

第六章

沉淀反应

(Precipitation)

定义

- 可溶性抗原 抗体



沉淀反应特点

- 可溶性抗原
 - 二个阶段 结合阶段 速率法
 免疫复合物 终点法
- **R型抗体 H型抗体**

液体内沉淀试验

- 絮状沉淀试验(**flocculation**)

抗原稀释法 **Dean-Webb test**

抗体稀释法

环状沉淀试验

表12-1Dean-Webb定量沉淀试验

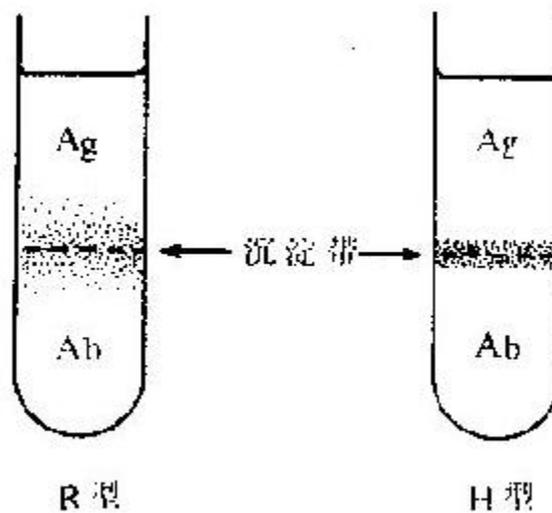
管号	抗原	抗体	总沉淀量	反应过剩物	抗原沉淀量	抗体沉淀量	沉淀中Ab/Ag
1	0.003	0.68	0.093	Ab	0.003	0.090	30.0
2	0.005	0.68	0.145	Ab	0.005	0.140	28.0
3	0.011	0.68	0.249	Ab	0.011	0.238	21.7
4	0.021	0.68	0.422	Ab	0.021	0.401	19.1
5	0.032	0.68	0.571	Ab	0.032	0.539	16.8
6	0.043	0.68	0.734	—	0.043	0.691	16.1
7	0.064	0.68	0.720	Ab	—	—	—
8	0.085	0.68	0.601	Ag	—	—	—
9	0.171	0.68	0.464	Ag	—	—	—
10	0.341	0.68	0.368	Ag	—	—	—

表12-2方阵最适比测定

抗体稀释度	抗原稀释度								
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/12	对照	
1/10	+	++	+++	+++	++	+	±	—	—
1/5	+	++	++	++	+++	++	+	—	—
1/20	+	+	++	++	+++	++	+	—	—
1/40	—	±	+	+	++	+++	++	+	—
1/80	—	—	—	—	+	+	+	+	—

环状沉淀试验

****Ascoli test**



• 免疫浊度测定(immunospectrophotometry)

可溶性抗原
一定分子大小的免疫复合物 浊度
自动化分析

方法:

速率法 与 终点法

透射比浊
散射比浊
速率散射比浊

入射光



透射光+散射光

(散射比浊测定)

检测器

检测器

(浊度测定)

影响因素:

抗原抗体比例
抗体的效价、特异性、亲和力
缓冲体系 (PH、离子、增浊剂)

凝胶内沉淀反应

- 特点:

凝胶为反应基质载体

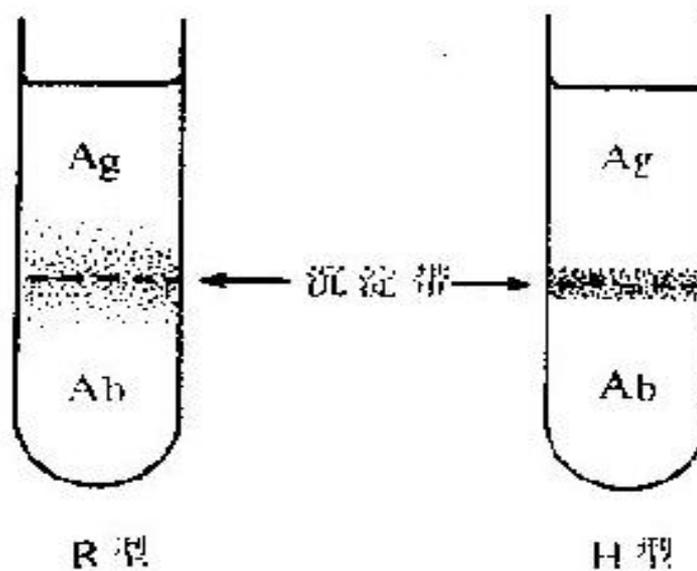
简单、方便

沉淀线 分子筛效应

单向扩散

抗体-凝胶 待测抗原

1、试管法



2、平板法 (single radial immunodiffusion, SRID)

环直径 面积 定量分析

条件：单价特异性抗血清
标准品
最低敏感性 $1.25\mu\text{g/ml}$

A: Mancini曲线 $K=C/d^2$

**C=抗原浓度,
d=沉淀环直径,
K=常数

大分子 长时扩散

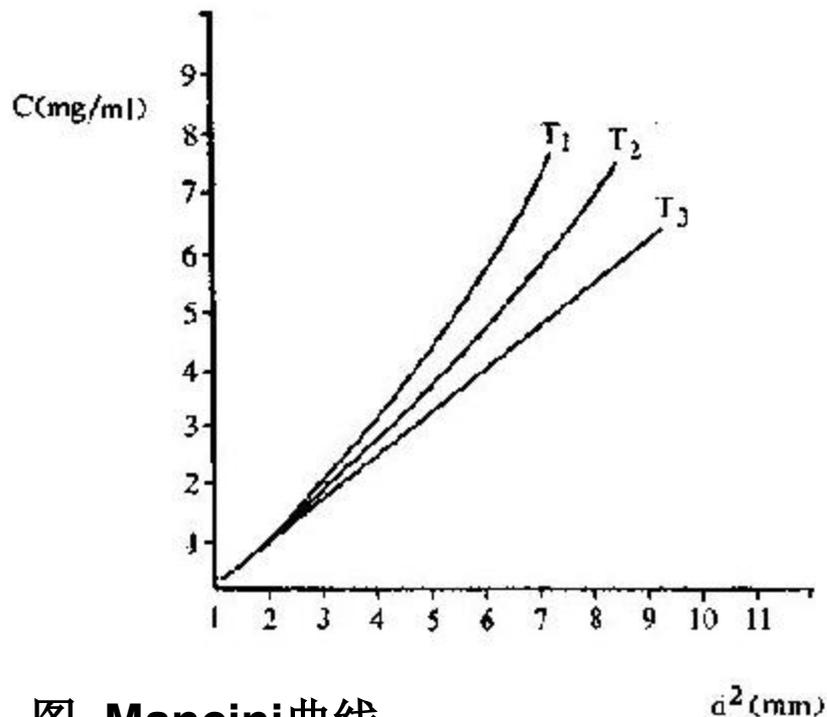


图 Mancini曲线

T₁为16h; T₂为24~48h; T₃为48h以上;
可见T₃为直线, T₁为反抛物线

- **B: Fahey曲线**
 $K=\log C/d$
- 小分子 短时扩散
- 临床应用
- 影响因素:
抗体---亲和力
标准品及质控血清
临床样本要求

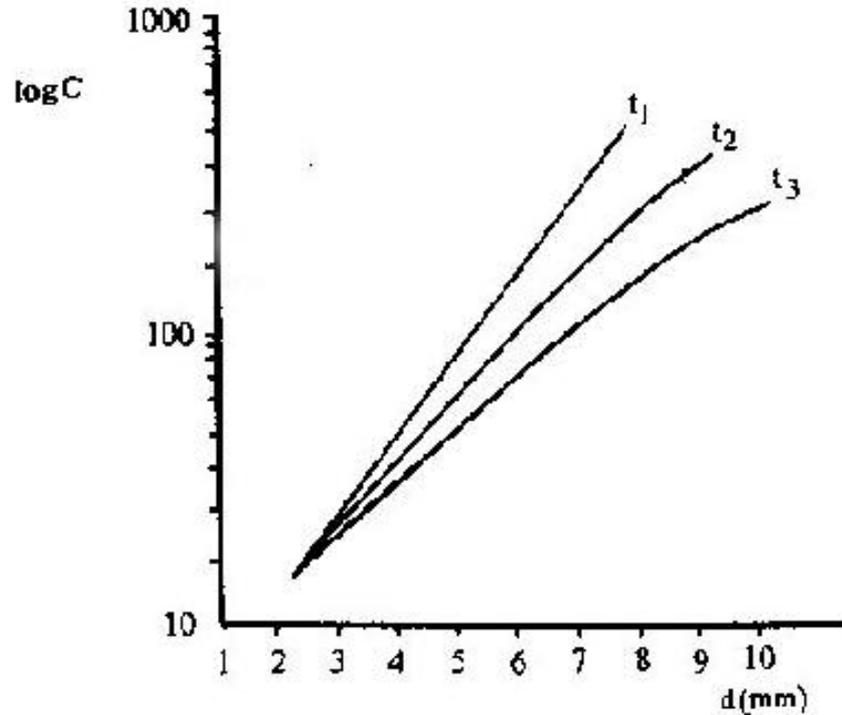
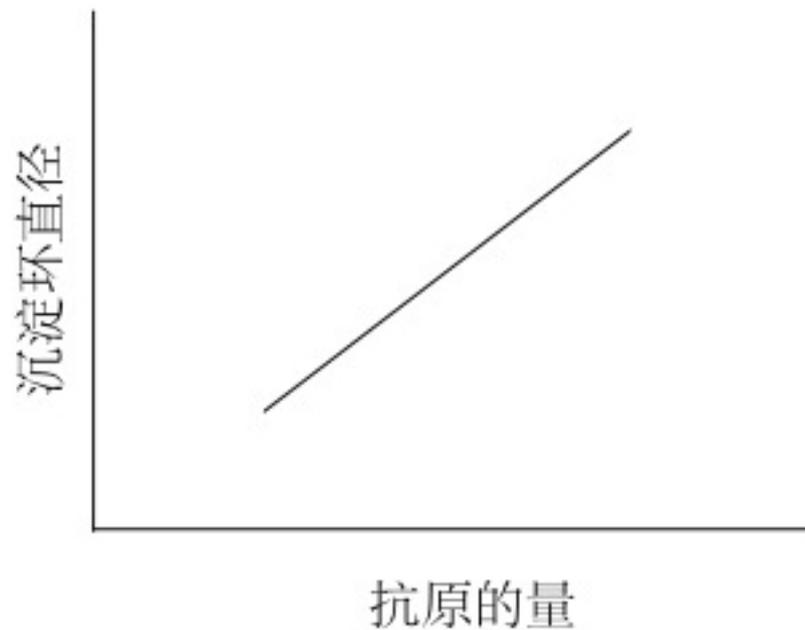
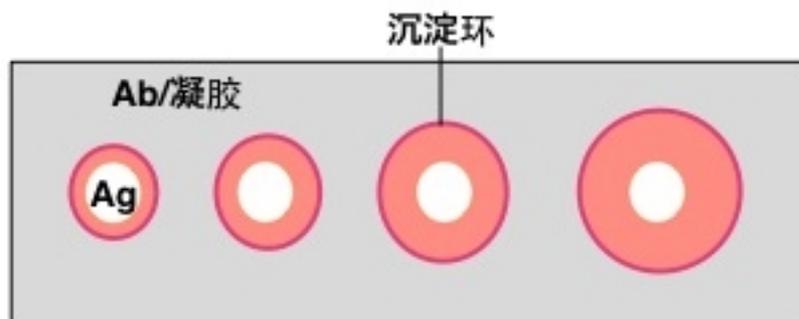


图 Fahey曲线
t1为16h; t2为24-48h; t3为48h以上
可见t1为直线, t3为抛物线

单向扩散试验



双向扩散试验

定性 抗原抗体合适浓度处形成沉淀线

1、试管法

2、平板法

基本方法

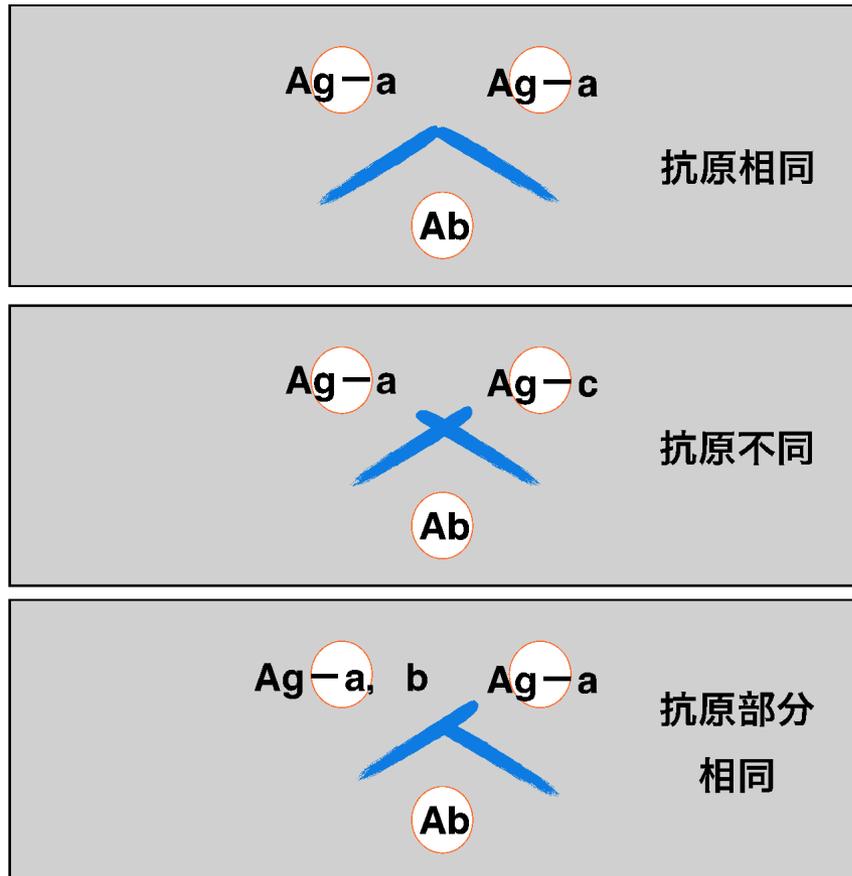
结果分析 **A:** 抗原抗体定性及相对量的估计

B: 抗原抗体相对分子量

C: 抗原的性质

D: 抗体效价的滴定

双向扩散试验



免疫电泳技术

- 基本原理：凝胶内电泳 免疫扩散
- 特点：反应的特异性 高分辨率 微量 快速
- 方法：对流免疫电泳、火箭免疫电泳、交叉免疫电泳、免疫电泳、免疫固定电泳

- ** 电解质和蛋白质的两性电离特性

-COOH -NH₂

等电点溶液 蛋白中性 原位

酸性溶液 正电荷 阴极移动

碱性溶液 负电荷 阳极移动

一般电泳 阴极----- 阳极

- 电泳迁移率 同一电场下，单位时间内的移动距离
- 电渗 电场中液体对固体的相对移动。

碱性缓冲液中载体：负电荷

水分子： 正电荷 ---- 向负极移动

影响因素：载体特性 缓冲液离子强度 电场电压

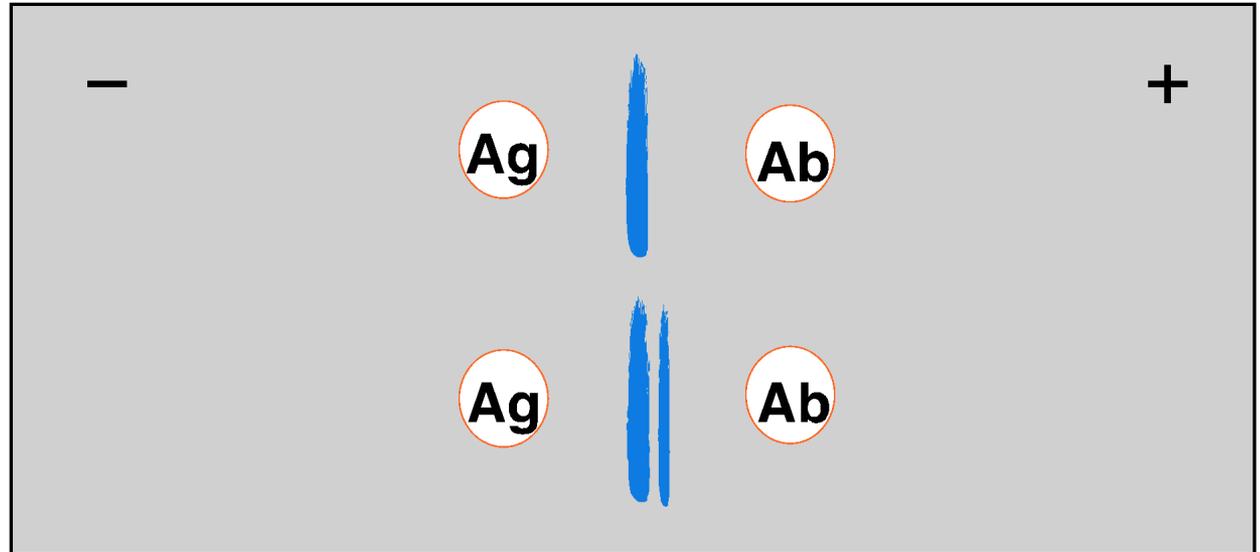
- **对流免疫电泳(counter immunoelectrophoresis, CIEP)**

双扩+电泳

缓冲液PH>8.4 蛋白抗原 负电荷 (负极)

IgG (IgG1 / IgG2) 电渗 (正极)

敏感性: $\mu\text{g/ml}$

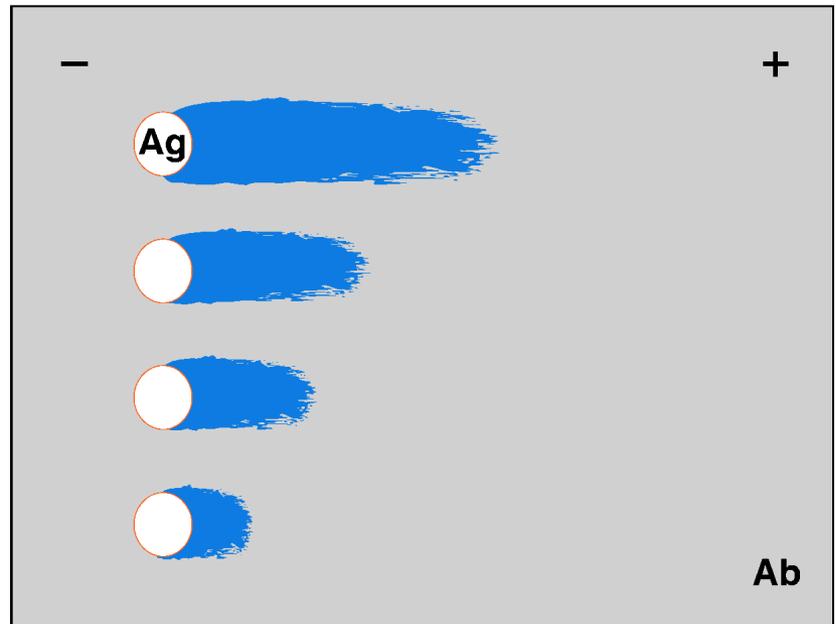


• 火箭免疫电泳

(Rocket immunoelectrophoresis, RIE)

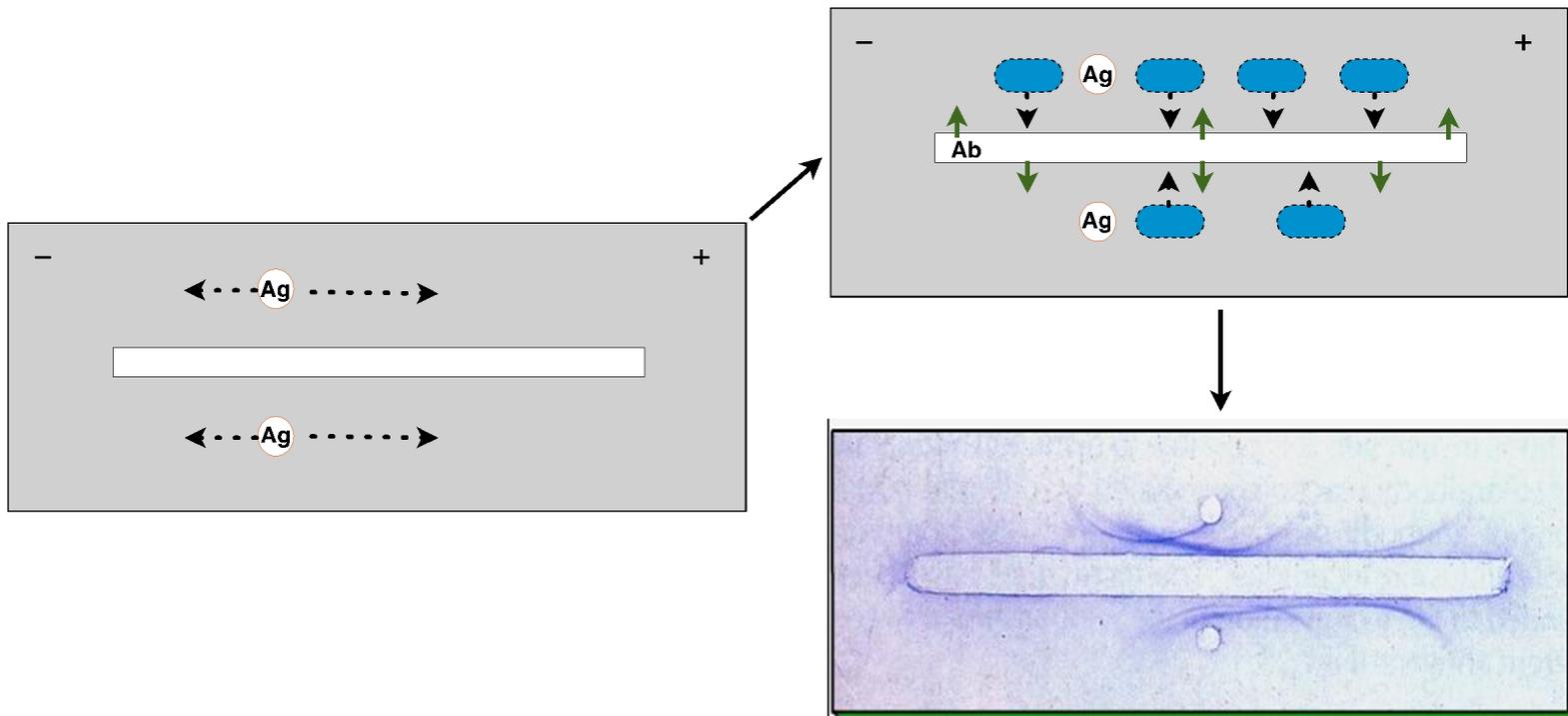
单扩+电泳

注意点：载体电渗小
终点时间的确定
IgG电泳要甲酰化
*免疫自显影技术



免疫电泳 (immunoelectrophoresis)

电泳 + 双扩



免疫电泳 (immunoelectrophoresis)

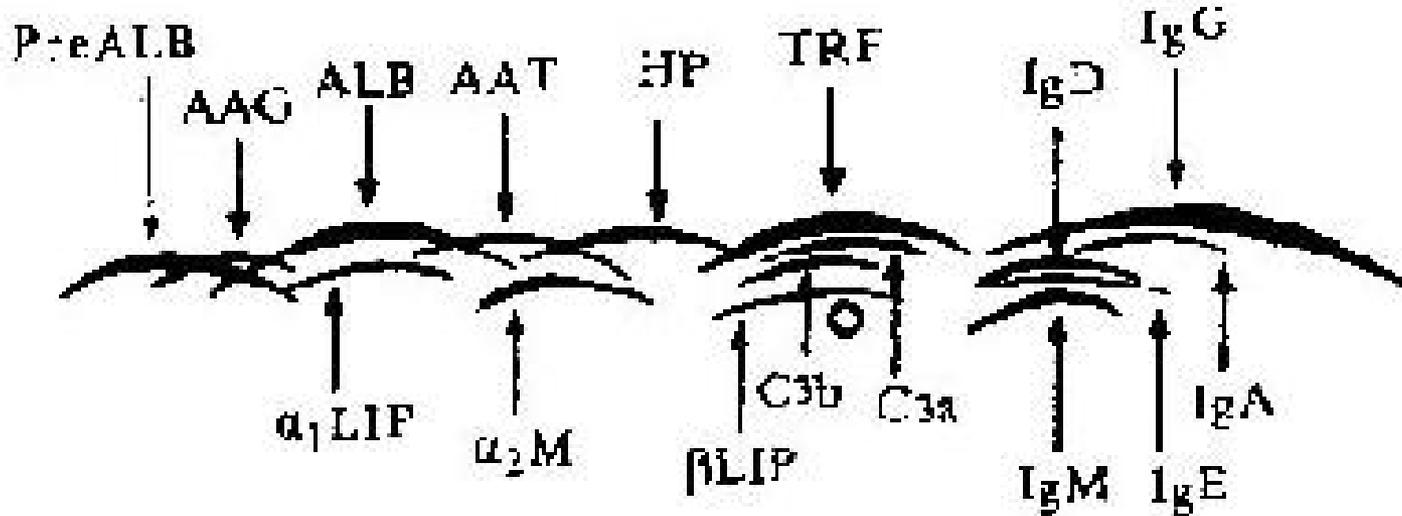
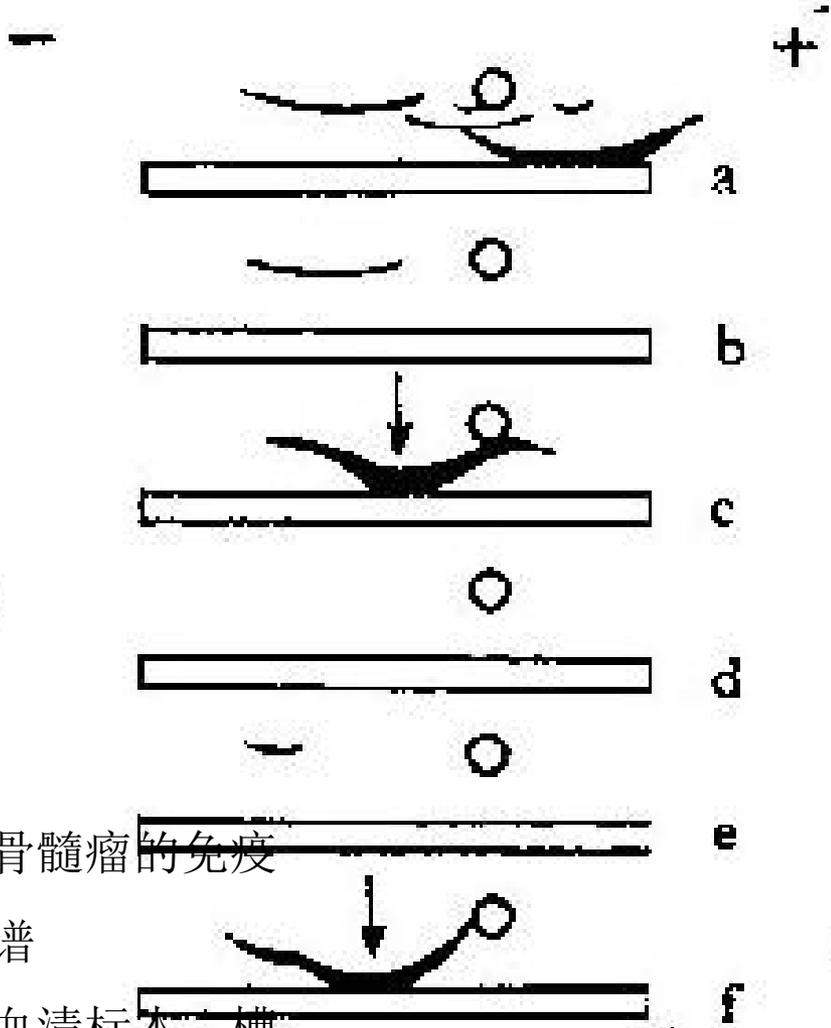


图12-9血浆蛋白各区带位置示意图

PreALB: 前白蛋白; HP: 触珠蛋白; α_1 脂蛋白; ALB: 白蛋白; TRF: 转铁蛋白

β LIP: β 脂蛋白; AAT: 抗胰蛋白酶; AAG: 酸糖蛋白; α_2 M: α_2 巨球蛋白

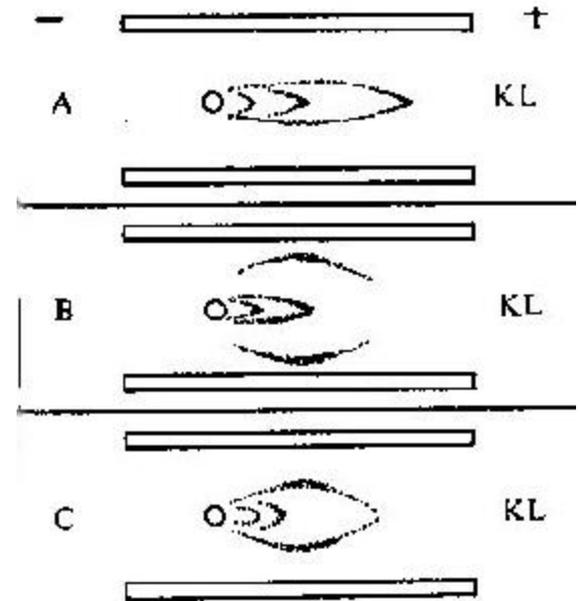


IgA λ 型骨髓瘤的免疫电泳图谱
 孔中为血清标本，槽中为抗血，
 箭头所指为骨髓瘤蛋

免疫选择电泳

- 将含抗 κ 或 λ 血清的琼脂制成薄层琼脂板，打孔后加入待测血清或其他标本进行火箭电泳，与标本相应的免疫球蛋白形成火箭样沉淀峰。然后于孔的两侧各挖一槽，加入某型免疫球蛋白的抗血清或另一型轻链抗血清，温育扩散后，按沉淀弧形成的情况，进行分析鉴定。

- 图为 α 重链病和IgA骨髓瘤的结果。
- 免疫选择电泳图谱示例孔中为血清标本，槽中为抗IgA重链抗血清
- KL表示琼脂中含抗 κ 及抗 λ 抗血清
- A: 正常人；
- B: α 重链病；
- C: IgA骨髓瘤



- 免疫固定电泳 (immunofixation electrophoresis, IEF)

先区带电泳 + 免疫沉淀

应用：各类免疫球蛋白及其轻链分析

M蛋白鉴定 轻链病

方法：琼脂凝胶电泳

染料：四氮唑盐

