

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材

供医学检验技术专业用

临床免疫学检验技术 实验指导

主 编 刘 辉



 人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材
供医学检验技术专业用

临床免疫学检验技术 实验指导

主 编 刘 辉

编 者(以姓氏笔画为序)

王雪松(北华大学医学检验学院)

朱小飞(新乡医学院)

刘 辉(大连医科大学)

李 妍(吉林医药学院)

李慧玲(佳木斯大学检验医学院)

张 波(第三军医大学)

陈 晨(大连医科大学)

陈 敏(福建医科大学)

武永康(四川大学华西临床医学院)

夏 圣(江苏大学医学院)

黄俊琼(遵义医学院)

秘 书 陈 晨(兼)

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床免疫学检验技术实验指导/刘辉主编.—北京:人民卫生出版社,2015

全国高等学校医学检验专业第六轮暨医学检验技术专业第一轮规划教材配套教材

ISBN 978-7-117-20181-0

I. ①临… II. ①刘… III. ①免疫学-医学检验-医学院校-教学参考资料 IV. ①R446.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 005335 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!

临床免疫学检验技术实验指导

主 编: 刘 辉

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: 北京市卫顺印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 10 插页: 1

字 数: 250 千字

版 次: 2015 年 2 月第 1 版 2015 年 2 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-20181-0/R·20182

定 价: 29.00 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)

前 言

2012年教育部公布《普通高等学校本科专业目录(2012年)》,目录规定医学检验技术专业授予理学学士学位。为了适应新的培养目标,本教材进行了改版。与前一版相比,本书强调以技术为主线,增加了免疫检测上游技术(免疫诊断试剂的研发)、免疫检测中游技术(免疫检测的质量控制),适当删减了免疫检测下游技术(诊断效果评估)的部分内容。当前,强调对大学生科学创新能力的培养,对理学学位学生的培养也更加强调科研能力,因此,本教材增加了基于免疫技术的科研设计训练、大学生“挑战杯”选题和“PBL”教学等内容。应当强调的是,实验教学是引领学生通过感性认识认识事物的教学,因此,我们主张科研设计训练,大学生科研选题应该结合具体实例,使学生产生间接的感性认识,同时要让学多作实验,产生直接的感性认识,增强教学效果。

本书每个单元设有验证型实验和设计型实验。验证型实验主要在基础学习阶段进行,以达到验证理论和培养技能的目的;设计型实验要求利用基本的理论和实验知识以解决和验证某一具体的科学问题为目的进行实验设计,是一个主动的实验探索过程,可以采用讨论的方式完成,更鼓励在实验室实施设计的实验。单元专题讨论旨在与理论教材配合,通过理论课和实验课的学习,启发学生提出有关问题,以及为解决这些问题可采取的措施。该部分将引领学生涉猎某一领域前沿知识与技术,建议在实验的间隙组织学生分组学习、讨论,发挥小班授课的优势,弥补大班授课的不足。为方便学习,本书对各单元的实验内容编写了PPT、单元讨论提示以及部分内容示范教学录像,在指定的网站上可以方便调取,与本书配合使用。需要注意的是讨论提示并不是讨论题的唯一答案。

免疫学检验技术发展日新月异,很多检验技术不能在教学实验室中完成,因此,到临床实验室中学习也是免疫学检验技术实验教学的重要内容,为此,本书还增加了临床见习的内容进行教学,达到实验教学的目的。这些内容也是临床实验室实习的要点,所以,本书也可以在临床实验室实习中参考使用。

本书的编者全部来自教学一线,大多具有临床实验室工作经历,有多位是医院检验科主任,具有丰富的教学和实践经验,主张针对当前免疫学检验技术的热点问题选择和设计实验,这在他们撰写的章节中能够很好地体现出来。本书主要的参考书是《临床免疫学检验实验指导》(第4版),在此向该书的作者表示衷心感谢!免疫学和免疫学检验技术为载体的新技术和新指标不断出现,教育改革也在不断深入进行,限于编者的认识水平,不足之处,希望广大师生对本书提出宝贵意见。

刘 辉

2015年1月

目 录

第一单元 免疫沉淀类实验	1
验证实验一 双向免疫扩散试验	1
验证实验二 单向免疫扩散试验	2
验证实验三 对流免疫电泳	4
设计实验 抗原物质的变化及性质分析	6
单元讨论 免疫沉淀类实验的发展	7
第二单元 免疫凝集类实验	9
验证实验一 直接凝集试验	9
验证实验二 间接凝集试验	11
验证实验三 间接凝集抑制试验	12
设计实验 不完全抗体检测的实验设计	13
单元讨论 免疫凝集类实验的发展趋势	14
第三单元 酶免疫检测技术	15
验证实验一 酶联免疫吸附试验	15
验证实验二 酶免疫组织化学染色技术	17
设计实验一 定量酶免疫分析中标准曲线数学模型的建立	18
设计实验二 酶联免疫试剂盒的研制	23
单元讨论 根据待测物质特性选择酶联免疫试验的技术类型	25
第四单元 其他免疫标记技术	27
验证实验一 荧光免疫技术	27
验证实验二 免疫印迹试验	28
验证实验三 斑点金免疫渗滤试验	31
验证实验四 胶体金免疫层析试验	32
设计实验 免疫印迹增敏实验	33
单元讨论 标记免疫检测技术发展进程和趋势	34
第五单元 细胞免疫检测技术	35
验证实验一 外周血单个核细胞的分离	35
验证实验二 T淋巴细胞转化试验	36

验证实验三 细胞吞噬率与吞噬指数测定	39
设计实验 白细胞杀菌能力测定	41
单元讨论 细胞免疫检测技术的现状及发展	42
第六单元 其他免疫物质检测实验	43
验证实验一 血清总补体活性测定	43
验证实验二 血清中免疫复合物检测	45
验证实验三 尿中本-周蛋白检测	46
设计实验 细胞因子检测	48
单元讨论 评估机体免疫状态的指标及选择原则	50
第七单元 综合型实验	51
综合实验一 免疫血清-多克隆抗体的制备技术	51
综合实验二 标记抗体的制备	55
综合实验三 酶联免疫吸附试验检测伤寒 O 抗体方法的建立	58
附:单克隆抗体制备	61
第八单元 免疫试剂盒说明书阅读及性能评价	65
实验一 最低检测限验证实验	67
实验二 精密度验证实验	69
实验三 可报告范围验证实验	74
实验四 特异度验证实验	77
实验五 参考区间评价实验	79
附:免疫试剂盒说明书基本要求	82
第九单元 实验设计训练	85
实验一 实验影响因素分析和最佳实验条件探索	85
实验二 机体免疫功能评估和影响机体免疫功能因素的观察	88
实验三 实验诊断效能评价和联合指标诊断效果观察	90
附:医学实验设计基本原则	94
第十单元 大学生“挑战杯”选题和“PBL”教学	97
选题指导一 感染疾病免疫学诊断	98
选题指导二 超敏反应性疾病	99
选题指导三 自身免疫性疾病	100
选题指导四 免疫增殖性疾病	101
选题指导五 免疫缺陷病	102
选题指导六 肿瘤免疫	103
选题指导七 移植免疫	104
附:科学研究基本过程	106

第十一单元 临床免疫实验室见习	111
临床见习一 免疫浊度分析系统	111
临床见习二 酶免疫分析系统	117
临床见习三 化学发光免疫分析系统	122
临床见习四 荧光免疫分析系统	128
临床见习五 流式细胞分析系统	133
临床见习六 免疫固定电泳系统	140
附:临床免疫实验室主要检测技术平台和检验项目	144

附录 常用试剂及配制方法	147
一、常用缓冲溶液	147
二、常用染色试剂	149
三、酶联免疫吸附试验常用试剂	150
四、其他类试剂	151

实验实训一 双向免疫扩散试验

双向免疫扩散试验(double immunodiffusion)是应用抗原抗体反应原理进行半定量检测血清中各自双向扩散,借此检测反应前未知抗原抗体效价并检测混合,出现肉眼可见的沉淀线。根据沉淀线的数量、形状及位置等,即可对未知抗原抗体效价进行分析。本试验以双向免疫扩散试验用于检测血清中抗原抗体的扩散效价。

【实验目的】

掌握双向扩散试验的操作步骤及结果判定方法,并能通过双向免疫扩散试验检测未知抗原抗体的效价。

【材料与试剂】

1. 抗原: 鸡蛋白血清,用生理盐水做 $1:3$ ~ $1:10$ 系列稀释液。
2. 抗体: 羊抗人IgG-琼脂凝胶。
3. 10~15%的氯化钠琼脂凝胶(用生理盐水配制,浓度为6%氯化钠)。
4. 载玻片、三角烧瓶、微量移液器、上孔器、3~4mm宽、0.5mm厚、2cm长玻璃棒。

【操作步骤】

1. 制备琼脂凝胶: 将生理盐水(蒸馏水)100ml煮沸,加入琼脂10g。
2. 倒胶: 将琼脂凝胶平铺于水平台上,用微量移液器加入10%氯化钠溶液10ml,待琼脂凝胶

沉淀反应(precipitation)是可溶性抗原与相应抗体在电解质存在的条件下发生特异性结合,在二者比例适当处形成肉眼可见的沉淀现象。沉淀反应分为两个阶段,第一阶段为抗原抗体特异性结合阶段,此阶段可以在几秒到几十秒内瞬间完成,出现不可见的可溶性复合物。第二阶段为形成可见的免疫复合物阶段,反应较慢,需要几十分钟到数小时完成,受抗原抗体比例、分子大小、亲合力、电解质浓度和反应温度的影响,沉淀反应中可根据此阶段形成的沉淀线或沉淀环来判断结果。沉淀反应根据反应介质和检测方法的不同,主要包括凝胶内沉淀试验和液相免疫沉淀试验。凝胶内沉淀试验是利用可溶性抗原和相应抗体在凝胶中扩散,形成浓度梯度,在抗原抗体相遇并且比例适当的位置形成肉眼可见的沉淀线或沉淀环。常用的凝胶包括琼脂、琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶等,适宜浓度的凝胶实际是一种固相化的缓冲液,呈网络结构,将水分固相化,抗原和抗体蛋白质在凝胶内自由扩散如同在液体中自由运动。抗原抗体复合物由于分子量超过凝胶网孔的限度而被网络在凝胶中,形成沉淀。凝胶内沉淀试验包括免疫扩散试验和免疫电泳技术,液相免疫沉淀试验包括环状沉淀反应、絮状沉淀反应和免疫浊度分析。本单元重点介绍双向免疫扩散试验、单向免疫扩散试验和双向免疫电泳。

验证实验一 双向免疫扩散试验

双向免疫扩散试验(double immunodiffusion assay)是指可溶性抗原与相应抗体在半固体琼脂介质中各自向对方扩散,彼此相遇后在浓度比例恰当处发生特异性结合,出现肉眼可见的沉淀线。根据沉淀线的位置、形状及对比关系,可对抗原或抗体进行定性分析。本试验以双向免疫扩散试验的方法检测健康人血清 IgG 的扩散效价。

【实验原理】

在琼脂凝胶中,待检人血清 IgG 和羊抗人 IgG 抗血清在不同孔内各自向四周扩散,在比例恰当处形成肉眼可见的白色沉淀线,证明两者发生特异性结合反应。

【试剂与器材】

1. 抗原 健康人血清,用生理盐水做 1:5 ~ 1:40 系列倍比稀释。
2. 抗体 羊抗人 IgG 抗血清。
3. 10 ~ 15g/L 琼脂糖或琼脂粉以生理盐水配制,隔水加热煮沸后备用。
4. 载玻片、三角烧瓶、微量加样器、打孔器、5ml 吸管、吸球、湿盒、水浴箱、温箱等。

【操作步骤】

1. 制备琼脂凝胶 用生理盐水配制 10 ~ 15g/L 琼脂,隔水加热煮沸备用。
2. 浇板 将载玻片置于水平台上,用吸管吸取 4 ~ 4.5ml 融化的琼脂倾注于洁净的载玻

片上,滴加时注意过程需要连续但速度不要过快,要使琼脂盖满整张玻片,使其均匀、饱满,勿溢出并避免产生气泡。静置待凝(10~15分钟),制成薄厚均匀的琼脂凝胶板。

3. 打孔 将梅花形打孔模板至于琼脂凝胶板下,用直径3mm的打孔器打孔,使其孔径为3mm,孔距4mm,孔要求圆整光滑,孔缘不能破裂,底部勿与载玻片脱离。如图1-1所示。

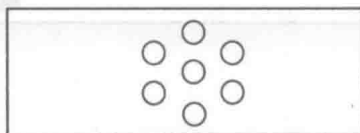


图1-1 双向免疫扩散试验打孔示意图

4. 加样 用10 μ l微量加样器分别取抗原(待检人血清IgG)、抗体(羊抗人IgG抗血清)加入孔中。中心孔加入抗体,周围孔分别加入不同稀释度的抗原。

5. 温育 将已加样的琼脂凝胶板平放于湿盒内,置37 $^{\circ}$ C温箱温育24小时,观察沉淀线。

【结果判断】 以出现沉淀线的健康人血清最高稀释度为人血清IgG的扩散效价。

【实验讨论】

1. 抗原抗体浓度的影响 当抗原和抗体浓度相同时,沉淀线居中;若沉淀线靠近抗原孔,说明抗体浓度较大;沉淀线靠近抗体孔,则表示抗原浓度较大。出现这一现象主要是因为浓度越大扩散越快,扩散距离越远,所以沉淀线靠近浓度低的一方。不出现沉淀线,可能为无相对应的抗体(或抗原)存在或者抗原过量。

2. 抗原抗体分子量的影响 当抗原和抗体分子量大致相等时,沉淀线呈直线。分子量越小扩散越快,分子量越大扩散越慢。扩散慢者扩散圈小,局部浓度高,形成的沉淀线弯向分子量大的—方。

3. 抗原性质的影响 若相邻两抗原形成的沉淀线互相吻合相连,表明抗体与两个抗原中的相同表位结合;若两条沉淀线交叉,说明两个抗原完全不同;若两条沉淀线相切,说明两个抗原之间有部分相同。因此可根据沉淀线的位置、形状、数目等,初步分析抗原和抗体的纯度、浓度、扩散速度等理化性状。

4. 扩散时间的影响 试验扩散时间要适当,一般在24~48小时内观察结果。时间过短,沉淀线不出现,时间过长会导致已形成的沉淀线解离而出现假象。

5. 方法评价 该方法简便易行,结果稳定可靠。除用于血清IgG的检测以外,还曾用于诊断和分析某些疾病,如检测AFP、HBsAg等,但敏感度低,所需时间长。

验证实验二 单向免疫扩散试验

单向免疫扩散试验(single immunodiffusion assay)是用已知抗体测定未知量的相应抗原,先将一定量的抗体混于琼脂凝胶中,使待测的抗原溶液从局部向琼脂内自由扩散,在一定区域内形成肉眼可见的沉淀环,从而根据沉淀环的直径与面积对抗原量做出计算。根据试验形式可分为试管法和平板法两种,试管法因沉淀环不易观察及定量,目前较少使用。平板法是由Mancini于1965年提出,是将一定量的已知抗体混于琼脂凝胶中制成琼脂板,在适当位

置打孔加入抗原,在适宜温度和一定反应时间后,孔内抗原环状扩散形成肉眼可观察到的浓度梯度环。最后测量沉淀环的直径或计算环的面积,环的直径或面积的大小与抗原含量呈正相关。由于该方法简单、易于操作、便于观察,仍是此类试验中较常用的一种方法。本试验以单向免疫扩散试验的方法对待检人血清 IgG 进行定量测定。

【实验原理】

将一定量的羊抗人 IgG 抗血清成分混合于琼脂凝胶中,制成含有特异性羊抗人 IgG 抗血清的琼脂板,待琼脂凝固后打孔,并在相应孔中加入待检人血清 IgG。待检血清在琼脂板中向四周呈环状扩散,随着扩散时间的延长,沉淀环不断溶解与再形成,其直径也不断扩大,直到抗原抗体反应结束为止,在两者浓度比例恰当处形成肉眼可见的白色沉淀环,沉淀环的直径或面积与待检人血清中 IgG 浓度呈正相关。同时用标准免疫球蛋白或国际参考蛋白制成标准曲线(Fahey),适于处理小分子抗原和较短时间 24 小时扩散的结果。抗原浓度的对数 $\log C$ 与沉淀环直径 d 呈线性关系,常数 $K = \log C/d$,用半对数坐标纸画曲线,此为 Fahey 曲线,即可用以定量检测人血清 IgG 浓度。

【试剂和器材】

1. 抗原 待检人血清、免疫球蛋白工作标准(IgG 含量为 10.10mg/ml)。
2. 抗体 羊抗人 IgG 抗血清(单扩效价 1:100)。
3. 琼脂糖或琼脂粉、生理盐水、 NaN_3 。
4. 载玻片、微量加样器、打孔器、5ml 吸管、吸球、三角烧瓶、湿盒、水浴箱、温箱、半对数坐标纸等。

【操作步骤】

1. 制备抗体琼脂凝胶

(1)用生理盐水配制 10 ~ 15g/L 琼脂,加 0.01% (0.1g/L) NaN_3 ,隔水加热煮沸琼脂,置 56℃ 水浴中备用。

(2)吸取 99ml 已融化的琼脂于三角烧瓶中,置 56℃ 水浴中保温,将预温的羊抗人 IgG 抗血清 1ml 与琼脂充分混合,继续保温于 56℃ 水浴中备用。

2. 浇板 将清洁干燥的载玻片置于水平台上,用吸管吸取充分混匀的抗体琼脂 4 ~ 4.5ml 倾注于玻片上,置室温冷却凝固。要求浇板时要均匀、平整、无气泡、薄厚均匀。静置待凝(10 ~ 15 分钟),制成薄厚均匀的含抗体的琼脂凝胶板。

3. 打孔 琼脂凝固后,用打孔器打孔,孔径 3mm,孔距 10 ~ 12mm。要求孔打得圆整光滑,孔缘不能破裂,底部勿与玻片分离。如图 1-2 所示。

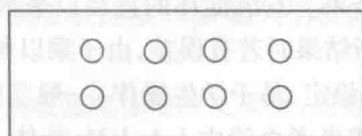


图 1-2 单向免疫扩散试验打孔示意图

4. 加样

(1)稀释人免疫球蛋白工作标准品:取冻干人免疫球蛋白工作标准品 1 支加蒸馏水 0.5ml,待完全溶解后,用生理盐水稀释成不同的稀释度。其稀释范围为 1:5、1:10、1:20、1:40, IgG 相应含量为 2020g/L、1010g/L、505g/L、252.5g/L。

(2) 稀释待检血清:将待检血清用生理盐水做 1:40 稀释。

(3) 用微量加样器分别吸取各稀释度的人免疫球蛋白工作标准品 $10\mu\text{l}$ 加入到标准抗原孔,制备标准曲线。再用同样的方法吸取已稀释好的待检血清 $10\mu\text{l}$ 加入到待检血清孔。

5. 扩散 将已加样的琼脂凝胶板平放于湿盒中, 37°C 温箱温育 24 小时,观察结果。如果沉淀环不清晰,可用生理盐水浸泡 2~3 小时。

【结果判断】

1. 绘制标准曲线 以各稀释度工作标准的沉淀环直径为横坐标,相应孔中的 IgG 含量为纵坐标,在半对数纸上按 Fahey 法绘制出标准曲线。如图 1-3 所示。

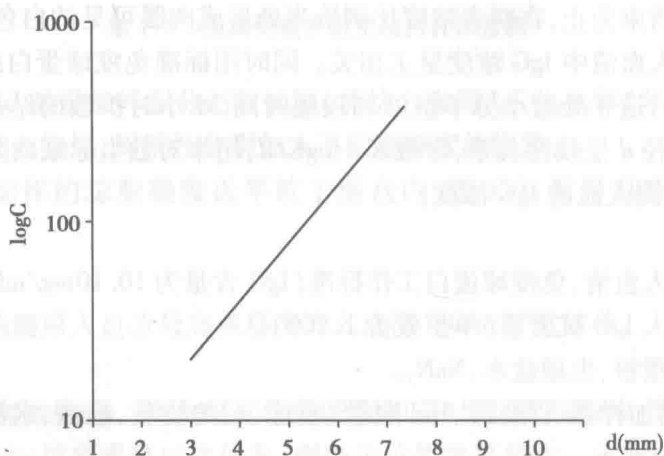


图 1-3 单向免疫扩散试验标准曲线

2. 结果判定 待测标本血清中所含 IgG 量根据沉淀环直径查标准曲线,将查得的 IgG 含量乘以标本的稀释倍数,即待检标本血清中 IgG 的实际含量。

【实验讨论】

1. 注意事项 ①抗血清要求亲和力强、特异性好、效价高。②每次测定必须制作标准曲线,标准曲线在 16~24 小时呈直线,48 小时以上呈反抛物线。制作标准曲线的同时须测定质量控制血清,不可一次做成,长期使用。③出现结果与真实含量不符的情况主要发生在 Ig 测定中。④双重沉淀环现象多是由不同扩散率但抗原性相同的两个组分所致。⑤制备抗体琼脂凝胶时,免疫血清要与琼脂充分均匀,保温时间不能太长,温度不宜过高,一般为 56°C 左右,否则,抗体容易变性失活。但温度又不宜过低,过低时琼脂趋于凝固,不能浇板或浇板不均匀、不平整,均会影响试验结果。⑥沉淀环的直径以毫米为单位,尽量采用游标卡尺进行测量,以保证结果准确,在判断结果时若有误差,由于乘以稀释倍数,则误差将成倍增加。

2. 方法评价 该方法简便、稳定、易于学生操作,一般实验室均可开展。除检测人血清 IgG 含量外,还可用于健康人群或患者血清中 IgA、IgM、补体、白蛋白、蛋白酶等蛋白质含量的定量测定。

验证实验三 对流免疫电泳

对流免疫电泳(counter immunoelectrophoresis, CIEP)是可溶性抗原和抗体在双向免疫扩散的基础上与电泳相结合的定向加速免疫扩散技术,此方法缩短了双向免疫扩散的时间,增

加了试验的敏感性,是一种更为简便快速的方法。

【实验原理】

在偏碱性的缓冲液和适当的直流电场中,抗原和抗体的扩散具有一定的特点。在 pH 8.6 以上的缓冲液中,大部分蛋白质抗原等电点低解离带较强的负电荷,分子量小,受电渗作用小,在电场中向正极泳动;而大部分抗体属于 IgG,等电点偏高,在此种 pH 条件下只带微弱的负电荷,由于其分子量大,暴露的极性基团少,在电场中泳动缓慢,且受电渗作用(指在电场中溶液对于一个固定固体的相对移动。琼脂是一种酸性物质,在碱性缓冲液中带有负电荷,而与其相接触的溶液带正电荷,因此便向负极泳动,此为电渗)的影响,随水流向负极移动,电渗引向负极移动的速度超过了 IgG 向正极的移动速度,因此抗体移向负极,由此抗原、抗体就达到了定向对流,在抗原抗体最适比处形成白色沉淀线,根据沉淀线相对于两孔的位置可大致判断抗原抗体的比例关系。

【试剂和器材】

1. 抗原 人血清。
2. 抗体 抗人血清。
3. pH 8.6 0.05mol/L 巴比妥缓冲液。
4. 用巴比妥缓冲液配制 1% 琼脂,加热混匀备用。
5. 电泳槽、电泳仪、孔型模板、打孔器、滤纸、纱布条、微量加样器、载玻片、水浴箱、湿盒、吸管、吸球等。

【操作步骤】

1. 制备巴比妥琼脂凝胶

- (1) 取出一清洁载玻片,用 75% 乙醇冲洗干净,晾干备用。
- (2) 将 1% 巴比妥琼脂融化后,置 56℃ 水浴中备用。
- (3) 用吸管吸取 4~4.5ml 琼脂溶液滴加于玻片上,室温放置,待凝固后打孔,孔径 3mm,孔距 10mm。如图 1-4 所示。

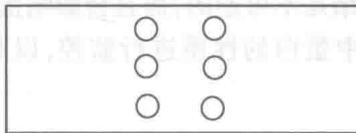


图 1-4 对流免疫电泳打孔示意图

2. 加样 用微量加样器分别吸取抗原 10 μ l 加入阴极侧孔内,抗体 10 μ l 加入阳极侧孔内,所加样品切勿外溢。

3. 电泳 将加样完毕的琼脂板置电泳槽的支架上,抗原孔置阴极端,抗体孔置阳极端,电泳槽内加 pH 8.6、0.05mol/L 巴比妥缓冲液置电泳槽的三分之二处,琼脂板两端分别用滤纸或纱布与缓冲液相连。

4. 通电 控制电流在 3~4mA/cm 板宽或端电压为 5~6V/cm 板长,电泳 30~60 分钟。电泳完毕后,切断电源,观察结果(注意避免触电)。

【结果判断】

在抗原和抗体两孔之间形成的白色沉淀线即为抗原抗体复合物。如果沉淀线不够清晰,于湿盒中 37℃ 保温数小时,可增强沉淀线的清晰度。

【实验讨论】

1. 注意事项 ①抗原抗体两者浓度相近,则在两者中间形成沉淀线;若抗原浓度高于抗体,沉淀线靠近抗体孔,抗原浓度越高,沉淀线越接近抗体孔,甚至超过抗体孔。②需要选择高特异性、高亲和力的抗体,否则结果难以判断。③抗原抗体的电极方向不能相反。电泳时所用电流不宜过大,时间不宜过长,以免蛋白质变性。④搭桥过程中要使滤纸与凝胶充分接触,保证电流均匀,避免沉淀线出现歪斜、变形。

2. 方法评价 ①此方法简便、快捷。敏感性比双向免疫扩散法高8~16倍,可测出蛋白质的浓度达 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。常用于某些抗原的定性检测(如AFP、HBsAg等),同时也可用于抗原的半定量测定,或根据沉淀线的位置、形状对抗原和抗体进行相对浓度的分析。②IgG在对流免疫电泳中有独特的电泳形式:一部分泳向正极,另一部分泳向负极。IgG₃和IgG₄与一般蛋白质相同,泳向正极,IgG₁和IgG₂带电荷少,受电渗作用力大于电泳,而向负极移动。因此对流免疫电泳只是部分IgG的电渗作用所致。此种方法不适合于抗原为免疫球蛋白或抗原抗体迁移率接近的情况,否则会导致抗原抗体朝同一方向泳动。③对流免疫电泳由于该方法分辨率差,当多种抗原抗体系统同时存在时,形成的沉淀线常重叠,难以分辨,所以不用该方法做某种抗原或抗体组分的免疫化学分析。

设计实验 抗原物质的变化及性质分析

大分子抗原物质经过理化因素处理之后是否发生了抗原性的变化,通过这些变化也可以推断抗原物质的结构和功能是否发生了新的改变。

【问题背景资料】

大分子的抗原物质在细胞和生物体的生命活动过程中,起着十分重要的作用,生物的某些结构和性状都与这些物质有关。现代分子生物学经常采用一些方法对大分子物质进行有目的的改造,如盐析、甲醛处理、加热、紫外线照射、超声波等,如处理不当这些物质会发生性质上的改变而凝结起来,这种凝结是不可逆的,而且会影响蛋白的性质。我们的目的为寻求是否有简单的方法对处理过程中蛋白的性质进行监控,以观察处理前后抗原物质的性质变化。

【实验设计提示】

首先制备出未处理抗原物质的抗体,用该抗体与处理前和处理后的物质分别进行免疫反应,观察处理前后抗原性是否发生变化。然后制备出处理后抗原物质的另一抗体,用该抗体与处理前和处理后的抗原物质分别进行免疫反应,观察抗原性是否有变化。通过了解抗原性的变化进一步推断大分子抗原物质的结构和功能是否有新的改变。在试验过程中,通过双扩的方法,观察各种抗原和抗体之间的反应及变化。如图1-5所示。

【小组讨论提纲】

1. 有哪些理化因素能够导致抗原性发生变化,变化的特点和意义是什么?
2. 免疫电泳的方法是否可以用于观察抗原物质性质的变化?
3. 是否能设计定量观察大分子抗原物质抗原性变化的实验?

第二单元

免疫凝集类实验

凝集试验是一种经典的血清学反应,它是指细菌、螺旋体和红细胞等颗粒性抗原或表面包被可溶性抗原(或抗体)的颗粒性载体与相应抗体(或抗原)特异性结合后,在适当电解质存在下,出现肉眼可见的凝集现象。参与凝集反应的抗原称为凝集原,参与凝集反应的抗体称为凝集素。凝集反应由于方法简便,操作简单,在临床中广泛用于细菌鉴定、菌种分型、ABO血型鉴定以及抗体效价测定等方面。

在免疫学检验技术中,凝集试验可以分为直接凝集试验和间接凝集试验两大类。

验证实验一 直接凝集试验

直接凝集试验(direct agglutination test)是指细菌、螺旋体和红细胞等颗粒性抗原与相应抗体直接反应,在适当电解质存在下,出现肉眼可见的凝集现象。可以用已知抗原检测未知抗体,也可以用已知抗体检测未知抗原。常用的试验方法有玻片凝集法和试管凝集法两种。本实验以肥达试验(Widal test)检测抗体的效价为例介绍试管凝集试验。

【实验原理】

将已知的颗粒性抗原(伤寒沙门菌)定量加入到倍比稀释的待测血清中,根据各稀释血清的凝集情况,判定血清中是否有相应抗体及其抗体的效价。

【试剂与器材】

1. 抗原 伤寒沙门菌 O 诊断菌液($7 \times 10^8/\text{ml}$)。
2. 抗体 待检伤寒沙门菌免疫血清或疑似感染的伤寒沙门菌的待测血清,用生理盐水做 1:20 稀释(生理盐水 3.8ml 加待测血清 0.2ml 混匀)。
3. 其他 生理盐水、试管架、试管、刻度吸管、吸耳球、微量加样枪、恒温水浴箱等。

【操作步骤】

1. 试管准备 取干燥、洁净试管 7 支排列于试管架上,依次编号做好标记;每支试管中各加入生理盐水 0.5ml。
2. 血清倍比稀释 取 1:20 稀释的待测血清 0.5ml 加入到第 1 管,充分混匀后吸取 0.5ml 加入到第 2 管,混匀后吸取 0.5ml 加入到第 3 管,以此类推,第 6 管混匀后吸取 0.5ml 弃去,第 7 管不加血清作为阴性对照。此时第 1~6 管的血清稀释倍数依次为 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280。
3. 加诊断菌液 每管各加伤寒沙门菌 O 诊断菌液 0.5ml 混匀,血清最终稀释度依次为 1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560,血清倍比稀释方法见表 2-1。

表 2-1 试管凝集法操作程序

试管号	1	2	3	4	5	6	7
生理盐水 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
待测血清 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	弃去
伤寒 O 菌液 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清稀释度	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	阴性对照

4. 水浴 置 37℃ 水浴中反应 2~4 小时,取出观察结果或室温过夜,次日观察结果。

【结果判断】

将试管置于有良好光源和黑色背景映衬下,先不要振摇试管,观察管底凝集物的范围和上清液的浊度,然后轻摇或用手指轻弹管壁使凝集物悬浮,观察悬液浊度和凝集块的大小,用++++、+++、++、+、-等符号记录凝集现象。

1. 阴性对照管 无凝集现象,可见管底沉淀物边缘规整,呈圆形聚集状,轻轻摇动试管,细菌分散均匀混浊。

2. 试验管 伤寒沙门菌 O 抗原凝集物呈颗粒状,轻摇时不易散开,往往黏附于管底;H 抗原凝集物呈棉絮状,轻摇时易悬浮和离散。

根据凝集程度,试验结果可分为以下五级:

“++++”:上清液澄清透明,细菌全部凝集,管底形成大片状凝集物。

“+++”:上清液较透明,细菌大部分凝集,管底形成片状凝集物,较小而薄。

“++”:上清液较混浊,约 50% 的细菌凝集并沉于管底,管底出现凝集环。

“+”:上清液混浊,仅少量细菌凝集,管底可见沉积的细菌周边有稀疏、点状的凝集物。

“-”:上清液混浊,无凝集,液体浊度与阴性对照管相似,细菌沉于管底呈边缘光滑的圆点。

3. 血清抗体效价 效价(或滴度)是指将标本作一系列倍比稀释后进行反应,以出现阳性反应的最高血清稀释度作为效价(或滴度)。血清效价代表血清中抗体的含量,血清效价愈高,抗体含量愈多。试验管出现“++”以上的凝集现象即可判断为阳性,以出现“++”凝集现象的最高血清稀释倍数为该待测抗体的效价。

【实验讨论】

(一) 关于肥达试验

肥达试验是一种经典的半定量试管凝集试验,在临床上主要用已知的伤寒沙门菌 O 抗原或 H 抗原检测血清中有无相应的特异性抗体及其效价,以辅助伤寒的诊断、治疗、判断预后以及流行病学调查。

试验中,在加菌液时,最好从第 7 管往前加,以免将高浓度的血清带到低浓度的试管里,导致结果不准确。试验结束后,将试管及吸头消毒灭菌。

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凝集现象。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,在检测中出现该情况时,可以增加抗体的稀释倍数重新测定。