

免疫荧光技术

(内部资料)

长春市畜牧兽医工作总站

前 言

免疫荧光技术在兽医科学究研、疫病的快速诊断和流行病学调查等方面的应用日益广泛。一些单位已取得了可喜的成果。国家有关部门组织生产了各种类型的荧光光源和有关化学试剂，为迅速推广和普及免疫荧光技术提供了有利的条件。

目前，在基层兽医检验部门，免疫荧光技术正在日益开展起来。为了适应这项工作的需要，省畜牧局委托我站举办免疫荧光技术培训班。但是有关畜牧兽医方面的免疫荧光技术资料还不多，因此我们参考有关资料和在开展猪病荧光抗体诊断方面取得的点滴经验，匆忙之中编写了这本小资料，简单的介绍了免疫荧光技术的操作程序，并选入了几篇实际应用的例子，做为培训班的讲义，也可供基层兽医检验室开展荧光抗体诊断的参考资料。

由于业务水平和试验条件的限制，可能有错漏和不当之处，望广大畜牧兽医工作者批评指正。

长春市畜牧兽医工作总站 检验科

一九八〇年四月五日

目 录

I	免疫荧光技术的基本知识	(1)
	一、免疫荧光技术发展的历史	(1)
	二、免疫光荧技术的原理和方法	(1)
	〈一〉原理	(1)
	〈二〉方法	(2)
	1、直接法	(2)
	2、间接法	(2)
	3、补体法	(2)
	三、免疫荧光技术的特点	(4)
	〈一〉特异性	(4)
	〈二〉快速性	(4)
	〈三〉敏感性	(4)
	四、免疫光荧技术必备的条件	(4)
	〈一〉抗原	(4)
	〈二〉荧光抗体	(5)
	〈三〉荧光染料	(5)
	〈四〉仪器设备	(5)
	五、免疫荧光技术的程序	(6)
	六、免疫荧光技术在兽医科学的应用	(6)
II	荧光抗体的制备	(7)
	一、高免血清的制备	(7)
	〈一〉免疫原	(7)
	1、免疫原的种类	(7)
	2、免疫原的制备	(8)
	〈 1 〉微生物抗原的制备	(8)
	〈 2 〉免疫球蛋白抗原制备	(8)
	〈二〉被免疫动物的选择	(8)
	〈三〉免疫的方法	(8)
	1、免疫途径	(8)
	2、佐剂的使用	(8)
	〈 1 〉弗氏佐剂抗原的制备	(8)
	〈 2 〉明矾佐剂的制备	(9)

3、免疫原的用量	(9)
< 四 > 抗血清效价的测定	(9)
1、环状沉淀试验测血清效价的方法	(9)
2、用免疫荧光法测血清效价的方法	(10)
< 五 > 分离血清	(10)
二、免疫球蛋白的提取及鉴定	(10)
< 一 > 免疫球蛋白的提取方法	(11)
1、硫酸铵盐析法	(11)
< 1 > 盐析的方法步骤	(11)
< 2 > 盐析时注意事项	(12)
< 3 > 去除盐离子的方法	(12)
① 用葡聚糖凝胶去除盐离子的方法	(12)
② 透析法除盐的方法	(14)
2、DEAE—纤维素离子交换层析法	(14)
① DEAE—纤维素精提免疫球蛋白的原理	(14)
② DEAE—纤维素的处理	(14)
③ DEAE—纤维素纯化免疫球蛋白的程序	(15)
④ DEAE—纤维素的再生	(15)
3、试剂的配制	(15)
< 1 > 磷酸盐缓冲液< P、B、S >的配制	(15)
< 2 > 饱和硫酸铵的配制	(15)
< 3 > 20% 磺酸水杨酸的配制	(16)
< 4 > 氯化钡溶液的配制	(16)
< 5 > 纳氏试剂的配制	(16)
< 6 > P、B缓冲液的配制	(16)
< 二 > 免疫球蛋白的定量测定	(16)
1、双缩尿法定氮的原理	(17)
2、双缩尿法定氮的方法	(17)
3、双缩尿试剂的配制	(18)
< 三 > 免疫球蛋白的鉴定	(18)
1、区带电泳	(18)
2、免疫电泳	(19)
3 试剂的配制	(19)
三、标记荧光素	(20)
< 一 > 荧光素标记抗体的原理	(20)
< 二 > 标记的方法	(20)
1、直接快速标记法	(20)
2、透析标记法	(21)

〈三〉标记抗体的纯化	(21)
1、游离荧光素的去除	(21)
〈1〉透析法去除FITC	(21)
〈2〉葡聚糖凝胶过滤法去除FITC	(21)
2、标记不适蛋白分子的去除	(22)
〈四〉荧光抗体〈FA〉的鉴定	(22)
1、F/P值的测定	(22)
2、染色性能的鉴定	(23)
〈1〉染色滴度的测定	(23)
〈2〉特异性鉴定	(23)
〈五〉记标抗体的保存	(23)
〈六〉溶液的配制	(24)
III 染色标本的制备和染色方法	(24)
一、标本的制备	(24)
〈一〉载片的选择和处理	(24)
〈二〉涂片和压印片的制法	(25)
1、涂片	(25)
2、压印片	(25)
〈三〉组织切片	(25)
1、冰冻切片	(25)
2、石蜡切片和碳蜡切片	(25)
〈四〉单层培养细胞	(26)
〈五〉标本的固定	(26)
1、固定液的选择	(26)
2、影响固定效果的因素	(26)
3、固定的方法	(27)
4、标本的保存	(27)
二、染色方法	(27)
〈一〉直接染色法	(27)
〈二〉间接染色方法	(28)
〈三〉补体染色法	(28)
〈四〉对照染色问题	(29)
三、结果判定	(29)
〈一〉非特异性荧光	(29)
1、自发荧光	(29)
2、来自FA的非特异性荧光	(29)
3、由于操作技术上的不当所引起的非特异性荧光	(30)
〈二〉特异性荧光的特点	(30)

1、细菌的特异性荧光的特点	(30)
2、病毒的特异性荧光的特点	(30)
3、原虫的特异性荧光	(30)
〈三〉观察判定	(30)
1、特异性的胞浆荧光的强度	(30)
2、判定	(30)
3、排除非特异性荧光的方法	(30)
IV 荧光显微镜	(31)
一、荧光现象及其产生的理论简介	(31)
二、荧光显微镜的构造和组成	(31)
1、光源	(32)
2、显微镜	(33)
3、滤板	(33)
三、荧光显微镜的使用和注意事项	(33)
V 荧光显微照像	(34)
一、胶卷的选择	(34)
二、土法荧光照像的方法	(35)
三、荧光照像的注意事项	(36)
VI 免疫荧光应用凡例	(36)
一、免疫荧光在细菌学中的应用	(36)
例：布氏杆菌的荧光抗体诊断	(36)
二、免疫荧光技术在病毒快速诊断中的应用	(37)
例一：用小肠粘膜洗沉液涂片直接荧光抗体染色检出猪传染性胃肠炎	(38)
例二：猪瘟荧光抗体的制备——部分采血快速标记直接测定荧光抗体效价的效果。	(42)
三、免疫荧光在寄生虫学中的应用	(47)
例：弓形体的荧光抗体诊断	(47)
附：透光度与光密密度换算表	(49)

I 免疫荧光技术的基本知识

一 免疫荧光技术发展的历史

很久以来，医学和生物科学工作者，他们梦想如何能够在显微镜下直接看到抗原（病毒、细菌、组织抗原、激素、酶等），在组织和细胞中的分布和定位。免疫化学推进了组织化学的发展，但是组织或细胞内抗原和抗体特异性结合形成的抗原-抗体复合物，在没有指示物标记它们的情况下，一般是看不见的。早在四十多年以前，(Reiner)和Heidelberger... (1933)曾报导过用偶氮染料做指示物，进行了这方面的尝试，但由于敏感性太低，没有达到应用的程度。

1941年美国病理学家Coons等用荧光素标记抗体，在世界上首次成功地检出人工感染小白鼠，肺组织切片内的肺炎球菌。1950年他们又合成了异氰酸盐荧光素(FIC)，用来标记抗体球蛋白，从此为现代荧光抗体技术的发展奠定了基础。由于当时所用的荧光素在合成和质量上都有问题，所以没有得到广泛的应用和推广。1958年Riggs合成了异硫氰酸荧光黄(FITC)，这种新的化合物不但稳定而且容易和球蛋白结合。1960年Goldstein等把凝胶过滤和柱层析的技术应用到标记抗体的提纯。由于技术上不断地完善，使很多疑难的问题得到了解决，排除了非特异和组织自发荧光的干扰。免疫荧光技术在七十年代有了很大的发展，已成为医学和兽医科学研究及临床快速诊断不可缺少的重要手段。有关研究和应用方面的成果，每年都有大量的文献报导。免疫荧光技术在生物学领域中的巨大潜力已经日益显示出来。由于应用范围的扩大，荧光蛋白示踪方法不仅标记抗体，根据试验的需要有时也标记抗原，所以“荧光抗体”这个概念，已被免疫荧光所代替。

另外关于标记方面的技术还有：放射性同位素、铁蛋白、酶标记，都可用来研究组织的超微结构和临床快速诊断。现在酶标记技术发展很快，一些技术上的问题正在克服。在医学和生物学的研究中，根据实验室条件的可能，可选用上述不同的标记技术，如果能联合应用这些方法则更为方便和有利。

二、免疫荧光技术的原理和方法、

〈一〉原理：荧光色素和抗体球蛋白分子牢固地结合后，而不损害抗体球蛋白和特异性抗原结合的能力，把这种标记的抗体，当作一种指示试剂去浸染包含相应抗原物质的标本，当相应的抗原和抗体发生反应时，能在抗原存在的部位，形成一种不溶性的沉淀。这时将被染的标本置于荧光显微镜下，带有荧光素的抗原—抗体复合物，当受到紫外光或兰紫光激发后，结果在抗原存在的部位可出现明亮的荧光，借这种荧光就可以鉴定

抗原在组织或细胞内的分布和定位。如果被染的标本和所用的荧光抗体，抗原——抗体关系不一致时，滴加在标本上的荧光抗体则不能结合，在水洗时被冲洗掉，于是在进行荧光检查时见不到发亮的荧光。由此可以看出，荧光素和紫外光或兰紫光是这个技术的基础。

(二)方法：按着——抗原抗体反应不同的安排，免疫荧光示踪的基本方法有以下三种：直接法、间接法、补体法，其中直接法和间接法为常用。三种方法的染色程序和原理见图(一)。

1、直接法

将荧光素标记在相应的抗体球蛋白上，直接检查相应的抗原。其优点是方法简单，非特异性染色影响因素少。缺点是敏感性比间接法低，而且一种标记抗体只能检查一种抗原。

2、间接法

先以相应的未标记抗体(也叫第一抗体)与抗原作用之后，再染荧光素标记的抗免疫球蛋白抗体(即抗第一抗体)，与形成的抗原——抗体复合物的免疫球蛋白结合而呈现特异性荧光。此法由于中间层的免疫球蛋白分子(指第一抗体)上有多个抗原决定簇，因而能结合多个标记抗球蛋白抗体分子，所以间接法比直接法敏感5—10倍。因为血清免疫球蛋白具有动物种间特异性，所以这种标记的抗球蛋白抗体，在同种动物的多种抗原——抗体系统检查时是通用的。例如：当提纯正常猪血清免疫球蛋白来高免家兔时，可获得兔抗猪免疫球蛋白抗体，用荧光素标记后，就可用来检查猪病中各种抗原——抗体系统(如病毒病、细菌病、寄生虫病等)。

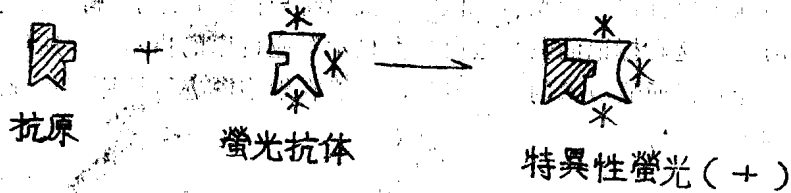
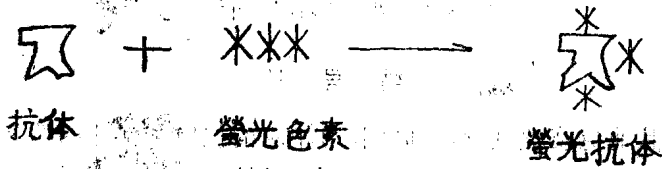
间接法不但能鉴定未知的抗原，也能测定未知的血清抗体滴度(用于血清学测定)。由于此法敏感性高，抗各种动物正常免疫球蛋白的标记抗体，可以进行商品化生产(如羊抗兔、兔抗猪等)，所以间接法的应用也比较普遍。它的缺点是，对照条件多，标本中的正常免疫球蛋白，在染色时容易出现干扰，所以此法多用于检查组织培养的接毒样品和某些寄生虫病的血清学调查。

3、补体法

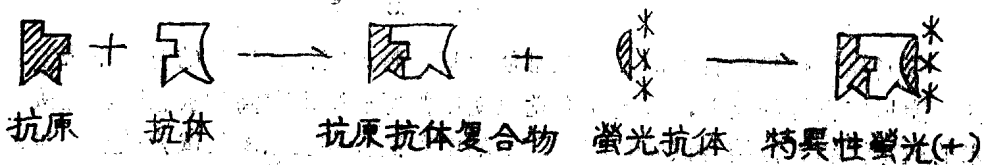
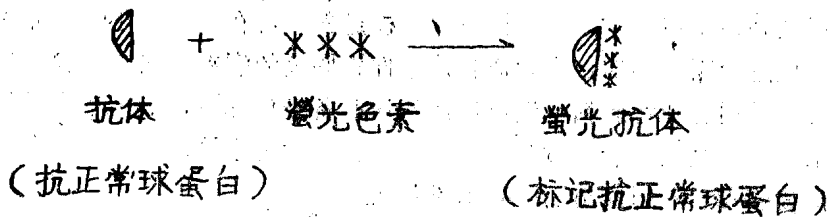
此法是利用补体结合反应的原理，反应中有补体参加，实际上此法是属于一种改进了的间接法。当抗原——抗体——补体复合物形成后，染荧光素标记的抗补体抗体，这叫做抗补体法。如果当抗原——抗体复合物形成后染荧光素标记的补体，叫荧光补体法。因为补体可被任何哺乳动物的抗原——抗体系统所固定，所以标记的抗补体法，在哺乳动物间有补体结合反应的试验中通用。虽然此法非常敏感，但因参加反应的因素多，对照更多，易出现非特异性反应，目前有关应用方面的报导还不多。

以上介绍的三种染色方法的过程中，一般都是应用固定的抗原，做为被作用物，荧光抗体能穿透细胞到达抗原存在的部位，而形成特异性的抗原——抗体复合物。为了检查细胞表面的抗原，抗体结合不用穿透到细胞内，而活的靶细胞可以直接在试管内进行

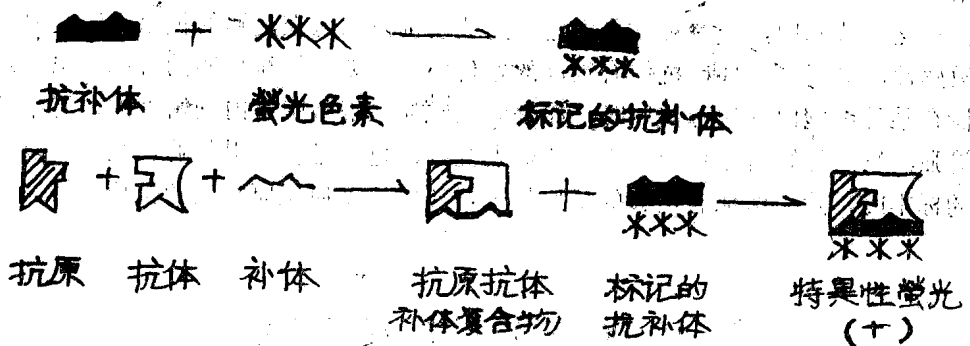
直接法



2. 间接法



3 补体法



图一、免疫荧光的原理和方法

反应。这个染色过程叫“膜免疫荧光”。另外还有其他的方法，如用荧光素标记的抗体或抗原，直接注入活体试验动物体内来示踪抗原——抗体反应的部位。

三、免疫荧光技术的特点

(一) 特异性

免疫荧光技术和其他免疫学试验，都是利用相应的抗原和抗体的特异性反应来进行，虽然抗体球蛋白标记了荧光素，但它和抗原特异性结合的能力没有受到损害。在荧光抗体染色时，把这种标记的荧光蛋白当做显示对应抗原的指示剂，所以具有很高的特异性。免疫荧光是普通显微术的重大发展，它能在细胞内进行抗原定位或证实包含体和病毒颗粒之间的关系等。

(二) 快速性

在免疫荧光技术中，由于染色标本制备容易，荧光抗体染色的方法也比较简单，一般从被检病料送到检验室开始，正个染色和镜检过程，可在1—2小时内完成。所以特别适用于临床快速诊断。例如：当疑似猪传染性胃肠炎的病料，送到检验室进行荧光抗体鉴别诊断时，采用患猪小肠粘膜洗沉液涂片法制备染色标本，一个半小时就可做出可靠的诊断结果。这比其它血清学试验、分离病毒、电镜观察等，不知要快多少倍。用组织培养来分离该病毒，不但麻烦而且目前不易成功。

(三) 敏感性

荧光显微镜检查标本时，一般都使用暗视野观察，在黑暗的背景下观察彩色的图像，能形成良好的反差，因此在视觉上就比普通显微术有高的敏感度。直接荧光抗体技术的敏感性和补体结合试验很相似，不如中和试验和血球凝集试验敏感。间接法和补体法比直接法的敏感性提高5—10倍。目前特异性荧光的强度不好定量，所以精确的敏感性指标还不好确定。

在这个技术中，一般都是采用过剩的荧光抗体来检查足够的抗原，因此要想提高它的敏感性，除了要求标记抗体有很高的效价外，主要是依靠足够的抗原来决定。例如，在检查某种细胞内的病毒抗原时，如果病毒颗粒在细胞胞浆内的密度大，胞浆荧光的亮度就强，反之尽管有足够的高效价的荧光抗体，也不能获得很强的荧光。所以在制备被检的标本时，除了保证有足够的抗原量外，还应注意使抗原物质的抗原活性不受到损害。

四、免疫荧光技术必备的条件

(一) 抗原

免疫原是制备高免血清的先决条件。用做高免动物的抗原，主要是微生物抗原和组

织抗原，不管使用那种免疫原，在免疫动物时，都要求制得尽量纯，不能含有类属抗原物质和正常组织成份。为了防止抗原中的正常组织产生抗体，人们在增殖抗原时，都尽可能采用同种动物或同种动物的组织细胞培养来制备。因为同种动物的组织一般不产生抗体，这样可以免去抗体用正常组织吸收的复杂过程。

用做荧光抗体染色抗原标本，要求有足够的抗原量，所以应选择含抗原物质多的部位来制备染色标本，在病料的运输和制备过程中，应使其抗原性不受到损失，应尽量利用低温的条件，尽快将被检材料送到检验室，或者将病料按制片要求先固定在载片上，经过适当固定处理的标本，一般就是在室温的条件下，保存几天后对荧光抗体染色的影响不大。如果将固定的标本在4℃或低温保存效果更好。

(二) 荧光抗体

一个好的荧光抗体试剂，必须特异性强，效价高。要想制备高效价的荧光抗体，必须先获得高效价的高免血清，所以在制定高免计划时，一个突出的问题就是如何达到高效价，用什么样的测血方法作为血清高效价的测定指标，这些都是免疫计划中不可缺少的重要内容。如果所标记的抗体缺乏高效价时，它的特异性就很难显示出来。只有标记抗体效价很高，在染色时抗体才能经得起高倍稀释使用，这样那些在低倍稀释染色时所产生的一些干扰因素，就会顺利地得到克服。高效价的标记抗体往往用不着丙酮脏粉吸收等程序。另外在免疫荧光技术中，那些自然感染某种传染病而耐过的动物血清，如果效价很高时也可应用。

高效价的荧光抗体，要求它本身有很弱的阴电荷。如果标记过高，标记抗体的蛋白分子上阴电荷增加，在染色时就可产生非特异性吸附，即发生非特异性荧光反应。荧光素和蛋白分子结合时，要求控制在适当的比率，F/P（荧光素/蛋白）比值，应1—2之间（按克分子比）。

(三) 荧光染料

在免疫荧光技术中所用的荧光染料，要求它易于和抗体球蛋白分子结合，并连接地很牢固，结合后不防碍抗原—抗体特异性反应。要求荧光素在紫外光或兰紫光的激发下，产生荧光的效能高而稳定。现在广泛应用异硫氰酸荧光素（FITC），这种荧光素符合上述的条件，它不仅含有能发荧光的基团，并含有能与蛋白质分子结合的活性基团。另外还有四乙基罗达明（RB200），有时用做对比染色或双标记。目前所用的FITC有不同的厂牌和批号，在它们之间，一般在质量和效果上有时差异较大。这种荧光素长期保存可以降解，所以应尽量使用近期效果可靠的产品。

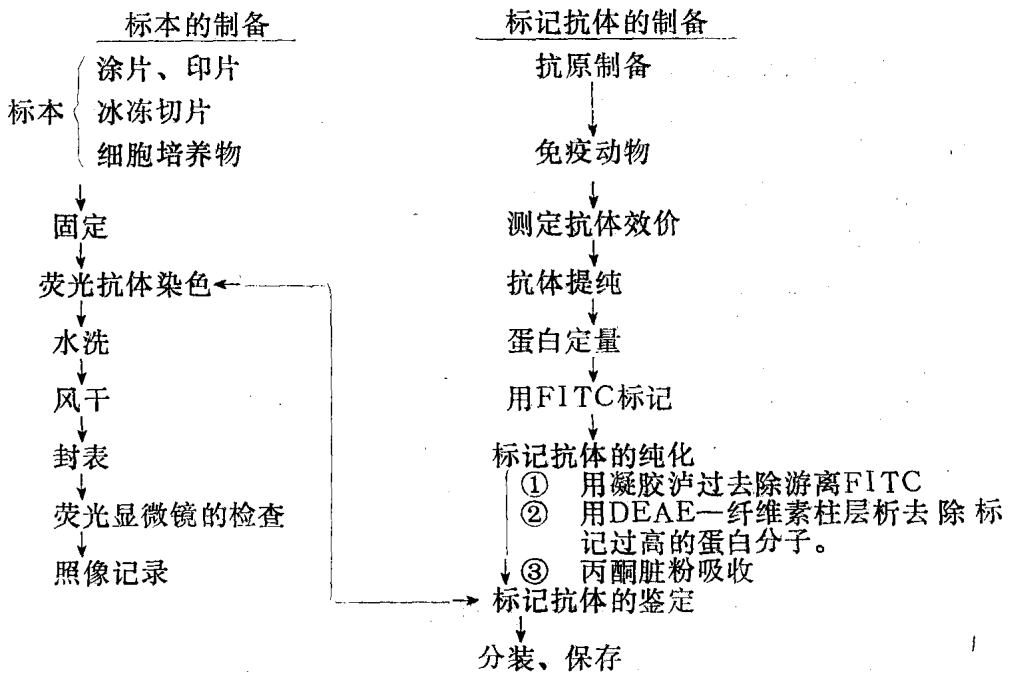
(四) 仪器设备条件

开展荧光抗体快速诊断工作，如果不需要本检验室自己制备荧光抗体，如能从外单位得到某种合格的标记抗体，或能购到商品荧光抗体试剂时，可在一般检验室设备的基础上，增加荧光显微镜和半导体冰冻切片机，就可以开展荧光抗体快速诊断。现在国产的荧光源（200瓦汞灯），配上普通生物学显微镜，可以代替荧光显微镜，采用暗视野聚

光器进行荧光观察，可获得很好的效果。如果进行免疫荧光诊断方面的研究，自己制备标记抗体时，还应增加一些必需的设备：如中型离心机（4000转/分）、磁力搅拌器、分光光度计、电泳仪、低温冰箱（-20℃）等。

五 免疫荧光技术的程序

免疫荧光的操作程序，首先是制备标记抗体，经实际测定所标记的抗体合格后，进行分装低温或冻干保存，可以长期使用。第二步是制备被检样品，进行荧光抗体染色和观察。每步的具体程序和操作方法，将在以下的材料中进行较详细的讨论，现以简表的方式概括如下：



六 免疫荧光技术在兽医科学的应用

免疫荧光技术自从1942年问世以来，经过不断地完善，克服和解决了许多疑难问题。近年来又增添了一些应用荧光蛋白示踪的新方法。这项技术在七十年代已成为医学和兽医科学研究及临床快速诊断不可缺少的重要手段。免疫荧光技术能在细胞水平上，对组织和细胞内的抗原物质进行鉴定和定位，因此可应用于微生物学、免疫学、病理学、组织学等，特别是在病毒学的研究和快速诊断上应用的范围日益扩大，而且显示了它的优越性。过去病毒病的确诊主要依靠分离病毒和血清学反应，这些过程由于方法上的限制，都需要较长的时间。利用荧光抗体诊断不但快速而且把掌可靠。应用间接荧光抗体法，不但能鉴定未知的抗原，而且也能在动物生前测定抗体的滴度，用这种方法来进行流行病学调查或临床诊断，比其他的常规血清学试验更为简单快速。

近年来免疫荧光技术在兽医科学研究方面的应用，也相当普遍，为某些病毒病、细菌病、寄生虫病等，临床快速诊断和流行病学调查方面的提供了一些新的途径。有关这方面的文献，每年都有大量的报导：马传贫、马毕肺炎、马脑脊髓炎、马毕疽、牛瘟、牛毕气管炎、牛白血病、牛肝炎病毒、牛结核、副结核、猪瘟、非猪瘟、猪传染性胃肠炎、猪轮状病毒（Rotavirus）引起的下痢，流行性乙型脑炎、猪流感、猪细小病毒、猪水泡病、伪狂犬病、猪支原体肺炎、猪痢疾、猪丹毒、李氏杆菌病、钩端螺旋体、鸡瘟、鸡传染性支气管炎、禽脑脊髓炎、鸡马立克氏病、狂犬病、犬瘟热、炭疽、布氏杆菌病、坏死杆菌、沙门氏菌、链球菌、弓形体、旋毛虫、肝片吸虫、锥虫病、利什曼氏病等。以上这些病的研究或应用方面都取得了一定的成果和进展。

目前我国很多医学研究单位和一些高等院校，在免疫荧光技术的研究和应用方面，做了大量的工作，取得了一定的成果。国家科委组织了有关部门，生产了大量的荧光光源，半导体冰冻切片仪，国产异硫氰酸荧光黄（FITC）、葡聚糖凝胶（Sephadex）、DEAE—纤维素等。这些器材和试剂性能稳定效果可靠，这就为我们基层开展荧光抗体快速诊断创造了有利的条件。

II 荧光抗体的制备

一、高免血清的制备

特异的高免血清，是制备荧光抗体的物质基础，也是成败的关键一步。所以必须先制备出特异高效价的高免血清。制备高免血清的基本原理是：用免疫原〈抗原〉，通过不同途径，不间断的刺激机体的网状内皮系统，使之活化，分泌出高效价的免疫球蛋白。在免疫血清的制备中，一般以高效价为主。在一定的高效价的基础上来显示高免血清的特异性。制备高免血清的主要环节是：免疫原，被免疫的动物和免疫方法。

〈一〉免疫原：

免疫原是制备高免血清的关键。没有高质量的免疫源，在一般情况下，是不能制备出高效价的特异的高免血清。

1、免原的种类：上边已经讲到，免疫荧光技术基本上有三个方法：直接法：间接法、补体法，所以在制备高免血清时所用的免疫原也相应的有三类：

直接法免疫原：主要是微生物抗原：原虫、真菌，细菌，立克次体，支原体，病毒等。

间接法免疫原：主要是某种动物的免疫球蛋白，包括IgG、IgA、IgM等。

补体法免疫原：主要是用豚鼠的补体，因为豚鼠血清含补体量最多，补体又不是种的特异。

2、免疫原的制备：制备免疫原的原则，就是尽可能使其少含或不含不需要的抗原性杂质（如培养基成分，其它异种组织成分等），才能制备出特异性高的高免血清，从而消除由免疫原不纯所引起的非特异性染色。

〈1〉微生物抗原的制备；由于微生物抗原的种类凡多，制备方法各有不同，这里仅谈一些共同性的要求。

首先必须选择抗原性强，稳定，标准的微生物毒株，在使用前要仔细的进行鉴定。另外，在增殖微生物毒株时，要注意所用的动物，细胞和培养基。动物：一般多用于病毒等不易分离培养的微生物毒株。要求选用对接种的微生物敏感，并能使其大量繁殖的动物。同时为避免产生正常组织成分的抗体，要尽可能利用和被免疫动物同种的动物去增殖抗原。如：用鸡胚培养的抗原最好免疫成年鸡；用新生仔猪增殖的TGE病毒抗原去免疫断奶仔猪等。组织细胞是增殖病毒的主要方法，要求细胞发育良好，同时尽量选用和被免疫动物同种的细胞，如：用猴肾细胞培养的病毒去免疫猴，用猪肾细胞培养的病毒去免疫猪。培养基主要是凡殖细菌抗原，要求选用适合的培养基配方，提供丰富的营养，绝对无杂菌污染。

〈2〉免疫球蛋白抗原〈间接法抗原〉的制备：动物的免疫球蛋白的抗原性具有种的特异性。制备方法在下一部分“免疫球蛋白”提取一节详细叙述。

〈二〉被免疫动物的选择：

要根据不同的疾病和所选用的不同的免疫方法，适当的选择被免疫动物，在一般的情况下要选择雄性成年动物。如家兔在2——3公斤左右，猪在20—50公斤之间。被免疫动物月令过小没达到成年，机体的免疫系统尚未健全。被免疫动物太大、太老，机体的反应迟纯，免疫原用量也大，效果往往不好。所以雄性，健康，无其它疾病史的刚成年动物是最理想的被免疫动物。

〈三〉免疫的方法：

有了质量好的免疫原和合格的被免疫动物，免疫的方法也是十分重要的。要根据被免疫的动物和免疫原的种类，制定适宜的免疫方案，决不能千篇一律。

1、免疫途径：免疫途径有多种，如静脉注射、腹腔内注射、肌肉、皮下，皮内注射，淋巴结内注射等。一般以多途径免疫为好，免疫途径的选择决定于抗原的生物学特性和理化特性而定、如激素、酶、毒素等生物学活性抗原不宜静脉注射。

2、佐剂的使用：抗原经佐剂乳化，再去免疫动物，能延长抗原的做用时间，刺激机体产生更多的抗体。一些抗体，如可溶性蛋白质抗原，在高度纯化时，抗原性往往降低，还有一些抗原：如IgM、IgA等一般只能得到微量，要想制备出有一定效价的抗血清就更为困难，所以必须使用一定免疫佐剂，以提高动物的免疫反应性、增强抗体的合成。常用的佐剂有两种，即弗氏佐剂，（Freund's、adjuvant）和明矾佐剂。

① 弗氏佐剂抗原的制备	{	无水羊毛脂	一份	注：减掉卡介苗为弗氏不完佐剂。
		石蜡油	一份	
		卡介苗	〈3—4mg/ml〉二份	

配法：将等量的无水羊毛脂和石蜡油混匀后高压灭菌，降至室温后与等量的抗原充分乳化后即可应用。在乳化时根据需要，决定是否加卡介苗。乳化的方法：如果抗原量很大可以置乳钵内，在无菌条件下充分研磨乳化，少量时，可用注射器和青霉素小瓶反复抽注乳化。

(2) 明矾佐剂抗原的制备：

10% 硫酸钾铝：	}	Na ₂ HPO ₄	240mg
		KH ₂ PO ₄	174mg
		CH ₃ COONa·3H ₂ O	100mg
		NaNal Ce	11mg
		蒸馏水	75ml
		硫酸钾铝	10.0g
		蒸馏水加至	100ml

取25.6份上述溶液，逐滴加入一份的抗原溶液（10mg/ml）内，用1N NaOH溶液调PH至5.5，离心〈4000转/分〉15分，收集沉淀的抗原，然后再重溶于PH5.5缓冲生理盐水中，使每毫升含抗原量为30—50mg，按需要量去免疫动物。

在抗原剂量充足，而且纯度差一些时，可以不使用佐剂，定时的不间断的把抗原通过不同途径注入体内也可以。使用佐剂有时还可以产生付作用：如弗氏佐剂，可产生局部坏死，无菌性炎症和脓肿等缺点：明矾佐剂的付作用较小，但是必须精确的算出抗原和明矾的比例，才能获得好的结果。微生物抗原经佐剂处理后，往往由于处理方法不当，而使抗原失去活性。

3、免疫原的用量：要根据被免疫动物的大小，免疫原的毒力和免疫的途径来确定免疫原的用量，量太小达不到免疫效果，量太大容易使动物造成死亡或产生免疫麻痹现象。如果动物产生了免疫麻痹现象应立即淘汰。在免疫时，抗原的量都是逐渐增加。如：50公斤的猪用猪瘟石门系种毒免疫时：经大量的免化弱毒基础免疫后：第一次可用石门系种毒〈血毒〉100ml最后一次可增加到400ml决不能先多后少。

〈四〉抗血清效价的测定：

对于制备荧光抗体用的高免血清，一般要求都是以高效价为主。测定高免血清效价的方法很多，不同疾病有不同的测定方法：如制备兔抗猪r—球蛋白抗体的测血方法常用环状沉淀试验；制备抗猪瘟病毒高免血清的测血方法常用END试验或免疫荧光测血法。对于在试验室内没有可靠的诊断方法的疾病，用免疫荧光法测血法显得很适用。如猪传染性胃肠炎，目前国内还没有很好的诊断方法：用其它方法测血清效价都不能获得可靠的结果。实践证明在进行猪传染性胃肠炎和猪瘟的免疫荧光诊断时，用免疫荧光法测血清效价都获得了好的结果，成功地制备出高效价的抗猪传染性胃肠炎病毒的荧光抗体和抗猪瘟病毒的荧光抗体。关于其它的测血方法可参照有关疾病的诊断方法进行。本文着重介绍一下，环状沉淀试验和免疫荧光法测血清效价的方法。

1、环状沉淀试验测血清效价：

(1) 原理：在免疫血清的液面上重叠上透明的抗原溶液：借助于抗原抗体的对应

关系，于两液面交界处出现乳白色的环状沉淀反应带。

此法常用于可溶性蛋白抗原的免疫血清的效价测定。

(2) 方法步骤：先把抗原按1:2:5稀释的方法稀释，1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, ……等几个稀释梯度；第二步是把待测血清用毛吸细管加入到一系列的状环沉淀管中〈直径0.4mm, 高40mm〉的底部，高约10mm, 切勿产生气泡及沾染上端管壁。第三步，用毛吸细管吸取上述已稀释的不同浓度的抗原〈从稀释倍数最高一管吸起〉分别加入上述预先加好血清的沉淀管中，沿管壁缓缓加入，使两液层重叠。切勿使两液相混或在其中间产生气泡。加入抗原的量应和血清的量相等。对照管内加生理盐水，室温静止30分钟后判定，要在对照管呈阴性反应的基础上进行判定。判定时后面用黑纸或黑布等相衬更有利于判定。发生环状沉淀的抗原最高稀释倍数即为免疫血清的效价。一般环状沉淀试验，抗原做 $8000\times$ 〈每毫升抗原含Ig1mg〉以上稀释出现阳性结果时，即可采血进行标记荧光素。

2、用免疫荧光法测血清效价方法：

此方法常用于某些在试验室内没有可靠的血清学诊断方法的传染病的高免血清制备上。如猪传染性胃肠炎，猪瘟等。此测血方法可靠效果确实，有一定的适用价值。其原理和免疫荧光技术的原理相同。分为直接标定测血法和间接测血法的。

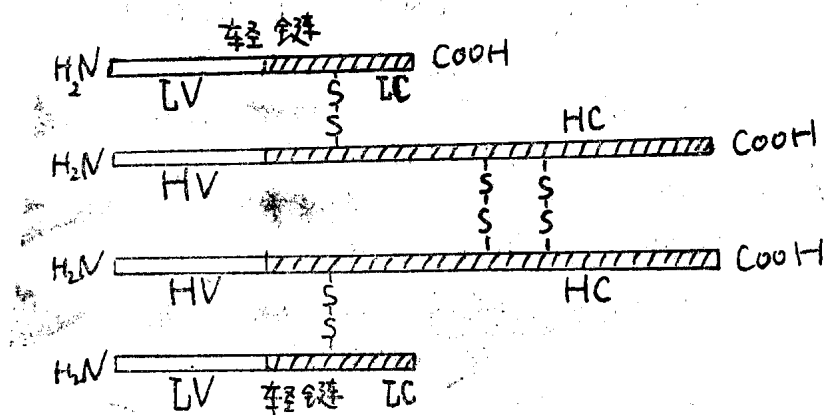
〈1〉：直接标记荧光素测血法：此方法适用于大中动物，采被测血样50ml，分离血清，快速制备荧光抗体。把此荧光抗体按倍比稀释， $4\times$ 、 $8\times$ …… $64\times$ 、 $128\times$ 。然后染已知的阳性标本和阴性对照标本，同时设其他染色对照。荧光显微镜下观察，确定特异性染色效价达 $16\times$ 以上时即可放全血，进行大量标记荧光素。

〈2〉：间接法：和间接荧光抗体染色法一致。方法步骤：把待测的抗血清从 $8\times$ 开始，倍比稀释到 $516\times$ 分别滴加在已知的阳性标本和阴性标本上，在 37°C 下作用30分钟后充分水洗，风干后再与抗待测血清r-球蛋白的荧光抗体在 37°C 作用30分钟，充分水洗，风干后，甘油封片，荧光显微镜下观察，出现特异性荧光的最高稀释倍数，为此血清的效价，一般达 $516\times$ 以上时合乎要求。

〈五〉分离血清：经测定抗血清的效价达到所要求的标准后，就可以放全血，分离血清进行荧光抗体的制备，也可以分装保存，以每个包装50ml为适， -20°C 保存备用，要注意不要反复冻融。

二、免疫球蛋白的提取及鉴定

免疫球蛋白就是我们大家熟知的抗体，它是由r延至 β 甚至到 α 的球蛋白部分的一种蛋白质。它主要由五种成分组成：即A、G、M、D、E，一九六四年世界卫生组织会议命名为免疫球蛋白，简写Ig，各类分别称IgA, IgG, IgM, IgD, IgE。免疫球蛋白是直接参与免疫反应的球蛋白，它的基本结构含有两条轻链和两条重链，都是由双硫键联接的。如示意图。是根据重链内抗原性的明显差异，应用免疫电泳技术和离心沉淀技术分的类，一般动物只有三种免疫球蛋白，IgG, IgA, IGM。



注：L = 轻链， H = 重链， V = 可变区， C = 不可变区

〈一〉免疫球蛋白的提取方法

提取免疫球蛋白的方法很多，如中性盐析法，DEAE—纤维素离子交换层析法，葡聚糖凝胶过滤法，冷乙醇沉淀法，电泳分离法等。其中最常用，最简单的方法是盐析法，精提免疫球蛋白时常用DEAE—纤维素离子交换层析法。在此仅介绍常用的两种方法：

1 硫酸铵盐析法

使用硫酸铵提取免疫球蛋白比其它几种中性盐的效果好，稳定，受外界条件影响的小，所以是中性盐中首选的方法。其原理是：因为硫酸铵为中性盐类，对蛋白无损害作用，可保持蛋白的活性，当加入到血清等蛋白溶液内后，依靠其盐离子的活动和浓度可降低蛋白的溶解度，使蛋白沉淀下来，从而把蛋白从血清中或蛋白溶液中分离出来，硫酸铵对蛋白质的沉淀作用与其浓度有明显的关系，不同的浓度可使不同类的蛋白沉淀下来。如下表

硫酸铵的浓度对血清球蛋白沉淀的影响

硫酸铵的饱和度	血浆各蛋白质的沉淀情况
>50%	白蛋白 ↓
46%	假球蛋白 I ↓
40%	假球蛋白 II ↓
28—33%	优球蛋白 (r) ↓
20%	纤维蛋白 ↓

注、盐析时一般先用20%饱和先除去血清中的纤维蛋白

〈1〉盐析的方法步骤：〈以50ml血清为例〉