

关于对流免疫电泳和琼脂双向扩散试验的研究*

陈 光 云

(福建省卫生防疫站)

对流免疫电泳和琼脂双向扩散是免疫学技术常用的沉淀试验方法之一。目前已广泛地应用于病毒、细菌、寄生虫和毒素等抗原抗体的检测、鉴别和分类¹⁻⁴。本试验通过肠道革兰氏阴性菌的抗原分析,进而掌握此法的特点和规律。现将结果报道如下。

材 料 与 方 法

一、菌种

本室保存的 15 株肠道革兰氏阴性菌株,分为三类: 第一类溶血反应阴性的 6 株(1—6 号); 第二类溶血试验阳性的 6 株(7—12 号); 第三类系对第一类细菌免疫血清呈弱凝集的 3 株(13—15 号)。

二、抗原制备

1. 福尔马林抗原: 常规法培养的细菌菌苔用 0.5% 福尔马林盐水洗下,每毫升含菌 20 亿。菌液作无菌试验后放 4℃ 冰箱保存。

2. 煮沸抗原: 系注射用的免疫血清煮沸抗原。每毫升含菌 20 亿。

3. 50% 乙醇抗原: 菌种接种陈水, 37℃ 6 小时, 移种营养琼脂平板, 37℃ 14—18 小时, 用 0.075N 氢氧化钠溶液洗下菌苔(每碟 5ml), 水浴煮沸 15 分钟, 冷却后加无水乙醇等量, 制成 50% 乙醇浓度。4000rpm 离心 30 分钟, 取沉淀物加盐水 2ml, 在水浴中摇溶即成。

4. 酚红抗原: 用培养 6 小时肉汤菌液接种

营养琼脂克氏瓶, 37℃ 18 小时后, 每瓶用 0.8% 氢氧化钠溶液 20ml 洗下菌苔, 滤去杂质, 水浴煮沸 1 小时, 加灭菌酚红指示剂 0.5 ml, 用 2N 盐酸调节 pH 7.2, 离心 30 分钟, 上清液为抗原。

三、载体

1. 琼脂糖: BDH 进口和东海制药厂出品。

2. 净化琼脂: 取惠安县乘风牌琼脂 10 克, 洗净, 配成 2% 琼脂浓度, 水浴溶化, 离心 5—10 分钟, 冷却去杂质, 再溶化, 补足水份, 加 1% 迭氮钠防腐。4℃ 保存。试验时用 tris 液稀释成 1% 浓度。

3. 琼脂粉: 进口的有日本及鹿牌; 国产的有青岛海燕牌。

四、免疫血清

挑选生化反应和菌落外观典型、血清凝集力强的菌种经培养。盐水洗下菌苔, 水浴煮沸 2 小时, 测定菌浓度。用家兔作免疫注射。第 1 针腹腔注射 1ml, 菌量 100 亿, 隔 5 天, 第 2—5 针作耳静脉注射, 每次 1ml, 菌量每次增加一倍。各次间隔一天。3 天后试血, 效价如低于 1:6400, 再注射 1—2 次。如达到 1:10000 以上则可放血分离血清。56℃ 30 分钟灭活, 加 1% 迭氮钠防腐, 放 4℃ 备用。

* 参加本工作的还有林谷忠、洪青山、方志林、曾凝梅等同志。林金祥、林抗生和张绍佩协助沉淀线摄影。特致谢。

五、缓冲液

用 tris 液和盐酸巴比妥液两种。

六、搭桥介质

纱布和滤纸,大小同玻片。

七、染色

用胺基黑、偶氮胭脂红和考斯亮蓝液染色^[6]。

八、电泳仪

国产 Dy-1 型。

九、操作方法

1. 对流免疫电泳和双向琼脂扩散试验的操作方法按文献 [5, 6]。

2. 定量试验: 抗原抗体用生理盐水双倍稀释后分别试验。琼脂扩散板放在 37℃ 温箱内每天观察试验结果。

结 果

一、抗原定性试验

1. 沉淀线形状: 用不同方法制备的抗原与相应抗体结合, 呈现的沉淀线形状不同。扩散法: 福尔马林抗原、煮沸抗原和乙醇抗原所呈现的沉淀线多为带状, 福尔马林抗原呈现的沉淀线较明显。酚红抗原的沉淀线常呈块状, 界线不明显(37℃ 10 小时内也呈带状)。电泳法: 福尔马林抗原出现的沉淀线快而明显, 呈单条, 乙醇抗原出现的沉淀线慢, 呈多条(见图版 I-1)。

2. 三类不同菌株抗原分析结果, 同类抗原在扩散模板上所呈现的沉淀线是一致的, 不同类抗原呈刺状或交叉形和不同条数的沉淀线(见图版 I-2)。

二、定量试验

扩散法: 如高效价抗体放中央孔, 周围孔

表 1 中央孔抗体周围孔抗原的扩散结果

抗 体 效 价	抗 原 浓 度 (亿/ml)					
	1152	576	288	144	72	36
1:1280	+++	+++	++	+	-	-
1:640	+++	++	+	+	-	-
1:320	++	+	+	+	-	-
1:160	+	+	+	+	-	-
1:80	-	-	-	-	-	-
1:40	-	-	-	-	-	-

表 2 中央孔抗原周围孔抗体的扩散结果

抗原浓度 (亿/ml)	抗 体 效 价					
	1:1280	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40
1152	++	++	+	-	-	-
576	++	++	+	-	-	-
288	++	+	+	-	-	-
144	++	+	+	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-

依次滴加相应的不同稀释度的抗原, 结果沉淀线明显, 其明显程度按菌量不同稀释度依次减

弱。反之, 若中央孔放高浓度抗原, 周围孔依次滴加不同稀释度抗体, 其沉淀线则不如前者明

表 3 沉淀线出现与抗原抗体浓度和时间的关系* (37℃)

琼脂板号	中央孔	时 间 (天)											
		1				2				3			
IX	抗体 抗原	b	c	d	e	b	c	d	e	b	c	d	e
		2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	
X	抗原 抗体	b	c	d	e	b	c	d	e	b	c	d	e
		2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	

琼脂板号	中央孔	时 间 (天)											
		4				5				6			
IX	抗体 抗原	b	c	d	e	b	c	d	e	b	c	d	e
		2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	
X	抗原 抗体	b	c	d	e	b	c	d	e	b	c	d	e
		2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	

* b-e: 为“0”多价抗体(效价 1:640—1:80)。“2—7”: 为 1 号抗原(菌量: 576—18亿/ml)。“+++...-”: 示沉淀线明显度。

表 4 用血清测定抗原或以抗原测定抗体的电泳结果

电 泳 结 果	抗原 (亿/ml)/抗体(效价)							
	1152	576	288	144	72	36	18	9
	1:1280	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
I 抗体测抗原	抗体 a	+	+	+	+	+	+	-
	抗体 b	+	+	+	+	+	+	-
II 抗原测抗体	抗原 1	+	+	-	-	-	-	-
	抗原 4	+	+	-	-	-	-	-

显, 只有高效价抗体的孔反应清晰。若中央孔抗原浓度减低, 周围孔抗体效价不变, 结果沉淀线反应则更差, 3 天后才能出现不明显的沉淀线。沉淀线一般 3 天出现完全, 4—6 天出现的只有低浓度的。7—10 天出现的结果无大变化。详见表 1—3 和图版 I-3。

电泳法: 用高效价抗体(1:1280)可检出抗原浓度 1152—18 亿/ml(a, b 抗体结果一致。效价均 1:1280, a, b 为 1, 2 号菌免疫的抗体), 而用高浓度抗原(1152 亿/ml)检测抗体, 只能检出高效价抗体 1:1280 和 1:640(抗原 1, 4 结果一致, 抗原 1 为 1152 亿/ml, 抗原 4 为 144 亿/ml),

均比扩散法低二个稀释度。而用高效价血清(1:1280)测定抗原,比扩散法敏感三个稀释度(见表4)。

三、不同载体的试验效果

电泳法试验结果,琼脂糖比净化琼脂敏感。东海厂琼脂糖比BDH出品的反应稍快,沉淀弧较粗松。扩散法结果,净化琼脂呈现的沉淀线清晰,不易自溶,而琼脂糖出现沉淀线条数多,易自溶,明显程度不如净化琼脂。琼脂粉效果差。海燕牌比日本进口的琼脂效果好。鹿牌最差(见图4)。载体浓度以0.6—0.7%为适宜。

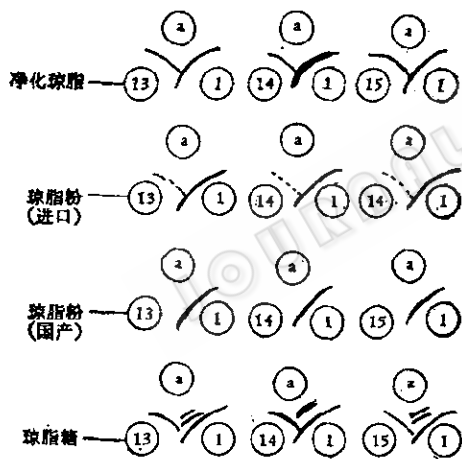


图4 四种载体所呈现的沉淀线效果

(a: 为1号菌免疫血清效价1:6400以上, 1, 13, 14, 15为福尔马林抗原)

四、其他方面

tris 缓冲液比盐酸巴比妥液反应敏感, tris

原液与稀释液效果同。加1% 迭氮钠既防污染, 又不影响结果。每片琼脂板4.5ml, 电流15mA, 电压100V, 电泳1—3小时, 纱布搭桥, 电泳效果好。孔径3或4mm, 孔矩小, 琼脂板厚, 沉淀线出现快而明显。如抗原浓度和血清效价高, 37℃ 6—8小时即可出现沉淀线, 48小时呈现清楚。

体 会

经上述试验, 初步认为电泳法和扩散法可用于肠道革兰氏阴性菌的抗原分析, 不同的抗原呈现不同的沉淀线。要获得快而明显的沉淀线与下列条件有关: ① 免疫抗血清效价高, 1:320以上。② 抗原浓度不低于20亿/ml。③ 孔径大(3—4mm), 孔距小(2—3mm), 抗原孔比抗体孔小2—3倍; 或重复加抗体1—2次。④ 载体板每片4.5—5ml。⑤ 中央孔放抗体, 边孔加抗原。⑥ 电泳用琼脂糖, 扩散用净化琼脂。⑦ 37℃ 放置3天以上, 保持一定湿度, 防止琼脂板污染和干裂。⑧ tris 缓冲液比盐酸巴比妥液敏感。⑨ 用纱布搭桥。⑩ 抽血时防止溶血, 空腹抽血。

参 考 文 献

- [1] 何健军: 中华医学杂志, 51(1): 44—46, 1965。
- [2] 俞永平等: 微生物学通报, 8(1): 22—26, 1981。
- [3] 徐礼园: 上海免疫通讯, 5: 18, 1980。
- [4] Waters et al.: *Am. Clin. Pathol.*, 71: 330—332, 1979。
- [5] Diaz, R. et al.: *Bull. W. H. O.* 53(4): 417—424, 1974。
- [6] Odds, F.C. et al.: *J. Immuno. Methods*, 7(2/3): 211—218, 1975。