

全国高等医药

院校实验教材



主编 李柏青 张林杰

医学免疫学

YIXUE

MIANYI XUE

SHIYAN JIAOCHENG

实验教程



安徽科学技术出版社

全国高等医药院校实验教材

医学免疫学实验教程

主 编 李柏青 张林杰

副主编 张荣波 吴俊英

编 委 (以姓氏笔画为序)

许礼发 (安徽理工大学医学院)

张荣波 (安徽理工大学医学院)

吴俊英 (蚌埠医学院)

张林杰 (安徽医科大学)

李 群 (安徽医科大学)

李柏青 (蚌埠医学院)

陈 勇 (蚌埠医学院)

 安徽科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验教程/李伯青,张林杰主编. —合肥:
安徽科学技术出版社,2004.10

(全国高等医药院校实验教材)

ISBN 7-5337-3078-X

I. 医… II. ①李…②张… 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(2004)第101522号

*

安徽科学技术出版社出版

(合肥市跃进路1号新闻出版大厦)

邮政编码:230063

电话号码:(0551)2833431

E-mail: yougoubu@sina.com

yougoubu@hotmail.com

网址: www.ahstp.com.cn

新华书店经销 合肥华星印务有限责任公司印刷

*

开本:787×1092 1/16 印张:5.5 字数:90千

2004年10月第1版 2004年10月第1次印刷

印数:8 500

定价:10.00元

(本书如有倒装、缺页等问题,请向本社发行科调换)

前 言

免疫学是一门仍在不断发展的学科。同时,免疫学也是一门实验研究和理论研究紧密结合的学科。综观免疫学的发展历史,在实验研究中应用新的实验方法和技术往往可引发免疫学理论研究的突破。免疫学实验方法和技术在临床实践中的应用大大提高了临床诊断的水平,也有利于临床疾病的防治工作。而且,免疫学的实验方法和技术在生命科学许多领域的实验研究中也发挥了独特的作用。

医学免疫学的实验课是医学免疫学理论课教学的重要补充和扩展。在实验课中,学生不仅可以对理论课内容加以验证,以巩固理论课上所学的知识,从而提高学习兴趣;同时,可以比较系统地了解常用免疫学实验的原理、操作过程、结果观察和应用范围,以培养学生的操作技能;另外,也能提高分析问题和解决问题的能力,树立严谨的科学态度。因此,实验教学是免疫学教学不可缺少的重要环节。

在编写本实验教程时,从目前医学院校的免疫学实验课的教学实际情况出发,选择了25个实验,具备以下特点:①实验内容以经典免疫学实验为主,也适当增加目前已在临床应用的免疫学新技术的实验,如胶体金免疫斑点试验等;②实验的操作过程的设置使学生在一次实验课2~3个学时内完成,每次实验课一般可以进行2~3个实验;③对书中有些实验,若有时间安排或器材准备方面的困难,可以采取选做、示教或部分操作与部分示教相结合的方法进行;④在部分实验操作内容后,提出了思考题,目的是使学生深入理解免疫学实验方法的原理以及提高学生分析问题和解决问题的能力。

本书适用于基础、临床、预防、口腔医学等专业本科及专科的免疫学实验教学,也可供各类医学院校的免疫学教师以及进行免疫学实验研究的科研人员和研究生参考。

由于免疫学发展迅速,医学实验课的教学也在不断改革和更新,而编

者水平有限，编写中可能有不妥和错误之处，恳请老师和同学批评指正并提出建议，以便日后修订。

编 者
2004 年 8 月



绪论	1
实验一 中性粒细胞吞噬试验	3
实验二 巨噬细胞吞噬试验	6
实验三 溶菌酶试验	8
实验四 补体参与的溶血反应	10
实验五 玻片直接凝集试验	12
实验六 试管直接凝集试验 (肥达反应)	16
实验七 间接凝集抑制试验 (妊娠试验)	20
实验八 单向琼脂免疫扩散试验	23
实验九 双向琼脂免疫扩散试验	26
实验十 单向扩散免疫电泳——火箭电泳	29
实验十一 对流免疫电泳	31
实验十二 免疫电泳	34
实验十三 补体结合反应	37
实验十四 荧光免疫技术	39
实验十五 酶联免疫吸附试验 (ELISA)	42
实验十六 斑点金免疫渗滤试验	47
实验十七 斑点免疫层析试验	49
实验十八 外周血淋巴细胞分离方法	51
实验十九 E 花环形成试验	53
实验二十 T 淋巴细胞亚群的检测	55
实验二十一 T 淋巴细胞转化试验	58
实验二十二 白细胞介素-2 活性的测定	60
实验二十三 NK 细胞自然杀伤活性的测定	62

实验二十四	豚鼠速发型超敏反应	64
实验二十五	循环免疫复合物的测定	66
附录 I	免疫学实验常用试剂及配制方法	69
附录 II	免疫学实验的前期准备工作	74

绪 论

免疫学是一门实验研究和理论研究密切结合和相互促进的学科。新的实验方法和技术往往可导致免疫学理论的突破,因此免疫学的实验方法和技术对免疫学的发展有重要作用。免疫学实验方法和技术在临床的应用也极大提高了临床诊断的水平,促进了临床疾病的防治工作。此外,免疫学的实验方法和技术在生命科学许多领域中得到广泛应用,在生命科学的实验研究中发挥着独特的作用。

一、医学免疫学实验课的目的和要求

医学免疫学实验课是本课程学习中的重要环节。实验课的目的是使学生加深和巩固对理论课内容的理解和体会。通过实验,学生们可以了解和熟悉医学免疫学中最基本和最常用的实验方法的原理和具体的操作技术,提高动手操作能力,提高分析问题、解决问题等独立思考的能力,为今后临床实践和科学研究打下良好基础。为了增强实验课的效果,应做到以下几点:

1. 实验前预习实验内容,明确实验的目的、原理和操作过程,以避免或减少错误发生。
2. 在实验中注意合理安排时间。操作中应持认真的科学态度,严格遵守实验步骤。
3. 认真观察实验结果,记录必须真实。如得到的实验结果与理论不符合,应寻找或探讨原因,以训练科学思维能力。每次实验完成时,应根据要求写出实验报告。

二、医学免疫学实验室规则

在医学免疫学实验课的操作过程中,有可能接触到某些病原微生物以及有毒试剂。因此,在进行某些实验操作时,须参照微生物实验课要求,牢固树立“无菌概念”,执行“无菌操作”规范。同时也要建立生物安全防护概念,以防止自身和周围环境的污染及有毒试剂的扩散。

凡进入实验室进行实验必须遵守以下实验室规则:

1. 进实验室必须穿白色工作衣,离开实验室时脱下,反折。
2. 书包和衣服等不要带入实验室,带入的必要用具应放在远离操作部位的地方。
3. 实验室内严禁吃东西、喝饮料,严禁抽烟。
4. 实验室内应保持安静,不准高声谈笑,以免影响他人的实验。
5. 实验室内应保持整洁,应杜绝随地吐痰和乱丢垃圾的现象,用过的器材(如吸管、试管、玻片等)应放在指定的污物缸内,不能放在桌面上或水池内。
6. 实验时应注意节约实验材料和用品,爱护公物,器材如有损坏,应及时报告指导老师。
7. 如果发生菌液污染事故,应立即报告指导老师,根据不同情况给予处理。
8. 实验完毕后,应整理桌面,将所有物品放在原来的位置或指定的地方。离开实验室时应洗手。值日生打扫卫生,最后离开实验室时应关闭水、电和门窗。

实验一 中性粒细胞吞噬试验

【目的】

观察中性粒细胞对细菌的吞噬现象，了解吞噬试验的操作方法。

【原理】

外周血中性粒细胞可以非特异吞噬细菌等微生物，并把它消化、分解，称为小吞噬现象。本试验取人外周血在体外与葡萄球菌混合，孵育一段时间后取出涂片，进行瑞特染色，观察并计算其吞噬百分率和吞噬指数，可反映机体的非特异性免疫功能。

【材料】

1. 白色葡萄球菌菌液（约 2.4×10^9 /ml）。
2. 抗凝管（内含 3.8% 枸橼酸钠 0.2ml）及生理盐水。
3. 瑞特染液（配制方法见附录 I）。
4. 玻片、吸管、香柏油、二甲苯、碘酒、酒精棉球、无菌注射器及针头、显微镜。

【方法】

1. 抽取静脉血 1ml，注入含抗凝剂的试管内，混匀后加入葡萄球菌悬液 3~5 滴。
2. 充分混匀，置 37℃ 水浴箱中孵育 10~15 min，取血 1 滴，推成血涂片（图 1）。
3. 待血涂片自然干燥，做瑞特染色，步骤如下：
 - （1）将血涂片置于染色架上。
 - （2）加瑞特染液 3~5 滴盖满血膜，保持约 1 min。因染液含甲醇，易

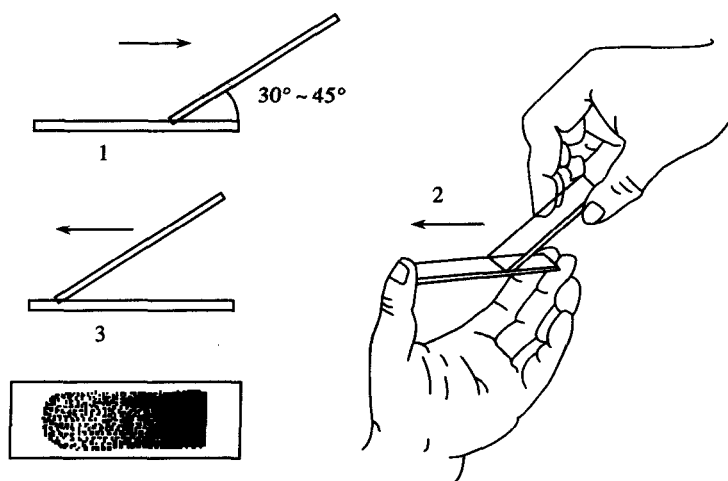


图1 血涂片示意图

挥发，必要时需添加少量染液勿使其干固。

(3) 不倒掉染液，直接滴加 2~3 倍磷酸缓冲液 (pH6.4) 或新鲜蒸馏水，小心摆动玻片，使其与染液充分混合，保持 5 min。

(4) 用细水流冲洗，切勿先倒染液再冲洗。自然干燥或用吸水纸吸干。

4. 将染色后的血涂片置于显微镜油镜下观察，绘图记录。

【结果观察】

镜下中性粒细胞的细胞核和被吞噬的葡萄球菌均被染成紫色，细胞质被染成淡红色。计数 100 个中性粒细胞，计算其吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬百分率 = $\frac{100 \text{ 个中性粒细胞中内含葡萄球菌的细胞数}}{100 \text{ 个中性粒细胞总数}}$

吞噬指数 = $\frac{100 \text{ 个中性粒细胞吞噬葡萄球菌总数}}{100 \text{ 个中性粒细胞总数}}$

【注意事项】

1. 血涂片不宜太厚或太薄，否则影响细胞计数。
2. 因中性粒细胞多分布于血膜片尾部，计数时应注意。

附 显微镜油镜的使用

1. 油镜的识别

普通光学显微镜的接物镜有低倍镜、高倍镜及油镜3种。观察免疫细胞时最常用的为油镜。油镜镜头常有以下几种标志：①镜头上标的放大倍数为“90×”或“100×”；②镜头下缘常有一圈黑色线；③透镜孔径最小。

2. 油镜的原理

使用油镜时，需在玻片上滴加香柏油。这是因为油镜的放大倍数较高，而透镜很小，光线通过不同密度的介质物体（玻片→空气→透镜）时，部分光线会发生折射而散失，进入镜筒的光线少，视野就暗，物体观察不清。如果在透镜与玻片之间滴入香柏油，香柏油的折光率（ $n=1.515$ ）与玻璃的折光率（ $n=1.52$ ）相近，因此通过的光线不易散失，使视野亮度加强，就可以比较清晰地观察到物体。

3. 油镜的使用方法

(1) 使用油镜时，勿将镜臂弯曲倾斜，以免镜油流出或载玻片上溶液外溢，影响观察效果或污染环境。

(2) 用低倍镜对光，自然光线用平面反光镜，人工光源则用凹面反光镜，同时调节集光器和光圈以取得最适亮度，油镜检查染色标本时，光线宜亮，应开大光圈，升高集光器。如检查不染色标本及应用低倍镜时，光线宜弱，应缩小光圈，降低集光器。

(3) 观察标本：将标本片置于载物台上，用弹簧夹或标本移动器固定。在标本片待检部位上滴加一小滴香柏油，眼睛从侧面注视油镜头，并缓慢转动粗调节器，使镜头逐渐下降至油镜头浸没在油内，几乎和标本片接触，但两者切勿相碰。然后将眼移至目镜，同时轻轻向上移动粗调节器，待获得模糊物像时，再用细调节器调节至物像完全清晰为止。调节油镜时，千万不可使强力将镜头任意下降，以免压碎标本片或损坏贵重的油镜头。

(4) 观察完毕，取下标本片，立即以擦镜纸拭去镜头上的油（忌用粗布、硬纸擦拭），若油已干，可用擦镜纸蘸二甲苯少许擦净，并用另一擦镜纸拭去二甲苯，以防二甲苯使透镜头脱胶落下。

(5) 显微镜使用完毕后，将三个接物镜转成“八”字形，将镜筒下移、集光器下降，放入显微镜箱内，或一手托镜座、一手持镜臂，归还显微镜室。

实验二 巨噬细胞吞噬试验

【目的】

观察巨噬细胞的大吞噬现象，了解吞噬试验的操作方法。

【原理】

巨噬细胞可非特异吞噬较大的颗粒性异物，如鸡红细胞、白色念珠菌等，称为大吞噬现象。本试验将鸡红细胞注入小鼠腹腔中，腹腔巨噬细胞可吞噬和消化鸡红细胞，一段时间后取巨噬细胞观察吞噬现象并计算其吞噬百分率和吞噬指数，作为判定其吞噬活性的指标。

【材料】

1. 1%鸡红细胞悬液：取肝素抗凝鸡血 1 ml 与生理盐水 99 ml 混匀。
2. 6%可溶性淀粉肉汤：在肉汤培养基 100 ml 中加入可溶性淀粉 6 g，经煮沸灭菌 30 min。
3. 小白鼠 1~2 只。
4. 瑞特染液、手术剪刀、镊子、显微镜等。

【方法】

1. 试验前 3 天，于小鼠腹腔内注射可溶性淀粉肉汤 1 ml。
2. 试验当天，于小鼠腹腔内再注射 1% 鸡红细胞悬液 1 ml。
3. 注射后 30 min，处死小鼠，取腹腔液涂片，冷风吹干，施行瑞特染色。
4. 将染色后的涂片置于显微镜油镜下观察，绘图记录。

【结果观察】

鸡红细胞是有细胞核的，镜下巨噬细胞的细胞核和鸡红细胞核均被染成蓝色，巨噬细胞的细胞质呈浅红色。记数 100 个巨噬细胞，计算吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬百分率 = $\frac{100 \text{ 个巨噬细胞中内含鸡红细胞的巨噬细胞数}}{100 \text{ 个巨噬细胞总数}}$

吞噬指数 = $\frac{100 \text{ 个巨噬细胞吞噬的鸡红细胞总数}}{100 \text{ 个巨噬细胞总数}}$

【注意事项】

1. 处死小鼠后立即注入生理盐水 2 ml，轻揉腹部，可获得较多的巨噬细胞。

2. 腹腔注射鸡红细胞后收集巨噬细胞的时间应预先摸索。时间过短则吞噬的鸡红细胞较少；时间过长则鸡红细胞易被消化。

实验三 溶菌酶试验

【目的】

了解溶菌酶的溶菌活性和检测方法。

【原理】

溶菌酶是一种碱性蛋白，主要来源于吞噬细胞，广泛分布于血清、泪液、唾液等分泌物中，它能作用于革兰阳性细菌细胞壁的肽聚糖，使其分解，细胞壁失去坚韧性，使细菌发生渗透性溶解。

【材料】

1. 含溶壁微球菌 (*M. Lysodeikdicus*) 的琼脂平板。
2. 人的新鲜唾液 (含溶菌酶)。
3. 空平皿、毛细吸管、刻度尺、打孔器等。

【方法】

1. 唾液的收取：垂头，微张口，勿做吞咽动作，略待片刻将唾液流入空平皿中。
2. 取已制备好的含有溶壁微球菌的 1% 琼脂平板一个 (图 2)，对不同的孔标记编号，用毛细吸管吸取唾液加于实验孔内，注意不要使其溢出；另取一支毛细吸管在孔 1 中滴加生理盐水，作为对照。
3. 将平皿置于 37℃ 温箱中温育 18~24 h 后观察结果，量取溶菌环直径，并做记录。

【结果观察】

将平皿置于合适的光线下，观察加唾液的孔周围出现的透明环，即为

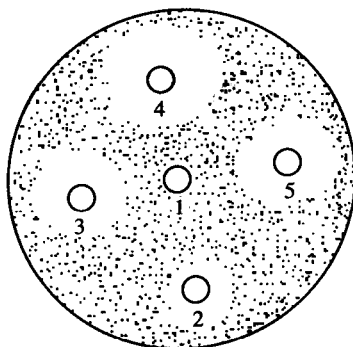


图2 溶菌酶试验琼脂平板

加样孔和结果示意图

溶菌酶溶解溶壁微球菌后形成的溶菌环，溶菌环直径的大小可以相对反映加入的唾液中所含有溶菌酶的活性，中间的孔1加生理盐水是实验阴性对照，应该不出现透明环。

【注意事项】

1. 收集唾液时，应该让唾液自然流出，有泡沫的唾液不易加到孔中，影响加入量。
2. 吸取生理盐水的毛细吸管应严格与吸取唾液的毛细吸管分开，以防止唾液混入生理盐水中。
3. 毛细吸管使用完毕后，用清水冲洗几次，倒置晾干，以备以后实验使用。

实验四 补体参与的溶血反应

【目的】

了解补体在溶血反应中的作用；掌握补体介导的细胞溶解的机理。

【原理】

作为抗原的绵羊红细胞 (sheep red blood cell, SRBC) 与其对应抗体 (溶血素) 结合后, 通过补体活化的经典途径激活补体, 经过一系列放大的级联反应, 最后形成膜攻击复合体 (MAC), 产生膜攻击作用, 导致 SRBC 溶解, 发生溶血反应。

【材料】

1. 2% 绵羊红细胞悬液。
2. 溶血素 (抗绵羊红细胞抗体, 适当稀释)。
3. 豚鼠新鲜血清 (含补体, 适当稀释)。
4. 生理盐水。
5. 试管架、试管、吸管、37℃ 水浴箱。

【方法】

1. 取洁净小试管 4 支, 标记管号 “1” “2” “3” “4”, 其中 1 号管为实验管; 2 号管为溶血素对照管; 3 号管为补体对照管; 4 号管为 SRBC 对照管。按表 1 加入各成分。
2. 将上述 4 支试管摇匀后放入 37℃ 水浴箱内, 30 min 后观察结果。