

- Med Coll Natl, 2005, 18(3):159-160.
- [6] Mou R, Lang SY, Bao HE, et al. An investigation on the epidemiology of *Taenia saginata* in wushi County of Xinjiang autonomous region[J]. J Guiyang Med Coll, 2006, 31(5):385-387.
- [7] Li T, Craig PS, Ito A, et al. Taeniasis/cysticercosis in Tibetan population in Sichuan Province, China[J]. Acta Trop, 2006, 10(3):223-231.
- [8] 张搭燕, 李莉莎, 林金祥. 猪带绦虫病和猪囊尾蚴病 3 例报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(1):319.
- [9] 黄江, 胡旭初, 吴璇, 等. 牛带绦虫亚洲亚种乳酸脱氢酶基因的克隆表达及免疫原性分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(4):268-271.
- [10] 方文, 包怀恩, 肖敬安, 等. 猪囊尾蚴特异性抗原的筛选、鉴定和生物信息学分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(4):313-317.

(收稿日期:2011-03-22)

• 检验技术与方法 •

兔抗人血清制备与效价的鉴定

何艳嫦, 钟俊东

(广东省佛山市第一人民医院检验科 528000)

摘要:目的 制备兔抗人丙种球蛋白(HGG)免疫血清并鉴定其效价。方法 将加有福氏佐剂的 HGG 注射于家兔后脚足跖两侧, 将未加佐剂的 HGG 分别注射于家兔后脚腓窝淋巴结两侧、背部皮内、上肢或下肢肌肉两侧, 然后采血并提纯免疫血清, 利用双向免疫扩散试验、ELISA 法来分析鉴定兔抗 HGG 血清的效价。**结果** 双向免疫扩散试验在 1:1、1:2 抗血清稀释处出现抗原抗体反应沉淀线, ELISA 法在抗血清稀释度为 1:25 600 处的颜色深度约为阴性对照的 2 倍。**结论** 在双向扩散试验中鉴定的抗血清效价为 1:2, 在 ELISA 法中鉴定其效价为 1:25 600。

关键词: 丙种球蛋白类; 补体溶血活性测定; 双向扩散试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)18-2109-02

抗体分子是生物学和医学领域用途最广泛的蛋白分子, 抗体作为疾病预防、诊断和治疗的重要生物制剂已有百余年的发展历史^[1]。抗体在医药生物技术领域中的应用日趋广泛, 地位越来越重要, 而抗体的制备技术也是众多研究者们关注的问题。当前制备多克隆抗体主要是通过免疫动物所得, 但是如何快速、经济地制备高效价的多克隆抗体是许多研究都要面对的问题^[2]。本组使用人丙种球蛋白免疫家兔制备抗血清, 利用双向扩散试验和 ELISA 法检测所得抗血清的效价, 为获得更加快速、经济的制备方法奠定了一定的基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选用健康家兔, 适龄、健壮, 无感染, 年龄在 6 个月以上。

1.2 试剂 牛血清清蛋白、福氏佐剂、青霉素、人丙种球蛋白血清 15 g/L、缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.6、PBST pH7.4、磷酸与柠檬酸缓冲液 pH5.0、TMB 底物使用液、H₂SO₄ 终止液 2 mol/L)、抗体为兔抗人丙种球蛋白免疫血清(自制)、HRP 标记羊抗兔 IgG(北京博奥森生物制品公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 人丙种球蛋白抗原的制备 将石蜡油和羊毛脂(V/W=3:1)加热倾入乳钵中, 待冷却后加入卡介苗(10 mg/mL), 研磨。逐滴加等量 1% BSA, 直至完全磨成乳剂保存用于第 1 针注射, 其他针使用含人丙种球蛋白的血清注射。

1.2.2 免疫家兔 第 1 针: 将加有福氏佐剂的 HGG 注射家兔后脚足跖两侧, 每侧 0.25 mL; 第 2 针: 将未加佐剂的 HGG 注射家兔后脚腓窝淋巴结两侧, 每侧 0.25 mL; 第 3 针: 将未加佐剂的 HGG 注射家兔背部皮内, 注射 5 点, 每点 0.1 mL; 第 4 针: 不加佐剂, 只注射 1% 牛血清清蛋白于家兔上肢或下肢肌肉两侧, 每侧 0.25 mL。每注射一次后应隔 7 d 再注射; 试血: 末次注射后 4~7 d 后试血。从耳静脉采血分离血清, 通过双向免疫扩散试验测定抗体效价。

1.2.3 对已接受免疫的家兔进行颈动脉放血和分离血清。

1.2.4 双向扩散试验 将已制备好的琼脂糖板进行打孔。中央孔内加 50 μ L 抗原(500 μ g/mL), 周围各孔内分别加入 50 μ L 1:2、1:4、1:8 及不稀释的抗血清, 以生理盐水作为空白对照, 以未经免疫的兔血清作为阴性对照。将加好样的琼脂板放入湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 温育 24 h, 观察结果。

1.2.5 用 ELISA 法对血清效价进行鉴定 将待测血清做倍比稀释(1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:51 200、1:102 400、1:204 800、1:409 600), 以最高稀释倍数的孔为阳性的稀释倍数作为免疫血清的效价。

2 结果

2.1 双向扩散试验结果 在 1:1、1:2 稀释度与中央孔(兔抗人血清)之间可出现清晰的乳白色沉淀线, 而在 1:4、1:8、NS 以及阴性对照中没有出现沉淀线, 所以, 免疫血清的效价为 1:2。

2.2 ELISA 法鉴定试验结果 在 ELISA 法试验中, 随着低稀释度到高稀释度的逐渐升高, 孔内的蓝色逐渐加深, 为阳性反应, 并且呈现一定的梯度性, 而两个阴性对照孔和空白对照孔没有颜色显示, 为阴性结果。通过目测, 可知稀释度中颜色的深浅为阴性对照 2 倍的是 1:25 600, 则免疫血清的效价为 1:25 600。

3 讨论

3.1 当机体受到抗原刺激后, 产生免疫学反应, 由机体的浆细胞合成并分泌与抗原有特异性结合能力的一组球蛋白, 这就是免疫球蛋白, 这种与抗原有特异性结合能力的免疫球蛋白就是抗体^[3]。抗体的特异性取决于抗原分子的决定簇, 各抗原分子具有许多抗原决定簇。因此, 由其免疫动物所产生的抗血清实际上是多种抗体的混合物, 称为多克隆抗体。目前制备抗体的方法主要有杂交瘤技术制备单克隆抗体、免疫动物制备多克隆抗体、基因工程技术制备抗体^[4]。

3.2 本组利用免疫家兔的方法制备兔抗人丙种球蛋白血清, 即多克隆抗体。最后成功免疫家兔, 并利用 ELISA 法检测出

相应的效价为 1 : 25 600,此效价比较理想,可用于一般实验的使用,如凝集反应试验,沉淀反应试验及相关的免疫学诊断^[5-6]。

3.3 本实验经济实用,适合于初学者学习制备抗血清。本法还可用于检测血清中各种免疫球蛋白、甲胎蛋白、乙型肝炎表面抗原。

3.4 在利用双向扩散试验检测抗体时,需要时间较长,而且灵敏度不够高,可以用免疫电泳试验来替代抗体的检测,提高效率与灵敏度^[7-8]。

3.5 ELISA 法试验灵敏度高,特异性好,在临床上得到广泛应用^[9]。但是在操作中各环节对试验检测效果影响较大,如不注意,将会导致显色不全、花板等结果。

参考文献

[1] 徐军发. 不同免疫扩散[J]. 临床免疫学检验实验,2010,8(6):31-32.
[2] 吕世静. 抗原和抗体的制备[J]. 临床免疫学检验实验,2010,1

(2):88-90.
[3] 盘箐,李贝晶. 动物免疫血清的制备[M]. 中国当代医药,2009,16(24):233-235.
[4] 英信,李红花,李芳芳,等. 不同免疫途径对制备抗血清影响的探讨[J]. 现代预防医学,2010,37(6):1106-1107.
[5] 莫链杰,陈晨,胡希文,等. 不同免疫程序制备兔抗牛血清清蛋白抗血清的效价比较[J]. 健康研究,2009,2(19):95-97.
[6] 吴震杰,蔡玲斐,王金鑫,等. 不同免疫程序制备伤寒抗血清的效价比较[J]. 杭州师范学院学报:医学版,2007,27(5):317-318.
[7] 陈燕飞. 抗原与免疫血清的制备[J]. 长治医学院学报,2006,23(2):17.
[8] 朱振久,张冉,杨惠军,等. 短程免疫法制备高效价抗血清研究[J]. 湖南师范大学学报:医学版,2006,1(6):67-69.
[9] 蔡玲斐. 不同免疫途径制备伤寒抗血清效价的比较[J]. 杭州医学高等专科学校学报,2002,23(3):106-107.

(收稿日期:2011-03-28)

• 检验技术与方法 •

膜杂交多重检测技术在 HPV 基因分型中的应用

王文强,龙 丹,胡庆宏,易诚予,骆长玲
(南昌大学附属第一医院 330006)

摘要:目的 应用膜杂交多重检测技术进行人乳头瘤病毒(HPV)基因分型诊断,以了解 HPV 亚型的感染状态。方法 采用膜杂交多重检测技术对 2 322 例患者进行 21 种 HPV 基因亚型检测。结果 共检出 HPV 感染者 952 例,阳性率为 40.99%。其中高危型感染 795 例,占 83.5%;低危型感染 157 例,占 16.5%;混合感染 309 例,占总阳性的 32.46%;单个亚型感染数为 643 例,占 67.54%,其中最常见 3 种亚型是 52、16 和 58 型,分别为 131 例(20.37%)、110 例(17.11%)和 76 例(11.82%)。不同年龄组的 HPV 感染检出率差异明显,小于 20 岁、20~35 岁、35~50 岁和大于 50 岁的 HPV 感染检出率分别为 3.8%、48.7%、42.9%和 4.6%,各年龄组低危型和高危型感染阳性率分别为 1.6%和 2.2%、17.5%和 31.2%、10.8%和 32.1%、0%和 4.6%。结论 膜杂交多重检测技术在 HPV 感染基因分型中的应用具有高度特异性和敏感性,可以为临床 HPV 感染诊断和宫颈癌的监测及预防提供可靠的实验依据。

关键词:基因型; 人乳头瘤病毒; 宫颈肿瘤; 膜杂交; 多重检测
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.030 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)18-2110-02

宫颈癌是仅次于乳腺癌的最常见的妇科恶性肿瘤之一,近年来,我国宫颈癌发病率和死亡率逐渐上升,并趋于年轻化,因此越来越受到人们的重视。目前宫颈癌是人类所有癌症中惟一病因明确的癌症,即人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的感染是宫颈癌发生的必要条件和主要病因^[1-2]。几乎所有的宫颈患者体内都检测到 HPV,从 HPV 感染到宫颈癌的发生需要经过多年甚至数十年的时间,如能早期发现、早诊断和治疗,就可将宫颈癌的发病率降到最低,甚至可能杜绝宫颈癌的发生。目前已发现了 100 多种 HPV 亚型,其中至少有 40 多种亚型与宫颈病变密切相关,且不同亚型致病能力、引起宫颈病变的病理性质有所不同。其中高危型 HPV 的持续感染是宫颈上皮内高度病变和宫颈癌发生的主要病因,这些高危型 HPV 主要包括 HPV16、18、31、33、35 等^[2];而低危型 HPV(如 HPV6、11、42 等)则常引起外生殖器湿疣等良性病变和宫颈上皮低度病变。因此,对 HPV 的分型检测是预防宫颈癌和早诊早治的重要手段。现应用膜杂交多重检测技术对患者进行了 HPV 分型检测,并对其各亚型感染情况、年龄组分布进行了分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2 322 例临床标本均为 2009 年 1 月 1 日至

2010 年 3 月 31 日期间到该院门诊就诊的不同年龄段女性,年龄为 17~83 岁,均用棉拭子擦取宫颈处的表皮脱落细胞。
1.1.2 仪器与试剂 检测试剂盒由凯普生物化学(潮州)有限公司提供,每张膜条可同时检测低危型 HPV6、11、42、43、44 和高危型 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、CP8304 亚型。基因扩增仪为美国 ABI 公司 PE-5700 型(使用 9600 模式)荧光定量扩增仪,杂交仪为香港基因科技有限公司 HHM-2 型凯普医用核酸分子快速杂交仪。
1.2 方法 将含有保养液的棉拭子混匀,取 800 μL 转移到 1.5 mL 的微量 EP 管中,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,按试剂说明书进行 DNA 提取,即得 DNA 提取液备用。在 PCR 反应管中加入已提取的待测样品 1.2 μL,反应总体积 25 μL。按以下条件进行扩增:20 ℃ 10 min,95 ℃ 9 min 变性;95 ℃ 20 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共 40 个循环,最后延伸 72 ℃ 5 min。杂交条件为:取 PCR 产物 20 μL 在 95 ℃加热 5 min,立即冰浴 2 min 以上,于 45 ℃进行杂交试验,每步均严格按试剂说明书操作。每批次均取试剂盒内提供的阳性标本做对照。
2 结 果
2.1 2 322 例患者共筛查出 HPV 亚型阳性标本 952 例,阳性率 40.99%。在所有 HPV 感染者中,高危型感染 795 例,其中