

实验免疫学技术

实验免疫学技术

徐宜为 编

科学出版社

1979

内 容 提 要

本书以 Rose 和 Bigazzi (1973) 编著的《免疫学诊断方法》为基础, 收集了截至 1977 年底的有关新技术, 共九章。内容有: 免疫沉淀检测法、免疫标记检测法、凝集试验法、补体测定法、细胞免疫测定法、免疫血液学方法以及其它一些方法和试剂的制备等。可供从事人医、兽医学工作的研究人员、实验室工作人员及学员参考。

实 验 免 疫 学 技 术

徐 宜 为 编

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中 国 科 学 院 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1979 年 7 月 第 一 版 开 本: 787 × 1092 1/16

1979 年 7 月 第 一 次 印 刷 印 张: 14 3/4

印 数: 0001—25,200 字 数: 334,000

统一书号: 13031 · 1026

本社书号: 1445 · 13—10

定 价: 1.50 元

几点说明

本书是以 Rose 和 Bigazzi 编著的《免疫学诊断方法》(《Methods in Immunodiagnosis》1973)为基础,收集近年部分期刊上发表的一些新技术,整理编集而成。第四章(补体测定技术)和第六章(免疫血液学方法)未增加新内容。引用该书资料时,原书参考文献一律从略。主观愿望是:较为系统地介绍实验免疫学技术,同时又尽力反映目前的国内外新水平。由于大多数技术来源于国外资料,故在应用这些技术时,应发扬学、创结合的精神,根据具体情况建立最适实验条件。

在本书的整理编集过程中,得到了我所党组织的热情支持,得到了谢少文、杨贵贞和胡祥璧等老一辈专家的热情支持。谢教授在紧张的工作中审阅了部分章节,并对全书内容的安排提供了宝贵意见;杨教授利用春节和休假时间,详细审阅了全部内容,作了许多重要修改。另外,黄侠方和芦景良等同志也看阅过部分有关内容。在此谨向这些同志和其他曾给予支持和帮助的有关同志,表示衷心的感谢!

由于个人缺乏实践经验,加之专业水平所限,本书肯定会有不少缺点甚至错误,在内容的取舍和安排上也会有不当之处,恳请读者批评与指正!

编者

一九七八年三月十五日于哈尔滨

目 录

几点说明	v
第一章 免疫沉淀检测方法	1
一、玻璃管沉淀反应	1
毛细管沉淀反应	1
二、单向免疫扩散试验	2
三、单向辐射红细胞溶解试验	4
四、双向免疫扩散试验	5
五、免疫液流泳技术	8
六、琼脂凝胶免疫电泳试验	9
七、免疫结合电泳技术	11
八、琼脂凝胶对流免疫电泳技术	12
九、酶联免疫电扩散测定技术	14
十、电免疫扩散技术	15
十一、免疫电滤过技术	17
十二、免疫选择技术	18
十三、抗原-抗体交叉电泳技术	19
十四、定量-因次酶免疫电泳技术	20
十五、酶免疫电泳技术	20
十六、荧光免疫电泳试验	22
十七、凝胶中沉淀反应的放射自显影术	22
(一) 放射免疫扩散	23
(二) 放射免疫电泳	23
(三) 放射免疫对流电泳	24
十八、醋酸纤维膜在免疫沉淀反应中的应用	24
(一) 醋酸纤维膜双向免疫扩散	25
(二) 醋酸纤维膜免疫电泳	26
(三) 醋酸纤维膜-琼脂免疫电泳	26
十九、聚丙烯酰胺凝胶在免疫沉淀反应中的应用	27
(一) 聚丙烯酰胺凝胶免疫电泳	28
(二) 聚丙烯酰胺凝胶免疫扩散	30
二十、免疫超离心技术	32
第二章 免疫标记检测方法	34
一、免疫酶技术	34
(一) 原理	34
(二) 概述	38
(三) 酶联方法	39
(四) 呈色反应	47

(五) 酶联免疫测定流程	49
(六) 应用酶免疫测定组织抗原时应注意的几个重要问题	51
(七) 应用实例	51
(八) 不标记的抗体-酶技术	55
二、免疫电子显微镜技术	58
(一) 铁蛋白抗体法	58
(二) 酶及其抗体复合物的免疫电镜技术	62
(三) 使用酶标记抗体的免疫电镜技术	64
(四) 直接使用抗体的免疫电镜方法	68
三、放射免疫测定方法	72
(一) 基本原则	72
(二) 必须要求	73
(三) 影响放射免疫测定的主要因素	73
(四) 标记方法	74
(五) 应用实例	77
四、免疫荧光技术	81
(一) 使用二氯三嗪基氨基荧光素的免疫荧光方法	82
(二) 可溶性抗原的荧光抗体技术	84
第三章 凝集试验方法	87
一、肠道细菌的凝集试验	88
二、间接(被动)凝集试验	91
(一) 甲状腺抗体的鞣化细胞凝集试验	91
(二) 双偶氮联苯胺血凝试验	94
(三) HBsAg 及其抗体(抗-HBs)的血凝试验	95
(四) HBsAg 的反向间接血凝试验	96
(五) HBsAg 的免疫粘附血凝试验	99
(六) 细菌的血凝试验	101
(七) 阿米巴抗体的间接血凝测定方法	102
(八) 致敏 SRBC 的凝集试验 (Waller-Rose 试验)	103
(九) 乳胶凝集试验	104
(十) 炭凝集试验	105
(十一) 用单层细胞培养物的混合凝集试验	106
三、细菌的共同凝集试验	108
四、被动红细胞溶解试验	109
第四章 补体测定技术	111
一、补体结合试验	112
二、病患者的补体活性	115
(一) 人血清中总的补体活性的滴定	116
(二) 人血清中补体成分的测定	117
第五章 细胞免疫的测定方法	119
一、体内试验	120
(一) 皮肤试验	120

(二) 人巨噬细胞吞噬试验	121
(三) 实验动物的巨噬细胞消失反应	122
二、体外试验	124
(一) 游走抑制试验	124
(二) 淋巴细胞转化试验	128
(三) 玫瑰花结形成试验	132
(四) 淋巴细胞的细胞毒性试验	134
(五) 混合淋巴细胞培养试验	137
第六章 免疫血液学方法	139
一、ABO 和 Rho(D) 血型的测定	139
二、ABH 分泌状态的测定	142
三、抗-D 不完全抗体的检查	145
四、三份广泛(Tripartite Comprehensive) 适合性方法	149
五、检查红细胞致敏抗体的试验	151
第七章 其它方法	155
一、血小板凝集和 ^3H -5-HT 释放试验	155
二、吞噬试验	157
(一) 细菌或颗粒吞噬试验	158
(二) 硝基蓝四氮唑吞噬试验	158
三、溶血蚀斑技术	159
四、被动皮肤过敏试验	161
五、免疫细胞粘附试验	162
六、免疫血清细胞毒性试验	163
第八章 制备方法	165
一、凝胶过滤技术	165
二、离子交换纤维素层析法	166
三、离子交换葡聚糖凝胶层析法	168
四、制备 IgG 的硫酸铵沉淀法	170
五、乙醇分离血清免疫球蛋白方法	171
六、免疫吸附剂的制备技术	172
(一) 纤维素免疫吸附剂	173
(二) 琼脂糖珠免疫吸附剂	174
(三) 制备琼脂糖珠免疫吸附剂的最新改良法	179
(四) 半抗原免疫吸附剂	180
(五) Sephadex 免疫吸附剂	181
七、淀粉块电泳技术	182
八、聚丙烯酰胺凝胶电泳	183
九、IgG 的 Fab 段片的制备方法	186
十、碱性磷酸酶的制备方法	192
十一、铁蛋白的制备方法	194
十二、醋酸纤维膜的制备方法	195
十三、抗过氧化物酶血清的制备	195

十四、超滤过技术	195
十五、区带超离心技术	197
十六、蛋白浓度的测定方法	197
(一) 紫外光吸收法	197
(二) 缩脲法	198
(三) Coomassie 亮蓝法	199
(四) 折光计法	199
第九章 试剂	201
附录一 几种常用缓冲液配制表	216
附录二 关于旋转半径(厘米)、离心力(g)和每分钟转速的计算图	222
本书所用缩写	223

第一章 免疫沉淀检测方法

当可溶性抗原与其相应的抗体在溶液或凝胶中彼此接触时,所产生的抗原-抗体复合物,可成为肉眼可见的不溶性沉淀物。沉淀物产生的速度,取决于它们的比例、分子量大小、反应温度和盐的浓度;在某种程度上,也取决于溶液的 pH。利用抗原和抗体沉淀反应的这一特征,用已知的抗原或抗体检测抗体或抗原的存在,从而诊断人、畜的疾病,已早有广泛应用。例如,炭疽病的阿斯古里(Ascoli)氏反应,布氏杆菌病的全乳环状反应等。实施这种反应,可在小玻璃管或毛细玻璃管及凝胶平板中进行。在用凝胶平板做试验时,有的加电流,有的不加电流;形式多样,方法各异,但本质相同,所以统归于“免疫沉淀检测方法”。

免疫沉淀检测方法尽管有其不足,但一般说,都比较简单、方便、易行,且准确、可靠、重复性好,所以应用很广泛。

一、玻璃管沉淀反应

玻璃管沉淀反应包括试管法、吸移管法和毛细管法。过去用得比较多的是试管法。它是将抗原和抗体在一小试管中,小心地使其重叠成不相混的两层,使之发生反应。由于抗原和抗体在接触的界面产生沉淀物,所以很快便出现肉眼可见的白色环带。这种方法可用于测定抗血清中的沉淀抗体,也可以用于某些疾病的诊断,尤其是炭疽病的诊断,这就是众知的阿斯古里氏反应。它是炭疽病诊断的一个很重要方法,特别是对可疑的动物尸体(包括已腐败的尸体)及其皮张的检疫,具有简单、快速、实用等特点。吸移管法,一般很少应用。而毛细管法,即 Swift-Wilson-Lancefield 沉淀试验,可以认为是前两种方法的结合。它是在毛细管中进行的,沉淀物最初在界面见到,后来由于对流而发生了混合,所以在管的下半部分也可见到。

以阿斯古里氏反应为代表的试管沉淀反应,在何平夏等(1964)编的《兽医检验手册》一书中已有介绍,这里不再重复。下面叙述毛细管沉淀反应的做法。

毛细管沉淀反应^[5]

毛细管沉淀反应与试管法相比较,具有所需试剂用量很少的优点。该试验是由 Swift 等(1943)引进的,用于试验链球菌 M 物质的存在,也曾用于检查肺炎球菌多糖及 C-反应蛋白,通常可应用此反应检查可溶性抗原并滴定其抗体。判定的标准,依据抗原和抗体在反应中所形成的沉淀物的大小。抗原和抗体的比例最适时,所形成的沉淀物最大(图 1-1)^[6],即反应最明显。

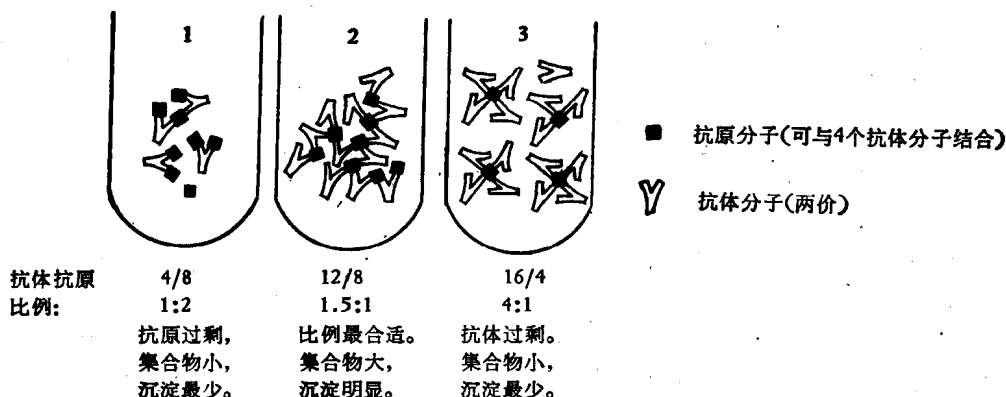


图 1-1 抗原与抗体比例对沉淀反应的影响

材料

- (1) 可处理的毛细管 (75 × 1.04—1.24 毫米内径)。
- (2) 抗血清。
- (3) 可溶性抗原。
- (4) 放毛细管的架。

方法

- (1) 用抗血清¹⁾充盈毛细管的三分之一。
- (2) 在抗血清上重叠等体积的抗原溶液。(注意: 在抗血清和抗原之间不应有气泡。)
- (3) 将管放在毛细管架上。沉淀将在数秒内开始, 但完成反应需较长时间。
- (4) 在室温静置 1 小时, 然后读取结果。
- (5) 放置冰箱过夜, 并再读结果。
- (6) 反应可按以下标准分级: 正好可见(±); 用放大镜可见一些细小团块(+); 不用放大镜就容易看到(++); 或沉淀的团块充盈毛细管(+++—++++)。当得到密集的沉淀物时, 也可以毫米测其在每管中的高度。
- (7) 有时需试验不同浓度的抗原, 以避免过剩性抑制。

二、单向免疫扩散试验^[1,2,15]

单向免疫扩散是指抗原或抗体这两种成份, 只有其中的一种成份扩散的方法。它又分两种, 即单向直线型免疫扩散和单向辐射型免疫扩散(图 1-2)。在直线型扩散中, 沉淀线的位置随抗原浓度而异。抗原浓度大, 则沉淀线距抗原侧远; 抗原浓度低, 则距抗原侧近。在辐射型扩散中, 孔周围所形成的沉淀环的大小, 与孔中抗原物质的浓度成正比, 即浓度大, 沉淀环也大。这种方法大多用于抗原或抗体的定量测定, 但也有用于实验室诊断的, 如鸡的马立克氏病的单向免疫扩散试验 (Marquardt, W. W., 1972)。下面先介绍

1) 抗血清应清亮, 必要时可离心; 抗原也如此。

在定量测定中的一般方法,然后介绍一个实例。

材料

- (1) 磷酸盐缓冲生理盐水 (Phosphate Buffered Saline, 以下简称 PBS), pH7.2。[试剂 26]
- (2) 琼脂或琼脂糖, 3%, PBS 配。[试剂 32]
- (3) 玻璃或塑料培养皿或载玻片。
- (4) 定量蛋白的标准溶液。
- (5) 待测样品溶液。
- (6) 定量蛋白的特异性抗血清。
- (7) 打孔器(内径 3 毫米)和微升滴管等。

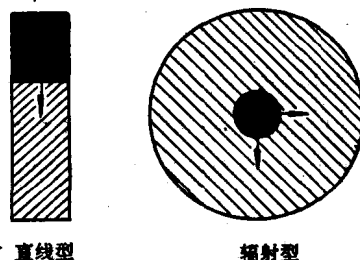


图 1-2 单向免疫扩散: ■ 抗原。▨ 抗体

选择最适抗血清浓度

- (1) 将琼脂融化并在 56℃ 水浴中保温。
- (2) 用 PBS 制备几个浓度的稀释抗血清, 并在水浴中加温到 56℃。
- (3) 将温琼脂与等体积的各个浓度的稀释抗血清混合, 并倒在培养皿或载玻片上, 使琼脂层大约 1.5 毫米厚。每个浓度的稀释抗血清各制一个凝胶板。
- (4) 琼脂冷凝后, 用打孔器打孔, 每个平板打 6 个孔。
- (5) 用标准蛋白溶液的稀释液(在未知溶液所期望的浓度范围)注满每个孔。
- (6) 盖上平皿或将载片放在一湿盒内, 置室温¹⁾孵育 22 小时。
- (7) 检查平板, 并选择提供最适大小沉淀环的抗血清浓度用于测定。

未知浓度的测定

- (1) 如上制备凝胶板, 但使用选定的抗血清稀释度。
- (2) 将 2 倍稀释的标准蛋白溶液加到至少 3 个孔内。
- (3) 将 2 倍稀释的未知浓度的蛋白样品溶液也加到 3 个孔内。
- (4) 如上在室温扩散 24 小时。
- (5) 测量标准的和未知的沉淀环的直径。
- (6) 画出标准曲线, 并以它确定未知的浓度。

应用实例: 流感病毒血凝素抗原的测定

材料

- (1) 1.5% 琼脂或琼脂糖。
- (2) 流感病毒抗原。
- (3) 抗流感病毒血凝素血清。
- (4) PBS, pH7.2。[试剂 26]
- (5) 0.5% Coomassie 亮蓝 (brilliant blue), 蒸馏水配。
- (6) 处理抗原用的甲替甲氨基硫酸钠 (sodium sarcosyl Sulfate) 溶液, 5% (W/V)。

1) 室温: 一般为 18—22℃。

(7) 玻片或培养皿、吸管、滴管及打孔器等。

方法

微量法:

(1) 取 10 毫升融化的 1.5 % 琼脂, 冷却到 56℃。

(2) 将抗血凝素血清用 PBS 作 1:10 稀释后, 取 125 微升加到 56℃ 琼脂内, 迅速混匀。

(3) 将干净的玻片放在水平的台面上, 用吸管加 3 毫升含抗血清的琼脂在玻片上, 并使其均匀展开, 静置冷凝。

(4) 冷凝后 (20—30 分钟), 用打孔器打孔, 孔径约 3 毫米。

(5) 在室温放置 20 分钟, 让多余的湿气蒸发。(如不立即使用, 在 4℃ 条件下可保存 3—4 周。)

(6) 将试验抗原和标准抗原用 PBS 作连续 2 倍稀释, 每个稀释度的体积为 0.5 毫升。

(7) 每个稀释度加入 0.2 毫升 5% 的甲替甲氨基硫酸钠溶液。

(8) 在室温静置 30 分钟后, 以 10 微升的量加到抗体凝胶板孔内。每个稀释度用 2 个孔。

(9) 将凝胶板放在一湿盒内, 在室温扩散 24 小时。

(10) 先将凝胶板在 PBS 中浸洗 24 小时, 然后读结果。每个稀释度取 2 个孔的平均数。

读结果有两种方法: 一种是用误差为 0.1 毫米的测微计, 直接读取沉淀环的大小; 另一种是染色后读结果。染色方法如下: 将浸洗后的凝胶板, 浸在 0.5% Coomassie 亮蓝溶液中, 染色 15—30 分钟。然后, 用自来水脱色, 直到背景无色或呈淡蓝色为止 (约需 24—36 小时)。

(11) 根据标准抗原的结果, 画出标准曲线, 并以它确定试验抗原的浓度。

巨量法:

基本上同微量法, 所不同的是:

(1) 在制备凝胶板时, 不用载片, 而是用培养皿 (9 厘米)。每个培养皿加 12 毫升含抗血清琼脂。

(2) 凝胶中的抗血清浓度比微量法增加 1 倍。

(3) 孔径 4 毫米。

(4) 抗原的处理在孔内进行, 即: 先将 20 微升的稀释抗原加到孔中, 待其扩散完 (约 30 分钟) 后, 加入 10 微升的甲替甲氨基硫酸钠溶液。

三、单向辐射红细胞溶解试验^[3]

单向辐射红细胞溶解试验 (Singal-radial-haemolysis) 是单向免疫扩散的一种新发展, 可用它检出或分析流感病毒的特异性抗体。因为这种方法不但只要少量粗制病毒抗原, 而且迅速、简单, 所以适于对流感病毒变异株进行大规模的血清流行病学研究。

单向辐射红细胞溶解方法, 是通过抗血凝素抗体和补体, 使经过病毒处理的红细胞被

动溶解,从而产生肉眼可见的抗原-抗体反应。因此,该方法不仅适用流感病毒的血清学研究,而且在医学病毒的血清学研究中,有广泛应用的可能性,特别是对红细胞表面有自然亲和力的病毒。用风疹病毒进行的初步研究表明,此法不仅可以进行抗体分析,而且用成对血清样品作感染的血清学诊断也是有效的。

不能自然吸附于红细胞的病毒,通过化学处理使其吸附在红细胞表面,也能进行单向辐射红细胞溶解试验。

本试验的敏感性和特异性,与被动红细胞凝集试验很相似,但它更有以下优点:①所用血清不用稀释和处理。②结果精确,重复性好。③不受非特异性红细胞凝集抑制因子的作用。④比被动红细胞凝集试验快而简单。

材料

- (1) 鸡的红细胞悬液。
- (2) 病毒抗原: 接种病毒鸡胚的绒毛尿囊液。
- (3) PBS, pH7.0—7.2。[试剂 26]
- (4) 补体: 豚鼠血清。
- (5) 特异性抗血清。
- (6) 1.5% 琼脂糖, PBS 配, 含 0.1% NaN_3 。

方法

- (1) 取鸡红细胞,用 PBS 洗三次,制成 10%(V/V) 悬液。
- (2) 将接种流感病毒的鸡胚绒毛尿囊液,加到红细胞悬液中,每毫升 10% 的红细胞悬液,加 500 个红细胞凝集单位 (HAU)。用未接种病毒的鸡胚绒毛尿囊液作同样处理,以资对照。
- (3) 混合物在 4℃ 放置 10 分钟,让病毒吸附于红细胞。
- (4) 离心沉降病毒吸附的红细胞,弃上清液。
- (5) 用 PBS 将沉降的红细胞再悬浮,并通过离心方法,洗涤 2 次,以去除游离的病毒。
- (6) 吸 0.3 毫升上述洗过的红细胞悬液与 0.1 毫升补体(不稀释的豚鼠血清),一起加到 2.6 毫升已融化的、保持在 45℃ 水浴中的琼脂糖溶液中。
- (7) 用力振荡,使红细胞均匀分布后,倒在塑料免疫平板或载玻片上,使其均匀展开,静置冷凝。
- (8) 30 分钟后,打孔,孔径 2 毫米。如不立即使用,4℃ 可保存 48 小时。
- (9) 吸 5 微升待检血清样品,加到孔内。然后将平板放到湿盒内,置 37℃ 孵育 16 小时。
- (10) 读结果: 用测微计测量加样孔周围的完全或部分溶血环的直径,并记录。每个待检血清样品做 2 个孔,取其平均直径为试验结果。环的直径大于或等于 2.5 毫米的血清样品,判为阳性。

四、双向免疫扩散试验^[1,15]

双向免疫扩散是利用抗原和抗体在同一个凝胶内彼此都扩散,彼此相遇后形成特异

的沉淀线(或叫带)。这种沉淀线对形成它的抗原和抗体是不可透过的,而对与这种抗原和抗体无关的所有其它抗原和抗体,则是可透过的。因此,两种一致的抗原或抗体从两个不同的孔扩散,当与从第三个孔扩散的它们的抗体或抗原反应时,彼此将以一定的角度形成融合的沉淀线(一致的反应,图 1-3-1)。在同样条件下,两种无共同决定簇的抗原与它们的抗体(混合放在第三孔中)反应时,彼此将以一定的角度形成两条交叉的沉淀线(不一致的反应,图 1-3-2)。在部分一致的情况下,上述两种情形都可能出现,即形成部分交叉和部分融合的沉淀线(图 1-3-3 和图 1-3-4)。

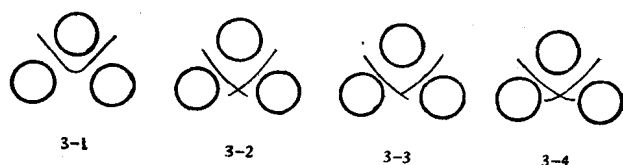


图 1-3 双扩散法中的基本反应图相

双向免疫扩散可分三种类型,即 180° 直线型双向扩散, 90° 直线型双向扩散和辐射型双向扩散(图 1-4)。在这些方法中,沉淀线的位置一般总在孔之间的同一位置出现。这就是说,沉淀线的位置一般只取决于试剂的扩散系数,而非它们的浓度。但当两种试剂之一,例如抗原,其浓度比抗体高得多时,可引起沉淀线在抗体方向增厚,或引起整个沉淀线向抗体方向明显位移;相反亦然(图 1-5)。

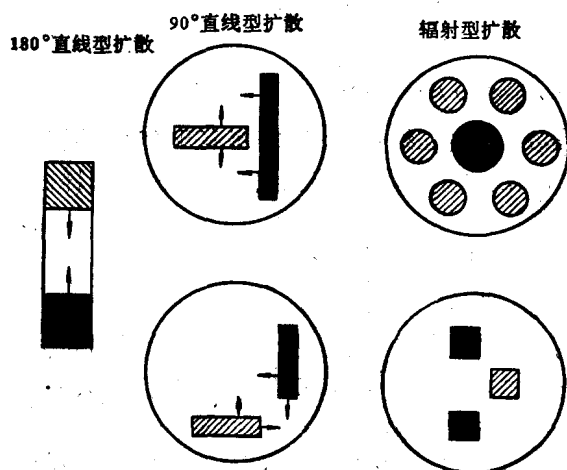


图 1-4 双向免疫扩散: ■ 抗原; ▨ 抗体。

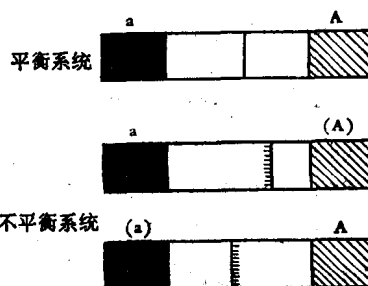


图 1-5 基本沉淀系统: ■ 抗原; ▨ 抗体。(A) 或 (a) 浓度小于 a 或 A。

双向免疫扩散广泛应用于细菌和病毒抗原的研究,也广泛用于某些细菌和病毒病的临床诊断。在人医方面,应用于检查病毒性肝炎患者和供血者的血清中,有无乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B Surface Antigen, 以下简称 HBsAg¹⁾) 存在;也用于检查肝病患者血清中是否有甲胎蛋白存在,以推测有无肝癌的可能。在兽医上,许多国家应用此法检查马传染性贫血病毒病的沉淀抗体,以诊断马传染性贫血病。

双向免疫扩散和单向免疫扩散一样,可以用玻板(包括显微载片)或培养皿进行,也分

1) 关于乙型肝炎抗原的名称,原叫肝炎相关抗原 (HAA, 1965), 后叫乙型肝炎抗原 (HBsAg, 1972)。世界卫生组织推荐: 乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B Surface antigen, HBsAg), 乙型肝炎核芯抗原 (hepatitis B core antigen HBcAg), 乙型肝炎 e 抗原 (hepatitis e antigen, HBeAg); 它们的相应抗体分别是抗-HBs, 抗-HBc 和抗-HBe (Intervirology, 8:65-67, 1977)。

微量法和巨量法两种。在微量法中,每种试剂只需约 0.02 毫升;而在许多巨量法中,所用试剂的量达微量法的 5—10 倍以上。

1. 巨量法

材料

- (1) 1% 琼脂糖或琼脂。[试剂 31]
- (2) PBS, pH7.2, 0.15M。
- (3) 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, 以下简称 BSA) 溶液。[试剂 9]
- (4) 兔抗 BSA 的抗血清。
- (5) 氨基黑或丽春红染料 [试剂 3 或 28] 及 1.0M 醋酸溶液。[试剂 1]
- (6) 塑料或玻璃培养皿 (50 × 12 毫米或 100 × 15 毫米)。
- (7) 吸管、滴管、吸水纸等。

方法

(1) 将培养皿放在一水平面上,注入融化的 1% 琼脂糖 (50 × 12 毫米的用 3 毫升, 100 × 15 毫米的用 12 毫升)。加完后,立即轻轻转动培养皿,使琼脂糖均匀展开后,盖上盖,室温冷凝。

(2) 20 分钟后,将其放入冰箱。使用时取出,按所需要的模型打孔。

(3) 用滴管加入所试验的试剂后,盖上培养皿盖,在室温扩散大约 24 小时。

(4) 借助照明读结果,或用侧面光对黑色背景照相。

(5) 染色: 1) 将培养皿浸在生理盐水中 2—3 天,每天换水 2—3 次。2) 浸洗后,用浸湿的吸水纸贴在凝胶表面(两者之间不要有空气)。3) 放 37℃ 温箱中干燥过夜,并揭去吸水纸片。4) 用 1% 氨基黑或丽春红染色 10—20 分钟。5) 在 1.0M 醋酸中脱色,直到背景变清爽为止。6) 用水冲洗后,干燥保存。

2. 微量法

材料

(1) 覆盖琼脂膜的玻片 (50 × 50 毫米或 50 × 75 毫米): 用蒸馏水配 0.3% 的稀琼脂,取 0.2—0.3 毫升,使其在玻片上展开后,在烘箱或温箱中干燥。

(2) 抗原和抗血清; 1% 琼脂糖或琼脂。[试剂 2]

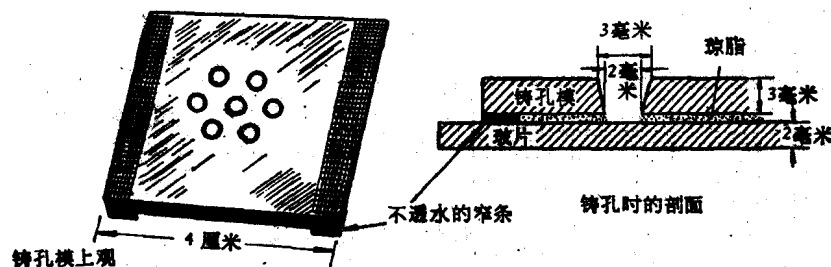


图 1-6 微量双向扩散试验模型的上观和剖面 (Wadsworth)

(3) 聚甲基丙烯酸甲酯制的模型(38 × 40 × 3毫米): 模型上孔的直径,上面是3毫米,底下是2毫米。在模型的反面,沿两边放有2条宽度不超过4毫米的不透水窄条,以提供一个所需深度(0.4—0.8毫米)的空隙(见图1-6)。

(4) 吸管(1.0毫升)和滴管,吸水纸。

(5) 染色液和脱色液(同上)。

方法

(1) 将模型放在覆盖琼脂膜的玻片上。

(2) 用吸管吸取温(50—60℃)琼脂糖,将吸管下口放在模型的敞口边附近,让琼脂糖沿模型的下面流入。另用琼脂糖将模型的两敞口边封闭。在灌注时,如果琼脂糖向上进入孔,最好用片吸水纸从敞口边吸出一些琼脂糖,使孔一致大小。如已冷凝,且只有1个或2个孔进了凝胶,则可用一吸管将其小心吸出,但勿损坏铺底的琼脂膜。

(3) 将制好的凝胶板置一湿盒内。使用前,在室温放置30分钟。

(4) 用滴管加样: 倾斜滴管,使试剂向上流入管内。然后将滴管的下口放到孔底,让试剂向下流入孔内。如形成气泡;则吸去后重加。否则,气泡将阻碍试剂扩散。

(5) 将平板放一湿盒内,置室温孵育1—3天,直到沉淀线出现为止。

(6) 当判定反应完成时,以下述方法去除模型: 1)首先去掉两敞口边的封闭琼脂糖凝胶; 2)用生理盐水冲洗孔; 3)将模型从凝胶表面滑离。

(7) 记录结果或照相。若不作永久保存,可按上述方法洗涤并染色观察。

五、免疫液流泳技术^[4, 15]

在通常的双向免疫扩散沉淀反应中,试剂是通过分子扩散而引起的,只有小部分试剂彼此向着对方扩散,而绝大部分则以不同的方向彼此分离扩散,永远不会相遇。这是这种类型反应敏感性相当低的一个主要原因。

如果设法使两种试剂以较高的比例碰到一起,则反应的效率可以改进。这可以通过电泳输送来进行,但是这只有在抗原和抗体的等电点的pH有明显区别,并且只有在小心选择一种缓冲液,使其具有介于这两个pH之间的pH时才能进行。使两种试剂碰到一起的另一种方法是通过流体动力学输送,这个方法就叫免疫液流泳(immunorheophoresis),它可以在任何pH应用,而且不管抗原和抗体是否有不同的等电点。在所有情况下,可以得到大约增加3倍的效率,即反应的敏感性增加3倍。

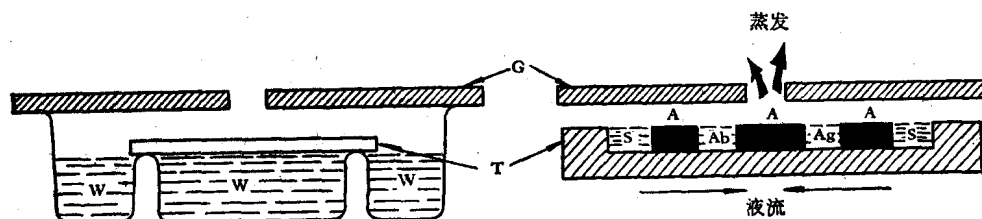


图1-7 单向免疫液流泳装置图解

A: 琼脂; Ab: 抗体孔; Ag: 抗原孔; S: 溶液; T: 载盘;
W: 水; G: 作盖的玻板,在琼脂板中间的上方留有蒸发缝。

这个方法的原理如下：抗原和抗体从各自孔彼此向着对方而进行的流体动力学输送,是通过在将要发生沉淀反应的地方,使水份不断从凝胶中蒸发而得到的。如果在周围提供足够的额外的缓冲液,它通过毛细作用不断流入发生蒸发处的凝胶中,这样便把抗原和抗体带到了一起(图 1-7)。

材料

- (1) PBS, pH 7.2。[试剂 26]
- (2) 人血清白蛋白(human serum albumin, 以下简称 HSA), 0.1%, PBS 配。
- (3) 兔抗 HSA 的抗血清。
- (4) 0.5% 琼脂, 1% 甘油配。[试剂 18]
- (5) 0.05M NaCl; 1% 甘油溶液。
- (6) 塑料免疫电泳盘。
- (7) 金属打孔器, 5 毫米直径。
- (8) 电泳盒、玻板、吸管、滴管等。

方法

(1) 制备 1.5 毫米厚的特殊琼脂凝胶板: 琼脂用 0.05M NaCl 和 1% 甘油(防琼脂干裂)溶液配制。选择 0.05M NaCl 浓度,以致在接近最强蒸发处离子浓度局部稍有增加时,不会产生任何破坏作用。在实践中发现,蒸发处的离子浓度的增加保持在 25% 以下,平均不超过 15%。孔之间蛋白浓度的增加,比 NaCl 浓度的增加要大。毫无疑问,这是由于蛋白与小离子相比,扩散性很低所致。将配好的琼脂在沸水浴中融化后,倒在塑料电泳盘内,静置冷凝。

(2) 冷凝后打孔。孔径 5 毫米,相距 4 毫米。然后在孔的两边,各去掉 2.5 厘米宽的凝胶条,所得到的地方加 0.05M NaCl 和 1% 甘油溶液。孔内分别加抗原和抗体溶液。

(3) 将盘放到一盒内。盒内放 1—2 厘米高的水,以确保盒内高的湿度。

(4) 用两块玻板作盒的盖子,放在距凝胶表面 9 毫米的高度,两块玻板之间留一条 9 毫米宽的窄缝,并使其正好在抗原和抗体孔中间(参看图 1-7)。

(5) 置室温蒸发过夜,观察结果。

六、琼脂凝胶免疫电泳试验^[15]

琼脂凝胶免疫电泳是使蛋白抗原在琼脂或琼脂糖凝胶内,在电场中根据其表面电荷的不同而分开,然后通过双向扩散,分开的蛋白各自与相应的抗血清反应。抗血清应与电泳分开的蛋白平行,并有一定距离(图 1-8)。

反应的结果是出现一系列的沉淀线,一般呈多少有点弯曲的弧形(图 1-9)。在抗原大量过剩的情况下,沉淀线将紧靠含抗血清的横槽出现。如果由于混合物中所含蛋白的迁移率很相似,因而沉淀弧发生重叠时,可在凝胶板上挖一较宽的槽,将抗血清和融化的琼脂或琼脂糖混合后加到槽内,这样有可能将其区分开。

免疫电泳方法对于检查骨髓性假白血病及其它血清蛋白异常患者的血清中,有无异