

SHIYAN MIANYIXUE
JISHU JIAOCHENG

实验免疫学 技术教程

白慧玲 主编



河南大学出版社
HENAN UNIVERSITY PRESS

实验免疫学技术教程

主 编 白慧玲

副主编 马远方 柴立辉 刘瑞敏 卢 峰
刘峰涛 赵粤萍 裴景堂

河南大学出版社

• 开封 •

图书在版编目(CIP)数据

实验免疫学技术教程/白慧玲主编. —开封:河南大学出版社, 2009. 9

ISBN 978-7-5649-0038-0

I. 实… II. 白… III. 医药学:免疫学—实验—高等学校—教材 IV. R392—33
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 147948 号

责任编辑 程新晓

责任校对 谢 冰

封面设计 马 龙

出 版 河南大学出版社

地址:河南省开封市明伦街 85 号

邮编:475001

电话:0378-2825001(营销部)

网址:www.hupress.com

排 版 郑州市今日文教印制有限公司

印 刷 郑州市毛庄印刷厂

版 次 2009 年 9 月第 1 版

印 次 2009 年 9 月第 1 次印刷

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 11.75

字 数 271 千字

印 数 1~2200 册

定 价 19.80 元

(本书如有印装质量问题,请与河南大学出版社营销部联系调换)

前 言

免疫学是一门既古老又崭新的学科,涉及医学各个领域,并与理工农各学科相互渗透。医学免疫学是生命科学的前沿学科,也是医科学生的主干必修课程之一。目前免疫学的研究已经进入了一个崭新的时代。现代免疫学的研究和应用涉及生物医学的各个领域,它与分子生物学一样是生物医学基础研究和临床不可或缺的工具。

医学免疫学实验教学是免疫学教学必不可少的重要环节,要培养学生的科学态度,动手能力,综合分析问题、解决问题的能力及创新精神等,主要依靠实验教学来完成。教育部《关于加强高等学校本科教学工作提高教学质量的若干意见》指出,“实验教学对于提高学生的综合素质、培养学生的创新精神与实践能力具有特殊作用。要重视本科教学的实验环节,保证实验课的开出率,达到本科教学合格评估标准,并开出一批综合性、设计性实验”。然而传统的免疫学实验教材和教学主要以验证理论知识和掌握实验技术为主要目标,这一传统的教学模式已不能适应当今社会对高等医学能力、素质的更高要求,也不利于激发学生的学习积极性。基于上述认识和实践,根据我院医学免疫学实验教学需要,同时为了帮助学生更好的、系统的掌握免疫学课程的基本知识,我们教研室教师总结多年一线教学经验编写了这本能力培养性的《实验免疫学技术教程》一书。

本书共分两部分。第一部分为免疫学实验技术,在编写过程中,汲取了有关教材的精华,删除了陈旧的实验内容,增加了部分新技术。并对医学免疫学实验教学内容进行了重新组织、分类、整合,形成了基础性实验、综合性实验和设计性实验三大教学模块。基础性实验帮助学生理解和巩固所学理论知识,掌握相应的试验方法和技能;综合性实验可以训练学生对所学的免疫学知识和实验技术的综合运用能力、独立工作能力等;设计性实验重在培养学生发现问题、解决问题的能力。

第二部分为试题集。重点是巩固学生所学的基础知识,每个章节都有重点及难点知识讲解,并根据教材精选了相当数量的试题供学生练习。试题形式包括填空题、单项选择题、名词解释和问答题。每部分试题均附有参考答案。

该教材以基础性实验为主,以综合性实验作为提高,以设计性实验作为扩展。全书内容完整、系统、科学,强调实用性和可行性,力求介绍学生需要掌握的基本技术和应用价值较大的技术;文字上力求简明扼要,重点突出,通俗易懂。

虽然参与本书编写的人员主要是从事一线教学工作的教师,有着丰富的教学经验,但由于医学免疫学及其技术的发展日新月异,也由于我们的编写时间和知识水平有限,错误和不足之处在所难免,请广大读者和同行给予批评指正,以使该教材在今后的修订中不断完善,我们将表示诚挚的谢意。

编 者
2009.6

目 录

第一部分 医学免疫学实验技术

概述	(3)
一 医学免疫学实验目的与要求	(3)
二 医学免疫学实验室规则	(3)
第一章 基础性实验	(5)
实验一 免疫血清的制备	(5)
实验二 凝集反应	(8)
一 直接凝集反应	(8)
二 间接凝集反应	(9)
实验三 沉淀反应	(15)
一 环状沉淀实验	(15)
二 双向免疫扩散实验	(16)
三 单向免疫扩散实验	(17)
四 对流免疫电泳实验	(18)
五 火箭电泳实验	(19)
六 免疫电泳实验	(21)
七 免疫浊度测定实验	(22)
实验四 补体参与的反应	(24)
一 血清总补体溶血活性(CH50)测定	(24)
二 溶血反应	(25)
三 补体结合试验	(26)
四 补体依赖的细胞毒试验(附:HLA 血清学分型法)	(28)
实验五 免疫标记技术	(31)
一 酶免疫技术	(31)
二 免疫荧光技术	(36)
三 放射免疫技术	(37)
四 胶体金标记技术	(40)
五 化学发光免疫分析	(42)
六 生物素-亲和素免疫标记技术	(45)
实验六 免疫细胞的分离	(48)
一 人外周血单个核细胞的分离	(48)
二 小鼠腹腔巨噬细胞的分离	(49)
三 T淋巴细胞和B淋巴细胞的分离技术	(50)
实验七 免疫试验有关动物模型的建立	(54)

一	免疫功能低下动物模型的建立	(54)
二	荷瘤动物模型的建立	(55)
第二章	综合性实验	(57)
实验八	T 细胞亚群测定	(57)
实验九	免疫细胞功能检测	(59)
一	E 玫瑰花环试验	(59)
二	CTL 杀伤功能测定	(60)
三	溶血空斑形成试验	(62)
四	巨噬细胞吞噬功能的检测	(63)
实验十	淋巴细胞增殖试验	(66)
一	形态学方法	(66)
二	^3H -TdR 掺入法	(67)
三	MTT 比色法	(68)
实验十一	细胞因子检测技术	(70)
实验十二	超敏反应	(72)
一	豚鼠过敏性反应	(72)
二	皮肤试验	(73)
实验十三	临床免疫检测	(76)
一	血清 IgE 测定	(76)
二	循环免疫复合物的检测	(77)
三	类风湿因子的检测	(78)
实验十四	淋巴细胞交叉配合试验	(80)
第三章	设计性实验	(81)
实验十五	设计性实验的选题、设计与实施	(81)
一	设计性实验的选题	(81)
二	设计性实验的内容及步骤	(82)
三	设计性实验的组织实施	(83)
四	实验论文的撰写	(84)
五	论文答辩	(85)
六	设计性实验举例	(85)
实验十六	设计性实验参考选题	(88)
附录	免疫学实验常用试剂及配制方法	(92)
一	缓冲液	(92)
二	培养液	(96)
三	ELISA 试剂	(97)
四	其他试剂溶液	(98)
参考文献		(100)

第二部分 医学免疫学考试同步指导

第一章	免疫学概论及免疫系统·····	(103)
第二章	抗原·····	(111)
第三章	免疫球蛋白·····	(118)
第四章	补体系统·····	(128)
第五章	主要组织相容性抗原·····	(136)
第六章	免疫细胞与免疫应答·····	(143)
第七章	超敏反应·····	(152)
第八章	免疫学技术与应用·····	(160)
第九章	临床免疫学·····	(169)

第一部分

医学免疫学实验技术

概 述

免疫学是一门既古老又崭新的学科,涉及医学各个领域,并与理工农各学科相互渗透。医学免疫学是生命科学的前沿学科,也是医学生的主干必修课程之一。目前免疫学的研究已经进入了一个崭新的时代。现代免疫学的研究和应用涉及生物医学的各个领域,它与分子生物学一样是生物医学基础研究和临床医学不可缺的工具。

医学免疫学是一门实践性、应用性很强的学科,教学过程分为理论教学和实验教学。实验教学作为免疫学教学的重要环节,直接影响到人才培养目标的实现,特别是在培养学生的科学态度、实践技能、创新能力方面,具有重要的地位。

一 医学免疫学实验目的与要求

医学免疫学实验课程的开设,目的在于不仅使学生验证部分理论知识和加深对课堂讲授内容的理解,更重要的是在掌握系统理论知识的基础上,学习和掌握免疫学实验的基本技术和技能,培养学生观察、思考、分析和解决问题的能力,以及严肃认真的科学态度和创新精神,提高学生的综合素质。

1. 基础性实验 要求学生系统学习和掌握常用的经典免疫学实验方法和现代免疫学实验技术,使学生理解和巩固所学的理论知识,掌握相应的实验方法和实验技能。

2. 综合性实验 实验内容涉及本课程的综合知识或相关课程知识,往往由多种实验手段、技术和层次的实验内容所组成。通过综合性实验,进一步训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、独立工作能力和对实验结果的综合分析能力。

3. 设计性实验 是在完成基础性试验和综合性试验的基础上,给定实验目的、要求和所提供的实验条件,由学生自行查阅资料、自选题目、自行设计实验方案,并在老师指导下,进行试验,最后以论文形式写出实验报告。目的在于激发学生的创新性思维,培养学生的科研能力,提高学生的综合素质。

二 医学免疫学实验室规则

1. 学生在上实验课前,应对实验内容进行预习,明确实验目的、要求,了解实验原理和操作步骤,熟悉所要使用的仪器、药品的性质和注意事项,预测实验结果。

2. 注意保持科学实验的严肃性、严格性和严密性。实验过程中,应仔细认真地观察教师的演示,严肃认真地按规定步骤进行操作。

3. 仔细、耐心地观察实验过程中出现的各种现象,及时、真实、客观地记录实验结果,并积极思考,认真分析,得出结论。

4. 积极参与小组设计实验,树立团队精神,并发挥自己的聪明才智,创造性地开展科学实

验。

5. 实验所用的仪器、器材和试剂须按照要求摆放,严格按照操作程序进行操作,保证实验过程顺利进行,并取得预期结果。

6. 要爱护公共财物,节约试剂材料,不得将实验室任何物品私自带走。如将仪器、器材损坏,应及时报告教师,并登记备案。

7. 实验室内应保持安静,遵守纪律,不得高声谈笑、随便走动、玩弄动物。

8. 实验室内禁止吸烟、进食、饮水,不得用嘴吸吸管及润湿标签,不准随地吐痰。

9. 如有传染性材料、有毒材料流洒于桌面、地面或衣服上,或发生割破皮肤、被动物咬伤等意外时,要及时报告教师,做好妥善处理。

10. 实验结束后,应清理实验用品,物归原处。实验废弃物应放入或倒入指定的地方或容器内。服从卫生值日安排,认真负责地做好清洁卫生。

11. 离开实验室前应洗手,注意关好水、电、门、窗等。

12. 认真填写实验记录,按时提交实验报告。

(白慧玲)

第一章 基础性实验

实验一 免疫血清的制备

免疫血清是机体受到抗原物质刺激后的血清,含有特异性免疫球蛋白。可直接应用于病原的诊断或感染性疾病的紧急预防和治疗;也可通过纯化血清中的免疫球蛋白来制作多种与免疫相关或不相关疾病的诊断和治疗制剂。免疫血清又称抗血清或抗体,而从抗血清中纯化的免疫球蛋白则只能称为抗体。在传统的免疫学方法中,尤其是作细菌的血清学鉴定时,抗血清即能满足要求,无需纯化,因为纯化的过程将造成免疫球蛋白的丢失。但在现代免疫学方法中,由于免疫标记和反应精确度的需要,必须纯化抗血清的有效成分,即获得免疫球蛋白甚至是某一类或亚类的免疫球蛋白。

抗体的制备大致包括三个阶段,即抗原的制备与纯化、动物免疫和血清分离纯化与鉴定。抗原是制备抗体的先决条件,要制备高质量的抗体,必须首先获得特异性高的抗原性物质。抗体制备的方案视抗原的性质不同而异。

【目的要求】

本实验制备抗人全血清和伤寒沙门菌 O 抗体,要求掌握免疫血清制备的原理及其方法步骤。

【实验原理】

用抗原刺激机体可以使机体产生抗体,抗原与抗体是一对概念,抗原的纯度和活性影响着其免疫动物后获得的抗体的特异性和滴度。根据抗体产生的一般规律,视抗原的性质选择不同的途径免疫动物,经初次、再次免疫的过程,使得动物血清中产生足量的特异性抗体,继而分离血清并纯化免疫球蛋白,得到免疫血清或抗体。

【器材试剂】

1. 抗原与免疫对象 细菌菌种(伤寒沙门菌 O₉₀₁)、混合人全血清、健康家兔。
2. 福氏佐剂 ① 福氏不完全佐剂:称取羊毛脂 5g,逐滴加入石蜡油 20mL(羊毛脂:石蜡油可为 1:1~1:4),高压灭菌后 4℃保存备用。② 福氏完全佐剂:于不完全佐剂中加入卡介苗 2~20mg/mL,研钵中研磨乳化后即为完全佐剂,冰箱保存备用。
3. 生理盐水、麦氏比浊管、甘油、防腐剂(0.02%叠氮钠或 0.01%硫柳汞)等。
4. 剪刀、镊子、注射器、研钵、试管等器材和冰箱、离心机等仪器。

【方法步骤】

1. 伤寒沙门菌 O 抗体的制备

(1) 伤寒沙门菌 O 抗原的制备:经革兰染色作细菌纯度鉴定的伤寒沙门菌 O₉₀₁,密集划线接种于普通琼脂平板(若需大量制备,可接种于用柯氏瓶制备的琼脂培养基),37℃培养 24~48h 后,用生理盐水将细菌菌苔洗于清洁、无菌的三角烧瓶中,置 60℃水浴或隔水煮沸 1h 以破

坏细菌的鞭毛,用滤纸过滤(大量制备时)或移入离心管 4000r/min 离心 10~20min(少量时)。将滤过的菌液接种少量于琼脂平板进行无菌试验(37℃,24h),确定无菌后用生理盐水调整菌液浓度至 10⁹ 个/mL,此为细菌 O 抗原,置 4℃ 保存备用。若制备鞭毛抗原,则可用含有 5%石炭酸(苯酚)的生理盐水洗下琼脂平板上的菌苔,37℃ 温育 48h 后做无菌试验,滤过后用生理盐水配成一定浓度。

(2) 伤寒沙门菌 O 抗原免疫方案:用于免疫动物的菌液浓度视菌种的不同而异,伤寒沙门菌、志贺痢疾菌等肠道杆菌,免疫浓度多为 10⁹ 个/mL 左右。细菌性抗原的免疫方案大致相同,见表 1-1

表 1-1 伤寒沙门菌 O 抗原免疫方案

免疫日期(d)	免疫途径	抗原	免疫剂量(mL)
1	多点皮内	伤寒沙门菌 O 抗原	1.0
6	静脉	伤寒沙门菌 O 抗原	0.5
11	静脉	伤寒沙门菌 O 抗原	0.5
16	静脉	伤寒沙门菌 O 抗原	1.0
19	静脉	伤寒沙门菌 O 抗原	2.0

(3) 试血:末次免疫 7d 后即可试血,耳静脉或心脏采血,分离血清与伤寒沙门菌 O 抗原作试管凝集试验,凝集效价(滴度)在 1:1600~1:3200 之间时即可放血,若效价较低可继续加强免疫。

(4) 放血:颈动脉放血(也可心脏采血),以最大限度地获得血清。

2. 抗人全血清的制备

(1) 抗原-福氏完全佐剂:取混合人全血清,用生理盐水作 1:4 稀释。将稀释血清按与完全佐剂 1:1 体积的比例混合,制成油包水状态。具体方法如下:

1) 研磨法:取完全佐剂置于无菌研钵中,然后逐滴加入稀释混合人血清,边加边研磨,直至滴一滴至水中不散开为止,此即完全乳化的油包水状态。若系不完全佐剂,则像加入人全血清那样,按 2~20mg/mL 的量加入卡介苗。

2) 注射器法:即用两个注射器对接,使佐剂与抗原往返推拉,直至乳化。另外,也可将佐剂置磁力搅拌器上,边搅拌,边滴加抗原并继续搅拌,使其完全乳化。

(2) 抗原-福氏完全佐剂免疫动物:取健康家兔,用剪刀减去家兔双后足足掌的毛,碘酒和酒精棉球消毒。每只足掌注射抗原-福氏完全佐剂 0.5mL,每只家兔注射量 1mL。两周后,再于膈窝淋巴结内注射抗原-福氏完全佐剂,每侧注射量仍为 0.5mL。

(3) 无佐剂的人血清加强免疫:上述免疫一周后,耳静脉注射人血清(1:2 稀释)0.5mL 左右以加强免疫,如此重复 1~2 次,并于最后一次注射一周后采血。

(4) 试血:采血方法同伤寒沙门菌 O 抗血清制备。试血时,环状沉淀测定的抗体效价达到 1:5000,双向琼脂扩散试验效价达到 1:16 以上即可放血收集血清。如效价不够,可追加免疫。

(5) 抗血清采集:颈动脉放血或心脏采血获得的兔血,置 37℃ 促进血块收缩,并用毛细吸管吸取血清,经 3000r/min 离心去除残留的红细胞。

3. 抗血清的鉴定

获得的免疫血清需要进行特异性检测、亲和力测定和效价滴定。针对颗粒性抗原的免疫

血清效价,可通过凝集或溶细胞实验(如溶血素效价滴定)检测。可溶性抗原相应抗体的效价和纯度多选用环状沉淀、琼脂扩散和免疫电泳的方法检测。酶免疫测定、放射免疫分析及平衡透析等方法,可用于抗体的特异性和亲和力测定。抗血清鉴定的方法详见后述相应实验。

4. 抗血清的纯化

更加精细的免疫实验需要从抗血清中提取免疫球蛋白,此过程称为抗血清的纯化。纯化的步骤为:50%饱和硫酸铵盐析以沉淀血清球蛋白,应用透析或分子筛法除盐。除盐后的球蛋白过阴离子交换柱(DEAE-纤维素),根据不同类别免疫球蛋白的等电点,选用不同pH和离子强度的缓冲液分别洗脱之;高渗或风干法浓缩免疫球蛋白,若使用冷冻干燥器则可获得干燥制品。

5. 抗血清的保存

抗体的保存以浓度20~30mg/mL为宜,加入万分之一的硫柳汞或千分之一的叠氮钠防腐,并加入等量的中性甘油,分装小瓶,-20℃以下保存,数月至数年内抗体效价无明显改变。

【结果分析】

抗原免疫动物后获得的抗血清,效价可用上述相应试验判断;其特异性则可通过双扩、免疫电泳或交叉凝集试验进行考察。各试验结果的观察和判断参见相应单元。此外,抗血清的外观应该为澄清,力求无溶血、无血液有形成分残留和无细菌等微生物污染。

【注意事项】

1. 动物的选择

免疫血清的制备多选用家兔为免疫对象,若系大量制备或二抗种属特异性的需要,也可选用羊或马。选用的动物必须健康,且以雄性为佳。为了避免个体差异,每种抗原最好免疫3只以上动物。

2. 抗原的准备

全血清抗原应该选择3人以上混合血清,以避免个体差异性;血清应新鲜,以保持血清中各成分的活性。在细菌性抗原制备过程中,应严格无菌操作,保证其纯度和避免对实验者的感染。

3. 佐剂的准备与使用

佐剂应用于可溶性抗原的免疫,颗粒性抗原的免疫无需佐剂。佐剂与抗原混合研磨时,应充分乳化,否则难以达到预期的免疫效果。在使用佐剂-抗原时,若难以吸入注射器,则可将连同装有佐剂的容器置热水上加热,并选用较粗的注射针头。注射完毕后,剩余佐剂-抗原置4℃保存。

4. 免疫程序

免疫程序并非固定不变,一般而言,不与佐剂一同免疫的抗原,免疫间隔时间较短,可每隔2~3天免疫一次。由于佐剂具有缓释作用,与佐剂一起免疫的抗原可隔1~2周免疫一次。无论有无佐剂,应在最后一次免疫一周后,采集血清。加强免疫的剂量一般为首次剂量的1/5~2/5。如需制备高度特异性的抗血清,可选用低剂量抗原短程免疫;若欲得到高效价的抗血清,则宜采用大剂量抗原长程免疫。由于免疫期限及间隔时间较长,要注意脱敏,尤其在进行静脉免疫时。脱敏的原则是少量多次注射抗原,例如,在静脉注入抗原前,先将抗原少量注入腹腔,1h后再作缓慢静脉注射。

(刘瑞敏)

实验二 凝集反应

细菌和红细胞等颗粒性抗原,当与相应抗体特异结合后,在适量电解质存在的条件下,可逐渐聚集,出现肉眼可见的凝集现象称为凝集反应。反应中的抗原称为凝集原(agglutino-gen),抗体称为凝集素(agglutinin)。反应过程可分为两阶段:① 抗原抗体的特异结合;② 出现可见的颗粒凝集。

凝集试验既是一个定性的检测方法,即根据凝集现象的出现与否判定结果为阳性或阴性;也是一个半定量的检测方法,即将标本作一系列对倍稀释后进行反应,以出现阳性反应的最高稀释度作为滴度。由于凝集反应方法简便,敏感度高,因而在临床检验中被广泛应用。

凝集反应可分为直接凝集反应和间接凝集反应两大类。

通过以下实验的实践,掌握各种凝集反应的原理,熟悉方法步骤、结果判断以及注意事项。

一 直接凝集反应

直接凝集(direct agglutination)反应是指细菌、红细胞等颗粒性抗原,在适量电解质参与下,直接与相应抗体结合而出现的凝集现象。常用的凝集试验有玻片法和试管法两种。

(一) 玻片法凝集试验

【实验原理】

玻片法凝集试验(slide agglutination test)多用作定性试验。一般是用1滴已知诊断血清与1滴受检菌液或细胞悬液,在玻片上混匀后,短时间内用肉眼观察结果。出现颗粒凝集的为阳性反应。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。也常用于红细胞ABO血型的鉴定。

【器材试剂】

1. 标本 任一常见细菌的平板或斜面培养物,待测血清。
2. 试剂 与细菌相对应的诊断血清(可用生理盐水作适当稀释,以免发生前带现象)、生理盐水、已知沙门伤寒菌菌体抗原悬液(7×10^8 个/mL)、伤寒沙门菌O抗血清。

方法步骤(以鉴定待测标本中的细菌为例)

- (1) 取洁净玻片1张,用蜡笔划分为左右2格。
- (2) 用接种环按无菌操作取生理盐水和已知诊断血清各2环分别置于左右格内。
- (3) 用接种环取标准菌液少许于左格生理盐水中混匀。
- (4) 灭菌接种环,同样方法取待检菌液少许于右格诊断血清并混匀。
- (5) 将玻片轻轻晃动,室温下观察结果。

【结果分析】

生理盐水对照组不出现凝集,为均匀浑浊的乳状液。在诊断血清中,细菌与相应抗体反应

会出现肉眼可见的凝集块,为阳性结果。如与对照组相同不发生凝集则为阴性。

【注意事项】

1. 每一待检菌均需作生理盐水对照,以排除当细菌发生S—R变异时的细菌自凝,保证试验结果的准确性。
2. 在载玻片两端涂布细菌时,应先涂生理盐水一侧,后涂诊断血清一侧,以免将血清误带入生理盐水一侧
3. 试验后的细菌仍有传染性,应将玻片放入消毒缸内
4. 若作ABO血型鉴定,室温过低(-10°C 以下)可出现冷凝集,造成假阳性结果。
5. 严格无菌操作。

(二) 试管法凝集试验

试管法凝集试验(tube agglutination test)为半定量试验,在微生物学检验中常用已知细菌作为抗原液与一系列稀释的受检血清混合,保温后观察每管内抗原凝集程度,通常以产生明显凝集现象的最高稀释度作为血清中抗体的效价(titer),亦称为滴度。在试验中,由于电解质浓度和pH不适当等原因,可引起抗原的非特异性凝集,出现假阳性反应,因此必须设不加抗体的稀释液作对照组。

临床上常用的直接试管凝集试验为肥达试验(Widal test)和外斐试验(Weil—Felix test)。在输血时也常用于受体和供体两者的红细胞和血清的交互配血试验。(方法步骤见肥达试验)

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与免疫特异性无关的颗粒性载体的表面,形成人工的免疫微球(或致敏载体),然后与相应抗体(或抗原)作用,在适宜的电解质存在的条件下,出现特异性凝集现象,称间接凝集反应(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,因此被广泛应用于临床检验。

(一) 间接血凝试验

【实验原理】

血凝试验(hem agglutination test)是红细胞凝集试验的简称。间接血凝试验(indirect hem agglutination test)是将可溶性抗原(细菌的提取液等)吸附于红细胞成为抗原致敏红细胞,这种“致敏红细胞”与相应抗体作用可产生红细胞凝集现象(图2—1)。以测定伤寒血清抗体滴度为例叙述如下:

【器材试剂】

1. 伤寒杆菌“O”抗原。
2. 伤寒杆菌O₉₀₁免疫兔血清。
3. 2%绵羊红细胞悬液、生理盐水、试管、吸管、37℃水浴箱。
4. “O”抗原的制备:将伤寒杆菌O₉₀₁接种于柯氏瓶,37℃培养18~24h,用生理盐水洗下

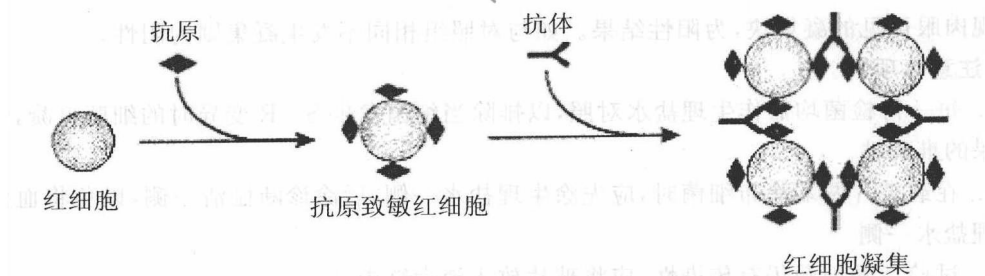


图 2-1 间接血凝试验原理示意图

菌苔配制成每毫升含 100 亿个细菌的悬液，置 100℃ 水中 2h，离心沉淀，吸取上清液分装于无菌试管，4℃ 冰箱保存备用。

5. 致敏红细胞悬液制备：取一定稀释度的抗原（应事先滴定）加等量 2% 绵羊红细胞悬液，混合后放入 37℃ 水浴箱中，每隔 15min 取出振摇 1 次，共经 2h，然后取出，用生理盐水洗涤 3 次，再配制成 0.25% 悬液即成。

【方法步骤】

1. 取小试管 10 支，排于试管架上，于第 1 管中加入生理盐水 0.9mL，其余各管加 0.25mL。

2. 以吸管吸取已加热灭活的免疫血清 0.1mL，加入第 1 管，混匀后吸取 0.75mL，于第 2 管中加 0.25mL，余下 0.5mL 弃去。

3. 将第 2 管血清与盐水混合后，吸取 0.25mL 至第 3 管。如此依次稀释到第 9 管，自第 9 管中吸出 0.25mL 弃去。第 10 管不加血清留作对照。

4. 于每管加入等量已致敏的 0.25% 绵羊红细胞悬液，混匀后放入 37℃ 水浴中 2h 观察结果。

【结果分析】

凡红细胞沉积于管底，集中呈一圆点的为不凝集（—）。如红细胞凝集，则分布于管底周围。根据红细胞凝集的程度判断阳性反应的强弱（图 2-2），以 +++ 凝集的孔为滴度终点。

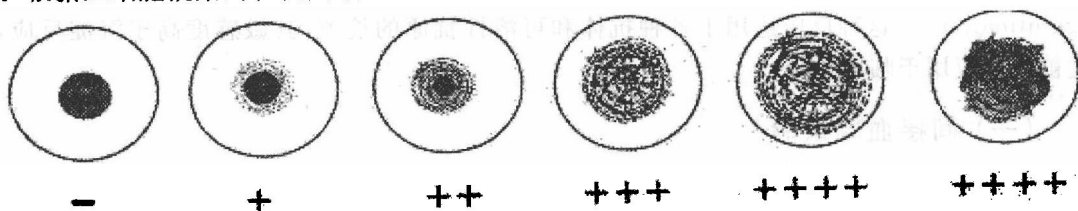


图 2-2 血凝反应强度示意图

—：红细胞沉积于管底；

＋：红细胞沉积于管底，周围有散在少量凝集；

＋＋：红细胞形成片状凝集，面积较小，边缘较松散；

＋＋＋：红细胞形成片状层凝集，面积略多于＋＋；

＋＋＋＋：红细胞形成片状凝集，均匀布满孔底，或边缘皱缩如花边状（如左）；

呈现明显血凝（＋＋）的试管中免疫血清的最高稀释倍数，即为该血清的间接血凝效价。

【注意事项】