

动物免疫学 实验技术

刘玉斌 苟仕金 主编



吉林科学技术出版社

动物免疫学实验技术

刘玉斌 苟仕金 主编

审校 杨 本 升
主编 刘 玉 斌 苟 仕 金
编者 王 兴 龙 刘 玉 斌 宋 耀 彬
沈 广 苟 仕 金 陈 宗 泽
梁 焕 春 韩 文 瑜 曹 占 国
黎 诚 耀

(以上按姓氏笔划为序)

动物免疫学实验技术

刘玉斌 苟仕金 主编

责任编辑: 司 荣 科

封面设计: 杨 玉 中

出版 吉林科学技术出版社 787×1092毫米16开本 23.5印张
发行 插页4 522,000字

1989年10月第1版 1989年10月第1次印刷

印数: 1—3000册 定价: 7.70元

印刷 鲁大印刷厂 ISBN 7-5384-0444-9/S·95

前 言

动物免疫学和医用免疫学一样，是一门欣欣向荣、发展迅速的学科。将动物免疫学实验技术汇编成册，使其更系统更全面地为科研、教学、生产、医疗服务，是我们多年来的愿望。如今，在各方面的大力支持下，经过编者的共同努力，这个愿望终于实现了。

本书除收集了传统的免疫学技术，如佐剂制备、免疫血清制备、各种血清学反应等外，重点写了近十几年来发展起来的新技术，如电泳技术、标记技术、免疫电泳技术、免疫球蛋白技术、细胞免疫技术、基因工程、单克隆抗体、SPA技术、免疫印迹法、高效液相色谱技术、双特异抗体酶免疫技术、生物导弹技术、相分离测定技术等，还编写了实用性强的免疫生物制剂制备技术，如免疫核糖核酸、胸腺肽、干扰素、白细胞介素及肿瘤坏死因子等的制备。在编写过程中，参阅了大量的国内外文献，力争达到系统、具体、简练、先进、实用的要求。书中不少内容是编者的研究成果或多年来应用的方法，绝大部分实验技术，读者看书即可以操作，便于应用和推广。

本书是微生物学及免疫学工作者的工具书，也可以作为兽医、畜牧、医学、医药、生物制品及食品检验等专业和临床检验工作者及大专院校有关专业师生的重要参考书。

在编写过程中，得到了许多专家、教授的支持，有不少同志提供了资料。杨本升教授对本书的编写工作进行了全面指导，并对全书进行审校，在此表示诚挚的谢意。

免疫学发展十分迅速，理论和技术方面的研究成果大量涌现，尽管我们在编写过程中，尽量搜集了最新成果和资料，但是由于文献浩瀚，加之水平有限，遗漏和错误在所难免，诚恳希望同志们批评指正。

主 编

1989年1月6日

目 录

第一章 免疫球蛋白技术 1	术.....40
第一节 免疫血清的制备..... 1	第二节 双向电泳技术.....44
一、动物的选择..... 1	第三节 免疫印迹法.....49
二、免疫原..... 1	第四节 高效液相色谱技术.....54
三、佐剂的应用..... 2	第三章 血清学反应57
四、免疫的次数和方法..... 3	第一节 沉淀反应.....57
五、几种常用免疫血清的制备	一、环状沉淀反应.....57
法..... 4	二、絮状沉淀反应.....58
六、免疫血清的效价测定..... 7	三、琼脂扩散沉淀反应.....58
七、免疫血清的浓缩..... 8	第二节 直接凝集反应.....59
八、免疫血清的保存..... 9	一、试管凝集反应.....60
第二节 免疫球蛋白的分离和提	二、玻板凝集反应.....61
纯..... 9	三、玻片凝集反应.....61
一、IgG 的分离和提纯..... 9	四、微量凝集反应.....62
二、IgM 的分离和提纯.....19	第三节 微载体技术.....62
三、IgA 的分离和提纯.....20	一、间接红细胞凝集反应.....63
四、IgE 的分离和提纯.....23	二、反向间接乳胶凝集反应
第三节 免疫球蛋白的纯度鉴	67
定.....25	三、反向间接炭凝集反应.....69
一、琼脂免疫双向扩散.....25	第四节 抗球蛋白凝集反应
二、琼脂免疫电泳.....27	70
三、琼脂单纯(区带)电泳.....28	第五节 补体的测定.....72
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳(圆	第六节 补体结合反应.....77
盘电泳).....29	一、直接补体结合反应.....77
五、对流免疫电泳.....31	二、固相补体结合试验.....87
第四节 免疫球蛋白的含量测	三、微量补体结合反应.....89
定.....33	四、间接补体结合反应.....92
一、紫外吸收法.....33	第七节 固相溶血试验.....94
二、福林酚法.....34	第八节 团聚反应.....95
三、双缩脲法.....36	第九节 凝集溶解试验..... 101
四、其他测定法.....37	第十节 中和试验..... 103
第二章 抗原抗体分析技术40	第十一节 红细胞凝集及红细胞
第一节 薄层等电聚焦电泳技	凝集抑制试验..... 111

第四章 免疫荧光技术	114	类.....	150
第一节 免疫荧光技术的原理及特点.....	114	二、酶结合物的制备.....	150
第二节 荧光抗体的制备.....	117	第二节 酶联免疫吸附试验.....	151
一、免疫血清的制备及免疫球蛋白的提纯.....	117	第三节 免疫酶染色法.....	154
二、荧光色素的标记.....	118	第四节 化学发光免疫测量法.....	155
第三节 荧光抗体染色法.....	129	第五节 其他免疫酶技术.....	158
一、标本的制备.....	129	一、BAS免疫酶技术.....	158
二、标本的固定和保存.....	130	二、斑点酶联免疫吸附测定法.....	161
三、染色方法.....	132	三、单克隆抗体酶联免疫吸附试验.....	162
四、染色标本的保存.....	134	四、双特异抗体酶免疫测定法.....	163
第四节 荧光显微镜检查.....	134	第六章 放射免疫技术	165
一、光源.....	134	第一节 放射免疫饱和分析法.....	165
二、滤光片.....	136	一、基本原理.....	165
三、显微镜.....	137	二、测定技术.....	167
四、观察方法.....	138	三、放射免疫饱和分析法的应用.....	176
五、使用荧光显微镜的注意事项.....	138	第二节 放射免疫沉淀自显影法.....	177
六、摄影.....	139	第七章 免疫电泳技术	180
第五节 非特异性荧光的产生和消除.....	139	第一节 免疫复合物电泳技术.....	180
第六节 免疫荧光技术在兽医学上的应用.....	143	一、离心法.....	180
一、在细菌学中的应用.....	143	二、琼脂滤过法.....	180
二、在霉形体及病毒病方面的应用.....	145	三、琼脂聚乙二醇法.....	181
第七节 其他免疫荧光技术.....	147	第二节 免疫标记电泳技术.....	181
一、荧光菌团染色法.....	147	一、铁蛋白抗体法.....	181
二、吖啶橙简易免疫荧光法.....	148	二、酶抗体法.....	187
三、红细胞吸附免疫荧光技术.....	149	三、重金属标记抗体技术.....	192
四、荧光素标记葡萄球菌A蛋白试验.....	149	四、血蓝蛋白标记抗体技术.....	192
第五章 免疫酶技术	150	五、病毒的电镜凝集试验.....	193
第一节 概述.....	150	第八章 基因工程技术	194
一、免疫酶技术的原理及分类.....	150	第一节 基因工程的基本原理.....	

.....	194
一、目的基因的分离.....	194
二、用于基因重组的基本工具酶.....	195
三、用于分子克隆的载体.....	199
四、基因表达.....	200
第二节 分子克隆基本操作方法.....	201
一、细菌质粒DNA的大量提取.....	201
二、细菌质粒DNA的快速提取.....	202
三、用限制性内切酶酶切DNA.....	203
四、DNA凝胶电泳.....	204
五、用低熔点琼脂糖回收DNA片段.....	206
六、DNA的去磷酸化.....	207
七、DNA片段与载体DNA的连接.....	208
八、细菌质粒的转化.....	208
九、共转化.....	209
十、重组克隆系的筛选与鉴定.....	210
第三节 基因工程技术在免疫学中的应用实例.....	214
一、仔猪大肠杆菌基因工程菌株的构建.....	214
二、应用P _g PL串联启动子和Clts857调控基因高效表达 γ 干扰素.....	217
三、用生物素标记DNA探针检定弯曲菌.....	219
附：基因工程技术常用溶液及试剂的配制.....	220
第九章 细胞免疫检测技术	222
第一节 硝基蓝四氮唑还原试验.....	222

第二节 白细胞杀菌功能试验.....	224
第三节 巨噬细胞吞噬功能检测法.....	225
一、体内法.....	225
二、体外法.....	225
第四节 淋巴细胞转化试验.....	226
一、形态学检查法.....	227
二、 ³ H-胸腺嘧啶核苷掺入法.....	229
第五节 巨噬细胞移行抑制试验.....	231
第六节 T淋巴细胞酸性 α -醋酸萘酯酶的测定.....	234
第七节 白细胞粘附抑制试验.....	236
第十章 T、B淋巴细胞计数技术	240
第一节 T淋巴细胞计数法.....	240
一、E-玫瑰花环形成试验.....	240
二、微量E-玫瑰花环形成试验.....	243
三、活性玫瑰花环形成试验.....	244
第二节 B淋巴细胞计数法.....	245
一、B淋巴细胞SmIg的检测.....	246
二、免疫微球法.....	247
三、EAC花环试验.....	248
四、FBC花环试验.....	249
五、EA花环试验.....	251
第三节 溶血空斑试验.....	252
第四节 EY-混合玫瑰花环形成试验.....	255
第十一章 葡萄球菌A蛋白技术	258
第一节 SPA的基本特性.....	258
一、SPA的理化特性.....	258
二、SPA的免疫学及生物学特	

性.....	259	第一节 原理.....	288
第二节 SPA制剂.....	260	第二节 材料和方法.....	290
一、菌种与培养.....	260	第三节 注意的问题.....	294
二、SPA的提取.....	261	第四节 抗鼻疽菌McAb 杂交瘤	
三、SPA试剂.....	262	细胞株的建立.....	295
第三节 SPA 在免疫诊断中的		第五节 生物导弹技术.....	297
应用.....	265	第十四章 其他免疫学技术	398
一、协同凝集试验.....	265	第一节 红细胞免疫功能测定技	
二、酶标SPA染色法.....	267	术.....	301
三、酶标SPA酶联免疫吸附测		第二节 碳免疫测定法.....	301
定法.....	268	第三节 免疫染色法.....	302
第四节 应用 IgG-SPA 菌免疫		第四节 胶乳免疫测定法.....	303
法制备抗IgG 血清		第五节 相分离免疫测定技术...	306
的技术.....	269	第十五章 免疫生物制剂的制备	311
第五节 用SPA-Sepharose-4		第一节 免疫核糖核酸的制备	
B亲和层析法提取			311
IgG 的技术.....	271	一、免疫学作用机理.....	311
第六节 SPA-Sepharose 6MB		二、免疫核糖核酸的类型.....	311
亲和层析法分离B		三、制备技术.....	312
细胞.....	272	四、免疫核糖核酸制剂检定	
第十二章 循环免疫复合物检测方			314
法	274	五、免疫核糖核酸的临床应	
第一节 聚乙二醇沉淀法.....	275	用.....	315
第二节 利用C _{1q} 进行循环免疫		第二节 转移因子的制备.....	315
复合物检测的方		一、转移因子的作用机理.....	315
法.....	276	二、转移因子的制备方法.....	315
一、C _{1q} 的制备.....	276	三、转移因子的含量测定.....	317
二、C _{1q} 琼脂扩散测定法.....	278	四、转移因子的检定程序.....	317
三、C _{1q} 放射免疫测定法.....	278	第三节 胸腺肽的制备.....	319
四、酶联C _{1q} 测定法.....	279	一、概述.....	319
第三节 固相团聚素结合测定法		二、猪胸腺肽的提取.....	319
.....	280	三、牛胸腺肽的制备.....	320
第四节 C _{3b} 致敏酵母菌凝集试		四、含量测定.....	321
验测定法.....	282	五、活力测定.....	321
第五节 抗补体试验测定法.....	283	第四节 干扰素技术.....	322
一、试管法抗补体试验.....	283	一、干扰素的制备.....	323
二、微量板法抗补体试验.....	285	二、白细胞干扰素的纯化.....	324
第十三章 单克隆抗体技术	288	第五节 白细胞介素的制备.....	327

一、IL-1 的制备	327	四、联苯胺溶液	349
二、IL-2 的制备	328	五、双重氮联苯胺溶液	350
第六节 肿瘤坏死因子的制备	329	六、甘油缓冲液	350
第十六章 免疫学技术常用试剂配制	332	七、等渗的EDTA二钠溶液	350
第一节 缓冲溶液	332	八、鞣酸溶液	350
一、缓冲溶液的基本性质	332	九、酯酶染色液	351
二、常用缓冲液的配制	334	十、淋巴细胞分离液	351
第二节 平衡盐溶液	347	十一、赛氏液	352
一、平衡盐溶液的种类与作用	347	附录	353
二、实际应用及配制要求	347	1、常用元素的原子量表	353
三、常用平衡盐溶液的配制	347	2、希腊字母表	353
第三节 其他溶液的配制	349	3、常量、微量和超微量度量衡单位名称表	354
一、Alsever 氏液	349	4、常用实验动物正常体温变动范围(直肠温)	355
二、钙镁盐水	349	5、免疫学常用缩写略语	356
三、硼酸盐水	349	6、离心机与离心力	363

第一章 免疫球蛋白技术

第一节 免疫血清的制备

免疫血清为体液免疫和细胞免疫（在免疫试验中使用抗淋巴细胞血清）实验中主要的试剂之一。免疫血清的质量直接影响试验的准确性、特异性和敏感性。所谓质量是指免疫血清的特异性强弱和效价的高低两个方面。对于一个抗全血清抗体，又必须具有足够种类的抗体，因此，免疫血清的制备是免疫实验室的主要任务之一。在某种意义上讲，一个免疫实验室掌握免疫血清的种类和数量标志着这个实验室的工作水平。

免疫血清分两大类，一类为多价免疫血清，如兔抗马全血清、羊抗兔全血清；兔抗马或羊抗兔 γ 球蛋白血清等。另一类是单价抗血清，这是一类特异的为抗某种特定抗原物质而制备的免疫血清，如抗IgA、抗IgG、抗IgM以及抗某一种补体成分的抗血清等。

一、动物的选择

可作为免疫用的动物多为哺乳类和禽类，主要有家兔、绵羊、马、猪、驴、豚鼠和鸡等。其中实验室较常用者为家兔、绵羊、鸡和豚鼠。选择动物时要注意以下几个问题：

（一）抗原与动物种系 动物性抗原的免疫原性，随着动物种系远近而有差别。近缘动物的蛋白质免疫原性弱，反之则强，如用鸡球蛋白免疫哺乳动物则是强抗原，而用于免疫亲缘关系较近的鸭或鹅，其抗原性则较差，甚至不能出现抗体。同样，大鼠与小鼠之间，马和驴之间则很难获得高效价的抗体。因此，选择动物时应选用亲缘关系较远的动物。

（二）免疫血清的用量 所需要的免疫血清，如是经常大量的使用，选择免疫动物时则应选择大动物，如马、驴、绵羊、猪等；如所需的免疫血清量不大，则以选择小动物为宜，如家兔、豚鼠和鸡等。

（三）动物的个体状态 用于免疫的动物必须是适龄、雄性、健壮、无感染的动物，体重合乎一定要求，如家兔应在2~3 kg以上。免疫过程中应特别注意营养和卫生管理。注射抗原1个月后，动物仍无良好的抗体反应，或在规定注射日程后抗体效价不高，可再注射1~2次，若仍不佳者立即弃去。此外，在免疫前应预先测定实验动物的血清标本，观察是否存在针对注入的抗原和某些常见微生物如金黄色葡萄球菌、链球菌等“自然”抗体。

二、免疫原

免疫原系指用于免疫动物的抗原。免疫原的质量是制备优质免疫血清最基本的条

件，它决定着免疫血清特异性的强弱或效价的高低。免疫原必须具备优良的决定簇、可靠的纯度、足够大的分子量和足够的注射量。

一般蛋白质抗原、多肽抗原均具有良好的抗原决定簇，抗原物质进入机体后，由于该决定簇的存在，易被动物淋巴细胞识别而产生抗体。抗原的纯度对于制备单价免疫血清是不可缺少的条件，任何不纯的抗原都会阻碍主要抗体的产生。一般来讲，一种抗原成分可刺激机体产生一种抗体。纯化的抗原虽经检查含极微量的杂抗原成分，多次注射后亦会出现足量的抗体。抗原的分子量与抗体的产生有极大关系，一个优良的抗原其分子量应在10 000以上，有些分子量小的蛋白质，如轻链、转铁蛋白等，为了使其抗原性增大，可以将抗原聚合或将其吸附在一种无关的载体上以增大其分子量。抗原的用量应严格掌握，因为抗原量太少不能有效地刺激动物产生抗体，抗原量过多，则会抑制抗体的产生。

抗原用量的幅度较大，这决定于抗原类型、动物种类、免疫周期和所要求抗体的特性等。抗原性强的物质，用量可小些；抗原性弱的抗原，用量则应大。免疫用的动物体重大者，抗原总量应大，反之应小。免疫周期长者可少量多次注射抗原，周期短者则应大量少次。如要制备特异性很强的免疫血清，则应小量、短程、不加佐剂；如免疫血清效价要求很高，则应大量、长程、加佐剂。总之，抗原的用量应根据情况而定，没有统一标准。

三、佐剂的应用

有些抗原，如可溶性蛋白质抗原，经高度纯化后，抗原性往往降低，尤其是IgM、IgA和补体等，一般只能得到微量，要想制备出效价高的免疫血清比较困难。因此，在这种情况下，必须使用一定的佐剂，以提高免疫反应性，增强抗体的形成。但是佐剂中常混有微量的其他物质，这些物质进入体内后也可引起抗体的产生，影响免疫血清的特异性。因此，所用的抗原应尽量纯，并应通过一定的吸收程序处理。

(一) 佐剂的种类

1. 水油乳剂 一般用液体石蜡(8.5ml)、羊毛脂(1.5ml)。也有人报告，羊毛脂和液体石蜡的比例为3:1或2:1。还有使用羊毛脂40ml、石蜡油60ml。水油乳剂又称为Freund氏不完全佐剂(Incomplete Freund adjuvant)。

2. 佛氏完全佐剂(Complete Freund adjuvant)这是一种含有分枝杆菌或其提取物的水油乳剂。分枝杆菌用人型、禽型、牛型结核分枝杆菌或卡介苗皆可。一般每毫升升不完全佐剂含0.2~0.5ml结核分枝杆菌(死菌)或卡介苗(75mg/ml)。

3. 细菌内毒素 这种物质和抗原一起注入动物体内后，亦可引起抗体水平升高。如用伤寒杆菌和其他革兰氏阴性杆菌内毒素同时给动物注射，可使抗体效价提高2~40倍。有人发现提纯的细菌内毒素对IgG和IgM的产生均有加强作用。Braun氏认为内毒素促进抗体产生的机制，主要是内毒素刺激了RNA的合成。

4. 其他佐剂 如琼脂、明胶、胶体金、明矾、镁盐、水杨酸、氢氧化铝等均可刺激机体增强免疫力。近来又出现一些新免疫诱导剂，如双链多聚肌苷酸和胞苷酸

(polyI:C)、双链多聚肌苷酸和尿苷酸 (polyA:U) 等。

(二) 佐剂的配制

1. 佛氏佐剂的配制 配制佐剂抗原时, 将石蜡油和羊毛脂按上述比例混合后, 定量装入小瓶中, 经高压灭菌后低温处保存备用。免疫前取需要量的佐剂, 加温溶解后, 加入等量抗原液制成乳剂。佛氏佐剂必须制成油包水的乳剂才能使用。具体方法如下:

制备大量佐剂抗原时, 可用乳钵研磨, 即先将需要量佐剂放乳钵中研磨均匀后, 再逐滴加入等量抗原液和卡介苗 (边加边研磨), 加完后再继续研磨, 直至乳剂滴于水上完全不扩散为止 (或滴于水面上仍保持水滴状), 即可应用。若制成的乳剂稍许放置后, 乳状液与蛋白质抗原液分离, 说明未完成油包水过程, 应继续研磨。本法的缺点是, 在乳钵壁上粘附大量乳剂, 使抗原损失较大, 对于微量或难得的抗原, 不宜采用此法。

制备小剂量佐剂抗原, 可在青霉素瓶内混合, 即先将佐剂加温溶解, 加入等量抗原后, 向一个方向振荡混合, 直至水油不能分开为止。也可用两个注射器制备, 其中一个注射器内装抗原液, 另一个注射器内装加温溶解的佐剂, 两个注射器间以塑料管或胶管连接, 然后两个注射器来回抽吸, 10多分钟后即能完全乳化, 检查合格后即可使用。

2. 明矾佐剂配制 取 Na_2HPO_4 240mg、 KH_2PO_4 174mg、 $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 100mg、 NaCl 11mg、蒸馏水 75ml、明矾 10g, 并用蒸馏水补至 100ml, 即为 10% 明矾溶液。取这种溶液 25.6 份, 逐滴加入抗原溶液 (蛋白浓度为 10mg/ml) 1 份, 边加边形成沉淀。用 30% Na_2HPO_4 或 1mol NaOH 将 pH 调至 5.5, 则绝大部分蛋白质抗原形成沉淀物, 以离心法收集沉淀物, 再溶解于 pH 值 5.5 盐水中, 使每毫升含 30~50mg 蛋白质, 按需要量多部位肌肉注射 (家兔通常以 2~3 ml 为宜), 3 个月后再以普通抗原加强一针, 即可产生高效价免疫血清。

(三) 佐剂的作用机理

1. 加入佛氏佐剂, 因为是油包水, 吸收缓慢, 可在局部保持较长时间的刺激作用, 使免疫活性细胞不断产生。

2. 佐剂可以直接兴奋网状内皮系统, 激活免疫活性细胞, 使之繁殖和增强吞噬作用, 扩大免疫范围。有人试验, 将佐剂和抗原分别注射也能收到相同的效果。从而证实了佐剂的直接增强免疫作用。

3. 根据细胞免疫学原理, 有人认为佐剂可能使抗原分子变成大的聚合物或颗粒, 激发巨噬细胞对抗原物质的吞噬、处理作用, 并将抗原信息传递给免疫活性细胞, 使免疫作用增强。

四、免疫的次数和方法

(一) 无佐剂免疫法 根据抗原的性质采用适当的免疫方法, 颗粒性抗原, 如红细胞、细菌等, 通常不用佐剂。有人认为, 按以下方法进行免疫注射即可得到满意的抗体, 即将某种抗原 (内含大约 10% 固相成分) 根据以下顺序, 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、足跖注射抗原0.4ml、静脉注射抗原0.4ml、皮下注射抗原0.5ml。

于最后一次注射后7天，采取血清用特异性抗原测定效价。

(二) 佛氏佐剂免疫法 可溶性抗原由于分子量小，通常需与佐剂混合后再免疫动物，目前常用的为佛氏佐剂，佛氏佐剂的免疫方法主要有以下四种。

1. 皮内注射法 将抗原与佛氏完全佐剂制成混悬液后使用。每次注射时抗原的蛋白质含量为3~5mg，首次注射以后，每周皮内加强免疫一次，共免疫5周。末次免疫后10天采血清测效价。

2. 皮下或肌肉注射法 该法主要有足跖皮下免疫及三点免疫法。足跖皮下免疫时，首次在家兔双后肢跖部皮下各注射抗原-佛氏完全佐剂混悬液0.5ml，每次抗原的蛋白质含量为1~5mg，以后每两周加强免疫1次，共2次。末次免疫后10天采血清分离血清测试效价。三点免疫时，首次在家兔头颈部皮下、背部及两后肢小腿皮下、肌肉三点，各注射抗原-佛氏完全佐剂混悬液2ml，每次抗原的蛋白质含量为10~20mg，两周后每周用不含佐剂的抗原加强免疫1次，每点1ml，如此重复3次。末次免疫后1周测定效价。

3. 淋巴结注射法 对小动物可采用腮淋巴结进行免疫，羊、马和毛驴等动物也可采用颌下淋巴结免疫。注射时为了使腮淋巴结肿大，可预先在两后肢足跖部注射活卡介苗，每侧0.3ml（含弱毒活结核分枝杆菌75mg/ml），即皮下0.1ml，皮内0.2ml，两周后淋巴结可肿大如黄豆或蚕豆大。用两指固定淋巴结后即可较容易地注射抗原-佛氏完全佐剂混悬液0.5ml，两周后再重复1次即可。

4. 混合法 此法是综合使用足跖皮下、淋巴结和静脉等途径进行免疫。其特点是抗原用量少，免疫血清效价上升快。具体方法是：选择2.5~3kg的兔，首次于双后肢足跖各注射0.5ml抗原-佛氏完全佐剂混悬液。两周后，于双后肢肿大的腮淋巴结内各注射同样制剂。第三周于耳静脉放血，分离血清测定效价。如果效价不够高，可再用无佐剂的抗原（15mg/ml）通过耳静脉注射，以加强免疫，1周内注射3次，各次的量分别为0.1ml、0.3ml和0.5ml。1周后采血清测效价。

(三) 明矾佐剂免疫法 明矾佐剂与抗原的混悬液，通常采用肌肉注射法进行免疫。即于动物不同部位的肌肉进行免疫，注射抗原的总量为2~3ml，间隔2个月再加强免疫注射一次即可得到高效价的免疫血清。

五、几种常用免疫血清的制备法

(一) 兔抗马全血清

1. 采用数匹新鲜的混合马血清或血浆1份，加佛氏完全佐剂1份，用无菌乳钵充分研磨成乳剂，该乳剂放置后不分层，取一滴放入水中，乳剂不上浮、不分散，方可用于注射。

2. 采用多点皮下注射法进行免疫，通常于家兔背部、肩胛骨内侧和趾间选择5个点，每点注射0.1ml。

3. 共注射4~5次, 每次间隔10天。

4. 末次注射后10~15天试血。

5. 试血后效价不高, 可休息1个月后再注射1~2次, 试血, 如果效价仍不太高, 应弃之不用。

制备抗马(其他动物也同)全血清时, 由于血清内抗原成分多, 而且各成分的含量有多有少, 造成免疫不均, 特别是白蛋白和IgG常有抑制现象(因这两种蛋白的含量太多)。故有人提出, 先用小剂量白蛋白和 γ 球蛋白作初次免疫(含量在25~50 μ g/kg之间), 然后再用全血清进行免疫。

(二) 羊抗兔球蛋白免疫血清

1. 内蒙古畜牧科学院研究所方法 制备绵羊抗家兔球蛋白高免血清, 用2岁绵羊作免疫动物。第一天肌肉注射明矾沉淀的健康家兔球蛋白40ml(含球蛋白500mg), 分别注射于四条腿, 第16天、第30天、第47天各肌肉注射同样抗原500mg。第42天试血, 用环状沉淀反应法测得效价为1:15 000(++)。第57天采血160ml, 第70天肌肉注射同样抗原576mg。如用环状沉淀反应测定, 抗球蛋白免疫血清的效价在1:10 000以上为合格。第81天动脉放血至死。

2. 北京医学院方法 按下表所列程序将抗原注射于绵羊肩胛皮下或臀部肌肉, 每次均同时注射两处, 每次间隔10天。每次注射的抗原均混以佛氏不完全佐剂(抗原1份、无水羊毛脂1份、液体石蜡2份), 于末次注射后20天试血。用环状沉淀反应检查, 于5分钟内出现沉淀环, 效价在1:4 000以上即可放血。具体免疫方法参考下表。

表1—1 免 疫 程 序 表

注 射 次 数	注 射 剂 量
第一次	50mg家兔丙种球蛋白
第二次	50mg家兔丙种球蛋白
第三次	100mg家兔丙种球蛋白
第四次	100mg家兔丙种球蛋白
第五次	150mg家兔丙种球蛋白
第六次	150mg家兔丙种球蛋白

(三) 病毒抗原免疫法(家兔)

1. 取病毒抗原悬液, 第一次皮下、腹腔或静脉内注入5~10ml。

2. 间隔1~3天后, 反复注射2~4次, 每次注射剂量均同上。

3. 4~6周后, 再加强注射一次, 抗原剂量10ml。

4. 末次注射后5~10天采血。

(四) 兔抗其他动物免疫球蛋白注射法

1. 微量注射法

(1) 选择健康雄性家兔, 在两后肢足跖处注射活卡介苗各0.5mg。

(2) 10天后于两侧腹股沟淋巴结内各注入佛氏完全佐剂抗原混悬液(含免疫球蛋

白0.1~0.5mg) 0.1ml, 或四只足跖各注射0.1ml。

(3) 3~4周后, 追加佛氏完全佐剂抗原一次, 注射部位和剂量同上。

(4) 末次注射2周后试血, 如果效价不高可再加强注射抗原一次, 剂量同上。3~5天后试血。

2. 常量注射法

(1) 取纯化免疫球蛋白(20mg/ml)溶液加等量佛氏完全佐剂。采取多点注射, 每点0.1ml; 总量0.5~1ml。

(2) 3周后用同剂量佛氏完全佐剂抗原再注射一次。

(3) 末次注射后2周试血, 如果效价不高, 可皮下注射抗原一次(20mg蛋白), 1周后试血。

3. 大剂量注射法

(1) 静脉内注射 共注射4个周期, 每个周期连续3天, 每天注射20~60mg蛋白, 间隔3天为1周期。第3周期起作脱过敏注射(先小量注射, 隔20min后再注射全量)以防休克。末次注射1周后放血。普遍认为用这种方法免疫, 可以获得高效价的免疫血清。

(2) 腹腔内注射 共注射4次, 每次间隔3~4天, 各次注射的剂量分别为30mg蛋白、60mg蛋白、90mg蛋白、120mg蛋白。末次注射后试血, 如效价不高, 可再重复注射若干次。

(五) 自然感染动物抗血清的利用 某些病原体(流乙脑炎病毒、马传贫病毒等), 自然感染动物后可产生高效价的抗体。如流行性乙型脑炎流行地区的猪, 几乎大多数有自然感染, 在流行期间猪的中和抗体效价很高, 这种抗血清由于抗原是经媒介昆虫注入, 不含杂质, 所以特异性也比实验室制备的高, 应该尽量利用。

另外, 市售的抗血清和球蛋白制剂, 如炭疽沉淀素血清等, 一般质量比较稳定, 可以选购, 不必自制。

(六) 采血及血清分离 不论免疫动物是大动物或小动物, 采血方法均分为一次放血法和多次放血法两种。

1. 一次放血法 绵羊或其他大动物可用颈动脉放血, 家兔、豚鼠则可通过心脏直接采血。具体方法是: 动物仰卧保定, 暴露颈部, 消毒后用手术刀小心切开皮肤, 暴露胸锁乳头肌, 用手推开乳头肌即暴露出颈动脉(弹性强、有搏动, 呈粉红色), 分离动脉后, 用右手指垫于血管下面, 取大号注射针头, 向心方向直接插入血管内, 动脉血可直接从连接橡皮管注入收集瓶。亦可先阻断动脉血流, 在阻断处剪一小口, 直接插入塑料管, 然后连同血管一起用线固定或用手直接固定。为了多取一些血液, 可将放血速度减慢或提高动物后躯位置。

2. 多次少量放血法 大动物可通过静脉采血, 家兔和豚鼠等小动物可用心脏采血。为了在一只家兔身上取得更多的血液, 可采用如下的分段采血法。

末次免疫注射后放血45ml, 以后每隔6周放血45ml, 放血前8~10天加强注射抗原一次。这样可使高效价血清在前3~4次继续上升, 以后保持较长时间不变。放血的方法一般多采用家兔耳中央动脉分枝切开法放血。切开前先消毒并擦耳朵, 使血管充

血，然后在中央动脉分枝处作横断切开，动脉血即可流出。也可以使耳边静脉怒张后，切开一个1~3mm的口放血，取血后用灭菌干纱布压迫止血即可。

免疫血清的分离应在无菌条件下进行，并应尽量防止溶血。

六、免疫血清的效价测定

测定免疫血清效价是及时掌握采血时机的重要步骤。测定的方法很多，较常用的有以下几种。

(一) 环状沉淀反应

1. 抗原稀释法

(1) 1、2、5稀释法 可将抗原按下表进行稀释。

表1—2

抗 原 稀 释 法

要 素	稀 释 倍 数						
(ml)	1:1 000	1:2 000	1:5 000	1:10 000	1:20 000	1:50 000	1:100 000
生理盐水	1.8	0.5	0.8	1.8	0.5	0.8	1.8
稀释的抗原 (1:100)	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2

用毛细吸管吸取待测动物血清，分别加入7支沉淀反应管中，每管高约1cm。再用另一支毛细吸管吸取上述稀释抗原液（从最高稀释倍数开始），沿管壁徐徐加于待测的血清上。加入抗原液时应防止两液相混，或者在其间产生气泡。另外，加入的抗原量应与血清量相等。抗原全部加完后，用另一支毛细吸管吸取生理盐水，加于另一管待测血清上（代替抗原）作对照。

全部加完后，在室温中静置20~30min观察结果。若两液面接触处有白色环状沉淀物出现，即为阳性。当被检血清与最高稀释倍数的抗原管出现阳性反应时，即为该血清的效价。

(2) 倍比稀释法 亦先将抗原按下表进行稀释：

表1—3

抗 原 稀 释 法

要 素	稀 释 倍 数									
(ml)	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200
生理盐水	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
稀释抗原 (1:10)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

试验方法基本上与前述1、2、5稀释法相同，即首先向沉淀反应管加入待测血清后，再在血清上徐徐加入各稀释度的抗原（从最高稀释倍数管开始）。全部加完后，于20~30分钟内观察并判定结果。

2. 抗体稀释法 首先将待测血清用生理盐水作成1:2、1:4、1:8……1:1024倍稀释。然后用毛细吸管吸取每毫升含1~2mg球蛋白抗原液，加于沉淀反应管中，再用另一支毛细吸管吸取稀释血清（从最高稀释倍数管开始），分别徐徐加于抗原上。加完后按上述抗原稀释法进行观察判定。

用家兔制备的抗各种动物球蛋白抗体时，通常用抗原稀释法测定其效价，当其效价在1:6400~8000倍以上，即可应用；如用抗体稀释法测定时，其效价则应在1:64~128倍以上才能应用。以绵羊制备免疫血清，其效价一般比家兔低，如果用抗体稀释法测定，效价一般在1:64倍以上即可用。

（二）双相琼脂扩散试验 本法是比较简单而实用的方法，可以稀释抗原（一般作1000~20000倍稀释），也可稀释抗体（一般作1:2~1:128倍稀释）。双扩散后出现沉淀线条数、位置和浓度即代表抗体的纯度和效价。稀释抗原可出现较高的效价，而稀释抗体时，效价最高也不过1:128倍左右。具体方法加下。

取琼脂粉1g加于100ml生理盐水中，于水浴中加热溶化，将溶解的琼脂液加于玻板上（用7.5×5cm玻板时，需琼脂溶液8ml左右，用普通载玻片时3~4ml即可），待琼脂凝固后，用打孔器按六角形打孔，孔径为4~6mm，周围孔与中央孔的距离为5~6mm。中央孔通常加入每毫升含1~2mg球蛋白的抗原液，周围孔分别按顺时针方向添加用生理盐水作倍比稀释的待测动物血清。各孔加完后，将琼脂板放在湿盒内（必要时湿盒内可加入少量石炭酸溶液防腐），于20~37℃处放置24~72小时后观察结果。

如果在抗原孔与抗体孔之间出现沉淀线者，即为阳性。最高稀释倍数血清孔出现沉淀线，即为该血清的抗体效价。琼脂扩散试验的效价通常与环状沉淀反应法相同，但用抗原稀释法测定时，则比环状沉淀反应稍低。

此外，还可以用凝集反应、中和试验、补体结合反应、间接血凝试验、对流免疫电泳和定量沉淀试验等方法进行免疫血清效价的测定，可根据免疫血清的种类不同选择应用。

七、免疫血清的浓缩

免疫动物后，所取得的抗血清有时因为效价太低，不能用于诊断，可用适宜的方法将血清进行浓缩后使用。浓缩的方法很多，较常用的有以下两种。

（一）硫酸钠提取法 取无水硫酸钠粉末18g，徐徐加入100ml免疫血清中，边加边摇，直至完全溶解为止（硫酸钠的溶解度随室温的高低而变化，20℃时可溶解18.9g，0℃时只溶解4.9g）。室温处放置30分钟后离心（10000r/min，10min）。弃上清，沉淀用PBS50ml溶解后，再加入9g无水硫酸钠粉末，按上述方法沉淀后，加少量PBS溶解，放入冰箱中一夜，次日取出稍离心，去掉结晶硫酸钠。上清液用PBS稍加透析后，按蛋白质含量配成5~10%蛋白质溶液，按上述方法进行效价测定。