

表4 微量花环试验对PRFc值(%)的影响

方 法	人 血 标 本 号										P 值
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
常 量 法	48	50	47	70	60	47	46	58	48	60	P<0.01
微 量 法	43	47	41	61	58	42	43	54	44	54	

表5 猪红细胞和绵羊红细胞花环形成百分率的比较

红细胞种类	人 血 标 本 号										$\bar{x} \pm SD$
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
猪红细胞花环	59	71	79	74	67	65	57	63	62	65	66.2±3.7
绵羊红细胞花环	60	70	81	75	65	68	58	62	63	64	66.6±6.6

参 考 文 献

- [1] 林飞卿、章谷生主编, 细胞免疫学研究进展。人民卫生出版社, 1980。
- [2] Browns., 1975. *Clin Exp Immunol* 20: 505.
- [3] Lambermont M., 1977 *J. Immunol Meth* 15: 157.
- [4] Ross GD., 1973 *J. Clin Invest* 52: 377.
- [5] Binns RH., 1978 *J. Immunol Meth* 21: 1192.
- [6] Ботвини В. В., 1979. *Лабораторное Дело* 1: 5.
- [7] Малы Л., 1979 *Лабораторное Дело* 1:7.
- [8] 章谷生等。上海第一医学院学报, 1: 9, 1979。
- [9] 谷洪喜等。天津免疫学术会议资料, 1978。
- [10] 北京医学院微生物学教研组。实验免疫学。人民卫生出版社, 1980。
- [11] 陈璋等。输血及血液学, 3: 58, 1979。



检测抗体生成细胞的方法 ——几种溶血空斑试验及其改良法

江 子 卿

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

溶血空斑试验(Plaque-forming cell Assay 简称PFC 试验)是体外检测和计数产生IgM及其他类型Ig的抗体生成细胞的一种方法。由于PFC试验具有特异性高,检测力强、直观等特点,故可作为判断机体免疫功能的指标,藉以观察免疫应答的动力学变化,除适用于免疫学基础理论研究外,也可用以寻找抗肿瘤而不抑制机体免疫功能的新抗癌药。

溶血空斑试验大致有两类,一类为直接空斑,即由产生IgM型的抗体生成细胞形成机体接受免疫时,此类细胞出现最早。3—4日后

即达高峰,此时细胞所分泌的IgM抗体,溶血效应很强,只需很少的抗体分子致敏靶细胞(绵羊红血球)即可活化补体而直接导致溶血。另一类为间接空斑,即由产生其他Ig型抗体生成细胞形成,这类细胞在一次免疫反应的较晚期才出现,8—10日才达高峰,一般是分泌IgG或IgA,其溶血效应较低,单独致敏靶细胞,不足以活化补体,故需在反应系统中再加入高度特异性抗Ig类血清(又称显斑血清,如兔抗鼠IgG),使单体的抗体分子聚合成复合体时,才能活化补体导致溶血。

从 Jerne 等 1963 年首先建立溶血空斑试验以来, 几经改良约有以下几种方法均可检测直接或间接空斑: 1. 琼脂与羧甲基纤维素溶血空斑平板法 (Jerne 和 Nordin 1963^[1], Ingraham 和 Bussard 1964^[2]); 2. 单层玻片小室法 (Cunningham 等 1965^[3]); 3. 琼脂或琼脂糖溶血空斑玻片法 (Sulitzeam 和 Marbrook 1973^[4]); 4. 斑点试验及溶血扩散试验 (Lefkovits 1972^[5], Köhler 和 Milstein 1976^[6]); 5. 葡萄球菌 A 蛋白-SRBC 溶血空斑法 (Gronwicz 等 1976^[7]); 6. 淋巴细胞介导红细胞溶血的分光光度法 (Simpson 和 Gozzo 1975^[8]) 上述诸法中, 有的目前已广泛用于实验免疫研究, 最近也试用于检测人的抗体生成细胞。本文仅介绍实验动物抗体生成细胞的检测方法。

一、Jerne 等琼脂与琼脂糖溶血空斑平板试验

将经 SRBC 免疫 4 天的小鼠脾脏制成脾细胞悬液, 在半固体琼脂介质中与 SRBC 混合, 浇在平皿或玻片上成薄层, 置 37°C 温育, 由于抗体生成细胞可释放溶血性抗体, 使其周围形成一个肉眼可见局部性圆形透明溶血区, 称之为溶血斑。本法测出的细胞主要是 IgM 抗体生成细胞, 每个空斑表示一个抗体生成细胞, 空斑大小表示抗体生成细胞产生抗体的多少。

方法^[9,10]:

1. SRBC 悬液制备 从健康(约半岁)绵羊颈静脉采血, 加入等量阿氏血球保存液, 置 4°C 保存, 一般不超过二周。用前以生理盐水洗涤三次, 每次离心 (2000 转/分) 5 分钟, 除去其中的纤维蛋白原和白血球、血小板等, 制成红细胞悬液。计数细胞, 最后稀释成每毫升含 15×10^8 个细胞。

2. 免疫小鼠脾细胞悬液的制备 取上述稀释的 SRBC 经尾静脉或腹腔免疫小鼠 (鼠龄 8—12 周), 每只动物接受 0.2 毫升 (3×10^8 个细胞), 4 天后断颈椎或放血处死, 取出脾脏, 用含 5% 经灭活的小牛血清的 Hanks 液清洗, 去除脂肪和结缔组织, 剪碎脾脏制成悬液, 用

120 目尼龙网过滤, 冷的 Hanks 液再洗一次, 即为免疫脾细胞悬液。计数细胞, 并用台盼蓝染色法检查细胞的存活, 活细胞率应大于 90%, 稀释至每毫升含 10^6 细胞数。

3. 试验过程 (1) 底层琼脂或琼脂糖平板的制备。制板目的是提供一个平面, 防止倾注后形成半月面。用 Hanks 液配制 1.4% 琼脂 (或用琼脂糖, 以下同), 加热融化后倾注于直径 8.5 厘米平皿内, 每皿 2—2.5 毫升, 在水平台上使均匀平铺, 待其凝固后也可置 4°C 冰箱保存数天即可倾入下述表层琼脂。(2) 表层琼脂平板的制备。取 0.1 毫升的免疫脾细胞 (1×10^6), 对照组用同量的正常脾细胞分别与 0.1 毫升 (3×10^8) SRBC 一起加至融化后保温于 48—50°C 水浴的, 2 毫升 0.7% 琼脂 (内含 0.05% DEAE—葡聚糖, 分子量约 50 万或琼脂糖 Eagle 氏液配制) 内, 摇匀后立即将混合物倾入铺有底层琼脂的皿内, 轻摇使其铺开, 置水平台上待凝。检查细胞分布是否均匀, 凝固的琼脂是否平整而透明, 如不符合要求应弃去。每份标本铺 3—5 个平皿。如测间接空斑, 尚需添加高度特异性、适当稀释度的抗 Ig 类血清 (显斑血清) 0.1 毫升后, 再行制板。制好的平皿水平放置含有饱和湿度和 5% CO₂ 温箱中, 温育 1—1.5 小时。(3) 加补体。取温育过平皿加入经 SRBC 吸收过的、1:5 稀释的新鲜豚鼠血清, 每皿加入 2 毫升后置温箱继续温育 30 分钟, 即可显现肉眼可见的溶血空斑。如需保存, 则可在 6 毫升 0.25% 戊二醛的生理盐水或 PBS 稀释液中加入以固定。(4) 观察与计数。用放大镜或解剖显微镜观察计数每一平皿中的空斑数, 一般计算 3—5 只平皿上的空斑均数, 为该组的空斑数。同时准确计数加入脾细胞数, 以推算每百万细胞中产生空斑数。实验数据用 t 测验作统计学处理。

4. 注意事项 (1) 实验动物应选用纯系小鼠, 体重 20—25 克。(2) SRBC 要新鲜, 洗涤过程中离心速度不宜过高, 时间不宜过长, 以免影响结果。(3) 脾细胞悬液制备要在冰浴中

快速进行,以保持细胞的活力,计数细胞力求正确,以免影响结果。(4)使用琼脂液时,需加入 DEAE-葡聚糖,但也可用不稀释豚鼠血清来代替。(5)补体采用混合豚鼠新鲜血清,经 SRBC 吸收(补体 1 毫升加压积 SRBC 0.2 毫升,混匀,置 4°C 30 分钟后,3000 转/分离心 15 分钟,取上清液)。

二、Cunningham 等单层玻片小室溶血空斑试验

本法测定直接空斑时比平皿法敏感,能查出淋巴细胞周围被溶解数为 10—20 个红细胞这样小量的抗体。原理与 Jerne 平皿法相似,将 SRBC、溶血空斑生成细胞(淋巴细胞)和豚鼠血清悬浮在培养液(Eagle 氏)或平衡盐溶液(BSS)中,并定量注入成水平的、非常薄的、小室内,使细胞沉淀于小室底层形成单层细胞层,37°C 温育 30 分钟即能形成空斑,1 小时后结果最好。

方法:

1. 小室的制作 选择非常干净无油的载玻片,将其排齐成行,用两面带胶的胶带在玻片两头和中间各粘一条,每条宽 1/4 英寸(约 6 毫米),然后覆盖上玻片,轻轻挤压使其粘牢,割断胶带则形成一对小室(每块玻片有 2 个小室,容积约为 180 微升),继后玻片长端放入融化石蜡池中封闭小室一面。

2. 小室悬浮液配制^[1] 用含 HEPES 和 0.5% 明胶的 Eagle 氏培养液稀释的 150 微升免疫脾细胞(对照用正常脾细胞),20 微升合适稀释度的抗-Ig 血清,20 微升 16% SRBC,10 微升经 SRBC 吸收过豚鼠血清,混合成悬液。

3. 单层玻片小室溶血空斑测定 将配制好的悬液 160 微升注入制作好的一对小室内,余下的空隙用悬浮于培养液的 SRBC 追加之,然后用石蜡封闭小室另一端,水平置于 37°C 温箱温育 1 小时,即可出现溶血空斑。

4. 注意事项 (1)计数空斑时间。在液体中由于布朗氏运动和轻微的对流,致使已形成

的空斑会模糊和消失,因此必须严格掌握在限定时间(1 小时)范围内。(2)气泡会影响结果。加入悬液前,小室先要温育到室温可防止气泡产生,不然气泡在液体内可导致运动,造成小的空斑消失。

由于 Cunningham 单层玻片小室法,需制备一定大小的小室,要定量地向小室注入悬液比较困难,为此 Bussard 和 Pagés 作了改进*: 0.1 毫升($5-10 \times 10^5$ /毫升)免疫脾细胞、0.1 毫升 1:10 稀释补体、0.1 毫升 25% SRBC 混合后,滴于用胶带在玻片上隔成的空室中,随即盖上 22×22 毫米盖玻片,使悬液均匀摊开形成单层,用石蜡封四周,水平放置于 37°C 温育 1 小时后,计数玻片上的空斑数。另外季永镛等对小室的制作和空斑计数作了改变。

(1)小室的制作。将三片盖玻片条(4×24 毫米)分别放在 75×25 毫米载玻片的两端和中央,再覆盖上另一玻片,然后用夹子将这中间夹有 3 条盖玻片条的两片玻片一起夹住,用石蜡将其一边和两端封固,如此就形成一边开口的两个小室。(2)反应混合物组成。将 RPMI-1640 培养液 0.1 毫升、 2.5×10^6 /毫升免疫脾细胞 0.5 毫升(对照用正常脾细胞)、25% SRBC 0.1 毫升、补体 0.1 毫升一起混匀组成反应混合物,用滴管将此混合物注满小室后,用石蜡将小室封闭,水平放置于 37°C 温育 45—60 分钟,即可计数空斑。如作间接空斑则以一定浓度的抗-Ig 类血清 0.1 毫升取代 RPMI-1640 即可。

(3)空斑计数。温育后水平移于解剖镜下,在暗视野中可以清晰看到呈暗黑色的空斑,为能正确地计数即在玻片小室上放置一片画有 5×5 格的 22×22 毫米盖玻片,可以按格依次计数。因为制作小室所用的盖玻片条厚度为 0.18 毫米,在上述计数范围内小室内容物的体积为 22×22×0.18 毫米,即 0.087 毫升,根据反应混合物中脾细胞的浓度和小室内容物的体

* Bussard 和 Pagés 1980 年 10 月来上海细胞生物学研究所时交流和使用的方法。

积, 即能算出 10^6 脾细胞中溶血空斑数, 以 PFC/ 10^6 表示。

三、Sulitzeam 和 Marbrook 琼脂或琼脂糖溶血空斑玻片法

原理与 Jerne 平皿法相似。玻片标本经固定、洗涤、干燥后, 可进行放射自显影术。

方法:

1. 玻片标本的制备 0.25 毫升 (5×10^6 /毫升) 免疫脾细胞与 0.025 毫升 50% SRBC 加至在 45°C 水浴预热的 1.8% 琼脂糖 0.25 毫升内, 摇匀后, 用滴管立即将混合物滴入已预热的玻片上, 使混合物平铺于玻片, 形成约 50×25 毫米大小的薄层, 玻片移置水平台, 待其凝固, 每份标本滴 3—5 片, 制好玻片凝胶面向下放在片架上, 在饱和湿度和 5% CO_2 温箱中温育 2 小时。如测间接空斑, 尚需添加高度特异、适当稀释度抗 Ig 类血清 0.025 毫升后再行制片。

2. 加补体 取温育过玻片加入 10 毫升以生理盐水 1:10 稀释的豚鼠血清, 使凝胶面浸于补体中 1 小时, 即可出现溶血空斑, 如需保存, 则可在 0.25% 戊二醛的生理盐水稀释液中固定 5 分钟, 流水冲洗数分钟, 蒸馏水冲洗, 片架上晾干。

四、Lefkovits、Köhler 和 Milstein 等的斑点试验及溶血扩散试验

1. 斑点试验^[13] 2 毫升预热至 48°C 的 0.6% 琼脂糖液中, 加入 0.2 毫升 10% SRBC、0.2 毫升 10% 补体, 混匀后迅速浇于水平放置的玻片上, 凝固后在凝胶表面固定区域内滴加待测样品 5 微升, 每片滴 10 个样品, 待样品全部渗入凝胶后, 在湿盒内, 37°C 温育 1 小时, 灯光下观察结果, 按有透亮斑点或没有斑点区分为阳性或阴性。

2. 溶血扩散试验 在预热至 48°C 的 2 毫升 0.6% 的琼脂糖液中, 加入 0.2 毫升 10%、0.2 毫升 10% 补体, 混匀后迅速浇于水平放置的玻片上, 待凝固后打孔, 每块玻片 8 个孔 (孔径 4 毫米), 然后放 4°C 冰箱中过夜, 第二

天每孔加待测样品 0.5 毫升, 水平置于湿盒内在 37°C 温育 3 小时后观察结果。孔边有溶血圈出现为阳性, 否则为阴性, 溶血圈的宽窄反映抗体的强弱。

五、Gronwicz 等葡萄球菌 A 蛋白-SRBC 溶血空斑法

葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 能与人及多数哺乳动物 IgG 的 Fc 段呈非特异性结合, 利用这一特性将其连接在 SRBC 上进行溶血空斑测定, 可提高敏感度和应用范围。在 SPA-SRBC 空斑测试系统中, 加入针对产生免疫球蛋白细胞供者的 Ig 的抗体, 从而细胞产生的免疫球蛋白即与抗免疫球蛋白的抗体结合形成复合物, 复合物上的 Fc 段可与连接在 SRBC 上的 SPA 结合, 同时激活补体使 SRBC 溶解形成空斑。

方法:

1. SPA-SRBC 的交联 将 1 份生理盐水稀释的 SPA (0.5 毫克/毫升) 和 10 份氯化铬 ($2.5 \times 10^{-4} \text{M}$) 以及 1 份经过 0.9% NaCl 洗涤 3 次的压积 SRBC, 迅速混匀, 置 30°C 水浴中温育 1 小时, 并不时轻轻搅动, 温育后用生理盐水洗一次, 再用 BSS 洗两次, 最后将交联好的 SPA-SRBC 于 4°C 保存, 可存 3 天。

2. 空斑测定 保存的 SPA-SRBC 用 BSS 洗一次, 稀释成 30% 的 SPA-SRBC 25 微升、100 微升 (10^6 /毫升) 免疫脾细胞, 25 微升 1:30 稀释的抗 Ig 类血清、50 微升 1:4 稀释的补体, 四种反应物混匀后, 迅速加到 800 微升经 45°C 预温的 0.5% 琼脂或琼脂糖液中, 混匀后快速浇入培养皿或玻片上, 移置水平台待凝固后, 置湿盒 37°C 温育 4—6 小时, 在放大镜或解剖镜下计数空斑。

六、Simpson 和 Gozzo 淋巴细胞介导红细胞的分光光度法 (简称 QHS 测定)

根据溶血空斑试验原理, 作了改良, 将免疫脾细胞 (对照用正常脾细胞), SRBC 和补体在液相介质中进行反应, 观察红细胞被抗体生成细胞产生的 IgM 所裂解, 而释放的血红蛋

白量,用分光光度计作定量测定,据此推知抗体生成细胞多少。

方法^[14]:

测定过程以 pH7.2PBS 为介质,在 15×100 毫米试管中加入 1 毫升(2×10^7 /毫升)免疫脾细胞(对照管用 1 毫升 PBS 代替)、1 毫升 0.2%SRBC、1 毫升 1:10 稀释补体,充分混匀后置 37℃温育 1 小时取出,3000 转/分离心 5 分钟,用 413nm 波长测其上清液中红细胞裂解释放的血红蛋白量(以 O.D 值表示)。

注意事项 1.要选用合适的试剂作为介质。当细胞和补体浓度等因素相同时,用 pH 7.2PBS、0.85%NaCl、199 培液, Hanks 液作介质,结果表明 PBS 所得光波吸收最大,生理盐水次之,199 液最低,以 PBS 作介质最为适宜。2.不同浓度补体对反应的影响。选用 1/5—1/10 稀释度补体时,均可得到反应的峰值。3.细胞的质与量。在冰浴中制成细胞悬液,并经常保存在冰浴,12 小时测定期内结果大致稳定。 10^6 — 2×10^7 个细胞浓度范围内,测得的反应与细胞浓度成正比。

总之,溶血空斑法所测到的数值是反映了在一定脾细胞群体内的抗体生成细胞数。换言之,它测定了分泌 IgM 型或其他类型的免疫球蛋白的 B 淋巴细胞的功能,而淋巴细胞介导红细胞溶血的分光光度法是测定由一定的 B 淋巴细胞产生和分泌的 IgM 型或其他类型抗体所引起的红细胞裂解释放的血红蛋白量的大小。

综上所述,可以看出,平板法需要在半固体介质中进行试验,并要提供一个薄层平面,步骤较繁,而且所用试剂较多。采用单层玻片小室法测定直接空斑要较平板法敏感,所用试剂较少,缺点是要制作小室、定量注入悬液、计数需在限定时间内。而用玻片法得到标本,经固定后,可进行放射自显影术,但温育时间较长,所用试剂较多。斑点试验能检测抗体生成细胞所分泌的抗体,方法简便、灵敏,适于大量检测,缺点是不能检测单个抗体生成细胞。SPA-SRBC 法的敏感度比前几种法均

高,应用范围也广,但 A 蛋白来源较困难,还要制备交联好的 SPA-SRBC,温育时间过长。分光光度法是观察在液相介质中由红细胞裂解而释放的血红蛋白量,方法简便、灵敏,可是需要很多抗体生成细胞。Bassard 教授改进的玻片法,制作方便,不需要小室,敏感度比平板法高,计数不需要限定时间,所用试剂也少,适于大量检测之用。

溶血空斑试验除了适用于测定 RBC 抗原外,还可通过 CrCl_3 等方法将可溶性蛋白抗原或半抗原(例 BSA、天花粉蛋白和 DNP-FrG)^[14]结合到 RBC 上,来测定可溶性蛋白抗原或半抗原。

参 考 文 献

- [1] Jerne, N. K. and Nordin, A. A. 1963. *Science*, 140: 405.
- [2] Ingraham, J. S. and Bussard, A. 1964. *J. Exp. Med.* 119: 667.
- [3] Cunningham, A. J. 1965. *Nature (London)* 207: 1106.
- [4] Sulitzeam and Marbrook 1973. *Immunology* 24: 707.
- [5] Lefkovits, I. 1972. *Eur J. Immunol.* 2: 360.
- [6] Köhler, G. et al.; Eur 1976. *J. Immunol.* 6: 511.
- [7] Eva Gronowicz, A. Coutinho and F. Melchers. 1976. *Eur. J. Immunol.* 8: 588—590.
- [8] M. A. Simpson and J. J. Gozzo 1978. *J. Immunological Methods* 21: 159—165.
- [9] 张宗梁、叶庆伟、章国城、江子卿、黄永安。1975. *动物学报*, 21: 309—318.
- [10] 北京医学院。1980, *实验免疫学*, 485—515.
- [11] Dresser, D. W. 1978. "Handbook of Experimental" Weir, D. M. ed. Chap. 28. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [12] 季永镛、叶敏。1979. *实验生物学报*, 12: 323—328.
- [13] 葛锡锐、陈登鸿、江子卿、黄嘉陵。1981. *上海免疫学杂志*, 1: 1—4.
- [14] 葛锡锐、江子卿、陈登鸿、南国华。1980. 中国生化学会“免疫技术在分子生物学和细胞生物学中的应用”学术会议论文摘要, p. 33.