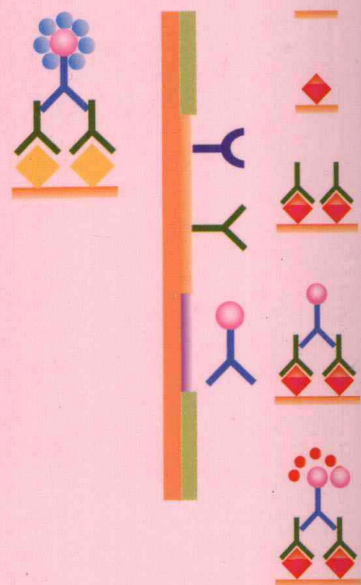
 全国高等医药院校医学检验专业规划教材

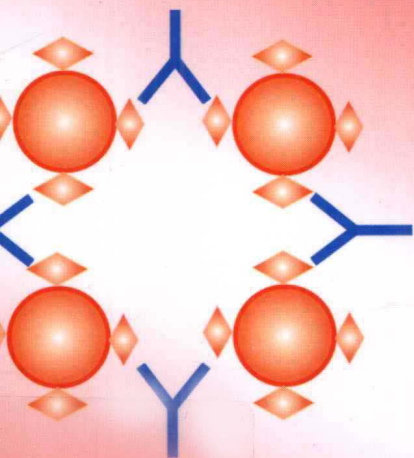
# 临床 免疫学检验 实验指导


(第2版)



LINCHUANG  
MIANYIXUE  
JIANYAN  
SHIYAN ZHIDAO

主编 曾常茜 陶志华  
主审 吕世静



 中国医药科技出版社

● 全国高等院校医学检验专业规划教材

# 临床免疫学检验 实验指导

(第2版)



LI CHENGJING  
LI CHENGJING  
LI CHENGJING  
SHI YUAN ZHONGYUAN

主编 李成静 李成静  
副主编 石园 石园

中国医药出版社

全国高等医药院校医学检验专业规划教材

# 临床免疫学检验实验指导

## 第 2 版

主 编 曾常茜 陶志华  
主 审 吕世静  
副主编 翟登高 徐 霞  
编 者 (以姓氏笔画为序)  
毛旭虎 (第三军医大学)  
邓念华 (成都医学院)  
刘晓霞 (河北工程大学)  
李会强 (天津医科大学)  
李 丽 (东南大学)  
李 波 (佛山科学技术学院)  
杨宝珍 (宁夏医科大学)  
谷俊莹 (贵阳医学院)  
张学宁 (昆明医学院)  
陈章权 (广东医学院)  
林向阳 (温州医学院)  
徐 霞 (广州医学院)  
秦 雪 (广西医科大学)  
陶志华 (昆明医学院)  
曾常茜 (大连医科大学)  
翟登高 (河北北方学院)



中国医药科技出版社

## 内 容 提 要

本书为全国高等医药院校医学检验专业规划教材之一,是《临床免疫学检验》的配套教材。全书共包括13个单元、52个实验项目,并设免疫学实验常用附录,利于学生、实验技术人员及教师操作和查阅。各实验项目后均附有思考题,以帮助学生更好地学习、理解和掌握免疫学实验技术的原理、技术要点和临床应用,提高学习效果。全书内容紧密结合临床实际,体现了精炼、新颖、实用的特点。

本书可供高等院校医学检验专业本科、专科师生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

临床免疫学检验实验指导/曾常茜,陶志华主编.—2版.—北京:  
中国医药科技出版社,2010.2

全国高等医药院校医学检验专业规划教材

ISBN 978-7-5067-4531-4

I. ①临… II. ①曾…②陶… 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(2009)第239438号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 [www.cmstp.com](http://www.cmstp.com)

规格 787×1092mm  $\frac{1}{16}$

印张 11

字数 207千字

初版 2004年9月第1版

版次 2010年2月第2版

印次 2010年2月第2版第1次印刷

印刷 北京地泰德印刷有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-4531-4

定价 22.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

# 全国高等医药院校医学检验专业规划教材 建设委员会

**主任委员** 丛玉隆 (解放军军医进修学院)

**副主任委员** (以汉语拼音为序)

樊绮诗 (上海交通大学)

胡丽华 (华中科技大学)

刘新光 (广东医学院)

吕建新 (温州医学院)

王 前 (南方医科大学)

吴忠道 (中山大学)

姚 智 (天津医科大学)

尹一兵 (重庆医科大学)

**委 员** (以汉语拼音为序)

陈育民 (河北工程大学)

洪秀华 (上海交通大学)

胡建达 (福建医科大学)

胡翊群 (上海交通大学)

李咏梅 (北华大学)

刘 辉 (大连医科大学)

刘成玉 (青岛大学)

吕世静 (广东医学院)

王 辉 (新乡医学院)

徐克前 (中南大学)

姚群峰 (湖北中医学院)

张进顺 (河北北方学院)

吴俊英 (蚌埠医学院)

郑铁生 (江苏大学)

**秘 书 长** 王应泉 (中国医药科技出版社)

**办 公 室** 解秀兰 (中国医药科技出版社)

浩云涛 (中国医药科技出版社)

王宇润 (中国医药科技出版社)

# 出版说明

全国高等医药院校医学检验专业规划教材是由全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会组织规划,全国数十所医药院校积极参与编写和使用,中国医药科技出版社出版的全国性医学检验专业教材。本套教材是国内第一套四色印刷的医学检验专业教材,自2004年出版以来,由于其新颖独到的编排设计、图文并茂的四色印刷、与临床紧密结合的实用性,深受广大教师和学生的欢迎,获得了良好的市场效应,为我国的检验专业本科教育做出了重要贡献。

为适应我国医学检验专业本科教育发展的需要,全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会在调研和总结一版教材质量和使用情况的基础上,组织上海交通大学医学院、中山大学医学院、华中科技大学同济医学院、中南大学湘雅医学院、南方医科大学、温州医学院、青岛大学医学院、重庆医科大学、新乡医学院等数十所院校的教师共同进行第二轮规划教材的编写修订工作。

第二轮规划教材的编写修订工作,坚持紧扣教育部、卫生部对医学检验专业本科教育的培养目标,以新的医学检验专业教育纲要为基础,以临床实际需求为指导,着重强调培养目标与用人要求相结合的原则,注重体现“三基”(基本理论、基础知识和基本技能)、“五性”(思想性、科学性、先进性、启发性和适用性)。在继承上一版教材优点的基础上,有以下创新:①新增补《临床检验仪器》和六本配套实验指导教材,让本套教材体系更趋完善;②理论课教材每章前保留学习要点,部分教材章后增加病例分析和小结,加强系统性;③原中英文或英中文对照升级为汉英或英汉名词索引,便于查找;④新增大量彩图,版面设计更美观、更活泼、更趋人性化;⑤实验指导更注重全面提高学生动手能力和综合分析解决问题的能力,所选实验更新、更全、更实用。

该套教材主要供全国高等医药院校医学检验及相关专业的学生使用。全套教材书目如下:

1. 临床检验基础(第2版)
2. 临床检验基础实验指导★
3. 临床生物化学检验(第2版)

4. 临床生物化学检验实验指导 (第2版)
5. 临床血液学检验 (第2版)
6. 临床血液学检验实验指导★
7. 临床微生物学检验 (第2版)
8. 临床微生物学检验实验指导★
9. 临床免疫学检验 (第2版)
10. 临床免疫学检验实验指导 (第2版)
11. 临床寄生虫学检验 (第2版)
12. 临床寄生虫学检验实验指导★
13. 分子诊断学 (第2版)
14. 分子诊断学实验指导★
15. 临床输血检验 (第2版)
16. 临床输血检验实验指导★
17. 临床实验室管理 (第2版)
18. 临床检验仪器★

注: ★表示本轮规划教材建设的新增品种。

全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会

2010年1月

# 前言

为贯彻落实教育部关于“教材建设精品化，教材要适应多样化教学需要”的精神，来自全国十多所高等医学院校，从事教学、临床与科研第一线的教授、专家一致认为作为配套实验教材，编写的原则应与规划理论教材保持原则上的一致性，反映免疫学新技术和发展趋势。全书科学、系统、规范，紧密结合临床，体现了精炼、新颖、实用的特点，并能充分体现现代教育理念，通过实验培养学生的实践能力和创新能力。

全书内容编排与理论教材衔接一致，按技术特点分为13个单元，共计52个实验项目。实验项目较全面，不同专业、不同层次的免疫学实验教学可根据教学需求选择相关实验内容。各院校也可结合自身条件，组合成不同层次的综合性实验。实验方法尽量详尽，并设附录介绍常用动物的接种和采血方法、常用试剂配制、常用免疫学检测试剂盒等，以便于学生、实验技术人员和教师操作和查阅。每个实验项目后均附有思考题，以帮助学生更好地学习、理解和掌握免疫学实验技术的原理、技术要点和临床应用，提高学习效果。

与上版教材相比，本书增编了单克隆抗体制备、时间分辨荧光免疫测定、荧光偏振免疫测定、酶促化学发光免疫测定、化学发光免疫测定、电化学发光免疫测定、酶联免疫斑点试验等临床免疫学检验技术，体现了本书的先进性；并增编了检验系统的方法性能评价和临床免疫学实验的诊断效能评价的有关实验，其中临床免疫学实验的诊断效能评价单元为设计性实验，有利于培养学生的科学思维，提高学生分析问题和解决问题的能力，这也是本书的特色之处。

本教材适用于医学检验、临床医学类专业本科、专科的免疫学实验教学，也是教师、医学类研究生、科研人员及相关专业技术人员的参考书。

本教材在编写过程中得到各编者单位领导和同行们的大力支持。此外，本版教材是在第一版教材的基础上修订而来，因此仍包含了一版教材作者的辛勤劳动。在此向以上同志表示衷心的感谢！

免疫学和免疫学技术的发展日新月异，医学教育及教学改革正在逐步深入，而编者的认识水平所限，书中难免会有不妥或不足。恳请广大师生和同仁在使用过程中对本书提出宝贵意见和建议，以便不断完善和提高。

《临床免疫学检验实验指导》编委会

2010年1月



## 目 录

<b>第一单元 抗体制备技术</b> .....	(1)
实验一 免疫血清的制备 .....	(1)
(一) 伤寒沙门菌“O”抗血清的制备 .....	(1)
(二) 溶血素的制备 .....	(2)
(三) 抗 IgG 血清的制备 .....	(4)
实验二 单克隆抗体的制备 .....	(5)
实验三 抗体的纯化 .....	(9)
(一) 盐析法 .....	(9)
(二) 凝胶过滤法 .....	(11)
(三) 离子交换层析法 .....	(12)
(四) 亲和层析法 .....	(14)
<b>第二单元 免疫凝集类技术</b> .....	(16)
实验四 直接凝集试验 .....	(16)
(一) 玻片凝集试验 .....	(16)
(二) 试管凝集试验 .....	(17)
实验五 间接凝集试验 .....	(19)
(一) 间接血凝试验 .....	(19)
(二) 反向间接血凝试验 .....	(22)
(三) 胶乳凝集试验 .....	(24)
(四) 间接凝集抑制试验 .....	(25)
(五) 协同凝集试验 .....	(26)
实验六 抗人球蛋白试验 .....	(28)
(一) 直接 Coombs 试验 .....	(28)
(二) 间接 Coombs 试验 .....	(30)
<b>第三单元 免疫沉淀类技术</b> .....	(32)
实验七 单向免疫扩散试验 .....	(32)
实验八 双向免疫扩散试验 .....	(33)
实验九 免疫电泳 .....	(35)
实验十 对流免疫电泳 .....	(37)
实验十一 火箭免疫电泳 .....	(38)
实验十二 免疫固定电泳 .....	(40)

实验十三 免疫浊度测定 .....	(43)
<b>第四单元 补体参与的技术 .....</b>	<b>(45)</b>
实验十四 补体结合试验 .....	(45)
实验十五 血清总补体溶血活性测定 .....	(49)
<b>第五单元 酶免疫技术 .....</b>	<b>(51)</b>
实验十六 酶标记抗体的制备 .....	(51)
实验十七 酶联免疫吸附试验 .....	(53)
实验十八 酶免疫组化技术 .....	(56)
实验十九 免疫印迹技术 .....	(58)
实验二十 酶联免疫斑点试验 .....	(60)
<b>第六单元 放射免疫技术 .....</b>	<b>(63)</b>
实验二十一 放射免疫测定 .....	(63)
实验二十二 免疫放射测定 .....	(65)
(一) 一步法 .....	(65)
(二) 两步法 .....	(67)
<b>第七单元 荧光免疫技术 .....</b>	<b>(69)</b>
实验二十三 荧光标记抗体的制备 .....	(69)
实验二十四 荧光抗体染色技术 .....	(71)
实验二十五 时间分辨荧光免疫测定 .....	(74)
实验二十六 荧光偏振免疫测定 .....	(76)
<b>第八单元 化学发光免疫分析 .....</b>	<b>(80)</b>
实验二十七 酶促化学发光免疫测定 .....	(80)
实验二十八 化学发光免疫测定 .....	(82)
实验二十九 电化学发光免疫测定 .....	(85)
<b>第九单元 胶体金免疫技术 .....</b>	<b>(89)</b>
实验三十 胶体金免疫渗滤试验 .....	(89)
实验三十一 胶体金免疫层析试验 .....	(90)
<b>第十单元 免疫细胞检测技术 .....</b>	<b>(93)</b>
实验三十二 外周血单个核细胞的分离 .....	(93)
实验三十三 E 花环形成试验 .....	(95)
实验三十四 T 细胞亚群的测定 .....	(97)
实验三十五 T 细胞增生试验 .....	(99)

(一) 形态学方法	100
(二) MTT 比色法	101
(三) $^3\text{H}$ -TdR 掺入法	102
实验三十六 细胞毒性 T 细胞功能测定	103
实验三十七 NK 细胞活性的测定	105
实验三十八 吞噬细胞功能测定	107
(一) 中性粒细胞吞噬功能测定	107
(二) 巨噬细胞吞噬功能测定	108
(三) 硝基蓝四氮唑还原试验	111
(四) 白细胞杀菌活性测定	112
实验三十九 细胞因子的测定	114
(一) 肿瘤坏死因子的生物活性测定	114
(二) 白细胞介素-2 的测定	116
<b>第十一单元 其他免疫学检测项目</b>	118
实验四十 豚鼠过敏反应观察	118
实验四十一 血清 IgE 的测定	119
(一) 血清总 IgE 测定	119
(二) 血清特异性 IgE 测定	120
实验四十二 循环免疫复合物的检测	122
实验四十三 群体反应性抗体的检测	124
实验四十四 人类白细胞抗原的检测	125
(一) 补体依赖的微量细胞毒试验	125
(二) 淋巴细胞交叉配合试验	127
<b>第十二单元 检验系统的方法性能评价</b>	129
实验四十五 可报告范围验证实验	129
实验四十六 精确度评价实验	131
实验四十七 参考区间评估实验	133
实验四十八 分析灵敏度验证实验	135
实验四十九 检测系统干扰实验	138
实验五十 检测系统间结果比对实验	140
<b>第十三单元 临床免疫学实验的诊断效能评价</b>	144
实验五十一 临床免疫学定性试验的诊断效能评价	144
实验五十二 临床免疫学定量试验的诊断效能评价	146
<b>附录</b>	148
附录一 常用实验动物的接种和采血方法	148

(一) 接种方法.....	(148)
(二) 采血方法.....	(149)
附录二 常用试剂的配制.....	(151)
(一) 酸碱溶液的配制.....	(151)
(二) 缓冲液的配制.....	(151)
(三) 其他试剂溶液的配制.....	(156)
(四) 洗液的配制.....	(159)
附录三 离心速度、相对离心力 (RCF) 和离心时间的计算.....	(160)
附录四 常用免疫学检测试剂盒.....	(161)
(一) 临床免疫学诊断试剂盒的基本要求.....	(161)
(二) 临床免疫学诊断试剂盒的种类和基本组成.....	(161)

# 第一单元 抗体制备技术

免疫学检测技术的基础是抗原抗体反应。基于抗原抗体反应具有高度特异性，可用已知抗体检测与之特异反应的未知抗原，或用已知抗原检测与之特异反应的未知抗体，以此诊断或辅助诊断疾病。因此，抗原和抗体是免疫学检测的两个重要指标，也是体外抗原抗体反应中最基本的试剂。抗体制备技术主要有三类：多克隆抗体、单克隆抗体及基因工程抗体制备技术，本单元重点介绍免疫血清、单克隆抗体制备技术以及抗体的纯化方法。

## 实验一 免疫血清的制备

免疫血清的制备是将免疫原按照一定的免疫程序接种于动物，抗原刺激其免疫系统发生免疫应答，产生针对抗原不同表位的多克隆抗体，采集分离免疫动物的血清，得到相应的抗体，即为免疫血清或称为抗血清。免疫原的制备是免疫血清制备的前提。不同性质的免疫原，在制备免疫血清中选择的适用动物和采取的免疫程序有所不同。下面以伤寒沙门菌诊断血清、溶血素以及抗 IgG 血清为例介绍颗粒性、可溶性抗原免疫血清的制备。

### （一）伤寒沙门菌“O”抗血清的制备

#### 【实验原理】

用伤寒沙门菌的代表菌株制成灭活菌抗原免疫家兔所得的血清，供凝集试验诊断伤寒沙门菌用。

#### 【主要试剂与器材】

1. 伤寒沙门菌标准菌株（如 O901）。
2. pH 7.2 ~ 7.4 普通琼脂培养基（或普通肉汤）。
3. 健康雄性家兔（2 ~ 3kg）。
4. 甲醛溶液、2% 碘酒、75% 乙醇、无菌生理盐水、硫柳汞。
5. 37℃ 培养箱、离心机、离心管、吸管、注射器。

#### 【操作方法】

**1. O 抗原的制备** 将伤寒菌 O901 菌种接种于 pH 7.2 ~ 7.4 琼脂培养基（或普通肉汤），置 35 ~ 37℃ 培养 18 ~ 20h，收集细菌，以无菌生理盐水洗涤后

制成适宜浓度（约  $1 \times 10^9$  CFU/ml）的菌液，于  $100^\circ\text{C}$  水浴中加热 2.5h，然后按菌液量的 0.3% 加入甲醛溶液备用。

**2. 免疫动物** 取健康雄性家兔若干只（根据需要而定），通过耳静脉免疫，免疫程序见表 1-1。

表 1-1 伤寒沙门菌“O”抗血清制备免疫方案

免疫时间（天）	0	5	10	15	20
抗原剂量（ml）	0.25	0.5	1.0	1.0	1.0

**3. 试血** 末次注射后 6~8 天试血，从耳静脉采血，分离血清，以免疫菌采用玻片凝集试验测定抗血清效价。若效价达不到要求，可按最后 1 次免疫剂量再加强注射抗原 1~2 次，再试血，直至符合要求。

**4. 采血** 试血合格后即可采血，可采用颈动脉放血或者心脏采血，分离血清，加入硫柳汞溶液使其最终含量为 0.10~0.20g/L。

### 【结果判断】

收获的抗血清凝集效价应  $\geq 1:640$ ，且应无菌、无溶血。

### 【注意事项】

1. 操作活菌时应注意生物安全，防止实验因子污染和对操作者的影响。
2. 注射灭活细菌抗原剂量较大时要缓慢推注。
3. 为尽可能多地采集血清，大多采用颈动脉放血或心脏采血。
4. 分离血清时应注意无菌操作。
5. 玻片凝集试验时为避免假阳性结果，应设置生理盐水对照。

### 【方法评价】

免疫动物制备抗体，方法简单易行，也可用于其他细菌抗血清的制备。由于动物个体间的差异，产生的抗体质量难以控制，重复性和稳定性差，应密切监测各个体动物的变化。

### 【临床应用】

用于伤寒沙门菌 O 抗原的抗血清制备，制备的抗血清经吸收也可用于制备沙门菌 O 因子（单价）血清，临床用于沙门菌群或型的鉴定。

### 【思考题】

1. 制备免疫血清时选择免疫动物有哪些基本原则？
2. 制备免疫血清过程中采血、分离血清应注意些什么？

## （二）溶血素的制备

### 【实验原理】

用绵羊红细胞（SRBC）免疫家兔，可获得抗绵羊红细胞抗体（抗 SRBC 抗体）。SRBC 与抗 SRBC 抗体结合，在补体参与下，可出现红细胞溶解，因此

抗 SRBC 抗体也称为溶血素。

### 【主要试剂与器材】

1. 健康雄性家兔 (2~3kg)、绵羊。
2. 2% 碘酒、75% 乙醇、无菌生理盐水。
3. 0.10g/L 硫酸镁 0.01g 硫酸镁加生理盐水 100ml。
4. 无菌三角瓶 (内装玻璃珠)、离心管、吸管、注射器。
5. 离心机。

### 【操作方法】

#### 1. 抗原的制备

(1) 用 2% 碘酒、75% 乙醇消毒绵羊颈静脉处皮肤, 抽血, 缓慢注入含有玻璃珠的无菌三角瓶内, 轻轻摇动三角瓶, 脱纤维抗凝。抗凝绵羊血用 Alsever 液可保存 2 周。

(2) 无菌取抗凝绵羊血于离心管中, 加适量生理盐水, 2000r/min 离心 5min, 吸去上清液和白细胞层, 再用较多的无菌盐水与红细胞混匀, 离心再弃上清液, 重复 3 次, 最后一次离心 10min。

(3) 根据血细胞比容, 用 0.10g/L 硫酸镁配成 10% SRBC 悬液。

#### 2. 免疫动物

(1) 取健康雄性家兔若干只 (根据需要而定), 通过耳静脉免疫, 免疫程序见表 1-2。

表 1-2 溶血素制备免疫方案

免疫时间 (天)	0	7	14	21	28
10% SRBC 剂量 (ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

(2) 试血 末次免疫后第 7~10 天试血。从耳静脉或心脏采血, 分离血清, 做免疫溶血试验, 滴定溶血素效价。若效价不理想, 可再注射抗原, 再试血, 直至达到要求。

3. 收获血清 无菌采血, 分离血清。血清经 56℃ 30min 灭活后分装, 冻干或加入 0.1%  $\text{NaN}_3$ , -20℃ 以下保存。

### 【结果判断】

收获的抗血清应是无菌、无溶血的, 其溶血效价应高于 1:16 000。

### 【注意事项】

1. 注意无菌操作, 并尽可能多地采集血清。
2. 实验室制备抗体时, 血清需要量不大, 宜选择小动物免疫, 便于管理。
3. 用细胞性抗原制备抗体时, 多选用静脉注射途径。免疫的次數、间隔时间以及试血时间均可随实验安排适当调整。

### 【方法评价】

溶血素方法简便易行, 但是动物个体间产生溶血素质量差异较大。





(2) 注射方法和免疫程序见表 1-3。

表 1-3 抗 IgG 血清制备免疫方案

免疫时间 (天)	0	14	21	28
免疫原剂量 (ml)	福氏完全佐剂 - IgG (1.0)	福氏不完全佐剂 - IgG (1.0)	IgG (0.5)	IgG (0.5)
免疫部位及途径	足掌、皮下、背部皮内 5~10 点	腋窝淋巴结、背部皮下 5~10 点	耳静脉、背部皮内、皮下	耳静脉、背部皮内、皮下

(3) 试血 末次注射免疫原后 7~10 天试血。从耳静脉或心脏采血，分离血清。通过双向免疫扩散试验测定抗体效价。若抗体效价不理想，可再次注射抗原，再试血，直至达到要求。

3. 采血 从心脏采血，分离血清，小量分装， $-20^{\circ}\text{C}$  以下保存。

### 【结果判断】

收获的抗血清应是无菌、无溶血的，其效价应高于 1:32。

### 【注意事项】

1. 注意无菌操作，尽量多采血清。
2. 用可溶性抗原制备抗体时多选用皮内注射途径，因加有佐剂，注射不太容易。
3. 免疫的次数、间隔时间及试血时间可随实验安排调整。
4. 再次注射抗原时，要防止过敏反应发生。

### 【方法评价】

与其他多克隆抗体制备类似，方法简便易行，但是抗体质量在动物个体间差异较大。

### 【临床应用】

抗人 IgG 血清可用于抗人球蛋白试验，纯化的抗人 IgG 常用于免疫标记技术中作为第二抗体使用，或用于亲和层析技术提纯人 IgG，或用于双向免疫扩散试验、免疫电泳检测人 IgG。

### 【思考题】

1. 为什么在制备可溶性抗原的抗血清时大多要使用免疫佐剂？
2. 抗血清的保存有哪些方法？

(毛旭虎)

## 实验二 单克隆抗体的制备

单克隆抗体 (McAb) 是由一个 B 细胞杂交瘤克隆所产生的针对单一表位