

沧州医学高等专科学校自编教材



供临床医学、护理、医学技术、卫生管理等专业类用

病原生物学与免疫学 实验及学习指导

BINGYUANSHEGWUXUE YU MIANYIXUE
SHIYAN JI XUEXI ZHIDAO

■ 主编 许郑林 孙凤娥

 人民军医出版社
PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

沧州医学高等专科学校自编教材

供临床医学、护理、医学技术、卫生管理等专业类用

病原生物学与免疫学 实验及学习指导

BINGYUANSHEGWUXUE YU MIANYIXUE
SHIYAN JI XUEXI ZHIDAO

主 编 许郑林 孙凤娥

副主编 朱凤林 陈瑞玲

主 审 张瑞兰

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 蕾 田 毅 朱凤林 刘玉霞

许郑林 孙凤娥 杨华馥 陈瑞玲

金 芸



人民军医出版社

People's Military Medical Press

北 京

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学与免疫学实验及学习指导/许郑林,孙凤娥主编. —北京:人民军医出版社,2007.7
沧州医学高等专科学校自编教材
ISBN 978-7-5091-1131-4

I. 病… II. ①许…②孙… III. ①病原微生物—实验—医学院校—教学参考资料②医药学:免疫学—实验—医学院校—教学参考资料 IV. R37-33 R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 112058 号

策划编辑:徐卓立 文字编辑:顾 森 责任审读:张之生

出版人:齐学进

出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编:100036

电话:(010)66882586(发行部) 51927290(总编室)

传真:(010)68222916(发行部) 66882583(办公室)

网址:www.pmp.com.cn

印刷:京南印刷厂 装订:桃园装订有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:11.5 字数:273千字

版、印次:2007年7月第1版第1次印刷

印数:0001~7100

定价:24.00元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

电话:(010)66882585 51927252

沧州医学高等专科学校自编教材

编委会

- 主任委员** 牟兆新 沧州医学高等专科学校常务副校长
- 副主任委员** 张丽华 沧州医学高等专科学校副校长
张中兴 沧州医学高等专科学校副校长
- 顾问** 陈金源 天津武警医学院解剖学教授
姬淑梅 天津医科大学教育学研究员
赵若华 天津武警医学院神经内科学教授
- 委员** (以姓氏笔画为序)
- 刘立新 沧州医学高等专科学校教务科科长
齐秀泽 沧州医学高等专科学校护理系副书记
闫金辉 沧州医学高等专科学校医学系副书记
李怀珍 沧州医学高等专科学校科研科科长
张秋雨 沧州医学高等专科学校教务处处长
张瑞兰 沧州医学高等专科学校医学技术系主任
陈风云 沧州医学高等专科学校基础部副主任
陈树君 沧州医学高等专科学校医学系主任
陈俊荣 沧州医学高等专科学校教务处副处长
金玉忠 沧州医学高等专科学校护理系主任
孟羽俊 沧州医学高等专科学校医学系副主任
赵佩瑾 沧州医学高等专科学校基础部主任
侯振江 沧州医学高等专科学校医学技术系副书记

序

2007年的春天是我国教育事业的春天,因为不久前召开的第十届全国人民代表大会第五次会议关于加大教育投入、大力发展职业教育等一系列的决议给我国的教育发展带来了春天的信息;2007年的春天也是沧州医学高等专科学校教材建设的春天,因为凝聚着我校教师心血的20余部学习指导及实验实训系列辅助教材即将由人民军医出版社付梓刊印,这是我校教材建设的一件盛事,值得祝贺。

作为一所医学高职高专学校,我们始终坚持以服务为宗旨,以就业为导向,密切产学结合,开展专业及课程改革,提高教学质量的方针。依据高职高专院校培养技能型人才的要求,全面修订了各专业教学计划,立足于公共课、基础课为专业课服务的原则,进行教学内容的整合,并力求与执业资格考试接轨;加强了实践教学,增加了人文和礼仪等选修课;护理专业实施了就业岗位综合素质训练,不断提高学生的整体综合能力;临床医学专业也积极探索专业课教学模式改革,提高了学生临床实践能力,缩短了学生与临床之间的距离。多年来,在河北省卫生厅、教育厅组织的卫生类院校护理技能和物理诊断操作考核中,我校均名列前茅。

学校积极鼓励教师在开展教学改革基础上,结合各专业特点自编教材,特别是实验实训教学指导教材。辛勤的耕耘结出了硕果,这套旨在帮助学生进行自主学习、提高学生实验实训能力和岗位综合素质的系列教材应运而生,相信对于促进学生的学习将大有裨益。

这套教材的编者都是我校教学一线的教师,他们既要承担教学任务,又要利用业余时间努力完成编写工作,付出了很多辛苦。限于编者水平与能力,加之时间仓促,难免玉有瑕疵,期冀在使用中不断修订完善,渐成佳作。

人民军医出版社作为有着光辉历史的出版社,为我们出版这套教材,对我校教材建设给予了极大的支持,在此一并致以谢意。



2007年4月

前 言

根据高等职业教育关于“培养生产、建设、管理、服务第一线的德、智、体、美等方面的高等技术应用型专门人才”的培养目标,本教材的编写着眼于学生的职业素质、创新精神、专业知识和应用能力的培养,在教材内容方面以“必需、够用”为度,在保证“思想性、科学性”的同时,努力体现其“实用性和创新性”。

本教材内容分为两大部分,第一部分为实验指导,第二部分为学习指导。两部分内容既保持了相对独立性,又注意到内容的联系与衔接。实验指导部分包括本学科一些最基本的实验,并努力体现实验内容的综合性。学习指导部分以章为单位,每章包括大纲要求、学习重点、复习思考题及参考答案。力求做到使学生能自我检查学习效果,复习重点内容。有助于学生把所学的有关知识进行联系,融会贯通,既巩固学生所学理论知识,又培养学生综合分析问题的能力。

本教材是在全体编者共同努力下完成的。在编写过程中,得到了单位各级领导及同仁的大力支持和热心帮助,在此一并表示感谢。由于我们的学术水平和编写能力有限,恳请广大师生、同行对教材中的缺点、错误提出宝贵意见。

许郑林
2007年4月

目 录

第一部分 实验指导

实验一	凝集试验	(1)
实验二	琼脂扩散试验	(3)
实验三	吞噬细胞的吞噬作用	(5)
实验四	酶联免疫吸附试验(乙肝表面抗原检测)	(7)
实验五	外周血单个核细胞的分离	(8)
实验六	免疫器官及生物制品观察	(9)
实验七	豚鼠过敏实验	(9)
实验八	细菌形态结构观察	(10)
实验九	细菌革兰染色法	(11)
实验十	细菌的人工培养	(12)
实验十一	细菌的分布与消毒灭菌	(14)
实验十二	细菌代谢产物的检查	(16)
实验十三	病原性球菌的形态和检查	(18)
实验十四	肠道杆菌的形态和检查	(21)
实验十五	厌氧菌、棒状杆菌及分枝杆菌的形态和检查	(23)
实验十六	病毒及其他微生物形态观察	(24)
实验十七	医学蠕虫实验	(25)
实验十八	医学原虫实验	(30)
实验十九	医学节肢动物实验	(33)

第二部分 学习指导

绪论	(35)
----	------

第一篇 免疫学基础

第1章	抗原	(37)
第2章	抗体与免疫球蛋白	(41)
第3章	补体系统	(45)
第4章	人类主要组织相容性复合体	(48)
第5章	免疫系统	(51)

第 6 章	免疫应答	(54)
第 7 章	超敏反应	(59)
第 8 章	免疫缺陷病与自身免疫病	(64)
第 9 章	免疫学临床应用	(69)

第二篇 医学微生物学

第 10 章	细菌的形态与结构	(74)
第 11 章	细菌的生理	(78)
第 12 章	细菌的分布与消毒灭菌	(82)
第 13 章	细菌的遗传与变异	(86)
第 14 章	细菌的感染与免疫	(89)
第 15 章	球菌	(93)
第 16 章	肠道杆菌	(99)
第 17 章	弧菌属与弯曲菌属	(103)
第 18 章	厌氧性细菌	(105)
第 19 章	分枝杆菌属	(108)
第 20 章	动物源性细菌及其他细菌	(110)
第 21 章	其他微生物	(114)
第 22 章	病毒学总论	(117)
第 23 章	呼吸道病毒	(120)
第 24 章	肠道病毒	(124)
第 25 章	肝炎病毒	(127)
第 26 章	人类免疫缺陷病毒	(131)
第 27 章	虫媒病毒	(134)
第 28 章	其他病毒及朊粒	(137)

第三篇 人体寄生虫学

第 29 章	总论	(140)
第 30 章	线虫	(143)
第 31 章	吸虫	(150)
第 32 章	绦虫	(154)
第 33 章	阿米巴	(158)
第 34 章	鞭毛虫	(161)
第 35 章	孢子虫	(164)
第 36 章	医学节肢动物	(167)
附录	常用培养基、试剂的配制方法	(170)

第一部分 实验指导

实验一 凝集试验

一、直接凝集试验(玻片凝集试验)

【实验原理】

玻片凝集试验是一种定性实验。用已知的诊断血清,与被检的细菌或细胞等抗原混合,如出现特异性凝集,可确定被检抗原的种属或型别。常用于鉴定细菌和 ABO 血型鉴定。

【实验材料】

1. 标本 任一常见细菌的平板或斜面培养物。
2. 试剂 与细菌对应的诊断血清(可用生理盐水作适当稀释以免发生前带现象)、生理盐水等。
3. 器材 载玻片、接种环等。

【实验方法】

1. 于洁净载玻片的一端加生理盐水 1 滴,另一端加诊断血清 1 滴。
2. 用接种环挑取细菌,分别涂于生理盐水和待检血清中,充分混匀。
3. 室温下静置数分钟观察结果。

【实验结果】

生理盐水对照不发生凝集,为均匀浑浊的乳状液。在诊断血清中,细菌与相应抗体反应会出现肉眼可见的凝集块,为阳性结果。如与对照相同则为阴性结果。

【注意事项】

1. 每一待检菌均须做生理盐水对照,如对照发生凝集,试验结果无效。
2. 在载玻片两端涂布细菌时,注意一定要先在生理盐水中涂,后在诊断血清中涂,以免将血清误带入盐水中。

二、间接凝集试验(类风湿因子测定)

【实验原理】

将可溶性抗原吸附于一种与免疫无关、大小均匀的载体颗粒表面,再与相应抗体在适宜条件下相互作用,从而使载体颗粒被动凝集出现肉眼可见的凝集现象,称间接凝集试验,又称被动凝集试验。常用来检测血清中各种病原微生物的抗体及自身抗体。类风湿因子(RF)是类风湿病人血清中的抗人变性 IgG 抗体(IgM 为主),当与吸附在胶乳颗粒上的变性 IgG 相遇并有电解质存在时,可出现肉眼可见的凝集现象。

【实验材料】

1. 标本 待检人血清。
2. 试剂 类风湿胶乳诊断试剂(人变性 IgG 致敏的胶乳颗粒)、生理盐水。
3. 器材 吸管、反应板或凹玻片。

【实验方法】

1. 将待检血清用生理盐水做 1:20 稀释。
2. 在反应板方格或凹玻片上分别加阳性对照血清、阴性对照血清、1:20 待检血清各 1 滴。
3. 在上述血清中分别滴加类风湿胶乳诊断试剂各 1 滴。
4. 立即旋转摇动反应板,使之充分混匀。1~3min 观察结果。

【实验结果】

出现明显而均匀的凝集颗粒者为阳性,不出现凝集颗粒者为阴性。

【注意事项】

1. 使用前将胶乳试剂充分摇匀。
2. 血清和胶乳试剂的液滴量应一致,并充分混匀。

三、间接凝集抑制试验(妊娠试验)

【实验原理】

吸附有可溶性抗原的胶乳颗粒即乳胶抗原与相应抗体作用,可形成间接凝集。若使该抗体先与可溶性抗原作用,再加入乳胶抗原,则间接凝集被抑制。孕妇尿中含有大量绒毛膜促性腺激素(HCG),HCG 为可溶性抗原。将孕妇尿与 HCG 抗体先作用后,再加入 HCG 乳胶抗原,不出现凝集。而非妊娠尿经上述反应出现凝集。

【实验材料】

1. 标本 待检尿。

2. 试剂 人绒毛膜促性腺激素(HCG)致敏的乳胶颗粒、抗人 HCG 免疫血清和生理盐水等。

3. 器材 反应板或载玻片、滴管等。

【实验方法】

1. 所有试剂使用前均先放室温下预温。

2. 选择一块洁净载玻片,平均分成 3 个格,并分别标上阳性、阴性及待测标本记号。若使用反应板,则选择 3 个孔,标上相应的记号。

3. 吸取尿标本 1 滴置于载玻片的中央格或反应板的中央孔,两侧分别加 1 滴生理盐水和阳性对照。

4. 在载玻片上的 3 个格或反应板的 3 个孔内均加抗人 HCG 免疫血清 1 滴,轻轻摇动或用牙签搅动,使其充分混匀。

5. 各滴加 HCG 致敏乳胶颗粒 1 滴。

6. 缓慢摇动 2~3min,在较强光线下观察结果。

【实验结果】

1. 生理盐水对照侧应出现明显凝集颗粒,否则可视为试剂有问题或操作有误。

2. 尿标本试验侧若呈现凝集为 HCG 阴性,如仍呈乳白色均匀非凝集状则为 HCG 阳性。

【注意事项】

1. 待测尿液以晨尿为好,此时 HCG 含量最高。

2. 所用试剂均应保存于 4℃,切勿冻存,使用前应摇匀。

(孙凤城)

实验二 琼脂扩散试验

一、单向琼脂扩散试验(人血清 Ig 含量测定)

【实验原理】

将一定量已知抗体混于加热溶化的琼脂中,制成琼脂板。打孔后,孔中加入抗原。抗原在向四周扩散的过程中与凝胶中的抗体反应,在二者比例合适处形成白色沉淀环。沉淀环直径的大小与孔中抗原浓度成正比。待检标本中的抗原含量可根据沉淀环直径从标准曲线中查到。故此法为定量试验,常用来检测血清中各类免疫球蛋白和补体的含量。

【实验材料】

1. 标本 待检人血清、免疫球蛋白工作标准(IgG 含量 10mg/ml)。

2. 试剂 羊抗人 IgG 诊断血清(单扩效价 1:60)、15g/L 盐水琼脂。

3. 器材 三角烧瓶、载玻片、打孔器、吸管、滴管、湿盒、水浴箱、微量加样器和半对数坐标纸等。

【实验方法】

1. 琼脂准备 吸取已溶化琼脂 59ml 于三角瓶中，置 56℃ 水浴保温，将预温的羊抗人 IgG 诊断血清 1ml 与琼脂充分混合，继续保温于 56℃ 备用。如果羊抗人 IgG 诊断血清的单扩效价不是 1:60，试验时所需琼脂量与抗体量的比例应加以调整。

2. 浇板 取混有抗血清的琼脂液 4.5ml 浇注于载玻片上，注意浇板要均匀、平整、无气泡、布满整张载玻片。

3. 打孔 待琼脂凝固后，用打孔器打孔，孔径 3.5mm，孔距 10~12mm。孔要打得圆整光滑，边缘不要破裂，底部勿与载玻片脱离。

4. 加样 将待检血清用生理盐水做 1:40 稀释，用微量加样器取稀释血清 10 μ l 加入相应的试验孔中。如同时测定多个标本，注意做好标记，认真记录，不要搞混。

另外，取免疫球蛋白工作标准 1 支加 0.5ml 蒸馏水溶解，用生理盐水稀释成如下浓度：1:10、1:16、1:20、1:32、1:40，分别加入另一套孔中，每孔中加 10 μ l，用于制备标准曲线。

5. 扩散 将加样完毕的琼脂板放于湿盒中，置 37℃ 温箱 24h 后观察结果。

6. 绘制标准曲线 以各稀释度工作标准的沉淀环直径为横坐标，相应孔中 IgG 含量为纵坐标在半对数纸上绘制标准曲线。

【实验结果】

精确测量各试验孔沉淀环的直径，如果沉淀环不太圆，则取最大直径和最小直径的平均值。从标准曲线上查得相对应的 IgG 含量，乘以稀释倍数，即为待检血清中 IgG 的实际含量。

【注意事项】

1. 浇制琼脂板时，琼脂温度要适宜，动作要迅速。
2. 琼脂溶化后置水浴中保温时，温度不可超过 56℃，否则会使抗体变性。

二、对流免疫电泳

【实验原理】

是一种将双向扩散和电泳技术相结合的试验，试验时在琼脂板上成对打孔，分别加入抗原与抗体，放入偏碱性的缓冲环境和适当的直流电场中，大部分抗原带有较多的负电荷，向正极移动；而抗体（尤其是 IgG）在同样的环境中带负电荷较少，加上凝胶内较强的电渗作用，故抗体向阴极移动。在一定时间内（30~90min），移动的抗原和相应抗体在两孔间相遇并发生反应，在浓度比例适当时形成沉淀线。其应用与琼脂双向扩散试验相同，但大大提高了反应速度和敏感性。

【实验材料】

1. 标本 待测人血清、阳性对照血清。

2. 试剂 AFP 诊断血清、pH8.6 0.05mol/L 巴比妥缓冲液、15g/L 琼脂巴比妥溶液。
3. 器材 电泳槽、电泳仪、孔型模板、打孔器、载玻片、吸管、微量加样器、吸球、滤纸和纱布条等。

【实验方法】

1. 制板 取溶化的琼脂液 4.5ml 浇注于载玻片上,注意浇板要均匀、平整、无气泡、布满整张载玻片。
2. 打孔 待琼脂凝固后成对打孔,孔径为 3mm,孔距为 10mm。
3. 加样 在两侧孔中分别加入抗原、抗体及阳性对照。
4. 电泳 将加样完毕的琼脂板置电泳槽的支架上,抗原孔置阴极端,抗体孔置阳极端,电泳槽内加 0.05mol/L pH8.6 的巴比妥缓冲液,液面至槽高的 2/3 处,琼脂板两端用滤纸条和纱布条与缓冲液相连。接通电源,控制电流强度在 2.5~3.5mA/cm 板宽。电泳 30~90min 后,切断电源,取出琼脂板观察结果。

【实验结果】

待测孔与抗血清之间出现沉淀线为阳性,否则为阴性。

【注意事项】

1. 浇制琼脂板的注意事项同前。
2. 搭桥时应注意与凝胶接触紧密,否则会使电流不均匀,致使沉淀线歪斜、不均匀。

(孙凤城)

实验三 吞噬细胞的吞噬作用

一、豚鼠腹腔巨噬细胞吞噬作用测定

【实验原理】

淀粉可以刺激豚鼠腹腔引起非感染性炎症渗出,在腹腔局部出现较多巨噬细胞,巨噬细胞则能吞噬注入腹腔的鸡红细胞等较大异物。

【实验材料】

1. 动物 豚鼠。
2. 试剂 5%鸡红细胞悬液,5%淀粉肉汤溶液,姬姆萨染液。
3. 器材 注射器、载玻片、显微镜等。

【实验方法】

1. 取无菌 5%淀粉肉汤溶液 5ml 注入豚鼠腹腔,常规饲养 3d。

2. 实验前 1h 再次注入豚鼠腹腔无菌 5% 淀粉肉汤溶液 5ml, 然后注射 5% 鸡红细胞悬液 5ml, 轻揉其腹部, 使鸡血细胞均匀分布。
3. 在注射后 30min、1h、2h、3h, 分别用注射器抽取豚鼠腹腔液推片。
4. 自然干燥后, 姬姆萨染色, 油镜观察。

【实验结果】

计算 100 个巨噬细胞中吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数目及被吞噬的鸡红细胞的总数, 按下列公式计算吞噬百分比和吞噬指数。

$$\text{吞噬百分比} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{100 \text{ 个巨噬细胞}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{100 \text{ 个巨噬细胞中被吞噬鸡红细胞数}}{100 \text{ 个巨噬细胞}} \times 100\%$$

二、中性粒细胞吞噬作用的测定

【实验原理】

血液中的中性粒细胞有吞噬病原微生物等较小异物的能力。将新鲜血液和细菌混合, 经合适的时间后涂片染色, 即能观察到被吞噬到中性粒细胞内的但还没有被消化掉的细菌。

【实验材料】

1. 标本 新鲜抗凝人血 0.5ml。
2. 试剂 白色葡萄球菌(肉汤培养液中 37℃ 培养 16~18h 待用), 瑞氏染液。
3. 器材 显微镜、孵箱、玻片等。

【实验方法】

1. 吸取 0.1ml 白色葡萄球菌液加入新鲜抗凝人血 0.5ml 中, 摇匀, 37℃ 孵育 30min。
2. 孵育过程的前 20min, 每隔 5min 轻轻振荡 1 次, 共 4 次, 后 10min 静置孵育。
3. 孵育结束后, 用毛细滴管从红细胞层表面吸取上清液少许推片。
4. 自然干燥后, 滴加瑞氏染液染色 1min, 再加等量蒸馏水混匀, 静置 4min 水洗, 晾干油镜观察。

【实验结果】

计算 100 个中性粒细胞, 分别计算吞噬有细菌的中性粒细胞数目和被吞噬的细菌总数, 计算吞噬百分比和吞噬指数(计算方法同前), 正常人吞噬百分比为 60%, 吞噬指数大于 1。

【注意事项】

1. 血涂片应薄厚均匀适中, 避免过薄或过厚。
2. 瑞氏染液染色时间不能过长以免染色过重。

实验四 酶联免疫吸附试验(乙肝表面抗原检测)

【实验原理】

酶联免疫吸附试验是一种利用酶标记抗原或抗体,在固相反应板上进行抗原抗体反应的方法。本试验采用双抗体夹心法检测乙型肝炎表面抗原。将抗-HBs 包被到固相载体表面,加入待检样品,样品中若有 HBsAg 则与固相抗-HBs 结合,形成 HBsAg-抗-HBs 复合物,再与酶标抗-HBs 反应,加入酶的底物,酶催化底物生成有色物质,颜色的深度与样品中所含的 HBsAg 量成正比,反之则无显色反应。双抗体夹心法常用于测定微生物成分、激素、细胞因子等微量抗原。本实验目的为了解 ELISA 的原理和基本操作过程。

【实验材料】

1. 标本 待检血清。

2. 试剂

(1)pH9.6 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液:

A 液:Na₂CO₃10.6g 加蒸馏水至 500ml。

B 液:NaHCO₃16.8g 加蒸馏水至 1 000ml。

取 A 液 16ml 加 B 液 34ml 再加蒸馏水至 200ml,即可。

(2)pH7.4 磷酸盐缓冲液-吐温-20 (PBS-Tween-20) 溶液:NaCl 8g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, KCl 0.2g 加蒸馏水至 1 000ml,溶解后再加入 Tween-20 0.5ml。

(3)pH5.0 底物(基质)缓冲液(磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液):

A 液:(0.2M Na₂HPO₄)取 Na₂HPO₄ · 12H₂O 71.6g 加蒸馏水至 1 000ml。

B 液:(0.1M 柠檬酸溶液):取柠檬酸 19.2g 加蒸馏水至 1 000ml。

取 A 液 25.7ml 加 B 液 24.3ml 再加蒸馏水 50ml 即可。

(4)底物溶液(新鲜配制):邻苯二胺 40g 加基质缓冲液 100ml 溶化后加 H₂O₂ (30%) 0.15ml 即可。

(5)反应终止液:2mol/L 硫酸。

(6)纯化的马抗-HBs,酶标抗-HBs,HBsAg 阳性及阴性血清等。

3. 器材 微孔反应板、试管、微量移液器、酶标仪。

【实验方法】

1. 包被抗体,取 pH9.6 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液稀释的纯化的马抗-HBs 每孔 0.1ml 于湿盒中置 4℃ 过夜。

2. 倾尽凹孔板中液体,用装 PBS-Tween-20 洗瓶注满平板孔内保留 3~5min,倾尽,反复洗 3 次,在滤纸上将孔中剩余液体拍净。

3. 每孔加待检血清 0.1ml 置湿盒中于 37℃ 放 1h,同时设 HBsAg 阳性和阴性对照孔各一个孔,空白对照一孔加生理盐水。洗涤方法同上。

4. 加入用磷酸盐缓冲液稀释的酶标记抗-HBs,每孔加 0.1ml 置湿盒中 37℃ 放 1h,然后洗

涤,方法同上。

5. 每孔加入底物溶液 0.1ml 置室温 30min,然后每孔加 2mol/L 硫酸 1 滴,终止反应。
6. 观察颜色情况或测定 OD 值。

【实验结果】

1. 肉眼观察 在白色背景下观察各孔颜色,无色为阴性,蓝色或浅蓝色为阳性。与阳性对照相比,按反应变黄程度可分为卅、卅、卅、十。

2. 用分光光度计测定 OD 值 $\frac{\text{阳性计数}-\text{空白}}{\text{阴性计数}-\text{空白}} > 2.1$ 时,可判为阳性。

【注意事项】

1. 从冷藏环境中取出的试剂盒内全部瓶装试剂及待测标本所需微孔反应条应置 37℃ 平衡 30min 后方可使用。
2. 试剂使用前应摇匀,并弃 1~2 滴后垂直滴加。
3. 封片不能重复使用。
4. 结果判断应在反应终止后 10min 内完成。

实验五 外周血单个核细胞的分离

【实验原理】

用密度梯度离心法,根据各类血细胞的比重不同,分离提取单个核细胞,这是从外周血初步分离淋巴细胞的最常用方法。分离液的比重稍高于淋巴细胞,而低于红细胞和粒细胞,离心后红细胞和粒细胞比重较大,位于最下层;而单个核细胞的比重为 1.075~1.090,位于分离液的上方。本实验用比重为 1.077 聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分离液分离单个核细胞,可用于细胞的分类鉴定、计数及各种功能测定。通过分离人血单个核细胞的过程,掌握其原理及操作方法,熟悉其意义及应用。

【实验材料】

1. 标本 外周静脉血。
2. 试剂
 - (1) 淋巴细胞分离液(聚蔗糖-泛影葡胺)。
 - (2) 肝素、Hank's 液。
3. 器材 注射器、针头、10ml 离心管、滴管、乳胶头、试管、试管架、离心机、天平。

【实验方法】

1. 取肝素抗凝血:取静脉外周血 3ml,每毫升血加肝素 25~30U。
2. 用 Hank's 液稀释 1 倍到 6ml。

3. 用 10ml 离心管,加入 3ml 淋巴细胞分离液,在分离液的界面上轻轻加入 6ml 已稀释的肝素抗凝血。

4. 然后以 2 000r/min 的速度离心 20min。

5. 此时可见液体分为四层,由于比重不同,最下层是红细胞和粒细胞,分离液在它的上层,最上层是血浆层,单个核细胞层在血浆层和分离液之间。用滴管轻轻插入单个核细胞层吸取该层细胞。

6. 将单个核细胞层放入含有 Hank 液 5ml 试管中,充分混匀,1 000r/min 离心 10min,弃去上清液,即获得单个核细胞,包括淋巴细胞和单核细胞。

【实验结果】

用密度梯度离心法分离单个核细胞,速度快、纯度高,分离后得到的单个核细胞,可满足许多实验的需要。

1. 在分离液的界面上轻加 6ml 肝素抗凝血液,千万不要打乱两液间的液面。

2. 分离液与加入血液的量应是:分离液:未稀释血液=1:1,因血液已稀释 1 倍,分离液 3ml,血液应加入 6ml,整个液面高度不能超过 10ml。

3. 分离出单个核细胞后,要进一步检测细胞活力。

(朱凤林)

实验六 免疫器官及生物制品观察

【实验原理】

通过对免疫器官及生物制品的观察,掌握免疫器官的种类及功能,了解生物制品的用途。

【实验材料】

胎儿胸腺、鸡法氏囊、卡介苗、乙肝疫苗、脊髓灰质炎疫苗、麻疹疫苗、百白破三联制剂、流脑疫苗、乙脑疫苗、白喉类毒素、破伤风类毒素、白喉抗毒素、破伤风抗毒素、抗狂犬病病毒免疫血清、丙种球蛋白、干扰素、IL-2、转移因子、胸腺素、伤寒 O 菌液、伤寒 O 诊断血清、伤寒 H 诊断血清、副伤寒 H 菌液。

【注意事项】

玻璃制品要轻拿轻放,防止损坏,避免擦掉玻璃制品上的字迹。

(朱凤林)

实验七 豚鼠过敏试验

【实验原理】

给豚鼠注射异种蛋白,经过一定时间,豚鼠产生 IgE。IgE 结合于肥大细胞和嗜碱性粒细