

免疫荧光技术 讲座

北京协和医院检验科

1992. 1. 20.

46.61
J

将抗体(免疫球蛋白)与抗原或荧光素结合,而不失其抗体(或抗原)活性,成为具有特异性的抗体(或抗原)试剂。当浸染标本中含有特异性的抗原(或抗体)时,就会在抗原和抗体结合部位发出亮绿荧光。依其荧光强度判定加号,阴性则无特异荧光。

目 录

(一) 免疫荧光技术的应用	1—22
(二) 抗核抗体研究进展	22—27
(三) 自身抗体研究进展	27—29
(四) 免疫荧光技术在病毒方面的应用	29—33
(五) 金胺—罗丹明染色法	34

(一) 免疫荧光技术的应用

一、荧光标记技术

【原理】

将抗体(免疫球蛋白)或抗原与荧光色素结合,而不失其抗体(或抗原)活性,成为具有特异性的荧光抗体(或抗原)试剂。当浸染标本中含有特异性的抗原(或抗体)时,就会在抗原和抗体结合部位发出亮绿荧光。依其荧光强度判定加号,阴性则无特异荧光。

常用方法:



直接法



间接法



补体法

【试剂】

人 IgG 抗原

荧光色素 (FITC)

0.5 M PH 9.5 碳酸盐缓冲液

0.01 M PH 7.4 PB

0.01 M PH 7.2 PBS

葡聚糖凝胶 G 25

1% 琼脂扩散板: 4 号琼脂糖 1 g + PH 8.8 巴比妥缓冲液 10 ml

DEAE 纤维素

生理盐水

活卡介苗 7.5 mg / ml

完全佐剂 (羊毛脂 1 份, 液体石蜡 1 份, 卡介苗 3 ~ 5 mg / ml 佐剂)

1% BaCl₂ 试剂, 饱和硫酸铵

【器材】

离心机

磁力搅拌器

透析袋

注射器

层析柱

[方法]

(一) 抗原制备：人血清 IgG 提取（盐析法）

正常人血清 20 ml + 冷生理盐水 20 ml。混合后加 40 ml 饱和硫酸铵（边加边摇）→ 放冰箱 30 分钟 → 离心 4000 转 / 1 分 20 分钟 → 弃掉上清。沉淀加冷生理盐水 20 ml。加饱和硫酸铵 20 ml → 放冰箱 30 分钟 → 离心同上，以下同样操作 2 次，最后一次沉淀用少许冷生理盐水溶解。自来水流水透析 5 分钟，放生理盐水中透析至铵离子完全除掉为止。以上操作需在 4℃ 下进行。此为粗提 IgG。

(二) 纯化 IgG：DEAE 纤维素过柱（DEAE 英国进口分装）。(1) 将已经酸碱处理过的 DEAE 纤维素。用 0.01 M PH 7.4 PB 平衡后装柱，柱床长短和纤维素用量依蛋白量的多少而定。(2) 装柱后继续用 0.01 M PH 7.4 PB 平衡直到上下 PH 一致为止。(3) 加样：待 PB 流至柱床边时，关闭下口，将粗提 IgG 蛋白液慢慢加入。然后打开下口，(4) 洗脱：待蛋白液流至柱床边时，开始加 0.01 M PH 7.4 PB 洗脱。(5) 收集蛋白：用 20% 硫柳酸监视蛋白是否已洗脱下来，当有混浊的蛋白出现，立即开始收集蛋白。继续用 20% 硫柳酸监视无蛋白流出为止。(6) DEAE 纤维素再生：用过的 DEAE 纤维素按碱 (0.5 N NaOH) → 水 → 酸 (0.5 N HCl) → 水 → 碱 (0.5 N NaOH) 顺序抽滤处理直到滤液清晰透明为止。放冰箱待用。

(三) 纯化 IgG 定量测定：将蛋白质溶液稀释适当浓度。用分光光度计 280 nm 读取 OD 值。查标准曲线。或按生化常数计算即：CD 值 1.24 = 1 mg / ml 蛋白。

(四) 蛋白质纯度鉴定：用醋酸纤维膜电泳电流 0.4 ~ 0.8 ml / cm。电压 8 ~ 10 V / cm。一般常用 120 V 35 分钟，电泳结果应当经丽春红染色。观察球蛋白 IgG 的纯度。或用免疫电泳的方法。其结果应当只有 IgG 一条线。

(五) 淋巴结免疫：制备完全佐剂抗原——佐剂 2 ml 加 IgG 抗原 0.1 ml (2.1 mg / ml) 加生理盐水 1.9 ml → 研磨，直到完全乳化为止。免疫方法如下：

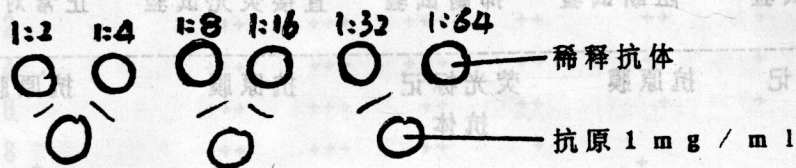
1、将 1800 ~ 2000 克的白色雄兔的两后脚掌皮内注射卡介苗 25 mg。

2、10 天后，兔两后腿窝处淋巴结肿大，将两侧共注射 0.4 ml 完全佐剂抗原。（抗原含量 100 ~ 200 γ）。

3、1 个月后加强水剂抗原 0.5 ~ 1 mg / ml 于腹部皮下注 0.5 ml。

4、10 天后试血：用稀释抗体的方法，效价达 1 : 16 ~ 1 : 32 以上

即可放血。(琼脂扩散法)



(六) 荧光标记:

- 1、按蛋白质浓度 1 / 100 的比例称取异硫氰酸荧光黄 1 mg 溶解在少量 0.5 M PH 9.5 碳酸盐缓冲液。
- 2、将蛋白质溶液放称量瓶中, 在磁力搅半下用 0.05 M PH 9.5 碳酸盐缓冲液调 PH 至 9。
- 3、在搅拌下将溶解的 FITC 加入蛋白质溶液中, 搅拌 18 ~ 20 小时。以上操作需 4℃ 下进行。

(七) 去除游离荧光: 葡聚糖凝胶 G-25 过柱。

- 1、装柱: 将处理好的葡聚糖凝胶 G-25, 按与荧光标记液 6:1 的体积装柱。
- 2、平衡: 用 0.01 M PH 7.2 PBS 平衡上下 PH 一致为止。
- 3、加样: 待缓冲液流至柱床边时关闭下口, 将荧光标记抗体液轻轻的均匀地加入。
- 4、洗脱: 当标记抗体液流完时, 开始加缓冲液。此时肉眼可观察到一条浓的荧光带慢慢与游离荧光分开。
- 5、收集: 因球蛋白分子大, 跑的快, 最先下来的荧光带, 即为所需要的特异荧光标记抗体。

(八) 去除非特异荧光: DEAF 过柱一同前

(九) 特异性鉴定:

吸收试验	阻断试验	抑制试验	直接荧光试验	正常对照	阳性对照
荧光标记 抗体 + 相应抗原	抗原膜 + 未标记的 抗血清 + ANA阳性 血清	荧光标记 抗体 + 未标记的 抗血清	抗原膜 + ANA阳性 血清	抗原膜 + 正常血清	抗原膜 + ANA阳性 血清
↓	↓	↓	↓	↓	↓
染ANA阳性 血清 (-)	荧光标记 抗体染色 (-)	染ANA阳 性血清 (-)	染ANA阳 体染色 (-)	荧光标记 抗体染色 (-)	用荧光标记 抗体染色 (+)

(十) F / P 比测定： 将荧光标记抗体用分光光度计。分别在 280 nm，和 495 nm 测其 OD 值，然后按下列公式计算 F / P 比，可将 OD 值查标准曲线：得出蛋白质浓度，也可按生化常数计算。

即：280 nm OD × 1.24 = 1 mg / ml
495 nm OD × 0.173 = 1 ug / ml

公式：
$$\text{克分子比} = \frac{\text{FITCug/ml} \times 10^{-3}}{\frac{\text{FITC分子量} 389.39}{\text{旦白含量mg/ml}}}$$

分子量 160000

F / P 合适比 1~2

(十一) 棋盘稀释： 将荧光标记抗体作梯度稀释，将 ANA 阳性血清作对倍稀释，然后按下列方法进行试验。

标记抗体\阳性血清 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640

1:2	+++	+++	+++	++	++	+
1:4	+++	+++	+++	++	++	+
1:6	+++	+++	++	++	++	+
1:8	+++	+++	++	+	+	-
1:10	+++	++	+	+		

二、冰冻切片技术

〔原理〕

常用冰冻切片机为水循环半导体制冷切片。温度可达 -40°C ，根据所需抗原的不同，选用不同动物的组织进行切片，作为抗原底物。

〔操作〕

- 1、先打开水使水循环流通。
- 2、打开电源开关，冻台和刀开始制冷。
- 3、将动物的组织剪成 $0.5 \sim 2.0\text{cm}$ 长块放在冻台上。
- 4、当组织冻好后，开始切片，厚度 $4 \sim 5\mu$ 。
- 5、当前部组织薄片翻过在组织块时，用一张洁净玻片，轻轻接近组织薄片，便会贴在玻片上，立即电风扇吹干。
- 6、切好的抗原片要放在有干燥剂的塑料盒内。
- 7、使用时要对着电风扇开盒，以免湿气影响抗原活性。
- 8、关掉切片机时要先关电源，再关水源。

〔注意事项〕

- 1、切片刀要快，特别是切复合片时。
- 2、注意水源：在切片时不能断水，否则会在1分钟内烧掉半导体制冷箱。
- 3、切片时要进刀时推拉要快。

三、石蜡切片脱蜡技术

有些回顾性检查，需要石蜡切片，要脱蜡后荧光染色。

〔方法〕

- 1、石蜡切片前工作同病理科操作。
- 2、石蜡切片厚度 $3 \sim 4\mu$ ：先放 60°C 烘箱将石蜡烘烤化掉。
- 3、将切片放二甲苯中4分钟，取出后再放二甲苯中4分钟（第二缸）。
- 4、取出后放无水乙醇中2分钟 $\rightarrow 90\%$ 乙醇2分钟 $\rightarrow 80\%$ 乙醇2分钟

→ 70%乙醇2分钟。

5、取出切片放PBS中洗10分钟。

6、再放0.1%胰酶和0.1mCaCl₂溶液中消化。时间要根据具体切片而定。

7、放PBS中泡洗30分钟。

8、经过以上处理的脱蜡切片，即可用直接荧光法或间接荧光法染色

[注意事项]

1、石蜡包埋前组织固定液，要用Bonnins固定液固定。

2、胰酶消化时要根据抗原片的性质和切片薄厚，如果很薄不一定都要消化。

3、贴片时，玻片需要事先涂蛋清等载体物质以免脱落。

四、直接荧光染色技术

[原理]

荧光标记抗原或抗体，直接与相对应的抗体和抗原结合，则抗原和抗抗体结合部位发出亮绿的荧光，为特异性结合

[试剂和材料]

1、荧光标记抗体（或抗原）

2、0.01M PH7.2 PBS

3、湿盒

4、泡洗缸

5、荧光显微镜

[方法]

1、抗原底片：从冰箱拿出是，应立即电风扇吹干，无水酒精固定，或丙酮固定，或不固定。要根据不同抗原性质。

2、将与抗原对应的荧光抗体工作液，滴于抗原膜上，放湿盒内，室温或37℃温箱30分钟。

3、用0.01M PH7.2 PBS冲洗15分钟，中间换水三次。

4、凉干，缓冲甘油封片。

5、荧光显微镜观察

[方法特点]

1、免疫荧光直接法，特异性强。

2、只能检一种抗原或抗体。

3、适用于细菌抗原，病毒检查

五、间接荧光染色技术

〔原理〕

间接荧光染色分双层法和夹层法，双层法主要是定位于抗原和鉴定未知抗体。夹层法主要是示踪细胞内的免疫球蛋白，它的关系如下：

双层法：抗原 + 抗体 → 抗原。抗体复合物 + 荧光标记抗体

夹层法：抗体 + 抗原 → 抗体。抗原复合物 + 荧光标记抗体

〔方法〕： 双层法

1、抗原底物，可以是各种动物组织冰冻切片，也可是涂片，也可以是细胞培养（玻片培养）等。从冰箱取出后，必须立即风干。

2、固定：无水乙醇或丙酮，固定5～10分钟。

3、将被检血清用0.01M PH7.2 PBS稀释1:5，滴加在抗原膜上，放湿盒中，室温或37℃30分钟。

4、冲洗：用0.01M PH7.2 PBS冲去抗原膜上的血清，放在PBS冲洗缸内，浸泡冲洗15分钟，中间换两次水。

5、荧光标记抗体染色：将冲洗后的标本片取出，凉潮干，开始滴加荧光标记抗人IgG工作液，放湿盒30分钟。

6、冲洗：同上。

7、凉干后缓冲甘油封片，荧光显微镜观察

〔方法特点〕

1、双抗体的作用：抗体I——病人血清，它可以显示标本内的抗原成分和鉴定未知抗体。同时对第二步的荧光抗体又起抗原作用。抗体II可以与每个未知抗体作用，显示了抗原性的优点，从而加强了实验的敏感性。因为一个抗原单位可以结合很多抗体单位，如果每个抗原单位可结合50个抗体单位，而每个抗体单位又可结合50个荧光抗体单位，则细胞内的抗原是以2500倍的荧光物质显示出来。

2、既可定位和鉴定抗原，还可测未知抗体，这就扩大了免疫荧光技术的应用范围。

〔试剂〕

1、0.01M PH7.2 PB

2、缓冲甘油：优质纯甘油9份加0.01M PH7.2 PBS 1份配成。

3、抗人IgG荧光标记抗体。

4、抗原片

〔方法〕 抗原片

↓
无水乙醇固定3~5分钟，凉干

↓
待测血清1:5稀释(0.01M PH7.2 PBS)

↓
温盒内30分钟(室温或37℃)

↓
0.01M PH7.2 PBS冲洗15分钟，中间换水2次凉干

↓
加荧光标记抗人IgG

↓
放湿盒30分钟(室温或37℃)

↓
冲洗同上

↓
凉干、缓冲甘油封

↓
荧光显微镜观察

〔临床应用〕

间接荧光法的应用较广泛，本室主要应用于自身免疫性疾病的自身抗体检测，如抗核抗体，抗平滑肌抗体，抗线粒体的抗体，抗心肌抗体，抗骨骼肌抗体，抗肾上腺抗体，抗甲状腺抗体，抗着丝点抗体，抗梅毒螺旋体抗体，抗DNA抗体(TE-IF法)，抗胰岛细胞抗体等。

六、细胞培养技术

〔原理〕

细胞在有丝分裂中期，染色体集缩成典型形态，适于做染色体形态和结构的研究。体外培养细胞的技术称细胞培养技术

试剂

1、Eagle培养基：

原液：9.4 g Eagle MEM 加双蒸水（或无离子水）至 1000 ml
→ 8 磅高压消毒 20 分钟（针头排气，高压取出后胶布封住排气口）→ 冷却 4℃
保存。

应用液：将原液中加入 10% (V/V) 的灭活小牛血清；1% (V/V) 的碳酸氢钠调至 PH 7.2~7.4。

2、3 g% 的谷氨酰胺：3 g 谷氨酰胺加双蒸水至 100 ml（如不溶可在 37℃ 水浴内稍微加温），用无菌滤器过滤分装、低温冰箱内保存。

3、NaHCO₃ 溶液：10% NaHCO₃ 双蒸水配制。8 磅 15 分钟高压灭菌，分装，于冰箱内保存。

4、0.25% 胰蛋白酶 (Trypsin) 溶液的配制：(1) 用少量 D-Hank's 液先把胰蛋白酶粉末调成糊状（也可用 PBS 配制）；(2) 补足 D-Hank's 液振荡混匀，置 4℃ 冰箱过夜。(3) 次日胰酶溶解后，用滤纸过滤。(4) 滤液再经玻璃滤器滤过除菌。(5) 分装入小瓶，低温冰箱或普通冰箱保存。(6) 使用时 NaHCO₃ 调至 PH 7.0 左右。

5、Hank's 液应用液：

(1) 10 倍 Hank's 母液配制：
A 液：NaCl 80 g KCl 4 g CaCl₂ 1.4 g MgSO₄ 2 g
去离子水 450 ml

B 液：Na₂HPO₄ 0.6 g KH₂PO₄ 0.6 g 葡萄糖 10 g
无离子水 450 ml

C 液：1% 酚红 16 ml

(2) 方法：依次将上述成分在水中溶解，将 B 液慢慢加入到 A 液中，同时不断搅拌。然后加入 C 液，加离子水到 1000 ml。加压过滤除菌（或 8 磅高压 25~30 分钟，或加氯仿 2 ml），4℃ 贮存。

6、EDTA 消化液配制：乙二胺四乙酸 0.4 g + 无钙镁磷的缓冲液加至 1000 ml。分装高压，4℃ 保存。

7、无钙镁磷的缓冲液 PH 7.3：NaCl 8 g，KCl 0.2 g
Na₂HPO₄ 1.15 g，KH₂PO₄ 0.2 g 加无离子水至 1000 ml。

8、秋水仙氨：配 50 μg/ml。使用时稀释 10 倍 (5 μg/ml)。

9、KCL 低渗液 0.0075 M 1.4 g + 250 ml DW

10、溴化乙啶：10 mg/ml。

11、PLP 固定液：

A 液：0.1 M 盐酸赖氨酸：称 0.45 g 盐酸赖氨酸加 DW 至 25 ml
(可配 8 瓶)。

B 液：0.0375 M 磷酸钠 PH 7.4 称 7.1 g 磷酸钠加 DW 至 500 ml。

C 液：0.5% 多聚甲醛：0.5 g 多聚甲醛加 DW 至 100 ml。水浴加温 60~70℃ 使其大部分溶解，加 1 N NaOH 2~3 滴使溶液变清。分装 10 ml 1 小瓶。

D 液：用 0.0375 M 磷酸钠 (B 液)，稀释 A 液至 0.01 M，即成

250 ml, 分装30 ml小瓶。

应用液: 0.01M 盐酸赖氨酸30 ml + 0.5%多聚甲醛10 ml。
然后加入NaIO₄(0.08 g)到0.01M 即成固定液。

[方法]

HeLa细胞培养: HeLa细胞培养48-72小时, 倒出培养液。加入胰酶消化3-5分钟, 在显微镜下观察, HeLa细胞变成圆形。用吸管轻轻将胰酶吸出, 加入培养液吹打, 使HeLa细胞全部脱落, 加足培养液混匀, 一般情况按1:3传代(一瓶传三瓶)。

七、染色体制备技术:

HeLa细胞培养48-72小时, 换培养液, 加秋水仙氨, 使细胞分裂终止到中期, 其最终浓度0.05 μg/ml (5 ml培养液中加入5 μg/ml浓度的秋水仙氨50 μl)。再培养3-4小时, 倒出培养液加入胰酶2-5分钟, 消化, 吸掉胰酶加入培养液冲洗细胞, 收集细胞离心。去掉上清加入0.075M KCl将细胞打散成悬液, 放室温30分钟。离心2000 rpm/5分钟, 弃上清, 加入甲醇-冰醋酸固定液(3:1)约5-6 ml固定15分, 离心2000 rpm/5分钟, 重复固定2-3次。调整细胞数。甩片, 将细胞滴在冰水预冷的载玻片上, 风扇吹干, 用PLP固定液固定15分钟, 再用PBS洗5分钟, 吹干, 写上标记, 放低温冰箱保存。

八、抗核抗体的细胞培养技术

(一) 细胞培养的制片:

1、HeLa细胞培养2天, 胰酶消化2-5分钟, 吸出胰酶, 加入培养液洗脱, 制成悬液, 调整细胞数。

2、将准备好(已消毒)的载玻片放入消毒好的白磁盒内, 将细胞悬液滴入载玻片。

3、放入培养箱13-24小时, 取出1张玻片镜下观察, 细胞全部贴壁, 部分细胞分裂成棱形。

4、将培养好的细胞玻片, 放入37℃予温的0.01M PH7.4 PBS 30秒×3次。

5、将培养细胞玻片移入用PBS配制的3%甲醛固定液, 固定20分钟(37℃预温)。

6、用PBS洗3次, 每次1分钟。

7、用预冷-10~-20℃的冷丙酮固定7分钟。

8、用PBS洗1分钟×3次, 晾干, -20℃冰箱保存

(二) 培养瓶的消毒:

1、玻璃器皿: 自来水冲洗→洗衣粉洗刷→自来水冲30分钟→控干→酸泡过夜→自来水冲洗10次→蒸馏水漂洗3次→晾干→无菌包装→高压15磅

20分钟。

2、塑料器皿：用清水充分浸泡和冲洗→20%NaOH溶液浸泡过夜→自来水洗3次晾干→紫外线直接照射。

(三) 细胞的冻存与复苏

1、细胞的冻存：消化后的细胞→调整细胞数 $4 \times 10^6 / \text{ml}$ →取消毒好的冷存管加0.2ml高压灭菌甘油→加0.8ml细胞培养液混匀，用胶布封口，写上标记，放 -40°C 冰箱3~4小时→取出，快速放入液氮罐内的液化气中($-80 \sim -100^\circ\text{C}$)约2小时向下放一节，约分3~4次全部放入液氮中(-190°C)。

2、细胞的复苏：从液氮罐中将冻存的细胞取出，马上放 50°C 的水浴中，摆动至全部溶解，无菌倒入已加入培养液的培养瓶中， 37°C 培养箱培养。

九、自身抗体检测

(一) 抗核抗体(ANA)

【原理】病人血清中存在抗细胞核成分的抗体，可以特异的和核抗原成分结合，形成抗原抗体复合物(主要IgG)，再与荧光标记抗人IgG结合，在荧光显微镜下可观察到特异的亮绿荧光为阳性。

【试剂】

0.01M PH7.2 PBS

大白鼠肝组织，或人工培养细胞

【方法】用大白鼠肝冰冻切片或有人工培养细胞做抗原底物，用间接荧光抗体法进行操作

【结果判定】在肝细胞核的位置上出现亮绿荧光为阳性。阴性则无特异荧光。

抗核抗体阳性，由于核抗原成分的不同，所呈现的不同的荧光染色模型，

代表着不同的抗体成分，常见荧光染色模型有以下几种

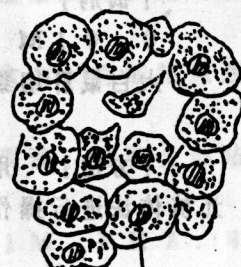
镜下荧光
染色模型

核	材	抗原成分	抗体名称
核膜型	鼠肝、细胞	d s DNA	抗 d s DNA 抗体
均质型	鼠肝、细胞	DNP	抗 DNP 抗体
斑点型	鼠肝、细胞	ENA	抗 ENA 抗体
散点型	鼠肝、细胞	非组蛋白性蛋白质	抗着丝点抗体
核仁型	鼠肝、细胞	RNA, 核小体	抗核小体抗体

抗核抗体阳性时，可进一步作血清对倍稀释。测其抗稀释，测其抗体滴度。

【临床意义】

- 1、正常健康人 1 : 5 稀释为阴性，但高龄老人有时会出现低滴度阳性。
- 2、活动期 SLE 病人 ANA 阳性，阳性率达 100%，非活动期 SLE 病人阳性率可达 80% 以上。
- 3、其它胶原性疾病：硬皮病、皮炎、混合性结缔组织病、弥漫性活动性肝炎等胶原病，可出现 ANA 阳性。



肝细胞核
发荧光

【注意事项】

- 1、抗原片需保存在 2 - 8℃，-40℃ 可保存 1 年。
- 2、抗原片从冰箱中取出时需立即风干。

(二) 抗双股 DNA 抗体 (d s DNA)

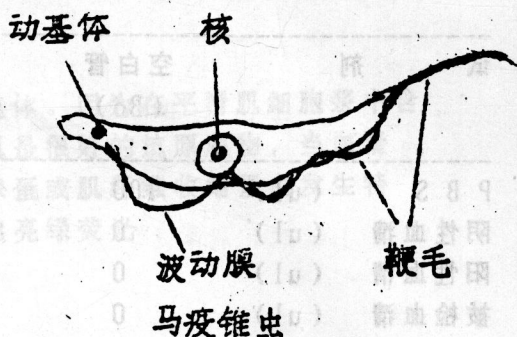
1、间接荧光法——TE-IF法

【原理】马疫锥虫 (简称 TE)，虫体结构中核和动基体是纯双股 DNA，用马疫锥虫作抗原底物，测抗双股 DNA，阳性时可见到核和动基体发出亮

绿荧光。阴性则无。

〔试剂和材料〕

- 1、0.01M PH7.2 PBS
- 2、荧光标记抗人IgG
- 3、马疫锥虫
- 4、湿盒



〔方法〕

- 1、将马疫锥虫接种小白鼠的腹部皮下，4天后，从尾部取一点血在镜下观察，高倍镜每视野30~40条虫子，即可放血制片。
- 2、将虫感染的小白鼠尾部剪断，取血涂成直径0.5×0.5cm大小圆点，晾干。放冰箱待用。
- 3、使用时从冰箱取出必须立即风干，放蒸馏水中30秒~1分钟溶解血红蛋白，晾干。
- 4、以下步骤同。

2、放射免疫法——Farr氏法

〔原理〕 病人血清中存在抗DNA抗体，与¹²⁵I-DNA抗原特异性的结合，生成抗体—¹²⁵I-DNA复合物，可被饱和硫酸胺沉淀。而游离子¹²⁵I-DNA则留在上清中，离心沉淀后被弃掉，而沉淀中的cpm数，标志了血清中抗DNA抗体的浓度

〔试剂和材料〕

- 1、¹²⁵I-DNA试剂盒(401所产品)：冻干制品使用时加10ml PBS溶解，冰箱中保存可稳定1个月。
- 2、PBS：用蒸馏水稀释至50ml，4℃冰箱保存。
- 3、饱和硫酸胺：用蒸馏水30ml加热溶解，温度勿高于90℃，溶后冷至室温备用

[方法]

试 剂	空白管 (Bo)	阴性管 (-)	阳性管 (+)	测定管 (B)
P B S (ul)	100	100	100	100
阴性血清 (ul)	0	20	0	0
阳性血清 (ul)	0	0	20	0
被检血清 (ul)	0	0	0	20
125I-DNA (ul)	100	100	100	100

混和后放 37℃ 水浴中 1 小时

正常人血清 (ul)	20	0	0	0
饱和硫酸胺 (ul)	150	150	150	150

混后测各管总放射性 T (cpm)

离心 20 分钟 (3000rpm), 吸去上清, 测各管沉淀的 CPM

计算公式

$$\text{DNA 结合率} = \frac{B - B_0}{T} \times 100 (\%)$$

[正常值] DNA 抗体结合率 < 20%

[临床意义] 抗 ds DNA 抗体是 SLE 的标记性抗体。ANA 荧光染色模型为核膜型。马疫锥虫法动基体、核、呈亮绿荧光。活动期 SLE, 特别是肾型活动 SLE 抗 ds DNA 抗体为 100% 阳性。非肾型活动期 SLE 病人 ds DNA 抗体阳性率 80% 左右。而非活动期 SLE 病人。ds DNA 抗体阳性率 30% 以下, 其它胶原病则阳性率很低

[注意事项] 放免法 125I-DNA 抗原不纯, 可能含有单链 DNA, 故测定时不如 TE-IF 法

(三) 抗平滑肌抗体 (SMA)

【原理】 抗平滑肌抗体是一种抗肌球蛋白抗体。因为在平滑肌细胞浆中含有丰富的肌球蛋白和肌纤维收缩蛋白。所以平滑肌是很好的抗原底物，当血清中含有抗平滑肌抗体时，就会与平滑肌浆中的肌球蛋白或肌纤维收缩蛋白发生特异性的结合，用间接荧光法可观察到平滑肌浆发出亮绿荧光

【试剂和材料】

1、0.01M PH7.2 PBS

2、荧光标记抗人 IgG

3、大白鼠胃冰冻切片

【方法】

1、病人血清用 PBS 稀释 1:10 倍

2、大白鼠胃冰冻切片抗原片，以无水酒精固定 5 分钟，晾干。

3、将稀释之病人血清滴加在抗原片上。

4、湿盒中室温放置 30 分钟。

5、以下操作同。

【结果判断】

抗平滑肌抗体阳性时，在镜下平滑肌细胞浆发亮绿荧光。1:10 稀释阳性有意义。阴性时平滑肌层与粘膜层一样呈暗绿色荧光

【临床意义】

此抗体为非特异性抗体。当肝炎病人，肝细胞严重亚重损害时，肝细胞胞浆中肌球蛋白和肌纤维收缩蛋白释放到血液中产生抗体。在急慢性肝脏疾病中或其它晚期肿瘤肝细胞受损时，抗平滑肌抗体可呈阳性

(四) 抗胃壁细胞抗体

【原理】 当血清中含抗胃壁细胞抗体时，可与大白鼠胃粘膜层壁细胞发生反应。阳性时壁细胞胞浆呈亮绿荧光

【试剂与方法】 同上。

【结果判断】 阳性时胃壁细胞胞浆发出亮绿荧光。阴性则无荧光出现。

【临床意义】 胃壁细胞抗体阳时，多见于萎缩性胃炎、胃癌等。