

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

病原生物学与免疫学实验

主编 强 华



科学出版社

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

病原生物学与免疫学实验

主 编 强 华

副 主 编 刘樑英 刘光英

编 者 (按姓氏拼音排序)

陈婉南 陈义忠 韩艳非 李 能

王辉丽 吴林青 张秋玉 章 涛

朱 玲 朱 苹

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

《病原生物学与免疫学实验》涵盖医学免疫学、医学微生物学及人体寄生虫学三门学科的实验内容,按基础性实验、综合性实验及研究性实验三大模块,循序渐进编写。全书共分五篇:第一篇介绍实验室生物安全知识;第二篇到第四篇分别为医学免疫学实验、医学微生物学实验、人体寄生虫学实验,每篇均分为基础性实验与综合性实验两章,旨在夯实学生的基础知识及基本操作技能;第五篇综合三门学科内容,选取一些简单易行的小课题作为研究性实验项目,抛砖引玉,以拓展学生的思维,提高科研创新能力。

本书可供临床医学、预防医学、口腔医学、医学检验、药学及护理等专业的医学生选用,满足本科、专科层次学生的实验教学需要,也为大学生创新创业训练项目的选题提供参考。

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学与免疫学实验 / 强华主编. —北京:科学出版社,2014.1

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

ISBN 978-7-03-039297-8

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

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第297729号

责任编辑:胡治国 / 责任校对:宣 慧

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏志印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年1月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014年1月第一次印刷 印张:10 插页:4

字数:230 000

定价:39.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

为促进医学教育的发展,适应教学改革的需要,我们编写了《病原生物学与免疫学实验》,在注重验证基本原理,培养基本技能的基础上,着眼于培养学生动手能力、分析问题和解决问题的能力,尽可能为综合性、设计性实验留出足够的课时空间。

《病原生物学与免疫学实验》在编写过程中,根据我校病原生物学系及免疫学系的实践教学经验,参考了兄弟院校的实验教材及其他著作文献,去除重复的实验,补充了实验室生物安全等学科新技术知识,对医学免疫学、医学微生物学及人体寄生虫学实验进行了整合。

本实验指导注重实验教学的实用性,详细说明实验方法,并提供必要的图表,以便学生理解和操作。编写内容从简单到复杂,从基础验证性实验,到综合设计性实验。在强化基本理论、基本知识和基本实验技能训练的同时也加强学科知识的融会贯通和横向联系。

以解决问题为目标的探究性学习更有利于培养学生的科研能力及创新思维。为此,我们选取了一些简单易行的小课题作为研究性实验项目,以期抛砖引玉,为学生进行设计性、探索性实验,参加各种形式的大学生创新创业训练提供思路。

为学生用书方便起见,本书从第二篇到第四篇按各门学科实验内容编写,即各门学科自成篇,每篇再分为基础性实验与综合性实验两章。本书在编写中同时兼顾了本、专科层次的教学内容,因此可供各层次学生教学选用。

由于我们的学术及编写水平有限,在内容和安排上难免存在疏漏、不足和错误,恳请各位同仁和同学们批评指正。

编 者

2013 年 10 月

目 录

第一篇 实验室生物安全知识

第一章 实验室生物安全概论	(1)
第二章 生物安全实验室的主要设备及操作	(3)
第三章 实验室规则	(5)

第二篇 医学免疫学实验

第一章 医学免疫学基础实验	(6)
实验一 中性粒细胞吞噬功能测定	(6)
实验二 中性粒细胞硝基四氮唑蓝还原能力的测定	(7)
实验三 巨噬细胞吞噬功能的测定	(7)
实验四 补体溶血试验	(8)
实验五 玻片凝集试验	(9)
实验六 试管凝集试验	(10)
实验七 间接凝集试验	(12)
实验八 单向免疫扩散试验	(13)
实验九 双向免疫扩散试验	(14)
实验十 免疫比浊测定	(15)
实验十一 免疫电泳	(16)
实验十二 对流免疫电泳	(18)
实验十三 火箭免疫电泳	(19)
实验十四 交叉免疫电泳	(20)
实验十五 免疫荧光技术	(20)
实验十六 酶联免疫吸附试验	(24)
实验十七 免疫胶体金技术	(28)
实验十八 免疫印迹技术	(30)
实验十九 人外周血单个核细胞的分离	(34)
实验二十 小鼠脾细胞的制备	(37)
实验二十一 免疫磁珠分选技术	(38)
实验二十二 I 型超敏反应动物模型——豚鼠过敏性反应	(39)
第二章 医学免疫学综合实验	(41)
实验二十三 兔抗人 IgG 多克隆抗体的制备	(41)
实验二十四 硫酸铵分段盐析法分离纯化免疫球蛋白	(43)
实验二十五 E 玫瑰花环实验	(45)

实验二十六 淋巴细胞增殖功能的测定	(46)
实验二十七 酶联免疫斑点实验	(48)
实验二十八 肿瘤坏死因子的诱生及其生物学活性检测	(50)
实验二十九 流式细胞术检测 T 细胞亚群	(51)
实验三十 免疫共沉淀技术	(53)

第三篇 医学微生物学实验

第一章 医学微生物学基础实验	(57)
实验一 革兰染色法观察细菌的基本形态	(57)
实验二 细菌动力的观察	(59)
实验三 细菌的特殊结构	(60)
实验四 培养基的制备	(60)
实验五 细菌的培养及保存	(62)
实验六 细菌代谢产物的观察	(64)
实验七 自然界细菌的分布	(65)
实验八 煮沸法对细菌的杀灭作用	(66)
实验九 高压蒸汽灭菌法	(66)
实验十 紫外线杀菌试验	(67)
实验十一 化学因素对细菌的影响	(67)
实验十二 抗生素的抗菌作用(抗生素敏感试验)	(69)
实验十三 噬菌体对细菌的作用	(71)
实验十四 病原性球菌	(72)
实验十五 厌氧芽孢杆菌	(74)
实验十六 白喉杆菌	(74)
实验十七 分枝杆菌	(75)
实验十八 病毒的组织细胞培养及结果观察	(76)
实验十九 立克次体	(77)
实验二十 病原性螺旋体	(77)
实验二十一 病原性真菌	(79)
第二章 医学微生物学综合实验	(81)
实验二十二 细菌荚膜的侵袭作用	(81)
实验二十三 细菌侵袭性酶的作用	(81)
实验二十四 细菌内毒素的致病作用及检测	(82)
实验二十五 细菌外毒素对机体的毒性作用及抗毒素的体内中和作用	(83)
实验二十六 R 质粒接合传递试验及其鉴定	(84)
实验二十七 质粒 DNA 的转化试验	(85)
实验二十八 可疑败血症患者血标本的检查	(87)
实验二十九 未知病原肠道杆菌的检测	(88)
实验三十 肥达试验	(91)
实验三十一 流感病毒的实验室诊断	(93)

实验三十二 病原微生物的核酸检测技术	(95)
实验三十三 轮状病毒 RNA 抽提及聚丙烯酰胺凝胶电泳	(98)

第四篇 人体寄生虫学实验

第一章 人体寄生虫学基础实验	(100)
第一节 线虫	(100)
实验一 似蚓蛔线虫(蛔虫)	(100)
实验二 十二指肠钩口线虫(十二指肠钩虫)与美洲板口线虫(美洲钩虫)	(101)
实验三 毛首鞭形线虫(鞭虫)	(104)
实验四 蠕形住肠线虫(蛲虫)	(104)
实验五 班氏吴策线虫(班氏丝虫)与马来布鲁线虫(马来丝虫)	(105)
实验六 旋毛形线虫(旋毛虫)	(107)
第二节 绦虫	(107)
实验七 链状带绦虫(猪带绦虫)与肥胖带绦虫(牛带绦虫)	(107)
实验八 曼氏迭宫绦虫	(110)
第三节 吸虫	(112)
实验九 华支睾吸虫(肝吸虫)	(112)
实验十 布氏姜片吸虫	(113)
实验十一 卫氏并殖吸虫(肺吸虫)与斯氏狸殖吸虫	(114)
实验十二 日本血吸虫(血吸虫)	(115)
第四节 原虫	(117)
实验十三 溶组织内阿米巴(痢疾阿米巴)和结肠内阿米巴	(117)
实验十四 蓝氏贾第鞭毛虫(贾第虫)	(120)
实验十五 阴道毛滴虫	(120)
实验十六 杜氏利什曼原虫	(121)
实验十七 疟原虫	(122)
实验十八 刚地弓形虫	(125)
实验十九 隐孢子虫	(126)
实验二十 结肠小袋纤毛虫	(127)
第五节 医学节肢动物	(128)
实验二十一 蚊、蝇、白蛉、蚤、虱	(128)
实验二十二 蜱、恙螨、疥螨、蠕形螨、尘螨	(132)
第二章 人体寄生虫学综合实验	(135)
实验二十三 人体肠道线虫感染的粪便自检	(135)
实验二十四 日本血吸虫感染家兔实验和免疫学诊断	(137)
实验二十五 野生青蛙体内裂头蚴的检查	(139)
实验二十六 学生口腔原虫感染情况的检查	(139)
实验二十七 阴道毛滴虫的体外培养	(140)

第五篇 研究性实验

实验一	建立评价中药多糖等制剂免疫调节作用的实验体系	(141)
实验二	慢性炎症和自身免疫病巨噬细胞功能的改变	(141)
实验三	辅助性 T 淋巴细胞在败血症休克中的作用	(142)
实验四	小鼠乳腺癌动物实验模型体内 CD4 ⁺ CD25 ⁺ foxp3 ⁺ Treg 细胞的检测及其意义	(142)
实验五	IL-2 生物活性检测	(143)
实验六	弓形虫诱导动物抗血清的制备方法探讨	(143)
实验七	胶原诱导性关节炎小鼠外周血 Th17 细胞的检测及其意义	(144)
实验八	肠球菌正常菌群与临床菌株的不同特性	(144)
实验九	医院留置导管细菌生物被膜形成情况调查	(145)
实验十	悬浮菌与细菌生物被膜的耐药性比较	(145)
实验十一	细菌生物被膜形成的观察及影响因素探讨	(145)
实验十二	HBV 感染检测方法的探讨	(146)
实验十三	本市幽门螺杆菌的耐药情况调查	(146)
实验十四	细菌耐受噬菌体自发突变频率的测定	(147)
实验十五	泌尿道大肠埃希菌 L 型感染的分离鉴定与耐药性检测	(148)
实验十六	洗手产品杀菌效果的实验研究	(148)
实验十七	新鲜瓜果、蔬菜中蛔虫卵、鞭虫卵污染状况调查	(149)
实验十八	肝吸虫感染动物实验	(149)
实验十九	牙龈内阿米巴的体外培养	(149)
实验二十	大学生人体蠕形螨感染的调查	(150)
主要参考资料		(151)
彩图		

第一篇 实验室生物安全知识

第一章 实验室生物安全概论

一、生物安全的概念

生物安全是指生物性的传染媒介通过直接感染或间接破坏环境而导致对人类、动物或者植物的真实或者潜在的危险。

二、生物因子风险等级

生物安全等级(biosafety level),根据生物因子对个体和群体的危害程度将其分为四级:

- 1. 风险等级Ⅰ(低个体危害,低群体危害) 不会导致健康工作者和动物致病的细菌、真菌和寄生虫等生物因子。
- 2. 风险等级Ⅱ(中等个体危害,有限群体危害) 病原体能引起人或动物发病,但一般情况下对健康工作者、群体、家畜或环境不会引起严重危害。实验室感染不导致严重疾病,具备有效治疗和预防措施,并且传播风险有限。
- 3. 风险等级Ⅲ(高个体危害,低群体危害) 病原体能引起人类或动物严重疾病,或造成严重经济损失,但通常不因偶然接触而在个体间传播,并且对感染具备有效治疗和预防措施,如能使用抗生素、抗寄生虫药治疗。
- 4. 风险等级Ⅳ(高个体危害,高群体危害) 病原体能引起人类或动物非常严重疾病,一般不能治愈,容易直接或间接传播,或因偶然接触在人与人、动物与人、人与动物或动物与动物间传播,对感染一般没有有效治疗和预防措施。

三、生物安全实验室分级

1. 生物安全实验室(biosafety laboratory) 也称生物安全防护实验室(biosafety containment for laboratories),是通过防护屏障和管理措施,避免或控制被操作的有害生物因子危害,达到生物安全要求的生物实验室和动物实验室。

依据实验室所处理对象的生物危险程度,把生物安全实验室分为四级,其中一级对生物安全隔离的要求最低,四级最高。生物安全实验室的分级见表 1-1-1。

表 1-1-1 生物安全实验室的分级

实验室分级	处理对象
一级	对人体、动植物或环境危害较低,不具有对健康成人、动植物致病的致病因子
二级	对人体、动植物或环境具有中等危害或具有潜在危险的致病因子,对健康成人、动物和环境不会造成严重危害。现有有效的预防和治疗措施

续表

实验室分级	处理对象
三级	对人体、动植物或环境具有高度危险性,主要通过气溶胶使人传染上严重的甚至是致命疾病,或对动植物和环境具有高度危害的致病因子。通常有预防治疗措施
四级	对人体、动植物或环境具有高度危险性,通过气溶胶途径传播或传播途径不明,或未知的、危险的致病因子。没有预防治疗措施



生物危害

生物安全二级实验室

外来人员未经许可严禁入内

图 1-1-1 生物安全实验室危险标识

入内(图 1-1-1)。

2. 生物安全实验室的表示 以 BSL-1、BSL-2、BSL-3、BSL-4(Bio-safety level, BSL)表示仅从事体外操作的实验室的相应生物安全防护水平。

3. 生物安全实验室的功能 根据实验活动的差异、采用的个体防护装备和基础隔离设施的不同,生物安全实验室可分为:

(1) 操作通常认为非经空气传播致病性生物因子的实验室。

(2) 可有效利用安全隔离装置如生物安全柜来操作常规量经空气传播致病性生物因子的实验室。

(3) 利用具有生命支持系统的正压服来操作常规量经空气传播致病性生物因子的实验室。

4. 生物安全实验室危险标识 生物安全实验室所在的实验室入口及核心工作间均应粘贴标有生物危害的国际通用标志,非工作人员未经允许不得

第二章 生物安全实验室的主要设备及操作

一、生物安全柜

(一) 定义

生物安全柜(biological safety cabinet, BSC)是为操作具有感染性的实验材料如原代培养物、菌(毒)株及诊断性标本时,用来保护操作者、实验室环境及实验材料,使其避免暴露于上述操作过程中可能产生的感染性气溶胶和溅出物而设计的具有过滤作用的负压排风装置。(注:超净工作台不属于生物安全柜,不能应用于生物安全操作)

(二) 防护原理

生物安全柜排风系统的 HEPA 过滤器对于直径 $0.3\mu\text{m}$ 的颗粒截留效率为 99.97%,对于更大或更小颗粒截留效率为 99.99%,从而确保排出的是完全不含有微生物的空气,从而保护环境;进入生物安全柜内的空气送至工作台面经 HEPA 过滤器从而在柜内形成百级洁净度的环境,从而保护了样品;经生物安全柜前窗口进入的空气与柜内下送风在前窗口共同形成气幕,从而保护了操作者本人与操作对象不被交叉污染。

(三) 生物安全柜的分级及功能

生物安全柜分为 I 级(BSL-1)、II 级(BSL-2)和 III 级(BSL-3)生物安全柜;BSL-2 级生物安全柜又分为 A 型、B 型、B2 型、B3 型。

生物安全柜其功能如下:BSL-1 级生物安全柜可提供人员和环境的保护,但不提供对样本的保护,常被用作特殊的密封设备(如离心),或可能产生气溶胶的操作过程。BSL-2 级生物安全柜可提供人员、环境和样本的保护,其中 B2 型为全排风式生物安全柜,没有空气在安全柜内循环,可同时提供基本的生物和化学防护。BSL-3 级生物安全柜可提供人员、环境和样本的最大保护,用于操作四级生物安全水平的微生物或病原体。

(四) 生物安全柜的操作程序

(1) 生物安全柜使用之前,应使用紫外灯照射至少 30min,打开生物安全柜机至少 15min。

(2) 关闭紫外灯,打开日光灯,准备实验。

(3) 打开生物安全柜的门,其高度不能超过最高警戒线。

(4) 进入生物安全柜的 Eppendorf 管,Tip 头必须要高压处理过,其他未经高压处理的物品进入生物安全柜前,必须用 70% 乙醇溶液消毒表面。

(5) 进入生物安全柜的物品,不应放置于通风口上面或外侧,应放置于通风孔以里,台面上。

(6) 污物处理桶表面用 70% 乙醇溶液消毒后,加入大约 1/5 体积的 0.5% 次氯酸钠消毒液,放置于生物安全柜内,实验中使用的离心管、Tip 头等物品一律放入污物桶中。生物安全柜内污物和洁净物应分开放置。

(7) 实验操作应严格按照无菌操作规范操作。

(8) 实验中溅出的血滴、血清等污物用 0.5% 次氯酸钠消毒和 70% 乙醇溶液消毒处理。

(9) 实验结束后,移出生物安全柜的物品应使用 70% 乙醇溶液消毒其表面。污物处理桶应进行高压处理后弃掉。

(10) 对安全柜的台面、边缘、后壁和观察窗内侧进行擦拭、消毒。首先使用 0.5% 次氯酸钠消毒处理半分钟,擦去;后用 70% 乙醇溶液处理,半分钟后擦去。

(11) 工作结束 5min 后关闭生物安全柜机、日光灯。

(12) 工作人员离开实验室应摘下手套、脱下工作服并洗手。

(13) 在生物安全柜使用记录本上进行登记。

二、洗 眼 器

根据《实验生物安全通用要求》(GB19489—2008)的规定,应在实验室工作区配备洗眼装置。洗眼装置应安装在室内明显和易取的地方,并保持洗眼水管的通畅,便于工作人员紧急时使用。工作人员应掌握其操作方法。当在实验工作中遵循了所有应注意的事项以后,如发生腐蚀性液体或生物危害液体喷溅至工作人员的眼睛时,工作人员应该(或在同事的帮助下)在就近的洗眼台用大量缓流清水冲洗眼睛表面至少 15 ~ 30min。

第三章 实验室规则

(1) 实验前要做好预习,掌握与实验相关的医学免疫学、医学微生物学及医学寄生虫学基础理论,明确实验目的与实验内容。进实验室只带必要的文具、讲义并穿工作服。

(2) 实验室内应保持清洁、安静,实验时要认真严肃,禁止抽烟、饮食和开玩笑。

(3) 爱护实验器材,注意节约实验材料。不可擅自搬动示教,实验器材或室内设施,如有损坏,应立即向指导教师报告,主动在破损物品登记本上登记。

(4) 注意安全,酒精灯不可互相点燃,以防发生意外。

(5) 微生物学实验要无菌操作,防止标本及纯培养物被污染,同时要避免病原微生物感染人体或污染环境。若带菌材料污染桌面、地板、书籍和衣物或误吸入口,应立即报告教师进行处理。实验中待培养的材料应放在培养区;实验用过的带菌材料如吸管、玻片等应放在指定的地方或消毒缸、消毒箱等消毒区,不得放在桌上或冲洗于水槽内。

(6) 实验完毕,桌面应整理清洁,显微镜、接种环、染色液、试管架等物品放回原处。洗手后方可离室。

(7) 实验室内任何物品(特别是菌种)不得带出室外。

(8) 值日同学负责湿性打扫实验室,并关好水、电、门窗。

(朱 苹)

第二篇 医学免疫学实验

第一章 医学免疫学基础实验

实验一 中性粒细胞吞噬功能测定

吞噬细胞主要包括单核吞噬细胞系统和中性粒细胞两大类。血液中的中性粒细胞为小吞噬细胞,通过趋化、调理、吞入和杀菌等步骤,能吞噬和消化衰老、死亡细胞及病原微生物等异物,是机体天然免疫力的重要组成部分。检测中性粒细胞的吞噬功能对了解机体的免疫功能状态具有重要意义。一般通过观察病人治疗前后白细胞吞噬指数与吞噬百分比的动态变化,作为疗效观察和预后判断的参考指标。

【目的要求】

观察小吞噬细胞的吞噬现象,加深对吞噬细胞吞噬功能的理解。

【实验材料】

1. 器材 无菌三棱针、2ml 刻度短吸管、小试管、玻片、油镜、水浴箱等。

2. 试剂

(1) 加热杀死的白色葡萄球菌悬液(10^{10} /ml)。

(2) 安尔碘皮肤消毒液。

(3) 肝素溶液。

(4) 瑞氏染液。

【实验方法】

(1) 左手无名指用安尔碘皮肤消毒液消毒,随后用三棱针采血 0.2ml,加入肝素抗凝管中(含肝素 10 单位),摇匀。

(2) 于上述管中加入 0.1ml 白色葡萄球菌悬液,混匀,置 37℃ 水浴中 30min,每 10min 轻摇一次。

(3) 取出后略加振摇,制作推片,干燥后作瑞氏染色。

【结果观察】 油镜下观察,结果见彩图 2-1-1。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,同时记录所吞噬的细菌数。结果以吞噬细胞百分比或吞噬指数表示。

吞噬细胞百分比:即 100 个中性粒细胞中吞噬有细菌的细胞数。

$$\text{吞噬细胞}\% = \frac{\text{有吞噬细菌的中性粒细胞数}}{100 \text{ 个中性粒细胞}} \times 100\%$$

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。

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的细菌总数}}{100 \text{ 个中性粒细胞}}$$

(吴林青)

实验二 中性粒细胞硝基四氮唑蓝还原能力的测定

由于中性粒细胞在杀菌过程中能量消耗剧增,耗氧量亦随之相应增加,糖代谢增强,以致糖代谢中间产物 6-磷酸葡萄糖增多,并在己糖磷酸化过程中氧化脱氢,此时加入硝基四氮唑蓝(nitrobluetetrazolium, NBT)可接受所脱的氢,使原先呈淡黄色的 NBT 还原成折光性强的点状或块状颗粒并沉积在胞质内。本法用以检测中性粒细胞的胞内杀菌能力。

【目的要求】

掌握中性粒细胞 NBT 还原实验的原理和方法。

【实验材料】

- (1) NBT 染液:称取 NBT 0.28g 加入生理盐水 100ml,用滤器过滤,分装,4℃ 保存。
- (2) 0.77% 沙黄 O 染液:取 1g 沙黄 O 加入 100ml 蒸馏水和 40ml 甘油。
- (3) 肝素抗凝剂:用无菌生理盐水将肝素稀释 25 倍,使成为 500U/ml,4℃ 保存。使用时取 0.1ml 可抗凝血 2ml。
- (4) 培养液:取正常人血清 0.5ml 加入生理盐水 0.3ml 和 NBT 染液 0.1ml。
- (5) 甲醇、碘酒、酒精棉球、温箱、显微镜、凹玻片、湿盒、注射器、吸管等。

【实验方法】

- (1) 取肝素抗凝外周静脉血 0.1ml 和培养液 0.1ml 加入凹玻片孔中混匀,置湿盒 37℃ 20min,中间摇动 1 次,再置室温 15min。
- (2) 取 1 滴混悬液于载玻片一端推成薄片,空气中快速干燥。
- (3) 甲醇固定 1~2min。
- (4) 0.77% 沙黄 O 染液染色 5min,水洗,干后油镜下检查。

【结果观察】

凡中性粒细胞胞质内含有斑点或块状的甲瓖颗粒沉积者为 NBT 阳性细胞,计算 100~200 个中性粒细胞,计算 NBT 阳性细胞百分率。正常范围参考值应在 10% 以下。

【注意事项】

- (1) NBT 染液应过滤,不要残留颗粒。
- (2) 所用器皿应洁净,避免玻璃表面因素参加 NBT 的还原反应。
- (3) 该实验简便、快速、便于重复,但特异性差,易出现假阳性或假阴性结果。

(吴林青)

实验三 巨噬细胞吞噬功能的测定

巨噬细胞吞噬异物的现象又称为大吞噬现象。如在豚鼠腹腔内注入鸡红细胞,腹腔巨噬细胞会吞噬鸡红细胞,并进一步将其消化。取小鼠腹腔液涂片,在显微镜下可见鸡红细胞被吞噬的现象。据此可了解巨噬细胞的吞噬功能。

【目的要求】

熟悉巨噬细胞吞噬功能测定的方法。

【实验材料】

1. 器材 无菌注射器、毛细吸管、玻片、染色架、洗耳球、油镜等。

2. 实验动物 健康成年豚鼠, 雄性。

3. 试剂

(1) 5% 淀粉溶液。

(2) 3% 鸡红细胞悬液。

(3) 新鲜蒸馏水。

(4) 瑞氏染液。

【实验方法】

(1) 给豚鼠腹腔内注射 5% 淀粉溶液 5ml。

(2) 12h 后, 再次腹腔注射 5% 淀粉溶液 5ml。

(3) 30min 后, 给豚鼠腹腔注射 3% 鸡红细胞悬液 3ml。

(4) 2h 后, 用毛细吸管吸取豚鼠腹腔液, 涂片, 瑞氏染色。

【结果观察】

油镜下观察, 结果如彩图 2-1-2 所示。计数 100 ~ 200 个巨噬细胞, 分别记录发生吞噬和未吞噬的巨噬细胞数, 同时记录所吞噬的鸡红细胞数。结果以吞噬细胞百分比或吞噬指数表示。

吞噬细胞百分比: 即 100 个巨噬细胞中吞噬有鸡红细胞的巨噬细胞数。

吞噬指数: 将 100 个巨噬细胞所吞噬的鸡红细胞总数除以 100, 得到每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的平均数, 即为吞噬指数。

此外, 在计数时, 应同时注意鸡红细胞被消化的程度, 一般分为 4 级:

I 级, 未消化——胞质浅红或浅黄, 带绿色; 胞核浅紫红色。

II 级, 轻度消化——胞质浅黄绿色; 胞核固缩, 染成紫蓝色。

III 级, 重度消化——胞质淡染; 胞核呈浅灰黄色。

IV 级, 完全消化——巨噬细胞内只见形状似红细胞大小的空泡, 边缘整齐, 胞核隐约可见。

【附】 瑞氏染色法

(1) 细胞涂片待干后, 置于染色架上, 滴加 Wright 染色液染色 1 ~ 2min。

(2) 再滴加等量蒸馏水稀释后, 继续染色 4 ~ 5min。

(3) 用蒸馏水冲洗, 待干后镜检。

(吴林青)

实验四 补体溶血试验

补体是机体免疫防御系统的重要组成成分, 它是存在于人及脊椎动物血清与组织液中的一组具有酶活性、不耐热的蛋白质。现今认识到它是一个由 30 余种糖蛋白组成的复杂系统, 占血清总蛋白的 5% ~ 6%, 故称补体系统。有些补体成分遇热不稳定, 加热 56℃ 20 ~ 30min 即可被灭活。多数补体成分属于球蛋白。

生理情况下,血清中大多数补体成分以无活性的酶前体形式存在,只有在某些活化物的作用下或在特定的表面上,补体各成分才依次活化,发挥其生物学效应。在补体活化的经典途径中,补体既不单独和抗原结合,也不单独和抗体结合,只能和抗原与相应抗体结合后的免疫复合物结合并被激活。按特定的连锁反应过程,参与该活化途径的各补体成分依次被激活,在靶细胞表面形成一个多分子的聚合物,即攻膜复合体(MAC),导致靶细胞溶解。若靶细胞为红细胞,则出现溶血现象。此外,补体还可通过MBL(甘露聚糖结合凝集素)途径或旁路途径活化。

作为机体免疫防御系统的重要组成部分,补体系统具有介导细胞溶解、调理吞噬、免疫黏附、引起炎症反应、参与免疫调节等作用。某些补体成分及调节因子的缺乏可导致相应疾病的发生。因此,体外测定血清中补体的总活性以及单个补体成分的量,有助于了解体内补体系统状况,对某些疾病的诊断、鉴别诊断及其发病机制的研究也具有重要意义。

【目的要求】

观察溶血现象,并了解补体系统在溶血反应中的作用。

【实验材料】

- 1. 器材 吸管、小试管、试管架、水浴箱、记号笔等。
- 2. 试剂

- (1) 生理盐水。
- (2) 2% 绵羊红细胞(SRBC)。
- (3) 绵羊红细胞溶血素(2个单位)。
- (4) 含补体的新鲜豚鼠血清(2个实用单位)。

【实验方法】

- (1) 取小试管3支,排列于试管架上,做好标记。
- (2) 按表2-1-1加入各种试验材料(容量单位均以毫升(ml)计算)。

表 2-1-1 补体溶血试验各管所加试剂

管号	SRBC(抗原)	溶血素(抗体)	补体(2个单位)	生理盐水	结果
1	0.5	0.5	0.5	0.5	
2	0.5	0.5	—	1.0	
3	0.5	—	0.5	1.0	

- (3) 把上述各管放置于37℃水浴箱中,水浴15~30min。

【结果观察】

观察溶血现象:在含有抗原(绵羊红细胞)、抗体(溶血素)、补体三种成分的试管中,出现红细胞溶解、液体透明的现象,而另两支试管内的液体仍然混浊。

(吴林青)

实验五 玻片凝集试验

大分子颗粒性抗原(如细菌、红细胞等)与其相应的抗体结合,在适量电解质存在及合适的温度下,经过一定的时间可出现肉眼可见的凝集现象,称为凝集反应。试验中的抗原