

先疾字实验技术讲义

说 明

免疫学实验技术讲义是在1976年下半年全军免疫学学习班所用实验技术讲义的基础上，经重新整理、修改和补充而编成的。

全书共分七个部分，包括基本的和一些较新的实验技术。书中以介绍我校已开展的实验方法为主，但考虑到免疫学实验技术发展很快，我军各单位的情况和需要不同，因此适当地选编了一些新的技术方法，以供部队从事检验和免疫学工作的专业卫生人员，在实际工作中参考之用。

由于我们的政治思想水平不高，在免疫学实验技术方面做的工作很少，参加修编的单位较多，交流又不够，因此本书在内容上势必会有不少缺点及错误，殷切地期望同志们给予批评指正。

免疫学实验技术讲义编写小组

一九七七年九月

C0149176



免疫学实验技术讲义目录

第一部分 免疫电泳技术	(1)
一、基本原理	(1)
二、琼脂免疫电泳	(4)
(一) 实验方法	(4)
(二) 结果判定	(7)
(三) 注意事项	(13)
(四) 附录	(15)
三、醋酸纤维薄膜电泳与免疫电泳	(15)
(一) 实验方法	(16)
(二) 结果判定	(18)
(三) 注意事项	(18)
〔附〕醋酸纤维薄膜的制备法	(18)
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳与免疫电泳	(19)
(一) 实验方法	(21)
(二) 结果判定	(23)
(三) 注意事项	(24)
〔附〕实验用各种试剂配制	(25)
五、对流免疫电泳	(25)
(一) 实验方法	(25)
(二) 结果判定	(27)
(三) 注意事项	(28)

六、单向琼脂免疫电泳（火箭电泳）	（ 28 ）
（一）实验方法	（ 28 ）
（二）结果判定	（ 30 ）
（三）标准曲线制定	（ 30 ）
（四）注意事项	（ 30 ）
七、应用举例——乙型肝炎表面抗原的检测	（ 31 ）
第二部分 免疫球蛋白测定	（ 40 ）
一、免疫球蛋白的提纯	（ 40 ）
（一）血清IgG的提纯	（ 40 ）
（二）初乳中分泌型IgA的提纯	（ 47 ）
二、免疫球蛋白的纯度鉴定	（ 51 ）
（一）琼脂单纯（区带）电泳	（ 52 ）
（二）琼脂双向扩散	（ 54 ）
（三）琼脂免疫电泳	（ 56 ）
（四）聚丙烯酰胺凝胶电泳（圆盘电泳）	（ 58 ）
三、免疫球蛋白定量测定——单向琼脂扩散法	（ 59 ）
（一）标准曲线的制定	（ 60 ）
（二）待检标本的测定	（ 67 ）
〔附〕以未标定抗血清制定标准曲线	（ 68 ）
（三）痰中IgA的定量测定	（ 69 ）
（四）注意事项	（ 70 ）
第三部分 其他体液免疫检测法	（ 73 ）
可凝血球凝集试验——检测脑膜炎球菌抗体	
菌液培养	（ 73 ）
（一）材料	（ 74 ）

(二) 试验方法	(77)
(三) 结果判定标准	(78)
(四) 注意事项	(78)
〔附〕培养基和试剂	(80)
二、反向血球凝集试验	(82)
(一) 基本原理	(82)
(二) 抗体致敏红细胞的制备	(84)
(三) 试验方法和结果判定	(91)
〔附〕常用溶液的配制	(95)
(四) 应用举例——检测脑膜炎球菌抗原	(97)
三、乳胶凝集试验——检测钩端螺旋体抗体	(101)
(一) 聚苯乙烯胶乳的合成	(102)
(二) 钩端螺旋体致敏原的制备	(103)
(三) 胶乳的胰蛋白酶处理	(103)
(四) 胶乳的致敏	(104)
(五) 胶乳抗原的鉴定	(104)
(六) 试验方法	(104)
〔附〕钩体乳凝试验应用情况简介	(106)
四、免疫粘附血凝试验——检测乙型肝炎	
抗原	(107)
(一) 基本原理	(108)
(二) 材料与方法	(109)
(三) 影响因素及注意事项	(113)
〔附〕IAHA的试剂和方法(DTT法)	(116)
五、细菌玻板凝集试验	(118)
(一) 器材和试剂	(119)

(二) 操作方法	(120)
(三) 玻板凝集抗原的制备原则及其滴定	(122)
六、微量补体结合试验	(125)
(一) 材料	(126)
(二) 方法	(126)
(三) 注意事项	(131)
七、人血清总补体量的测定	(133)
(一) 材料	(133)
(二) 试验方法	(134)
(三) 注意事项	(135)
八、微量滴定法	(135)
(一) 基本器材及其使用方法	(136)
(二) 一般操作步骤	(148)
(三) 实验结果及应用范围	(154)
第四部分 细胞免疫检测法	(163)
一、玫瑰花瓣形成试验	(163)
(一) 常量 E—玫瑰花瓣形成试验	(163)
(二) 微量 E—玫瑰花瓣形成试验	(168)
(三) 早期玫瑰花瓣形成试验	(170)
(四) EAC—玫瑰花瓣形成试验	(172)
(五) E 和 EAC 玫瑰花瓣联合试验	(173)
二、淋巴细胞转化试验	(175)
(一) 材料	(176)
(二) 试验方法	(177)
(三) 结果判定	(179)
(四) 注意事项	(181)

〔附〕微量淋巴细胞转化试验·····	(184)
三、巨噬细胞移动抑制试验·····	(185)
(一) 毛细管法 (一步法) ·····	(186)
(二) 平皿法·····	(188)
四、巨噬细胞吞噬试验 (皮泡法) ·····	(189)
(一) 材料·····	(190)
(二) 试验方法·····	(191)
(三) 结果判定·····	(192)
(四) 注意事项·····	(193)
〔附一〕细胞毒性试验 (微量法) ·····	(193)
〔附二〕各种细胞免疫检测法的比较·····	(194)
〔附三〕间接嗜硷细胞脱颗粒试验·····	(195)
第五部分 免疫荧光技术 ·····	(198)
一、免疫荧光技术的原理·····	(198)
(一) 直接法·····	(198)
(二) 间接法·····	(199)
(三) 补体法·····	(200)
二、免疫血清的制备·····	(200)
(一) 免疫血清制备方法·····	(200)
(二) 效价测定方法·····	(204)
三、荧光抗体的制备·····	(204)
(一) 荧光色素·····	(204)
(二) 标记方法·····	(205)
(三) 荧光抗体的鉴定·····	(209)
(四) 荧光抗体的保存·····	(211)
四、荧光抗体染色法·····	(211)

(一) 标本制作·····	(211)
(二) 荧光抗体染色法·····	(211)
(三) 荧光显微镜检查法·····	(215)
五、自身抗体的免疫荧光检查法·····	(218)
(一) 抗核抗体 (或抗核因子) ·····	(219)
(二) 平滑肌自身抗体·····	(222)
(三) 线粒体抗体·····	(223)
(四) 甲状腺球蛋白抗体·····	(224)
(五) 甲状腺微粒体抗体·····	(225)
(六) 抗心肌抗体·····	(225)
六、非特异性染色的消除法·····	(227)
(一) 非特异性染色的主要因素·····	(227)
(二) 消除非特异性染色的方法·····	(228)
〔附〕过氧化物酶标记抗体技术·····	(233)
第六部分 放射免疫技术 ·····	(242)
一、放射免疫饱和分析法·····	(242)
(一) 基本原理·····	(243)
(二) 标记抗原的选用·····	(246)
(三) 抗血清的选择和用量·····	(251)
(四) 分离B、F的方法·····	(255)
(五) 实验举例·····	(259)
二、放射免疫沉淀自显影法·····	(276)
(一) 基本原理和类型·····	(276)
(二) 实验举例·····	(278)
第七部分 有关蛋白质分离的技术 ·····	(287)
一、中性盐 (硫酸铵) 分段沉淀免疫球蛋白·····	(287)

(一) 基本原理及其优缺点·····	(287)
(二) 实验条件和方法·····	(290)
(三) 应用举例·····	(293)
(四) 去盐及浓缩·····	(294)
二、凝胶过滤(凝胶层析)·····	(296)
(一) 基本原理、优点和适用范围·····	(296)
(二) 几种常用层析凝胶的性质·····	(301)
(三) 实验条件的选择·····	(305)
(四) 应用举例·····	(314)
三、离子交换剂层析·····	(316)
(一) 离子交换剂·····	(316)
(二) 基本原理·····	(320)
(三) 实验条件及其选择·····	(327)
(四) 应用举例·····	(343)
四、免疫吸附亲和层析·····	(346)
(一) 基本原理·····	(348)
(二) 免疫吸附剂的几种类型·····	(349)
(三) 实验举例—免疫吸附亲和层析 提纯甲胎蛋白(AFP)·····	(358)

第一部分 免疫电泳技术

免疫电泳是将单纯（区带）电泳与免疫扩散相结合的一项免疫化学技术。通过区带电泳可将一混合物中的各个组分分离，在此基础上，加入相应的抗血清，使之垂直于电泳方向与分离物进行免疫扩散，根据扩散后所形成的沉淀弧线位置及特点，用于研究免疫球蛋白等高分子物质的性质。

根据区带电泳中所用支持物不同，免疫电泳具有各种名称。如纸上免疫电泳、醋酸纤维薄膜免疫电泳，琼脂免疫电泳及聚丙烯酰胺凝胶免疫电泳等，它们各有特点。近年来，由于技术上的不断改进，免疫电泳已在蛋白质化学、抗原与抗体的分析及鉴定，以及临床早期诊断等许多方面得到了广泛地应用。

一、基本原理

带电的胶体颗粒在电场的作用下，定向移动的现象称为电泳。蛋白质分子为一种两性电解质。在一定的 pH 下，其所带的正负电荷相等，叫做等电点。等电点时蛋白质在电场中不移动。当电泳所用缓冲液的 pH 小于蛋白质的等电点时，蛋白质的氨基电离带正电荷向负极泳动；当 pH 大于等电点时，蛋白质的羧基电离带负电荷向正极泳动（见下图）。

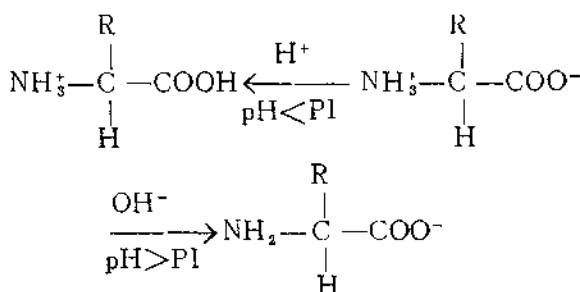


图1.1 不同pH条件下蛋白质解离方向

一般电泳所用缓冲液的 pH 偏于蛋白质等电点的碱侧，故蛋白质带正电荷，在电场作用下向正极泳动。泳动的速度和距离与蛋白质所带负电荷量、电场强度、介质的性质、粘度及温度，以及缓冲液的种类、pH、离子强度等因素有关。电泳时所用支持物，有的并非中性物质，其固相部分具有一些极性集团也带有负电荷，但固相部分不能移动，其液相部分则带正电荷，可向负极移动，造成所谓电渗流(如下图)。因此，电泳后可见拖尾及γ球蛋白部分后移。



图1.2 免疫电泳原理解 (1)

由于上述原因，一混合物中各组分在电泳后，便可依其电泳力与电渗力的不同，而形成不同的区带，使各组分分布

于支持物的不同位置上，在加入相应抗血清免疫扩散后，便可在最适比例处形成数条沉淀弧线。每一条沉淀弧线，即代表一对抗原、抗体反应。并由于抗原（混合物中各组分）向四周扩散，而抗体则为垂直扩散，故沉淀弧线呈弯曲弧形（见下图）。

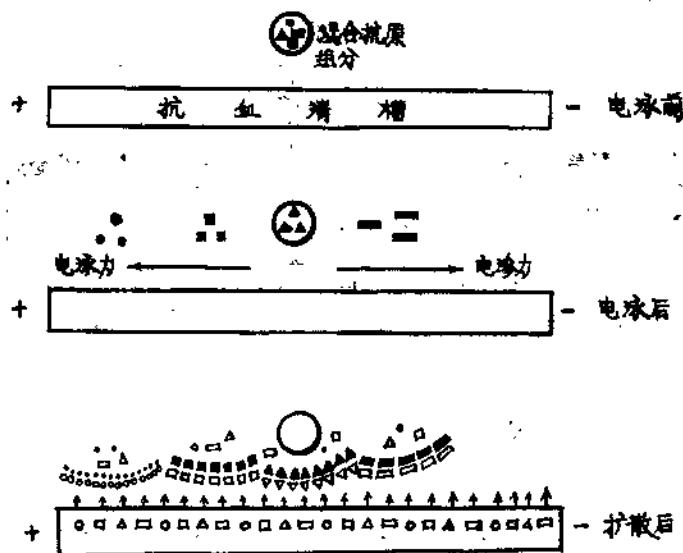


图1.3 免疫电泳原理图解 (2)

免疫电泳一般具有分辨力与特异性高，样品用量少等优点，但所分析的样品必须具有抗原性（至少是半抗原），抗血清应包括与抗原混合物中相应的全部抗体，否则所形成的沉淀弧线将不完全。

二、琼脂免疫电泳

琼脂免疫电泳是以琼脂凝胶作为支持物，将琼脂区带电泳与琼脂双向扩散结合起来，用于分析抗原或抗体的一种免疫学定性试验。在免疫电泳技术中，琼脂免疫电泳为应用较早和最广泛的一种方法。它具有取材方便、操作简单、结果稳定等优点。但琼脂为一种多聚糖，由琼脂糖（占80%）及琼脂果胶所组成。前者是由半乳糖及其衍生物所构成的中性物质，性质较稳定，后者是含硫酸及羧酸多糖的带电基团，在电泳中有引起电渗现象的缺点。

琼脂免疫电泳分为常量法与微量法两种。后者操作过程需时短，灵敏度高，节约样品与抗血清，目前常用于蛋白质的定性。

（一）实验方法

1. 全量法

（1）制备琼脂玻板：选一水平桌面，将 $5 \times 7.5\text{cm}$ （或按要求选择合适规格）洁净玻板放于桌面。于玻板上平行放置两根细玻棒（ $3 \times 65\text{mm}$ ），各距玻板边缘 1.5cm 。然后以1.5%融化的巴比妥缓冲琼脂（ 0.03M pH8.6 巴比妥缓冲液配）浇板。每块约需琼脂 7ml 。待琼脂凝固后，放于湿盒内置 $4-10^\circ\text{C}$ 保存备用。

（2）打孔、加样：将琼脂板放于方格座标纸上，按下图所示打孔3个，孔径 3mm ，孔距细玻棒 0.5cm 。为便于展示免疫球蛋白，孔的位置以在玻板长度的 $1/3$ 处为宜。于

中间孔中加入分析样品，上、下两孔中分别加入各种对照样品。加样量至孔满与琼脂板面相齐平，或每孔中加样10微升。

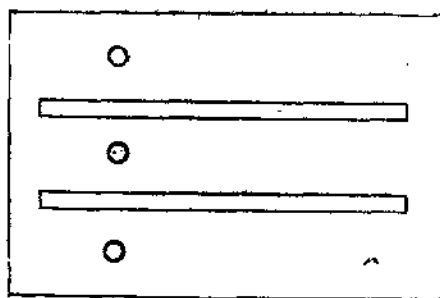


图1.4 琼脂免疫电泳全量法琼脂板

(3) 电泳跑样：于电泳槽内倒入0.06M pH 8.6

巴比妥缓冲液，液面相平。将琼脂板置于电泳槽的横梁上，板的两端以双层滤纸搭桥，即滤纸一端联接琼脂板，另一端浸于电泳槽的缓冲液内。于加样品端联接电泳仪的负极，另一端联接正极，接通电流。琼脂板电势梯度为5—6 V/cm，或电流强度4mA/cm，电泳1.5—2小时，关闭电源，取出琼脂板。

(4) 免疫扩散：以特制的挖槽刀或普通刮脸刀片，沿琼脂板上细玻璃棒边缘轻轻划开琼脂，用镊子取出细玻璃棒，即成两个横槽。于横槽底部薄薄浇一层0.5%无离子琼脂封底，即以滴管吸取融化琼脂，趁热由槽的一端至另一端，边挤边迅速移动滴管。然后再自横槽一端以毛细滴管连续滴入抗血清至横槽满。将琼脂板置湿盒内，加盖，于室温下扩散24—48小时，观察结果。湿盒内应放有湿纱布，布上可滴加几滴0.5%石炭酸防腐。

(5) 染色处理：染色处理的目的是：①利用待检物的生物学活性或特殊染色反应，作定性鉴定；②染色后标本可直接印机，且图谱质量高。其操作步骤如下：

①漂洗：将琼脂板浸泡于生理盐水中1—2天，换液2—3次，以洗去琼脂板上未起沉淀反应的残余蛋白质。然后以蒸馏水浸泡1—2小时。

②干燥：取出琼脂板，于板面覆盖一块与玻板等大的湿滤纸片，以吸去琼脂凝胶内的液体及盐分，防止盐分结晶析出。置于37℃过夜，干燥。干后，以蒸馏水打湿滤纸片并轻轻揭去。稍用水冲洗后，晾干，即可进行染色。

③染色：将已干燥的琼脂板浸于0.5%氨基黑10B染液中，浸染15分钟，取出，再泡于7%冰醋酸脱色液中，换液2—3次，脱至背底无色为止。脱色后，可将琼脂板上滴加少量5%甘油，置37℃干燥后保存。如欲长期保存时，可于干燥前，将琼脂板浸泡于10%甘油中，然后烘干，取下琼脂薄膜染色后保存之。

2. 微量法

本法的操作步骤及原则同全量法。下面简要说明其不同之处。

(1) 制备琼脂玻板：一般采用普通载玻片(2.5×7.5cm)。于玻片中央平行放置1根细玻棒，每块琼脂玻片浇融化琼脂约2ml，厚度1cm左右。

(2) 打孔、

加样：待琼脂凝固后，于细玻棒两侧各打孔1个，孔径2mm，孔与细玻棒相距0.4mm(见下图)。于上、下孔

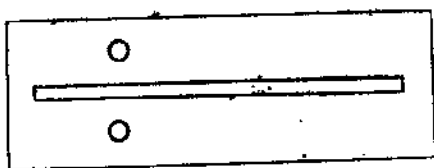


图1.5 琼脂免疫电泳微量法琼脂板

中分别加入分析样品与对照样品至孔满，或于每孔中加入样品 1—5 微升。

(3) 电泳跑样：电泳条件：电压 6V/cm，电流强度 0.6—4 mA/cm，泳动 1—2 小时，可展开 5—7 cm。

(4) 免疫扩散：以挖槽刀或刮脸刀片取出细玻棒，横槽封底，加入相应抗血清 0.2ml，置湿盒内 37℃ 扩散 24 小时，观察结果。

(5) 染色处理：同全量法。

(二) 结果判定

可以从下面三个方面进行分析与判定：

1. 免疫学特异性：对一个混合样品免疫电泳后所显示的沉淀弧线，主要靠特异性沉淀反应来判定。因为只有与特异性抗体起反应的那些抗原组分才能显示出来。因此，一个混合物中所含抗原的数目(组分)，可以用不同的沉淀弧线来判定。

(1) 常见的沉淀弧线及其特征：

数目：免疫电泳后，所出现的沉淀弧线的数目，常较待检样品中实际所含抗原的组分为少。这是因为：①抗原、抗体反应需达最低限量时，才能出现沉淀弧线。如少于此最低限量，则不能形成沉淀弧线。②抗血清中的抗体谱往往包括不齐全，因此可造成某些沉淀弧线的缺如。③抗原、抗体的比例不合适时，可不形成可见的沉淀弧线，或使已形成的沉淀弧线很快发生弥散、溶解、消失。④沉淀弧线间可能发生相互遮盖或抑制、干扰。

位置：沉淀弧线的位置包括：①各抗原组分本身的电泳迁移率。在电泳条件恒定，抗原的性质及浓度不变的情况下

下，其电泳迁移位置也较固定。这可通过查阅各种血清蛋白质电泳迁移率表，或将待检抗原与相应标准抗原同时作免疫电泳来比较确定。②沉淀弧线与抗血清槽间的距离。这与抗原、抗体的比例，抗原的分子量及其扩散系数有关。若沉淀弧线远离抗血清槽时，表明该抗原扩散慢，或因其分子量大，或被琼脂凝胶阻留所致。反之，如沉淀弧线靠近抗血清槽时，说明抗原的扩散系数大，或抗原、抗体的比例悬殊。在抗原过量时，弧线常接近抗血清槽，抗原量过少或抗体量过大时，则弧线远离抗血清槽。

形态：沉淀弧线的数目与清晰度，随抗原、抗体的比例而不同。弧线细清晰者，表明抗原、抗体的比例接近等价带；弧线界限不清者，可能系抗原或抗体过量。沉淀弧线的形态，常见者有以下几种（见下图）。

弧 形 态	注 释
交 叉	两种抗原的泳动性不同，但差异性不大。
平 行 	两种抗原的泳动性相同，但扩散率不同。
菜 碟 状 	弧线中部加宽、弥散，并接近抗血清槽，呈菜碟状，一般系抗原过量所致。
分 叉 	弧线末端逐渐弥散分叉，或中部逐渐加宽、弥散、溶解及分裂成双线。一般也系抗原过量所致。
过 弯 	抗原的扩散率低。
平 坦 	抗原的扩散率较高，且扩散速度较快。

图1.6 常见沉淀弧线及特征