

现代实用医学实验技术丛书

SHIYONG
MIANYIXUE
SHIYANJISHU

实用免疫学 实验技术

吴雄文 梁智辉 主编
湖北科学技术出版社



现代实用医学实验技术丛书

实用免疫学实验技术

主 编:吴雄文 梁智辉

编 者(按姓氏笔画顺序):

王 晶 尹丙姣 朱慧芬 李清芬

张 悦 吴雄文 邵静芳 陈 浩

杨 敬 郑 芳 姜小丹 徐 勇

梁智辉

湖北科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

实用免疫学实验技术/吴雄文等编. —武汉:湖北科学技术出版社, 2002. 9

(医学实验技术丛书)

ISBN 7-5352-2847-X

I. 实… II. 吴… III. 免疫学 - 实验 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 059344 号

现代实用医学实验技术丛书

实用免疫学实验技术

© 吴雄文 梁智辉 主编

责任编辑:冯友仁

封面设计:王 梅

出版发行:湖北科学技术出版社

电话:86782508

地 址:武汉市武昌黄鹤路 75 号

邮编:430077

印 刷:华中理工大学印刷厂

邮编:430074

787mm × 1092mm

16 开

19 印张

466 千字

2002 年 9 月第 1 版

2002 年 9 月第 1 次印刷

印数:0 001 - 2 500

ISBN 7 - 5352 - 2847 - X/R·638

定价:35.00 元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

前 言

免疫学是现代生物医学的支柱学科之一,免疫学技术不仅在免疫学理论研究和实践应用中体现其重要性,而且作为基础研究手段之一,广泛应用于现代生物医学的各学科,是基础研究、临床和预防工作的不可或缺的工具。免疫学技术的进展日新月异,较为系统地介绍进入实用阶段的免疫学新技术是必要的。

本书共分为12章,着重介绍目前较为广泛应用的免疫学新技术,内容包括抗体制备、免疫亲和层析、免疫印迹、免疫标记、免疫PCR、免疫细胞分离、免疫细胞功能检测、细胞因子及其受体检测、细胞凋亡检测、HLA分型、T细胞克隆、HLA/抗原肽四聚体制备、噬菌体展示技术。在编写过程中,强调内容的实用性和可行性,本书介绍的实验基本上是编者十分熟悉或亲自操作的内容,因此具有较大的技术参考价值。

正是由于本书为技术参考书,各位编者在编写过程中力求总结多年的研究工作经验,虽然力求使实验原理、操作步骤、资料数据等内容准确无误,但是因个人视野有限,加上免疫学技术进展迅速,难免在阐述上有不足之处。希望各位读者不吝斧正,以便修正和补充。

沈美心

2002年8月于华中科技大学同济医学院

第一章 抗体的制备技术

第一节 多克隆抗体的制备	第二节 单克隆抗体的制备
(抗血清的制备技术) (1)	(杂交瘤技术) (7)
一、免疫动物的选择 (1)	一、基本原理 (7)
二、抗原的准备和免疫原的	二、制备过程 (8)
注射剂量 (1)	第三节 基因工程抗体技术 (14)
三、佐剂 (2)	一、人-鼠嵌合抗体 (15)
四、免疫方案 (2)	二、小分子抗体 (18)
五、免疫效价的检测 (2)	三、抗体库技术 (21)
六、抗体的纯化 (2)	四、基因工程抗体的表达,
七、抗体的保存 (7)	纯化及活性测定 (21)

第二章 免疫亲和层析技术

第一节 免疫亲和层析的基本过程 (27)	第三节 免疫亲和层析的操作方案 (31)
一、概要 (27)	一、免疫亲和层析程序方案
二、操作步骤 (28)	概述 (31)
第二节 免疫亲和层析的主要	二、抗体亲和层析柱的制备 (31)
影响因素 (29)	三、抗原与抗体-微珠基质的
一、影响免疫亲和层析纯化效果	结合 (37)
的因素 (29)	四、从免疫亲和层析柱上
二、免疫亲和层析使用的抗体 (29)	洗脱抗原 (39)

第三章 免疫印迹

第一节 蛋白质的电泳分离 (43)	第二节 将蛋白质从凝胶中转印
一、样本的制备 (43)	至膜上 (49)
二、蛋白质凝胶电泳 (47)	一、以 PVDF 膜为固相载体的

半干转印法	(49)	问题	(54)
二、转印后切取印迹膜	(50)	一、抗体的性质	(54)
三、印迹膜蛋白染色	(51)	二、样品中待检测蛋白质的含量	(54)
第三节 免疫检测	(51)	三、背景问题	(54)
一、印迹膜上非特异性蛋白质结合位点的封闭	(52)	四、转印效率低	(55)
二、直接与间接检测方法	(52)	五、设置对照与解释结果	(56)
第四节 免疫印迹中需要注意的		六、免疫印迹技术的灵敏度	(56)

第四章 免疫标记技术

第一节 免疫荧光标记技术	(57)	第三节 放射性核素标记技术	(74)
一、荧光抗体的制备	(57)	一、放射性核素标记	(74)
二、荧光标记技术的应用	(60)	二、放射性核素标记技术的应用	(77)
第二节 免疫酶技术	(64)	第四节 免疫金标记技术	(81)
一、酶标抗体的制备	(65)	一、胶体金的制备	(81)
二、酶-抗酶复合物的制备	(68)	二、胶体金标记蛋白的制备	(82)
三、酶标抗体和酶-抗酶复合物的应用	(69)	三、胶体金标记技术的应用	(84)

第五章 免疫学中常用的 PCR 技术

第一节 PCR 基本原理和标准 PCR 方法	(88)	九、PCR 常见问题及处置	(93)
一、PCR 基本原理	(88)	第三节 PCR 反应模板的制备	(93)
二、标准 PCR 方法	(88)	一、细菌 DNA 的制备	(94)
第二节 PCR 反应体系的组成及优化	(90)	二、全血标本 DNA 制备	(94)
一、模板	(90)	三、白细胞标本 DNA 制备	(95)
二、寡聚核苷酸引物	(90)	四、临床拭子标本的 DNA 制备	(97)
三、三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP)	(91)	五、固定和包埋的组织标本的 DNA 制备	(97)
四、 Mg^{2+} 的浓度	(91)	六、微量和特殊标本的 DNA 制备	(99)
五、耐热 DNA 聚合酶	(91)	七、体外培养细胞和组织细胞 DNA 的提取	(100)
六、循环参数	(92)	八、凝胶中 PCR 产物的再扩增标本制备	(101)
七、污染的对策	(92)		
八、其他优化策略	(93)		

九、RNA 标本的制备····· (102)	三、原位 PCR(In situPCR) ····· (112)
第四节 PCR 产物的检测 ····· (102)	第六节 PCR 技术在免疫学中
一、凝胶电泳分析法····· (102)	应用 ····· (115)
二、点杂交····· (103)	一、PCR 在淋巴细胞抗原受体研究
三、PCR-ELISA 法 ····· (105)	中的应用····· (115)
第五节 免疫学中的特殊	二、在 HLA 分型、细胞因子
PCR 技术 ····· (106)	检测和基因工程抗体的
一、免疫 PCR(IM-PCR) ····· (106)	制备中的应用····· (118)
二、定量 PCR ····· (109)	

第六章 免疫细胞的分离

第一节 免疫细胞的分离的	四、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的分离····· (126)
原理和手段 ····· (120)	五、T 细胞亚群的分离 ····· (129)
一、基于细胞物理性状的	六、NK 细胞的分离 ····· (132)
分离方法····· (120)	七、单核细胞分离····· (134)
二、基于细胞表面标记的	八、人外周血中性粒细胞制备····· (135)
分离方法····· (121)	九、嗜碱性粒细胞的分离····· (136)
第二节 各种免疫细胞的	十、嗜酸性粒细胞的分离····· (137)
分离与纯化 ····· (122)	十一、组织肥大细胞的分离····· (137)
一、外周血白细胞的	十二、树突状细胞(DC) ····· (138)
分离和纯化····· (122)	十三、红细胞的分离····· (139)
二、外周血单个核细胞的分离····· (124)	
三、淋巴细胞的分离····· (125)	

第七章 免疫细胞功能的检测

第一节 免疫细胞数量的检测 ····· (141)	四、B 细胞功能的测定 ····· (152)
一、通过检测表面标志(CD 分子)	五、LAK/TIL 细胞的活性测定 ····· (155)
检测各类免疫细胞的数量····· (141)	第三节 NK 细胞活性测定····· (157)
二、抗原特异性 T 细胞数量的检测	一、同位素释放法····· (157)
——MHC/多肽四聚体法 ····· (145)	二、乳酸脱氢酶释放试验····· (159)
第二节 T、B 淋巴细胞功能测定 ····· (146)	第四节 中性粒细胞功能测定 ····· (160)
一、T、B 淋巴细胞增殖反应 ····· (146)	一、中性粒细胞吞噬功能
二、混合淋巴细胞培养····· (148)	的测定····· (160)
三、细胞毒性 T 细胞胞毒功能	二、中性粒细胞粘附功能
测定····· (149)	的测定····· (160)

三、中性粒细胞移动功能的测定	的检测····· (164)
——琼脂糖平板法····· (161)	三、巨噬细胞吞噬功能测定
四、中性粒细胞杀菌功能的检测	——皮泡法····· (165)
——全血化学发光测定法····· (161)	第六节 嗜碱性粒细胞功能和
五、硝基蓝四氮唑(NBT)	红细胞免疫功能的测定····· (166)
还原能力的测定····· (162)	一、嗜碱性粒细胞功能的测定——
第五节 单核-巨噬细胞	嗜碱性粒细胞脱颗粒试验····· (166)
功能测定····· (162)	二、红细胞免疫功能的测定····· (167)
一、单核-巨噬细胞胞毒作用	
的检测····· (163)	
二、单核-巨噬细胞趋化功能	

第八章 细胞因子及其受体的检测

第一节 细胞因子的生物活性	第三节 细胞因子的分子生物学
检测法····· (169)	检测法····· (189)
一、IL-1的生物活性检测法····· (170)	一、斑点杂交法测定培养
二、IL-2的生物活性检测法····· (175)	细胞 IL-2 mRNA 的含量····· (189)
三、TNF的生物活性检测法····· (179)	二、原位杂交法测定
第二节 细胞因子及其受体的免疫学	TNF的 mRNA····· (196)
检测法····· (181)	三、反转录 PCR(RT-PCR)定量
一、TNF的免疫学检测法····· (181)	检测细胞因子的 mRNA····· (198)
二、IL-2R的免疫学检测法····· (184)	
三、细胞内(胞浆)细胞因子的	
免疫学检测法····· (188)	

第九章 细胞凋亡的检测方法

第一节 细胞凋亡的形态学	一、基于细胞凋亡时 DNA 变化的
检测方法····· (200)	检测方法····· (208)
一、普通光学显微镜检测法····· (200)	二、基于凋亡诱导蛋白酶变化的
二、荧光显微镜检测法····· (202)	细胞凋亡检测····· (209)
三、电子显微镜检测法····· (207)	第三节 免疫学方法(ELISA)····· (211)
四、凋亡指数和细胞活力的	第四节 原位末端转移酶
定量测定(荧光染色法)····· (207)	标记技术····· (212)
第二节 细胞凋亡检测的	一、荧光标记法····· (212)
生物化学方法····· (208)	二、酶标记法····· (213)

第五节 靶细胞 DNA 片段的定量分析与杀伤 细胞介导的细胞溶解试验 ····· (214)	的常用方法 ····· (216)
第六节 流式细胞分析术检测 细胞凋亡 ····· (215)	第七节 细胞凋亡的相关 蛋白分析 ····· (219)
一、流式细胞分析术检测细胞凋亡 的基本原理 ····· (215)	一、Fas 抗原的检测 ····· (219)
二、流式细胞分析术检测细胞凋亡	二、Bcl-2 原癌基因的检测 ····· (221)
	三、P53 蛋白检测 ····· (222)

第十章 HLA 分型技术

第一节 PCR-SSO HLA 分型 技术 ····· (225)	三、PCR 扩增产物的 RFLP 分析 ····· (233)
一、标本基因组 DNA 提取 ····· (225)	四、结果分析 ····· (234)
二、HLA 等位基因序列特异性 探针(SSO)及其标记 ····· (226)	第三节 PCR-SSP HLA 分型技术 ····· (235)
三、PCR 扩增标本的 HLA-DR 基因 ····· (228)	一、标本基因组 DNA 提取 ····· (235)
四、扩增 DNA 固定于 尼龙膜上 ····· (228)	二、PCR-SSP 扩增体系的 组成和准备 ····· (235)
五、预杂交和杂交 ····· (229)	三、PCR-SSP 扩增 ····· (237)
六、洗膜 ····· (229)	四、琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物 ····· (238)
七、结果显示 ····· (230)	五、结果分析 ····· (238)
八、结果分析 ····· (230)	第四节 常用 HLA DNA 分型技术的 特点和选用 ····· (239)
第二节 PCR-RFLP HLA 分型技术 ····· (230)	一、常用 HLA DNA 分型技术 的特点 ····· (239)
一、待测样本基因组 DNA 的提取 ····· (232)	二、常用 HLA DNA 分型技术 的选用 ····· (240)
二、PCR 扩增样本 DNA 的 HLA 基因片段 ····· (232)	

第十一章 T 细胞克隆技术和 HLA/抗原肽四聚体制备技术

第一节 T 细胞克隆技术 ····· (241)	三、鼠 T 细胞克隆的制备 ····· (242)
一、抗原特异性 T 细胞克隆 的制备 ····· (241)	四、利用 HLA/抗原肽四聚体和流式细胞 分选仪制备 CTL 细胞克隆 ····· (244)
二、抗原非特异性 T 细胞克隆 的制备 ····· (242)	第二节 HLA/抗原肽四聚体 制备技术 ····· (246)

一、HLA - I 类分子单体的 制备和纯化····· (247)	和纯化鉴定····· (251)
二、MHC - I 单体的生物素化	三、四聚体的制备及应用····· (254)

第十二章 噬菌体展示技术

第一节 噬菌体展示技术	三、噬菌体滴度的测定····· (271)
基本原理····· (257)	四、噬斑的扩增····· (271)
一、噬菌体展示技术的 应用原理····· (257)	五、测序模板的快速纯化····· (272)
二、噬菌体展示载体 构建原理····· (258)	六、ELISA 检测筛选到的 靶分子结合肽····· (272)
第二节 噬菌体展示技术筛选	七、影响筛选的因素····· (274)
单链抗体····· (258)	第四节 噬菌体肽库的应用····· (274)
一、噬菌体展示抗体库的构建····· (258)	一、在生物活性小肽筛选方面 的应用····· (274)
第三节 噬菌体展示技术	二、在抗原表位研究中的应用····· (274)
筛选多肽····· (267)	三、在人工抗体合成中的应用····· (275)
一、噬菌体肽库的构建····· (267)	四、展望····· (275)
二、筛选多肽····· (267)	

附 录

附录一 细胞爬片、甩片或切片的 制备和固定····· (276)	附录四 常用发色底物····· (283)
附录二 蛋白质定量与凝胶染色····· (278)	附录五 Tris - 甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺 电泳凝胶的配制····· (284)
附录三 常用蛋白酶和 蛋白酶抑制剂····· (281)	附录六 实验用小鼠的品系····· (286)
	附录七 常用溶液的配制····· (286)

第一章 抗体的制备技术

抗体是机体在抗原刺激下所产生的特异性球蛋白,所以又称为免疫球蛋白(Ig)。特异性抗体是免疫应答中的重要产物,因此亦是免疫学实验中常用的试剂,对于抗原的分析鉴定和定量检测极为重要,在各种免疫学诊断和治疗中应用极为广泛。

传统的方法制备的抗体是用抗原免疫动物后所得,称为多克隆抗体(polyclonal antibody, PcAb),也称第一代抗体;通过杂交瘤技术制备出针对一种抗原决定簇抗体称为单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb),也称第二代抗体;采用基因工程的手段研究抗体与功能的关系,并对抗体基因进行改造和重组等,由此制备出的基因工程抗体(genetic engineering antibody, GEAb),即为第三代抗体。本章简要介绍三种类型抗体的制备方法。

第一节 多克隆抗体的制备(抗血清的制备技术)

由于抗原分子具有多种抗原决定簇,每一种决定簇可激活具有相应抗原受体的B细胞产生免疫应答,因而可产生多种针对不同抗原决定簇的抗体,这些由不同B细胞克隆产生的抗体称之为多克隆抗体。多克隆抗体的亲和力较一般单克隆抗体高,是其独特的优点。多克隆抗体的制备是一复杂的过程,为了制备高效价和高特异性的抗体,必须有理想的免疫原,挑选合适的动物和制定切实可行的免疫方案。

一、免疫动物的选择

供免疫用的动物主要有哺乳类和禽类,其中常用的有家兔、绵羊、豚鼠和鸡,有时根据需要也可选用鼠、山羊和马等。选择动物时应考虑抗原与动物的种属关系、抗原性质与动物种类、免疫血清的需要量、免疫血清的要求以及动物个体的选择等因素。如甾体激素多用家兔;对于难以获得的抗原,且抗体需要量少,可用纯系小鼠制备。免疫用动物应选适龄、健壮,最好为雄性。体重为25g左右BALB/c小鼠。

二、抗原的准备和免疫原的注射剂量

抗原的种类繁多,包括天然的蛋白质抗原和细胞性抗原、合成肽抗原以及基因工程抗原等,不同的抗原免疫动物具有不同的特殊性。一般的完全抗原免疫动物需加用佐剂,合成肽抗原和基因工程抗原等半抗原物质需先通过人工的方法与蛋白质载体连接后再与佐剂混合免疫动物,方可获得理想的免疫效果。

免疫原的注射剂量应考虑其抗原性的强弱、分子量大小、动物的个体状态和免疫时间。对于细胞免疫的剂量,每次用于免疫羊的细胞数一般不低于 1×10^8 ;免疫兔的细胞数不低于 1×10^7 ;免疫小鼠的细胞数不低于 1×10^6 。为了增强免疫反应,可以将佐剂注射在接种抗原部位的附近或对侧,或者先注射佐剂,再注射抗原。避免在细胞抗原中混合佐剂,以免破坏细胞,释放大量的胞质和胞核抗原,从而影响细胞膜抗原的免疫效果。对于纯可溶性抗原的免疫剂量,通常小鼠首次抗原剂量为50~100 μ g/次;大鼠为100~200 μ g/次;兔为100 μ g~1mg/次,合成免

抗原为 2mg(半抗原约为 20~200 μ g),一般需与等量福氏完全佐剂混合。加强免疫的剂量为首次剂量的 1/2,通常用不完全福氏佐剂或不用佐剂。如需制备高度特异性的抗血清,可选用低剂量抗原短程免疫法;反之,欲获得高效价的抗血清,宜采用大剂量抗原长程免疫法。

三、佐 剂

如用可溶性蛋白质抗原免疫家兔或山羊,在加用佐剂时一次注入量一般为 0.5~1mg/kg。如不加佐剂,则抗原剂量应加大 10~20 倍。佐剂有福氏(Freund's)佐剂、脂质体佐剂、氢氧化铝佐剂、明矾佐剂以及免疫刺激复合物(immune stimulating complex, ICOM)等。其中最常用的是福氏佐剂,根据其组成为完全福氏佐剂(CFA)和不完全福氏佐剂(IFA)两种。IFA 通常由羊毛脂 1 份、石蜡油 5 份组成,每毫升 IFA 中加入 1~20mg 卡介苗即为 CFA。

四、免疫方案

抗原注射途径可根据不同抗原及试验要求,选用皮内、皮下、肌肉、静脉或淋巴结内等不同途径注入抗原进行免疫。一般常采用背部、足掌、淋巴结周围、耳后等处皮内或皮下多点注射。初次免疫与第二次免疫的间隔时间多为 2~4 周。常规免疫方案为抗原加 CFA 皮下多点注射进行基础免疫;再以抗原加 IFA 作 2~5 次加强免疫,每次间隔 2~3 周,皮下或腹腔注射加强免疫。完成免疫程序后,先取少量血清测试抗体效价达到要求时,即可从动物心脏穿刺(豚鼠及家兔),颈静脉或颈动脉放血(家兔、羊及马匹)。待血液凝固后,离心沉淀分离出血清,加入 0.1%叠氮钠作为防腐剂。以可溶性蛋白抗原免疫家兔为例,具体免疫方案如下。

【主要材料和试剂】

- (1)健康雄性家兔 3 只;体重 2.5kg 左右,4~5 周龄。
- (2)CFA 和 IFA。
- (3)抗原(纯化人血清免疫球蛋白)。
- (4)无菌注射器,平皿。
- (5)刻度吸管,毛细吸管,研钵。

【免疫方法】

按每只家兔取纯化抗原 1mg 用 1~2ml PBS 或生理盐水稀释,加等体积 CFA 充分乳化后,于家兔背部及后腿肌肉、皮下多点注射。第一次免疫后间隔 1~2 周再以相同抗原 1mg/1ml 加等体积 IFA 乳化后,注入后腿肌肉或背部皮下多点加强免疫。尔后每隔 2~3 周按第二次免疫法重复加强免疫。每次免疫后 7~14d 抽取少许静脉血,分离血清,以备检测免疫效果。于第 4 次免疫后 5~7d 试血。

五、免疫效价的检测

于家兔耳静脉取血 1~2ml,分离血清。用环状沉淀试验测定抗体效价达 1:5 000 以上(稀释抗原),或用琼脂双向扩散试验测定抗体效价达 1:16 以上(稀释抗体),即可从心脏或颈动脉放血,或静脉采血,分离血清,进行抗体的纯化及检测。

六、抗体的纯化

(一)饱和硫酸铵盐析沉淀法

【材料和试剂】

(1) 饱和硫酸铵(saturated ammonium sulfate, SAS)。

(2) 透析袋。

(3) PBS。

(4) 高速低温离心机。

【操作步骤】

(1) 待提取样品经 4℃ 或室温离心 13 000r/min(20 000 × g), 30min, 收集上清。

(2) 取上清约 20ml 与等体积生理盐水混合后, 于搅拌下缓慢滴加 40ml SAS, 于 4℃ 沉淀 30min 以上或过夜, 使蛋白充分沉淀。

(3) 13 000r/min, 10min 4℃ 离心, 弃上清。

(4) 用 12ml 生理盐水溶解沉淀, 同步骤(2)滴加 8ml SAS, 4℃ 1h。

(5) 重复步骤(3)离心, 用 13.3ml 生理盐水溶解沉淀。

(6) 滴加 6.6ml SAS, 4℃ 1h。

(7) 重复步骤(4)离心后所得沉淀物用少许盐水溶解沉淀, 并装入透析袋。

(8) 用大于 20 倍体积的 PBS 于 4℃ 透析, 更换透析液数次, 可置 -20℃ 保存或进一步纯化。

(二) 辛酸提取法

该法可用于分离提取人、兔、小鼠血清中的 Ig 及杂交瘤诱生的腹水和培养上清液中 McAb。

【材料和试剂】

(1) 正辛酸。

(2) 60mmol/L, pH4.0 醋酸缓冲液, PBS。

(3) 透析袋。

(4) 高速低温离心机。

【操作步骤】

(1) 将待提取样品用 60mmol/L, pH4.0 醋酸缓冲液稀释 3~4 倍, 调 pH 至 4.5, 对含脂质较高的标本可采用二氧化硅粉或玻璃纤维吸附法除去脂质。

(2) 在室温下边搅拌边缓慢加入正辛酸, 按每 ml 样品中加 25μl, 若样品体积小于 5ml, 则每 ml 样品内加入 30μl 正辛酸, 搅拌 30min。

(3) 10 000g 离心 30min, 取上清液通过定性滤纸过滤, 装入透析袋, 用 20 倍体积的 PBS, 4℃ 透析过夜, 中间换液 3~4 次。

(4) 然后每毫升混合液加 0.27g 硫酸铵, 搅拌 30min。

(5) 以 5 000g 离心 15min, 收集沉淀物, 溶于少量 PBS 中, 再以 15 000g 离心 20min。上清液即为提取的 Ig, 其中大部分为 IgG, 约占 90%, 少量为 IgA 及 IgM, 回收率 > 80%。整个操作可在 24h 内完成。

(三) DEAE-纤维素提取法

该法提取 IgG 简便, 既可小量提取, 也可大量制备。

1. 批量提取法

称取 DEAE-纤维素(DE32 或 DE52) 50g, 置于 1 000ml 烧杯中, 先以蒸馏水漂浮除去细颗粒, 再经酸碱处理后, 用 0.01~0.05mol/L, pH8.0 左右的磷酸盐缓冲液(PB)平衡。将水分抽干, 或用布氏漏斗(内放两层滤纸)过滤, 收集湿纤维素, 以降低其离子强度。按 1ml 血清加湿

重 5g DEAE 纤维素,经过充分搅拌,置 4℃ 吸附 1h。上清液可再如此处理一次,即获得较纯的 IgG。该法提取 IgG 简便,既可小量提取,也可大量制备。

2. Tris - Cl 离子交换层析法 (Ion - exchange chromatography)

【材料和试剂】

- (1) DE32 或 DE52 纤维素。
- (2) HCl; NaOH; 0.01 ~ 0.05mol/L, pH8.0 PB; 0.01mol/L, pH8.6 Tris - Cl; 0.5mol/L NaCl。
- (3) 待纯化标本: 杂交瘤腹水或培养上清, 免疫血清或饱和硫酸铵粗提品。
- (4) 1.5 × 50cm 层析柱; 透析袋; 紫外分光光度计及其他透析和层析所需的试剂和器材。

【操作步骤】

- (1) DE52 纤维素的处理: DE52 经酸、碱处理, 0.01mol/L, pH8.6 Tris - Cl 平衡。
- (2) 装柱: 将层析柱固定于滴定架上, 柱底垫一圆形尼龙纱, 出口接一细塑料管并关闭出水。将浸泡于 0.01mol/L, pH8.6 Tris - Cl 中的 DE52 沿玻璃棒倒入柱中, 待 DE52 自然沉降 3 ~ 5cm 高时, 吸除 0.01mol/L, pH8.6 Tris - Cl, 或松开出水口螺旋夹, 控制流速 1 ~ 2ml/min, 同时连续加入 DE52 至所需高度。待 DE52 完全沉降后, 柱面放一圆形滤纸片。
- (3) 平衡: 松开出水口螺旋夹, 以 0.01mol/L, pH8.6 Tris - Cl 平衡, 控制流速为 15 滴/min, 待流出液与洗脱液之 pH 值达到一致时, 停止平衡。
- (4) 待提取样品的准备: 将蛋白装入透析袋里, 置 4℃ 冰箱, 对 0.01mol/L pH8.6 Tris - Cl 透析过夜。
- (5) 加样、洗脱与收集: 用吸管吸去柱面液体, 以毛细吸管沿柱壁加入样品, 样品体积相当于柱床体积的 1% ~ 2%, 蛋白浓度为 50 ~ 70mg。启开出水口螺旋夹使样品缓慢进入柱床内, 并用少量洗脱液清洗柱壁; 待液体进入柱床后, 以 0.01mol/L, pH8.6 Tris - Cl 洗脱, 控制流速为 14 ~ 16 滴/min。分部收集器收集, 紫外监测, 或人工收集, 以紫外分光光度计分别测定每管 280nm OD 值, 描绘洗脱液峰。
- (6) 浓缩: 将洗脱液的 280nm OD 上峰段与下峰段各管分别合并, 装入透析袋, 以 PEG 浓缩至所需体积。

3. Tris - PO₄ 离子交换层析法

该法在上述方法的基础上稍加改良, 即通过梯度洗脱, 可用于血清中 IgG 和 IgM 的提取。

【材料和试剂】

- (1) DE32 或 DE52 纤维素。
- (2) 待纯化标本: 杂交瘤腹水或培养上清, 免疫血清或饱和硫酸铵粗提品。
- (3) 1.5 × 50cm 层析柱; 透析袋及其他透析和层析所需的试剂和器材。
- (4) 梯度洗脱液包括: 0.005 mol/L, pH8.6 Tris - PO₄; 0.055mol/L, pH6.0 Tris - PO₄; 0.5mol/L, pH5.1 Tris - PO₄。

【操作步骤】

- (1) 蛋白标本对 0.005mol/L, pH8.6 Tris - PO₄ 透析。
- (2) DE52 装柱, 并以 0.005mol/L, pH8.6 Tris - PO₄ 平衡。
- (3) 加样, 以 0.005mol/L, pH8.6 Tris - PO₄ 洗脱, 紫外监测直至洗脱液 280nm OD 回到基线。这一步骤可除去血清中其他蛋白。
- (4) 以 350ml 0.055mol/L, pH6.0 Tris - PO₄ 洗脱, 这一步骤可用于纯化血清 IgG 和 IgM。
- (5) 以 125ml 0.055mol/L, pH6.0 Tris - PO₄ 和 125ml 0.5mol/L, pH5.1 Tris - PO₄ 梯度洗脱,

总量收集 250ml;重复步骤(5)。

(6)根据 280nm 峰值合并蛋白峰,透析浓缩和保存同上。

用过的 DE52 可用 0.01mol/L, pH8.6 Tris - Cl 和 0.5mol/L NaCl、0.01mol/L, pH8.6 Tris - Cl 梯度洗脱回收。再用蒸馏水洗至中性,加入 0.02%叠氮钠于 4℃保存备用。

(四)DEAE - Sephadex A - 50 提取法

DEAE - Sephadex A - 50(简称 A - 50)为弱碱性阴离子交换剂,经过 NaOH 处理将 Cl^- 型转为 OH^- 型后,可吸附酸性蛋白。 γ_1 球蛋白属中性蛋白,等电点为 pH6.85 ~ 7.5,其余均属酸性蛋白。在溶液为 pH8.0 时,酸性蛋白均被 A - 50 吸附。从而可分离纯化 IgG。

1. 批量吸附法

此法可在 1 天内完成提取过程,纯化前后样品体积变化不大,所得 IgG 无变性现象,抗体效价亦无明显降低。制品可达 PAGE 及免疫电泳纯。适用于提纯人、羊、兔等血清中的 IgG。

【材料和试剂】

(1) DEAE - Sephadex A - 50。

(2) PB 缓冲液:0.01mol/L, pH6.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液。

【操作步骤】

(1)A - 50 的预处理:称取 4 ~ 6g A - 50 悬浮于 500 ~ 1 000ml 蒸馏水中,1h 后倾去上层细粒。然后将 A - 50 浸泡于 0.5mol/L NaOH 液(60 ~ 100ml)中,搅拌后静置 30min,以蒸馏水洗至中性,再用 0.1mol/L NaH_2PO_4 同上操作过程处理,蒸馏水洗至中性。最后用 0.01mol/L, pH6.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(PB)平衡,减压抽干,保存备用。

(2)吸附提取:取 15ml 血清加等量 0.01mol/L, pH6.5 PB 稀释至 30ml(也可不稀释),加入 1/4 体积滤干的 DEAE - Sephadex A - 50(相当于干重 1g)混合。室温(或 4℃)浸泡 1 h 后过滤,收集滤液。再加入同样体积的 DEAE - Sephadex A - 50 重复上述处理过程共 3 次,亦可在血清内加入过量 DEAE - Sephadex A - 50 吸附处理一次。收集滤液合并,即为提纯的 IgG 制品。或再透析去盐,浓缩、冻干保存备用。

2. A - 50 柱层析法

【材料和试剂】

(1) DEAE - Sephadex A - 50。

(2)待纯化标本:杂交瘤腹水或培养上清,免疫血清或饱和硫酸铵粗提品。

(3)1.5 × 50cm 层析柱;透析袋及其他透析和层析所需的试剂和器材。

(4)PB 缓冲液:0.1mol/L, pH7.4 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液。

【操作步骤】

(1)A - 50 经酸碱处理,平衡至中性后,浸泡于 0.1mol/L, pH7.4 PB 中,置 4℃冰箱储存备用。

(2)装柱:同 DE52。

(3)平衡:松开出水口螺旋夹,以 PB 平衡,控制流速为 15 滴/min,待洗脱液与流出液之 pH 值达到一致时,停止平衡。

(4)加样、洗脱、收集与浓缩:基本上同 DE52,以 0.1mol/L PB 洗脱。

用过的 DEAE - Sephadex A - 50 可用 0.5mol/L Na_2HPO_4 洗脱回收。洗至流出液中无蛋白(OD280nm < 0.04)后再用蒸馏水洗至中性,加入 0.02%叠氮钠于 4℃保存备用。

(五) IgM 的纯化

大多数 IgM 类抗体是优球蛋白不溶于水,故可用双蒸水透析纯化 IgM。对那些溶于水的 IgM 类抗体可用饱和硫酸铵沉淀。沉淀后可以采用颗粒排斥层析法(凝胶过滤)进一步纯化。

颗粒排斥层析(size - exclusion chromatography)法:又称分子筛层析或凝胶过滤,是利用微孔凝胶分离不同大小分子的抗体,可用于样品中 IgG 和 IgM 的分离,常用于对硫酸铵粗提物的进一步纯化。通过该法纯化所得抗体可用于 Ig 分子片段的制备、FITC、生物素或同位素标记。

【材料和试剂】

- (1) 抗血清,杂交瘤腹水或其上清,硫酸铵沉淀粗提 γ 球蛋白。
- (2) 含 0.02% NaN_3 的硼酸缓冲液, PBS。
- (3) 透析袋; 26mm $\times$ 900mm 层析柱。
- (4) 适当筛孔的颗粒排斥(SE)凝胶(AcA Ultragel - 或 Sephacryl S - 200(Pharmacia LKB)。
- (5) 蛋白透析、SE 层析和 SDS - PAGE 所需的其他试剂和器材。

【操作步骤】

- (1) 待提取样品 11 000 ~ 13 000r/min(15 000 ~ 20 000g), 4℃或室温离心, 除沉淀。
- (2) 上清液对双蒸水透析 4℃24h。
- (3) 11 000 ~ 15 000r/min 4℃ 或室温离心 1h, 留沉淀。
- (4) 制备 SE 凝胶层析柱, 以硼酸缓冲液平衡。
- (5) 将步骤(3)沉淀或饱和硫酸铵粗提 γ 球蛋白以 3 ~ 5ml 硼酸缓冲液溶解, 缓慢加样。
- (6) 以硼酸缓冲液洗脱蛋白质, 并收集 100 管(每管为柱床体积的 1%), IgM 在洗脱液的第一个蛋白峰。
- (7) 收集 Ig 蛋白峰, 分别合并, 透析浓缩, 紫外分光光度计 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 测定 Ig 含量, SDS - PAGE 鉴定 IgM 纯度。

- (8) 以 1 ~ 20mg Ig/ml 硼酸缓冲液置 4℃或 - 70℃保存。

凝胶以硼酸缓冲液反复冲洗后, 加入 0.02% NaN_3 置 4℃保存可再次使用。

(六) IgA 的纯化

血清中 IgA 的含量较低, 一般从乳汁中提取分泌型 IgA。

【材料和试剂】

- (1) 人初乳 Xml。
- (2) 生理盐水(NS), HCl。
- (3) 2mol/L Tris, 0.1mol/L pH6.3 PB。
- (4) 0.01mol/L, pH7.5(含 0.1mol/L NaCl)和 0.01mol/L, pH7.7(含 0.25mol/L NaCl)的 PB。

【操作步骤】

- (1) 取 Sephadex G - 200 25g, 经蒸馏水充分膨胀后, 以 0.01mol/L, pH6.3 的 PB 平衡并装柱, 柱床体积为 2.5cm $\times$ 100cm。
- (2) 将 10ml NS 缓慢加入初乳中, 混匀, 43 000r/min 4℃离心 60min。
- (3) 吸出中层乳清液, 以 1mol/L HCl 调至 pH4.0, 4℃ 24 000r/min 离心 30min。
- (4) 吸取上清以 2mol/L Tris 调至 pH7.3, 同上离心, 取上清, 以 0.45 μm 硝酸纤维素膜过滤。
- (5) 收集滤出液过 Sephadex G - 200 层析柱, 以 0.01mol/L, pH6.8 的 PB 低温洗脱, 0.3 ~ 0.5ml/min, 分部收集, 并以紫外监测仪 280nm 监测。

(6)第一峰以 IgM 为主,第二峰为 IgA,第三峰为 IgG,收集合并第二峰各管,装入透析袋中。

(7)对 0.01mol/L, pH7.5(含 0.1mol/L NaCl)的 PB 透析 4~6h。

(8)过 DEAE - Sephadex A - 50 柱,以 0.01mol/L, pH7.5(含 0.1mol/L NaCl)的 PB 洗脱至 OD280nm < 0.02。

(9)改用含 0.25mol/L NaCl 的 PB 洗脱,分部收集,280nm 测蛋白峰,收集合并含蛋白的洗脱峰,浓缩后置 - 20℃ 保存。

七、抗体的保存

1. 抗血清经过 56℃, 30min 加热灭活后,加入适当的防腐剂。一般常用最终浓度为 1/1 000 的叠氮钠(NaN_3)、1/10 000 的硫柳汞或加入等量的中性甘油。分装小瓶,置 - 20℃ 以下低温保存,数月至数年内抗体效价无明显变化。但应防止反复冻融,反复冻融几次则效价明显降低。因此,低温保存应分装小瓶,以备取出后在短期内用完,特别是单克隆抗体及标记抗体更应如此。亦可将抗血清冷冻干燥后保存。

2. 蛋白质(抗体)试剂应置于非吸附性或低吸附性容器内保存,如聚丙烯管、聚碳酸酯管等。一些贵重的抗体试剂及大批量的同一类抗体试剂最好置于有停电警报装置及专门供电系统的低温冰箱保存。从冰箱取出试剂后应置室温缓慢融化,不宜加温促融。抗体保存液中加入叠氮钠一方面可防腐,另一方面在作免疫荧光染色时,可防止膜蛋白流动聚集。

3. 对市售产品,在获得新产品后,应先根据生产厂家提供的抗体效价,将其分装,可按每 10 μl 或 100 μl /支分装入 Eppendorf 管中,密封。放 - 20℃ ~ - 40℃ 冰箱中保存备用,一般可保存 1~2 年。小量分装的抗体最好一次用完,避免反复冻融而影响效价的降低。一般用前新鲜配制成应用液体,稀释的抗体不能长时间保存,在 4℃ 可存放 1~3 天,超过一周效价将显著降低。无论是一抗、二抗或各种标记抗体,用前都必须按不同的试验要求和抗原性强弱与抗原量的多少,稀释所需的各种抗体原液,以便获得最佳免疫实验效果。

被细菌污染的任何抗体或其他蛋白质试剂均应弃去,因在免疫检测实验中最易引起非特异性反应。

第二节 单克隆抗体的制备(杂交瘤技术)

1975 年 Koeñler 和 Milstein 创建了 B 淋巴细胞杂交瘤技术,该技术又称之为抗体的细胞工程技术。杂交瘤技术是一项周期长,高度连续性的实验技术,涉及大量组织细胞培养,细胞免疫学和免疫化学等方法。具体包括两种亲本细胞的选择和制备;细胞融合;杂交瘤细胞的选择性培养和克隆化,单克隆抗体的制备,特异性鉴定及纯化等。制备单克隆抗体的方法有经典的和改进的方法,本文仅介绍经典的方法。制备流程见 P₁₃图 1-1。

一、基本原理

借助物理或化学手段,将 2 个或 2 个以上不同特性的细胞融合在一起,组成一个异型核细胞,新形成的异型核细胞称为杂交细胞。如果 2 个细胞中有一个为瘤细胞,则融合后的细胞称为杂交瘤细胞,此项技术称为杂交瘤技术。杂交瘤细胞具有两种亲本细胞的基因和特性。

由免疫 B 细胞—浆细胞、瘤细胞融合形成的杂交瘤细胞系可产生单一、特异性、纯化的抗体。该融合的细胞是经过反复克隆而挑选出来的,由该克隆细胞所产生的抗体称之为单克隆