

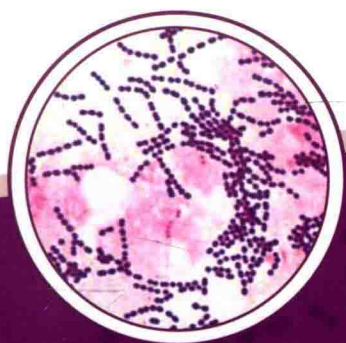
全国高等学校创新教材
供基础、临床、预防、口腔医学等专业用

基础医学实验学

医学免疫和病原生物 实验学

主 编 史丽云

副主编 何海根 韦跃宇



 人民卫生出版社

全国高等学校创新教材
供基础、临床、预防、口腔医学等专业用

基础医学实验学

医学免疫和病原生物 实验学

主 编 史丽云

副主编 何海根 韦跃宇

编 者 (以姓氏笔画为序)

韦跃宇 卢 哲 史丽云 冯雪鸣

何海根 陈斯东 钟石根 姚 慧

黄 茵 蔡玲斐

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫和病原生物实验学 / 史丽云主编. —北京: 人民卫生出版社, 2013.8

ISBN 978-7-117-17754-2

I. ①医… II. ①史… III. ①医药学—免疫学—实验—医学院校—教材②病原微生物—实验—医学院校—教材
IV. ①R392-33②R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 158592 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

医学免疫和病原生物实验学

主 编: 史丽云

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 10 插页: 8

字 数: 243 千字

版 次: 2013 年 8 月第 1 版 2013 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-17754-2/R·17755

定 价: 33.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

目 录

第一章 免疫学基础实验	1
实验一 凝集反应	1
实验二 沉淀反应	6
实验三 免疫标记技术	10
实验四 免疫细胞功能检测技术	16
实验五 补体功能检测试验	21
实验六 固有免疫功能检测技术	26
第二章 细菌学基础实验(一)	30
实验一 细菌形态学检测技术	30
实验二 细菌培养技术	36
实验三 细菌的生化反应检测	42
实验四 细菌毒力检测	45
实验五 细菌的血清学检测	49
实验六 细菌的药物敏感性检测	52
实验七 自然界及正常人体细菌的检测	55
实验八 消毒灭菌技术	58
第三章 细菌学基础实验(二)	63
实验一 病原性球菌	63
实验二 肠道杆菌	64
实验三 霍乱弧菌和厌氧性细菌	66
实验四 结核分枝杆菌	67
第四章 病毒学基础实验	68
实验一 病毒的形态学检测	68
实验二 病毒的分离培养与鉴定	69
实验三 病毒的免疫学检测	74

第五章 常见病原性真菌基础实验	77
实验 真菌的生物学特性观察	77
第六章 人体寄生虫学基础实验	78
实验一 线虫	78
实验二 吸虫	80
实验三 绦虫	83
实验四 原虫	84
实验五 医学节肢动物	87
第七章 分子生物学基本实验	89
实验一 PCR 技术	89
实验二 核酸分子杂交技术	91
第八章 综合性实验	95
实验一 多克隆抗体的制备及测定	95
实验二 黄芪注射液对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用	100
实验三 病原性球菌的分离与鉴定	103
实验四 粪便标本中致病性肠道杆菌的分离与鉴定	112
实验五 乙型肝炎检测的综合实验	117
实验六 HIV 抗体的检测	123
实验七 流行性感冒病毒的分离鉴定	127
实验八 水的卫生学检测	131
实验九 旋毛虫感染动物模型及其免疫学检测	135
实验十 日本血吸虫感染实验动物及其检测	139
实验十一 大学生人群蠕形螨感染的调查	144
第九章 设计和创新性实验	146
第一节 实验设计与实施	146
第二节 设计性实验参考选题	149
附录: 常用动物实验技术	151

第一章

免疫学基础实验

实验一 凝集反应

凝集反应(agglutination)是颗粒性抗原(如细菌、细胞等)与相应抗体结合,在适当浓度的电解质存在下,经过一定时间后,出现肉眼可见的凝集块。参与反应的抗原称为凝集原(agglutinogen),其抗体称为凝集素(agglutinin)。凝集反应分为直接凝集反应与间接凝集反应。

直接凝集反应(direct agglutination)是指细菌等颗粒性抗原,在适量的电解质的参与下,直接与相应抗体结合而出现的凝集现象。将可溶性抗原(或抗体)吸附于一类与免疫特异性无关的载体微球上,形成免疫微球(或称致敏颗粒),免疫微球与相应抗体(或抗原)相互作用,两者结合可产生的凝集现象,称为间接凝集试验(indirect agglutination test)。实验中常用的载体微球有人“O”型血红细胞、绵羊或家兔红细胞、活性炭、聚苯乙烯乳胶等。根据所用的载体的不同,分别称为间接血凝试验、间接炭凝试验、间接乳凝试验等。

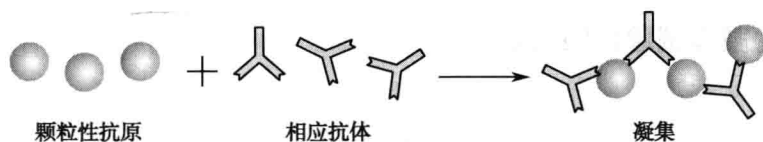


图 1-1 直接凝集反应示意图

一、玻片凝集试验(人 ABO 血型鉴定)

【原理】

玻片凝集试验(slide agglutination test)为定性试验,常用已知抗体检测未知抗原,如未知细菌的鉴定、血型的检测等。

人 ABO 血型抗原有两种, A 抗原和 B 抗原。A 型血红细胞表面有 A 抗原, B 型血红细胞有 B 抗原, AB 型红细胞上有 A、B 两种抗原, O 型血红细胞上则无这两种抗原。若分别将抗 A、抗 B 血清与待检红细胞混合,抗 A 和(或)抗 B 血清与红细胞上的相应抗原结合可引起红细胞凝集,根据凝集状况即可判定出受试者的血型。

【材料】

标准抗 A 血清、抗 B 血清、载玻片(或白色反应瓷板)、生理盐水、一次性采血针、无菌吸管、酒精棉球等。

【方法】

(1) 取洁净载玻片一张,用记号笔分为两格,并注明 A、B 字样。

(2) 采血:用酒精棉球消毒受试者无名指指腹,待酒精干后用无菌采血针刺破皮肤,用无菌吸管吸取血液 1~2 滴,加入含 1ml 生理盐水的试管中迅速与生理盐水混匀(约为 5% 红细胞悬液),再立即用无菌干棉球压迫止血。

(3) 加样: A 格中滴加抗 A 血清和红细胞悬液各 1 滴; B 格中滴加抗 B 血清和红细胞悬液各 1 滴。摇动载玻片使相应抗血清与红细胞悬液混匀。

(4) 将载玻片静置于实验台上数分钟后,在白色背景下观察凝集情况。

【结果判断】

如果混合液由红色均匀混浊逐渐变为透明,并出现大小不等的红色凝集颗粒,即为红细胞凝集;若混合液仍呈均匀混浊,则表明红细胞未发生凝集。血型判定参照表 1-1。

表 1-1 ABO 血型鉴定结果与判定

抗血清	血型			
	A	B	A B	O
抗 A 血清	+	-	+	-
抗 B 血清	-	+	+	-

注: +: 凝集; -: 无凝集

【注意事项】

(1) 混匀抗血清与红细胞悬液时,不同格内液体不可混合。

(2) 抗血清必须在有效期内。

二、试管凝集试验(肥达试验)**【原理】**

试管凝集试验(tube agglutination test)为半定量试验,常用已知抗原来检测患者血清中相应抗体的效价(titer)。将待检患者血清等待测标本稀释成不同的稀释度,然后在不同的稀释度标本中加入定量的颗粒性抗原;当待测标本中存在相应抗体,则抗体与抗原结合,出现凝集,其凝集的程度因待测标本的稀释度的增加而减弱;最终因稀释度过大,即标本中的相应抗体量太少而不出现凝集现象。本试验以出现明显凝集的被检标本最大稀释度作为该标本的凝集效价。

【材料】

伤寒沙门菌菌体抗原(TO)、伤寒沙门菌鞭毛抗原(TH)、甲型副伤寒沙门菌鞭毛抗原(PA)、肖氏沙门菌鞭毛抗原(PB)、1:10 稀释患者待检血清(须经 56℃ 30min 灭活补体)、生理盐水、试管、1ml 吸管、试管架、水浴箱等。

【方法】

(1) 取清洁小试管 32 支,分成 4 排,每排 8 支,依次编号(O、H、PA、PB)。

(2) 每支试管内加入生理盐水 0.5ml。

(3) 倍比稀释血清：另取一支 1ml 吸管吸取 1:10 待检患者血清 0.5ml，加入第 1 排第 1 管，用吸管吹吸 3 次混匀后，吸取 0.5ml 加入第 2 管，同法混匀，吸取 0.5ml 加于第 3 管，如此作连续倍比至第 7 管，从第 7 管吸出 0.5ml 弃去；第 8 管不加待检患者血清，为生理盐水对照(表 1-2)。第 2~4 排各试管以同样方法稀释待检患者血清。

(4) 加抗原：在第 1 排各管加伤寒沙门菌菌体抗原(TO)；在第 2 排各管加伤寒沙门菌鞭毛抗原(TH)；第 3 排各管加甲型副伤寒沙门菌鞭毛抗原(PA)；第 4 排各管加肖氏沙门菌鞭毛抗原(PB)。上述每管加入菌液量为 0.5ml，每排加抗原的顺序为从第 8 管起依次向前至第 1 管。

(5) 加完菌液后振荡试管架混匀，置 56℃ 水浴箱 2~4 小时，取出置室温过夜，次日观察结果，或放置 37℃ 孵箱 16~18 小时后观察结果。

表 1-2 肥达试验操作流程

单位: ml

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8
生理盐水	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1:10 患者血清	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
O 抗原(第 1 排)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清稀释度	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	—
结果								

* 第 2、3、4 排分别加入 TH、PA 和 PB 抗原，操作方法相同

【结果】

用肉眼判定：先观察对照管(第 8 管)，若该管无凝集现象，再依次观察试验管。

试管内液体完全澄清、透明，管底有大片凝集块者为 100% 细菌被凝集，记为“++++”。试管内液体略有混浊、接近透明，管底有明显凝集块者约为 75% 细菌被凝集，记为“+++”。试管内液体半透明，管底有细小但明显的凝集块者约为 50% 细菌被凝集，记为“++”。

试管内液体混浊度有所增强，管底仅有少量细小凝集块者约为 25% 细菌被凝集，记为“+”。

试管内液体混浊度与对照管相同，管底无凝集块者记为“-”。

肥达试验凝集效价判定：以出现“++”凝集的血清最高稀释度作为该血清标本的最终凝集效价。

【注意事项】

(1) 本试验可因诊断菌自凝、电解质浓度和 pH 不适当等原因引起非特异性凝集，出现假阳性结果。

(2) H 抗原的凝集物呈絮状，易观察；O 抗原凝集物呈颗粒状并铺于管底，不易观察，可轻摇试管，以利观察。

(3) 阴性对照管和“-”管中，细菌因重力作用呈圆盘状沉淀于管底中央，轻摇之，沉淀的细菌呈烟雾样飘起，但无凝集物。

三、间接血凝试验(血清类风湿因子检测)

【原理】

间接血凝试验(indirect hemagglutination test)是将可溶性抗原吸附于红细胞成为致敏红细胞,这种致敏红细胞与相应抗体结合可产生红细胞凝集现象。常用于检测血清中的相应抗体,作为疾病的辅助诊断。本试验致敏红细胞吸附的抗原为人变性 IgG,用以检测相应抗体(类风湿因子)的效价。将被检患者血清作不同稀释度的稀释后,再加入定量的致敏红细胞,若被检血清中存在相应抗体,则抗体与致敏红细胞上的抗原结合,出现凝集现象,并以出现明显凝集的血清标本稀释度作为该被检标本的类风湿因子效价。

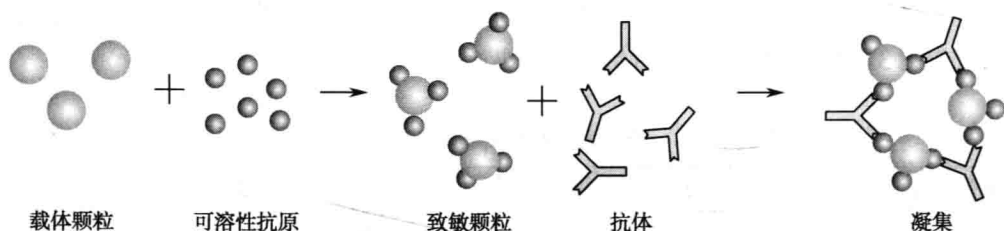


图 1-2 间接凝集反应示意图

【材料】

- (1) 致敏红细胞悬液。
- (2) 1:10 待检血清、阳性对照血清、稀释液。
- (3) V 型微量反应板、微量移液器、微量振荡器、37℃ 恒温箱、移液头。

【方法】

(1) 用微量移液器各吸取 50μl 稀释液分别加于微量反应板的第 1~9 孔内,第 10 孔加 50μl 阳性对照血清。

(2) 第 1 孔内加待检血清 50μl,混匀孔内液体后(用微量移液器上下轻吹吸 3 次),吸取 50μl 加入第 2 孔并混匀,再吸取 50μl 加入第 3 孔,如此依次作倍比稀释至第 8 孔,从第 8 孔中吸出 50μl 弃去。各孔的血清稀释度为 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280 和 1:2560。第 9 孔为阴性对照。

(3) 每孔加入混匀后的致敏红细胞悬液 50μl,但须从第 9 孔开始依次向前各孔内加入,最后加第 10 孔。1~8 孔最终血清稀释度为 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560 和 1:5120。

(4) 将反应板置于微量振荡器上,振荡 1min,37℃ 静置 30min 后观察结果。

【结果判断】

先观察第 9 孔阴性对照,孔中的红细胞应紧密集于孔中央,成为一红点;第 10 孔阳性对照孔中的红细胞应凝集并均匀地铺于孔的四周,孔中央无红细胞沉积的红点。然后根据孔中红细胞凝集现象及其强弱程度,分别表示如下:

“+++” 红细胞凝集铺于孔的四周,有时因凝集过于强烈,会出现周边的凝集物向孔心滑动的现象,此时应注意不要误判为阴性。

“++” 部分红细胞凝集,均匀铺于孔四周,孔中央可见疏松的红点。

“+” 红细胞大部分沉积,直径比阴性对照的大,环四周有少许凝集现象。

“-” 红细胞沉淀而紧密集于孔底,边缘整齐光滑。

以“++”的血清最高稀释度作为试验效价,凝集效价 $>1:40$ 判定为阳性。

间接血凝效价:出现“++”的最大免疫血清稀释度为该血清的间接血凝效价。

四、协同凝集试验(脑膜炎球菌可溶性抗原检测)

【原理】

葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A, SPA)是存在于金黄色葡萄球菌细胞壁上的一种表面蛋白,能与人及多种哺乳动物 IgG 的 Fc 段发生非特异性结合,因此可利用金黄色葡萄球菌为载体吸附 IgG。当 SPA 与已知 IgG 的 Fc 段结合后,具有结合抗原功能的 Fab 段暴露于 SPA 菌的表面,当它与相应抗原结合即出现凝集,此为协同凝集试验(coagglutination test)。本试验特异性及敏感性均较高,主要用于检测可溶性微量抗原。

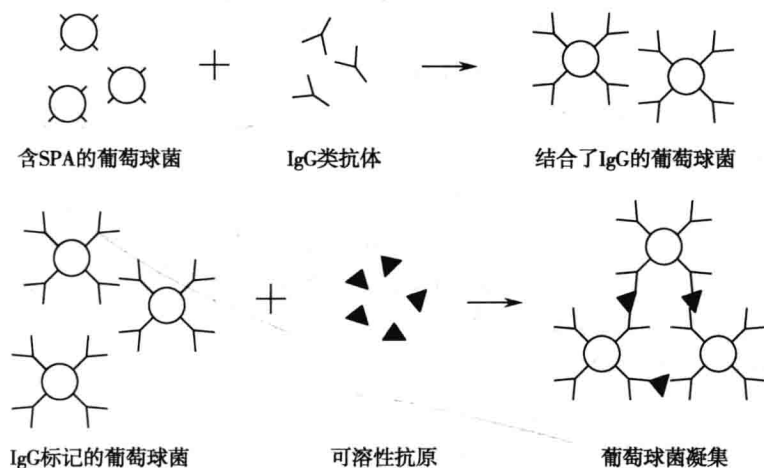


图 1-3 协同凝集反应示意图

【材料】

- (1) 流行性脑膜炎患者脑脊液(用前经煮沸处理 2min, 并适当稀释)。
- (2) A 群脑膜炎球菌抗体标记的 SPA 金葡菌。

【方法】

- (1) 取洁净载玻片 1 张,将其分为 3 大格,第 1 格及第 2 格各加 1 滴 A 群脑膜炎球菌抗体标记的 SPA 金葡菌菌液,第 3 格加 1 滴未经抗体标记的金葡菌菌液。
- (2) 于第 1 格及第 3 格各加 1 滴患者脑脊液,第 2 格加 1 滴生理盐水。
- (3) 不断摇动载玻片混匀各格内的液体,注意不要使不同格内液体相互混合。在明亮光线下观察结果,一般在几分钟内出现反应。

【结果】

第 2、3 格内无凝集物出现,如第 1 格内出现凝集颗粒则相应抗原阳性,否则阴性。

【注意事项】

- (1) 用前仔细检查试剂本身有无自凝颗粒。

(2) 本试验的特异性取决于标记用 IgG 的特异性,凝集反应的强弱取决于免疫血清效价的高低。

实验二 沉淀反应

可溶性抗原(如血清、细菌浸出液、外毒素等)和相应抗体结合,在有适量电解质存在时,经过一定时间,在二者比例适当时形成肉眼可见的沉淀物,称为沉淀反应(precipitation)。

一、单向琼脂扩散试验(人血清 IgG 检测)

【原理】

单向琼脂扩散试验(single immunodiffusion test)是一种定量试验,主要用于检测免疫球蛋白和补体成分的量,灵敏度较高。

将一定量的特异性抗体混合于琼脂凝胶板,再于琼脂层中打孔,在孔中加入定量的抗原;加入的抗原在含有抗体的琼脂中呈辐射状扩散,浓度逐渐降低;抗原抗体在琼脂凝胶中结合,并于两者比例合适处由抗原抗体复合物形成白色沉淀环。沉淀环的直径与抗原的浓度成正比。从不同浓度的标准抗原制成的标准曲线上可求知待测标本中的抗原量。本实验以检测人血清 IgG 为例。

【材料】

(1) 3% 琼脂(取精制琼脂粉 3g 加到 100ml 0.01mol/L、pH 7.2~7.4 的 PBS 中,加热溶解。加 NaN_3 至终浓度为 0.01% 以防腐,置 4℃ 冰箱备用)。

(2) 抗体:羊抗人 IgG 诊断血清(单向扩散效价 1:80)。

(3) 标准抗原:冻干正常人混合血清(混有已知含量的各种免疫球蛋白)。

(4) 待检人血清。

(5) 0.01mol/L、pH 7.2~7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)。

(6) 微量移液器、水浴箱、载玻片、打孔器(内径 3mm)等。

【方法】

(1) 将 3% 琼脂加热溶化,并保温于 56℃ 水浴中。

(2) 用 0.01mol/L、pH 7.2~7.4 的 PBS 将羊抗人 IgG 血清作 1:40 稀释,保温于 56℃ 水浴中,当琼脂和羊抗人 IgG 血清都为 56℃ 时,二者等量混合,仍置 56℃ 水浴保温。此时琼脂浓度为 1.5%,抗血清的稀释度为 1:80。

(3) 将混合羊抗人 IgG 血清的琼脂趁热倒板,琼脂厚 1~1.5mm。冷却凝固后,用打孔器按图 1-4 所示打孔。

(4) 根据已知的 IgG 含量将冻干标准血清用 PBS 稀释为几种不同稀释度,使 IgG 浓度分别为每毫升 50μg、100μg、200μg、400μg、800μg。

(5) 用微量移液器吸取各稀释度的标准血清 10μl,分别加于琼脂板各孔中。一种稀释度加 2 孔,用以制作标准曲线。

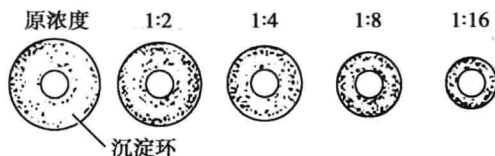


图 1-4 单向琼脂扩散试验

(6) 加好样品的琼脂板置于湿盒内, 37℃温箱中扩散 24h 后, 测量各孔沉淀环直径。

(7) 以相同稀释度孔沉淀环直径的平均值为纵坐标, 相应孔中 IgG 的含量为横坐标, 在半对数坐标纸上绘出标准曲线, 如图 1-5。

(8) 检测待检者血清时, 需采用与绘制标准曲线同一批琼脂板。先将待检血清用 PBS 作 1:40 稀释, 然后于每孔中加 10μl, 每份标本加 2 孔。置湿盒, 经 37℃ 24h 孵育后, 测量沉淀环直径, 取两孔的平均值, 在标准曲线中求出 IgG 的含量, 再乘以标本的稀释倍数, 即为该血清中 IgG 的含量。

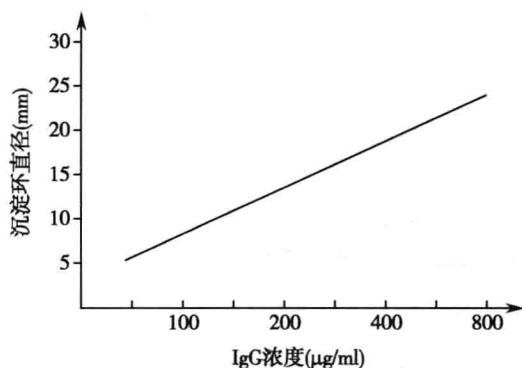


图 1-5 单向琼脂扩散试验标准曲线

【注意事项】

- (1) 要控制抗体保温的温度和时间, 否则对抗体的活性有影响。
- (2) 加标准抗原和待检标本时应力求准确, 否则实验结果有偏差。

二、双向琼脂扩散试验(人血清 AFP 抗原检测)

【原理】

双向琼脂扩散试验(double immunodiffusion test)是将抗原和抗体分别加到琼脂板相对应的孔中, 两者各自向四周扩散, 若二者相应, 在比例合适处形成白色沉淀线。若同时含有多种抗原抗体系统, 因其扩散速度不同, 可在琼脂层的两孔间形成多条沉淀线。本试验可用于多种抗原成分的分析 and 鉴定。其不足之处是所需时间较长, 灵敏度不太高。

此处检测血清甲胎蛋白(AFP)抗原。

【材料】

- (1) 抗原: 待检血清, 脐带血清(AFP 阳性对照)。
- (2) 抗体: 已知 AFP 诊断血清(抗 AFP 抗体)。
- (3) 1.5% 琼脂(生理盐水配制)。
- (4) 水浴箱、微量移液器、载玻片、打孔器等。

【方法】

- (1) 将 1.5% 琼脂加热溶化。
- (2) 取洁净载玻片 1 张, 放于水平台上。将已溶化的琼脂用吸管趁热吸加于载玻片上, 每片 4~5ml。待冷凝后按图 1-6 打孔, 内径 3mm。必要时将琼脂板在火焰高处过数次补底。

(3) 在梅花图案中心孔或三角图案任一孔中加入 AFP 诊断血清(已知抗 AFP 抗体)。

(4) 于梅花图案 1、4 孔或三角图案另一孔内加入脐带血清作为阳性对照。

(5) 于梅花图案 2、3、5、6 各孔或三角图案剩余孔内分别加入待检血清。

(6) 将加好样品的琼脂板放入湿盒内, 置 37℃孵育 24h 后, 观察并记录结果。

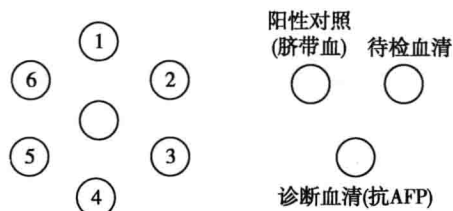


图 1-6 双向琼脂扩散试验打孔模板

【结果】

若待检血清标本产生沉淀线，并与阳性对照所产生的沉淀线吻接成一线，则表示阳性。如待检血清无沉淀线或与阳性血清沉淀线交叉，则表示阴性(图 1-7)。

【注意事项】

(1) 扩散时间要适当。时间过短，沉淀线不能出现；时间过长，会使已形成的沉淀线解离或散开。

(2) 加不同样本时，应更换微量移液器吸头。

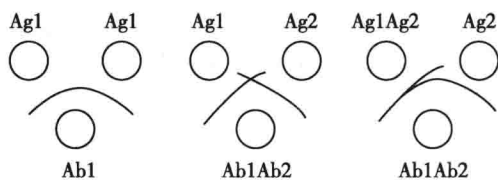


图 1-7 双向琼脂扩散试验沉淀线类型

三、免疫电泳试验(人血清免疫球蛋白成分分析)

【原理】

免疫电泳(immunoelectrophoresis, IEP)是将区带电泳和双向琼脂扩散结合起来，用于分析抗原组成的一种定性方法。将抗原样品在琼脂平板上先进行电泳，使其中的各种成分因电泳迁移率的不同而彼此分开，然后将含相应抗体的免疫血清加入与电泳方向平行的琼脂板中央一横槽中，免疫血清与已分离的各抗原成分在琼脂内作双向琼脂扩散，各区带在相应位置则与抗体形成沉淀弧(图 1-8)。根据沉淀弧的数量、位置和形态，可分析样品中所含抗原成分及其性质。该方法分辨率高，常用于抗原分析及免疫性疾病的诊断。

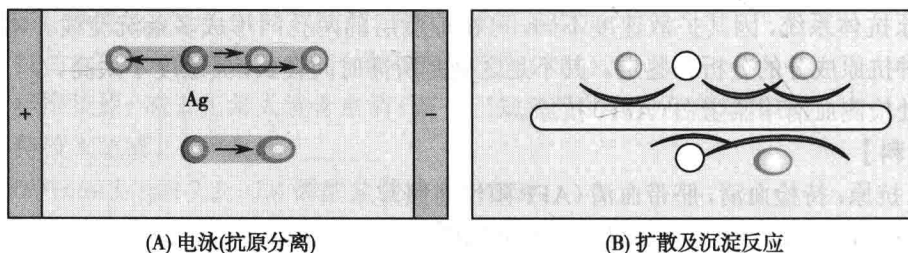


图 1-8 免疫电泳示意图

【材料】

1% 琼脂(用 0.05mol/L pH 8.6 巴比妥缓冲液配制)、载玻片、待检血清、人 IgG(1mg/ml)、兔抗人全血清、微量移液器、打孔器、2mm×6mm×60mm 聚苯乙烯塑料条、电泳仪、pH 8.6 巴比妥缓冲液等。

【方法】

(1) 制板: 载玻片放于水平台面上，按图所示将塑料条放置在载玻片上，吸取 4ml 已加热溶化的 1% 琼脂注于载玻片上，待其凝固后，取出塑料条，即成琼脂槽，按图 1-9 打孔。

(2) 加样: 用微量移液器将 10μl 待检血清及人 IgG 分别加入两个孔中，勿溢出。

(3) 电泳: 将加好标本的琼脂板置电泳槽

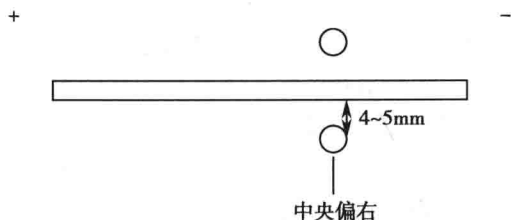


图 1-9 免疫电泳琼脂板制作示意图

上,电泳样品孔应靠近负极端。琼脂板两端用纱布与缓冲液相连,接通电源,控制电压 4V/cm 板长,电泳 1.5h。

(4) 扩散:电泳完毕,关闭电源,取出琼脂板。在琼脂槽中加入 100 μ l 兔抗人全血清,然后将其置湿盒 37 $^{\circ}$ C 扩散 24h,观察结果。

【结果】

根据沉淀弧的位置及形状,参照免疫球蛋白迁移范围,识别主要免疫球蛋白。

(1) 常见的弧形如下:①交叉弧:表示两个抗原成分的迁移率相近,但抗原性不同;②平行弧:表示两个不同的抗原成分,它们的迁移率相同,但扩散率不同;③加宽弧:一般是由于抗原过量所致;④分枝弧:一般是由于抗体过量;⑤沉淀线中间逐渐加宽并接近抗体槽,一般由于抗原过量,在白蛋白位置处形成;⑥其他还有弯曲弧、平坦弧、半弧等。

(2) 沉淀弧的曲度。匀质性的物质具有明确的迁移率,能生成曲度较大的沉淀弧。反之有较宽迁移范围的物质,其沉淀弧曲度较小。

(3) 沉淀的清晰度。沉淀线的清晰度与抗原抗体的特异性程度有关,也与抗体的来源有关。兔抗体的特点是形成沉淀线宽而淡,抗体过量对沉淀线影响较小,而抗原过量则沉淀线发生部分溶解。因此使用抗原抗体时,一定要找到适当的比例。

(4) 沉淀弧的位置。高分子量的物质扩散慢,所形成的沉淀线离抗原孔较近;而分子量较小的物质,扩散速度快,沉淀弧离抗体槽近一些。抗原浓度高沉淀弧离抗体槽近;反之,抗体浓度过高,沉淀弧则离抗原孔近。

【注意事项】

(1) 免疫电泳分析法的成功与否,主要取决于抗血清的质量。抗血清中必须含有足够的抗体,才能同被检样品中所有的抗原物质生成沉淀反应。

(2) 抗血清虽然含有对所有抗原物质的相应抗体,但抗体效价有高有低,因此要适当考虑抗原孔径的大小和抗体槽的距离。

四、对流免疫电泳试验(人血清 AFP 抗原检测)

【原理】

对流免疫电泳(counter immunoelectrophoresis)是把扩散和电泳技术结合在一起的实验方法。多数蛋白质抗原物质在碱性环境中由于羧基电离而带负电荷,在电泳时从负极向正极移动。抗体属球蛋白,所暴露的极性基团较少,在缓冲液中电离也少,而且分子质量较大,移动较慢,在琼脂电渗作用下由正极向负极移动,这样就使抗原和抗体定向移动而发生反应,并在短时间内出现肉眼可见的白色沉淀线,故可用于快速诊断。同时,由于抗原、抗体在电场中的定向移动,限制了抗原抗体分子的自由扩散,因而提高了试验的敏感度(比双向扩散高 8~10 倍)。

此处检测血清甲胎蛋白(AFP)抗原。

【材料】

(1) 抗原:待检血清,脐带血清(AFP 阳性对照)。

(2) 抗体:已知 AFP 诊断血清(抗 AFP 抗体)。

(3) 1% 琼脂(用 pH 8.6 的巴比妥缓冲液配制)。

(4) 电泳仪、电泳槽、水浴箱、微量移液器、载玻片、打孔器等。

【方法】

(1) 琼脂板制备: 取洁净载玻片 1 张, 将加热溶化的 1% 琼脂 4~5ml 加于载玻片上, 待凝。

(2) 打孔: 按图 1-10 用打孔器打孔, 孔距 4mm。

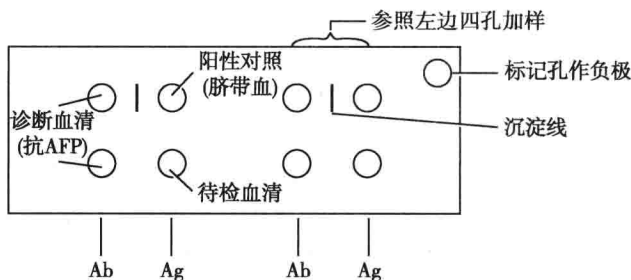


图 1-10 对流免疫电泳加样示意图

(3) 加样: 将两对应孔的负极侧加入待检血清或 AFP 阳性血清, 正极侧加入抗 AFP 诊断血清。加样时应刚好加满小孔但不能溢出。

(4) 电泳: 将琼脂板置于电泳槽上, 抗原孔置负极端, 抗体孔置正极端。设电压 2.5~6V/cm, 或电流强度 3~5mA/cm, 电泳时间 30~90min。切断电源, 取出观察结果。若沉淀线不太清晰时, 可放于 37℃ 温箱数小时, 以增加沉淀线的清晰度。

【结果】

将载玻片对着强光源衬以深色背景观察, 在阳性对照与 AFP 诊断血清孔之间应出现白色沉淀线; 如待测血清与 AFP 诊断血清孔之间也出现沉淀线, 则待检血清 AFP 为阳性, 否则为阴性。

【注意事项】

- (1) 电泳时电流不宜过大, 以免蛋白质变性。
- (2) 抗原、抗体的电极方向不能放反。
- (3) 抗原、抗体相对浓度要适当, 抗原过高或过低均不易出现沉淀线。
- (4) 电泳所需时间与孔间距离有关, 距离越大, 电泳时间越长。

实验三 免疫标记技术

免疫标记技术 (immunolabeling technique) 是指用荧光素、酶、放射性核素、胶体金或电子致密物质等标记抗体或抗原的检测技术。这类技术具有特异、敏感、快速、能定性和定量甚至定位等优点, 且易于达到检测的标准化和自动化。

一、酶联免疫吸附试验

免疫酶技术 (immunoenzymatic technique) 是一种把抗原抗体反应的特异性和酶的专一性高效催化底物的能力二者结合而设计的一种血清学方法。此法是通过化学方法将酶与抗原或抗体结合, 形成酶标记物。这种酶标记物仍保持其免疫活性和酶活性。它们与相应的抗体或抗原发生反应, 形成酶标记的免疫复合物, 在遇到相应酶的底物时, 催化底物的水

解、氧化还原等反应,生成有色产物。酶降解底物的量与呈现的色泽浓度成正比,由此反映被测定的抗原或抗体的量。若生成的产物为可溶性的,可用肉眼或比色法定性或定量测定;若生成的产物为不溶性沉淀物则可用光学显微镜进行抗原或抗体的定位研究。免疫酶技术既可应用于组织、细胞内抗原检查和定位,又可用于测定可溶性抗原或抗体,后者称为酶联免疫吸附试验。

酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是将抗原或抗体吸附在固相载体上,使免疫反应在载体上进行,然后借助特异性结合的标记抗体上显示的酶活性,通过测定酶催化底物所得的产物来判断抗原或抗体的量。现应用较广泛的有夹心法和间接法。

(一) ELISA 双抗体夹心法测抗原(检测血清 HBsAg)

【原理】

将特异性抗体(Ab)吸附于固相载体上,加上待检标本,则标本中的相应抗原(Ag)与吸附在固相载体上的抗体结合;再加上酶标记的相应抗体(Ab*)后,酶标抗体与结合在固相载体上的抗原结合,形成 Ab-Ag-Ab* 复合物;最后,再加入底物,底物在酶的作用下分解显色。ELISA 双抗体夹心法原理见图 1-11。

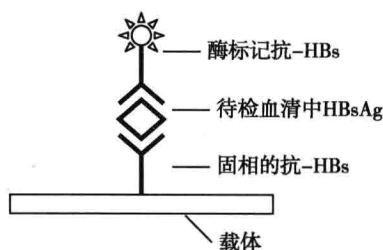


图 1-11 ELISA 双抗体夹心法检测 HBsAg 原理示意图

【材料】

(1) 乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的抗体(抗-HBs)、酶标记抗-HBs 抗体、待检患者血清。

(2) 其他试剂:包被缓冲液(0.01mol pH 9.6 碳酸盐缓冲液);标本稀释液(含 0.05% 吐温-20, 0.01mol pH 7.2 PBS);洗涤液(含 0.05% 吐温-20, 0.01mol pH 7.2 PBS);底物溶液(含 0.04% 邻苯二胺, pH 5.0 柠檬酸缓冲液);终止液(2mol H₂SO₄)。

(3) 聚苯乙烯酶标板、塑料洗瓶、微量移液器等。

【方法】

(1) 已知抗体包被酶标板:用包被缓冲液将抗-HBs 抗体稀释至工作浓度后,按每孔 100μl 包被酶标板,4℃过夜。

(2) 洗板:弃去酶标板内的包被抗体,在吸水纸上拍干,孔内加满洗涤液,静置 0.5~1min,再在吸水纸上拍干,如此洗涤 3 次。

(3) 加待检抗原标本:取不同稀释度的待检血清 1:128、1:64、1:32 加于酶标板内,每孔 100μl,每份标本加 2 孔,同时设空白对照、阴性对照和阳性对照,置 37℃湿盒 30min。

(4) 洗板:弃去酶标板内液体,按步骤(2)洗板 3 次。

(5) 加酶标记抗-HBs 抗体:除空白孔外,每孔加 100μl,置 37℃湿盒 30min。

(6) 洗板:同步骤(4)。

(7) 加底物溶液:临时配制,每孔 100μl,37℃避光孵育 20min。

(8) 终止反应:每孔加终止液一滴(约 50μl)。

(9) 观察显色反应或用酶标仪在 490nm 处用空白对照孔调零,测定其 OD 值。

【结果】

(1) 按下列公式计算 P/N。P/N > 2.1 为阳性;2.1 ≥ P/N ≥ 1.5 为可疑;P/N < 1.5 为阴性。

$$P/N = \frac{\text{标本 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}}{\text{阴性对照 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}}$$

(2) 肉眼判断: 反应孔呈棕黄色为阳性结果, 无色为阴性结果。

【注意事项】

(1) 每一洗板步骤一般为 3 次, 每次浸泡时间一般为 0.5~1min。洗板时需保证酶标板平放, 将洗涤液注满各孔, 但应避免洗涤液溢出现象, 洗板的液体残留量不宜过多, 洗完后, 应将酶标板在吸水纸上轻轻拍干。

(2) 加样时避免样本溢出, 如有样本溢出孔时, 应用吸水纸轻轻拭干, 并做相应记录。

(3) 空白对照不加样本, 其余步骤相同。

(4) 加终止液后, 应在 2 小时内比色测定。底物为邻苯二胺时用 490nm 波长比色; 底物为四甲基联苯胺时用 450nm 波长比色。

(5) 如使用 ELISA 试剂盒, 则根据说明书操作。

(二) ELISA 间接法测抗体(检测血清抗-HBs)

【原理】

将已知抗原(Ag)吸附于固相载体上, 加上待检标本, 则标本中的相应抗体(Ab)与吸附在固相载体上的抗原结合; 再加上酶标记抗人 IgG 抗体(酶标二抗), 后者与结合在固相载体上的抗体结合, 形成抗原-抗体-酶标抗体复合物; 最后, 再加入底物, 底物在酶的作用下分解显色。ELISA 双抗体间接法原理见图 1-12。

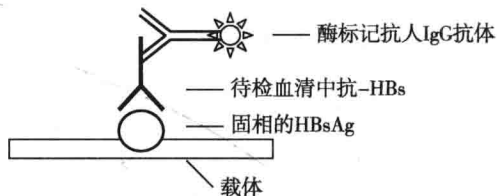


图 1-12 ELISA 间接法检测抗-HBs 原理示意图

【材料】

(1) 可溶性抗原 HBsAg、酶标记抗人 IgG 抗体、待检患者血清。

(2) 其他试剂: 包被缓冲液(0.01mol pH 9.6 碳酸盐缓冲液); 标本稀释液(含 1% 牛血清白蛋白、0.05% 吐温-20, 0.01mol pH 7.2 PBS); 洗涤液(含 0.05% 吐温-20, 0.01mol pH 7.2 PBS); 底物溶液(含 0.04% 邻苯二胺, pH 5.0 柠檬酸缓冲液); 终止液(2mol H₂SO₄)。

(3) 酶标板、塑料洗瓶、微量移液器、吸水纸等。

【方法】

(1) 已知抗原包被酶标板: 用包被缓冲液将已知可溶性抗原作适当稀释后, 用微量移液器每孔加入 100μl, 4℃ 过夜。

(2) 洗板: 弃去酶标板内的包被抗原, 在吸水纸上拍干, 孔内加满洗涤液, 静置 0.5~1min, 再在吸水纸上拍干, 如此洗涤 3 次。

(3) 加待检血清: 将待检患者血清用稀释液作不同倍数稀释。取不同稀释度的待检血清(1:128、1:64、1:32)加于酶标板内, 每孔 100μl, 每份标本加 2 孔, 同时设空白对照、阴性对照和阳性对照。置 37℃ 湿盒 30min。

(4) 洗板: 弃去酶标板内液体, 按步骤(2)洗板 3 次。

(5) 加酶标记抗人 IgG: 用稀释液将酶标记抗人 IgG 抗体稀释至工作浓度, 除空白孔外, 每孔加 100μl, 置 37℃ 湿盒孵育 2h。

(6) 洗板: 同步骤(4)。