

抗原抗体检测技术

抗原与相应的抗体在体外相遇时可发生特异性结合，呈现某种反应现象。根据抗原的物理性状及参与反应的物质不同可以分为凝集反应、沉淀反应及补体参与的各种反应等。

一、直接凝集

在玻片或其它支持物上，颗粒性抗原（细胞、细菌等）与相应抗体在有适量电解质存在时，直接结合可形成肉眼可见的凝集块。该方法简便，快速，为定性试验，常用于鉴定抗原。

（一）玻片凝集-ABO 血型鉴定

根据人红细胞表面 ABO 血型抗原和人血清中 ABO 抗体，可将人血型分为 A 型、B 型、O 型和 AB 型。A 型：有 A 抗原，抗 B 抗体；B 型：有 B 抗原，抗 A 抗体；AB 型：有 A 和 B 抗原，无抗 A 抗 B 抗体；O 型：无 A 和 B 抗原，有抗 A 和抗 B 抗体。检测红细胞表面 ABO 血型抗原，标本为红细胞，称为正定型。检测人血清中抗 A、B 抗体，标本为血清，称为反定型。

1、正定型

(1)材料：

①红细胞标本：采静脉血。

②抗体试剂：抗 A、抗 B 血型抗原单克隆抗体（血凝效价 256，亲合性少于 15 秒）。

③生理盐水。

④器材：玻片、小试管、小巴氏管、小吸球、无菌注射器、止血带、牙签、记号笔、酒精棉球、碘酒棉球等。

(2)方法：

①取一块玻片或瓷砖片，按下表标记划格，每块板可以检测 5 人。

试 剂	红细胞标本				
	1	2	3	4	5
抗 A 抗体					
抗 B 抗体					
抗原型别					

②取试管，装入 1 ml 生理盐水。皮肤消毒后，静脉抽血 1ml，滴 2 滴入试管中（余下静置，留取血清，做反定型用），混匀。

③取盐水稀释后的血液滴在玻片的相应上下格中，各 1 滴。

④滴抗 A、抗 B 单克隆抗体试剂各一滴于相应的上下格中，立即用牙签搅匀红细胞及抗体。搅抗 A 和抗 B 格时要用牙签的不同端。

⑤5 秒钟内就可形成凝集物。要在 3 分钟内观察结果并记录。出现凝集的记 +，无凝集的记 -，出现凝集的即为该标本所有的 ABO 血型抗原。

2、反定型

(1)材料：

①红细胞试剂：ABO 同型血 2~3 人份混合，生理盐水洗涤 3 遍后，制备成 2%红细胞生理盐水悬液。

②被检血清标本：见正定型方法 2。

③用正定型材料（3）和（4）。

(2)方法：

①玻片或瓷砖片，按下表标记划格。

红细胞	血清标本				
	1	2	3	4	5
A 型					
B 型					
抗体型别					

②取血清标本分别滴入上下相应 2 个格中，各 1 滴。

③分别滴 A 和 B 型红细胞于相应格中。

④立即用牙签搅匀血清和红细胞。用牙签的不同端搅匀 A 和 B 红细胞。

⑤3 分钟内观察结果，出现凝集的记为 +，无凝集的记为 -，出现凝集者即为血清中含有的 ABO 抗体。

3、试验结果判定：

	红 细 胞 标 本			
	1	2	3	4

抗 A	+	-	-	+
抗 B	-	+	-	+

血清标本

A 细胞	-	+	+	-
B 细胞	+	-	+	-
血型	A	B	O	AB

(二) 试管凝集

原理:

在试管中, 颗粒性抗原(细胞、细菌等)与相应抗体在有适量电解质存在时, 直接结合可形成肉眼可见的凝集块。

应用:

(1)用已知的病原菌为抗原, 与病人血清作定量细菌凝集试验, 辅助诊断某些疾病, 如: 诊断伤寒、副伤寒病的肥达氏反应(Widal test), 诊断斑疹伤寒的外-斐氏反应(Weil-Felix test)。

(2)用红细胞凝集试验测定免疫溶血性疾病等人体内血型抗体的效价

(3)鉴定人 ABO 血型单克隆抗体试剂的效价, 要求 ABO 血型抗 A 抗 B 单克隆抗体试剂凝集效价 ≥ 256 。

1、血型抗体凝集效价测定

(1)材料:

- ①人 A 型、B 型红细胞悬液(一周内采集, 无溶血)。
- ②单克隆抗体试剂: 抗 A、抗 B 单克隆抗体各一支。
- ③生理盐水、小试管、吸球、吸管、试管架等。

(2)方法:

- ①取小试管 10 支, 编号, 置试管架上。
- ②用 1ml 吸管吸生理盐水 0.9 ml 于第一管中, 其余管中加入生理盐水 0.5 ml。
- ③用 1 ml 吸管吸抗 A 或抗 B 试剂 0.1 ml 于第一管中, 反复吹吸三次, 防止起气泡, 混匀后吸出 0.5 ml 注入第二管, 同样混匀后吸出 0.5 ml 注入第三管中, 以此类推, 稀释至第九管, 第九管混匀后弃去 0.5 ml, 第十管不加抗体试剂。

- ④每管中加入 2%A 型或 B 型红细胞悬液各 0.5 ml。

⑤混匀后，37℃放置 2 小时以上，观察结果。

试管凝集操作及结果举例

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
生理盐水 ml	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗体(血清) ml	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗原(红细胞)ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清稀释度	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	
37℃放置 2 小时以上										
结果举例	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	±	-

(3)结果判定:

①第十管为阴性对照，应无凝集现象。

②凝集程度以 4+、3+、2+、1+、±、-表示。

4+：血球全部凝集，成 1 至 2 块，上清澄清。晃动时，凝集物成片状分散。

3+：血球绝大部分凝集，成大块拌数小块，或数个小块，上清较澄清。

2+：血球约半数凝集，成清楚的小凝块。上清略澄清。

1+：血球少数凝集，成肉眼可确定的小凝块。

±：血球很少数凝集，肉眼难判定，光镜下可见凝块。

-：无凝集，血球沉淀成边界清楚的圆点，晃动时，分散均匀。

③血型抗体凝集效价判定：以肉眼可见凝集（1+）的血型试剂最高稀释倍数为该试剂凝集效价。表中列举的血型试剂效价为 2560。

二、间接凝集-抗链球菌溶血素 O 抗体的检测

将小分子可溶性抗原（激素、细菌及寄生虫提取物等）吸附到一种与免疫无关的颗粒性载体（红细胞、聚苯乙烯乳胶、活性炭等）表面，再与相应抗体结合，能出现肉眼可见的凝集物。因载体的不同，又分别称为间接血凝，间接乳凝，间接炭凝等。

间接凝集具有快速、简便、微量等特点，敏感性比直接凝集高 2~8 倍，可用于检测微量抗原或抗体，如用于梅毒螺旋体、类风湿因子、乙肝表面抗原、抗链球菌溶血素 O 等的检测。

血清中 ASO 的测定可用于诊断链球菌感染。链球菌感染病人的血清中含有高滴度的 ASO，此血清中加入适量的溶血素后，可中和掉正常水平的 ASO，多余的 ASO 可与 ASO

乳胶试剂反应，出现凝集物。ASO 乳胶试剂系羧化聚苯乙烯乳胶与溶血素 O 共价交联的产物。

1、材料：

- (1)溶血素 O 溶液，用时摇匀。
- (2)ASO 乳胶试剂，用时摇匀。
- (3)病人血清、阳性及阴性对照血清。
- (4)微量反应板、加样器、吸头等。

2、方法：

- (1)血清标本用生理盐水 1：15 稀释，56℃灭活 30 分钟以灭活补体。
- (2)在微量反应板各孔里分别加入 50μl 稀释灭活血清以及阳性和阴性对照血清，每孔再分别加入 50μl 溶血素 O，轻轻摇动 1 分钟，使其充分混匀。
- (3)每孔加入 50μl ASO 乳胶试剂，室温下（18℃～20℃）轻轻摇动 3 分钟，将微量反应板平放在实验桌上，出现清晰凝集物者为阳性，不出现凝集物者为阴性，阴性者的 ASO≤250IU/ml。
- (4)阳性者的血清进一步稀释为 1：30 和 1：60，再重复步骤 2 和 3，出现凝集的血清稀释度和 ASO 滴度间的关系大致如下：

稀释度	1：15	1：30	1：60
ASO IU/ml	400	800	1600

3、注意事项：

- (1)ASO 乳胶加入后，轻轻摇动到三分钟时应立即记录结果，超过规定时间后再出现凝集者不记为阳性。
- (2)室温降低 10℃，在乳胶试剂加入后应延长反应时间 1 分钟，室温升高 10℃，应缩短反应时间 1 分钟。
- (3)溶血、脂血症、高胆红素血症、高胆固醇血症、类风湿因子阳性以及标本被细菌轻度污染都不会影响本试验的结果。
- (4)乳胶试剂不可冰冻，放置在 4℃冰箱保存，有效期可达一年，用前摇匀。

三、协同凝集

原理：

金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 作为无关载体, 能与特异性抗体 IgG 的 Fc 段结合, 使之成为致敏的抗体, 再与待检的抗原 (细菌、病毒、毒素等) 反应后, 如果抗原抗体能够结合, 金黄色葡萄球菌被动地发生凝集。反之, 金黄色葡萄球菌不发生凝集。

应用:

该法简便、快速, 特异性、灵敏性高。常用于病原微生物的快速鉴定。亦可用于淋巴细胞亚群、免疫复合物中的特异性抗原的鉴定。

试验

1、材料:

(1)金黄色葡萄球菌株选用的是国际标准菌株 Cowan-1 株(ATCC12598 或 NCTC8530), 不含 SPA 的对照菌株为 Wood 46 株。

(2)0.01mol/L Ph7.2 PBS。

(3)甲醛、NaN₃。

(4)琼脂培养板、离心机、水浴箱、玻片。

2、方法:

(1)10%SPA 菌体试剂的制备: 将标准菌株在琼脂平板上培养 18~24 小时, 用 PBS 洗下菌苔, 3000rpm 离心 15~20 分钟, 弃上清。用 PBS 重悬沉淀, 3000rpm 离心 15~20 分钟, 弃上清, 此为离心洗涤 1 次, 重复此步骤两次, 将沉淀重悬于 PBS 中 (含有 0.5% 甲醛), 置于室温 3 小时后, 用 PBS 再离心洗涤沉淀 3 次, 将沉淀制成 10% 的细菌悬液 (W/V), 80℃ 加热 20~30 分钟后, 用 PBS 离心洗涤沉淀三次, 将沉淀制成 10% SPA 菌体试剂, 加入 0.1% NaN₃, 放 4℃ 可保存 3 个月。使用前用 PBS 洗一次。

(2)抗体致敏的 SPA 试剂: 取步骤 1 制备的 10% SPA 菌体试剂 1ml, 加入特异性抗体 0.1ml, 充分混匀, 放 37℃ 1 小时后, 置 4℃ 过夜。3000rpm 离心 15~20 分钟, 弃上清。用 PBS 离心洗涤沉淀 2 次后, 制成 1% 抗体致敏的 SPA 试剂。同时应制备正常兔血清致敏的 SPA 试剂。4℃ 可保存 7 天。

(3)当进行抗原鉴定时, 取一洁净玻片, 从左至右分别加三滴生理盐水, 然后再加入少量的待检细菌悬液及一滴致敏的 SPA 试剂。具体操作参看下表。

	待 检 组	对 照 组 1	对 照 组 2
生理盐水	+	++	+
待检细菌悬液	+	+	+

特异性抗体致敏的 SPA 试剂	+	-	-
正常兔血清致敏的 SPA 试剂	-	-	+

(4)充分混匀，放置 5 分钟后观察结果。

3、结果判定：

(1)阴性组（-）：对照组 1（生理盐水对照组）及对照组 2（非特异性抗体对照组）应为阴性，液体混浊，无颗粒状凝集物出现。

(2)阳性组（++）：液体澄清，，有颗粒状凝集物出现。

四、双向免疫扩散

原理：

琼脂凝胶含水量大于 97%时，形成网状结构，其孔隙可容许大分子物质自由扩散，阻力很小。不同的物质由于它们的化学结构，分子量，扩散系数不同，所以它们在琼脂凝胶中的扩散速度亦有所差别。当抗原抗体加入含有适量电解质的琼脂凝胶的相邻的孔中，它们向四周扩散，若两者相互对应，分子比例适合，则扩散一定时间在两孔之间相遇并生成白色沉淀线。如有多对不同抗原抗体同时存在时，便可依各自的扩散速度，在适当部位形成各自独立的沉淀线。

应用：

可用于疾病的诊断：如检测 AFP，乙肝表面抗原等。亦可用于抗原抗体成分的定性，定量及不同种抗原间的相关性分析。但此法需要时间长，灵敏度低。

试验

1、材料：

(1)抗体：抗人全血清抗体。来源：用正常人血清作抗原，免疫家兔而得的抗体。因为正常人血清中含有多种蛋白质，对家兔均有抗原性，能刺激其产生 4~5 种抗体。

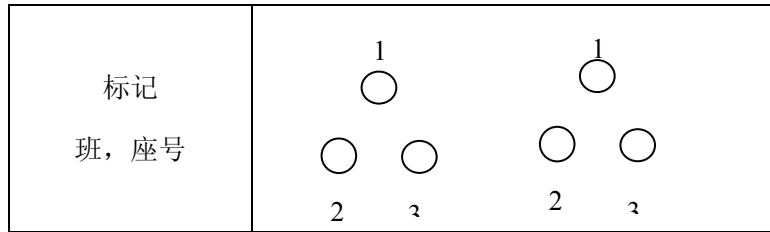
(2)抗原：正常人血清、人白蛋白。

(3)1.5%琼脂：琼脂粉溶于 0.1%石炭酸生理盐水中，置 70℃~80℃水浴中保温。

(4)玻片、吸管、加样器、打孔器、打孔图形、湿盒（带盖搪瓷盘，底部铺有浸透 0.5%石炭酸的纱布）等。

2、方法：

(1)取洁净玻片，如下图所示，在其左侧 1/3 处用记号笔划一直线，作标记。



(2)用吸管吸取融化的琼脂约 2.5ml, 加在划线右侧的玻璃片上, 使之自然流开, 形成厚约 2 mm的琼脂层。

(3)待琼脂冷凝后, 用打孔器按图形打孔, 除去孔中琼脂。

(4)用加样器吸取抗人全血清抗体放入 3 号孔中, 换吸头后吸取正常人血清 (抗原), 放入 1 号孔中。再换吸头吸取人白蛋白 (抗原) 放入 2 号孔中。

(5)将玻片置湿盒中, 放 37℃ 孵箱中, 24~48 小时后观察结果。

(6)标本若想长期保存, 应将玻片放入盐水中漂洗 2 天, 每天换水 2~3 次, 烘干, 然后用染蛋白质的方法染色。可用氨基黑染料染色, 沉淀线染成深兰色; 或用偶氮胭脂红染色, 沉淀线染成红色。

3、结果判定:

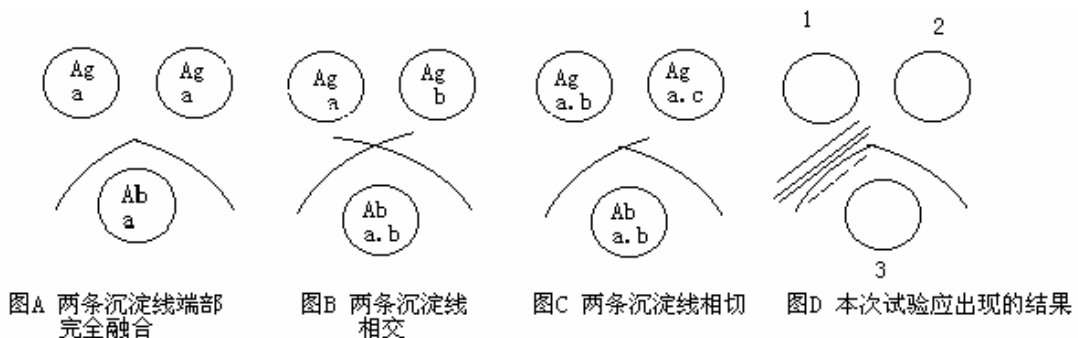
(1)观察抗原与抗体间是否生成白色沉淀线及沉淀线的数目。如抗原与抗体孔间生成一条沉淀线, 说明只有一对抗原抗体特异性结合, 而且二者分子比例较适宜。如果出现数条沉淀线, 则说明同时有数对抗原抗体各自特异性结合, 且分子比例亦较适宜。

(2)据 1、2 孔中抗原的性质及相互间的关系, 以及 3 孔中所含抗体的种类, 生成的沉淀线可能出现以下现象:

两种抗原完全同时, 相邻的两条沉淀线端部完全融合, 见图 A。

两种抗原完全不同时, 相邻的两条沉淀线相交或各自独立。见图 B。

如果两种抗原有部分相同时, 则相邻的两条沉淀线出现相切现象, 见图 C。



正常人血清中含有白蛋白, 所以 1 孔和 2 孔中的白蛋白抗原和 3 孔中的相应抗体结合所生成

的沉淀线端部融合。正常人血清与抗人全血清抗体生成其它沉淀线，与白蛋白的沉淀线可不发生关系，但也有可能与白蛋白的沉淀线相交。

4、注意事项：

(1)铺板时，速度要快，要均匀，厚薄一致。

(2)加样时，由于孔小，只能放入很少量液体，所以应将加样器吸头插入孔底，缓慢加入液体，直至孔满。

(3)一般 72 小时不出现沉淀线为阴性。

(4)孔距过大或过小均影响结果，一般孔距为 6.5mm（从两孔圆心算起）。

五、单向免疫扩散

原理：

将抗体预先混入琼脂中，铺板，然后在板上打孔，孔中加入抗原。因为抗原能在琼脂中扩散，所以在抗原抗体比例适宜处形成白色沉淀环。环的直径与抗原量成正相关。

应用：用于临床免疫学，特别是各类免疫球蛋白、补体 C3、甲胎蛋白等的定量。

试验：检测人血清中 IgG 含量。

1、材料：

(1)抗原：标准人 IgG 试剂、待测血清。

(2)抗体：抗人 IgG 免疫血清（从人血清中提取的 IgG 作为抗原，免疫家兔所得）。

(3)3%琼脂：用生理盐水配制，置 70℃ 水浴中保温。

(4)玻片、吸管、打孔器、打孔图形、加样器、湿盒等。

2、方法：

(1)把抗体按一定比例（预试测定好的）混合在融化的琼脂中，在玻片上浇注成 2mm 厚的琼脂板。

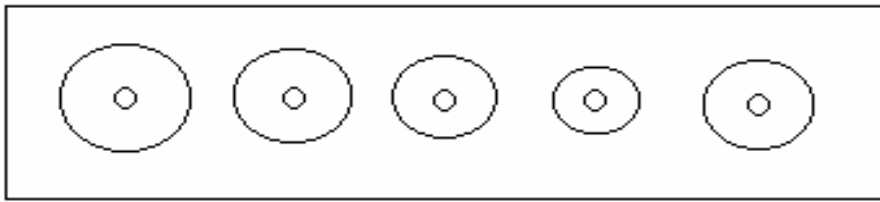
(2)琼脂冷凝后按一定距离（约 1.5cm）在琼脂板上打孔。

(3)从最低浓度开始把四个已知浓度的标准抗原溶液自左至右分别加到相应的几个孔中，每孔 10 μ l，余孔加入待测抗原。

(4)待抗原溶液完全吸收到琼脂层中，把琼脂板置于湿盒内，放置于 37℃，24~48 小时后，观察结果。

3、结果判定：

(1)测量各孔周围沉淀环的直径，记录结果。参照图 A。

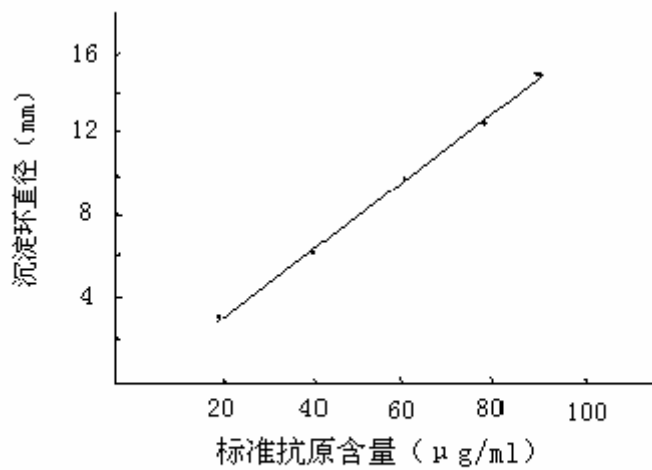


图A： 单向免疫扩散结果示意图

(2)用已知浓度的标准抗原量为横坐标，沉淀环直径为纵坐标，以统计学方法在坐标纸上绘制标准曲线。

(3)量出待测抗原沉淀环直径，在标准曲线上查知待测抗原的含量。

(4)参照图 B。



图B 单向免疫电泳标准曲线示意图