



免疫检验学

戎瑞雪◎主编

 吉林科学技术出版社

免疫检验学

戎瑞雪◎主编

图书在版编目 (C I P) 数据

免疫检验学 / 戎瑞雪主编. -- 长春 : 吉林科学技术出版社, 2018.9

ISBN 978-7-5578-4613-8

I. ①免… II. ①戎… III. ①免疫诊断 IV.

①R446.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第140057号

免疫检验学

主 编	戎瑞雪
出 版 人	李 梁
责任编辑	隋云平 端金香
封面设计	长春创意广告图文制作有限责任公司
制 版	长春创意广告图文制作有限责任公司
幅面尺寸	185mm×260mm
字 数	280千字
印 张	12.75
印 数	650册
版 次	2019年3月第2版
印 次	2019年3月第2版第1次印刷

出 版	吉林科学技术出版社
发 行	吉林科学技术出版社
地 址	长春市人民大街4646号
邮 编	130021
发行部电话/传真	0431-85651759
储运部电话	0431-86059116
编辑部电话	0431-85677817
网 址	www.jlstp.net
印 刷	虎彩印艺股份有限公司

书 号	ISBN 978-7-5578-4613-8
定 价	50.00元

如有印装质量问题 可寄出版社调换

因本书作者较多,联系未果,如作者看到此声明,请尽快来电或来函与编辑部联系,以便商洽相应稿酬支付事宜。

版权所有 翻印必究 举报电话:0431-85677817

前 言

免疫学检验是从实验室角度研究免疫系统异常导致疾病的一门科学，其衍生于免疫学和临床免疫学。无论是在以手工为主的严谨操作时期，还是在高速运转的现代化机械时代，免疫学都是临床医学专业的核心课程之一，临床免疫学检验更是临床检验工作的一个重心所在。

就医学检验专业而言，“免疫学检验”是一门重要课程。教材编写者们都在翔实、严谨地考究这门教材，各个版本的《免疫学》《免疫学检验》和几年来已陆续出版的类似教材，都体现了这一点。在吸取其他教材经验基础上，本书编者按照“从易到难，由感性到理性”及“重基础知识，基础知识与前沿知识相兼顾，基础知识与临床应用相结合”的编写原则，对课程内容和课程结构作了精心设计，这是本书的重要特色之一，期望这一尝试能对医学检验专业的师生和临床实验室工作人员有所帮助，也为科学地构建“免疫学检验”知识体系打下良好基础。

根据免疫学检验的基础、特点和应用，将《免疫检验学》按照免疫学技术基础、常用免疫学检验技术、常用免疫学检验技术的临床应用分为七章来讲述，第一章简要介绍抗原、抗体及其反应和各类抗原、抗体的制备方法，使读者从基础知识了解免疫、认知免疫。第二章至第七章介绍了各种常用免疫学检验技术以及免疫细胞分离和功能检测技术、流式细胞术、自动化免疫分析和质量保证等方面的内容，通过学习，读者可以在灵活应用免疫技术的同时保障检测的准确性，也为在今后工作中熟练掌握技术和树立高度责任心打下良好基础。

编者在编写过程中查阅、分析了大量资料，对编写内容进行了反复讨论和修改，付出了艰辛的劳动。

由于水平和经验有限，本书难免有不足或错误之处，敬请各位专家、同行批评指正，以便更臻完善。

著 者

目 录

第一章 免疫学技术基础	1
第一节 抗原抗体反应.....	1
第二节 免疫原和抗血清的制备.....	9
第三节 单克隆抗体和基因工程抗体制备.....	17
第二章 常用免疫学检验	27
第一节 凝集试验	27
第二节 沉淀试验	35
第三章 常用免疫检验技术（一）	45
第一节 放射免疫技术.....	45
第二节 荧光免疫技术.....	57
第三节 固相膜免疫测定技术.....	75
第四章 常用免疫技术（二）	87
第一节 酶免疫技术	87
第二节 化学发光免疫分析技术.....	100
第五章 免疫细胞检验技术	119
第一节 生物素—亲和素放大技术.....	119
第二节 免疫细胞的分离及其表面标志的检测技术.....	128
第三节 免疫细胞功能检测技术.....	142
第六章 自动化分析	157
第一节 自动化免疫浊度分析系统.....	158
第二节 化学发光免疫分析系统.....	165
第三节 自动化荧光免疫分析系统.....	173
第四节 自动化酶联免疫分析系统.....	177
第五节 自动化免疫分析仪器的质量控制.....	179

第七章 临床免疫学检测质量保证.....	181
第一节 概 述	181
第二节 免疫检测的质量控制原则.....	185
第三节 质量保证、室内质量控制和室间质量评价之间的关系.....	190
第四节 常用免疫检验的质量控制.....	192
第五节 免疫检验质量控制的数据处理.....	195
参考文献	197

第一章 免疫学技术基础

第一节 抗原抗体反应

抗原抗体反应(antigen-antibody reaction)是指抗原与其相应抗体在体内、外的特异性结合反应。体内发生的抗原抗体反应即为体液免疫应答的效应作用,其主要表现在介导吞噬、溶菌、杀菌、中和毒素以及介导诸如某些超敏反应在内的免疫病理损伤等作用;体外发生的抗原抗体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(电解质、补体、固相载体等)不同,出现凝集反应、沉淀反应、中和反应及补体参与的反应等各种不同的反应类型。因早期建立的实验方法中,在体外应用的抗体主要存在或来源于血清中,抗原或抗体的检测多采用血清作试验,所以体外抗原抗体反应有时亦被称为血清学反应(serologic reaction)。

一、抗原抗体反应的原理

抗原与抗体能够特异性结合是基于抗原决定簇(抗原表位)与抗体互补决定区(高变区)分子间的结构互补性与亲和性。这种特性是由抗原、抗体分子空间构型所决定的。当它们分子间的空间构型高度互补时,使得抗原决定簇与抗体互补决定区能够紧密接触,从而为抗原与相应抗体间产生足够的结合力提供了有利条件。

抗原抗体反应可分为两个阶段。第一阶段为抗原与抗体发生特异性结合,形成抗原抗体复合物,此阶段反应快,仅需数秒钟至数分钟,但并不出现可见的反应;第二阶段为可见反应阶段,抗原抗体复合物在适当的电解质、pH、温度或补体等的影响下,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。此阶段反应较慢,往往需要数分钟至数小时。实际上抗原抗体反应的两个阶段是一个连续的过程,不能严格区分,反应所需时间亦受多种因素和反应条件的影响,如反应中抗原抗体浓度较大且两者适合,则能很快形成可见反应。

(一) 抗原抗体结合力

在抗原决定簇与抗体互补决定区高度互补并能够紧密靠近时,有四种分子间引力参与并促进抗原抗体间的特异性结合,它们是静电引力、范德瓦耳斯力、氢键和疏水作用力(图 1-1)。

(1) 静电引力

静电引力(electrostatic forces)又称电荷引力或库仑引力,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,一方分子上某碱性氨基酸侧链带有阳离子化的氨基残基($-\text{NH}_3^+$)和酸性氨基酸电离后阴离子化的羧基($-\text{COO}^-$)可与另一方带有相反电

荷的对应基团产生静电引力,两者相互吸引促进结合。这种引力大小和两个电荷间距离的平方成反比。两个电荷越近,静电引力越强。

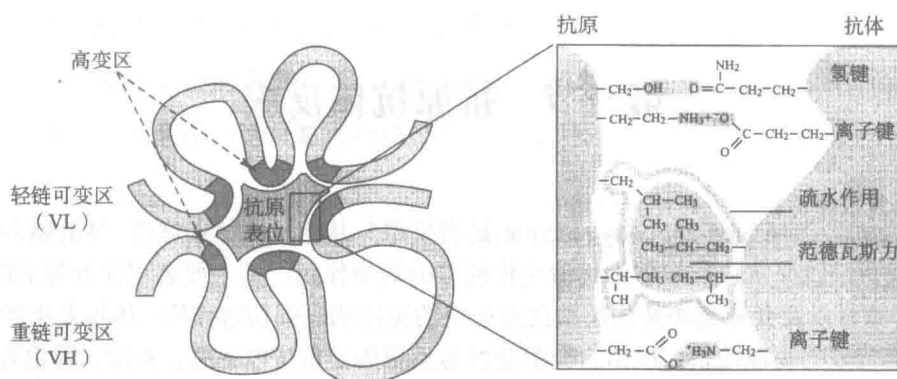


图 1-1 抗原抗体结合力示意图

(2) 范德瓦耳斯力

范德瓦耳斯力(van der Waals'forces)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的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而产生吸引力,促使抗原抗体相互结合。该引力的大小与两个相互作用基团的极化程度的乘积成正比、与它们之间距离的 7 次方成反比。相应抗原抗体结合位点间,两者分子空间构型的互补性较高,即能产生较强的范德瓦耳斯力。但一般来说,这种引力的能量小于静电引力。

(3) 氢键

氢键(hydrogen bond)是供氢体上的氢原子与受氢体原子间相互的引力。在抗原抗体反应中,主要表现在抗原抗体分子中的氢原子与电负性大的原子如氮、氧等相互的引力。当具有亲水基团(例如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 及 $-\text{COOH}$)的抗原或抗体与相对应的抗体或抗原彼此接近时,可形成氢键桥梁,使抗原与抗体相互结合。氢键结合力较范德瓦耳斯力强,并且由于其需要有供氢体和受氢体相遇时才能实现氢键的结合,因此氢键在分子结合力中更具有特异性。

(4) 疏水作用力

疏水作用力(hydrophobic interaction)在水溶液中相互靠近的两个疏水基团,由于它们均有对水分子的排斥作用而趋向聚集在一起,这种力称作疏水作用力。在抗原抗体反应中,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。

当抗原表位与抗体结合点靠近时,相互间正、负极性消失,由于静电引力形成的亲水层也立即失去,排斥了两者之间的水分子,从而促进抗原与抗体间的相互吸引而结合。这种疏水结合力对于抗原抗体的结合很重要,其提供的作用力最强。

(二) 亲和力

亲和力(affinity)是指一个免疫球蛋白分子单体的一条重链与一条轻链所构成的抗原结合位点与相应的抗原决定簇之间相适应而结合的强度,属于两个位点间的结合力,是抗原抗体间固有的结合力。同时抗原抗体的结合属于非共价的可逆结合,它们间的亲和力可用平衡常数 K_{eq} 来表示,以其来衡量抗原抗体结合的稳定性和亲和力。 K_{eq} 值越大,亲和力越高,意指抗原抗体位点间结合越牢固,不易解离(图 1-2)。

抗原+抗体 $\rightleftharpoons$ 抗原抗体复合物

$$K_{eq} = \frac{K_{结合}}{K_{解离}} = \frac{\text{抗原抗体复合物浓度}}{\text{游离抗原浓度} \times \text{游离抗体浓度}}$$

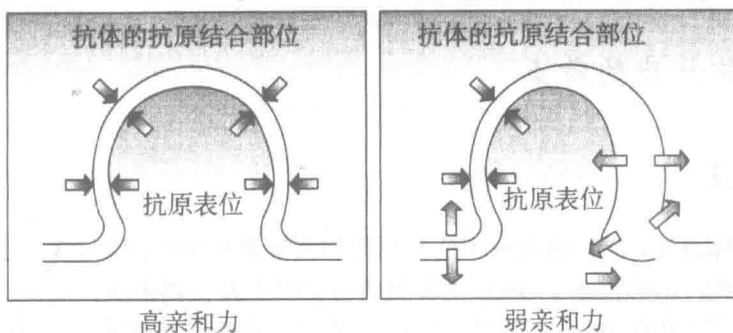


图 1-2 抗原抗体结合的亲和力示意图

(三) 抗体的亲合力

抗体的亲合力(avidity)是指整个抗体分子与抗原物质之间结合的强度,它除和抗原抗体间亲和力强弱有关外,还与抗体的结合价直接相关。由于不同的免疫球蛋白是以单体或多聚体形式存在的,即表现为多价优势,并且其强度增加不仅仅是亲和力的简单相加,而是呈几何级数上升的。如 IgG 为 2 价,其亲合力为单价的 10^3 倍, IgM 的五聚体形式时表现为 5~10 价,其亲合力为单价的 10^7 倍(图 1-3)。由于在抗原抗体发生结合反应时,它们空间构象的互补程度不同,结合力强弱也不同,互补程度越高的,亲合力也就越大,抗原抗体结合就更牢固,不易解离。

(四) 亲水胶体转化为疏水胶体

抗体和大多数抗原同属蛋白质,在通常的血清学反应的 pH 和电解质条件下均带有负电荷,由于静电作用,在蛋白质分子周围出现了带相反电荷的极化水分子,从而形成了水化层而被水

“包绕”，使其成为亲水胶体，因此蛋白质分子不会发生凝集或沉淀。

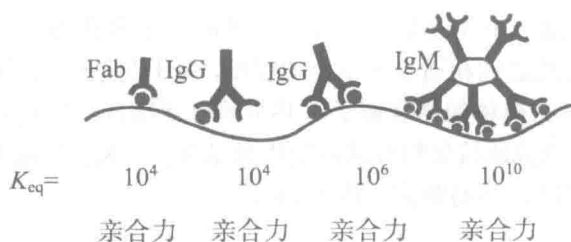


图 1-3 抗原抗体亲和力示意图

当发生抗原抗体的结合时，会使它们表面所带电荷减少或消失，水化层变薄，亲水性降低，从而由原来抗原抗体的亲水胶体形式转化为抗原抗体的复合物的疏水胶体。此时，如在一定浓度的电解质（如 0.85%NaCl 溶液）作用下，则可进一步中和胶体粒子表面的电荷，使疏水胶体物相互靠拢，形成可见的抗原抗体复合物。

二、抗原抗体反应的特点

（一）特异性

对于抗原抗体反应，一种抗原分子通常只能与其刺激机体后产生的抗体结合，这种反应的专一性称为特异性 (specificity)。抗原抗体的结合并没有共价键形成，而是这些特定部位之间的短程分子力相互作用的结果。这些吸引力只有在极短的距离内才有效。因此抗原决定簇与抗体结合位点在空间上必须处于紧密接触状态，才能产生足够的结合力。抗原抗体的结合是由抗原表位与抗体分子高变区之间的氨基酸顺序及空间构型的互补性所决定的。抗原抗体的结合实质上只发生在抗原的抗原决定簇与抗体的抗原结合位点之间。抗体的抗原结合部位 (antigen-binding site) 由抗体分子重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 上各自具有的三个高变区组成，该部位形成一个与抗原表位空间互补而又能相互吸引的沟槽，从而负责特异性识别及结合抗原。抗体分子的高变区氨基酸具有高度的变异性，加上负责链接支持高变区的骨架区的差异，使得其形成抗原结合沟槽千变万化，只有与其空间结构互补的抗原表位才能嵌入，形如锁与开锁的钥匙一样。因此抗原抗体反应具有高度的特异性。例如乙肝病毒中的表面抗原 (HBsAg)、e 抗原 (HBeAg) 和核心抗原 (HBcAg)，虽来源于同一病毒，但仅与其相应的抗体结合，而不与另外两种抗体反应。抗原抗体反应的这种特异性使免疫测定能在一个非常复杂的蛋白质化合物（例如血清）中测定某一特定的物质，而不需先分离待检物。

但是这种特异性也不是绝对的。大多数抗原分子通常具有多种抗原表位，也可以刺激机体产生多种特异性的抗体，假如两种不同的抗原分子有着部分相同或相似的抗原表位，则可以与彼此相应的抗体发生交叉反应（图 1-4）。例如：绒毛膜促性腺激素 (hCG) 和黄体生成激素 (LH) 均由 α 和 β 两个亚单位组成，其结构的不同处在 β 亚单位，而两者的 α 亚单位是同类的。用

hCG 免疫动物所得的抗血清中含有抗 α -hCG 和抗 β -hCG 两种抗体, 抗 α -hCG 抗体将与 LH 发生交叉反应。在临床检验中, 如用抗 hCG 抗血清作为妊娠诊断试剂检定尿液中 hCG, 只能用于 hCG 浓度较高的试验, 否则妇女生理性排泄人尿液中的微量 LH 将与之发生交叉反应。所以交叉反应的出现一定程度上影响着血清学诊断的准确性。同时, 临床检验中也可利用交叉反应性来进行诊断, 如变形杆菌与立克次体之间有相同的抗原表位, 故可以利用变形杆菌代替立克次体抗原来检测病人血清中是否含有抗立克次体抗体, 来协助诊断斑疹伤寒病, 此试验称为外-斐(Weil-Felix)试验。

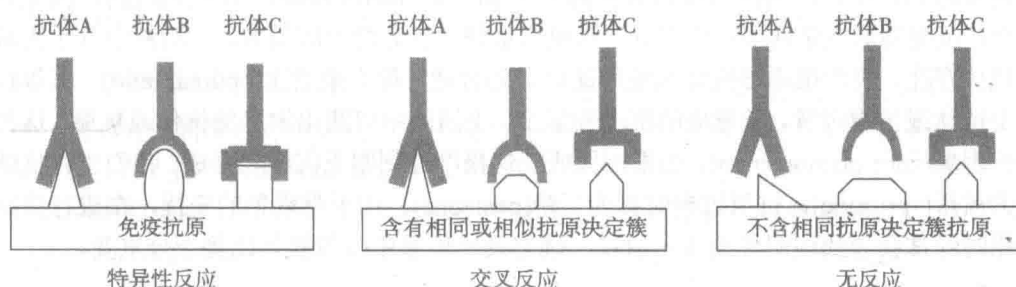
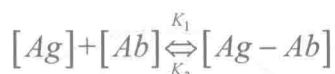


图 1-4 交叉反应示意图

(二) 可逆性

由于抗原抗体间的结合力均属于非共价结合, 在抗原与相应抗体结合成抗原抗体复合物后, 在一定条件下又可以解离为游离抗原和抗体, 这种特性称为抗原抗体反应的可逆性(reversibility)。抗原抗体反应也遵循生物大分子热动力学反应原则, 其是一种动态的平衡过程, 当达到平衡时, 抗原抗体结合与解离速度相等, 其反应式为:



$[Ag]$ 为抗原, $[Ab]$ 为抗体, K_1 为结合常数, K_2 为解离常数。

抗原抗体复合物解离取决于两方面的因素, 一是抗体对相应抗原的亲合力; 二是环境因素对复合物的影响。具有高亲合力抗体的抗原结合点与抗原表位在空间构型上非常适合, 两者结合牢固, 不容易解离。反之, 低亲合力抗体与抗原形成的复合物较易解离。解离后的抗原或抗体均能保持未结合前的结构、活性及特异性。在环境因素中, 凡是减弱或消除抗原抗体亲和力的因素都会使逆向反应加快, 复合物解离增加。如 pH 过高或过低均可破坏离子间的静电引力, 使抗原抗体间的结合力下降; 离子强度增加也可通过中和带电离子使静电引力消失而降低抗原抗体结合力, 促使复合物解离。由于抗原抗体结合的可逆性, 可利用亲和层析法分离纯化抗原或抗体; 利用待测抗原和标准抗原与抗体的竞争结合, 进行抗原或抗体的定量测定, 如放免检测法、酶联免疫吸附法等。

(三) 比例性

比例性(proportionality)是指在抗原抗体发生特异性结合,要出现可见反应,需要遵循一定的抗原抗体间的量比关系。无论在一定量的抗体中加入不同量的抗原或在一定量的抗原中加入不同量的抗体,均可发现只有在两者分子比例合适时才会出现最强的反应。以沉淀反应为例,若向一组含固定量抗体的试管中依次加入递增量的相应可溶性抗原,根据所形成的沉淀物及抗原抗体的比例关系可绘制出反应曲线(图 1-5)。从图中可见,曲线的高峰部分是抗原抗体分子比例合适的范围,称为抗原抗体反应的等价带(equivalence zone)。在此范围内,抗原抗体充分结合,沉淀物形成快而多。其中有一管反应最快,沉淀物形成最多,上清液中几乎无游离抗原或抗体存在,表明抗原与抗体浓度的比例最为合适,称为最适比(optimal ratio)。在等价带前后由于抗体或抗原过量,所形成的沉淀物量少,上清液中可测出游离的抗体或抗原,这种现象称为带现象(zone phenomenon)。如果抗原或抗体极度过剩则无沉淀物形成。我们也将抗体过剩时称为前带(prezone),抗原过剩时称为后带(postzone)。由于带现象的干扰,在进行抗原或抗体检测时经常会导致假阴性结果。所以,确定反应体系中抗原抗体比例十分重要。

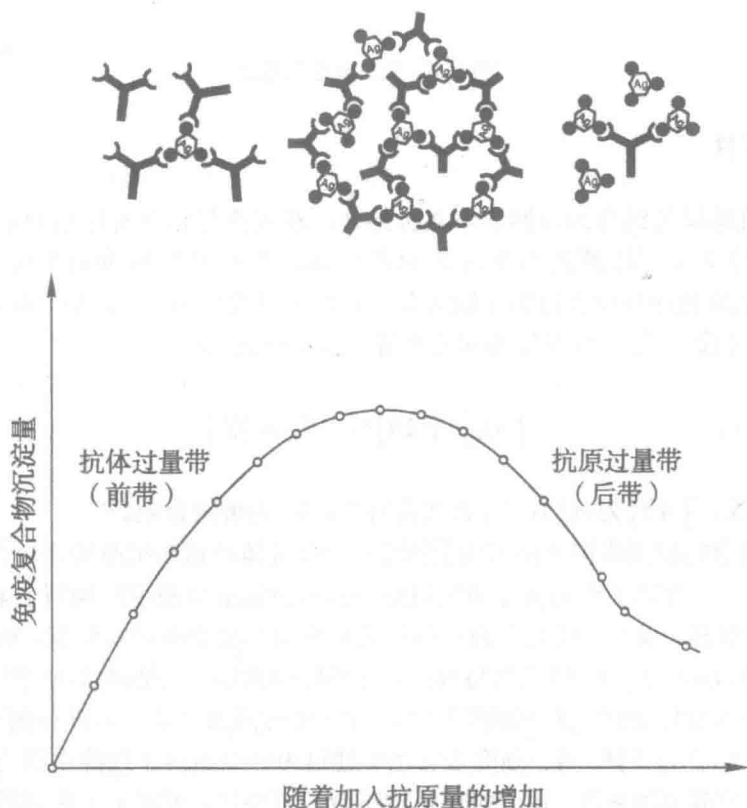


图 1-5 沉淀反应中沉淀量与抗原抗体的比例关系

关于抗原抗体反应按比例机制以及抗原抗体结合后如何形成聚合物,1934年 Marrack

高盐浓度(80 g/L NaCl 溶液)中沉淀现象明显;单克隆抗体一般不适用于沉淀反应或凝集反应。

(2) 抗体的特异性和亲和力。两者是影响血清学反应的两个关键因素,它们共同影响试验结果的准确程度。如:免疫动物早期获得的抗血清特异性较好,但亲和力低;后期获得的抗血清一般亲和力较高,但长期免疫易使免疫血清中抗体的类型和反应性变得更为复杂。因此,用于诊断的试剂必须尽量选用特异性高、亲和力强的抗体,才能保证和提高试验结果的可靠性。

(3) 浓度。抗体的浓度是与抗原相对而言。合适的浓度才出现明显的反应现象。因此许多试验应进行抗体预滴定,找出最适反应浓度。

(二) 环境因素

(1) 电解质

抗原与抗体发生特异性结合后,由亲水胶体向疏水胶体转换,在此过程中有适当浓度电解质存在,就会中和表面的部分电荷而使其电势下降,促进两者相互靠拢聚集形成可见的沉淀物或凝集物。若无电解质存在,则不出现可见反应。但如果电解质浓度过高,则会引起非特异性蛋白质沉淀,即出现盐析现象。通常在血清学试验中,以 0.85% NaCl 溶液或各种缓冲液作为抗原及抗体的稀释液及反应液,以提供适当电解质环境。补体参与的溶细胞反应,除需要等渗的 NaCl 溶液外,还需适量的 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 参与,以辅助补体活化。

(2) 酸碱度

抗原抗体反应必须在合适的 pH 环境中进行,一般以 pH 6~9 为宜。pH 过高或过低都将影响抗原与抗体的理化性质进而影响抗原抗体反应。因为每种蛋白质包括抗体都有同定的等电点,当 pH 达到或接近抗原的等电点时,即使无相应抗体存在,也会引起颗粒性抗原非特异性的凝集,造成假阳性反应。

(三) 温度

抗原抗体反应需要合适的温度才有利于反应的进行,一般在 15~40℃ 范围内均可,最适温度为 37℃。在此范围内温度越高,分子运动速度得以加快,抗原与抗体碰撞机会增多,使反应加速,但亦容易引起复合物解离;温度越低,反应速度缓慢,但抗原抗体结合牢固,易于观察。但若温度高于 56℃ 时,可导致已结合的抗原抗体再解离,甚至变性或破坏。但也有某些特殊的抗原抗体反应需要特定的温度,如冷凝集素在 4℃ 时与红细胞结合最牢固,20℃ 以上反而解离。

此外,抗原抗体在液相中反应时,适当振摇或搅拌也可促进抗原抗体分子的接触,加速反应。微波也可促使溶液中极性分子运动而加速其反应。还有对亲和力本身较弱的反应体系而言,仅增加离子强度即可达到解离抗原抗体复合物的目的;增加温度可增加分子间的热动能,加速已结合的复合物的解离,但由于温度变化易致蛋白变性,所以实际工作中极少应用。改变 pH 和离子强度是最常用的促解离方法,免疫技术中的亲和层析就是以此为根据纯化抗原或抗体的。

抗原抗体反应是抗原与相应抗体之间所发生的特异性结合反应。其反应的物质基础是抗原



分子表面的抗原表位与抗体分子高变区之间的互补结合。抗原抗体间的这种互补性是由抗原抗体分子的空间构象所决定的。抗原抗体之间的结合力包括静电引力、范德瓦耳斯力、氢键和疏水作用力。抗原抗体间的结合力参与并促进抗原与相应抗体结合成抗原抗体复合物，由亲水胶体转化为疏水胶体。

抗原抗体反应具有特异性、可逆性、比例性和阶段性的特点。特异性是抗原分子与抗体结合的专一性，是由抗原表位与抗体分子高变区间的空间构型的互补性所决定；可逆性是基于抗原抗体结合力量为非共价键结合，在一定条件下又重新可以解离为游离的抗原和抗体；比例性指抗原与相应抗体发生可见的反应需按照一定的比例关系。抗原抗体比例适当时才出现可见反应，称为抗原抗体反应的等价带，当抗体或抗原过量时分别称为前带和后带；阶段性指抗原抗体反应分为特异性结合阶段及可见阶段。

影响抗原抗体反应的因素包括抗原抗体自身因素和环境因素。自身因素包括抗原的理化性状、抗原决定簇的数目和种类以及抗体的来源、特异性和亲和力、浓度等方面；环境因素主要为抗原抗体反应介质中的电解质、pH 和温度等。

第二节 免疫原和抗血清的制备

免疫学检验主要以抗原抗体反应为基础。抗体的质量直接关系到检测方法的特异性和敏感性，而理想的免疫原又是制备高质量抗体的关键。

抗体制备技术的发展经历了三个阶段：第一代抗体是用免疫原常规免疫动物方法制备的多克隆抗体 (polyclonal antibody, PcAb)，第二代抗体是用 B 细胞杂交瘤技术制备的单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb) (详见第三章)，第三代抗体是用基因工程技术制备的基因工程抗体 (genetic engineering antibody) (详见第三章)。上述抗体的制备方法与特点各不相同，本章主要介绍免疫原和抗血清的制备。

一、免疫原的制备

免疫原 (immunogen) 是指能诱导机体免疫系统产生抗体或致敏淋巴细胞，并能与相应的抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应的物质。绝大多数自然条件下的免疫原都是由多种成分构成的混合物，极少是单一成分。因此制备高质量抗体的首要工作是制备免疫原，即从成分复杂的混合物中分离、纯化所需的单一成分。免疫原的性质和来源不同，制备方法也不尽相同。下面介绍几种常见免疫原的制备方法。

(一) 颗粒性免疫原的制备

天然的颗粒性免疫原包括人和各种动物的细胞抗原以及各种细菌抗原和寄生虫虫体抗原等，制备方法相对比较简单。

(1) 绵羊红细胞免疫原的制备

绵羊红细胞是制备溶血素的抗原,制备方法是新鲜采集健康绵羊的静脉血,立即注入带有玻璃珠的无菌三角烧瓶内,充分摇动 15~20 min,以去除纤维蛋白,即得抗凝绵羊全血。取适量抗凝血于离心管中,用无菌生理盐水洗涤细胞 3 次,然后将压积红细胞配成 $10^6/\text{mL}$ 浓度的细胞悬液,即可用于动物免疫。

(2) 细菌免疫原的制备

将鉴定合格的纯培养细菌,接种于固体或液体培养基中,置 37°C 培养 24 h 增菌后处理。若制备菌体抗原,则将菌液 100°C 水浴 2~2.5 h (杀菌并破坏鞭毛抗原);若制备鞭毛抗原,则需用有动力的菌株,菌液用 0.3%~0.5% 甲醛处理。

(二) 可溶性免疫原的制备

蛋白质(包括糖蛋白、脂蛋白、酶、补体、细菌毒素)、多糖和核酸等均为可溶性免疫原,它们主要来源于组织和细胞,成分复杂。制备这类免疫原时,首先须将组织和细胞破碎,再选用适当的方法从组织和细胞匀浆中提取目的蛋白并进一步纯化,经鉴定合格后即可用做免疫原。

1. 组织和细胞可溶性免疫原的粗提

(1) 组织匀浆的制备。新鲜或低温保存的组织先去除包膜及结缔组织,脏器用含 0.5 g/LNaN_3 的生理盐水盥洗,然后在冰浴中将组织剪成小块,加入适量生理盐水,装入捣碎机筒内以 $1\,000\text{ r/min}$ 的速度间断粉碎,制成组织匀浆。组织匀浆经 $3\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min 后,吸取上清液再继续高速离心去除微小细胞碎片后即可作为提取可溶性免疫原的材料。

(2) 细胞的破碎。细胞抗原一般分为细胞膜抗原、细胞质抗原、细胞核抗原及核膜抗原。这些抗原的制备均需将细胞破碎。常用的细胞破碎方法如下。

① 超声破碎法。超声波的机械振动使流体形成局部减压而发生内部液体流动、旋涡形成和消失,产生足以使细胞破碎的压力。该法简单、省时,对一般组织细胞破碎效果好,但对细菌特别是真菌厚膜孢子效果欠佳。进行超声破碎细胞时,使用频率为 $1\sim 20\text{ kHz}$ 不等,需间歇进行,以免超声产热导致抗原破坏。

② 反复冻融法。冷冻可使细胞内由于水分形成冰晶以及胞内外溶剂浓度突然改变而导致细胞膜和细胞内颗粒破坏。其方法是将细胞置于 -20°C 冰箱内完全冻结,再取出让其在 $30\sim 37^\circ\text{C}$ 中缓慢融化,如此反复两次,大部分组织细胞及细胞内的颗粒均可被破坏。该法适用于组织细胞,对微生物细胞的作用较差。

③ 酶处理法。溶菌酶、蜗牛酶、纤维素酶等在一定条件下能消化细菌和组织细胞。如溶菌酶在碱性条件下对革兰阳性菌的细胞壁有溶菌作用。该法温和、不易破坏内含物成分、细胞壁损坏程度可以控制,适用于多种微生物细胞的溶解。

④ 表面活性剂处理法。在适当的 pH、温度及低离子强度的条件下,表面活性剂能与脂蛋白形成微泡,使膜通透性改变而溶解。常用的表面活性剂有十二烷基磺酸钠、去氧胆酸钠、Triton X-100 等。该法作用温和,在提取核酸时,常用此法破碎细胞。

2. 可溶性免疫原的提纯

组织细胞的粗提液中除了含有目标抗原外,还含有其他蛋白质、多糖、脂质和核酸等成分,需进一步提取和纯化。

(1) 超速离心法。超速离心法分为差速离心法和密度梯度离心法。差速离心法是指低速和高速离心交替进行,用于分离分子大小差别较大的抗原颗粒;密度梯度离心法是一种区带离心法,利用待分离物中各颗粒在一定密度梯度介质(如蔗糖、甘油、CsCl 等)中的沉降速度不同,使具有不同沉降速度的颗粒处于不同密度梯度层内,达到彼此分离的目的。此法仅适用于少数大分子抗原(IgM、Clq、甲状腺球蛋白等)以及某些相对密度较轻的抗原(载脂蛋白A、B等)的分离,不适用于大多数蛋白质抗原。

(2) 选择性沉淀法。利用各种蛋白质理化特性的差异, 采用不同的沉淀剂或改变某些条件, 促使某一蛋白质抗原成分沉淀, 从而达到纯化的目的。最常用的方法是盐析沉淀法。

盐析法原理: 在蛋白质溶液中加入高浓度中性盐后, 由于中性盐与水分子的亲和力大于蛋白质, 致使蛋白质分子周围的水化层减弱乃至消失, 同时中性盐可使蛋白质表面的电荷被大量中和, 更加导致蛋白质溶解度降低, 从而使蛋白质分子之间聚集、沉淀而析出。最常用的盐溶液是 33%~50% 饱和度的硫酸铵。盐析法简单方便, 可用于蛋白质抗原的粗提、 γ -球蛋白的提取、蛋白质的浓缩等, 但盐析法提取的抗原纯度不高, 只适用于抗原的初步纯化。

(3) 凝胶过滤法。也叫分子筛层析。凝胶是具有三维空间多孔网状结构的物质, 当含有不同相对分子质量的蛋白质溶液缓慢流经凝胶柱时, 大分子蛋白质因直径较大不易进入凝胶颗粒的网孔内, 只能留在颗粒的间隙, 随洗脱液快速地由上而下移动, 最先被洗脱下来; 小分子蛋白质则可进入凝胶颗粒的网孔内, 洗脱时向下移动的速度较慢, 较迟被洗脱下来。通过凝胶的分子筛作用, 蛋白质分子由大到小依次分离, 通过分段收集, 达到纯化目的。

(4) 离子交换层析法。是利用带有离子基团的纤维素或凝胶作为交换剂, 吸附交换带有相反电荷的蛋白质抗原。由于各种蛋白质等电点不同, 所带电荷量不同, 故与纤维素或凝胶结合的能力也有差别。当洗脱时, 逐步增加流动相的离子强度, 使溶液中的离子与蛋白质竞争纤维素或凝胶上的电荷位点, 从而将溶液中不同等电点的蛋白质分别洗脱分离。常用于蛋白质分离的离子交换剂有离子交换纤维素、离子交换凝胶和离子交换树脂。

(5) 亲和层析法。是利用生物大分子的生物学特异性,即生物分子间所具有的专一性亲和力而设计的层析技术,例如抗原和抗体、酶和酶抑制剂、DNA 和 RNA、激素和受体等之间有特殊的亲和力,在一定条件下,将对应的两个分子中的一方偶联于不溶性支持物上,就可从溶液中专一性地分离和提纯另一方。亲和层析法纯化效率高,速度快,有时仅一步即可达到纯化目的。

3. 纯化抗原的鉴定

纯化抗原的鉴定主要包括含量鉴定、相对分子质量鉴定、纯度鉴定和免疫活性鉴定等。其鉴定方法较多,实际应用时可根据实验目的和条件选用几种方法联合进行鉴定。

(1) 蛋白含量测定。可采用紫外光吸收法、双缩脲法、酚试剂法等。常用的是紫外光吸收法, 测定溶液 280 nm 和 260 nm 的吸光度(A)值, 直接根据公式计算蛋白含量。