免疫学实验技术

于 涟 主编

-53

浙江大学出版社

97
R392-33
1
2

免疫学实验技术

于涟　主编

XHJ53106

3 0077 4928 0

浙江大学出版社

B 869578

（浙）新登字第10号

内 容 简 介

本书对传统的免疫学技术和近十余年来发展起来的免疫学新技术作了较为系统的阐述。主要内容有：免疫血清的制备，免疫球蛋白的分离与纯化，抗原抗体分析鉴定技术，血清学反应，免疫标记技术，细胞免疫测定技术，杂交瘤技术及其应用，基因工程技术基础及其他免疫学技术等。

本书着重介绍实验操作技术及材料准备，对一些基本原理的阐述力求简练、具体、实用。

本书可作为农业院校有关专业研究生公共课教材和兽医专业本科生《兽医免疫学》课程的主要参考教材；也可以作为从事兽医、畜牧技术工作的人员和其他农业技术人员的参考书。

免疫学实验技术

于 涟 主编

责任编辑 贾吉柱

浙江大学出版社出版发行
浙江大学印刷厂印刷

787×1092 32开本 6.5625印张 147千字
1992年3月第1版 1992年3月第1次印刷
印数 0001～2000

ISBN 7—308—00944—0/R·026 定价：3.00元

前　言

免疫学是一门年轻而发展又十分迅速的学科，尤其是本世纪60年代以来发展更为迅猛。现代医学和生物学向免疫学提出的每一个重大课题都促使免疫学在新的水平上进行研究，在新的领域里进行探索，免疫学理论的发展也就更加深入。免疫学的飞跃发展，与免疫学新技术的推广应用是分不开的。现代免疫学检测技术具有高度的敏感性，不仅可以进行抗原定位，还可以用于抗原抗体的超微定量及组分分析。随着免疫学基础理论及免疫学相关学科的发展和新仪器的相继问世，使免疫学技术日新月异，新方法层出不穷。免疫学技术已渗透到医学和生物科学的各个领域。

本书的内容包括传统的免疫学技术和近十余年发展起来的免疫学新技术两个方面：免疫血清的制备、免疫球蛋白的分离与纯化、抗原抗体分析鉴定技术、血清学反应、免疫标记技术、细胞免疫测定技术、杂交瘤技术及其应用、基因工程技术基础及其他免疫学技术等。本书是在浙江农业大学研究生公共课《免疫学实验技术》教材(1986年)的基础上修改、补充的。当时邀请黄希森副教授撰写了杂交瘤技术及其应用一章。五年来，作为研究生公共课的教材和《兽医免疫学》课程的主要参考书，得到了广泛好评，被全国理工农医高等院校讲义交流中心推荐为全国高等院校交流讲义(1987年)。本书着重介绍实验操作技术及材料准备，对一些基本原理的阐述，力求简练、具体、实用。

本书由于涟主编，并编写第一、二、三、五、六章。其

他参加编写的同志有：蔡渭明（第四章），黄寿森（第七章），余旭平（第八章），张文光（第九章）。

免疫学技术的发展十分迅速，限于学识和经验，不妥之处，祈请读者批评指正，不胜感激。

主　编

1991年8月

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.

目　录

第一章　免疫血清的制备…… 1
§1 动物 …… 1
§2 抗原 …… 2
§3 佐剂 …… 3
§4 免疫方法 …… 4
§5 试血 …… 6
§6 采血 …… 7
§7 血清的分离与保存 …… 8
§8 免疫血清制备实例 …… 9
第二章　免疫球蛋白的分离与纯化……11
§1 盐析法 ……11
§2 凝胶过滤法 ……15
§3 DEAE纤维素离子交换层析法……26
§4 QAE-交联葡聚糖A-50离子交换层析法……34
§5 亲和层析法 ……36
§6 免疫球蛋白或抗原蛋白质含量的测定 ……41
第三章　抗原抗体分析鉴定技术……45
§1 双向免疫扩散试验 ……45
§2 免疫电泳试验 ……52
§3 对流免疫电泳试验 ……55
§4 单向免疫扩散试验 ……58
§5 单向火箭免疫电泳试验 ……60
§6 双向火箭免疫电脉试验 ……63
§7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电脉 ……65
§8 免疫印迹技术 ……70
第四章　血清学反应……76
§1 凝集试验 ……76
§2 间接红细胞凝集试验 ……80
§3 环状沉淀试验 ……87

§4 补体结合试验 …… 88
第五章 免疫标记技术 …… 99
§1 免疫荧光技术 …… 99
§2 免疫酶技术 …… 111
§3 放射免疫技术 …… 121
第六章 细胞免疫测定技术 …… 130
§1 细胞分离技术 …… 130
§3 E玫瑰花环形成试验 …… 136
§3 酸性α-醋酸萘酯酶测定法 …… 139
§4 B淋巴细胞SIg检测法 …… 142
§5 淋巴细胞转化试验 …… 144
§6 空斑形成细胞——PFC测定法 …… 148
第七章 杂交瘤技术及其应用 …… 151
§1 杂交瘤技术 …… 151
§2 单克隆抗体的应用 …… 171
第八章 基因工程技术基础 …… 174
§1 质粒的提取与鉴定 …… 175
§2 感受态细胞的制备及转化 …… 177
§3 DNA的酶切与重组 …… 178
§4 cDNA文库的制备 …… 181
§5 PCR技术 …… 185
第九章 其他免疫学技术 …… 188
§1 免疫胶体金技术 …… 188
§2 化学发光免疫测定技术 …… 194
§3 循环免疫复合物测定技术 …… 197
§4 免疫胶乳技术 …… 200
§5 葡萄球菌A蛋白技术 …… 202

第一章　免疫血清的制备

免疫血清是免疫学实验必不可少的生物制剂，免疫血清的质量直接影响免疫学实验的准确性、特异性和敏感性。免疫血清的质量主要是指其特异性的强弱和效价的高低。将具有抗原性的物质免疫有免疫应答能力的动物，可刺激该动物产生针对免疫抗原（免疫原）的特异性抗体，含有特异性抗体的血清就是免疫血清。因此，优质免疫血清的产生，一方面取决于抗原的纯度及免疫原性，另一方面也取决于动物机体免疫应答的能力。因此要根据抗原的性质选择合适的动物、决定佐制的使用与否、制定合理的免疫方案。

§1　动物

具有良好免疫应答能力的动物是制备优质免疫血清的基础。免疫用的动物应选择成年、健康者，雄性较好，体重应合乎一定要求。实验室一般采用家兔、鸡、豚鼠等，当需要制备大量免疫血清时，可采用绵羊、马、驴、猪等动物。健壮雄性家兔（体重在2～3kg以上）是最常选用的动物。制备抗异种动物全血清的免疫血清和抗异种动物免疫球蛋白的免疫血清时，应选择亲缘关系较远的动物。因为动物蛋白质的免疫原性，一般与动物在系统分类上的亲疏程度成负相关，亲缘关系相距越远，生物种系差异越大，免疫原性越好。

免疫前应预试动物血清中有无与免疫抗原发生交叉反应

的“自然”抗体。这种“自然”抗体的产生，可能在自然条件下，动物摄取了某些抗原物质，或接触过某些微生物所致。因此，用于制备免疫血清的动物应尽可能饲养在很少接触常见的微生物的环境中；免疫过程中应特别注意营养和卫生管理。为防止动物个体差异或免疫中途死亡，一般一种抗原需免疫动物3只以上。

§2 抗原

要制备优质免疫血清(特异性强、效价高的免疫血清)，保证用于免疫动物的抗原（免疫原）的质量是先决条件。抗原的免疫原性除与其分子量的大小有关外，还与其表面抗原决定簇的性质、位置、立体构型有密切关系。一种优良的抗原其分子量一般应在10000道尔顿以上；有些分子量小的蛋白质如肌红蛋白、免疫球蛋白的轻链等，可以先将它们聚合成较大的分子或将它们吸附在一种与免疫无关的载体上再进行免疫；半抗原的分子量更小，如类固醇类激素、药物等，它们本身不具免疫原性，将它们与蛋白质载体结合后可获得免疫原性，通常用作载体的物质有丙种球蛋白(γ球蛋白)、卵白蛋白(OA)和牛血清白蛋白(BSA)等。一般蛋白质抗原、多肽抗原均具有良好的抗原决定簇，注入机体后易被相应的淋巴细胞克隆所识别而产生抗体。抗原可靠的纯度及足够的注射量也是获得优质免疫血清必须认真对待的两个问题。一种抗原成分可刺激机体产生一种抗体，不纯的抗原会阻碍我们所需要的主要抗体的产生，因此在免疫动物前，抗原应进行纯化。抗原的用量也应合适，抗原量过少不能有效地刺激机体产生抗体；抗原量过多会造成高剂量免疫耐受，抑制抗体

的产生。抗原用量应根据抗原性质、免疫动物的种类和所需要的抗体的特性而定。免疫原性强的抗原用量可小些，反之，抗原用量应加大。免疫动物体重大的抗原用量大，反之应小。抗原一次注射，抗体产生较慢且效价低，持续时间短，但特异性高；抗原再次注射，抗体效价上升较快，达到顶峰较高，抗体持续时间也较长。抗原多次注射，可获得高效价的免疫血清，但抗体特异性较低。

一般认为，采用多次小剂量、逐渐递增法注射较一次大剂量注射更为有效。

§3 佐剂

佐剂又称非特异性免疫增强剂，它们先于抗原或与抗原同时注射，可增强机体对该抗原的特异性免疫应答，这一效应是通过增强抗原的免疫原性及提高机体的免疫反应性而实现的。注射佐剂—抗原混合物比单独注射抗原所产生的抗体量高，且抗体持续时间长。佐剂种类很多，有微生物及其产物(如分枝杆菌、短小棒状杆菌、革兰氏阴性杆菌内毒素)、多聚核苷酸(如Poly I:C、Poly A:U)、无机物(明矾、氢氧化铝)、油佐剂(弗氏佐剂、矿物油、植物油)等，但实验室中最常用的佐剂是弗氏佐剂(Freund Adjuvant)。

弗氏佐剂分为弗氏不完全佐剂(Freund Incomplete Adjuvant, FIA)和弗氏完全佐剂(Freund Complete Adjuvant, FCA)。前者是将抗原水溶液与油剂(液体石蜡)、乳化剂(羊毛脂)按一定比例、用一定配制方法混合而成。后者是在前者的基础上，再加分枝杆菌(死的结核分枝杆菌或卡介苗)制成。

FIA一般用液体石蜡8.5份，羊毛脂1.5份。也有人报道，

液体石蜡与羊毛脂的比例为4:1、3:1或2:1的。配制时将液体石蜡与羊毛脂按上述比例混合（置盐水瓶中涡旋混匀或研钵中研匀），定量分装小瓶，高压灭菌，保存于4℃备用。FCA是在上述基础上加入卡介苗(BCG)，使其终浓度为10mg/ml。配制方法有两种。

（1）研磨法：将需要量的油脂混合液加温溶解，置乳钵中研磨均匀，再逐滴加入等量抗原液，边加边研磨；如欲使用FCA，还要滴加入卡介苗（使其终浓度为10mg/ml），边加边研磨，加完后再继续研磨，直至确认为乳白色粘稠油包水乳剂，方能使用。对于微量或难得的抗原，不宜采用本法，因为乳钵上往往粘附较多乳剂，抗原损失较大。

（2）注射器法：两个注射器长针头(12号或16号针头)，把一个针头的针钳去仅剩下接头处，把该接头处接到另一个针头上，制成有两个接头处的特殊针头（应确认新接头处不漏水），灭菌备用。将等体积的抗原液以及FIA或FCA分别吸入两支灭菌的5毫升（或2毫升）注射器内，将它们分别接在上述特殊针头的两个接头处，拧紧，左手和右手交替推动注射器，反复操作，来回抽吸，直至形成粘稠乳剂为止。

弗氏佐剂—抗原是否为油包水乳剂将直接影响免疫效果，因此制成的乳剂在免疫动物之前需检查其乳化效果。方法是，取一只洗净烧杯，装冷水于杯中，将佐剂抗原滴于冷水表面，如保持完整而不分散，即可应用。如滴入后油滴分散消失，表明此乳剂不合要求，尚需进一步乳化。

§4 免疫方法

根据抗原性质采用不同的免疫方法，通常可以分为两大

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.

类。

1．无佐剂抗原免疫法

颗粒性抗原，如动物红细胞，全菌抗原等，通常不用佐剂。Kwapinski证明用以下免疫方法，可获得效价满意的抗血清。将某种抗原（内含约10%固相成分），按以下顺序，每次间隔3～5天免疫动物。

皮下注射抗原0.3ml，肌肉注射抗原0.4ml，蹠垫注射抗原0.4ml，静脉注射抗原0.4ml，皮下注射抗原0.5ml。

于末次注射后7天采血，分离血清，用特异性抗原测定效价。

2．佐剂—抗原免疫法

可溶性抗原大都需与佐剂混合后免疫动物。常用的方法有：

（1）皮内免疫法：将抗原—弗氏完全佐剂混合液皮内注射（每次抗原的蛋白含量为3～5mg），以后每周皮内加强免疫一次，共免疫5次，末次免疫后10天试血。

背部多点皮内免疫法。用抗原—弗氏完全佐剂混合液，于家兔背部多点皮内注射。每点30～50μl，共40～70点，总量约2ml（抗原一次用量随性质而异，2～100μg不等）首免后，抗体在8～10周达高峰。如在6周时未测出抗体，可用抗原—弗氏不完全佐剂再免疫一次，抗原量减至原来的1/4或1/2。10～14天后试血。用完全抗原免疫时，抗体高峰可保持数周乃至数月；用半抗原—载体复合物免疫时，可保持数周。一般一次免疫即可达到预期要求。如需达到更高水平，可在抗体效价显著降低时，用同法再加强免疫一次，10～14天试血。

（2）皮下或肌肉免疫法：有蹠垫皮下免疫法及三点免疫法两种。蹠垫皮下免疫时，首次在兔双侧后足蹠垫皮下各注

射抗原—弗氏完全佐剂混合液0.5ml（每次抗原的蛋白含量为1～5mg）。此后每两周加强免疫一次，共两次。末次免疫后10天试血。

用三点免疫时，首次在兔头颈部皮下，背部皮下及两后肢肌肉各注射抗原—弗氏完全佐剂2ml（抗原的蛋白含量为10～20mg），两周后，每周用不含佐剂的抗原加强一次，每点1ml。如此重复三次，末次免疫后一周试血。

（3）淋巴结免疫法：主要采用腘淋巴结免疫，羊、马、驴等动物也可用颌下淋巴结免疫。为了使腘淋巴结肿大，可预先在两后足蹠垫注射活卡介苗各0.3ml（浓度为75mg/ml），腘淋巴结附近的皮下0.2ml，皮内0.1ml，两周后淋巴结可肿得如黄豆大或蚕豆大。用两指固定淋巴结后，注入抗原—佐剂混合液0.5ml。两周后再重复一次。末次免疫后7～10天试血。

（4）混合法：此法综合蹠垫皮下、淋巴结和静脉途径进行免疫，其特点是抗原用量节省，血清效价上升快。首次在兔两后足蹠垫皮下各注入0.5ml抗原—弗氏完全佐剂混合液。两周后，在两侧后肢肿大的腘淋巴结内各注入0.5ml抗原—弗氏完全佐剂混合液。第二周末试血，如效价不够高时，可用无佐剂抗原（浓度为5mg/ml）静脉注射，以加强免疫。一周内注射三次，分别为0.1、0.3、0.5ml，一周后试血。

§5 试血

一般于末次免疫后7～10天，耳静脉取少量血，分离出血清，试测免疫血清的效价，以便及时掌握采血时机。免疫血清效价测定的方法很多，颗粒性抗原常用凝集试验测定免

疫血清的效价，可溶性抗原常用双向免疫扩散试验测定免疫血清的效价，这两种方法简单而实用。环状沉淀反应、对流免疫电泳、中和试验、补体结合反应、间接血凝试验等方法也可用于免疫血清效价的测定，具体可根据免疫血清的种类及抗原的性质选用。以上各试验的方法将在后面有关章节中讨论。

§6 采血

经效价检验合格后即可采血，采血方法可根据需要选择一次放血或多次少量放血。

1．一次放血法

绵羊及其他大动物可用颈动脉放血；家兔、豚鼠可用心脏采血，家兔也可用颈动脉放血。方法是，将兔仰卧保定，头部放低，暴露颈部，剪毛、消毒，沿颈部中线用2%普鲁卡因局封，10～15分钟后，用手术刀小心切开颈中部皮肤，约10厘米，沿气管钝性分离皮下组织，直至暴露胸锁乳突肌。轻轻分开胸锁乳突肌，在肌束下面靠近气管两侧可见到搏动的颈动脉，将动脉游离，每侧动脉分别套入两根丝线，一根在远心端，一根在向心端。一侧动脉远心端先用丝线结扎紧，向心端用动脉夹夹住，用虹膜剪在两根丝线之间的动脉壁上剪一小口，插入塑料管，向心端丝线固定。轻轻放开动脉夹，使血放入平皿或收集瓶内。如该侧放血不够整想，可用同样方法在对侧颈动脉内插管放血。抬高兔后躯，可增加放血量。

2．多次少量放血法

绵羊及其他大动物可用静脉采血；家兔及豚鼠可用心脏

采血，缺点是技术不熟练会引起动物中途死亡。家兔的耳缘静脉滴血及耳中央动脉分枝切开放血都是行之有效的方法，兔保定确实后，耳剪毛消毒，并擦耳朵使血管充血，用无菌手术刀片切开耳缘静脉或耳中央动脉分枝放血，取血后用灭菌干纱布压迫止血。如流血不止，可用止血钳夹住止血。

§7 血清的分离与保存

待收集在平皿或三角烧瓶的血液凝固后，用接种针沿平皿或三角烧瓶边缘将血块与玻璃脱离，置37℃温箱中半小时，再置4℃冰箱中3～4小时，待血块收缩后，用毛细吸管将血清吸入试管中，以3000rpm离心15分钟，分离出血清，免疫血清的分离应在无菌条件下进行，并应尽量防止溶血。

免疫血清的保存十分重要，保存不当可使免疫血清的效价下降甚至失效。常用的方法有：

1．冰冻干燥保存

将免疫血清分装于安瓿中，急速低温冰冻，继而在低温真空冰冻干燥器内干燥，封口。冻干后的免疫血清干粉，可在4℃冰箱中保存2～3年。

2．冰冻保存

免疫血清分装小瓶后，用干冰急速冷冻，置－20℃处持续冰冻，可长期保存。切忌反复冻融，因反复冻融会使免疫血清的效价降低甚至失效。

3．加防腐剂保存

免疫血清接比例加入1%硫柳汞或5%叠氮钠，使其终浓度分别为0.01%或0.05%，分装后可置普通冰箱保存，在1～2年内使用。但，荧光抗体及准备制备荧光抗体的免疫血

清不能用叠氮钠防腐（叠氮钠对荧光素有猝灭作用）。

§8 免疫血清制备实例

1．兔抗鸡红细胞血清的制备

抗凝鸡血用生理盐水洗涤三次，最后以生理盐水配成20%鸡红细胞悬液。

选择健康、体重2～3kg的雄性家兔3只，耳静脉采血少许分离血清，与1%鸡红细胞作平板凝集试验，测定有无天然凝集素，如无或仅有微量时，该动物可用来免疫。

最常用的免疫途径是耳静脉注射。第一天注射20%鸡红细胞0.5ml，第三天注射1.0ml，第五天注射1.5ml，第七天注射2.0ml。

末次免疫后一周，耳静脉采血少许，分离血清，在56℃下，30分钟灭活补体，用试管凝集反应测定免疫血清效价，如效价符合要求（一般效价可达1:1028），即可放血。

[附]阿氏(Alsever's)液

葡萄糖2.05g、柠檬酸钠0.80g、氯化钠0.42g、蒸馏水加至100ml。用10%柠檬酸校正pH至6.1，过滤，分装，以113℃高压灭菌20分钟，4℃保存。此液主要用于红细胞的保存。使用时，与等量新鲜血液混合。

2．兔抗鸡γ球蛋白血清的制备

用盐析法从鸡血清中提取γ球蛋白，用生理盐水稀释至5mg/ml。首次于兔两后足蹠垫皮下各注入0.5ml鸡γ球蛋白—FCA混合液。两周后，于两侧后肢肿大的腘淋巴结内各注入0.5ml鸡γ球蛋白-FCA混合液。第二周末试血，如效价不够高时，可用上述浓度鸡γ球蛋白（不加佐剂）静脉注射，隔

天注射，共注射三次，分别为0.1、0.3及0.5ml。一周后采血，用双向免疫扩散试验测定免疫血清的效价（一般效价可达1:64）。

3．羊抗兔全血清的制备（大剂量抗原注射法）

用生理盐水将兔全血清稀释至60～70mg/ml，取5ml兔全血清与等量弗氏完全佐剂混合，将10ml兔全血清—FCA注射于绵羊两侧后腿肌肉，每侧5ml。两周后，按上法重复免疫一次。末次免疫后两周，采血，测定效价（一般效价可达1:4000）。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.