

免疫学习班资料汇编

• 下 册 •

首都医院基础医学组

免疫班筹备组

1974年7月

下 册 目 录

- 十二、 放射免疫
- 十三、 荧光抗体的应用
- 十四、 细胞免疫及其测定方法
- 十五、 干扰素和干扰素诱导剂
- 十六、 巨噬细胞及吞噬细胞
- 十七、 肿瘤抗原
- 十八、 IgE 的结构、功能及临床应用
- 十九、 免疫无反应性及先天缺损
- 二十、 非特异性免疫
- 二十一、 天然抗体(血型抗体)
- 二十二 超敏感性

第十二讲

同位素免疫技术

一、前言：

同位素示踪技术在免疫学的各个方面有着广泛的应用，其中有一个领域，它把同位素技术与免疫化学技术有机地结合起来，使之兼备二方面的特征，并不断地扩大着应用范围，放射免疫（RIA），免疫沉淀自显影，以及放射性标记抗体的定位应用等可以作为这一领域的一些重要代表；前二者也是本文重点介绍对象。

抗原与抗体之间的相互作用是免疫化学反应的基础。它具有较高的特异性。在同位素免疫技术中，应用了放射性标记的抗原或抗体，只要这种标记并不严重影响有关反应的决定簇，那么，起这种特异性反应的能力依然保持着，由于免疫反应体系中含有放射性同位素，后者所固有的高灵敏度，便于定量以及可以精确定位等特点也被吸取进来，使这种“技术杂交”的产物具有重要的应用潜力。

同位素免疫技术的发展虽然祇有十几年的历史，但它的进展非常快，在肿瘤学，内分泌学，药理学，微生物学等许多方面已经得到了广泛的应用。无论在理论研究或在实际应用上都取得了不少重要的进展。文化大革命以来，同位素免疫技术在我国发展很快，就在肿瘤的临床诊断方面，也已经建立了甲胎蛋白，CEA，绒毛膜促性腺激素等肿瘤相关抗原的同位素免疫测定并在临床上得到应用。其中甲胎蛋白的测定已开始应用于肝癌高发地区（包括农村在内）的大规模普查工作，正在肝癌防治实践中发挥其作用。

二、抗原的放射碘化及合格抗体的制备：

1. 抗原的放射碘化：

同位素免疫技术中广泛采用放射性标记的纯化抗原（包括半抗原在内）常用碘或氢的放射性同位素进行标记（ ^{131}I , ^{125}I , ^3H ）。由于碘化过程对绝大多数的被研究的抗原对象均可进行，易于获得高比放射性，而且标记及测定方法均较经济简便，因此放射碘化已成为比较通用的主要标记方法。不仅对抗原如此，对抗体也同样适用。

在放射碘化的各种方法中，氯胺T法比较简单效果也好，因此最多采用。此法的化学实质可理解为：放射性碘离子在较温和的氧化剂氯胺T的作用下，氧化成活泼的中间产物，（其形式尚未搞清楚），后者取代了多肽链中酪氨酸苯环上的一个或二个氢，使之成为含有碘化酪氨酸的多肽链。由于多肽链中含有放射性碘原子所取代的成分，这样，它就带有放射性了。如果每个抗原分子平均含有一个放射性 ^{125}I 原子，这样碘化程度的抗原的比放射性水平约为100微居里/微克（分子量为20,000的蛋白质）。

具体标记的细节随不同的标记对象和要求而有所变动，下面以甲胎蛋白为例，介绍用国产放射性碘制备比放射性高于30微居里/微克的碘化甲胎蛋白（分子量 $\approx 67,000$ ）的程序，反应容器用2cm高中1cm的圆底短试管，预先加0.05ml pH7.5 0.5M磷酸缓冲液，烤干。室温下，依次加入下列试剂，并保证良好的搅拌，

0.05 ml 甲胎蛋白 (20r 总蛋白)

0.05 ml $\text{Na } ^{131}\text{I}$ ($\approx 4 \text{ mC}$)

0.05 ml 氯胺T (400 r)

↓ 室温下，有效搅拌3~5分钟，再加

0.20 ml 偏重亚硫酸钠 (800 r)

0.10 ml 1% KI

0.45 ml (总体积)

↓ 经 Sephadex G25 (体积约20ml) 取其第一放射性峰的洗脱液 (约在9~12 ml 范围内)

↓ ^{131}I -甲胎蛋白

上述碘化所用的氨脲T量较大，主要为了去除 Na^{131}I 制备中所含还原剂影响以获得较高标记率，偏重亚硫酸钠是还原剂，用以中和氨脲T的作用以终止碘化反应，所用量一般为氨脲T的二倍。KZ是作为放射碘离子的载体引入的，用以减少蛋白分子上数量不稳定的被吸附着的放射碘离子，反应完毕后进行凝胶过滤除去 $^{131}\text{I}^-$ ，即可得到大分子的 ^{131}I -甲胎蛋白供有关的实验应用。

免疫测定中往往需要比放射性高的标记抗原，为了避免抗原的辐射损伤并减少防护要求，所用放射碘离子的量一般控制在5毫居里范围内。为了得到高比度，要考虑到如下条件：①所用抗原的量尽可能少些（5~10 μg ）。②所用 NaI^* 制剂具有较高的比放射性及同位素丰度，应及时用新鲜制备的同位素制剂。③尽可能减少碘化反应的溶液体积以增加作用物浓度。④保证反应在最佳pH的范围内进行。⑤应用足够的氨脲T量以促进碘化反应。应该指出，提高比放射性是有一定限度的，它将影响标记物质的免疫活性，因此，一般遵循的原则是：在免疫活性不受明显影响的前提下寻求尽可能高的比放射性。

尽可能减少标记损伤是进行成功标记所面临的另一个重要问题，由于在标记过程中，抗原分子受到电离辐射的作用，氧化剂还原剂等化学因素的影响，以及碘化本身所造成分子结构的改变（碘化酪氨酸的生成），这些都可以造成一定程度的损伤，表现为碘化后的抗原免疫活力下降。有些抗原以及抗体球蛋白，特别在纯化过程中曾经受过比较剧烈的理化因素的作用而有所改变的背景下，标记损伤更容易发生。为了减少或避免损伤，必需分析可能造成的原因并加以控制；必要时，尚需改变碘化的方法，例如，采用酶促碘化或者用连接法标记等新的碘化方法解决此矛盾。

对于一些不能尽行碘化的非抗原物质，例如固醇类激素，核苷类药物等。可以制备 ^3H 标记的有关化合物。但为了减少测量

上的困难而提高敏感度，近年来也采用间接碘化的方法。对于本身不能直接碘化的半抗原分子可以采用间接的方法进行标记，这种方法目前应用很广泛，其基本途径是：将便于碘化的酪氨酸的衍生物经过“连接剂”的作用接到半抗原分子上，选择所接的部位，使半抗原的决定簇，充分保持其活性，碘化过程可以在“连接”前或“连接”后进行。以CAMP为例，首先用“连接剂”琥珀酰肼作用于CAMP形成2'-O-琥珀酰肼CAMP，然后与酪氨酸甲酯缩合成复合物，最后按氨基T法进行碘化得到所需的标记半抗原。它的结构虽与待测的CAMP不同，但仍然保持着相同（或很相近）的抗原活性。类似的碘化方法也可以用到固醇类激素，地高辛等药物，以及其他一些有生物活性的小分子物质，这样，不仅使标记程序和测量过程得以简化，而且可以提高标记物质的比放射性。应该指出，这样标记的半抗原免疫活性易受影响，应加以注意，有关这一领域的详情可以参阅专门的文献⁽²⁾⁽³⁾。

最后，提一下碘的放射性同位素、 ^{131}I 和 ^{125}I 之间的选择问题，从应用角度来看，它们的特性可列下表进行比较。

	^{131}I	^{125}I
半衰期	8天	60天
100%丰度的比放射性	125mCi/ μg	18mCi/ μg
无载体新鲜制剂的丰度	<20%	>80%
计数效率（一般井形）	<40%	>80%
一般测量的本底	低	高
X光底片感光效果	快	慢
放射自显影的分辨率	差	高

根据不同的实验要求，制剂的规格，仪器的条件等情况，可以相应地作出合理的选择。这些问题，在以下的章节中还要提到。

二、合格的抗体的制备：

制备合格的抗体是同位素免疫技术中另一个关键性问题，所谓合格是指抗体的特异性，活度 (avidity) 及滴度能满足实验的要求，特别是前面两个特徵。特异性的意义是显而易见的。活度的含意在此作一些说明。所谓活度是指抗体与有关抗原起反应的亲和力，活度高表示形成复合物的速率快，而且很少解离，在量上，可以用有关抗原抗体反应的平衡常数 K 值的大小来标志， K 值大的抗体，活度也相应的高，制备中选择高活度的抗体在放射免疫测定中特别重要，因为这是决定敏感度的一个重要因素。

同位素免疫技术虽然广泛开展，但如何有把握地获得上述三项性能指标上均属满意的抗体，这一重要的技术问题，还没有很好的解决。下面简单介绍目前对有关影响因素的一些看法。

(1) 免疫元：一般说来，分子量在 5,000 以上的蛋白质容易刺激高活度抗体的生成，分子量在 5,000 以下的多肽，其免疫元性较差，虽然有些作者成功地制备了 8 肽~10 肽的抗体，但另一些却认为有必要结合上载体蛋白。

非多肽性的化合物，例如类固醇，甾苷， T_3 ， T_4 ，单核苷酸等，可以认为是半抗原，这些物质必需结合上一个大分子载体后才能刺激抗体的生成，但它仍单独存在时，可以与相应抗体起作用，一般说，如果载体本身的免疫活性较强，以及所结合的半抗原分子数多一些，则抗体反应也相应地增大，抗体的特异性与半抗原分子上交连的部位有关，由于空间位置的影响，抗体主要“识别”与交连点最远隔的部位，因此，考虑半抗原的抗体的特异性时，必需要选择好交连部位。

对免疫原的纯度要求如何？一般说，为了保证抗体高度的特异性，免疫元制品中，应不含化学结构上相近似的杂质，在这类上是要求“高纯度”的。其他的一些杂质，影响不大。

(2)佐剂：一般认为，用Freund佐剂的效果是最好的，第一次注射，用完全佐剂；如需要进行第二次加强注射时，可采用不完全佐剂。为了便于制备良好的乳剂，可用一分免疫原的水溶液加到二分佐剂油液中调匀制备。（常用1:1比例）。

③动物品种：一般首选兔，其次为豚鼠。一般说，动物品种的意义并不很大。胰岛素选用豚鼠制备抗血清可以看成是一种例外。同位素免疫技术需用血清量很少，因此量的问题不突出，由于动物对免疫原反应的个体差异很大，因此，增加免疫动物的数量，也增了获得合格抗血清的机会。

为了制备双抗体，往往用兔或豚鼠的血清，经硫酸铵法初步纯化得 γ 球蛋白后，在山羊或马上进行免疫注射，一般均可获得高效价的抗兔或抗豚鼠的球蛋白的抗血清。

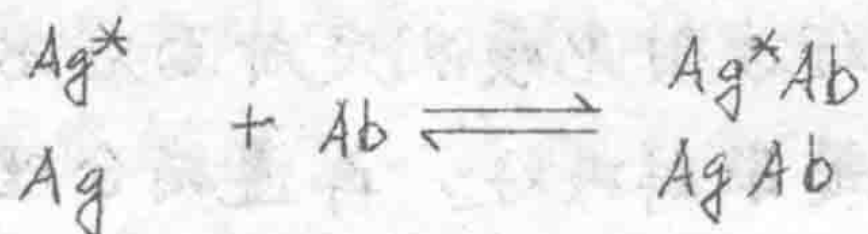
④注射的途径：静脉注射的效果不好。可以用皮下或肌肉注射，但当免疫原的量少而弱，而且希望较快地得到刺激效果时，近来常推荐采用另外二个注射途径。其一为多点皮内注射法：用1ml左右的乳剂（内含1mg以下的免疫原）在兔体表数十处进行皮内注射，不必进行第二次加强注射。另一方法采用淋巴结内注射，用量更少，伴不完全佐剂。如能保证注入结内，也可以获得很好的效果。

⑤剂量和进程的掌握：为了获得高活度的抗体，所用免疫原的量尽可能少些，注射之间的时间尽可能拉长些，这是一条比较重要的经验守则。一般用数百微克的抗原量已足。在用多点皮内或淋巴结内注射法时，可以不用加强注射，免疫后六周开始试血，随着时间的进程，效价变化不大，活度可能上升，可以根据锁定的结果选择合适时刻收取抗血清，必要时经吸收后，分装放低温冰箱（ -40°C 以下）中长期保存。

三、放射免疫测定 (Radio immuno assay, 简称RIA):

(一) 基本原理:

以抗原抗体的系统为例, 标记的抗原 (Ag^*) 与有限量的抗体相互作用, 形成带有标记抗原的复合物 (Ag^*Ab)。



由于浓度很低, 此复合物处于溶解状态, 当达到平衡时, 放射性按一定比例分佈于自由形式的 Ag^* 与结合形式的 Ag^*Ab 之间。当体系中又存在着一定量的非标记的抗原 (Ag) 时, 由于 Ag 与 Ag^* 二者具有相同的决定簇, 因此彼此竞争着与有限量的抗体起作用, 分别形成了相应的复合物。因此, Ag^* 与 Ab 结合而形成的 Ag^*Ab 的量比原来要减少了。减少的程度取决于“竞争者” Ag 的浓度。显然, 作为标准物或被测血清而引入的 Ag 竞争性地抑止了 Ag^* 与有限的抗体的结合量。引入的 Ag 量愈大, 抑止程度也更大, 这种特异的竞争性抑止的数量关系就是放射免疫测定的定量基础, 常用抑制曲线来表示抑制的程度与抑制物浓度二者之间的函数关系。抑制曲线的表达方式很多, 最便于理解的且也经常选用的是以结合状态的放射性% ($\frac{[Ag^*Ab]}{[Ag^*] + [Ag^*Ab]} \times 100\%$) 为纵座标, 抑止物浓度 ($[Ag]$) 为横坐标所作的半对数曲线。用标准的一系列 $[Ag]$ 作出曲线后, 根据未知样品所得的结合% 查出相应的待测抗原的浓度。放射免疫测定的基本原理简单说来就是这样。

基于竞争性抑制原理的这种测定不仅适用于抗原抗体系统也同样适用于其他特异性的有高度亲和力的系统, 例如, 一些激素或药物及其相应的受体。因此, 这一类测定方法概括称为竞争性测定 (Competitive assay) 可能更合适些。从当前的发展趋势看, 更多地选用抗原抗体系统。因为用免疫系统建立起来的测定方

法，性能比较优越。

(二)测定程序：

高质量的纯化标记抗原（免疫活性好，比放射性高），合格的抗体（特异性佳，活度高）以及分离自由和结合份放射性的合适技术（分离效果好，操作简便）是进行放射免疫测定所面临的三个关键性技术问题。如果这些技术问题能解决好，再遵循合理的操作程序，那么放射免疫测定是不难建立的，有关的程序要实如下：

(1)稀释液的制备与纯化标记抗原用量的确定：

一般用0.05M， $\text{PH}=7.5$ 的磷酸钠盐缓冲液，其中加入少量的动物血清（马、兔等），这样的理化环境对抗原抗体反应的进行是适宜的，其中动物血清（一般加到1或2%）的作用是提供一定的载体蛋白以克服管壁对微量抗原抗体的吸附，并使这些物质微量存在时免受非特异性因素的作用而失活。所选的动物血清必须经检定不含Ag或类似的能起交叉作用的物质。这样的稀释液比原先常用的含牛血清蛋白者更为有利。实验中，标记抗原，Ab等都用它来配制，标准Ag或待测样品可以用它稀释，或者采用成份相近的其他液体（包括人血清在内）。

纯化的标记抗原（ Ag^* ）的量如何选定？一般根据测定所需的敏感范围（抑止曲线的直线区）以及放射性测量的要求而定，以 AFP^* 为例，临床上重要的范围是 $20\sim 500\text{ ng/ml}$ ，可以选用竞争者 AFP^* 的浓度为 50 ng/ml 。由于实验时，血清常用50倍稀释（ $20\mu\text{l}\sim 1\text{ ml}$ ），因此，加入每支试管中的 Ag^* 量为 1 ng 。反应液总体积若为 1 ml 则相当于 50 ng/ml 血清中胎蛋白的“竞争力”。新鲜标记 Ag^* 的放射性水平用 ^{131}I 时最好达到 $20,000\sim 40,000\text{ cpm}$ ，用 ^{125}I 时可降低到 $10,000\text{ cpm}$ 左右。随着时间的推移，加入的 Ag^* 量保持不变，根据放射性衰减的程度相应的延长测量时间，这样初步考虑适当的 Ag^* 需要在制作标准曲线过程中，根据直线区是否符合要求而适当增减其量。

以达到最后确定。尚需指出者，在采用后加 Ag^* 以增加敏感度的操作中，所用 Ag^* 的量可以比上述情况增加数倍而不改变直线区的位置。

(2) 分离技术的选择：

自由与结合部份的放射性物质的分离在放射免疫测定中是一个很重要的环节。文献上介绍了许多种物理化学或免疫学的技术。实际上，分离效果既好，操作又简便的方法主要就是下列几种，前二者更为常用。

双抗体法：这是一种通用的方法， Ag^* 与相应的抗体（兔 γ 球蛋白，称第一抗体）形成的复合物由于量少而处于溶解状态，当加入了在另一种动物上免疫生成的抗兔 γ 球蛋白的抗体时（马或羊抗兔 γ 球蛋白的抗血清，称第二抗体）形成了相应的复合物沉淀，将 Ag^*-Ab_1 带了下来，因此， Ag^* 处于上清液中， Ag^*Ab_1 在沉淀内，便于分离测量。应用时，要少量加入正常兔血清以促进沉淀物的生成，为此，要实验确定需要加入的兔血清量以及第二抗体的量，然后在 $4^{\circ}C$ 下保温16小时以上，取出后离心分离。双抗体法对各种体系均适用，分离效果很好，操作也方便。主要缺点是双抗体消耗量大，测定时间也比较长。虽然如此，它仍然是放射免疫测定中最主要的分离方法。

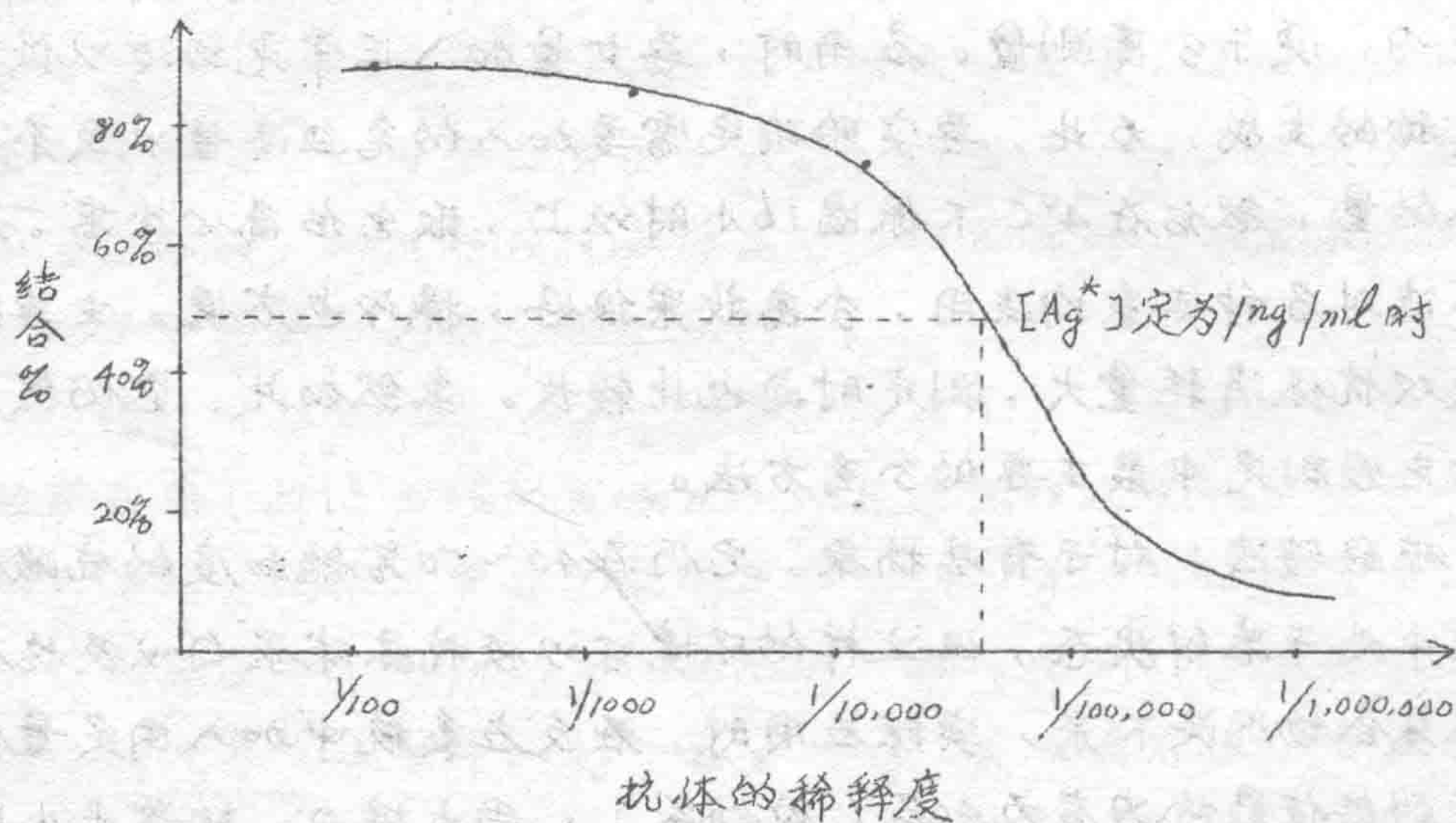
硫酸铵法：对于有些抗原，它们在40~50%饱和度的硫酸铵溶液中处于溶解状态，但这样的环境可以使抗体球蛋白以及抗原抗体复合物沉淀下来，实际应用时，在反应系统中加入固定量饱和硫酸铵使最终浓度为40%（或50%），用力摇匀，静置半小时，然后在4000 cpm转速下离心30分钟， Ag^* 在上清液中，而 Ag^*Ab 与其他 γ 球蛋白等均处于沉淀中，整个分离过程的温度要求一致，这个分离方法及所用试剂比较简单；但它适合于一部分抗原，而且当含量很低时分离效果不稳定，在AFP, CEA及一些半抗原的

测定中，用硫酸铵法还是可以得到满意的结果。

固相抗体法：将第一抗体（或第二抗体）经初步纯化后连接到活化的 Sephadex 或 Sepharose 珠上，制成免疫吸附剂，这种小球将结合 Ag^* （挂上第一抗体时），或 $Ag^* Ab_1$ （挂上第二抗体时），并使分离操作大为简化，固相抗体法目前尚在发展，其应用价值有待进一步确定。

(3) 抗体滴定曲线的制作：

应用选定量的 Ag^* ，与不同稀释度的抗体在 $4^{\circ}C$ 下作用以达到接近平衡（一般为48小时），然后经上节所述方法分离，测得每一个反应管的结合%，即 $\frac{Ag^*}{Ag^* + Ag^* Ab} \times 100\%$ 。以结合%为纵坐标，以相应的抗体稀释度为横坐标，所得的曲线称抗体的滴定曲线，见下图：



滴定曲线很重要，首先，它反映了 Ag^* 及抗体的一些重要性能，例如，曲线左侧表示 Ag^* 最大的结合率，它取决于 Ag^* 的免疫反应活性以及抗体的活度，尤其是前者。一个制备良好的 Ag^* ，其最大结合率往往超过90%。滴定曲线右侧的极限，即不含抗体时 Ag^* 的最低结合率，反映了 Ag^* 的理化特性以及分离技术的效能。这个数值

一般在5%左右，曲线的倾斜区所佔的横坐标部位反映了抗体的效价，效价在放射免疫测定中並不佔重要的地位。

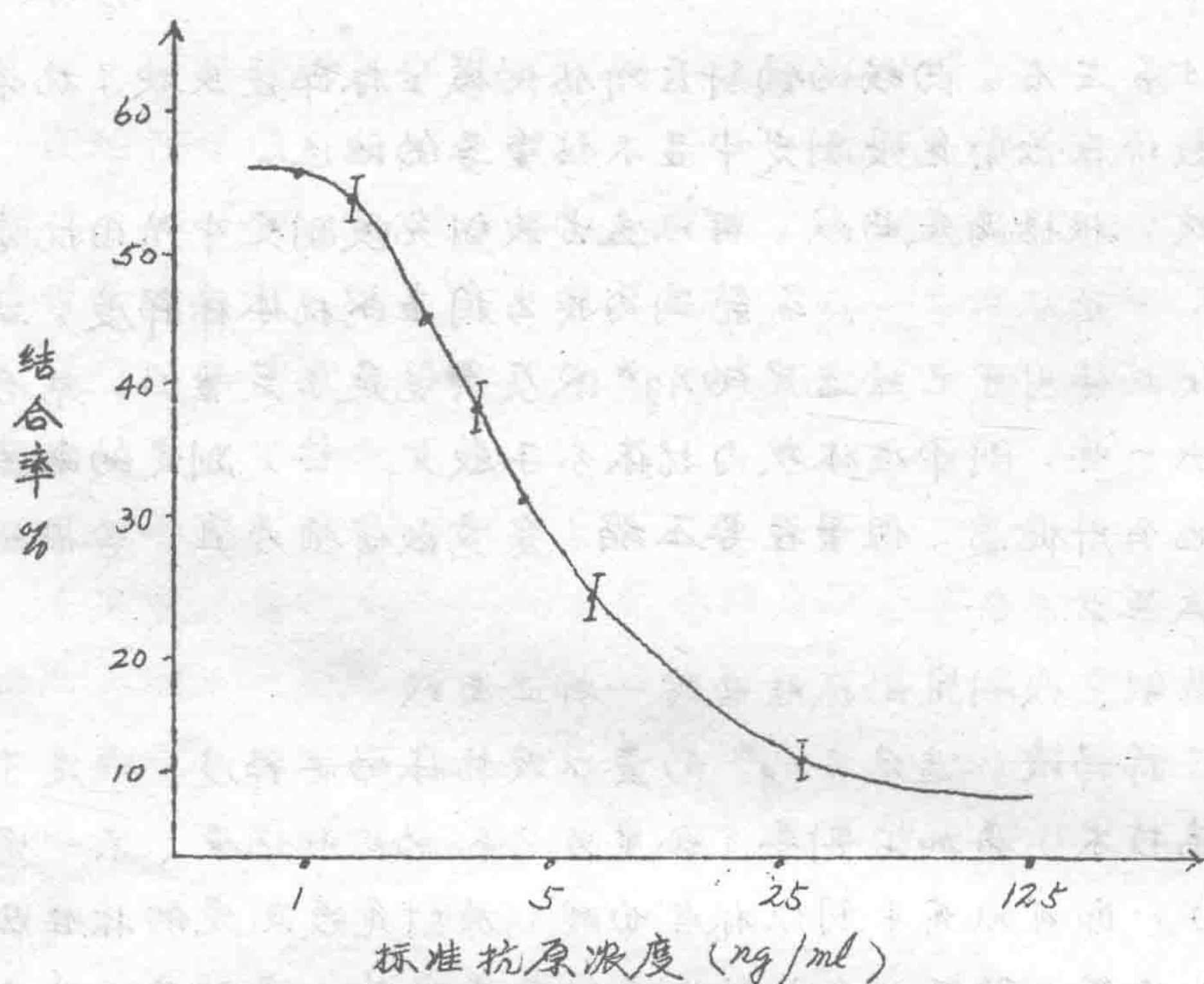
其次，根据滴定曲线，可以选出放射免疫测定中所用抗体的稀释度，一般从50%~70%范围内找出相应的抗体稀释度。这样稀释度的抗体对于已经选定的 Ag^* 浓度来说是不足量的，结合率若选得低一些，则单位体积内抗体分子数少一些，测定的敏感度也相应地有所提高，但量程要压缩，究竟取何值为宜，要根据实验的具体要求而定。

(4) 放射免疫测定的标准曲线——抑止曲线

有了稀释液，选定了 Ag^* 的量以及抗体的稀释度，确定了合适的分离技术，再加上制备了含量为已知的标准抗原（不一定是纯化的），即可以着手制作标准曲线，放射免疫测定的标准曲线，亦称抑止曲线，既可以反映该测定的基本性能（灵敏度，精确度，准确性及特异性），本身又是定量测定的依据，因此，它是一条关键线。这条关键性曲线能否做好，主要取决于前几节所述的一些程序是否已经落实。

具体制作曲线时一条重要的原则是：除抗原的数量外，每一试管中其他的因素和条件尽可能保持相同，其中包括溶液体积，理化环境，蛋白浓度， Ag^* 的量，抗体的最终稀释度等。如将来被测物是血清，则标准抗原最好用除去该抗原（一般用免疫吸附剂）的人血清来稀释，加入的体积亦与被测血清用量一致（例如用20 μ l或50 μ l），如这未能做到，则需选择被测血清的稀释度使血清中非特异性干扰因素的作用可以忽略不计，这样做，敏感度当然会受到一定影响。

~12-12~



标准曲线的一个具体型式如上图所示，曲线的横坐标为标准抗原的浓度，常用对数刻度表示。随着标准抗原（“抑制物”）浓度的增加，它将更多地争夺到有限量的一些抗体分子而与之结合，这样使 Ag^* 所能结合的量要减少，反映在结合%的相应下降。显然，在一些试管中不加标准抗原，而加相同体积的被测物时，则可以从所得的结合%，由曲线查得相应的抗原浓度，这就是放射免疫测定的最后一道程序。

标准曲线斜率最大的区域常呈一条直线，也是该项测定的工作区。直线区左端弯曲部份的横坐标反映了可以准确测得的最低浓度，即敏感度。重复测定的离散程度（用±标准差表示之）及曲线的斜率决定着有关范围的误差大小，即精确度，方法的准确性（可靠程度）常用回收试验来确定，对于大分子的抗原性物质，只要 Ag^* 纯度高，抗体制备合格（包括吸收架抗体在内），则特异性可以得到保证。对于小分子半抗原性物质，则需要用分子结构

相近的物质作交叉抑制的试验来确定，有关放射免疫测定性能的最后鑑定及其提高途径将随具体实验对象而定，详情可以参阅本文末所附文献资料。

(三)应用：

放射免疫测定发展很快，到目前为止，应用范围已很广泛。下表简单列举一些已经建立的放射免疫测定项目。

一、激素：

多肽及蛋白类激素：垂体前叶激素（包括 LH, FSH, TSH, GH, ACTH 等），垂体后叶激素，甲状旁腺激素，胰岛素，绒毛膜促性腺激素，血管紧张素 I、II，肾素，胃素等。

半抗原性激素：T₃, T₄；皮质类固醇；性激素；前列腺激素等。

二、肿瘤相关抗原：

胚胎性抗原：甲胎蛋白，CEA 等。

“异位”激素：绒毛膜促性腺激素，ACTH 等。

三、药物：

地高辛，吗啡，巴比土类等。

四、传染病及寄生虫病的病原体抗原：

肝炎相关抗原 (H.A.A.)，血吸虫抗原等。

五、其他：

CAMP, CGMP, 五羟色胺，叶酸，B₁₂ 等物质。

此表虽仅列举一些有代表性的项目，即使很不完全，但从应用的角度反映了二个重要的内容：(1) 放射免疫测定是微量测定技术中一个重要的新进展，它具有很高的敏感度和特异性，既适用于大分子，也能应用于小分子物质。(2) 这些技术在医学的一些重要领域中得到了应用，而且已经取得和正在取得有意义的进展。

四、免疫沉淀自显影：

多价的抗原与抗体相互作用可以形成沉淀物，这是次级免疫反应中一个重要的形式，当同时选用标准抗原或抗体作指示时，这种反应具有很高的特异性，一般常用的免疫沉淀反应可以分为如下四种基本类型：

自由扩散 { 双向扩散 (包括一般的免疫电泳)
单向扩散

电场作用下扩散 { 双向电扩散 (常称对流电泳)
单向电扩散 (常称火箭电泳)

(一) 基本原理：

在免疫沉淀试验中，不论采用那一种类型，如沉淀物量太少而肉眼看不见时，可以用标记的抗原，或标记的抗体藉放射自显影来显示有关免疫沉淀物所具有的形状和所在的位置。这就是免疫沉淀自显影的基本原理所在。这种方法的重要特征在于：它既保持着高度特异性，同时，由于同位素的引入又显著增加了敏感度，也无需特殊的测量设备，敏感度一般可以提高100倍左右。

现就火箭电泳自显影为例作进一步说明。在加有被测样品的孔内，再加入量少于被测抗原的高标记纯化抗原，在电场下，二者将一起泳动，并共同组成统一的免疫复合物沉淀，这种带有标记的纯化抗原只能选择地参入到相同的免疫体系内形成相对的集中，因此，它决定着反应的高度特异性。为了强调这个特征，我们将此现象称为“晶格”参入。同时，由于使用高纯度的标记抗原，放射性的利用率很高，背景乾淨，因此敏感度可以增加得更显著（以甲胎为例，可以增加500倍左右）。所加入标记抗原的显很少，它并不干扰测量结果，相反，可以作为指示剂以避免抗原量过多所造成常见的沉淀反应的假阴性。因此，大大增加了测定的“量程”。火箭电泳自显影也可用标记抗体进行。用标记第一抗

体时，可以在经实验确定的合适稀释度的抗体琼脂内再加一定量的标记抗体铺板，同样电泳后，洗去未结合的抗体，用自显影显示出沉淀线形。此外，也可以用标记的第二抗体浸润洗“净”的琼脂板，再经洗涤后，用自显影显示有第二抗体参与形成的沉淀线。在没有纯化抗原的情况下，用标记抗体的方法可以把敏感度增加到50倍以上。但由于标记抗体一般不是“纯”的，而且分散在整个板上，因此，特异性和敏感度受到一定的限制。

对于不能形成免疫沉淀的物质（如小分子的半抗原）免疫沉淀自显影法不适用。测定浓度很低的多价性抗原时，（例如，AFP的浓度 $< 5 \text{ ng/ml}$ 时）用此法也有困难。

（二）测定程序：

免疫沉淀自显影方法的类型很多，测定程序上也有不少差别，下面就纯化抗原参入的火箭电泳自显影定量测定甲胎蛋白为例将其程序要略作一介绍。

高质量的纯化标记抗原的制备是本法的技术关键所在，它决定着特异性与敏感度的水平。与放射免疫法相比，晶格自显影法对抗体的要求并不高，一般抗体均可以满足。

（1）纯化标记抗原量的选定：

根据对测定对象的敏感度要求决定参入用的标记抗原的量，由于正常水平的AFP在 10 ng/ml 左右，一般要超过 50 ng/ml 的水平才有临床意义，因此，选用AFP*的量小于 5 ng/ml 即可，如样品孔的加样量为 $20 \mu\text{l}$ ，则每孔内加入的AFP*量要小于 0.1 ng ，这样小量的AFP*，其放射性愈高（取决于放射比度），则曝光时间愈短。如所用 ^{131}I -AFP的放射性强度为 $0.01 \mu\text{Ci}$ 时，用普通X光片曝光6小时已足够（一般胶片对 ^{125}I 很不敏感）。

（2）电泳自显影条件：

电泳是在含抗体的琼脂板上进行。根据对象的测定范围