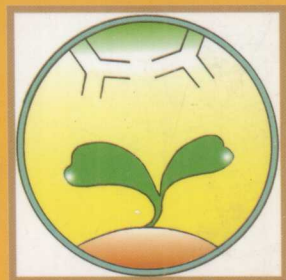


mianyixuejishuzaizhiwukexuezhongdeyingyong

免疫学技术在植物科学中的应用

陈新建 陈梅英 赵会杰 编著



中国农业大学出版社

免疫学技术 在植物科学中的应用

陈新建 陈梅英 赵会杰 编著

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

免疫学技术在植物科学中的应用/陈新建等编著. —北京:
中国农业大学出版社, 1998. 4

ISBN 7-81002-883-9

I. 免… II. 陈… III. 免疫学-应用-植物-繁殖 IV. Q94

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 26965 号

出 版	中国农业大学出版社
发 行	
经 销	新华书店
印 刷	北京丰华印刷厂印刷
版 次	1998 年 5 月第 1 版
印 次	1998 年 5 月第 1 次印刷
开 本	32 12.25 印张 310 千字
规 格	850mm×1168mm
印 数	1~1500 册
定 价	20.00 元

编 著:陈新建(河南农业大学农学系)

陈梅英 赵会杰

审 稿 人:孟繁静(中国农业大学)

责任编辑:晓 月

封面设计:郑 川

内 容 简 介

免疫学技术已成为生命科学研究中不可缺少的重要手段,广泛应用于当代生物学科各个领域。本著作重点介绍免疫学技术在植物科学中的应用概况,较系统地、完整地阐述了免疫学技术及最新成果。全书共分六章,其内容包括:第一章,抗原及其制备技术;第二章,抗体及其制备技术;第三章,免疫定性分离技术;第四章,放射免疫分析技术;第五章,酶免疫分析技术;第六章,免疫细胞化学技术。本书内容丰富、新颖、信息量大,并且融进了作者的独到见解,既有免疫技术的理论,又有详尽的实验方法,使植物学工作者既能了解免疫技术全貌又可按其中的具体方法进行操作。

本书可作为综合性大学、师范院校以及农林院校有关专业的大学生、研究生的教材,也可作为有关教师和科研人员的参考书。

序

免疫学分析是根据免疫学的基本原理而建立的对生物体内微量物质的检测技术。近年来,该方法在生命科学研究中的重要性日益明显。研究证明,由于免疫分析技术具有高度专一性和灵敏性,使用它几乎可以检测所有的生物活性物质,诸如对蛋白质、核酸、甾类激素、多肽激素等的定性、定量和定位的分析以及对生物膜的研究等。通常的生物测定法或物理化学检测技术往往需要几克甚至几十克的材料,经过反复提取、分离和纯化处理后方可得到供测样品,且要有价格昂贵的仪器(如高效液相色谱、气相色谱、气谱联用的质谱以及核磁共振等)配合分析才能完成,而免疫分析技术可直接测定略经纯化的微量样品中的某一种或某几种物质。它具有灵敏、精确、迅速和简便等优点。

本书在选题和内容上,既有引入门的基本原则,又收集大量近代新进展的内容,作者还结合个人的学习心得与工作经验并参阅大量书籍资料汇编而成。目前,在我国植物免疫方面的书籍甚少,本书的问世,虽说尚有不足甚至错误之处,对一名青年科技工作者确是个极好的锻炼机会。希望本书能发挥应用的作用。

孟繁静

1998.3

前 言

—

1977年12月8日,纽约市立大学医学院的 Yalow 教授^[1]在瑞典斯德哥尔摩接受该年度生理学诺贝尔奖金时,发表了题为“放射免疫分析——一个生物系统精细结构的探针”的著名讲演,高度评价了放射免疫分析方法(radioimmunoassay,简称为RIA)在生物学研究中所起的重要作用。她在演说中把放射免疫分析方法与显微镜、望远镜、射电望远镜等技术相提并论,足见该方法在科学研究中,尤其是在生命科学研究中的重要性。事实上,放射免疫分析的确是定量分析发展史上的一个重要里程碑^[2]。

放射免疫分析是免疫分析方法的一种。近几年来,随着免疫分析方法日渐完善和广泛应用,对生命科学的发展起到很大的推动作用。免疫分析几乎可以探测所有的生物活性物质,诸如蛋白质、核酸的定性、定量分析及其构象的研究;甾类激素、多肽激素、非多肽激素的定性、定量及定位分析;生物膜系统如高尔基器、线粒体内膜、内质网、肌质网的研究以及神经系统的研究等,无不用到免疫分析技术。当然,应用最多的还是在医学诊断方面。可以说免疫技术将以灵敏、精确、迅速简便等优点集于一身,已成为重要的现代生物技术之一,发挥着越来越重要的作用。

二

实际上,在植物科学中,从本世纪20年代人们就开始应用了血清学技术。例如,用血清学技术探测不同类型植物间的血缘关系^[3]。然而遗憾的是,尽管在植物科学的许多领域内迫切需要一些有效的

工具分析那些痕量的植物成分来定性、定量和定位一些生物活性物质以及中间代谢物,但一个时期以来,免疫分析的巨大潜能并没能引起人们的足够重视。

1967年,Ranadive 和 Sehon^[4,5]在研究药物性过敏反应时,为了测定 5-羟基色胺(5HT,为过敏反应中释放的中间产物),使用了免疫的方法。但 5HT 不稳定,易发生氧化,所以,不能直接用于合成免疫原,他们改用 5-羟基吲哚乙酸(5HIAA),结果产生的抗体可以与 5HT 反应。5HIAA 和植物生长素 IAA 在结构上相似,仅有一个—OH 之差。他们的工作无意中为植物激素的免疫分析提供了直接线索。

1969年,Fuchs 及其同事^[6,7]借鉴了 Ranadive 等的工作,首先用免疫方法测定了植物激素 IAA 和 GA;1972年又搞出了 ABA 的抗体,当时仅能测定 $0.1 \sim 0.01 \mu\text{mol/L}$ 以上的浓度。同时,他们又建立了噬菌体抑制分析(1971)^[8]和放射痕量处理分析(1974)^[9],但均因缺乏特异性和手续繁琐而不能分析生理浓度下的激素含量。尽管如此,他们毕竟是植物激素免疫分析的先驱,也是用不溶性抗体柱分离和鉴定植物激素 GA 的先行者。

1977年,Pengelly 等^[10]首先用放射免疫法测定植物髓组织分泌液及冠瘿组织中 IAA 的含量,可以探测出每克组织鲜重中小于 0.5 mgIAA 的量,使植物激素的免疫分析的灵敏度大大提高。

1979年,Weiler 等由用 RIA 测定植物微量的药用活性物质转入植物激素的测定,大大加速了植物激素免疫分析的研究进程。迄今,除乙烯以外,四大类植物激素的免疫分析方法已基本完善,成为植物激素研究中最有力的工具之一^[11,12]。

免疫学技术在向植物激素研究领域渗透的同时,也大踏步地向植物科学的其它研究领域进军。近几年来,免疫分析方法几乎涉及植物科学的各个研究领域,显示出了巨大的生命力,诸如光合作用^[13,14]、呼吸作用^[15,16]、植物细胞表面结构^[17]、细胞骨架^[18]、植物抗

逆性^[19]、氮素同化^[20]、植物色素^[21]、植物分子生物学^[22]及植物病理学等,这里只能挂一漏万,以见斑驳。

三

为了介绍植物科学中应用免疫学技术的方法及成果,许多人做过不少努力。日本学者板口进 70 年代初写过一个植物免疫化学实验法的小册子,我国已将其译出^[23]。由于时代所限,此小册子仅介绍免疫沉淀中的几个方法,过于简单,并且介绍此法在植物科学中应用的例子也极有限。1982 年由 Marchalonis J. J. 和 Warr G. W. 所编著的 *Antibody as a Tool* (作为一个工具的抗体) 一书中,以 Knox R. B. 所写的 *Immunology and the study of plants* (免疫学和植物研究) 作为第一章^[24],对免疫学技术在植物科学研究中的应用作了简要介绍。1986 年,剑桥大学出版社出版了一本由 Trevor L. Wang 主编的名为《植物科学中的免疫学》(*Immunology in Plant Science*) 的英文书^[25]。这可以说是世界上第一部较完整的植物免疫学技术专著。该书由 8 篇综述文章和一篇基础知识组合而成,涉及到植物激素、酶、植物细胞表面、植物细胞骨架、植物分子生物学、豆科植物固氮、植物色素及植物病理等内容,从这八个方面介绍了应用免疫学技术的概况、具体方法及进展。

我国植物科学中应用免疫技术起步较晚,尽管近年来在有关植物科学杂志上有部分文章出现,但就其水平、数量、研究领域等都不如国外那么广泛深入,更没有这方面的专著面世。笔者(陈新建)几年来一直从师于孟繁静教授,进行玉米赤霉烯酮这一植物体内新发现的活性物质的免疫分析,在免疫技术的实验过程中积累了一定的经验和教训,同时也为没有适用于植物科学工作者的免疫学技术方面的书籍而深感缺憾。尽管有不少地方举办过这方面的培训班并很有成效,但毕竟受益者有限。看到 Trevor L. Wang 的大作,又看到我国的研究现状,几年来总有如鲠在喉之感。为了推动植物科学研究中广

泛使用免疫学技术,我们将近几年来积累的资料,汇成此书,同时也融进一些自己的工作体会。读者或许可将她作为一块引玉之砖。

四

人或脊椎动物当受到一定物质侵染后,就能产生对同样物质的抵抗力。这种抵抗能力具有很高的特异性,且不仅局限于病原物,对进入的非病原物的大分子物质同样具有抵抗能力。这些能够引起动物体内的免疫反应,从而使动物产生抵抗能力的物质称为抗原(antigen)。因此,抗原可以是病原物,也可以是非病原物。受到抗原刺激后,动物体内会产生一类与该抗原发生特异性反应的蛋白质,这类蛋白质称为抗体(antibody)。抗原、抗体间的反应在动物体内或体外均能进行。利用抗原、抗体间的特异反应,对抗原(或抗体)进行定性、定量或定位分析,是免疫技术的核心。

植物体内的许多成分可作为抗原而引起动物的免疫反应,产生相应的抗体,从而使基于抗原、抗体反应的免疫学技术在植物科学研究中的应用成为可能。

众所周知,动物的免疫系统是非常复杂的。因此对植物科学工作者来说,要深入搞清这个系统既很困难,也无必要。但是,懂得一些有关的免疫学基础知识,对于我们开展植物免疫学技术工作却是非常必要的。本书从抗原、抗体的基础知识讲起,最后几章涉及到免疫技术,在具体技术的讨论中,先介绍理论后介绍方法,目的是使读者既能了解免疫技术全貌,又可按其中的具体方法进行操作。在编排过程中,尽可能以植物研究为例,便于植物科学工作者阅读。由于免疫技术发展较快,有些新技术,如均相酶免疫技术、时间分辨荧光免疫分析等,尚未在植物科学研究中得到应用,但本书也在原理部分做了较详细介绍,以便保持免疫技术体系的完整性,并希望这些先进技术能尽早在植物科学研究中得到应用。

现代科学技术的相互渗透已成为科学发展的趋势,并对科学的

发展具有强大的推动力。免疫学技术在植物科学研究中的应用已初步显示出它的生命力。

免疫学技术对植物病理学研究的影响也是巨大的,诸如诊断植物不同病害,以及定量分析除草剂、杀虫剂、杀菌剂等药物的残留量等,其文献量也是惊人的。由于作者受专业知识所限,在本书中未涉及该部分内容。

由于时间仓促,水平有限,专业跨度大,加之没有现成的模式可以借鉴,书中错误和不足之处在所难免,热切希望读者给以批评指正。

参 考 文 献

- 1 Yalow R S, 1978, Science, 200:1236
- 2 Mayer R T et al, 1980, Immunochemical Methods in the Biological Science: Enzymes and Proteins Academic Press Inc, London, LTD
- 3 Weiler E W, 1983, Biochem Soc Trans, 11:485
- 4 Ranadive V S et al, 1967, Canadian J Biochem, 45:161
- 5 Ranadive V S et al, 1967, Canadian J Biochem, 45:1707
- 6 Fuchs S et al, 1969, Biochem Biophys Acta, 192:528
- 7 Fuchs Y et al, 1972, Planta, 103:117
- 8 Fuchs S et al, 1971, European J Biochem, 18:384
- 9 Fuchs Y et al, 1974, Plant and Cell Physiol, 15:629
- 10 Pengelly M L et al, 1977, Planta, 136:173
- 11 Weiler E W et al, 1979, Planta, 144:255
- 12 Weiler E W et al, 1979, Planta, 149:155
- 13 Vidal J et al, 1983, Physiologia Plantarum, 57:124
- 14 Mayfield S P et al, 1984, Planta, 161:481
- 15 Perrot-Rechenmann et al, 1983, Plant Science Letters, 39:219
- 16 Sowokinos J R et al, 1993, Plant Physiol, 101:1073
- 17 Smith E et al, 1984, Planta, 161:330
- 18 Wick S M et al, 1981, J Cell Bio, 89:685

- 19 Funk C et al,1993, Plant Physiol, 101:1231
- 20 Murray D R et al,1977, J Cell Bio, 26:9
- 21 Pratt L H et al,1971, Proc Nat Aced Sci USA, 68:243
- 22 Coen E S et al,1991, Nature, 353:31
- 23 《植物免疫化学实验法》翻译小组,坂口进著,1975,植物免疫化学实验法,上海人民出版社
- 24 Marchalonis J J,Warr G W,1982, Antibody as a tool John Wiley and Sons Ltd, 293
- 25 Wang T L, 1986, Immunology in Plant Science, Cambridge University Press

目 录

第一章 抗原及其制备技术	(1)
第一节 抗原的性质及种类	(2)
一、抗原的性质	(2)
二、抗原的种类	(6)
三、佐剂	(8)
第二节 抗原决定簇及抗原特异性	(25)
一、抗原决定簇.....	(25)
二、抗原结合价.....	(26)
三、交叉反应.....	(29)
四、植物抗原特异性研究举例.....	(32)
第三节 植物抗原的制备技术	(42)
一、免疫原的提取与纯化.....	(42)
二、半抗原与蛋白质的连接方法.....	(46)
参考文献.....	(58)
第二章 抗体及其制备技术	(60)
第一节 抗体的概念及分类	(60)
一、概念.....	(60)
二、分类.....	(63)
第二节 抗体的分子结构	(63)
一、免疫球蛋白的基本结构.....	(63)
二、免疫球蛋白的结构域.....	(65)
三、免疫球蛋白的其它成分.....	(67)
四、免疫球蛋白的水解片段.....	(68)
第三节 产生抗体的细胞学基础	(70)
一、淋巴细胞的来源.....	(71)

二、抗体产生的过程.....	(72)
三、抗体的基因.....	(75)
第四节 抗体-抗原的反应.....	(78)
一、抗体-抗原反应的分子间力	(78)
二、抗体抗原间的可见反应.....	(80)
三、抗体抗原间的非沉淀反应.....	(83)
第五节 抗体的制备	(85)
一、抗血清的制备方法.....	(85)
二、抗体的纯化.....	(91)
三、抗体碎片的制备.....	(98)
第六节 单克隆抗体的制备	(99)
一、制备单克隆抗体的基本原理及流程	(100)
二、单克隆抗体制备技术	(104)
第七节 其它常用的亲和反应.....	(118)
一、葡萄球菌 A 蛋白技术	(118)
二、亲和素与生物素系统	(121)
三、凝集素与糖的亲合系统	(128)
参考文献	(128)
第三章 免疫定性及分离技术.....	(130)
第一节 免疫沉淀技术.....	(130)
一、扩散反应	(131)
二、免疫电泳技术	(142)
三、消除性免疫沉淀技术	(147)
第二节 免疫印迹技术.....	(151)
一、概述	(152)
二、操作方法	(162)
三、应用范围	(165)
第三节 免疫亲和层析.....	(176)

一、载体与配体的交联	(177)
二、亲和层析	(184)
参考文献	(188)
第四章 放射免疫分析技术	(193)
第一节 概述	(193)
第二节 基本原理	(196)
第三节 放射性同位素的标记	(198)
一、放射性同位素	(198)
二、放射性强度的测量	(201)
三、放射性同位素的标记方法	(206)
第四节 B 与 F 的分离技术	(211)
一、双抗体法	(212)
二、活性炭吸附法	(214)
三、非特异沉淀法	(216)
四、葡萄球菌 A 蛋白法	(217)
五、微孔滤膜法	(218)
六、层析和电泳法	(218)
七、微囊抗体技术	(218)
八、屏蔽计数法	(219)
九、固相抗体法	(219)
十、其它方法	(223)
第五节 放射免疫分析法的建立	(224)
一、反应介质	(225)
二、加样程序	(227)
三、温育的时间及温度	(229)
四、标准曲线的制作	(231)
五、样品处理	(244)
第六节 放射免疫分析中的重要参数	(246)

一、抗血清的质量指标	(246)
二、放射免疫分析法的质量参数	(256)
第七节 非同位素免疫分析法	(259)
一、化学发光免疫分析法	(260)
二、时间分辨荧光免疫分析法	(261)
参考文献	(266)
第五章 酶免疫分析技术	(267)
第一节 概述	(267)
一、非均相酶免疫分析	(270)
二、均相酶免疫分析	(274)
三、EIA 与 RIA 的比较	(280)
第二节 酶标记技术	(281)
一、标记技术概述	(281)
二、酶与蛋白质配体的交联方法	(293)
三、半抗原与酶或载体蛋白的交联方法	(299)
四、生物素与配体的标记	(303)
五、酶标记体的纯化与鉴定	(304)
第三节 酶免疫分析方法的建立	(306)
一、概述	(306)
二、酶免疫分析程序	(311)
三、植物样品的处理方法	(315)
第四节 提高酶免疫分析灵敏度的技术	(317)
一、抗酶复合物染色法	(318)
二、生物素-亲和素放大系统	(319)
三、酶循环放大系统	(320)
四、超灵敏酶标记放射免疫分析法	(322)
参考文献	(323)
第六章 免疫细胞化学技术	(325)

第一节 免疫细胞化学技术概述.....	(326)
一、免疫细胞化学技术的基本类型	(326)
二、固定和抗原性的保存	(328)
三、包埋与切片	(329)
四、免疫染色	(333)
第二节 免疫荧光技术.....	(336)
一、基本原理	(337)
二、荧光抗体的制备	(342)
三、荧光抗体染色及镜检	(344)
第三节 免疫胶体金技术.....	(347)
一、基本原理	(349)
二、胶体金标记抗体的方法	(351)
三、染色方法	(354)
四、双重和多重免疫胶体金标记简介	(359)
五、胶体金染色在植物科学研究中的应用举例	(362)
第四节 其它染色方法.....	(364)
一、免疫酶技术	(364)
二、免疫铁蛋白技术	(366)
参考文献	(366)