



G D Y Y Y X G H J C

高等医药院校规划教材

实验免疫学

■ SHIYAN MIANYIXUE

■ 主 编 余 平

■ 副主编 杨志英 高劲松 程 文 霍 治 王 洁

■ 湖南科学技术出版社



GAODENG
YIYAO YUAXIAO
GUHUA
JIAOCAI

实验免疫学

主编 王德成 副主编 王德成

编者 王德成 等

出版 人民卫生出版社

ISBN 7-117-04444-4

G D Y Y Y X G H J C

高等医药院校规划教材

实验免疫学

主 编: 余 平

副主编: 杨志英 高劲松 程 文 霍 治 王 洁

编 者: (以姓氏笔画为序)

王芙艳 (中南大学湘雅医学院)

王 洁 (中南大学湘雅医学院)

方会龙 (湘南学院)

余 平 (中南大学湘雅医学院)

李立新 (中南大学湘雅医学院)

湖南科学技术出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

实验免疫学 / 余平主编. -- 长沙 : 湖南科学技术出版社, 2011. 2

ISBN 978-7-5357-6611-3

I. ①实… II. ①余… III. ①医药学: 免疫学—实验
IV. ①R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 014032 号

高等医药院校规划教材

实验免疫学

主 编 余 平

副 主 编: 杨志英 高劲松 程 文 霍 冶 王 洁

责任编辑 李 忠

出版发行: 湖南科学技术出版社

社 址 长沙市湘雅路 276 号

[http //www hnstp com](http://www.hnstp.com)

邮购联系: 本社直销科 0731-84375808

印 刷: 长沙瑞和印务有限公司

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址: 长沙市井湾路 4 号

邮 编: 410004

出版日期: 2011 年 2 月第 1 版第 1 次

开 本: 787mm×1092mm 1/16

印 张: 10 75

字 数 256000

书 号: ISBN 978-7-5357-6611-3

定 价: 25.00 元

(版权所有 翻印必究)

近年来,随着免疫化学、细胞生物学和分子生物学的不断发展,以及各种高新技术在免疫学中的应用,许多微量、快速、高度特异和灵敏,并能进行自动化检测 and 数据分析处理的新实验方法得以建立。以抗原抗体反应为基础的现代免疫学实验技术不断更新、发展和充实,成为生命科学各个领域实验研究的重要手段。运用免疫学实验技术对抗原性物质的定性、定量检测不仅推动了对免疫学现象的研究,而且扩大了免疫学与医学各个领域的联系。目前,免疫学实验技术已广泛用于各种传染病、免疫缺陷病、超敏反应、自身免疫病、移植排斥反应及肿瘤等疾病的诊断、疗效评价及发病机制的研究。

本书共分为12章,主要介绍目前应用较为广泛的免疫学新技术,内容包括抗体的制备、抗原抗体反应、免疫标记技术、免疫细胞分离、免疫细胞功能测定、补体测定、免疫球蛋白及其他免疫相关蛋白的测定、细胞因子及其受体的检测、免疫组化技术、HLA分型技术、细胞凋亡检测、流式细胞术在免疫学中的应用以及免疫学实验的质量控制。在编写过程中,强调内容的实用性和可行性。本书的编者均是具有丰富经验的教学一线教师,书中介绍的实验基本上是编者十分熟悉或亲自操作的内容,因此具有较大的参考价值。本书既有利于读者对免疫学理论知识的认识和巩固,又有利于对其临床思维能力、科研创新能力及分析问题、解决问题能力的培养。

本书可作为科研工作者、医学院校研究生和本科生的实验用书,也可作为临床医务工作者等相关人员的参考书。由于免疫学技术进展迅速,而编者水平有限,时间仓促,不足之处敬请各位读者、专家批评指正。

编者

目 录

• 1 •

实验八 化学发光酶免疫检测三 碘甲腺原氨酸…………… (49)	实验十五 中性粒细胞吞噬功能 检测…………… (69)
第四章 免疫细胞功能测定…………… (52)	第五节 单核吞噬细胞系统的分离 与功能检测…………… (70)
第一节 淋巴细胞分离技术…………… (52)	实验十六 巨噬细胞吞噬功能检 测…………… (71)
实验一 人外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离 …… (52)	第六节 红细胞免疫功能的检测 …………… (72)
实验二 尼龙毛分离 T 淋巴细胞、 B 淋巴细胞…………… (54)	实验十七 红细胞 C3bR 花环试 验…………… (72)
第二节 淋巴细胞亚群检测…………… (54)	实验十八 红细胞 SPA 酵母混合 花环试验…………… (72)
实验三 流式细胞仪分离 T 淋巴 细胞亚群…………… (55)	第五章 补体测定技术…………… (74)
实验四 间接免疫吸附法分离 T 淋巴细胞亚群…………… (56)	第一节 补体总活性的测定…………… (74)
实验五 酶桥染色法分离 T 淋巴 细胞亚群…………… (57)	实验一 经典途径溶血活性测定 (CP-CH50 实验) …… (74)
第三节 淋巴细胞功能检测…………… (58)	实验二 旁路途径溶血活性 (AP- CH50) 测定 …… (77)
实验六 T 淋巴细胞转化试验形 态学检测法…………… (59)	第二节 补体各成分的测定…………… (78)
实验七 T 淋巴细胞转化试验 (³ H-TdR 掺入法) …………… (60)	实验三 补体 C4 溶血活性的测 定…………… (79)
实验八 T 淋巴细胞转化试验 (MTT 比色法) …… (62)	实验四 B 因子溶血活性的测定 …………… (79)
实验九 B 细胞膜表面免疫球蛋 白 (SmIg) 检测 …… (63)	第三节 补体裂解产物的测定…………… (80)
实验十 B 淋巴细胞溶血空斑试 验…………… (64)	实验五 C3 裂解产物 C3d 的测 定…………… (80)
实验十一 ⁵¹ Cr 释放法检测 NK 细胞活性…………… (65)	实验六 C3 裂解产物 C3a 的测 定…………… (81)
实验十二 乳酸脱氢酶释放法检 测 NK 细胞活性 …………… (66)	第四节 补体遗传多态性的检测 …………… (82)
实验十三 MTT 比色法检测 NK 细胞活性…………… (68)	实验七 补体 C4 溶血覆盖技术 …………… (82)
实验十四 LAK/NK 细胞的制备 和活性检测…………… (68)	第六章 免疫球蛋白及其他免疫相关 蛋白的测定…………… (84)
第四节 中性粒细胞的分离与功能 检测…………… (69)	第一节 免疫球蛋白测定…………… (84)
	实验一 免疫比浊法检测 IgG、 IgA、IgM …… (84)
	实验二 血清总 IgE 检测 …… (85)
	第二节 C 反应蛋白的测定…………… (87)

实验三 ELISA 法检测 CRP	实验三 单向混合淋巴细胞培养法
..... (87)	 (117)
实验四 胶乳凝集试验检测 CRP	第三节 DNA 分型技术
..... (88)	 (118)
第三节 溶菌酶的测定	实验四 基因组 DNA 的提取
..... (89)	 (120)
实验五 琼脂平板法	实验五 PCR/SSP 技术
..... (89)	 (121)
实验六 免疫测定法	实验六 PCR/SSCP 技术
..... (90)	 (122)
第七章 细胞因子及其受体的检测技术	实验七 PCR/SSO 技术 (正向杂交)
..... (91)	 (124)
第一节 细胞因子检测	第十章 细胞凋亡检测技术
..... (91)	 (126)
实验一 IL-2 的活性检测	第一节 细胞凋亡的形态学检测方法
..... (91)	 (126)
实验二 TNF- α 的活性检测	实验一 苏木素-伊红染色 (HE 染色法)
..... (92)	 (127)
实验三 ELISA 双抗体夹心法检测 IL-1	实验二 吖啶橙/溴化乙锭双染色法
..... (94)	 (128)
实验四 原位杂交法检测 TNF 的 mRNA	实验三 Hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡
..... (96)	 (129)
第二节 细胞因子受体检测	第二节 细胞凋亡检测的生物化学方法
..... (98)	 (130)
实验五 膜表面 IL-2R 阳性细胞的检测	实验四 琼脂糖凝胶电泳检测凋亡细胞的 DNA
..... (99)	 (131)
实验六 ELISA 双抗体夹心法检测可溶性 IL-2R	第三节 原位末端转移酶标记技术
..... (100)	 (133)
第三节 细胞因子基因的检测	实验五 TUNEL——荧光标记法
..... (101)	 (133)
第八章 免疫组织化学技术	实验六 TUNEL——过氧化物酶标记法
..... (103)	 (134)
第一节 组织与细胞材料的制备	第四节 细胞凋亡相关蛋白的检测
..... (103)	 (136)
第二节 免疫组织化学技术的类型	实验七 TFAR19 蛋白的细胞定位分析
..... (105)	 (136)
实验一 酶免疫组化技术检测 CD3	第十一章 流式细胞术在免疫学中的应用
..... (110)	 (138)
实验二 肠组织 TGF- β 1 表达水平检测	第一节 流式细胞术的基本原理
..... (111)	 (138)
第九章 HLA 分型技术	第二节 流式细胞术的荧光染色检测
..... (113)	 (140)
第一节 血清学分型技术	实验一 淋巴细胞亚群分析
..... (113)	 (146)
实验一 HLA 抗原血清学分型	
..... (113)	
第二节 细胞学分型技术	
..... (115)	
实验二 双向混合淋巴细胞培养法	
..... (115)	

第三节	流式细胞术测定细胞 DNA (147)		胞..... (149)
实验二	PI 单染色法检测细胞 凋亡 (亚 “G ₁ ” 峰检 测法) (148)	第十二章	免疫学实验质量控制..... (151)
实验三	Annexin V-FITC/PI 双 染色法检测早期凋亡细	第一节	免疫学质控的基本原则 (151)
		第二节	室间和室内质量控制..... (156)
		第三节	标本的处理与保存..... (160)

第一章 抗原抗体反应

抗原抗体反应是指抗原与相应抗体在体内或体外发生的特异性结合反应。抗原抗体的检测是用已知抗原检测未知抗体，或用已知抗体检测未知抗原。根据抗原抗体是否发生结合来判断在样本中是否存在相应的抗体或抗原。由于体外检测抗原抗体反应中的抗原或抗体多来源于血清，故又称血清学反应（serologic reaction）。它广泛应用于研究机体的免疫应答，抗原与抗体的特性以及疾病的辅助诊断、治疗评估等多种领域。

一、抗原抗体反应的一般原理

抗原抗体能够在体内体外特异性结合，是基于抗原与抗体分子间的非共价键结合，它们之间的结合力包括电荷引力、范德华引力、氢键结合力和疏水作用力。结合反应可分为两个阶段，首先是抗原抗体特异性结合阶段，此阶段反应快，仅需几秒至几分钟，但不出现可见反应；然后是可见反应阶段，抗原抗体复合物在环境因素（如电解质、pH、温度）的影响下进一步交联和聚集，表现为凝集、沉淀等肉眼可见的反应，此阶段反应慢，往往需要数分钟至数小时。实际上这两个阶段难以严格区分，而且反应所需时间亦受多种因素的影响。

二、抗原抗体反应的特点

（一）特异性

抗原抗体的结合是抗原表位与抗体超变区互补结构的结合，因而具有高度的特异性。天然抗原常含有多个抗原表位，可刺激机体分别产生相应的抗体，为多克隆抗体。如果两种抗原分子具有相同或相似的抗原表位则可能发生交叉反应。

（二）可逆性

抗原与抗体的结合为分子表面的非共价键结合，结合稳定但可逆。在一定条件下，如低pH、冻融、高浓度盐类等，结合物可以发生解离，解离后的抗原或抗体其化学结构、生物活性及特异性与未结合前一致。

（三）阶段性

如前所述，抗原抗体反应分两个阶段，第一阶段是特异性结合的阶段，第二阶段是可见反应阶段。

（四）最适比例结合

抗原抗体出现可见反应具有一定的量比关系，只有当反应体系中抗原与抗体分子比例合适时，才会出现肉眼可见的沉淀和凝集现象。如图1-1所示，在含有一定量抗体的试管中，逐渐增加相应可溶性抗原的量，绘制成免疫沉淀物与抗原量的关系曲线。从图中可见，当抗体过剩或抗原过剩时，沉淀物的形成相应较少，甚至无沉淀物形成，血清学实验中称为前带现象或后带现象。曲线的高峰部分是抗原抗体比例达到一合适范围内时，沉淀物形成多而快

速，称为抗原抗体反应的等价带。这反映了抗原抗体反应存在最适比例，Marrack 提出的网格学说认为当抗原或抗体过量时，均不能形成大分子的免疫复合物，仅当抗原与抗体处于等价带时，它们彼此相互连接可形成相对分子质量很大的免疫复合物从而容易形成肉眼可见的沉淀物。

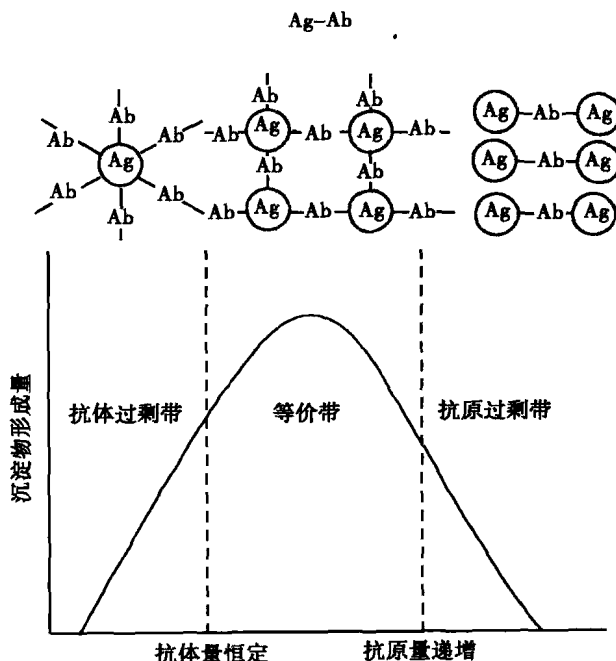


图 1-1 沉淀反应中沉淀量与抗原抗体比例关系示意图

三、影响抗原抗体反应的因素

适当电解质是抗原抗体出现可见反应的条件。抗原与抗体发生特异性结合后，电解质的存在使抗原抗体复合物失去电荷而凝聚，出现可见反应。故在免疫学实验中常以生理盐水或含盐缓冲液稀释抗原或抗体。

抗原抗体反应一般在 pH 为 6~8 时进行。过高或过低的 pH 值都将影响抗原与抗体的理化性质。例如，pH 达到或接近抗原的等电点时，即使无相应抗体存在，也会引起颗粒性抗原非特异性的凝集，造成假阳性反应。

适当的温度可增加抗原与抗体分子的碰撞机会，使反应加速。但若温度高于 56℃，可导致已结合的抗原抗体再解离，甚至变性。常用的抗原抗体反应温度为 37℃。但某些试验有其特殊的最适反应温度，例如冷凝集素在 4℃ 左右与红细胞结合最好，20℃ 以上反而解离。

四、抗原抗体反应的基本类型

抗原抗体反应可根据抗原的物理性状不同或参与反应的成分不同出现不同反应现象而分为 4 种主要经典类型：

1. 可溶性抗原与相应抗体结合所发生的沉淀反应 (precipitation)。
2. 颗粒性抗原与相应抗体结合所发生的凝集反应 (agglutination)。
3. 抗原抗体结合后激活补体所致的补体结合反应 (complement fixation reaction)。
4. 病毒与相应抗体结合所致的中和反应 (neutralization)。

第一节 沉淀反应

沉淀反应 (precipitation) 是指可溶性抗原与相应抗体在电解质参与下, 当两者比例适当时, 形成肉眼可见的沉淀物或沉淀线。目前常用的方法有凝胶扩散免疫沉淀反应, 免疫电泳技术和免疫比浊法。

一、凝胶扩散免疫沉淀反应

抗原抗体在凝胶中扩散, 形成浓度梯度, 在两者比例最适合的位置上, 形成沉淀线或沉淀环, 包括单向扩散沉淀反应和双向扩散沉淀反应。

实验一 单向琼脂扩散试验

【原理】 单向琼脂扩散试验是一种定量试验, 将一定量的单价抗体混合于琼脂内, 倾注于塑料板上, 凝固后打孔, 于孔内滴加相应抗原, 由于抗原从孔内向四周呈环状扩散, 在比例适当的区域与琼脂中抗体结合, 形成肉眼可见的沉淀环。

在一定条件下, 沉淀环直径的大小与抗原浓度呈正相关。用不同浓度的标准抗原制成标准曲线, 则未知标本中的抗原含量可从标准曲线中查出。现以检测血清 C3 含量为例。

【试剂与器材】

1. 单扩板、吸管、微量加样器、打孔器 (直径为 3 mm)、水浴箱、水平台、温箱、湿盒、半对数坐标纸。
2. 抗 C3 免疫血清、C3 标准血清、琼脂粉或琼脂糖。
3. 生理盐水、0.2 g/L NaN_3 盐水。
4. pH8.2 0.1 mol/L 巴比妥缓冲液 (内含 0.01 mol/L EDTA)。

【方法】

1. 制备 1.2% 巴比妥缓冲琼脂 先用生理盐水 50 mL 加 1.2 g 琼脂隔水煮沸融化, 再加 50 mL 巴比妥缓冲液继续隔水煮沸至澄清后, 置 56 °C 水浴中备用。
2. 制备抗 C3 免疫血清琼脂凝胶板 取上述备用的 1.2% 巴比妥缓冲琼脂与 C3 免疫血清按效价混合 (如 C3 免疫血清单扩效价为 1:60, 则做 60 倍稀释) 后在水平台上制板, 使琼脂凝胶厚度为 2 mm, 室温冷却凝固。
3. 打孔 用打孔器在琼脂凝胶板上打孔, 孔径 3 mm, 孔距 12~15 mm。要求孔打得圆整、光滑, 不要破裂。
4. 加样 将待测样品用 0.2 g/L NaN_3 盐水稀释 5 倍, 每孔加 10 μL , 每个样品加 2 孔

(便于发现偏差)，置室温 15 分钟后移至湿盒内。

5. 扩散 将加样的琼脂凝胶板平放于湿盒内，置 37℃，24 小时后观察结果，测量各孔沉淀环直径。如果沉淀环不清晰，可将琼脂板置生理盐水中浸泡 2~3 小时，取出滴加 1% 鞣酸浸泡 10~20 分钟后再测量。

6. 绘制标准曲线 将 C3 标准血清用 0.2 g/L 的 NaN_3 盐水稀释至 500 $\mu\text{g/mL}$ ，然后按表 1-1 稀释成各种不同浓度，测定方法同上。以沉淀环的直径为横轴，相应孔中 C3 含量为纵轴（对数坐标），在半对数纸上绘制标准曲线。

表 1-1

标准品稀释法

标准血清 (500 $\mu\text{g/mL}$)	0.85%NaCl (mL)	C3 含量 ($\mu\text{g/mL}$)
0.05	0.45	50
0.10	0.40	100
0.20	0.30	200
0.30	0.20	300
0.40	0.10	400
0.50	—	500

【结果】 测量待检血清标本的沉淀环直径，从标准曲线上查出 C3 含量。也可通过标准血清含量以及其沉淀环大小，求出回归函数 $y=10^{ax}$ ，其中 x 为直径， y 为含量，可直接算出待测 C3 含量。

经扩散 24 小时后，沉淀环见图 1-2。若出现双环现象，可能是抗原性相同的两个组分，有两种不同扩散率所致。

正常人血清中 C3 含量：男性，0.86~2.52 g/L；女性，0.86~2.06 g/L。

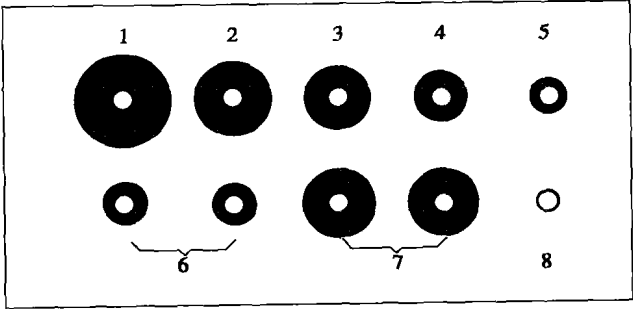


图 1-2 单向琼脂扩散试验结果

1~5：不同稀释度的标准抗原；6~7：待测血清；8：生理盐水对照

【注意事项】

1. 血清纯度与抗原的提纯及免疫方法有关，自制或购得的免疫血清使用前应重新测定其效价。

2. 巴比妥缓冲液中加入 0.01 mol/L EDTA 是为了防止 C1 酯酶被自发性激活，导致 C3 转化，影响结果。

3. 琼脂质量、浓度及加样孔的大小对结果有较大影响，因此条件要统一，加样量要准确。

4. 浇板时免疫血清与琼脂要充分混匀，保温时间不能太长（一般在8分钟内完成），温度不宜高于60℃，否则，抗体易失活变性。但低于50℃时，琼脂趋于凝固，均影响沉淀结果。室温低于10℃时，免疫血清需适当预温，以免加入时使琼脂凝固。

5. 为避免沉淀环变形，琼脂板要保持水平位置。

6. 每次测定需加标准血清对照。标准曲线在24小时呈半对数曲线，48小时弧度明显变小，72小时变为直线。

7. 所用器材必须清洁无油渍。

实验二 双向琼脂扩散试验

【原理】 将抗原和抗体分别加入同一凝胶板中两个相隔一定距离的小孔中，使两者相互扩散。当抗原和抗体浓度比例合适时，形成肉眼可见的沉淀线。根据沉淀线的位置、形状可以判断抗原和抗体的性质。本实验以测定正常人血清IgG的效价为例。

【试剂与器材】

1. 琼脂粉、生理盐水、 NaN_3 、玻片、吸管、微量加样器、打孔器、水浴箱、水平台、湿盒、温箱。

2. 羊抗人IgG抗血清、正常人血清（待测）。

【方法】

1. 制备琼脂凝胶 用生理盐水配制1.2%琼脂（按最终浓度0.1 g/L加入 NaN_3 以防腐），隔水煮沸融化琼脂。

2. 浇板 将玻片置于水平台上，用吸管吸取上述琼脂，仔细加在玻片上（每张玻片约3.5 mL），滴加时要小心，要使琼脂盖满玻片，勿溢出并避免产生气泡。

3. 打孔 待琼脂凝固后（置室温约15分钟），按图1-3用打孔器打孔，孔径3 mm，孔距4 mm，孔要求圆整、光滑。

4. 稀释正常人血清 用生理盐水将正常人血清稀释成不同浓度（1:2、1:4、1:8、1:16）。

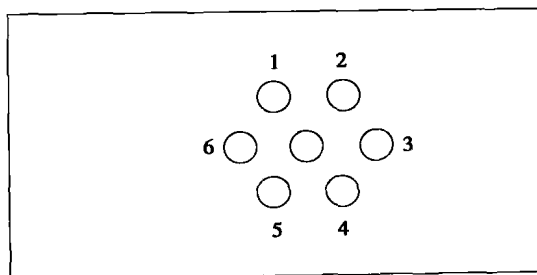


图1-3 双向琼脂扩散试验

中心孔：1:2 羊抗人IgG抗血清；1孔：原人血清；2孔：1:2 人血清；3孔：1:4 人血清；4孔：1:8 人血清；5孔：1:16 人血清；6孔：生理盐水

5. 加样 用 $10\ \mu\text{L}$ 微量加样器加样，中心孔加羊抗人 IgG 抗血清，1、2、3、4、5 孔加不同稀释度的正常人血清，第 6 孔加生理盐水作阴性对照，每孔 $10\ \mu\text{L}$ ，不要溢出或出现气泡。

6. 扩散 将加好样的琼脂凝胶板平放于湿盒内，置 $37\ ^\circ\text{C}$ 温箱，扩散 24~72 小时后观察结果。

【结果】 取琼脂平板于黑色背景上观察抗原、抗体孔间有无白色沉淀线及沉淀线的融合情况。

1. 以出现沉淀线的正常人血清最高稀释度为人血清 IgG 的效价。

2. 双向琼脂扩散试验沉淀线一般在 24 小时内出现，慢者不迟于 72 小时，如延迟到 96 小时仍无沉淀线出现，则为阴性结果。

3. 当 IgG 和抗 IgG 含量相当时，沉淀线为居中一直线，如其中之一含量较大，则沉淀线偏近含量较小的孔。极端情况下，沉淀线不在两孔间，跨越相对浓度低的孔，在另侧形成弧形沉淀线，如抗 IgG 不纯时，可能和正常人血清形成多条沉淀线。

4. 若相邻两条沉淀线完全相连，说明此两孔内抗原完全相同；若相邻两条沉淀线交叉而过，说明此两孔抗原完全不同；若两条沉淀线部分相连，呈毛刺状，说明此两孔抗原有部分相同的。

【注意事项】

1. 扩散时间要适当，时间过短，沉淀线不能出现，时间过长，会使已形成的沉淀线解离或散开而出现假象。

2. 本试验常见误差 ①加样孔破损或板浇注后保存时间过长而变形，使沉淀线的位置及线条模糊不清；②加样孔混有气泡，使溶液溢出孔外；③打孔后挑取琼脂时，将凝胶板挑起，以致检样在孔底流溢。

【临床意义】

1. 测定抗原浓度或判定抗体效价。

2. 用已知抗血清（或抗原）检测未知抗原（或抗体）。

3. 检查抗血清或抗体的纯度 可用于区别血清型不同的抗体与不同抗原的反应性，同时检查抗原和抗体交叉反应的可能性。假如出现几条沉淀线，说明抗原和抗体皆不是单一成分。

4. 抗原和抗体相对分子质量的估计 相对分子质量小的抗原或抗体在琼脂内扩散快，反之则慢，由于慢者扩散圈小，局部浓度则较大，形成的沉淀线弯向相对分子质量大的一方；若两者相对分子质量相等则形成直线（图 1-4）。

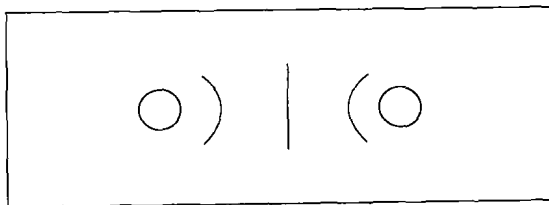


图 1-4 抗原、抗体相对分子质量大小对沉淀线的影响

二、免疫电泳技术

免疫电泳技术是电泳分析与沉淀反应结合的产物，它有两大大优点，一是加快了沉淀反应的速度，二是将某些蛋白质组分利用其带电荷的不同而将其分开，再分别与抗体反应，从而作更细致的分析。免疫电泳技术的种类很多。蛋白质在惰性支持物上进行电泳，不同蛋白质形成带状区域，称为区带电泳。琼脂平板区带电泳和琼脂扩散沉淀反应相结合就是免疫电泳。常用的免疫电泳技术有免疫电泳、对流免疫电泳和火箭电泳等。

实验三 对流免疫电泳

【原理】 对流免疫电泳又称免疫电渗电泳，是抗原、抗体在电场中双向扩散的一种方法。在用 pH8.6 巴比妥缓冲液配制成的琼脂板上打出成对且平行的小孔，在相应孔中加入待测抗原和相应抗体，抗原在负极侧，抗体在正极侧。由于蛋白质抗原的等电点 (pH4~5) 比抗体等电点 (pH6~7) 低，在 pH8.6 条件下，抗原分子表面所带负电荷较抗体多，所以在电泳时，抗原的电泳速度大于电渗速度，故由负极向正极移动，而抗体分子所带负电荷少，且分子质量又大，其电泳速度小于电渗速度，故由正极向负极倒退。在两者相遇的最适比例处，形成白色沉淀线。

由于抗原、抗体在电场中作定向移动，限制了双向琼脂扩散试验时抗原、抗体向各个方向自由扩散的倾向，从而提高了试验的敏感性（比双向琼脂扩散试验敏感 10 倍以上）。本法具有简便、快速等优点，故可作快速诊断。

【试剂与器材】

1. 抗体 乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 免疫血清。
2. 抗原 HBsAg 阳性血清、阴性血清、待测血清。
3. 纯化琼脂（或琼脂糖）、pH8.6、0.05 mol/L 巴比妥缓冲液（巴比妥钠 10.3 g、巴比妥 1.84 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水）。
4. 玻璃板、打孔器、微量加样器、小试管、电泳仪、纱布、镊子等。

【方法】

1. 1.2% 巴比妥琼脂板的制备 称取一定量纯化琼脂粉，加入适量巴比妥缓冲液，加热融化后迅速倾注于平放的玻璃板上（板的大小根据需要而定），琼脂量以 0.15 mL/cm^2 计算。

2. 按图 1-5 模式打孔，并标记正、负极。

3. 加样 按顺序将待测血清、阳性血清、阴性血清分别用微量加样器加入靠近负极的孔内，使液体平齐琼脂，切勿溢出。以同样方法将 HBsAg 免疫血清加入靠近正极的孔内。

4. 电泳 将琼脂板置电泳槽支架上，抗原端接负极，抗体端接正极。两端分别用两层纱布搭桥，贴在琼脂板上约 10 mm 处，其余部分浸入电泳槽缓冲液中。其电流强度为 $4 \sim 5 \text{ mA/cm}$ （玻板总宽），或端电压为 $4 \sim 6 \text{ V/cm}$ （玻板长），泳动 45~60 分钟后关闭电源，取琼脂板观察结果。

【结果】 在黑色背景上观察，于两孔之间见到白色沉淀线者为阳性，无沉淀线者为阴性。沉淀线不清晰时，可置室温下或湿盒内于 37°C 温箱中温育 1~2 小时，再观察结果。

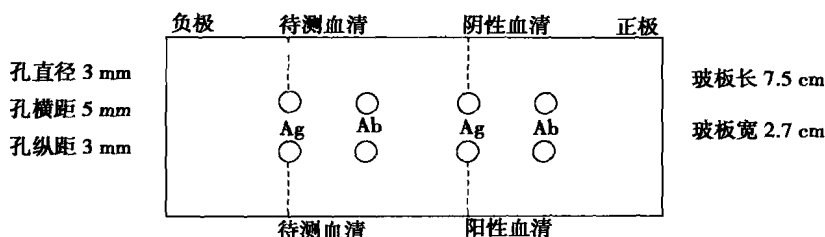


图 1-5 对流免疫电泳试验

三、免疫比浊法

免疫比浊法是抗原抗体结合动态测定方法。其基本原理是：当抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而又比例合适时（一般规定抗体过量），形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中的促聚剂聚乙二醇等作用下，形成微粒自液相析出，使反应液出现浊度。当抗体浓度固定时，形成的免疫复合物的量随着抗原量的增加而增加，反应液的浊度也随之增加。通过测定反应液的浊度与一系列标准品对照，即可计算出抗原的含量。（相关实验参见第六章）

四、免疫印迹技术

免疫印迹技术（immunoblotting/Western blot）是将凝胶电泳的高分辨力同固相免疫测定的特异、灵敏、稳定、简便结合起来的一种方法。它由十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）、蛋白质转印和固相免疫测定 3 项技术结合而成。方法简便易行，标本可长期保存且便于比较。免疫印迹技术可对转移到固相膜上的蛋白质、核酸等抗原进行定性或定量分析，现已广泛应用于分子生物学和医学领域。

实验四 免疫印迹技术

【原理】 蛋白质样品经 SDS-PAGE 分离后通过转移电泳或直接印渍等方式原位、几乎全量地转移至固相膜而成为固定相，然后应用抗原抗体反应进行特异性检测。

【试剂与器材】

1. 电泳仪、垂直平板夹心式电泳槽及转移电泳槽、NC 膜、滤纸等。
2. 30% 丙烯酰胺、0.8% 甲叉丙烯酰胺、10% 过硫酸铵（AP）、四甲基乙二胺（TEMED）。
3. pH8.8、2 mol/L Tris-HCl 缓冲液（含 0.1% SDS）和 pH6.8、0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液（0.1% SDS）。
4. 双蒸水、标准分子质量蛋白、1% 琼脂、样品。
5. pH8.3 Tris-甘氨酸电泳缓冲液（0.25 mmol/L Tris、1.92 mmol/L 甘氨酸和 1% SDS）。
6. pH8.3 转移电泳缓冲液（25 mmol/L Tris、192 mmol/L 甘氨酸、0.1% SDS，用时加入终浓度为 20% 的甲醇）。
7. 样品处理液（1 mol/L Tris-HCl、4% SDS、20% 甘油和 0.002% 溴酚蓝）。
8. 考马斯亮蓝 R250 染液，固定液及脱色液。