

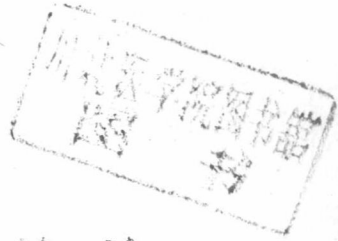
# 医学免疫学与微生物学 实验指导

赣南医学院  
微生物学与免疫学教研室

一九八九·十

R392-33

6030



# 医学免疫学与医学微生物学 实验指导

主 编 吴浔音 (副教授)

审 编 童竞亚 (教 授)

编 者 罗组才 (副教授)

马廉兰 (讲 师)

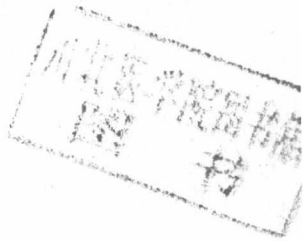
刘琥琥 (讲 师)

李绣辉 (讲 师)



A0179851

267256



# 前 言

现我院本科与专科并举，因教学需要，我们在87年实验指导的基础上补充了一些新的实验，删去了少量实验，作为本科与专科合用的实验指导。大专教学使用本教材时，可按专科教学时数及要求删除部分实验内容。

为了适应高等医学教育事业的发展，反映医学免疫学及医学微生物学的新技术，培养四化人才，培养学生独立思考、独立实验的能力，我们从广度和深度上结合理论教学及实际应用，增添了20余个实验内容，例如放射免疫检测、HLA检测、F'质粒消除试验等。

本实验指导反映了我室多年来在教学、科研及微生物学免疫学临床检验工作的经验，学习了兄弟院校的先进技术与成熟经验，并参考了有关文献，故实验结果的重现性及实验方法的可行性均较好。

陈文建老师曾编写部分内容，现已调至新的工作岗位。我室赵美贵实验师及严宜明、邱东海、肖士云同志在技术建立及抄写绘图中均付出了辛勤劳动。

由于编者水平有限，编写时间仓促，本实验指导肯定还有不少缺点甚至错误，恳请兄弟院校同道及读者批评指正。

赣南医学院微生物学免疫学教研室

一九八九年十月

# 医学免疫学与医学微生物学实验指导

## 目 录

实验室规则	( 1 )
显微镜(油镜)的使用和保护	( 2 )

### 免疫学实验部分

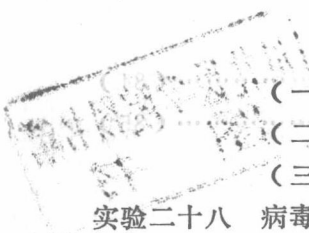
实验一	免疫血清的制备	( 4 )
实验二	总补体活性测定	( 5 )
实验三	观察免疫系统的形态结构	( 6 )
实验四	直接凝集反应	( 7 )
实验五	反向间接凝集试验	( 9 )
实验六	间接凝集抑制试验	( 11 )
实验七	琼脂扩散试验	( 12 )
实验八	对流免疫电泳	( 15 )
实验九	火箭电泳	( 17 )
实验十	免疫电泳	( 18 )
实验十一	补体结合试验	( 20 )
实验十二	B淋巴细胞膜免疫球蛋白的检测	( 24 )
实验十三	E玫瑰花结形成试验	( 26 )
实验十四	淋巴细胞转化试验	( 29 )
实验十五	白细胞移动抑制试验	( 30 )
实验十六	离子交换层析法——DEAE纤维素柱层析法提纯IgG	( 32 )
实验十七	用亲和层析技术分离抗人IgG抗体	( 34 )
实验十八	免疫荧光技术	( 36 )
实验十九	免疫酶技术	( 38 )
实验二十	放射免疫测定	( 39 )
实验二十一	动物I型超敏反应	( 41 )
实验二十二	母胎血型不合引起的免疫性溶血	( 42 )

实验二十三	循环免疫复合物的检测——抗补体法	(44)
实验二十四	植物血凝素皮肤试验	(48)
实验二十五	免疫缺陷及免疫增生患者的免疫学检测标本示教	(48)
实验二十六	自身免疫性溶血性贫血的检测——抗球蛋白试验	(49)
实验二十七	自身免疫变应性脑脊髓炎动物试验	(49)
实验二十八	类风湿性因子乳胶试验——玻片法	(50)
实验二十九	血脑屏障作用	(51)
实验三十	吞噬细胞的吞噬作用	(51)
实验三十一	溶菌酶试验	(52)
实验三十二	血清杀菌试验	(52)
实验三十三	HLA 血清学检测法——微量淋巴细胞毒试验	(53)
实验三十四	HLA 细胞学检测法——混合淋巴细胞培养法	(55)
实验三十五	生物制品示教	(57)

### 微生物学实验部分

实验一	细菌形态结构及运动的观察	(58)
实验二	细菌标本制作及革兰氏染色法	(58)
实验三	基础培养基的制备	(60)
实验四	细菌的培养方法	(62)
实验五	细菌代谢产物的检查	(65)
实验六	细菌呼吸酶的检查	(67)
实验七	细菌DNA中G + C含量百分比测定	(68)
实验八	细菌的分布	(71)
实验九	物理灭菌法	(72)
实验十	化学消毒剂的作用	(75)
实验十一	噬菌体	(76)
	(一) 烈性噬菌体的溶菌作用	
	(二) 噬菌体的效价测定	
	(三) 温和性噬菌体的诱导试验	
实验十二	细菌的遗传变异	(79)
	(一) 耐药性变异及R因子传递	
	(二) 细菌质粒琼脂糖凝胶电泳	
	(三) F'质粒消除试验	
实验十三	细菌致病性及免疫物质抗感染试验	(82)
	(一) 透明质酸酶试验	
	(二) 外毒素毒性及抗毒素中和试验	
	(三) 鲎变形细胞溶解物试验	

实验十四	感染动物的尸体解剖及细菌学检查.....	(84)
实验十五	病原性球菌.....	(85)
	(一) 葡萄球菌	
	(二) 链球菌	
	(三) 肺炎球菌	
	(四) 奈瑟氏菌属	
实验十六	肠道杆菌.....	(89)
	(一) 大肠杆菌	
	(二) 志贺氏菌属	
	(三) 沙门氏菌属	
	(四) 变形杆菌属	
实验十七	霍乱弧菌.....	(94)
实验十八	厌氧性细菌.....	(94)
	(一) 厌氧培养法	
	(二) 无芽胞厌氧菌	
	(三) 破伤风杆菌	
	(四) 产气荚膜杆菌	
实验十九	白喉杆菌.....	(98)
实验二十	分枝杆菌属.....	(102)
	(一) 结核杆菌	
	(二) 麻风杆菌	
实验二十一	放线菌.....	(104)
实验二十二	动物源性细菌.....	(106)
实验二十三	其他细菌.....	(106)
实验二十四	临床标本的微生物学检查.....	(107)
	(一) 化脓及创伤感染标本的检查	
	(二) 血液标本的检查	
	(三) 粪便标本的检查	
	(四) 尿液标本的检查	
	(五) 脑脊液标本的检查	
	(六) 咽喉标本的检查	
	(七) 痰液标本的检查	
实验二十五	立克次体、衣原体.....	(118)
实验二十六	螺旋体.....	(119)
	(一) 钩端螺旋体	
	(二) 梅毒螺旋体	
	(三) 奋森氏螺旋体	
实验二十七	真菌.....	(124)



	(一) 真菌的基本形态、培养	四十	铜突
	(二) 浅部感染真菌	五十	铜突
	(三) 深部感染真菌		
实验二十八	病毒的形态与培养	(128)	
	(一) 病毒的形态		
	(二) 动物接种法		
(98)	(三) 鸡胚培养法	六十	铜突
	(四) 组织培养法		
实验二十九	病毒血凝和血凝抑制试验	(132)	
实验三十	病毒中和试验	(134)	
	(一) 用已知病毒检测血清中和抗体效价		
(40)	(二) 用已知免疫血清鉴定病毒种类与型别	七十	铜突
实验三十一	人类轮状病毒RNA聚丙烯酰胺凝胶电泳	八	(138)
实验三十二	乙型肝炎病毒抗原抗体系统的检测	(141)	
实验三十三	EB病毒VCA—IgA 抗体的检测	(146)	
附: 不加热血清反应素试验 (USR 试验)		(148)	
(80)		二十	铜突
(101)		十二	铜突
(101)		十二	铜突
(98)		二十	铜突
(108)		三十二	铜突
(101)		四十二	铜突
(81)		五十二	铜突
(118)		六十二	铜突
(151)		七十二	铜突



# 实用实验室规则

我室实验用对象主要是病原微生物及病人标本，如果不注意，可能发生感染，甚至传播，为防止实验室感染，并提高实验课的效果，必须严格遵循下列规则。

- 一、进实验室必须穿工作衣（白大衣）。不必需的物品，勿携入室内。
- 二、实验室内严禁吸烟和饮食。
- 三、实验操作应严格遵照实验指导和教师的讲授进行，以期获得正确的实验结果。
- 四、在实验过程中，如果不慎发生培养物或传染性材料污染桌凳地面、衣物等，应立即报告教师，用2%来苏水处理半小时，然后洗净；若手上沾有活菌，应即浸泡于2%来苏水中5—10分钟，再以肥皂及水洗刷；若将病原菌吸入口中，应立即吐在来苏水缸内，并以0.1%高锰酸钾溶液充分漱口；根据菌类不同选用抗菌药物以资预防。
- 五、吸过菌液的吸管、毛细吸管，要及时放入装有来苏水的容器中消毒，不得放在他处亦不可在水槽内冲洗。用过的玻片（示教标本除外）也应放于含消毒液的容器内。
- 六、实验室内要求肃静、整洁。爱护公物，注意节约水电及实验材料。器材如有损坏，应向指导教师报告，进行登记。
- 七、每次实验后应整理桌面，将物品放回原处或指定地点，打扫卫生，用2%来苏水洗手，脱去工作衣，反折好，关好水电门窗，方可离开实验室。



显微镜各部分名称

（二）  
 。（三）  
 （四）



# 显微镜油镜的使用和保护

## 目的

学会显微镜油镜的使用和保护。

## 内容

### 一、显微镜油镜的使用方法：

(一) 普通光学显微镜(图1)的接物镜有低倍镜、高倍镜及油镜三种, 检查微生物时常用油镜, 油镜常见的标志是: 1. 透镜直径最小(孔径数最大, 为1.25); 2. 油镜头长度大于低倍镜和高倍镜, 油镜头的下缘有一圈黑线或两圈红线; 3. 有oel等字样; 4. 有放大倍数 $90\times$ 或 $95\times$ 或 $100\times$ 的标记。若镜筒的长度不变, 显微镜的放大倍数=接目镜倍数 $\times$ 接物镜的倍数。例如接目镜倍数为 $10\times$ , 接物镜倍数为 $100\times$ , 则放大倍数为1000倍。

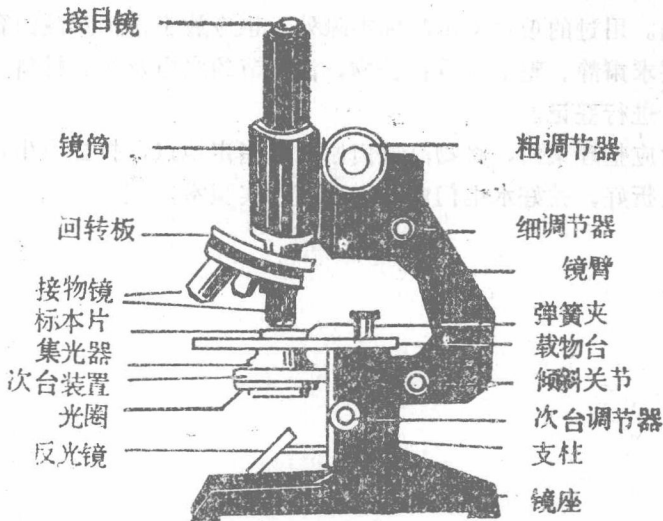


图1 普通光学显微镜

(二) 使用油镜时必须将显微镜直立于桌上, 切勿将镜臂和载物台倾斜, 以免镜油流出, 影响观察。

(三) 先用低倍镜对光, 显微镜不能采用直接阳光作光源, 因其光线过强, 反而不易看清, 且反射热有损光学装置, 应采取间接日光为光源, 使用平面反光镜; 如采用灯光为光源时, 宜用凹面反光镜。转动反光镜, 使光线集中于集光器。

(四) 根据所观察的标本, 升降集光器和缩放光圈, 以获得最佳光度。一般染色标本用油镜检查时, 光度宜强, 可将光圈开足, 集光器上升至载物台相平; 检查未染色标本用低倍

镜或高倍镜观察时，应适当缩小光圈，下降集光器，使光度减弱。

(五) 将标本置载物台上，用弹簧夹或标本推进器固定，移待检部位于接物镜下。

(六) 先用低倍镜找出标本的范围，然后提高镜筒，在标本的待检部位加一滴镜油，量勿过多，更勿将油涂开。用油镜对准油滴，眼睛从侧面看着油镜，将粗调节器缓缓移动，使镜筒逐渐下降，直至油镜的末端浸没在油内，但切勿碰到玻片，然后眼睛转移至目镜处，一面观察，一面微转动粗调节器，使镜筒徐徐上升（此时只应上升，不能下降，以免压碎标本片和损坏油镜！）待看到模糊物象时，再改用细调节器转动到物象清晰为止。如果油镜末端已离开油面，应按上述过程重复操作。

(七) 检查完毕，向上转动粗调节器将镜筒提起，取下标本片，用擦镜纸将油镜上的油擦净。

## 二、显微镜的保护法：

显微镜是精密的光学仪器，要特别注意爱护。

(一) 取送搬移时，要一手握紧镜臂，一手托住镜座，轻拿轻放，避免碰撞。

(二) 细调节器是显微镜最精细而脆弱的部分，只能做轻微的来回旋转，不要向一个方向转动数周以上。目镜、物镜、反光镜等光学部分，必须保持清洁，避免日光直接照射。各部分结构切勿自行拆卸，以免损坏。强酸、强碱、氯仿、乙醚和酒精等均能去漆或损坏机件，应避免与显微镜接触。

(三) 油镜每次使用完毕，立即用擦镜纸（不能用布类或其他纸）拭去镜油，如油已干或透镜模糊不清，可用擦镜纸蘸二甲苯少许擦净，但必须随即用另一干擦镜纸拭去残留的二甲苯，以免渗入油镜内溶解用以粘固透镜的胶质，造成透镜移位或脱落，因此应尽量少用二甲苯，也可用擦镜纸蘸乙醚酒精少许将镜油拭去，接着用干擦镜纸拭去残留的乙醚酒精。

(四) 保存：显微镜不用时，必须将接物镜转成“品”字形，并下降集光器和镜筒，用软绸拭净各部件后覆盖于接目镜上，放入镜箱或罩内，避免直射日光，置于干燥处，以防受潮。

## 问题

油镜的使用和保护应该注意哪些事项？

## 附录

使用油镜时，需要在玻片上滴加镜油的原理（图2）：由于油镜的透镜很小，自玻片透过的光线，因介质密度（从玻片至空气，再进入油镜）不同，部分光线因折射（如图2中之A—A'）不能进入透镜，致使射入的光线很少，物象显现不清。采用与玻璃折光率相近的介质如香柏油加于玻片和油镜之间，即增加了进入透镜的光线（如图2中C—C'），使视野的亮度加强物象可看清楚。

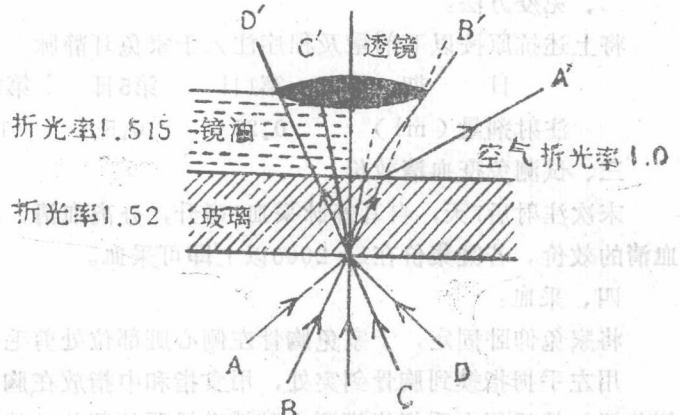


图2 使用油镜时加镜油的原理

# 免疫学实验部分

## 实验一 免疫血清的制备

制备特异性强，亲和力好，效价高的免疫血清必须掌握三个环节，即制备好免疫原性较强的抗原，选择健康的合适的动物及采取合适的免疫方法。抗原包括颗粒性抗原（如细菌悬液等）及可溶性抗原（如类毒素、血清蛋白等）。制备诊断血清多采用家兔，制备防治用的抗血清则选用马、羊等大动物。免疫途径有皮内、皮下、静脉、脚掌、淋巴结等。应根据抗原性质，及动物对免疫原的反应，选择免疫途径、设计合适的免疫方案。

### 原理

用抗原免疫动物可刺激其B细胞分化增殖为浆细胞，由后者合成特异性抗体，此种含有特异性抗体的血清即为免疫血清。

### 材料

- 一、健康雄家兔（体重2—3公斤）
- 二、菌种：H型伤寒杆菌标准菌株
- 三、普通琼脂培养基
- 四、其他：无菌注射器及针头、生理盐水、0.2%及0.4%甲醛盐水、Mecfarland标准比浊管、无菌试管及毛细吸管、平皿、剪刀、镊子、碘酒、酒精、消毒干棉球。

### 方法

一、抗原（菌液）的制备：（见直接凝集反应附录）

二、免疫方法：

将上述抗原按以下剂量及程序注入于家兔耳静脉

日期	第1日	第5日	第10日	第15日
注射剂量 (ml)	0.25	0.5	1.0	2.0

三、试测免疫血清效价

末次注射后7天，自耳静脉采血1毫升，分离血清，用上述菌液作试管凝集反应，测免疫血清的效价。若凝集价在1:2000以上即可采血。

四、采血：

将家兔仰卧固定，于家兔胸骨左侧心脏部位处剪毛，用碘酒、酒精消毒皮肤。

用左手拇指摸到胸骨剑突处，用食指和中指放在胸骨右侧，轻向左推，使心脏固定于左侧位置，然后用左手拇指摸测心脏搏动最强的部位（约在左侧近胸骨的第三肋间处），将针头对准心搏最强部位自左下向右上方刺入（呈45°角），待见注射器内有回血右手即将位置固定，左手轻轻抽动注射器针芯，血液即涌出，抽血20—30毫升。用干棉球压迫伤口止血。

五、分离血清：将血液立即注入无菌平皿中，室温凝固后，置37° 1小时，即用无菌毛细吸管吸出血清，置无菌试管中3000转/分离心15分钟。除去红血球。

六、防腐保存：将已分离之血清加入防腐剂0.01%硫柳汞，分装，于4℃冰箱保存，备用。

## 实验二 总补体活性 (CH<sub>50</sub>) 测定

### 原理

补体与溶血系统接触后，形成具有活性的溶血系统，从而使致敏的绵羊红血球溶解。其溶血的程度与补体量成正比，溶血程度在30—70%的范围内，补体的用量稍有变动即能影响溶血程度，因50%溶血 (CH<sub>50</sub>) 时，其溶血的程度与补体量的关系最敏感，近似直线关系，故以50%溶血度作为反应的终点指标，所测补体量较为准确。

本法较100%溶血 (CH<sub>100</sub>) 试验要敏感得多，但操作要求要比CH<sub>100</sub>高。它多用于研究补体在血清中含量的变动，作为检查人体非特异性免疫的指标之一。而且测定血清补体效价对于疾病的诊断、病因研究、预后判断都有一定的实际意义。

### 材料

一、2%绵羊红血球 (SRBC)：经脱纤维的SRBC用生理盐水洗涤三次，末次用2000转/分离心5分钟，配成2%SRBC悬液。

二、标化2%SRBC液：取上述已配好的2%SRBC悬液0.2毫升，加生理盐水5毫升，混匀，用581—G光电比色计，50滤光板进行比色，在透光度74处为宜，否则应予调整。

三、溶血素 (抗SRBC抗体)：试验时用1个单位的溶血素。

四、1%致敏SRBC：取1u/ml溶血素与2%已标化好的SRBC等量混合，15分钟后即可应用。

五、50%溶血标准管配制：

(一) 先配制2%血红蛋白溶液：取10毫升刻度离心管1支，加2%SRBC至10毫升刻度，经2000转/分离心10分钟，除去上清液，加蒸馏水至9.5毫升处，使全部溶血，再加0.5毫升17%NaCl缓冲盐水，使成等渗，并加入少许NaN<sub>3</sub>，置冰箱中保存。

17%NaCl缓冲盐水的配制：

NaCl 17克

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.13克

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27克

加蒸馏水 100ml溶解即成。

(二) 取上述已配制好的2%血红蛋白0.1毫升加2%SRBC0.1毫升，再加入生理盐水0.8毫升，混匀，经2000转/分离心沉淀5分钟，其上清液作为50%的溶血标准管，仅供当天使用，否则久置后血球发生溶血，影响比色标准 (如欲使每次试验的血球浓度一致，可取0.4%血红蛋白用光电比色计取得一定读数，以后每次均应调整血球浓度，使其0.4%血红蛋白均能达到同一读数)。

六、补体：用新鲜豚鼠血清。

七、生理盐水

八、37℃水温箱，华氏试管，试管架，1毫升及2毫升吸管。

方法

一、取洁净小试管7支，分别标记管号1、2、3、4、5、6、7。

二、稀释血清：取血清0.2毫升，加生理盐水1.8毫升，混合即成1:10稀释，吸出0.5毫升放入第一管，然后将余下的1.5毫升血清与等量生理盐水混合，稀释成1:20，从其中吸出0.5毫升放入第二管，将所余的2.5毫升血清与等量生理盐水混匀，即成1:40稀释，再按下表所列的量将1:40血清分别加于3~7管。

三、按下表加入各种成份。

四、37℃水温箱中作用30分钟。

五、离心沉淀后与50%溶血标准管比较，判定结果。

管号		1	2	3	4	5	6	7
稀 释 血 清	1:10	0.5						
	1:20		0.5					
	1:40			0.5	0.4	0.3	0.25	0.2
生 理 盐 水		0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.35	0.4
1%致敏绵羊红血球		0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
37℃水浴30分钟，1000转/分5分钟离心沉淀后与50%溶血标准管比较								
结 果 ( 单 位 )		20	40	80	100	133	160	200

### 结果判断

以待检血清中的最少量补体仍能产生50%溶血的试验管，与50%溶血标准管用肉眼观察（白纸衬底）相比较，定出CH50单位数。

补体含量计算：

$$\text{补体含量} = \frac{1}{\text{补体用量 (血清用量)}} \times \text{稀释倍数}$$

如血清经1:40稀释后在第5管（即用0.3毫升）出现50%溶血，则待检血清补体含量为  $\frac{1}{0.3} \times 40 = 133$  单位。

正常值：80—120单位/毫升血清

### 问题

总补体活性测定为什么要用CH50法，而不采用CH100的方法？

## 实验三 观察免疫系统的形态结构

### 目的

结合免疫学与组织学复习免疫系统的组织细胞形态结构。

## 内容

### (一) 免疫器官

1. 观察家兔胸腺组织切片, HE染色。
2. 观察雏鸡腔上囊组织切片, HE染色。
3. 观察家兔淋巴结及脾脏组织切片, HE染色。
4. 观察正常人骨髓涂片, Gimsa染色。

### (二) 免疫细胞

1. 观察家兔淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞的Gimsa染色标本。
2. 观察家兔淋巴母细胞、浆细胞Gimsa染色标本。
3. 观察家兔或大鼠疏松结缔组织中肥大细胞, 甲苯胺兰染色片。
4. 观察T细胞形成的E花结标本片, HE染色。
5. 观察B细胞膜表面免疫球蛋白检测标本片。

## 实验四 直接凝集反应

### 原理

颗粒性抗原悬液与其相应抗体, 在有适量电解质的环境中, 两者直接特异性结合, 进一步凝集成肉眼可见的凝集块, 称为直接凝集反应。

### 目的

了解直接凝集反应的方法、结果判断及应用。

### 内容

#### 一、玻片凝集反应

玻片凝集反应为定性试验, 用已知抗体(诊断血清)鉴定未知的抗原(细菌)。

#### (一) 材料:

1:20稀释的痢疾杆菌多价诊断血清和1:20稀释的沙门氏菌属多价诊断血清, 待检病原菌24小时斜面培养物, 生理盐水, 载玻片。

#### (二) 方法:

1. 取洁净载玻片一张, 用蜡笔划成三格, 并注明号码。
2. 用灭菌接种环取3~4环1:20稀释的痢疾杆菌多价诊断血清放在第一格; 烧灼接种环后取3~4环1:20稀释的沙门氏菌属多价诊断血清放在第二格; 烧灼接种环, 于第三格加3~4环生理盐水。
3. 用灭菌接种环取待检病原菌斜面培养物少许, 先后与盐水及血清分别混合, 加菌时于玻片上液体边缘处先将细菌磨开, 然后再混匀。注意每次取菌与不同血清或盐水混合时, 接种环均需烧灼, 以免不同血清成份互相污染, 发生干扰, 影响结果的正确性。
4. 轻轻摇动载玻片, 数分钟后将载玻片稍微倾斜对光观察, 首先观察第三格(盐水对照)有无凝集, 若出现非特异性凝集颗粒, 则本次实验无效。若待检菌与沙门氏菌属多价诊

断血清不发生凝集，而与痢疾杆菌多价诊断血清出现凝集者，该菌即为痢疾杆菌；若待检菌与痢疾杆菌多价诊断血清不发生凝集，而与沙门氏菌多价诊断血清出现凝集者，则该菌为沙门氏菌属细菌。

## 二、试管定量凝集反应

用已知的抗原检测血清中的特异性抗体及其含量，以辅助诊断疾病。

### (一) 材料：

“O”型或“H”型伤寒杆菌菌液，1:20稀释的伤寒杆菌免疫血清，生理盐水，小试管，试管架，吸管。

### (二) 方法：

1. 取小试管7支在试管架上排成一行，标以管号。
2. 用5毫升吸管吸取生理盐水，除第一管外，各管加入生理盐水0.5毫升。
3. 用1毫升吸管吸取1:20稀释的伤寒杆菌免疫血清1毫升，加入第一管及第二管各0.5毫升，然后于第二管吹吸三次，使血清与盐水充分混匀，再吸出0.5毫升加入第三管，如此依次稀释到第六管，自第六管吸出0.5毫升弃去。第七管不加血清作为对照。(图1)
4. 用5毫升吸管取“O”型或“H”型伤寒杆菌菌液加入上述各管，每管0.5毫升。
5. 振荡试管架使管内菌液与液体充分混匀，置37℃温箱中过夜，第二天观察结果。

(三) 结果观察：先勿振动试管，首先观察盐水对照管，正确结果是管底沉淀物呈圆形边缘整齐，轻轻振荡，细菌分散呈均匀混浊，即未出现凝集现象，若出现了非特异性凝集现象，则本次试验无效。观察试验管应自第一管看起，“O”型伤寒杆菌抗原凝集物呈颗粒状，轻摇时不易升起和离散；“H”型抗原凝集物呈疏松棉絮状，沉于管底，轻摇时即易离散和升起。根据凝集反应的程度，分别以下列记号表示：

生理盐水 (各 0.5 ml)

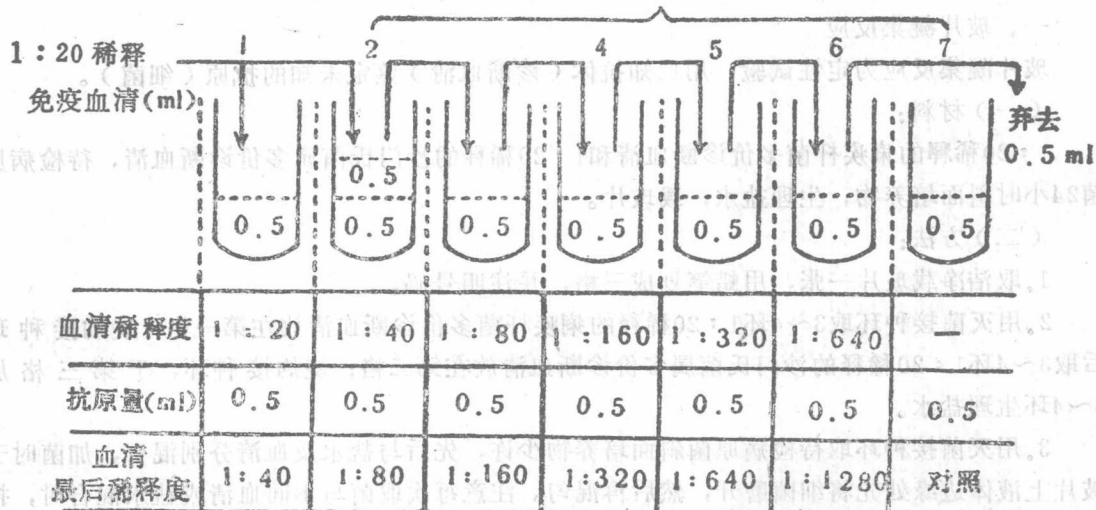


图1 试管定量凝集反应操作法

册，管内液体澄清，细菌完全被凝集于管底，轻摇有大片凝集块。

- 卅：管内液体轻度混浊，细菌大部分被凝集于管底，凝集块较小。
- 廿：管内液体中度混浊，部分细菌被凝集于管底，凝集仍明显，呈颗粒状。
- ＋：管内液体很混浊，仅少量细菌凝集。
- －：管内液体与对照管相同，无凝集。

凝集效价的判断：与相应菌液发生“卅”凝集反应的血清最高稀释度为该被检血清的凝集效价（滴度）。

### 问题

- 一、决定血清凝集效价高低的因素是什么？
- 二、直接凝集反应有何用途？

### 附录

- 一、痢疾杆菌多价诊断血清和沙门氏菌属多价诊断血清均由生物制品研究所出售。
- 二、试管定量凝集试验诊断菌液的制备：

（一）“H”型菌液的制备：将有鞭毛的伤寒杆菌或甲、乙型副伤寒杆菌标准菌株（生物学性状典型者）接种于柯氏瓶中的培养基上，37℃孵育24小时，以10毫升0.4%甲醛的生理盐水将菌苔洗下，放入盛有玻璃珠的无菌烧瓶中充分振荡，使细菌均匀分散，置4℃冰箱中3~5日以杀菌，通过无菌试验证实细菌确已杀死，即用0.2%甲醛盐水稀释成每毫升含菌10亿的浓度，放入4℃冰箱备用。

（二）“O”型伤寒杆菌菌液的制备：将标准菌种依上法培养，用0.5%石炭酸盐水将菌苔洗下，放37℃温箱中过夜或室温中4~7日以杀菌。经检查无菌生长时，则用0.25%石炭酸盐水稀释（10亿/毫升）后放4℃冰箱备用。

（三）菌液浓度测定：菌液浓度可用麦克法伦特（McfarLand）氏标准比浊管比浊的方法来测定

McfarLand氏标准比浊管的组成及其相当的菌数表  
（系指中等大小细菌）

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1%氯化钡溶液(ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1%硫酸溶液(ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
相当菌数(亿/毫升)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

## 实验五 反向间接血凝试验

反向间接血凝常用于检测血清中甲胎蛋白（AFP）以普查肝癌；测定乙型肝炎表面抗原（HBsAg）可诊断乙型肝炎并普查HBsAg携带者。

### 原理

将可溶性抗原吸附在某种载体微球上，成为人工免疫微球，与相应抗体结合后，可出现免疫微球的凝集现象，称为间接凝集反应，由于载体微球增大了可溶性抗原的反应面积，且



便于观察，因此少量抗体就能与载体微球上的抗原结合，出现肉眼可见的凝集（图2）。

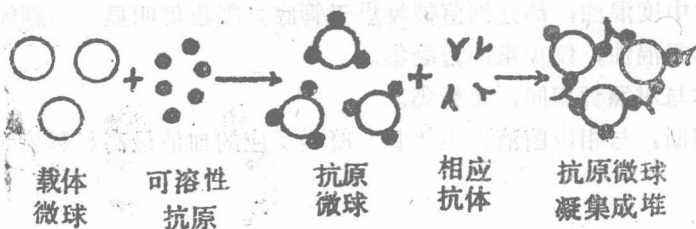


图2 间接凝集反应

载体微球的种类很多，如人（O型）和动物（羊、兔）的红细胞、活性炭颗粒、聚苯乙烯胶乳微球等。如以红细胞为载体微球的间接凝集反应为间接血凝试验，即是将可溶性抗原吸附于红细胞表面用于检测相应的抗体的凝集反应。相反的，将抗体吸附于红细胞表面用于检测相应抗原的凝集反应称为反向间接血凝试验（图3）。

下面介绍检测甲胎蛋白的反向间接血凝试验。将抗甲胎蛋白血清吸附在正常人“O”型红细胞上，用以测定待检血清中的甲胎蛋白。

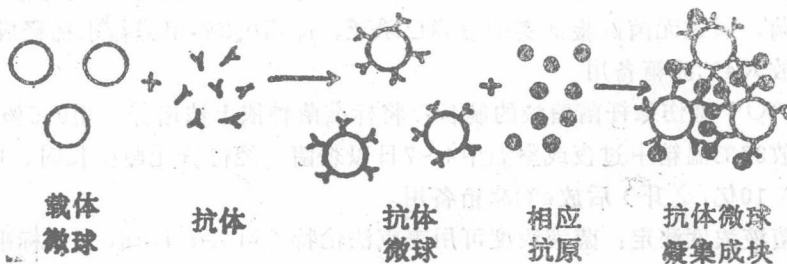


图3 反向间接凝集试验

**材料**

抗甲胎蛋白致敏的人“O”型红血球，甲胎蛋白阳性血清及阴性血清，待检血清，微量血凝板，血色素吸管，滴管，生理盐水等。

**方法**

一、以血色素吸管取待检者末梢血0.04毫升（含血清0.02毫升），置于含3.8%枸橼酸钠0.18毫升的试管中混匀，稀释度即为1：10，作为第一管，静置2小时或离心数分钟，使红细胞下沉。

二、小心吸上清液0.1毫升移入盛有0.9毫升生理盐水的第二管中混匀，即为1：100稀释度。

三、自第2管（1：100）吸取0.1毫升移至盛有0.9毫升生理盐水的第三管中混匀，稀释度即为1：1000。

四、将1：10、1：100、1：1000的血清各取一小滴（约0.025毫升）分别加于微量血凝板的三个小孔内。

五、将致敏红细胞（若为冻干致敏红细胞则应按说明书规定量，加入蒸馏水溶化），加于以上已加血清的三个小孔内各一滴（约0.025毫升）轻轻摇匀，置室温（或37℃）20~30