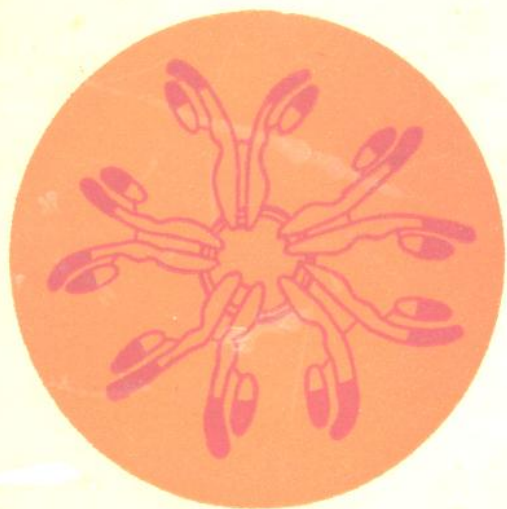


实用临床免疫学技术

郑武飞主编



R392-33
ZWF

120412

天津科学技术出版社

120412

郑武飞主编

实用临床免疫学技术

天津科学技术出版社



A1C00398710

责任编辑：于素芝

实用临床免疫学技术

郑武飞 主编

*

天津科学技术出版社出版

天津市赤峰道130号

天津新华印刷一厂印刷

新华书店天津发行所发行

*

开本787×1092毫米 1/16 印张14.5 插页1 字数331 000

1991年5月第1版

1991年5月第1次印刷

印数：1—3 970

ISBN 7-5308-0304-2/R·96 定价：16.85元

编 著 者

(按撰写章节顺序排列)

王 聆	郑武飞	侯 军	王金龙
魏宏生	畅继武	李 勇	叶秀君
陈祖琼	杨树森	孙贵珍	谢醒民

前 言

第二次世界大战结束以来,免疫学的飞速发展已为人所共知的事实。免疫学作为一门生物-医学科学之所以受到人们极大重视,一则是它的以“识别自身和异己”为中心的理论体系已被用于解释许多生物学和临床医学现象,二则是它的迅速发展和建立的许多免疫学方法提供了研究手段,促进了对许多疾病发病机制的探讨,以及对诊断和防治的研究。正因如此,免疫学作为一门基础学科,它与其它学科融合产生出新的边缘学科之多是其它学科所无法比拟的,这点可以有关边缘学科的专著和专门刊物日见增多得到有力证明。

近年来国内已出版了相当数量的免疫学教科书和参考书,对免疫学在我国的传播起到一定作用,但至今专科性的基础与临床相结合的专著仍极少见。不少临床医师即使掌握了一定的有关知识,但具体到如何用免疫学方法探讨和研究本专业临床现象,提高诊断质量,往往感到无从下手。基于此种情况,我们参考了国内外专著和刊物,并结合临床、教学及科研经验编写了本书。本书并不对免疫学作基础性介绍,而是着重论述如何将免疫学与临床上重要的免疫介导或免疫性疾病联系理解。这些疾病包括常见的肾脏病、结缔组织病、肾移植、变态反应性疾病、免疫缺陷,以及妇产科的某些疾病等。对肿瘤和寄生虫病也作了有关免疫学诊断的重点介绍。至于细菌、病毒等传染病的免疫学诊断已有大量文献资料和专著,因此本书就有意识地不再介绍了。各篇各章均重点放在提供详细的实验方法学上,使临床医师或实验室工作人员基本不用参考其它资料即可掌握这些技术。书中还论述了对实验结果的解释及对临床意义的评价,使临床医师对患者病理发生发展进行免疫学探讨时有章可循。希望此书有助于打开长期以来我国多数临床医师进实验室无从下手的局面;也为基础免疫学工作者在进行这方面研究时提供直接的参考。如果这一工作对推动临床免疫学工作的开展有所帮助,我们应当感谢天津科学技术出版社组织我们撰写这本书的远见。本书不足之处和错误所在,望读者不吝指正。

郑武元

天津医学院免疫学教研室

1987年5月20日

目 录

第一篇 肾 脏 病

第一章 肾脏病中的免疫球蛋白	(1)	五、肾癌	(45)
一、免疫球蛋白的测定方法	(1)	六、肾功能衰竭	(48)
二、冷蛋白	(10)	七、下尿道疾病	(48)
第二章 抗体和自身抗体	(12)	八、肾移植中的血清CRP	(48)
一、概述	(12)	九、多发性骨髓瘤	(48)
二、抗链球菌抗体的测定	(12)	第七章 尿	(49)
三、抗核抗体	(15)	一、蛋白尿	(49)
四、抗肾小球基底膜抗体	(16)	二、尿蛋白的研究	(49)
五、抗肾小管基底膜抗体	(16)	三、纤维蛋白降解产物	(53)
六、抗肾小管刷状缘抗体	(16)	四、补体成分	(54)
七、其它自身抗体	(17)	五、基底膜抗原	(54)
八、抗Tamm-Horsfall蛋白抗体	(17)	六、包被抗体的细菌	(55)
第三章 抗肾小球基底膜抗体的意义以及用固相放免法的检测	(17)	第八章 T抗原及其与溶血性尿毒症综合征的关系	(56)
一、概述	(17)	一、概述	(56)
二、方法	(19)	二、方法	(58)
三、放射免疫测定	(21)	三、讨论	(59)
四、在其它肾脏病中的抗GBM抗体	(25)	第九章 血清或血浆神经氨酸酶活性的测定	(60)
五、结论	(27)	一、概述	(60)
第四章 补体	(27)	二、人血清或血浆神经氨酸酶的生物化学测定法	(60)
一、补体活化	(27)	三、测定血清神经氨酸酶活性的免疫学方法	(61)
二、补体的检测	(29)	四、结论	(62)
三、补体格局的解释	(30)	第十章 ADCC抑制试验检测肾小球肾炎患者的可溶性免疫复合物	(63)
第五章 免疫复合物的检测	(32)	一、概述	(63)
一、概述	(32)	二、ADCC中的作用因素	(63)
二、循环免疫复合物的检测	(32)	三、ADCC抑制试验	(64)
三、从抗补体活性检测免疫复合物	(34)	四、讨论	(66)
四、用Clq结合放免法检测免疫复合物	(35)	五、总结	(67)
五、免疫复合物肾病	(40)	第十一章 肾小管间质性肾炎的蛋白尿的诊断依据	(68)
第六章 急性期反应蛋白在监测肾脏病中的意义	(41)	第十二章 Henoch-Schönlein紫癜	
一、概述	(41)		
二、主要急性期蛋白的功能	(42)		
三、急性期反应的诱发	(43)		
四、急性期蛋白的测定	(43)		

患者免疫球蛋白合成增加及免疫调节缺陷的迹象.....	(73)
一、概述.....	(73)
二、病例报道.....	(74)
三、方法.....	(75)
四、结果.....	(78)
五、讨论.....	(80)
第十三章 肾活检	(81)

一、肾活检的意义.....	(81)
二、肾穿刺标本的处理.....	(81)
三、免疫荧光的形态学.....	(82)
四、关于免疫荧光表现的分析.....	(83)
五、肾活检免疫荧光法解决什么问题.....	(84)
六、特殊疾病的免疫荧光表现.....	(84)
七、免疫过氧化物酶法.....	(88)
八、肾外研究.....	(89)
九、洗脱液研究.....	(90)

第二篇 结 缔 组 织 病

第十四章 使用人体细胞分裂中期染色体检测dsDNA抗体.....	(91)
一、概述.....	(91)
二、细胞分裂中期的染色体法.....	(92)
三、中期抗原的制备方法和免疫荧光的步骤.....	(93)
第十五章 应用中性粒细胞吞噬作用检测免疫复合物	(95)
一、概述.....	(95)
二、方法.....	(95)
三、评价.....	(96)
第十六章 循环免疫复合物的测定与系统性红斑狼疮	(97)

一、概述.....	(97)
二、循环免疫复合物的测定方法.....	(97)
三、固相Clq测定法(Sc).....	(100)
四、乳胶凝集抑制试验(L _G 和L _C).....	(102)
五、CIC的大小.....	(107)
六、CIC测定法在SLE中的应用	(108)
第十七章 系统性红斑狼疮和狼疮性肾炎的诊断	(112)
一、概述.....	(112)
二、病因学和发病机制.....	(112)
三、流行病学和预后.....	(112)
四、临床特征.....	(112)
五、血清学和免疫学试验.....	(113)
六、狼疮性肾炎.....	(116)
七、小结.....	(117)

第三篇 移植中的免疫学检测方法

第十八章 人类白细胞抗原(HLA)的血清学分型法.....	(118)
一、HLA-ABC抗原的检测	(118)
二、HLA-DR抗原的检测	(121)
第十九章 HLA的细胞学分型法	(123)
一、原理.....	(123)
二、方法.....	(123)
三、评价.....	(124)
第二十章 抗球蛋白交叉配型试验	(125)
一、原理.....	(125)
二、检测方法.....	(125)
三、评价.....	(126)

第二十一章 细胞介导的细胞毒性的检测	(126)
一、细胞介导的细胞毒活性测定.....	(126)
二、抗体依赖性细胞介导的细胞毒(ADCC)测定.....	(127)
第二十二章 标准化尿酶测定法在人类肾移植和肾毒理学实践中的诊断意义	(128)
一、概述.....	(128)
二、材料和方法.....	(129)
三、单个酶的变化.....	(133)
四、讨论.....	(136)

第四篇 变态反应性疾病

第二十三章 变应原的提取和标准 化	(139)
一、常用提取液	(139)
二、提取方法	(139)
三、提取物的标准化	(140)
第二十四章 敏感试验	(142)
一、皮肤试验	(142)
二、间接(被动转移)试验	(145)
三、眼试验	(145)
四、鼻试验	(145)
五、激发试验	(145)
第二十五章 血清IgE的检测	(145)
一、反向被动血凝法	(145)
二、酶联免疫吸附测定	(146)
三、纸片放射免疫吸附试验	(147)

第二十六章 鼻分泌液检查	(148)
一、材料的准备	(148)
二、试验方法	(148)
三、结果解释	(149)
第二十七章 嗜酸粒细胞的检查	(149)
一、材料的准备	(149)
二、检查方法	(149)
三、结果解释	(149)
第二十八章 组胺释放测定法	(149)
一、洗过的人白细胞的组胺释放	(150)
二、全血的组胺释放	(152)
三、组胺测定法	(152)
四、计算	(153)
五、解释和评价	(153)

第五篇 免疫缺陷

第二十九章 免疫缺陷的免疫学诊 断	(155)
一、T细胞的评估	(155)

二、B细胞的评估	(158)
三、多形核白细胞异常的评估	(159)

第六篇 妇产科疾病

第三十章 妊娠期母体免疫反应	(163)
一、酶联免疫吸附试验测定血清中抗滋养层 抗体	(163)
二、妊娠期自然杀伤(NK)细胞活性的检 测(⁵¹ Cr释放试验)	(164)
第三十一章 习惯性流产和滋养细 胞肿瘤患者血清中封 闭因子的测定	(165)
一、概述	(165)
二、封闭因子的测定	(165)
第三十二章 先兆子痫患者循环免 疫复合物的研究	(168)

一、概述	(168)
二、主要检测方法	(168)
第三十三章 妊娠期疾病的免疫遗 传学研究	(172)
一、概述	(172)
二、HLA-A、B、C和DR抗原的测定	(172)
第三十四章 免疫不育症的研究方 法	(175)
一、概述	(175)
二、血清中抗精子抗体测定方法	(175)
三、生殖道局部抗精子抗体的检测	(179)
四、抗透明带抗体的检测	(180)

第七篇 肿瘤的免疫学诊断

第三十五章 甲种胎儿球蛋白(AFP)	
检测诊断原发性肝癌	
.....	(181)
一、间接反向血凝法.....	(181)
二、放射火箭电泳自显影法.....	(182)
第三十六章 鼻咽癌的早期诊断——	

检测EB病毒壳抗原的	
IgA(VCA-IgA)	(185)
免疫酶法测定鼻咽癌病人的VCA-IgA	
.....	(185)

第八篇 寄生虫病的免疫学诊断

第三十七章 弓形虫病的免疫学诊断	
.....	(188)
一、Sabin-Feldman 染色试验.....	(188)
二、间接血凝试验.....	(190)
三、酶联免疫吸附试验检测抗弓形虫IgM	
.....	(192)
四、过氧化物酶-抗过氧化物酶法(PAP	
法) 检测组织内的弓形虫.....	(193)
第三十八章 阿米巴病的免疫学诊断	
.....	(196)
一、间接荧光抗体试验.....	(196)
二、间接血凝试验.....	(197)
三、双向免疫扩散试验.....	(199)
四、对流免疫电泳试验.....	(200)
五、酶联免疫吸附试验.....	(201)
第三十九章 贾第虫病的免疫学诊断	
.....	(202)
一、酶联免疫吸附试验.....	(203)
二、对流免疫电泳试验.....	(204)

第四十章 包虫病的免疫学诊断	
.....	(205)
一、皮内试验.....	(206)
二、琼脂双向扩散试验.....	(206)
三、免疫电泳.....	(208)
四、酶联免疫吸附试验.....	(209)
第四十一章 猪囊尾蚴(囊虫)病的免疫学诊断	
.....	(211)
一、间接血凝试验.....	(211)
二、酶标记抗原对流免疫电泳.....	(213)
三、酶联免疫吸附试验.....	(215)
第四十二章 旋毛虫病的免疫学诊断	
.....	(216)
一、皮内试验.....	(216)
二、微量沉淀试验.....	(217)
三、间接荧光抗体试验.....	(218)
四、对流免疫电泳.....	(220)
五、其它血清学诊断方法.....	(221)
参考文献	(222)

第一篇 肾脏病

第一章 肾脏病中的免疫球蛋白

免疫球蛋白是血浆蛋白中参与机体正常免疫应答和免疫病理现象的重要成分。其基本结构是由二条相同重链（H链）和二条相同轻链（L链）组成，根据重链抗原性的不同分为IgG、IgA、IgM、IgD和IgE五类。血清免疫球蛋白浓度受许多因素影响，在肾脏病中，由于蛋白尿引起血清IgG浓度降低以及由于尿毒症效应使这一现象复杂化。肾功能衰竭可产生抑制免疫球蛋白合成的毒性效应，最先影响IgM，其次IgA，最后是IgG。

值得注意的是IgG增高加速其分解代谢，IgG浓度异常可能是分解加速的结果或由于合成减少所致；而在大多数情况下IgA和IgM降低是由于合成障碍引起。切记针对某一抗原的抗体应答在质和量上均不同。某些抗原（如脂多糖）无需T细胞的协助可直接刺激B细胞，胸腺非依赖性抗原诱发IgM应答而仅有轻度或无二次IgG应答。当给予T细胞依赖性抗原后，产生的循环抗体是以IgM、IgG和IgA的顺序出现。同样可产生针对细胞抗原的高效抗体，但以常规测定免疫球蛋白的方法不能检出。

某些疾病与特定类别的血清免疫球蛋白浓度有关，大多数为非特异性的。一种特殊的情况是检测单克隆免疫球蛋白和/或其组分，此时可获得重要的诊断资料。

对检测的免疫球蛋白浓度的分析需考虑下述因素：

1. 遗传学因素。

2. 生理因素，例如年龄、性别、营养、体位。

3. 代谢因素，例如免疫球蛋白合成和清除率，在机体各部位的分布。

4. 环境因素，例如季节变化、地理位置。

5. 病程和间歇性发病或感染的效应。

6. 疾病的并发症，例如蛋白丢失、血容量改变。

7. 治疗，例如皮质甾类、氯甲苯噻嗪、苯妥英钠等药物的应用，后者可选择性引起IgA缺陷。

8. 技术条件，影响因素很多，将在有关方法部分中讨论。

以免疫学方法确定肾脏病，通常测定特异性抗体（如抗链球菌溶血素O，抗DNA，抗肾小球基底膜抗体）、循环免疫复合物，以及免疫球蛋白和补体在肾脏组织中的沉积比测定血清免疫球蛋白类别更有意义。

由激活免疫应答和纤维蛋白原降解造成的补体水平的改变同样提供了有用的诊断资料，测定免疫球蛋白与其它蛋白质相对肾脏清除率的意义将在第七和十一章中讨论。

一、免疫球蛋白的测定方法

（一）琼脂糖凝胶区带电泳 电泳分离蛋白质的方法是鉴定与疾病相关的血清蛋白质类别有用的分析工具。琼脂凝胶区带电泳简单、有效，一次可做十几份标本，适于对血清及其它体液蛋白质的临床常规分析。

1.器材 直流电源,电泳槽,200×20×3mm Wettex 纱条,水平台,调温磁力搅拌器,205×110×1.5mm 玻璃板,0.5mm 切槽器,50mL和200mL烧杯,3μL自动加样器,压胶用的2kg重物,31ET色谱纸,90℃烤箱。

2.试剂

(1)电泳缓冲液 pH8.8 0.1mol/L Tris-巴比妥钠-巴比妥缓冲液。

巴比妥钠 9.5g

巴比妥 3.0g

Tris 4.6g

乳酸钙 0.4g

用蒸馏水溶解至1000mL。

加入钙离子能改善对蛋白质成分的分辨率,每次电泳后改变电极,缓冲液可连续用约10次电泳。

(2)固定液 苦味酸的饱和溶液与冰醋酸3:1混合。苦味酸混合液最多用于15块凝胶板,因其固定蛋白质的能力随时间及应用次数增加而降低。

(3)染色液 氨基黑B5g/L或考马氏亮蓝R-250 5g/L溶于96%乙醇-冰醋酸-水混合液(9:2:9)中,染料溶于此液中,混合24小时,用Whatman 1号滤纸过滤。考马氏亮蓝对蛋白质染色的敏感性比氨基黑B至少高3倍,且稳定,可室温保存。

(4)脱色液 96%乙醇-冰醋酸-水混合液(9:2:9),此脱色液稳定,可大批配制。

(5)样品稀释液 0.2mol/L Tris-巴比妥钠-巴比妥缓冲液含有300mL甘油/L和1g溴酚蓝/L的缓冲液。溴酚蓝与白蛋白结合,使在电泳过程中可示踪泳动最快的白蛋白的位置。甘油增加样品的密度,减低移动速度,使样品不至于扩散至孔外,而均匀泳入琼脂。

(6)琼脂糖 做电泳试验时对琼脂糖的选择是最重要的。Miles Seravac或BDH是最适来源,其琼脂呈透明状具有中度胶

性。带负电荷基团能引起中度至高度电渗现象,高度纯化的琼脂糖因无适合的电渗现象,影响γ球蛋白的移动。

3.方法

(1)琼脂凝胶板的制备(厚度约为1.0mm) 10g/L比例的琼脂糖加入0.1mol/L Tris-巴比妥缓冲液50mL中,将此三角瓶放在磁力搅拌器加热板上煮沸。在三角瓶口插入直径约40mm的玻璃滤器漏斗或倒插小三角瓶以减少煮沸过程中水的丢失,琼脂糖应完全溶解在缓冲液中才可铺板。铺板过程如下:

a.将烧杯放在60℃的热水中,吸入25mL溶解的琼脂糖。

b.将一块已于90℃烤箱中预热的干净玻璃板放在水平台上。

c.将琼脂糖快速倒在玻板中央,用玻棒将琼脂铺开至外缘,可得到均匀厚度的凝胶板。

d.铺板后立即将切槽器插入距长边缘5mm处,静置20分钟。

(2)血清样品的处理和加样 电泳样品的离子强度和pH应尽可能地与凝胶缓冲液相近,因此用甘油-Tris-巴比妥稀释液对血清样品及对照样品做1:1稀释。移走切槽器后,加样前用滤纸轻触槽面吸除槽内液体,切勿将槽损坏,以保证电泳质量。随即用自动加样器将3μL样品和对照样品分别加入槽内,样品液面应与胶面一致以防溢出。

(3)电泳分离蛋白质 制备的凝胶板小心放在有冷循环水降温的电泳槽内平板上,将胶板和冷板间铺一薄水层,并去除气泡以利更好地降温。一些研究者发现如在平面上滴入浓度为0.5g/L的非离子型去垢剂可减少气泡形成。用缓冲液浸湿的Wettex纱条连接凝胶板和缓冲液。电泳时电压梯度为20V/cm,整块板需电压250~260V,电流100~120mA,冷水温度10~15℃。重要的是这种势差梯度的平衡受此系统冷却效应的

影响, 过冷或过热都将改变电泳结果。当前峰白蛋白泳至距阳极端边缘约10mm时终止电泳, 整个电泳平均需时55分钟。从槽内取出凝胶板前须先关闭电源。

(4) 蛋白质的固定和染色 将凝胶板放在饱和苦味酸溶液中10分钟固定分离的蛋白质, 之后覆盖一层31ET层析纸, 应避免气泡, 盖纸应柔软, 再铺盖数层毛巾纸, 顶端放一厚3mm玻璃板, 用2kg重物加压15分钟, 将凝胶压成一薄片; 将凝胶板连同层析纸放入90℃烤箱烘干; 移走盖纸, 用冷自来水将多余的苦味酸冲净, 放入考马氏亮蓝染液中染色至少10分钟, 冷水冲洗, 再用脱色液脱色约30秒去除剩余染料, 防止过度脱色。再以冷水冲板, 烘干, 最后标本照像保存。

4. 实验注意事项

(1) 10次电泳后更换电泳缓冲液, 整个电泳槽应用自来水冲洗后再装液。

(2) 电泳时确保纱条连接凝胶板和缓冲液。再次电泳前将纱条彻底清洗并在水中煮沸才可重新使用。

(3) 某些电泳试验最好用空腹血清样品, 因为血浆样品电泳呈现的纤维蛋白原可遮掩单克隆免疫球蛋白带。而Laurell赞同将收集的血液直接加入 Na_2EDTA 中, 这样使蛋白酶不被激活, 增强样品中不稳定的 C_3 和 C_4 成分的稳定性, 陈旧样品中 α 和 β 脂蛋白移动增快亦能改善, 而且, 纤维蛋白原的异常可被测出。

(4) 存在于其它体液(如尿和脑脊液)中的蛋白质, 如具有适当浓度也适于用此法分离。

(5) 采集样品需小心, 对于血清应避免过长的静脉郁滞和溶血, 而对尿及其他体液, 则应采用尽可能新鲜的样品。

(6) 样品最好放在密闭的聚乙烯、聚碳酸酯或玻璃管中, 保存于4℃至多1周, 如时间再长应将样品冰冻储存, 避免反复冻

融导致蛋白变性。某些人愿将样品保存在浓度为1g/L的叠氮钠中, 叠氮化合物与铜和其它金属能形成不稳定的、易爆炸的复合物, 需经排泄通道除去含有叠氮化合物的液体。

(7) 肉眼观察蛋白质分离的结果而不能定量测定。患者蛋白类别应与至少7名无乙型肝炎的健康男性混合血清比较, 此混合血清于试验当天稀释。

(8) 一些蛋白质经电泳后也泳至免疫球蛋白所在区带的位置, 造成假性免疫球蛋白增高, 如用免疫双扩散、免疫电泳或交叉免疫电泳等方法易于鉴别。某些与免疫球蛋白电泳区带位置相似的蛋白质列于表1-1。

(二) 免疫双扩散试验 (Ouchterlony法) 抗原与抗体在琼脂凝胶中同时向对方扩散, 在比例平衡处形成抗原-抗体复合物, 于孔间出现白色沉淀线。免疫双扩散是一种半定量试验, 是确定抗原决定簇是否为同一性或非同一性的简单、直接的方法。

表1-1 易与免疫球蛋白混淆的蛋白质

电泳移动区带	蛋白质成分
白蛋白	双白蛋白
α_1 -球蛋白	甲胎蛋白 α_1 -抗胰蛋白酶变体
β 球蛋白	转铁蛋白变体 补体降解产物 β -脂蛋白
β - γ 球蛋白	纤维蛋白原 细菌污染
γ 球蛋白	C反应蛋白 溶菌酶

1. 器材 调温磁力搅拌器, 水平台, 60×40×2mm玻璃板, 直径4.0mm的打孔器, 10 μL 自动加样器, 湿盒, 光盒。

2. 试剂

(1) Tris-巴比妥钠-巴比妥缓冲液 (0.1mol/L pH8.8) 参看琼脂凝胶区带电泳。

(2) 琼脂糖10g/L。

(3) 抗血清, 兔抗人免疫球蛋白血清。

3. 方法

(1) 制备琼脂糖凝胶板 (厚度1.0~2.0mm) 溶解琼脂糖方法与琼脂凝胶电泳相同, 预热玻板放在水平台上, 将6mL熔化琼脂均匀铺在玻板上, 放置10分钟待凝胶形成后打孔。

(2) 打孔 用打孔器在凝胶中打孔, 每孔直径4mm, 孔的位置根据研究需要而定。孔间距通常为4~5mm, 为避免样品的流散, 加样前在孔底加入一滴熔化琼脂封底。

(3) 加样 10 μ L抗原和抗体分别加入相对应的孔中, 同时也作阳性和阴性对照样品。

(4) 扩散 凝胶板放在湿盒内, 于室温中进行扩散。扩散时间取决于特异的抗原抗体系统, 常为1~72小时。

(5) 观察结果 在抗原抗体比例合适处形成白色沉淀线, 将凝胶板对着黑色背景的光盒观察, 沉淀线最清楚。之后压胶、染色、照像保留结果。

4. 实验注意事项

(1) 玻璃板面应洁净, 以保证沉淀线清晰。

(2) 扩散温度在18~37 $^{\circ}$ C最适, 增高温度可提高抗原抗体扩散率, 应避免温度变化, 以防影响沉淀线形状。

(3) 凝胶孔的损坏或电泳过程中, 抗体或抗原的变性可引起免疫沉淀的人为误差。

(4) 此技术的灵敏度取决于孔距、反应物浓度、凝胶浓度及厚度, 其最低抗原检出量为2mg/L。

(5) 抗原或抗体过量可抑制沉淀线的显现, 故应做抗原或抗体-系列稀释度的预试, 摸索二者反应的合适浓度。

(6) 陈旧的或脂血症样品可产生围绕

抗原孔的环状沉淀线。

(7) 有时由于抗体及抗原决定簇的不均一性, 或抗血清间相互反应可出现不止一条沉淀线。

(三) 火箭免疫电泳 (Laurell法) 火箭免疫电泳也可对免疫球蛋白进行定量测定。抗原泳入含有单一特异性抗体的琼脂糖凝胶, 在抗原抗体比例合适处形成火箭形沉淀, 沉淀峰长度与抗原浓度呈正比。

1. 器材 直流电源, 电泳槽, 200 $\times$ 20 $\times$ 3mm wettex 纱条, 调温磁力搅拌器, 2块205 $\times$ 110 $\times$ 1.5mm 玻璃板, 205 $\times$ 110 $\times$ 1.0mm U形架, 4个铁夹, 50mL量筒, 直径2.5mm的打孔器, 打孔模板, 3 μ L自动加样器, 透析管, 0~110 $^{\circ}$ C温度计, 2kg重物, 31ET层析纸, 90 $^{\circ}$ C烤箱, 刻度为mm的量尺。

2. 试剂

(1) 电泳缓冲液 巴比妥-甘氨酸-Tris缓冲液 (pH8.8, 离子强度0.08) 应用前将等量的缓冲液1和缓冲液2混合配制。

缓冲液1 巴比妥钠13g

巴比妥 2.07g

溶解于1000mL蒸馏水中,

缓冲液2 甘氨酸56.2g

Tris 42.2g

溶解于1000mL蒸馏水中。

(2) 琼脂糖 Litex HSA15g/L

Miles Seravac10g/L

最好用纸电渗的琼脂糖, 使电泳时抗体在凝胶中基本不移动。同样应根据所测定的特异性蛋白选择琼脂糖, 例如Miles Seravac琼脂糖适用于IgM的定量测定, 而用Litex HSA琼脂糖结果较差。

(3) 染色和脱色液 参看琼脂凝胶区带电泳。

(4) 抗血清 根据其组成, 特异性, 亲和力, 抗体滴度及稳定性选择抗血清。应用兔抗人抗血清的效果较好, 所产生的沉淀线清晰, 很少出现人沉淀素抗兔血清蛋白的

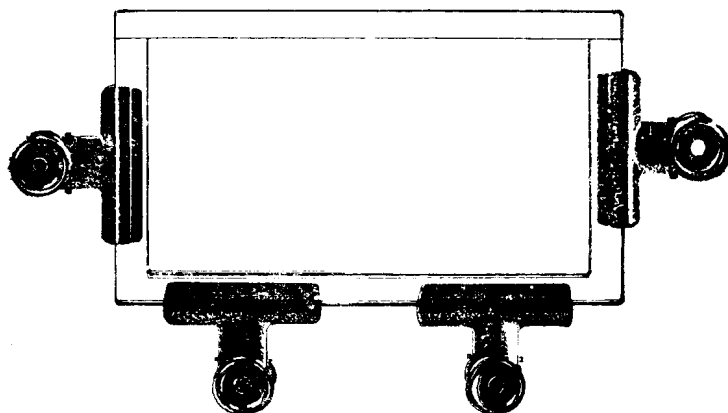


图 1-1 均-厚度琼脂糖凝胶制备装置

现象，最好应用从抗血清中提纯的免疫球蛋白。应测定特异性抗血清的抗体效价，各批血清间抗体滴度差异应小于10%，每年抗体活性的下降应小于2%。

3. 方法

(1) 凝胶板制备(厚度1.0mm) 用蒸馏水将巴比妥-甘氨酸-Tris缓冲液1:1稀释，与所用琼脂糖混合加热溶解，铺板。

a. 将U形架用水浸湿，放在两块玻璃板之间，以铁夹夹紧。参见图1-1。

b. 铺板前将U形板放在烤箱中预热(90℃) 2分钟，用吸管将熔化琼脂糖沿玻璃板边缘滴入，待胶面距底边5mm高为止，放入90℃烤箱2分钟，取出加含抗体的琼脂糖。

c. 将30mL煮沸的琼脂糖倒入预热的量筒，待琼脂糖降温至56℃时，用加样器加入适量的特异性抗血清，彻底混匀。

d. 将含有抗体的琼脂糖沿玻璃板边缘快速倒入板间，注意避免气泡，这室温中放置20分钟使凝胶固定，取掉铁夹，细心移走上方的玻璃板。

e. 小心去除U形架，将熔化琼脂糖滴加在凝胶周边，使后者固定在玻璃板上，保证外侧火箭形沉淀线的完整。

f. 使凝胶板固定在打孔模板下，用打孔器打孔，每孔直径2.5mm，孔排的位置由所测定的抗原所带电荷决定，最外侧孔应距

边缘至少2cm，因为凝胶板边缘电势梯度较高，易影响沉淀线的形状。

(2) 准备样品及加样 样品的pH和离子强度应与电泳缓冲液接近，而样品是用缓冲液或用0.9%NaCl稀释则无关紧要。用自动加样器吸出3μL稀释样品，对照样品及标准液，分别加入各孔内，下述操作很重要：

a. 孔内液体不应溢出以避免抗原流至孔周，孔应完整。

b. 4~5个连续稀释的标准样品最好从边孔加向中央孔。

c. 每隔10孔加一种稀释度的对照液，第一孔和终末孔加入同样稀释度样品，以确定在电泳过程中是否产生偏差。

d. 为防止先加样孔内液体的扩散，加样过程不应超过10分钟。

(3) 电泳 加样后即将玻璃板放入电泳槽，在凝胶与缓冲液间以Wettex纱条连接，切勿过分压胶，特别是当距孔很近时，以防影响火箭形沉淀线形成。电泳期间以冷循环水冷却凝胶的温度。电泳时间和电压主要根据抗原泳动速度及与抗体相结合的能力，最满意的沉淀峰长为10~40mm。

(4) 染色和脱色 参看免疫双扩散试验。

(5) 抗原浓度的计算 沉淀线峰长为

10~40mm时,其与抗原含量密切相关。首先应仔细严格观察沉淀峰的形态,只有当标准液和检测样品沉淀峰的形状和显现相似时,才能依标准液计算检测抗原的浓度。

a.精确测量每一标准液沉淀峰长度,以mm表示。

b.按实际数值在绘图纸上描绘标准曲线,纵坐标为峰长,横坐标为抗原浓度。

c.测量每份样品和对照液浓度的方法是将凝胶板放在绘图纸上,孔底沿横坐标移动,使沉淀峰的顶端与标准曲线相接,阅读浓度值,再乘以样品的稀释度计算样品的抗原浓度。

4.实验注意事项

(1) 此实验的最低抗原检出量为300 μg/L。

(2) 质量控制大多采用商品供应的对照样品,但应注意到这些对照的电泳迁移率和沉淀线形状并不总与检测样品相似,最好用混合血清。

(3) 凝胶厚度为1mm较好,随着凝胶厚度的增加,沉淀线前峰不规则移动的危险性增大。

(4) 一般用控制沉淀峰值在10~40mm的最低抗血清浓度,保证沉淀线的清晰。用4份连续稀释的参考血清描绘标准曲线,曲线的斜度很重要,取决于:①应用的抗血清浓度;②参考样品的浓度范围。

(5) 含有抗体的凝胶铺板后封闭在模板内,以防止脱水及微生物污染,可置4℃1周备用。

(6) 直接查找标准曲线确定未知样品抗原浓度(g/L)的步骤如下:

a.摸索出当特异性抗血清的量一定时,沉淀峰在40mm的最高抗原浓度,以此确定工作范围。

b.计算出符合这一工作范围的未知样品稀释度。

c.以适当的稀释因子稀释参考样品,使

其最大标准值与最高抗原浓度相等。

$$\text{稀释因子} = \frac{\text{参考样品浓度} \times \text{未知样品稀释度}}{\text{最高抗原浓度}}$$

例如: 参考样品浓度 = 2.0g/L

未知样品浓度 = x10

最高抗原浓度 = 4.0g/L

$$\text{适宜的稀释因子} = \frac{2.0 \times 10}{4.0} = 5$$

5.氨基甲酰化 抗原所带电荷如与抗体相近常不能形成适于定量的沉淀线。IgG和IgM为慢移动蛋白,形成阳极-阴极沉淀线,如要定量需计算二者总和。用氰酸盐处理抗原,使其氨基部分地转化为氨基甲酰基团,增加蛋白质的阳极移动速度,产生满意的沉淀反应。将样品与氰化钾各1份(v/v)混合,于37℃反应2小时,或于45℃30分钟,也可于室温中过夜。当加样准备就绪后,用盐水或缓冲液适量稀释终止反应。标准液和待测样品应以同样方式氨基甲酰化,以保证结果的可比性,得到相似的沉淀峰长度。

6.免疫沉淀峰的变异 免疫沉淀峰的变异可能由下述原因所致:

(1) 不同抗原-抗体复合物的可沉淀性不同。

a.免疫沉淀峰的尖度受蛋白质电泳迁移率和沉淀扩展程度影响。

b.与相应抗体迁移率很接近的小分子量抗原,即使在延长电泳时间后也不能出现有意义的沉淀峰。

c.如用免疫电泳技术根据其在阳极和阴极沉淀线的产生定量测定电泳和抗原性不均一的免疫球蛋白(如IgG和IgM),则结果分析较棘手。对此类蛋白先进行氨基甲酰化处理,改变其电荷,就只形成阳极沉淀线。

d.免疫球蛋白的抗原不均一性及商品抗血清不同程度的抗原特异性提示,免疫球蛋白的免疫化学分析的可靠性不如其它蛋白质,对抗原决定簇为数有限的单克隆免疫球蛋白来说更是如此。

e. 单克隆免疫球蛋白于免疫电泳中通常不出现沉淀线, 或产生染色不清、不规则突起的沉淀线。

(2) 实验条件 (表1-2)。

表1-2 因实验条件所致免疫沉淀峰的异常

异常沉淀线	技术原因
由于凝胶表面抗原过多导致的非典型性沉淀峰	孔内抗原溢出
异常狭窄沉淀线及沉淀峰减小	孔内加样量不够
短、宽、双沉淀峰, 尤其当低电荷和低浓度的抗原时双沉淀峰	泳动过快
抗原移动速度不同引起的不均一沉淀峰	凝胶过厚导致温度不均
结条大滴, 例如沉淀线基底部与孔相连	由于蒸发, 凝胶顶部和底部离子强度不同
偏斜的火滴	电泳时间不合适, 电势梯度过高
二条以上的沉淀峰	纱布与凝胶接触不良或凝胶厚度不一致, 或电泳仪器未放在水平位置
	抗血清含有针对一种以上蛋白质的抗体, 或具有部分免疫化学同一性和/或蛋白质的电泳不均一性, 或电泳终止前电流中断

(四) 环状免疫扩散 (Mancini 法)

环状免疫扩散是定量测定特异性蛋白质的另一条途径。抗原环状扩散至含有单一特异性抗体的琼脂糖凝胶内, 在抗原比例合适处形成沉淀环, 环区域与抗原浓度成正比。已有多种环状免疫扩散板出售。

1. 实验方法

(1) 制备环状扩散板 铺板过程参看火箭电泳一节, 所用抗体浓度需参照抗原浓度范围、灵敏度及精确性预先确定。

(2) 打孔 每孔直径2.5mm, 各孔应一致, 圆整、清洁, 孔间距约15mm。可利用显微镜打孔器和打孔模板。

(3) 加样 每孔内精确加入未知样品或参考样品5 μ L, 将板放在湿盒内, 水平放置, 于室温中扩散。

(4) 常用三种稀释度的标准液描绘标准曲线。

(5) 实验需用不止一块板时, 若这些扩散板为同一批, 仅做一份系列稀释标准液即可, 而在每块板中均需加对照样品。

(6) 扩散时间取决于下述因素:

a. 加入抗原的绝对量。

b. 抗原的扩散性质。

c. 温度, 温度增高能减少完全扩散所需时间, 但不影响最终沉淀环的大小。

将扩散板放置于室温中结果满意。在不考虑准确性和灵敏度的情况下, 对高浓度特异性抗原的测定在4~24小时可完成。参照Fahey技术, 依据沉淀环直径计算抗原浓度的对数值。扩散时间愈短, 标准曲线愈呈曲线形。虽然Mancini技术扩散时间较长, 但抗原定量精确。当抗原抗体反应完全时, 沉淀环区域大小与所加抗原量及凝胶中相应抗体浓度呈线性正比关系。用Mancini方法测定IgG、IgA、C3和C4所需的最短扩散时间是50小时, IgM为80小时。

(7) 经足够时间扩散后, 测量沉淀环直径, 精确到0.1mm。

(8) 如果一块板上并非所有的孔都被利用, 可将板保存在4~6 $^{\circ}$ C, 继续备用, 但最好使用新的标准液。

2. 描绘标准曲线 在绘图纸上描绘标准曲线, 纵坐标为不同稀释度标准液沉淀环的直径平方, 横坐标为相应的抗原浓度。按照未知样品沉淀环直径在标准曲线上查找其浓度值, 再乘以稀释度确定样品原浓度。注意, 沉淀环应为圆形才能准确定量。如果曲线呈凸面向上, 提示高浓度抗原扩散不完全, 如果曲线呈凹形, 说明存在技术误差。

3. 标准 应用的标准免疫球蛋白制品应以世界卫生组织 (WHO) 免疫球蛋白标准加以校正。

4. 误差原因。

(1) 抗原性质 如果样品含有不同的抗原, 对不同的特异性抗血清可产生一种以上的沉淀环。就抗原性不均一的免疫球蛋白

而言,当应用了广范围多克隆特异性抗血清时,仅出现一个沉淀环,在某些情况下可见双沉淀环。例如样品中存在7S和11S IgA,或存在正常的多克隆免疫球蛋白及一种单克隆免疫球蛋白。其它异常可能为:

a.蛋白复合物,例如结合珠蛋白-血红蛋白复合物环状扩散值比估计的低。

b.多聚体,例如IgA和IgM多聚体扩散结果也低于估计值,已知分泌型11S IgA的扩散程度是等量7S IgA的70%。

c.亚单位,例如低分子量的部分(如7S IgM)环状扩散值比估计的大。

d.通常单克隆免疫球蛋白扩散结果比估计值大,这取决于普通免疫球蛋白和各个单克隆免疫球蛋白之间抗原性差异程度。

e.过量抗原可抑制沉淀线的形成,造成报告值偏低的误差。

f.偶然情况下,IgM多聚体或冷球蛋白不扩散至凝胶中,因此不出现沉淀环或只产生低水平数值。

g.类风湿因子因可与凝胶中抗体反应产生孔周的沉淀反应,干扰抗原的定量测定。

(2) 实验条件

a.各孔内抗原液量不一致,加样量不适宜,液体过满溢至孔周;扩散板孔内含水或过度冷凝;凝胶孔破损。

b.在不同的扩散时间后分析未知样品和标准品,对沉淀环的读数不准确。

c.标准曲线的描绘不正确,使用厂家校正表时未严格采用对照样品和标准条件。

d.参考样品和未知样品变性。

5.单克隆免疫球蛋白的定量测定 将单克隆免疫球蛋白的抗原-抗体反应与普通血清标准比较不能测得前者的绝对值,故应以同样的提纯物作为标准。用火箭电泳测定单克隆免疫球蛋白不出现通常情况下的沉淀线。由于在普通免疫球蛋白和各个单克隆免疫球蛋白范围间抗原性差异的程度不同,用环状免疫扩散测定单克隆免疫球蛋白浓度趋

向高于估计值。

经以普通血清为标准的一系列环状免疫扩散测得的结果可推算出一个单克隆免疫球蛋白浓度变化指数,与区带电泳结合分析,能评价①疾病的进展;②患者对治疗的反应。

(五) 定性免疫电泳 免疫电泳需二步完成,依据蛋白质的电泳和免疫学特性对其鉴定。首先使抗原在琼脂糖凝胶中电泳,然后加相应的抗血清,使其在琼脂中扩散达到鉴定抗原的结果。免疫电泳使在区带电泳中异常不连续的电泳带得以定性。

1.器材 直流电源,电泳槽,200×20×3mm Wettex纱条,水平台,调温磁力搅拌器,205×110×1.5mm玻璃板,分为宽25mm的8部分,每部分中心用金刚石笔标记,切槽器,打孔器,50mL和200mL烧杯,注射器,50μL自动加样器,皮下注射针头,2kg重物,31ET层析纸,湿盒,90℃烤箱。

2.试剂

(1) 电泳缓冲液 下述缓冲液可任选一种

Tris-巴比妥-巴比妥钠缓冲液 (0.1 mol/L pH8.8): 参看琼脂糖凝胶区带电泳。

巴比妥-甘氨酸-Tris缓冲液 (pH8.8, 离子强度0.08): 参看火箭免疫电泳。

醋酸钠-巴比妥钠缓冲液 (pH8.2, 离子强度0.10):

巴比妥钠 8.14g

无水醋酸钠 6.47g

0.1mol/L HCl 90mL

加蒸馏水溶解至1000mL,使用前用蒸馏水1:1稀释。

(2) 琼脂糖: 任选一种, Miles Seravac效果最佳。

Miles Seravac 10g/L

BDH 10g/L

Litex HSA 20g/L