



卫生部“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校配套教材
供医学检验专业用

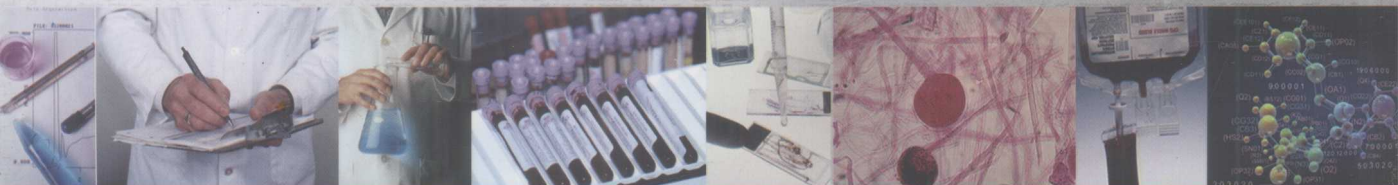
临床免疫学检验 实验指导

第4版

主编 刘辉



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE





《临床免疫学检验》
《临床免疫学检验》

主编：王卫华
副主编：王卫华、王卫华

临床免疫学检验 实验指导

第2版

王卫华 主编

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版

第2版



卫生部“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校配套教材
供医学检验专业用

临床免疫学检验 实验指导

第4版

主 编 刘 辉

副主编 陶志华

编 者 (以姓氏笔画为序)

王雪松 (北华大学医学检验学院)

陈 敏 (福建医科大学)

刘 辉 (大连医科大学)

邵启祥 (江苏大学基础医学与医学技术学院)

李 妍 (吉林医药学院)

武永康 (四川大学华西临床医学院)

李会强 (天津医科大学)

徐 霞 (广州医学院)

杨红英 (昆明医学院)

陶志华 (温州医学院)

吴 超 (第三军医大学)

裘宇容 (南方医科大学)

张文玲 (中南大学湘雅医学院)

学术秘书 李 妍 (吉林医药学院)

 人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

临床免疫学检验实验指导/刘辉主编. —4 版. —北京:
人民卫生出版社, 2011. 12
ISBN 978-7-117-15103-0

I. ①临… II. ①刘… III. ①临床医学—免疫学—
实验—医学院校—教学参考资料 IV. ①R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 234633 号

门户网: www.pmph.com 出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com 护士、医师、药师、中 医 师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

临床免疫学检验实验指导 第 4 版

主 编: 刘 辉

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830
010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京市卫顺印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 9 插页: 1

字 数: 219 千字

版 次: 1999 年 7 月第 1 版 2011 年 12 月第 4 版第 21 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-15103-0/R·15104

定价(含光盘): 24.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前 言

本书是由卫生部教材办公室统一组织编写的系列实验教材之一,供医学检验专业本科和专科使用。与前一版相比,本书增加了临床免疫章节的实验内容,使之能更好地与理论教材配合使用。同时针对各单元的实验内容编写了PPT光盘附于书后,与本书配合使用,使有关实验特别是临床免疫相关的实验能够在PPT的辅助下进行。应当强调的是,实验教学是引领学生进行感性认识的教学环节,因此,我们仍然主张让学生多做实验或亲自到临床实验室中见习,了解新技术、新方法。为此,本书还增加了临床见习的内容,这些内容也是临床实验室实习的要点,因此,本书也可以在临床实验室实习中参考使用。

本书每个单元设有验证型实验、设计型实验和临床实验室(检验科)见习等内容;免疫技术部分设有单元专题讨论,临床免疫部分编写了病案讨论。验证型实验主要在基础学习阶段进行,以达到验证理论和培养技能的目的;设计型实验要求利用基本的理论和实验知识以解决和验证某一具体的科学问题为目的进行实验设计,是一个主动的实验探索过程,可以采用讨论的方式完成,更鼓励在实验室实施设计的实验。单元专题讨论旨在与理论教材配合,通过理论课和实验课的学习,启发学生提出有关问题,以及解决这些问题可采取的措施。该部分将引领学生摄取某一领域前沿知识与技术,建议在实验的间隙组织学生分组学习、讨论,发挥小班授课的优势,弥补大班授课的不足。为方便学习,书后附有单元讨论提示,需要注意的是讨论提示并不是讨论题的唯一答案。实验课中的病案讨论是一种案例教学,要求讨论的病例具有真实性和典型性,书中所给出的病例全部是真实的典型病例。

本书的编者全部来自教学一线,大多具有临床实验室工作经历,有多位是医院检验科主任,具有丰富的教学和实践经验,主张针对当前免疫学检验的热点问题选择和设计实验,这在他们撰写的章节中很好地体现出来。本书主要的参考书是《临床免疫学与检验实验指导》(第3版)和《全国临床检验操作规程》(第3版),在此向两本书的作者表示衷心感谢。免疫学理论和技术的发展日新月异,教育改革也在不断深入进行,限于编者的认识水平,本书会有缺点和不足,希望广大师生对本书提出宝贵意见。

刘 辉

2011年10月

目 录

第一单元 抗体制备技术	1
实验一 免疫血清——多克隆抗体的制备技术.....	1
实验二 单克隆抗体的制备.....	4
实验三 酶标记抗体的制备.....	6
单元讨论 新型抗体制备的途径和策略.....	8
第二单元 免疫沉淀类实验	9
验证实验一 双向免疫扩散试验.....	9
验证实验二 单向免疫扩散试验.....	10
验证实验三 对流免疫电泳.....	11
设计实验 抗原物质的变化及性质分析.....	13
临床见习 免疫比浊分析系统.....	13
单元讨论 免疫沉淀类实验的发展.....	17
第三单元 免疫凝集类实验	18
验证实验一 直接凝集试验.....	18
验证实验二 间接凝集试验.....	20
验证实验三 间接凝集抑制试验.....	21
设计实验 不完全抗体检测的实验设计.....	22
临床见习 免疫凝集分析系统——全自动血型分析系统.....	22
单元讨论 免疫凝集类实验的发展趋势.....	26
第四单元 酶免疫检测技术	27
验证实验一 酶联免疫吸附试验.....	27
验证实验二 酶免疫组织化学染色技术.....	29
设计实验一 酶联免疫试剂盒的研制.....	30
设计实验二 酶联免疫试剂盒的评价体系.....	31
设计实验三 定量酶免疫分析中标准曲线数学模型的建立.....	33
临床见习 全自动酶联免疫分析仪.....	36
单元讨论 根据待测物质特性选择酶联免疫试验的类型.....	40

第五单元 细胞免疫和非特异免疫功能检测技术	41
验证实验一 外周血单个核细胞的分离.....	41
验证实验二 T淋巴细胞转化试验.....	42
验证实验三 细胞吞噬率与吞噬指数测定.....	45
验证实验四 血清总补体活性测定.....	47
设计实验 白细胞杀菌能力测定.....	49
临床见习 流式细胞分析系统.....	50
单元讨论 细胞免疫检测技术的现状及发展.....	52
第六单元 感染性疾病的免疫学检测	53
实验一 乙型肝炎病毒表面抗体检测.....	53
实验二 HBsAg 不同检测方法的最低检测限验证实验.....	54
实验三 抗链球菌溶血素“O”检测.....	57
实验四 梅毒螺旋体抗体检测.....	59
实验五 人类巨细胞病毒抗体 IgM 检测.....	61
临床见习 临床感染免疫学检测项目、实验操作、技术优势与存在问题.....	63
病案讨论 感染性疾病.....	63
第七单元 超敏反应性疾病的免疫学检测	65
实验一 血清 IgE 的检测.....	65
实验二 红细胞表面不完全抗体的检测.....	67
实验三 循环免疫复合物的检测.....	70
临床见习 临床常用超敏反应性疾病免疫学检测项目与临床应用.....	71
病案讨论 超敏反应性疾病.....	71
第八单元 自身免疫性疾病的免疫学检测	73
实验一 抗核抗体检测.....	73
实验二 可提取性核抗原抗体谱检测.....	75
实验三 抗双链 DNA 抗体检测.....	77
实验四 抗环瓜氨酸肽抗体检测.....	78
临床见习 荧光免疫显微镜技术.....	80
病案讨论 自身免疫性疾病.....	82
第九单元 免疫增殖性疾病的免疫学检验	84
实验一 血清免疫固定电泳实验.....	84
实验二 血清 IgG 定量检测的可报告范围评价实验.....	86
临床见习 临床用于免疫增殖性疾病免疫学检测的设备、项目与临床意义.....	88
病案讨论 免疫增殖性疾病.....	89

目 录

第十单元 免疫缺陷性疾病的免疫学检测	90
实验一 人类免疫缺陷病毒抗体初筛实验.....	90
实验二 人类免疫缺陷病毒确证实验.....	91
实验三 T细胞亚群的流式细胞仪检测.....	93
临床见习 人类免疫缺陷病毒抗体初筛试验.....	96
病案讨论 免疫缺陷性疾病.....	99
第十一单元 肿瘤免疫学检验	100
实验一 化学发光免疫技术检测血清甲胎蛋白参考区间建立实验.....	100
实验二 血清前列腺特异性抗原诊断前列腺癌的性能评价实验.....	101
临床见习 肿瘤标志物检测新指标新技术.....	102
病案讨论 肿瘤免疫学检测.....	103
第十二单元 移植免疫学检测	104
实验一 微量淋巴细胞交叉毒试验.....	104
实验二 群体反应性抗体检测.....	106
临床见习 化学发光免疫技术——全血环孢素浓度检测.....	108
病案讨论 器官移植中的免疫学问题.....	110
第十三单元 综合型实验	112
综合实验一 酶联免疫吸附试验检测伤寒O抗体方法的建立.....	112
综合实验二 机体免疫功能评估.....	115
综合实验三 科研设计——免疫相关疾病的实验诊断.....	120
单元讨论 评价机体免疫状态免疫评估指标的选择.....	124
附录	
附录一 本书实验常用试剂及配制方法.....	125
附录二 本书有关实验指标参考范围.....	130
附录三 本书单元讨论与病案讨论提示.....	132

抗体是由抗原刺激机体免疫系统,免疫系统在识别抗原的B细胞表位后,针对B细胞表位产生的,并能与之结合发挥生物学作用的免疫球蛋白。天然抗原通常是由多个抗原决定簇组成的,一个抗原决定簇刺激机体后,通常由一个B淋巴细胞克隆接受该抗原决定簇所产生的抗体称之为单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)。若由多种抗原决定簇刺激机体,相应地就活化多个B淋巴细胞克隆,产生多个McAb的混合物,为多克隆抗体;因抗体大多数存在于血清或其他体液中,因此在抗体纯化前我们称之为免疫血清,而利用抗体进行的实验被称为血清学试验,抗体介导的免疫也称为体液免疫。

抗体是最早应用于免疫学诊断的生物制剂,是免疫学诊断技术重要的基本工具,对疾病的免疫学诊断具有重要意义。因此,抗体制备技术是医学检验专业的学生必须掌握的基本技能。

实验一 免疫血清——多克隆抗体的制备技术

多克隆抗体是针对多个表位产生的抗体,因此在免疫学诊断中有可能出现交叉反应,但是由于多克隆抗体具有很好的亲合力,并且针对多个表位,因此其在免疫学检测中具有很好的灵敏度,因此目前仍然有许多试剂中使用多克隆抗体,甚至一些治疗性抗体仍然采用多克隆抗体,如精制抗破伤风抗体。本实验以制备抗伤寒沙门菌(颗粒性抗原)菌体和鞭毛抗原以及人IgG(可溶性抗原)抗体为例,进行抗体制备的实验。

【实验原理】

抗体的制备原理就是根据机体免疫应答的基本理论,在体外制备相应的抗原,通过免疫动物而获得相应的高亲合力抗体。

【试剂与器材】

1. 菌种 伤寒沙门菌 O901 和伤寒沙门菌 H901 菌株。
2. 动物 体重在 2.5kg 左右的健康青年新西兰家兔。
3. 培养基 细菌普通肉汤培养基、细菌普通固体培养基。
4. 试剂 人 IgG、羊毛脂、石蜡油、注射用卡介苗、二甲苯、无菌生理盐水、0.5% 无菌甲醛盐水、0.5% 无菌石炭酸盐水、2% 叠氮钠(NaN_3)和 3% 戊巴比妥钠等。
5. 器械 细菌接种环、16 号钢质注射针头(或 7 号留置针)、注射器三通阀、5ml 无菌玻璃注射器、兔子固定架,灭菌三角烧瓶(200ml)和烧杯(200ml)、平皿(直径 9cm)等。

6. 其他 酒精棉、脱脂棉、塑料放血管、纱布、800ml 细菌培养用克氏培养瓶，标准麦氏比浊管和 50ml 圆底离心管或 100~500ml 细菌离心瓶。

7. 仪器 37℃ 恒温培养箱、37℃ 恒温气浴（或水浴）摇床、低温高速大容量离心机（水平并适配 50ml 离心管的转子）。

【操作方法】

1. 菌液（颗粒性抗原）的制备

(1) O901 菌液的制备：将实验室保存的伤寒沙门菌 O901 菌株复苏，经鉴定后，传代于普通固体培养基上（直径 9cm 平皿）。37℃ 恒温培养 18~24 小时后用无菌生理盐水洗涤细菌，接种于预先制备的克氏培养瓶（普通固体培养基）中，摇匀，使得菌液正好铺满整个固体培养基表面。37℃ 培养 18~24 小时后，用无菌 0.5% 石炭酸盐水（具有灭菌作用）将菌苔洗下，分装于 100~500ml 无菌三角烧瓶中，置 37℃ 恒温摇床，250r/min 过夜。第二天用接种环取少量菌液，接种固体培养基，经 37℃ 培养 18~24 小时后，如未见细菌生长，即可使用。将菌液分装于 50ml 圆底离心管或 100~500ml 离心瓶。5000r/min 离心 5 分钟收集细菌，4℃ 储存备用。

(2) H901 菌液的制备：将实验室保存的伤寒沙门菌 H901 菌株复苏，按照上述方法扩增细菌，用无菌甲醛生理盐水洗下菌苔，同制备 O901 菌液一样进行细菌灭活鉴定，如无细菌生长，即可收集细菌，4℃ 备用。

(3) 麦氏比浊管的配制和应用：先分别配制 1% 硫酸溶液及 1% 氯化钡溶液，然后取质地和大小均一的中号试管 10 支，按表 1-1 所示配制比浊液，用乙醇喷灯封口，标明管号码。将备用的菌液在与比浊管相同的中号管中按一定比例稀释，然后与三个浊度接近的标准比浊管相比较，观察其浊度最接近哪一管，最后将比浊管相当的菌数乘以稀释倍数即得每毫升中所含细菌的数量。

表 1-1 麦氏比浊管的配制方法

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% BaCl ₂ (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1% H ₂ SO ₄ (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
相当细菌数 (10 ⁹ /ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

(4) O901 和 H901 菌液应用液的制备：将准备好的菌液按照麦氏比浊管比色，将菌液用无菌生理盐水稀释至浓度为 1 × 10⁹/ml。在菌液中加入适量的甲醛使其终浓度为 0.25%（有利于长期），保存于 4℃ 冰箱（一般不超过 1 年）。

2. 颗粒性抗原（O901 和 H901 菌液）免疫家兔

(1) 由家兔的耳静脉采血 2ml，分离血清。取其中一半与 O901 和 H901 菌液分别按第三单元实验一的方法作凝集试验，观察有无天然抗体。如不凝集或凝集效价很低，说明动物适宜制备抗体。余下的血清作为阴性对照血清。

(2) 将稀释后的 O901 和 H901 菌液 (1 × 10⁹/ml) 按表 1-2 进行家兔耳缘静脉注射免疫。

表 1-2 家兔 O901 和 H901 菌液抗原免疫程序

免疫程序	第 1 天	第 5 天	第 10 天	第 15 天	第 20 天
免疫剂量	0.5ml	1ml	1.5ml	2ml	2.5ml

(3) 第5次免疫7天后,自家兔耳静脉采血1ml,分离血清。与对应的免疫用菌液作试管凝集试验,如凝集效价 $\geq 1:2560$,即为免疫成功。若效价远低于 $1:2560$,则还需要继续免疫1~2次,直至达到理想效价。

3. 可溶性抗原(人IgG)免疫家兔

(1) 不完全弗氏佐剂的制备:将羊毛脂与液体石蜡按1:5比例混合,高压灭菌。冬天时液体石蜡可适当多些;夏天时羊毛脂可适当增加。

(2) 弗氏完全佐剂的制备(含人IgG):将灭菌的不完全弗氏佐剂一份加等体积的溶有卡介苗(3~4mg/ml)的抗原(IgG)混匀,吸入5ml玻璃注射器。用三通阀将该注射器和另一相同的注射器相连,反复推捻,充分混合各成分形成乳剂。当乳剂滴入清水中不扩散时,说明佐剂和抗原已经形成油包水状态,可用于免疫动物。

(3) 免疫家兔:采用背部皮下多点注射,每点注射抗原0.1ml左右。首次免疫抗原剂量为200~1000 μ g,加强免疫为50~100 μ g。首次免疫与二次免疫间隔时间为3~4周,具体免疫程序见表1-3。第三次免疫后5~7天,经家兔耳缘静脉采血,按照第二单元实验一的方法进行双向扩散试验,如双扩效价 $\geq 1:32$,即为免疫成功。若效价远低于 $1:16$,则还需要继续免疫1~2次,直至达到理想效价为止。

表 1-3 家兔人 IgG 抗原免疫程序

免疫程序	第1周	第3周	第4周	第5周
免疫剂量	0.5ml	1ml	1.5ml	2ml

4. 免疫血清的采集与保存 家兔采血常用的方法有三种:①耳缘静脉或耳中央动脉采血;②心脏采血;③颈动脉采血。家兔在采血过程中必须以3%戊巴比妥钠注射液按0.1ml/100g行腹腔注射麻醉。三种采血的方法均有优缺点。耳动脉采血获得的血量中等,一般每只家兔可以采到50ml,但是可以反复采血;心脏采血可以采得较多的血量,大约为70~80ml,但技术要求较高,也容易发生心包压塞而导致家兔死亡;颈动脉采血获得的血量最多,大概可以获得100~150ml左右,但是不能反复采血。本书以耳动脉采血为例进行实验。

耳中央动脉采血:将麻醉后的家兔固定于兔台架,剪去耳中央动脉边缘的兔毛,用二甲苯涂抹耳廓,使耳中央动脉血管充分扩张、充血。用肝素浸泡的16号无菌针头(也可采用7号留置针)插入扩张的耳中央动脉,每次可收集30~50ml血液。最后用无菌干棉球压迫止血,此法可反复多次放血。

将无菌收集的血液置于室温下1小时左右,凝固后,置4℃冰箱过夜,充分析出血清,4000r/min离心10分钟,在无菌条件,吸出血清,加叠氮钠或硫柳汞($C_9H_9O_2HgNaS$)至终浓度0.01%(W/V)防腐,置4℃保存备用,或用于进一步纯化IgG。如需长期保存,可用0.45 μ m滤膜过滤除菌,-80℃保存,也可将抗血清冷冻干燥后保存。

5. 抗体的鉴定 抗体的鉴定主要包括抗体效价、特异性、亲合力等方面的评价。本实验不进行深入的抗体鉴定,主要进行效价测定。

(1) 效价测定:免疫血清的效价是指血清中所含抗体的浓度或含量,可以用相对效价或者绝对定量。测定效价的方法很多,包括试管凝集反应、琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验和间接荧光标记检测等。具体方法参见第二、第三和第四单元,本单元不再赘述。

(2) 特异性鉴定: 抗体的特异性是指抗体对相应的抗原及结构相似的抗原的识别能力, 以交叉反应率来表示。交叉反应率用竞争抑制曲线来判断。特异性的鉴定通常以不同浓度的抗原和相似抗原物质分别与抗体做竞争抑制试验, 计算各自的结合率(B/T 或 B/B₀), 求出各自在半抑制浓度(IC₅₀)时的浓度, 按下列公式计算交叉反应率: $S = y/Z \times 100\%$ (S: 交叉反应率, y: IC₅₀ 时抗原浓度, Z: IC₅₀ 时近似抗原物质的浓度)。

(3) 亲合力测定: 亲合力是指抗体与抗原结合的强度, 常以亲合常数 K 表示。K 的单位是升/摩尔(L/mol), 通常 K 的范围在 $10^8 \sim 10^{10}$ L/mol。抗体亲和力的测定对抗体的筛选、确定抗体的用途、验证抗体的均一性等均有重要意义。

【结果判断】

通过试血、采血与分离血清以及凝集实验或双向扩散, 可分别观察 O901、H901 菌液或人 IgG 与相应的免疫血清是否出现凝集反应或沉淀反应, 如果效价分别 $\geq 1:2560$ 和 $\geq 1:32$ 说明免疫比较成功。具体的凝集反应和沉淀反应结果的判读请参考本书第二和第三单元相关内容。

【实验讨论】

颗粒性抗原的抗血清制备比较简单, 而且获得的免疫血清效价高。可溶性抗原的免疫血清制备相对困难, 经常会出现效价不高的问题。原因首先可能与抗原和佐剂没有达到油包水的理想状态, 导致免疫效果不佳有关。其次是免疫程序不合理, 有的实验室采用每周注射抗原免疫的方法来免疫, 动物体内产生的抗体与注射的抗原相结合, 导致抗原被清除, 而达不到免疫效果。如果免疫效果不好, 可以采用足垫免疫的方法: 首次将含佐剂的抗原在家兔的两个足垫中注射各 0.1ml (也可以单独注射卡介苗); 大概 1 周以后, 在家兔肿大的腋窝淋巴结内各注射 0.1ml 抗原 (不含卡介苗的佐剂); 第三次免疫可以与第二次免疫间隔 1~2 周, 在家兔的耳缘静脉中直接注射抗原。

结合本次实验请做如下思考:

1. 为什么颗粒性抗原可以直接通过静脉途径注射免疫, 而可溶性抗原要与佐剂一同免疫?
2. 你认为在诊断试验中应用多克隆抗体有哪些缺点? 相对于单克隆抗体而言, 它又有哪些优点?

实验二 单克隆抗体的制备

1975 年 Kohler 和 Milstein 创立了制备 McAb 杂交瘤技术。McAb 具有理化性状高度均一、生物活性单一、特异性强和滴度高等特点, 这些优点是多克隆抗体所不具备的。因此目前试剂盒中愈来愈多地采用 McAb, 其在疾病诊断、疾病防治、预后判断以及疾病机制研究等方面的应用也日益广泛。

【实验原理】

McAb 技术的基本原理是应用杂交瘤技术, 将抗原免疫小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞在体外融合为杂交瘤, 而杂交瘤既保持 B 淋巴细胞分泌抗体的能力, 又获得了骨髓瘤细胞无限增殖的能力, 最后通过筛选而获得针对某一抗原决定簇的抗体分泌细胞, 并纯化其分泌的 McAb。

【试剂与器材】

1. 细胞 SP2/0 细胞系、人 O 型红细胞悬液(红细胞浓度调整至 $2 \times 10^7/\text{ml}$)。
2. 试剂 50%(W/V)的聚乙二醇(PEG 1500)、 $100 \times$ HT 母液、 $100 \times$ A 母液、琼脂糖、降植烷、二甲基亚砜、Tris 碱、盐酸、硫酸铵液、DEAE-纤维素、RPMI-1640 培养液和新生牛血清。
3. 动物 采用和杂交瘤同源的 8 周龄 Balb/c 健康小鼠,另备经产母鼠 3~5 只。
4. 耗材 24 孔和 96 孔细胞培养板、无菌毛细滴管、1ml 无菌刻度吸管。
5. 器械 无菌直头和弯头眼科剪各 3 把、无菌直头和弯头眼科镊各 3 把。
6. 仪器 水平低温冷冻离心机、 CO_2 培养箱。

【操作方法】

1. 免疫程序 初次免疫:人 O 型红细胞悬液($2 \times 10^7/\text{ml}$), 0.5ml 腹腔内注射,每 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次。最后 1 次免疫后 7 天,进行加强免疫:融合前 3 天 0.5ml 红细胞悬液经尾静脉内注射,3 天后取脾融合。

2. 饲养细胞的准备 用 6% 淀粉肉汤注入 8 周龄 Balb/c 小鼠腹腔,24 小时后轻揉腹部数次,麻醉处死小鼠,浸泡在 75% 乙醇内,3~5 分钟,用无菌眼科剪剪开皮肤,暴露腹膜。用无菌滴管滴入 5~6ml 预冷的 RPMI-1640 培养液,反复冲洗,吸出冲洗液。冲洗液放入 10ml 离心管,1200r/min 离心 10 分钟。用 20% 小牛血清(NCS)RPMI-1640 培养液重悬,调整细胞数至 $1 \times 10^5/\text{ml}$,加入 96 孔板,100 微升/孔。放入 37°C CO_2 孵箱培养(饲养细胞对于杂交瘤的生长很重要,饲养细胞能提供杂交瘤细胞生长所需要的细胞因子和细胞膜分子信号,还能够吞噬死细胞碎片和少量可能污染的细菌)。

3. 脾细胞的准备 小鼠加强免疫 3 天后麻醉处死,无菌取脾,无血清 RPMI-1640 培养液洗 1 次,过 200 目不锈钢筛网,收集脾细胞,1200r/min 离心 10 分钟,洗涤 2 次,计数后取 10^8 脾细胞备用。

4. SP2/0 细胞准备 取对数生长 SP2/0 细胞离心,用无血清 RPMI-1640 培养液洗 2 次,计数,取 10^7 细胞备用(骨髓瘤细胞使用前最好用 8- 氮鸟嘌呤筛选,如果注射动物后获取实体瘤再分离获得的骨髓瘤细胞作融合效果更好)。

5. 细胞融合 将 SP2/0 细胞与脾细胞按 1:10 比例在 50ml 离心管中混匀,用 RPMI-1640 培养液洗 1 次,1200r/min 离心 10 分钟,弃上清,吸净残留液体。轻弹管底,使细胞沉淀略松动。将带细胞的离心管置于 37°C 水浴中,一边轻微摇动一边加入 37°C 预温的 1ml 50% PEG 溶液,于 1 分钟内加完,静止 1 分钟。然后加入 37°C 预温的无血清培养液 1ml,于 1 分钟内加完,接着在 2 分钟内加入 5ml 无血清培养液,随后在 5 分钟内加入 15ml 无血清培养液,最后加至 50ml,边加边摇,充分稀释和终止 PEG 作用(一般选用分子量在 1500~4000 的 PEG,一般来说 PEG 的分子量越大融合效率越高,但是毒性也越大)。800r/min 离心 10 分钟,去上清,用含 20% 小牛血清 HAT 选择培养液轻轻重悬。将上述细胞,按照每孔含 0.5、1 和 2 个骨髓瘤细胞加到已有饲养细胞层的 96 孔板内,每孔加 100 μl 。接种 4 块 96 孔板,剩余的细胞接种 24 孔培养板,每孔 1~2ml。将培养板置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

6. 阳性克隆的筛选 在含 20% 胎牛血清(FCS)RPMI-1640 的 HAT 选择培养基筛选 7 天后,观察杂交瘤细胞生长情况,细胞生长超过 96 孔板孔底 1/3 左右,吸出上清液检测抗体水平,同时补充 HT 培养液,再维持 2 周,改用一般培养液。在选择培养期间,一般每 3 天换

一半培养液。

7. 抗体的检测 本实验采用红细胞间接凝集试验检测抗红细胞抗体：将人 O 型红细胞配成 5% 悬液，于 96 孔 V 型血凝板中每孔加 50 μ l 红细胞悬液，同时加杂交瘤上清液 50 μ l 混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟，加入 1:1000 羊抗鼠 IgG 50 μ l，振荡混匀后，37 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时，肉眼观察凝集反应结果。以凝集效价在“++”以上为阳性，选择效价在“+++”以上的杂交瘤进行克隆。

8. 杂交瘤的克隆 采用有限稀释法进行杂交瘤的克隆化。克隆前 1 天将预备的饲养细胞加入培养板，将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹起吸出，用 0.1% 台盼蓝作活细胞染色，计数活细胞。用 HT 培养基重悬细胞至 3~10 个 / 毫升，每孔加入 100 μ l 杂交瘤细胞于含饲养细胞的 96 孔板中。培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中。每天观察克隆生长情况，将只有一个集落生长的孔进行标记。1 周换液，以后每 2~3 天换液 1 次。待细胞铺满 1/3 孔时收集上清，检测抗体活性。反复克隆化 2~3 次，将阳性细胞扩大培养，并尽快冻存保种。

除了采用上述间接凝集滴定抗体效价外，还需要对杂交瘤细胞的染色体数目、杂交瘤的稳定性、IgG 类型、亚型、特异性、识别抗原表位的能力和亲合力进行鉴定，抗体的大量制备和纯化在此不赘述。

【结果判断】

本实验通过数个阶段来判断实验是否成功：①融合后能否在 HAT 培养基中生长；②杂交瘤是否能产生针对人 O 型红细胞的抗体；③杂交瘤分泌抗体的稳定性。

【实验讨论】

1. 本实验制备的抗人红细胞抗体单抗（还应进一步鉴定明确其针对的表位）可以应用于常规的 ABO 血型和一些稀有血型的分型。请在查阅相关文献资料的基础上，简要说明抗人红细胞单抗的应用价值。

2. 本实验检测抗红细胞抗体为什么要加入羊抗鼠 IgG 抗体？

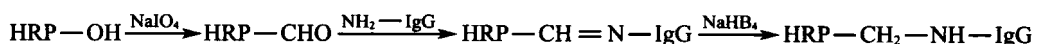
3. 在查阅相关文献资料的基础上，谈谈兔单克隆抗体的优点。

实验三 酶标记抗体的制备

抗体标记技术在抗原的特异性示踪、抗原的检测、肿瘤的治疗等领域具有重要作用，酶标记技术是其中应用最为广泛的一种。酶标记抗体常被应用于酶免疫测定和免疫组化染色等。酶标记抗体的质量直接关系到酶免疫技术的成败。酶标记抗体的质量主要取决于酶的纯度、比活性及抗体的纯度、特异性和亲和力，其次要有良好的制备方法。

【实验原理】

酶与抗体交联的方法很多，根据酶的结构不同可采用不同的方法。制备辣根过氧化物酶 (HRP) 结合物，可用戊二醛二步法和过碘酸钠 (NaIO₄) 法，尤以后者更为常用。本实验采用 NaIO₄ 标记法将 HRP 标记于抗人 IgG 抗体上。其基本原理如下：NaIO₄ 是强氧化剂，能将 HRP 的甘露糖部分（与酶活性无关的部分）的羟基氧化成醛基，然后与抗体的氨基结合，形成酶标记抗体，反应式如下：



【试剂与器材】

1. 试剂 抗人 IgG 抗体、HRP、0.30mol/L pH 8.1 NaHCO₃ (现用现配)、1% 氟二硝基苯 (FDNB) 无水乙醇溶液、0.08mol/L NaIO₄、0.16mol/L 乙二醇溶液、0.10mol/L pH 9.5 NaHCO₃ 缓冲液、0.01mol/L 碳酸盐缓冲液、氢化硼钠 (NaBH₄)、0.15mol/L pH 7.4 PBS 缓冲液、pH 7.8 饱和硫酸铵溶液及半饱和硫酸铵溶液和萘氏试剂。

2. 仪器 搅拌器、分光光度计、普通低速冷冻离心机和高速冷冻离心机。

3. 材料 透析袋, 大、小烧杯, 试管, 吸管等。

【操作方法】

1. 标记过程

(1) 在 5ml 小烧杯中将 5mg HRP 溶于 1ml 0.30mol/L pH 8.1 NaHCO₃ (现用现配) 中, 加 0.1ml 1% 氟二硝基苯 (FDNB) 无水乙醇溶液, 在室温中混合后, 再加入 1ml 0.04~0.08mol/L NaIO₄, 室温, 置于搅拌器上轻搅 30 分钟。

(2) 当溶液呈黄绿色时, 加 1ml 0.16mol/L 乙二醇溶液终止氧化反应, 在室温中放置 1 小时。

(3) 用 0.10mol/L pH 9.5 NaHCO₃ 缓冲液透析 (4℃ 过夜), 换液 3 次。

(4) 在 3ml HRP- 醛基溶液中, 加入 5mg 抗体 (溶于 1ml 的碳酸盐缓冲液中), 室温置 2~3 小时。

(5) 加入 5mg 氢化硼钠 (NaBH₄), 于 4℃ 冰箱放置 3 小时, 然后用 0.15mol/L pH 7.4 PBS 液透析, 4℃ 过夜。

(6) 离心去沉淀物, 将上清液置于烧杯中, 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵, 置 4℃ 1 小时, 3000r/min 离心 30 分钟, 弃上清。

(7) 沉淀物用半饱和硫酸铵洗 2 次, 最后将沉淀物溶于少量 0.15mol/L pH 7.4 的 PBS 中。将上述溶液装入透析袋中, 于 0.15mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲盐水透析, 直至完全去除铵离子 (用萘氏试剂检测), 10 000r/min 离心 30 分钟去除沉淀, 上清液即为酶结合物, 分装后, 冰冻保存。也可以用 0.22μm 滤膜或 ≥12 000r/min 高速冷冻离心 5 分钟, 除菌后分装于 EP 管中, 加入 30%~50% 无菌甘油, -20~-80℃ 保存。

2. 酶标记抗体的鉴定

(1) 定性及效价滴定: 用人 IgG (1mg/ml) 与 HRP 标记抗人 IgG 抗体作双向琼脂扩散试验 (见第二单元实验一), 然后用 HRP 的底物邻苯二胺使沉淀弧显色, 显色后用生理盐水漂洗, 沉淀线不褪色, 说明酶和抗体都具有活性。最后以直接 ELISA 法 (见第四单元实验一) 对 HRP 标记抗人 IgG 抗体进行滴定。

(2) 酶结合物的定量测定: 包括酶量、IgG 含量、酶与 IgG 克分子比值以及结合率的测定。以光程 1cm, 分别用分光光度计测定不同波长下 HRP 标记抗人 IgG 抗体的光密度。计算公式:

$$\textcircled{1} \text{ HRP 量 } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{403\text{nm}} \times 0.42$$

$$\textcircled{2} \text{ IgG 量 } (\text{mg/ml}) = (\text{OD}_{280\text{nm}} - \text{OD}_{403\text{nm}} \times 0.30) \times 0.62$$

$$\textcircled{3} \text{ 克分子比值} = \frac{\text{酶 } \mu\text{g/ml}}{40\,000} \bigg/ \frac{\text{IgG mg/ml}}{160\,000} = \frac{\text{酶} \times 4}{\text{IgG}}$$

(40 000 和 160 000 分别为 HRP 和 IgG 的分子量)

④ 酶结合率 = 结合物中的 HRP 量 / 标记时加入的 HRP 量 × 100%

⑤ 酶标记率: OD_{403nm}/OD_{280nm} , 即酶中正铁血黄素辅基的吸光度(403nm)与抗人 IgG 抗体-HRP 蛋白中的色氨酸、酪氨酸的吸光度(280nm)之比, 表示 HRP 在酶标记抗体中所占的比例, 它与 E/Ab 克分子比值呈高度正相关。

【结果判断】

良好的酶标结合物的琼脂扩散滴度应 $\geq 1:16$ 。酶标记抗体评价的各项参数见表 1-4。

表 1-4 评价酶标记抗体的各项参数

评价	最好	好	一般
酶结合量(mg/ml)	≥ 1.0	≥ 0.5	0.4
酶结合率(%)	> 30	9~10	7
酶 IgG 克分子比	> 1.5	1.0	0.7

【实验讨论】

1. HRP 和抗辣根过氧化物酶单克隆抗体(AP)两种常用的酶各有什么优缺点? 分别适用于哪些诊断性实验?
2. 谈谈常用于抗体酶标记的戊二醛二步法和过碘酸钠($NaIO_4$)标记方法的优缺点。
3. 本实验中哪些因素会影响标记抗体的质量?

单元讨论 新型抗体制备的途径和策略

自从 McAb 诞生以来, 由于其具有理化性状高度均一、生物活性单一、特异性强、亲和力大、滴度高等优越的特点, 用途越来越广泛。但是随着应用的日趋广泛, 其缺点也日益突出, 特别是其对于人体应用来说属于异源性蛋白, 刺激患者体内产生免疫反应, 导致 McAb 失效; 此外抗体分子比较大, 在体内诊断和治疗时很难达到病灶局部。这些缺点大大限制了其在临床上的应用。因此降低 McAb 的免疫原性, 成为当今抗体研究领域的一个热点, 人源化抗体的方法也是层出不穷, 大有取代杂交瘤 McAb 之势。试分析新型抗体的制备技术有哪些? 其目的和意义如何?

(邵启祥)

沉淀反应(precipitation)是可溶性抗原与相应抗体在电解质存在的条件下发生特异性结合,在两者比例适当时形成肉眼可见的沉淀现象。主要包括凝胶内沉淀反应和液相免疫沉淀反应。本单元重点介绍双向免疫扩散试验、单向免疫扩散试验、对流免疫电泳和免疫比浊技术。

验证实验一 双向免疫扩散试验

双向免疫扩散试验(double immunodiffusion assay)是指可溶性抗原与相应抗体在半固体琼脂介质中相互扩散,彼此相遇后发生特异性结合,出现肉眼可见的沉淀线。本实验以双向免疫扩散试验的方法检测健康人血清 IgG 的扩散效价。

【实验原理】

在琼脂凝胶中,待检人血清 IgG 和羊抗人 IgG 抗血清在不同孔内各自向四周扩散,在比例恰当处形成肉眼可见的白色沉淀线,证明两者发生特异性结合反应。

【试剂与器材】

1. 抗原 健康人血清,用生理盐水做 1:5~1:40 系列倍比稀释。
2. 抗体 羊抗人 IgG 抗血清。
3. 琼脂
4. 载玻片、微量加样器、打孔器、5ml 吸管、洗耳球、湿盒、水浴箱、温箱等。

【操作方法】

1. 制备琼脂凝胶 用生理盐水配制 10~15g/L 琼脂,隔水加热煮沸备用。
2. 浇板 将载玻片置于水平台上,用吸管吸取 4~4.5ml 融化的琼脂倾注于玻片上,滴加时注意速度不要过快,要使琼脂盖满整张玻片,使其均匀、饱满,勿溢出并避免产生气泡。
3. 打孔 待琼脂凝固后,将梅花形打孔模板置于琼脂板下,用直径 3mm 的打孔器打孔,使其孔径为 3mm,孔距为 4mm,孔要求圆整光滑,孔缘不能破裂,底部勿与载玻片脱离,如图 2-1 所示。
4. 加样 用微量加样器分别取 10 μ l 抗原、抗体加入孔中。中心孔加入抗体,周围孔分别加入不同稀释度的抗原。
5. 温育 将加好样的琼脂凝胶板平放于湿盒内,

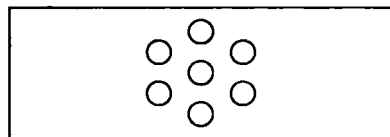


图 2-1 双向免疫扩散试验打孔示意图