

· 论 著 ·

不同动物红细胞制备实验教学用溶血素的方法探讨

李洱花¹, 叶吉云¹, 邹 浩², 陈 芳¹, 刘云霞^{1△}, 张才军^{1▲}

(1. 昆明医科大学病原生物学与免疫学实验室 650500; 2. 昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科 650032)

摘要:目的 检测绵羊红细胞(SRBC)和猪红细胞(PRBC)分别经 2 种程序免疫家兔所制得溶血素的效价,并比较几种溶血素在医学免疫学实验中的应用效果,以寻求制备符合免疫学实验及教学需求的高效价溶血素的较好方法。方法 40 只雄性家兔分为 4 组,分别用 SRBC 和 PRBC,间隔 2 d 经不同程序免疫家兔制备溶血素,再用补体溶血试验检测几种溶血素的效价,比较其在免疫学实验教学中的应用,并探讨高效价溶血素的制备方法。结果 经补体溶血试验测得几种溶血素效价,A 组兔抗-SRBC 血清效价为 1:4 800;B 组兔抗-PRBC 血清效价为 1:1 200;C 组兔抗-SRBC 血清效价为 1:1 000,D 组兔抗-PRBC 血清效价为 1:200。结论 用 SRBC 制备的溶血素效价均高于相同方法下用 PRBC 制备的溶血素;红细胞抗原相同时,采取先皮内全血注射后耳缘静脉接种的免疫方法制备的溶血素效价也要高于单纯采取耳缘静脉注射的免疫方法制备的溶血素;且 PRBC 可代替 SRBC 免疫家兔,制备满足实验教学要求的溶血素。

关键词:溶血素; 红细胞抗原; 效价; 免疫学; 实验教学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.14.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)14-1921-04

To explore the preparation method of different animal erythrocyte hemolysin in experimental teaching of medical immunology

LI Erhua¹, YE Jiyun¹, ZOU Hao², CHEN Fang¹, LIU Yunxia^{1△}, ZHANG Caijun^{2▲}

(1. Laboratory of Microbiology and Immunology, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China;

2. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To detect different animal erythrocyte hemolysins titer, and compare the application of these hemolysins in immunological experimental teaching, for selecting the better method of preparing high titer hemolysin for experimental teaching of medical immunology. **Methods** A total of 40 experiment rabbits were divided into 4 groups in this study, and immunized by sheep red blood cell(SRBC) and porcine red blood cell(PRBC) through different immunization procedures to prepare the hemolysin, detect and compare these 4 groups hemolysins titer by the complement hemolysis test. **Results** Rabbit Anti -SRBC in the group A was 1:4 800, rabbit Anti -PRBC in the group B was 1:1 200, rabbit Anti -SRBC in the group C was 1:1 000, rabbit Anti -PRBC in the group D was 1:200. **Conclusion** The hemolysin titer of the rabbit Anti -PRBC was lower than that of the rabbit Anti -SRBC by the same immunization procedures, and the immunization procedure by intradermal multi-point and auricular vein injection is the better method of preparing high titer hemolysin, so PRBC could replace SRBC as antigen, and immunize the rabbits for preparing hemolysin, which could be used in experimental teaching of medical immunology.

Key words: hemolysin; red blood cell antigen; titer; immunological; experimental teaching

在医学生免疫学实验教学中,溶血反应、补体参与的反应均被列为本科临床医学、医学检验、医学实验技术等专业学生实验的必修内容,而这几个实验都要用到溶血素。同时溶血素也是医学实验及临床、科研中常用的试剂^[1-2]。在实际教学中,由于学生实验所需溶血素量大,而市场上售溶血素价格较贵。因此为了节约成本,保证学生实验的正常开展,常需要自行制备,一直以来,采用绵羊红细胞(SRBC)免疫家兔是制备溶血素的公认方法,但在实际制备中,究竟何种免疫程序所制得的溶血素效价更高,且更符合免疫学实验教学的需求,却各有说法。加之在实际情况中,绵羊的饲养条件要求较多,用于动物实验更是不易饲养,常难以满足实验教学的需求,于是笔者考虑到猪红细胞(PRBC)的获取要比 SRBC 更为方便、实用,且实验成本也更为经济,能否用 PRBC 进行溶血素制备方法。因此,本

实验室在自行制备溶血素的经验基础上,尝试分别用 SRBC 和 PRBC,经不同方法免疫家兔以制备溶血素,再用补体溶血试验检测几种不同溶血素的效价高低,并比较其在免疫学溶血实验及教学中的应用效果,以寻求制备符合医学实验及教学要求的高效价溶血素的优选方法,现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康家兔由昆明医科大学实验动物中心提供,每只体质量 2.0~3.0 kg,共 40 只,均为雄性,无传染性疾病,无任何免疫接种史。将家兔随机分成 A、B、C、D 4 组,每组各 10 只,并做好编号、标记及分笼工作。

1.2 制备不同种类及剂型的红细胞抗原

1.2.1 SRBC 全血及不同浓度 SRBC 悬液 选择健康绵羊,由昆明医科大学实验动物中心提供。从绵羊颈静脉无菌抽取

绵羊血,将其放入装有小玻璃珠的无菌三角烧瓶中,盖好瓶盖后朝同一方向均匀摇动,使充分混合,以除去纤维蛋白,至血液不凝固,即为 SRBC 全血,置 4 ℃ 冰箱保存备用。另取上述已脱纤维的 SRBC 全血,置于无菌离心管中,加入 2~3 倍体积的无菌生理盐水混匀,经 2 000 r/min,10 min 离心,后去上清,再用无菌生理盐水如此反复洗涤 2 次,最后一次去上清后,取压积红细胞用无菌生理盐水分别配成 20.0%、10.0%、1.5% 的 SRBC 悬液,置于 4 ℃ 冰箱保存备用^[3]。

1.2.2 PRBC 全血及不同浓度 PRBC 悬液 选择健康家猪,由昆明医科大学实验动物中心提供。从猪上腔静脉无菌抽取猪血,分别制成 PRBC 全血以及 20.0%、10.0%、1.5% PRBC 悬液,其制备方法同 1.2.1,将上述制好的 PRBC 全血及 PRBC 悬液置于 4 ℃ 冰箱保存备用^[4-5]。

1.3 制备新鲜补体溶液 采用豚鼠心脏无菌采血法制备新鲜补体溶液^[6-7]。选体质量在 1.0 kg 左右的健康豚鼠,由昆明医科大学实验动物中心提供,取仰卧位,充分暴露前胸。探明心跳最明显部位用无菌注射器垂直缓慢刺入心脏抽取血液,并及时将针筒内抽取的血液置入无菌培养皿中(每个培养皿约 15

mL),后将培养皿置于 37 ℃ 温箱中孵育 2 h,待血液完全凝固后无菌收集血清转移至无菌离心管中,经 2 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液分装成若干小管(每管 5 mL),置 -20 ℃ 冰箱保存。使用前用生理盐水稀释,配成 1:30 的补体溶液。

1.4 各实验组家兔免疫程序^[6-8] A 组兔子(10 只):全程共免疫 7 次,间隔时间为 2 d;先用备好的脱纤维 SRBC 全血经皮内多点注射家兔,首次注射 0.5 mL,以后逐次递增 0.5 mL,共注射 5 次,第 6、7 次则使用已备好的 20% 的 SRBC 悬液经耳缘静脉注射家兔,每次 1 mL。B 组兔子(10 只):除免疫原为 PRBC 外,其余免疫剂量、免疫次数、免疫途径及间隔时间均与 A 组相同。见表 1。C 组兔子(10 只):全程共免疫 7 次,间隔时间为 2 d;使用已备好的 10% 的 SRBC 悬液经耳缘静脉注射家兔,每次 1 mL。D 组兔子(10 只):除免疫原为 PRBC 外,其余免疫剂量、免疫次数、免疫途径及间隔时间均与 C 组相同。见表 2。A、B、C、D 组均于第 17 天分别采集家兔的免疫血清进行试验血,试血成功后于第 18 天分别采集各组家兔免疫血清保存备用。

表 1 A、B 2 组实验家兔的免疫方案

时间(d)	A 组免疫途径	A 组免疫原(SRBC)	A 组剂量(mL)	B 组免疫途径	B 组免疫原(PRBC)	B 组剂量(mL)
1	皮内多点	全血	0.5	皮内多点	全血	0.5
3	皮内多点	全血	1.0	皮内多点	全血	1.0
5	皮内多点	全血	1.5	皮内多点	全血	1.5
7	皮内多点	全血	2.0	皮内多点	全血	2.0
9	皮内多点	全血	2.5	皮内多点	全血	2.5
11	耳缘静脉	20%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	20%PRBC 悬液	1.0
13	耳缘静脉	20%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	20%PRBC 悬液	1.0

表 2 C、D 2 组实验家兔的免疫方案

时间(d)	C 组免疫途径	C 组免疫原(SRBC)	C 组剂量(mL)	D 组免疫途径	D 组免疫原(PRBC)	D 组剂量(mL)
1	耳缘静脉	10%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	10%PRBC 悬液	1.0
3	耳缘静脉	10%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	10%PRBC 悬液	1.0
5	耳缘静脉	10%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	10%PRBC 悬液	1.0
7	耳缘静脉	10%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	10%PRBC 悬液	1.0
9	耳缘静脉	10%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	10%PRBC 悬液	1.0
11	耳缘静脉	10%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	10%PRBC 悬液	1.0
13	耳缘静脉	10%SRBC 悬液	1.0	耳缘静脉	10%PRBC 悬液	1.0

1.5 各组免疫血清效价的初步测定 在末次免疫后第 4 天分别进行血清抗体效价的初步测试。随机选择 A、B、C、D 4 组兔子各一只,用无菌注射器分别在兔耳缘静脉采血 1 mL 置于无菌离心管中,置 37 ℃ 温箱中温育 2 h,后以 2 000 r/min,离心 10 min,分别收集 4 组血清,用试管直接凝集法进行 A、C 组兔抗-SRBC 和 B、D 组兔抗-PRBC 血清效价的测定。经试验后,分别测得 A 组兔抗-SRBC 血清效价为 1:640;B 组兔抗-PRBC 血清效价为 1:160;C 组兔抗-SRBC 血清效价为 1:160,D 组兔抗-PRBC 血清效价为 1:40。

1.6 采集各实验组家兔免疫血清^[3,8] 试血成功后,于第二天分别进行 A、B、C、D 4 组家兔心脏无菌采血。家兔取仰卧

位,充分暴露前胸。探准心脏搏动最强部位,用无菌注射器垂直缓慢刺入心脏抽取血液,并及时将针筒内抽取的血液置入无菌培养皿中(每个培养皿约 15 mL),后将培养皿置 37 ℃ 温箱孵育 2 h,待血液完全凝固后无菌收集血清转移至无菌离心管中,经 2 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液分装入无菌干燥离心管中(每管 10 mL),做好标记后置于 -20 ℃ 冰箱保存。4 组家兔免疫血清均用相同方法采集分装后保存待检。

1.7 各实验组免疫血清效价的测定 在试管凝集试验阳性的基础上,采用补体溶血试验分别检测 4 组免疫血清的效价。4 组免疫血清均用相同的方法分别进行溶血素的滴定^[4]。

1.7.1 实验 A、C 组所得兔抗-SRBC 溶血素效价的测定 取

2 份 15 支试管依次编号,1 份测定 A 组兔抗-SRBC 溶血素效价;另 1 份测定 C 组兔抗-SRBC 溶血素效价。2 份试管中除所加的兔抗-SRBC 不同(分别来自 A 组或 C 组)外,其余均按成分、次序、剂量分别加样后进行滴定。

1.7.2 实验 B、D 组所得兔抗-PRBC 溶血素效价的测定 取 2 份 15 支试管依次编号,1 份测定 B 组兔抗-PRBC 溶血素效价;另 1 份测定 D 组兔抗-PRBC 溶血素效价。2 份试管中除所加的兔抗-PRBC 不同(分别来自 B 组或 D 组)外,其余均按成分、次序、剂量分别加样后进行滴定。

2 结 果

以完全溶血的溶血素最高稀释倍数作为该溶血素的效价。

本实验分别用 2 种红细胞抗原,通过 2 种不同方法免疫家兔获得兔抗不同红细胞的溶血素,经补体溶血试验检测 4 种溶血素的效价,见表 3、4。滴定结果为:A 组兔抗-SRBC 血清效价 1:4 800;B 组兔抗-PRBC 血清效价 1:1 200;C 组兔抗-SRBC 血清效价 1:1 000,D 组兔抗-PRBC 血清效价 1:200。其溶血素效价即为 1 个溶血素单位,当进行补体正式实验时,通常采用 2 个溶血素单位进行使用。4 种溶血素在其效价内应用于溶血实验时,均可与相应红细胞发生完全溶血,形成清亮的红色透明液体,现象直观、明显。本次实验中,A、B、C、D 4 组家兔注射部位均出现不同程度的表皮色素沉着、结痂、坏死或脱落等现象,但 4 组家兔都完成了整个免疫程序,均未出现死亡现象。

表 3 实验 A、C 组兔抗 SRBC 溶血素滴定及结果

试管编号	A 组/C 组的兔抗 S RBC 溶血素(mL)	新鲜补体 1: 30(mL)	缓冲盐水 (mL)	1% SRBC 悬液(mL)	A 组滴定结果	C 组滴定结果
1	0.1(1:200)	0.2	0.2	0.1	全溶	全溶
2	0.1(1:400)	0.2	0.2	0.1	全溶	全溶
3	0.1(1:800)	0.2	0.2	0.1	全溶	全溶
4	0.1(1:1 000)	0.2	0.2	0.1	全溶	全溶
5	0.1(1:1 200)	0.2	0.2	0.1	全溶	半溶
6	0.1(1:2 400)	0.2	0.2	0.1	全溶	微溶
7	0.1(1:3 200)	0.2	0.2	0.1	全溶	不溶
8	0.1(1:3 600)	0.2	0.2	0.1	全溶	不溶
9	0.1(1:4 000)	0.2	0.2	0.1	全溶	不溶
10	0.1(1:4 800)	0.2	0.2	0.1	全溶	不溶
11	0.1(1:5 600)	0.2	0.2	0.1	半溶	不溶
12	0.1(1:6 400)	0.2	0.2	0.1	微溶	不溶
13	0.1(1:7 000)	0.2	0.2	0.1	不溶	不溶
14	0.1(1:8 000)	0.2	0.2	0.1	不溶	不溶
15	对照	—	0.5	0.1	不溶	不溶

注:— 为无数据。

表 4 实验 B、D 组兔抗 PRBC 溶血素滴定及结果

试管编号	B 组/D 组的兔抗 PR BC 溶血素(mL)	新鲜补体 1:30 (mL)	缓冲盐水 (mL)	1% PRBC 悬液(mL)	B 组滴定结果	D 组滴定结果
1	0.1(1:50)	0.2	0.2	0.1	全溶	全溶
2	0.1(1:100)	0.2	0.2	0.1	全溶	全溶
3	0.1(1:200)	0.2	0.2	0.1	全溶	全溶
4	0.1(1:300)	0.2	0.2	0.1	全溶	半溶
5	0.1(1:400)	0.2	0.2	0.1	全溶	微溶
6	0.1(1:600)	0.2	0.2	0.1	全溶	不溶
7	0.1(1:800)	0.2	0.2	0.1	全溶	不溶
8	0.1(1:1 000)	0.2	0.2	0.1	全溶	不溶
9	0.1(1:1 200)	0.2	0.2	0.1	全溶	不溶
10	0.1(1:1 400)	0.2	0.2	0.1	半溶	不溶
11	0.1(1:1 600)	0.2	0.2	0.1	微溶	不溶
12	0.1(1:2 000)	0.2	0.2	0.1	不溶	不溶

续表 4 实验 B、D 组免抗 PRBC 溶血素滴定及结果

试管编号	B 组/D 组的免抗 PRBC 溶血素(mL)	新鲜补体 1:30 (mL)	缓冲盐水 (mL)	1% PRBC 悬液 (mL)	B 组滴定结果	D 组滴定结果
13	0.1(1:3 000)	0.2	0.2	0.1	不溶	不溶
14	0.1(1:4 000)	0.2	0.2	0.1	不溶	不溶
15	对照	—	0.5	0.1	不溶	不溶

3 讨 论

3.1 抗原种类对溶血素效价的影响 在本实验中 A 组与 B 组, C 组与 D 组均是采用 2 种不同抗原经同一免疫程序免疫家兔后制备溶血素, 见表 1~2, 比较其效价高低, A 组大于 B 组, C 组大于 D 组。由此可见在相同免疫程序下, 用 SRBC 制备的溶血素效价要明显高于用 PRBC 所制得的溶血素, 但 4 种溶血素在其效价内应用于溶血实验时, 均可与其相应红细胞发生完全溶血, 实验现象没有明显差别, 其原因可能是: (1)抗体的产生与抗原的种类及其自身性质有很大关系。SRBC 一直是制备免抗溶血素的首选抗原, 张改等^[9]、徐存来等^[6]、张淑莉等^[5,8]都先后制得 1:800~1:3 000 不等效价的免抗-SRBC 溶血素, 并广泛应用于实验及教学中。SRBC 和 PRBC 虽然都为动物红细胞, 但二者抗原性质也有差别, 刺激家兔发生的免疫反应及效果也固然不同。(2)抗原有效刺激剂量对免疫血清效价的影响也很重要, 在能有效诱导产生抗体的剂量范围内, 抗原剂量越大, 免疫效果越好, 产生的效价也越高。实验中 2 种动物的红细胞数参考值分别为: SRBC 计数为 (8.42±1.20)×10¹²/L, SRBC 平均体积 (MCV) 为 30~44; PRBC 为 (5.509±0.335)×10¹²/L, PRBC 平均体积 (MCV): 53~66^[11]。在本实验中, A 组与 B 组、C 组与 D 组家兔在行免疫接种时, 2 种红细胞的注射剂量是一样的, 同样剂量的血液中, PRBC 的有效免疫剂量 (红细胞数) 比 SRBC 的低, 故注射 PRBC 刺激家兔产生的免疫效果较注射 SRBC 差, 因此在以后的试验中, 可以适当地增加 PRBC 的接种剂量, 以提高溶血素的效价。

3.2 抗原剂型、免疫途径对溶血素效价的影响 本实验中 A 组与 C 组, B 组与 D 组是采用同一有效抗原的不同剂型经不同免疫程序免疫家兔后制备溶血素, 见表 1~2, 其效价对比结果显示 A 组大于 C 组, B 组大于 D 组; 与此同时, 本研究发现采取先皮内全血注射后耳缘静脉接种的免疫方法制备的免抗-PRBC 溶血素效价却高于单纯采取耳缘静脉注射的免疫方法制备的免抗-SRBC 溶血素, 即 B 组大于 C 组。由此可见在使用相同有效免疫原的情况下, 采用先全血皮内多点注射, 后 20% 红细胞耳缘静脉接种的免疫方法所制备的溶血素效价要明显高于只采用 10% 红细胞耳缘静脉注射的免疫方法, 其原因是: 高效价溶血素的获得不仅与抗原的自身性质有关, 而且与抗原的剂型、剂量、注射途径、次数, 间隔时间也有很大的关系。皮内免疫的效果最佳, 静脉注射则免疫效果较差^[10]; 而全血刺激产生的应答效果要比单纯红细胞悬液刺激的效果强。实验中, 采用间隔 2 d 连续免疫的方法, 使得因第一次抗原刺激形成记忆性淋巴细胞, 经后几次注射产生了放大效应, 从而生成更多抗体(一般维持 4 周), 而本研究也在抗体水平缓慢

平稳下降之前, 完成了免疫血清的采集。

本实验通过 18 d 的免疫成功制备 4 种溶血素, 2 种免抗-SRBC 溶血素效价都超过了 1:1 000, 而用 PRBC 制备的溶血素效价分别达到了 1:1 200 和 1:200, 且 2 种免抗-PRBC 溶血素产生的溶血现象和免抗-SRBC 溶血素的一样明显直观, 其效价和效果要高于, 也优于虞上宠等^[7]使用鸡红细胞免疫家兔所制得的溶血素。随后笔者将 2 种免抗-PRBC 溶血素应用于昆明医科大学 2014 级医学检验、临床医学等专业本科生补体溶血反应的实验教学中, 效果明显。因此, 笔者认为虽然 SRBC 仍是制备溶血素的最佳抗原, 但用 PRBC 代替 SRBC 免疫家兔制备的溶血素成本低, 效价高, 实验效果明显, 能满足医学生实验教学的需求, 另外虽然家兔耳缘静脉注射红细胞悬液的免疫方法, 易操作, 家兔不良反应少, 先皮内全血注射后耳缘静脉接种的方法的确是制备高效价溶血素优选的免疫程序, 但是, 在相同免疫程序下, 如何解决免抗-PRBC 血清效价不及免抗-SRBC 高的问题, 笔者也希望在今后的研究中进行探索和改进。

参 考 文 献

- [1] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 221.
- [2] 吴俊英. 免疫学检验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2012: 82.
- [3] 赵巧辉, 刘孟州. 实验动物采血方法 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006, 51(4): 51-53.
- [4] 刘琥琥. 微生物学与免疫学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 23-25.
- [5] 张淑莉, 李妮. 高效价免抗羊免疫血清制备及其在实验教学中的应用 [J]. 山西医药杂志, 2015, 44(11): 1241-1243.
- [6] 徐存来, 赖登明. 2 种免疫方法制备免抗绵羊红细胞溶血素的效价观察 [J]. 健康研究, 2011, 31(2): 91-93.
- [7] 虞上宠, 马益炳, 唐丹燕, 等. 绵羊红细胞与鸡红细胞制备溶血素在免疫学溶血反应中的运用比较 [J]. 杭州师范学院学报(医学版), 2008, 28(2): 87-89.
- [8] 张淑莉, 张琪, 曹佩华, 等. 实验教学用免抗羊免疫血清的制备与检测 [J]. 陕西教育(高教), 2015, 28(6): 54-55.
- [9] 张改, 王书伟. 短程免疫制备实验用溶血素方法探讨 [J]. 河南职工医学院学报, 2013, 25(3): 238-240.
- [10] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 21.
- [11] 安丽英. 兽医实验诊断 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 25.