

高效价兔抗小鼠 IgG 抗血清制备

王 珏 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物研究所)

在免疫学技术中,如放射免疫,免疫酶标技术,免疫荧光等方法常用标记的第二抗体来检测小鼠抗原特异性抗体,包括单克隆抗体的产生。如何获得高效价的兔抗小鼠抗血清,是一个重要的技术问题。经常遇到的一个问题就是所获抗血清的效价常不够理想^[1,2]。我们在前人的基础上就免疫方法和鉴定方法略作改变,获得了较高效价的兔抗小鼠 IgG 抗血清。其过程如下:

一、动物

Bald/CJ 小鼠及家兔来自我所动物房。用 6 月龄左右雄性家兔作免疫用。

二、兔抗小鼠 IgG 的制备用免疫吸附柱方法见^[2]。

三、小鼠 IgG 的分离

方法见^[2]。

四、免疫方法

试验共分三组(第一组 10 只兔,第二组 10 只兔,第三组 5 只兔)免疫程序分别叙述如下:

第一组:首次免疫用 1 毫升内含 200~300 微克的小鼠 IgG,加等量弗氏完全佐剂(羊毛脂:石蜡油=1:4,内含 B、C、G 为 1 毫克/1 毫升),背部皮下多点注射。以后每二周以同样方法和剂量注射一次,但用不完全佐剂代替完全佐剂。至第七次注射,改为 600 微克小鼠 IgG。注射后 7~10 天采血,分离血清,测效价。

第二组:首次用 1 毫升内含 1 毫克小鼠 IgG,加完全佐剂,皮下注射,二周后用 1 毫克小鼠 IgG,加不完全佐剂皮下和肌肉注射。第三次为 1.5 毫克小鼠 IgG,注射方式同上,第四次

和第五次为 2 毫克小鼠 IgG 肌肉注射,间隔时间均二周。采血同上。

第三组:首次加完全佐剂,皮下注射,每兔 1.5 毫克小鼠 IgG。第二、三次注射量分别为 1.5 毫克和 2 毫克小鼠 IgG,加不完全佐剂,均肌肉注射。每次注射间隔二周。采血同上。

五. 抗血清效价和特异性鉴定:用琼脂扩散鉴定法。血清稀释剂为 0.01 MPBS pH7.4。稀释兔抗小鼠 IgG 血清自 1/2~1/4096 置周围孔;1:10 或 1:20 或 1:30 稀释的混合 Balb/CJ 小鼠血清分别置中央孔中。为检定抗血清的特异性,将羊抗小鼠 IgG、IgM 和 IgA 标准血清*与待测抗血清同时与稀释的 Balb/CJ 小鼠血清反应,只有与抗 IgG 标准血清呈完全融合的抗血清才被认为是抗 IgG 血清。

除第二组和第三组各死 1 只兔子外,其余 23 只兔血清效价测定结果列于表 1。

从表 1 可见,第二组和第三组平均效价明显优于第一组。第二组和第三组中有 4 只效价低于 64 以下的兔。于 2 周后再注入 2 毫克小鼠 IgG(肌肉和皮下),七天后采血,效价变化如下:(1)从 64 升到 256,(2)从 32 升到 128,(3)效价为 32,未见改变,(4)从 64 降到 32。江世益等^[1]用加弗氏完全佐剂注射三次,小鼠 IgG 总量为 7.5 毫克,注入兔后足掌皮下和膈淋巴结,所得效价为 64。陈登鸿等^[2]采用相同方法,但只注射二次,小鼠 IgG 总量为 3 毫克。所得抗体效价除一只兔大于 64 以外其余均在 32 以下。为制备效价较高的标

* 羊抗小鼠 IgG、IgM、IgA 系美国 Buffalo Medical College 谢广美博士赠送。

表 1 三组实验动物抗体效价的比较

组 别	动物只数	抗 体 效 价	每兔接受 IgG 总量
第一组	10	64,32,32,32,32,16,16,16,8,4	2.4 毫克
第二组	9	1024,256,256,256,256,256,128,64,32	7.5 毫克
第三组	4	512,128,64,32	5.0 毫克

记化合物,有必要提高抗血清的效价。第二组和第三组均用数次肌肉注射,并改用弗氏不完全佐剂。我们通常以 1:20 稀释的混合小鼠血清作效价测定时效果最好。

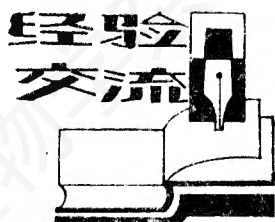
用荧光标记的兔 Ig 抗鼠 IgG 染活细胞,膜荧光清晰可见。

(参加本工作的还有车裕芳、章应慧、王润田、张

建伟和吴夏君等同志。)

参 考 文 献

- [1] 江世益等 1982. 上海免疫学杂志 2(2): 11-14.
- [2] 陈登鸿等 1983. 上海免疫学杂志 3(4): 223-227.
- [3] 孔宪涛 1980. 上海第二军医大学长征医院 159~161.



鱼类外周血染色体的简易制备法

王 绳 琦

(江西大学生物系细胞室)

在制作鱼类外周血细胞染色体时,通常需采用 Ojima 等和 Heckman 等建立的淋巴细胞培养法。最近,我们未采用淋巴细胞体外培养,制得了尼罗罗非鱼、草鱼、江西万安玻璃鲤鱼等数种鱼类外周血淋巴细胞的染色体中期分裂相(图略)。具体方法如下:

1. 将预先饲养在池塘网箱或室内水族箱中的成鱼自水中提出,用布包住鱼体(臀鳍以下裸露),使仰卧,然后用碘酒和 70% 酒精消毒臀鳍基部皮肤。将吸有用鱼类生理盐水稀释的 2% 植物血球凝集素(广州市医药工业研究所出售的 PHA 冻干注射剂)液的注射器的针头沿鱼体中线、臀鳍基部后鳞下刺入锥体腹部血管弧

中,轻抽注射器,有血液涌入即证明已插入。注射 PHA 液(用量见表 1)。

2. 把鱼放回,继续饲养 2—3 天后提出水,仿 1 法向血管弧中注入 0.2% 的秋水仙素液(用量见表 1)。4 小时后即可采血。

3. 用预先经肝素(500 单位/毫升)浸润过的洁净注射器自鱼体尾动脉中抽取血液 1 毫升左右,注入小试管中。加入 0.5 毫升鱼类生理盐水溶液,混匀,静置 30—60 分钟。

4. 用吸管吸取富含白细胞的上、中层液体约 0.5—0.6 毫升,移入另一试管中,加入 0.06 M 氯化钾液 1 毫升,低渗处理 10—20 分钟。然后,取一大型培养皿,底部平行放置二

表 1 注射药剂用量表

成鱼体重(克)	150-200	200-250	250-300	300-350	350-400	400-500
植物血球凝集素(毫升数)	0.15-0.20	0.20-0.26	0.26-0.32	0.32-0.40	0.40-0.48	0.48-0.65
秋水仙素(毫升数)	0.12-0.16	0.16-0.20	0.20-0.26	0.26-0.33	0.33-0.40	0.40-0.50