




临床检验医师必读

王永祥 齐顺祥 王存平 总主编

临床免疫学 检验

王云双 赵英剑 刘永杰◎主编

JM LINCHUANG
MIANYIXUE
IANYAN

 军事医学科学出版社



第 2 版

临床免疫学

第二版

王学军 主编

JM LINCUIANG
JINLIANXUE
JINLIAN

人民卫生出版社

临床检验医师必读

临床免疫学检验

主 编	王云双	赵英剑	刘永杰
副主编	庞敏红	马金群	高连辉
	张长庚	李庆禄	魏丽珍

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

临床免疫学检验/王云双,赵英剑,刘永杰主编.

-北京:军事医学科学出版社,2009.9

(临床检验医师必读)

ISBN 978-7-80245-163-6

I. 临 II. ①王… ②赵… ③刘… III. 免疫学 -
医学检验 IV. R446.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第018765号

出 版: 军事医学科学出版社

地 址: 北京市海淀区太平路27号

邮 编: 100850

联系电话: 发行部:(010)66931051,66931049,81858195

编辑部:(010)86702759,66931127,66931039,

66931038,86703183

传 真: (010)63801284

网 址: <http://www.mmsp.cn>

印 装: 三河佳星印装有限公司

发 行: 新华书店

开 本: 850mm×1168mm 1/32

印 张: 12.125

字 数: 310千字

版 次: 2009年3月第1版

印 次: 2009年3月第1次

定 价: 24.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

前 言

随着基础医学与临床医学的迅速发展,临床检验作为一门辅助学科,如何适应这一发展,及时准确地为临床提供各种实验数据,从而更好地促进临床医学的发展,是我们检验人员一项非常重要的职责。为了适应临床检验学的发展,帮助广大临床检验医师掌握科学的检验方法、技能,提高临床检验水平,我们组织具有经验丰富的教授、一线专家,编写这套《临床检验医师必读》。

该丛书在编写设计上,从临床实际出发,考虑到检验人员理论水平的实际状况和临床医生对检验结果能有一个全面深入的分析判断,对各种实验的基础部分和临床意义部分介绍得较为详细,以满足检验人员基础素质的提高、适应临床发展的需要。丛书包括:《临床基础检验》、《临床细菌学检验》、《临床病毒学检验》、《临床免疫学检验》、《临床血液学检验》。该丛书是临床检验人员掌握基础检验知识、技能,并了解临床检验学发展的一本重要参考书。

由于编写时间及作者能力所限,文中不足之处在所难免,望读者指正。

编委

2009-01-1

目 录

第一章 概论	(1)
第一节 免疫学基础	(1)
第二节 免疫学检验	(5)
第二章 抗原抗体反应	(7)
第一节 抗原抗体反应的原理	(7)
第二节 抗原抗体反应的特点	(9)
第三节 影响抗原抗体反应的因素	(12)
第三章 免疫原和抗血清的制备	(14)
第一节 免疫原的制备	(14)
第二节 抗血清的制备	(26)
第三节 抗血清的鉴定	(29)
第四节 抗血清的纯化和保存	(30)
第四章 单克隆抗体与基因工程抗体的制备	(34)
第一节 单克隆抗体的制备	(34)
第二节 基因工程抗体的制备	(46)
第五章 凝集反应	(53)
第一节 直接凝集反应	(54)
第二节 间接凝集反应	(56)
第三节 其他凝集技术	(59)
第六章 沉淀反应	(62)
第一节 液体内沉淀试验	(62)
第二节 凝胶内沉淀试验	(65)
第三节 免疫电泳技术	(68)

第七章 放射免疫技术	(72)
第一节 放射免疫分析	(72)
第二节 免疫放射分析	(78)
第三节 固相放射免疫分析	(79)
第八章 荧光免疫技术	(82)
第一节 荧光的基本知识	(82)
第二节 荧光抗体技术	(85)
第三节 荧光免疫测定	(97)
第九章 酶免疫技术	(103)
第一节 酶免疫技术的分类	(103)
第二节 酶免疫分析的技术要点	(106)
第三节 酶联免疫吸附试验	(115)
第四节 均相酶免疫测定	(119)
第十章 化学发光免疫分析技术	(121)
第一节 发光原理	(121)
第二节 发光标记物和发光标记技术	(121)
第三节 化学发光免疫测定	(127)
第十一章 固相膜免疫测定	(130)
第十二章 免疫组织化学技术	(138)
第十三章 免疫细胞的分离及其表面标志检测技术	(147)
第一节 免疫细胞的分离	(147)
第二节 T 淋巴细胞表面标志的检测	(157)
第三节 B 淋巴细胞的检测	(163)
第十四章 免疫细胞功能检测技术	(166)
第一节 淋巴细胞功能检测	(166)
第二节 巨噬细胞和中性粒细胞功能检测	(172)
第十五章 细胞因子与细胞黏附因子的测定	(179)
第一节 细胞因子检测的方法	(179)
第二节 细胞因子的测定	(182)

第三节	细胞黏附因子的测定	(192)
第十六章	流式细胞仪分析技术及应用	(201)
第一节	流式细胞仪分析技术	(201)
第二节	流式细胞仪分析技术的临床应用	(211)
第十七章	体液免疫球蛋白测定	(222)
第十八章	补体检测及应用	(230)
第十九章	免疫检验自动化仪器分析	(241)
第二十章	临床免疫检验的质量保证	(247)
第一节	免疫学检验方法的质量控制	(247)
第二节	免疫学检验实验室的质量控制	(254)
第三节	常用免疫学试验的质量保证	(258)
第二十一章	感染性疾病与感染免疫检测	(264)
第二十二章	超敏反应性疾病及免疫学检测	(274)
第一节	超敏反应性疾病	(274)
第二节	超敏反应的免疫学检测	(279)
第二十三章	自身免疫性疾病及其免疫检测	(296)
第一节	自身免疫性疾病	(296)
第二节	自身抗体检验	(297)
第二十四章	免疫增殖性疾病及其免疫检测	(312)
第一节	免疫增殖病的分类	(312)
第二节	单克隆丙种球蛋白病的临床免疫学特征	(313)
第三节	单克隆丙种球蛋白病的检测方法	(320)
第二十五章	免疫缺陷性疾病及其免疫检验	(326)
第一节	原发性免疫缺陷性疾病	(326)
第二节	继发性免疫缺陷病	(331)
第二十六章	肿瘤免疫与免疫学检验	(333)
第一节	概述	(333)
第二节	常用肿瘤标志物的检验	(336)

第二十七章 移植免疫及其免疫检测	(365)
第一节 概述	(365)
第二节 供者与受者的配合选择	(368)
第三节 排斥反应及其监测	(373)
参考文献	(377)

第一章 概 论

第一节 免疫学基础

免疫是指机体识别和排除抗原性异物以维持自身生理平衡和稳定的功能。

机体的免疫功能体现为对抗原性异物的识别和清除。机体受到抗原性异物刺激时,由于抗原物质的性状特征、刺激时的具体条件(包括机体的情况),机体可通过多种方式对其进行清除。抗原性异物包括无致病性的异物,如引起超级反应的花粉;某些食物和药物,如引起超级反应的花粉,某些食物和药物、病原微生物及其毒性产物(毒素和酶),正常机体内经常出现的衰残细胞以及偶尔出现的癌变细胞。通过对这些抗原性异物的识别和清除,机体才能保持相对的自身稳定。其功能具体表现在以下3个方面:

1. 免疫防御功能 指机体抵抗病原微生物的侵袭或清除其他外来异物的功能。机体在正常情况下可以防御,当机体的防御反应过高时可出现变态反应;当反应过低时,则可出现免疫缺陷病。

2. 免疫稳定功能 指机体清除损伤或衰老的细胞,进行自身调节,维持体内生理平衡和稳定的功能。这个功能失调,易发生自身免疫疾病。

3. 免疫监视功能 指机体识别和清除突变细胞,防止发生肿瘤的功能。机体在代谢过程中出现大量的新生和分化的细胞,基因发生突变,机体能够发现和防止肿瘤,如果不被清除,就会发生肿瘤。

一、免疫器官

免疫器官又称免疫组织,是免疫细胞分化增殖或定居的场所。由于骨髓和胸腺能使淋巴干细胞增殖,进行一定程度的分化,成为成熟的免疫细胞并输送到外周淋巴组织定居,因而骨髓和胸腺被称为中枢免疫器官。接受这些细胞的组织——淋巴结、脾、扁桃体、回肠末端淋巴集结及阑尾等,则被称为外周免疫器官或末梢淋巴组织。

(一) 中枢免疫器官

1. 胸腺 胸腺是 T 细胞,即胸腺依赖性淋巴细胞(简称 T 细胞)分化成熟的场所。胸腺细胞(淋巴细胞)在胸腺内由网状上皮细胞提供的微环境及其所分泌的胸腺激素——胸腺素、胸腺生成素等诱导下,成为成熟的 T 细胞。

T 细胞在胸腺内成熟的基本过程为:由骨髓淋巴干细胞衍生的前 T 细胞经血流进入胸腺,先在皮质迅速大量增殖,然后逐渐移向皮质深层,并分裂增殖成许多小型胸腺细胞。绝大多数小型胸腺细胞不久即死亡,仅有少数($<5\%$)可在胸腺髓质内继续发育成成熟 T 细胞。成熟 T 细胞随血流迁移至外周免疫器官的一定区域——胸腺依赖区定居。

2. 骨髓 骨髓是造血器官,不属于淋巴组织,它是各种血细胞(如红细胞、粒细胞、单核细胞、巨噬细胞)的发源地和分化成熟的场所。同时也是人和哺乳类动物 B 细胞,即骨髓依赖性淋巴细胞(简称 B 细胞)的分化成熟场所。

(二) 外周免疫器官

1. 淋巴结 淋巴结是淋巴细胞定居和增殖的场所,并可捕捉淋巴液中的异物。淋巴结由被膜包绕,分为皮质和髓质两部分。靠近被膜的皮质称为浅皮质区,存在有由 B 细胞聚集而形成的淋巴滤泡,又称淋巴小结或一级滤泡。当一级滤泡中的 B 细胞受到抗原刺激,不断增殖分化,在淋巴滤泡中出现生发中心时,此种滤

泡称为二级滤泡。浅皮质区内侧为深皮质层,主要是 T 细胞定居的部位,称为胸腺依赖层。在皮质区内除淋巴细胞外,尚有网状细胞、巨噬细胞和树突状细胞,它们对抗原性物质有很强的捕捉能力。髓质由髓索和髓窦组成,髓索中有 B 细胞、浆细胞、网状细胞和巨噬细胞,髓窦中有许多巨噬细胞,它们可清除淋巴液中的细菌等异物。

2. 脾脏 脾脏可分为白髓和红髓。白髓由密集的淋巴细胞组成,其内的中央小动脉周围的淋巴鞘是 T 细胞定居区域。淋巴鞘中有散在的圆形或椭圆形的淋巴小结,与淋巴结中的淋巴滤泡相似,亦可有生发中心,它是 B 细胞定居部位。红髓中含有大量的 B 细胞,浆细胞则多位于淋巴鞘周围的红髓中。脾脏除具有与淋巴结相似的功能外,还有造血、储血、调节血量及清除自身衰老的红细胞和免疫复合物的功能。

3. 扁桃体、淋巴集结和阑尾 淋巴液中的抗原由淋巴结捕捉,血液中抗原多经脾脏捕捉,而由呼吸道及消化道进入体内的抗原则分别由扁桃体及肠道淋巴组织捕捉。扁桃体和肠道淋巴组织也有滤泡和胸腺依赖区,除捕捉不同部位的抗原以外,它们之间在结构上未见有本质差异。这些器官中可能有高立方内皮细胞的血管,有利于淋巴细胞的出入。此外,覆盖淋巴集结的上皮与其周围的回肠上皮形态不同,抗原易于由前者进入。至于扁桃体和阑尾是否有同样的结构目前尚不清楚。

二、免疫细胞

凡参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞统称为免疫细胞,按免疫细胞在体内的作用不同分为三大类:①淋巴细胞(lymphocyte),是免疫系统的主要细胞,包括能特异性识别抗原,能增殖分化并产生免疫效应的 T 细胞、B 细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞,它们各自有不同的特性和功能,在免疫应答反应中,它们共同承担了机体的细胞免疫和体液免疫功能。②单核巨噬细

胞,包括血液中的单核细胞和组织中的巨噬细胞,它们组成单核巨噬细胞系统,在免疫反应中起辅助作用。③参与免疫应答的细胞,包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞等,它们参与免疫应答中的某一环节。

(一)淋巴细胞

主要包括 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。

1. T 细胞:T 细胞是在胸腺中发育成熟的淋巴细胞,故又称为胸腺依赖淋巴细胞(thymus dependent cell),通常简称为 T 淋巴细胞或 T 细胞。成熟的 T 细胞经血液循环和淋巴循环运行,定居于周围免疫器官,并通过淋巴管、血液循环及组织液等进行再循环(recirculation),以发挥细胞免疫功能。外周血中 T 细胞占淋巴细胞的 70% ~ 75%,T 细胞在发育的不同阶段,细胞表面可表达不同种类的受体和 T 细胞抗原,这些受体和抗原与细胞功能密切相关,也是鉴别 T 细胞及其活化状态的重要标志。

2. B 淋巴细胞:B 淋巴细胞是在骨髓内发育成熟的细胞,又称为骨髓依赖性淋巴细胞(bone marrow dependent lymphocyte),简称 B 淋巴细胞或 B 细胞,是免疫系统的一种重要细胞,具有 3 个主要功能:①产生抗体。②递呈抗原。③分泌细胞因子参与免疫调节。B 细胞受抗原刺激后可分化为产生抗体的浆细胞和长寿记忆性 B 细胞,执行特异性体液免疫的功能。B 细胞可借其表面的 B 细胞受体(B cell receptor, BCR)结合可溶性抗原,经加工递呈给 T 细胞,激活的 B 细胞能产生大量细胞因子,参与免疫调节、炎症反应及造血过程。人外周血液中 B 淋巴细胞占 5% ~ 25%。

3. NK 细胞:NK 细胞来源于骨髓造血干细胞,其发育成熟依赖于骨髓及胸腺微环境。NK 细胞无需抗原刺激,可非特异直接杀伤肿瘤和病毒感染的靶细胞,因此在机体免疫监视和早期抗感染免疫过程中起重要作用。活化 NK 细胞可分泌 IFN- γ 和 TNF- α 等细胞因子,参与免疫调节作用。NK 细胞在外周血中占 10% ~ 15%。

(二) 辅佐细胞

在特异性免疫应答过程中,淋巴细胞活化及抗原信息的加工、处理均需一些非淋巴细胞参与,凡参与辅助淋巴细胞活化的细胞统称为辅佐细胞(accessory cell, AC)。最常见的主要辅佐细胞有单核吞噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)两大类。单核吞噬细胞系统包括外周血中的单核细胞和组织器官中的巨噬细胞,这类细胞具有两大共同特点,即表达 MHC II 类分子和具有吞噬作用。在辅助免疫应答过程中,这类细胞先通过特定方式摄入抗原,进行处理递呈,然后与细胞表面 MHC II 类分子结合,将抗原信息递呈给 T 细胞。同时,单核吞噬细胞还可产生多种细胞因子,参与免疫调节反应。DC 由身体各处表皮部位具有吞噬功能的朗格汉斯细胞(langerhans cell)迁移至局部淋巴结并分化成熟为树突状细胞,DC 不具有吞噬能力,但具有很强的抗原递呈能力,被称为专职性抗原递呈细胞。

第二节 免疫学检验

免疫学检验是利用免疫学的基础原理和技术检测样本的成分、特征和功能的一门新兴学科,免疫学检验在基础医学、预防医学和临床医学中具有重要的作用。自 1896 年 G. Widal 和 A. Sicad 应用凝集反应诊断伤寒起,免疫学检验技术就开始在医学领域发挥重要作用,至今已经历了一个世纪。

研究免疫学技术在预防学等领域中的应用是免疫学检验的一个重要组成部分。传统上讲,免疫学检验的检测对象是具有免疫活性的物质。随着免疫学检验技术的飞速发展,免疫学检验已分为两个部分,一部分为利用免疫学检验原理检测,具有免疫活性的细胞、抗原、抗体、补体、细胞因子、细胞黏附分子等免疫相关物质;另一部分是利用免疫学检验原理检测人体、环境、材料、产品中的微量物质,如激素、酶、血浆中的微量蛋白、血液药物浓度、微量元

素等。由于新技术的发展,许多与免疫无关的物质亦可作为免疫原制备其相应抗体并用于这些物质的测定。利用抗原抗体反应来测定标本中微量物质的方法称为免疫测定。免疫测定具有高度的特异性和敏感性,在卫生检验中已用于测定各种蛋白质、酶、激素、药物和毒品等。随着免疫学检验技术的发展,免疫学检验的范围进一步扩大,应用也更加广泛。

由于免疫检测越来越普及,免疫学检验的技术也越来越多,免疫学检验技术的应用和免疫学检验结果的判定不再是一件简单的事情,因此,对免疫学检验技术的正确选择及应用评价是免疫学检验专业人员应具备的基本素质。全面了解每一项技术本身的优点、缺点和适用范围,掌握每一项检测指标的特异性、敏感性,是免疫学检验的目的。为保证实验结果不出现错误,强化和完善免疫诊断的全面质量控制体系,执行标准化程序操作,建立质量控制制度,规范实验仪器的校准,是确保检测质量和水平的关键。免疫学检验的主要任务是选择恰当检验技术,为疾病的预防、诊断和治疗提供具有价值的检验报告。免疫学检验应与预防医学、临床医学等广泛、紧密地结合,检验专业人士不仅要掌握免疫学检验的技术、正确解释检测结果的意义,而且要正确地选择相关的检验方法。

近几十年来,免疫学检验技术的发展十分迅速,特别是单克隆抗体技术的应用、标记免疫技术水平的不断成熟和计算机技术的飞速发展,使得免疫学检验的灵敏度、特异度、检测速度和检测通量都大大提高。荧光免疫技术、酶联免疫分析技术、自动化速率散射免疫分析、化学发光免疫技术、流式细胞免疫分析和免疫印迹技术,以及蛋白质芯片等新技术不断完善,一些新的免疫学检验技术不断涌现,免疫学检验技术呈现出一些新的趋势,特别是高通量检测、自动化检测,以及超高灵敏度检测技术已成为当今免疫学检验技术的发展方向。

(赵英剑)

第二章 抗原抗体反应

抗原抗体反应(antigen-antibodyreaction)是指抗原与相应抗体之间所发生的特异性结合反应。可发生于体内(in vivo),亦可发生于体外(invitro)。体内反应可介导吞噬、溶菌、杀菌、中和毒素等作用;体外反应则根据抗原的物理性状、抗体的类型及参与反应的介质(如电解质、补体、固相载体等)不同,可出现凝集反应、沉淀反应、补体参与反应及中和反应等各种不同的反应类型。因抗体主要存在于血清中,在抗原或抗体的检测中多采用血清做试验,所以体外抗原抗体反应亦称为血清反应(serologicreaction)。

第一节 抗原抗体反应的原理

抗原与抗体能够特异性结合是基于两种分子间的结构互补性与亲和性,这两种特性是由抗原与抗体分子的一级结构决定的。抗原抗体反应可分为两个阶段。①抗原与抗体发生特异性结合的阶段,此阶段反应快,仅需几秒至几分钟,但不出现可见反应。②可见反应阶段,抗原抗体复合物在环境因素(如电解质、pH、温度、补体)的影响下,进一步交联和聚集,表现为凝集、沉淀、溶解、补体结合介导的生物现象等肉眼可见的反应。此阶段反应慢,往往需要数分钟至数小时。实际上这两个阶段以严格区分,而且两阶段的反应所需时间亦受多种因素和反应条件的影响,若反应开始时抗原抗体浓度较大且两者比较适合,则很快能形成可见反应。

(一)亲水胶体转化为疏水胶体

抗体是球蛋白,大多数抗原亦为蛋白质,它们溶解在水中皆为胶体溶液,不会发生自然沉淀。这种亲水胶体的形成机制是因蛋

白质含有大量的氨基和羧基残基,这些残基在溶液中带有电荷,由于静电作用,在蛋白质分子周围出现了带相反电荷的电子云。如在 pH 7.4 时,某蛋白质带负电荷,其周围出现极化的水分子和阳离子,这样就形成了水化层,再加上电荷的相斥,就保证了蛋白质不会自行聚合而产生沉淀。

抗原抗体的结合使电荷减少或消失,电子云也消失,蛋白质由亲水胶体转化为疏水胶体。此时,如再加入电解质,如 NaCl,则进一步使疏水胶体物相互靠拢,形成可见的抗原抗体复合物。

(二) 抗原抗体结合力

有 4 种分子间引力参与并促进抗原抗体间的特异性结合。

1. 电荷引力(库伦引力或静电引力) 这是抗原抗体分子带有相反电荷的氨基和羧基基团之间相互吸引的力。例如,一方在赖氨酸离解层带阳离子化的氨基残基($-\text{NH}_3^+$),另一方在天门冬氨酸电离后带有阴离子化的羧基($-\text{COO}^-$)时,即可产生静电引力,两者相互吸引,可促进结合。这种引力和两电荷间的距离的平方成反比。两个电荷越接近,静电引力越强。反之,这种引力便很微弱。

2. 范登华引力 这是原子与原子、分子与分子互相接近时发生的一种吸引力,实际上也是电荷引起的引力。由于抗原与抗体两个不同大分子外层轨道上电子之间相互作用,使得两者电子云中的偶极摆动产生吸引力,促使抗原抗体相互结合。这种引力的能量小于静电引力。

3. 氢键结合力 氢键是由分子中的氢原子和电负性大的原子,如氮、氧等相互吸引而形成的。当具有亲水基团(如 $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ 及 $-\text{COOH}$)的抗体与相对应的抗原彼此接近时,可形成氢键桥梁,使抗原与抗体相互结合。氢键结合力较范登华引力强,并更具有特异性,因为它需要有供氢体和受氢体才能实现氢键结合。

4. 疏水作用 抗原抗体分子侧链上的非极性氨基酸(如亮氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸)在水溶液中与水分子间不形成氢键。当