

医学免疫学 实验技术

主 编 马兴铭

副主编 何玉林

● YIXUE MIANYIXUE SHIYANJISHU

YIXUE MIANYIXUE SHIYANJISHU



兰州大学出版社
LANZHOU UNIVERSITY PRESS

21世纪高等医药院校教材

R392-35
17

医学免疫学 实验技术

YIXUE MIANYIXUE SHIYANJISHU

YIXUE MIANYIXUE SHIYANJISHU

主 编 马兴铭

副主编 何玉林

主 审 尹少甫

编 委 马兴铭 尹少甫

王竞秋 吴玉凤

何玉林 张李峰

梁亚玲 雒艳萍



兰州大学出版社

图书在版编目 (CIP)数据
医学免疫学实验技术/马兴铭主编. —兰州:兰州大
学出版社, 2005.7
ISBN 7-311-02607-5

I. 医... II. 马... III. 医药学:免疫学—实验—
医学院校—教材 IV. R392—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 081695 号

医学免疫学实验技术

主编 马兴铭

副主编 何玉林

兰州大学出版社出版发行

兰州市天水南路 222 号 电话:8912613 邮编:730000

E-mail: press@onbook.com.cn

http://www.onbook.com.cn

兰州大学出版社激光照排中心照排

兰州德辉印刷有限责任公司印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 6.5

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月第 1 次印刷

字数: 127 千字 印数: 1~2000 册

ISBN7-311-02607-5/R·112 定价: 10.00 元

本书如存在漏印、缺页、倒页、脱页等印装质量
问题, 请与兰州大学出版社市场营销中心联系调换。
联系电话: (0931)8914298

前 言

医学免疫学是一门医学基础课,是生命科学的前沿学科。为了培养高层次、高素质的人才,提高学生操作技能,让学生在有限的时间内学到现代免疫学的实验方法和技术,并使學生通过实验课的学习进一步认识和巩固课堂所学的知识,同时加强学生的实验创新能力及分析问题、解决问题能力的培养,我所在上世纪80年代编写了《微生物学与免疫学实验指导》,2000年组建了独立的免疫学研究所,并编写了《免疫学实验指导》,在使用期间修改补充多次,在实验课教学中取得了良好的教学效果,曾获得校级及教育厅级教学改革成果奖两项。免疫学的实验技术发展突飞猛进,实验技术已广泛应用于生命学科各个方面,为了适应免疫学发展的形势,在以往的实验指导基础上,增加了综合设计实验,编写了这本《医学免疫学实验技术》。

全书约15万字,所介绍的内容包括基础实验和综合设计实验。学生通过基础实验掌握免疫学的基本实验操作技能,训练学生的基本功;综合设计实验有利于培养学生的科学研究和创新思维能力。本书是医学本科生和硕士研究生很好的实验指导,也可供青年教师进行实验时参考。

本书是我所多年实验工作的积累,也是全体同仁共同努力的结晶,由于水平有限,时间仓促,不仅内容涵盖不全,而且难免有错误之处,真诚希望读者提出批评和建议,以利我们进一步改进和完善。

免疫学研究所

2005年7月

目 录

第一篇 基础实验	1
实验一 免疫系统组织和细胞形态学	3
实验二 吞噬细胞功能检测	7
实验三 花环法测定红细胞 CD35 分子	10
实验四 外周血单个核细胞的分离	12
实验五 花环法 T 细胞 CD2 分子的检测	15
实验六 NK 细胞活性测定	18
实验七 沉淀反应	21
实验八 凝集反应	26
实验九 酶联免疫吸附试验	30
实验十 胶体金标记技术	33
实验十一 荧光抗体法	37
实验十二 I 型过敏试验	39
第二篇 综合设计实验	41
实验一 巨噬细胞碳粒廓清试验	43
实验二 红细胞对肿瘤细胞免疫粘附能力的测定	45
实验三 花环法检测 T 细胞总数、CD4 ⁺ T 细胞数及 CD8 ⁺ T 细胞数	47
实验四 T 细胞体外增殖试验	50
实验五 B 淋巴细胞功能测定	53
实验六 脾脏 B 淋巴细胞增殖试验(XTT 比色法)	56
实验七 免疫血清的制备与抗体纯化技术	58
实验八 单克隆抗体技术	63
实验九 流式细胞仪对人 T 淋巴细胞亚群的分析	71
实验十 免疫印迹法	73
实验十一 免疫组织化学法测组织中细胞因子	75
实验十二 细胞因子及其受体检测	80
实验十三 细胞凋亡的检测	83
附录一 常用试剂配方	87
附录二 药物的浓度	93
附录三 医学免疫学实验实规则	94
参考文献	95



第一篇

基础实验

1999



实验一 免疫系统组织和细胞形态学

机体免疫系统由免疫器官、免疫细胞、免疫分子组成。该系统具有识别和排除抗原性异物、维持机体内环境稳定和生理平衡的功能,是执行体液免疫和细胞免疫的物质基础。本次实验主要观察免疫器官大体解剖学、免疫细胞的形态学特征,了解血脑屏障对神经系统的保护作用。

一、小鼠免疫器官解剖学观察

【原理及意义】

小鼠是啮齿目中体形较小的动物,淋巴系统很发达,包括胸腺、脾脏、淋巴管、外周淋巴结及肠道派氏集合淋巴结。本实验在带教老师指导下,解剖小鼠,观察胸腺、脾脏等免疫器官。

【材料】

1. 动物:昆明种小白鼠。
2. 试剂:3%来苏尔水,10%福尔马林,瑞特氏染液。
3. 器材:眼科镊,眼科剪,玻片。

【方法】

1. 小鼠脱臼处死,投入盛有3%来苏尔水的缸内,浸泡5分钟。取出小鼠,仰卧位置于试验台上,使动物腹部朝上。
2. 以镊子提起耻骨处皮肤,用剪刀沿正中线直剪开至下颌部,然后钝性分离皮肤,再把皮肤向四肢剪开。
3. 注意观察腹壁,用无菌剪刀沿正中线自阴部至膈肌为止剪开,观察腹腔液量及性状,观察脾脏。
4. 切开膈肌,剪断胸骨两侧肋软骨,翻起胸骨,观察胸腺、心脏及肺脏,胸腺位于小鼠胸腔前上方,内有许多大淋巴细胞(即前胸腺细胞)及特定的上皮网状细胞(分泌胸腺激



素)。

5. 将做病理检查的组织置于 10% 福尔马林中固定。解剖结束,深埋动物。

二、免疫细胞的形态观察

【原理及意义】

通过免疫器官压印片及血涂片染色,观察主要免疫细胞,包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、DC、单核巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、红细胞、血小板,认识主要免疫细胞的形态并绘图。

【材料】

1. 动物:昆明种小白鼠。
2. 试剂:3% 来苏尔水,瑞特氏染液,pH8.6 硫酸盐缓冲液,20% 盐酸甲醇。
3. 器材:眼科镊,眼科剪,玻片。

【方法】

1. 准备洁净玻片两张,一张用于推片,另一张用于固定标本。
2. 剪断小鼠尾巴取血或小鼠眼球取血,迅速在玻片上涂血膜制备血涂片,同时制备免疫器官压印片,自然干燥。

3. 瑞氏染色

(1)染色:甲醇固定标本 2 分钟(亦可省略),滴加瑞氏染液数滴覆盖血膜,染色 1 分钟,再加等量的 pH8.6 硫酸盐缓冲液或新制蒸馏水,用洗耳球吹打,使之与染液混匀,静置染色 8~10 分钟,弃去染料,水洗。

(2)脱色:用 20% 盐酸甲醇脱色,肉眼观察玻片呈粉红色为宜,显微镜下观察结果。

4. 细胞特征

T 细胞:T 细胞是由胸腺内的淋巴干细胞分化而成的,是淋巴细胞中数量最多、功能最复杂的一类细胞,占外周血液淋巴细胞总数的 75%~80%。T 细胞体积较小,胞质少,核呈圆形,常在一侧有小凹陷,染色质呈块状,较致密,故着色较深。电镜下,细胞表面较光滑,胞质内有丰富的游离核糖体、少量的线粒体和溶酶体。多数 T 细胞寿命较长,可存活数月至数年或更长。在抗原刺激下,T 细胞经过多次分裂增殖,形成效应性 T 细胞。效应性 T 细胞的存活期短,具有杀伤靶细胞的能力,但必须与靶细胞结合才能产生免疫效应。

B 细胞:B 细胞由骨髓中的淋巴干细胞分化而成,占血中淋巴细胞总数的 10%~15%,数量较少。细胞体积比 T 淋巴细胞略大。B 细胞的结构,在光镜下与 T 细胞难以区别;在电镜下 B 细胞的特点是在表面有较多微绒毛,胞质内可见少量粗面内质网,但很少见到溶酶体。B 细胞生存期一般较短,可存活数周或数月,也有寿命长达数年的。当 B 细胞受到抗原刺激后,增殖分化为大量浆细胞。浆细胞可合成和分泌抗体(免疫球蛋白),



抗体在血液中循环。通过抗体与抗原结合,可中和毒素,抑制细菌或靶细胞的代谢,溶解靶细胞,从而清除相应抗原并促进巨噬细胞吞噬抗原。

NK 细胞:自然杀伤细胞,由骨髓中淋巴干细胞分化而来,占血中淋巴细胞总数的 2%~5%,在人体内分布广泛,以外周血和脾、淋巴结中 NK 细胞活性最高。在中空器官的管壁固有层和一些实质性器官的间质中,均有 NK 细胞存在。在骨髓中 NK 细胞活性较低。NK 细胞是大淋巴细胞,平均直径为 12~15 μm ,胞质较多,在胞质内有许多大小不等的嗜天青颗粒,故又称大颗粒淋巴细胞,核呈卵圆形。在电镜下,胞质内的嗜天青颗粒是溶酶体,核内染色质丰富,异染色质多在边缘。在细胞表面有短小的微绒毛。NK 细胞不需抗原激活,更不需抗体的协助,它可直接杀伤靶细胞,例如杀伤被病毒感染的细胞和肿瘤细胞,NK 细胞的这种抗感染和抗肿瘤的杀伤作用是广谱的。

DC: 树突状细胞,是一类形状不规则的非单核吞噬系统细胞,特点是胞浆有许多长突起呈触须状,使整个细胞的形态像一个蜘蛛。树突状细胞分散于全身的上皮组织和实质性器官,其细胞数量不超过局部细胞总数的 1%;也可迁移到血液和淋巴,其数量不超过血液有核细胞总数的 0.1%。树突状细胞的吞噬能力较弱,但细胞表面积大,且有丰富的 MHC II 类分子,所以捕获抗原和递呈抗原的能力很强。

单核巨噬细胞:单核细胞发生于骨髓的多能干细胞,循环于血液中,穿透血管内皮进入组织内,转变为巨噬细胞。单核吞噬细胞系统在体内分布广,细胞数量多,主要分布于疏松结缔组织、肝、脾、淋巴结、骨髓、脑、肺以及腹膜等处,并依其所在组织的不同而有不同的名称。单核细胞一般为圆形,直径约 10~20 μm ;巨噬细胞大小不等,直径约 10~30 μm 或更大,常有伪足,呈多形性。单核巨噬细胞有肾形或马蹄形的核,胞浆中富含溶酶体及其他各种细胞器。

中性粒细胞:占白细胞总数的 50%~70%,是白细胞中数量最多的一种细胞。细胞呈球形,直径 10~12 μm ,核染色质呈团块状。核的形态多样,有的呈腊肠状,称杆状核;有的呈分叶状,叶间有细丝相连,称分叶核。细胞核一般为 2~5 叶,正常人以 2~3 叶者居多。中性粒细胞的胞质染成粉红色,含有许多细小的淡紫色及淡红色颗粒,颗粒可分为嗜天青颗粒和特殊颗粒两种。嗜天青颗粒较少,呈紫色,约占颗粒总数的 20%,光镜下着色略深,体积较大;电镜下呈圆形或椭圆形,直径 0.6~0.7 μm ,电子密度较高。它是一种溶酶体,含有酸性磷酸酶和过氧化物酶等,能消化分解吞噬的异物。特殊颗粒数量多,淡红色,约占颗粒总数的 80%,颗粒较小,直径 0.3~0.4 μm ,呈哑铃形或椭圆形,内含碱性磷酸酶、吞噬素、溶菌酶等。吞噬素具有杀菌作用,溶菌酶能溶解细菌表面的糖蛋白。中性粒细胞具有活跃的变形运动和吞噬功能。

嗜酸性粒细胞:占白细胞总数的 0.5%~3%。细胞呈球形,直径 10~15 μm ,核常为 2 叶,胞质内充满粗大(直径 0.5~1.0 μm)、均匀、略带折光性的嗜酸性颗粒,染成桔红色。电镜下,颗粒多呈椭圆形,有膜包被,内含颗粒状基质和方形或长方形晶体。颗粒含有酸性磷酸酶、芳基硫酸酯酶、过氧化物酶和组胺酶等,因此它也是一种溶酶体。嗜酸性粒细胞也能做变形运动,并具有趋化性。它能吞噬抗原抗体复合物,释放组胺酶灭活组胺,从



而减弱过敏反应。嗜酸性粒细胞还能借助抗体与某些寄生虫表面结合,释放颗粒内物质,杀灭寄生虫。故嗜酸性粒细胞具有抗过敏和抗寄生虫作用。

嗜碱性粒细胞:数量最少,占白细胞总数的0~15%。细胞呈球形,直径10~12 μm 。胞核分叶呈S形或不规则形,着色较浅。胞质内含有嗜碱性颗粒,大小不等,分布不均,染成蓝紫色,可覆盖在核上,颗粒具有异染性,甲苯胺蓝染色呈紫红色。电镜下,嗜碱性颗粒内充满细小微粒,呈均匀状或螺旋状分布。

红细胞与血小板:红细胞直径7~8.5 μm ,呈双凹圆盘状,中央较薄(1.0 μm),周缘较厚(2.0 μm),故在血涂片标本中呈中央染色较浅、周缘染色较深。在扫描电镜下,可清楚地显示红细胞的这种形态特点。血小板是骨髓中巨核细胞胞质脱落下来的小块,故无细胞核,表面有完整的细胞膜。血小板体积甚小,直径2~4 μm ,呈双凸扁盘状;当受到机械或化学刺激时,则伸出突起,呈不规则形。在血涂片中,血小板常呈多角形,聚集成群。血小板中央部分有蓝紫色的颗粒,称颗粒区;周边部呈均质浅蓝色,称透明区。电镜下,血小板的膜表面有糖衣,细胞内无核,但有小三管系、线粒体、微丝和微管等细胞器,以及血小板颗粒和糖原颗粒等。

三、小鼠血脑屏障观察

【原理及意义】

血脑屏障是机体的屏障结构的重要组成部分。血脑屏障主要由软脑膜、脉络丛、脑毛细血管和星状胶质细胞构成。该组织结构致密,病原菌及其它大分子物质不易通过,故能保护中枢神经系统。婴幼儿因血脑屏障尚未发育完善,故较易发生脑膜炎等中枢神经系统感染。

【材料】

1. 动物:昆明种小白鼠。
2. 试剂:5%的台盼蓝水溶液,无菌生理盐水。
3. 器材:眼科镊,眼科剪,剪刀。

【方法】

1. 将5%的台盼蓝水溶液经尾静脉分别注入两只小白鼠体内,每只0.7mL,其中一只颅内注射无菌生理盐水0.1mL。
2. 5~10分钟后观察小白鼠皮肤、眼、嘴等的颜色变化。
3. 于30~60分钟后,见小白鼠眼、嘴呈蓝色,即窒息死亡,腹部朝下固定。
4. 由头部到尾部沿背中线剪开皮肤,暴露皮下、肌肉和内脏,观察颜色变化。
5. 小心剖开颅骨椎管,暴露脑和脊髓,与皮下、肌肉和内脏相比,并比较两只小鼠有何不同。



实验二 吞噬细胞功能检测

体内具有吞噬功能的细胞群按其形态的大小分两类:一类为大吞噬细胞,即组织中的巨噬细胞和血液中的大单核细胞。它们对异物有吞噬和消化的功能,在机体非特异性免疫、特异性免疫和免疫调节中有重要的作用,因此,通过测定吞噬细胞的吞噬作用可判断机体的免疫力。另一类为小吞噬细胞,即中性粒细胞(neutrophilic granulocyte, neutrophil)。中性粒细胞的功能包括粘附、移动、吞噬杀菌等,是机体天然免疫力的重要组成部分。

一、中性粒细胞吞噬功能的测定

【原理及意义】

中性粒细胞对侵入机体的微生物及其它异物有吞噬和消化的功能,是机体天然免疫力的重要组成部分,在机体的非特异性免疫中起重要作用,它出现早,清理作用强,但寿命短。

【材料】

1. 试剂:白色葡萄球菌,肝素溶液,甲醇,碱性美蓝染液。
2. 器材:血红蛋白吸管,凹玻片,载玻片,1mL注射器及26号针头,采血针,酒精棉球等。

【方法】

1. 菌液的制备

将白色葡萄球菌接种于肉汤培养基中,放37℃温箱内培养12h左右;置100℃水浴中加热10min,杀死细菌,用无菌生理盐水稀释成每毫升 6×10^8 个细菌备用。

2. 试验方法

用血红蛋白吸管吸取受试者耳垂或指血40μL,立即加入盛有20μL肝素(浓度为20U/mL)的洁净凹玻片的凹孔内,轻轻搅动混匀,再加上葡萄球菌菌液20μL充分混匀。然后置入铺有湿纱布的有盖容器内(此容器先放37℃温箱中预温),在37℃温箱中作用30min,其间每隔10min摇匀一次。作用完毕,取1小滴混合液置于洁净无油污的载玻片一端,推成薄片。待干后,用甲醇固定4~5min,碱性美蓝液染2~3min,置油镜下观察。



第一篇 基础实验

随机计数 100 个中性粒细胞,分别记录发生吞噬和未吞噬的白细胞数,对有吞噬作用的白细胞,应同时记录所吞噬的细菌数。

3. 结果表示方法

(1)吞噬细胞(%):即 100 个中性粒细胞中吞噬有细菌的细胞数;

(2)吞噬指数:将 100 个中性粒细胞所吞噬的细菌总数除以 100,得到每个白细胞吞噬细菌的平均数,即为吞噬指数。

4. 临床应用

一般多用于病人治疗前后白细胞吞噬指数与百分率的动态变化,作为观察疗效和判断预后的参考指标。

【注意事项】

本法可清楚地观察到中性粒细胞的清理作用,但作为科研指标,客观性差,不宜采用。

二、中性粒细胞移动功能检测

【原理及意义】

中性粒细胞的运动可以分为随机运动和定向运动。前者类似于布朗运动,检测方法是采集的白细胞悬液滴于玻片上,用光学显微镜直接观察其运动。也可用毛细管法将细胞悬液装入硅化毛细管中,稍加离心,使细胞沉积在一端,切去无细胞的毛细管段,继而移放在含细胞培养液的培养小瓶中,37℃ 温育 18~20h,游动的细胞将从毛细管内外移,在管口形成一细胞团,根据细胞面积可判断受检中性粒细胞活动的强弱。某些患者中性粒细胞的任意运动明显减弱,甚至消失。中性粒细胞的定向运动表现为趋化运动,测定方法有多种,其原理相同,而方法大同小异,以下为体外试验法(琼脂糖平板法)。

【材料】

1. 试剂:琼脂糖,蒸馏水,Hanks 液,明胶,甲醇,酵母多糖,新鲜血清。
2. 器材:眼科镊,眼科剪,无菌盖玻片,微孔滤膜,显微测微器。

【方法】

1. 趋化因子的制备:取酵母多糖 500mg,加入 50mL Hanks 液中,煮沸 1h;2000r/min 离心 20min,弃上清。用 Hanks 液调整酵母多糖为 50mg/mL,4℃ 保存。用前取 1 份酵母多糖和 3 份新鲜血清混合;37℃ 搅拌反应 30min,离心弃上清,并用含 0.1% 明胶的 Hanks 液等体积稀释,将酵母多糖处理的血清作为趋化因子。还有大肠杆菌培养滤液、合成多肽 f-met-leupe(10⁻⁸mol/L, Sigma)等均可作为趋化因子。

2. 取 0.25g 琼脂糖,加 12.5mL 蒸馏水,沸水内加热溶化,冷至 47℃。

3. 取 Hanks 液 2mL,10% 明胶 25mL 和蒸馏水 8mL,混匀后加 7% 的 NaHCO₃ 2 滴,将此液与 47℃ 保温的琼脂糖混匀倒板。

4. 在琼脂糖板上打孔,孔径 3mm,孔间距 2~3mm。中央孔内加中性粒细胞悬液



10 μ L,左侧孔内加 10 μ L 趋化因子,右侧孔内加 10 μ L 对照液。将琼脂糖板放入湿盒内,于 37℃、5% CO₂ 条件下温育 4~8h。

5. 待孔中液体干后用甲醇固定 30min。琼脂糖膜用 Giemsa 染色,用显微测微器测量细胞从中央孔向左侧孔的移动距离 A 和向右侧孔的移动距离 B,趋化指数为 A/B。

三、巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

【材料】

1. 动物:昆明种小白鼠。
2. 试剂:1% 鸡血球,2% 面粉或淀粉肉汤,瑞特氏染液。
3. 器材:无菌注射器及针头,玻片。

【体内方法】

1. 于实验 24 小时前,在小鼠腹腔内注射 1mL 淀粉肉汤。
2. 次日重复注入淀粉肉汤 1mL,经过 1 小时后再给小鼠腹腔内注入 1% 鸡血球悬液 1mL。
3. 血球注射后 1 小时,用注射器抽取小鼠腹腔渗出液做涂片,自然干燥后,进行瑞氏染色(方法同前)。

4. 用油镜观察巨噬细胞浆内有无被吞噬的鸡红细胞,并进行计数。

5. 结果:

(1)吞噬百分率:油镜下观察 100 个巨噬细胞,计算吞噬百分率,以表示吞噬细胞的吞噬功能。正常值为 60% 左右。

(2)吞噬指数。按下列公式算出吞噬指数(即每个吞噬细胞吞噬鸡红细胞的平均数):
吞噬指数 = 100 个巨噬细胞中所吞噬的鸡红细胞总数 / 100

(3)吞噬鸡红细胞的等级观察:借以判定巨噬细胞吞噬和消化功能,Ⅰ级表示吞噬功能,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级表示消化功能强弱。

Ⅰ级:被吞噬的鸡红细胞完整,未消化,胞浆浅红或浅黄带绿色,胞核浅紫红色。

Ⅱ级:轻度消化,胞浆浅黄绿色,核固缩,染成紫蓝色。

Ⅲ级:重度消化,胞浆淡染,胞核呈浅灰黄色。

Ⅳ级:完全消化,巨噬细胞内仅见形态类似鸡红细胞大小的空泡,边缘整齐,胞核隐约可见。

【注意事项】

鸡红细胞呈橄榄球形,有清楚的细胞核,亦呈橄榄球形,染色后清晰可见,容易与小白鼠的红细胞相区别。本实验的观察指标是吞噬百分率、吞噬指数,这两个指标是主观指标,客观性差。



实验三 花环法测定 红细胞 CD35 分子

【原理及意义】

红细胞膜上 C3b 受体(CD35)可与补体致敏的酵母菌粘附形成花环(RBC - C3bR 花环);红细胞膜上粘附的 IC 中 C3b 分子可与未致敏的酵母菌粘附形成花环(RBC - IC 花环)。RBC - C3bR 和 RBC - IC 花环率可作为红细胞免疫粘附功能的指标,如二项指标都低下,判为原发性红细胞免疫功能低下,为红细胞膜 C3b 受体受到破坏和影响所致;如果 RBC - C3b 受体花环率降低,而 RBC - IC 花环率增高,为继发性红细胞免疫功能低下,是由于 CIC 增加,红细胞粘附 IC 过多引起的。此两项试验可作为临床上免疫性疾病的疗效及预后检测指标,亦可作为器官移植、疾病发病机理与药物筛选的红细胞免疫指标,以及用于中医中药作用的免疫学研究。

【材料】

1. 动物:昆明种小白鼠。
2. 试剂:肝素,生理盐水,酵母菌,0.25%戊二醛。
3. 器材:离心机,细胞计数板,二层定性滤纸,光学显微镜,试管,水浴箱,玻片。

【方法】

1. 制备待测红细胞悬液:将肝素抗凝的指血或静脉血用生理盐水洗涤离心 3 次,2000r/min 离心 3~5min,计数后配成 1.25×10^7 /mL 红细胞悬液备用。

2. 酵母菌培养:取酵母菌菌种接种于沙保培养基,28℃ 培养 24h 即可。

3. 制备补体致敏的酵母菌悬液:将酵母菌用生理盐水洗涤 3 次后,配成 1% 悬液,水浴内煮沸 20min,充分混匀。用二层定性滤纸(或 16 层纱布)过滤,除去小凝块,在低倍镜下呈单个酵母菌细胞分散状态,加等量小白鼠血清,混匀后置 37℃ 水浴致敏 15min。用生理盐水洗涤 1 次,2500r/min 离心 10min。去尽上清,用生理盐水重混悬。计数后配成 1×10^8 /mL 补体(C3)致敏的酵母菌悬液。

4. 取两支小试管,每管加待测红细胞悬液 100 μ L,第一管再加补体致敏酵母菌悬液 100 μ L,第二管加未致敏的酵母菌悬液 100 μ L,摇匀放 37℃ 水浴 30min;取出用手腕轻轻摇匀,加生理盐水 200 μ L;混匀后,再加 0.25% 戊二醛 75 μ L 轻轻混匀;分别取 1/3 量水平涂片,吹干,加甲醇固定;用瑞氏法染色,油镜下计数。



5. 红细胞上粘附 2 个或 2 个以上酵母菌者为花环。分别计数 200 个红细胞, 算出花环阳性细胞百分率。第一管为 RBC-C3b 受体花环率, 第二管为 RBC-IC 花环率。

【注意事项】

1. 酵母菌要分散不能自凝, 要充分吹打分散。
2. 水浴时防止红细胞破坏。
3. 细胞计数要准确, 红细胞与酵母菌比例要合适。



实验四 外周血单个核细胞的分离

【原理及意义】

人体 T、B、NK 淋巴细胞免疫功能的测定都需要外周血单个核细胞分离这一操作。外周血单个核细胞包括巨噬细胞、淋巴细胞。常用的分离方法有三种：低渗破碎法、红细胞沉降法和聚蔗糖-泛影葡胺分层液法。

聚蔗糖-泛影葡胺分层液(ficoll-isoaque, $D_2O = 1.077$)法：经过密度梯度离心后，可以得到纯度 90%~95% 的淋巴细胞，是目前临床实验室最常用的方法。此方法速度快、纯度好，适于临床和科研需要。其原理是根据血液中各种血细胞比重的不同进行分离：外周血中红细胞和粒细胞的相对密度(1.092 左右)大于单核细胞和淋巴细胞(1.075~1.092)，故在离心场中红细胞和粒细胞沉降速度大于淋巴细胞和单核细胞，离心后沉积于试管底部，而淋巴细胞和单核细胞则悬浮于和它相对密度相近的淋巴细胞分层液中，取分层液中的悬浮细胞即可得到淋巴细胞。

【材料】

1. 试剂：抗凝剂——肝素钠溶液，聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液(自己配制聚蔗糖-泛影葡胺分离液，见附录)，Hanks 液，1640 细胞培养液。

2. 器材：10mL 尖底离心管，10mL 圆底离心管，毛细吸管，血球计数板，载玻片，水平式离心机，显微镜等。

【方法】

1. 无菌抽静脉血 1mL 注入含有肝素钠溶液 0.1mL 的试管中。

2. 加 Hanks 液 1mL 将血液稀释一倍，混匀。

3. 取淋巴细胞分层液 2~3mL 加入离心管中。

4. 用毛细吸管吸取稀释血液，沿离心管壁轻轻加在分层液表面，注意勿冲破液面(如图甲)。

5. 用水平式离心机离心，2000rpm，20 分钟。离心后细胞分布如图乙所示：绝大部分单个核细胞悬浮于血浆与分离液之间的界面层，呈白色云雾状。