

面向 **21** 世纪高等医药院校精品课程教材

EXPERIMENTAL TECHNOLOGY OF IMMUNOLOGY

# 免疫学实验技术

鲍建芳 沈建根 主编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大學出版社

面向 21 世纪高等医药院校精品课程教材

# 免疫学实验技术

鲍建芳 沈建根 主 编

浙江大学出版社

## 内 容 提 要

本书系统地介绍了免疫学实验技术的基础知识、基本理论和基本技能。全书共分 16 个实验,内容包括:凝集反应、沉淀反应、补体参与的免疫反应、免疫标记技术、免疫印迹、免疫细胞的分离与纯化、细胞免疫功能测定、流式细胞测定技术、细胞因子及其受体的检测、化学发光免疫分析、HLA 分型技术、超敏反应、多克隆抗体的制备、单克隆抗体的制备、抗体的纯化和非特异性免疫实验等。书中详细介绍了上述实验的原理、材料、方法及实验注意事项,内容丰富、知识性强。本书可作为基础医学、临床医学、口腔医学、预防医学、护理学、药学及生物学等专业的免疫学实验教材,同时也可作为从事免疫学及相关研究人员的参考用书。

## 图书在版编目(CIP)数据

免疫学实验技术 / 鲍建芳, 沈建根主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2006. 12  
ISBN 7-308-05037-8

I. 免... II. ①鲍... ②沈... III. 医药学: 免疫学  
—实验—医学院校—教学参考资料 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 135757 号

## 免疫学实验技术

鲍建芳 沈建根 主编

责任编辑 杜玲玲

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(E-mail: zupress@mail.hz.zj.cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 浙江大学出版社电脑排版中心

印 刷 浙江省临安市曙光印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 11.25 彩插 2 页

字 数 274 千

版 次 2006 年 12 月第 1 版 2006 年 12 月第 1 次印刷

印 数 0001—3000

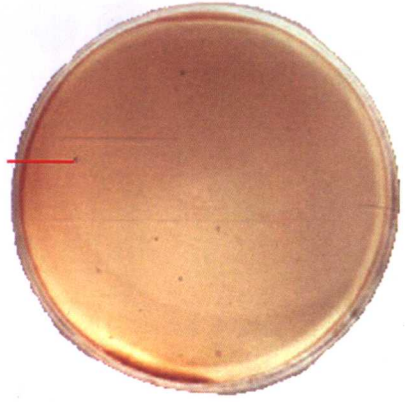
书 号 ISBN 7-308-05037-8

定 价 18.00 元

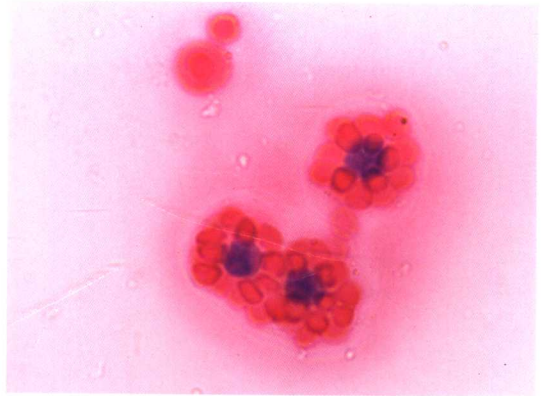
版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571) 88072522

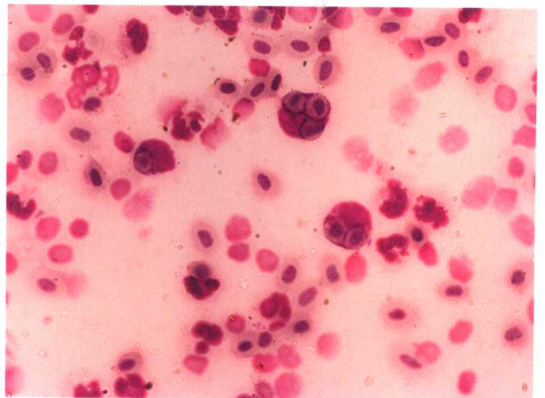
目测溶血空斑



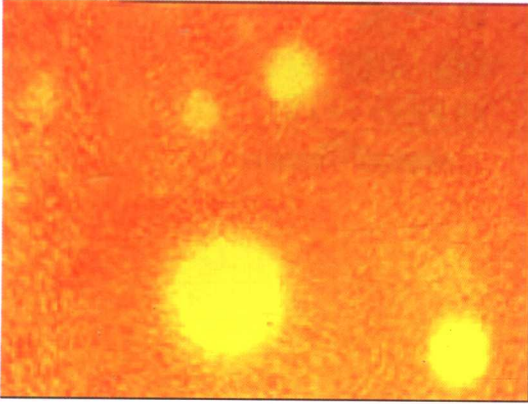
E 玫瑰花环



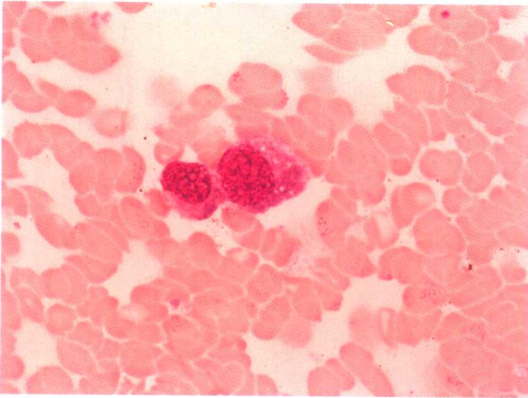
巨噬细胞吞噬现象(大吞噬)



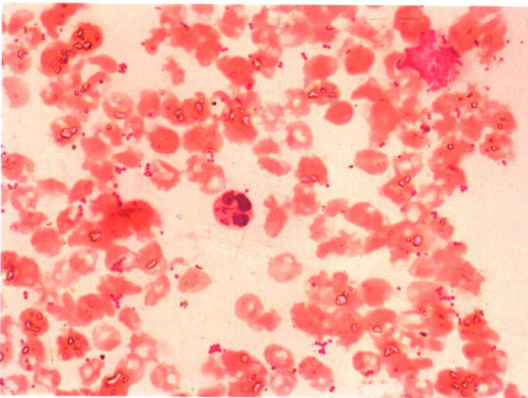
40 倍镜下溶血空斑



淋巴母细胞



中性粒细胞吞噬现象(小吞噬)







半暗视野中的荧光阳性细胞(CD4<sup>+</sup>T 细胞)



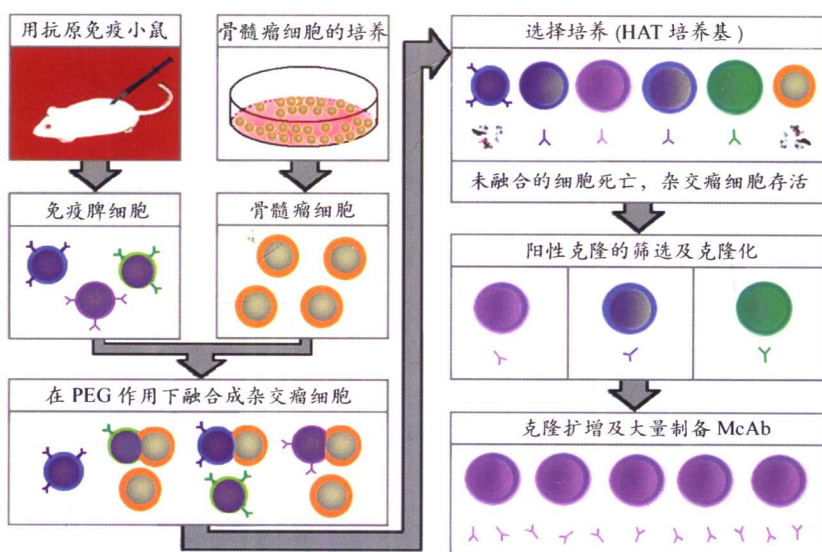
暗视野中的荧光阳性细胞(CD4<sup>+</sup>T 细胞)



细胞分析仪



流式细胞仪



单克隆抗体的制备

# 前 言

我们先前编写的《医学免疫学实验技术》发行距今已有 5 年,在这期间受到了读者的好评,我们欣感宽慰。免疫学是一门支撑生物学和生物医学众多领域发展的学科,免疫学的不断发展促进了免疫学实验技术的不断更新。让众多生物学和生物医学学生了解和掌握免疫学实验技术,为今后他们的科学研究及工作打下基础,是我们这些免疫学工作者编写《免疫学实验技术》一书的重要目的。

本书中,我们在总结吸收近年来实验教学改革经验的基础上对收编的实验内容作了调整,增加了免疫印迹、细胞因子及其受体检测和化学发光免疫分析三个章节的实验内容,同时对免疫标记技术中的金免疫技术、抗体纯化技术和附录部分作了大量的扩充,对每个实验应注意的事项作了充分的说明,突出了本书的实用性。在实验编次上我们力求与课堂授课内容一致,以便于学生预习。同时,我们还增添了实验报告书写格式的内容,对规范学生书写实验报告有一定的作用。我们的目的是给初学者提供足够的信息,使其能够快速进行工作,同时不妨碍经验丰富的工作者应用其他的方法。

在此我们要感谢所有为本书的编写出版提供帮助的人。深深感谢我们的编辑杜玲玲、阮海潮,在本书的编辑和出版过程中,他们提供了宝贵的建议和帮助,感谢浙江大学免疫所(系)全体教师。

限于我们的水平和研究经验,疏漏错误之处在所难免,切盼广大师生指正。希望本书能给读者带来收获,有所裨益。

编 者

2006 年 10 月

# 实验室守则

免疫学实验对象有一部分是病原微生物,为实验人员的安全健康起见,进入实验室必须遵守以下规则:

- 一、进入实验室必须穿白大衣,离室时脱下并反折。
- 二、实验室内严禁饮食、吸烟、用嘴湿润标签等。
- 三、实验室内要保持安静,遵守秩序,不得高声谈笑和随便走动,以免影响他人实验。
- 四、使用显微镜时必须细心,严格遵守操作规程,防止损坏仪器设备。
- 五、实验室内一旦发生意外,如吸入菌液、刺破皮肤、细菌污染桌面或地面等,应立刻报告老师,及时进行处理。
- 六、如损坏实验器材,须报告老师进行登记,并按有关规定进行赔偿。未经允许,不得随意将实验室内任何物品带出实验室。
- 七、吸过菌液的吸管、毛细吸管及用过的玻片要投入消毒容器中,不能随意放在桌面上,也不可冲洗于水槽中。
- 八、爱护公物,节约酒精、染色液、水电和其它材料。
- 九、实验完毕时,必须将用过的器材、标本、玻片以及废物按规定地点放好。纸屑等不可随便抛掷于地上,保持实验室清洁。
- 十、每次实验结束时,必须打扫并整理实验室。洗手后方可离开实验室。

(另外,在每次实验前,请认真阅读本书附录“危险品的防护”中相关的内容)

# 目 录

## 实验室守则

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 实验一 凝集反应               | ( 1 )  |
| 一、直接凝集反应               | ( 1 )  |
| (一)玻片凝集试验——ABO 血型鉴定    | ( 1 )  |
| (二)试管凝集试验              | ( 2 )  |
| 二、间接凝集试验               | ( 4 )  |
| (一)间接血球凝集试验——血清类风湿因子测定 | ( 4 )  |
| (二)间接凝集抑制试验——妊娠试验      | ( 5 )  |
| (三)协同凝集试验              | ( 6 )  |
| 实验二 沉淀反应               | ( 7 )  |
| 一、琼脂扩散试验               | ( 7 )  |
| (一)单向琼脂扩散试验            | ( 7 )  |
| (二)双向琼脂扩散试验            | ( 9 )  |
| 二、免疫电泳试验               | ( 10 ) |
| (一)对流免疫电泳试验            | ( 10 ) |
| (二)免疫电泳试验              | ( 12 ) |
| (三)火箭免疫电泳试验            | ( 13 ) |
| (四)交叉免疫电泳试验            | ( 14 ) |
| 三、环状沉淀试验               | ( 15 ) |
| 实验三 补体参与的免疫反应          | ( 17 ) |
| 一、溶血反应                 | ( 17 ) |
| 二、补体结合试验               | ( 18 ) |
| (一)溶血素单位滴定             | ( 19 ) |
| (二)补体单位滴定              | ( 19 ) |
| (三)正式试验                | ( 20 ) |
| 三、血清总补体含量的测定(CH50 测定)  | ( 21 ) |
| 四、溶血空斑试验               | ( 22 ) |
| 五、补体介导的细胞毒试验           | ( 24 ) |



|                            |      |
|----------------------------|------|
| 实验四 免疫标记技术                 | (26) |
| 一、酶免疫技术                    | (26) |
| (一)酶联免疫吸附试验                | (26) |
| (二)酶免疫组织化学技术—PAP法(可溶性酶抗酶法) | (30) |
| 二、荧光免疫技术                   | (32) |
| (一)直接(或间接)荧光免疫法检测标本中的抗原    | (32) |
| (二)间接荧光免疫法检测人外周血中T淋巴细胞亚群   | (34) |
| 三、金免疫技术                    | (36) |
| (一)胶体金的制备                  | (36) |
| (二)免疫金的制备                  | (37) |
| (三)斑点免疫渗滤试验                | (38) |
| (四)斑点免疫层析试验                | (39) |
| 四、放射免疫技术                   | (40) |
| 实验五 免疫印迹                   | (41) |
| 一、蛋白质的电泳分离                 | (41) |
| (一)样本的制备                   | (41) |
| (二)蛋白质凝胶电泳                 | (43) |
| 二、将蛋白质从凝胶中转印至膜上            | (45) |
| (一)以PVDF膜为固相载体的半干转印法       | (46) |
| (二)转印后切取印迹膜                | (46) |
| (三)印迹膜蛋白染色                 | (47) |
| 三、免疫检测                     | (47) |
| (一)印迹膜上非特异性蛋白质结合位点的封闭      | (47) |
| (二)直接与间接检测方法               | (47) |
| 实验六 免疫细胞的分离与纯化             | (50) |
| 一、外周血液中白细胞的分离              | (50) |
| (一)自然沉降法                   | (50) |
| (二)高分子聚合物沉降法               | (50) |
| 二、外周血液中单个核细胞的分离——密度梯度离心法   | (51) |
| 三、淋巴组织中淋巴细胞的分离             | (53) |
| (一)脾细胞悬液的制备                | (53) |
| (二)淋巴结细胞悬液的制备              | (53) |
| (三)胸腺细胞悬液的制备               | (53) |
| 四、淋巴细胞的分离纯化                | (54) |
| (一)分离PMNC中的淋巴细胞和巨噬细胞       | (54) |
| (二)T细胞、B细胞及T细胞亚群的分离纯化      | (56) |

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| 五、人外周血树突状细胞的分离与培养 .....            | ( 62 )  |
| <b>实验七 细胞免疫功能测定</b> .....          | ( 64 )  |
| 一、E 玫瑰花环试验 .....                   | ( 64 )  |
| 二、淋巴细胞转化试验 .....                   | ( 65 )  |
| (一)形态学检查法 .....                    | ( 65 )  |
| (二) <sup>3</sup> H-TdR 掺入法 .....   | ( 66 )  |
| 三、NK 细胞活性的检测 .....                 | ( 67 )  |
| (一)乳酸脱氢酶(LDH)法检测人外周血 NK 细胞活性 ..... | ( 68 )  |
| (二)同位素法检测小鼠脾脏 NK 细胞活性 .....        | ( 69 )  |
| (三)MTT 比色法检测小鼠脾脏 NK 细胞活性 .....     | ( 70 )  |
| 四、LAK 细胞的制备及其细胞毒活性检测 .....         | ( 71 )  |
| 五、肿瘤浸润淋巴细胞的制备 .....                | ( 72 )  |
| (一)TIL 的分离 .....                   | ( 72 )  |
| (二)TIL 的体外培养 .....                 | ( 73 )  |
| 六、CTL 细胞毒活性检测 .....                | ( 74 )  |
| 七、抗体介导的淋巴细胞毒试验 .....               | ( 75 )  |
| 八、混合淋巴细胞培养试验 .....                 | ( 76 )  |
| 九、白细胞移动抑制试验 .....                  | ( 78 )  |
| <b>实验八 流式细胞测定技术</b> .....          | ( 80 )  |
| <b>实验九 细胞因子及其受体的检测</b> .....       | ( 82 )  |
| 一、细胞因子的生物活性检测法 .....               | ( 82 )  |
| (一)IL-1 的生物活性检测法 .....             | ( 82 )  |
| (二)IL-2 的生物活性检测法 .....             | ( 87 )  |
| (三)TNF 的生物活性检测法 .....              | ( 91 )  |
| 二、细胞因子及其受体的免疫学检测法 .....            | ( 93 )  |
| (一)TNF 的免疫学检测法 .....               | ( 93 )  |
| (二)IL-2R 的免疫学检测法 .....             | ( 96 )  |
| (三)细胞内细胞因子的免疫学检测法 .....            | ( 101 ) |
| 三、细胞因子的生物学检测法 .....                | ( 101 ) |
| (一)斑点杂交法测定培养细胞 IL-2 mRNA 的含量 ..... | ( 102 ) |
| (二)原位杂交法测定 TNF 的 mRNA .....        | ( 108 ) |
| <b>实验十 化学发光免疫分析</b> .....          | ( 111 ) |
| <b>实验十一 HLA 分型技术</b> .....         | ( 113 ) |
| 一、微量淋巴细胞毒试验 .....                  | ( 113 ) |

|                                          |              |
|------------------------------------------|--------------|
| 二、DNA 分型技术·····                          | (114)        |
| <b>实验十二 超敏反应·····</b>                    | <b>(117)</b> |
| 一、豚鼠过敏试验 ·····                           | (117)        |
| 二、血清中总 IgE 水平测定(酶联免疫吸附试验,ELISA) ·····    | (118)        |
| 三、血清中特异性 IgE 抗体的测定(酶联免疫吸附试验,ELISA) ····· | (119)        |
| 四、肥大细胞脱颗粒试验 ·····                        | (120)        |
| 五、循环免疫复合物(IC)的检测 ·····                   | (121)        |
| (一)PEG 环状沉淀试验 ·····                      | (121)        |
| (二)直接 PEG 沉淀试验·····                      | (122)        |
| 六、迟发型超敏反应(皮肤试验) ·····                    | (123)        |
| (一)结核菌素(OT)试验·····                       | (123)        |
| (二)PHA 皮肤试验·····                         | (123)        |
| <b>实验十三 多克隆抗体的制备及纯化·····</b>             | <b>(125)</b> |
| 一、伤寒杆菌(颗粒性抗原)抗血清的制备 ·····                | (125)        |
| 二、溶血素(颗粒性抗原)的制备 ·····                    | (127)        |
| 三、抗人 IgG(可溶性抗原)免疫血清的制备 ·····             | (127)        |
| <b>实验十四 单克隆抗体的制备·····</b>                | <b>(129)</b> |
| 一、小鼠骨髓瘤细胞的准备 ·····                       | (129)        |
| (一)小鼠骨髓瘤细胞株 ·····                        | (129)        |
| (二)小鼠骨髓瘤细胞株的保存 ·····                     | (129)        |
| (三)小鼠骨髓瘤细胞的培养 ·····                      | (131)        |
| 二、免疫 B 淋巴细胞的准备 ·····                     | (131)        |
| (一)免疫动物 ·····                            | (131)        |
| (二)免疫效果检测 ·····                          | (132)        |
| 三、细胞融合 ·····                             | (132)        |
| (一)收集骨髓瘤细胞 ·····                         | (133)        |
| (二)收集 B 淋巴细胞 ·····                       | (133)        |
| (三)细胞融合 ·····                            | (133)        |
| 四、融合细胞的接种与选择性培养 ·····                    | (133)        |
| (一)饲养细胞的准备 ·····                         | (133)        |
| (二)接种 ·····                              | (134)        |
| 五、杂交瘤细胞的检测 ·····                         | (134)        |
| (一)固相酶联免疫测定 ·····                        | (135)        |
| (二)放射免疫测定 ·····                          | (135)        |
| (三)荧光免疫测定法 ·····                         | (136)        |
| (四)其它方法 ·····                            | (136)        |

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| 六、阳性杂交瘤细胞的克隆化培养 .....          | (136) |
| (一)有限稀释法 .....                 | (136) |
| (二)半固体培养基法 .....               | (136) |
| 七、杂交瘤细胞的扩增与冻存 .....            | (137) |
| 八、单克隆抗体性质的鉴定 .....             | (137) |
| (一)特异性 .....                   | (137) |
| (二)亲和常数 .....                  | (138) |
| (三)单克隆抗体的免疫球蛋白(Ig)类和亚类鉴定 ..... | (139) |
| (四)结合位点 .....                  | (139) |
| 九、单克隆抗体的生产 .....               | (140) |
| 十、单克隆抗体的提纯 .....               | (140) |
| (一)IgG 类抗体 .....               | (140) |
| (二)IgM 类抗体 .....               | (141) |
| 实验十五 抗体的纯化 .....               | (142) |
| 一、中性盐沉淀法粗提抗体 .....             | (142) |
| 二、离子交换层析法纯化抗体 .....            | (144) |
| 实验十六 非特异性免疫实验 .....            | (146) |
| 一、吞噬细胞的吞噬作用 .....              | (146) |
| (一)中性粒细胞的吞噬作用(小吞噬) .....       | (146) |
| (二)巨噬细胞的吞噬作用(大吞噬) .....        | (147) |
| (三)抗体的调理作用 .....               | (148) |
| 二、正常体液杀菌作用的测定 .....            | (149) |
| (一)溶菌酶的溶菌作用 .....              | (149) |
| (二)正常血清的杀菌作用 .....             | (149) |
| 附 录 .....                      | (151) |
| 附录 I 常用试剂的配制 .....             | (151) |
| 附录 II 动物实验技术 .....             | (156) |
| 附录 III 常用免疫学检查正常值 .....        | (159) |
| 附录 IV 工作中应常注意的要点 .....         | (160) |
| 附录 V 危险品的防护 .....              | (160) |
| 附录 VI 实验报告书写规范 .....           | (165) |

# 实验一 凝集反应

在一定浓度的电解质溶液中,颗粒性抗原与相应抗体结合后,出现肉眼可见的凝集块,称为凝集反应(agglutination reaction)。凝集反应是一种定性的检测方法,即根据凝集现象的出现与否判定结果阳性或阴性;也可以进行半定量检测,即将标本作一系列倍比稀释后进行反应,出现阳性反应的最高稀释度作为滴度(或效价)来判断结果的强弱。凝集反应可分为直接凝集反应和间接凝集反应。由于凝集反应方法简便,目前在临床检验中仍被广泛应用。

## 一、直接凝集反应

细菌、细胞等颗粒性抗原,在适当电解质参与下可直接与相应抗体结合出现凝集,称为直接凝集反应(direct agglutination reaction)。凝集反应中的抗原又称为凝集原(agglutinin),抗体称为凝集素(agglutinin)。常用的直接凝集试验有玻片法和试管法两种。

### (一)玻片凝集试验——ABO 血型鉴定

#### 【原理】

玻片凝集试验为定性试验,一般用已知抗体作为诊断血清,与受检颗粒性抗原如菌液或红细胞,各加一滴在玻片上,混匀,数分钟后即可用肉眼观察凝集结果,出现凝集颗粒的为阳性。此法简便、快速,适用于从病人标本中分离得到的菌种的诊断或分型,也可用于红细胞ABO血型的鉴定。

#### 【材料】

1. 标准血清(抗体):抗 A 分型试剂和抗 B 分型试剂各 1 支。
2. 盛有 1ml 生理盐水的一次性试管 1 支。
3. 一次性无菌采血针 1 枚、白瓷板或玻片 1 块、一次性毛细吸管 1 支、75%酒精棉球和灭菌干棉球。

#### 【方法】

1. 用酒精棉球消毒被检者的耳垂或手指尖端,用采血针刺破皮肤,稍加挤压,使血液流出,滴 1~2 滴血液于含有生理盐水的试管内,摇匀,使成为血球悬液。用灭菌干棉球止血。
2. 取白瓷板 1 块,将抗 A、抗 B 分型试剂分别滴加 1 滴于白瓷板的两个圆孔内。
3. 用毛细吸管吸取血球悬液,在白瓷板的两个圆孔内各加 1 滴。
4. 将白瓷板前后左右不停地摇动,使其充分混匀,5~10min 后观察血球有无凝集发生。如有凝集,可见红细胞凝集成块;无凝集,红细胞呈均匀分散(图 1)。
5. 记录受检者红细胞凝集情况,根据 ABO 血型鉴定表,判断受检者的血型。

#### 【注意事项】

1. 采血前应对采血部位进行消毒。

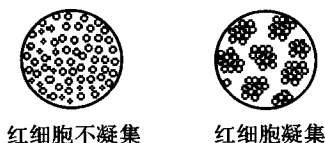


图1 红细胞凝集判断示意图

2. 采血针必须一人一针, 禁止混用, 严防交叉感染。
3. 本法也可将血液直接滴在白瓷板或玻片上, 而不必用生理盐水稀释, 其结果不变。

表 1-1 ABO 血型鉴定表

| 抗 A 分型试剂 | 抗 B 分型试剂 | 血型 |
|----------|----------|----|
| +        | —        | A  |
| —        | +        | B  |
| +        | +        | AB |
| —        | —        | O  |

## (二) 试管凝集试验

### 【原理】

试管凝集试验是一种半定量的试验方法, 常用于血清中抗体的测定, 其浓度常以效价表示。即将待检血清在试管内作一系列倍比稀释, 然后加入相应的颗粒性抗原, 使其在试管内发生直接凝集, 以出现明显凝集(++)的血清最高稀释度为其效价(亦称为滴度)。临床上常用的试管凝集试验有: 肥达试验(Widal test)和外斐试验(Weil-Felix test)。

### 【材料】

1. 诊断血清: 1:10 稀释的伤寒杆菌“O”及“H”诊断血清。
2. 抗原: 伤寒杆菌“O”菌液(菌体抗原), 伤寒杆菌“H”菌液(鞭毛抗原)。
3. 生理盐水、小试管、吸管、试管架、水浴箱等。

### 【方法】

1. 取清洁小试管 16 支, 分两排列于试管架上, 每排 8 支, 依次编号, 每管内加生理盐水 0.5ml。

2. 用 1ml 洁净吸管吸取伤寒杆菌“O”诊断血清 0.5ml 加入第一排的第 1 管内, 于管内容上下吹吸 3 次, 使血清与生理盐水充分混匀, 吸出 0.5ml 加于第 2 管, 同法混匀, 吸取 0.5ml 加于第 3 管, 依次稀释至第 7 管, 从第 7 管吸出 0.5ml 弃去。第 8 管为生理盐水对照。稀释方法如图 2 所示。

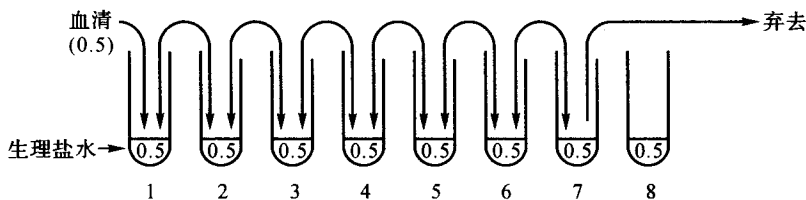


图2 血清倍比稀释法

3. 同法稀释第 2 排的伤寒杆菌“H”诊断血清。



4. 用 1ml 洁净吸管吸取伤寒杆菌“O”菌液,从第 1 排的第 8 管起依次向前在各管内加入 0.5ml(表 1-2)。

表 1-2 试管凝集试验加样程序

| 单位: ml     |                            |      |       |       |       |        |        |     |
|------------|----------------------------|------|-------|-------|-------|--------|--------|-----|
| 试管编号       | 1                          | 2    | 3     | 4     | 5     | 6      | 7      | 8   |
| 生理盐水       | 0.5                        | 0.5  | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5    | 0.5    | 0.5 |
| 1:10伤寒杆菌血清 | 0.5                        | 0.5  | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5    | 0.5    | 0.5 |
| 伤寒杆菌菌液     | 0.5                        | 0.5  | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5    | 0.5    | 弃去  |
| 血清稀释度      | 1:40                       | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 |     |
| 结 果        | 37℃水浴箱中2~4h, 初步观察结果后4℃冰箱过夜 |      |       |       |       |        |        |     |

5. 另取 1 支 1ml 吸管,同法于第 2 排各管中加入伤寒杆菌“H”菌液 0.5ml。

6. 将各试管振荡混匀,放入 37℃水浴箱中 2~4h,初步观察结果后,置 4℃冰箱过夜,次日再行观察。

### 【结果】

先观察第 8 管对照(图 3),管底沉淀物呈圆形,边缘整齐,轻轻振摇细菌分散呈均匀混浊,此为阴性。然后从第 1 管起,逐管观察,如有凝集,可见管底有凝集块,边缘不整齐,液体澄清。“O”菌液的凝集呈致密颗粒状,不易摇散,“H”菌液的凝集呈疏松棉絮状,易摇散。

凝集强度的判断以“+”号表示如下:

“++++”:很强,细菌全部凝集,液体澄清,管底有大片凝集物。

“+++”:强,细菌大部分凝集,管底的凝集物较小,液体微混。

“++”:中等强度,细菌部分凝集,管底凝集物细小,但仍明显可见,液体半澄清。

“+”:弱,细菌仅少部分凝集,液体混浊。

“-”:不凝集,液体混浊与对照管相似。

以产生明显凝集(++)的血清最高稀释度为该血清的凝集效价。



图 3 试管凝集结果示意图

### 【注意事项】

1. 加抗原时必须先从对照开始,然后从低浓度血清稀释度到高浓度血清稀释度依次加入。

2. “H”菌液的凝集很疏松,极易摇散,判断结果时应避免剧烈振动,以免影响结果。

注:效价是指机体对抗原产生免疫应答时,其血清中含有特异性抗体的浓度,常以出现阳性反应的血清最高稀释度为效价(滴度)。

## 二、间接凝集反应

将可溶性抗原或抗体先吸附于适当大小的颗粒性载体表面(这种载体与免疫无关),然后与相应抗体或抗原结合,在适量的电解质存在下,出现特异性凝集现象,称为间接凝集反应(indirect agglutination)或被动凝集反应(passive agglutination)。这种反应适用于各种抗体和可溶性抗原的检测,其敏感度高于沉淀反应,因此被广泛用于临床检验。其中将抗体吸附于载体表面检测抗原的间接凝集反应称为反向间接凝集反应。根据载体的不同可将间接凝集反应分为:间接血球凝集试验、间接乳胶凝集试验(及间接乳胶凝集抑制试验)和金黄色葡萄球菌协同凝集试验。

### (一)间接血球凝集试验——血清类风湿因子测定

#### 【原理】

以红细胞为载体,将人丙种球蛋白(可溶性抗原)吸附在载体表面而成为致敏红细胞,然后用此致敏红细胞检测类风湿性关节炎患者血清中的类风湿因子(抗变性 IgG 抗体),当患者血清中含有类风湿因子时红细胞发生凝集。此方法常用于检测血清中的抗体,辅助诊断疾病。

#### 【材料】

1. 致敏红细胞悬液。
2. 1 : 10 待检血清、阳性对照血清、稀释液。
3. V 型微量反应板、微量移液器、微量振荡器、37℃ 恒温箱、移液头。

#### 【方法】

1. 用微量移液器吸取稀释液加于微量反应板的第 1~9 孔内,每孔 50 $\mu$ l,第 10 孔加 50 $\mu$ l 阳性对照血清。
2. 第 1 孔内加待检血清 50 $\mu$ l,混匀后吸出 50 $\mu$ l 加于第 2 孔内,依次作倍比稀释至第 8 孔,并从第 8 孔中吸出 50 $\mu$ l 弃去。各孔的血清稀释度为 1 : 20、1 : 40、1 : 80...,第 9 孔为阴性对照,第 10 孔为阳性对照。
3. 将致敏红细胞悬液混匀,从第 9 孔起依次向前各孔内加入 50 $\mu$ l 致敏红细胞悬液。
4. 第 10 孔阳性对照加 50 $\mu$ l 致敏红细胞悬液。将反应板置于微量振荡器上,振荡 1min,37℃ 静置 30min 后观察结果。

#### 【结果】

先观察第 9 孔阴性对照,孔中的红细胞应紧密集于孔中央,成为一暗红点(图 4);第 10 孔阳性对照孔中的红细胞应凝集并均匀地铺于孔的四周,孔中央无红细胞沉积的暗红点。然后根据孔中红细胞凝集现象及其强弱程度,分别以“+”表示如下。

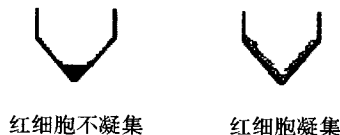


图 4 红细胞凝集判断示意图

“+++”——红细胞凝集,铺于孔的四周,有时因凝集过于强烈,会出现周边的凝集向孔心滑动的现象,此时应注意不要误判为阴性(阴性:红细胞紧密集于孔底,边缘整齐光滑)。

“++”——部分红细胞凝集,均匀铺于孔四周,孔中央可见疏松的暗红点。

“+”——红细胞沉积为环形,直径比阴性对照的大,环四周有凝集现象。

“-”——红细胞紧密集于孔底,边缘整齐光滑。

以“++”的血清最高稀释度作为试验效价,凝集效价 $>1:40$ 判定为阳性。

#### 【注意事项】

1. 在进行多样本血清稀释时,极易发生操作失误,因此,操作要小心。
2. 加致敏红细胞悬液应从第9孔阴性对照开始依次从低浓度向高浓度进行。
3. 观察结果时应轻拿V型反应板,避免已凝集的红细胞从孔壁滑落,造成凝集效价下降或出现假阴性结果。

#### (二)间接凝集抑制试验——妊娠试验

##### 【原理】

可溶性抗原致敏的乳胶颗粒与相应抗体作用可使乳胶颗粒凝集,此为间接乳胶凝集试验。若使该抗体先与可溶性抗原作用,再加入该抗原致敏的乳胶颗粒,则乳胶凝集被抑制,此为间接乳胶凝集抑制试验,此法可用于检测标本中的抗原。

妊娠试验据此原理设计:孕妇尿中绒毛膜促性腺激素(HCG)含量明显增高。HCG与抗HCG抗体先作用后,再加入HCG致敏的乳胶颗粒,就不出现凝集反应,此为妊娠试验阳性;反之,非孕妇尿中HCG含量甚微,不足以消耗掉抗HCG抗体,故抗体与后加入的HCG致敏乳胶结合,呈现细小的凝集颗粒,则妊娠试验阴性。

##### 【材料】

1. 妊娠诊断试剂抗血清(抗HCG)、妊娠诊断试剂乳胶抗原(HCG致敏)、待检尿、孕妇尿、正常尿。
2. 有格玻片、毛细吸管等。

##### 【方法】

1. 在玻片的第1、2和3格内分别滴加1滴正常尿、待检尿及孕妇尿。
2. 每格内加入妊娠诊断试剂抗血清1滴,轻轻摇动使其充分混匀,静置1~2min。
3. 每格内加入乳胶抗原1滴,轻轻摇动玻片3~5min后观察结果,记录各标本有无凝集现象(图5)。

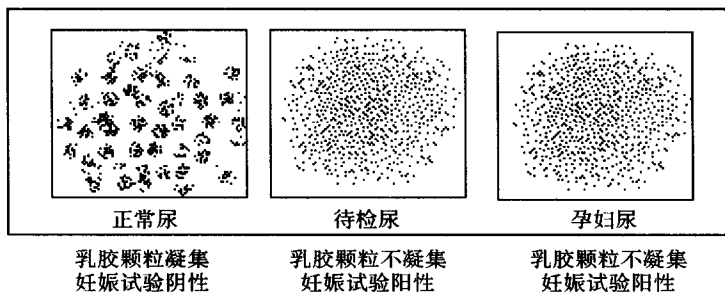


图5 妊娠试验结果示意图

##### 【结果】

孕妇尿格呈均匀混浊乳状液,无凝集,妊娠试验阳性;正常尿格出现白色细小凝集物,随时间延长凝集物变成小块状,妊娠试验阴性。待检尿若为乳状液,妊娠试验阳性;若出现凝