

全国高等农业院校试用教材

兽医免疫学实验指导

(兽医专业用)

刘宝全 孙惠兰 李俊宝 张绍学 施善清 编

上海科学技术出版社

NGYIEYUANXIAOSHIYONGJIAOCAI

全国高等农业院校试用教材

兽医免疫学实验指导

刘宝全 孙惠兰 李俊宝 编
张绍学 施善清

兽医专业用

上海科学技术出版社

编 写 者

(按姓氏笔划为序)

刘宝全 孙惠兰 李俊宝

张绍学 施善清

审 稿 者

杜 念 兴

全国高等农业院校试用教材

兽医免疫学实验指导

刘宝全 孙惠兰 李俊宝 编

张绍学 施善清

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所发行 上海东方印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 3.125 字数 67,000

1985 年 5 月第 1 版 1985 年 5 月第 1 次印刷

印数 1—8,300

统一书号: 16119·878 定价: 0.61 元

前 言

兽医免疫学是高等农业院校五年制兽医专业新开设的一门理论性和技术性都比较强的专业基础课。在编写本教材的同时,我们根据各自在南京农业大学、东北农学院、江苏农学院和山东农业大学的实验特长,分工撰写了《兽医免疫学实验指导》。但由于学时的限制,只编入了一些基本实验;同时考虑到我国东西南北的地区差异,各院校的条件不尽相同,所以又适当增加了几次机动的实验,以供选用。

在编写过程中,尽管总结了各方面的实践经验,也参阅了一些技术资料,但由于水平和经验所限,加上时间仓促,定有不少缺点、错误,希望各方面的读者多加批评指正。

编 者

目 录

实验一	凝集试验	1
实验二	间接血凝试验	6
实验三	SPA 协同凝集试验	16
实验四	环状沉淀试验	19
实验五	琼脂扩散试验	21
实验六	免疫电泳	24
实验七	对流免疫电泳	27
实验八	火箭免疫电泳	30
实验九	补体结合试验	33
实验十	荧光抗体染色法	48
实验十一	免疫酶组化染色法	53
实验十二	E 玫瑰花环形成试验	60
实验十三	淋巴细胞转化试验(形态学方法)	65
实验十四	移动抑制试验	69
实验十五	血清免疫球蛋白盐析试验	74
附录	常用溶液	84

实验一 凝集试验

一、目的要求

通过实验，掌握试管凝集反应和平板凝集反应的操作技术和判定方法。

二、原理

颗粒性抗原与相应的抗体混合后，在电解质参与下，经过一定时间，抗原与抗体即可凝集成肉眼可见的凝集块。凝集反应一般是利用已知抗原（凝集原）检查未知抗体（凝集素），也可用已知抗体诊断抗原（被检病料中分离出的未知菌），以达到鉴定抗体（抗原）和诊断疾病的目的。

三、实验方法

（一）试管凝集试验（以布氏杆菌为例）需要以下材料：

1. 布氏杆菌试管凝集抗原及布氏杆菌阳性血清、阴性血清：均由兽医生物药品厂供应。

2. 被检血清：必须新鲜、无明显的蛋白凝固，无溶血现象和腐败气味。

3. 试验用稀释液：无菌 0.5% 石炭酸生理盐水。

4. 试管架、小试管（口径 8~10 毫米）及灭菌吸管等。

（二）玻片凝集试验（以雏鸡白痢为例）需要以下材料：

1. 鸡白痢全血平板凝集反应抗原及鸡白痢阳性和阴性

血清:均由兽医生物药品厂供应。

2. 洁净无油垢玻板、吸管及酒精灯等。

四、操作方法

(一) 试管凝集试验(以布氏杆菌病为例)

1. 被检血清的稀释度:在一般情况下,牛、马和骆驼用 1:50、1:100、1:200 和 1:400 四个稀释度;猪、山羊、绵羊和狗用 1:25、1:50、1:100 和 1:200 四个稀释度。大规模检疫时,也可只用两个稀释度,即牛、马和骆驼为 1:50 和 1:100;猪、山羊、绵羊和狗为 1:25 和 1:50。

2. 血清的稀释(以羊、猪为例)和加入抗原的方法:为每份血清准备小试管 5 支。第一管加入 2.3 毫升石炭酸生理盐水(检查绵羊时需用含 0.5% 石炭酸的 10% 盐水),第二管不加,第三、四、五管各加入 0.5 毫升。用 1 毫升吸管取受检血清 0.2 毫升,加入第一管中,并混合均匀。混合的方法,是将该试管中的混合液吸入吸管内,再沿管壁吹入原试管中,如此反复吸吹三、四次。混匀后,用吸管吸取混合液,向第二、三管中各加 0.5 毫升,再用同一吸管将第三管的混合液混匀(方法同前),并从中吸取 0.5 毫升加入第四管混匀,再从第四管吸取 0.5 毫升加入第五管,第五管混匀后弃去 0.5 毫升。这样稀释之后,从第二管到第五管,血清稀释度分别为 1:12.5, 1:25, 1:50 和 1:100。

血清稀释后,即可加入抗原。方法是先用含 0.5% 石炭酸的生理盐水,将抗原原液作 20 倍稀释(羊用含 0.5% 石炭酸的 10% 盐水溶液稀释),然后从第二管起每管加入抗原稀释液 0.5 毫升(第一管不加,作血清蛋白凝集对照)振摇均匀。加入抗原后,第二到第五管各管混合液的容积均为 1 毫升,血

清稀释度依次变为 1:25, 1:50, 1:100 和 1:200。

牛、马、骆驼的血清稀释和加抗原的方法与上述方法基本一致。不同的是第一管加 2.4 毫升 0.5% 石炭酸生理盐水和 0.1 毫升被检血清，加抗原后第二管到第五管的血清稀释度，依次为 1:50、1:100、1:200 和 1:400。

3. 对照管的制作: 每次试验均须作阴性血清、阳性血清、抗原对照。

4. 全部试管于充分振荡后置于 37~38°C 温箱中 22~24 小时，然后检查并记录结果。

试管凝集反应术式						单位: 毫升		
管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
血清稀释倍数	1:12.5	1:25	1:50	1:100	1:200	抗原对照	阳性血清对照 (1:25)	阴性血清对照 (1:25)
0.5% 石炭酸生理盐水	2.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
被 检 血 清	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	—	0.5	0.5
抗 原 (1:20)	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

5. 结果判定: 根据各管中上层液体的透明度、抗原被凝集的程度及凝集块的形状, 来判定凝集反应的强度(凝集价)。

++++ 液体完全透明, 菌体完全凝集呈伞状沉于管底, 振荡时, 沉淀物呈片、块或颗粒状(100% 菌体被凝集)。

+++ 液体基本透明(轻微混浊), 75% 菌体被凝集, 沉于管底, 振荡时情况如上。

++ 液体不甚透明,管底有明显的凝集沉淀,振荡时有块状或小片絮状物(50%菌体被凝集)。

+

液体透明度不显或不透明,有不甚显著的沉淀或仅有沉淀的痕迹(25%菌体被凝集)。

- 液体不透明,管底无凝集。有时管底中央有小圆点状沉淀,但振荡后立即散开呈均匀混浊。

确定每份血清的效价时,应以出现“++”以上的凝集现象的最高血清稀释度为血清的凝集价。

6. 判定标准:牛、马和骆驼于 1:100 稀释度,猪、山羊、绵羊和狗于 1:50 稀释度出现“++”以上的凝集现象时,被检血清应判为阳性反应。牛、马和骆驼于 1:50,猪、羊和狗于 1:25 稀释度出现“++”以上凝集现象时,应判为可疑反应。

可疑反应的牲畜,经 3~4 周,须重新采血检验。牛和羊如仍为可疑,即可判定为阳性。猪和马重检时,如凝集价仍为可疑反应,而又无临床症状者,可判为阴性。

(二) 玻板凝集试验(以鸡白痢病全血平板凝集为例)

1. 将抗原于试验前充分振荡,并使其温度达到 20°C 以上时,方可应用。

2. 用灭菌的吸管吸取鸡白痢全血平板凝集反应抗原一滴(约 0.05 毫升)滴在玻板上,同时固定被检鸡,用针头刺破鸡冠或翅静脉,以大号接种环(直径 4~5 毫米)蘸满鸡血(约 0.02 毫升),与抗原搅混均匀,静置待判定。

3. 每次试验均需作阴性和阳性血清对照。

4. 判定标准:

(1) 抗原与血液混合后,在 2 分钟内出现明显的颗粒凝集或块状凝集的为阳性反应,记录符号为“+”。

(2) 抗原和血液混合后,在 2 分钟内不出现凝集或仅呈

现均匀一致的微细颗粒者判为阴性,记录符号为“-”。

(3) 对不易判定为阳性或阴性的,可判为疑似反应,记录符号为“±”。

实验二 间接血凝试验

一、目的要求

1. 掌握微量反应板上试验操作及凝集图象的识别。
2. 通过示教了解红细胞醛化和致敏的基本方法。

二、原理

可溶性抗原和相应抗体在一定条件下形成复合物，当此复合物数量较少时，不能为肉眼所觉察。如果将抗原（或抗体）吸附在具有载体作用和指示功效的红细胞上，在电解质溶液中与对应物相遇，即可出现肉眼可见的凝集现象，使反应的敏感性大为提高。为区别于普通血凝反应，称此试验为“间接血凝”。

三、器材药品

1. 微量反应板：V型或U型，96孔或72孔均可。
2. 滴管及稀释棒：每滴的标准量是25微升，用于定量检测；一般定性试验，每滴30~50微升都行，不要求十分精确。
3. 微量混合器：单板型或双板型。
4. 稀释液：普通PBS（磷酸盐缓冲液）、生理盐水，甚至蒸馏水都可以。应用最多的是RSPB（含兔血清的磷酸盐缓冲液），配制方法见七（一）2~3项（11页）。
5. 敏化红细胞：一般就地取材，自备抗原或抗体，用以致敏醛化红细胞。比较方便的现成材料，如南方的锥虫补反抗

原,北方的鼻疽抗原,都很容易吸附(致敏)在红细胞上,作成敏化红细胞,方法见七(三) 2~3 项(13 页)。

6. 被检材料: 采集病畜血清若干份,要有标准的阴性血清及较多的阳性血清,便于对照观察。

四、操作方法

(一) 凝集试验

1. 根据被检材料的份数,按每份材料一排孔安排,在反应板上顺序编号。反应板可以横用,也可以竖用,视需要的孔数而定;一般定性试验多竖用,定量试验多横用。

2. 于计划的各排每孔加稀释液一滴。

3. 取被检材料一滴,对号加入该排第一孔,混合均匀,逐孔向后作倍比稀释至倒数第二孔为止。其系列稀释的倍数是: 2、4、8、16、32、64、128……等,最后一孔为稀释液对照。

4. 每孔加敏化红细胞一滴,移反应板于混合器上,中速摇振至红细胞分散均匀(约一分钟)。然后将反应板放入 37°C 温箱(南方的温暖季节可静置于室温),经 80~90 分钟观察结果。其形成的凝集图象,在静置状态数日不变;所以不必当场等候观察,可根据各自的情况,安排合适的时间记录结果。

(二) 凝集抑制试验 被检材料(血清)中的抗体与游离抗原结合后,就不再凝集携带抗原的红细胞,称为凝集抑制反应。主要用于证实凝集的特异性,也可用于检测抗体或抗原。

操作方法前段 1、2、3 项都与凝集试验相同。接着是拟作抑制试验的排,每孔加适度稀释的抑制材料一滴(板上稀释的抗体,以相应抗原作抑制材料;板上稀释的抗原,则以相应抗体作抑制材料。抑制材料的稀释度应事先预测,以至少能抑

制两个以上的凝集滴度为宜)。不需抑制的排,每孔加稀释液一滴。混合均匀,于 37°C 保温 30 分钟,再滴加敏化红细胞,照凝集试验 4 方法处理。

五、结果观察与凝集图象的识别

经过试验操作,静置 80 分钟之后,在数日之内,随时可以观察结果。将反应板衬以白色背景,或置于下有照明的毛玻璃板上,从正上方观察。

1. 先看对照排及对照孔是否标准典型。正常情况下,每排最后一孔是阴性;阴性对照排无凝集孔,某些材料可能出现非特异凝集,至多允许 2 孔;阳性对照排应凝集 4 孔以上。否则无效,宜查清原因重试。

2. 将各被检材料排与对照排比较,近阴性者为阴性,近阳性者为阳性(凝集孔数至少比阴性对照多 2 孔以上)。介于两性之间者为可疑,应适当降低敏化红细胞的浓度进行复试,再作判定。

3. 凝集图象与记录符号:不凝集的阴性孔红细胞都集中沉于孔底的最低处,形成一定的图象。不同孔型略有差异,V 型孔呈边缘清晰的圆点;U 型孔呈小圆圈(红细胞浓度偏高时呈较大的圆点)。记录符号是“-”或“0”。

不同程度的凝集孔,两种孔型都很近似。过去以“+”数代表凝集程度,现在改用数字表示更为方便。

红细胞形成薄层凝集,均匀分布整个孔底(有时边缘可出现皱缩),判为全凝集,记“4”。

红细胞少许沉积中部,周围有混浊带,约占孔面积的 50%,外围液澄明者,判为半凝集,记“2”。

孔内凝集范围比半凝集大,未遍及全孔者,判为多半凝

集,记“3”。

红细胞大部分沉积孔中心,沉积点边缘模糊者,判为少许凝集,记“1”。

凝集价的计算以“2”为终点,多半凝集与少许凝集的判定也以半凝集为标准,所以半凝集图象的识别和判定是关键,必须准确。

六、实验例式

1. 以抗原敏化红细胞测抗体:将被检血清与对照的阳性血清、阴性血清各稀释一排孔,滴加同一种敏化红细胞,结果如下式:

排序	组 别	1~12孔图象记录	结果判定
I	阴性对照	2 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	正 常
II	检料①	4 4 4 4 4 4 3 2 1 0 0 0	阳 性
III	检料②	4 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	阴 性
IV	阳性对照	4 4 4 4 4 3 2 1 0 0 0 0	正 常

检查材料凝集孔的最高稀释倍数,为该检料对该批敏化红细胞的凝集价。上表阳性对照血清的凝集价是128,检料1的凝集价是256。凝集的孔数也就是所谓凝集滴度。

2. 以抗体敏化红细胞测抗原(即所谓反向间接血凝):将被检材料、阴性对照材料和标准抗原等,各稀释一排,滴加同一种敏化红细胞,操作方法和结果判定同上。

3. 以抗原敏化红细胞测抗原:用凝集抑制试验,以阳性

血清稀释两排，一排滴加稀释 10 倍左右的被检材料(抗原)，每孔一滴，另一排各孔补加稀释液一滴。振荡混匀后置 37°C 保温 30 分钟，两排滴加同一种敏化红细胞。

术 式： I . 阳性血清 + 被检抗原 + 抗原敏化红细胞

II . 阳性血清 + 稀释液 + 抗原敏化红细胞

阳性结果： I . 4 3 1 0 0 0 0 0 0 0 0

II . 4 4 4 4 3 2 1 0 0 0 0

表明阳性血清凝集 6 孔，抑制排凝集 2 孔。被检材料对阳性血清的抑制滴度是 $6 - 2 = 4$ 。

抑制指数按稀释血清的倍比法计算，即 $2^4 = 16$ 。

抑制价 = 抑制指数 $\times$ 抑制物稀释倍数，即 $16 \times 10 = 160$ 。

阴性结果： I . 4 4 4 4 4 3 2 0 0 0 0

II . 4 4 4 4 3 2 1 0 0 0 0

4. 以抗体敏化红细胞测抗体：亦用凝集抑制试验，术式与反应结果类似上项 3，只是稀释在反应板上的是已知抗原，被检血清作抑制物。

5. 以上 3、4 两项的反向检查：稀释被检材料的抑制试验。将被检抗原或抗体，按倍比法稀释在反应板上，以已知的对应材料作抑制物，中和后滴加敏化红细胞，结果如下：

阳性反应：0 0 0 0 1 2 3 4 4 4 4 4

阴性反应：4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4

七、红细胞的醛化与致敏

(一) 溶液配制

1. PB(磷酸盐缓冲液)：由 0.15M 的 A、B 两液配成。

A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 53.73 克加蒸馏水至 1000 毫升

B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 23.40 克加蒸馏水至 1000 毫升

几种常用 PB 的 pH 及配合比例:

pH:	6.0	6.2	6.4	6.6	7.2	7.4	7.8	8.0
A:	13	19	27	38	73	82	92	95
B:	87	81	73	62	27	18	8	5

2. PBS(磷酸盐缓冲液): 其中 PB 为 $0.01M$, 由以上 PB 稀释 15 倍而成; S 即 NaCl, 生理盐水浓度。

3. RSPB(兔血清缓冲液): 兔血清含 1%, 经 $63^{\circ}C$ 30 分钟灭活; PB 为 $0.11M$, pH 7.2~7.4, 由 PB 母液($0.15M$) 100 毫升, 加蒸馏水 36 毫升而成。外加 NaN_3 使含 0.1%。

4. AB(醋酸缓冲液): 由 $0.1M$ 的甲、乙两液配成。

甲: $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 6.8 克加蒸馏水至 500 毫升

乙: CH_3COOH 3.0 毫升加蒸馏水至 500 毫升

常用几种 AB 的 pH 及配合比例:

pH:	4.0	4.2	4.4	4.6	4.8	5.0
甲:	18	26	37	49	60	70
乙:	82	74	63	51	40	30

5. 3% 丙酮醛溶液: 取原液(含丙酮醛 20%)15 毫升, 以 10% NaOH 液调 pH 至 7.2, 加同 pH PB 至 100 毫升。

6. 2.5% 戊二醛溶液: 取原液(含戊二醛 25%)10 毫升, 加 pH 7.4 PB 90 毫升。

7. 3% 甲醛溶液: 取原液(含甲醛 36~38%)8.5 毫升, 加 pH 7.4 PB 至 100 毫升。

8. 鞣酸溶液: 宜临用时以生理盐水新鲜配制, 1% 浓度的母液, 保存于 $4^{\circ}C$, 以用三个星期为限。

(二) 红细胞醛化(或固化) 利用醛类等蛋白质凝固剂比较温和地固定红细胞, 并保持其原形及表面化学基团的粘附作用。南京农业大学兽医系微生物室制备的醛化红细胞,

4°C保存3年多仍有效用。

1. 采血与洗涤红细胞: 以抗凝法或脱纤法取数头绵羊血混合, 暂存4°C, 一星期内处理完毕。先用生理盐水洗5次, 每次用液约为血量的10倍, 混合均匀, 离心1500 rpm (约200 g) 10分钟, 弃上清液。少量血凝块用镊子除去, 必要时以数层纱布过滤。

2. 红细胞泥容积的估计: 去上清液后的沉降红细胞如粘土状, 称为红细胞泥。用pH 7.2~7.4的PB悬浮, 先加入定量PB(譬如60毫升, 约相当于红细胞泥的数倍), 从离心管内洗出红细胞泥, 倒入量筒测得80毫升悬液, 则知红细胞泥实际容积为 $80 - 60 = 20$ 毫升。

3. 室温醛化: 将洗好的红细胞泥用同一PB配成8%悬液, 上项20毫升红细胞泥可配悬液250毫升(即在80毫升的基础上加入同一PB 170毫升)。然后与3%丙酮醛等量相混, 于24~25°C室温下, 缓慢搅拌17~18小时(采用南京微分电机厂供应的TYC-60型同步马达)。最后红细胞呈咖啡色, 离心去上清液, 以同一PB洗5次, 即得丙酮醛固化的红细胞。甲醛处理的方法与过程也是如此; 戊二醛则不同, 宜配成5%红细胞悬液, 每100毫升加入2.5%戊二醛20毫升, 搅拌30分钟。

4. 低温醛化: 无搅拌设备时, 加有丙酮醛(或甲醛)的红细胞悬液, 混匀后存4°C, 每隔数小时摇振混匀一次, 单程48小时, 其它操作同室温醛化。

5. 双醛化: 以上几种醛化方法, 可以任取一种; 也可以任取两种方法连续处理, 即双醛化。其中以戊二醛处理的红细胞最敏感, 缺点是容易自凝; 比较稳妥尚数丙酮醛—甲醛化。处理完毕的红细胞, 用含0.1% NaN_3 的PB (0.11M,