

生物分子

实验教材

主编 翟朝阳

SHENGWU FENZI SHIYAN JIAOCAI



四川大学出版社

(生物化学、免疫学、分子生物学实验)

生物分子实验教材

主 编 翟朝阳

参编人员 (以姓氏笔画为序)

千 蓉 刘 宇 朱 平 杨鲁川

黄德清 翟朝阳 魏 玲

四川大学出版社

责任编辑:胡兴戎
责任校对:胡 羽
封面设计:罗 光
责任印制:曹 琳

图书在版编目(CIP)数据

生物分子实验教材 / 翟朝阳主编. —成都: 四川大学出版社, 2004.6

ISBN 7-5614-2821-9

I. 生... II. 翟... III. ①免疫学-实验-教材
②生物化学-实验-教材③分子生物学-实验-教材
IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 051940 号

书名 生物分子实验教材

主 编 翟朝阳
出 版 四川大学出版社
地 址 成都市一环路南一段 24 号 (610065)
印 刷 四川大学印刷厂
发 行 四川大学出版社
开 本 787 mm×1 092 mm 1/16
印 张 11.5
字 数 210 千字
版 次 2004 年 6 月第 1 版
印 次 2004 年 6 月第 1 次印刷
印 数 0 001~3 000 册
定 价 17.00 元

版权所有◆侵权必究

◆读者邮购本书,请与本社发行科
联系。电 话:85408408/85401670/
85408023 邮政编码:610065

◆本社图书如有印装质量问题,请
寄回出版社调换。

◆网址:www.scupress.com.cn

出版说明

为了适应高等院校教育改革，新的四川大学建立了医学生物分子实验室，并将原来免疫学、生物化学和分子生物学的实验课程纳入这个实验室的教学范畴。这本教材就是在这个背景下产生的。

这本教材的内容，除包括了原有的免疫学、生物化学和分子生物学三门课程的主要实验外，还设计了一些综合性实验，其目的不仅要让学习者通过这样的实验掌握较全面的实验技能，而且要使他们能够将各学科的知识贯通起来综合运用。由于这样的实验需要连续的操作，对学习者的意志、耐力、信心也将是一个考验。希望通过这样的实验课学习，对学习者的素质的提高有所帮助。

我国的教育体制与国外有所不同，但在培养学习者成才这个目的上应当是相同的。怎样达到这个目的，对教育工作者来说是需要探索的。编写这本教材，实际上就是要吸取前人的精华而弥补他们的不足。我们愿意尽力把这项工作做好。尽管愿望很好，但本教材仍可能存在新的问题。我们诚恳地虚心地欢迎使用者和前辈们、同行们提出宝贵的意见，以便我们今后修正，把大学的生物分子实验教学做得更好。

这本教材是为大学本科生编写的，也适合作为研究生或教师的参考用书。

编者

2004 春季

目 录

实验 1 凝集反应	(1)
实验 2 沉淀反应	(4)
实验 3 免疫扩散和免疫电泳	(6)
实验 4 补体结合实验	(13)
实验 5 溶血实验	(19)
实验 6 E 玫瑰花环实验	(21)
实验 7 酶联免疫吸附实验	(24)
实验 8 猪脾(肝)细胞染色体 DNA 的提取与测定	(30)
实验 9 植物染色体 DNA 的提取	(34)
实验 10 细菌染色体 DNA 的提取	(36)
实验 11 酵母 RNA 的提取与测定	(38)
实验 12 定磷法测定核酸浓度	(41)
实验 13 质粒 DNA 的提取	(45)
实验 14 随机引物 PCR 测定细菌染色体 DNA 基因型	(49)
实验 15 核酸(DNA)电泳	(52)
实验 16 DNA 的限制性核酸内切酶酶切分析	(54)
实验 17 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(60)
实验 18 从凝胶中回收目的 DNA 片段	(65)
实验 19 质粒 DNA 与目的 DNA 片段的连接	(71)
实验 20 重组质粒 DNA 转化原核细胞	(75)
实验 21 大肠埃希氏菌感受态细胞的制备及转化	(78)
实验 22 重组克隆筛选	(82)
实验 23 蛋白质的沉淀和变性反应	(89)

实验 24	血清蛋白乙酸纤维素膜电泳	(92)
实验 25	琼脂糖凝胶电泳分离脂蛋白	(96)
实验 26	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	(99)
实验 27	染色法测定蛋白质浓度	(108)
实验 28	Folin - 酚法测定蛋白质浓度	(110)
实验 29	紫外吸收法测定蛋白质浓度	(113)
实验 30	SDS - PAGE 测定蛋白质相对分子质量	(115)
实验 31	超氧化物歧化酶的分离和纯化	(122)
实验 32	超氧化物歧化酶活性染色鉴定法	(126)
实验 33	血清高密度脂蛋白 - 胆固醇和总胆固醇的测定	(129)
实验 34	去污剂及膜活性试剂对红细胞细胞膜的作用	(133)
实验 35	滴定法测定维生素 C 的含量	(135)
实验 36	细胞色素 C 的制备	(138)
实验 37	细胞色素 C 含铁量的测定	(142)
实验 38	碱性磷酸酶的分离、纯化和动力学	(147)
实验 39	肝糖原的提取与鉴定	(162)
实验 40	尿糖定性实验	(164)

专题介绍

单克隆抗体制备技术	(166)
酶免疫组化染色技术	(172)
荧光免疫组化技术	(175)
DNA 序列分析	(177)

实验 11

凝集反应

【原理】

凝集反应是一种抗原抗体反应，在一定条件下发生。直接凝集反应是颗粒性抗原与相对应的抗体在有电解质存在的情况下发生的反应，以出现肉眼可见的凝集现象为特征。间接凝集反应则是先将抗原吸附在某种载体上（多种物质可充当吸附抗原的载体），再与抗体进行反应而出现凝集现象。间接凝集反应还可以用抑制的方式（间接凝集抑制实验）来进行。另有一种间接凝集反应是将抗体吸附在载体上，与抗原进行反应，同样也会产生凝集现象，被称为反向间接凝集反应。发生直接凝集反应的抗原一般较大，如细菌。利用凝集反应可以鉴定未知的抗原，阳性反应强度一般用“+”的数量表示。在一定条件下，可以利用凝集反应做半定量测定。

直接凝集反应（玻片法）

直接凝集反应是用已知抗体（如免疫血清）测定未知抗原的反应。

I. 细菌鉴定

【材料】

1. 志贺氏菌多价诊断血清，沙门氏菌多价诊断血清。两种血清都做1:20稀释。
2. 待测菌培养于平皿或斜面，培养24h。

3. 生理盐水, 载玻片, 接种环。

【方法】

1. 取一张洁净的载玻片, 用笔划分成 3 格, 编号。
2. 用灭菌接种环取志贺氏菌多价诊断血清 3~4 环放于第 1 格; 在酒精灯上将接种环烧灼灭菌并冷却后再取 3~4 环沙门氏菌多价诊断血清放在第 2 格; 同法灭菌后取 3~4 环生理盐水放于第 3 格。
3. 接种环灭菌后取待测菌, 分别与血清和生理盐水混合。每次取菌与一种材料混合后都需要在火焰上将接种环烧灼灭菌, 再进行取菌, 否则会造成血清之间的污染而使反应的特异性和正确性受到影响。
4. 轻摇载玻片, 使各样品混合, 几分钟后, 在光线斜射下观察结果。加有细菌的实验组与加生理盐水的对照组应有明显区别, 后者没有任何反应迹象。

【结果】

阳性实验组有白色块状凝集物出现, 阴性为无任何凝集现象出现。出现凝集的实验组, 其抗原菌是与诊断血清抗体相应的细菌。

【注】

本实验也可以在试管中进行, 将免疫血清做 1:10 系列稀释, 再与细菌进行混合。设生理盐水对照组。将混合后的样品置 37℃ 孵箱过夜, 第 2 天观察结果。

II. 血型鉴定

【材料】

1. 抗 A 血清, 抗 B 血清。
2. 碘附。
3. 载玻片, 采血针, 棉签, 牙签。

【方法】

1. 取一张洁净的载玻片，用笔划分成 2 格，编号。
2. 在第 1 格滴入抗 A 血清，第 2 格滴入抗 B 血清。
3. 用碘附将左手无名指尖消毒后，迅速用采血针扎一下，将血滴入载玻片第 1 格和第 2 格的血清中，用牙签轻轻混匀一下，30s 后观察结果。

【结果】

有凝集物出现者为阳性，用“+”表示；无凝集物出现者为阴性，用“-”表示。血型判断见表 1-1。

表 1-1 血型鉴定结果判断

抗 A	抗 B	血型
+	-	A
-	+	B
+	+	AB
-	-	O

实验 2

沉淀反应

【原理】

沉淀反应的原理与凝集反应的原理相似，两种反应都是抗原与相应的抗体在比例适当的情况下并有适当电解质参与时发生的反应。由于沉淀反应的抗原与凝集反应的抗原有所不同，所以沉淀反应发生时形成肉眼可见的沉淀物或沉淀线。沉淀反应的种类很多，单向或双向的琼脂扩散实验、火箭电泳和免疫电泳实验等都属于沉淀反应的范畴。

双向琼脂扩散实验

【材料】

1. 琼脂粉，用生理盐水配制成 1% 浓度的溶液。
2. 实验样品为待测血清，以肝癌患者阳性血清为对照。
3. 甲胎蛋白（AFP）诊断血清。
4. 载玻片，打孔器，毛细滴管等。

【方法】

1. 将配制好的琼脂液加热熔化，置室温自然冷却到 60℃ 左右。
2. 取一张洁净的载玻片，置水平台面上，将 3ml~4ml 熔化的琼脂液用大口吸管吸出后小心地加在玻片上，让其铺满玻片，琼脂板内应无气泡产生。将琼脂板置室温条件下自然凝固。
3. 用打孔器在凝固的琼脂板上打孔，四周各打 6 个孔，中间打 1 个孔。

4. 中心孔内加甲胎蛋白诊断血清，四周孔内分别加入待测血清和肝癌患者阳性血清。加样时，应将孔加满，但不应溢出琼脂表面。

5. 将琼脂板放入湿盒，置 37℃ 孵箱，24h 后观察结果。

【结果】

1. 在阳性对照孔与中心孔之间出现清晰的乳白色沉淀线。

2. 如果待测样品孔与中心孔之间也出现与阳性对照孔类似的沉淀线，并且这个沉淀线与阳性对照孔的沉淀线相连，则判断待测血清为阳性；如果有沉淀线，并且沉淀线与阳性对照的沉淀线交叉，说明这一待测血清的抗原性与阳性对照有所不同，但与抗体有对应关系，是另一抗原抗体反应，则不把这种情况判为阳性。将没有沉淀线出现的判断为阴性。实验结果如图2-1所示。

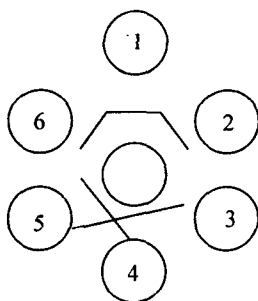


图 2-1 双向琼脂扩散实验结果示意图

【注】

双向扩散沉淀是抗原、抗体都同时扩散，在相遇时发生的反应。如果将抗体（免疫血清）加在琼脂液中混匀，再铺到载玻片上，而将抗原加在孔内，则沉淀线将围绕孔形成沉淀环。沉淀环的直径与抗体含量有近似正比的关系。通过测量直径和抗体稀释倍数，可以绘制出标准曲线。

实验 3

免疫扩散和免疫电泳

【原理】

免疫扩散和免疫电泳的反应原理与沉淀实验相同。

【材料】

1. 健康家兔 2~3 只，年龄为 6 个月以上，体重为 2kg。
2. 福氏 (Freund) 不完全佐剂：羊毛脂：液体石蜡=1:4 或 1:2 (体积比)。
3. 福氏完全佐剂：在不完全佐剂中，加入一定量的死卡介苗，即为福氏完全佐剂。死卡介苗的用量一般为 1 只兔 30mg 或每毫升不完全佐剂中加 4mg。配制时，先将羊毛脂和液体石蜡混合并灭菌。使用时先将佐剂置研钵内，再将死卡介苗、抗原溶液逐滴加入，顺同一方向研磨成乳剂。临用前在无菌条件下配制。将活卡介苗置 56℃，30min 可灭活。
4. 0.01~0.015 离子强度的琼脂或琼脂糖：称取 1g~1.5g 的琼脂 (或琼脂糖)，用离子强度为 0.03、pH8.3 的巴比妥缓冲液配制。可先加入适量溶液加热熔化后补水至 100ml，再使其充分熔化。
5. 离子强度为 0.06、pH8.6 的巴比妥缓冲液：称取 10.3g 巴比妥钠、1.84g 巴比妥酸溶于水，稀释至 1000ml。配制离子琼脂时可将其按 1:2 稀释，使其离子强度为 0.03。
6. 0.05% 氨基黑 10B 染色液：称取 0.5g 氨基黑 10B，溶于 500ml 1mol/L 乙酸及 500ml 0.1mol/L 乙酸钠溶液中。
7. 正常人混合血清 (A、B、O 型血清等体积混合) 或甲胎蛋白 (1g/L~5g/L)，兔抗人 A、B、O 型混合血清 (或兔抗甲胎蛋白血清)。
8. 0.9% NaCl 溶液，5% 乙酸，10% 甘油等。
9. 注射器，研钵，解剖用具，兔板，玻璃板 (7.5cm×2.5cm，7.5cm×8.0cm)，量筒 (10ml)，4mm 打孔器，注射器针头，试管，试管架，小滴

管,电泳仪,厚滤纸,大表面皿等。

I. 双向免疫扩散法

【原理】

抗体是具有免疫功能的球蛋白——免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig), 存在于血清中及其他体液、组织以及一些分泌物中。当给动物注射外源性生物大分子时,大分子物质刺激浆细胞产生抗体。电泳时,抗体通常出现在血清蛋白的 γ 球蛋白区,或 α 或 β 区。抗体具有特异性,即某种抗体只能与其相应的抗原特异性结合。这类具有抗体活性的免疫球蛋白都由两条重链 (H 链) 和两条轻链 (L 链) 组成,各链间以二硫键相连接,同一链上也有二硫键相连。重链有 5 种,分别是 γ 、 μ 、 α 、 δ 及 ϵ 。每一种免疫球蛋白 (IgG、IgH、IgE、IgD 和 IgA) 分子只具有一种特殊的重链。轻链只有 Kappa (κ) 和 Lambda (λ) 两种。

抗原与其相应的抗体具有分子表面结合的特性,而这种结合是有条件的,只有在分子比例合适并且有电解质 (如 NaCl、磷酸盐、巴比妥盐) 存在的情况下,才可以见到沉淀反应。由于抗原是多价的,可结合多个抗体分子,而抗体是二价的,只能结合两个抗原分子,因此抗原与抗体结合有不同的数量关系。

在抗原与抗体以合适的分子比结合时,能够组成大的复合物,出现明显的沉淀反应,将这种情况称为等价带。在等价带的两侧是抗原或抗体过剩的情况,未结合的抗原或抗体游离于上清液中而不能形成大块复合物,常不出现沉淀反应或沉淀量极少。前者被称为抗原过剩,后者被称为抗体过剩。此时若在等价带的反应液中加入过量的抗原或抗体,将会造成抗原或抗体过剩而使沉淀复合物部分溶解。因此,在做免疫扩散或电泳实验时,必须了解抗原体结合的条件和特点,掌握合适比例,才能获得满意结果。

免疫沉淀反应若在琼脂 (糖) 内发生,可出现沉淀线、沉淀弧或沉淀峰,根据沉淀是否出现以及沉淀量的多少,可定性或定量检测出样品中抗原和抗体的存在和含量。

本实验以人 A、B、O 型混合血清为抗原,免疫动物 (兔子) 产生抗血清,当适量抗原、抗体在琼脂 (糖) 中扩散并相遇时,则形成抗原-抗体复合物的白色沉淀线。不同抗原分子与相应的抗体分子的扩散速度不同,当二

者间比例适当时, 出现数目不同的沉淀线。根据沉淀线的情况可定性抗原以诊断疾病或测定抗体的效价。

【方法】

1. 制备抗血清。

选择年龄在 6 个月以上, 体重为 2kg~3kg 的健康家兔 2~3 只, 编号、标记。

2. 血清(抗原)乳剂的制备。

(1) 正常人 A、B、O 型血清乳剂的制备: 取 1ml 正常人 A、B、O 型混合血清, 加等体积福氏完全佐剂, 按照配制佐剂的研磨法, 在无菌条件下, 制成乳白色黏稠的油包水乳剂。

(2) 甲胎蛋白乳剂的制备: 取粗甲胎蛋白制品(1g/L~5g/L) 1ml 与等体积福氏完全佐剂混合, 用上述方法使其充分乳化。

制成的乳剂是否为油包水乳剂直接影响免疫的效果, 须进行鉴定。

鉴定油包水乳剂的方法: 将制得的佐剂抗原乳剂滴于冷水表面, 第 1 滴应保持完整而不分散, 否则须重新制备。

3. 免疫方法。

在已选择好的兔子的四足掌处, 采取皮内注射的方法各注射 0.5ml 抗原-福氏完全佐剂乳剂。首次注射后, 每隔 7~10 天于两肩后侧及两髋附近皮下多点注射抗原-福氏不完全佐剂乳剂, 总量为 2ml, 共 2~3 次。待能测出抗体效价后, 再进行一次加强免疫, 即从耳缘静脉注射抗原 0.5ml。一周后将兔子放血。

4. 取血与放血。

如果需检测抗体效价或保留免疫动物, 可由耳缘静脉取血或心脏取血。

取血方法: 先将耳缘静脉附近的毛剪去, 用无菌棉球擦净皮肤; 然后用二甲苯涂擦血管处, 或用台灯照射加温等办法使血管扩张; 识别耳静脉后, 用注射器针头插入静脉取血。如取血量大时, 于取血后由静脉缓缓注入等体积 5% 葡萄糖溶液以补足失血量。

如需要放血, 可采用颈动脉放血法。

颈动脉放血法: 将兔腹部向上, 固定在兔板上, 颈部伸直固定。用少量乙醚麻醉兔。剃去颈部的毛, 用 70% 酒精消毒。然后纵向切开颈部, 用止血钳将皮分开夹住, 用刀柄剥离皮下组织、肌层, 可见到搏动的颈动脉。小心将颈动脉和迷走神经剥离, 剥离长度约为 5cm, 选择血管中段, 将颈动脉远心端用丝线结扎, 近心端用动脉止血夹夹住, 在截断血流的这一段颈动脉

上剪一V形缺口，取直径为1.6mm长约25cm的一段干燥的塑料管，将已剪成斜口的一端插入颈动脉中，并用丝线缚紧，以防小管脱漏。塑料管的另一端放入200ml三角瓶（或离心管）内，然后松开动脉止血夹，血即流入三角瓶内。动物因放血而死亡。

5. 抗血清的收集。

待收集于三角瓶或离心管内的血液凝固后，用干净平头玻棒沿瓶壁或管壁剥离血块，置室温下2h~3h后，置4℃冰箱内过夜。血凝块收缩后，血清析出。通过离心使血清完全析出。用滴管吸出血清，分装在小瓶中，存于低温冰箱备用。

6. 铺琼脂板。

取4ml熔化的琼脂并趁热（约50℃）倒在玻璃板（7.5cm×2.5cm）上，待冷却、凝固后打孔，孔的直径为4mm。周围孔与中央孔之间的距离为5mm左右。打完孔后，用注射器针头将孔内的琼脂挑出。在酒精灯上烘烤玻璃板背面，使琼脂与玻璃板贴紧。

7. 稀释抗原。

对抗原的稀释采用倍比稀释法：取数支试管，分别加入1份生理盐水，于第一管中加抗原液1份，混匀后取出1份，加入第二管中，依次进行至最后一管，各管的稀释度依次为1:2、1:4、1:8、1:16等。

8. 加样。

将原浓度的抗原液及稀释后的系列抗原液依次加入外周孔内，在中心孔中加入抗血清。抗原、抗体的加量以平琼脂板表面为宜。将加样后的琼脂板置于湿盒内，在37℃或室温下扩散24h~48h。

【结果】

1. 出现沉淀线的抗原稀释度最高的一孔的稀释度为被测抗血清的效价。为提高沉淀线的可见度，需要染色，然后再确定效价。

2. 染色及保存。

(1) 漂洗琼脂板：将琼脂板置0.9%NaCl溶液中浸泡48h，以除去未反应的抗原、抗体等。其间更换NaCl溶液3~4次，再用双蒸水浸泡24h，换水2次。

(2) 干燥：取出琼脂板，用滤纸覆盖，置空气中自然干燥（也可吹干或37℃烘干）。

(3) 染色：将琼脂板浸入0.05%氨基黑10B染色液中30min。

(4) 脱色：染色完毕后，将琼脂板放在5%乙酸中漂洗以去掉多余的染

料，至胶板的背景无色为止。

(5) 长期保存：染色后的凝胶，经脱色后浸泡于 10% 甘油中 3h~4h，不时摇动至凝胶与玻璃板分开。用一块较凝胶板大的玻璃纸小心将凝胶托起，置于另一块与玻璃纸大小相似的玻璃板上，再用另一块经水浸湿的玻璃纸覆盖在凝胶上面，使琼脂胶板夹在两张玻璃纸之间，室温下晾干。此法制备的琼脂板可长期保存。

II. 单向定量免疫电泳（火箭电泳）

【原理】

一定量的抗原在电场作用下，在含有适量抗体的琼脂糖凝胶中移动时，前面的抗原与琼脂糖中的抗体相遇时形成抗原-抗体复合物沉淀，后面的抗原再与沉淀相遇时，由于抗原过剩，部分沉淀溶解，并一同向前泳动，再度与未结合的抗体相遇时，又产生新的抗原-抗体复合物沉淀，如此不断地沉淀-溶解-再沉淀，最后达到全部抗原与抗体结合，在电场中不再移动而形成锥（峰）形沉淀线，其形似火箭，因此这种方法被称为火箭电泳。在一定范围内，抗原含量愈高，则所形成的火箭峰愈长，面积也愈大。在这个电泳体系中，火箭峰的面积与抗原浓度有关，其关系如下式：

$$\text{抗原-抗体复合物沉淀峰的面积} = K \times \frac{\text{抗原的浓度}}{\text{抗体的浓度}}$$

式中， K 为标准量免疫电泳中测得的系数。抗体浓度为恒定的已知数，通过在标准免疫电泳中测得未知样品的沉淀峰的面积与已知浓度的标准抗原形成的沉淀峰面积做比较，可算出待测抗原的精确浓度。

为使实验数据较为理想，定量免疫电泳应具备下列基本条件：

(1) 抗原与相应抗体的比例应合适，才能形成完整、清晰的沉淀峰。为提高定量精确度，应使用单价抗血清。在一定浓度范围内，沉淀峰高（面积）与所加的样品浓度呈正比。峰高在 5mm~60mm，定量比较准确，测量精确度一般在 95% 以上。

(2) 一般说来，只有那些向正极移动速度较快的抗原能用免疫电泳进行定量。在电泳时要采用低离子强度的碱性（pH8.6）缓冲体系，以使蛋白质（抗原）颗粒带负电荷，在电场作用下向正极移动。否则无法准确定量。为了使蛋白质能进行单向定量免疫电泳，可采用甲酰化、乙酰化或氨甲酰化处

理,使蛋白质颗粒带更多的负电荷,在上述 pH 8.6 的条件下即可向正极移动。酰化反应常用 0.36% 甲醛将蛋白质样品稀释到所要求的浓度,室温反应 20min~30min。由于反应抑制了蛋白质碱性基团(氨基)的解离而形成了某种酸,因此在 pH 8.6 的碱性条件下,就增加了蛋白质解离时的负电荷,加大了其向正极移动的趋势。

(3) 定量免疫电泳的基本要求是在电泳时抗体不移动,要达到这个目的,电泳应在碱性条件下进行,最常用的是 pH8.6 的缓冲体系。在此条件下,所有蛋白质都带负电荷,向正极移动。作为抗体免疫球蛋白之一的 γ 球蛋白只带较弱的负电荷,实验中所采用琼脂糖凝胶介质的电渗作用足以抵消它向正极的移动能力。一般的琼脂不宜作为定量免疫电泳的支持介质,原因是其电渗作用力太大,超过了抗体向正极移动的力,导致抗体移动。

蛋白质浓度低于 0.3mg/L 时,很难用单向定量免疫电泳测出。若抗体用放射性核素标记,其灵敏度可提高 40~60 倍。

单向定量免疫电泳在临床上常用于检测病人血清甲胎蛋白的含量,为肝癌诊断提供依据。

【方法】

1. 制备抗体琼脂糖板。

(1) 熔化的 1.5% 琼脂糖待冷却到 50℃ 左右时,加入适量抗体(7.5cm × 8cm 玻板需用约 10ml 凝胶液铺板,抗体加入量视其效价而定),用玻棒小心搅匀,注意不要产生泡沫。

(2) 将配好的抗体琼脂糖倒在玻璃板上,制成抗体琼脂糖板,待凝固后,按图 3-1 打孔,用注射器针头挑出孔内的琼脂。

2. 加样。

在孔内加入不同稀释度的抗原至与凝胶板相平。定量测定时,需用微量注射器定量准确加入样品。

3. 电泳。

在胶板正、负电极端与电极槽缓冲液之间搭好滤纸桥。抗原孔端接负极。通电,电压为 10V/cm,每块琼脂板的电流为 40mA,电泳时间为 1h~5h,泳动距离为 2cm~5cm。在电泳过程中注意观察锥形沉淀弧的形成。电泳结束后,关闭电源,取下琼脂糖板。

4. 染色及固定。

染色及固定的方法同双向免疫扩散实验。图 3-2 为火箭电泳示意图。

如做定量测定,可将已知不同浓度的抗原在同样条件下做火箭电泳,根