

医学基础实验系列教程

总主编 尤昭玲 李凡成 肖子曾

病原免疫学 实验教程

BINGYUAN MIANYIXUE
SHIYAN JIAOCHENG

主编 伍参荣



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

医学免疫学实验系列教材

第2版 主编 李成斌 副主编 王宇明

病原免疫学 实验教程

IMMUNOLOGICAL EXPERIMENTAL
TECHNIQUES

李成斌 主编 王宇明 副主编



人民卫生出版社
REHSENGHONG PUBLISHING

• 基础医学实验系列教程 •

病原免疫学实验教程

BINGYUAN MIANYIXUE SHIYAN JIAOCHENG

总主编 尤昭玲 李凡成 肖子曾

主 编 伍参荣

副主编 万红娇 卢芳国 胡建中

编 委 (以姓氏笔画为序)

万红娇 卢芳国 申可佳 朱应武

伍参荣 李 珊 胡建中 蔡 锐

谭周进



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

病原免疫学实验教程/伍参荣主编. —北京:人民军医出版社, 2010. 3
(基础医学实验系列教程)
ISBN 978-7-5091-3301-9

I. ①病… II. ①伍… III. ①病原微生物—实验—医学院校—教材②医药学:免疫学—实验—医学院校—教材 IV. ①R37-33②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 026052 号

策划编辑:杨磊石 文字编辑:王月红 责任审读:黄栩兵
出 版 人:齐学进
出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店
通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编:100036
质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283
邮购电话:(010)51927252
策划编辑电话:(010)51927292
网址:[www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

印、装:三河市春园印刷有限公司
开本:787mm×1092mm 1/16
印张:6.75 字数:147 千字
版、印次:2010 年 3 月第 1 版第 1 次印刷
印数:0001~3500
定价:20.00 元

版权所有 侵权必究
购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

内 容 提 要

本书系“基础医学实验系列教程”之一,由资深的医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学教师集体编写。作者根据这三门学科的教学大纲及相应的规划教材,结合病原微生物及免疫学实验教学的特点和实际需要,简述了实验教学的安全守则、目的要求和注意事项;详述了40个实验,包括每个实验的目的、原理、器材、操作步骤、结果分析和注意事项等。本书内容实用,阐述简明,注重加强医学生动手、动脑能力的培养,主要供高等中医院校和其他高等医学院校医学基础实验课教学之用。

编写说明

随着现代医学科学技术、教育科学技术的进步与发展,医学教学理念也发生了深刻变化。尤其在基础医学教学领域,不仅要求在教学过程中传授理论知识,更要求加强学生的动手能力训练,而且还要求教学方法、内容、手段的规范、先进,以适应时代的发展,满足高等医学院校招生规模迅速扩大的需求。

为此,我们根据近几年来基础医学教学实践与经验,并借鉴其他院校经验,编写了本套《基础医学实验系列教程》,包括《人体解剖学实验教程》《医学机能学实验教程》《医学显微形态学实验教程》《分子生物与生物化学实验教程》《病原免疫学实验教程》,主要供高等中医院校、高等医学院校医学基础实验课的教学之用。

由于编者水平及我校医学基础实验教学条件所限,本套教程的编写可能存在某些不足之处,恳请读者及有关教师批评指正。

尤昭玲 李凡成 肖子曾

2009年10月

前 言

医学免疫学、医学微生物学及人体寄生虫学,是医学基础、医学临床相互联系的重要学科。为此,我们在为上述学科单独开设基础实验的基础上,初步将这三门学科进行整合,围绕临床免疫性疾病、感染性疾病的病原学、免疫学检测,编写了这本《病原免疫学实验教程》,本教程系《基础医学实验系列教程》之一。

本教程的主要内容包括绪论、免疫学基础实验、病原生物学基础实验、综合性实验和设计性实验五大部分。以贯彻新时期教育方针,“培养具有综合素质创新型人才”为目的,通过实验培养学生的动手能力、分析能力和创新能力。

在编写过程中,尽管我们通力合作,努力使教程符合实验教学的要求,但由于编者水平有限,书中仍难免欠妥和错漏之处,欢迎读者不吝指正。

伍参荣

2009 年 10 月

目 录

第一章 绪论	(1)
一、病原生物实验室安全守则	(1)
二、病原生物实验室意外事故紧急处理办法	(1)
三、病原生物学与免疫学实验的目的和要求	(2)
四、实验室常用物品的准备与消毒灭菌	(2)
第二章 免疫学基础实验	(5)
第一节 免疫细胞的分离技术	(5)
实验 1 外周血单个核细胞的分离	(5)
实验 2 淋巴细胞的分离	(6)
实验 3 T 细胞、B 淋巴细胞的分离	(7)
第二节 免疫细胞数目的检测	(7)
实验 4 E-花环形成试验	(7)
实验 5 B 细胞膜表面免疫球蛋白的检测	(8)
第三节 免疫细胞功能的检测	(9)
实验 6 中性粒细胞吞噬功能检测	(9)
实验 7 巨噬细胞吞噬功能检测	(10)
实验 8 淋巴细胞转化试验(1)	(10)
实验 9 淋巴细胞转化试验(2)	(11)
实验 10 体外诱生白细胞介素-2 实验	(12)
第四节 抗原抗体反应	(12)
实验 11 凝集反应	(13)
实验 12 沉淀反应	(16)
实验 13 对流免疫电泳试验	(18)
实验 14 酶联免疫吸附实验	(19)
第五节 补体测定	(20)
实验 15 补体溶血试验	(20)
实验 16 血清总补体活性测定(CH_{50})	(20)
第六节 变态反应实验技术	(21)
实验 17 豚鼠血清过敏反应试验	(21)
实验 18 反向间接血凝法测定人血清 IgE	(22)

第三章 病原生物学基础实验	(25)
实验 1 显微镜的构造和使用方法	(25)
实验 2 细菌的形态观察	(27)
实验 3 细菌的人工培养法	(31)
实验 4 细菌生化鉴定法	(36)
实验 5 真菌形态和培养性状观察	(38)
实验 6 病毒的形态观察	(39)
实验 7 病毒的分离与培养	(39)
实验 8 寄生虫的虫卵形态观察	(44)
实验 9 环境、物体及人体体表的细菌培养及消毒灭菌	(45)
实验 10 中药体外抗菌试验	(47)
实验 11 中药体外抗真菌试验	(49)
第四章 综合性实验	(51)
第一节 脓标本和咽拭子的细菌检查	(51)
第二节 呼吸道感染常见病原生物的实验室检查	(54)
第三节 肠道感染常见病原生物的实验室检查	(61)
第四节 泌尿生殖道感染常见病原生物的实验室检查	(75)
第五节 皮肤创伤及血液感染常见病原生物的实验室检查	(78)
第六节 血吸虫感染小鼠及病理学观察和诊断方法	(81)
第七节 中药无菌检查及质控菌检测	(84)
第五章 设计性实验	(89)
实验 1 模拟感染性粪便标本的病原学诊断	(89)
实验 2 临床乙型肝炎病例设计实验诊断方法	(92)
实验 3 小鼠感染病原生物及其细胞免疫现象检查	(93)
实验 4 小鼠抗体形成细胞的检查	(96)

第一章 绪 论

一、病原生物实验室安全守则

《病原生物学与免疫学实验教程》包括医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学3个专业的实验教学内容。实验中所用标本大多含有活的病原生物,其中有些病原生物的传染性很强。为此,实验中必须严格树立“无菌观念”,严格遵守无菌技术操作规范,防止实验中发生自身感染和环境污染,全体师生共同遵守以下安全守则。

1. 进入实验室前必须穿好白大衣,离开时脱下并反折;必要时戴口罩、帽子。

2. 与实验无关物品不得放在实验操作台上;必要的学习用具可放入实验台抽屉内;实验指导应放置于远离操作的部位。

3. 实验室内严禁打闹喧哗、随便走动;禁止饮食、吸烟、咬笔杆、化妆、触摸隐形眼镜等。

4. 接触病原生物时,应严格按照无菌操作技术进行操作。

(1)接种环(针)在使用前、后均应烧灼灭菌,用后插在接种环架上,不得任意放在桌面上。

(2)含细菌培养物或体液的试管必须加盖、直立插在试管架上,不得任意横放于桌面上;非操作时不得任意打开盖子并将盖子随意放于桌面上;含菌培养皿一律倒置搁放于桌面上。

(3)实验用过的有菌器材等物品应放在指定的消毒容器内,不得随意放在桌面上或水槽内。

(4)若发生任何意外污染(如含菌试管或平皿被打破、菌液外溢等)应立即报告带教老师进行消毒灭菌处理。

5. 使用电炉、微型灭菌器和酒精灯要注意防火。不要把易燃物品(如纸、棉拭子等)包括电炉的电源线靠近热源附近。用电炉加热液体时不能离开,要防止液体溢出或烧干。电炉用后应立即切断电源,放到不易碰到之处冷却,避免接触烫伤。恒温水浴箱使用结束应关闭电源。

6. 酒精灯点燃前需将灯芯及塞子轻轻上提,排出灯内气体以防止火星爆出。酒精灯用后应及时盖上罩熄火。

7. 进行动物实验时,不得虐待动物。动物尸体应放在塑料袋中,集中放于指定地点按规定处理。

8. 爱护公物,节约使用实验材料;严格按照实验仪器的操作规则使用仪器。未经带教老师允许,不得擅自将实验室内物品携出。不慎损坏实验器材应立即报告带教老师。

9. 实验完毕需及时整理台面、清点回收物品。值日生打扫室内卫生、关闭不用的仪器、水、电、门、窗。

10. 全体同学实验结束离开实验室前应应用肥皂流水洗手后方可离开。

二、病原生物实验室意外事故 紧急处理办法

1. 菌液误入口 立即将误吸入口的菌液吐于消毒容器内,并用1:1 000高锰酸钾溶液或3%过氧化氢漱口;根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。

2. 手指沾有活菌 把沾有活菌的手指浸于0.1%苯扎溴铵液5min后用肥皂或流水清洗,或用2%碘酊涂抹后再用75%乙醇棉球涂抹。

3. 菌液污染环境 将适量5%煤酚皂

液、0.1%苯扎溴铵液或0.5%84消毒液倾于污染面上,覆盖30min后擦净。

4. 化学药品腐蚀伤 如不慎把酸、碱等化学药品溅到皮肤或眼睛上,应立即用大量清水冲洗。可用5%碳酸氢钠中和酸腐蚀;5%醋酸或5%硼酸中和碱腐蚀。

5. 酒精灯芯塞子爆出引起烧伤 轻伤如局部皮肤发红无破损可浸入冷水中镇痛,然后在局部涂抹凡士林。

6. 火警险情

(1)干烤箱温度过高时打开箱门可能引起箱内物品着火,此时应立即关闭箱门、切断电源或气源。

(2)乙醇、乙醚等有机溶剂起火应采用沙土或干粉灭火器灭火。使用灭火器时,先拔保险插销,然后压握手柄,将喷射筒对准燃烧物。

三、病原生物学与免疫学

实验的目的和要求

【教学目的】

1. 牢固树立无菌观念,掌握生物安全的基本知识和病原生物实验中的无菌操作技术。

2. 用光学显微镜识别常见病原生物的基本形态,掌握常用的涂片和染色技术。

3. 熟悉感染性疾病的常见病原生物种类及其检测方法;了解病原生物学和免疫学实验技术的新进展。

【实验要求】

1. 预习 实验课前应预习,明确本次实验课内容、理论依据及操作中的注意事项,尽量避免或减少实验失误。

2. 合理安排时间 依据不同实验的操作流程和所需时间,合理安排各项实验的操作顺序以提高效率。

3. 协作、独立思考 操作中同学之间要互相协作,并力求独立思考、勤于动手,做到善于发现问题、提出问题、分析讨论和解决问题。

题。

4. 实验报告 认真观察、真实记录实验结果,独立完成实验报告。实验报告内容包括实验名称、目的、材料、步骤流程、结果及其意义分析。如出现实验结果与理论不符,应分析其原因。

5. 实验绘图 实验课中有部分内容以观察形态标本为主,因此,绘图是实验基本技术之一,应重点掌握以下要领。

(1)绘图笔:实验前准备好铅笔和红、蓝、黄、绿、褐色等彩笔和绘图本,不得使用圆珠笔或钢笔。

(2)认真观察和分析病原生物的主要形态特点,并仔细、真实地做绘图记录。画面需整洁、字迹清楚。

(3)根据标本的特点选择下列绘图方法。

①铅笔点线图:铁苏木素染色和无色标本应选择铅笔点线图,用点和线勾画标本结构图,线要流畅,点要圆,可利用点的疏密表示病原生物的立体感(不用衬阴画法)。②彩图:除铁苏木素染色外,其他染色和有颜色的标本要求绘彩图,按所观察标本的实际颜色绘制。

(4)按标本大小比例绘图:构造复杂和体积较小的标本图可画大些,以展示其结构;构造简单和较大的标本可画小些,画清楚结构,以不影响标注为准。

四、实验室常用物品的准备与消毒灭菌

(一)常用实验物品的清洁方法

1. 玻璃器材 先用自来水冲洗后,用洗涤剂浸泡24h以上,再用自来水冲洗10次左右和去离子水冲洗3次,晾干后包装灭菌(注射用过的玻璃器材影响消毒灭菌,余同上。新玻璃器材先用自来水洗,再用0.5%碱水煮沸15min,余同上处理)。

2. 橡胶类制品 先用自来水冲洗,再用去离子水煮沸5min,取出晾干后包装灭菌。

3. 金属器械 先煮沸15min,取出后用自来水冲洗并擦干防锈(如果金属器械上带

有动物组织碎屑,先用 5% 苯酚洗去碎屑,余同上处理)。

4. 塑料及有机玻璃制品 使用后用 2%~3% 盐酸溶液浸泡过夜,用棉签蘸去污剂刷洗后用自来水冲洗干净后用去离子水冲洗 2~3 次,晾干备用(细胞培养板须用两层塑料袋包装密封后用 120 万 rad⁶⁰Co 照射后方能使用)。

(二)常用实验物品的包装方法

1. 平皿 用纸包装好,放入金属盒内。

2. 试管、锥形瓶 均用棉塞塞好,并用不透水的厚纸包扎于棉塞外。试管应直立扎成捆,避免灭菌时倾倒。

3. 吸管 吸口端塞入少许棉花(不可太松或太紧),然后每支分别用纸斜向从吸管端开始卷好,并在吸口端将包装纸打结,放入有盖的金属筒内。

4. 注射器 将内芯取出,与外套一起用纱布或用纸包好;针头装入垫有棉花的试管内,试管口用棉塞塞好。

(三)常用实验物品的灭菌方法

1. 上述包装好的清洁物品(塑料和有机玻璃物品除外),均可用高压蒸汽灭菌法灭菌。

2. 玻璃器皿也可用干烤法灭菌,温度 160℃ 2h。

3. 金属器械也可用煮沸法灭菌。临时急用可用乙醇烧灼灭菌,即将器械浸泡于 95% 的乙醇中,用时取出经酒精灯火焰,待器械上的乙醇自行燃烧完后即可使用(忌直接在火焰上烧灼或干烤)。

(四)常用灭菌器

1. 电热高压蒸汽灭菌器(Autoclver)

(1)工作原理:在高压蒸汽灭菌器两层金属桶之间加水,内桶放置待灭菌的物品,盖上金属盖。通电后在密闭的环境中水被加热变为蒸汽(蒸汽不能外溢),使灭菌器内的压力升高,温度也随之升高,从而达到消毒的目的。

(2)适用范围:用于耐高温、高压、潮湿的物品灭菌(如普通培养基、生理盐水、手术敷料、器械等),为最常用、效果最可靠的灭菌方法。通常灭菌压力为 103.43kPa (15 磅/cm²),温度 121.3℃,时间是 15~20min。

(3)操作流程:高压蒸汽灭菌器加水至规定水位,内桶置入待消毒物品,合盖并拧紧螺栓,加热(接通电源),当桶内压力为 33.78 kPa(5 磅/cm²)时排冷空气。压力表回“0”后关上排气阀,继续加热至灭菌所需的压力、温度、时间后断电、关机、冷却,当压力表指示回“0”时方可打开盖。

(4)注意事项:①消毒时高压锅内桶所置物品不应超过内桶的 2/3,以免妨碍蒸汽对物品的穿透。②应先排尽高压锅内的冷空气,方可继续加热,否则灭菌器内的实际温度达不到设定值影响灭菌效果。③灭菌完毕后严禁立即减压、排气、开盖。必须等压力表数值回“0”后才能开盖。④定期检查灭菌效果。常用硫黄粉(熔点 115℃)或苯甲酸(熔点 120℃)置于试管中放入灭菌器内一同灭菌,观察上述物质是否熔化,判断灭菌效果。

2. 电热恒温干燥箱(干烤箱, Hot Air Sterilizer)

(1)工作原理:电热恒温干燥箱是由电热器、温度控制器以及箱体构成。当电热器加热超过设定温度时,温度控制器就中断电路,加热自动停止;当温度低于设置温度时,电路接通自动加热。

(2)适用范围:实用于耐高温但不耐湿热的物品;湿热不易穿透的物品如油脂、液状石蜡、玻璃制品、瓷器等物品的灭菌。

(3)使用方法:将已经清洁、包装好的待灭菌的物品置烤箱内,闭门通电,设置所需温度与时间,开始加热。达到设定的温度和时间后断电。常用灭菌温度与时间为 150℃ 150min;160℃ 120min;170℃ 60min;180℃ 30min。

(4)注意事项:①灭菌温度不得超过

180℃,否则纸质包装物和棉花将被烧焦。②断电后必须使箱内温度下降至室温后方可开箱门,否则有引起箱内包装物以及棉花起火的危险。③为了保证消毒效果,箱内消毒物品不宜放置过多、过紧。

3. 滤菌器 滤菌器是由不同孔径的滤板或滤膜制成,滤孔的直径 0.45 μm 、0.22 μm 、0.1 μm 。

(1)工作原理:当待消毒液体通过滤菌器时,在正压(或负压)作用下细菌等微生物被阻隔在滤板或滤膜上,而达到除去液体中细菌的目的。

(2)滤菌器分类:按工作原理将滤菌器分为正压滤菌器和负压滤菌器。①负压滤菌器,常用的有赛氏滤菌器和玻质滤菌器。②正压滤菌器,即薄膜滤菌器(membrane filter)。目前常用的一次性针头滤菌器,可直接安装在注射器上使用。

(3)注意事项:①使用负压滤菌器前(赛氏滤菌器或玻质滤菌器)必须对其严格清洗(用毛刷蘸洗涤剂将滤菌器洗刷干净,并用自

来水冲洗后再用蒸馏水冲洗干净、晾干(赛氏滤菌器放置新滤膜),经高压灭菌方可使用。

②一次性针头滤菌器使用时不可回抽注射器。③除菌常用滤膜孔直径为 0.22 μm ,只能除去液体中的细菌,不能除去病毒、细菌 L 型、支原体、衣原体等病原体。

【思考与讨论】

1. 哪些实验器材可采用高压蒸汽灭菌?使用高压蒸汽灭菌器应注意哪些问题?

2. 哪些器材可使用干烤灭菌?干烤灭菌时应注意哪些问题?

3. 吸管的吸口端为什么要塞入少许棉花?

【附】

清洁液的配制

重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)100g、水 1 000ml、浓硫酸(粗)250ml。

先将重铬酸钾与水置塑料桶中搅拌溶化,置桶于冷水中,慢慢加入浓硫酸,并不断搅拌混匀,即成。此液可多次使用,至颜色变暗绿色即失去清洁能力,则不能再使用。

第二章 免疫学基础实验

免疫细胞系指参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞,包括淋巴细胞、单核吞噬细胞、抗原提呈细胞、粒细胞、红细胞、肥大细胞等。通过相关技术检测免疫细胞的数目及功

能对于了解机体的免疫状态、临床某些疾病的诊断、疗效观察及预后判断等有重要的参考价值。本章主要介绍几种常用的免疫细胞检测技术。

第一节 免疫细胞的分离技术

在体外测定免疫细胞的功能,首先要从外周血或淋巴样器官中分离免疫细胞。一般可依据它们的大小和密度、细胞黏附于各种物质表面的特性以及细胞表面的标志进行分

离。以获得所需要的单一的免疫活性细胞。本节的实验目的是让学生了解常用的免疫细胞分离技术。

实验1 外周血单个核细胞的分离

【实验原理】 本试验采用聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)混合液作为分层液,密度介于1.075~1.092。将血液离心后,不同密度的血细胞在分层液中呈梯次分布:红细胞和多核白细胞密度较大(1.092),位于最下层;而单个核细胞的密度为1.075~1.090,位于分层液的上方。

【实验材料】

1. 聚蔗糖-泛影葡胺分层液:有成品淋巴细胞分离液供应,密度为 1.077 ± 0.001 。

2. 台盼蓝染液:称取4g台盼蓝,于研钵中用少量双蒸馏水研磨,加双蒸馏水至100ml,1500r/min离心15min,吸取上层液,即为4%水溶液。使用前用1.8%氯化钠溶液稀释1倍,即为2%台盼蓝染液。

3. Hanks 或 RPMI-1640 液。

【操作步骤】

1. 采集静脉血若干毫升,注入盛有肝素的无菌小瓶中(每毫升全血用0.1ml 125~250U/ml 肝素溶液抗凝),加盖后立即轻轻摇匀,使血液抗凝。

2. 加入等体积的 Hanks 或磷酸缓冲液(PBS);使血液对倍稀释,可降低红细胞的凝聚。

3. 吸取淋巴细胞分层液(每10ml 稀释血加5ml 分层液)置于10ml 离心管中,然后将离心管倾斜45°,将稀释血液在距分层液界面上1cm处沿试管壁缓慢加至分层液上面(亦可将吸管嘴插入离心管底部,将分层液缓慢加在稀释血液的下面),应注意保持两者界面清晰,勿使血液混入分层液内。

4. 将离心管置水平式离心机内,在18~20℃下,2000r/min,离心20min。离心后,管内可分为4层。

5. 用毛细吸管沿管壁轻轻吸出灰白色的单个核细胞,移入另一支离心管中,或先吸去上层的血浆层、稀释液及血小板,再用一支毛细吸管仔细吸取单个核细胞,放入离心管中。

6. 将所得到的外周血单个核细胞悬液用5倍体积的 Hanks 液或 RPMI-1640 洗涤2次,依次以2000r/min、1500r/min 在室温下(18~25℃)离心10min,可去掉大部分混杂的血小板(图2-1)。

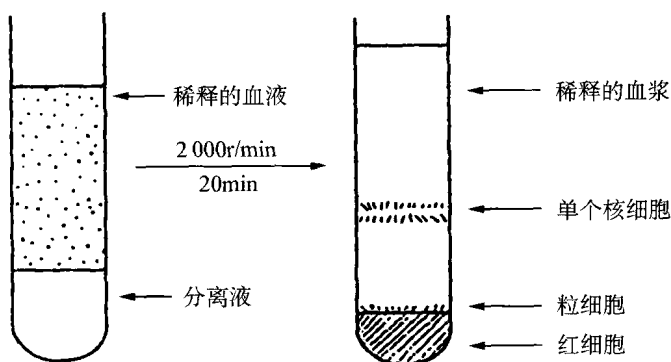


图 2-1 Ficoll-Hypaque 离心法分离血液细胞成分

7. 用完全 RPMI-1640 调节细胞悬液浓度,计数细胞后再调整细胞所需浓度。一般每毫升健康成人血可分离出 $(1 \times 10^6) \sim (2 \times 10^6)$ 个单个核细胞。

8. 用台盼蓝染液检查所分离的细胞活性:取 2 滴细胞悬液加 1 滴 2% 台盼蓝染液, 5~10min 取样做湿片高倍镜检。活细胞不着色,死细胞染成蓝色。计数 200 个细胞,计算活细胞百分率,一般活性应在 95% 以上。

【注意事项】

1. 细胞分层液的密度是影响分离效果的关键之一,最适密度在室温下应为 $(1.077 \pm 0.001) \text{g/L}$;避光 4°C 下保存,取出后逐渐升至室温后混匀,方可使用。

2. 若从未抗凝血中分离单个核细胞,可先用链激酶溶解血凝块,然后再按上述方法分离细胞。

3. 分离组织中的单个核细胞亦可采用上述方法。

实验 2 淋巴细胞的分离

【实验原理】单核细胞和多核白细胞具有黏附在塑料或玻璃表面及吞噬羟基铁粉等特性,而淋巴细胞则不能,由此可将其从悬液中分离出来。

【操作步骤】

1. 玻璃器皿吸附法

(1) 将分离的外周血单个核细胞(PB-MC)悬液 $(2 \times 10^6/\text{ml})$ 倾入玻璃平皿中,于 37°C 温箱内静置 30~40min,使单核细胞黏附于玻璃平皿上。

(2) 用毛细吸管轻轻吸取未黏附的细胞悬液,即为除去单核细胞的淋巴细胞悬液。此法也可制备纯单核细胞。

2. 玻璃纤维柱法

(1) 取抗凝血,倾入装有玻璃纤维的柱层中,置 37°C 温箱内 45min。

(2) 用经 37°C 温箱预温的 Hanks 液洗脱,收集洗脱下来的细胞。

(3) 将收集的细胞用聚蔗糖-泛影葡胺分层液离心分离淋巴细胞。用本法既可除去血小板,又可将单核细胞减至 2% 以下,但仍含有一定数量的粒细胞。

3. 磁铁吸引法

(1) 取 10ml 用 Hanks 液稀释 1 倍的抗凝血加入试管,再加 6% 右旋糖酐生理盐水溶液 3ml、1g 羟基铁和 3mm 大小的玻璃珠 10 粒,混匀后,置摇动台上 37°C 旋转摇动 10min。

(2)用磁铁在试管外将铁屑吸至管底,再将试管斜放 45°,经 37℃温箱预温 20min,吸取上清,即为除去单核细胞的淋巴细胞。

4. 羟基铁-乳胶分层液法

(1)将 5%右旋糖酐 4ml 与抗凝血 20ml 混匀,置室温下 30min 使红细胞沉降。

(2)移出富含白细胞的血浆层,将之与等

体积的 1%羟基铁 Hanks 液混合,并加 1 滴 0.6 μ m 大小的乳胶颗粒悬液。

(3)将试管放 37℃摇台上摇 1h,再将混合液用聚蔗糖-泛影葡胺分层液离心分离,吞噬铁末和乳胶的单核细胞比重较高,多沉于管底,所得淋巴细胞纯度可达到 94%~95%。

实验 3 T 细胞、B 淋巴细胞的分离(尼龙毛柱法)

【实验原理】 B 淋巴细胞和单核细胞具有易黏附于尼龙毛表面的特性,所以将淋巴细胞悬液通过尼龙毛柱流出的细胞均为 T 细胞。

【实验材料】

1. 尼龙毛(长 97.8mm,细度 3D 的尼龙-6 短纤维)、超净工作台、CO₂ 培养箱、水浴箱、离心机、注射器。

2. IMDM 培养液(含 100U/ml 庆大霉素,10%小牛血清),0.2NHCl 溶液。

【操作步骤】

1. 尼龙毛柱的制备

(1)将尼龙毛浸入 0.2NHCl 溶液中浸泡过夜,次日用双蒸馏水充分漂洗,然后用纱布将尼龙毛挤干,37℃干燥。

(2)称取尼龙毛 0.6g,仔细将尼龙毛撕开,梳整去掉乱结,使其疏松连结折叠以适应注射器容积,再填入 5ml 注射器内。

(3)分别包装,110℃高压灭菌 15min。

2. 细胞分离

(1)在超净工作台中,将经高压灭菌装填有尼龙毛的注射器固定于环形支架上,以培养液 20ml 清洗尼龙毛,同时以细玻璃棒搅

动去除柱内气泡,最后将尼龙毛压实至 4~6cm,封闭上、下口,置 37℃温箱内孵育 1h。

(2)取出孵育后的尼龙毛柱,用 5ml 37℃预温培养液淋洗尼龙毛一次。加入单个核细胞悬液 2ml,直至细胞悬液完全浸入柱内,封闭上、下端,置二氧化碳培养箱内 45~60min。

(3)用 37℃预温培养液 10ml,冲洗尼龙毛柱同时收集流出物并离心。用适量培养液悬浮,此即富含 T 细胞的细胞悬液。

(4)尼龙柱黏附细胞获取:复以 10ml 预温培养液冲洗该柱,流出物弃去,然后以 4℃培养液 10ml 冲洗,并以注射器活塞挤压尼龙毛,收集流出物,此即为尼龙毛黏附细胞。

(5)B 细胞获取:取经尼龙柱黏附细胞(一般含 B 细胞纯度不超过 60%),用补体依赖细胞毒的方法消除 T 细胞,即用抗 Thy-1 血清和补体,可完全消除 T 淋巴细胞。

(6)细胞鉴定:用非特异酯酶染色(ANAE)和分别用 T 细胞丝裂原或 B 细胞丝裂原(ConA, PHA)诱导淋巴细胞转化试验,检测 T 细胞、B 细胞后,用台盼蓝染色检测细胞活力。

第二节 免疫细胞数目的检测

实验 4 E-花环形成试验

【实验原理】 本实验是根据人 T 细胞表面有绵羊红细胞(CD 2)受体而设计的。

将人外周血淋巴细胞与绵羊红细胞按适当比例混合,绵羊红细胞可吸附于 T 细胞的表

面,形似花环,称花环试验。此法可用于 T 细胞数目的检测。

【材料】

1. 肝素抗凝剂(200U/ml 生理盐水溶液)。
2. 淋巴细胞分层液(Ficoll)2ml。
3. 绵羊红细胞(SRBC)。
4. 无 Ca^{2+} Mg^{2+} Hanks 液。
5. 姬姆萨-瑞特染液。
6. 小牛血清、试管、吸管、微量塑料管、离心机、显微镜。

【操作步骤】

1. 取肝素 0.1ml(20U),加外周血 2ml,用 Hanks 液稀释 1 倍后,分离淋巴细胞,用含 20%小牛血清的 Hanks 液配成 5×10^6 个细胞/ml 悬液。
2. 绵羊红细胞用生理盐水洗 3 次,再用含 20%小牛血清的 Hanks 液配成 1×10^8 个细胞/ml。

3. 取上述淋巴细胞悬液和红细胞悬液各 0.1ml 放小试管内混合,1 500r/min 离心沉淀 5min,放冰水中 1~2h(或置 4℃ 冰箱内过夜)。

4. 弃去大部分上层澄清液体,轻轻摇动试管将沉淀物悬浮,滴在载物片上,自然干燥,加姬姆萨-瑞特染液 1 滴,加盖片,显微镜下计数 E 花环阳性细胞率。

【结果】 凡淋巴细胞周围黏附 3 个以上绵羊红细胞,即为花环阳性细胞。计数 200 个淋巴细胞,算出其中花环阳性细胞百分数,一般正常值为 60%~70%。

【注意事项】

1. 应采用新鲜绵羊红细胞,一般采血后保存在 Alsever 液中,2 周内可用。超过 2 周与淋巴细胞结合能力下降。
2. 计数前应将沉于管底的细胞重悬,但不能强力吹打,只能轻轻旋转试管,使细胞团块松开,否则花环会消失或减少。

实验 5 B 细胞膜表面免疫球蛋白的检测

【实验目的】 掌握间接免疫荧光技术的原理,熟悉荧光显微镜的操作使用和间接荧光抗体检测法的技术程序,了解 FITC-SPA 菌体法及临床意义。

【实验原理】 B 淋巴细胞的表面带有 Smlg。葡萄球菌 A 蛋白(SPA)能够与许多哺乳动物 IgG 的 Fc 段发生非特异性结合,同样也能够与 B 淋巴细胞膜表面的 Ig 非特异性的结合。由此可用荧光标记的 SPA 菌体(FITC-SPA)替代荧光标记的抗 IgG,以检测 SmlgG 阳性的 B 细胞。凡与 FITC-SPA 结合的细胞,在荧光显微镜下可见到细胞表面和周围布满许多呈黄绿色荧光的菌体。

【实验材料】

1. 冻干 FITC-SPA 菌体,使用时按说明书要求稀释。
2. Hanks 液 pH 为 7.2~7.4,含 0.1% NaN_3 。

3. 淋巴细胞分层液,密度为 1.077。
4. 荧光显微镜。
5. 试管、滴管、载玻片等。

【操作步骤】

1. 取肝素抗凝血 2ml,加等量 Hanks 液稀释,加入预先放有 2~3ml 淋巴细胞分层液的试管中(勿与分层液混合)于水平离心机,以 2 000r/min 离心 20min,用吸管仔细吸出中间层淋巴细胞,用 Hanks 液洗涤两次(1 000r/min,离心 10min),最终配成细胞数为 $(2 \times 10^6) \sim (5 \times 10^6)$ /ml 淋巴细胞悬液,分装入试管中(每管 50~100 μ l)。

2. 将淋巴细胞悬液与等量 FITC-SPA 菌体悬液混合均匀,在 4℃ 下放置 30min,用 Hanks 洗涤 2~3 次后,取沉淀细胞滴加于载玻片上,覆以盖玻片,镜检。

【结果判定】 SPA 菌体法以淋巴细胞表面黏附 5 个以上菌体判定为 Smlg 阳性细