

国家级实验教学示范中心
全国高等院校医学实验教学规划教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、中医等专业使用

医学免疫学实验指导

主编 王大军 车昌燕 韩 梅



科学出版社

教育部高等学校医学类专业教学指导委员会

中国高等医药教育学会免疫学专业委员会

《医学免疫学实验指导》编写组

医学免疫学实验指导

主编 廖卫华 副主编 廖卫华 廖卫华 廖卫华

人民卫生出版社

国家级实验教学示范中心
全国高等院校医学实验教学规划教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、中医等专业使用

医学免疫学实验指导

主 编 王大军 车昌燕 韩 梅

副主编 苏春霞 原素梅 摆 茹

编 者 (以姓氏笔画排序)

王 浩(宁夏医科大学)

王大军(宁夏医科大学)

车昌燕(山西医科大学汾阳学院)

杨志伟(宁夏医科大学)

周 娅(宁夏医科大学)

原素梅(山西医科大学汾阳学院)

韩 梅(宁夏医科大学)

摆 茹(宁夏医科大学)

王 琦(宁夏医科大学)

王宁萍(宁夏医科大学)

苏春霞(宁夏医科大学)

张艳丽(宁夏医科大学)

赵建宁(宁夏医科大学)

梁锦屏(宁夏医科大学)

游荷花(山西医科大学汾阳学院)

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书主要介绍了抗原抗体反应相关实验技术、免疫细胞检测技术、细胞因子及其他免疫分子检测技术、抗体的制备技术。此外,为了培养学生的科学实验能力,还单独编写了综合性和设计性实验这一章。全书所涉及的实验既能满足多数高等医学院校基本实验教学的需要,又能很好地反映日益发展、不断涌现的免疫学新技术、新方法。

本书可供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、中医等专业根据教学大纲选用,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

医学免疫学实验指导 / 王大军,车昌燕,韩梅主编. —北京:科学出版社, 2013. 2

国家级实验教学示范中心·全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-036684-9

I. 医… II. ①王… ②车… ③韩… III. 医学-免疫学-实验-医学院校-教材 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 026801 号

责任编辑:王 颖 李国红 / 责任校对:包志虹

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 2 月第一次印刷 印张:6 1/2

字数:148 000

定价:19.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

根据高等医学院校“医学免疫学”专业课教学的需求,在学校相关部门的组织领导下,我们会同兄弟院校一起编写了《医学免疫学实验教学指导》(2010年),这本教材在编写时力求适合于普通高等医学院校各专业医学免疫学实验课教学的需要,同时能尽量多地介绍不断涌现的与免疫学相关的新技术、新方法,以及其在生物医学实践中的地位。经过2年来的教学实践,受到了一定的好评,这与各位参编教师扎实的理论知识、丰富的实验教学经验和辛勤的劳动分不开。

在教材使用过程中,我们也发现了一些不足之处。因此,我们再次组织相关教师对本教材重新进行编写。重新编写时,我们做了一些调整,如在第一章抗原抗体反应的第一节凝集反应中加了利用间接乳胶凝集试验检测抗链球菌溶素O,以方便不同院校使用时有所选择。在重新编写过程中,我们以目前一些院校正在使用的最新《医学免疫学》(2010年6月第5版,金伯泉主编)教材中介绍免疫学检测技术的相关章节为蓝本,力求实验教学与理论教学能更好地衔接。本书主要介绍抗原抗体反应相关实验技术(共23个实验)、免疫细胞检测技术(共7个实验)、细胞因子及其他免疫分子的检测技术(共4个实验)、抗体的制备技术(共2个实验);另外为了培养学生进行科学实验的能力,还单独编写了综合性、设计性实验这一章(共4个实验)。在内容编排上具有以下特色:①与医学免疫学教材紧密衔接,便于学生学习;②选取的实验大多为地方医学院校常用实验,具有较强的实用性;③书中安排了综合性和设计性实验,以培养学生的独立观察能力及分析、解决问题的能力。本书中涉及的实验可供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、检验、护理、法医、中医等专业根据教学大纲选做。

本书是参编教师多年从事理论和实验教学经验的积累,倾注了全体编者的辛勤工作,在此表示感谢。感谢科学出版社的同志们对本书付出的辛勤劳动。

由于水平有限,书中存在疏漏和不足之处,我们真诚希望广大读者在使用过程中坦诚指出,以便修正。

王大军 车昌燕 韩 梅

2012年11月30日

目 录

医学免疫学实验目的和要求	(1)
实验室规则	(2)
第一章 抗原抗体反应	(3)
第一节 凝集反应	(4)
I. 直接凝集反应	(4)
一、玻片凝集试验	(4)
实验一 痢疾杆菌的血清学鉴定	(4)
实验二 ABO 血型鉴定	(5)
二、试管凝集试验	(6)
实验三 血清抗体效价的测定	(6)
实验四 肥达试验	(7)
II. 间接凝集反应	(7)
一、间接凝集试验	(7)
实验五 间接乳胶凝集试验——抗链球菌溶素 O 的检测	(8)
实验六 间接乳胶凝集试验——类风湿因子的检测	(8)
二、间接凝集抑制试验	(9)
实验七 乳胶间接凝集抑制试验——妊娠诊断试验	(9)
三、反向间接血凝试验	(9)
实验八 甲胎蛋白检测	(10)
III. 协同凝集反应	(11)
实验九 肺炎链球菌的快速诊断	(11)
第二节 沉淀反应	(12)
I. 免疫扩散试验	(13)
一、双向免疫扩散试验	(13)
实验十 双向免疫扩散试验	(13)
二、单向免疫扩散试验	(14)
实验十一 人血清中 IgG、IgA、IgM 的测定	(14)
II. 免疫比浊	(15)
实验十二 人血清中补体 C3 的测定	(15)
III. 免疫电泳	(16)
实验十三 对流免疫电泳	(16)
实验十四 火箭免疫电泳	(17)
第三节 补体参与的反应	(17)
实验十五 免疫溶血反应	(18)
实验十六 溶血空斑试验	(18)
实验十七 50%溶血法(CH_{50})测总补体活性	(19)
第四节 免疫标记技术	(20)

一、酶免疫技术	(20)
实验十八 ELISA 间接法检测血清中结核特异性 IgG 抗体	(21)
实验十九 ELISA 双抗体夹心法检测 HBsAg	(22)
实验二十 ELISA 双抗原夹心法检测 HBsAb	(23)
二、免疫荧光技术	(23)
实验二十一 间接免疫荧光法检测抗核抗体(ANA)	(24)
三、放射免疫测定	(25)
四、免疫印迹	(25)
实验二十二 Western Blot 检测组织中 β -actin	(25)
五、胶体金免疫技术	(26)
实验二十三 斑点金免疫层析试验	(27)
第二章 免疫细胞的检测	(29)
第一节 免疫细胞的分离与纯化	(29)
实验二十四 外周血单个核细胞的分离	(29)
第二节 T 细胞检测	(31)
实验二十五 T 细胞数量检测——E 花环形成试验	(31)
实验二十六 T 细胞亚群检测——间接免疫荧光法	(33)
实验二十七 T 细胞功能检测——淋巴细胞转化试验	(34)
第三节 NK 细胞活性检测	(37)
实验二十八 NK 细胞活性检测	(38)
第四节 中性粒细胞功能检测	(40)
实验二十九 中性粒细胞吞噬功能的测定	(40)
第五节 巨噬细胞吞噬功能检测	(41)
实验三十 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬实验	(41)
第三章 细胞因子及其他免疫分子的检测	(43)
实验三十一 IL-2 活性检测	(43)
实验三十二 ELISA 双抗体夹心法检测 TNF- α	(46)
实验三十三 放射免疫分析法检测 IL-1 β	(47)
实验三十四 ELISA 法检测 IFN- γ	(48)
第四章 抗体的制备	(51)
第一节 多克隆抗体的制备	(51)
实验三十五 伤寒杆菌抗血清的制备	(51)
第二节 单克隆抗体的制备	(52)
实验三十六 单克隆抗体的制备	(52)
第五章 综合性、设计性实验	(54)
实验三十七 小鼠抗绵羊红细胞多克隆免疫血清的制备及效价检测	(54)
实验三十八 中草药对小鼠免疫功能的影响	(55)
实验三十九 环磷酰胺对小鼠免疫功能的抑制作用	(56)
实验四十 慢性乙型肝炎患者机体免疫功能的检测	(57)
参考文献	(58)
附录 1 常用溶液的配制	(59)
附录 2 医学免疫学实验报告册	(65)

医学免疫学实验目的和要求

(一) 医学免疫学实验课目的

- (1) 加深对理论知识的理解和运用。
- (2) 学习和掌握医学免疫学的基本操作技术。
- (3) 培养学生从事科学实验的能力,即观察记录实验结果、整理分析实验资料、综合书写实验报告和论文的能力。
- (4) 培养学生严谨求实的科学作风,独立分析和解决问题的能力,相互帮助和团结协作的精神。

(二) 医学免疫学实验课要求

- (1) 严格遵守实验室规则。
- (2) 实验前做好预习,明确实验目的、原理、主要方法、实验步骤和注意事项,做到心中有数,提高实验的成功率。
- (3) 在实验时,对要求动手操作的实验应按指导所列的步骤依次进行,仔细观察并认真记录实验结果或绘图;多人同做一项实验时,要注意分工协作、密切配合;对示教的实验要仔细观察,并应联系有关理论积极思考;实验中注意科学合理地分配和运用时间。
- (4) 实验完毕,应认真分析实验结果,探讨实验原理,得出可信的结论。若实验结果与理论不符合时,要加以分析讨论,以逐步提高自己的科学思维能力。实验课后,须按时按要求递交实验报告。
- (5) 防止发生各种事故。

实验室规则

医学免疫学实验室的实验对象大多是病原微生物或含病原微生物的血、尿、粪便、痰液及实验动物等,有传染的危险。要求同学们进入实验室必须严格遵守以下规则:

(1) 进入实验室必须先穿实验服,只带必要的实验指导、书籍和文具进入,实验指导、书籍和文具应放在实验台下的抽屉里,其他个人物品一律不得带入实验室。

(2) 实验室内禁止饮食、吸烟、用嘴湿润铅笔或标签等行为。

(3) 在操作含病原微生物的实验时,要坚持无菌操作,既要防止标本被污染,更要防止标本中的病原微生物感染人体或污染环境。

(4) 用过的吸管、滴管、试管、玻片等器材,应放在指定的地方或含消毒液的容器内,不得放在桌面上或水池内,亦不得将带病原微生物的液体倾入水槽。

(5) 酒精灯不可互相点燃,以防发生意外。

(6) 若发生割破手指、菌液进入口、眼,或遇带菌材料破损,污染环境、物品等事故时,应立即报告老师,及时进行预防处理。

(7) 不可擅自搬动示教、实验器材或室内设施。爱护公物,节约使用实验材料。如有损坏,应立即向指导教师报告,并主动在破损物品登记本上登记,某些物品需按规定酌情赔偿。

(8) 实验完毕,应清理桌面,把用过的物品放回原处(如显微镜、染色液、擦镜纸、香柏油、火柴等)。

(9) 值日生负责整理清洁实验室(包括桌面、地面、实验设备等),然后关好水、电、门、窗,脱衣洗手后离室。

(10) 未经许可,不得将实验室内任何物品带出室外。

第一章 抗原抗体反应

抗原抗体反应(antigen antibody reaction)指抗原与相应的抗体在体内或体外发生的特异性反应。抗原与抗体发生结合反应的物质基础是抗原表位与抗体的高变区(hypervariable region, HVR)之间的结构互补性,二者相互结合,在一定条件下出现可见反应。

在抗原抗体反应中,可用已知抗体检测未知抗原,也可用已知抗原检测未知抗体,并可根据需要选择定性或定量的测定方法。由于抗体主要存在于血清中,在检测样品时一般采用血清进行试验,故体外的抗原抗体反应又称为血清学试验。

(一) 抗原抗体反应的特点

1. 特异性 一种抗原一般只能与由它刺激机体所产生的抗体结合,这种抗原抗体结合反应的专一性即特异性。抗原抗体反应具有高度的特异性。

2. 可逆性 抗原与抗体的结合为非共价的可逆结合,结合后形成的复合物在一定条件下可以解离,解离后的抗原和抗体仍保持原有的性质。

3. 比例性与可见性 体外抗原抗体反应中,确定抗原抗体的最适比例十分重要。天然抗原分子表面一般有多多个抗原表位,是多价。而单体的抗体分子(如 IgG)是两价。在抗原抗体反应中,如果不考虑抗原抗体的数量比例,则很可能出现抗原或抗体过剩,结果只有小分子的复合物形成,不能被肉眼观察到。当抗原抗体的数量比例恰当时,抗体分子的两个 Fab 分别结合两个抗原分子,相互交叉连接成网格状复合体,此时有明显的反应物(沉淀物或凝集物)形成,肉眼可见(图 1-1)。

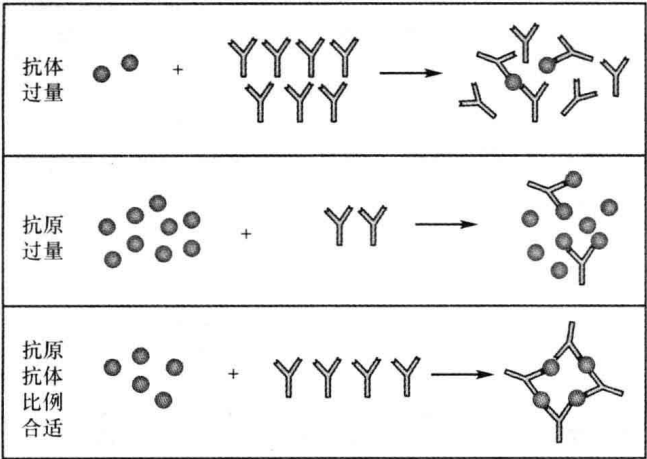


图 1-1 抗原抗体反应的比例性和可见性

(二) 抗原抗体反应的影响因素

1. 电解质 抗原与抗体结合后由亲水性变为疏水性,如有适当浓度电解质存在,可促进其电荷丢失,形成大分子复合物。因此免疫学实验中常用生理盐水或含盐缓冲液作为稀

释液或反应液。

2. **温度** 在一定温度范围内(15~40℃),升高温度可促进抗原抗体分子的碰撞,加速可见反应的出现。一般最适温度为 37℃。

3. **酸碱度** 适宜的 pH 是抗原抗体反应的重要条件,过酸或过碱都影响抗原抗体分子的性质。最适酸碱度为 pH 6~8。

(三) 抗原抗体反应的类型

根据抗原的性质、出现结果的现象、参与反应的成分不同,可将抗原抗体反应分为凝集反应、沉淀反应、补体参加的反应、采用标记物的抗原抗体反应等。

第一节 凝集反应

凝集反应(agglutination reaction)是颗粒性抗原与相应抗体结合,在一定条件下,出现肉眼可见的凝集物现象,称为凝集反应。凝集反应包括直接凝集反应和间接凝集反应。

I. 直接凝集反应

颗粒性抗原(细菌或红细胞等)与特异性抗体直接结合,当比例合适时,出现的凝集现象,称为直接凝集反应(direct agglutination reactions)(图 1-2)。

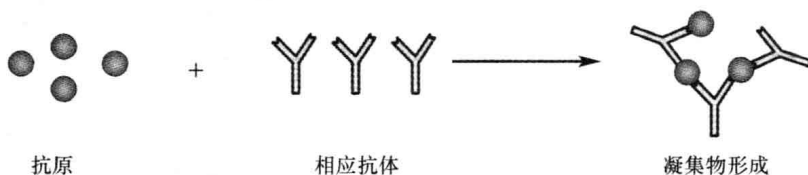


图 1-2 直接凝集反应

实验方法可分玻片法和试管法两种。玻片凝集试验一般用作定性检测,常用于病原菌的鉴定及分型、人类 ABO 血型的鉴定等;试管凝集试验常用于定量测定,如诊断伤寒、副伤寒的肥达试验等。

一、玻片凝集试验

实验一 痢疾杆菌的血清学鉴定

【实验原理】

已知的抗细菌抗体(志贺菌属多价诊断血清)与待检细菌反应,如两者为相对应的抗原抗体,则直接结合出现凝集。可定性检测细菌种类。

【实验材料】

待检细菌(痢疾杆菌)18~24h 培养物、志贺菌属多价诊断血清、生理盐水、载玻片、接种环、酒精灯等。

【实验方法】

- (1) 取一张洁净的载玻片,用记号笔划分为二格。
- (2) 以无菌取材法于左侧加 2 接种环诊断血清,右侧加 2 接种环生理盐水。
- (3) 左、右侧分别加入挑取的待检细菌。
- (4) 轻摇玻片 1~2min,观察结果。

【实验结果】

首先观察盐水对照侧,呈均匀混浊状;再观察试验侧,出现乳白色凝集块者即为阳性;对照侧及试验侧均呈均匀混浊,不出现凝集为阴性;如对照侧及试验侧均出现凝集,为自凝。

实验二 ABO 血型鉴定

【实验原理】

血型是根据红细胞表面血型抗原的种类而判定的。人类 ABO 血型系统即将红细胞上有 A 抗原者称 A 型,有 B 抗原者称 B 型,同时存在 A、B 抗原者称 AB 型,无 A、B 抗原者称 O 型。据此,分别用已知标准含抗 A 抗体和含抗 B 抗体的试剂与受试者红细胞作凝集反应,便可判定受试者的血型。

【实验材料】

玻片、已知标准抗 A 血型定型试剂和抗 B 血型定型试剂、刺血针、酒精棉球、无菌干棉球。

【实验方法】

- (1) 取洁净玻片一张用记号笔划分两个区,标明 A、B。
- (2) 在 A、B 两侧分别滴 1 滴已知标准抗 A 血型定型试剂和抗 B 血型定型试剂。
- (3) 酒精棉球消毒被检查者的耳垂,用刺血针刺血。
- (4) 取少量血液分别与已知标准抗 A 血型定型试剂、抗 B 血型定型试剂混匀。
- (5) 摇转玻片数次,静置数分钟,观察结果。

【实验结果】

实验结果见表 1-1。

表 1-1 ABO 血型鉴定的实验结果

抗 A 血型定型试剂	抗 B 血型定型试剂	血型判定
—	—	O 型
+	—	A 型
—	+	B 型
+	+	AB 型

注:“+”表示凝集现象;“—”表示未出现凝集。

【注意事项】

- (1) 一般在室温 20~24℃ 内进行试验,37℃ 条件,可使反应减弱。
- (2) 所用器材必须干燥清洁,为避免交叉污染,建议使用一次性器材。血型定型试剂从

【实验结果】

先观察对照管:应无凝集,液体混浊,管底有白色圆点状的沉积物,边缘整齐。

++++ ——细菌全部凝集,管内液体清澈透明,管底形成大片凝集物。

+++ ——细菌大部分凝集,液体澄清,管底凝集物略少于“++++”。

++ ——细菌部分凝集,液体半澄清,管底有明显的凝集物。

十 ——少量细菌凝集,液体较混浊,管底少量凝集物,不易察觉。

— ——液体混浊,细菌无凝集。与对照管相同。

抗体效价(滴度)的判定:产生明显凝集反应(++)的最高血清稀释度为血清中所测抗体的效价。此效价代表血清中被测抗体的相对含量。血清中被测抗体效价愈高,表示血清中含该抗体愈多。

实验四 肥达试验

【实验原理】

用已知伤寒沙门菌菌体(O)抗原和鞭毛(H)抗原,甲型副伤寒沙门菌、肖氏沙门菌和希氏沙门菌的H抗原与患者血清作试管凝集试验,测定患者血清中是否有相应抗体及其效价,以辅助诊断伤寒和副伤寒。

实验材料、方法等请参照《医学微生物学实验指导》。

II. 间接凝集反应

间接凝集反应(indirect agglutination reactions)是将可溶性抗原(或抗体)先吸附于一定大小、与免疫无关的载体颗粒(如红细胞、聚苯乙烯乳胶颗粒等)表面,使之成为致敏颗粒,然后再与相应的抗体(或抗原)进行特异性反应,并在电解质存在的适宜条件下,出现凝集的现象(图 1-3)。如果载体颗粒为红细胞,则称为间接血球凝集试验(简称间接血凝);如果载体为乳胶颗粒,则称为间接乳胶凝集试验。根据致敏物质和反应方式的不同可分为三类:间接凝集试验、间接凝集抑制试验、反向间接凝集试验。

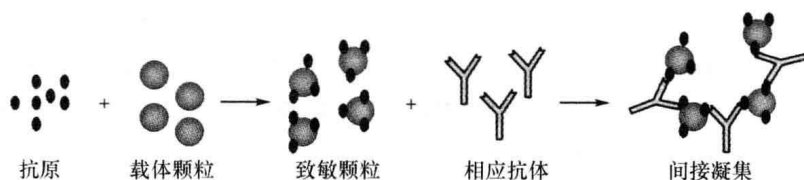


图 1-3 间接凝集反应

一、间接凝集试验

用可溶性抗原致敏载体颗粒,可以用来测定细菌、病毒等微生物的抗体和某些自身抗体。

实验五 间接乳胶凝集试验——抗链球菌溶素 O 的检测

【实验原理】

链球菌溶素 O(streptolysin O, SLO)是溶血性链球菌的代谢产物之一,具有溶血作用和较强的免疫原性。人受溶血性链球菌感染后 2~3 周,体内便产生抗 SLO 的抗体。将 SLO 吸附于聚苯乙烯乳胶颗粒成为致敏颗粒,可用以检测血清中是否有相应抗体。

【实验材料】

抗链球菌溶血素 O(antistreptolysin O, ASO)测定试剂盒、待测血清。

【实验方法】

- (1) 取洁净黑色反应板一块,选择三区,分别标记阴性对照、阳性对照、待检血清。
- (2) 分别在对应区加阴性对照、阳性对照、待检血清各一滴。
- (3) 在三区中分别加胶乳试剂各一滴,轻轻搅拌使其混匀。
- (4) 静置数分钟,观察结果。

【实验结果】

先观察阴性对照侧,应不出现凝集现象,阳性对照侧出现凝集。再观察试验侧,一段时间内出现均匀的乳白色凝集颗粒者为阳性,无凝集者为阴性。

【注意事项】

- (1) 加试剂和阴性、阳性对照,保证液滴大小一致。
- (2) 若阴、阳性对照结果出现异常,则试剂不可使用。

【思考题】

抗链球菌溶素 O 试验可以辅助诊断哪些疾病?

实验六 间接乳胶凝集试验——类风湿因子的检测

【实验原理】

类风湿因子(rheumatoid factor, RF)是一种抗变性 IgG 的自身抗体,可分为 IgM、IgA、IgG、IgD、IgE 五型。IgM 型 RF 阳性率为 60%~78%,通常被认为是 RF 的主要类型,也是临床免疫检验中常规方法所测定的类型。用乳胶颗粒吸附变性 IgG 作为检测试剂,待检血清中如含有 RF,可与胶乳颗粒出现凝集反应。这是检测 IgM 型 RF 的常用方法。

【实验材料】

类风湿免疫诊断试剂、待测血清、生理盐水、洁净载玻片、巴氏吸管、特种铅笔(或记号笔)、小试管、1ml 和 5ml 刻度吸管。

【实验方法】

- (1) 取洁净玻片或黑色反应板一块,分为二等份。
- (2) 两侧各加一滴类风湿免疫诊断试剂。
- (3) 用巴氏吸管吸取生理盐水一滴加于玻片右端,取一滴待测血清加于玻片左端。
- (4) 摇转玻片数次,静置数分钟,观察结果。

【实验结果】

先观察右侧对照,应不出现凝集现象,再观察试验侧,5min 内出现均匀的乳白色凝集颗粒者为阳性,无凝集者为阴性。

二、间接凝集抑制试验

如果先将待测可溶性抗原(抗体)与相应抗体(抗原)混合,隔一定时间后,加入致敏颗粒则因抗体(抗原)已被中和,不再出现凝集现象,则称为间接凝集抑制试验(indirect agglutination inhibition test)(图 1-4)。

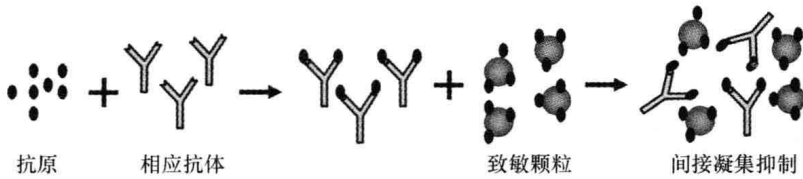


图 1-4 间接凝集抑制试验

间接凝集抑制试验可用来检测标本中是否存在与致敏载体相同的抗原(抗体),如血清中生长激素、尿中的绒毛膜促性腺激素等。

实验七 乳胶间接凝集抑制试验——妊娠诊断试验**【实验原理】**

用乳胶颗粒吸附人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)作为已知抗原,以 HCG 免疫血清作为已知抗体,利用孕妇尿中 HCG 含量远较非孕妇尿高的特点,使孕妇尿中 HCG 优先与 HCG 抗体结合,从而抑制抗体再与吸附有 HCG 的乳胶发生凝集,即间接凝集抑制现象。

【实验材料】

抗 HCG 免疫血清、吸附 HCG 的乳胶、待检尿液、生理盐水。

【实验方法】

- (1) 取洁净玻片或黑色反应板一块,分为二等份,右侧为对照侧,左侧为实验侧。
- (2) 取生理盐水一滴加于玻片右端,取待检尿液一滴加于玻片左端。
- (3) 两侧各加一滴抗 HCG 免疫血清,缓慢摇动 0.5~1min。
- (4) 两侧各加一滴乳胶,缓慢摇动混合均匀,3~5min 后观察结果。

【实验结果】

先观察右侧对照,应出现明显均一的凝集颗粒。左侧 2min 内出现凝集现象者为阴性,2~5min 内出现凝集为可疑,5min 不出现凝集为阳性。

三、反向间接血凝试验

反向间接血凝试验(reverse passive hemagglutination assay, RPHA)是以抗体致敏红

细胞来测定相应抗原的一种方法,其优点是灵敏、快速、简便和无需昂贵仪器,常用于检测标本中微生物抗原和某些肿瘤相关抗原等。

实验八 甲胎蛋白检测

【实验原理】

将甲胎蛋白(α -fetoprotein, α FP 或 AFP)抗体吸附在正常人 O 型红细胞上使成为致敏红细胞,再用其检测患者血清中的 AFP(抗原),以协助原发性肝癌诊断或普查等。

【实验材料】

甲胎蛋白诊断血球、待检血清、甲胎蛋白阳性血清、微量血凝板、吸管、滴管、生理盐水等。

【实验方法】

(1) 打开安瓿,按要求加入一定量蒸馏水或生理盐水溶化冻干的甲胎蛋白诊断血球,使用前必须摇匀。

(2) 取小试管三支,每支内放入 0.9ml 生理盐水,取待检血清 0.1ml 加入第一管中,并用吸管吹匀后,取 0.1ml 加入第二管中,同法混匀后,吸取 0.1ml 加入第三管中,此时待检血清分别稀释为 1:10、1:100、1:1000 备用。

(3) 用微量滴管(每滴约 0.025ml)从高稀释度至低稀释度分别移血清一滴置于微量血凝板的三个孔内。

(4) 按上述方法稀释已知阳性血清,加入血凝板小孔内,作阳性对照。

(5) 于另一孔内加入生理盐水一滴,备作血球盐水对照。

(6) 用微量滴管取混匀之诊断血球加入上述各孔内,每孔一滴,置振荡器上振摇 2min,静置室温 30min 后观察结果。

【实验结果】

各孔的血球凝集程度以“+”表示。

++++ ———— 坚实片状凝集,均匀铺于孔底,并有折边、卷曲现象。

+++ ———— 血球 3/4 凝集,均匀平铺,边缘不整齐,红细胞少量滑下。

++ ———— 血球 2/4 凝集,红细胞在孔底形成一个环状,四周有小凝集块。

— ———— 血球 1/4 凝集,血球集中孔底呈小圆团,但边缘不光滑,四周有小凝集块。

- ———— 血球下沉至孔底呈一个红色小圆团,边缘光滑整齐。

以出现“++”凝集的血清最高稀释倍数作为凝集效价。

【注意事项】

(1) 血凝法有前带现象,故抗原含量较高的血清(1:10)可能不表现凝集。在所有对照都正确的前提下,试验才能成立。

(2) 除原发性肝癌患者外,一部分肝病、胚胎性生殖细胞癌的患者和孕妇都可能有阳性反应。近期接受过马血清制品类注射的人,可出现假阳性。因此要结合病史及临床表现综合分析,必要时复查及随访,并用其他诊断方法慎重加以区别。

(3) 三种稀释度的甲胎蛋白半定量见表 1-3:已知诊断血球灵敏度为 5ng/ml。