

卫生部规划教材

高等医药院校 配套教材
全国医学专科学校

(供医学检验专业用)

免疫学和 免疫学检验 实验指导

尹学念 主编

人民卫生出版社

高等医药院校 配套教材
全国医学专科学校

(供医学检验专业用)

免疫学和免疫学检验实验指导

尹学念 主编

陶义训 主审

编者(以姓氏笔画为序)

王钦富(大连大学医学院)

尹学念(吉林医学院)

朱光恒(重庆医科大学)

刘 辉(大连医科大学)

刘若英(贵阳医学院)

刘荣臻(山西医科大学汾阳学院)

许化溪(镇江医学院)

李 稻(上海第二医科大学)

杨铁生(北京医科大学)

吴俊英(蚌埠医学院)

余 平(湖南医科大学)

沈 霞(上海第二医科大学)

张忠英(福建医科大学)

张逢春(吉林医学院)

唐珊熙(南京海军医专)

曾常茜(吉林医学院)

翟登高(张家口医学院)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

免疫学和免疫学检验实验指导/尹学念主编. —北京:
人民卫生出版社, 1999
ISBN 7-117-03276-6

I. 免… II. 尹… III. ①免疫学-医学院校-教材②免疫学-医学检验-医学院校-实验课-教材 IV. R392

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 08498 号

免疫学和免疫学检验实验指导

尹学念 主编

人民卫生出版社出版发行
(100078 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼)

北京市卫顺印刷厂印刷

新华书店经销

787×1092 16开本 4.75印张 104千字
1999年7月第1版 1999年7月第1版第1次印刷
印数: 00 001—3 000

ISBN 7-117-03276-6/R·3277 定价: 6.00 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究。

编写说明

本书是与医学检验专业规划教材配套的系列实验教材之一,由卫生部教材办公室统一组织编写。内容分为4章14节,共36个基本实验项目,计约10万字,全部完成这些教学实验项目约需 72 ± 6 学时。

作为配套实验教材,编写的首要原则是与规划(理论)教材保持原则上的一致性,内容上互为补充,避免不必要的理论重复,力求简明扼要;第二是实用性,适合国内大多数院校的实验课开出能力和教学改革的需要,尽量顾及免疫检验的临床实际,充分发挥对实验课的指导作用;第三是教材,不是试剂盒的说明书,应体现教与学的系统性和规律性,注重对学生进行基本理论和基本技能训练。

本教材编写的难点之一是本科和专科共用。国家没有指导性大纲,各院校对本科与专科教学的区别有不同的理解,各地的教学计划和教学大纲在不同形式的教学改革中形成很大差异,尤其是在实验课方面。所以编者只能最大限度地满足教学条件较好的院校,条件较差的院校或专科学校可根据实际情况从教材中选择基本的实验项目进行教学。

教材编写的难点之二是教学与实际的脱节。教学重视对基本理论和基本技能的培养,所做实验多是手动或半自动的;而临床检验设备却逐步走向全面自动化。虽然这一空当主要依靠毕业实习来弥补,但在教学过程中应该让学生对现代化设备有个基本的了解。

本书除了适用于医学检验专业本科和专科教学以外,也可作为医学类其他专业的免疫学实验教材,还可作为医院检验科、防疫站、卫生学校和科研单位工作人员的参考用书。

本教材在编写过程中得到了陶义训教授和杨廷彬教授的热情关怀和悉心指导。参加编写工作的人员除了封面署名的编者以外,还有杨蜜、许瑞环、李良菊、高艳平、张丛胜、何东苟和王军老师等,在此一并表示感谢。

免疫学和免疫学检验技术的发展日新月异,医学教育和教学改革也正逐步深入,而编者的认识水平和教学经验有限,所以本书会有各种各样的缺点和不足。衷心希望广大师生和医学检验工作者在使用过程中对本书提出宝贵的意见和建议,以便不断充实、完善和提高。

编者

1998年10月

目 录

第一章 血清学技术	(1)
第一节 免疫血清制备	(1)
第二节 沉淀反应	(4)
一、凝胶双扩散试验	(4)
二、凝胶单扩散试验	(5)
三、对流免疫电泳	(6)
四、火箭电泳	(7)
五、免疫电泳	(9)
六、免疫浊度测定	(11)
第三节 凝集反应	(12)
一、直接凝集试验	(12)
二、间接凝集试验	(14)
三、凝集抑制试验	(16)
四、协同凝集试验	(17)
第四节 溶血反应和补体结合试验	(19)
一、血清补体活性测定	(19)
二、补体结合试验	(21)
第二章 免疫标记技术	(25)
第一节 酶免疫技术	(25)
一、酶联免疫吸附试验	(25)
二、免疫印迹试验	(27)
三、酶免疫组织化学技术	(30)
第二节 放射免疫技术	(31)
RIA 法测定 AFP	(31)
第三节 免疫荧光技术	(33)
荧光显微法检测抗核抗体	(33)
第四节 其他免疫标记技术	(35)
一、发光免疫测定技术	(35)
二、斑点金免疫结合试验	(36)
第三章 细胞免疫检测技术	(39)
第一节 免疫细胞的分离及分类	(39)
一、外周血单个核细胞的分离	(39)
二、淋巴细胞尼龙毛分离法	(40)
三、T 细胞亚群测定	(42)
第二节 免疫细胞的功能检测	(43)
一、淋巴细胞转化试验	(43)
二、CTL 杀伤功能测定	(46)

三、溶血空斑形成试验	(48)
四、巨噬细胞吞噬功能的检测	(49)
第三节 细胞因子检测技术	(52)
一、白细胞介素Ⅰ的检测	(52)
二、肿瘤坏死因子的测定	(53)
第四章 免疫性疾病及移植免疫检测	(56)
第一节 变态反应的检测	(56)
一、皮肤试验	(56)
二、血清IgE测定	(59)
三、循环免疫复合物的检测	(60)
第二节 自身抗体的检测	(61)
一、抗心肌抗体的检测	(61)
二、类风湿因子检测	(62)
第三节 移植免疫检测	(63)
一、补体依赖的细胞毒试验	(64)
二、淋巴细胞交叉配合试验	(65)
附录 免疫学实验常用试剂及配制方法	(67)

第一章 血清学技术

血清学技术是指传统的抗原抗体反应体外检测方法,根据反应现象和试验方法的不同可分为沉淀反应、凝集反应、溶解反应和补体结合反应等类型,广泛应用于各类微生物抗原、各种抗体、其他蛋白质和药品的检测。这类试验的第一步是获得纯度高、特异性强的抗原或抗体。虽然现在已有许多更灵敏的方法和自动化检测仪器,但是血清学技术仍是免疫学检验的基础与核心。

第一节 免疫血清制备

目的和原理

针对某种抗原制备特异性抗血清是免疫学的基本技术之一。根据抗原的生物学和理化特性,可用不同的方法制得高纯度的免疫原;再进行不同形式的处理(例如加入佐剂),可使其具有更强的免疫原性。将免疫原经适当途径、按合理程序免疫动物,可刺激机体免疫系统产生抗体并释放入血。当血中抗体达到一定效价时采血,即可获得特异性免疫血清(通常称之为抗血清)。此种抗血清可直接用来进行某些试验,也可从中提取特异性抗体。

本试验以绵羊红细胞(SRBC)和人全血清为免疫原,以家兔为免疫动物,制备兔抗羊SRBC和兔抗人血清的免疫血清。要求学生初步学会免疫原和佐剂的制作及免疫血清制备的基本方法,了解其意义和应用;熟悉动物实验的基本知识。

器材和试剂

1. 标本和实验对象 混合人血清、绵羊红细胞(SRBC)、健康家兔。
2. 福氏佐剂 福氏不完全佐剂(羊毛脂+石蜡油,比例为1:1~1:4,高压灭菌后置冰箱保存备用)和福氏完全佐剂(上述不完全佐剂加入卡介苗2~20mg/ml,经研磨乳化后置4℃冰箱储存备用,乳化方法见后)。
3. 其他试剂 生理盐水、阿氏(Alserver)液等。
4. 主要器材 注射器、16号针头、胶管、三角烧瓶、玻璃珠、试管、乳钵、止血钳、手术剪等,以上器材均需高压灭菌后备用。另外还需离心机、冰箱等。

步骤和方法

1. 颗粒性免疫原的制备 以SRBC悬液为例。

(1)选健康绵羊1只,取侧卧位,固定其头部和四肢,剪去颈侧的羊毛。消毒皮肤后,用手压迫颈静脉,待其明显隆起后用100ml注射器(以胶管连接16号针头)自颈静脉无菌采血。

(2)采足所需血量后,注入装有玻璃珠的三角烧瓶内,加塞后沿着一个方向摇动烧瓶,用玻璃珠脱去羊血中的纤维蛋白。或事先在烧瓶内加入适量肝素抗凝。

(3)留出适量的羊血立即做细胞悬液,其余放入阿氏液中保存(羊血与阿氏液之比为1:2),置4℃冰箱大约可有效保存2周。

(4)将羊血加2倍生理盐水稀释,离心2000r/min 10min,弃上清;同样用生理盐水洗涤3次,最后一次的沉淀物即为压积血细胞。

(5)将压积血细胞稀释为 $5 \times 10^8/\text{ml}$ (5%) 的细胞悬液,通常亦称为 SRBC 悬液,白细胞可忽略不计。

2. 可溶性免疫原的制备 以人全血清+佐剂为例。

(1)选健康志愿者(学生)或献血员,静脉采血 5ml,放试管中置室温下使其自然凝集,凝集后离心取上清约 2.5ml。将多人(至少 2~3 人)的血清混合,即为可用的人全血清。

(2)将人全血清用生理盐水作 1:2~1:5 稀释。取所需量稀释血清加等量福氏完全佐剂,放入无菌乳钵内研磨成乳化物,形成油包水状态。

(3)研磨方法如下:将佐剂置研钵内,逐滴加入稀释血清,边加边研磨使其完全乳化。如为不完全佐剂,则先逐滴加入卡介苗研磨,使菌体完全分散乳化后再加入抗原研磨。研磨是经典的乳化方法,但乳钵壁上粘附大量乳剂会使小量的抗原损失过大。

亦可用两个注射器对接、将佐剂和抗原往复推拉;还可将佐剂放在磁力搅拌器上、边搅拌边滴加抗原。但这些方法都不易使佐剂和抗原乳化完全。

(4)乳化完全与否用以下方法进行鉴定:将一滴乳剂滴入冷水中,不管是漂在水面上还是沉入水底,如果不立即散开即为乳化完全。如果很快分散成云雾状或小颗粒,则为不合格,需继续研磨或搅拌,或者重新制备。

3. 动物准备 取 2~3kg 健康雄性家兔若干只(根据需要而定),先饲养观察数日,无疾病等特殊情况即可使用。将家兔分笼饲养,笼上挂标牌,注明免疫原、免疫程序及免疫途径等。

4. 免疫程序 根据不同的免疫原,所用免疫程序也不相同。

(1)SRBC 的免疫程序:见表 1-1。

表 1-1 兔抗 SRBC 抗体制备免疫程序

次序	日序(d)	注射量(ml)	注射途径	免疫原类型
1	1	0.5	皮内,分 3~4 点注射	羊全血
2	3	1.0	皮内,分 5 个点注射	羊全血
3	5	1.5	皮内,分 5 个点注射	羊全血
4	7	2.0	皮内,分 5 个点注射	羊全血
5	9	2.5	皮内,分 5 个点注射	羊全血
6	12	1.0	耳静脉注射	SRBC 悬液
7	15	1.0	耳静脉注射	SRBC 悬液

第 20 天试血,测凝集效价, $>1:2000$ 以上可放血。

另外,还可用快速免疫法,免疫程序见表 1-2。

表 1-2 SRBC 快速免疫程序

次序	日序(d)	注射量(ml)	注射途径
1	1	1	耳静脉注射
2	3	2	耳静脉注射
3	5	3	耳静脉注射
4	7	4	耳静脉注射
5	9	5	耳静脉注射

第 12 天试血,测凝集效价, $>1:500$ 以上可放血。

(2)人全血清+佐剂的免疫程序:见表 1-3。

表 1-3 抗人全血清制备程序

次序	日序	注射量	注射途径
1	第 1 天	1ml	家兔后足掌,每侧 0.5ml
2	第 14 天	1ml	腋窝淋巴结,每侧 0.5ml

第 22 天试血,双扩效价达 1:16 以上可放血。否则可用不加佐剂的免疫原 0.3ml 经静脉加强注射 1 次,1 周内测效价。

5. 采血 家兔采血有三种基本方法。①耳静脉采血法:小量采血时(如测试抗体效价等)应用此法;②心脏采血法:大量采血时应用,此法简便易行,可以使动物继续存活,如果进行加强免疫,饲养一段时间后可再行采血;③动脉放血法:可以最大限度地得到血清,但动物不能再存活。

6. 抗血清鉴定 对免疫动物试血和采血时,都要进行血清抗体性质和抗体效价的测定。颗粒性抗原的相应抗体效价多用凝集试验测定,可溶性抗原的相应抗体效价多用凝胶沉淀或凝胶电泳进行测定。沉淀试验和凝集试验的方法见以后章节,此处不予赘述。

结果和评价

1. 抗 SRBC 和抗菌免疫血清的凝集效价应 $>1:2000$ 。低于此效价说明免疫不成功,效价高时可达 $1:20000$ 以上。快速免疫程序常不能获得较高的抗体效价,但赢得了时间。

2. 抗人全血清抗体的双扩效价应达 $1:16$ 以上,用免疫电泳测定时可见 4~5 条沉淀线。

注意事项

1. 选择动物时,动物种系与抗原来源的差异越远越好;动物应健康,处于青壮时期,无特殊要求时最好为雄性。因有个体差异,故每种抗原最好免疫 2~3 只动物。

2. 制备压积红细胞时,应无菌操作,避免剧烈振荡,试管应洗涤洁净,充分干燥,以免发生溶血。

3. 全血清做抗原时要用混合血清,以避免个体差异带来的误差。

4. 红细胞和细菌等颗粒性抗原比较容易诱导免疫应答,可直接用来免疫动物;而血清等可溶性抗原则需要加入免疫佐剂,充分乳化,否则不易免疫成功。

5. 免疫时采用皮内多点注射易诱导免疫应答,提高血清的抗体效价。

6. 免疫间隔时间无固定模式,但一般可溶性抗原首次免疫和第二次免疫以间隔 10~20d 为宜。

临床意义

随着医学科学的不断发展,免疫血清的应用日益广泛,虽多有商品供应,但部分诊断血清及科研用血清常需自行制备。因此制备高纯度、高效价的免疫血清是实验室工作的基本技术之一,也是医学检验专业学生必备的基本技能之一。

思考题

1. 佐剂的种类有哪些? 主要成分是什么? 如何制备? 有何用途?
2. 为什么不同抗原免疫动物的途径和程序不同?
3. 检测抗血清效价的方法有哪些?

(朱光恒)

第二节 沉淀反应

一、凝胶双扩散试验

目的和原理

将对应的抗原与抗体放在琼脂凝胶板中的相应孔内,可各自向凝胶中自由扩散。当二者相遇时发生特异性反应,在浓度比例合适处形成可见的白色沉淀线。根据抗原与抗体的性质、纯度和比例的不同,沉淀线的形状、位置和数量不一。

要求掌握试验原理、方法和结果分析,熟悉其临床意义。

器材和试剂

1. 试验标本 待检人血清、阳性对照血清。
2. 主要试剂 羊抗人 IgG 诊断血清、15g/L 盐水琼脂等。
3. 主要器材 载玻片、吸管、打孔器、湿盒、微量加样器等。

步骤和方法

1. 浇板 用粗孔吸管吸取熔化的 15g/L 盐水琼脂 4.5ml,浇注于普通洁净载玻片上,要均匀、平整、无气泡、布满整个玻片。

2. 打孔 待琼脂凝固后(室温约需 15~20min),用直径 3mm 的打孔器打孔,使孔间距为 4~5mm。临床常用的孔型为梅花形,中间为抗体孔,四周等距排列 6 个抗原孔。

3. 加样 用微量加样器向中央孔加入抗体(羊抗人 IgG 诊断血清),向周围孔加入待测抗原,其中第 1、4 孔加入阳性对照血清,第 2、3、5、6 孔分别加入不同的待检血清。如用于检测抗体特异性时,中央孔加抗血清,四周孔加入不同的有关抗原;如进行抗体效价滴定时,则在中央孔加入抗原,四周孔加不同稀释度的抗血清。

4. 扩散 将加好样的琼脂板放入湿盒中(内有 5mol/L 的石炭酸湿纱布),置室温或 37℃ 1~2d,于 24h 和 48h 各观察和记录结果一次。

结果和评价

如果凝胶中出现白色沉淀线,说明抗原与抗体相对应。若抗原与抗体只含单一的对应成分,则形成一条沉淀线;若含多种对应成分,可形成多条沉淀线。沉淀线的位置因抗原和抗体的分子量、浓度比例、扩散速度等因素的不同而异。另外,若相邻抗原浓度相等,可出现对称相融的沉淀线;若不等,沉淀线移向低浓度一边。

在梅花孔型中,若相邻两条沉淀线完全融合,说明两孔内抗原完全相同;若相邻沉淀线部分融合,说明两抗原部分相同;若相邻沉淀线发生交叉,说明两抗原完全不同。

阳性结果多在 24h 以内出现,48h 不出现沉淀线可判为阴性结果。放置过久可使沉淀线消失。

此方法简便易行,结果稳定可靠;但灵敏度低,试验所需时间长,且只能定性,不能定量,仅适用于大量普查项目。

注意事项

1. 所用载玻片要洁净、边缘无破损,不然难以浇制琼脂板。
2. 缓冲琼脂的温度要适宜,温度过高浇板时易外溢,同时表面蒸发量大,琼脂板光洁度差;但温度过低则琼脂凝固过快,制板厚度不均匀,表面不光滑。

3. 浇制琼脂板时动作要迅速, 过于缓慢容易边加边凝, 使琼脂板凸凹不平。

4. 打孔时要小心, 勿使琼脂层脱离载玻片或琼脂板底层开裂, 以免加样时顺裂缝或底部散失。一旦出现裂缝或脱离现象, 可向孔内滴加少许温琼脂加以弥补。

5. 为了使沉淀线保持清晰度, 可在加样完毕将琼脂板置 37℃ 下形成沉淀线, 然后置室温或 4℃ 冰箱为佳。

临床意义

1. 根据沉淀线的位置、形状和数目, 可判断抗原的免疫学特异性及其纯度, 初步估计抗体的滴度和扩散速度等。

2. 琼脂双扩散试验在临床检验中曾用于诊断和分析某些疾病, 如检测 AFP、HBsAg 等; 但因其敏感性过低, 已被其他方法取代, 现仅适合于流行病普查等。

思考题

1. 分析自己所作的试验结果, 并认真给予合理的解释。

2. 琼脂双扩散试验主要可用于哪些方面?

(刘荣臻 高艳平)

二、凝胶单扩散试验

目的和原理

将一定量抗体混匀于琼脂凝胶内, 凝胶孔中加入抗原, 抗原向四周扩散的过程中与凝胶中的抗体发生反应, 在抗原与抗体比例合适处出现白色沉淀环。沉淀环直径的大小与孔中的抗原浓度成正比, 可从已知的标准曲线上查出待检标本中抗原的含量。

要求掌握试验原理、试验方法及结果分析, 熟悉其临床意义。

器材和试剂

1. 标本 待检人血清、免疫球蛋白工作标准(IgG 含量 10mg/ml)。

2. 试剂 羊抗人 IgG 诊断血清(单扩效价 1:60)、15g/L 盐水琼脂。

3. 器材 三角烧瓶、载玻片、打孔器、吸管、滴管、湿盒、水浴箱、微量加样器和半对数坐标纸等。

步骤和方法

1. 琼脂准备 吸取已融化琼脂 59ml 于三角烧瓶中, 置 56℃ 水浴保温, 将预温的羊抗人 IgG 诊断血清 1ml 与琼脂充分混合, 继续保温于 56℃ 备用。如果羊抗人 IgG 诊断血清的单扩效价不是 1:60, 试验时所需琼脂量与抗体量的比例应加以调整。

2. 浇板 取混有抗血清的琼脂液 4.5ml 浇注于载玻片上, 注意浇板要均匀、平整、无气泡、布满整张载玻片。

3. 打孔 待琼脂凝固后, 用打孔器打孔, 孔径 3.5mm, 孔距 10~12mm。孔要打得圆整光滑, 边缘不要破裂, 底部勿与载玻片脱离。

4. 加样 将待检血清用生理盐水做 1:40 稀释, 用微量加样器取稀释血清 10 μ l 加入相应的试验孔中。如同时测定多个标本, 注意做好标记, 认真记录, 不要搞混。

另外, 取免疫球蛋白工作标准 1 支加 0.5ml 蒸馏水溶解, 用生理盐水稀释成如下浓度: 1:10、1:16、1:20、1:32、1:40, 分别加入另一套孔中, 每孔中加 10 μ l, 用于制备标准曲线。

5. 扩散 将加样完毕的琼脂板放于湿盒中,置室温或 37℃ 24h 观察结果。

6. 绘制标准曲线 以各稀释度工作标准的沉淀环直径为横坐标,相应孔中 IgG 含量为纵坐标,在半对数纸上绘制标准曲线。

结果和评价

精确测量各试验孔沉淀环的直径,如果沉淀环不太圆,则取最大直径和最小直径的平均值。从标准曲线上查得相对应的 IgG 含量,乘以稀释倍数,即为待检血清中 IgG 的实际含量。

本方法比较稳定,易于操作;但观察结果等待时间较长,敏感度偏低,每次试验均需做参考血清的标准曲线。

注意事项

1. 浇制琼脂板的注意事项同前。
2. 每批实验均应同步绘制标准曲线。
3. 琼脂熔化后置水浴中保温时,温度不可超过 56℃,否则会使抗体变性;温度也不可过低,否则琼脂凝固而不能浇板。

临床意义

琼脂单扩散试验为定量测定法,因此常用于血清中 IgG、IgM、IgA、补体、白蛋白、蛋白酶等物质的定量测定,为临床诊断提供参考指标。

思考题

1. 为什么浇板时要求琼脂胶要均匀、平整、无气泡、布满整张载玻片?
2. 试验中更换不同批号的羊抗人 IgG 诊断血清时,为什么需重新制备标准曲线?
3. 试从不同角度分析琼脂双扩散试验与单扩散试验的区别。

(刘荣臻 高艳平)

三、对流免疫电泳

目的和原理

在偏碱性的缓冲环境和适当的直流电场中,大部分抗原带有较多的负电荷,向正极移动;而抗体(尤其是 IgG)在同样的环境中带负电荷较少,加上凝胶内较强的电渗作用,故抗体向阴极移动。在一定时间内(约 30~90min),移动的抗原和相应抗体在两孔间相遇并发生反应,在浓度比例适当时形成沉淀线。

本实验以测定血清中 AFP 为例,要求掌握实验原理、操作过程和结果分析;熟悉其临床应用及意义。

器材和试剂

1. 试验标本 待测人血清、阳性对照血清。
2. 主要试剂 AFP 诊断血清、pH8.6 0.05mol/L 巴比妥缓冲液、15g/L 琼脂巴比妥溶液。
3. 主要器材 电泳槽、电泳仪、孔型模板、打孔器、载玻片、吸管、微量加样器、吸球、滤纸和纱布条等。

步骤和方法

1. 配制试剂 按本书后的附录配制 pH8.6 0.05mol/L 巴比妥缓冲液和 15g/L 琼脂

巴比妥液并将后者加热熔化。

2. 制板 用粗孔吸管吸取已熔化好的巴比妥琼脂 4.5ml, 加到洁净载玻片上浇制成琼脂板。

3. 打孔 待琼脂凝固后成对打孔, 孔径为 3mm, 孔距为 10mm。

4. 加样 做好抗原和抗体的标记(例如在无关紧要的边缘打一小孔等), 按标记分别加入抗原、抗体及阳性对照。

5. 电泳 将加样完毕的琼脂板置电泳槽的支架上, 抗原孔置阴极端, 抗体孔置阳极端, 电泳槽内加 0.05mol/L pH8.6 的巴比妥缓冲液, 液面至槽高的 2/3 处, 琼脂板两端用滤纸条和纱布条与缓冲液相连。接通电源, 控制电流强度在 2.5~3.5mA/cm 板宽。电泳 30~90min 后, 切断电源, 取出琼脂板观察结果。

结果和评价

待测孔与抗血清之间出现沉淀线为阳性, 否则为阴性。

阳性结果的沉淀线位置与抗原和抗体分子的电荷情况有关, 也与抗原和抗体的比例有一定关系。

对流免疫电泳操作简便, 观察结果快, 敏感度比琼脂双扩散法高 8~16 倍。制作琼脂板时必须选择高电渗作用的普通琼脂, 还要选择高特异性、高亲和力的抗体, 否则结果难以解释。

注意事项

1. 浇制琼脂板的注意事项同前。

2. 搭桥时应注意与凝胶接触紧密, 否则会使电流不均匀, 致使沉淀线歪斜、不均匀。

3. 电泳完毕, 先断开电源(不仅关闭电源按钮, 一定要脱开电泳槽和电泳仪之间的连接线, 以防积蓄电压触电), 再取出电泳板。

4. 抗体或抗原要根据所标效价做适当稀释, 多做几个稀释度, 选择最适的比例关系。

临床意义

对流免疫电泳实际上是电场作用下的琼脂双扩散试验, 其检测项目的临床意义也与双扩散试验相似。

1. 在临床检验中曾用于定性检测某些抗原(例如 AFP、HBsAg 等), 现因敏感度不够已不常用。

2. 用于抗原的半定量测定, 或根据沉淀线的位置、形状做抗原和抗体相对浓度的分析。但该方法的分辨率较差, 当有多种抗原抗体系统存在时, 形成的沉淀线常形成重叠, 难以分辨清楚, 所以用作此目的时, 反倒不如琼脂双扩散试验。

思考题

1. 在此试验中, 抗体为什么会泳向阴极?

2. 为什么抗原-抗体要选择适当的比例?

(刘荣臻 高艳平)

四、火箭电泳

目的和原理

将凝胶单扩散的琼脂板置入直流电场, 板孔中的抗原会在含有抗体的离子琼脂中向

正极泳动,并与抗体发生反应,在泳道上形成可见的沉淀带。泳动中的抗原浓度越来越小,沉淀带越来越窄,直至全部抗原与抗体结合,形成一个尖尖的沉淀峰。整个沉淀带的形状呈火箭样,故名火箭电泳。抗原含量越高,火箭峰越长。

要求掌握火箭电泳的原理,熟悉其操作方法及其在临床上的应用。

器材和试剂

1. 标本 待检人血清、阳性血清(脐带血清)。
2. 试剂 抗AFP抗体、pH8.6 0.05mol/L 巴比妥缓冲液、精制琼脂粉或琼脂糖等。
3. 器材 电泳槽、电泳仪、打孔器、水浴箱、玻璃板、吸管、三角烧瓶和微量加样器等。

步骤和方法

1. 常规配制 pH8.6 0.05mol/L 巴比妥缓冲液,称取 1.5g 精制琼脂粉或琼脂糖加到 100ml 缓冲液中,在三角烧瓶内加热融化。

2. 将融化好的琼脂置 56℃ 恒温水浴中预温,待温度平衡(琼脂胶温度为 56℃)后,将抗 AFP 抗体加到琼脂液中,二者比例为 1:30。摇匀后迅速浇制琼脂板。如果技术熟练,可用三角烧瓶直接向玻璃板上倾倒琼脂溶胶。

3. 待琼脂凝固后在琼脂板的一端(距板端约 5mm)打孔,孔径 3mm,孔间距 6~8mm,孔的数目根据需要而定。

4. 向每孔加入不同稀释度的待检血清,其稀释倍数分别是 5、10、20、40、80。另外,向另一板的孔中加入系列已知浓度的阳性血清或其他抗原,用来绘制标准曲线。

5. 电泳槽内加入 pH8.6 0.05mol/L 巴比妥缓冲液至槽高的 2/3 处。将加样完毕的琼脂板置电泳槽的支架上,将打孔加样端置阴极,用滤纸或纱布条将凝胶板与电泳液相连。接通电源,调整电流强度在 2~4mA/cm 板宽。电泳 1~2h 可见火箭峰的出现。

6. 电泳结束后,切断电源,取下琼脂板,如沉淀峰清晰可见,可直接判读结果,否则将琼脂板浸入 10g/L 鞣酸生理盐水中 10min,可使沉淀峰更明显。如欲永久保留,可将琼脂板进行染色干燥处理。

结果和评价

1. 首先测量已知抗原的火箭峰高度,然后与对应浓度作图,绘制出标准曲线。待测样品的定量可根据峰高从标准曲线上查出。

2. 火箭峰高度与孔中抗原浓度呈正相关,与凝胶中抗体浓度呈负相关。但抗原浓度过高则在琼脂板上看不到峰顶;而抗体浓度过高则沉淀峰太低,降低试验的敏感度。

3. 沉淀峰呈尖角状表示无游离抗原,泳动已到终点;前端呈钝圆形或云雾状则表示还未到终点,应继续电泳。

4. 用多价抗血清时每个火箭可出现多个子峰;抗原与抗体比例不适合或电泳条件不适当时不出现火箭峰。

5. 与前述几个电泳方法相比,火箭电泳操作简便省时,结果重复性好,检测灵敏度可达 0.3μg/ml。

6. 如在抗原标本中加入微量放射性核素,电泳后具有放射性的沉淀带在暗室中可使胶片感光,感光峰比凝胶中肉眼可见的火箭峰高得多——此法称火箭电泳放射自显影,检测灵敏度可提高 40~60 倍。

注意事项

1. 凝胶单扩散中的注意事项在此均适用,例如加入抗体时要严格掌握琼脂胶的温度,抗原与抗体的浓度应预先试验。
2. 应选择电渗作用最小的精制琼脂粉或优质琼脂糖来制备凝胶,而不用普通琼脂。
3. 打孔完毕,可先将琼脂板放在电泳槽上,低电流通电后再加样,加样后立即加大电流。这样可防止抗原液向孔四周扩散,使火箭峰形状良好,敏感性增加。这一做法适用于所有打孔加样的凝胶电泳。
4. 使用低电压、低离子强度、电泳时间长些,效果会更好。

临床意义

如有相应的特异性抗血清,大多数蛋白质均可用这一方法进行测定。定量的可靠性依赖于抗血清的质量。

火箭电泳适用于测定那些在 pH8.6 以上环境中带负电荷的蛋白质,IgG、IgA 等在 pH8.6 条件下净电荷几乎等于零,因此要使 IgG、IgA 等在电场中也向正极泳动,应先经乙酰化、甲酰化或氨甲酰化处理来增加它们的负电荷。

甲酰化方法:取待检血清若干,用 0.36% 甲醛稀释至分析要求的浓度,室温 30min,即可使蛋白质分子中的氨基与甲醛发生缩合反应,该反应抑制了蛋白质分子中碱性基团的解离,使其形成某种酸,因此在 pH8.6 的碱性条件下增加了其负电荷量。

思考题

1. 火箭电泳试验的火箭峰是怎样形成的?
2. 抗体应加在何液中? 加入时温度是多少。

(刘荣臻 高艳平)

五、免疫电泳

目的和原理

免疫电泳(immunoelectrophoresis, IEP)是琼脂区带电泳和凝胶双扩散相结合的一种免疫技术。试验时先进行琼脂凝胶电泳,将样品中不同分子量和不同电荷的组分分离成若干区带;然后与电泳方向平行挖一小槽,加入含相应抗体的免疫血清,与已分离的各抗原成分在琼脂中作双向免疫扩散。各区带蛋白在相应位置与抗体形成弧形沉淀线。根据沉淀弧的位置、数量和形态,可分析样品中所含抗原成分及其性质。

本试验以鉴定人血清 IgG 提取物的纯度为例,掌握免疫电泳的原理及操作方法,熟悉其结果分析及临床应用。

器材和试剂

1. 标本 正常人血清、待鉴定的人 IgG 提取液。
2. 主要试剂 兔抗人全血清、pH8.6 0.05mol/L 巴比妥缓冲液、12g/L 琼脂巴比妥液凝胶、凝胶指示剂(葡萄糖 0.5g 和氨基黑 10B 0.1g 溶于 20ml 巴比妥缓冲液中)等。
3. 主要器材 电泳仪、电泳槽、37℃ 温箱、恒温水浴箱、水平台等;载玻片、吸管、3mm 打孔器、孔型样板、尖头棉签棒、毛细滴管、手术刀片、湿盒等。

步骤和方法

1. 琼脂板制备 加热熔化巴比妥琼脂胶,用粗口吸管吸取 4ml 琼脂胶于载玻片上,浇注到置于水平台上的洁净载玻片上。凝固后按孔型样板打孔、开槽。槽可用刀片划制,也可用模具在浇注前放到载玻片上;打孔开槽时要求外壁整齐,防止琼脂破裂。制成后琼脂板厚约 1.5mm,孔径 3mm(可加样品 10 μ l),槽宽 1.5~2mm。

2. 加样 用微量加样器吸取正常人血清和待检的人 IgG 各 10 μ l 分别加入两个样品孔中,注意不要外溢。为便于观察样品泳动位置可在正常人血清中加微量氨基黑染液。

3. 电泳 将琼脂板置于电泳槽内进行电泳。控制端电流 2~4mA/cm 板宽,当蛋白指示剂泳动至距槽端 1.0cm 时,可终止电泳(约 1.5h)。

4. 双扩散 电泳后取出琼脂板,向槽中加入预温的琼脂胶封底。用毛细滴管加入抗人全血清,充满槽内,勿使外溢。将板平置湿盒内,置 37 $^{\circ}$ C 温箱扩散 24h 后观察结果。

结果和评价

1. 观察已分离的血清抗原成分与相应抗体形成的沉淀弧。根据正常人血清各蛋白成分所处的电泳位置可分为白蛋白(A1b)区、球蛋白 α 区、 β 区和 γ 区。待鉴定的提纯人 IgG 的沉淀弧应主要在 γ 区,并可延伸到 β 区,甚至 α 区。如出现两条以上沉淀线,则指示提取物不纯。

2. 若抗原抗体反应形成的沉淀线很弱,肉眼难见,可将琼脂板用生理盐水浸泡 10h(其间应换液数次),以去除未反应的蛋白。再将板浸入 10~40g/L 鞣酸水溶液中,10min 后取出观察,可增加沉淀线的清晰度。

3. 如欲制作染色标本,可将琼脂板浸泡于生理盐水中 24~48h,其间换水 2~3 次,以除去未反应的蛋白,再用蒸馏水浸泡 2h 除盐,然后于板上覆盖用水浸湿的棉布一块,置 37 $^{\circ}$ C 温箱过夜,使其干燥,再浸入氨基黑染液中染 10~20min,用脱色液脱色,保存。

4. 免疫电泳的主要优点不仅是加快沉淀反应的速度,而且样品用量少、特异性和分辨率高,可鉴定混合样品中的不同抗原组分。但免疫电泳技术的分辨率也受很多因素的影响,如抗原抗体比例、抗血清的抗体谱、以及影响区带电泳的各种因素:缓冲液、琼脂、电流等。

注意事项

1. 抗原与抗体均不能溢出孔或槽外,防止沉淀线弯曲。

2. 抗原抗体比例需适当,抗体过多时清晰的沉淀带减少;抗原过多会出现弧线融合或消失。所测抗原的蛋白含量一般应在 20g/L 以下,若过高需用缓冲液稀释。

3. 为防止电泳后两个缓冲槽中缓冲液的 pH 与离子强度有所改变,每次电泳后应更换阴阳电极,或将两槽中的缓冲液混合。

临床意义

免疫电泳主要应用于复杂抗原和抗体成分的分析、或其提取物的纯度鉴定。临床上常用于骨髓瘤、 γ -球蛋白缺乏症、肝脏疾病、白血病、系统性红斑狼疮等患者血清蛋白成分的分析。

思考题

1. 简述免疫电泳的原理及特点。
2. 为什么每次电泳后要调换电极?

3. 在免疫电泳中,如果出现沉淀弧数目与混合物中应有的成分不相等时,试分析产生这种现象的原因。

(余 平)

六、免疫浊度测定

目的和原理

抗原和抗体在液相中反应,所形成的免疫复合物使液相出现浊度,复合物的量与浊度呈正相关。这种浊度可以反射、散射和吸收入射的光线,使人射光衰减。因此可通过测定透射光衰减(以 A 值表示)或散射光强度来检测抗原抗体反应,本试验以常用透射比浊法检测人血清 IgG 为例。在反应系统中保持抗 IgG 抗体过量时,所形成的免疫复合物与血清 IgG 量呈正相关,而形成的浊度大小与入射光的衰减呈正相关,因此测定 A 值可反映液相中的抗原量,通过参照标准曲线或标准品数值的计算,即可得知待检血清中 IgG 含量。

掌握免疫浊度测定的原理,熟悉其操作方法,了解其意义及应用。

器材和试剂

1. 标本 待检人血清、标准血清(混合正常人新鲜血清)、人 IgG 标准品(或冻干人血清 IgG 参考标准)。
2. PEG 溶液 PEG 6000~8000 4.0g、NaF 1.0g、NaHPO₄·12H₂O 10.15g、NaH₂PO₄·2H₂O 1.0g、NaN₃ 0.1g,加蒸馏水至 100ml。
3. 其他试剂 羊抗人 IgG 抗血清、生理盐水、蒸馏水等。
4. 主要器材 分光光度计(721 或 731 等)、水浴箱、微量移液器、刻度吸管、试管等。

步骤和方法

1. 系列标准管准备 用生理盐水稀释人 IgG 标准品或人血清 IgG 工作标准,使其浓度分别为 5.5g/L、11.0g/L、22.0g/L、44.0g/L(浓度可根据不同制剂略有变动)。取上述 IgG 标准液各 10 μ l,分放于 4 个试管中;另取生理盐水 10 μ l,放于第 5 支试管中,作为空白对照。分别做好标记。
2. 血清管准备 将待检血清和标准血清均做 1:10 稀释(0.1ml 血清+1.0ml 生理盐水),各取 10 μ l 分放于预先标记的试管中。
3. 抗体准备 用 PEG 溶液稀释羊抗人 IgG 抗血清,注意保持适宜的抗体浓度。
4. 抗原抗体反应 向各标准管和血清管中分别加入稀释抗血清,混匀后至 37℃ 水浴 30min。
5. 测定 用分光光度计进行测定,使用 340nm 波长,用生理盐水校正零点。逐次测定各标准管和血清管,准确读取和记录各自的 A 值。

结果和评价

1. 以 4 个浓度 IgG 标准品的 A 值为纵坐标,以其分别的 IgG 含量为横坐标,绘制出标准曲线。各血清管的 IgG 含量可从标准曲线上查得。标准血清的 IgG 含量应该处于正常参考值的范围以内,否则应考虑实验结果可能有问题。

2. 也可用分段直线计算法得到结果,举例如下:

标准管序号	1	2	3	4
标准管 IgG 含量(g/L)	5.5	11.0	22.0	44.0