

# 免疫诊断方法

N. R. 罗 斯  
P. E. 比格基 编

新疆维吾尔自治区流行病学研究所  
科技情报资料研究室

一九七七年

# 免疫诊断方法

N. R. 罗 斯    P. E. 比格基编

纽约州立大学免疫学中心

(布法罗)

张金桐 王伟导 冯润金 译

张福田 校

李桓英 审 校

新疆维吾尔自治区流行病学研究所  
科技情报资料研究室

一九七七年

## 内 容 提 要

世界卫生组织免疫学中心于1969和1971年在美国布法罗举办了两期免疫诊断方法短训班，本书是短训班的实验指导，其中包括基本血清学诊断方法和在此基础上发展的新方法。内容较新，方法实用。可供生物学、免疫学研究人员和临床检验工作者参阅。

Methods in  
Immunodiagnosis  
Edited by  
Noel R. Rose  
and  
Pierluigi E. Bigazzi

A WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATION  
JOHN WILEY & SONS  
New York·London·Sydney·Toronto  
1973

## 译者序

近年来,国内外对免疫学的研究有了很大进展,并已广泛地应用于多种疾病的预防、诊断和治疗。国内有关科研、医疗、卫生防疫部门在科研实践和临床工作中,越来越多地采用免疫学的研究成果和方法,促进了我国免疫学的发展。

目前,国内外有关免疫诊断的研究及临床应用方面的文献多散在于各种期刊杂志及专题报告中,汇集成册的不多。为了便于从事实际工作的基层同志更好地学习和掌握免疫学的原理和方法,批判地吸收和应用国外的经验,我们遵照毛主席“洋为中用”的教导,翻译了这本《免疫诊断方法》,供同志们在实际工作中参考。

本书的前身系世界卫生组织免疫学中心于1969年在布法罗举办的免疫诊断研究方法训练班的实习指导,成书时由编著者作了若干修改和补充,着重从实际操作方面比较全面地介绍了现代免疫学的各种技术方法。虽然原书出版至译文脱稿已过四年,但是我们认为本书对于从事医学研究和临床诊断工作的同志仍具有一定的参考价值。

由于近年来免疫学的迅速发展,新的名词术语不断涌现,新词的译名也不尽一致,我们一般参照广西人民出版社出版的《英汉免疫学名词汇编》的译名翻译,以求统一。凡属我们试译的译名,则将原文附后,以资参考。原书有一篇简短的前言和编著者姓氏录,意义不大,故在付印时删去。

译稿完成后,承北京阜外医院李恒英大夫详细审校并提

出许多宝贵意见，谨此表示衷心的感谢。

限于我们的业务水平和翻译能力，书中谬译之处肯定不少，恳请读者批评指正。

一九七七年元月

## 导 言

“免疫诊断”一词表示许多应用于人类疾病诊断的免疫学方法。它比“血清诊断”这个旧术语更确切，因为许多重要的实验方法是根据细胞免疫反应而不是体液免疫反应。此外，这类方法取决于免疫反应本身而不取决于血清本身。

免疫反应有显著的敏感性和特异性因而可应用于诊断。敏感性指的是免疫学的识别抗体 (reagent-antibody) 或细胞受体、或次级受体例如补体或组织胺对极微量抗原的反应能力。往往只需微克甚至微微克的量就足以引起可察觉的反应。

免疫学反应的特异性能够使人们很容易地发现即使使用最精密的生化分析方法也很难发现的差异。通过适当选择的抗血清可区分一种氨基酸或单糖基的差异。

免疫学诊断最初主要用于检查病原微生物的循环抗体。法国医生Widal氏指出，可以通过血流中的特异凝集素对伤寒做出间接的诊断。更确凿的证据是，人们发现在恢复期所采的血清标本较之急性期的血清标本滴度升高了。这一原理成为经典血清学的基础。当病原菌不明时，这些方法也是有用的，只要能发现一种适当的有关的抗原决定簇。例如，梅毒补体结合试验决定于一种广泛分布的心脂；变形杆菌交叉凝集反应决定于立克次氏体和蛋白质共有的一种抗原；冷血凝试验决定于同人类红细胞抗原的异质性反应。在许多病毒感染诊断中以及安全输血时，检定抗体十分重要。异性抗

原的抗体指向过敏性或变态反应性疾病，自身抗原的抗体可以做为自身免疫性疾病的标志。

利用抗体来识别细菌性抗原是由Gruber和Durham二氏首先提出的。他们用选定的抗血清做特异的凝集反应，可以很容易地区别伤寒和霍乱菌。今天，用这一基本概念来鉴别许多病原微生物和鉴别红细胞、白细胞以及其它组织细胞的抗原。而且，免疫学方法也可以对身体的许多成分——包括免疫球蛋白和它的血浆蛋白，循环肽(circulating peptide)或类固醇类激素以及药剂——进行精确的定量分析。

免疫诊断方法在研究免疫系统本身的失调上有特殊的应用价值。恶性网状淋巴细胞可引起免疫球蛋白成分生成的不平衡；先天性缺陷可使循环抗体产量减少，或使淋巴细胞、巨噬细胞、正常吞噬细胞及补体的机能降低。异常的免疫学反应性可以引起变应性或自身免疫性疾病。

由于免疫诊断方法日益重要，世界卫生组织免疫学会促请其在布法罗地区自身免疫血清学参考中心在这一领域中举办学习班。1969年，该参考中心的前身——免疫学中心举办了为期三周的着重于实验室方面的免疫诊断研究方法的夏季训练班。这期训练班培训了来自北美和南美、欧洲、亚洲和非洲的临床实验室医生及科学工作者，并于1971年又重复举办。

免疫诊断学习班是在布法罗的免疫学工作者（包括免疫学中心）的经验和技巧的基础上举办的。本书的编写即基于夏季训练班的实验指导。它体现了布法罗免疫学工作者的集体努力。在放射免疫测定和补体测定方面得到了其它单位专家的协助。

编写本书时，编者们强烈地意识到免疫诊断学的非常迅速的发展。甚至在编写过程中，有些方法——例如对癌胚抗原的放射免疫分析——已经用得很广泛，致使它们应该在本书中占有适当的位置。显然，做一些选择是必要的。我们试图着重叙述在现有的免疫化学方法的书籍中叙述得不够充分的操作方法并介绍一些在免疫诊断中广泛应用的基本原理。

布法罗 纽约

1972年12月

N.R. 罗斯

P E. 比格基

# 目 录

|                                             |        |
|---------------------------------------------|--------|
| 导言                                          | ( I )  |
| 第一章 沉淀反应                                    | ( 1 )  |
| C.J.范奥斯, P.比格基, A.巴伦, B.拉宾,<br>W.巴塞洛缪, K.威克 |        |
| 毛细管沉淀反应                                     | ( 3 )  |
| 两度双向扩散 (Ouchterlony氏法)                      | ( 4 )  |
| 免疫电泳                                        | ( 11 ) |
| 可溶性蛋白的辐射状扩散定量测定                             | ( 15 ) |
| 电免疫扩散                                       | ( 17 ) |
| 一度定量酶免疫电泳                                   | ( 20 ) |
| 抗原-抗体交叉电泳                                   | ( 20 ) |
| 对流免疫电泳                                      | ( 23 ) |
| 免疫透析                                        | ( 29 ) |
| 酶免疫电泳                                       | ( 31 ) |
| 凝胶沉淀反应的自动放射显影                               | ( 34 ) |
| 第二章 补体测定                                    | ( 39 ) |
| N.罗斯, P.比格基, W.巴塞洛缪, R.扎科                   |        |
| 补体结合反应                                      | ( 42 ) |
| 人类疾病中的补体活性                                  | ( 48 ) |
| 第三章 凝集反应                                    | ( 56 ) |
| N.罗斯, P.比格基, W.巴塞洛缪, K.威克,                  |        |

E. 戈津斯基, C. 艾贝尤尼斯

肠道细菌凝集反应..... ( 57 )

间接 (被动) 凝集反应..... ( 63 )

单层细胞培养物混合凝集反应..... ( 84 )

#### 第四章 免疫血液学方法..... ( 89 )

J. R. 莫恩, R. M. 兰伯特

ABO和Rh<sub>0</sub>(D) 血型的测定..... ( 91 )

ABH分泌状态的测定..... ( 98 )

不完全抗-D 抗体的测定..... ( 109 )

三相综合配血法..... ( 121 )

红细胞抗体致敏作用的测定方法..... ( 126 )

#### 第五章 使用标记抗体或抗原的方法..... ( 136 )

P. 比格基, K. 威克, E. 戈津斯基,

R. 泽斯科, J. 普利奥, G. 安德列斯, S. 格乔

免疫荧光法..... ( 136 )

免疫过氧化物酶法..... ( 153 )

免疫电子显微镜技术..... ( 162 )

放射免疫测定法..... ( 165 )

#### 第六章 白细胞分型..... ( 176 )

F. 米尔格罗姆, K. 卡诺

微滴淋巴细胞毒性试验..... ( 177 )

#### 第七章 细胞免疫反应..... ( 181 )

S. 科恩, R. 泽斯科

细胞免疫的体外测定..... ( 183 )

淋巴激活素的体内测定: 巨噬细胞消失反应... ( 198 )

#### 第八章 杂录..... ( 201 )

107 2.50元

C.J. 范奥斯, H. 富基, K. 威克, B. 拉宾,

J. 凯特

吞噬作用..... (201)

溶血斑测定法..... (206)

被动皮肤过敏症..... (210)

免疫细胞粘连 (玫瑰花瓣形成) ..... (214)

免疫细胞毒性..... (217)

## **第九章 准备性程序..... (224)**

C.J. 范奥斯

凝胶过滤..... (224)

离子交换色层分析..... (226)

淀粉板电泳..... (229)

SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳..... (232)

超滤过..... (234)

区带超速离心..... (238)

免疫吸附剂..... (240)

蛋白定量测定..... (246)

**试剂..... (249)**

# 第一章 沉 淀 反 应

C.J.范奥斯, P.比格基, A.巴伦, B.拉宾,

W.巴塞洛缪, K.威克

当可溶性抗原及其抗体在溶液中相遇时, 这种抗原—抗体复合物可形成不溶性的沉淀。沉淀速率取决于反应物的比例, 温度, 盐浓度, 且与溶液的pH值有一定关系。

沉淀反应可通过在试管或 Lang-Levy 氏吸管中使抗原和抗体混合而产生。也可通过将一种反应物小心地添加到盛在一支小直径试管中的另一种反应物的上面于是发生扩散来产生沉淀反应; 在两种反应物的交界面上可见到抗原抗体反应的沉淀线。Swift-Wilson-Lancefield 沉淀试验可以看做是前两种方法的综合。该试验在毛细管中进行, 最初在交界面处观察到沉淀, 随后, 由于对流作用而使反应物混合, 于是在毛细管下部也可见到沉淀。

沉淀反应可以通过使抗原和抗体在凝胶上扩散来实现。当一种反应物在含有另一种反应物的凝胶上扩散时, 这种反应称做单向扩散。单向扩散法是在试管中 (Oudin氏法) 更通常地是在凝胶板上 (辐射状免疫扩散或Mancini氏法) 进行的。当抗原和抗体同时在凝胶上扩散, 而凝胶中原不含有任何一种反应物时, 这种反应称做双向扩散。双向扩散法可在试管中 (一度双向扩散, Oakley—Fulthorpe 氏法或

Preer 氏法)，或更通常地是在凝胶板上（两度双向扩散，Elek 氏法或 Ouchterlony 氏法）进行的。

在琼脂上做两度双向扩散之前先进行电泳的方法是 Grabar 和 Williams 二氏首先提出的，称之为“免疫电泳分析”。由此而演变出其它的方法，例如，在琼脂单向扩散之前和做扩散时都进行电泳（两度，“交叉”免疫电泳），或只在单向扩散的同时进行电泳（电免疫扩散）。另一种改进的方法是利用内渗流（endosmotic flow），当在具有负电荷的凝胶上电泳时，内渗流使  $\gamma$ -球蛋白缓慢地移向阴极，即与快速移动的抗原移动方向相反。适当地安排凹孔，可使抗原和抗体会聚在一起（免疫电渗电泳或“交叉”电泳）。利用流体动力的传送，在发生沉淀反应处从凝胶中连续蒸发水分以促使抗原和抗体进行反应，也可促进双向扩散沉淀反应的效率（免疫透析，Immunorheophoresis）。

利用特殊的蛋白染色剂，或者可能的话，利用特殊的酶染色剂，可以提高凝胶沉淀反应的敏感性。将抗原或抗体用放射性同位素标记，利用自动放射显影术可以检出极微弱的沉淀反应。

在诊断实验室中使用免疫沉淀技术为诊断和了解患有各种免疫性和非免疫性疾病的患者的病程提供了可能性。使用两度扩散法检查抗原直接作出诊断的例证是甲胎蛋白和肝炎协同抗原（HAA）的检查。血清中蛋白含量异常的病症有溶血性贫血症中结合珠蛋白含量的降低、慢性功能障碍性肺病中抗胰蛋白酶含量的降低以及免疫缺乏病中免疫球蛋白含量的降低等。含量异常是通过定量辐射状免疫扩散法来进行分析的。

定性和定量方法在诊断浆细胞恶液质方面日益重要。同质性血清蛋白通常首先是用血清蛋白电泳检定的，其后用免疫电泳来做鉴定和证实它们的同质性。最后用辐射状免疫扩散法对同质的、非异常性免疫球蛋白成分进行定量测定以了解患者的病程，并对患者究系良性或恶性病程提出诊断上所需要的参考资料。

## 毛细管沉淀反应

在毛细管中进行沉淀反应，比起在普通试管中做沉淀反应来，具有所需要的抗原量极小这样的优点。毛细管沉淀法是Swift, Wilson和Lancefield三氏提出来的，用以检查链球菌中的M物质，但现在也用来检查肺炎球菌的碳水化合物和C-反应性蛋白。此法通常可用来检定可溶性抗原和滴定它们的抗体。

### 材料

1. 普通毛细管 (75毫米×1.04—1.24毫米内径)

2. 抗血清

3. 可溶性抗原

}这两种试剂须是透明的，必要时离心。

4. 橡皮泥制支座 (在一块木板上开一道凹槽并用橡皮泥填充；或用橡皮泥填充免疫扩散板；或把橡皮泥涂在载玻片上；或用微量血球容量计中的毛细管支座)

### 方法

1. 以毛细管吸取抗血清三分之一管。

2. 用潮湿的吸水纸擦净毛细管外部。

3. 吸取等量的抗原液。

4. 再把毛细管外部擦净。
5. 吸进少量空气。勿使抗血清和抗原之间产生气泡。
6. 用食指按住毛细管的顶端，将毛细管粘牢在支座的橡皮泥上。几秒钟内即开始发生沉淀反应，但使反应完全，则需较长时间。
7. 室温下静置一小时，然后观察结果。
8. 将毛细管置于冰箱中过夜，再观察结果。
9. 反应可分为若干等级：刚刚能观察到反应（±）；用放大镜可观察到少量的微细团块（+）；不用放大镜就能观察到反应（++）；毛细管中充满了团块状沉淀（+++到++++）。当发生致密的沉淀时，也可测量沉淀柱的高度（用毫米表示）。
10. 有时需要试验不同浓度的抗原以避免过多的抑制。

### 参 考 文 献

1. Anderson, H. C. and McCarty, M. Determination of C-reactive protein in the blood as a measure of the activity of the disease process in acute rheumatic fever. *Am. J. Med.* 8, 445(1950).
2. Swift, H. F. Wilson, A. T. and Lancefield, R. C. Typing group A hemolytic streptococci by M precipitin reactions in capillary pipettes. *J. Exptl. Med.* 78, 127(1943).

### 两度双向扩散（Ouchterlony 氏法）

双向扩散法能使抗原及其抗体在凝胶上通过双向扩散相遇后形成一条沉淀带，这条沉淀带对于形成它的抗原和抗体具有特异的不可透性。该沉淀带（从上面看则为沉淀线）

对其它的抗原和抗体（与第一对抗原、抗体完全不同）是可以透过的。

因此，当两份相同的抗原（或抗体）从两个不同的凹孔处扩散，与从第三个凹孔扩散的相应抗体（或抗原）反应时，将形成有角的沉淀线，而沉淀线的顶角处是融合的（一致性反应，图1.1.A）。在相同的条件下，两种不同的抗原从两个不同的凹孔处扩散，与其相应的两种抗体混合在一起从第三个凹孔扩散，发生反应时将形成两条沉淀线，这两条沉淀线是互相交叉的（非一致性反应，图1.1.B）。在部分一致性反应中，这两种情况也可同时发生。这时可见到沉淀线部分交叉，部分融合，如此形成的沉淀线型称作支线（图1.1.C和D）。

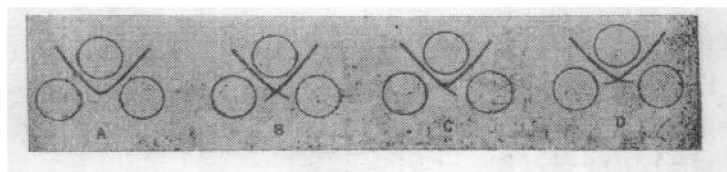


图1.1. 双向扩散法之基本反应类型（1和2：抗原凹孔；3：抗体凹孔）

由于沉淀带的形成仅取决于反应物的扩散常数而不由它们的浓度来决定，所以总是首先在两个凹孔之间一定的地方形成沉淀带，因此可以利用凝胶沉淀双向扩散法定量地滴定抗原—抗体。只要沉淀带两侧的溶液中反应物的量相等，则该沉淀带仅对形成它的抗原和抗体保持特异的不可透过性。当一种反应物，比方说抗原的浓度高于抗体的浓度时，抗原就能透过沉淀线进一步向抗体凹孔方向扩散，于是，或使沉淀

线在低浓度的抗体一侧加宽，或使整个沉淀线明显地移向抗体一方。这样，就能进行滴定了：细长的、未移位的沉淀线表示抗原和抗体的量相等，而在抗原和抗体不等量的情况下，沉淀线增宽或移位，增宽或移位的方向均在低浓度反应物的一方。

双向扩散技术已被用来研究细菌和病毒性抗原以及检出各种微生物所产生的抗体，但在临床微生物学上不是常规方法。然而，在病毒性抗原的研究中双向扩散法对初步诊断是非常有用的。此方法并不特别敏感，但仍被用来检定一些病毒性感染的抗体。用患者的血清对相应的抗原做扩散，检出了单纯性疱疹、水痘、肠道病毒及流行性感胃的抗体。这一方法也可用来检查病毒性抗原，例如天花，大量的抗原积聚在损害部位，因而很容易被检出。双向扩散法的一个主要贡献是从病毒性肝炎患者和供血者的血清中检出了肝炎协同抗原（HAA 或澳大利亚抗原）。目前检定HAA的常规方法是用对流免疫电泳法（第23页），但双向扩散法仍旧用来验证对流免疫电泳法或其它方法所得出的结果。

Ouchterlony氏法也被用来检查甲胎蛋白（胎球蛋白）。正常成年人血清中没有这种蛋白质，但在许多肝癌患者的血清中存在甲胎蛋白。这项检查对于鉴别肝硬变患者是否同时患有肝癌的诊断尤其重要。睾丸癌患者中也会出现一定比例的甲胎蛋白阳性病例，但从临床诊断的角度来看，这些阳性反应并不干扰原发性肝癌的诊断。这一反应也可用来验证睾丸癌的存在。

已报道了多种双向扩散方法。按照凝胶容器的不同（培养皿、玻璃板、显微镜载玻片），凹孔形状和容积的不同以及