


全国高等中医药院校配套教材

供中医学（含骨伤方向）、针灸推拿学、中西医临床医学等专业用

免疫学基础与病原生物学实验

主编 罗 晶 关洪全

 人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

教育部高等学校生物类专业教学指导委员会推荐教材

细胞生物学基础与细胞生物学实验

第二版

人民卫生出版社

全国高等中医药院校配套教材
供中医学(含骨伤方向)、针灸推拿学、
中西医临床医学等专业用

免疫学基础与 病原生物学实验

主 编 罗 晶 关洪全

副主编 卢芳国 万红娇

编 者 (以姓氏笔画为序)

丁剑冰 (新疆医科大学)	万红娇 (江西中医学院)
马 萍 (成都中医药大学)	马彦平 (山西中医学院)
卢芳国 (湖南中医药大学)	邝枣园 (广州中医药大学)
边育红 (天津中医药大学)	刘文泰 (河北医科大学)
关洪全 (辽宁中医药大学)	江 华 (河南中医学院)
汤冬生 (安徽中医学院)	苏 韫 (甘肃中医学院)
张学敏 (福建中医药大学)	罗 晶 (长春中医药大学)
周 宏 (长春中医药大学)	郝 钰 (北京中医药大学)
席孝贤 (陕西中医学院)	梁裕芬 (广西中医药大学)
韩晓伟 (辽宁中医药大学)	詹 臻 (南京中医药大学)
颜培宇 (黑龙江中医药大学)	

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

免疫学基础与病原生物学实验/罗晶等主编.
—北京:人民卫生出版社,2012.6
ISBN 978-7-117-15936-4

I. ①免… II. ①罗… III. ①免疫学-实验-
医学院校-教材②病原微生物-实验-医学院校-教材
IV. ①R392-33②R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 098421 号

门户网: www.pmph.com 出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com 护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有,侵权必究!

免疫学基础与病原生物学实验

主 编: 罗 晶 等
出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)
地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号
邮 编: 100021
E - mail: pmph@pmph.com
购书热线: 010-67605754 010-65264830
010-59787586 010-59787592
印 刷: 北京市后沙峪印刷厂
经 销: 新华书店
开 本: 787×1092 1/16 印张: 6
字 数: 127 千字
版 次: 2012 年 6 月第 1 版 2012 年 6 月第 1 版第 1 次印刷
标准书号: ISBN 978-7-117-15936-4/R·15937
定 价: 13.00 元
打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com
(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

出版说明

在国家大力推进医药卫生体制改革,发展中医药事业和高等中医药教育教学改革的新形势下,为了更好地贯彻落实《国家中长期教育改革和发展规划纲要(2010—2020年)》和《医药卫生中长期人才发展规划(2011—2020年)》,培养传承中医药文明、创新中医药事业的复合型、创新型高等中医药专业人才,根据《教育部关于“十二五”普通高等教育本科教材建设的若干意见》,全国高等医药教材建设研究会、人民卫生出版社在教育部、卫生部、国家中医药管理局的领导下,全面组织和规划了全国高等中医药院校卫生部“十二五”规划教材的编写和修订工作。

为做好本轮教材的出版工作,在教育部高等学校中医学教学指导委员会和原全国高等中医药教材建设顾问委员会的大力支持下,全国高等医药教材建设研究会、人民卫生出版社成立了第二届全国高等中医药教育教材建设指导委员会和各专业教材评审委员会,以指导和组织教材的编写和评审工作,确保教材编写质量;在充分调研的基础上,先后召开数十次会议对目前我国高等中医药教育专业设置、课程设置、教材建设等进行了全方位的研讨和论证,并广泛听取了一线教师对教材的使用及编写意见,汲取以往教材建设的成功经验,分析历版教材存在的问题,并引以为鉴,力求在新版教材中有所创新,有所突破,藉以促进中医药教育教学发展。

根据高等中医药教育教学改革和高等中医药人才培养目标,在上述工作的基础上,全国高等医药教材建设研究会和人民卫生出版社规划、确定了全国高等中医药院校中医学(含骨伤方向)、中药学、针灸推拿学、中西医临床医学、护理学、康复治疗学7个专业(方向)133种卫生部“十二五”规划教材。教材主编、副主编和编者的遴选按照公开、公平、公正的原则,在全国74所高等院校2600余位专家和学者申报的基础上,近2000位申报者经全国高等中医药教育教材建设指导委员会、各专业教材评审委员会审定和全国高等医药教材建设研究会批准,被聘任为主审、主编、副主编、编委。

全国高等中医药院校卫生部“十二五”规划教材旨在构建具有中国特色的教材建设模式、运行机制,打造具有中国特色的中医药高等教育人才培养体系和质量保障体系;传承、创新、弘扬中医药特色优势,推进中医药事业发展;汲取中医药教育发展成果,体现中医药新进展、新方法、新趋势,适应新时期中医药教育的需要;立足于成为我国高等中医药教育的“核心教材、骨干教材、本底教材”和具有国际影响力的中医药学教材。

全套教材具有以下特色:

1. 坚持中医药教育发展方向,体现中医药教育教学基本规律

注重教学研究和课程体系研究,以适应我国高等中医药学教育的快速发展,满足21世纪对高素质中医药专业人才的基本要求作为教材建设的指导思想;顶层设计和具体方案的实施严格遵循我国国情和高等教育的教学规律、人才成长规律和中医药知识的传承规律,突出中医药特色,正确处理好中西医之间的关系。

2. 强化精品意识,体现中医药学学科发展与教改成果

全程全员坚持质量控制体系,把打造精品教材作为崇高的历史使命和历史责任,以科学严谨的治学精神,严把各个环节质量关,力保教材的精品属性;对课程体系进行科学设计,整体优化,基础学科与专业学科紧密衔接,主干学科与其他学科合理配置,应用研究与开发研究相互渗透,体现新时期中医药教育改革成果,满足 21 世纪复合型人才培养的需要。

3. 坚持“三基五性三特定”的原则,使知识点、创新点、执业点有机结合

将复合型、创新型高等中医药人才必需的基本知识、基本理论、基本技能作为教材建设的主体框架,将体现高等中医药教育教学所需的思想性、科学性、先进性、启发性、适用性作为教材建设的灵魂,将满足实现人才培养的特定学制、特定专业方向、特定对象作为教材建设的根本出发点和归宿,使“三基五性三特定”有机融合,相互渗透,贯穿教材编写始终。以基本知识点作为主体内容,适度增加新进展、新技术、新方法,并与卫生部门和劳动部门的资格认证或职业技能鉴定标准紧密衔接,避免理论与实践脱节、教学与临床脱节。

4. 突出实用性,注重实践技能的培养

增设实训内容及相关栏目,注重基本技能和临床实践能力的培养,适当增加实践教学学时数,并编写配套的实践技能(实训)教材,增强学生综合运用所学知识的能力和动手能力,体现医学生早临床、多临床、反复临床的特点。

5. 创新教材编写形式和出版形式

(1) 为了解决调研过程中教材编写形式存在的问题,除保障教材主体内容外,本套教材另设有“学习目的”和“学习要点”、“知识链接”、“知识拓展”、“病案分析(案例分析)”、“学习小结”、“复习思考题(计算题)”等模块,以增强学生学习的目的性和主动性及教材的可读性,强化知识的应用和实践技能的培养,提高学生分析问题、解决问题的能力。

(2) 本套教材注重数字多媒体技术,相关教材增加配套的课件光盘、病案(案例)讲授录像、手法演示等;陆续开放相关课程的网络资源等,以最为直观、形象的教学手段体现教材主体内容,提高学生学习效果。

本套教材的编写,教育部、卫生部、国家中医药管理局有关领导和教育部高等学校中医学教学指导委员会、中药学教学指导委员会相关专家给予了大力支持和指导,得到了全国近百所院校和部分医院、科研机构领导、专家和教师的积极支持和参与,谨此,向有关单位和个人表示衷心的感谢!希望本套教材能够对全国高等中医药人才的培养和教育教学改革产生积极的推动作用,同时希望各高等院校在教学使用中以及在探索课程体系、课程标准和教材建设与改革的进程中,及时提出宝贵意见或建议,以便不断修订和完善,更好地满足中医药事业发展和中医药教育教学的需要。

全国高等医药教材建设研究会
第二届全国高等中医药教育教材建设指导委员会
人民卫生出版社

2012年5月

实验目的及实验室规则

一、实验目的

1. 加深对原有理论知识的理解,获得和发现更多的新理论、新知识。
2. 培养学生观察、思考、分析、解决问题的能力以及动手操作能力。
3. 培养学生严肃的工作态度,严密的科学实验方法和严谨的工作作风。
4. 让学生掌握本学科实验方法和基本操作技术。

二、实验室规则

在医学免疫学及病原生物学实验中,经常会接触到具有传染性的材料,如果在实验中稍有不慎,就有发生感染的危险,同时实验结果也容易受环境因素影响。因此,要求同学们严格遵守实验室规则,以保证安全并得到正确的实验结果。

1. 进入实验室必须穿工作服,非实验课相关物品不可携入室内。
2. 实验室内禁止吸烟、饮食。
3. 认真按操作规程进行。对用过的带有传染性的物品应按要求进行严格的灭菌消毒处理,不得乱扔乱放。
4. 实验过程中如发生意外,应立即报告老师处理。如传染性材料污染地面,可用3%来苏水消毒30分钟;污染手部应把手浸入2%来苏水中浸泡5~10分钟。
5. 在实验过程中,要保持室内安静,要爱护实验器材,节约实验材料,如有破损应报告老师,进行登记和听候处理。
6. 实验结束后,要清理桌面及环境。将用过的实验器材按要求处理后放回原处或指定地点,室内物品未经允许不得带出室外。
7. 值日生要按规定做好实验室相关记录,在实验教师指导下进行安全检查(水、电、煤气及门窗是否关好),清理卫生。
8. 学生实验课结束需用2%来苏水洗手后方可离开实验室。

目 录

第一篇 医学免疫学实验

第一章 抗原抗体检测	1
一、凝集试验	1
实验 1 直接凝集试验	1
实验 2 间接凝集试验	3
实验 3 间接凝集抑制试验	4
二、沉淀试验	4
实验 4 单向琼脂扩散试验	5
实验 5 双向琼脂扩散试验	6
实验 6 对流免疫电泳试验	6
实验 7 火箭免疫电泳试验	7
三、免疫酶技术	8
实验 8 酶联免疫吸附试验(直接法)	8
实验 9 酶联免疫吸附试验(间接法)	9
实验 10 酶联免疫吸附试验(夹心法)	10
四、补体测定	12
实验 11 补体介导的溶血试验	12
第二章 免疫细胞检测技术	14
一、免疫细胞的分离	14
实验 12 外周血单个核细胞的分离(密度梯度离心法)	14
实验 13 T、B 淋巴细胞的分离(尼龙毛柱法)	15
二、免疫细胞数量检测	17
实验 14 E-花环形成试验	17
三、免疫细胞功能的检测	18
实验 15 中性粒细胞吞噬功能检测(硝基蓝四氮唑还原能力测定法)	18
实验 16 巨噬细胞吞噬功能检测	19
实验 17 淋巴细胞转化试验(MTT法)	20
实验 18 淋巴细胞转化试验(³ H-TdR 标记法)	21
实验 19 细胞毒性 T 细胞杀伤功能测定(LDH 释放法)	22

第二篇 医学微生物学实验

第三章 微生物学基本技能实验	25
一、微生物学实验室常用仪器设备	25
实验 1 微生物学实验消毒灭菌仪器设备	25
实验 2 光学显微镜油镜的使用	29
二、细菌形态学检测	31
实验 3 细菌的基本形态、特殊结构观察	31
实验 4 细菌的形态学检查(革兰染色法)	32
实验 5 细菌动力检查	33
三、细菌的人工培养	34
实验 6 制备常用培养基	34
实验 7 细菌培养技术	35
附:厌氧培养及二氧化碳培养技术	39
实验 8 细菌生长现象观察	40
四、细菌对药物敏感性试验	41
实验 9 细菌对抗生素敏感性试验(纸片法)	41
实验 10 细菌对中草药的敏感性试验(打孔法)	42
实验 11 细菌对中草药的敏感性试验(试管法)	43
实验 12 紫外线杀菌试验	44
第四章 病原微生物学实验	46
一、病原微生物的形态检测	46
实验 13 病原性球菌的形态及培养物观察	46
实验 14 肠道杆菌的形态及培养物观察	47
实验 15 其他病原微生物的形态观察	48
实验 16 结核分枝杆菌抗酸染色法	49
二、病原微生物的其他检测方法	50
实验 17 血浆凝固酶试验	50
实验 18 抗链球菌溶血素“O”试验(胶乳凝集法)	51
实验 19 肥达试验	52
实验 20 病毒鸡胚培养法	53
实验 21 流感病毒的血细胞凝集试验	55
实验 22 致病真菌形态及培养物观察	56
三、综合性实验——粪便标本中肠道杆菌的分离鉴定	57

第三篇 医学寄生虫学实验

第五章 寄生虫病原学诊断技术·····	63
一、粪便检查·····	63
二、血液检查·····	68
三、排泄物与分泌物检查·····	70
四、活组织检查·····	71
第六章 医学寄生虫学实验·····	73
实验1 医学线虫·····	73
实验2 医学吸虫·····	75
实验3 医学绦虫·····	76
实验4 医学原虫·····	77
实验5 医学节肢动物·····	79

第一篇 医学免疫学实验

第一章 抗原抗体检测

通过实验,了解抗原与相应抗体可以在体内外发生特异性结合的特性,掌握应用抗原抗体反应进行免疫学检测的临床意义。

一、凝集试验

颗粒性抗原,如病原微生物或红细胞等,与相应抗体能在体外发生特异性结合,当两者比例合适并在电解质存在时,可形成肉眼可见的凝集块,这种现象称为凝集反应。检测方法有直接凝集试验和间接凝集试验。

实验1 直接凝集试验

直接凝集试验有玻片法凝集试验和试管法凝集试验两种方法。是取已知的诊断血清(含抗体)与待测样品中的颗粒性抗原物质(如细菌、钩端螺旋体、红细胞等)结合,出现肉眼可见的凝集物,即为阳性;无凝集物出现,即为阴性。以大肠埃希菌为例,介绍直接凝集试验方法。

【实验目的】

了解直接凝集试验的主要方法、操作过程和临床意义。

【实验内容】

玻片法凝集试验和试管法凝集试验方法。

(一) 玻片法凝集试验

【实验材料】

1. 菌液 大肠埃希菌 18~24 小时斜面培养物。
2. 诊断血清 1:20 稀释的大肠埃希菌多价免疫血清。
3. 其他材料 载玻片、生理盐水、接种环、酒精灯等。

【实验步骤】

1. 取清洁玻片 1 张,用记号笔分别在玻片上划 2 个直径约 1.5cm 左右的圆圈,标号为 1、2。用滴管在 1 号圈内加生理盐水 2 滴,2 号圈内加大肠埃希菌免疫血清 2 滴。
2. 用灭菌后的接种环取少许大肠埃希菌培养物分别加入第 1、2 圈内的生理盐水及大肠埃希菌免疫血清内混合成均匀的悬液。

【实验结果】

玻片静置数分钟后观察结果。如上述混合悬液由均匀混浊状变为澄清透明,并出现大小不等的乳白色凝集块者即为阳性(+);如混合物仍呈均匀混浊状则为阴性(-);如肉眼观察不够清楚(图 1-1A),可将玻片置于显微镜下用低倍镜观察(图 1-1B)。

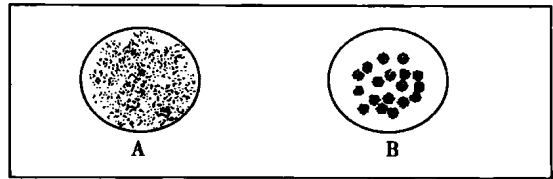


图 1-1 玻片法凝集试验示意图

(二) 试管法凝集试验

【实验材料】

1. 菌液 大肠埃希菌培养物制备的菌悬液。
2. 诊断血清 大肠埃希菌免疫血清,经 56℃ 30 分钟灭活(破坏补体)。
3. 其他材料 小试管、试管架、生理盐水等。

【实验步骤】

1. 取小试管 8 支,编号,分列在试管架上。
2. 用吸管取生理盐水,第 1 管加 0.9ml,其他管各加 0.5ml。
3. 吸取大肠埃希菌免疫血清 0.1ml 加入第 1 管中,吹吸 3 次充分混匀,此管血清稀释度为 1:10。从第 1 管中吸出 0.5ml 加入第 2 管中,吹吸混匀,吸出 0.5ml 加入第 3 管中,同法依次稀释至第 7 管。从第 7 管吸出 0.5ml 弃之。第 8 管不加血清作为阴性对照管。
4. 吸取大肠埃希菌菌液每管加入 0.5ml,加入菌液后血清稀释度从第 1 管开始分别为 1:20、1:40……1:1280。
5. 将试管内液体振荡混匀后,置 37℃ 温箱过夜,方法见表 1-1。

表 1-1 试管法凝集试验操作和结果举例

(单位:ml)

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8
生理盐水	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗体(血清)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	弃
抗原(菌液)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	-
37℃ 温箱过夜								
结果举例	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-

血清凝集效价(血清中抗体滴度)为 1:320

【实验结果】

1. 对照管 应无凝集现象,液体均匀混浊,部分细菌沉积于管底,形成白色小圆形沉积物。
2. 观察 1~7 试验管,液体的混浊度,管底的凝块。根据这两种现象确定凝集的程度并记录。

++++ 完全凝集,上层液体澄清透明,管底有边缘不整的白色凝块。

+++ 大部分凝集,上层液体微微混浊,管底有边缘不整的白色凝块。

- ++ 半数凝集,上层液体中等混浊,管底有大而薄的伞状白色凝块。
 - + 少量凝集,上层液体混浊,管底有少量凝块,管底有圆形沉积物。
 - 不凝集,菌液混浊,部分细菌沉积于管底形成圆形沉积物,与对照管现象相同。
3. 判定血清凝集效价(又称滴度),血清凝集效价是指能发生 ++ 凝集现象的最高血清稀释度。

【实验报告】

将所观察的图像和结果描绘和记录下来,并分析结果。

【实验思考】

玻片法与试管法有何不同,凝集试验有何临床意义?

实验 2 间接凝集试验

将已知的可溶性抗原吸附或偶联在与免疫无关的颗粒性物质(载体颗粒,如:人 O 型血红细胞、绵羊红细胞、聚苯乙烯乳胶、活性炭等)表面,然后再与相应抗体混合,并在有适当电解质存在的条件下,由抗原抗体的特异性结合而发生肉眼可见的特异性凝集现象,即为间接凝集试验。该试验可用于细菌、病毒、钩端螺旋体、梅毒螺旋体等抗体,以及某些自身抗体的检测。

【实验材料】

1. 试剂 已知可溶性抗原致敏的 0.5% 绵羊红细胞悬液,制备方法为取一定稀释度的可溶性抗原,加等量的 2% 绵羊红血细胞悬液,混合后置 37℃ 水浴箱中,每隔 15 分钟取出振摇一次,2 小时后取出,用生理盐水洗涤 3 次,每次离心 1000r/min,5 分钟。取压积的绵羊红细胞 0.5ml 加生理盐水至 100ml,即配成 0.5% 的致敏绵羊红细胞悬液。
2. 待测样品 抗血清。
3. 器皿 V 型微量血凝板,微量加样器。

【实验方法】

1. 用微量加样器,在微量血凝板上每孔加 250μl 生理盐水。
2. 将受检血清 25μl 加入第 1 孔,倍比稀释至第 9 孔(1:512),第 10 孔为空白对照孔。
3. 各孔加 0.5% 抗原致敏的绵羊红细胞悬液 25μl,放微型振荡器上振荡 1 分钟,置室温 22℃ 1~2 小时,方法见表 1-2。

表 1-2 间接凝集试验操作和结果举例 (单位:ml)

孔 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
生理盐水	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
受检(血清)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	弃	-
5% 致敏羊红 细胞	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
血清稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	-
22℃ 1~2 小时										
结果举例	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-

【实验结果】

红细胞不凝集,则沉积于孔底,集中呈一圆点状;如红细胞凝集,则形成片层凝集。根据红细胞凝集程度的强弱,可分为以下级别:

++++ 红细胞形成片层凝集,均匀布满孔底或凝集边缘皱缩如花边状。

+++ 红细胞形成片层凝集,面积略小于++++。

++ 红细胞形成片层凝集,面积较小,边缘较松散。

+ 红细胞沉积于孔底,周围有散在的少量凝集。

- 红细胞沉积于孔底,呈小圆盘点状,边缘清晰整齐。以 ++ 凝集的孔为滴度终点,此孔血清的稀释倍数即为受检血清的抗体效价。

实验3 间接凝集抑制试验

将可溶性抗原先与相应抗体混合,再加入吸附有相同抗原的载体颗粒(致敏载体颗粒),由于抗体已与可溶性抗原结合,故不能再与致敏载体颗粒发生间接凝集反应,称此方法为间接凝集抑制试验。用该试验检测待查标本时,不发生凝集者为阳性,凝集者为阴性。如临床常用的免疫妊娠试验即为此类型的试验。

【实验材料】

1. 抗原 吸附有人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)的胶乳颗粒。

2. 抗体 人绒毛膜促性腺激素免疫血清。

3. 待测样品 可疑孕妇尿液。

4. 器皿 玻璃反应板(玻璃背面涂以黑漆,正面用红漆分成 2.5cm × 2.5cm 的方格)、毛细吸管等。

【实验步骤】

1. 用毛细吸管滴加 1 滴被检材料于玻璃反应板的一个方格内,再加 1 滴生理盐水于另一个方格内作为对照。

2. 各加免疫血清 1 滴,轻轻摇动,充分混匀。

3. 再加 1 滴致敏胶乳颗粒,缓缓摇动 3~5 分钟,在较强光线下观察结果。

【实验结果】

出现均匀一致的细小凝集颗粒者为阴性反应,说明待检尿液中无 HCG。仍为乳状液体者为阳性反应,说明待检尿液中有 HCG。

二、沉淀试验

可溶性抗原(如血清、毒素等)与相应抗体结合,在比例适宜且有电解质存在的条件下,形成肉眼可见的沉淀物,称为沉淀反应。

【实验目的】

了解沉淀试验的主要方法、操作过程和临床意义。

【实验内容】

单向琼脂扩散试验、双向琼脂扩散试验的实验方法。

实验4 单向琼脂扩散试验

将特异性抗体混合于琼脂中,制成含抗体的琼脂板,打孔,将一定量的可溶性抗原加入孔中。抗原向四周自由扩散,如抗原与已知的抗体相对应,在比例适合处即出现白色沉淀环,其直径的大小与抗原浓度成正比(图 1-2)。以不同浓度的标准抗原与固定浓度的抗血清反应后测得沉淀环的直径作为纵坐标,以抗原浓度为横坐标绘制标准曲线,待测抗原可在标准曲线中查找其含量。单向琼脂扩散为定量试验,用于测定血清 IgG、IgM、IgA 和补体以及甲胎蛋白等的含量。



图 1-2 单向琼脂扩散试验示意图

【实验材料】

1. 抗原 标准人 IgG、待测血清。
2. 抗体 抗人 IgG 免疫血清。
3. 3% 琼脂 用生理盐水配制,置 60℃ 水浴中保温。
4. 器皿 载玻片、直径 3mm 打孔器、微量加样器等。

【实验步骤】

1. 稀释抗血清 如抗血清单向扩散效价为 1:120,则将 1ml 抗血清加入 119ml 3% 溶化的琼脂中,充分混匀。
2. 铺板 将溶化的琼脂浇注在载玻片(厚 2mm)上,平置冷却备用。
3. 稀释标准抗原(人 IgG) 每支冻干人 IgG 中加入蒸馏水 0.5ml,待完全溶解后,用生理盐水稀释成 100、75、50、25 μ g/ml 四个不同稀释度。
4. 待测血清 用生理盐水 1:40 稀释。
5. 打孔 用打孔器在琼脂板上打孔,孔径 3mm,孔间距 15mm,用针头挑出孔中琼脂。
6. 加样 每孔加样 10 μ l,前 4 孔加标准人 IgG,余孔加待测血清。
7. 反应 将加样的琼脂板平放在湿盒中,置 37℃ 24~48 小时后,观察结果。

【实验结果】

1. 用标尺测乳白色沉淀环直径并记录。

2. 标准曲线的绘制 以标准抗原的沉淀环直径为纵坐标,相应孔中 IgG 浓度为横坐标,在半对数纸上,绘制标准曲线(图 1-3)。

3. 待测标本 Ig 含量的计算 以待测标本孔的沉淀环直径查标准曲线,将查得的 Ig 含量乘以标本的稀释倍数,即标本 Ig 的含量。

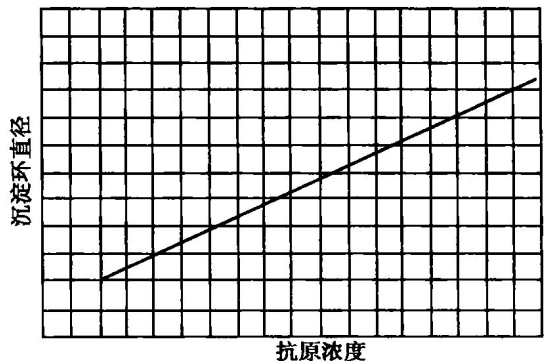


图 1-3 单向琼脂扩散试验标准曲线

实验5 双向琼脂扩散试验

将可溶性抗原和相应抗体分别加到生理盐水琼脂双扩板小孔中自由扩散,两者相遇即发生特异性结合,并在比例适合处形成白色沉淀线。如果抗原和抗体标本中分别含有若干不同的相对应的抗原抗体体系,则因各种抗原抗体的扩散系数最适比例不同,扩散后可以形成若干条沉淀线。双向琼脂扩散试验,可用已知抗体(或抗原)检测未知抗原(或抗体),可分析鉴定复杂抗原性物质成分或测定免疫血清的浓度、纯度及比较抗原之间的异同点。此法可应用于血清甲胎蛋白(AFP)的检测。

【实验材料】

1. 抗体 抗人全血清抗体。
2. 抗原 正常人血清、人白蛋白。
3. 1.5% 盐水琼脂。
4. 器皿 载玻片、3mm 打孔器、微量加样器、吸管等。

【实验步骤】

1. 琼脂板的制备 将载玻片水平放置,加入溶化的 1.5% 盐水琼脂 2.5ml,待琼脂凝固后,用打孔器打孔,孔径 3mm,孔距 5mm,挑出孔中琼脂。

2. 加样 1孔加入正常人血清,2孔加入人白蛋白血清,3孔加入抗人全血清抗体。

3. 扩散 将琼脂板放入湿盒内,置 37℃温箱中,24~48 小时后取出观察结果。

【实验结果】

观察孔间沉淀线的数目及特征。本试验可能出现的结果是在 1孔、3孔之间出现一条沉淀线,与 2、3孔间出现的沉淀线相融合(图 1-4)。

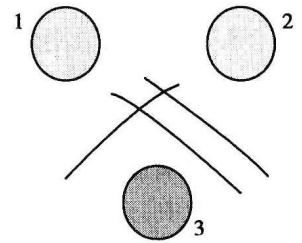


图 1-4 双向琼脂扩散试验结果示意图

实验6 对流免疫电泳试验

在 pH8.6 缓冲液中抗原带负电荷,在电场作用下由阴极向阳极移动。抗体为大分子球蛋白,带少量的负电荷,移动较慢,受电渗作用反而向阴极移动,当抗原与抗体在琼脂板两孔间相遇时,在两者比例适当处形成白色沉淀线。这种在双向扩散基础上加电泳的方法,称为对流免疫电泳。由于抗原、抗体在电场中受外力定向移动,因而提高了试验速度及敏感度,而使沉淀线出现较快,可在短时间内观察结果,可用于快速诊断。以检测血清甲胎蛋白(AFP)为例介绍对流免疫电泳的实验方法。

【实验材料】

1. 血清 已知 AFP 诊断血清、待检血清、已知 AFP 阳性血清。
2. 0.05mol/L pH8.6 巴比妥缓冲液。
3. 器皿 电泳仪、3mm 打孔器、载玻片、微量加样器等。

【实验方法】

1. 用 0.05mol/L pH8.6 巴比妥缓冲液配制 1.5% 琼脂。水浴中加热溶化琼脂,用吸管吸取 3.5ml 置于载玻片上,冷凝后备用。

2. 按图 1-5 打孔,孔径 3mm,孔间距离 4~5mm。

3. 孔内加入 AFP 诊断血清,向 1 孔内加入已知 AFP 阳性血清,向 2 孔内加待检病人血清。

4. 将加好样品的琼脂板放置电泳槽上,抗原孔接阴极端,抗体孔接阳极端。

琼脂板两端分别用滤纸(滤纸宽度应与琼脂板宽度一致,滤纸应盖在琼脂板两端各 1cm 处),与 0.05mol/L pH8.6 的巴比妥缓冲液相连,接通电源,控制电流在 4mA/cm 宽,端电压约 6V/cm 长,电泳 45~90 分钟,关闭电源,取出琼脂板。

【实验结果】

观察二孔间白色沉淀线的产生,出现沉淀线为阳性反应。若沉淀线不够清晰,可在 37℃ 放置数小时,以增强线条清晰度。

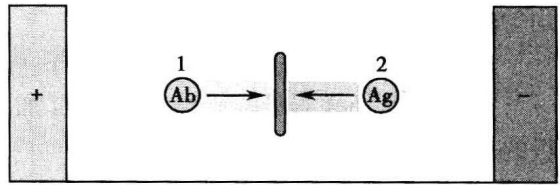


图 1-5 对流免疫电泳示意图

实验 7 火箭免疫电泳试验

火箭免疫电泳是一种单向免疫扩散加电泳的方法。即在直流电场作用下,抗原在含一定量抗体的琼脂中泳动,两者比例合适时形成形状似火箭的沉淀峰,故称火箭免疫电泳。在一定浓度范围内,沉淀峰高度与抗原量成正比(图 1-6)。由于是在电场中泳动,故是一种快速定量检测方法。以 AFP 检测为例介绍该实验。

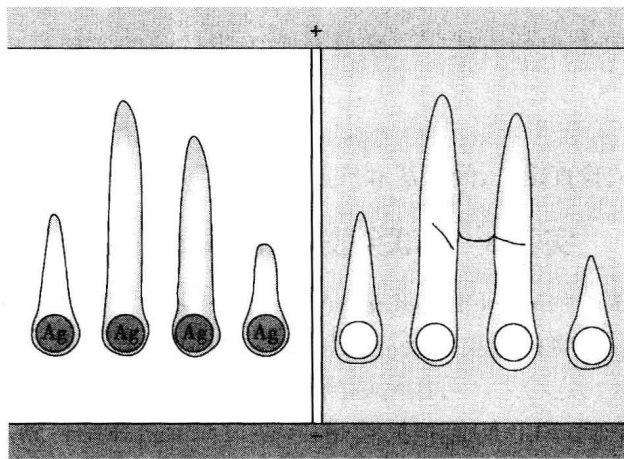


图 1-6 火箭电泳试验示意图

【实验材料】

1. 血清 AFP 诊断血清、待检血清、已知含量的甲胎蛋白标准溶液。
2. 0.05mol/L pH8.6 巴比妥缓冲液、3% 巴比妥琼脂。
3. 器皿 电泳仪、电泳槽、5cm × 9cm 玻璃板、3mm 打孔器、微量移液器等。

【实验步骤】

1. 将 AFP 诊断血清用巴比妥缓冲液稀释成 1:100 加热至 56℃ 与溶化并冷至 56℃ 左右的 3% 巴比妥琼脂 1:1 混匀,取 7ml,立即浇于 5cm × 9cm 洁净玻璃板上制成 2mm 厚薄