

免疫酶技术



山东科学技术出版社

·91

内 容 提 要

该书是我国第一本免疫酶技术专著。它向读者全面系统地介绍了免疫抗血清、免疫球蛋白、标记酶、酶底物、酶标记抗体的制备和配备；免疫酶标固相载体方法、免疫酶标组织化学方法、非标记免疫酶技术、免疫酶电镜技术以及免疫酶技术的进展、应用和相关的实验技术，并对实验技术原理作了简要地说明。这是一本理论联系实际的书。它既能使读者对免疫酶技术有理性的认识，又能使读者较为全面地掌握免疫酶技术，并能在工作中迅速应用。对医药、农、林、牧业有关科研人员、兽医、检疫员、植保员以及大专院校有关专业的师生进行科学研究、实际应用和教学均有参考价值。

免 疫 酶 技 术

朱 培 坤

*

山东科学技术出版社出版

山东省新华书店发行

山东新华印刷厂德州厂印刷

*

787×1092毫米32开本 9印张 4插页 186千字

1983年5月第1版 1983年5月第1次印刷

印数1—4,000

书号 13195·00 定价 1.10元

序

新技术，新方法，新概念和各学科相互渗透是当前学科发展的主流。这在生物科学中更加鲜明与突出。由于免疫化学测定技术的发展，特别是免疫酶技术的发展，对有关抗原或抗体进行检测与定位就既灵敏又简便。我们要了解病毒和研究病毒病，尤其要控制病毒病，其前提是对病毒进行正确的鉴定诊断。根据有关方面的研究指出：在感染病毒的植物中，约有15%左右是隐症。如果没有正确有效的鉴定诊断，便无法进行控制。就是症状明显的发病植物，引起近似病毒病症状的原因也很多，倘无适当的技术方法，误诊在所难免，从而不可能取得“对症下药”的效果。另外，从一般生物材料的鉴定来说，有化学、物理学等方法。但是，如果测定材料是微量的，传统的化学方法便无能为力。放射化学追踪技术虽然可以解决一般化学方法不能解决的问题，但是在使用时因对工作人员有放射性元素的辐射危险性而感到不便，并且同位素试剂比较昂贵，当前难以普遍推广应用。而免疫技术特别是免疫酶技术，既高度灵敏，又是非放射性的，它能够实现在组织细胞内对有关抗原或抗体的定位，也能对溶液中的有关抗原进行定量测定。免疫酶技术的灵敏度与放射化学测定相仿，但试剂便宜，操作简便，使用安全，它既能用于细胞内亚显微结构的定位，又能大规模检测样品，为生物科学的有关研究开辟了一条新的途径。

《免疫酶技术》是朱培坤同志根据自己的工作实践体会，并参阅了国内外大量有关资料编写而成。这本书可以使读者较为全面地了解与掌握免疫酶技术。我想这本书的出版定能为广大读者服务，为开展免疫酶技术的研究和应用起促进作用。

王 鸣 岐

1982.10.

目 录

序

一、绪言	1
二、专一性抗血清的制备	6
I. 抗原及其纯化	6
(一) 抗原	6
(二) 抗原纯化的一般方法	8
(三) 植物病毒纯化的实例—长叶车前花叶病毒的纯化	9
II. 机体的特异性免疫反应及生产抗血清的免疫程序	14
(一) 机体的免疫反应	14
(二) 生产抗血清的免疫程序	19
III. 抗血清效价及其纯度测定	22
(一) 抗血清效价测定	22
(二) 抗血清纯度鉴定	23
IV. 植物病毒抗血清制备的实例	25
(一) RMV单价抗血清的制备	25
(二) RMV抗血清效价的测定	28
(三) RMV抗血清纯度的测定	29
三、免疫球蛋白的制备	33
I. 免疫球蛋白及其性质	33
(一) 免疫球蛋白的基本概念	33
(二) 免疫球蛋白的化学结构	33
(三) 免疫球蛋白的免疫学功能	35
(四) 免疫球蛋白的产生机理	35

II. 免疫球蛋白的制备	36
(一) 饱和硫酸铵沉淀法	36
(二) 硫酸钠沉淀法	38
(三) 冷乙醇法	39
(四) 抗体碎片的制备	40
III. 免疫球蛋白的效价、纯度与定量测定	41
(一) 免疫球蛋白的效价测定	41
(二) 免疫球蛋白的纯度鉴定	42
(三) 免疫球蛋白的定量测定	42
IV. 植物病毒抗血清免疫球蛋白的制备实例	43
(一) 饱和硫酸铵法粗提 RMV 抗血清中的免疫球 蛋白 IgG	43
(二) RMV 抗血清免疫球蛋白 IgG 的纯度鉴定	44
(三) RMV 抗血清免疫球蛋白 IgG 的效价测定	46
四、标记酶及其制备	47
I. 作为标记抗体用的酶	47
(一) 作为标记抗体用的酶应具备的特点	47
(二) 现在国内外已用于免疫酶技术的酶	48
II. 酶纯化的一般原理和方法	48
III. 酶纯化的实例	51
(一) 辣根过氧化物酶及其制备	51
(二) 碱性磷酸酶的制备	61
五、酶标记抗体的制备	65
I. 酶与抗体的交联	65
(一) 交联方法简述	65
(二) 酶与 IgG 交联的原理	68
(三) 使酶与抗体结合的交联剂	70
(四) 酶标记抗体的纯化及保存	71

II. 酶标记抗体制备的实例	74
(一) 戊二醛一步法交联辣根过氧化物酶与IgG	74
(二) 戊二醛一步法交联碱性磷酸酶与IgG	75
(三) 戊二醛二步法交联辣根过氧化物酶与IgG	76
(四) 过碘酸氧化法交联辣根过氧化物酶与IgG	78
(五) 简易戊二醛二步法交联辣根过氧化物酶与IgG	80
(六) 戊二醛—过碘酸钠法交联辣根过氧化物酶与 IgG	82
(七) 苯二马来酰亚胺法交联半乳糖苷酶和抗体Ig的 Fab'	83
(八) 偶氮桥法交联碱性磷酸酶与IgG	85
III. 酶标记抗体的定量及其克分子比值	87
(一) 酶标记抗体的定量	87
(二) 酶(HRP)标记抗体的克分子比值	87
六、酶底物的配备	89
I. 酶底物的选择	89
(一) 在免疫酶技术中作为酶底物的条件	89
(二) 酶底物的选择	89
(三) 合理使用酶底物	90
II. 酶底物的配备法	93
(一) 辣根过氧化物酶的底物配备法	93
(二) 碱性磷酸酶的底物配备法	98
(三) 葡萄糖氧化酶的底物配备法	98
(四) β -D-半乳糖苷酶的底物配备法	99
七、免疫酶标固相载体方法	101
I. 免疫酶技术的产生、发展、分类及其命名	101
II. 免疫酶标固相载体方法	105
(一) 固相载体	105

(二) 酶联免疫吸附测定(ELISA)	109
(三) ELISA应用实例	112
(四) ELISA应用的一些说明	117
(五) 具有吸附能力的小球状物载体方法	125
八、免疫酶标组织化学方法	131
I. 组织细胞内源过氧化物酶的抑制	131
(一) 抑制内源酶的重要性	131
(二) 酶抑制的一般概念	134
II. 组织及组织内有关抗原的固定	136
III. 标本的制备	139
(一) 撕剥表皮	139
(二) 徒手切片	139
(三) 涂抹法	140
(四) 压碎法	140
(五) 冰冻切片法	141
(六) 石蜡切片法	143
IV. 免疫酶标组织化学法原理及实验	145
(一) 免疫酶标组织化学法原理	145
(二) 免疫酶标组织化学直接法对青菜叶片(横切面) 内RMV的定位	145
(三) 免疫酶标组织化学间接法对青菜叶片(横切面) 内TuMV的定位	149
(四) 免疫酶标组织化学简便法对青菜下表皮内RMV 的检测	150
九、非标记免疫酶技术	153
I. “抗体搭桥”法	154
(一) “抗体搭桥”法原理	154
(二) 混合抗体直接法实验程序	155

(三) 混合抗体间接法实验程序	157
(四) “杂交抗体”法	157
(五) 扩大抗体法	157
II. PAP法	158
(一) PAP法原理	158
(二) PAP法一般程序	159
(三) PAP的克分子比例	160
(四) PAP最适实验浓度	161
(五) 讨论	162
(六) PAP法对青菜叶片(冰冻切片)内RMV定位 的实例	164
I. 非标记免疫酶固相载体方法	168
十、免疫酶电子显微镜技术	170
I. 制备电子显微镜样品常识	170
(一) 电子显微镜技术中使用的标本支持物	170
(二) 超薄切片	172
II. 免疫酶标电镜技术	177
(一) 免疫酶标电镜技术的简要介绍	177
(二) 免疫酶标电镜技术的一般程序	179
(三) 免疫酶标电镜技术的实例	180
I. 非标记免疫酶电镜技术	183
(一) 非标记免疫酶电镜技术的基本原理	183
(二) 使用HRP抗体的非标记免疫酶电镜技术的 程序	184
(三) 使用HRP抗体的非标记免疫酶电镜技术对 RMV在植物组织细胞内定位的实例	186
(四) 使用PAP复合物的非标记免疫酶电镜技术	189
十一、免疫酶技术的进展	190

I. 酶免疫电泳技术	190
(一) 酶免疫电泳技术的原理	190
(二) 酶 (H R P) 免疫电泳技术的程序	190
II. 酶联免疫电扩散测定技术	192
(一) 酶联免疫电扩散测定技术的原理	192
(二) 酶联免疫电扩散测定技术的程序	192
III. 酶标记抗原对流免疫电泳	194
(一) 酶标记抗原对流免疫电泳的原理	194
(二) 酶标记抗原对流免疫电泳程序 (检测血吸虫 病)	194
IV. 酶标醋酸纤维膜免疫电泳技术	196
(一) 酶标醋酸纤维膜免疫电泳技术的原理	196
(二) 酶标醋酸纤维膜免疫电泳技术的程序 (检测 RMV)	196
V. 用酶标试纸检测组织或器官内有关抗原	199
(一) 用酶标试纸检测组织或器官内有关抗原的原 理	199
(二) 用酶标试纸检测青菜叶片内长叶车前花叶 病毒的程序	199
VI. 免疫酶技术的发展趋势	202
十二、免疫酶技术的应用	207
I. 免疫酶技术的应用简况	207
(一) 内分泌学	207
(二) 免疫病理学	207
(三) 血液学	208
(四) 寄生虫学	208
(五) 微生物学	209
(六) 人体及动物病毒学 (包括立克次氏体)	209

(七) 植物病毒学	210
(八) 兽医学	211
(九) 肿瘤学	211
(十) 细胞生物学	211
(十一) 遗传学	212
(十二) 生物化学	212
(十三) 医学及药理学	212
(十四) 食品卫生学	213
(十五) 其它	213
II. 免疫酶技术应用实例的介绍	213
(一) 免疫酶标固相载体方法的应用实例	213
(二) 免疫酶标组织化学方法和免疫酶标电镜技术的 应用实例	218
(三) 非标记免疫酶组织化学方法和非标记免疫酶电 镜技术的应用实例	220
III. 关于免疫酶技术应用的说明	224
十三、相关的实验技术	225
(一) 盐(硫酸铵)的饱和度与盐析技术	225
(二) 密度梯度离心技术	226
(三) 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术	227
(四) 凝胶过滤技术	230
(五) 离子交换葡聚糖凝胶层析技术	232
(六) 离子交换纤维素层析技术	234
(七) 琼脂糖珠免疫吸附剂亲和层析技术	238
(八) 葡聚糖凝胶(Sephadex)免疫吸附剂亲和层 析技术	241
(九) 微量克氏定氮法与双缩脲法	242
(十) 酶与蛋白抗原的交联技术	243

(十一) 酶联金葡萄球菌A蛋白(简称PPA)技术	244
(十二) 样品去盐技术	247
(十三) 样品浓缩技术	248
(十四) 冰冻干燥技术	251
(十五) 样品贮藏方法	253
(十六) 玻璃器皿(包括盖玻片、载玻片)清洗技术	253
(十七) 醋酸纤维膜的制备法	255

附录

I. 试剂(包括缓冲液)配方	256
II. 缩写检索	264

参考文献	269
------	-----

编后语

一、绪 言

免疫酶技术是一项新兴的先进的免疫化学测定技术，自本世纪六十年代问世以来，引起了许多学者和有关技术人员的注意。这是因为免疫酶技术有其独特的优点，主要表现在以下几个方面。

专一性强。抗原与抗体的免疫反应是专一反应，而免疫酶技术以免疫反应为基础，所检测的对象是抗原（或抗体），使用的抗体除标记了酶以外，与普通抗体的免疫反应特性并无多大差别。

灵敏度高。由于抗体联结上了酶，因此，藉助于酶与底物的显色反应，显示抗原与抗体的结合，大大提高了灵敏性，使检测水平接近放射免疫测定法。

样品易保存。经过酶反应显示的有色产物大多比较稳定，因此有利于样品的保存。

结果易观察。对检测结果既可用肉眼观察，又可用显微镜观察，也可以用分光光度计进行比色测定，还可用电子显微镜观察，这是因为某些酶反应产物能使电子密度发生改变，从而引起被检物的显示。

可以定量测定。溶液中的抗原物质，应用酶免疫吸附技术，进行比色测定，依据光密度值的变化，可以定量。预计用细胞分光光度计，可对组织内的抗原进行免疫酶技术的定量测定。

仪器和试剂简单。对免疫酶技术来说，不需要荧光显微镜，也不需要测试放射性的特殊仪器，所用仪器及试剂均属一般。普通实验室及生产应用单位均易购置。

此外，各项免疫酶技术，操作比较简便，工作人员不需要采取安全防护措施。

如果将抗原联结了酶，那么，用所得到的酶标记抗原可以检测相应的抗体。

本世纪六十年代末七十年代初，Sternberger, L.A 等先后报道了非标记免疫酶的技术方法即通常所称的“抗体搭桥”法和PAP染色法。非标记免疫酶技术对抗原或抗体的检测与定位，无论是用光学显微镜还是用电子显微镜观察，其灵敏度均很高。据某些学者估计，要比免疫荧光反应灵敏100~1,000倍。另外，可以避免标记处理给酶与抗体的活性所带来的损害和标记抗体与非标记抗体对抗原竞争所带来的干扰。因此，尽管非标记免疫酶技术方法比较繁复，但是使用它的人越来越多。

当前，对分子生物学的研究方兴未艾，因此，可以应用免疫酶技术对动植物组织内的有关抗原物质予以定位，然后用电子显微镜在亚显微结构的水平上，对有关抗原物质和抗原与细胞亚显微结构的关系进行观察与研究，这项免疫酶电镜技术的工作内容同样有必要向读者作些介绍。

本书将免疫酶标技术、非标记免疫酶技术和免疫酶电镜技术统称为免疫酶技术。经过许多科学家和技术人员的努力，免疫酶技术的三大类技术又各衍生出许多分支，其中有免疫酶标固相载体方法的酶联免疫吸附测定，即ELISA和具有吸附能力的小球状物载体方法，即DASS等；免疫酶标

组织化学方法；非标记免疫酶的“抗体搭桥”法和PAP法以及免疫酶标电镜技术和非标记免疫酶电镜技术等。这些技术可以根据不同的材料和不同的研究课题予以采用。

任何新兴的先进的科学技术，总有着其自身存在的基础。免疫酶技术成功应用的基础主要取决于：

抗原的纯化以及纯化抗原的量。只有获得相当数量的纯化抗原，才有可能制备高效价的专一性抗血清，和获得理想的免疫球蛋白。

酶的纯化及其数量。只有获得一定数量的纯化酶才能用于对抗体（或抗原）的标记，或者在非标记免疫酶技术中作为抗原使用。

使酶与抗体（或抗原）交联起来的方法与条件，直接影响酶标抗体（或抗原）的活性，从而影响免疫酶技术的使用。

在免疫酶技术的固相载体方法中，固相载体的选择是否合适，影响实验结果；在免疫酶技术的组织化学方法中，则要注意消除组织中内源酶染色与非特异性染色的干扰，否则会使实验达不到理想的目的。

上述诸因素虽然非常重要，但也不能忽略其它的一些实验条件，尤其是对连续步骤处理的免疫酶技术，不能容许任何环节的脱节。本书在介绍免疫酶技术的应用时，要注意每项实验处理的连贯性，使得读者能将免疫酶技术较快地应用到自己的工作中去。

另外，考虑到当前研究领域相互渗透的同时，出现了各项技术之间密切相关的联系，就免疫酶技术的应用来说，还牵涉到一些常规的生物化学实验技术、电子显微镜技术、组

织制片技术等，这些相关的实验技术对某些读者来讲或许已经知道，但是，在使用一些时用时不用的技术时又会促使人去查阅文献，而对于一些还不了解这些技术的读者来说，甚至会感到查阅文献的不便，为此，特选择某些相关的常规实验技术作为参考内容，这对掌握和应用免疫酶技术是有益的。

虽然本书将植物病毒作为介绍免疫酶技术的实验材料，但是这些理论与实验方法同样适用于其他学科。这是因为，原则上讲，只要有抗原抗体反应的实验，均能使用免疫酶技术。免疫酶技术的应用范围十分广泛，不管是人、动物、植物，还是微生物，只要存在着可以作为抗原的物质，就能采用免疫酶技术进行研究和观察。因此，对于医生、化验师、植保人员、检疫人员、兽医、微生物工作者以及对于哪些从事生物化学、细胞学、植物生理学、植物病理学、植物病毒学、动物生理学、动物病理学、微生物学、遗传学等有关医学、农学、生物学的研究人员，大专院校和中专技校有关学科的师生，均有必要了解和掌握免疫酶技术。

免疫酶技术与其它新兴技术一样正处于发展之中。现在许多学科的实验室广泛采用免疫酶技术，使免疫酶技术的发展有了扎实的基础。可以这样说，凡是原来可用免疫荧光技术或放射免疫技术测定的工作，几乎均可使用免疫酶技术。加之免疫酶技术在其它技术的配合下不断地更新与进步，使免疫酶技术经常增添新内容，从而在检测灵敏度，测定样品数量和测定方法简便化等方面，均取得了进展。免疫酶技术的优点虽然很多，但是还不完善，在许多方面还有待于研究人员进一步探索，例如在免疫酶标固相载体方法中，蛋白质

与固相载体的吸附不够稳定；在免疫酶标组织化学方法中，非特异性染色影响检测的结果；在免疫酶电镜技术中，由于酶与多个底物分子反应，从而影响亚显微结构水平的定位等。可以相信，随着科学技术的发展，这些问题迟早会一一解决，从而使免疫酶技术在实际应用中发挥更大的作用。