



中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

微生物学与免疫学实验

第2版

主 编 邓祖军



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

微生物学与免疫学实验

第2版

主 编 邓祖军

主 审 刘琥琥

副主编 王卓娅 袁保红

编 者 (按姓氏笔画排序)

王卓娅 (广东药科大学)

邓祖军 (广东药科大学)

刘琥琥 (广东药科大学)

袁保红 (广东药科大学)

黄雅丽 (广州中医药大学)

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本教材将 173 个实验有机组合编写成 12 个实验组,分成三篇。在第一篇(免疫学实验)中,除了编写常规免疫技能实验(实验一)外,还沿着非特异性免疫、特异性免疫、超敏反应这条主线,用 22 个理论验证性实验编写成 3 个综合实验(实验二~四)。第二篇(微生物学基本技能实验)围绕着需氧性细菌、厌氧性细菌、真菌和病毒的形态观察方法,分离与培养技术,常规鉴定及分子鉴定方法等内容编写了 4 个综合性、系统性较强的全新主题实验(实验五~八),可全面指导学生完成常见微生物类型的分离培养与鉴定实验。第三篇(微生物应用与综合设计实验)则编写了 4 个应用性较强的综合设计类实验,以加强对学生微生物应用相关技术的培养。本教材最多可供 54 个实验学时使用。

本教材供高等院校临床、预防、基础、口腔、药学、护理、中药学和生物技术各专业本、专科学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学与免疫学实验 / 邓祖军主编. —2 版. —北京: 科学出版社, 2017.7

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-053904-5

I. ①微… II. ①邓… III. ①医学微生物学-实验-高等学校-教材
②医学-免疫学-高等学校-教材 IV. ①R37-33 ②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 153568 号

责任编辑: 胡治国 周 园 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

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>

三河市书文印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 8 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2017 年 7 月第 二 版 印张: 14 1/2 插页: 1

2017 年 7 月第十次印刷 字数: 341 000

定价: 52.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)



前言

免疫学与微生物学是临床医学、预防医学、药学、中药学和生命科学各专业学生的两门重要专业基础课程。免疫学与微生物学的理论体系是在长期科学实验基础上建立和发展的，其实践性很强。因此，实验课教学是加强理论课教学、提高教学质量的重要环节。进入 21 世纪后，这两门课程的教材已经更换为面向新世纪的新版教科书。为了配合新教材，充实实验教学内容，使学生有一本内容较全面、实用性较强的实验课教材，我们对《微生物学与免疫学实验教程》进行了改版（第 2 版），以便更好地满足临床医学、预防医学、药学、中药学和生物技术各专业的本、专科学生的使用要求。新版教材在忠于第 1 版编写原则的基础上，主要体现以下几个新特点。

（1）加强细节处理，进一步提高实验内容的操作性和实用性。本教材所编写的实验均由编者多次全程亲自动手操作，同时结合了多年教学科研的实践经验，对一些操作要点、难点、涉及实验成功与实验室安全的关键之处，增加照片或示意图直观教学，并配有“特别提示”。

（2）强化了分子生物学相关技术在各实验内容中的渗透。在第 1 版教材中分子生物学相关技术方法涉及较少，而在新版教材中我们将分子生物学相关技术渗透到几个综合性设计实验中（如细菌、放线菌、真菌、病毒的分离培养鉴定实验），而不是像目前多数实验教材那样简单地罗列某些分子生物学技术的操作流程，从而进一步增加了教材的系统性和可操作性。

（3）注重实验内容编写的系统性和综合性，加强学生科研素质的培养。本实验教程编写的 12 个实验组中有 11 个为综合性实验，每一个实验都将涉及某一方面或一个共同主题的有关实验有机地组织在一起，以利于学生在更高层面上、通过实验对某些理论知识进行全面深入地了解。本教材还特别编写了 3 个有关细菌鉴定的系统性综合实验（实验六、十一、十二），从编写实验计划、实验材料准备直至撰写实验报告，全过程指导学生完全独立地完成有关细菌鉴定实验（包括常规生化鉴定，血清学鉴定及分子生物学鉴定），锻炼学生独立操作和解决实际问题的能力，使其对科研过程有初步了解。

（4）补充更新了一些与免疫学、病毒学、细菌学等有关的应用性较强

的实验内容及技术,如增加了胶体金免疫层析诊断技术,细胞因子(白细胞介素-2、转化生长因子 β)相关实验,RT-PCR法检测HCV-RNA,环境、食品与药品微生物的检验技术,细菌的数值分类法及自动化鉴定系统,细菌诱变育种与基因工程相关技术等新内容。

(5) 注重与理论课学习的无缝衔接:除了在实验内容上加强与理论课学习的互补互通外,还在实验教材附录中增加了关于微生物学与免疫学这门课程的复习提纲及习题,便于学生对理论课的复习,从而使得这本教材除了作为实验教材这个功能之外,还可以作为理论课的复习资料使用。

在本实验教程编写过程中,还参考了多本兄弟院校的实验教材及其他文献和著作,努力使本教材成为更有助于学生学习掌握理论知识和实验基本技能的辅助教材。但由于编写时间仓促,学术水平和编写能力有限,不足之处在所难免,恳请各位同道及读者不吝提出宝贵意见。

邓祖军

2016年11月



目 录

实验室守则	1
-------------	---

第一篇 免疫学实验

实验一 常规免疫学诊断技术	3
一、凝集试验	3
二、琼脂扩散试验	5
三、琼脂凝胶免疫电泳	9
四、免疫标记技术	12
五、补体结合试验（半量法）	16
六、非特异性免疫诊断技术	18
实验二 非特异性免疫防御功能	26
一、血-脑屏障作用	26
二、吞噬功能	27
三、溶菌酶溶菌试验	28
四、血清总补体活性测定	29
五、补体溶菌实验	30
实验三 特异性免疫防御功能	32
一、免疫血清（多克隆抗体）的制备	32
二、血清特异性抗体效价测定	34
三、细菌毒素中和实验	36
四、分离外周血单个核细胞	37
五、E 花环形成试验（微量法）	38
六、T 淋巴细胞转化试验	40
七、B 细胞溶血空斑试验	41
八、白细胞介素-2 对 CTLL-2 细胞增殖的促进作用及生物活性单位测定	42
九、转化生长因子 β 对 T 细胞增殖的抑制作用	44
实验四 超敏反应	46
一、动物 I 型超敏反应	46

二、新生儿溶血病诊断试验	47
三、循环免疫复合物检测——PEG 比浊法	48
四、自身抗体类风湿因子的检测	49
五、结核菌素试验	49

第二篇 微生物学基本技能实验

实验五 需氧性细菌基础实验方法与技术	51
一、微生物实验室安全与无菌操作技术	51
二、细菌培养基制备	53
三、需氧细菌培养法	55
四、细菌生长实验	61
五、细菌形态与结构观察技术	63
六、细菌代谢实验及生化鉴定技术	73
七、细菌遗传性状检测技术	85
八、药物体外抗菌实验技术	88
九、细菌致病性研究实验技术	94
十、消毒与灭菌技术	101
十一、细菌菌种的保藏技术	105
实验六 厌氧性细菌人工培养及基本性状观察	113
一、厌氧性细菌的培养	114
二、生物学性状鉴定	116
三、致病性试验	117
实验七 真菌培养、形态观察及鉴定方法	118
一、真菌培养方法	118
二、真菌形态学鉴定方法	119
三、基于 rDNA -ITS 序列分析的真菌分子鉴定方法	121
四、真菌致病性	123
实验八 病毒培养、基本性状观察及检测	126
一、病毒培养法	126
二、病毒抗原的检测	129
三、抗病毒特异性抗体的检测	130
四、病毒核酸的检测	134

第三篇 微生物应用与综合设计实验

实验九 环境与卫生微生物检验技术	142
一、实验室微生物污染状况检测	142
二、食品微生物检验技术	146
三、药品微生物检验技术	149
实验十 细菌诱变育种与基因工程相关技术	162
一、诱变育种与筛选	162
二、噬菌体效价测定及转导实验	164
三、微生物基因文库的构建与应用	167
实验十一 革兰阳性球菌鉴定	172
一、配制培养基	172
二、分离培养	173
三、纯培养	173
四、生物学性状鉴定	174
五、致病性试验	176
六、甲氧西林抗药性金黄色葡萄球菌鉴定（碘淀粉平板法）	178
七、撰写鉴定报告	179
实验十二 肠杆菌科细菌鉴定	180
一、配制培养基	180
二、分离培养	182
三、纯培养	182
四、生物学性状鉴定	183
五、内毒素毒性试验	186
六、药物敏感试验	187
七、病后免疫力检查——肥达试验	187
八、撰写鉴定报告	189
主要参考文献	191
附录	192
附录一 微生物学与免疫学复习提要及习题	192
附录二 微生物学与免疫学复习习题参考答案	216

彩插



实验室守则

学生在实验室有时可能接触感染性病原微生物,为了防止实验室污染和人员感染、确保安全及实验课顺利进行,学生进入实验室后必须严格遵守以下规定。

1. 进入实验室时必须穿好白大衣,不许穿拖鞋,无关物品不许带入室内。
2. 实验室内严禁吃任何食品和饮料,严禁吸烟。
3. 保持肃静,严禁喧哗打闹和随意走动,切勿互相碰撞,以免出现意外事故。

4. 应按照实验教程在教师严格指导下进行实验。对实验材料(特别是灭菌材料及含活菌材料)和实验操作有不明白之处,应仔细阅读实验教程或询问老师弄明白后再正确使用和操作,以期获得正确实验结果并确保安全。

5. 牢固树立安全意识,在使用感染性实验材料过程中应遵守以下规定。

(1) 接触过感染性材料或活菌的吸管、玻片等实验器材,用后应立即投入盛有来苏水的消毒缸内浸泡,其余废弃物及器材应放在指定地方统一处理。

(2) 如不慎将感染性材料污染桌面、地面、书本和衣物,桌面或地面应立即用 2% 来苏水冲洗,书本应用紫外线灯照射半小时,衣物应用苯扎溴铵水浸泡洗净。

(3) 若手上沾有活菌,应立即将手在 2% 来苏水中浸泡 5 分钟左右,再用清水冲洗干净;若不慎将活菌吸入口中,应立即吐到来苏水缸内,然后用 2% 硼酸水充分漱口,必要时内服抗菌药物;若活菌溅入眼睛内,应立即用 1% 蛋白银或眼药水冲洗眼睛。

6. 实验结束后,需孵育的培养物应放至指定的温箱,要按规定时间及时认真观察、正确记录和分析实验结果,并按时独立完成实验报告。所有微生物培养物观察完毕后务必送洗涤室灭菌处理,不得随手乱放,更不得带出实验室。

7. 爱护公物,注意节约实验材料和水电,如损坏实验仪器和器材,应立即向老师报告并进行登记,按学院有关规定赔偿。

8. 保持室内整洁,下课后应归放整理好实验器材,用 2% 来苏水擦洗实验桌面和地面,用消毒液泡手并冲洗干净,脱下白大衣反折好,关好水电门窗后,方可离开实验室。

第一篇 免疫学实验



实验一 常规免疫学诊断技术

目的要求

- (1) 熟悉血清学反应的基本原理、反应条件、反应现象及实际应用意义。
- (2) 掌握凝集反应和琼脂扩散的实验操作和结果判定方法。
- (3) 了解其他免疫学诊断技术的基本原理、操作方法和结果判定方法。

实验内容

一种抗原分子只能与由它刺激产生的对应抗体高度特异结合而发生反应。抗原特异性取决于抗原表位的化学基团性质、数目及其立体构型，而抗体特异性则取决于V区的抗原结合部位与相应抗原表位空间构象吻合的程度。由于抗原与抗体的结合具有高度特异性，因此可利用已知抗体鉴定标本中的未知抗原（或反过来）。

应用免疫学理论和技术进行诊断是医学免疫学的一项基本内容，而常规免疫学诊断技术即是利用体外抗原抗体反应（也称为血清学反应）原理设计的。目前，最为常用的免疫学诊断技术包括凝集反应、沉淀反应、琼脂凝胶免疫电泳、免疫荧光标记、酶免疫技术及补体结合实验等。

在进行体外抗原抗体反应时，当抗原和抗体分子比例最合适时，抗原与抗体结合充分，形成的抗原抗体复合物大且多，出现明显可见反应现象，上清液中几乎无游离的抗原或抗体存在，称为抗原抗体反应的等价带（即平衡区）。当抗原量太少而抗体量太多（抗体过剩）时无沉淀物形成，称为前带现象；而当抗体量太少抗原量太多（抗原过剩）时，称为后带现象。前带现象与后带现象均不会出现可见反应。

测定抗原抗体分子比例是否合适，在进行沉淀反应时，一般用抗原稀释法，即抗体恒量而抗原做系列稀释（如下述单向琼脂扩散实验）；在进行凝集反应时，一般用抗体稀释法，即抗原恒量而抗体做系列稀释（如下述双斐反应）；或者用更为精确的抗原与抗体方阵滴定法。

一、凝集试验

当抗原或抗体其中一种物理状态为颗粒时，抗原与对应抗体特异性结合后，在电解质溶液中颗粒逐渐聚集，形成可见凝集块，称为凝集反应（agglutination reaction）。此反应

可分为直接凝集反应（direct agglutination reaction）和间接凝集反应（indirect agglutination reaction）。

1. 直接凝集反应 在适宜电解质溶液中,天然颗粒性抗原悬液与其对应抗体发生特异性结合,抗体可将颗粒性抗原交叉连接,形成肉眼可见的凝集块,称为直接凝集反应(图 1-1)。

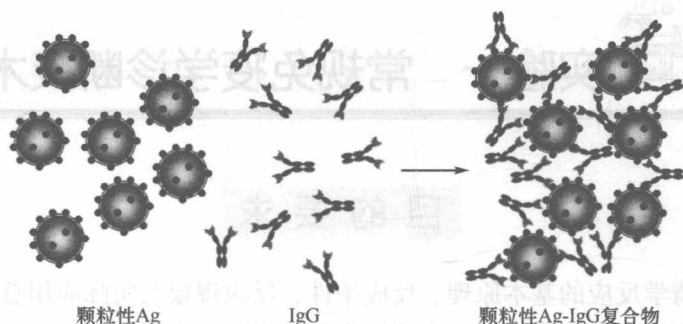


图 1-1 直接凝集反应原理示意图

2. 间接凝集反应 将可溶性抗原吸附于适当的微小颗粒载体表面,称之为抗原性致敏颗粒;若将抗体 Fc 段吸附于颗粒载体表面,则称之为抗体性致敏颗粒,此颗粒表面的 Ig-V 区仍可以与对应抗原特异性结合。常用的颗粒载体有红细胞(间接血凝反应)、胶乳颗粒、明胶颗粒、SPA⁺金黄色葡萄球菌(协同凝集反应)等。

在适宜电解质溶液中,致敏颗粒与相应抗体(或抗原)特异结合后,可出现凝集现象,称为间接凝集反应。

间接凝集反应可分为(正向)间接凝集反应、反向间接凝集反应、间接凝集抑制反应和协同凝集反应四类。

(1) (正向)间接凝集反应:诊断试剂为标准抗原的致敏颗粒,如果被检样品与抗原致敏颗粒混合后出现凝集现象,说明标本中含有对应抗体,此为凝集阳性反应。

(2) 反向间接凝集反应:诊断试剂为诊断抗体的致敏颗粒,如果被检样品与抗体致敏颗粒混合后,凝集阳性反应说明标本中含有与诊断抗体对应的抗原。

(3) 间接凝集抑制反应:诊断试剂为标准抗原致敏颗粒及其对应诊断抗体。先将被检样品与诊断抗体混合反应,再加入标准抗原致敏颗粒。若检测样品中含有与标准抗原相同的抗原,则没有诊断抗体与抗原致敏颗粒结合,不会出现凝集现象,此为阳性反应,说明被检样品中含有目标抗原。

(4) 协同凝集试验:诊断试剂为诊断抗体致敏的 SPA⁺金黄色葡萄球菌。大多数金黄色葡萄球菌细胞壁上有葡萄球菌 A 蛋白(Staphylococcal protein A, SPA)。SPA 是 C 末端连接在金黄色葡萄球菌细胞壁上的一条肽链,其胞膜外肽链部分有 4 个可与人类或动物的 IgG-Fc 段结合的活性区段。当 SPA 与 IgG-Fc 结合后, IgG-Fab 仍保持与相应抗原分子特异性结合的能力,利用这一特性检测各种可溶性抗原的方法,称为协同凝集试验(coagglutination)。

在凝集反应中, IgM 的凝集作用很强,与对应抗原形成的凝集块大,易于肉眼观察;而 IgG 凝集作用较差,若与抗原分子比例不太合适时,可能出现不完全凝集反应,即所形成的 Ag-IgG 复合物小而肉眼不可见。此外,因 Z 电位(zeta potential)可使颗粒互相排斥,

适当增加电解质浓度可降低 Z 电位，促使凝集块形成。

(一) 人 ABO 血型鉴定——玻片凝集试验

玻片凝集试验 (slide agglutination test) 是在载玻片上进行的直接凝集反应，通常是将已知抗体 (诊断血清) 与适量未知颗粒性抗原 (如细菌、红细胞等) 悬液在载玻片上混匀，若出现凝集现象，说明未知抗原与已知抗体特异对应，为定性试验，常用于细菌种属鉴定、人类 ABO 血型鉴定 (determine blood type) 等。

1. 材料

- (1) 样品：自身手指血。
- (2) 诊断试剂：抗 A 血型定型试剂，抗 B 血型定型试剂。
- (3) 其他：无菌采血针，无菌毛细吸管，灭菌生理盐水 (normal saline, NS; 分装小试管：0.5 ml/支)，载玻片，2.5%碘酒棉球，75%乙醇溶液棉球，灭菌干棉球等。

2. 方法

- (1) 采血：用 2.5%碘酒棉球消毒待检者的手指尖端，用 75%乙醇溶液棉球脱碘，待干或用干棉球擦干。用采血针刺破手指，挤出血，用无菌毛细吸管采血 1~2 滴放入小试管内，与生理盐水混匀成红细胞悬液。
- (2) 取清洁玻片 1 张，用油性笔在两边上角标注“A”或“B”，分别在 A 或 B 对应位置上各加 1 滴抗 A 或抗 B 血型定型试剂。
- (3) 用毛细滴管吸取待检红细胞悬液，分别各加 1 滴于抗 A 或抗 B 血型定型试剂中。
- (4) 手持玻片前后倾斜摇动，以使红细胞悬液与血型定型试剂充分混匀 (注意切勿使“A”和“B”两边液体相混)。

3. 结果 边摇边观察有无凝集发生，发生凝集时可见液体澄清，红细胞凝集成小血块；无凝集者红细胞呈均匀分散 (彩图 1)。若 10 min 仍无凝集，判断为阴性结果。如观察不清，可置低倍镜下检查。记录检查结果，参考表 1-1 判断被检者血型。

表 1-1 血型鉴定结果

抗 A 血型定型试剂	抗 B 血型定型试剂	血型
+	-	A
-	+	B
+	+	AB
-	-	O

注：+ 凝集；- 不凝集。

(二) 试管凝集试验

试管凝集试验 (tube agglutination test) 是定性和半定量试验，常用已知抗原检测血清中的相应特异性抗体及其含量，以辅助诊断疾病。一般将被检测血清样品在试管内做递减系列稀释，然后在每支试管中加入定量的已知颗粒性抗原 (如标准菌种) 悬液。若出现凝集现象，说明被检血清样品中含有与已知抗原特异对应的抗体，把出现凝集程度为“++”的血清最高稀释倍数作为样品中抗体的效价 (或滴度)，是定性和半定量试验，如外斐反应、肥达反应等。

具体操作方法参考本实验内容六 (一) 外斐反应。

二、琼脂扩散试验

可溶性抗原与其相应抗体结合形成肉眼可见的沉淀线或环，称为沉淀反应

(precipitation reaction)。根据操作方法和反应介质不同,分为液体中沉淀试验和琼脂扩散试验(agar diffusion test)。目前琼脂扩散试验应用最广。

琼脂(agar)是从石花菜、紫菜、江篱等大型海藻类植物提取出来的藻胶类物质,由琼脂糖(agarose)和琼脂果胶(agaropectin)组成。琼脂糖是一种由1,3连接的 β -D-半乳糖和1,4连接的3,6-脱水 α -D-半乳糖交替组成的线状多聚糖,琼脂果胶是许多结构相似的小分子异质混合物,带硫酸根和羧基组分,凝胶能力差且会造成电内渗。琼脂具有亲水性,极少引起生物大分子变性和吸附,是理想的惰性载体;而且,由于几乎不被细菌、真菌等水解,因此是微生物固体培养基的最佳固形剂。

琼脂(粉)在水中加热到90℃以上溶化成液状,温度下降至约45℃以下时凝结成半固体状的凝胶。在浓度适宜的琼脂凝胶中,琼脂糖纤维聚集成胶束,胶束之间形成微孔状网格,将水分固化。抗原及抗体等蛋白质分子由于分子质量较小,可在凝胶网孔之间的液体中自由扩散。当抗原与抗体结合形成免疫复合物时,由于分子质量常在百万以上,受凝胶网格孔径的限制,不能自由运动,因此在抗原与抗体相遇处停滞,形成沉淀物。

常用的有双向扩散和单向扩散试验。

(一) 双向琼脂扩散试验

在琼脂板上间距适当地打一对孔(或者梅花孔、双排孔、三角孔等),在孔中分别加入可溶性抗原或抗体(图1-2上),当两者自由扩散相遇时可特异性结合,在抗原抗体分子比例合适处可成肉眼可见的沉淀线(图1-2下),称为双向琼脂扩散(double immunodiffusion)试验。由于不同的抗原抗体在琼脂中扩散的速度不同,而一对抗原抗体系统只能形成一条沉淀线,所以在琼脂凝胶中,每一条沉淀线均代表着一对特异对应的抗原和抗体。因此该法主要优点是能够对抗原成分进行精细分析。

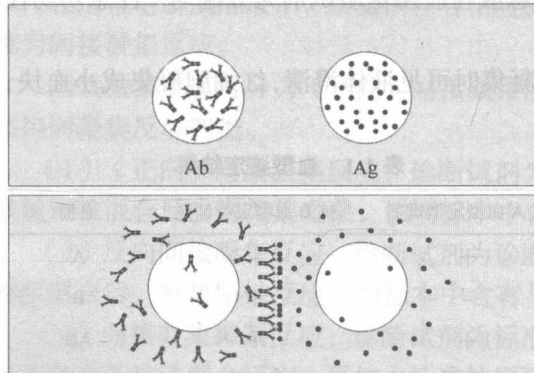


图1-2 双向琼脂扩散原理示意图

1. 血清甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)检测

(1) 材料

- 1) 样品: 待检患者血清。
- 2) 试剂: AFP 诊断血清, 脐带(AFP 阳性)血清, 健康人(AFP 阴性)血清, 1.2% 生理盐水琼脂凝胶。
- 3) 器材: 玻璃平皿($\Phi 60$ mm), 打孔器($\Phi 5$ mm), 微量加样器等。

(2) 方法

- 1) 制备琼脂凝胶板: 取洁净 $\Phi 60$ mm 玻璃平皿1块, 加已煮沸溶化的1.2%琼脂凝胶10ml, 铺成约4 mm厚的琼脂凝胶板。待凝胶凝固后用打孔器按图1-3所示样式打孔, 孔内径5 mm, 孔间距5 mm。通过火焰微微加热, 将凝胶与皿底之间的空隙封闭, 防止样品溶液在孔底流散。

2) 加样: 用微量加样器吸取 50 μl AFP 诊断血清加入中央 7 号孔内; 1 和 4 号孔各加入脐带血清 50 μl ; 作为 AFP 阳性对照; 6 号孔加入健康人血清 50 μl , 作为 AFP 阴性对照; 其余 3 孔分别各加入待检患者血清 50 μl ; (图 1-3)。

3) 将平皿置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 24 h 后观察结果。

(3) 结果: 在琼脂凝胶板上, 1、4 两孔为 AFP 阳性对照, 在它们与中心孔之间各应出现 1 条白色沉淀线(阳性沉淀线)。其余各孔与中心孔之间, 如有沉淀线且与阳性对照线平滑吻合, 表明两条沉淀线为同一, 即受检血清 AFP 阳性。如虽有沉淀线但与阳性对照线不吻合, 则表明两条沉淀线非同一, 为其他抗原抗体的沉淀线, 判断为 AFP 阴性。如果 48 h 后待检血清与中心孔间仍无沉淀线形成, 亦为 AFP 阴性(彩图 2)。

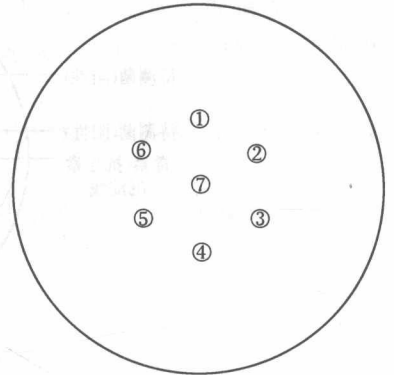


图 1-3 双向琼脂扩散加样图

⑦ 甲胎蛋白免疫血清; ①④ 甲胎蛋白抗原阳性血清; ⑥ 阴性对照血清; ②③⑤ 待检患者血清

检测意义: 甲胎蛋白 (AFP) 主要是胎儿时期产生的胚胎性蛋白, 出生后不久血中就检查不出或者含量极低 ($<40 \text{ ng/ml}$)。AFP 在肝病、原发性肝癌或胚胎性癌等发生时在血液中出现并增加。非妊娠期被检者血液 AFP 定性检测结果如为阳性 (正常情况应该是阴性), 建议进一步进行定量检测。

2. 白喉棒状杆菌毒力试验 (Elek 平板毒力试验)

(1) 材料

1) 菌种: 白喉棒状杆菌产毒阳性菌株和产毒阴性菌株、待测白喉棒状杆菌 37 $^{\circ}\text{C}$ 18~24h 吕氏血清斜面培养物各 1 支。

2) 培养基: Elek 琼脂 (15 ml/管), 小牛血清 (或兔血清)。

3) 试剂: 白喉抗毒素水溶液 (1000 单位/ml)。

4) 器材: 无菌滤纸条 (60 mm $\times$ 15 mm), 无菌空培养皿 ($\Phi 90 \text{ mm}$)。

(2) 方法

1) 将 Elek 琼脂培养基 (15 ml/管) 煮沸溶化, 待冷至 50~55 $^{\circ}\text{C}$ 时, 无菌操作加入小牛血清 3 ml, 混匀后立即倾入无菌平皿内。

2) 琼脂凝胶尚未完全凝固前, 将浸有白喉抗毒素溶液的灭菌滤纸条平铺在平板中央 (在未贴前, 滤纸条上过剩的抗毒素溶液应使滴尽), 再放 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 1 h, 烘干表面水分。

3) 用接种环分别刮取白喉棒状杆菌产毒阳性及阴性菌株、待测白喉棒状杆菌的大量菌苔, 如图 1-4 所示划线接种于滤纸条两侧, 接种线紧靠滤纸条边缘并与纸条垂直, 平板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24、48、72 h 后观察结果。

(3) 结果: 肉眼直接观察, 白喉棒状杆菌产毒阳性菌株, 因能产生白喉毒素, 在距离滤纸条约 1cm 处, 形成一条喷泉式白色沉淀线。待检标本如为产毒菌株, 会出现与阳性菌株沉淀线相吻合的白色沉淀线。不出现沉淀线则为阴性菌株, 与已知阴性菌株结果相同 (图 1-4)。

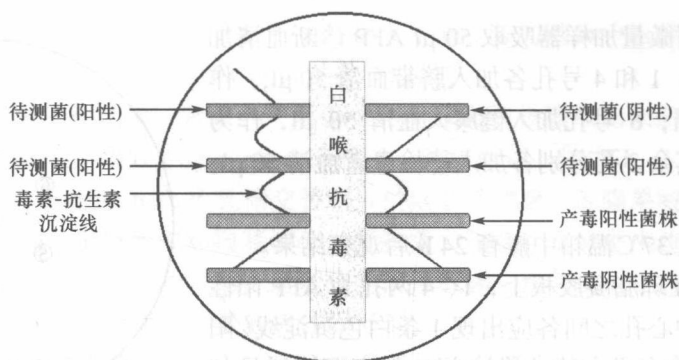


图 1-4 Elek 平板毒力试验

(二) 单向琼脂扩散试验

单向琼脂扩散 (single radial immunodiffusion) 是指可溶性抗原或抗体分子, 其中一种固定在琼脂凝胶中, 另一种则自由扩散。一般是将一定量的抗体混合于溶化的琼脂凝胶内倾注于玻璃板上, 待胶凝固后打孔, 将标准抗原与未知抗原分别加于孔中, 使其在凝胶中向四周扩散。抗原与相应抗体在琼脂凝胶内结合后形成白色沉淀环, 沉淀环直径的大小与抗原浓度成正比。用不同浓度的标准抗原 (参考血清) 扩散后制成标准曲线, 根据所测样品沉淀环直径即可从标准曲线中求出样品抗原的含量。若将抗原固定在琼脂凝胶中, 而抗体在琼脂凝胶中自由扩散, 则称为反向单向琼脂扩散。

1. 材料

(1) 样品: 待检人血清。

(2) 试剂: 羊抗人 IgG 诊断血清 (单扩效价 1 : 80), 标准冻干人 IgG (标准抗原), pH7.2 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS), 3% 琼脂凝胶 (用 pH7.2 PBS 配制, 内加 1% NaN₃ 防腐)。

(3) 器材: 玻璃板 (60 mm × 100 mm), 打孔器 (Φ3 mm), 吸管, 微量加样器, 半对数坐标纸, 湿盒, 56℃ 水浴箱等。

2. 方法

(1) 配制诊断血清: 按实际测定效价, 用 PBS 将羊抗人 IgG 血清作 1 : 40 稀释, 保温于 56℃ 水浴中。

(2) 制备琼脂胶板: 将 3% 琼脂煮沸溶化后, 保温于 56℃ 水浴中。在抗血清和琼脂均为 56℃ 时, 两者等量混匀后 (此时抗血清浓度为 1 : 80, 琼脂的浓度为 1.5%) 浇板, 制成厚约 2 mm 的琼脂胶板, 冷却凝固后, 按图 1-5 所示样式用打孔器打孔, 孔径 3 mm, 孔间距 20 mm。

(3) 配制标准抗原稀释液: 每支标准冻干人 IgG 加入蒸馏水 0.5 ml, 待完全溶解后, 用 PBS 作 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80 精确稀释, IgG 相应含量 (μg/ml) 可根据说明书标示量计算。

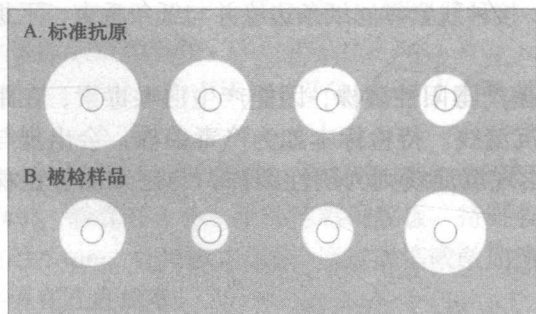


图 1-5 单向琼脂扩散试验沉淀环示意图

(4) 加样：用加样器吸取各种稀释度的标准抗原 10 μl 准确地分别加入琼脂板的孔中，一种稀释度加两个孔。测待检血清时，先将被检血清用 PBS 做 1 : 40 稀释，每份标本加两个孔，每孔加 10 μl 。

(5) 将琼脂板置于湿盒中，在 37℃ 恒温箱中过夜取出，用游标卡尺测量沉淀环直径(图 1-5)。

(6) 以标准抗原各孔沉淀环的直径值为横坐标，相应孔中的 IgG 含量为纵坐标，在半对数坐标纸上绘出标准曲线(图 1-6)。

3. 结果 根据被检血清标本孔沉淀环的直径，查标准曲线，将查到的 IgG 含量乘以标本的稀释倍数(40 倍)，即为血清中 IgG 的含量。

三、琼脂凝胶免疫电泳

琼脂凝胶免疫电泳(gel immunoelectrophoresis)技术即是 将琼脂免疫扩散放在电场中进行，这种免疫电泳技术使抗原和抗体在电场中定向泳动，并大大加快了抗原抗体的扩散速度，缩短了反应时间，提高了检测抗原或抗体的灵敏度和分辨力。常用的有对流免疫电泳、火箭电泳、免疫电泳等。

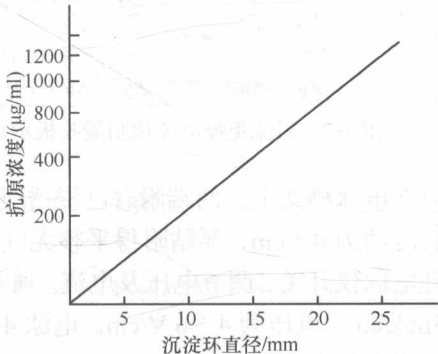


图 1-6 单向琼脂扩散试验的标准曲线

(一) 对流免疫电泳

对流免疫电泳(counter immunoelectrophoresis, CIEP)是双向琼脂扩散与电泳相结合的一种技术。在电场中，缓冲液为 pH8.6，蛋白质抗原与抗体 IgG 均带负电荷，应向正极泳动。而琼脂凝胶中含有硫酸根、羧酸等带负电荷的基团，使琼脂凝胶带负电荷。在电场力的作用下，凝胶本身不能向正极移动，因此凝胶中的水在水合氢离子(H_3O^+)的作用下向负极移动，这就是电渗(electro-endosmose)作用。由于蛋白质抗原等电点较低(pI 为 4~5)且分子质量相对较小，在电场中带负电荷数较多且质量较轻，其电泳力能克服电渗作用使之保持向正极泳动；而抗体 IgG 由于等电点较高(pI 为 6~7)且分子质量大，在电场中带负电荷数较少且质量较大，其电泳力不能克服电渗作用使之反而向负极泳动，致使抗原和抗体在电场中相向泳动，如果抗原与 IgG 对应，可在相遇的最适分子比例处形成白色沉淀线。

1. 材料

(1) 样品：待检患者血清。

(2) 免疫试剂：甲胎蛋白(AFP)诊断血清，脐带(AFP 阳性)血清，健康人(AFP 阴性)血清。

(3) 电泳试剂：0.05 mmol/L pH8.6 巴比妥-巴比妥钠缓冲液，1%巴比妥-巴比妥钠缓冲液琼脂凝胶。

(4) 器材：玻璃板(75 mm×25 mm)，打孔器($\Phi 3$ mm)，微量加样器，电泳仪，平板电泳槽等。