

免 疫 化 学 技 术

上

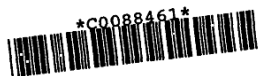
李 成 文

新华书店
PBC

序 言

近年来免疫化学技术在医学等各个领域中的应用更为广泛，作者根据自己的工作经验体会和有关文献资料整理成教材，最近又加以修改补充，新收集的资料，为免疫学工作者，提供了有参考意义的方法和参数。

苏 新



编者的话

免疫化学是一门新兴的边缘学科，无论它的基础理论，或是实验技术都在迅速发展。目前，在国内大学里都还没有设立这门学科，就是研究单位也仅有个别的免疫化学专业研究组。本人在从事免疫化学实践的基础上，又参阅了部分新的文献，对84年初稿的内容作了适当的修改和补充。带*者为这次新添的内容，又重新整理了这本免疫化学技术资料。鉴于本学科发展较快，再加上时间仓促和本人水平有限，资料中难免有缺点和错误之处，望读者批评指正。

另外，在编写过程中，得到了苏新、黄策付研究员的关心和指导，以及其它同志的帮助。书中有一些方法在建立过程中，先后有左秀琴、周帮祥、时华富及邵军石等同志参加了部分实验工作。在此表示衷心地致谢。

编者 李成文

1986. 5

前 言

免疫化学是一门将免疫与生物化学相结合而发展起来的新兴边缘科学，也是一门为分子生物学和分子免疫学奠定基础的技术性很强的学科。虽早在1890年德国细菌学家埃利希在研究毒素与抗毒素反应中首创了免疫化学的课题，但直到1907年，才由瑞典的物理化学家Arrhenius首先确定了“Immunochemistry—免疫化学”这一名词。在近代日本的书籍中还有沿用免疫生物化学的概念，其实质与内容二者完全一致。

免疫化学研究的物质基础是抗原和抗体，近代的免疫化学中还扩展至补体系统各成分等物质的研究。免疫化学研究的重要内容是抗体的蛋白质化学本质，抗体与抗原反应的机理，以及讨论抗体的制备、定量、纯化、鉴定和应用等理论和技术。

免疫化学是一门实验技术很强的学科，它即保留与沿用着古老的免疫学方法，也大量地植入了先进的生物化学和生物物理等技术。继1938年Tiselius用电泳方法证明抗体是 γ 球蛋白之后，1959年两位生物化学家Porter和Edelman分别用酶与化学试剂开始研究了抗体分子的结构。迄今仅有25年，免疫化学发展之快，不仅成为一门独立学科，而且成为医学与生物学基础学课中必修之课。自七十年代以来先后有不少免疫化学专著。国内除在免疫学中有部分章节对免疫化学的论述，而且也有关于免疫化学技术的书籍。

免疫化学技术发展快，技术新，大量采用了先进的生物化学技

术。也保留着免疫学特征。因此。目前免疫化学技术不仅广泛用于免疫学的各个分支学科。也逐渐地向分子生物学、生物化学与临床医学等学科中渗透。这就充分反映出学习与掌握免疫化学的重要性与必要性。

目 录

前 言

一、免疫化学基本技术	1
(一)、盐析	1
(二)、脱盐	3
1、半透膜透析, 2、凝胶过滤法, 3、超过滤法	
(三)、蛋白溶液的浓缩	8
1、化学吸水剂法, 2、表面蒸发浓缩, 3、超过滤法, 4、冷冻干燥法。	
(四)、蛋白浓度的定量方法	9
1、紫外吸收法, 2、考马斯亮兰G-250定量法, 3、改良Lowry (Folin 酚法)法。	
二、层析技术	14
(一)、各种凝胶层析	15
(二)、离子交换纤维素层析	30
(三)、抗原-抗体特异亲合层析	45
1、活化琼脂糖珠亲合层析 (Sephrose 4B)	45
2、生物凝胶珠免疫吸附剂的制备 (Bio-Gelp - 300)	49
3、葡聚糖凝胶珠免疫吸附剂的制备 (Sephadex G-200)	53
(四)、特异吸附层析	56

三.

1. ConA - Sepharose 4B 的亲合层析	57
2. Blue - Dextran Sepharose C ₁ -6B 层析 (人β干扰素的纯化*)	60
3. 磁性胶等特异亲合层析吸附剂*	63
三、电泳技术	63
(一) 免疫电泳	63
1. 微量免疫电泳, 2. 对流免疫电泳, 3. 火箭免疫电泳, 4. 免疫火箭扩散电泳 (Immunol - Rocket - diffusion Electrophoresis IRDE)*	
(二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)	76
1. 盘状PAGE, 2. 盘状SDS - PAGE, 3. 盘状等电点聚胶电泳 (PAGE - IFE), 4. 同工酶的PAGE及IFE, 5. 垂直板状SDS - PAGE (单一浓度法、梯度胶法)*, 6. PAGE蛋白的银染色法*	
(三) 其它电泳技术	105
1. 醋酸纤维素膜电泳, 2. 薄层琼脂糖凝胶聚焦电泳	
四、标记技术	109
(一) 荧光素标记抗体法	109
1. 异硫氰酸荧光素 (FITC) 的直接、间接标记法, 2. 异硫氰酸四甲基罗丹明 (TMFITC) 标记法, 3. 四乙基罗丹明 (RB200) 标记法	
(二) 免疫荧光染色法	121
1. 直接法, 2. 间接法, 3. 抗补体染色法, 4.	

细胞表抗原免疫荧光染色法 5、免疫荧光定量染色法 6、
 荧光激活细胞分离法 7、酶作用底物产生荧光法 8、自身
 抗体免疫荧光染色法。

四、酶标记抗体技术 138

1、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体法

(1) 过碘酸钠氧化标记法 (2) 改良过碘酸钠标记法*

(3) 戊二醛二步标记法。

2、酶-抗酶复合物 (PAP) 的制备*

3、免疫酶染色法及酶联免疫吸附试验 (ELISA)

四、亲合素 (Avidin) - 生物素 (Biotin)
 标记技术* 145

1、生物素 (B) 分子的活化, 2、生物素与大分子
 的连接, 3、亲合素 (A) 分子的 HRP 或 FITC 标记, 4、
 亲合素-生物素系统的染色技术: BA、BAE、ABC、ABC-
 ELISA 及 ABC-dot-ELISA。

四、同位素标记抗体法 152

五、化学发光免疫标记法 156

五、免疫扩散技术 160

(一) 双向免疫扩散 160

(二) 单向免疫扩散 163

(三) 逆向免疫扩散 165

六、血浆蛋白的纯化与鉴定 169

(一) 血清免疫球蛋白 (Ig) 的分离纯化 169

1、盐析法分离纯化 Ig

- (1)、硫酸铵盐析人血清中的 α 、 β 及 γ 球蛋白
- (2)、硫酸钠盐析纯化人IgG
- (3)、硫酸铵盐析各种动物血清IgG及小鼠IgG的纯化。

ISM

- (4)、辛酸及Rivanol盐析分离人IgG、ISA及ISM
- (5)、人、兔、羊、马及狗血清IgG的盐析—离子交换层析

- 2、兔血清IgG的简便快速纯化法
- 3、人IgG、ISA及ISM的连续分离法
- 4、人IgA的亲和层析分离制备
- 5、分泌ISA(SISA)的分离法
- 6、ISE的分离纯化
- 7、ISD的分离纯化
- 8、人IgG亚类的分离纯化
- 9、小鼠血清IgG亚类的分离纯化

(一)、Ig多肽链的分离纯化 193

- 1、人IgG的 γ 重链、 κ 或 λ 轻链的制备
- 2、人IgM μ 链的制备
- 3、人IgA的 α 链、J链的制备
- 4、SISA的分泌成分(SC)的制备

(二)、Ig多肽链碎片的制备 196

- 1、胃蛋白酶水解IgG制备F(ab)₂及Fc'片段
- 2、木瓜蛋白酶水解IgG制备Fab及FC片段

3、IgM的Fab ² 及Fc ² 片段的制备	
4、IgA的F(ab) ₂ Fab' Fc α 片段的制备	
5、Fc α 的制备	
(四)、血浆Ig等蛋白的分析与鉴定	207
七、抗血清的制备技术	209
(一)、免疫原的制备	209
(二)、动物免疫	209
(三)、试血及效价测定	210
(四)、免疫动物血液采集及血清分离	211
(五)、抗血清的鉴定及分装保存	211
主要参考文献	

免疫化学技术

本书以简明扼要，而较系统地分别介绍了基本技术、层析、电泳、标记技术、免疫扩散蛋白纯化与鉴定以及抗血清制备等内容，之后又较详细地列述了有关技术参考资料，可以前面技术相辅使用，更为方便，可成为生化及免疫化学工作者必备之工具。

一、免疫化学基础技术

(一) 盐析 (Salting Out) 技术

1、概念：(1) 当不同性质或不同分子量的蛋白质分子，可通过加入不同浓度的中性盐而分别从溶液中沉淀出来，这种过程常称为盐析。

2、基本原理：(1) 蛋白质是一种高分子亲水胶体，当向蛋白质溶液中加入一定浓度的中性盐之后，作为脱水剂的盐离子可与大量的蛋白质分子外部的水化层相结合，使蛋白质亲水胶体的水化层解体，从而使失去水化层的蛋白质分子彼此互相撞击，由于分子的内聚力及静电引力形成较大的聚集体，逐渐地由浑浊而沉淀析出，即仅改变了蛋白质分子的溶解性，破坏了溶液的平衡状态。

3、使用中性盐的种类 (2-3)

(1) 硫酸铵、硫酸钠和硫酸镁等

1859年 Denis 首先提出用 $MgSO_4$ 盐析蛋白质。

1878年 Mehu 首先研究了 $(NH_4)_2SO_4$ 对蛋白质沉淀作用。

1887年 Hofmeister 等首先研究了硫酸铵对血浆蛋白的盐析作用，并区分开球蛋白与清蛋白。

(2) Rivanol 沉淀盐析

Rivanol 是 lactate of 2-ethoxy-6, 9-diamino-acridine (6, 9-二氨基-2-乙氧基吡啶-乳酸盐) 的商品名, 本品是一种亮黄色易溶于水的物质, 1956 年 Horejsi 等首次用于血浆蛋白的分级沉淀作用。

(3) 辛酸 (Caprylic acid)

辛酸虽不是中性盐, 在一定 PH 值和一定浓度下可沉淀不同的蛋白质分子, Chanutin 年 (1960) 首先用于沉淀不同的血浆蛋白。

(4) 聚乙二醇 (PEG)

PEG (POLYETHYLENE GLYCOL) 是 Sfockiny (1956) 首次用于沉淀蛋白质分子, 虽目前原理还不太清楚, 但它是实践中较有效的蛋白质沉淀剂。

4. 技术关键及注意事项

(1) 被盐析的蛋白质分子最好要处于 PI 值附近, 才不仅回收量较高, 且质量较好。

(2) 严格控制盐析时的盐浓度及盐质量。

(3) 盐析操作中仅防局部盐浓度过高, 而使不希望成分共沉下来, 要在搅拌或均摇条件下慢慢滴加。

(4) 注意对不同动物血清, 沉淀同一类蛋白仍有不同, 根据具体情况进行。

(5) 盐析中即要沉淀充分, 又要注意使用较好沉降蛋白手段, 一般低温高速, 可省时又回收量大。如低速离心, 应注意延长离心时间, 观察温度对蛋白质活性的破坏作用。

(6) 盐析时注意综合利用, 使用不同浓度盐溶液沉淀不同蛋白分子, 以及采用几种方法获得纯度较高的产品。

5. 盐析蛋白质例子, 详见 Ig 的纯化与鉴定部分。

(二) 脱盐 (Desalting) 方法

脱盐是指从高分子溶液中去除其中的盐类离子以及其它低分子量的物质。

目前所用的脱盐方法有半透膜透析法、凝胶过滤法、超过滤法及大规模的脱盐办法及渗析法脱盐。

1. 半透膜透析法: 根据脱盐样品体积选择合适大小的透析袋, 检查是否漏液, 装样时要留有一定空体积并排出空气。透析时, 视情况可静止透析、流水透析或搅拌透析。透析液可先用自来水或蒸馏水, 再换成低渗缓冲液, 需要时最后可选用所希望的缓冲液透析, 以达到即脱盐又平衡其样品中的离子强度及 PH 值。

硫酸铵的脱盐效果检查, 可用 10% BaCl_2 检查 SO_4^{2-} 的有无, 用纳氏试剂检查 NH_4^+ 的存在与否。(BaCl_2 与 SO_4^{2-} 反应生成白色沉淀, 纳氏试剂同 NH_4^+ 生成橘黄色沉淀)。

2. 凝胶过滤脱盐

凝胶过滤脱盐的基本技术与原理见后面凝胶层析部分, 用于脱盐的技术关键有以下几点要注意:

(1) 脱盐要选择交联度高, 排除(排阻)极限较小的, 中等颗粒度的 Sephadex G-50, G25 或 Bio-Gel P-30 等。

(2) 所装柱子大小取决于样品体积多少, 一般脱盐凝胶柱, 所加样品体积最大在床积的 10-15% 以下。

(3) 洗脱样品的流动相液要求不严，可根据样品要求溶液的缓冲液或其下步实验要求的条件而定。

(4) 洗脱的蛋白样品可用紫外监测器测定或用20%磺基水杨酸滴测灵敏度可到500-1000 μ g/ml蛋白，共盐离子同盐析监测试剂。

3. 超过滤脱盐(4)*

超过滤是一种高效分子滤膜的新技术，目前国外已有各种分子孔径的滤膜及各种类型的超过滤器，国内近几年已有部分商品及滤器。用于脱盐的技术有以下几步。

(1) 选择适当的超滤膜(即膜孔可允许盐离子下去而阻挡蛋白分子)像Millipore公司产的孔径0.025 μ m膜可阻挡分子量20000左右，孔径0.05 μ m可阻挡70000以上。及适当体积的超滤器。

(2) 组装超滤器系统：超滤室、搅拌器、纯氮气及调压部分等。之后检查是否漏气及有漏液。如符合要求可加样超滤。

(3) 超滤脱盐可采用低离子强度的缓冲液反复稀释反复浓缩数次。一般脱盐可连续稀释4~5次超滤后可达目的。

醋酸纤维素超过滤膜的制备及鉴定

一、溶液的配法：

超滤膜制备成份配制

型号	二醋酸纤维素※ (克)	丙酮 (ml)	甲酰胺 (ml)
CA35	25	100	35
CA60	25	100	60
CA80	25	100	80
CA100	25	100	100

二醋酸纤维素 (Cellulose (Acetate) diacetate) 上海红旗厂产, 结合酸为 54.5~56%, 粘度 500 厘泊左右。

根据上表配方, 称醋酸纤维素置于可密封的广口试剂瓶中, 再分别按指定量加入丙酮与甲酰胺。搅拌器搅拌 15 分钟, 密封后室温过夜。搅拌 10 分钟, 再放 37°C, 湿箱消泡并溶解完全均一成淡黄色粘稠状液体, 密封保存备用。注意, 最好使用时配液, 放置过久颜色深, 粘度增加, 影响制膜。

超滤膜的制备

在干净的玻璃板一端, 倒上一厘米左右宽的膜液 (注意膜液切勿有气泡), 用缠有铜丝 (直径 0.3 mm 左右) 的不锈钢刮刀, 以一端均匀用力将膜液推开, 在空气中蒸发约 3~5 秒后, 放 4~5°C 冰水中, 1 小时后将膜从玻璃板上取下。刮刀膜的一面为正面, 用圆珠笔作记号及时间, 以表示为使用面。取出置于 0.01% NaCl₂ 水中保存。制好的膜一般为 0.2 毫米左右厚度。

三、超滤膜的鉴定

1. 厚度: 可用游标卡尺测量厚度。

2、流速测定：以 3 kg/cm^2 氮气压力，分别测定对水和 0.1% 不同蛋白质，过滤速度，以：毫升/小时厘米² 计算。

3、不同分子量蛋白截止率的测定：用 3 kg/cm^2 氮气压力，分别测定不同分子量的 0.1% 的蛋白溶液的截止率。再分别测定其过滤前后的 OD 280 nm 值，根据下式计算其截止率。通常某一滤膜对某蛋白液的截止率 75% 左右即认为可用于该蛋白浓缩使用。

$$\text{截止率} = \frac{\text{样品 OD } 280 \text{ nm} - \text{滤液 OD } 280 \text{ nm}}{\text{样品 OD } 280 \text{ nm}} \times 100\%$$

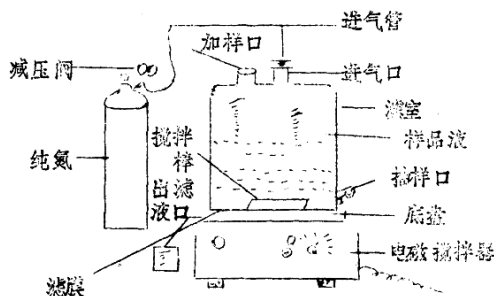
二、超滤器的构造及组装

超滤器的构造主要有三个组成部分，超滤器，纯氮供压系统（氮气钢瓶，减压阀及耐压管）及电磁搅拌器。因我们浓缩干扰素的需要，超滤器装置在冷箱 $2-4^\circ\text{C}$ 下操作。

超滤器，有机玻璃器室，最大容量为 270 毫升，上有加样和压力进气咀，下端有取样咀，座上有螺孔，用螺钉固定于滤器底盘上。滤器底盘为黄铜制成，边上一滤液出咀。在滤室与底盘之间有一尼龙筛板及橡皮垫圈。用时滤室装一个搅拌棒。

工作压力由压缩氮气钢瓶通过减压阀，自滤室上方进气口维持 3 公斤/厘米² 左右，由减压阀控制氮气压力。

滤器组装见下图示。



超滤浓缩装置图示

三、样品的浓缩实验

1、超滤膜的组装及膜的检查

组装好滤器、滤膜及压力装置，先加入少量水于滤器中，关闭气口，打开滤液咀，未见有水流出现认为滤膜无漏孔即为可用。再打开进气孔，调至3公斤/厘米²压力，同时观察滤器的螺丝钉等处有无漏水，如有应重新拧好螺钉，直到无漏水为止。

2、样品的浓缩（纯化）或脱盐

根据浓缩样品的蛋白质分子量等因素，选择合适型号的滤膜（对粗制鼠干扰素液浓缩可使用CAGU，CA80滤膜），组装好超滤装置后，视情况加入浓缩样品，分别收集滤液和膜上样品，并进行蛋白量及生物活性测定，计算其超滤器浓缩效果。

如采用超滤法进行脱盐时，一般可用蒸馏水或缓冲液在超滤器