

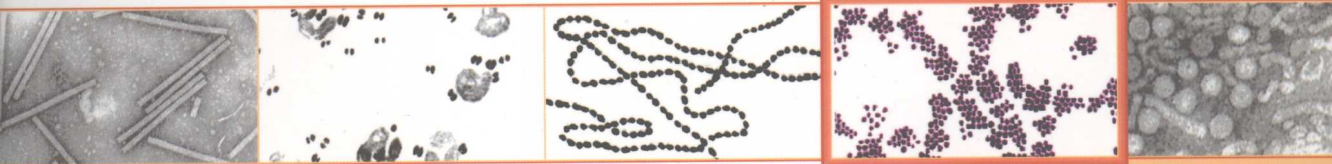
21世纪高等医药院校教材

供中医药类及临床医学专业使用

医学免疫学与病原生物学

实验教程及模拟试卷

卢芳国 范虹 主编



 科学出版社
www.sciencep.com

·21 世纪高等医药院校教材·

供中医药类及临床医学专业使用

医学免疫学与病原生物学 实验教程及模拟试卷

卢芳国 范虹 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书共分五篇。第一篇为医学免疫学实验技术,其中包括免疫功能的检测实验和其他多种免疫学实验技术;第二篇为医学微生物学实验技术,介绍了常见病原微生物的检测方法和相应疾病的诊断操作技术;第三篇为中药微生物学检查与抗菌作用的检测技术,介绍了常用药物的微生物检测以及中药抗菌作用的检测技术;第四篇为医学寄生虫学实验技术,介绍了常见寄生虫的检测方法和相应疾病的诊断操作技术;第五篇为模拟考试或考查试卷。

本书适合高等医药院校中医、中西医结合、针灸推拿、护理、骨伤、医学检验、中药、药学、药物制剂等专业教学使用,同时也可供临床检验和相关学科科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学与病原生物学实验教程及模拟试卷/卢芳国,范虹主编. —北京:科学出版社,2007

(21世纪高等医药院校教材)

ISBN 978-7-03-019699-6

I. 医… II. ①卢…②范… III. ①医药学:免疫学-实验-医学院校-教学参考资料②病原生物学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. R392-33 R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第128506号

责任编辑:杨瑰玉/责任校对:王望容

责任印制:高 嵘/封面设计:宝 典

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>

武汉市新华印刷有限责任公司印刷

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

2007年8月第一次印刷 印张:10

印数:1-5 000 字数:220 000

定价:15.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《医学免疫学与病原生物学实验教程及模拟试卷》编委会

主 编 卢芳国 范 虹

副主编 汤冬生 刘文泰

编 委 (以姓氏笔画为序)

王晓红(吉首大学)

朱应武(湖南中医药大学)

吴淑慧(河北医科大学)

汤冬生(安徽中医学院)

陈殿学(辽宁中医药大学)

周国兴(湖南中医药高等专科学校)

高清华(湖北中医学院)

龚宗跃(湖南中医药高等专科学校)

程惠娟(安徽中医学院)

蔡 锐(湖南中医药大学)

戴 军(河北医科大学)

卢芳国(湖南中医药大学)

刘文泰(河北医科大学)

何一中(浙江中医药大学)

张学敏(福建中医学院)

范 虹(湖北中医学院)

胡建中(湖南中医药大学)

黄 敏(湖北中医学院)

梁裕芬(广西中医学院)

雷 萍(辽宁中医药大学)

谭周进(湖南中医药大学)

前 言

《医学免疫学与病原生物学》是医学院校的重要基础学科。随着该学科的发展，新的实验方法、实验技术层出不穷。加强实验教学、丰富实验教学内容是更进一步搞好其教学的有力手段。为满足教学需求，培养学生的实验操作技能，我们在总结吸收多年实验教学经验的基础上，编写了本实验教材。同时考虑到该课程的教学难度，我们在书中加入了部分模拟考试或考查试卷，以帮助学生复习思考。

本书不仅介绍了一些经典的实验方法，同时也对近年来本学科科学研究和临床检验中所应用的一些新方法、新技术如流式细胞术、聚合酶链反应等做了介绍，供有条件的学校选用。此外，为便于读者的自学，书中附加了多种试剂和培养基的制备方法。

本书通俗易懂，理论联系实际，有较强的科学性和实用性。在编写过程中得到了主编单位各级领导的支持，得到了湖南中医药大学伍参荣教授的关心和支持，在此表示感谢。

由于水平有限，时间仓促，本书中的疏漏和不足之处恐难避免，敬请读者提出宝贵意见，以便修订时完善。

本书编委会

2007年5月23日

目 录

实验室规则	1
第一篇 医学免疫学实验技术	
第一章 体液免疫功能检测实验	2
实验一 免疫血清的制备	2
实验二 免疫球蛋白的提取与鉴定	3
实验三 玻片凝集试验	5
实验四 试管凝集试验	5
实验五 间接血凝试验	6
实验六 环状沉淀试验——血迹鉴定	7
实验七 单向琼脂扩散法	8
实验八 双向琼脂扩散法	9
实验九 火箭免疫电泳	10
实验十 免疫电泳	11
实验十一 补体溶血反应	12
实验十二 溶血空斑试验	13
实验十三 EA 花环试验	14
实验十四 B 细胞表面免疫球蛋白测定	14
实验十五 酶联免疫吸附试验	15
第二章 细胞免疫功能检测实验	16
实验十六 巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验	16
实验十七 吞噬细胞刚果红吞噬试验	17
实验十八 外周血单个核细胞分离——密度梯度离心法	18
实验十九 E 花环形成试验	19
实验二十 淋巴细胞转化试验——形态法	20
实验二十一 淋巴细胞转化试验——MTT 法	21
实验二十二 人外周血 T 淋巴细胞亚群的检测	21
实验二十三 人外周血单个核细胞凋亡百分率的检测	23
实验二十四 耳肿试验	23
第三章 医学免疫学其他实验技术	24
实验二十五 白细胞介素 2 活性测定	24
实验二十六 大鼠 I 型被动皮肤过敏反应	25
实验二十七 血清中免疫复合物测定——PEG 法	26

第二篇 医学微生物学实验技术

第一章 细菌学总论实验	27
实验二十八 显微镜的使用与细菌形态、特殊结构观察	27
实验二十九 细菌的单染色法	28
实验三十 细菌的革兰染色法	29
实验三十一 活菌运动的观察	30
实验三十二 常用培养基的制备	30
实验三十三 细菌的接种技术与细菌生长情况的观察	32
实验三十四 细菌代谢产物的鉴定	35
实验三十五 物理因素对细菌的影响	37
实验三十六 化学因素对细菌的影响	40
实验三十七 细菌对药物的敏感性试验	41
第二章 细菌学各论实验	43
实验三十八 病原性球菌的形态、染色性及培养特性	43
实验三十九 葡萄球菌血浆凝固酶试验	44
实验四十 抗链球菌溶血素 O 试验	45
实验四十一 肺炎链球菌胆汁溶解试验	46
实验四十二 淋病奈瑟菌氧化酶试验	46
实验四十三 肠道杆菌的形态、染色性与培养特性	47
实验四十四 粪标本中致病性肠道杆菌的分离与鉴定	49
实验四十五 伤寒和副伤寒的血清学检查(肥达反应)	50
实验四十六 厌氧性细菌形态、染色性与培养特性	51
实验四十七 牛奶发酵试验	52
实验四十八 破伤风痉挛毒素的毒力试验与抗毒素的中和试验	52
实验四十九 临床标本中厌氧菌的分离与鉴定	52
实验五十 结核分枝杆菌的形态、染色性及培养特性	54
实验五十一 结核分枝杆菌的抗酸染色法	55
第三章 原核细胞型微生物实验	56
实验五十二 原核细胞型微生物的形态、染色性和培养特性观察	56
实验五十三 钩端螺旋体动力检查	57
实验五十四 溶脲脲原体脲酶试验	57
实验五十五 钩体的显微镜凝集试验	58
实验五十六 梅毒螺旋体的血清学试验	58
第四章 真菌学实验	61
实验五十七 真菌形态与菌落观察	61
实验五十八 真菌培养	62
实验五十九 浅部真菌感染临床标本的检查	64
实验六十 常见深部真菌感染临床标本的检查	65

第五章 病毒学实验	66
实验六十一 病毒的培养方法	66
实验六十二 红细胞凝集试验	73
实验六十三 血凝抑制试验	74
实验六十四 酶联免疫吸附试验检测 HBsAg	75
实验六十五 酶联免疫吸附试验检测抗 HBs	75
实验六十六 聚合酶链反应	76
第三篇 中药微生物学检查技术与抗菌作用的检测	
第一章 中药微生物学检查技术	79
实验六十七 注射剂的无菌检查	79
实验六十八 口服药物的微生物学检查	79
实验六十九 外用药物的微生物学检查	81
第二章 中药体外抗菌作用的检测	83
实验七十 中药体外抗菌作用的定性检测——琼脂扩散法	83
实验七十一 中药体外抗菌作用的定量检测——液体稀释法	84
第四篇 医学寄生虫学实验技术	
第一章 原虫实验	86
实验七十二 溶组织内阿米巴(痢疾阿米巴)	86
实验七十三 阴道毛滴虫	87
实验七十四 杜氏利什曼原虫(黑热病原虫)	88
实验七十五 蓝氏贾第鞭毛虫	89
实验七十六 刚地弓形虫	90
实验七十七 疟原虫	91
第二章 线虫实验	92
实验七十八 似蚓蛔线虫(蛔虫)	92
实验七十九 毛首鞭形线虫(鞭虫)	93
实验八十 蠕形住肠线虫(蛲虫)	94
实验八十一 钩虫(十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫)	94
实验八十二 丝虫(班氏吴策钱虫和马来布鲁线虫)	96
第三章 吸虫实验	97
实验八十三 华枝睾吸虫(肝吸虫)	97
实验八十四 布氏姜片吸虫(姜片虫)	97
实验八十五 卫氏并殖吸虫(肺吸虫)	98
实验八十六 日本血吸虫	99
实验八十七 日本血吸虫病动物模型制作	100
第四章 绦虫实验	101
实验八十八 链状带绦虫(猪带绦虫)	101
实验八十九 肥胖带绦虫(牛带绦虫)	102

实验九十 细粒棘球绦虫(包生绦虫).....102

第五篇 模拟试卷

一、《医学免疫学与病原生物学》考试模拟试卷一.....104
二、《医学免疫学与病原生物学》考试模拟试卷二.....110
三、《医学免疫学与病原生物学》考试模拟试卷三.....116
四、《医学免疫学与病原生物学》考试模拟试卷四.....123
五、《医学免疫学与病原生物学》考查模拟试卷.....130
六、《人体寄生虫学》考试模拟试卷.....135
七、《人体寄生虫学》考查模拟试卷.....143

实验室规则

1. 进实验室必须先穿好白大衣，离实验室时脱下反折叠好，白大衣要经常清洗消毒。
2. 必需的实验讲义、笔记本、文具等应放在指定位置。其他个人物品一律不准带入实验室内。
3. 实验室内应保持安静有序，禁止高声谈话，不准打闹嬉笑，以免影响他人实验和安全。
4. 在实验室内不准喝水，进食，吸烟，用嘴湿润铅笔或纸张，以免发生感染。
5. 实验过程中，接种环和接种针使用前后必须烧灼灭菌。必须避免任何有菌材料溅出。如不慎发生吸入菌液、划破手指、培养物损坏致传染物溢出时，应立即报告教师，以便处理。
6. 要爱护实验室的仪器，使用显微镜和其他仪器时要按要求操作。显微镜油镜使用后应立即用擦镜纸擦净镜头上的油。
7. 实验过程中应注意节约材料。损坏器材及时报告、登记。
8. 实验后应将所用物品放回原处，需培养的标本及时放入培养箱，需消毒处理的物品及时送到指定地点，用过的涂有细菌的玻片放入消毒缸内，不得随意弃置。
9. 未经教师许可，不得将实验室内任何物品，特别是菌种带出室外。
10. 实验完毕，整理桌面，肥皂洗手后清水冲洗。值日生打扫室内卫生，关好水电、门窗后离室。

第一篇 医学免疫学实验技术

第一章 体液免疫功能检测实验

实验一 免疫血清的制备

【原理】 机体接受抗原刺激后可以发生免疫应答，产生相应的抗体和致敏淋巴细胞。一种抗原能否引起免疫应答，除了主要取决于抗原分子有无抗原决定基外，还与抗原的性质、剂量、免疫途径及次数有关。适当的抗原进入机体，经过一定的潜伏期后，抗体水平逐渐升高，在恰当时期取免疫后的动物血清，即为免疫血清(也称抗血清)。

【材料】 绵羊红细胞(SRBC)、家兔等。

【方法与结果】

1. 抗原的制备 无菌采集绵羊静脉全血(抗凝)，静置使红细胞沉降后，用无菌生理盐水洗涤3次(每次离心2000r/min, 10min)，最后配成 10^6 /ml浓度的细胞悬液即可。

不同性质的抗原的处理方法不同，颗粒性抗原主要是指细胞抗原或细菌抗原。最常用的细胞抗原为制备溶血素用的绵羊红细胞。细菌抗原多用液体或固体培养物处理而制备。H抗原用有动力的菌株，菌液用0.3%~0.5%甲醛处理，而O抗原则需要100℃加温2~2.5h后应用。Vi抗原应在杀菌后再加0.5%~1%氯化钙溶液。有时虫卵也可做成抗原，如日本血吸虫虫卵抗原可制成悬液供免疫用。有些细胞膜成分，如组织细胞膜、血细胞膜经打碎后亦可制成颗粒抗原。颗粒抗原悬液呈乳浊状，多采用静脉内免疫法，较少使用佐剂。蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、细菌毒素、酶、补体等皆为良好的可溶性抗原。但因这些蛋白质多为复杂的蛋白组分，免疫前需进行纯化。蛋白质纯化方法在生物化学技术中已有详述。可溶性抗原免疫时，常加佐剂皮下注射。

2. 免疫动物 免疫效果与抗原的性质、剂量、免疫途径及免疫次数密切相关。本实验的具体免疫动物的方法(见表1-1)。

表1-1 绵羊红细胞免疫家兔实验设计

免疫次序	免疫时间	注射部位	抗原剂量(10^6 /ml)
1	第1天	皮下注射	0.4ml
2	第10天	肌肉注射	0.4ml
3	第17天	足底注射	0.4ml
4	第24天	静脉注射	0.4ml
5	第31天	皮下注射	0.5ml

3. 免疫血清的制备

(1) 试血：一般在末次注射后的7~10天，家兔耳静脉采少量血制备血清，与相应抗原反应，进行试血。抗体效价 $>1:16$ 即可采血。

(2) 采血制备血清: 无菌耳静脉或心脏采血(不抗凝), 收集于无菌试管内静置, 血液凝固后, 用无菌细玻璃棒使血块与试管壁分离, 置 37℃, 2h 后, 置 4℃ 过夜。使血清充分析出, 最终离心 2000r/min, 20min, 取上清即得。

【注意事项】

1. 免疫实验动物时要少量多次注射。
2. 免疫实验动物时注意无菌操作, 以防感染。
3. 实验中所用器皿要干燥、清洁。

附: 免疫血清的保存

1. 4℃ 保存 将抗血清除菌后, 液体状态保存于普通冰箱, 可以存放 3 个月到半年, 效价高时, 1 年之内不会影响使用。保存时要加入 0.15%~0.2% 叠氮钠(NaN_3) 以防腐。如若加入半量的甘油, 则保存期可延长。

2. 低温保存 放在 -20~-40℃, 一般保存 5 年效价不会有明显下降, 但应防止反复冻融, 反复冻融几次则效价明显降低。因此, 低温保存应用小包装, 以备取出后在短期内用完。

3. 冷冻干燥保存 最后制品内水分不应高于 0.2%, 封装后可以长期保存, 一般在冰箱中 5~10 年内效价不会明显降低。

实验二 免疫球蛋白的提取与鉴定

【原理】 根据各类免疫球蛋白及其他血清蛋白的分子大小、电离密度、等电点以及在水溶液中的溶解度不同等特性, 可以相互鉴别与分类。利用这些特性, 还可以从液体中分离和提取各种免疫球蛋白。

【材料】 免疫血清、50% 饱和硫酸铵、层析柱、Sephadex G-200、洗脱液(PBS 或含 NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液) 等。

【方法与结果】

1. 免疫球蛋白的提取

(1) 盐析法(salt fractionation): 蛋白质在不同浓度的盐溶液中相对溶解度不同。血清 γ 球蛋白在一定浓度盐溶液中易于沉淀, 而白蛋白则不易沉淀, 据此可将二者分离。

1) 饱和硫酸铵溶液的配制: 取 500ml 蒸馏水加热至 70~80℃, 将 400g 硫酸铵溶于其中, 搅拌 20min, 冷却。待硫酸铵结晶沉于瓶底, 其上清即为饱和硫酸铵。在使用前用 28% 氨水调 pH 为 7.0。

2) 用 50% 饱和硫酸铵提取血清中 α 、 γ 球蛋白: 血清一份加生理盐水一份, 混匀, 然后逐滴加入二份的饱和硫酸铵中, 边加边搅拌(防止形成团块, 降低沉淀物的特异性)。混匀后静置 30min 或置 4℃ 冰箱过夜。高速低温离心 10 000r/min, 10min, 将上清液(含白蛋白)弃去, 取沉淀物(含球蛋白), 溶于少量生理盐水中。

3) 用 33% 饱和硫酸铵提取 γ 球蛋白: 将上述提取物生理盐水溶液两份加一份饱和硫酸铵, 然后再高速低温离心 10 000r/min, 10min。其余操作同上。

4) 按同样方法再用 33% 饱和硫酸铵提取一次。

5) 将提取物装入透析袋, 在生理盐水中透析, 以除去其中所含的硫酸铵。经此法提取的蛋白质为粗提的免疫球蛋白, 若要获得纯化的免疫球蛋白, 必须经凝胶过滤或离子交换层析提纯。

(2) 凝胶过滤法(gel filtration): 利用具有分子筛效应的多孔网状凝胶作为介质, 可分离提纯分子量不同的大分子物质。在凝胶过滤过程中, 分子量大的物质因不能进入凝胶网孔而沿凝胶颗粒间的空隙先流出凝胶柱外; 分子量小的物质因能进入凝胶网孔而受阻滞, 流速缓慢而最后流出柱外, 这样就能将分子量不同的物质分离。

1) 处理凝胶: 将 Sephadex G-200 用蒸馏水经充分膨胀后进行浮选。

2) 装柱: 在层析柱底部铺加一层尼龙纱, 然后将洗脱液饱和凝胶粒子沿插入柱底的玻璃棒缓缓倾注于层析柱内。

3) 加样: 在凝胶柱表面再加一层尼龙纱, 沿管壁缓缓加入样品, 所加样品的体积不超过凝胶柱的 10%。

4) 洗脱: 洗脱液洗脱, 流速 20ml/h。待样品洗脱下来(用 20% 磺酸水杨素检测), 用试管分段收集。

5) 蛋白测定: 在紫外分光光度计上选波长 280nm, 测定各管样品的 OD 值, 以判读各管蛋白含量。

6) 凝胶的处理: 样品洗脱完毕后, 凝胶即已再生。一次装柱可反复使用多次。凝胶悬液可加防腐剂于冰箱内保存数月。

7) 结果分析: 正常人血清经凝胶过滤后可分出三个主要蛋白峰(图 1-1)。第一峰主要是 IgM, 其次是 α 巨球蛋白。第二峰主要是 IgG, 在第二峰开始部分含 IgA 和 IgD, 第三峰为白蛋白和分子量 100 000 以下的蛋白质。

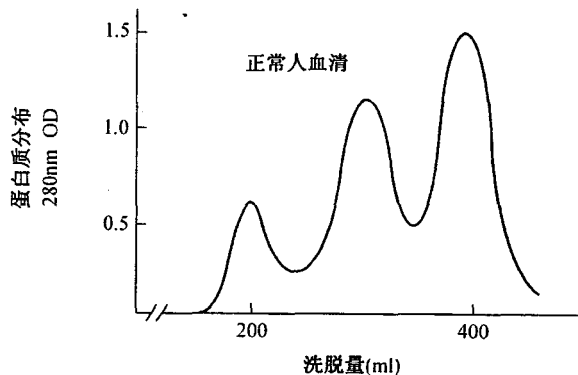


图 1-1 正常人血清经 Sephadex G-200 过滤后 Ig 的分布

2. 抗体的鉴定

(1) 鉴定抗体的类别: 用已知的抗 IgG、抗 IgM、抗 IgA, 通过双向免疫扩散法(详见实验八)鉴定所提抗体的类型。通过单向免疫扩散法(详见实验七)测定其含量。用混合的抗 IgG、抗 IgM、抗 IgA 与所提抗体反应, 通过双向免疫扩散法, 观察两孔之间形成沉淀线的条数, 鉴定其抗体类别的纯度, 若仅有一条沉淀线, 说明所提抗体较纯。

(2) 鉴定抗体的特异性: 用粗提或纯化抗原, 通过双向免疫扩散法鉴定所提抗体的抗原特异性。按双向免疫扩散技术打孔呈三角排列, 上两孔分别加抗原粗提物(如抗原来自动物血清则直接加相应血清)和纯化抗原, 下孔加抗血清, 进行双扩散 18~24h 后, 仔细观察抗体孔与两个抗原孔之间出现的沉淀线。若与粗抗原及纯抗原之间皆出现一条沉

淀线,且两者互相融合,则证明该为抗原特异性抗体;若与纯化抗原出现一条,而与粗抗原出现多条线,且其中一条沉淀线与纯抗原沉淀线相连接,说明除了含有针对纯化抗原的特异性抗体外,还有其他的杂抗体。

【注意事项】

1. 提取免疫球蛋白最好在 2~4℃ 条件下进行,防止抗体失活。
2. 层析柱应足够长,增加压力梯度,减缓流速。
3. 柱床表面应平整,无沟流及气泡,否则应重装。
4. 上样的体积不能过大,浓度不宜过高。
5. 加样及整个洗脱过程中,严防柱面变干。

实验三 玻片凝集试验

玻片凝集试验(slide agglutination test)一般均用于诊断未知抗原,如用已知的免疫血清鉴定未知的细菌和血型等。由于方法简便,并具有较高的敏感性和一定的特异性,故各实验室广泛应用。玻片凝集的反应时间短(在 2~5min 左右出现凝集),因而免疫血清的浓度应相应提高(如免疫血清试管凝集效价在 1:1280 以上,此时应做 1:20 稀释)。本试验方法只能用做定性试验。

【原理】 颗粒性抗原与相应抗体(尤其 IgM、SIgA)结合,会发生肉眼可见颗粒凝集现象。

【材料】 1:20 抗宋内志贺菌免疫血清(用生理盐水配制)、宋内志贺菌菌液、生理盐水、载玻片、尖吸管、红蜡笔等。

【方法与结果】

1. 取洁净载玻片一张,用红蜡笔画分两格。
2. 用尖吸管分别取上述免疫血清及生理盐水各一滴分别加于两格内。
3. 在两格内各加一滴细菌悬液,将玻片轻轻摇动 1~2min,使细菌与免疫血清及生理盐水充分混匀。
4. 在抗宋内志贺菌免疫血清一格出现细菌凝集,而另一格内无细菌凝集,则实验成立。如果两格内均出现凝集说明菌液有问题,若两格均不凝集,说明免疫血清有问题(不含相应抗体或为非凝集性抗体)。

【注意事项】

1. 凝集反应最好在温度为 20℃ 以上条件下进行。
2. 试验中所用吸管、玻片等必须清洁,否则不容易出结果。

实验四 试管凝集试验

试管凝集试验(tube agglutination test)一般均以标准抗原(已知抗原)测定免疫血清或患者血清中抗体的效价。

【材料】 1:100 抗绵羊红细胞(SRBC)血清(配制前需经 56℃, 30min 灭活)、2%SRBC 生理盐水悬液和生理盐水等。

【方法与结果】

1. 取试管 7 支,排列于试管架上并做好编号标记。

2. 每管各加生理盐水或 PBS 0.5ml。

3. 取 1:100 抗 SRBC 血清 0.5ml 加入第一管中混匀后, 从第一管中吸取 0.5ml 液体加于第二管, 同法依次加入下一管, 直到倒数第二管, 混匀后吸出 0.5ml 弃去(如图 1-2)。

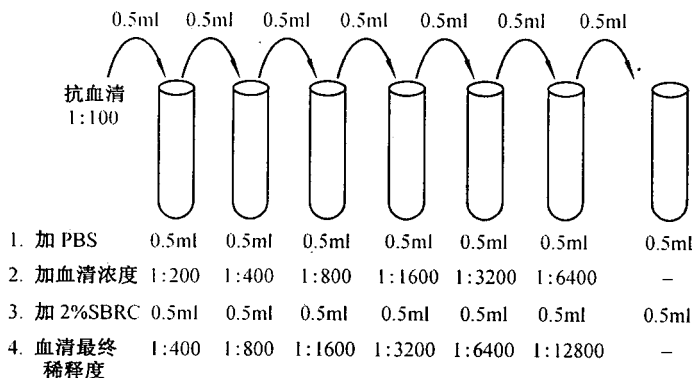


图 1-2 试管凝集试验倍比稀释法

4. 每个试管各加 2%SRBC 0.5ml(注意: 加 SRBC 前必须将细胞悬液充分混匀)。

5. 室温静置 2h, 观察结果。观察前切勿摇动试管, 以免凝集分散。

6. 结果观察时首先应观察对照管, 对照管无凝集现象的前提下, 再观察 1~6 试验管凝集状况和强度, 并以“++++、+++、++、+、-”表示凝集状况和强度。以血清最高稀释度出现“++”凝集现象者作为该免疫血清的效价(滴度)。例如, 在本次实验中第 5 管呈“++”, 第 6 管呈“+”或“-”, 对照管为“-”, 则该血清的抗体效价为 1:6400。

++++: 完全凝集, 血球呈厚膜状铺于管底, 边缘呈锯齿状。

+++ : 血球呈薄层贴于管底, 边缘不齐。

++ : 中央呈较小圆盘状沉淀, 边缘凝集呈颗粒状。

+ : 血球呈较大的圆盘状沉淀, 边缘有少量凝集颗粒。

- : 无凝集, 血球沉于管底呈规则圆盘状。

上述实验也可在凹孔塑料板上进行, 方法步骤及观察结果方式基本同上, 仅每孔加入的反应液体积在 0.2~0.5ml。

【注意事项】

1. 准确取样、加样, 应仔细认真操作。稀释血清时不能跳管, 且每管都要吹打混匀。

2. 2%SRBC 悬液应新鲜配制, 当天用完, 若置 2~10℃, 使用期不超过 3 天。

附: SRBC 制备方法

以无菌操作从健康成年绵羊外颈静脉取血, 放入有玻璃珠的三角瓶内, 振摇 10~20min 脱去纤维, 然后倒入二倍量羊血的阿氏液, 摇匀分装小管, 在 4℃冰箱内保存备用。实验时取 SRBC, 加无菌生理盐水(约 1:4), 离心 2000r/min, 10min 洗涤, 去上清, 再加生理盐水, 按上法洗涤三次。最后取压积红细胞 0.2ml, 加生理盐水 9.8ml 即得 2%SRBC。

实验五 间接血凝试验

【原理】 以红细胞作为载体吸附抗原或抗体与相应的抗体或抗原发生凝集反应。

【材料】 血吸虫 SEA、醛化的绵羊血细胞、病人血清、血凝板、微量加样器、试管、试管架、刻度吸管、恒温水浴箱。

【方法与结果】

1. 取稀释的抗原与等体积的已醛化的 2%SRBC 混合, 37℃水浴 2h, 每隔 15min 振摇一次, 取出后洗涤弃上清, 稀释成 0.5%的致敏 RBC 备用。

2. 于微量血凝板中每孔加入稀释液 25 μ l, 在第一孔中加入病人血清 25 μ l 并做倍比稀释。

3. 在每孔中加入 0.5%的致敏血细胞 25 μ l, 然后于微量振荡器上摇 3~5s, 置 37℃、1h, 观察结果。

4. 以“++++、+++、++、+、-”表示致敏血细胞凝集程度。以血清最高稀释度管仍能出现“++”凝集现象者, 作为该免疫血清的效价(滴度)。

++++: 完全凝集, 血球呈厚膜状铺于孔底, 边缘呈锯齿状。

+++ : 血球呈薄层贴于孔底, 边缘不齐。

++ : 中央呈较小圆盘状沉淀, 边缘凝集呈颗粒状。

+ : 血球呈较大的圆盘状沉淀, 边缘有少量凝集颗粒。

- : 无凝集, 血球沉于孔底呈规则圆盘状。

【注意事项】

1. 实验用的血凝板、微量加样器必须十分清洁。

2. 血凝板用后可用 10%的次氯酸钠浸泡过夜, 用自来水冲洗后, 再用蒸馏水冲洗, 晾干待用。

3. 试剂盒应于 2~10℃干燥暗处保存。

实验六 环状沉淀试验——血迹鉴定

【原理】 在环状沉淀试验(ring precipitation test)中, 当可溶性抗原与相应抗体特异结合后, 于两者界面处可形成白色沉淀环。本试验的最大优点是具有相当高的敏感性和特异性, 这主要取决于有高效价的特异性抗体和制备抗体时抗原的纯化程度。如某些特异性抗体的效价可达 1:20 000~1:40 000 或更高, 即将相应的可溶性抗原做 1:20 000~1:40 000 倍稀释后仍可出现反应。因此, 在检测微量抗原时本试验是经典的沉淀试验, 到目前为止仍有其实用价值。

【材料】 未知血迹(人血迹)的干燥纸片、抗人血清抗体、抗羊血清抗体、抗鸡血清抗体、生理盐水、环状沉淀管及环状沉淀管架等。

【方法与结果】

1. 取环状沉淀管 3 支置于环状沉淀管架上, 用 3 支尖吸管分别加抗人、抗羊及抗鸡血清抗体各 0.1ml 于沉淀管, 并注明抗体类型。

2. 取任一未知血迹纸片放入洁净的试管中, 并加入生理盐水 1ml, 放置室温 5~10min 后, 摇匀。用尖吸管吸取上清液(抗原), 分别缓缓加入上述含有抗人、抗羊及抗鸡血清抗体的沉淀管中, 并使两者间呈一清晰界面。

3. 室温静置 1~5min, 观察结果。

4. 如仅在抗人血清管出现白色沉淀环, 则此血迹为人血。

【注意事项】

1. 加抗原时应使沉淀管倾斜，使其缓缓由管壁流下，轻浮于抗体上面，勿使相混，避免气泡产生。
2. 观察结果时将沉淀管平放在眼前，若在小管后衬以黑纸或手指，使光线从斜上方射入两液面交界处，则能更清楚看到沉淀环。
3. 试验设立阴性和阳性对照，以免出现假阳性。

实验七 单向琼脂扩散法

【原理】 在单向琼脂扩散法(single agar diffusion)中，在含有特异性抗体的琼脂板上打孔，并在孔中加入相应抗原，抗原向周围扩散并与琼脂中抗体相结合，即形成白色沉淀环，其直径或面积大小与抗原浓度呈正相关。同时用标准抗原或国际参考蛋白制成标准曲线，即可用以定量检测未知标本的抗原浓度(mg/ml 或 U/ml)。应用这一方法可检测正常人群或患者血清中 IgG、IgA 及 IgM 等各种血清蛋白的含量及正常值。

【材料】 2%离子琼脂或生理盐水琼脂(内含 0.2%NaN₃)、标准羊抗兔 IgG 血清(抗体)、兔血清(2 份)、标准的兔 IgG、打孔器(孔径 3mm)及打孔模板、微量加样器、湿盒(容器内加湿纱布或泡沫塑料)等。

【方法与结果】

1. 标准曲线的制备

(1) 溶解琼脂：取能制作 1~1.5mm 厚度的琼脂板所需 2%琼脂盐水的 1/2 量溶解(例如，用普通载玻片制作时其 1%琼脂量为 4ml，在分装 2%琼脂盐水时即为 2ml)，溶化后置 56~60℃水浴中平衡温度备用。

(2) 稀释抗体：将标准羊抗兔 IgG 血清按其效价，用 pH7.2 PBS 做浓 1 倍稀释。例如，血清效价为 1:140，原浓血清即应稀释为 1:70。并分装试管，其分装量应与 2%琼脂盐水量相等。

(3) 制板：将已稀释的标准羊抗兔 IgG 血清，置 56~60℃水浴中预热约 30s 后，倾入已溶化并维持 56~60℃的 2%琼脂盐水管中，用拇指将管口堵紧。翻转试管 1~2 次，将抗体与琼脂混合均匀(注意：抗体与琼脂混合时切勿产生气泡)，迅速倾注于玻片上，待凝固后即成。

(4) 打孔：将琼脂板置于模板上，在同一直线上用打孔器打 5 个孔，孔距 1.0cm。

(5) 稀释不同浓度的标准兔 IgG：应根据制品说明进行稀释，例如，工作标准液中免疫球蛋白含量 IgG 为 100U/ml，80.4μg/U，其稀释范围为 1:10、1:20、1:40、1:80 及 1:160。

(6) 加样：将已稀释的不同浓度的工作标准液，用微量加样器每孔加入 10μl(注意：每一稀释度均应更换塑料吸头)。

(7) 置湿盒中，放 37℃温箱，24h 后观察结果。

(8) 准确测量并记录沉淀环直径，然后以沉淀环直径为纵坐标，标准兔 IgG 含量为横坐标，绘制成标准曲线(在制作标准曲线时，为尽量减少误差，至少应做两份以上标准板)。

2. 兔血清中 IgG 含量的测定