

实 验 免 疫 学

北京医学院微生物学教研组 编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

人 民 卫 生 出 版 社 印 刷 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

787×1092毫米32开本 17¼印张 5插页 403千字

1930年3月第1版第1次印刷

印数：1—14,150

统一书号：14048·3782 定价：1.55元

目 录

第一章 免疫球蛋白的分离技术	1
一、盐析法	1
(一)基本原理	1
(二)材料	2
(三)方法	2
二、凝胶过滤法	3
(一)基本原理	3
(二)方法	8
(三)应用	13
三、离子交换层析法	13
(一)基本原理	13
(二)方法	22
(三)成批制备技术	27
(四)制备电泳	28
1. 粉末平板电泳 2. Pevikon 板电泳	
第二章 各类免疫球蛋白的提取与断链技术	30
一、血清 IgG 的提纯	30
(一)粗提	30
(二)低温酒精法提取 γ -球蛋白 (略)	31
(三)层析法提纯	31
二、血清 IgA 的提纯	32
(一)材料	32
(二)方法	32
三、分泌 IgA 的提纯	33
(一)材料	33

(二)方法·····	33
四、血清 IgM 的提纯·····	34
(一)材料·····	34
(二)方法·····	34
(三)血清蛋白分布·····	35
五、血清 IgE 的提纯·····	36
(一)正常人血清或高 IgE 血症患者分离 IgE·····	36
(二)骨髓瘤病人血清 IgE 的分离·····	37
六、化学还原法断链技术·····	40
(一)基本原理·····	40
(二)材料·····	41
(三)方法·····	41
(四)评价·····	42
七、蛋白分解酶断链技术·····	43
(一)木瓜酶消化法·····	43
(二)胃酶消化法·····	45
第三章 亲和层析法纯化抗体技术·····	48
一、基本原理·····	48
二、方法·····	49
(一)活化载体·····	49
(二)偶联蛋白·····	49
(三)层析吸附与解吸附纯化蛋白·····	49
1. 装备层析柱 2. 上样吸附 3. 解吸附 4. 层析柱再生	
〔附一〕 Sepharose 4B 的制备法·····	52
(一)材料·····	52
(二)方法·····	52
〔附二〕 溴化氰合成法·····	53
(一)仪器及药品·····	53

(二)制备方法	54
(三)注意事项	56
第四章 免疫球蛋白基本鉴定技术	58
一、单向免疫扩散法	58
(一)基本原理	58
(二)材料	58
(三)方法	58
二、双向扩散法	61
(一)材料	62
(二)方法	62
(三)抗原浓度	63
(四)抗血清类型	63
(五)结果分析	63
(六)抗原浓度半定量试验	63
(七)抗原的分子量与扩散系数的鉴定	63
三、免疫电泳法	64
(一)基本原理	64
(二)材料	65
(三)方法	66
(四)技术分析	66
四、单向定量免疫电泳(火箭电泳)	72
(一)基本原理	72
(二)材料	73
(三)方法	73
(四)影响因素	75
五、醋酸纤维膜电泳	75
(一)基本原理	75
(二)材料	76
(三)方法	76

(四) 技术分析·····	79
第五章 免疫球蛋白的特殊鉴定技术 ·····	83
一、聚丙烯酰胺凝胶电泳 ·····	83
(一) 基本原理·····	83
1. 丙烯酰胺的聚合	
2. 聚丙烯酰胺孔径的调节	
3. 缓冲系统	
(二) 材料·····	89
(三) 仪器装置·····	90
(四) 试剂的纯化与保存·····	91
(五) 方法·····	93
(六) 聚丙烯酰胺凝胶免疫电泳·····	95
(七) 免疫球蛋白凝胶电泳鉴定·····	96
二、放射免疫自显影法测定 IgE·····	97
(一) 基本原理·····	97
(二) 材料·····	98
(三) 方法·····	98
(四) 放射免疫电泳·····	99
(五) 放射双向扩散·····	100
(六) 放射单向扩散·····	100
第六章 免疫球蛋白的定量与标准化技术 ·····	102
一、免疫板中抗体稀释度的选择·····	102
(一) 原理·····	102
(二) 材料·····	102
(三) 方法·····	103
二、免疫板上抗原稀释度的选择·····	104
三、抗原抗体比例关系的选择·····	104
(一) 直线形曲线·····	104
(二) 稀释比例·····	105
四、免疫球蛋白水平的标定 ·····	106

(一)正常血清定量标准化·····	106
(二)免疫球蛋白标准曲线的制订·····	107
五、体液免疫球蛋白正常值·····	110
〔附一〕 2-巯基乙醇制备·····	112
〔附二〕 碘(代)乙酰胺的制备·····	116
第七章 补体的测定 ·····	123
一、简介·····	123
二、总补体活性 (CH_{50} 单位) 的测定·····	124
(一)原理·····	124
(二)材料·····	126
(三)方法·····	130
〔附〕 本研究室的实验资料·····	137
三、补体第二途径溶血活性 (ACH_{50} 单位) 的测定·····	138
(一)原理·····	138
(二)材料·····	139
(三)方法·····	140
(四)注意事项·····	141
(五)补体第二活化途径与临床的关系·····	141
四、单一补体成分的测定·····	142
(一)人血清补体成分的分离·····	142
(二)人血清补体成分的鉴定·····	154
1. 免疫溶血法	
〔附〕 溶血试验平皿法·····	169
2. 免疫化学法	
(三)补体第三成分的分离和测定·····	173
1. 酵母素吸附法	

〔附〕 人体中补体第三种成分 (C_3) 的测定法	177
-------------------------------	-----

第八章 免疫荧光技术 198

一、荧光色素及抗血清 198

(一) 荧光色素 198

1. 荧光的特性 2. 荧光色素 3. 荧光色素的鉴定

(二) 抗血清 201

1. 抗体效价 2. 抗体特异性 3. 抗体的纯化

二、荧光抗体的标记、纯化、鉴定及贮存 203

(一) 标记方法 203

(二) 标记抗体的纯化 206

1. 去除游离荧光色素 2. DEAE-Cellulose 柱层析分段

3. 脏粉吸收纯化 4. F/P 比值的计算

(三) 标记抗体的鉴定 212

1. 无游离荧光色素 2. 足够的抗体含量及合适的 F/P 比值 3. 抗体活性不明显降低 4. 不含非需要的抗体

(四) 荧光抗体的贮存 214

三、标本的制作 214

(一) 组织标本的取材、处理及运送 214

1. 速冻法 2. 固定包埋法

(二) 组织及细胞标本的制作 216

(三) 切片及细胞的固定 217

1. 固定剂的选择 2. 固定条件

(四) 组织的选择 220

(五) 玻片的洁淨及处理 220

四、染色方法及特异性试验 221

(一) 染色方法 221

(二) 染色要点 227

(三)特异性试验·····	228
1. 抗体特异性对照 2. 标记程度适宜性对照 3. 特异抗 原吸收试验 4. 阻断试验 5. 自发荧光对照	
五、荧光显微镜及标本观察·····	230
(一)荧光显微镜的基本结构·····	230
(二)使用要点及标本观察要点·····	239
六、非特异荧光的来源及其去除和荧光抗体标准化·····	242
(一)非特异荧光的来源及其去除·····	242
1. 荧光色素标记抗体不合要求 2. 标本自身的非特异荧 光 3. 显微镜光源发射的荧光	
(二)免疫荧光技术的标准化·····	245
1. 实验结果不一致的原因 2. 荧光抗体的标准化	
七、免疫荧光定量·····	247
(一)限定抗原底物珠系统 (DASS) 的制备·····	249
(二)免疫荧光反应·····	250
(三)荧光定量测定·····	250
八、免疫荧光技术的应用·····	251
(一)病原微生物学方面的应用·····	251
1. 细菌及病毒的快速鉴定 2. 体液抗体测定 3. 病毒在 细胞内增殖周期的研究	
(二)免疫学方面的研究·····	252
(三)组织内抗原物质及介质的定位与分布·····	254
(四)肿瘤方面的研究·····	254
(五)淋巴细胞的快速分离·····	255
第九章 免疫酶技术·····	257
一、常用的标记酶·····	257
二、酶标记抗体的制备·····	261
(一)戊二醛标记法及标记抗体的纯化·····	262

1. 一步法	2. 二步法
(二) 过碘酸盐氧化法	264
(三) 标记抗体定量和克分子比值的计算	266
三、可溶性酶-抗酶复合物的制备	267
四、免疫酶组化法操作技术	269
(一) 常规免疫组化法	269
(二) 特殊染色法	272
五、固相酶免疫分析	273
(一) 酶免疫吸附分析	275
(二) 限量抗原底物珠体系 (DASS 体系)	280
六、免疫酶技术的应用	283
(一) 细胞成分的定位	284
(二) 体液中生物成分的测定	284
七、结束语	284
第十章 免疫电子显微镜技术	286
一、概述	286
二、铁蛋白的性质	287
三、铁蛋白的制备和纯化	288
四、铁蛋白与抗体的偶联方法	290
(一) 异氰酸酯偶联法	290
(二) F. N. P. S 偶联法	290
(三) 戊二醛偶联法	291
(四) 杂交抗体方法	295
五、免疫电镜中的标本处理	296
(一) 固定	296
(二) 染色	296
(三) 包埋剂	297
六、对照实验	297

七、铁蛋白免疫电镜的应用	298
八、总结	300
第十一章 放射免疫分析	302
一、放射免疫分析概述	302
(一)基本原理	302
(二)材料	308
(三)方法	318
二、几种放射免疫分析方法	326
(一)绒毛膜促性腺激素-黄体生成素 (HCG-LH) 放射免疫分析	326
(二)人血浆胰岛素放射免疫分析	334
(三)甲种胎儿蛋白 (AFP) 放射免疫分析	340
(四)癌胚抗原 (CEA) 放射免疫分析	343
第十二章 血清学试验	350
一、乳胶凝集试验	350
(一)测定类风湿因子的乳胶凝集试验	352
(二)测定抗链球菌溶血素“O”乳胶凝集试验	355
〔附〕 聚苯乙烯乳胶颗粒的制备	357
(三)诊断囊虫病的乳胶凝集试验	357
(四)诊断钩端螺旋体病的乳胶凝集试验	359
(五)反相乳胶凝集试验	361
1. 检测流脑的乳胶凝集试验 2. 检测沙门氏菌的乳胶凝集试验 3. 检测肝炎协同抗原的乳胶凝集试验 4. 诊断隐球菌病的乳胶凝集试验	
(六)乳胶颗粒凝集抑制试验	371
二、抗球蛋白试验	374
(一)原理	374
(二)试剂	378

1. 抗-人丙种球蛋白血清	2. 抗-非丙种球蛋白(抗-人补体球蛋白)血清的制备	3. 抗-人球蛋白血清的处理
4. 抗-人球蛋白血清的标准化		
(三)抗球蛋白试验	387	
(四)抗补体球蛋白试验	389	
(五)注意事项	391	
(六)分析假阳性和假阴性反应出现的原因	391	
(七)抗球蛋白试验的应用	393	
三、间接血细胞凝集试验	396	
(一)原理	396	
(二)间接血细胞凝集试验	399	
(三)反向间接红细胞凝集试验	412	
(四)间接红细胞凝集抑制试验	413	
(五)注意事项	413	
(六)应用范围	414	
四、免疫粘着试验	415	
(一)基本原理	415	
(二)材料	416	
(三)方法	419	
〔附〕 颗粒抗原 I-A 反应结果判定法	421	
(四)注意事项	422	
(五)结果分析	423	
五、血清免疫复合物的测定	425	
(一)前言	425	
(二)测定方法的种类	426	
(三)Raji 细胞放射免疫分析	429	
第十三章 T 细胞与 B 细胞计数	434	
一、T 细胞计数——E 玫瑰花形成试验	434	
(一)基本原理	434	

(二)总 T 玫瑰花试验·····	434
(三)活性 T 玫瑰花试验·····	438
(四)微量活性 T 与总 T 玫瑰花试验·····	439
(五)E 玫瑰花试验的实用意义·····	441
二、B 细胞检查法·····	441
(一)细胞膜表面免疫球蛋白 (SmIg) 的检查 (直接免疫荧光法)·····	441
(二)Fc 受体的检查 (EA 玫瑰花试验)·····	444
(三)补体 (C_3) 受体的检查 (EAC 玫瑰花试验)·····	447
第十四章 淋巴细胞功能检查 ·····	451
一、淋巴细胞转化试验·····	451
(一)淋巴细胞培养条件·····	451
(二)淋巴细胞转化的刺激物·····	453
(三)PHA 刺激淋巴细胞转化试验方法·····	453
(四)各种淋巴细胞转化检查法的比较·····	458
(五)淋巴细胞转化试验的影响因素·····	458
二、白细胞移动抑制试验 (LMIT)·····	460
(一)概述·····	460
(二)白细胞移动抑制试验直接毛细管法·····	460
(三)白细胞移动抑制试验琼脂糖平皿法·····	462
(四)白细胞移动抑制试验琼脂糖微滴法·····	463
(五)白细胞移动抑制试验间接法 (二步法)·····	464
(六)方法与结果的评述·····	465
三、白细胞粘附抑制试验 (LAI)·····	466
(一)原理·····	466
(二)材料·····	466
(三)LAI 试验·····	467
(四)LAI 试验两步法·····	470
四、抗体、补体引起的细胞毒试验·····	470

(一)淋巴细胞毒试验微量法·····	470
(二)淋巴细胞毒试验试管法·····	472
(三)两种方法的评述·····	472
(四)实用意义·····	472
五、依赖抗体的淋巴细胞毒 (ADCC) 试验——K	
细胞的检查·····	473
(一)空斑形成法测K细胞·····	474
(二)以靶细胞释放 ^{51}Cr 为指标的 ADCC 试验 (检查K细胞) ·····	475
(三)用全血检查K细胞·····	477
六、淋巴细胞细胞毒试验·····	479
(一)淋巴细胞毒试验·····	480
(二)用 ^{51}Cr 释放作淋巴细胞细胞毒试验·····	482
(三)淋巴细胞细胞毒试验结果评价·····	483
〔附〕 Hanks 液配方 ·····	483
七、体外抗体形成细胞检查法 ·····	485
(一)简介·····	485
(二)PFC 的测定法 ·····	486
〔附〕 Gey 氏溶液配制法 ·····	487
(三)显斑血清的制备·····	498
(四)PFC测定与其他技术的联合应用·····	507
(五)应用·····	509
(六)结束语·····	514
〔附〕 T细胞和B细胞对半抗原-载体结合物在抗体产生中的协同作用·····	515
第十五章 其他免疫功能检查法 ·····	523
一、嗜中性粒细胞 NBT 还原试验 ·····	523
(一)原理·····	523

(二)材料·····	523
(三)Park 法·····	524
(四)Gifford 法·····	525
(五)临床意义·····	526
(六)注意事项·····	527
二、白细胞杀菌功能试验·····	527
(一)白细胞的分离·····	527
(二)细菌悬液制备·····	527
(三)调理素准备·····	528
(四)试验方法·····	528
三、巨噬细胞吞噬功能测定·····	528
(一)材料·····	529
(二)方法·····	529
(三)临床意义·····	530
四、嗜硷细胞及肥大细胞脱颗粒试验·····	531
(一)原理·····	531
(二)直接嗜硷细胞脱颗粒试验·····	532
(三)间接嗜硷细胞脱颗粒试验·····	532
(四)间接肥大细胞脱颗粒试验·····	533
五、过敏性皮肤试验·····	533
(一)速发型皮肤试验·····	533
(二)迟发型皮肤试验·····	535
〔附〕 关于用 PHA 作皮试的方法·····	538

第一章 免疫球蛋白的分离技术

各类免疫球蛋白及其与其它血清蛋白间，根据它们的分子大小、电离密度、等电点以及在水溶液中的溶解度不同等，得以相互鉴别与分类。利用上述特性，还可以从体液中分离和提取各种免疫球蛋白。

一、盐析法

(一) 基本原理

盐析法 (Salt fractionation) 的原理是根据蛋白质在纯水和各种盐类溶液中的相对溶解度不同，它作为蛋白质的初步提纯技术，一个世纪以来已得到广泛应用。血清在蒸馏水中透析，可以分为优球蛋白(不溶性)与假球蛋白(可溶性)。虽然本法在纯化 IgM 中(不溶于水)可作为第一个步骤，但优球蛋白常常混杂 IgG 等，并可能导致 IgM 变性，而且产量较低。

当介质中盐分增加时，就会影响水分子与蛋白质分子极化部分的相互作用而减少其亲水性。最后使蛋白分子间具有较高的疏水性而沉淀。尽管每种蛋白质沉淀所需盐分的浓度不一，但象免疫球蛋白这类物质，由于彼此间分子关系相当密切，使得单纯增减盐分的含量，难以获取纯化的蛋白沉淀。不过，盐析法用于分离免疫球蛋白，沉淀，去掉不需要的血清白蛋白等组分(留在上清中)，仍是最常使用的粗提法。此外，在纯化时，盐析法也是浓缩免疫球蛋白的一种有效方法。主要是硫酸铵或酒精沉淀法。

硫酸铵沉淀法是最广泛用以生产粗制免疫球蛋白组分的技术。这种盐的优点是具有很高的溶解度且受温度影响最小。温差

在 $0^{\circ}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 间, 变化只有 3 % 左右。而硫酸钠盐析法在 25°C 时的溶解度是 0°C 时的 5 倍。

就浓度而言, 33.3% 的饱和硫酸铵 ($\text{pH } 7.0$) 提取免疫球蛋白时, 可以获取较纯的 IgG, 但会损失一部分 β -球蛋白。用 50% 饱和硫酸铵提取时, IgG 产量较高, β -球蛋白也会同时沉淀。因此, 作为粗提, 为了将血清中各种免疫球蛋白都能分离出来, 以后者硫酸铵的浓度为宜。否则以前者为佳。分离较小的分子断片时, 需要较高的盐类浓度进行沉淀。

(二) 材料

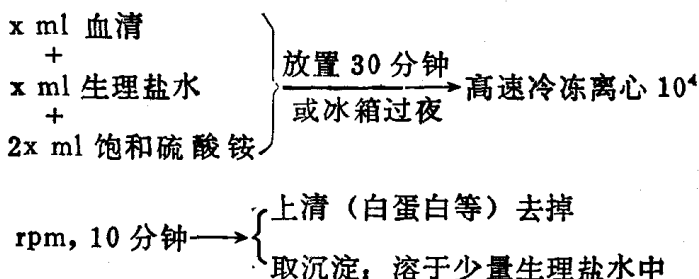
硫酸铵

血清或血浆 (正常人或骨髓瘤患者)

(三) 方法

1. 配制饱和硫酸铵 取 500ml 蒸馏水, 加热至 $70\sim 80^{\circ}\text{C}$, 将 400g 硫酸铵粉剂溶于水中, 搅拌 20 分钟, 冷却。硫酸铵结晶沉于瓶底, 上清即饱和硫酸铵。再取 28% 氨水将饱和硫酸铵调节为 $\text{pH } 7.0$ 。

2. 用 50% 饱和硫酸铵提取血清中 β 、 γ 球蛋白。方法如下:



注意点: 硫酸铵必须逐滴加入, 边加边搅拌, 以防止形成团块或降低沉淀的特异性。

3. 用 40% 饱和硫酸铵提取血清中 β 球蛋白。
4. 用 33% 饱和硫酸铵提取血清中 γ 球蛋白。
5. 生理盐水(蒸馏水)透析或 Sephadex-G50 凝胶过滤除盐。

此外，低温酒精沉淀法也很常用，现简述如下。

低温酒精沉淀法：

酒精沉淀法主要是依靠逐级增加酒精浓度与严格控制 pH，在低温下 (-2°C 左右) 沉淀抗体。

酒精沉淀法方法很多 (Felton 1931, Cohn 1946, Deutsch 1952)，也有不少改良法 (Steffanini 1954)。目前我们广泛应用的是 Cohn 氏分段法 (表 1-1)。

表 1-1 Cohn 氏分段法

pH	酒精 浓度 (%)	分段	分段组分(%)				
			纤维蛋白原	白蛋白	α 球蛋白	β 球蛋白	γ 球蛋白
7.2	8	I	61	7	8	15	9
6.8	25	I + II	5	4	6	48	37
5.2	18	IV - 1	0	—	89	10	1
5.8	40	IV - 4	0	16	46	38	0
4.8	40	V	0	95	4	1	0

二、凝胶过滤法

根据分子大小，利用凝胶过滤法 (Gel filtration)，可以分离血清蛋白各组分。

(一) 基本原理

凝胶过滤法是利用具有分子筛效应的天然或合成的多孔网状凝胶作为介质，分离、提纯和定性各种具有生物特性的高分子物质。