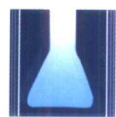


全国高等医药教材建设研究会规划教材·全国高等医药院校配套教材



供医学检验专业用

临床免疫学和免疫检验 实验指导

第2版

WBC	50.0		WBC	50.0	
LY%	13.5		LY%	13.5	
MO%	36.6	L	MO%	36.6	L
GR%			GR%		
LY#		H	LY#		H
MO#		H	MO#		H
GR#		H	GR#		H
RBC	4.45		WBC		
HGB	14.2		LY%	50.0	
HCT	42.6		MO%	13.5	
MCV	95.8		GR%	36.6	L
MCH	31.9		LY#		H
MCHC	33.3		MO#		H
RDW	12.0		GR#		H
MPV					
PDW					

2-33
4(2)
2

主编 刘辉

 人民卫生出版社

全国高等医药院校配套教材

供医学检验专业用

临床免疫学和免疫 检验实验指导

第 2 版

主编 刘 辉

编者（以姓氏笔画为

王兰兰（四川大学华西临床医学院）

卢贤瑜（重庆医科大学）

刘 辉（大连医科大学）

许化溪（江苏大学医学院）

吕世静（广东医学院）

沈 霞（上海第二医科大学）

李金明（卫生部临床检验中心）

陈育民（邯郸医学高等专科学校）

柳永和（中南大学湘雅医学院）

曾常茜（北华大学医学院）

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

临床免疫学和免疫检验实验指导/刘辉主编. —2
版. —北京: 人民卫生出版社, 2002

ISBN 7-117-05165-5

I. 临... II. 刘... III. ①医药学: 免疫
学—实验 ②免疫诊断—实验 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 077279 号

临床免疫学和免疫检验实验指导

第 2 版

主 编: 刘 辉

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

印 刷: 北京市通县永乐印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 6

字 数: 129 千字

版 次: 1999 年 7 月第 1 版 2003 年 6 月第 2 版第 6 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-05165-5/R·5166

定 价: 8.50 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

本书是由卫生部教材办公室统一组织编写的系列实验教材之一，供医学检验专业本科和专科使用，2001年秋决定改版，2002年10月脱稿，期间，主编对全国部分院校的有关专家以及医院检验科主任就当前临床免疫学实验开课情况和临床实验室经常采用的免疫学技术及发展趋势进行了调研，在此基础上形成了编写提纲。本书第一版主编尹学念教授对提纲进行了审阅；著名免疫学专家杨廷彬教授生前对提纲提出了重要修改意见，指出临床免疫学实验课应增加有关培养免疫学技术在临床诊断中应用能力的內容，这一观点在编委会上取得了共识，因此本书增加了病案讨论和实验设计等内容。

本书对主要经典免疫学实验予以保留，以达到验证理论和培养技能的目的，实验二十六将实验一、实验七和实验八组成一个系统实验，这样可以训练组织和驾驭大型综合实验的能力，因此本书也是临床医学生和研究生很好的实验教材。

目前，以设备为载体的新型免疫学技术发展很快，以高知识含量为特征的成套免疫诊断试剂盒不断出现，这使临床免疫学实验在很大程度上减少了对操作者实验经验的依赖，其有关具体实验虽然应该是在实习阶段重点掌握，但在实验课程中对有关新技术和新方法也应有相当多的了解和感性认识，因此本书在每一单元都附有有关设备、仪器或试剂盒的介绍，这些内容可以通过临床实验见习或电化教学等方式完成，应当成为实验教学的实质内容予以重视。

本书每一单元后均设有单元专题讨论，其目的是与理论教材配合，通过理论课和实验课的学习，启发提出有关问题和为解决这些问题而采取的措施，实际这正是某一领域发展的前沿，在实验的间隙可组织有关讨论。为方便学习，书后附有单元讨论提示，需要注意的是讨论提示并不是讨论题的惟一答案。

本书所有实验均经过预试，大连医科大学化学教研室刘有训副教授对附录中化学试剂配方作了审核和验算，本书成稿过程中大连医科大学临床免疫学教研室的老师和研究生做了大量的计算机录入和文字校对工作，本书主要的参考书是《免疫学和免疫学检验实验指导》（第一版）和《全国临床检验操作规程》（第二版），在此向上述人员以及两本书的主编与全体作者表示衷心感谢。免疫学和免疫学技术的发展日新月异，教育改革也在不断深入进行，限于编者的认识水平，本书会有各种缺点和不足，希望广大师生对本书提出宝贵意见。

编 者

2002年10月

目 录

第一单元 免疫血清的制备	1
实验一 抗体的制备	1
附一 直接凝集试验	3
附二 双向琼脂扩散试验	5
单元讨论 新型抗体制备的途径和策略	6
第二单元 免疫沉淀类实验	7
实验二 单向免疫扩散实验	7
实验三 对流免疫电泳	8
实验四 免疫电泳	9
附 免疫散射比浊分析仪简介	10
单元讨论 免疫沉淀类实验的发展	12
第三单元 免疫凝集类实验	13
实验五 胶乳凝集试验	13
实验六 胶乳凝集抑制试验	13
附 凝集试验检测 HIV-1 抗体试剂盒简介	14
单元讨论 免疫凝集类实验的发展趋势	15
第四单元 酶联免疫技术	16
实验七 酶标记抗体的制备	16
实验八 酶联免疫吸附实验	17
实验九 酶免疫组化技术	18
实验十 酶标免疫定量测定	19
附 酶标仪及其主要性能指标简介	21
单元讨论 酶联免疫测定的影响因素及数据处理原则	23
第五单元 其他免疫标记技术	24
实验十一 免疫荧光技术	24
实验十二 免疫印迹技术	25
实验十三 斑点金免疫渗滤试验	27
实验十四 斑点免疫层析试验	28
附 全自动微粒子化学发光免疫分析仪简介	28

单元讨论 免疫标记技术的发展趋势	30
第六单元 细胞免疫检测技术	31
实验十五 单个核细胞分离	31
实验十六 淋巴细胞 E 受体检测	32
实验十七 淋巴细胞转化试验	34
实验十八 NK 细胞功能检测	37
附 流式细胞仪简介	38
单元讨论 细胞免疫检测技术的现状及发展	39
第七单元 非特异免疫功能测定	40
实验十九 细胞吞噬率与吞噬指数测定	40
实验二十 白细胞杀菌能力测定	41
实验二十一 硝基四氮唑蓝 (NBT) 还原实验	42
附 细胞因子检测试剂盒简介	43
单元讨论 细胞计数和功能检测的意义	44
第八单元 器官移植的免疫学检测	45
实验二十二 混合淋巴细胞培养	45
实验二十三 微量细胞毒实验	46
附 HLA 配型 (血清定型法) 检测试剂盒简介	47
单元讨论 HLA 配型方法的比较	48
第九单元 其他免疫学实验	49
实验二十四 血清总补体溶血活性 (CH50) 测定	49
实验二十五 循环免疫复合物测定	50
实验二十六 系统免疫学实验	52
附 有关自身免疫病检测试剂盒简介	53
单元讨论 免疫指标的选用原则	55
第十单元 免疫学检测技术临床应用综合训练	56
病案讨论一 自身免疫性疾病的实验诊断	56
病案讨论二 免疫增殖病的实验诊断	58
病案讨论三 肿瘤的免疫学诊断	61
病案讨论四 实验设计	63
附 实验诊断评价指标	64
附录	66
附录一 免疫学实验常用试剂及配制方法	66

附录二 离心力及有关参数换算	70
附录三 主要免疫学检测项目参考值.....	70
附录四 微量加样器的质控	71
单元讨论提示	75

第一单元 免疫血清的制备

免疫血清是机体受到抗原物质刺激后的血清，含有特异性免疫球蛋白。根据用途的不同，可直接应用免疫血清于病原的诊断或感染性疾病的紧急预防和治疗；也可通过进一步纯化血清中的免疫球蛋白，用做多种免疫相关或不相关疾病的诊断和治疗制剂。免疫血清又称抗血清或抗体，而从抗血清中纯化的免疫球蛋白则只称为抗体。在传统的免疫学方法中，尤其是作细菌的血清学鉴定时，抗血清即能满足要求，无需纯化，因为纯化的过程将造成免疫球蛋白的丢失。但在现代免疫学方法中，由于免疫标记和反应精确度的需要，必须纯化抗血清的有效成分，即获得免疫球蛋白甚至是免疫球蛋白的某一类别或亚类。

实验一 抗体的制备

抗体的制备大致包括三个阶段，即抗原的制备与纯化、动物免疫和血清分离纯化与鉴定。抗原是制备抗体的先决条件，要制备高质量的抗体，必须首先获得特异性高的抗原性物质。抗体制备的方案视抗原的性质不同而异。本实验制备抗人全血清和伤寒沙门菌O抗体。

[实验原理]

用抗原刺激机体可以使机体产生抗体，抗原与抗体是一对概念，抗原的纯度和活性，影响着其免疫动物后获得的抗体的特异性和滴度。根据抗体产生的一般规律，视抗原的性质选择不同的途径免疫动物，经初次、再次免疫的过程，使得动物血清中产生足量的特异性抗体，继而分离血清并纯化免疫球蛋白，得到免疫血清或抗体。

[试剂与器材]

1. 抗原与免疫对象 细菌菌种（伤寒沙门菌 O901）、混合人全血清、健康家兔。
2. 福氏佐剂 ①福氏不完全佐剂：称取羊毛脂 5g，逐滴加入石蜡油 20ml（羊毛脂：石蜡油可为 1：1~1：4），高压灭菌后 4℃ 保存备用。②福氏完全佐剂：于不完全佐剂中加入卡介苗 2~20mg/ml，研钵中研磨乳化后即完全佐剂，冰箱保存备用。
3. 试剂 生理盐水、麦氏比浊管、甘油、防腐剂（0.02%叠氮钠或 0.01%硫柳汞）等。
4. 设备与器材 剪刀、镊子、注射器、研钵、试管等器材和冰箱、离心机等仪器。

[操作方法]

1. 伤寒沙门菌O抗血清的制备

(1) 伤寒沙门菌O抗原的制备：经革兰染色作细菌纯度鉴定的伤寒沙门菌 O901，密集划线接种于普通琼脂平板（若需大量制备，可接种于用柯氏瓶制备的琼脂培养基），37℃ 培养 24~48h 后，用生理盐水将细菌菌苔洗于清洁、无菌的三角烧瓶中，置 60℃ 水浴或隔水煮沸 1h 以破坏细菌的鞭毛，用滤纸过滤（大量制备时）或移入离心管

4 000r/min离心 10~20min (少量时)。将滤过的菌液接种少量于琼脂平板进行无菌试验 (37℃, 24h), 确定无菌后用生理盐水调整菌液浓度至 10^9 个/ml, 此为细菌 O 抗原, 置 4℃ 保存备用。若制备鞭毛抗原, 则可用含有 5% 石炭酸 (苯酚) 的生理盐水洗下琼脂平板上的菌苔, 37℃ 温育 48h 后作无菌试验, 滤过后用生理盐水配成一定浓度。

(2) 伤寒沙门菌 O 抗原免疫方案: 用于免疫动物的菌液浓度视菌种的不同而异, 伤寒沙门菌、志贺痢疾菌等肠道杆菌, 免疫浓度多为 10^9 个/ml 左右。细菌性抗原的免疫方案大致相同, 见表 1-1。

表 1-1 伤寒沙门菌 O 抗原的免疫方案

免疫日期(天)	免疫途径	抗原	免疫剂量(ml)
1	多点皮内	伤寒沙门 O 抗原	1.0
6	静脉	伤寒沙门 O 抗原	0.5
11	静脉	伤寒沙门 O 抗原	0.5
16	静脉	伤寒沙门 O 抗原	1.0
19	静脉	伤寒沙门 O 抗原	2.0

(3) 试血: 末次免疫 7d 后即可试血, 耳静脉或心脏采血, 分离血清与伤寒沙门菌 O 抗原作试管凝集试验, 凝集效价 (滴度) 在 1:1 600~3 200 之间时即可放血, 若效价较低可继续加强免疫。

(4) 放血: 颈动脉放血 (也可心脏采血), 以最大限度的获得血清。

2. 抗人全血清制备

(1) 抗原-福氏完全佐剂: 取混合人全血清, 用生理盐水作 1:4 稀释。将稀释血清按与完全佐剂 1:1 体积的比例混合, 制成油包水状态。具体方法如下:

1) 研磨法: 取完全佐剂置无菌研钵中, 然后逐滴加入稀释混合人血清, 边加边研磨, 直至滴一滴至水中不散开为止, 此即完全乳化的油包水状态。若系不完全佐剂, 则像加入人全血清那样, 按 2~20mg/ml 的量加入卡介苗。

2) 注射器法: 即用两个注射器对接, 使佐剂与抗原往返推拉, 以至乳化。另外, 也可将佐剂置磁力搅拌器上, 边搅拌, 边滴加抗原并继续搅拌, 使其完全乳化。

(2) 抗原-福氏完全佐剂免疫动物: 取健康家兔, 用剪刀减去家兔双后足掌的毛, 碘酒和酒精棉球消毒。每只足掌注射抗原-福氏完全佐剂 0.5ml, 每只家兔注射量 1ml。两周后, 再于腠窝淋巴结内注射抗原-福氏完全佐剂, 每侧注射量仍为 0.5ml。

(3) 无佐剂的人血清加强免疫: 上述免疫一周后, 耳静脉注射人血清 (1:2 稀释) 0.5ml 左右以加强免疫, 如此重复 1~2 次, 并于最后一次注射一周后采血。

(4) 试血: 采血方法同伤寒沙门菌 O 抗血清制备。试血时, 环状沉淀测定的抗体效价达到 1:5 000, 双向琼脂扩散试验效价达到 1:16 以上即可放血收集血清。如效价不够, 可追加免疫。

(5) 抗血清采集: 颈动脉放血或心脏采血获得的兔血, 置 37℃ 促进血块收缩, 并用毛细管吸取血清, 经 3 000r/min 离心去除残留的红细胞。

3. 抗血清的鉴定 获得的免疫血清需要进行特异性检测、亲和力测定和效价滴定。

针对颗粒性抗原的免疫血清效价，可通过凝集或溶细胞试验（如溶血素效价滴定）检测。可溶性抗原相应抗体的效价和纯度多选用环状沉淀、琼脂扩散和免疫电泳的方法检测。酶免疫测定、放射免疫分析及平衡透析等方法，可用于抗体的特异性和亲和力测定。抗血清鉴定的方法详见后述相应实验。

4. 抗血清纯化 更加精细的免疫试验需要从抗血清中提取免疫球蛋白，此过程称为抗血清的纯化。纯化的步骤为：①50%饱和硫酸铵盐析以沉淀血清球蛋白；②应用透析或分子筛法除盐；③除盐后的球蛋白过阴离子交换柱（DEAE-纤维素），根据不同类别免疫球蛋白的等电点，选用不同pH和离子强度的缓冲液分别洗脱之；④高渗或风干法浓缩免疫球蛋白，若使用冷冻干燥器则可获得干燥制品。

5. 抗血清保存 抗体的保存以浓度20~30mg/ml为宜，加入万分之一的硫柳汞或千分之一的叠氮钠防腐，并加入等量的中性甘油，分装小瓶，-20℃以下保存，数月甚至数年内抗体效价无明显改变。

[结果判断]

抗原免疫动物后获得的抗血清，效价可用上述相应试验判断；其特异性则可通过双扩、免疫电泳或交叉凝集试验进行考察。各试验结果的观察和判断参见相应单元。此外，抗血清的外观应该为澄清、力求无溶血、无血液有型成分残留和无细菌等微生物污染。

[实验讨论]

1. 动物的选择 免疫血清的制备多选用家兔为免疫对象，若系大量制备或二抗种属特异性的需要，也可选用羊或马。应用的动物必须健康，且以雄性为佳。为了避免个体差异，每种抗原最好免疫3只以上动物。

2. 抗原的准备 全血清抗原应选择3人以上混合血清，以避免个体差异性；血清应新鲜，以保持血清中各成分的活性。在细菌性抗原制备过程中，应严格无菌操作，保证其纯度和避免对实验者的感染。

3. 佐剂的准备与使用 佐剂应用于可溶性抗原的免疫，颗粒性抗原的免疫无需佐剂。佐剂与抗原混合研磨时，应充分乳化，否则难以达到预期的免疫效果。在使用佐剂-抗原时，若难以吸入注射器，则可将连同装有佐剂的容器置热水上加热，并选用较粗的注射针头。注射完毕后，剩余佐剂-抗原置4℃保存。

4. 免疫程序并非固定不变，一般而言，不与佐剂一同免疫的抗原，免疫间隔时间较短，可每隔2~3天免疫一次。由于佐剂具有缓释作用，与佐剂一起免疫的抗原可隔1~2周。无论有无佐剂，最后一次免疫一周后采取血清。加强免疫的剂量一般为首次剂量的1/5~2/5。如需制备高度特异性的抗血清，可选用低剂量抗原短程免疫；若欲得到高效价的抗血清，则宜采用大剂量抗原长程免疫。由于免疫期限及间隔时间较长，要注意脱敏，尤其在进行静脉免疫时。脱敏的原则是少量多次注射抗原，例如，在静脉注入抗原前，先将抗原少量注入腹腔，1h后再作缓慢静脉注射。

(许化溪)

附一 直接凝集试验

[实验原理]

颗粒性抗原与相应抗体在适当条件下发生反应，出现肉眼可见的凝集小块，称为直接凝集反应。在操作方法上有玻片法和试管法两种，前者多用于细菌或 ABO 血型鉴定，后者可应用于抗血清的定量测定和判断患者血清中某种抗体的水平。

[试剂与器材]

1. 标本 任一常见细菌的平板或斜面培养物；待检血清。
2. 试剂 与细菌对应的诊断血清（可用生理盐水作适当稀释，以免发生前带现象）、生理盐水、已知沙门伤寒菌菌体抗原悬液（ 7×10^8 /ml）、伤寒沙门菌 O 抗血清（用生理盐水作 1:10 稀释）。
3. 器材 载玻片、接种环、恒温水浴箱、试管架、试管、吸管等。

[操作方法]

1. 玻片凝集试验

- (1) 于洁净载玻片的一端加生理盐水一滴，另一端加诊断血清一滴。
- (2) 用接种环挑取细菌，分别涂布于生理盐水和待检血清中，充分混匀。
- (3) 室温下静置数分钟观察结果。

2. 试管凝集试验

- (1) 取洁净试管 8 支，排列于试管架上，依次编号并作好标记。
- (2) 向各试管中加入生理盐水 0.5ml。
- (3) 吸取 1:10 稀释的被检血清 0.5ml，加入第 1 管中，充分混合，吸出 0.5ml 放入第 2 管；混合后取出 0.5ml 于第 3 管中，如此类推直至第 7 管，混匀后吸出 0.5ml 弃去。第 8 管不加血清，为生理盐水对照。至此，第 1~7 管的血清稀释度分别为 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 和 1:1280。这种稀释方法称为连续倍比（2 倍）稀释法，为免疫试验中常用的稀释方法。
- (4) 向每管加入诊断菌液 0.5ml，此时每管的液体总量为 1.0ml，血清稀释度又增加 1 倍。
- (5) 摇匀，置 37℃ 2~4h，取出置 4℃ 或室温过夜后观察结果。

试验操作程序和加入成分参见表 1-2。

表 1-2 试管凝集操作程序

管号	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
稀释血清	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5(弃)
诊断菌液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
终稀释度	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	—

[结果判断]

1. 玻片凝集法 生理盐水对照侧不发生凝集，为均匀混浊的乳状液。在诊断血清中，细菌与相应抗体反应会出现肉眼可见的凝集块，为阳性结果。如与对照侧相同则为阴性。
2. 试管凝集法 判断凝集试验的结果，要选择适当的光暗对比背景，先不要振摇，观察管底凝集物的范围和上清的浊度。然后轻轻摇动试管，注意观察凝集颗粒的大小、

均匀度等。每一试验管的观察，都应与对照管进行比较。盐水对照管应无凝集现象，轻轻摇动试管则细菌分散呈均匀混浊；伤寒沙门菌 O 抗原凝集块沉于管底，轻摇时不易散开，凝集程度通常以“+”号表示：

“4+”很强，细菌全部凝集，凝集块全部沉于管底，液体澄清。

“3+”强，细菌大部分凝集并沉于管底，液体稍混浊。

“2+”中等强度，细菌部分凝集（大约一半细菌凝集），液体较混浊。

“+”弱，仅少量细菌凝集，液体明显混浊。

“-”不凝集，液体混浊与对照管相同。

只要待测血清管出现“2+”以上的凝集现象，即可判断为反应阳性；以出现“2+”凝集的最大血清稀释度为待测血清的抗体效价。

[实验讨论]

1. 玻片凝集试验时应注意 ①每一待检菌均需作生理盐水对照，以排除当细菌发生 S-R 变异时的细菌自凝，保证试验的准确性。②在载玻片两端涂布细菌时，应先涂生理盐水一侧，后涂诊断血清侧，以免将血清误带入生理盐水侧。③试验后的细菌仍有传染性，应将玻片放入消毒缸内。④作 ABO 血型鉴定时，室温过低（10℃以下）可出现冷凝集，造成假阳性结果。⑤细菌凝集时要严格无菌操作。

2. 试管凝集时应注意 ①凝集反应只有在抗原、抗体比例适当时，才能出现肉眼可见的反应。一般情况下，随着血清浓度的逐渐稀释，凝集反应越来越弱。但在抗体浓度过高时，反而无凝集现象出现，此为前带现象。出现该情况时，须加大抗体稀释倍数重新试验。②注意温度、电解质、振摇等对试验的影响。抗原、抗体加入后，要充分混匀，以增加抗原与抗体接触的机会。

（许化溪）

附二 双向琼脂扩散试验

[实验原理]

相应的抗原与抗体，在琼脂凝胶板上的相应孔内，分别向周围自由扩散。在抗原和抗体孔之间，扩散的抗原与抗体相遇而发生特异性反应，并于两者浓度比例合适处形成肉眼可见的白色沉淀线。沉淀线的形状、位置，与抗原和抗体的浓度、扩散速度相关。

[试剂与器材]

1. 标本 人血清、人 IgG、人血清白蛋白、兔血清等。
2. 试剂 兔抗人全血清（待鉴定自制抗血清）、10~15g/L 琼脂凝胶等。
3. 器材 载玻片、湿盒、5~10ml 吸管、打孔器、毛细滴管或微量加样器、水浴箱或水浴锅、温箱等。

[操作方法]

1. 浇板 用 5~10ml 吸管吸取溶化的 10~15g/L 琼脂凝胶，于一张洁净载玻片的后三分之一处浇注，以使琼脂凝胶均匀布满玻片，不要留有气泡。每张标准载玻片约需 4ml 琼脂。

2. 打孔 待琼脂板凝固后，用直径 3mm 的打孔器打孔，每孔之间的距离约 4~5mm，根据需要，孔的分布可呈梅花状、三角状等（图 1-1）。

3. 加样 用微量加样器或毛细滴管加样。如果作抗体效价测定，则抗原（本实验为人血清）置中间孔，抗体（本实验为自制的抗人全血清）作不同稀释后置周围孔；若作抗原定性检测，则将已知抗体（本实验用抗人全血清）置于中间孔中，而将待测标本和阳、阴性对照（本实验以人血清、人 IgG、人白蛋白以及兔血清取代）置周围孔中。

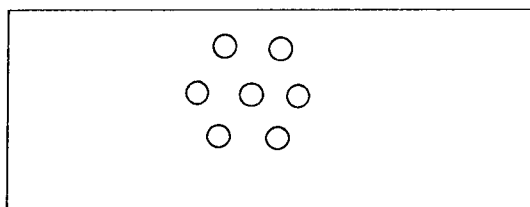


图 1-1 双向琼脂扩散打孔示意图

4. 温育 将加好样品的琼脂板置湿盒中，37℃温育过夜，观察沉淀线。

[结果判断]

在抗原和抗体孔之间形成乳白色沉淀线，表明抗原和抗体相对应。若沉淀线是一条，提示抗原与抗体只含一种相应的成分；如果是两条以上，则说明有两种以上相应的成分。对抗体进行定量时以出现沉淀线的抗体最高稀释孔作为抗体的免疫双扩效价。

[实验讨论]

1. 玻片需要清洁、边缘无破损。使用时避免玻片上有水，可用吸水纸擦干，并在浇制时置水平处。

2. 浇制琼脂板时动作要匀速，过快易使琼脂倾至玻片之外，过慢易导致边加边凝，使琼脂板凹凸不平。

3. 打孔时避免水平移动，否则易使琼脂板脱离载玻片或琼脂裂开，如此可导致加入的样品顺裂缝或琼脂底部散失。

4. 加样时应尽量避免气泡或加至孔外，以保证结果的准确性。

5. 37℃扩散后，可置冰箱放置一定时间后观察结果，此时沉淀线更加清晰。

（许化溪）

单元讨论 新型抗体制备的途径和策略

何谓基因工程抗体技术，制备基因工程抗体的目的和意义如何？

第二单元 免疫沉淀类实验

可溶性抗原与相应抗体在溶液或凝胶中接触可形成肉眼可见的沉淀物质，此即为免疫沉淀反应。基于免疫沉淀反应发展出不同类型的免疫沉淀类实验，是观察和了解抗原抗体反应的经典实验，本单元选择典型实验进行操作和介绍。

实验二 单向免疫扩散实验

单向免疫扩散试验（single immunodiffusion test）是指在抗原抗体反应时，只有其中的一种成分发生扩散的试验，它是一种定量的血清学测定方法，分试管法和平板法两种，目前最常用的是平板法。

[实验原理]

将一定抗体混匀于琼脂凝胶内，制备琼脂凝胶板、打孔、在凝胶孔中加入定量抗原，抗原向四周呈辐射状扩散并与凝胶中的抗体发生结合反应，在抗原与抗体比例合适处，形成白色沉淀环。沉淀环直径的大小与孔中抗原的浓度成正比，可从用不同浓度的标准抗原制成的标准曲线上查出待测标本中抗原的含量。

[试剂与器材]

1. 羊抗人 IgG 诊断血清（单扩效价 $>1:60$ ） 有商品出售。
2. 人免疫球蛋白工作标准（IgG 含量 10mg/ml） 有商品出售。
3. 待测人血清。
4. 琼脂糖或琼脂粉。
5. 生理盐水、 NaN_3 。
6. 载玻片（玻璃板或扩散板）、三角烧瓶、吸管、 $10\mu\text{l}$ 微量吸管、加样器、打孔器、水浴箱、温箱、湿盒、水平台、测量尺、圆规、半对数坐标纸等。

[操作方法]

1. 琼脂凝胶准备

(1) 用生理盐水配制浓度为 1.5%（15g/L）的琼脂凝胶，加 0.01%（0.1g/L） NaN_3 ，置水浴中煮沸溶化至澄清，置 56℃ 水浴中备用。

(2) 吸取已溶化琼脂 59ml 于三角烧瓶中，置 56℃ 水浴保温，将预温的羊抗人 IgG 诊断血清 1ml 与 59ml 溶化琼脂充分混合，继续保温于 56℃ 水浴中备用。

2. 制板

(1) 取洁净干燥玻片，置于水平台上。

(2) 用吸管取混有抗血清的琼脂液 4ml 浇于载玻片上（如用 8.5cm×15cm 玻璃板，则需取 20ml），置室温冷却凝固。

3. 打孔 待琼脂凝固后，用打孔器打孔，孔径 3.5mm，孔距 10~12mm。

4. 加样 将待检血清用生理盐水做 1:40 稀释，用微量加样器吸取稀释血清 $10\mu\text{l}$

加入相应的试验孔中，若同时测定多个标本，应做好标记。取人免疫球蛋白工作标准 1 支加 0.5ml 蒸馏水溶解，用生理盐水稀释成如下浓度：1 : 10、1 : 16、1 : 20、1 : 32、1 : 40，分别用微量加样器取 10 μ l 加于相应琼脂凝胶孔中。

5. 扩散 将加样的琼脂凝胶板平放于湿盒内，置 37 $^{\circ}$ C 24h 后观察结果。

[结果判断]

精确测量各试验孔沉淀环的直径，如沉淀环不圆，则取最大直径和最小直径的平均值。以各稀释度工作标准的沉淀环直径为横坐标，相应孔中 IgG 含量为纵坐标，在半对数纸上绘制标准曲线。从标准曲线上可查得待检血清相应的 IgG 含量，乘以稀释倍数，即为待检血清中 IgG 的实际含量。

[实验讨论]

1. 注意事项 ①浇制琼脂板时，抗血清与琼脂要充分混匀，浇板要均匀、平整、薄厚一致，无气泡，布满整张玻片。②加样孔打得圆整光滑，边缘不要破裂，底部勿与载玻片脱离。③抗血清与溶化琼脂混合时，一定要把溶化琼脂的温度控制在 56 $^{\circ}$ C 条件下，如过高会使抗体变性，过低则琼脂凝固不能浇板或浇板不均匀，不平整。④抗血清、待检标本、参考血清的稀释及加样要准确，每个样品最好加 2 个孔。沉淀环测量必须准确，若有误差，当乘以稀释倍数后会成几十倍增长。⑤每批实验均应同步绘制标准曲线。⑥扩散时琼脂板应保持水平，以免沉淀环变形，影响结果判定。若沉淀环不清晰，可用 1%鞣酸浸泡 10min 后再测量。

2. 方法评价 该方法稳定、简便、不需要特殊设备，参考血清及抗血清易购得，一般实验室即可开展此项试验；其结果可经染色、干燥后长期保存。但该方法敏感度较低，观察结果需时间较长，每次测定需同时做参考血清对照。

(陈育民)

实验三 对流免疫电泳

对流免疫电泳 (counter immunoelectrophoresis, CIEP)，是建立在免疫沉淀反应的基础上，通以电流，使蛋白质抗原、抗体在电场中作定向加速度免疫双扩散，从而加速沉淀的形成。

[实验原理]

在电场中，抗原、抗体自由扩散的行为受到限制，使它们在凝胶中的局部浓度得到保证。在一定的离子强度、pH8.4 以上的缓冲液中，大多数抗原解离带负电，在电场中向阳极移动，而抗体大部分是 IgG，其等电点与环境中的 pH 接近，故解离很少。另外，由于其分子量较大，加上电渗作用使其缓慢向阴极移动，在短时间内 (30~90min)，抗原与抗体在两孔之间或抗体的另一侧形成沉淀线，见图 2-1。

[试剂与器材]

1. 抗原 人血清。

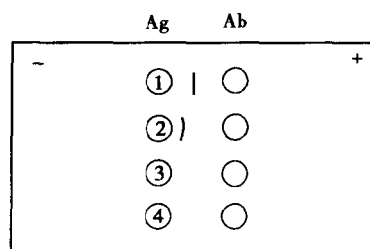


图 2-1 对流免疫电泳

2. 抗体 抗人血清（有商品出售或按实验一制备）。
3. 0.05mol/L pH8.6 巴比妥缓冲液 配制方法见附录一。
4. 1.5%离子琼脂 取备用的3%琼脂块（蒸馏水配制），加热融化后加入等体积的巴比妥缓冲液，加热混匀备用。
5. 0.05%氨基黑 10B 配制方法见附录一。
6. 电泳槽、电泳仪。
7. 其他物品 载玻片、打孔器、带盖搪瓷盘、量筒、注射器针头、适量滤纸与纱布等。

[操作方法]

1. 制备琼脂板 以吸管取琼脂 4ml 乘热时倒在载玻片上，琼脂凝固后即成离子琼脂板，然后按图 2-1 打孔，用注射器针头挑出孔内凝胶，再用热融琼脂液封闭孔底，然后将琼脂板置于电泳槽中，槽两侧搭用纱布或滤纸做盐桥。

2. 加样 将待测抗原样品 10 μ l 加在阴极侧孔内，抗血清加到阳极侧孔内，加样量与琼脂面平。

3. 电泳 电势梯度 4V/cm 长（恒压）或者电流 3~4 mA/cm 宽（恒流），电泳 30 min~1h。

[结果判断]

在电泳过程中可打开电泳槽观察，如发现有沉淀线即可关闭电源，如不清晰，可将琼脂板放入搪瓷盘中 37 $^{\circ}$ C 或室温数小时。必要时可按常规洗涤、染色。

[实验讨论]

1. 本方法宜采用带有适当电渗的琼脂为介质，应注意电渗的方向和强度，电渗作用过强会使多数蛋白质向阴极移动。

2. 如果抗原也是免疫球蛋白，或抗原抗体的扩散率比较接近，会导致电泳时抗原和抗体向一个方向移动，不能形成对流效应，这种情况一般不宜做对流免疫电泳。

3. 试分析还有哪些因素会影响电泳结果？

（沈霞）

实验四 免疫电泳

免疫电泳（immunoelectrophoresis, IEP）是将琼脂电泳与琼脂免疫扩散相结合的一种免疫化学分析技术。1953 年 Grabar 首先应用该方法进行抗原、抗体分析。

[实验原理]

在电场作用下，位于琼脂凝胶中的抗原样品因各组份的电泳迁移率不同而彼此分离，电泳结束后，在与电泳方向平行在两侧各挖一长形槽，加入相应抗血清，置室温或 37 $^{\circ}$ C 使抗原、抗体扩散，由于经电泳分离后的各种抗原成分在琼脂中呈放射状扩散，而反应抗体呈直线扩散，因此生成的沉淀线一般多呈弧状。根据各蛋白所处的电泳位置，可分为白蛋白区、球蛋白 α_1 区、 α_2 区、 β 区和 γ 区（图 2-2）。

[试剂与器材]

除指示剂（葡聚糖 0.5g，偶氮胭脂红 0.1g，巴比妥缓冲液 20ml）外，其他同对流免疫电泳。

[操作方法]

1. 离子琼脂板制备 同对流免疫电泳, 打孔按图 2-2。

2. 加样 将制备好的琼脂板置于电泳槽内, 搭好盐桥。用毛细管滴加待测样品于样品孔内 (充满小孔约 10 μ l), 再加入一小滴指示剂以指示电泳前沿。蛋白质含量应在 20mg/ml 以下。

3. 电泳 恒压 4~6V/cm 或恒流 2mA/cm。电泳 0.5~1h。

4. 琼脂扩散 电泳后用不锈钢刀片在琼脂板上如图 2-2 所示挖一长形槽, 去掉槽内琼脂, 用热融琼脂封底, 然后加入相应抗血清, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱内扩散 24~48h。

[结果判断]

扩散后结果可以直接观察, 必要时常规浸洗、染色。

[实验讨论]

免疫电泳突出的优点是分辨率高。电泳过程首先将具有不同迁移率的组份进行分离, 加入抗血清后, 依抗原抗体的特异性反应而形成各自的沉淀弧。因此可用该方法鉴定混合物中各组份的数目和性质。常见血浆蛋白各区带见图 2-3。

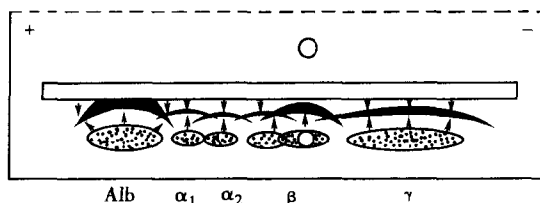
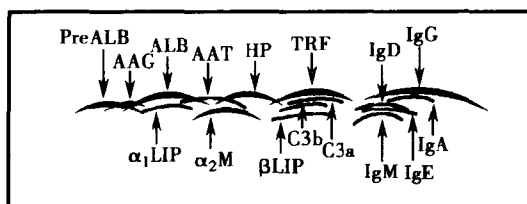


图 2-2 免疫电泳扩散模式图



PreALB: 前白蛋白; HP: 触珠蛋白; α_1 LIP: α_1 脂蛋白; ALB: 白蛋白; TRF: 转铁蛋白; β LIP: β 脂蛋白; AAT: 抗胰蛋白酶; AAG: 酸糖蛋白; α_2 M: α_2 巨球蛋白

图 2-3 血浆蛋白各区带位置示意图

由于免疫电泳的影响因素较多, 对异常结果的分析增加了复杂性。如沉淀弧数目不总是与混合物中应有的成分相符。这一现象的产生一是抗原、抗体比例不恰当, 使一些成分未生成沉淀线, 或由于相邻两抗原的迁移率非常接近而致两条弧线重叠, 也有可能一条沉淀线分离成多条。因此, 用该方法检测多种混合物时, 将几只动物或几种动物的抗血清混合使用, 则效果更好。对于免疫电泳的分析, 更重要的是经验的积累, 只有多看, 多对比分析, 才能做出恰当的结论。

(沈霞)

附 免疫散射比浊分析仪简介

光线是一种电磁波, 光散射是电磁波经过一个样品时作用于微粒的结果。散射浊度法是一定波长的光沿水平轴照射, 通过溶液时遇到抗原抗体复合物粒子, 光线被粒子颗