

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

于修平 主编



科学出版社

[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

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

主 编 于修平  
副主编 周亚滨 马春红 何深一  
编 者 (按姓氏笔画排序)  
于修平 马春红 王晓燕 齐 眉  
何深一 周亚滨 袁方曙 高丽芬  
郭淑玲 唐 伟

科学出版社

北京

100071

http://www.sciencep.com

中国科学院大学

生命科学出版社

科学出版社

元 00.25 份 家

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强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,我们编写了这本涵盖这三个学科的实验教材。本教材包括三篇,第一篇为三个学科的基本实验,分属3章。第二篇为融合实验,每个实验都融合了三个学科的相关内容,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和创新能力。本实验教材概念准确、文字简明,层次清晰、使用方便;一本教材三个学科使用,既便于学生提前预习和教师对相关学科实验内容的了解,又可减轻学生的经济负担。

本书适合医学院校5年制、长学制学生使用,也可供研究生参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学与病原生物学实验 / 于修平主编. —北京:科学出版社,2007  
(国家级实验教学示范中心·基础医学实验教学系列教材)  
ISBN 978-7-03-019602-6

I. 医… II. 于… 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. R392.33 R37.33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第123883号

责任编辑:胡治国 / 责任校对:李奕莹

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超

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>

北京市文林印务有限公司 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

2007年8月第一次印刷 印张:11

印数:1—3 000 字数:249 000

定价:25.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈文林〉)

# 《基础医学实验教学系列教材》编委会

丛书主编 高英茂  
丛书副主编 刘传勇 胡维诚 苑辉卿 于修平 孙靖中  
编者 (按姓氏笔画排序)

丁 华	丁兆习	丁 岩	于 卉	于春晓
于修平	于清水	马春红	马剑峰	马雪莲
马 榕	王小玲	王立祥	王 进	王 欣
王建丽	王桂敏	王晓燕	王菊英	王 越
孔 峰	田克立	邢子英	吕 斌	朱 敬
任桂杰	刘传勇	刘运芳	刘志芳	刘志艳
刘克敬	刘 杰	刘奇迹	刘 凯	刘 萍
齐 眉	江 虹	孙靖中	孙 霞	杨贵忠
杨艳平	李自英	李芳邻	李劲松	李 英
李 岩	李 莉	李振华	李景新	李瑞峰
李 霞	吴伟芳	何深一	辛 华	宋文延
宋 静	张立平	张庆慧	张孟业	张 茜
张洁晶	张晓明	张 超	张虞毅	陈丙玺
陈哲宇	陈 峰	陈蔚文	邵 军	邵红莲
武玉玲	苑辉卿	周玉琴	周亚滨	郑玉兰
孟晓慧	赵 玲	郝建荣	胡晓燕	胡维诚
钟 宁	侯桂华	袁方曙	徐红岩	高丽芬
高英茂	高建新	高贵敏	郭辰虹	郭淑玲
郭 强	唐 伟	黄 涛	崔 敏	梁 婷
谢冬萍	潘 芳	魏来临		

# 前 言

多年来的教学实践使我们体会到,实验教学是培养创新型人才的重要环节;实验教学完全依附于理论教学的传统模式不利于创新人才的培养;改革这种传统模式,构建实验教学既与理论教学密切结合,又不依附于理论教学,重在培养学生实践能力和创新精神的新模式势在必行。我们按照山东大学教学改革统一部署,将基础医学中学科内容相关、实验手段相近的三级学科的实验教学融合为一个实验平台,共构建了5个实验平台,即由人体解剖学、组织学与胚胎学和病理学融合而成的医学形态学实验平台;由生理学、药理学、病理生理学、医学心理学和神经生物学融合而成的医学机能学实验平台;由医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学融合而成的医学免疫学与病原生物学实验平台;由医学细胞生物学、医学生物化学与分子生物学、医学遗传学融合而成的医学细胞分子生物学实验平台;由诊断学、手术学、实验核医学及临床技能培训中心融合而成的临床技能实验平台。每个实验教学平台都是一个独立的教学单位,独立开设实验课程,独立考核、考试、记学分。

多少年来,实验教学的功能只是验证理论和加深对理论的理解,实验教学的内容也千篇一律、多年一贯。随着实验教学模式的改革,我们对实验教学的内容也进行了深层次的更新,新添了融合性和创新性实验,强化了实验教学的实践和创新功能。每个实验平台都包含3个层面的实验,即基本实验、融合实验和创新实验。基本实验与相应学科的理论课同步进行,开设一些经典的验证实验,以巩固理论知识和培养学生的实践动手能力;融合实验是融合了相关学科的知识而设计的一些实验,以培养学生综合运用所学知识、分析和解决问题的能力;创新实验是由教师提出问题并在教师引导下由学生自行设计和完成的一些实验,以培养学生的创新能力。融合实验和创新实验在几个相关学科的理论教学全部完成后进行。在医学院的统一领导下,我们组织了各相关学科的学术带头人和骨干教师,编写了与5个实验教学平台相对应的5本实验教材,每本教材都分为3篇,即基本实验篇、融合实验篇和创新实验篇。

这套实验教学系列教材涵盖了基础医学各学科的全部实验内容,版面字数近百万,内容丰富,文字简明,图表清晰,适用面广。但由于实验教学改革还处于探索阶段,编写这样的改革教材尚无经验可循,加之我们的水平所限,教材中不足之处在所难免,恳请同行专家和同学们批评指正。

高英茂

2007年5月于济南

## 目录

# 目 录

## 第一篇 基本实验

第一章 医学免疫学基本实验 .....	1	实验十 病毒的血清学实验 .....	59
实验一 巨噬细胞吞噬功能试验 .....	1	实验十一 支原体、衣原体、立克次体、螺旋体 的形态观察及血清学实验 .....	63
实验二 凝集反应 .....	2	实验十二 真菌、放线菌的培养方法与形态 观察 .....	67
实验三 沉淀反应 .....	6	实验十三 用 PCR 方法检测病原微生物 .....	69
实验四 补体结合试验 .....	7	第三章 人体寄生虫学基本实验 .....	71
实验五 酶联免疫吸附试验 .....	10	实验一 总论 线虫(1) .....	71
实验六 人外周血单个核细胞的分离 .....	13	实验二 线虫(2) .....	76
实验七 E-玫瑰花环形成试验 .....	14	实验三 线虫(3) .....	81
实验八 豚鼠过敏试验 .....	15	实验四 吸虫(1) .....	83
第二章 医学微生物学基本实验 .....	17	实验五 吸虫(2) .....	86
实验一 细菌的形态观察 .....	17	实验六 绦虫 .....	89
实验二 细菌的培养 .....	21	实验七 医学原虫(1) .....	92
实验三 物理、化学及生物因素对细菌的 影响 .....	28	实验八 医学原虫(2) .....	96
实验四 细菌的生理 .....	31	实验九 医学原虫(3) .....	100
实验五 细菌的致病性试验 .....	36	实验十 机会致病原虫 .....	104
实验六 细菌质粒 DNA 的提取 .....	38	实验十一 医学节肢动物(1) .....	106
实验七 病原性细菌的微生物学检查法 .....	39	实验十二 医学节肢动物(2) .....	113
实验八 病毒的观察 .....	51	实验十三 医学节肢动物(3) .....	118
实验九 病毒的培养 .....	52		

## 第二篇 融合实验

实验一 小儿腹泻的病原体检测 .....	123	实验九 B 淋巴细胞免疫功能的检测 .....	139
实验二 流感病毒的分离、鉴定 .....	126	实验十 T 淋巴细胞免疫功能检测 .....	141
实验三 链球菌属的鉴别 .....	128	实验十一 NK 细胞功能检测 .....	144
实验四 病原性真菌的检查法 .....	132	实验十二 多克隆抗体的制备与检测 .....	146
实验五 TORCH 感染的检测 .....	134	实验十三 伤寒沙门菌感染小鼠后体液和细 胞免疫功能检测 .....	147
实验六 日本血吸虫家兔模型建立和鉴定 .....	135	实验十四 肿瘤坏死因子的诱生及活性测定 .....	151
实验七 鼠疟原虫(伯氏疟原虫)接种试验 .....	138		
实验八 孢子虫动物模型的建立 .....	138		



### 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 ..... 153

实验二 乙肝病毒感染的实验室诊断 ..... 154

实验三 如何确定一个华支睾吸虫(肝吸虫)病的流行区 ..... 155

实验四 暴发性腹泻的流行病学调查和控制方案 ..... 156

实验五 食用猪肉的寄生虫学检疫 ..... 156

实验六 人体蠕形螨感染的检查 ..... 156

实验七 细菌耐药性检查 ..... 157

实验八 病例分析 ..... 159

实验九 大学生中人疱疹病毒 8 型感染的血清学检测 ..... 159

实验十 如何利用实验方法检测 T 细胞亚群 ..... 160

实验十一 如何进行骨髓移植前的 HLA 配型 ..... 161

实验十二 DC 的诱生与鉴定 ..... 162

实验十三 巨噬细胞活性测定 ..... 163

实验十四 利用 PCR 方法检测 HIV-1 ..... 164

实验十五 利用 ELISA 方法检测 HIV-1 ..... 165

实验十六 利用 Western blot 方法检测 HIV-1 ..... 166

实验十七 利用 RT-PCR 方法检测 HIV-1 ..... 167

实验十八 利用 DNA 探针检测 HIV-1 ..... 168

实验十九 利用免疫电镜检测 HIV-1 ..... 169

实验二十 利用流式细胞术检测 HIV-1 ..... 170

实验二十一 利用 X 射线衍射法检测 HIV-1 ..... 171

实验二十二 利用核磁共振波谱法检测 HIV-1 ..... 172

实验二十三 利用质谱法检测 HIV-1 ..... 173

实验二十四 利用扫描电镜检测 HIV-1 ..... 174

实验二十五 利用透射电镜检测 HIV-1 ..... 175

实验二十六 利用冷冻电镜检测 HIV-1 ..... 176

实验二十七 利用冷冻 X 射线衍射法检测 HIV-1 ..... 177

实验二十八 利用冷冻核磁共振波谱法检测 HIV-1 ..... 178

实验二十九 利用冷冻质谱法检测 HIV-1 ..... 179

实验三十 利用冷冻扫描电镜检测 HIV-1 ..... 180

实验三十一 利用冷冻透射电镜检测 HIV-1 ..... 181

实验三十二 利用冷冻 X 射线衍射法检测 HIV-1 ..... 182

实验三十三 利用冷冻核磁共振波谱法检测 HIV-1 ..... 183

实验三十四 利用冷冻质谱法检测 HIV-1 ..... 184

实验三十五 利用冷冻扫描电镜检测 HIV-1 ..... 185

实验三十六 利用冷冻透射电镜检测 HIV-1 ..... 186

实验三十七 利用冷冻 X 射线衍射法检测 HIV-1 ..... 187

实验三十八 利用冷冻核磁共振波谱法检测 HIV-1 ..... 188

实验三十九 利用冷冻质谱法检测 HIV-1 ..... 189

实验四十 利用冷冻扫描电镜检测 HIV-1 ..... 190

实验四十一 利用冷冻透射电镜检测 HIV-1 ..... 191

实验四十二 利用冷冻 X 射线衍射法检测 HIV-1 ..... 192

实验四十三 利用冷冻核磁共振波谱法检测 HIV-1 ..... 193

实验四十四 利用冷冻质谱法检测 HIV-1 ..... 194

实验四十五 利用冷冻扫描电镜检测 HIV-1 ..... 195

实验四十六 利用冷冻透射电镜检测 HIV-1 ..... 196

实验四十七 利用冷冻 X 射线衍射法检测 HIV-1 ..... 197

实验四十八 利用冷冻核磁共振波谱法检测 HIV-1 ..... 198

实验四十九 利用冷冻质谱法检测 HIV-1 ..... 199

实验五十 利用冷冻扫描电镜检测 HIV-1 ..... 200

实验五十一 利用冷冻透射电镜检测 HIV-1 ..... 201

实验五十二 利用冷冻 X 射线衍射法检测 HIV-1 ..... 202

实验五十三 利用冷冻核磁共振波谱法检测 HIV-1 ..... 203

实验五十四 利用冷冻质谱法检测 HIV-1 ..... 204

实验五十五 利用冷冻扫描电镜检测 HIV-1 ..... 205

实验五十六 利用冷冻透射电镜检测 HIV-1 ..... 206

实验五十七 利用冷冻 X 射线衍射法检测 HIV-1 ..... 207

实验五十八 利用冷冻核磁共振波谱法检测 HIV-1 ..... 208

实验五十九 利用冷冻质谱法检测 HIV-1 ..... 209

实验六十 利用冷冻扫描电镜检测 HIV-1 ..... 210

### 附录二 实验合编

附录一 实验一 ..... 211

附录二 实验二 ..... 212

附录三 实验三 ..... 213

附录四 实验四 ..... 214

附录五 实验五 ..... 215

附录六 实验六 ..... 216

附录七 实验七 ..... 217

附录八 实验八 ..... 218

附录九 实验九 ..... 219

附录十 实验十 ..... 220

附录十一 实验十一 ..... 221

附录十二 实验十二 ..... 222

附录十三 实验十三 ..... 223

附录十四 实验十四 ..... 224

附录十五 实验十五 ..... 225

附录十六 实验十六 ..... 226

附录十七 实验十七 ..... 227

附录十八 实验十八 ..... 228

附录十九 实验十九 ..... 229

附录二十 实验二十 ..... 230

附录二十一 实验二十一 ..... 231

附录二十二 实验二十二 ..... 232

附录二十三 实验二十三 ..... 233

附录二十四 实验二十四 ..... 234

附录二十五 实验二十五 ..... 235

附录二十六 实验二十六 ..... 236

附录二十七 实验二十七 ..... 237

附录二十八 实验二十八 ..... 238

附录二十九 实验二十九 ..... 239

附录三十 实验三十 ..... 240

附录三十一 实验三十一 ..... 241

附录三十二 实验三十二 ..... 242

附录三十三 实验三十三 ..... 243

附录三十四 实验三十四 ..... 244

附录三十五 实验三十五 ..... 245

附录三十六 实验三十六 ..... 246

附录三十七 实验三十七 ..... 247

附录三十八 实验三十八 ..... 248

附录三十九 实验三十九 ..... 249

附录四十 实验四十 ..... 250

附录四十一 实验四十一 ..... 251

附录四十二 实验四十二 ..... 252

附录四十三 实验四十三 ..... 253

附录四十四 实验四十四 ..... 254

附录四十五 实验四十五 ..... 255

附录四十六 实验四十六 ..... 256

附录四十七 实验四十七 ..... 257

附录四十八 实验四十八 ..... 258

附录四十九 实验四十九 ..... 259

附录五十 实验五十 ..... 260

附录五十一 实验五十一 ..... 261

附录五十二 实验五十二 ..... 262

附录五十三 实验五十三 ..... 263

附录五十四 实验五十四 ..... 264

附录五十五 实验五十五 ..... 265

附录五十六 实验五十六 ..... 266

附录五十七 实验五十七 ..... 267

附录五十八 实验五十八 ..... 268

附录五十九 实验五十九 ..... 269

附录六十 实验六十 ..... 270

附录六十一 实验六十一 ..... 271

附录六十二 实验六十二 ..... 272

附录六十三 实验六十三 ..... 273

附录六十四 实验六十四 ..... 274

附录六十五 实验六十五 ..... 275

附录六十六 实验六十六 ..... 276

附录六十七 实验六十七 ..... 277

附录六十八 实验六十八 ..... 278

附录六十九 实验六十九 ..... 279

附录七十 实验七十 ..... 280

# 第一篇 基本实验

## 第一章 医学免疫学基本实验

### 实验一 巨噬细胞吞噬功能试验

**【原理】** 巨噬细胞(Macrophage, MΦ)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。MΦ受抗原刺激后活化,可使其吞噬功能明显增强。在此,介绍两种小鼠腹腔MΦ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,以冷美蓝染色,油镜下计数吞噬白假丝酵母菌的百分数,以及观察MΦ内因被杀死而染为蓝色的白假丝酵母菌的形态、数目,以判断MΦ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MΦ与白假丝酵母菌按比例混合,温育,以冷美蓝染色,油镜下进行观察,观察指标同上。

#### 【材料】

1. 动物 小白鼠(雌或雄,20~22g)。
2. 白假丝酵母菌悬液:接种于沙氏培养基的白假丝酵母菌,28℃培养18~24小时,生理盐水洗下,配成 $1 \times 10^7$ 个/ml细胞悬液。
3. 无菌6%淀粉溶液、无菌性注射器、针头、Hank液(含5%小牛血清)。
4. 0.03%美蓝(4℃存放)、华氏管、吸量管。

#### 【方法】

##### 1. 体内法

- (1) 试验前3天,小白鼠腹腔注射6%无菌淀粉液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假丝酵母菌菌液1ml,轻揉腹部,使菌液在腹腔中分布均匀,利于吞噬。
- (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%冷美蓝,盖上盖玻片。
- (4) 高倍镜下进行观察,计数。





## 2. 体外法

- (1) 将 6% 消毒淀粉溶液 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,1000 转/分离心 5 分钟,收集 MΦ。
- (3) 以 Hank 液洗涤 MΦ,1000 转/分,离心 5 分钟,重复二次。
- (4) 计数 MΦ,以 Hank 液配制  $1 \times 10^6$  个/ml 细胞悬液。
- (5) 取华氏管,加入等量的  $1 \times 10^6$  个/ml 的 MΦ 悬液及  $1 \times 10^7$ /ml 白假丝酵母菌菌液。
- (6) 37℃,温育 30 分钟(中间摇动试管二次)。
- (7) 500 转/分,离心 5 分钟,弃上清液。
- (8) 轻轻振荡试管,取悬液一滴加至载玻片,取冷美蓝一滴,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 =  $\frac{\text{发生吞噬的 100 个 M}\Phi \text{ 内含有的白假丝酵母菌数}}{100(\text{发生吞噬的 M}\Phi \text{ 数})} \times 100\%$
- (3) 杀菌率 =  $\frac{\text{被吞入的白假丝酵母菌中死亡数}}{\text{被吞入的白假丝酵母菌数}} \times 100\%$

(杀死的细菌呈蓝色,活菌不着色)

#### 2. 正常值

- (1) 吞噬百分率:  $(62.77 \pm 1.38)\%$ 。
- (2) 吞噬指数:  $(1.058 \pm 0.049)\%$ 。
- (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假丝酵母菌的自然死亡率)。

### 【注意事项】

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

## 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,因此又称之为血清学反应。

### 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) 玻片凝集试验(人 ABO 血型鉴定)

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。例如细菌的鉴定、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、70% 乙醇溶液、碘酒、无菌三棱采血针、无菌木棒、无菌棉棒。

#### 【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 血清中搅拌均匀。
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】** 混合液由红色均匀浑浊逐渐变为透明,并出现大小不等的红色凝集块者,为红细胞凝集。混合液仍呈均匀浑浊,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	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 70% 乙醇溶液干燥前不要采血,以免 70% 乙醇溶液破坏红细胞。
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) 试管凝集试验

**【原理】** 此次实验是以定量的伤寒菌为抗原,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。然后在第一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加入第二管中;再将第二管中的液体吹打混匀,取出0.5ml加入到第三管中,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,作为试验的阴性对照管。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 试管凝集试验的加样表 (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

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):上清液浑浊,管底可有沉淀的细菌,轻摇后分散呈均匀浑浊。
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,细菌大多数凝集于管底,摇动后凝块较前者小。
- ++ : 液体中等浑浊,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. 试管要作标记,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(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或环的现象,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。

琼脂扩散试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。琼脂扩散试验又可分为单向和双向扩散,只有抗原或抗体扩散的试验称为单向扩散,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、单向琼脂扩散试验

**【原理】** 单向琼脂扩散试验是定量试验,通常是用已知抗体测定未知抗原。试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,离孔愈远浓度愈低,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,故称之为单向扩散。

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含量。本试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。

#### 【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。立即用 5ml 吸管吸取 3ml 含抗血清的琼脂均匀加到玻片上,凝固后放 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 $\mu$ l,第二排相邻孔中加待检血清各 10 $\mu$ l。
5. 将琼脂板放入湿盒,37℃ 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℃ 预温,与冷却至 56℃ 的琼脂混匀后,迅速灌板,避免气泡。
2. 加样时避免碰坏孔壁。
3. 孔间距不能小于 1cm。

## 二、双向琼脂扩散试验

**【原理】** 双向琼脂扩散试验是定性试验。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,待测抗原标为抗原 1、抗原 2。
2. 生理盐水配制的 1% 琼脂。
3. 玻片、打孔器、湿盒、37℃ 恒温箱等。

### 【方法】

1. 制板 将熔化的 1% 琼脂加在玻片上,3ml/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 $\mu$ l。
4. 将琼脂板置于湿盒内,37℃ 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,对准孔放置滴管,轻挤出液体,避免量多溢出,影响沉淀线的形成。

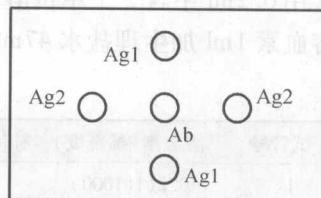


图 1-1-1 加样示意图  
中央孔加 Ab,上下孔加 Ag1、  
左右孔加 Ag2

## 实验四 补体结合试验

**【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、预备试验

### (一) 溶血素单位滴定

#### 【材料】

1. 2% 绵羊红细胞溶液: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中的结果表明,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% 绵羊红细胞悬液	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
3	0.2(1:1600)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
4	0.2(1:2000)	0.2	0.4	0.2	完全溶血
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(1:12 800)	0.2	0.4	0.2	大部分溶血
13	0.2(1:16 000)	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% 绵羊红细胞悬液(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。
2. 依次加入其他成分于每管中,混匀后置 37℃ 水浴 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

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:

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

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

即将补体原液稀释 25 倍,用 0.2ml 即可。

表 1-1-4 补体单位滴定 (单位:ml)

试管	补体(1:30)	NS	溶血素(2 单位)	2% 绵羊红细胞悬液	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	37℃ 水浴	0.2	0.2	37℃ 水浴	全溶血
5	0.14	0.46	15~30 分钟	0.2	0.2	15~30 分钟	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	0.2	不溶血		

## 二、正式试验

### 【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,3000 转/分离心 30 分钟,吸取上清作为





抗原,实验前作抗原滴定,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% 绵羊红细胞悬液(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	NS		溶血素	绵羊红细胞悬液	结果
1(试验管)	0.2	0.2	0.2	-	摇匀	0.2	0.2	
2(血清对照管)	0.2	—	0.2	0.2	37℃	0.2	0.2	溶血
3(抗原对照管)	—	0.2	0.2	0.2	水浴	0.2	0.2	溶血
4(补体对照管)	—	—	0.2	0.4	15分钟	0.2	0.2	溶血
5(SRBC对照)	—	—	—	0.8		—	0.2	不溶血

**【结果判定】** 第2~5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,对照管的反映情况是否正常是判断试验可信的参照。

## 实验五 酶联免疫吸附试验

**【原理】** 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),由 Van Weeman 和 Schuur 以及 Enyvall 和 Perlmann 同在 1971 年报道并确立。酶与抗体或抗原结合后,既不改变抗体或抗原的免疫学反应的特异性,也不影响酶本身的酶学活性。先将已知的抗体或抗原结合在某种固相载体上,并保持其免疫活性。测定时,将待检标本和酶标抗原或抗体按不同步骤与固相载体表面吸附的抗体或抗原发生反应。用洗涤的方法分离抗原-抗体复合物和游离成分。然后加入酶的作用底物催化显色,根据酶底物颜色的有无或深浅进行定性或定量测定。

酶联免疫吸附试验将抗原抗体的特异性免疫反应和酶的高效催化作用有机结合起来,具有灵敏度高、特异性强、快速方便等优点,是免疫学技术中应用最广的方法之一。