免疫荧光技术

朱维正 编

中国人民解放军兽医大学

1981.4.

39.91
9

免疫荧光技术

目　录

第一章　免疫荧光的原理及特点……1
第二章　荧光抗体的制备……3
第一节　免疫血清的制备……3
一、抗原……3
二、动物……3
三、免疫途径……4
四、佐剂……4
五、抗原剂量……5
六、多次注射的间隔时间……5
七、免疫血清的效价……6
八、自然感染病例抗血清的利用……7
第二节　免疫球蛋白的提取……7
一、硫酸铵盐析法……7
二、离子交换层析技术……9
三、凝胶过滤……12
四、简易快速提取法……13
第三节　脱盐……14
一、透析法……14
二、葡聚糖凝胶过滤法……14
第四节　定氮及浓缩……17
一、双缩脲法……17
二、福林—酚法……19
三、紫外光谱吸收法……20
四、凯氏微量定氮法……21
五、蛋白液的浓缩……21
第五节　荧光色素的标记……21
一、适于蛋白标记的荧光色素……22
二、标记方法……23
三、影响标记的因素……24
第六节　标记抗体的提纯……24
一、去除游离荧光色素……25
二、去除过度标记的蛋白分子……26
三、去除特异交叉或额外反应性标记抗体……27
第七节　标记抗体的鉴定……28
一、F/P比值的测定……28
二、免疫电泳……29
三、染色性能鉴定……31
第八节　关于非特异性荧光染色问题……33
一、非特异性荧光染色的原因……33
二、非特异性荧光染色因素的去除……34
第三章　标本的制备方法……36
一、材料的收集……36
二、显微镜标本片的制备……36
三、标本的固定……37
四、标本片的保存……39
第四章　荧光抗体染色法……40
第一节　荧光抗体染色的基本条件……40
第二节　荧光抗体染色法……40
一、直接法……40
二、间接法……41
三、特殊染色法……43
四、染色标本的保存……43
第五章　荧光显微镜检查……44
第一节　光源……44

第二节　滤片系统……………………45
一、激发滤板…………………………46
二、压制滤板…………………………46
第三节　显微镜…………………………47
一、聚光器……………………………47
二、反光镜……………………………48
三、落射光装置………………………48
四、物镜………………………………48
五、目镜………………………………49
六、载玻片及盖玻片…………………49
七、镜油………………………………49
第四节　荧光显微镜的使用…………49
第五节　荧光抗体镜检结果记录法…………………………50
第六节　荧光显微摄影术……………50
附：实验中常用溶液的配制法…………51

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

免 疫 荧 光 技 术

当动物感染某种传染病或注入某种蛋白质时，在病原体或蛋白质（统称为抗原物质）的刺激下，在其体内可产生一种物质，叫做抗体（即具有免疫活性的球蛋白）。抗原抗体能发生特异性结合，因此，就可利用已知的一个因子去测定另一个未知的因子，如我们在临床检验中常应用已知的抗原去测定未知的抗体，或用已知的抗体测定未知的抗原。根据这一基本原理，人们常应用各种血清学方法（如凝集反应、沉淀反应、补体结合试验等）以诊断传染病。一般认为，抗原抗体反应过程分为两个阶段，第一阶段，抗原与抗体结合，这在数分钟内完成，是不可见的；第二阶段，各种抗原抗体复合物在电解质的影响下出现各种可见的反应，如凝集、沉淀、溶解等，借此就可知道抗原与抗体发生了反应。但是，这些血清学反应，常常需要较长的时间才能完成，不能达到快速诊断的目的。再则，这些反应不能用于测知固定在组织或细胞内的抗原或抗体（抗原与抗体在组织或细胞内结合时，其反应只停留在不可见的第一阶段）。这是这些血清学诊断法所不可克服的缺点。

很久以来，医学、兽医学和生物科学工作者就很想知道病毒、细菌抗原、组织抗原、激素和酶等这些具有生物活性的物质，在机体的组织细胞中是怎样存在的，因此，在很早以前就企图以色素作为标记与抗体相结合，用来研究抗原抗体反应，如曾以偶氮色素等来研究机体组织和细胞中存在着的微量抗原，但由于敏感性太差而不能应用。1941年 Coons 等合成了一种新的荧光色素——异氰酸荧光黄（FIC），能够有效地标记抗体球蛋白而不损害抗体的活性，但标记技术相当困难，不易普及。1958年合成了异硫氰酸荧光黄（FITC），能够很容易地与抗体球蛋白形成稳定的结合物，从而使免疫荧光技术迅速得到推广，这对传染病的快速诊断和测定组织或细胞内的抗原或抗体找到了一种良好的方法。

第一章　免疫荧光的原理及特点

一、原　　理

免疫荧光技术又称荧光抗体技术。它的原理是将荧光色素（主要是异硫氰酸荧光黄）与血清抗体以化学的方法结合起来，但不影响血清抗体的免疫特性，然后将这种标记有荧光色素的抗体作为一种特异性试剂，在特定条件下去浸染标本，如果标本中存在有相应的抗原时，抗原抗体发生特异性结合，由于抗体上标记有荧光色素，因此当在荧光显微镜下观察抗原抗体复合物时，在荧光显微镜的紫外线照射下，使标本中的抗原抗体复合物上的荧光素激发出荧光来，荧光的出现表明了该标记的抗体或抗原的存在。如果标本中不存在抗原或抗原抗体不一致时，两者不能结合，在水洗时荧光抗体被洗掉，

因而在显微镜下不呈现荧光，这种用荧光抗体染色来示踪抗原或抗体的方法，即是荧光抗体技术。

二、特　　点

免疫荧光技术与一般血清学技术相比，它具有以下几个特点：

1．特异性与形态学结合　由于荧光抗体是将荧光色素与抗体中的蛋白分子牢固结合，而在结合后又不损害抗体蛋白质的活性。因此，它仍然具有抗原抗体特异性结合的特点；同时又由于它是在荧光显微镜下观察，所以还可看到染色对象的形态学特征（如各种微生物、组织细胞、寄生虫等），这就使这个方法的意义远远超出了单纯对抗原抗体是否结合的了解，而成为一种免疫组织化学方法，对生物学特异性的一般研究有显著的意义，这是其它血清学方法无法相比的，同时，由于有形态学特征，也显著提高了判断的可靠性。

2．快速性与敏感性　由于免疫荧光是建立在血清学反应的第一阶段，即抗原抗体在数分钟内结合，因此要比常用的其它血清学诊断法缩短较多时间。通常在1～2小时内即可完成，这就便于快速诊断。此外，由于抗体上标记有荧光色素，因此，即使仅有少量的抗原抗体复合物，也都可在荧光显微镜的暗色背景下看到发亮的被检物，提高了检验的敏感性，这也是普通光学显微镜所不可媲美的。

3．可对抗原或抗体进行组织或细胞内的定位　应用免疫荧光技术不仅可用来测知组织内或细胞内病原微生物的定位及分布，而且也可用来测定抗体产生的部位。

鉴于免疫荧光技术具有上述特点，因此国内外对其研究和应用也日益普遍。早在60年代国外兽医学方面就已比较广泛地应用这一技术诊断猪瘟、猪传染性胃肠炎、马传染性贫血、布氏杆菌病、炭疽、钩端螺旋体病等，有些已作商品出售。国内兽医学方面也先后于60～70年代开始研究和应用，并取得了一定的成果。

第二章　荧光抗体的制备

从前述原理可知，免疫荧光实际上是一种免疫组织化学染色技术，它把标记有荧光色素的抗体或球蛋白作为一种特殊的蛋白染料，去着染相应的抗原或抗体。因此，制备一种良好的荧光抗体，则是试验成功与否的重要因素。现将荧光抗体的制备程序简述如下图：

制备免疫血清
↓
抗体提取
↓
蛋白定量
↓
标记荧光色素
↓
标记抗体提纯
↓
标记抗体鉴定

第一节　免疫血清的制备

制出高效价和特异性强的免疫血清，是制备良好的荧光抗体的先决条件。效价高，则荧光抗体沉积在抗原上的沉淀层厚，荧光强，与抗原反应快，结合也紧密，这就提高了反应的敏感性。但是，效价高与特异性强（尤其是应用含有组织成分的抗原物质时）往往是有矛盾的。供制备荧光抗体用的免疫血清，应以高效价的免疫血清为好，因高效价的免疫血清，即使有少量非特异性抗体，也可通过稀释将其除去。

常用的免疫血清有抗病原体的免疫血清（如抗细菌或病毒的免疫血清）；抗-γ球蛋白免疫血清（如兔抗猪球蛋白免疫血清，羊抗兔球蛋白免疫血清等），抗组织免疫血清（如兔抗大白鼠肝组织免疫血清等）。

制备高效价免疫血清的条件

一、抗原　制造荧光抗体用高免血清的抗原主要有以下几种，即微生物抗原（细菌、病毒、钩端螺旋体、支原体等），组织抗原（激素、酶、血浆蛋白、肿瘤组织成分等），免疫球蛋白抗原（IgG、IgA 等）。

无论使用那种抗原物质，应是抗原性强，稳定性好，抗原物质丰富，纯度高，剂量要合适，抗原量太少不能有效地刺激机体产生抗体，过多，反而能抑制抗体的生成。尤其在应用微生物抗原时，应选择抗原性强、稳定和标准的微生物株。同时，还应注意微生物抗原的剂量，并尽量使用与免疫动物同种的动物或细胞（如以猪肾细胞培养的病毒免疫猪），以大大减少或消除对细胞成分的免疫反应，提高抗体的纯度和特异性。

二、动物　作免疫用的动物常用的有家兔、羊、鸡和豚鼠。究应选择何种动物为

宜，应根据抗原的生物学特性（即对动物的免疫反应性）和所要求的抗血清数量而定。最常用的是家兔和羊。用于免疫的动物应以成年，健康、雄性的为好（雌性动物应是没有妊娠的），体重要合乎一定的要求，如家兔应在 2～3 公斤以上。在免疫过程中应特别注意营养和卫生管理。如注入抗原一个月后仍无良好的抗体反应或在规定的注射日程后，抗体效价不高，再注射 1～2 次，效价仍提不高者，应弃去不用。

三、免疫途径　应是多种多样的，如静脉、腹腔、肌肉、皮内、皮下、淋巴结等处，一般倾向于采用多途径的方法。但是，具体采用那些途径，应视抗原的生物学特性和理化特性来决定。激素、酶、毒素等生物学活性抗原，一般不宜采用静脉途径。组织抗原及免疫球蛋白免疫可选用皮下、皮内、腘淋巴结和肌肉注射。但这些抗原常不易获得理想的高效价免疫血清，因此一般都用佐剂的办法来增强动物合成抗体的能力，并采用足掌皮下注射的途径常获良好的效果。近年来也提出用多部位同时注射，以增进免疫的效果。

四、佐剂

有些抗原，如可溶性蛋白抗原，在高度纯化时，抗原性常被降低。有些抗原如 IgA、IgM 等，一般只能获得微量，这样，要制出高效价免疫血清就更困难。为了提高动物的免疫反应性，增强抗体的合成，在抗原中应加入适当的免疫佐剂。但是，添加有佐剂的抗原中如混有微量的其它物质时，也可产生相应的抗体，影响免疫血清的特异性，因此所用的抗原应尽量的纯，并以一定的吸收程序处理。

免疫佐剂的种类很多，常用的有弗氏佐剂（Freund's adjuvant），明矾佐剂两种，使用最广范的还是弗氏佐剂。

（一）弗氏佐剂　弗氏佐剂有两种，即弗氏完全佐剂与不完全佐剂。弗氏佐剂是由石腊油、羊毛脂所组成，两者比例合适，才易收到较好的效果，石腊油与羊毛脂的比可由 8∶1 或 1∶1。我们常用的弗氏佐剂配法如下：

1．弗氏完全佐剂

石腊油	3
羊毛脂	1
卡介苗	2～4 毫克/毫升佐剂

2．弗氏不完全佐剂　上述配方中如不加入卡介苗，即为不完全佐剂。

配制佐剂抗原液时，将石腊油和羊毛脂按上述比例混合后，定量放入小瓶中，经高压灭菌后保存备用。免疫前取需要量佐剂，加温融解后，加入等量抗原液，制成乳剂。

应用弗氏佐剂，必须要彻底完成油包水的过程，才能起作用。为了达到油包水的目的，制备佐剂抗原时可采用以下几种方法。

制备大剂量佐剂抗原时，可用乳钵研磨，即先将需要量佐剂放乳钵中研磨均匀后，再边磨边逐滴加入等量抗原液和卡介苗，加完后，再继续研磨至乳剂滴于冰水上完全不扩散为止（或滴于水面上仍保持水滴状），即可应用。若制成的乳剂放置稍许后，乳状液再次与蛋白液分离，则为未完成油包水。此法的缺点是在乳钵壁上要粘附不少乳剂，抗原损耗较大，故对于微量难得的抗原，不宜采用此法。

小剂量时，可在链霉素瓶内混合，即先将佐剂加温融解，加入等量抗原后，向一个

方向混合振荡，一直到水油不分开为止。

也可用两个注射器制备，即一个注射器内装抗原液，另一注射器内装加温融解的佐剂，两注射器间以聚乙烯塑料管或胶皮管连接，然后两者来回抽吸，10多分钟后即能完全乳化，检查合格后即以其中一个注射器给动物注射。

弗氏佐剂作用的原理，弗氏佐剂所以能提高动物的免疫反应性，增强抗体的合成，其原理是：1）佐剂粘附抗原可以增加抗原的表面面积和改变抗原活性基团的构形，从而增强抗原的免疫原性。2）延长抗原在局部组织内的储存时间（犹如仓库作用），能减低抗原的分解速度，使抗原缓慢释放。3）佐剂能引起局部细胞浸润，形成局部肉芽肿，出现巨噬细胞、组织细胞、淋巴细胞及浆细胞集聚，促进这些细胞增殖。4）巨噬细胞吞噬佐剂和抗原后，对抗原进行加工处理，赋予较强的免疫原性，促进T淋巴细胞免疫力，并加强T淋巴细胞与B细胞的协作。5）能促进体内激素的合成，包括可的松及脑下垂体促肾上腺皮质激素（ACTH），从而增高蛋白质（球蛋白）的合成代谢。

（二）明矾佐剂　取 Na_2HPO_4 240毫克，KH_2PO_4 174毫克，$CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 100毫克，NaCl 11毫克，蒸馏水75毫升，加明矾10克，补充蒸馏水至100毫升即为10％明矾溶液。

以25.6份10％明矾溶液，逐滴加入1份抗原溶液（蛋白浓度为10毫克/毫升），边加边形成沉淀，以1 NNaOH 调整 pH 至5.5，则绝大部分蛋白质抗原形成沉淀，以离心沉淀收集沉淀物，重溶于pH5.5盐水中，使每毫升含蛋白约30～50毫克，按需要量多部位肌肉注射（通常家兔为2～3毫升），3个月后再以普通抗原加强一针，即可产生高效价免疫血清。

注射混有佐剂的抗原时，应采用多途径，但每点不应超过0.5毫升，不然不易吸收，容易形成局部无菌性坏死和溃疡。

五、抗原剂量　免疫时所用抗原的剂量幅度很大，这决定于抗原类型、动物种类、免疫周期和所要求的抗体特性。抗原性强的抗原，量应小，过大反而会引起免疫抑制；抗原性弱的抗原（如某些病毒抗原）则量要大。动物一般按体重估计，如以免疫球蛋白加弗氏佐剂免疫家兔时，每公斤体重0.5～1.0毫克（如体重3公斤的兔，则1.5～3.0毫克即可）为宜。如不加弗氏佐剂，则剂量应加大十倍以上。免疫周期长者可小量多次，短者则应大量多次。对要求特异性很高的血清，则应小量、短程、无佐剂；如要求效价很高，则应大量、长程、加佐剂。

总之，抗原的用量不外是，短时间使用突击剂量及长时间反复使用小剂量两种。据我们的体会，对于抗原性强的可用短时间突击剂量，抗原性弱的则应反复多次使用小剂量。但反复注射容易引起过敏反应，增加接种损失，应引起注意。

六、多次注射的间隔时间　多次注射的间隔时间应长短适宜。间隔太短，起不到再次反应的效果（第一次接种抗原后，机体处于初次应答阶段，此时抗体效价低，消失也快，故应反复接种，但在初次应答阶段的早期，作第二次刺激也是无效的），太长，则失去第一次激发敏感的作用，同时免疫过程过久，易影响血清的特异性。具体时间应视抗原性质和抗体反应而定，一般间隔时间为1～2周（死菌抗原间隔应短，活菌（毒）抗原间隔时间可稍长），若加有佐剂时、间隔时间可延长至3～4周。

七、免疫血清的效价　做免疫荧光用的抗血清，一般以要求高效价为主。因此，为了测定免疫血清是否达到免疫要求的效价，就应在免疫到一定阶段后测试其效价、测定抗血清效价的方法常用的有环状沉淀试验及双相琼脂扩散试验两种。

（一）环状沉淀试验

1. 抗原稀释法

(1) 1、2、5稀释法·按下表稀释抗原：

表1　　抗原稀释法

成分（毫升）	稀释倍数						
	1:1,000	1:2,000	1:5,000	1:10,000	1:20,000	1:50,000	1:1,000,000
生理盐水	1.8	0.5	0.8	1.8	0.5	0.8	0.8
100倍稀释抗原	0.2	0.5 ↑	0.2 ↑	0.2 ↑	0.5 ↑	0.2 ↑	0.2 ↑

用毛细管吸取待测血清分别加入7支沉淀反应管中，每管高约1厘米，再用另一支毛细吸管吸取稀释的抗原液（从最高稀释倍数管开始），沿管壁徐徐将抗原液重叠在待测血清上。防止两液相混或在其间产生气泡，加入的抗原量应与血清量相等。加完各稀释度抗原后，用另一支吸管吸取生理盐水，加在另一管血清上，以作对照用。全部加完后，在室温中静置20～30分钟后观察结果。两液接触面出现一轮白环时，即为阳性。当最高稀释倍数抗原管出现阳性反应时即为该血清的效价。

(2) 倍比稀释法　即将抗原按下表稀释：

表2　　抗原稀释法

稀释倍数 / 成分（毫升）	100×	200×	400×	800×	1600×	3200×	6400×	12800×	25600×	512,000×
生理盐水	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
10倍抗原	0.1	↘0.5	↘0.5	↘0.5	↘0.5	↘0.5	↘0.5	↘0.5	↘0.5	↘0.5

如上法向沉淀反应管中加完待测血清后，再在血清上徐徐重叠各稀释抗原（从最高稀释倍数开始），并于20～30分钟内观察判定结果。

2. 抗体稀释法

将待测血清用生理盐水稀释成1：2、1：4、1：8……1：1024。用毛细吸管吸取每毫升含1～2毫克的球蛋白抗原加入沉淀管中，然后用另一支毛细吸管自血清最高稀释倍数起吸取稀释血清，分别徐徐重叠在抗原液上，再按抗原稀释法进行观察、判定。

在用兔制备的各种动物球蛋白抗体时，当以抗原稀释法测定，其效价在1：6400～8000倍以上即可应用。如用抗体稀释法时，则应在1：64～1：128以上才能使用。如以羊制备免疫血清时，其滴度要比兔低，用血清稀释法一般在1：64以上即可。

（二）双相琼脂扩散试验

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

取1克琼脂粉放在100毫升生理盐水中，于水浴中加热，待琼脂液完全透明时，即为1%琼脂液。将溶解的琼脂液用吸管倾加于玻板上（用7.6×5厘米玻板时需琼脂液8毫升左右，如用普通载玻片时，4毫升即够），待凝后用打孔器按六角形打孔，孔直径为4～6毫米，周缘孔与中心孔距为5～6毫米。通常中心孔加每毫升含1～2毫克球蛋白的抗原，周缘各孔分别按正时针方向添加用生理盐水作倍比稀释的待测血清。加完后，将琼脂板放在湿盒内（湿盒内可加少量石炭酸以防腐），于20～37℃中放置24～72小时后观察结果。

在抗原抗体两孔间出现沉淀线者即为阳性，最高稀释倍数血清孔出现沉淀线者即为该血清的抗体效价。通常琼扩试验的效价与环状沉淀法基本相等，但在抗原稀释法时，则要比环状沉淀法稍低。

此外，也有用凝集反应、中和试验、补体结合试验、间接血球凝集试验及对流免疫电泳等方法测试免疫血清效价的。这主要根据免疫血清的种类而适当选择之。

八、自然感染病例抗血清的利用　有些传染病的病原体（如马传贫病毒）利用实验动物制备高免血清是很难实现的，但是自然感染病例在病的中、后期，其血清中确可产生高效价的抗体。因此，完全可以利用这种免疫血清来制备荧光抗体。此外，某些虫媒传染病，其病原是通过媒介昆虫注入，不含杂质，所以其特异性也比人工免疫的高，如乙型脑炎流行区的猪，几乎大多数有自然感染，在流行期内中和抗体的效价很高，且特异性也好，故可尽量利用。

此外，市售的各种抗血清，如炭疽沉淀素血清，布氏杆菌病阳性血清等，一般质量比较稳定，可以应用，也可减少实验室的负担。

第二节　免疫球蛋白的提取

免疫球蛋白是一类具有抗体活性的球蛋白，在家畜中现已发现有IgG，IgA，IgM，IgE四种免疫球蛋白。在正常情况下，这些免疫球蛋白是由分化成熟的浆细胞所产生，然后进入体液中。浆细胞具有高度的特异性，由某种抗原引起分化而成的浆细胞，只能形成与该抗原相结合的抗体。对绝大多数抗原来说，尤其是可溶性胶体抗原，免疫反应后期所形成的抗体以IgG类为主，而大多数动物（如兔、羊）血浆中，IgG含量占全部免疫球蛋白的55～70%以上。此外，在免疫荧光染色中，非特异性染色最少的标记抗体为IgG类。因此，在荧光抗体技术中主要是提纯IgG。标准荧光抗体试剂就是IgG的荧光色素结合物。

分离提取免疫球蛋白的方法很多，常用的有盐析法，离子交换层析法，分子筛层析法（凝胶过滤）等，现分述如下：

一、硫酸铵盐析法

（一）原理　抗体都是蛋白质（免疫球蛋白），蛋白质的分子很大，具有胶体的性质。蛋白质形成的胶体一般都是乳胶，或称亲水胶体。这种胶体颗粒，都带有电荷，同时胶体粒子又有许多强极性基（如蛋白质的羧基、氨基及肽链等）它们与水有很强的亲

和力，以致在粒子外周构成水层膜，称为亲水胶体（胶体粒子不带有水膜的叫憎水胶体）。胶体粒子的稳定性即有赖于所带的水层及电荷，因而使颗粒互相隔绝而不能粘合下沉。

中性盐的浓溶液能使蛋白质亲水胶体脱水并降低电势（由电解质中离子的中和电荷而降低电势），因之，使蛋白质失去胶体性质而沉淀。

大量的盐类能使蛋白质非特异性的沉淀，这个作用称为盐析。中性盐也具有沉淀作用。硫酸铵是最常用于盐析的中性盐。

各种血清蛋白在不同浓度硫酸铵溶液中的溶解度是不同的，因此，可以利用不同浓度的硫酸铵溶液，将各种血清蛋白分离出来。当血清蛋白中饱和硫酸铵浓度为50%时，即可使95%的全量γ-球蛋白沉淀，即使沉淀三次仍含有大量的α、β蛋白及清蛋白，当血清中饱和硫酸铵浓度由50%逐渐减少到35%时，则沉淀蛋白质中的α、β球蛋白和清蛋白的含量也相应逐渐减少，而γ球蛋白的纯度逐渐提高。如以35%饱和度硫酸铵沉淀血清蛋白时，第一次的沉淀物中仍含有大量的清蛋白和少量α，β球蛋白。在第二次的沉淀物中清蛋白浓度极大地减少，第三次沉淀物只含有少量的α，β球蛋白。

利用硫酸铵中性盐可在室温中提取球蛋白，并使其不受损失，产量高，且此法取材容易，操作简便，不需特殊技术和设备，故目前仍被广泛采用。但本法不足之处是所提取γ球蛋白的纯度较差，含有少量α和β球蛋白。

（二）硫酸铵盐析的方法步骤

1．饱和硫酸铵液的配制　饱和硫酸铵液必须事前配制，使其充分饱和。配制时，取蒸馏水500毫升，加热至50～60℃，称取化学纯或试剂级硫酸铵400克，于乳钵中研成细末，加入蒸馏水中，搅拌使其充分溶解，置室温中冷却后，瓶底即有硫酸铵结晶析出，上清液即是饱和溶液。此时溶液的pH偏酸，应以28%氢氧化铵调至pH7.0备用。

2．沉淀法　用生理盐水或磷酸缓冲盐水（PBS）将血清稀释一倍，然后在搅拌的条件下缓慢地加入等量的饱和硫酸铵（即50%饱和度）。此时，溶液中出现白色沉淀，于4℃放置0.5～1小时后，以3000转/分离心沉淀30分钟，上清液为清蛋白部分，弃去不要。沉淀物中加入原血清量的生理盐水或PBS，充分溶解后，再加入半量的饱和硫酸铵（即33%饱和度），进行第二次沉淀，如此再重复二次，使沉淀物达到完全白色为止。沉淀物以原血清1/5～1/10量的生理盐水或PBS溶解，放透析袋中透析脱盐。

硫酸铵四次沉淀法操作步骤如下（以20毫升血清为例）。

免疫血清20毫升＋生理盐水（或PBS）20毫升

↓

加饱和硫酸铵40毫升，使成50%饱和度，边加边搅拌

↓

4℃放置30分钟

↓

3000转/分离心沉淀30分钟

↓

去上清，沉淀物中加入20毫升生理盐水（或PBS）至原血清量

↓

加饱和硫酸铵10毫升，使成33%饱和度，边加边搅拌

↓

4 ℃放置 30 分钟

↓

2000转/分离心沉淀 30 分钟

↓

去上清，取沉淀溶于 20 毫升生理盐水
中，如上法再以33%饱和硫酸铵沉淀二次

↓

沉淀物溶于 2 ～ 4 毫升（原血清量的1/10～1/5）生理盐水或 PBS

↓

脱盐

二、离子交换层析技术

离子交换层析法是以离子交换纤维素或离子交换——葡聚糖凝胶为固定相，分离和提纯具有胶体性离子化的高分子物质。目前此法已成功地用于提纯蛋白质、核糖核酸、酶、激素及病毒、噬菌体等。

（一）离子交换层析的基本原理　离子交换剂与蛋白质等高分子间的交换作用包括两个步骤，首先是被分离的物质与离子交换纤维素的配对离子如氯离子(两者电荷相同)交换后，结合在交换剂上，也就是吸附剂表面的带电基团和带相反电荷的胶体物质的带电基团之间形成静电键结合。蛋白分子带的电荷数目越多，形成的静电键也越多，因此结合的就越紧。其次是用缓冲液逐次的将被分离的物质从吸附剂上解脱下来。由于各种蛋白质的等电点不同，分子大小不同，荷电不同，与交换剂结合的强度也就不同，因此利用不同的置换条件，如改变洗脱液的盐浓度和 pH 时，就可把结合在交换剂的各种成分分别地从离子交换剂上释放下来。

蛋白质具有两性电解质的性质，它的荷电状态可以随着缓冲液 pH 的改变而变化。如在 pH7.0 以上时，血清蛋白质带负电荷，而交换剂（如 DEAE-纤维素）带正电荷，当血清蛋白通过 DEAE—纤维素柱时，蛋白质即借电力吸引在 DEAE—纤维素带正电荷的铵离子上，形成离子键，交换吸附在 DEAE—纤维素上。当改变缓冲液的 pH 时，使蛋白质的荷电状态可发生改变，可由带负电荷变为电中性，以至带正电荷，于是蛋白质便从交换剂——DEAE—纤维素柱上逐渐洗脱下来。

当改变缓冲液中盐的浓度时，由于盐类浓度的增加，便与蛋白质竞争结合位置，以减低静电键的结合而将不同的蛋白质逐渐地被洗脱下来。盐浓度越高，洗脱力越强。

血清蛋白质解脱的先后程序与它们在电场中泳动的速度刚好相反。在硷性溶液中，γ 球蛋白荷电最少，首先被洗脱下来，而泳动最慢，其次是 β 、α 球蛋白，最后为白蛋白，它荷电最多，吸附较牢，不易洗脱，而泳动最快。我们在将初提的球蛋白溶液利用 DEAE-纤维素提纯时，常用 0.05M pH8.0 的Tris-HCl 溶液，其目的就 在于此。

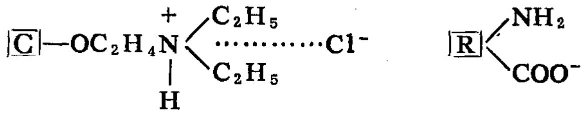
（二）离子交换剂的种类和剂型　离子交换剂分阴离子型和阳离子型两种。阴离子型交换剂中常用的 DEAE-纤维素和 DEAE-葡聚糖凝胶。阳离子交换剂中以 CM-纤维素较常用。蛋白质是两性离子，故可用阴离交换剂分离，也可用阳离子交换剂，但最常用的还是阴离子交换剂 DEAE-纤维素及 DEAE-葡聚糖凝胶 A50。

1. DEAE-纤维素（Diethyl-amino ethyl Cellulose）又叫二乙氨乙基纤维素。它是将二乙氨乙基借化学反应结合在纤维素分子上，但仍保留纤维素所固有的优点，即

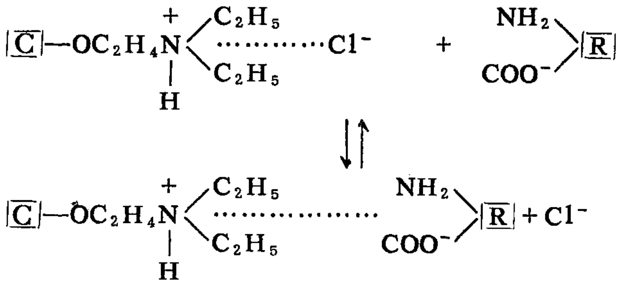
亲水性、多孔性以及其它物理和化学的稳定性。纤维素上结合二乙氨乙基后，使纤维素颗粒带正电荷，它能与负电荷结合成盐，其外层的负电荷能可逆地被其它带负电荷的离子置换，但其本身并不改变电荷，所以 DEAE-纤维素是阴离子交换剂。当带负电荷的免疫球蛋白的酸性基团与其相遇时，就产生了静电吸附，再用洗脱法解吸附，即将结合的蛋白质置换下来，而获得较纯的蛋白溶液。因此利用 DEAE-纤维素层析柱法可提纯 IgG 以及去除荧光抗体中带负电荷过多的部分。

DEAE—纤维素与 IgG 的交换反应如下图：

① 当 pH 为 8.0 时，DEAE—纤维呈阳离子形式，带正电荷；IgG 呈阴离子形式，带负电荷。

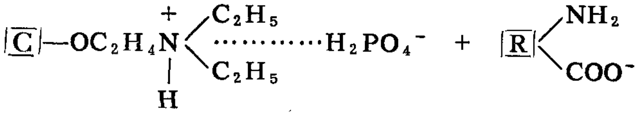


② 当将 IgG 加到 DEAE—纤维素柱上时，IgG 扩散到 DEAE—纤维素的表面上



离子扩散到交换位置进行交换

③ 当用 0.05 M pH 8.0 的 PBS 洗脱时，交换的离子进行扩散进而解吸附



DEAE-纤维素各型号的粒度(筛孔)在 100～325之间，常用者为 100～250，粒度大，洗脱速度较快，但分离能力较低，粒度小于 325， 则洗脱阻力大。其交换容量为 1 毫克当量/克左右。对蛋白质的吸附容量（吸附比）约为 1：1， 即 1 克交换剂约可交换蛋白质 1 克。

2. DEAE-葡聚糖凝胶是将离子化基团联于葡聚糖链的葡糖单位上而制成的。它是由葡聚糖凝胶（Sephadex）G-25 或 G-50 分别引入阴离子或阳离子功能基团制成的。阴离子交换剂标记为“A”，阳离子交换剂标记为“C”。DEAE-葡聚糖目前有 A-25 和 A-50 两型。“25”和“50”代表葡聚糖的型号，蛋白质的分子量低于 30,000 者选用 A-25。分子量大于 30,000 的则选用 A-50。这样溶质可进入凝胶珠孔隙与珠内的离子基团交换吸附，但分子量大于 1×10^6 的溶质排阻于凝胶珠孔隙，采用 25 和50 型都可，但以 25 型较好，因其流速较 50 型快。

DEAE-葡聚糖凝胶是一种较好的离子交换剂，它的交换剂量比离子交换纤维素高 3～4 倍（DEAE-SephadexA-25 和 A-50 两型的交换容量为 3.5 毫克当量/克左右)。

（三）交换剂的处理及使用

1. DEAE-纤维素的处理　取适量粉剂，洒在 0.5N NaOH 溶液内（每克干粉约需15毫升硷液），使自然沉降，浸泡 30 分钟，用布氏漏斗抽滤，如硷液呈黄色，则用 NaOH 重复洗至无色，用水充分洗至中性（以广范试纸测试）。再用 0.5N HCl 液浸泡，搅拌均匀，30分钟后，在布氏滤斗中抽滤，并用大量蒸馏水反复洗至中性。再用 0.5N NaOH 处理，30分钟后，再用蒸馏水洗至中性。然后用洗脱液平衡（如与起始洗脱液的 pH 值相差太大时，可用 0.2M 的较酸或较硷的浓溶液滴定至所需 pH 的 0.1 范围内，再用起始缓冲液洗）。

2. 装柱　层析柱有两种，一种是在玻璃管内烧制有一块 3 号滤板的特制层析柱，另一种是用一根直管的玻璃管，用一钻有小孔的胶塞，外包一层尼龙筛绢后，塞在玻璃管的下端，胶塞孔内插一细玻璃管即成。

柱的大小按起始材料（血清或粗提品）及其容量而定。一般柱的直径比高（内径与高度之比），以比值小于 0.1 为好。柱床容量，对于 DEAE-纤维素，以干重大于蛋白质 10～15 倍以上为好，如欲分离的蛋白量为 1 克，则需干纤维素 10～15 克以上，即相当于柱床容量 60 毫升左右（1 克干纤维素相当于 4～5 毫升柱床容量）。如柱的直径为 2 厘米，则柱长应是 20 厘米以上（柱容量 $=3.14\times$ 柱半径$^2\times$ 柱高）。

装柱方法，有加压法及自然沉降法，但以自然沉降装柱法较常用。自然沉降法特别适用于较长的柱。装柱时，先把层析柱垂直固定好后，先加入少量缓冲液，打开下端活塞，使少量缓冲液流出，待柱底部的气泡全部排出后，关闭下端。将处理好并经起始缓冲液平衡好的纤维素，加入1/2量的缓冲液，调成均匀的浓浆，通过滤斗装入柱内，待下部形成 5 厘米左右的柱床时，放开下面的开关，使液体流出。当管中液面下降至近纤维素床面时，再加入纤维素均浆，并用玻棒将纤维素床面轻轻搅动，使两次加入的纤维素不致形成分界面，待其自然沉降，这样加到所需高度，然后放置约 24 小时，使柱床紧密，高度稳定不变，装柱时，要防止出现气泡、干裂和分层。

3. 加样　柱床加好后，应在柱床顶部放一张大小合适的滤纸片，以防止洗脱时将纤维素冲起。待纤维素中的液体下沉至纤维素柱高时，关闭下口，立即用吸管将样品于床面正中轻轻滴加样品，约加 1～2 毫升后，打开下口，再继续加样完毕，待柱内样品剩一薄层时，用少量洗脱液冲洗管壁，随即用多量洗脱液洗脱。标本的加入量，可直接影响分离物的纯度。一般来说，层析柱吸附样品后形成的带应不超过柱床的10%，柱床的其余部分用作洗脱过程中的多阶段再吸附。经过初提的γ球蛋白（33%饱和硫酸铵沉淀）50～100毫克，用干量约 4 克的 DEAE 纤维素装成的柱进行分离可得到预期结果。当从全血清分离γ球蛋白时，1 克干 DEAE 纤维素可以分离 1 毫升血清。

4. 洗脱　物质的吸附状态是随环境条件而改变的，洗脱就是改变环境条件使原来紧密吸附的物质逐渐改变为有限吸附平衡状态而由柱上洗脱下来。改变吸附状态的办法有两种：(1) 增加缓冲液的离子强度，使它与生物高分子对吸附部位的竞争力加大，降低高分子的亲合力；(2) 改变缓冲洗的 pH，使高分子的解离度降低，电荷减少，从而降低其亲合力。

所用洗脱液的 pH 和离子强度，各实验室都不一致，对阴离子交换剂，基本的是

使 pH 逐渐降低，离子强度逐渐升高。因为盐浓度增加后，离子交换剂的吸附能力即迅速降低，从而相应地提高洗脱液的去吸附能力。而pH降低将使H^+浓度增加，从而使交换剂和蛋白吸附体向解脱方向进行。常用的洗脱液有 PBS 和 Tris 缓冲液。缓冲液的浓度为0.005～0.3M，pH 范围为4.8～8.6。

为了从DEAE-纤维素层析柱内洗脱IgG，可用梯度洗脱法洗脱，即先以0.01M pH7.6的 PBS 洗脱，继则以0.0175M pH6.3的 PBS 或0.01 M pH8.0的 PBS 洗脱，通常第一峰即为 IgG 部分。

另外，根据在硷性溶液中，γ球蛋白的荷电最少，可首先被洗脱下来的原理，特别是对利用硫酸铵沉淀法初提的球蛋白溶液作进一步提纯处理时，常用0.05 M pH 8.0的 Tris—HCl 缓冲液进行洗脱，第一峰即为 IgG。

这种方法的优点是它的设备和操作简单，洗脱体积小，浓度高，便于分析，对于分离某种蛋白质混合物，尤其是被分离物质的组成比较简单，而且它们对吸附剂的亲合力差别相当大时，只要事先找出适合的洗脱条件，应用此法是比较合适的。

5. 收集洗脱液　从层析柱中洗脱出来的液体，使用自动分布收集器（部分收集器）收集，这样不仅可减少人力，而且可及时得到分离物。如无自动分布收集器，就需人工收集。收集洗脱液时；可用20%磺酸水杨酸测试，从出现蛋白（白色沉淀）开始，定量收集，直至无蛋白为止，每管约10～15毫升，然后按顺序于280毫微米波长测试光密度（如无紫外分光光度计也可用其它蛋白显示法测定），第一峰即为 IgG 部分，将同一峰的洗脱液混在一起保存备用。

起始样品最好是经过硫酸铵盐析初提者，但也可直接从血清分离。经过初提的样品，IgG 量约占样品总蛋白量的1/2，而由血清直接分离时，IgG 量则只占样品总蛋白量的1/10～1/20。IgG 洗脱完成后，其余蛋白可用0.1M、0.2M 的 PBS 洗脱。

6. 柱的再生　蛋白全部洗脱下来后，用过的 DEAE 纤维素可用0.5NNaOH 和0.5NHCl 溶液交换洗脱，然后用蒸馏水冲洗至中性，再以洗脱液平衡，柱即再生。

三、凝 胶 过 滤

凝胶过滤又称凝胶层析或分子筛层析（Molecular sieve chromatography）。提取球蛋白用的凝胶物质主要是葡聚糖凝胶（Sephadex），而葡聚糖凝胶的型号又很多，从葡聚糖凝胶G25—G200，各种型号的葡聚糖凝胶，用途也都不同，提取球蛋白时所用的葡聚糖凝胶有低高联度的 G150 或 G200。凝胶过滤的基本原理将在下节脱盐中阐述，下面介绍以葡聚糖凝胶 G200 层析提取免疫球蛋白的方法。

1. 凝胶的制备　取一定量的葡聚糖凝胶G200干粉，缓慢地倒入约10倍于凝胶吸水量（凝胶吸水量一般为其目的1/10）的蒸馏水或 PBS 中，在室温下浸泡三天，然后轻轻搅拌，在室温中静置20～30分钟后，将上层液倒去，以除去细小颗粒，再加入适量蒸馏水或 PBS，这样反复浮洗四次左右即可。

2. 装柱　可参照 DEAE 纤维素柱装柱法进行。

3. 加样及洗脱　待柱上的缓冲液剩一薄层时，夹住下口，用吸管缓缓滴加样品1～2毫升后，打开下口，并继续将样品加完，待柱内样品剩一薄层时，用少许洗脱液冲洗

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com