样品混合物被分开后形成扁圆盘状区带而命名 (图 1-2)。

将丙烯酰胺及甲叉双丙烯酰胺按需要浓度混合后加入催化剂、过硫酸铵及四甲基乙二胺 (TEMED), 然后迅速装入管内使之聚合。在分离胶上加浓缩胶。聚丙烯酰胺浓度

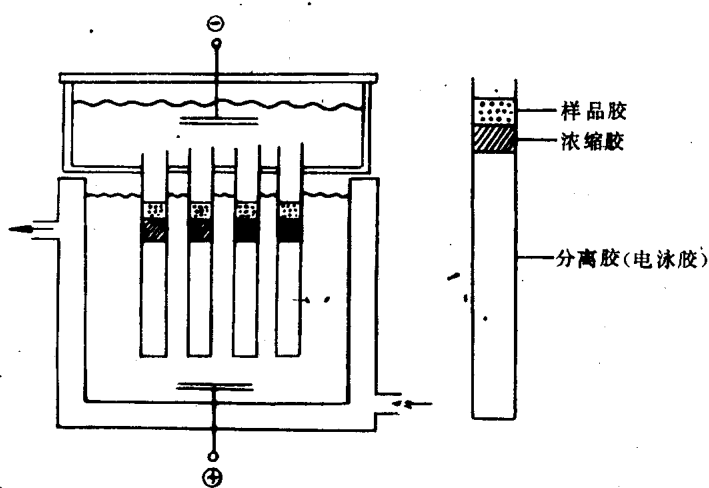


图 1-2 圆盘电泳示意图



愈高，孔径愈小，凝胶硬度愈大，可分离的蛋白质的分子量愈小。常用的标准凝胶浓度是7.5% (5~15%)，生物体内大多数蛋白质在此凝胶中电泳能得到满意的结果。

缓冲系统的选择很重要，包括pH、离子种类及强度。酸性蛋白质在高pH条件下，碱性蛋白质在低pH条件下常得到较好的解离，电泳分离效果较好。一般电泳时，常用离子强度低的缓冲液(0.01~0.1 mol/L之间)，从而电导低，低电导能产生高电压梯度，分离过程短，分离效果好。

一般聚丙烯酰胺凝胶电泳能保持蛋白质样品的天然状态。若要分析其亚单位，排除其它杂质，则缓冲液中要加解离剂，以破坏其非共价键。目前广泛使用的较温和而有效的解离剂是阴离子去污剂十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)。其它一些较强烈的变性解离系统是尿素等。为了打开硫键，还应在SDS处理样品的同时加用0.1%巯基乙醇，可使双硫键还原而解离成亚基(图1-3)。

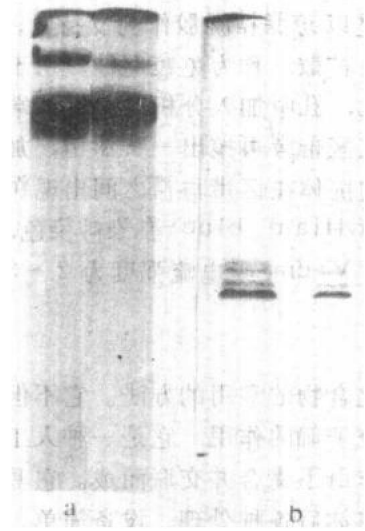


图1-3 SDS聚丙烯酰胺圆盘电泳  
a. 正常肝铁蛋白 左: 考马斯蓝染色  
右: 普鲁士蓝染色  
b. 细胞角蛋白, 由四条肽链构成

此系统中，则蛋白质亦必泳动到其等电点而停止，并聚集在该处，故而可以测出该蛋白质的等电点。

聚丙烯酰胺凝胶垂直板型电泳(slab electrophoresis)，是将凝胶放在两块垂直放置的相隔几个mm的平行玻板中进行。所得的是垂直的平板状的凝胶(图1-4)。垂直板型与垂直管型相比，其优点在于：①表面积大，易于冷却控制温度；②电泳后易于取出凝胶；③能在同一凝胶板上，同一操作条件下，同时比较多个样品；④可作双向电泳；⑤便于进一步利用各种鉴定方法，尤其便于进行放射自显影术。

分离后可用切片法(将区带切片)或抽提法(捣碎离心)回收样品，也可以用电泳抽提法，即将区带捣碎加入浓缩胶，重新电泳，在电泳管底部套上一个小透析袋，样品泳出进入透析袋中收集之。

双向凝胶电泳(twodimensional electrophoresis)用板电泳将样品分开后，

SDS电泳还可以测定蛋白质的分子量。在一般电泳中，蛋白质的迁移率主要取决于它的分子量，而与其所带电荷无关。其原理有人认为是SDS与蛋白质结合成带负电荷的复合物后，其电荷量大大超过了蛋白质分子原有的电荷，因而掩盖了不同种类蛋白质间原有电荷差别。同时SDS与蛋白质结合后，在水溶液中的形状，都近似雪茄烟形的长椭圆形，不同蛋白质的短轴长度类似。但长轴长度则与其分子量的大小成正比。所以在SDS电泳下，迁移率不再受蛋白质原有电荷和形状的影响，而能对比出分子量。因而通过与已知分子量的蛋白质标准品的电泳结果相比较，即可计算出所测蛋白质的分子量。

等电点聚焦：在聚丙烯酰胺系统中放入两性电解质(ampholytes)，阳极置于强碱、阴极置于强酸中，则在两者之间形成pH梯度。两性电解质在系统中移动时，当到达其等电点处，由于失去电荷而不再移动，蛋白质亦系两性物质。在无盐的情况下将蛋白质加入