

21 世纪

柳忠辉
吕昌龙 主编

高等医学院校教材

供本科生及研究生使用

免疫学 常用实验技术



科学出版社
www.sciencep.com

21 世纪高等医学院校教材

(供本科生及研究生使用)

免疫学常用实验技术

主编 柳忠辉 吕昌龙

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书以免疫学的教学和科研实践为基础,在兼顾 20 多年来广泛应用的免疫学实验方法的同时,融入了近年来出现并证明行之有效的新方法、新技术,以实验技术手册的形式编写而成。全书共分为 16 章,主要涉及抗体制备和标记技术,抗原纯化和鉴定,免疫细胞分离、鉴定及功能检测等三大部分,各章节之间既相互独立又相互关联。本书在讲述实验基本操作过程的同时,着重阐述了实验关键知识点,集实验操作的实用性和科学性于一体,既适合免疫学研究生、本科生教学使用,也可作为参考书籍供从事免疫学研究的相关人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学常用实验技术/柳忠辉,吕昌龙主编. —北京:科学出版社,
2002. 8

21 世纪高等医学院校教材

ISBN 7-03-010506-0

I. 免… I. ①柳… ②吕… II. 免疫学-实验-医学院校-教材
IV. Q939. 91-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 037911 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002 年 8 月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2002 年 8 月第一次印刷 印张: 10

印数: 1-5 000 字数: 185 000

定价: 15.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换<环伟>)

《免疫学常用实验技术》编写人员

主 编 柳忠辉 吕昌龙

副主编 李 一 曹雅明 朱 伟 汪广荫 张逢春

编 者 (按姓氏笔画排序)

于春雷 尹艳慧 艾金霞 台桂香

刘永茂 刘凤芝 朱 伟 吕昌龙

汪广荫 李 一 劳凤学 张逢春

张学军 杨 煜 杨 蜜 柳忠辉

曹雅明 曾常茜 韩宏伟

前言

免疫学作为现代生命科学的三大前沿学科之一,伴随着细胞生物学、分子生物学的进步而获得迅猛的发展。现代免疫学技术已广泛渗透到生命科学研究的一个研究领域,不论是基础医学研究,还是临床医学研究,都离不开免疫学技术。

作为一种技术的创建,还没有哪一门生命科学能像免疫学一样造就了众多的医学诺贝尔奖的获得者。1901年,首届医学诺贝尔奖即授予了建立抗血清(抗体)治疗的 Behring EV 先生;1977年,又将这一殊荣颁发给放射免疫分析技术的创建者 Yallow R 女士;1984年,这一最高科学荣誉又被开创单克隆抗体技术的 Milstein C 和 Küller GF 双双获得。从这些科学巨匠的工作中,我们可以了解到免疫学技术的巨大进步。

现代免疫学技术发展的特点是,微量化与高特异性检测技术相结合的新技术的发现,使得免疫学技术在不断地推陈出新。20年前,人们只能应用 RIA 检测微量蛋白,而今天,人们几乎可以用 ELISA 法检测所有的细胞因子,应用 Western blot 和免疫沉淀技术分析组织中微量蛋白,采用单克隆抗体技术、荧光标记和计算机相结合的流式细胞仪,开辟了细胞学研究的新途径,已经广泛应用在细胞分类、分化及凋亡等方面的研究中。

免疫学技术虽然带动了多学科研究的发展,但人们对免疫学技术仍缺乏足够的认识。国内虽然已经有多部介绍免疫学实验的书籍,但一本好的参考书必须具有实用性、保证实验的可操作性,既不能只介绍单纯的理论知识,也不能仅仅介绍实验操作程序,而应该具有举一反三的作用,也就是能让学习者知道怎样应用一个实验,什么条件下采用什么样的具体实验方法,这在以往的教科书中介绍得较少。本书最大特点是每个实验都有应用时进行相关实验改进的指导——即实验操作的“关键点”。在关键点中作者详细地阐明每个实验的影响因素,在不同条件下改进实验的方法。举一个最简单的例子,在双位点 ELISA 应用单克隆抗体包被酶标板时,为什么有时采用 pH 9.6 包被液并不能获得满意的结果;在 Western blot 电转印时,不同的膜怎样处理,采用什么样的电流转印效果最佳。这些实际问题是实验者最想知道、一般书籍又很少涉及的,而这些正是本书着重阐述的内容。

由于编写时间仓促,编写者水平不一,本书虽经最后统一审核,错误之处在所难免。希望广大读者给予谅解,并对不足之处给予批评指正。

在此,对本书的合作者中国医科大学、齐齐哈尔医学院和北华大学的同仁表示衷心的感谢,同时也对参加本书审校过程中的各位工作者表示感谢。最后还要对将本书列为吉林大学立项教材的校教材科同仁及学者们的支持表示诚挚的谢意。

柳忠辉

2002年2月于长春

目 录

第一章 多克隆抗体制备	1
第一节 动物免疫与采血.....	1
一、免疫原.....	1
二、佐剂.....	2
三、动物选择.....	2
四、免疫方法.....	3
五、免疫动物采血.....	3
六、抗原免疫实例.....	4
第二节 抗体纯化.....	5
一、盐析法.....	5
二、凝胶柱层析.....	6
三、应用举例——重组蛋白抗体制备.....	7
第三节 抗体保存.....	10
第二章 单克隆抗体制备	11
一、试剂与器材.....	11
二、实验流程.....	13
三、关键点.....	15
四、应用举例.....	16
第三章 酶免疫测定技术	18
一、实验原理.....	18
二、试剂与材料.....	20
三、基本流程.....	20
四、关键点.....	22
第四章 放射标记技术	23
第一节 抗原放射性核素标记.....	23
一、氯胺 T 标记法.....	23
二、Iodogen 标记法.....	24
三、 ¹²⁵ I 标记复合物的分离.....	25
第二节 放射免疫分析技术.....	26

一、实验原理	26
二、主要技术条件	26
第三节 免疫放射分析	28
第四节 应用举例	29
一、人卵泡休止素放射免疫分析	29
二、人卵泡休止素免疫放射分析	30
三、关键点	31
第五节 免疫细胞受体放射分析	31
第五章 免疫细胞化学技术	35
一、试剂配制	36
二、器材准备	36
三、实验基本流程	37
四、关键点	41
五、常见问题及解决办法	43
六、应用举例	44
第六章 经典抗原抗体反应	46
第一节 凝集反应	46
一、直接凝集反应	46
二、间接凝集反应	48
第二节 沉淀反应	49
一、单向免疫扩散试验	49
二、双向免疫扩散试验	50
第三节 补体的测定	51
一、血清补体总活性测定	51
二、C4 溶血活性的测定	52
第四节 循环免疫复合物(CIC)的测定	53
第七章 抗原分离、纯化与鉴定	55
第一节 抗原粗分离	55
第二节 抗原精制	56
一、吸附层析	56
二、离子交换层析	57
三、凝胶过滤层析	59
四、亲和层析	61
五、高效液相色谱法	63
六、离心法	63

第三节 抗原性质鉴定	64
第四节 应用举例	65
一、离子交换层析分离血清蛋白抗原	65
二、亲和层析法纯化甲胎蛋白	66
第八章 免疫印迹	68
第一节 蛋白质抗原电泳分离	68
一、样本处理	68
二、凝胶的选择	69
三、蛋白标准品的选择	70
第二节 蛋白质的转膜	71
一、半干式电转印	71
二、湿式电转印	72
第三节 杂交	72
一、抗体的选择	72
二、封闭	73
三、抗体杂交	73
第四节 检测	74
一、放射性核素检测	74
二、辣根过氧化物酶——ECL 法	74
三、碱性磷酸酶法	75
四、关键点	75
第五节 应用举例	76
第九章 免疫沉淀	78
一、细胞裂解	79
二、免疫沉淀抗原-抗体复合物	80
三、抗原-抗体复合物法应用举例	81
四、三分子复合物法应用举例	83
第十章 免疫细胞分离	86
第一节 外周血白细胞分离	86
一、低渗分离	86
二、聚蔗糖-泛影葡胺分离法	88
三、聚乙烯吡咯烷酮硅胶分离法	89
第二节 单核巨噬细胞分离	90
一、腹腔巨噬细胞分离	90
二、脾巨噬细胞分离	91

三、单核细胞纯化	92
第三节 T、B 淋巴细胞选择性分离	93
一、E 花环分离 T 细胞	93
二、尼龙毛分离 T 细胞	94
三、B 细胞分离	95
第四节 NK 细胞分离	96
一、Percoll 不连续密度梯度分离法	96
二、磁化细胞分离器分离法	96
第五节 中性粒细胞分离	98
一、小量分离法	98
二、大量分离法	98
第六节 树突状细胞分离	99
第十一章 流式细胞仪检测技术	101
一、实验原理	101
二、实验应用	102
三、实验方法	103
四、应用举例	106
五、关键点	108
第十二章 淋巴细胞转化试验	109
一、试剂配制	110
二、材料准备	110
三、基本流程	111
四、关键点	112
五、B 淋巴细胞增殖实验	113
第十三章 细胞毒实验技术	114
第一节 NK 细胞活性测定	114
一、放射性核素释放法	114
二、乳酸脱氢酶释放法	115
第二节 细胞毒性 T 细胞功能测定	117
第三节 补体依赖性细胞毒试验	118
第十四章 吞噬功能及溶血空斑试验	119
一、中性粒细胞吞噬功能测定	119
二、小鼠巨噬细胞吞噬功能测定	120
三、人巨噬细胞吞噬功能测定	121
四、小鼠 B 细胞溶血空斑形成试验	121

第十五章 细胞因子活性检测	124
一、IL-1 生物学活性检测.....	124
二、IL-2 生物学活性检测.....	125
三、IL-4 生物学活性检测.....	127
四、IL-6 生物学活性检测.....	128
五、IL-8 生物学活性检测.....	128
六、IL-10 生物学活性检测	129
七、肿瘤坏死因子生物学活性检测	130
第十六章 免疫细胞凋亡	132
第一节 细胞形态学观察法	132
一、普通光学显微镜观察方法	132
二、荧光显微镜观察方法	134
第二节 寡核苷酸片段检测法	136
一、普通琼脂糖凝胶电泳法	136
二、定量琼脂糖凝胶电泳法	138
三、ELISA 检测法	140
第三节 流式细胞仪	141
一、PI 单染色法	141
二、Hoechst 33342/PI 双染色法	142

第一章

多克隆抗体制备

机体具有多种 B 细胞克隆,抗原刺激机体后可被不同的 B 细胞克隆同时识别,受刺激活化的 B 细胞克隆针对抗原表位的多少而产生相应的特异性抗体,因此,利用抗原物质免疫动物时,每一抗原表位都能诱发相应 B 细胞克隆产生单克隆抗体(mAb),所获得的免疫血清即为多种 mAb 的混合物,称之为多克隆抗体血清。

第一节 动物免疫与采血

一、免疫原

1. 抗原种类 常用的抗原主要包括:①微生物抗原:如细菌、病毒、立克次体、支原体、螺旋体、真菌等。②组织抗原:主要是来源于细胞的各种蛋白质或蛋白质复合物,如多种酶类、激素、血浆蛋白、肿瘤组织等成分。③免疫球蛋白抗原。

2. 抗原纯度 抗原纯度越高越好,但并非要达到绝对的氨基酸分析纯,一般的抗原只要达到亲和层析或 SDS-PAGE 电泳纯即可用于免疫。特殊情况下要求达到 90%以上的纯度。应用病原微生物抗原时,要选择抗原性强、特异性好、遗传性稳定的标准菌株或病毒株。免疫球蛋白抗原在纯化过程中应避免因操作而造成的蛋白质变性和降解。

3. 抗原用量 抗原量在一定范围内与免疫应答强度呈正相关。抗原量过大、过小均易产生免疫耐受。抗原用量与抗原成分、剂型、注射途径以及所用佐剂种类、含量均有关。在应用完全弗氏佐剂时,蛋白质类抗原剂量以 0.5~1mg/kg 体重为宜。静脉注射时应适当减少用量,以免引起动物超敏反应而死亡。

4. 抗原的处理

(1) 颗粒性抗原,如动物的红细胞、细菌菌体等可制备成悬液,不需佐剂,直接免疫。菌体数以 1×10^{10} 个/ml 为适。

(2) 可溶性蛋白质抗原(如人的 IgG)、病毒抗原、细菌可溶性抗原组分等,可以直接与弗氏完全佐剂(1:1 V/V)混合、乳化。抗原乳化方法有多种,如果采用注射器研磨法,可以取 2 支 5ml 注射器,以双接头注射针头连接,反复推拉,混合至油和水在放置时不再析出即可,约半小时左右达到乳化完全。乳化完全的抗原滴在水面上不扩散为合格。

(3) 半抗原(多糖、多肽、激素、化学药品等)需与载体偶联后,才能免疫动物,制备抗体。常用载体为牛血清白蛋白(BSA)、KLH(keyhole limpet hemocyanin)、鸡血清蛋白(OA);偶联剂有过碘酸钠、戊二醛以及碳化二亚胺(carbodiimide)等。载体蛋白以 KLH 最为常用,该蛋白与哺乳动物蛋白没有亲缘关系,不会引起免疫交叉反应。偶联剂以碳化二亚胺最常用,方法简单,偶联效果好。

*注:半抗原与载体蛋白偶联的碳化二亚胺法

取半抗原 5mg 与 BSA 5mg 溶解在 0.5ml 蒸馏水中,10mg 碳化二亚胺溶解在 0.5ml 蒸馏水中,将上述溶液混合,4℃避光搅拌过夜,再用生理盐水透析除去碳化二亚胺,即为偶联的抗原,免疫时按每只家兔半抗原量 250~500μg 计算免疫抗原总量。

二、佐 剂

佐剂属非特异性免疫增强剂,与抗原一起注射或预先注入机体时,可增强机体免疫应答或改变免疫应答的类型。佐剂种类繁多:如卡介苗(BCG)、短小棒状杆菌(CP)、脂多糖(LPS)、细胞因子;氢氧化铝、明矾;双链多聚肌苷酸:胞苷酸(poly I:C)和双链多聚腺苷酸:鸟苷酸(poly A:U);矿物油、脂质体、免疫刺激复合物(ISCOMs)、CPG 寡核苷酸等。在多克隆抗体制备中以弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂最为常用。弗氏完全佐剂配方较多,主要成分为羊毛脂、液状石蜡和灭活的卡介苗。羊毛脂与液状石蜡之比为 1:2,也可用 1:1 等。灭活的卡介苗,一般在临用前加入(2~4mg/kg 体重)。通常佐剂与抗原等量混合,充分乳化。弗氏不完全佐剂不含卡介苗,其他同弗氏完全佐剂。

三、动物选择

实验室用于免疫的动物主要有兔、山羊和鼠。如大量制备商品用抗血清或提取免疫球蛋白时也可选用马、驴等大型动物。对免疫动物的主要要求有:

1. 应选择与抗原物质亲缘关系远的动物,特别是在制备抗免疫球蛋白血清时更应注意。抗原物质的来源生物与被免疫动物亲缘关系越远,免疫应答能力越强,抗体产生水平越高,抗体亲和力也越强。

2. 动物生理状态正常,发育成熟,健壮,体重符合规定,家兔初始免疫的体重通常在 2~2.5kg。

3. 性别上以雄性成年动物较常用,也可采用雌性非妊娠动物。患病或刚刚病愈、有免疫缺陷或应用免疫抑制剂的动物不能应用。

四、免疫方法

1. 免疫途径 可采用静脉、腹腔、肌内、皮下、皮内和淋巴结等注射方法。但一般采用小剂量、多点、多途径的免疫方法。颗粒性抗原(细菌悬液、红细胞悬液)多采用小鼠腹腔注射法。而可溶性抗原(如 IgG 等)多采用含弗氏完全佐剂的乳剂(油包水型),家兔背部多点皮下注射法。

2. 可溶性抗原免疫 基础免疫后(即初次免疫)的 3 周左右,应进行加强免疫,以后每隔 2 周进行一次加强免疫。加强免疫的次数取决于试血的结果。末次免疫后,从家兔耳缘静脉、小鼠眶静脉采血少量,分离血清,采用免疫双扩散试验测定抗血清效价,血清效价 $>1:32$,或 ELISA 法检测抗体效价 $>1:10\,000$,表明抗体水平已经较高,此时可以从兔颈动脉或心脏采集全部血液,分离血清。如果抗体效价较低,可继续加强免疫,一般需 4~5 次免疫,抗体效价即可达到合适水平,如果此时仍不能达到采血的抗体效价要求,应该考虑重新免疫。

3. 颗粒性抗原免疫 第一周注射 2 次,随后每周加强免疫一次,加强免疫后 4~5 天试血,做凝集试验,抗血清效价 $>1:2\,000$,即可以从兔颈动脉或心脏采集全部血液,分离血清。

五、免疫动物采血

1. 一次放血法 家兔最后一次加强免疫的第 7 天采血。采血前禁食 12 小时,但不禁水。动物仰卧固定,切开皮肤将颈动脉与迷走神经剥离,选择血管中段,用两支止血钳夹住(约 5cm),切开放血(2500g 家兔可放血约 100ml)。为提高采血量,可适当减慢放血速度,并提高动物下肢位置。血液放于大试管、平皿或三角烧瓶中,待凝固后,用铂耳或无菌滴管沿边缘剥离,置 37℃ 1 小时,再放 4℃ 过夜,使血清充分析出。离心沉淀,分装,鉴定合格后, -40℃ 以下保存备用,效价可保持 2 年以上。此外,家兔与豚鼠也可通过心脏直接采血。

2. 少量多次放血法 家兔末次免疫后放血 40~50ml,并补充生理盐水或

10%葡萄糖溶液,继续饲养。以后每隔4周放血40~50ml,每次放血前5~8天可加强免疫一次。该法既可提高抗体效价,又能维持较长时间采血。采血时可采用心脏或家兔耳缘静脉切开放血法。耳缘静脉切开前,先消毒并采用加热扩张血管,然后横断切开静脉,保持血流通畅,一般可采集30~40ml血。取血后用灭菌干纱布压迫止血。

六、抗原免疫实例

1. 颗粒抗原多克隆抗体制备方法(溶血素制备为例)

(1) 抗原制备:采取雄性绵羊血液,以玻璃珠脱纤维或10%枸橼酸钠溶液抗凝(10%枸橼酸钠溶液10ml可抗凝新鲜血液100ml),离心弃血浆,生理盐水洗血细胞3~4次,然后按表1-1配制稀释液。

表 1-1 血细胞浓度稀释与免疫次数

免疫次数	1	2	3	4	5	6	7
血细胞浓度	10%	20%	30%	40%	40%	40%	40%
剂量(ml)	4	4.5	5.5	6.5	7	7	7

(2) 免疫方法:选择体重2kg以上的健康家兔,按耳静脉注射法进行,前5次免疫间隔48小时,后两次每日免疫1次,末次免疫后5~6天试血,当免疫血清溶血效价达1:2000以上即可采血,若低于1:2000,应继续免疫1~2次,采血后分离血清,分装冻存。

2. 可溶性蛋白质抗原多克隆抗体制备方法

(1) 抗原制备:人血清可采用饱和硫酸铵沉淀、DEAE纤维素层析法或protein A亲和层析纯化IgG,所得人IgG样品经免疫双扩散法鉴定,与标准的抗人全血清或抗人IgG免疫血清应呈单一沉淀线。将纯化IgG(5mg/ml)与弗氏完全佐剂按1:1(V/V)混合,采用注射器法乳化。

(2) 免疫方法:取家兔4只,采用背部皮下多点注射(20点以上),初次免疫剂量约1mg/只,3周后加强免疫,剂量1mg/只,以后每隔2周加强免疫一次,共3~4次。

(3) 试血:末次注射后第7天,耳缘静脉采血少量,分离血清与IgG做免疫双扩散试验;抗体效价在1:32以上,可采血分离血清,分装保存。

第二节 抗体纯化

由免疫动物制备的多克隆抗体血清,因其中含有非常复杂的多种蛋白质组分,并不适用于实验室实际分析、检测应用,必须将其有效的抗体成分分离、纯化。根据实验的目的不同,其分离、纯化的纯度要求也不同,如作为 ELISA 检测时的抗体,部分情况下饱和硫酸铵纯化即可,而免疫放射测定的标记用抗体必须达到双级纯才可应用(亲和层析纯+SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯)。抗体纯化的方法常用的有盐析法、凝胶柱层析、离子交换剂层析、免疫亲和层析等技术。下面主要介绍盐析法、凝胶柱层析以及亲和层析分离法。

一、盐析法

1. 实验原理 蛋白质由于分子质量和携带的电荷等不同,可在不同浓度的高盐液体内分级析出,根据这一原理,在免疫血清中加入不同浓度的硫酸铵溶液,逐步使免疫球蛋白沉淀析出,达到分离纯化抗体的目的。这种通过向血清等高分子溶液中加入大量盐类分子,使原来溶解的免疫球蛋白析出沉淀的过程称为蛋白质盐析。

2. 试剂与材料

(1) 饱和硫酸铵溶液:取 500ml 蒸馏水,加入约 400g 硫酸铵,水浴加热至 70℃,用磁力搅拌器充分搅拌,直到加入的硫酸铵不再溶解,以氨水(也可用 NaOH)调 pH 至 7.2,室温保存。

(2) 0.9%氯化钠溶液。

(3) 磁力搅拌器,500ml 烧杯,透析袋。

(4) 兔抗人 IgG 免疫血清。

3. 基本流程

(1) 盐析过程:取免疫血清 10ml,加等量生理盐水稀释,置磁力搅拌器上,边搅拌边逐滴加入饱和硫酸铵溶液 20ml,至 50%饱和度 4℃放置 1 小时,4 000r/min,4℃离心 30 分钟,弃上清,沉淀物加生理盐水 20ml 溶解。再次加入饱和硫酸铵溶液 10ml,至饱和硫酸铵浓度大于 33%,4 000r/min,4℃离心 30 分钟,弃上清,重复此步骤 2 次。最后将离心沉淀物加生理盐水 4ml 溶解,装入透析袋。

(2) 除盐:将盛装盐析物溶液的透析袋置入大烧杯中,蒸馏水 4℃下透析 4 小时,换用生理盐水透析 48 小时,此过程应反复换液数次,目的是除去 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 成分。也可采用 Sephadex G25 层析除盐,该法除盐较彻底、快速,但抗体浓度将被稀释。

4. 关键点

(1) 全部实验操作应避免在超过 20℃ 温度环境中进行,最好在 4℃ 冷室中操作,以防 Ig 变性。

(2) 磁力搅拌器搅拌血清时,速度不宜过快,以防产生多量泡沫影响饱和硫酸铵液的加入。

(3) 如果盐析的免疫球蛋白来源于小鼠,饱和硫酸铵溶液的终浓度不宜低于 45%,尤其是单克隆抗体纯化时,饱和硫酸铵溶液终浓度以 50% 为宜,过低会导致大量单克隆抗体(IgG)丧失。

二、凝胶柱层析

1. 实验原理 凝胶本身是一种多孔网状结构的分子筛,其线性基质含多个羟基,具有亲水性,在交联剂作用下交联形成不溶于水的三维空间网络结构。蛋白质溶液流经凝胶柱时,大分子蛋白质不能穿过凝胶网孔进入凝胶粒内部,而留在胶粒间隙的溶液中,随洗脱液最先流出。而小分子蛋白质则进入胶粒内部,由于受到胶粒阻留,洗脱较慢。这样,不同的蛋白质组分根据分子质量大小不同,由大到小依次洗脱而得到分离。

2. 试剂及材料

(1) 抗体样品:经饱和硫酸铵溶液沉淀、初步分离的 IgG。

(2) 0.2mol/L Na_2HPO_4 溶液:称取固体 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 358.22) 71.64g,用蒸馏水溶解至 1 000ml。

(3) 0.2mol/L NaH_2PO_4 溶液:称取固体 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 156.03) 31.21g,用蒸馏水溶解至 1 000ml。

(4) 0.05mol/L pH8.0 磷酸缓冲液(PB):0.2mol/L Na_2HPO_4 溶液 94.7ml, 0.2mol/L NaH_2PO_4 溶液 5.3ml 混合后,用蒸馏水稀释至 400ml。

(5) Sephadex G-200 干胶 20g。

(6) 实验材料:层析仪(蠕动泵 1 台、紫外监测仪 1 台、记录仪 1 台、梯度发生器 1 台和分部收集器 1 台)1 套;2.5cm×100cm 层析柱 1 套;1 000ml 烧杯 2 个;玻璃棒 1 根;5ml 吸量管 1 支;8ml 试管 100 支。

3. 基本流程

(1) 凝胶处理:Sephadex G-200 为干燥颗粒,使用前应用缓冲液浸泡,使其充分膨胀。缓冲液的量通常为凝胶溶胀体积的 2 倍,浸泡 72 小时。为节约时间,也可煮沸 2~4 小时,加速膨胀。将膨胀好的凝胶混悬后自然沉降,用吸管吸除上层细小颗粒,并重复漂洗 2~3 次。

(2) 装柱:选择合适的层析柱(柱内径和高度应在 1:20~1:50 之间),将层