

QHS 法检测抗体的产生及其与 PFC 法的比较

邬光惠 田 跃 韩志涛

(军事医学科学院基础医学研究所)

空斑技术(plaque forming cell-PFC)于1963年由杰尼氏(Jerne)^[1]介绍问世以来,已广泛用于抗体形成细胞的检测。PFC测定不仅可作为机体免疫状态的指标,而且也可采用进行细胞动力学的观察。该法特点是反应特异性高,检测能力强并可直观,特别适用于免疫学的基础研究,它是利用经SRBC免疫的小鼠脾脏制成脾细胞悬液,在半固体凝胶介质中与靶细胞SRBC混合,在补体参加下使靶细胞溶解,形成肉眼可见的空斑。但此法操作比较繁琐需由人计数空斑,重复性较差而且它所检测的是抗体形成细胞的数目,并不能精确地反映各个细胞产生抗体的能力。近年来有些学者发展了定量溶血法(Quantitative hemolysis of SRBC-QHS)检测脾脏中抗体产生的量^[2]。此法是通过分光光度法检测抗体形成细胞介导的溶血反应中绵羊红细胞(SRBC)溶解后释放的血红蛋白来定抗体形成细胞产生的抗体量。由于工作中的需要建立了QHS法检测抗体的产生,并与PFC法测抗体形成细胞的结果比较。实验表明两者呈平行关系,可作为对机体免疫状态的指标。

材料与 方法

1. 动物 LACA 小鼠体重 22—25 克、雄性。
2. 小鼠免疫 取新鲜保存于阿氏液中的

SRBC 数毫升,用 Hank's 液或磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤 3 次。2,000 转/分离心 5 分钟。按压缩体积制成 10% SRBC 悬液。每只小鼠静脉注射 0.2 毫升或腹腔注射 0.5 毫升。

3. 脾细胞悬液的制备 将免疫 4 天小鼠脱颈椎致死,取出脾脏置匀浆器中,每只脾用 2 毫升 Hank's 液制成匀浆,在有少许棉花的漏斗中过滤,滤出液作活细胞计数,约得 2×10^8 脾细胞,再稀释成浓度为 1×10^6 — 1×10^7 /毫升细胞悬液。

4. 补体 豚鼠心脏取血 5 毫升,置冰箱 1 小时以上,离心 2,500 转/分 5 分钟分出血清。用 SRBC 吸收,每 0.8 毫升血清加 0.2 毫升压缩体积的 SRBC 混匀放 0—4℃ 置 1 小时,离心取上清液,用 Hank's 液做 1:20 稀释。

5. SRBC 悬液的制备 取新鲜 SRBC 数毫升用 Hank's 液洗涤 3 次。按压缩体积配成 0.2—0.4% 的悬液。

6. PFC 法 按杰尼法^[3]

7. QHS 法^[2-3] 取上述脾细胞悬液 1 毫升加 0.2—0.4% SRBC 1 毫升和 1:20 稀释的补体 1 毫升。对照管不加脾细胞悬液,以 Hank's 液补充。充分混匀后 37℃ 保温 1 小时,3,000 转/分离心 5 分钟,取上清液再加 Hank's 液 2 毫升使终体积为 5 毫升,在分光光度计上测对 413 毫微米(nm)的光密度。

结 果

1. 免疫脾细胞量与介导溶血的关系 QHS 法能较好地反映抗体形成细胞量的变化 (见图 1)。随着脾细胞加量的增加,介导溶血反应也随之加强。表现在对 413nm 的光密度读数的提高,在脾细胞量 2×10^6 — 8×10^6 范围内呈线性关系。4 次实验测得的 O.D._{413nm} 及其均值 (见表 1)。

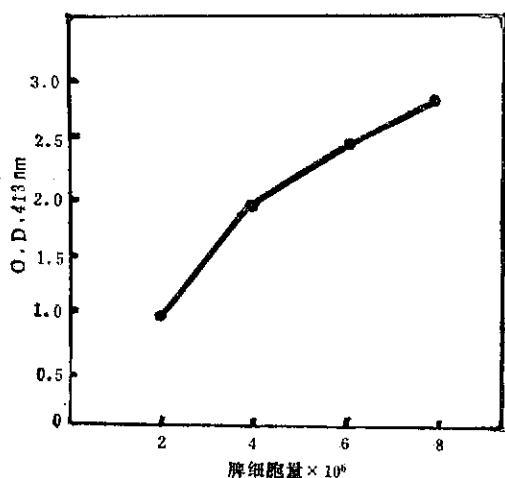


图 1 脾细胞加量与介导溶血的关系

表 1 不同脾细胞加量下的 QHS

项 目	O.D. _{413nm}			
	脾细胞量 × 10 ⁶			
	2	4	6	8
1	1.327	2.331	2.548	2.782
2	1.073	2.171	2.984	3.446
3	0.430	1.102	1.630	2.000
4	0.801	1.744	2.205	2.670
均值 ± SD	0.910 ±0.384	1.840 ±0.549	2.340 ±0.495	2.670 ±0.602

2. SRBC 悬液浓度对 QHS 的影响 SRBC 用 Hank's 液冲洗后按压缩体积配制成不同浓度,与定量抗体形成细胞 (5×10^6) 作用 (见表 2)。

表 2 所列数据表明随着 SRBC 加量增加 QHS 的光密度上升。但我们注意到当 SRBC 加量过多时 (表 2 第 4 行 1.6% SRBC) 光密度反而下降。

表 2 绵羊红细胞浓度对 QHS 的影响

项 目	O.D. _{413nm}			
	SRBC 浓度			
	0.2%	0.4%	0.8%	1.6%
1	0.429	1.120	1.590	1.000
2	0.056	0.401	0.456	0.275
3	0.889	1.656	2.326	2.001
均值 ± SD	0.457 ±0.417	1.059 ±0.629	1.456 ±0.942	1.092 ±0.867

3. 补体浓度对 QHS 的影响 补体在抗体形成细胞介导溶血反应中起着重要的作用。补体的用量大小直接影响着红血球的溶解。用浓度较大的补体,溶血固然较好,但这样血清的用量较大。我们的实验结果表明以 1:20 稀释度较为合适 (见图 2) 其溶血效果与 1:10 的相似。

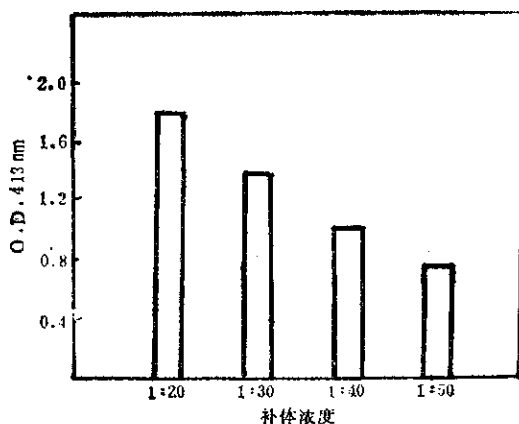


图 2 补体浓度对 QHS 的影响

但一般采用 1:30 稀释的补体即可达到实验的要求。用经洗涤干净的 SRBC 预先吸收补体可以消除实验中补体非特异性的溶血。

4. QHS 法与 PFC 法的比较 用 QHS 与 PFC 两种方法对同一标本进行检测,结果 (表 3 与图 2) 表明这两种方法均能检测免疫小鼠的抗体形成细胞的数量,两者呈平行关系。

在本实验条件下随着抗体形成细胞的增加,空斑数目增多呈高度正相关 ($r=0.982054$),介导溶血作用的光密度值也随之提高,二者亦呈高度正相关 ($r=0.982947$),其回归方程前

表3 QHS法与PFC法比较

项目	QHS法(光密度值)				PFC法(PFC/皿)			
	脾细胞量×10 ⁶				脾细胞量×10 ⁶			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	0.365	0.899	1.393	1.759	687	1.327	2.048	2.328
2	0.043	0.394	0.762	1.173	428	800	1.174	1.527
3	1.326	2.330	2.548	2.732	576	1.160	1.259	1.625
4	1.073	2.191	2.984	3.446	480	819	795	926
5	0.820	1.744	2.205	2.490	771	1.632	1.907	2.160
均值	0.725	1.510	1.978	2.320	586	1.148	1.437	1.713
±SD	±0.521	±0.838	±0.896	±0.880	±142	±352	±526	±557

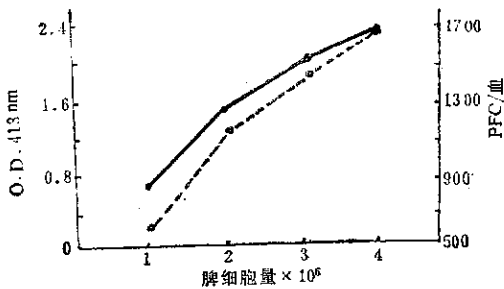


图3 QHS法与PFC法比较

●—● QHS法 ○---○ PFC法

者 $y = 0.32 + 5.25 \times 10^{-7}x$, 后者

$$y = 305.5 + 3.664 \times 10^{-7}x$$

(见图3)。

讨 论

自从杰尼及其同工者1963年提出PFC法测定抗体形成细胞以来,该技术不断改进。方法的敏感性较原来很大提高。在探讨机体免疫机制和研究某些免疫学基本理论等方面学者们应用PFC法做了大量工作。如在临床上该技术除用作为机体免疫状态的指标外,也被广泛地应用于药物筛选工作等。如将PFC法与其他技术联合使用,更能扩大它的应用范围,大大促进了对免疫机体细胞动力学研究的发展。但是此法如前言中所说的也有它的缺点,在应用上也有一定的限制,PFC的数目被认为并不能准确地测量抗体的产生,因为空斑大小的不同并不等同于血中溶血素的滴度。

由于发现半固体琼脂可为液体介质所代

替,免疫脾细胞所分泌的抗SRBC抗体的量可用分光光度法定量,QHS技术因此就被介绍用来检测产生的抗体量了。该技术重复性好。可以更准确地反映抗体产生的量而且不需要由人来计数空斑的数目,这些可能是它的优点,在本文所报道的实验结果中,可以看到用QHS法测得的结果与PFC法测得的结果之间有很好的平行关系。统计学处理所得数据充分说明了这一点。至于有可能产生的非特异性补体介导溶血则介以压缩SRBC预先吸附补体加以解决。QHS法操作比较简单,用材料少,测得的数据比较客观。所用脾细胞悬液可保存在4℃一定时间,不影响结果,曾用贮藏24小时的样品再进行测定,所得结果说明重复性较好。SRBC用量不宜太少,否则不能反映抗体形成细胞的最大值,但如用量太大则一方面会产生非特异性溶血,另一方面反使光密度值下降,产生此现象的原因尚有待研究。根据实验结果,应以选用0.2—0.4%浓度SRBC较为合适。通过两种方法的比较,可以认为QHS和PFC一样,可作为机体免疫功能的检测手段。但在某种程度上QHS法较PFC法更为简便和准确。

参 考 文 献

- [1] 王珏等 1980 小鼠抗体生成细胞的辐射敏感性及几种抗放药物对它的保护作用。军事医学科学院院刊(3): 225。
- [2] 李占荣 1975 测定抗体形成细胞的方法——溶血空斑试验 免疫学讲义 209。
- [3] Jerne N. K. et al. 1963 Plaque formation in agar

by single antibody producing cells. *Science* **140**:
405.

- [4] Simpson M. A. et al. 1978 Spectrophotometric
determination of lymphocyte mediated sheep red
blood cell hemolysin in vitro]. *Immunol. methods*

21: 159—165.

- [5] Van Dijk. H. et al. 1977 Quantification of in
vitro antibody Secretion by immune spleen cells
]. *Immunol. methods* **14**: 325—331.