

国家级实验教学示范中心

基础医学实验教学系列教材

第3版

医学免疫学与 病原生物学实验

主编 周亚滨



科学出版社

国家级实验教学示范中心
基础医学实验教学系列教材

医学免疫学与病原生物学 实验

第3版

主 编 周亚滨

副主编 郭淑玲 齐 眉 王晓燕

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 红 王晓燕 朱法良 齐 眉

刘 娟 肖 颖 何深一 周亚滨

周怀瑜 郭淑玲 胡晓燕 袁方曙

高立芬 唐 伟 曹 倩 程轶喆



科学出版社

北 京

内 容 简 介

实验教学是医学教育的重要内容,是培养实践能力和创新精神的创新型人才的重要环节。在积累多年实验教学经验的基础上,结合当今先进的医学免疫学、医学微生物学及人体寄生虫学实验技术,融合数字化实验教学资源,我们编写了涵盖这三个学科的实验教材。本教材包括三篇:第一篇为基本实验,按学科分属3章,培养学生的基本操作技能;第二篇为融合实验,培养学生的综合分析能力;第三篇是创新实验,培养学生的独立思考 and 创新能力。

本实验教材概念准确、文字简明,层次清晰、使用方便。本教材可供医学类各专业不同层次学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学与病原生物学实验 / 周亚滨主编. —3 版. —北京:科学出版社, 2018.6

基础医学实验教学系列教材

ISBN 978-7-03-058025-2

I. ①医… II. ①周… III. ①医药学-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(2018)第 131739 号

责任编辑:张天佐 胡治国 / 责任校对:郭瑞芝

责任印制:张欣秀 / 封面设计:王 融

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>

北京虎彩文化传播有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 8 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 7 月第 二 版 印张:10 1/2

2018 年 6 月第 三 版 字数:255 000

2018 年 6 月第十一次印刷

定价:45.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

医学教育的终极目标是培养有社会主义觉悟、基础理论扎实、实践能力强的医学人才。实验教学是整个医学教育过程的重要组成部分，是培养合格医学人才的一个重要环节，它与课堂理论教学具有同等重要的意义。

传统的实验教学方法多侧重于演示性和验证性实验，这些实验内容很难适应人才培养的要求，而综合性、设计性实验能激发学生的创新意识，培养学生的创新能力、综合应用能力，使学生初步掌握科学研究的思维方式、分析问题和解决问题的方法。

虚拟仿真实验是将现代信息技术融入实验教学之中，拓展了实验教学内容的广度和深度、延伸了实验教学的时间和空间、提升了实验教学的质量和水平。

第3版《医学免疫学与病原生物学实验》是在我们积累多年实验教学经验及进行实验教学改革的基础上，结合当今先进的医学免疫学、医学微生物学及人体寄生虫学实验技术，并使用现代化的信息技术手段，融入了虚拟仿真实验内容而编写的。本实验教材将病原生物学与医学免疫学有机地结合起来，同时通过扫描植入的二维码，使学生可以方便地使用数字化实验教学资源，虚实结合，拓展了学生的学习空间，丰富了教材的内容。本教材中涉及的数字化素材均来自山东数字人科技股份有限公司的“数字人虚拟仿真教学系统”。

本教材共分三篇：第一篇为基本实验，包括微生物学、免疫学、寄生虫学研究所涉及的基本实验技术，分三章加以论述。第二篇为融合实验，该部分设计的每一个实验内容，均涉及两到三个相关的学科，变单独实验为系列实验，把有关实验内容有机地串联起来，培养学生综合使用实验技术及解决问题的能力。第三篇为创新实验，在前两部分学习的基础上，给出课题范围，由学生自主设计实验方案、实验方法，教师加以点评。旨在激发学生的创造潜能，吸引学生自觉地参与到新的实验内容中去，提高学生分析问题和解决问题的能力，培养学生的创新意识和创新能力。本教材可供医学类各专业不同层次学生使用。

我们对实验教学的改革及其教材内容的编写一直在进行新的尝试，不足之处在所难免，恳请同行批评指正。

编 者

2018年3月

目 录

第一篇 基本实验

第一章 医学免疫学基本实验	1
实验一 巨噬细胞吞噬功能实验	1
实验二 凝集反应	2
实验三 沉淀反应	6
实验四 补体结合实验	8
实验五 酶联免疫吸附实验	10
实验六 人外周血单个核细胞的分离和小鼠骨髓细胞的获取	13
实验七 E-玫瑰花环形成实验	15
实验八 豚鼠过敏实验——I型超敏反应	16
第二章 医学微生物学基本实验	18
实验一 细菌的形态和特殊结构观察	18
实验二 细菌的培养	23
实验三 细菌菌落计数	29
实验四 细菌的生理	31
实验五 物理、化学及生物因素对细菌的影响	34
实验六 细菌的变异性实验	39
实验七 细菌的致病性实验	41
实验八 结核分枝杆菌的培养	42
实验九 细菌质粒 DNA 的提取	43
实验十 病毒的观察	45
实验十一 病毒的培养	46
实验十二 病毒的定量测定	52
实验十三 病毒的血清学实验	54
实验十四 支原体、衣原体、立克次体、螺旋体的形态观察及血清学实验	58
实验十五 真菌、放线菌的培养方法与形态观察	61

第三章 人体寄生虫学基础实验	66
实验一 总论 线虫(1)	66
实验二 线虫(2)	68
实验三 线虫(3)	73
实验四 吸虫(1)	76
实验五 吸虫(2)	79
实验六 绦虫	82
实验七 医学原虫(1) 溶组织内阿米巴和非致病阿米巴	85
实验八 医学原虫(2)	89
实验九 医学原虫(3)	93
实验十 机会致病原虫	97
实验十一 医学节肢动物(1)	99
实验十二 医学节肢动物(2)	105
实验十三 医学节肢动物(3)	110

第二篇 融合实验

实验一 小儿腹泻的病原体检测	115
实验二 化脓性球菌的分离鉴定	121
实验三 病原性真菌的检查法	123
实验四 流感病毒的分离、鉴定	125
实验五 TORCH 感染的检测	128
实验六 盲肠结扎穿孔术诱导多细菌性脓毒症小鼠模型的微生物学与免疫学分析	129
实验七 白假丝酵母菌生物被膜形成实验	132
实验八 日本血吸虫家兔模型建立和鉴定	133
实验九 食用猪肉和淡水鱼的寄生虫学检疫	135
实验十 肺孢子虫动物模型的建立	136
实验十一 B 淋巴细胞免疫功能的检测	137
实验十二 T 淋巴细胞免疫功能检测	139
实验十三 NK 细胞功能检测	143
实验十四 多克隆抗体的制备与检测	145
实验十五 伤寒沙门菌感染小鼠后 T 细胞亚群的检测	146

实验十六 肿瘤坏死因子的诱生及活性测定	147
---------------------------	-----

第三篇 创 新 实 验

实验一 运用你所掌握的实验技术检测环境及人体中细菌、真菌的分布及种类	150
实验二 如何确定一个中华支睾吸虫（肝吸虫）病的流行区	151
实验三 暴发性腹泻的流行病学调查和控制方案	152
实验四 “蜱咬性发热伴血小板减少综合征”传播媒介调查和控制方案	152
实验五 庭院蚊虫的调查和控制方案	153
实验六 人体蠕形螨感染的检查	153
实验七 流式细胞术检测 Th1 淋巴细胞功能	153
实验八 如何利用实验方法检测 T 细胞亚群	154
实验九 如何进行骨髓移植前的 HLA 配型	154
实验十 DC 的诱生与鉴定	155
实验十一 巨噬细胞活性测定	157
实验十二 基因工程疫苗的设计及其免疫效果的实验室评价	158
实验十三 利用实时荧光定量 PCR 技术进行病原体诊断与分析	158
实验十四 基因芯片技术在病原微生物鉴定与研究中的应用	159
实验十五 病原生物实验室生物安全	160

第一篇 基本实验

第一章 医学免疫学基本实验

实验一 巨噬细胞吞噬功能实验



【原理】巨噬细胞 (macrophage, $M\Phi$) 作为单核-吞噬细胞系统的主要细胞, 具有活跃的吞噬功能。能清除体内抗原物质及变性的细胞, 在特异性及非特异性免疫中均起重要作用。 $M\Phi$ 受抗原刺激后活化, 可使其吞噬功能明显增强。在此, 介绍两种检测小鼠腹腔 $M\Phi$ 吞噬功能的方法:

1. 体内法 在小鼠体内诱导腹腔巨噬细胞产生后, 再给小鼠腹腔注射白色念珠菌, 30 分钟后处死小鼠, 取出腹腔液, 以冷亚甲蓝染色, 高倍镜下计数吞噬白色念珠菌的百分数, 及观察 $M\Phi$ 内因被杀死而染为蓝色的白色念珠菌的形态、数目, 以判断 $M\Phi$ 的杀伤能力, 由此间接地测定机体的非特异免疫水平。

2. 体外法 在体外将小鼠腹腔 $M\Phi$ 与白色念珠菌按比例混合、温育, 以冷亚甲蓝染色, 高倍镜下进行观察, 观察指标同上。

【材料】

- (1) 动物: 昆明种小鼠, 6~8 周龄 (雌或雄, 20~22g)。
- (2) 白色念珠菌悬液: 接种于沙氏培养基的白色念珠菌, 28℃ 培养 18~24 小时, 生理盐水洗涤, 配成 1×10^7 个/ml 真菌悬液。
- (3) 6% 无菌淀粉溶液、无菌性注射器、针头、Hank's 液 (含 5% 小牛血清)。
- (4) 0.03% 亚甲蓝溶液 (4℃ 存放)、华氏管、滴管。

【方法】

1. 体内法

- (1) 试验前 3 天, 小鼠腹腔注射 6% 无菌淀粉溶液 1ml, 诱导巨噬细胞渗出至腹腔中。
- (2) 实验时, 每只小鼠腹腔注射白色念珠菌菌液 1ml, 轻揉腹部, 使菌液在腹腔中分布均匀, 利于 $M\Phi$ 吞噬。
- (3) 30 分钟后, 将小鼠拉颈处死, 固定, 打开腹腔暴露肠管, 用滴管取出腹腔液, 均匀涂布于载玻片上, 然后再滴一小滴 0.03% 冷亚甲蓝溶液, 盖上盖玻片。
- (4) 高倍镜下进行观察, 计数。

2. 体外法

- (1) 将 6% 无菌淀粉溶液 1ml 注入小鼠腹腔。
- (2) 72 小时后, 拉颈处死小鼠, 剖腹, 吸取腹腔液, 1000r/min 离心 5 分钟, 收集 MΦ。
- (3) 以 Hank's 液洗涤 MΦ, 1000r/min 离心 5 分钟, 重复两次。
- (4) 计数 MΦ, 以 Hank's 液配制 1×10^6 个/ml 细胞悬液。
- (5) 取华氏管, 加入等量的 1×10^6 个/ml 的 MΦ 悬液及 1×10^7 /ml 白色念珠菌菌液。
- (6) 37℃, 温育 30 分钟 (中间摇动试管两次)。
- (7) 500r/min 离心 5 分钟, 弃上清液。
- (8) 轻轻振荡试管, 取悬液 1 滴加至载玻片, 取冷亚甲蓝 1 滴, 混匀后, 加盖玻片。
- (9) 高倍镜观察并计数。

【结果】

1. 计算方法

- (1) 吞噬百分率 = $\frac{100 \text{ 个 M}\Phi \text{ 内发生吞噬的 M}\Phi \text{ 数}}{100} \times 100\%$
- (2) 吞噬指数 = $\frac{\text{发生吞噬的 100 个 M}\Phi \text{ 内含有的白色念珠菌数}}{100 (\text{发生吞噬的 M}\Phi \text{ 数})} \times 100\%$
- (3) 杀菌率 = $\frac{\text{被吞入的白色念珠菌中死亡数}}{\text{被吞入的白色念珠菌数}} \times 100\%$
(杀死的细菌呈蓝色, 活菌不着色)

2. 正常值

- (1) 吞噬百分率: 62.77 ± 1.38 。
- (2) 吞噬指数: 1.058 ± 0.049 。
- (3) 杀菌率: 因激活条件、观察计数时间的不同而表现不同 (计算杀菌率应减去白色念珠菌的自然死亡率)。

【注意事项】

- (1) 吞噬用的白色念珠菌菌龄应在 18~24 小时内, 不能有假菌丝及出芽现象。
- (2) MΦ 数与白色念珠菌数要计数准确, 温育时其比例为 MΦ: 白色念珠菌 = 1: 10。
- (3) 温育时要摇动 2~3 次, 以免 MΦ 与白色念珠菌沉于管底。

实验二 凝集反应

抗原与相应抗体相遇, 可发生特异性结合, 并在外界条件的影响下呈现某种反应现象, 如凝集或沉淀。此原理可用已知抗原 (或抗体) 检测未知抗体 (或抗原)。实验所采用的抗体常存在于血清中, 因此又称为血清学反应。

一、直接凝集反应

直接凝集反应是指颗粒性抗原 (如完整的细菌或细胞) 与相应抗体在体外直接结合而出现的凝集反应。

直接凝集反应又可分为玻片凝集和试管凝集。

(一) 玻片凝集实验 (人 ABO 血型鉴定)

玻片凝集是用已知抗体与未知颗粒性抗原在玻片上直接结合而出现的凝集反应。

这类反应较简单、迅速,常用于抗原或抗体的定性检测,如细菌的鉴定、分型及 ABO 血型鉴定。这里介绍人类的 ABO 血型鉴定方法。

【原理】 ABO 血型系统是按照血液中红细胞表面的抗原分子来命名的。人类 ABO 血型抗原有两种: A 抗原和 B 抗原。A 型血红细胞表面有 A 抗原, B 型血红细胞表面有 B 抗原, AB 型血红细胞表面有 A、B 两种抗原,若红细胞表面无这两种抗原,则为 O 型血。

若用已知的抗 A 血清和抗 B 血清与受试者红细胞上的相应抗原结合,即可能引起红细胞凝集,据凝集状况便可判定出受试者的血型。

【材料】

- (1) 标准抗 A 血清、抗 B 血清。
- (2) 玻片、乙醇溶液、碘酒、无菌三棱采血针、无菌木棒、无菌棉球。

【方法】

- (1) 取洁净载玻片 1 张,用蜡笔分为 2 格,注明 A、B 字样。
- (2) 倒置标准抗血清试剂瓶,悬空轻挤出抗 A 血清 1 滴,滴加在 A 格内;同法在 B 格内加抗 B 血清 1 滴。
- (3) 消毒左手无名指指尖,待乙醇自然干燥后,用无菌采血针快速刺破皮肤。
- (4) 用木棒的两端取血,分别在抗 A 血清和抗 B 血清中搅拌混匀。
- (5) 无菌干棉球压迫手指止血。
- (6) 静置玻片数分钟,在白色背景下观察凝集结果。

【结果】 混合液由红色均匀混浊逐渐变为透明,并出现大小不等的红色凝集块者,为红细胞凝集。混合液仍呈均匀混浊,则未发生凝集。根据结果可判断血型(表 1-1-1)。

表 1-1-1 血型的判断

血型 抗血清	A	B	AB	O
抗 A 血清	+	—	+	—
抗 B 血清	—	+	+	—

【注意事项】

- (1) 载玻片标明 A、B,不要让两种抗血清混合。
- (2) 采血前要消毒手指,在乙醇干燥前不要采血,以免乙醇破坏红细胞。
- (3) 木棒的两端不可混用。
- (4) 及时观察结果。
- (5) 对被血液污染的用品在废弃前,要定点放置,集中进行严格的消毒,以防传播疾病。例如,沾血的载玻片浸泡在 84 消毒液中,木棒、采血针、棉球要高压处理。

(二) 试管凝集实验



【原理】 此次实验是以定量的伤寒菌为抗原，以梯度稀释的待检动物血清为抗体，根据是否发生凝集反应，来检测血清中是否含有对应的抗体；并根据各管凝集程度的不同，来判断抗体的效价。应用此原理可帮助临床诊断和判断病人的病程、预后等。

【材料】

- (1) 灭活的伤寒菌液 ($7 \times 10^8/\text{ml}$)。
- (2) 待检的动物血清 (经伤寒“H”免疫)。

【方法】

- (1) 取试管 6 支，用红笔标记好顺序，依次放在试管架中。
- (2) 于第 1 管内加生理盐水 0.9ml，其余各管加生理盐水 0.5ml。然后在第 1 管中加入伤寒免疫血清 0.1ml，用吸管将它与生理盐水吹打混匀后，取出 0.5ml 加入第 2 管中；再将第 2 管中的液体吹打混匀，取出 0.5ml 加入到第 3 管中，其余各管都照此方法将血清对倍稀释。至第 5 管时，将试剂混匀后，取出的 0.5ml 弃去不用。使第 6 管不含伤寒免疫血清，作为实验的阴性对照管。最后在各管中都加入 0.5ml 伤寒菌液。加样量如表 1-1-2 所示：

表 1-1-2 试管凝集实验的加样表 (单位: ml)

试管号	1	2	3	4	5	6
生理盐水	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
伤寒免疫血清	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	弃 0.5
伤寒菌液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最终稀释度	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	对照

- (3) 轻摇试管架，混匀试管内液体，56℃水浴 1~2 小时，观察结果。

【结果】

- 1. 对照管 (第 6 管) 上清液混浊，管底可有沉淀的细菌，轻摇后分散呈均匀混浊。
- 2. 实验管 按 1~5 管依次观察。阳性者管底有不规则凝集物，较松散。阴性者与对照管相同。
- 3. 凝集程度的判断
 - ++++: 液体澄清透明，细菌全部凝集于管底，轻摇可见大的凝集块。
 - +++ : 液体稍混浊，细菌大多数凝集于管底，摇动后凝块较前者小。
 - ++ : 液体中等混浊，液体中有明显的凝集物，凝集块较小。
 - +: 液体混浊，仔细观察可以看到液体中有很小的凝集颗粒。
 - : 与对照管相同。
- 4. 判断凝集效价 出现明显可见凝集物 (++) 时的血清最高稀释度为血清效价。

【注意事项】

- (1) 试管要做标记, 不同试剂的吸管勿交叉混用。
- (2) 在对倍稀释伤寒免疫血清时, 要混匀后再加入下一试管。
- (3) 加样要准确, 避免有气泡干扰。
- (4) 加样后要轻摇混匀, 再进行水浴。
- (5) 水浴时避免水滴落入试管内, 影响结果。
- (6) 实验结束时, 小心轻取出试管, 以免凝集物分散, 影响观察。
- (7) 先观察对照管的结果, 判断实验可信性; 然后观察实验管。

二、间接凝集反应

颗粒性抗原与相应抗体的反应可用直接凝集来定性、定量。而可溶性抗原与相应抗体的反应不能发生肉眼可见的直接凝集现象。借鉴直接凝集反应的原理, 把可溶性抗原附加在颗粒性物质——载体上, 使之成为人工的颗粒性抗原, 然后与相应的抗体混合, 观察间接凝集现象。

间接凝集反应是将可溶性抗原(或抗体)先吸附或偶联在与免疫无关、有一定大小的颗粒性物质(载体)上, 然后再与相应抗体(或抗原)反应而出现的凝集反应。常用作载体的物质有红细胞、聚苯乙烯胶乳颗粒、金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)等。根据载体的不同, 间接凝集反应可分为血凝抑制试验、胶乳凝集试验、协同凝集试验等。

本文只介绍用于诊断妊娠的胶乳凝集试验。

【原理】 以聚苯乙烯胶乳颗粒作为载体, 抗原致敏的胶乳颗粒与相应抗体结合能发生凝集。如果先将抗体与可溶性抗原作用, 然后加入抗原致敏的胶乳颗粒, 则不出现凝集, 称为胶乳凝集抑制试验。

妊娠妇女尿液中含有人绒毛膜促性腺激素(the human chorionic gonadotropin, HCG), 将待测尿液与抗 HCG 的血清混合, 该尿液中的 HCG 与抗血清结合, 消耗了抗 HCG 血清。然后加入 HCG 致敏的胶乳颗粒, 无抗 HCG 血清与之反应, 不能发生凝集, 为妊娠试验阳性。如果待测尿液中没有 HCG, 则致敏胶乳颗粒与抗 HCG 血清结合, 发生凝集, 称为妊娠试验阴性。

【材料】

- (1) HCG 致敏的胶乳抗原。
- (2) 抗 HCG 的血清。
- (3) 妊娠妇女尿与未妊娠妇女尿。
- (4) 妊娠试验板, 滴管。

【方法】

- (1) 在试验板的相邻两孔中分别加入 1 滴妊娠妇女尿和未妊娠妇女尿。
- (2) 在上述两孔中分别悬空加入 1 滴抗 HCG 的血清, 轻摇混匀 1~3 分钟。
- (3) 在上述两孔中分别悬空加入 1 滴致敏胶乳抗原, 轻摇混匀 1~3 分钟, 观察结果。

【结果】 出现白色细小凝集颗粒者为妊娠试验阴性, 不出现凝集者呈白色混浊液, 为妊娠试验阳性。

【注意事项】

- (1) 标本和试剂应按顺序加入。
- (2) 滴加抗 HCG 血清和胶乳抗原时应悬空加入, 以免污染试剂。
- (3) 加入试剂时液滴大小应均匀。

实验三 沉淀反应

可溶性抗原与相应抗体结合, 在一定条件下出现沉淀线/环的现象, 称为沉淀反应。常用的沉淀反应有环状沉淀反应、絮状沉淀反应、琼脂扩散及免疫电泳等。

琼脂扩散实验是指可溶性抗原与抗体在琼脂内扩散, 若两者对应且比例适当, 则出现白色沉淀线/环。琼脂是大分子多糖, 100℃时熔化, 45℃以下凝固而形成网状结构, 允许抗原抗体分子在其中自由扩散。琼脂扩散实验又可分为单向和双向扩散, 只有抗原或抗体扩散的实验称为单向扩散, 可用于定量检测; 抗原与抗体都发生扩散的试验称为双向扩散, 常用于定性检测。

一、单向琼脂扩散实验

【原理】 单向琼脂扩散试验是定量实验, 通常是用已知抗体测定未知抗原。实验中将定量的抗体混合于琼脂内, 倾注于玻片上, 制成含抗体的琼脂板, 凝固后打孔。再将待检抗原加入孔内。因抗体与琼脂混合凝固, 抗体的浓度均匀, 只有孔中抗原向四周扩散, 离孔越远浓度越低, 这样在抗原、抗体比例合适处形成白色沉淀环。由于只有抗原扩散, 故称为单向扩散。

观察结果可发现, 在同样的反应条件下, 沉淀环的直径大小与抗原浓度成正比。以不同浓度的标准抗原与固定浓度的抗血清反应形成的沉淀环的直径为纵坐标, 以抗原浓度为横坐标, 绘制标准曲线。量取待测抗原出现的沉淀环直径, 从标准曲线中即可求得其含量。本实验可用于检测标本中各种免疫球蛋白或血清补体含量。

【材料】

- (1) 人免疫球蛋白 IgG 的诊断血清 (冻干羊抗人 IgG)。
- (2) 人免疫球蛋白标准血清, 待检人血清。
- (3) 琼脂、玻片、打孔器、加样器、湿盒、37℃恒温箱等。
- (4) 生理盐水配制的 2%琼脂。

【方法与结果】

(1) 制板: 按抗血清效价的一半, 用 56℃预热的生理盐水稀释抗血清, 再加入等量的冷却至 56℃的琼脂轻轻混匀。用 5ml 吸管吸取 3ml 含抗血清的琼脂均匀加到玻片上, 凝固后放入 4℃冰箱 5 分钟。

(2) 打孔: 以打孔器打孔, 孔径 3mm, 孔距 1cm, 每板 2 排, 每排 5 个孔。

(3) 按说明书要求稀释标准血清与待检血清。待检血清 1:50 稀释, 标准血清系列稀释至 1:12.5、1:25、1:50、1:100、1:200。

(4) 加样：用微量加样器在第一排孔中依次加入不同稀释度的人标准血清 $10\mu\text{l}$ ，第二排相邻孔中加待检血清各 $10\mu\text{l}$ 。

(5) 将琼脂板放入湿盒， 37°C 24 小时后测各沉淀环直径。

(6) 以沉淀环直径为纵坐标，相应孔的 IgG 含量为横坐标，在半对数纸上制作标准曲线。根据待检血清沉淀环直径查标准曲线，将查得的 IgG 含量乘以标本的稀释倍数，即为待检血清中的 IgG 含量。

【注意事项】

(1) 灌板时，要将抗血清 56°C 预温，与冷却至 56°C 的琼脂混匀后，迅速灌板，避免产生气泡。

(2) 加样时避免碰坏孔壁。

(3) 孔间距不能小于 1cm 。

二、双向琼脂扩散实验

【原理】 双向琼脂扩散试验是定性实验。将可溶性抗原与相应抗体分别加入琼脂板上的孔内，两者均可扩散，在抗原抗体比例适宜处形成可见的沉淀线。如果不是相应的抗原与抗体，就不出现沉淀线。本试验常用于分析抗原抗体的纯度及相互关系。

【材料】

(1) 羊抗人 IgG 标记为 Ab，待测抗体标为抗原 1、抗原 2。

(2) 生理盐水配制的 1% 琼脂。

(3) 玻片、打孔器、湿盒、 37°C 恒温箱等。

【方法】

(1) 制板：将熔化的 1% 琼脂加在玻片上， $3\text{ml}/\text{板}$ 。

(2) 打孔：待琼脂凝固后，在板上打孔。

(3) 加样：如图 1-1-1 所示，中央孔加抗体，上下孔加抗原 1，左右孔加抗原 2，每孔 $10\mu\text{l}$ 。

(4) 将琼脂板置于湿盒内， 37°C 24 小时后观察结果。

【结果】 在中央孔与周围孔之间，如出现沉淀线，则为阳性反应，提示有相应抗体与抗原反应。如无沉淀线出现，则为阴性反应，说明抗体与抗原不相对应。

【注意事项】

(1) 琼脂铺板应一次铺成，均匀平滑。

(2) 加样时，对准孔倒置滴管，轻挤出液体，避免量多溢出，影响沉淀线的形成。

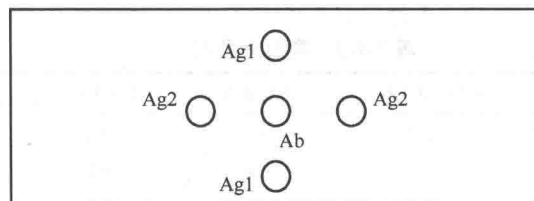


图 1-1-1 加样示意图

中央孔加 Ab，上下孔加抗原 1，左右孔加抗原 2

实验四 补体结合实验



【原理】 补体无特异性，可与任何抗原抗体复合物结合而被激活，但不能与单独的抗原或抗体结合。

补体结合试验 (complement fixation test, CF) 是一种有补体参与，以绵羊红细胞 (sheep red blood cell, SRBC) 和溶血素 (抗 SRBC 的抗体) 作为指示系统的抗原抗体反应体系。绵羊红细胞与溶血素结合后可激活补体，导致红细胞破坏，出现溶血现象。参与补体结合反应的五种成分可分为两个系统：①待检系统：已知抗原 (或抗体)、待检抗体 (或抗原)；②指示系统：SRBC、溶血素。待检系统与补体作用后，加入指示系统，若不出现溶血，表示待检系统中的抗原抗体相对应；两者特异性结合形成抗原抗体复合物结合并消耗了补体，无游离的补体与指示系统结合，故不溶血，为补体结合试验阳性。反之，若出现溶血，则为补体结合试验阴性。

一、预备实验

(一) 溶血素单位滴定

【材料】

1. 2%绵羊红细胞 取新鲜脱纤维的羊血，用生理盐水洗两次后，配成 2%浓度备用。
2. 溶血素 用绵羊红细胞免疫动物后制备的动物血清。
3. 补体 取新鲜豚鼠血清作 1 : 30 稀释，冰箱保存备用。
4. 其他 生理盐水、试管、吸管、37℃水浴箱。

【方法】

- (1) 按照表 1-1-3，于各管中分别加入不同稀释度的溶血素 0.2ml，然后加入其他成分。
- (2) 充分混匀后，置 37℃水浴箱 30 分钟，观察结果。
- (3) 凡最高稀释度的溶血素可呈现完全溶血者为 1 个单位。

表 1-1-3 中的试验表明，第 11 管 (即 1 : 9600 倍稀释) 0.2ml 溶血素为 1 个单位。试验时常用 0.2ml 中含 2 个单位溶血素单位的稀释液 (即 1 : 4800 倍稀释)，配制时可取 1 : 100 倍的溶血素 1ml 加生理盐水 47ml。

表 1-1-3 溶血素滴定

(单位: ml)

试管号	溶血素(稀释度)	补体 (1 : 30)	生理盐水	2%SRBC	结果	
1	0.2 (1 : 1000)	0.2	0.4	0.2	完全溶血	
2	0.2 (1 : 1200)	0.2	0.4	0.2	完全溶血	摇匀后置
3	0.2 (1 : 1600)	0.2	0.4	0.2	完全溶血	37℃水浴
4	0.2 (1 : 2000)	0.2	0.4	0.2	完全溶血	30 分钟

续表

试管号	溶血素(稀释度)	补体(1:30)	生理盐水	2%SRBC	结果
5	0.2(1:2400)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
6	0.2(1:3200)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
7	0.2(1:4000)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
8	0.2(1:4800)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
9	0.2(1:6400)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
10	0.2(1:8000)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
11	0.2(1:9600)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
12	0.2(1:12800)	0.2	0.4	0.2	大部分溶血
13	0.2(1:16000)	0.2	0.4	0.2	不溶血
对照	—	0.2	0.4	0.2	不溶血

摇匀后置
37℃水浴
30 分钟

(二) 补体单位滴定

【材料】

- (1) 补体：1：30 稀释（同溶血素滴定）。
- (2) 2 单位溶血素。
- (3) 2%绵羊红细胞（同溶血素滴定）。
- (4) 其他（同溶血素滴定）。

【方法与结果】

- (1) 按表 1-1-4 中各管加入 1：30 稀释的补体。

表 1-1-4 补体单位滴定 (单位：ml)

试管	补体(1:30)	生理盐水	溶血素(2单位)	2%SRBC	结果
1	0.06	0.54	0.2	0.2	不溶血
2	0.08	0.52	0.2	0.2	稍溶血
3	0.10	0.50	0.2	0.2	全溶血
4	0.12	0.48	0.2	0.2	全溶血
5	0.14	0.46	0.2	0.2	全溶血
6	0.16	0.44	0.2	0.2	全溶血
7	0.18	0.42	0.2	0.2	全溶血
8	0.60	0.2		0.2	不溶血

(2) 依次加入其他成分于每管中，混匀后置 37℃水浴箱 15~30 分钟后观察结果，判定补体单位。

(3) 补体单位：凡能使一定量红细胞发生完全溶解的最小补体量，称为 1 个确定单位。如表 1-1-4 中自第 3 管开始出现完全溶血现象，因此第 3 管(0.1ml)所含补体量为 1 个确定单位。

由于在实际应用时补体有一部分损失及活性降低，故通常取其次高一管补体量称为一个实用单位。例如，表 1-1-4 中第 4 管(0.12ml)为 1 个实用单位，可以表示为：

- 1 个确定单位=0.1ml 1：30 稀释的补体
- 1 个实用单位=0.12ml 1：30 稀释的补体

- (4) 补体的稀释：若使每 0.2ml 补体含 2 个实用单位，可按下式计算：

370034

$$30 : (2 \times 0.12) = x : 0.2$$

$$x = 30 \times 0.2 / 2 \times 0.12 = 25$$

即将补体原液稀释 25 倍, 用 0.2ml 即可。

二、正式实验

【材料】

- (1) 补体: 豚鼠血清按上述补体单位滴定结果稀释。
- (2) 抗原: 伤寒菌液 10 亿个/ml, 煮沸 2 小时, 离心 3000r/min, 30 分钟, 吸取上清作为抗原, 实验前做抗原滴定, 用 4 个单位的抗原。
- (3) 待检血清: 56℃ 30 分钟灭活后, 1:5 稀释。
- (4) 溶血素 2 个单位。
- (5) 2% 绵羊红细胞 (SRBC)。

【方法】

- (1) 取 5 支试管, 依次做好标记, 放在试管架中。
- (2) 按照表 1-1-5 加样。

表 1-1-5 补体结合试验

(单位: ml)

试管号	待检血清	抗原	补体	生理盐水		溶血素	SRBC		结果
1 (试验管)	0.2	0.2	0.2	—		0.2	0.2		—
2 (血清对照管)	0.2	—	0.2	0.2	摇匀	0.2	0.2	摇匀	溶血
3 (抗原对照管)	—	0.2	0.2	0.2	37℃	0.2	0.2	37℃	溶血
4 (补体对照管)	—	—	0.2	0.4	水浴	0.2	0.2	水浴	溶血
5 (SRBC 对照)	—	—	—	0.8	15 分钟	—	0.2	15 分钟	不溶血

【结果判定】 第 2~5 管均为对照管, 具有不同的对照意义, 应分别出现溶、溶、溶、不溶, 说明反应条件和材料的可信程度。第 1 管为试验管, 不溶血为补体结合试验阳性 (+), 溶血为补体结合试验阴性 (-)。

【注意事项】

- (1) 羊血用前轻轻摇匀, 避免剧烈震荡引起溶血。
- (2) 各种试剂的吸管不要混用。
- (3) 补体性质较不稳定, 低温保存, 加样时再从冰箱取出。
- (4) 水浴时避免水滴进试管。
- (5) 本试验影响因素很多, 对照管的反应情况是否正常是判断试验可信的参照。

实验五 酶联免疫吸附实验

