

实用基础 医学实验技术

主编 龚守良



吉林科学技术出版社

实用基础医学实验技术

主 编 龚守良

副主编 张 铭

审 阅 刘树铮

吉林科学技术出版社

实用基础医学实验技术

龚守良 主编

责任编辑：齐向东

封面设计：刘 烨

出版：	吉林科学技术出版社	787 × 10 92毫米16开本	30印张
发行：		插页 4	7 23 0 00 字
		1991年 4 月第 1 版	1991年 4 月第 1 次印刷
		印数： 1 — 30 00册	定价： 13.60元
印刷：	吉林省委党校印刷厂	ISBN 7 - 5384 - 0716 - 2 /R · 127	

前 言

近年来,随着医学实验新技术的广泛应用和推广,基础医学也获得了空前的飞跃发展,一些令人瞩目的分子生物学、生物遗传工程学、免疫学、神经内分泌学等理论的重大突破,都涉及到新技术的引用。因此,在医学科学研究领域中,医学实验技术占有举足轻重的地位。

目前,国内已出版了许多有关基础医学各专业方面的实验技术书籍,但尚缺乏适用于青年医学工作者,特别是医学研究生的基础医学各专业常见实验技术的参考书。有鉴于此,我们根据多年的教学、科研经验,查阅国内外有关文献,编成此书,以期对读者有所裨益。

本书荟集了基础医学常见的实验技术,内容广、方法新;且每种实验技术都经作者本人反复应用,并在教学和科研中取得满意效果;文章叙述又以操作程序为主;文字力求简明扼要。

全书共分八章,主要包括放射配体分析、组织培养技术、细胞遗传学实验技术、分子生物学实验技术、免疫学实验技术、蛋白质及其他物质提纯和测定技术、常用仪器使用和动物模型建立及医学生物学中的数学模型及其计算机拟合等方面的内容;同时,还选编了一些上述实验中常用缓冲液配制、国际制单位及实验动物的生物学数据等作为附录。

为医学研究生和青年医学工作者编写本书,是刘树铮教授几年来的宿愿,从书稿的总体设计到编排的具体内容都倾注了他的心血。在编写本书过程中,刘教授又给予热诚关怀和亲切指教,并在百忙工作中对全部书稿认真审阅、修改,提出了许多宝贵意见,使本书得以顺利出版。

本书是由多位作者编写,加之编者水平有限,缺点、错误在所难免,尚祈读者不吝赐教,以便再版修订。

龚守良

一九九〇年九月

目 录

第一章 放射配体分析	1
第一节 放射配体分析的基本原理、技术条件、质量控制及有关问题	1
一、放射配体分析的基本原理	1
二、抗原和标准品	2
三、抗血清的制备和鉴定	5
四、抗原的标记	7
五、加样程序及分离技术	8
六、标准曲线、Scatchard 作图及K 值	10
七、放射免疫分析中的质量控制	13
八、放射免疫分析的有关问题	16
第二节 放射免疫测定	18
一、促甲状腺激素、滤泡刺激素、促黄体激素、生长激素和催乳素氯胺T 碘化标记	18
二、促甲状腺激素、滤泡刺激素、促黄体激素、生长激素和催乳素放射免疫测定	19
三、睾酮放射免疫测定	20
四、抑制素放射免疫测定	22
五、孕酮放射免疫测定	23
六、雌二醇放射免疫测定	25
七、三碘甲状腺原氨酸(T_3)放射免疫测定	27
八、甲状腺素(T_4)放射免疫测定	28
九、促肾上腺皮质激素(ACTH)的碘化标记及其放射免疫测定	29
十、 β -内啡肽(β -EP)的碘化标记及其放射免疫测定	33
十一、脑组织中神经肽放射免疫测定	35
十二、胰岛素放射免疫(双抗体法)测定	39
十三、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的氯胺T 碘化法	40
十四、蛋白质酶促放射性标记法	42
十五、环磷酸鸟苷放射免疫测定	43
第三节 竞争性蛋白质结合分析	45
一、皮质醇(酮)测定	45
二、环磷酸腺苷蛋白质结合测定	46
第四节 放射受体分析	48
一、大鼠脾细胞糖皮质激素受体分析	48
二、大鼠肝细胞糖皮质激素受体分析	50
三、雌二醇受体分析	52
四、应用 ^{125}I 标记ACTH进行免疫细胞受体分析	53

第二章 组织培养技术.....	57
第一节 组织培养基本知识、实验室条件、培养用液及培养技术.....	57
一、组织培养概念.....	57
二、组织培养实验室设计和设备.....	61
三、培养用液.....	63
四、清洗与消毒.....	67
五、培养基本要领和操作要求.....	69
第二节 细胞、组织培养.....	74
一、大鼠垂体细胞单层培养及其分泌功能测定.....	74
二、Leydig 细胞及Sertoli 细胞离体培养.....	75
三、大鼠卵巢颗粒细胞单层培养及其功能的测定.....	76
四、肾上腺组织制备及培养.....	78
五、粒-巨噬系造血祖细胞体外培养.....	79
六、人骨髓成纤维细胞集落形成培养.....	80
七、小鼠脾淋巴细胞混合培养.....	81
八、人周围血液单核细胞分离.....	83
九、悬浮细胞在半固体琼脂内集落形成.....	86
第三节 杂交瘤技术.....	88
一、杂交瘤技术的基本原理.....	88
二、实验材料和方法.....	89
三、杂交瘤细胞的制备.....	90
四、杂交瘤细胞的选择性培养.....	92
五、杂交瘤细胞的筛选.....	93
六、杂交瘤细胞的克隆化.....	96
七、单克隆抗体的制备.....	98
八、杂交瘤细胞的冻存和复苏.....	99
九、污染和控制.....	100
十、单克隆抗体的特性.....	101
十一、单克隆抗体的纯化.....	102
十二、筛选和鉴定单克隆抗体的方法.....	105
附 聚乙二醇溶液、阿氏液、2-巯基乙醇溶液及几种染液配制.....	112
第三章 细胞遗传学实验技术.....	114
第一节 人淋巴细胞染色体技术.....	114
一、常规制备人外周血淋巴细胞染色体标本.....	114
二、姊妹染色单体差别染色.....	116
附 BudR 参入后细胞分裂周期鉴别及SCE 分析.....	117
三、人外周血淋巴细胞微核标本制备.....	118
附 微核判定标准.....	119

第二节 哺乳动物体细胞染色体标本制备方法	119
一、家兔外周血染色体标本制备	119
二、小鼠骨髓细胞染色体标本制备	120
三、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验	122
第三节 生殖细胞染色体标本制备	123
一、雄性生殖细胞染色体标本制备	123
二、雌性生殖细胞染色体标本制备	126
第四节 染色体畸变类型和判定标准	127
一、人类染色体畸变类型	127
二、小鼠染色体畸变类型	128
第四章 分子生物学实验技术	132
第一节 制备转基因小鼠技术	132
一、真核细胞DNA的快速制备	132
二、真核细胞DNA制备的一般方法	133
三、组织和培养细胞DNA提取、制备	134
四、限制性内切酶	135
五、琼脂糖凝胶电泳	137
六、Southern 转印	138
七、缺口翻译	139
八、DNA 分子杂交 (Southern 转印杂交)	140
九、细菌的转化	141
十、质粒DNA制备 — Triton - Lysozyme 法	143
十一、异硫氰酸胍法提取制备总RNA	145
十二、聚丙烯酰胺序列电泳凝胶的制备	146
十三、S ₁ 核酸酶保护测定	147
十四、转基因小鼠的制备	152
第二节 确定四膜虫rDNA特异序列位置技术	156
一、四膜虫rRNA基因 (rDNA) 提取	156
二、应用琼脂糖凝胶电泳纯化四膜虫rDNA片段	157
三、Southern转移确定四膜虫rDNA 特异序列位置	159
四、应用分子杂交进一步确定四膜虫rDNA 特异序列位置	160
第三节 几种检测DNA 损伤技术	162
一、快速测定DNA 损伤方法	162
二、DNA 聚合酶活性测定	163
三、外周血淋巴细胞DNA 非程序合成测定 (液闪法)	164
第四节 有关rRNA 合成测定及mRNA体外翻译技术	165
一、四膜虫核糖体RNA 合成的测定	165
二、ConA活化淋巴细胞mRNA 的体外翻译技术	167

第五章	免疫学实验技术	170
第一节	免疫沉淀反应	170
一、	血清中IgG、IgA和IgM测定(琼脂单相免疫扩散法)	170
二、	双向免疫扩散	172
三、	免疫电泳	173
第二节	T淋巴细胞功能测定	175
一、	E玫瑰花结反应——一种计数T淋巴细胞方法	175
二、	人T细胞亚群(T _r 、T _μ)检测	176
三、	α-醋酸萘酯酶(ANAE)染色检测T淋巴细胞	178
四、	淋巴细胞转化试验 ³ H-TdR参入法(微量全血法)	180
附	氟衰变表	181
五、	淋巴细胞转化试验形态学方法	182
六、	双重双标记法检测淋巴细胞内三种大分子合成	184
七、	单克隆抗体免疫荧光染色及流式细胞仪检测脾脏淋巴细胞亚群	184
第三节	B淋巴细胞功能测定	186
一、	酵母多糖-补体 ₃ 复合物花环形成法(ZYC花环形成法)——一种检测B细胞方法	186
二、	溶血空斑试验(液相单层玻片法)	187
第四节	淋巴因子测定	189
一、	胸腺细胞对白细胞介素1反应性测定	189
二、	脾细胞IL-2产生及活性测定	190
三、	小鼠肿瘤坏死因子的诱生及检测	191
四、	干扰素活性测定	192
第五节	细胞毒技术	196
一、	抗体依赖细胞介导的细胞毒(ADDC)活性测定	196
二、	小鼠脾脏NK细胞活性测定	198
三、	淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK细胞)活性测定(¹²⁵ I-UdR释放法)	199
第六节	免疫组织化学及放射自显影术	200
一、	组织石蜡切片	200
二、	免疫组织化学技术	202
三、	细胞贴附放射自显影术	205
四、	组织切片放射自显影术	206
第六章	蛋白质及其他物质提取、纯化、鉴定及其测定技术	209
第一节	蛋白质及酶的提取和纯化	209
一、	组织细胞破碎	209
二、	样品的浓缩、干燥和保存	210
三、	蛋白质及酶的提取和纯化	211
第二节	层析技术	213
一、	纸层析	213

二、薄层层析	214
三、应用薄层吸附层析法检查氚标地塞米松放化纯度	215
四、凝胶层析	216
五、离子交换层析	221
第三节 电泳技术	225
一、十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	225
二、聚丙烯酰胺等电聚焦电泳	227
第四节 几种蛋白质的制备及其测定	228
一、滤泡刺激素的提取、纯化及其生物学特性测定	228
二、动物垂体促黄体激素的分离和纯化	229
三、抑制素的制备及其生物活性测定	231
四、免疫球蛋白 IgG 的提取、纯化和羊抗兔 IgG 的制备	232
五、植物血球凝集素 (PHA) 的制备	235
六、蛋白质定量测定——Lowry 氏法	236
七、应用紫外光吸收法计算蛋白质浓度	237
第五节 组织中自由基及其抗氧化酶测定	238
一、体内的自由基反应	238
二、组织中自由基的测定——电子自旋共振法	241
三、TBA 显色法测定组织中过氧化脂质	242
四、化学发光法测定组织中超氧化物歧化酶	243
五、DTNB 直接法测定血液和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力	244
第六节 色氨酸、抗坏血酸测定及氚化 5-羟色胺在体内组织中分布实验	246
一、应用分光光度法测定游离或结合色氨酸	246
二、肾上腺抗坏血酸测定	247
三、氚化 5-羟色胺在下丘脑、垂体及肾上腺中分布实验	248
第七章 仪器使用及动物模型建立	250
第一节 液体闪烁计数仪及 γ 计数仪	250
一、液体闪烁计数仪的主要部件和使用	250
二、 γ 计数仪的主要部件和使用	253
第二节 高效液相色谱法及其应用技术	257
一、概述	257
二、液相色谱法的基本原理	258
三、色谱柱及其参数的选择	260
四、检测器	261
五、定性与定量方法	262
六、高效液相色谱分离类型的选择	264
七、HPLC 法测定组织中单胺类化合物	264
八、反相 HPLC 荧光检测法检测人血浆中 α -生育酚	265

九、吉林红参中多肽的HPLC法分离.....	266
十、氨基酸的高效液相色谱分析.....	266
第三节 气相色谱法及其在医学研究的应用.....	267
一、气相色谱法基本原理.....	267
二、气相色谱仪的组成.....	268
三、气相色谱法的定性定量分析.....	272
四、气相色谱法在医学上的应用.....	272
第四节 双光束紫外可见分光光度计及分光光度法的应用.....	274
一、分光光度法的基本原理.....	274
二、双光束紫外-可见分光光度计构造.....	274
三、分光光度法.....	275
四、分光光度法的应用.....	276
第五节 荧光分析法及荧光分光光度计的应用.....	278
一、概述.....	278
二、化学结构和荧光.....	278
三、浓度与荧光强度的关系.....	279
四、荧光仪器.....	279
五、荧光分析的应用.....	282
六、荧光法测定核黄素(维生素B ₂).....	282
七、荧光法测定组织中吲哚胺.....	283
第六节 流式细胞仪原理与应用.....	284
一、流式细胞仪的工作原理和基本构造.....	284
二、细胞的分析与分选.....	285
三、流式细胞仪主要特点.....	285
四、流式细胞术的应用范围及样品测定步骤.....	285
五、样品制备.....	287
六、微量全血溶解染色法测量T淋巴细胞亚群(间接荧光法).....	289
七、单荧光染色的细胞周期测定方法.....	290
第七节 原子吸收分光光度计及应用原子吸收分光光度法测定发锌含量.....	290
一、原子吸收分光光度计的工作原理.....	291
二、原子吸收分光光度计.....	291
三、毛发中锌的测定——火焰原子吸收分光光度法.....	293
第八节 多道分析器及其核分析技术在生物医学中的应用.....	294
一、多道分析器的工作原理.....	294
二、核分析方法概述.....	295
三、中子活化分析.....	295
四、同位素源激发X射线荧光分析.....	296
第九节 超薄切片机及超薄切片术.....	302
一、超薄切片机.....	302

二、标本的制作.....	302
三、超薄切片步骤.....	303
四、制备优良的超薄切片条件.....	305
五、超薄切片的常规染色法.....	305
六、半薄切片的制作及染色.....	306
第十节 超速离心机及菲利普深部X光治疗机的应用.....	306
一、超速离心机的使用.....	306
二、菲利普深部X光治疗机在实验中的应用.....	308
第十一节 动物模型的建立.....	310
一、小鼠实体瘤模型制备.....	310
二、大鼠去垂体术.....	311
三、大鼠睾丸摘除术.....	312
四、初生期大鼠胸腺摘除术.....	312
五、鼠类动物弓状核药物损毁模型.....	313
六、吗啡耐受动物模型.....	313
七、大鼠肾上腺摘除术.....	314
第十二节 大鼠脑立体定位.....	315
一、大鼠脑立体定位术.....	315
二、大鼠第三脑室定位插管.....	315
第十三节 大鼠剖腹探查及颈静脉插管.....	316
一、大鼠剖腹探查诊断妊娠.....	316
二、大鼠颈静脉插管术.....	317
 第八章 医学生物学中的数学模型及其计算机拟合.....	318
第一节 数学模型.....	319
一、数学模型的分类及建立数学模型的方法与步骤.....	319
二、医学生物学中的数学模型实例.....	321
第二节 计算机拟合程序.....	337
一、XFIT单变量的最小二乘拟合.....	337
二、LINFIT直线的最小二乘拟合.....	338
三、POLFIT多项式的最小二乘拟合.....	340
四、LEGFIT勒让德多项式的最小二乘拟合.....	343
五、REGRES多重线性回归拟合.....	348
六、FCTN用于REGRES的幂级数拟合函数.....	352
七、FCTN用于REGRES的勒让德多项式拟合函数.....	353
八、FCHISQ拟合的约化 χ^2 , χ^2_μ	354
九、GRIDLS非线性函数网格寻优最小二乘拟合.....	356
十、FUNCTN(高斯函数+二次多项式)非线性拟合函数.....	358
十一、GRADLS非线性函数的梯度寻优最小二乘拟合.....	359

十二、CHIFIT 采用 χ^2 抛物线外推法的最小二乘拟合	362
十三、CURFIT 拟合函数线性化的最小二乘拟合	366
十四、FDERIV (高斯函数+二次多项式) 拟合函数的导数	370
十五、FDERIV 无解析形式的拟合函数的导数	371
十六、SMOOTH 平滑化过程	372
十七、INTERP 数据的内插与外推	373
十八、AREA 面积的数值积分	375
十九、INTEG 面积积分程序	377
二十、DETERM 方矩阵的行列式	378
二十一、MATINV 矩阵求逆	380

附 录

§ 1 常用缓冲液配制、药物浓度计算、酒精稀释法、各种酸碱浓度及人工培养基	383
一、常用缓冲液配制	383
二、药物浓度计算	388
三、酒精稀释法	389
四、各种酸碱浓度	389
五、常用人工合成培养基	390
§ 2 化学试剂分级、激素国际标准、国外测定药盒及激素正常值	391
一、化学试剂分级	391
二、激素的国际标准和国际参考制剂	392
三、国外测定药盒的指标值	394
四、人体26种激素正常值	396
§ 3 冷却剂、干燥剂、需特殊保存的试剂、指示剂、滤纸、滤膜及相对离心力换算	402
一、冷却剂	402
二、干燥剂	402
三、硝酸纤维素膜与尼龙膜的比较表	403
四、易变质和需用特殊方法保存的常用试剂	404
五、常用酸碱和混合指示剂	405
六、层析滤纸的规格与性能	407
七、离心转数与相对离心力(g)的换算	407
§ 4 度量衡单位、医学许用和非许用单位及医学检验新旧单位换算	408
一、常量、微量和超微量度、量、衡单位名称	408
二、与医学有关的许用和非许用单位	409
三、医学检验新旧单位换算	414
§ 5 辐射剂量单位、放射性衰变表及放射性去污方法	434
一、辐射剂量单位	434
二、放射性衰变表	438
三、放射性去污方法	441

§ 6 动物近交品系命名法、精液采取法、肿瘤接种法、常用麻醉剂、主要传染病及某些生物学数据.....	442
一、近交品系命名法.....	442
二、各种动物精液采取方法和精液特点.....	444
三、常用动物肿瘤接种方法.....	444
四、动物常用麻醉剂.....	445
五、动物主要易患传染病.....	446
六、成年动物正常体温、呼吸、脉搏、尿比重、体表面积及血压值.....	447
七、实验动物红细胞、血红蛋白、白细胞及血小板数.....	449
八、实验动物生化指标参考值.....	452
九、实验动物染色体数目、正常组织细胞分裂各间期的时间及细胞更新速度.....	454
十、不同种类生物的LD ₅₀	456
十一、实验动物繁殖生理数据及其寿命.....	457
十二、实验动物重要脏器重量、与体重之比以及年龄与体重的关系.....	459
十三、实验动物饲料、饮水要求量和排便排尿量及1次灌胃能耐受的最大容量.....	461
十四、实验动物的营养需要量、循环时间及所需的活动面积.....	462
十五、供实验用的各种动物体重要求及采血量.....	463

第一章 放射配体分析

第一节 放射配体分析的基本原理、技术条件、质量控制及有关问题

1959年Yalow和Berson首先建立了血浆胰岛素的放射免疫分析法, 1960年Ekins报道了甲状腺激素的竞争性蛋白结合分析法。以后这两种技术迅速扩展到许多其他物质的微量和超微量测定, 同时又不断发展了放射酶分析、放射受体分析, 并研制成用放射性同位素标记特异性抗体的一类方法, 称为免疫放射分析等。

放射配体分析和其它体外放射分析, 是放射性同位素示踪法体外应用的一种特殊形式。这类技术结合了同位素示踪和免疫反应的特点, 具有很高的灵敏度和特异性。目前, 应用这类技术可精确测定许多种生物样品中数百种物质的含量, 其灵敏度达ng或pg水平。此类技术除了灵敏度高、特异性强外, 还具有样品用量小、精密度高、操作简便、价格低廉及可体外应用同位素等优点, 较易于规格化和自动化。此类技术尚存许多缺点, 只能以免疫反应测得具有免疫活性的物质, 被测物和标准物都不能全部参与反应, 有的流程较长(如双抗体法需48~72h), 需要仪器设备, 且存在电离辐射和污染等问题。尽管如此, 放射免疫分析作为一种超微量分析方法, 仍具有它的生命力和发展前途。

一、放射配体分析的基本原理

放射配体分析及有关技术可统称为饱和分析, 是同位素稀释法的一种特殊应用。在一定的反应系统中, 某种被测的微量物质S, 与标记有放射性的该种物质S*竞争有限量的结合剂或结合蛋白P, 形成可溶性复合物PS和PS*, 其反应遵循质量作用定律。当反应系统中P和S*的量固定时, 若S愈多, 则形成PS亦愈多, 而PS*则愈少, 反之亦然:



如果是放射免疫分析, 则反应式中的S为某种抗原Ag, P为其特异抗体Ab, Ag*为标记的某种抗原, 其反应式如下:



由此可见, 放射免疫分析是饱和分析的一种特殊形式。

若向一系列反应管内分别加入固定量的Ab和Ag*以及不同量的Ag, 当反应达到平衡以后, 用一定的方法分离Ag*(即游离的Ag*, 用F表示)与Ag*Ab(即结合的Ag*, 用B表示), 然后测定Ag*Ab或Ag*或二者的放射性, 就可以得出一条剂量效应曲线, 即标准曲线。绘制标准曲线时, 一般以B% (或B/F)为纵座标, 以加入的Ag量(或其对数)为横座标。在标准曲线的适宜段上, 通过被测(未知)管的放射性, 即可读出被测物的含量

(图 1—1)。

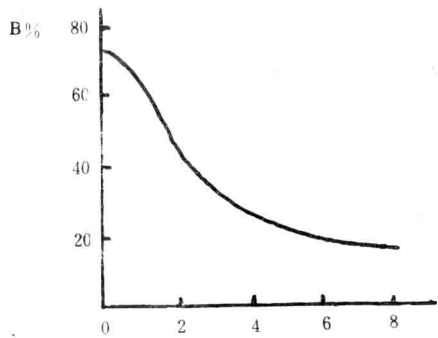


图 1—1 竞争结合抑制曲线示意图

上述的竞争结合反应，实质是抗原—抗体的免疫反应。三种试剂（Ag、Ag*、Ab）混合后，温育一定时间，使其反应达到平衡，形成抗原—抗体复合物（Ag*Ab、AgAb）。当开始温育时，结合和解离反应两者同时进行，最后达到平衡，可用下列反应式表示：



式中， K_1 为结合常数， K_2 为解离常数， $K = \frac{K_1}{K_2}$ 为平衡常数。

二、抗原和标准品

（一）抗原的性质

抗原（Antigen）在适宜的条件下，能刺激机体的免疫活性细胞产生抗体或致敏淋巴细胞，并能引起免疫反应，与抗体在体内外发生特异性结合的物质。

抗原一般都是异种或异物物质，自身的组织没有抗原性，但在外伤、感染、电离辐射及药物等影响下，可成为自身抗原。凡是有抗原性的物质，分子量愈大抗原性愈强；通常分子量大于10 000者有抗原性，小于5 000者无抗原性。抗原分子具备一定空间构型的特异性结构的化学活性基因，即抗原决定簇，如此决定簇具有环形基因物质（酪氨酸、苯丙氨酸等），且外露分子表面，易被免疫活性细胞所识别，免疫原性较强。抗原具有能与相应抗体发生反应的特异性，其特异性也取决于一定空间构型的抗原决定基因。

（二）抗原的种类

根据抗原的性能特点，可分为两大类，即完全抗原和不完全抗原，后者亦称半抗原。

- 1. 完全抗原：亦称免疫原，具有免疫原性与反应原性，即能刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞，并能与其产物在体内外发生特异性结合反应。属于完全抗原的都是异种蛋白质及复杂结构的大分子多糖质或糖脂蛋白复合物，能在体内久留，发挥异物的免疫刺激作用。
- 2. 不完全抗原：不完全抗原本身无免疫原性，仅有反应原性，即单独不能刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞，但能与相应的抗体或致敏淋巴细胞起特异性的结合反应。不完全抗原与蛋白质结合后具有完全抗原的特性，并保持其特异性；在这种结合物中，蛋白质具有抗原性，而不完全抗原起决定簇的作用。绝大多数多糖和所有类脂都属于不完全抗原。

（三）半抗原—蛋白质的制备

- 1. 载体的选择：小分子半抗原几乎与所有的蛋白质载体偶合后产生抗体。蛋白质类具

有很强的免疫原性，其表面或一端具有自由氨基和自由羧基，易于和半抗原结合。因此，蛋白质是制备半抗原首选载体。但是，选择蛋白质作为载体应从分子大小、溶解度、活性基团、免疫原性、取材方便及价格低廉等多方面考虑。常用的是牛血清白蛋白，其次是人血清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺球蛋白、聚-L-赖氨酸、牛血清 γ 球蛋白及聚谷酰胺酸等。牛血清白蛋白物理化学性能稳定、溶解度大、免疫活性高，便于化学处理，价廉易得，是较为理想的载体。

另外，有些非蛋白质，如多肽聚合物可作为半抗原的载体，能够诱发抗体的形成，排除抗蛋白质抗体对测定系统中抗原、抗体反应的干扰。有些免疫原性较弱的肽类激素（如ACTH等），可以和某些大分子聚合物或不溶性的颗粒以静电吸附注射动物，以便保持局部持续性强刺激而诱发抗体的产生。

2. 偶联剂的类型：小分子半抗原并无直接与蛋白质等载体偶联的基团，而是借助联结剂（缩合剂），结合成稳定的共价键，生成半抗原-蛋白质结合物。偶联剂的种类较多，常用的如表1-1。

表 1-1 半抗原与蛋白质偶联常用的试剂

偶 联 试 剂	水 溶 性	最佳pH	溶 剂	与 反 应 有 关 的 基 因	形 成 的 键
碳化二亚胺类： 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺·HCl(EDC) 1-环己基-3-(2-吗啉-4-乙基)碳化二亚胺甲基对甲苯磺酸盐(CMC) N,N'-二环己碳化二亚胺(DCC)	高 高 低	5.5 5.5 —	水 水 —	—NH ₂ —COOH	CO—NH CO—NH
二异氰酸化合物类： 甲代苯撑-2,4-二异氰酸盐(TDI) 二甲苯撑二异氰酸盐(XDI)	低 低	7.5~9.5	水 水	—NH ₂ 、酚基、 组氨酸残基	NH— R—NH
二卤化硝基苯： 1,5-二氯-2,4-二硝基苯(DFDNB) P,P'-二氯-m,m'-二硝基苯砒(FNPS)	低 低	8.5 10.0	丙酮 水	—NH ₂ 、酚基 组氨酸残基	NH— R—NH
重氮盐类： 双-重氮化联苯胺(BDB) 双-重氮化-3,3'-联茴香酸(BDD)	高 高	7.5 —	水 水	组氨酸残基 赖氨酸残基 酪氨酸残基	X—R—X
醛类： 戊二醛 甲醛	高 高	7.5 7.5	水 水	—NH ₂	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}=\text{C}-(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{C}=\text{N}- \end{array}$
异恶唑盐类： N-乙基-5-苯异恶唑-3'-磺酸盐(K试剂)	高	5.5	水	—NH ₂ —COOH	CO—NH

在选择偶联剂时,注意能够作用于半抗原的活性基团,与蛋白质结合的共价键应在半抗原特异性“决定簇”的背面,以利获得特异抗血清。同时,在半抗原和蛋白质相结合的反应过程中,要保持半抗原的化学结构不变,也不得引起蛋白质变性。

3. 偶联方法:偶联半抗原和蛋白质的方法很多,常见的有以下几种。

(1) 混合酸酐法:常用于甾体激素和蛋白质的偶联,如皮质醇-21-半琥珀酸-BSA是用此法合成的。其方法较为简单,通过氨基的蛋白质偶联于羧基的半抗原。

(2) 碳二亚胺法:此法是半抗原和载体蛋白按一定比例混合溶解后,加入碳二亚胺,反应一定时间,半抗原的羧基(或氨基)与蛋白质的氨基(或羧基)相结合。碳二亚胺除了使氨基和羧基形成肽键外,还可作用于单核苷酸和蛋白质结合成磷酸氨键。此法比较简单,所用碳二亚胺有水溶性和脂溶性两种,前者常用。

(3) 戊二醛法:此法很简单,是将半抗原的氨基偶联到蛋白质的氨基,以共价键方式结合。偶联时,将血清白蛋白与半抗原溶于缓冲液中,再慢慢滴加戊二醛即可得到半抗原载体免疫原。

(4) 对硝基苯酰氯-重氮化法:此法先将对硝基苯酰氯反应,使其脂肪胺转变为对硝基苯酰胺,后者可用催化加氢或其它方法还原为对氨基苯酰衍生物,再通过重氮化接到蛋白质的酪氨酸羧基上。

(5) 其他:有些小分子半抗原分子既无羧基又无氨基,故不能用偶联剂与蛋白质结合。对于这类半抗原,可视其化学性质,选择适当的反应条件,以获得带有羧基的衍生物。然后,再选择适宜方法与蛋白质偶联。如带羟基的半抗原,与琥珀酸酐在无水吡啶中反应;带酮基的半抗原,与O-(羧甲基)羟胺反应;带苯酚基的半抗原,与一氯醋酸钠反应,这些反应皆可生成带有羧基的半抗原。

(五) 标准品

在放射免疫分析中所得数据,再根据已知一系列标准品的不同含量,绘制成标准曲线,即可查出被测样品含量。因此,标准品质量好坏,含量准确与否,可直接影响样品含量的测定。标准品一般为人或动物体内的某些蛋白质或人工合成的短肽、甾体等。选用的标准品,其免疫活性应与待测样品基本一致,而且不含有干扰放射免疫的物质,同时取之较易,贮存稳定。另外,在标准品中应含有与测定样品中相同的蛋白含量,如大鼠FSH标准品的配制要用去FSH正常大鼠血清配制,这样测得的大鼠血清中FSH含量,不致于由于反应管中的蛋白含量的不一致而影响结果。

建立一种新的放免分析体系,必须配制成一系列标准品。一般,先将提纯的抗原经某种可靠的方法(如凯氏定氮法)测定,计算出蛋白质含量,然后配制成一系列不同含量的标准品,此为第一标准。采用纯抗原作为第一标准,往往满足不了实际工作的需要,必须根据第一标准再校正出第二标准,供实验室或临床应用。如国外已建立某种放射免疫分析方法,且有药盒供应,或WHO已有统一标准品,可设法购买或索取,校正出第二标准,以求统一,便于大量应用。

标准品多采用冻干品,如贮于 $-20\sim-40^{\circ}\text{C}$,1年内不会有变化。对于液态标准品,不宜反复冻融,以免影响免疫活性。另外,不要经常更换配制的标准品,以免由于各次配制的误差而影响实验的动态观察。