

# 免疫學實驗

趙大衛 國立中山大學生物科學系

## 壹、免疫細胞的鑑別與計數

人類的血液是由血球及血漿所組成。血球包括紅血球 (red blood cells, RBC, erythrocytes)、白血球 (white blood cells, WBC, leucocytes) 及血小板 (platelets)。免疫細胞主要是白血球，可以分為顆粒性白血球 (granulocytes) 及無顆粒白血球 (agranulocytes) 兩大類；前者包括鹼性球 (basophils)、中性球 (neutrophils) 和酸性球 (eosinophils)，後者包括淋巴球 (lymphocytes) 和單核球 (monocytes)。在不同的健康狀況下，或被帶不同抗原的病原體感染時，各種白血球的比例會發生變化，故藉由白血球的檢查，即可對人的健康狀況有一初步的了解。

組織學家 (histologists) 通常用 Wright-Giemsa 染色法來鑑定和研究人類血球細胞。Wright-Giemsa 染劑為混合甲基藍 (methylene blue)、甲基天藍 (methylene azure) 以及二者的伊紅化合物 (eosinates) 而成的。天藍為鹼性染劑，可將細胞內嗜鹼性部分染為藍色，伊紅化合物為酸性染劑可將細胞內嗜酸性部分染為紅色。由於染劑為綜合性染劑，且細胞對不同的染劑有不同的親和性，所以各部分亦呈現不同的顏色。Wright-Giemsa 染劑一般在中性略偏酸 (pH6-7) 的環境下染色，不同的血球細胞各有其獨特的形態及顏色，很容易鑑定。

各種免疫細胞的特徵如下述：

- (1)中性球：為最常見的白血球細胞，約佔 55-75%左右。細胞呈圓形，直徑 9-12  $\mu\text{m}$ ，細胞質呈淡粉紅色，具有微含紅的淡紫色特定小粒 (specific granules)，另有少許較大的淡紫色嗜天青小粒 (azurophil granules)。細胞核呈深紫色，一般分 3 至 5 葉，各葉間由纖細的線狀染色質 (chromatin) 連接，年輕的中性球細胞核不分葉，故又稱做帶狀中性球 (band neutrophils)，成熟而有多葉核的中性球則稱為節狀中性球 (segmented neutrophils)，中性球也因多變化的核而被稱做多形核白血球 (polymorphonuclear leucocytes)。
- (2)酸性球：因對酸性染劑有高度的親和力而得名，約佔白血球數目 1-5%。細胞圓形，直徑約 10-14  $\mu\text{m}$ ，細胞核通常為二葉、深紫色，葉與葉之間由線狀至帶狀的染色質相連，細胞質內具有甚多橘紅色大顆的嗜伊紅小粒 (eosinophil granules)，這些小體功能上屬溶體 (lysosomes)。
- (3)鹼性球：因對鹼性染劑有高度親和力而得名，數目甚少，僅佔全體白血球的 0.5%，大小約 10  $\mu\text{m}$ 。細胞核為紫色，圓形、凹入圓形、帶狀、或葉狀。細胞質內具有眾多功能不明的深紫色嗜鹼性小粒 (basophil granules)。
- (4)淋巴球：在全體白血球種類中，數目佔第二位，約 20-40%。大小變化很大，一般約在 7-15  $\mu\text{m}$  之間。其主要特徵在於其比例上大而圓的細胞核，細胞質則甚少。核一般染成深紫色，且呈團塊狀分佈，細胞質藍色。

(5)單核球：外形類似大淋巴球，12-15  $\mu\text{m}$ ，佔白血球的 3-8%。細胞為圓形至卵形，時有偽足 (pseudopod)。細胞核為圓形或腎臟形，染色較淋巴球的細核略淡，且不呈團塊狀分佈。細胞質為灰藍色，含少數紫色的小粒。

此外，血液中常見的血球尚有紅血球及血小板。紅血球每毫升約五、六百萬個，人類紅血球為呈雙凹的圓盤狀細胞，無核，直徑約 7.5  $\mu\text{m}$ ，邊緣厚約 1.9  $\mu\text{m}$ 。Wright-Giemsa 將紅血球染成粉紅色，中間顏色較淡。血小板為微小，不規則的細胞碎片，每毫升約有三、四十萬個，主要功能是受傷後使血液凝結，約 1-4  $\mu\text{m}$  大小，染成藍色或紫色。

### 實驗步驟：

(一)實驗時以採血針 (lancet) 刺食指或中指取血，將一小滴血置於載玻片的一端，再用另一張載玻片斜推而成薄片塗抹 (thin smear)。

●注意：刺血針只能使用於一個人，並且只能用一次，以確保衛生安全。

(二)Wright-Giemsa 染色法：

等自然風乾後，加約 1 毫升的 Wright-Giemsa 染劑於塗片上約 1 至 3 分鐘，再加 2 毫升的蒸餾水或磷酸緩衝液 (phosphate buffer, pH7.2) 稀釋 (見 ●說明)，靜置雙倍時間 (2 至 6 分鐘) 後，以水洗至玻片呈粉紅色為止，風乾後置於顯微鏡下觀察。

●說明：如果是用水來稀釋 Giemsa 的原液，其染色效果較不穩定，而且容易產生沉澱物，特別是染色體上的染色帶 (Chromosome band)，如果不用緩衝液稀釋，染色帶就不易呈現。

(三)觀察紅血球、帶狀中性球、節狀中性球、酸性球、鹼性球、淋巴球、單核球、及血小板各一至數個。

(四)確定學會如何分辨各種白血球之後，數一百個白血球，看各種白血球的百分比，共數三次後平均，即為白血球區別計數 (WBC differential count)。

(五)另外製備其他動物的血液塗片數片，做血球形態的比較觀察。

## 貳、血型的鑑定

人類的血型有十多種，一般大眾較為熟稔者，是 ABO 血型與 Rh 血型，這兩種血型在免疫學、生理學及遺傳學上都很重要。

### 一、ABO 血型

ABO 血型有 A 型、B 型、AB 型和 O 型。A 型者其紅血球表面有某種特定的醣蛋白 (glycoprotein)，叫做 A 抗原；B 型者則有另一種醣蛋白，叫做 B 抗原；AB 型者其紅血球表面兼有 A 抗原和 B 抗原；O 型者則兩者抗原都付闕如。ABO 血型可以遺傳，其對偶基因有  $I^A$ ， $I^B$  和  $i$ ，故屬複 (multiple) 對偶基因。A 抗原是基因  $I^A$  的產物，B 抗原則是基因

$I^B$  的產物，基因  $i$  不會產生抗原。 $I^A$  與  $I^B$  對  $i$  皆為顯性，故稱為共顯性 (codominance)，基因型為  $I^A I^B$  者，兩種抗原皆能產生，血型為 AB。基因型為  $I^A I^A$  或  $I^A i$  者，血型為 A 型；基因型為  $I^B I^B$  或  $I^B i$  者，血型為 B 型； $ii$  者則為 O 型。

ABO 血型，除了紅血球表面有抗原外，在血漿中尚抗體。A 型者有抗 B 抗體，B 型者有抗 A 抗體，O 型者兩種抗體皆具有，AB 型者兩種抗體皆無。A 抗原與抗 A 抗體相遇時，紅血球便會凝集；B 抗原與抗 B 抗體相遇時，紅血球也會凝集，因此在輸血時，供血者與受血者都必須先鑑定血型，根據抗原的種類，便可利用含有抗體的血清來鑑定血型。

血型鑑定有時也被用來解決親子關係的紛爭，不過 ABO 血型並不能肯定證明親子的關係，僅能將不可能的親子關係排除，如父母皆為 A 型也可能生出 O 型的孩子。除 ABO 血型外，多鑑定幾種其他的血型，就有助於補足單以 ABO 血型確定親子關係之不足。

## 二、Rh 血型

Rh 血型的名稱，是由恒河猴的屬名 *Rhesus* 而來，因為這種血型的抗原，最初是從恒河猴的血液中發現。Rh 血型的抗原至少八種，通常稱之為 Rh 因子 (Rh factors)，其中最重要者是 D 抗原。具有抗原者稱  $Rh^+$  (陽性)，不具抗原者為  $Rh^-$  (陰性)。與 ABO 血型不同者，是 Rh 血型在血清中沒有抗體。但是， $Rh^+$  人的血液，會使  $Rh^-$  的人產生抗體。

Rh 血型有時會引起母體和胎兒不相合的情形。 $Rh^+$  在遺傳上為顯性， $Rh^-$  為隱性，若母親為  $Rh^-$ ，父親為  $Rh^+$ ，胎兒有可能自父方遺傳到  $Rh^+$  的基因而為  $Rh^+$ 。通常孕婦與胎兒的血液不會混雜，不過在懷孕後期或是分娩過程中，會有少量血液經由胎盤滲漏至母體，胎兒紅血球表面的 D 抗原，便會刺激母體的白血球產生抗體。當此婦女再懷孕時，抗體會經由胎盤進入胎兒的血液，並與胎兒紅血球表面的抗原結合，而使紅血球凝集並破裂，嚴重時常導致胎兒死亡。類似情形在輸血時也可能發生，當有  $Rh^+$  血液輸入  $Rh^-$  者體內後，後者會產生抗體，若後來再次輸血，供血者也是  $Rh^+$ ，則輸入血液中的抗原與第一次輸血後產生的抗體相遇，產生紅血球的凝集。

胎兒 Rh 若不相合當然可換血，不過危險性很高。最好是在  $Rh^+$  的孩子出生後，用一種抗 Rh 的 Rhogam 抗體處理  $Rh^-$  的婦女，這種抗體能迅速將母體內胎兒的紅血球清除，使母體白血球受刺激的機會降低，再次懷孕時即不會因血液中含有抗體而傷害到胎兒。

### 實驗步驟：

利用 A 型和 B 型人的血清，可以鑑定 ABO 血型。本實驗目的在了解血型鑑定的基本原理，並學習檢查血型的技術。

- (1) 在載玻片中央劃一條線，將之分為左右兩半。左方寫抗 A，右方寫抗 B。
- (2) 在載玻片左方置一滴抗 A 血清，右方置一滴抗 B 血清。
- (3) 用浸濕 70 % 酒精的棉球，擦拭中指，以消毒針刺破指尖的皮膚，若沒有血液流出，不妨用另一手將針口後方的皮膚向前推擠。
- (4) 滴一滴血在載玻片上血清附近，注意勿將手指觸及血清，同時動作要快，以免血液凝固。
- (5) 迅速用牙籤將血液與抗 A 血清混和，再用另一根清潔牙籤將右邊的血液與抗 B 血清混合。
- (6) 一分鐘後，在顯微鏡下檢查，血球有無凝集現象。未發生凝集者紅血球分布均勻。將實驗結果，與圖比較，以確定自己的血型。

## 參、凝集反應

在一般免疫診斷、或血清流行病學試驗時，所採集的血清樣品成份非常複雜，除了抗體之外，尚包含補體、生長因子、凝血因子、激素、脂類、代謝物、無機鹽、及其他蛋白質，而抗體的成份也受到動物的品系、性別、健康、年齡、營養等影響而有所不同。一般在血清中出現的抗體濃度，在定量時不以絕對濃度表示，而是以相對濃度：抗體力價 (antibody titer) 值表示。

抗原與抗體間結合力的強弱，取決於抗原決定位和抗體結合位間構型 (conformation) 的合適程度，有最佳合適性和最強結合力的抗體，則其對抗原就有高親和力 (affinity)，當抗原與抗體結合後再分離的傾向也較低。反之，低親和力之抗體，則較易與抗原再度分離。這便是抗原與抗體之間是否有高度專一性或有交叉反應 (cross reaction) 的原理。

抗體專一性是指一抗體只對某一特定的抗原才發生反應。但由於不同的蛋白質可能擁有類似的抗原決定部位，如牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的某些抗原決定部位與人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 類似，因此抗人體血清的蛋白的抗體，除了能與人血清白蛋白結合以外，也能與牛血清白蛋白結合，造成交叉反應，是免疫反應中偽陽性 (false positive) 的主要原因，也是過去免疫診斷時發生誤診的原因之一。利用抗原抗體之間極為專一性的結合，可以作為免疫分析的基礎，用來診斷疾病、檢驗刑事案件、以及鑑別物種等。

凝集反應 (agglutination reaction) 為顆粒性抗原 (如細菌、細胞、紅血球等) 懸浮液，與其抗體溶液的反應，由於反應結果使顆粒性抗原凝集成塊狀，故稱凝集反應。本實驗以最簡單的直接凝集試驗，來顯示抗原抗體間的反應。

### 實驗步驟：

BALB/c 品系小白鼠在感染枯西錐蟲 (*Trypanosoma cruzi*) 後，會引發寄生蟲血症並死亡，但如果以體外培養側鞭型蟲體先作免疫注射，再感染枯西錐蟲，則血液中的寄生蟲數目降低，小白鼠也不會死亡。免疫小白鼠的血清中含有大量

抗體，可凝集、分解、並協助細胞吞噬、或毒殺錐蟲。

- (1) 免疫試驗中用的抗原液製備法，是以 2% 緩衝等滲福馬林固定寄生蟲 24 小時後，保存於 0.2% 福馬林。試驗時以生理鹽水或 PBS 離心洗 3 次，作為寄生蟲抗原。本次實驗以體外培養側鞭型蟲體活蟲作抗原，以加深印象。
- (2) 抗體為大鼠抗血清，大鼠於接受  $1 \times 10^7$  側鞭型蟲體免疫注射後第 14 天，再接受側鞭型蟲體追加注射一次，於第 17 天以心臟穿刺法採血，將血液置入試管待凝固後，離心取上清液即為抗血清內含大量抗體，血清樣品通常保存在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。如果需要反復試驗，一般應把樣品分裝。
- (3) 直接凝集 (Direct agglutination test) 試驗：凝集反應為抗體與顆粒性抗原（如細菌、細胞、紅血球）間的反應。本實驗中由於血清中的抗體具有與蟲體表面抗原結合的能力，結果可使寄生蟲凝集成毛絮狀、粒狀、網狀、團狀或塊狀，利用凝集反應可偵測出較低濃度的抗體。加熱、搖動、攪拌、和離心等，均能增加抗原與抗體接觸之機會，有助於凝集反應的發生。先用生理食鹽水將抗體作系列稀釋，通常是 2 倍稀釋，置入血球凝集盤的各槽中，其中須包括陽性控制與陰性控制組。再將等量的寄生蟲懸浮液加入盤中，若抗體的量足使寄生蟲發生凝集，則在槽底可發現毛絮狀、粒狀、網狀或塊狀凝集物，描述凝集物的外觀。實驗時要與控制組比對，並嘗試求出抗體力價：即能使蟲體發生陽性凝集反應最高稀釋倍數的倒數。取少量凝集物置於顯微鏡下觀察，寄生蟲的那些部位被凝集？什麼意義？

## 肆、沉澱反應

沈澱反應 (precipitation reactions) 為在可溶性抗原溶液（如外毒素、類毒素、或異種動物血清）與其抗體溶液（抗血清）之間，第一個可以被觀察到的抗原與抗體反應。反應之初，會很快的形成可溶性抗原抗體複合物，然後這些可溶性抗原抗體複合物再慢慢凝集成肉眼可見的沈澱物。要使沈澱反應完全，需要一小時以上，溫度愈高反應愈快。

在液體中進行的沈澱反應，一般不能辨別有幾種抗原抗體系統存在。但若沈澱反應在軟瓊脂的半固態膠體 (gel) 環境中進行，稱為膠體沈澱反應，因不同抗原在軟瓊脂膠體中擴散速率不同，使不同抗原在不同的擴散距離處，與其相對應最適宜比例的抗體反應，而產生免疫沈澱線 (immunoprecipitation line)，因此可用肉眼分辨出有幾種抗原抗體系統存在。利用沈澱反應在軟瓊脂中進行的免疫雙向擴散法 (immunodouble diffusion)，可以區別血清中不同抗體與不同抗原間之作用。藉著所產生不同形狀的沈澱線，可以說明不同抗原間的三種關係：相同、部份相同、及完全不同。

免疫雙向擴散技術，可以用來決定抗原與某一特殊試驗抗體之間的關係。此種反應會有三種基本型態：(a) 抗體與二種受測抗原間形成的沈澱線融合成弧狀 (arc)，表示抗體與相同的抗原決定位置反應（即抗原決定部位），此結果並不

表示抗原完全相同，只能表示此抗體無法區別其不同。(b) 抗體可區別不同的抗原決定部位。(c) 二抗原之間具有相同的抗原決定部位，但其中一抗原卻另外具備個別的抗原決定部位，因抗體具有與二種不同抗原決定位置反應的能力，而可區別二種抗原，表示在二種抗原間只有部分相同性。

以上技術只能用於抗原抗體的定性分析，若用單向免疫擴散法 (single radial diffusion, SRD)，則可在瓊脂中對抗原或抗體作相對的定量分析。如定量抗原時，其方法為在一含抗體濃度固定、且均勻的瓊脂平板中挖洞，並加入抗原，隨著抗原濃度之不同，在不同的擴散距離處能與濃度固定的抗體達適當比例而產生沈澱環。沈澱環的直徑與抗原的濃度成正比，由沈澱環直徑與已知抗原濃度關係的標準曲線，便可測量待測未知抗原的濃度。

有些抗原過於複雜，無法用擴散與沈澱的方法來分析，因此發展免疫電泳技術 (immunoelectrophoresis)，先將抗原依其電荷不同而分開，再與抗體產生免疫擴散反應，形成沈澱。若在膠質上加電壓使抗原與抗體移動，則免疫雙向擴散技術改良為逆電流電泳 (contercurrent electrophoresis)，而將單向免疫擴散可改良為火箭型電泳法 (rocket electrophoresis)。這些技術可用來分析濃度在 2 與 20mg/ml 間的抗原或抗體。

在抗原抗體間相互作用的研究上，免疫擴散作用曾經提供了非常有用的訊息，但現在已被許多使用更微量抗原抗體的免疫方法取代了。本實驗中為節省經費，採用類似於免疫擴散的方法，以液體在凝膠體中的擴散模式來表達，因膠體在空間上固定的位置，會限制液體分子自由擴散的途徑，而形成沉澱，如同抗原抗體溶液相遇時形成的免疫沉澱線。

#### 實驗步驟：

- (1) 在固化之洋菜膠上，用鑽孔器(borer)鑽孔。
- (2) 依指示於每一個孔中加入等量的特定溶液，各端的液體會往中央擴散而與中央往外擴散之液體相會，此時會有化學作用而形成沉澱線。
- (3) 記錄沉澱線形成的時間及位置，並依此來推估離子的相對大小(或分子量)，依此推測是那些正負不同電價的離子在作用。
- (4) 若使用不同濃度的溶液，沉澱線的位置是否會有不同？為什麼？