现代组织化学的原理及应用

翟为溶　张锦生　主编

-33

上海科学技术文献出版社

内 容 提 要

本书简明扼要地叙述了现代组织化学(酶、免疫、杂交组织化学)的原理,结合编写者多年的实践,详细地介绍了目前常用的和最新的方法,并重点地述及现代组织化学在肿瘤诊断、病原生物体检测、细胞外基质研究以及免疫性损伤和细胞凋亡等领域中的应用,书后还附有常用技术实验指导和有实用价值的附录。本书适合于研究生、临床病理工作者以及其他有关科研工作者使用。

现代组织化学的原理及应用
主 编 翟为溶 张锦生
*
上海科学技术文献出版社出版发行
(上海市武康路2号 邮政编码200031)
全国新华书店经销
上海教育学院印刷厂印刷
开本 850×1168 1/32 印张 6.75 字数 187000
1998年6月第1版 1998年6月第1次印刷
印数:1-1200
ISBN 7-5439-1219-8/R·334
定 价:20.00元
《科技新书目》458-611

前　言

常规组织化学技术是以化学反应为主的染色方法区分胞质、胞核和细胞外基质，从而清晰地显示正常或病理状态下的组织和细胞形态，并藉此作出诊断。随着生物科学研究技术的发展，在组织、细胞标本的制作上引入了某些新技术，主要有生物化学的酶-底物反应、免疫化学的抗原-抗体反应以及分子生物学的 DNA 或 RNA 基因片段杂交反应。它们与组织形态学技术相结合分别形成酶组织化学、免疫组织化学和杂交组织化学，统称为现代组织化学。通过光学或电子显微镜的观察，人们能够在组织、细胞以及核酸水平对细胞的蛋白合成、免疫反应作出定性、定位和定量的判断，使细胞的形态与功能有机地结合起来，因而现代组织化学技术已成为生物学、组织解剖学、病理学等研究中不可缺少的手段。

为了让研究人员在短时间内能掌握常用的形态学研究新技术，我们从 1986 年起开设了免疫组化技术课程，1994 年又发展成现代组织化学课程，自编了相应教材。该教材虽然比较粗糙，但因其内容新颖、实用，受到研究生和其他实验室工作人员的广泛欢迎。在此基础上，我们结合近几年的新发展，将原有教材进行了改编、扩充，正式出版，奉献给读者，希望她在教学、科研以及临床病理检验中起到有益的辅助作用。

本书作为医学研究生教材，编写中特别注意了三条原则：(1)在顾及内容系统性、完整性的同时，更突出其先进性，尽可能包括近年来发展的、行之有效的新技术，如免疫组化、杂交组化技术的新进展，形态定量技术，细胞凋亡的检测等等；(2)对各种技术的介绍，既有精辟的原理讲解，又有最常用的实验操作步骤，使读者不仅能照着做，还能根据其原理作某些调整或创新；(3)在应用方面注意到专业覆盖面，使各个专业的读者都能从中找到对应点，从而

引起学习兴趣，并应用于自己的工作中。由于本书涉及的原理和方法有一定普遍性，故适用范围并不局限于医学，同样也适用于生物学乃至其他生命学科；读者也不仅限于研究生，实验室各级工作人员也能从本书获益。

本书的顺利出版首先要感谢上海医科大学研究生院领导的大力支持。参加编写的人员除上海医科大学病理教研室的教师外，还特邀肿瘤医院病理科施达仁教授共同撰写。这了保证编写质量，各章节除执笔者外，还有专人审校。各位专家教授都为之付出了辛勤的劳动。左理华、刘琛等同志协助完成电脑输入。我们要特别感谢承接本书出版事务的上海科学技术文献出版社。最后，我们还将感谢读者们的关注和厚爱，并热诚欢迎对本书的不足之处提出批评指正。

编　者

目　　录

第一章　现代组织化学的原理及方法 …………………………… 1
第一节　酶组织化学 ………………………………………… 1
一、酶组织化学的原理及一般原则 ……………………… 1
二、酶组织化学对组织处理的要求 ……………………… 2
三、酶显示方法 ……………………………………………… 2
四、酶组织化学的应用价值 ……………………………… 4
第二节　免疫组织化学 ……………………………………… 6
一、免疫组织化学中的免疫化学 ………………………… 7
二、组织和细胞标本制备 ………………………………… 19
三、常用染色方法和原理 ………………………………… 26
四、非特异着色及对照设置 ……………………………… 34
五、双重或多重免疫组化 ………………………………… 39
六、免疫电子显微镜技术 ………………………………… 42
七、常用免疫组化试剂的类型及其选用 ………………… 50
第三节　杂交组织化学 ……………………………………… 59
一、杂交组织化学的原理 ………………………………… 59
二、探针的制备和标记 …………………………………… 60
三、组织和细胞标本的准备 ……………………………… 70
四、原位杂交技术 ………………………………………… 72
五、杂交组化技术的发展 ………………………………… 76
第四节　现代组织化学定量技术 …………………………… 79
一、图像分析系统的组成 ………………………………… 80
二、图像处理及分析的基本方法 ………………………… 83
三、图像分析系统的定量测定方法 ……………………… 87
四、图像细胞光度技术 …………………………………… 89

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

第二章　现代组织化学的应用 …………………………… 99
第一节　肿瘤诊断与鉴别诊断 ……………………………… 99
一、上皮性肿瘤………………………………………… 100
二、淋巴瘤……………………………………………… 102
三、软组织肿瘤………………………………………… 109
四、神经内分泌肿瘤…………………………………… 112
五、肿瘤中雌、孕、雄激素受体……………………… 115
六、肿瘤中癌基因和抗癌基因………………………… 118
七、肿瘤细胞增殖活性………………………………… 122
第二节　免疫性损伤及变态反应性疾病………………… 123
一、免疫性损伤………………………………………… 123
二、变态反应性疾病…………………………………… 126
第三节　细胞外基质的研究……………………………… 129
一、细胞外基质的成分及其代谢……………………… 129
二、ECM 的原位显示 ………………………………… 135
三、ECM 原位研究举例 ……………………………… 139
第四节　病原生物体的检测……………………………… 142
一、病毒核酸及表达产物的定位……………………… 142
二、细菌………………………………………………… 157
三、寄生虫和霉菌……………………………………… 158
第五节　细胞凋亡及其检测……………………………… 160
一、细胞凋亡的表现及基因调控……………………… 160
二、细胞凋亡的检测方法……………………………… 163
三、细胞凋亡的医学意义……………………………… 165
第三章　常用技术实验指导…………………………… 173
第一节　酶组织化学实验………………………………… 173
第二节　免疫组织化学实验……………………………… 174
第三节　杂交组织化学实验……………………………… 179
第四节　形态定量实验(示教)…………………………… 187
附　录…………………………………………………… 189

附录 1　标本的采集和处理 …………………………………… 189
附录 2　石蜡切片制作流程 …………………………………… 190
附录 3　冰冻切片制作流程 …………………………………… 191
附录 4　H. E. 染色及常用的衬染方法 ………………………… 192
附录 5　常用特殊染色方法简介 ……………………………… 193
附录 6　常用固定液的配制 …………………………………… 199
附录 7　常用缓冲液的配制 …………………………………… 201
附录 8　常用酶消化液的配制 ………………………………… 206
附录 9　免疫组化染色常用显色液的配制 …………………… 206
附录 10　常用组织切片粘附剂及使用方法 ………………… 207
附录 11　水溶性封固剂——缓冲甘油明胶液的配制 …… 208

第一章　现代组织化学的原理及方法

第一节　酶组织化学

酶组织化学是通过细胞内的酶催化底物的作用并借助显色反应在切片或涂片上来显示组织或细胞中内源性酶的活性及定位的方法。自 Klebs 1868 年首次采用这一方法显示组织中的过氧化物酶以来，已有近 130 年的历史。但直至本世纪，酶组织化学才得到长足发展并成为组织化学中一门独立的分支。目前用这一技术显示的酶已逾 100 种。70 年代以后，随着免疫组织化学技术的不断开拓，酶组织化学的发展趋缓。免疫组织化学与酶组织化学相比虽然有许多优点，但在某些方面前者并不能完全代替后者，故酶组织化学仍有应用价值。

一、酶组织化学的原理及一般原则

酶组织化学的基本原理就是细胞内的酶催化分解合适的底物，使之生成中间产物，即初反应产物(primary reaction product，PRP)，然后其中之一再与辅助物经一或两步反应生成有色不溶的终反应产物(final reaction product，FRP)，沉积在原位以显示酶的存在。在此过程中可能会出现 PRP 的弥散而造成定位不准确。弥散受 3 个因素左右：一是底物在酶催化下水解的速度；二是 PRP 在缓冲液中的弥散系数；三是 PRP 与辅助物反应的速度。选择合适的底物和辅助物可以使水解反应和 PRP 与辅助物的反应迅速进行以减少弥散。有时辅助物的浓度过高不但会抑制酶的活性，而且还会影响 FRP 的形成，一般以不超过 1mg/ml 为宜。

酶组织化学的一般原则是：

1. 对标本的处理和制片过程不能影响酶的活性及分布。

2. 所选择的底物和辅助物必须能迅速和同步地渗透到组织

和细胞中去。

3. 所选择的底物最好只能被一种酶催化分解。

4. 所选择的辅助物不能影响酶的活性和其他反应剂穿透进入细胞。

5. PRP 必须能迅速与辅助物进行反应，且 FRP 是水不溶性的有色而稳定的物质。

6. 所有参加反应的试剂都不能与组织细胞内除了所检测的酶以外的任何成分自行吸附或结合。

二、酶组织化学对组织处理的要求

组织经一般固定剂固定、常规石蜡包埋的方法处理后，酶的活性几乎都会丧失，仅极少数情况例外(如氯乙酸酯酶)，除非针对具体的酶使用特殊的固定剂和特殊的包埋方法，才可以部分保持酶的活性，如用丙酮固定、低温酒精脱水、低温石蜡包埋，可部分保持大鼠肝脏内的 γ-谷氨酰转肽酶的活性。所以，酶组织化学一般都使用冰冻切片。新鲜组织应立刻用液氮速冻，为了使组织结构保持得更好，也可使用经液氮冷却的异戊烷。速冻时最好使组织包埋于 OCT 以便容易切片。速冻的组织在－20℃时酶的活性仍易丢失，故只能短期保存，如要长期保存组织块，应置于－70℃。在冷冻保存时，还要防止水份蒸发使组织变干。冰冻切片在染色前可以预固定也可以不固定。为了使组织形态结构保持良好，常用低浓度(1%～4%)的多聚甲醛、福尔马林或戊二醛进行预固定，其中福尔马林能较好地保持酶的活性。

细胞涂片和培养细胞在制备后应迅速使其干燥，以保持酶的活性。在干燥的情况下，室温下可保存数周。相反，放在 4℃冰箱或无包装放在－20℃常使酶失活。如想保存较长时间，则应密封放在－20～－70℃。

三、酶显示方法

酶组织化学中酶的显示方法众多，归纳起来，有以下几类：

1. 同步显示法：细胞中的酶催化底物水解生成的 PRP 立即与辅助物如偶氮盐或金属离子等反应成为有色不溶的 FRP，沉积

在原位以显示酶的存在。

2. 二步显示法：也称孵育后偶联法。此法中酶促底物的水解反应和 PRP 与辅助物的显色反应是前后分开进行的。其优点是可以充分满足这两种反应的最适 pH 值，尤其当它们各自要求的 pH 值相差较大时。另外，有时酶促底物的水解反应要求较长的孵育时间，而有些辅助物在这段时间中已开始分解，用二步显示法可避免此不足。此法的局限性是要求 PRP 停留原位不发生弥散。

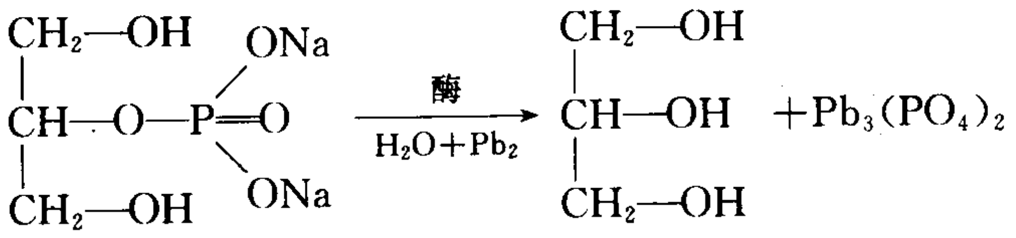
3. 底物自身显示法：酶促底物水解反应后，有色底物的溶解基团被去除而生成不溶的有色物质，或者底物分子内部重组生成有色的不溶物质沉积原位以显示酶的存在。

现就常用的几种方法简述之。

(一) 金属离子沉淀反应

酸性磷酸酶的 Gomori 氏反应是典型的例子，其原理如下：

1. 酶促反应



2-甘油磷酸钠盐　　　　　　甘油　　　　　磷酸铅(PRP)

2. 显色反应

$Pb_3(PO_4)_2+3\ S^{2-} \longrightarrow 3\ PbS$ (棕黑色沉淀) (FRP)

用此法显示的酶还有 ATP 酶和 5′-核苷酸酶等。

(二) 偶氮盐偶联反应

在这类反应中，PRP 与偶氮盐结合，生成不溶的偶氮染料。现以碱性磷酸酶为例说明之。

α-萘基磷酸钠 $\xrightarrow{\text{酶+水}}$ 磷酸氢二钠＋α-萘酚

α-萘酚＋FAST BLUE ⟶ 偶氮染料↓

用此法显示的酶还有酯酶、转肽酶、肽酶等。

(三) 靛蓝反应

在这类反应中，底物被酶分解为 2 个 PRP，其中之一可在一

定的条件下形成不溶的靛蓝。以酯酶反应为例：

$$\text{吲哚酚酯}\xrightarrow{\text{酶}+\text{水}}\text{吲哚酚}+\text{RCOOH}$$

$$\text{2-吲哚酚}\xrightarrow{\text{氧化作用}}\text{靛蓝}\downarrow$$

靛蓝反应还可用来显示胆碱酯酶、磷酸酶、糖苷酶和非特异性酯酶等。

(四) 四唑反应

底物被某些氧化酶或脱氢酶氧化脱氢后，产生的氢离子传递给四唑盐，四唑盐在这里作为一种受氢体，还原后形成有色的沉淀物。常用的四唑盐有两种，一种是双四唑盐，如氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium，即 NBT)，还原后产生的深色沉淀不溶于脂肪；另一种是单四唑盐，如 MTT[3(4,5-dimethyl thiazolyl-2YL)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]还原后生成有色的细颗粒，能溶解于脂肪。

单胺氧化酶和几乎所有的脱氢酶都可以用此法显示。

四、酶组织化学的应用价值

酶组织化学用来确定组织细胞有无某种酶的活性，故至少在以下 5 个方面有其应用价值。

(一) 组织细胞的代谢活动

酶组织化学既可以用来在原位观察生理情况下组织中不同部位的细胞代谢的差异，还可以用以研究病理状态下细胞代谢活动的改变。如心肌梗塞发生后 4～6h 内，H. E. 切片上是不会发现明显变化的，而用酶组织化学可显示心肌在梗塞早期(2h 左右)即出现能量代谢变化，梗死心肌细胞内的琥珀酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、细胞色素氧化酶和磷酸化酶的活性均明显下降。又如 Reye's 病时，酶组织化学可显示肝细胞缺乏琥珀酸脱氢酶。这些酶活性变化的检测有助于病理诊断。

(二) 细胞类型的判定

在细胞培养和临床细胞学检查时，有些细胞可以通过酶组织化学而确定其类型。如在血液细胞范围内，非特异性酯酶被认为是

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

单核细胞和巨噬细胞的特异性标志，据此可与其他血细胞区别。但这种特异性是有一定范围的，因为上皮细胞和脂肪细胞此酶的活性也很高。另外，氯乙酸酯酶可以作为中性粒细胞的特异性标志。由于很多酶都有广泛的细胞分布，因此单依靠酶组织化学有时很难对细胞进行分类。目前，细胞类型的判定大部分已被免疫组化所替代。

（三）细胞定位

在组织中有些特殊细胞的定位可以依靠酶组织化学，如在小肠中用乙酰胆碱酯酶（ACE）进行神经节细胞和神经纤维的定位；在皮肤中用 ATP 酶进行郎罕细胞的定位；在各种组织中用非特异性酯酶进行巨噬细胞的定位等。

（四）癌变过程的研究

应用酶组织化学研究癌变过程主要在肝脏中进行。用化学致癌剂诱发大鼠肝癌的最早期，肝脏的 H. E. 切片未显示明显变化，但用组织化学和酶组织化学能观察到肝内一些肝细胞灶已发生糖代谢紊乱。具体讲，用过碘酸雪夫反应显示这些肝细胞有糖原沉积的增加，铅盐法酶组织化学可发现糖原过度沉积的肝细胞葡萄糖-6-磷酸酶（G-6-P）的活性明显下降，同时糖原磷酸化酶的活性也下降，但用四唑盐法却可见 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性增高，这些酶活性的改变与肝细胞糖原的过度沉积有关。随着诱癌过程的进展，沉积的糖原可逐步减少，出现嗜碱性肝细胞灶，此时，γ-谷氨酰转肽酶活性（GGT）可显示阳性。同样的现象在长期服用避孕药的妇女的肝脏中也可出现。也有报道在人肝再生结节性增生灶中有与动物肝相似的糖原过度沉积及其有关酶活性的改变。但是，这种糖代谢的改变究竟与肝细胞的癌变有何关系尚有待进一步深入研究。作者曾用酶组织化学对大鼠肝癌癌变过程的 GGT 活性进行过研究。在非致癌剂 D-半乳糖胺与致癌剂 3′-Me-DAB 所致肝组织损害的材料中，肝细胞 GGT 酶组织化学的反应不同，前者为阴性而后者为阳性。酶组织化学结合 ^{3}H-dT 放射自显影的结果显示，GGT 阳性肝细胞结节中肝细胞的增殖远较 GGT 阴性结节中的

活跃，而这种增生迅速的肝细胞被认为是一种癌前的病变，因此GGT 可作为肝癌癌前病变的标记。用 GGT 的酶组织化学结合甲胎蛋白(AFP)免疫组织化学的双染色，观察了 3′-Me-DAB 诱发大鼠肝癌的癌变过程，发现由卵圆细胞演变而来的过渡细胞和小肝细胞及其增生结节 AFP 和 GGT 均可显示阳性，另外去分化肝细胞及嗜酸性增生结节中的肝细胞当出现异形时，AFP 和 GGT 也阳性，从而提出肝癌的发生可归纳为两大来源，其一来自肝内干细胞或卵圆细胞的增生，由卵圆细胞演变而成的，一般为小细胞性嗜碱性增生结节，癌变后形成的肝细胞癌分化程度也较低；另一种来源可能通过原有肝细胞受致癌剂的引发或始动作用而成的所谓的抵抗细胞，增生后主要形成嗜酸性肝细胞增生结节，形成的肝细胞癌分化程度相对较高。这些结果对研究人肝癌的组织发生和分型可能有着重要的参考价值。如上所述，GGT 和 G-6-P 可分别作为肝癌癌前病灶的阳性和阴性标志来显示肝癌癌前病灶，故借助定量立体化学的方法还可对其进行定量分析。

（五）免疫组化和杂交组化的显示手段

酶组织化学又是免疫组织化学和杂交组织化学常用的一种显示方法。无论是免疫酶组化还是标有生物素或 digoxigenin 探针的杂交组化，其最后一步常要依靠标记酶催化底物形成不溶的有色物质沉淀于原位以显示被检物质的存在。常用的标记酶是辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

（张锦生）

第二节　免疫组织化学

免疫组织（细胞）化学（immunohistochemistry 或 immunocytochemistry）是将抗原、抗体间的免疫反应引入组织（细胞）标本，并通过对其所带有的特殊标记物的显示，藉以对组织（细胞）内某抗原或抗体作定性、定位以及定量检测。目前由于大量特异性抗体和标记抗体的面市以及检测方法日益稳定、简捷，免疫组化已广泛应用于实验研究和临床病理检验。本节除简要述及免疫组化中的

免疫化学知识外，重点介绍免疫组化的原理、常用方法，以及有关的实验问题。

一、免疫组织化学中的免疫化学

免疫组织化学中常用的免疫化学方法有抗原的提取和纯化、抗体的制备及免疫球蛋白的提取、抗体的标记。近年来，免疫化学方法已进入分子生物学阶段，对极微量而难以提取的抗原，可根据cDNA 的顺序来合成多肽而获得，而单克隆抗体则已用基因工程的方法来大量制备。尽管如此，一般实验室仍使用常规方法，分述于后。

（一）抗原的提取和纯化

提纯抗原的目的是制备特异性高的抗体，抗原越纯制备的多克隆抗体特异性越高。从理论上讲，单克隆抗体对抗原的纯度要求不高，但实际上不纯的抗原会给克隆筛选带来困难，还会影响融合的成功率，故仍然需要纯化抗原。

1. 抗原的概念

凡能在机体内引起体液免疫和（或）细胞免疫反应的物质，称为抗原。抗原具有两方面的特性，抗原能引起机体产生抗体和（或）致敏淋巴细胞，称之为免疫原性；抗原还能与相应的抗体及致敏淋巴细胞发生特异的结合或反应，称为免疫反应性。有免疫反应性而缺乏免疫原性的抗原称为半抗原。半抗原与载体（通常是大分子物质）结合，可变为全抗原。载体不仅增加半抗原的大小，可在体内激发免疫反应，而且还直接与免疫记忆有关。

2. 抗原的分类

抗原有可溶和不溶性两类，后者主要包括一些颗粒性抗原，如细胞、细胞器、某些病原体等。根据性质，抗原又可分为：①结构抗原，为组成细胞结构的成分，如细胞骨架蛋白；②分泌抗原，为细胞所产生和分泌的酶、激素、粘液蛋白等；③沉积抗原，如肾小球肾炎时沉积在肾小球基膜的免疫球蛋白、补体和免疫复合物等；④入侵抗原，主要指病原微生物。

3. 抗原提纯的一般原则

免疫组化方法检测的抗原中，蛋白质占了大多数，故此处叙述的一般原则以蛋白抗原为主要对象。

（1）抗原检测方法的选择及建立　为确保抗原提取纯化的成功，在正式开始前，应建立合适的定性或定量的方法，以跟踪监测一系列提纯过程中抗原是否存在，其含量和活性如何。这些方法大致可分为特异和非特异两种。特异的方法是利用抗原的特异性反应，包括抗原(酶)与底物、抗原与受体、抗原与已知抗体之间的反应以及抗原的生物效应来判定抗原的存在和活性。此方法可靠，但必须具备一定的条件，如少量的标准抗体、特异的酶活性测定方法、受体测定方法和生物效应测定方法等。非特异的方法是利用抗原已知的理化性质，如溶解度、沉降系数、凝胶层析行为、电泳行为、等电点(pI)等来估计抗原的存在、活性和含量。如用制备电泳纯化大鼠甲胎蛋白(AFP)，当聚丙烯酰胺凝胶浓度 T＝12%时，已知电泳最快的 3 条带分别是白蛋白、AFPa、AFPb，因此根据 AFP 的电泳行为可定出 AFP 的存在；又如在纯化波形蛋白和结蛋白时，也是用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)来进行监测的。此法虽然可靠性差些，但它不需要特殊的条件，只要预先知道所提抗原的一些理化性质，就能作出判断。

（2）组织材料来源的选择　分离纯化的过程就是将不要的成分不断去除、欲提纯成分不断浓缩的过程。因此一种组织中欲提抗原含量越高，提纯也就越容易。胎儿血清或 AFP 阳性的肝癌病人腹水中 AFP 的含量高，故人的 AFP 常从这两种体液中提取，大鼠孕 14 天以后，羊水中 AFP 逐步升高，故大鼠 AFP 常从孕 18 天左右的大鼠羊水中提取，波形蛋白(Vimentin)从猪或牛的晶状体提取，人肌红蛋白从人骨骼肌提取，而大分子细胞角蛋白则从角化上皮中提取。除此之外，还应考虑材料来源是否经济、方便，能否大量收集。

（3）保持抗原分子的稳定性　提取纯化蛋白抗原的步骤很多，往往费时较长，因此在每一道纯化步骤中都应考虑到蛋白抗原分子的稳定性。缓冲液的 pH 值对蛋白质的稳定起重要作用，应十分小

心。大多数蛋白质含有相当数量的巯基，如果巯基被氧化，形成分子间或分子内二硫键，有时会导致蛋白质活性丧失，2-巯基乙醇、半胱氨酸、还原性谷胱甘肽等化合物均能防止这种氧化作用。另外，铅、铁、铜等重金属离子常与巯基反应，为保护蛋白质中的巯基，必须在缓冲液中加入浓度为 10^{-4}～3×10^{-4}M 的 EDTA 以螯合掉大部以至全部有害的金属离子。有些蛋白质在疏水的环境较稳定，为此可用蔗糖、甘油以至二甲基亚砜(DMSO)等。有些蛋白质则需要极性介质以保持其活性，这时可用 KCl、NaCl、NH_4Cl 或$(NH_4)_2SO_4$ 以提高溶液的离子强度。在蛋白质抗原提取过程中最令人头痛的是蛋白酶的水解作用。蛋白酶有内肽酶和外肽酶之分，防范蛋白水解的措施有两方面，一方面可将抗原设法与蛋白水解酶分隔开，如可先提出溶酶体或用亲和层析法去掉水解酶；另一方面可使用蛋白水解酶的抑制剂，可逆的抑制剂如 Pepstatin 可抑制门冬氨酸蛋白酶，不可逆的抑制剂如 DIPF(二异丙基氟磷酸)、PMSF(苯甲基磺酰氟)是丝氨酸蛋白酶抑制剂。除了对冷敏感的蛋白，如纤连蛋白(FN)，一般蛋白质的提取过程均应在 0～4℃间进行。

4. 抗原分离纯化的一般步骤

(1) 增溶溶解　由于全部分离步骤通常在水溶液中进行，因此增溶溶解对于任何要纯化的蛋白质抗原都是必要的一步。所谓增溶溶解就是采用各种方法使蛋白抗原从细胞内或细胞器内释放出来，溶解于缓冲液中，并保存其完整性和活性。如果欲提取的蛋白抗原(如细胞骨架蛋白)不溶于一般的盐溶液，那么，增溶溶解可以洗去大量不需要的可溶蛋白，以利最后的分离纯化。如果欲提取的蛋白抗原位于细胞器内(如线粒体、溶酶体、微粒体等)，则应采取温和的方法来破碎细胞，保持细胞器的完整，分离细胞器后，再提纯蛋白抗原。在破碎细胞时，为促进蛋白质的溶解，常加一定浓度的离子性去垢剂，如十二烷基硫酸钠(SDS)或非离子性去垢剂(Triton-X-100 等)。SDS 因极性较大，有时会影响抗原的活性，故 Triton-X-100 更为常用。增溶溶解的常用方法有：①渗透溶胞：为破碎细胞最温和的方法之一，将细胞放在低渗溶液中，另一温和的

破裂力（如把细胞反复吸入和挤出吸管），即可达到目的，此法常用于培养细胞的破碎；②研磨：使用不同的工具和不同的操作方法，其破碎程度不一，有的比较温和，有的比较剧烈（最温和的是用手操作研钵，其次常用手操作玻璃组织匀浆器进行研磨，电动组织匀浆器效力较大），为使研磨更有效，可添加研磨剂（如氧化铝粉末，直径 45～50μm 的玻璃珠），研磨剂有可能吸附一定的蛋白质，用时须小心；③绞切器：用绞切器是比较剧烈的方法，绞切器容量有大有小，以适合处理大小不同的样品，上海标本模型厂出品的 DS-1 高速组织捣碎器，螺旋桨形刀的转速为 10000～12000r/min，连续工作 30～45s 以上，温度将升高 10℃左右，故必须在冰浴下进行；④超声波：用超声振荡器破碎细胞也是一种很有效的手段，缺点是会产热，因此也需要冰浴，并且尽量缩短操作时间；⑤挤压：在高压下迫使细胞悬液通过微孔以破碎细胞，此法虽然既温和又彻底，但需要复杂的设备，而且容纳的样品量有限；⑥从细胞器组分中提取蛋白抗原：如果蛋白与细胞器的结合比较疏松，只需将细胞器悬浮于高离子强度的溶液（0.5～5M 的氯化钾或氯化铵）中就可达到目的，对于结合牢固者，应用低浓度、温和的去垢剂加上温和的超声波处理才能达到目的。

（2）分离纯化　提纯的方法应先粗后细，先简后繁，即在开始应使用简便的方法，而把耗时长、分辨率高的方法放在后面使用。但也不是一成不变的，在正式提取前，应先作小样本的预实验，摸索最佳方案。

（3）抗原纯度的鉴定　提取获得的抗原应测定其纯度，而纯度水平取决于所用方法的分辨率和灵敏度，低分辨率、低灵敏度的方法测定认为是纯的抗原，改用高分辨率的方法测定时就可能是不纯的。PAGE 分析只有单条带或固有的条带时，即可认为是纯的，而用等电点聚焦电泳来测定比 PAGE 更可靠，另外免疫电泳也常用来测定抗原的纯度。

5. 常用的分离纯化方法

（1）差别溶解法　其中最常用的是盐析法，又以中性盐硫酸

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com