

基础医学实验系列教材

总主编 肖子曾 严杰 总主审 黄政德

新世纪全国高等中医药院校教材

新世纪全国高等中医药院校创新教材

XIN SHI JI QUAN GUO GAO DENG ZHONG YI YAO YUAN XIAO
CHUANG XIN JIAO CAI

医学免疫学与病原生物学 实验教程

(供医药类各专业用)

主 编 伍参荣 卢芳国

全国百佳图书出版单位

中国中医药出版社

014042279

R392-33
15



新世纪全国高等中医药院校创新教材
基础医学实验系列教材

总主编 肖子曾 严杰 总主审 黄政德

医学免疫学与病原生物学 实验教程

(供医药类各专业用)

主 编 伍参荣 卢芳国



定价 22.00元
网址 www.cptcm.com

中国中医药出版社
· 北 京 ·



北航 C1728664

R392-33
15

014045279

图书在版编目 (CIP) 数据

医学免疫学与病原生物学实验教程/伍参荣, 卢芳国主编. —北京: 中国中医药出版社, 2014. 1

基础医学实验系列教材

ISBN 978 - 7 - 5132 - 1158 - 1

I. ①医… II. ①伍… ②卢… III. ①药理学 - 免疫学 - 教材 ②病原微生物 - 教材 IV. ①R392 ②R37

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 218116 号

中国中医药出版社出版
北京市朝阳区北三环东路 28 号易亨大厦 16 层
邮政编码 100013
传真 010 64405750
北京市亚通印刷有限公司印刷
各地新华书店经销

*
开本 787 × 1092 1/16 印张 8.75 彩插 0.25 字数 198 千字

2014 年 1 月第 1 版 2014 年 1 月第 1 次印刷

书号 ISBN 978 - 7 - 5132 - 1158 - 1

*

定价 25.00 元

网址 www.cptcm.com

如有印装质量问题请与本社出版部调换

版权专有 侵权必究

社长热线 010 64405720

购书热线 010 64065415 010 64065413

书店网址 csln.net/qksd/

官方微博 <http://e.weibo.com/cptcm>

《基础医学实验系列教材》

专家指导委员会

总 主 编 肖子曾 严 杰

总 主 审 黄政德

编 委 (以姓氏笔画为序)

万红姣 文礼湘 邓冰湘 艾碧琛

卢芳国 成细华 伍参荣 刘群良

刘慧萍 孙贵香 严 杰 杜 可

杨胜辉 李 杰 李新华 李鑫辉

李迎秋 肖子曾 吴长虹 何 倩

余望贻 宋 岚 张 波 张国民

陈 安 欧阳建军 赵爱明 梅 胡

胡方林 郭春秀 唐 群 曾 辉

曾 嵘 雷久士 廖 君 熊艾君

编委会秘书 刘慧萍

《医学免疫学与病原生物学实验教程》编委会

主 编 伍参荣 卢芳国

副主编 杨胜辉 万红娇

编 委 (以姓氏笔画为序)

万红娇 卢芳国 申可佳 伍参荣

向 琴 刘 俐 杨胜辉 李 珊

胡建中 蔡 锐 谭周进

(基础医学实验系列教材)

编委会

2012年9月

前 言

基础医学

随着现代医学科学技术、教育科学技术的进步与发展,医学教学理念也发生了深刻变化。尤其是在基础医学教学领域,不仅要求在教学过程中传授理论知识,更要求加强学生动手能力的训练,而且还要求教学方法、内容、手段规范和先进,以适应高等中医药院校发展的要求。

为此,湖南中医药大学在近20年基础医学实验教学改革的基础上,借鉴其他院校的经验,依照教育部对实验教学改革的要求,编写了本套基础医学实验系列教材,包括《人体解剖学实验教程》、《医学显微形态学实验教程》、《医学免疫学与病原生物学实验教程》、《生物化学与分子生物学实验教程》、《医学机能学实验教程》、《中医学基础实验教程》6本,主要适用于高等中医药院校各专业基础医学实验课程的教学。本系列教材打破了传统的学科界限,将性质相似的实验课重新组合;改变了传统的实验模式,提高了综合性实验和设计性实验的比例;用现代实验方法验证中医的经典理论。

由于我校基础医学实验教学条件所限,该套教材难免存在不足之处,恳请读者、教师和学生提出宝贵意见,以便再版时修订提高。

《基础医学实验系列教材》

编委会

2012年9月

第一节 补体测定	1
实验15 补体定性试验	1
实验16 补体定量试验(COL)	27
实验17 补体激活产物的检测	27
实验18 补体激活产物的检测方法	31
实验19 补体激活产物的检测方法	31
实验20 补体激活产物的检测方法	34
实验21 细菌的人工培养法	39
实验22 细菌生长量测定法	45
实验23 真菌形态和培养性状观察	48
实验24 病毒的形态观察	50

编写说明

自20世纪80年代末始,国内各中医药院校在西医课程实验教学方面逐步由简单验证性实验教学,进入到综合性实验教学,改善了学生的知识结构,开拓了科研思路,提高了实验操作技能。但随着医药科学技术的发展,已有中医专业西医课程的实验教学已难以满足日益发展的高等中医药教育的需求。为此,我们特编写了《医学免疫学与病原生物学实验教程》,供医学免疫学与病原生物学实验教学使用。

本教材参考国内外医学免疫学与病原生物学实验教学等权威性书籍进行编写,全书分为五个部分,即绪论、免疫学基础实验、病原生物学基础实验、综合性实验、设计性实验。

本实验教程中的基础实验部分主要帮助学习者掌握“三基”,验证理论教学。综合性实验部分是在基础实验基础上结合临床病原生物感染性疾病进行编写,将医学免疫学、医学微生物学、人体寄生虫学结合在一起,有利于医药各专业学生通过实验提高分析并解决问题的能力;药物的质量控制综合实验部分,依据药学专业的学习特点,帮助药学专业学生学习如何寻找可能使药物污染的环境、消毒措施等方面原因,提高对药物质量控菌的检测认识,解决控制药物质量的方法。教程中的设计性实验部分通过病例提示,指导学生在学习医学免疫学、病原生物学的同时,学习如何开展实验设计,有利于提高医药各专业学生分析问题、解决问题的能力,为学生进行创新性研究提供思路。

初次尝试编写医学免疫学与病原生物学综合性实验与设计性实验教程,由于我们的学术水平有限,肯定有很多不足之处,敬请各位读者提出宝贵意见,以便再版时修订提高。

《医学免疫学与病原生物学实验教程》
编委会
2014年1月

目 录

第一章 绪 论	1
第二章 免疫学基础实验	7
第一节 免疫细胞检测技术	7
实验 1 外周血单核细胞的分离	7
实验 2 淋巴细胞的分离	8
实验 3 T、B 淋巴细胞的分离 (尼龙毛柱法)	9
实验 4 E 花环形成试验	10
实验 5 B 细胞膜表面免疫球蛋白的检测	11
实验 6 中性粒细胞吞噬功能检测 [硝基蓝四氮唑 (NBT) 还原能力的测定]	12
实验 7 巨噬细胞吞噬功能检测	13
实验 8 淋巴细胞转化试验——MTT 法	14
实验 9 淋巴细胞转化试验—— ³ H/TdR 标记法	15
实验 10 体外诱生 IL-2 试验	16
第二节 抗原抗体反应	17
实验 11 凝集反应	17
实验 12 沉淀反应	21
实验 13 对流免疫电泳试验	22
实验 14 酶联免疫吸附试验	24
第三节 补体测定	25
实验 15 补体溶血试验	25
实验 16 血清总补体活性测定 (CH ₅₀)	25
第四节 超敏反应实验技术	27
实验 17 豚鼠血清过敏反应试验	27
实验 18 反向间接血凝法测定人血清 IgE	27
第三章 病原生物学基础实验	31
实验 19 显微镜的构造和使用方法	31
实验 20 细菌的形态观察	34
实验 21 细菌的人工培养法	39
实验 22 细菌生化鉴定法	45
实验 23 真菌形态和培养性状观察	48
实验 24 病毒的形态观察	50

实验 25 病毒的分离培养	50
第四章 综合性实验	58
综合性实验 1 环境、物体及人体体表的细菌培养及消毒	
灭菌	58
综合性实验 2 脓标本和咽拭子的细菌检查	60
综合性实验 3 呼吸道感染常见病原生物的实验室检查	65
综合性实验 4 肠道感染常见病原生物的实验室检查	73
综合性实验 5 泌尿生殖道感染常见病原生物的实验室	
检查	93
综合性实验 6 皮肤创伤及血液感染常见的病原生物实验室	
检查	98
综合性实验 7 血吸虫感染小鼠及病理学观察和诊断	
方法	101
综合性实验 8 中药无菌检查及质控菌检测	104
综合性实验 9 中药体外抗菌实验	110
综合性实验 10 中药体外抗真菌实验	114
第五章 设计性实验	115
设计性实验 1 肠道菌群失调的微生物学检查	115
设计性实验 2 小鼠抗体形成细胞的检查	116
设计性实验 3 小鼠感染病原生物及其细胞免疫现象	
检查	118
设计性实验 4 临床乙型肝炎病例诊断实验设计	122
设计性实验 5 结核分枝杆菌病感染的微生物学检查	123
设计性实验 6 模拟感染性粪便标本的病原学诊断	124
设计性实验 7 淋病奈瑟菌感染的微生物学检查	128
设计性实验 8 溶脲脲原体感染的微生物学检查	128
设计性实验 9 几种市售洗手产品杀菌效果的检查	129
设计性实验 10 食用猪肉的寄生虫学检疫	130
附图 常见病原生物形态	131

第一章 绪论

一、病原生物实验室安全守则

《医学免疫学与病原生物学实验教程》包括医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学三个专业的实验教学内容。实验中所用标本大多含有活的病原生物，其中有些病原生物的传染性很强。因此，实验中必须严格建立“无菌概念”，严格遵守无菌操作技术规范，防止实验中发生自身感染和环境污染。因此，特制定安全守则，希望全体师生共同遵守。

1. 进入实验室前必须穿好白大衣，离开时脱下并反折；必要时戴口罩、帽子。
2. 与实验无关物品不得放在实验操作台上；必要的学习用具可放入实验台抽屉内；实验指导应放置于远离操作部位。

3. 实验室内严禁打闹喧哗、随便走动；禁止饮食、吸烟、咬笔杆、化妆、触摸隐形眼镜等。

4. 接触病原生物时，应严格按照无菌操作技术规范进行操作。

(1) 接种环（针）在使用前后均应烧灼灭菌，用后插在接种环架上，不得任意放在桌面上。

(2) 含细菌培养物或体液的试管必须加盖，直立插在试管架上，不得任意横放于桌面上；非操作时不得任意打开盖子并将盖子随意放于桌面；含菌培养皿一律倒置搁放于桌面。

(3) 实验用过的有菌器材等物品应放在指定的消毒容器内，不得随意放在桌面上或水槽内。

(4) 若发生任何意外污染（如含菌试管或平皿被打破、菌液外溢等）应立即报告带教老师进行消毒灭菌处理。

5. 使用电炉、微型灭菌器和酒精灯要注意防火。不要把易燃物品（如纸、棉拭子等）包括电炉的电源线靠近热源附近。用电炉加热液体时不能离人，要防止溢出或烧干。电炉用后应立即切断电源，放到不易碰到之处冷却，避免接触烫伤。恒温水浴箱使用结束应关闭电源。

6. 酒精灯点燃前须将灯芯及塞子轻轻上提，排出灯内气体以防止火星爆出。酒精灯用后应及时盖上罩熄火。

7. 进行动物实验时,不得虐待动物。动物尸体应放在塑料袋中并集中放于指定地点,按规定处理。

8. 爱护公物,节约实验材料;严格按照实验仪器的操作规则使用仪器。未经带教老师允许,不得擅自将实验室内物品携出。实验器材不慎损坏应立即报告。

9. 实验完毕须及时整理台面、清点回收物品。值日生打扫室内卫生,关闭不用的仪器及水、电、门、窗。

10. 全体同学实验结束离开实验室前,应用消毒水浸泡或肥皂流水洗手后方可离开。

二、病原生物实验室意外事故紧急处理办法

1. 菌液误入口 立即将误吸入口的菌液吐于消毒容器内,并用1:1000高锰酸钾溶液或3%双氧水漱口;根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。

2. 手指沾有活菌 浸于0.1%新洁尔灭液5分钟后用肥皂或流水清洗,或用2%碘酒涂抹后再用75%酒精棉球涂抹。

3. 菌液污染环境 将适量5%来苏液、0.1%新洁尔灭液或0.5%84消毒液倾于污染面上,盖半小时后擦净。

4. 化学药品腐蚀伤 如不慎被酸、碱等化学药品溅到皮肤或眼睛上,应马上用大量清水冲洗。可用5%碳酸氢钠中和酸腐蚀,5%醋酸或5%硼酸中和碱腐蚀。

5. 酒精灯芯塞子爆出引起烧伤 轻伤如局部皮肤发红无破损,可浸入冷水止痛,然后局部涂抹凡士林。

6. 火警险情

(1) 干烤箱温度过高时打开箱门可能引起箱内物品着火,此时应立即关闭箱门、切断电源或气源。

(2) 酒精、乙醚等有机溶剂起火应采用沙土或干粉灭火器灭火。使用灭火器时,先拔保险插销,然后压握手把,倒转灭火器,将喷射筒对准燃烧物喷射。

三、病原生物学与免疫学实验的目的和要求

(一) 教学目的

1. 牢固树立无菌观念,掌握生物安全的基本知识和病原生物实验中的无菌操作技术。

2. 用光学显微镜识别常见病原生物的基本形态,掌握常用的涂片和染色技术。

3. 熟悉传染性疾病的常见病原生物种类及其检测方法;了解病原生物学和免疫学实验技术的新进展。

(二) 实验要求

1. 预习 实验课前应预习,明确本次实验课内容、理论依据及操作中的注意事项,

尽量避免或减少实验失误。

2. 合理安排时间 依据不同实验的操作流程和所需时间, 合理安排各项实验的操作顺序, 以提高效率。

3. 协作、独立思考 操作中同学之间要互相协作, 并力求独立思考、勤于动手, 做到善于发现、提出、分析讨论和解决问题。

4. 实验报告 认真观察、真实记录实验结果, 独立完成实验报告。实验报告内容包括: 实验名称、目的、材料、步骤流程、结果及其意义分析。如出现实验结果与理论不符, 应分析其原因。

5. 实验绘图 实验课中有部分内容以观察形态标本为主。因此, 绘图是实验基本技术之一, 应重点掌握以下要领:

(1) 绘图笔: 实验前准备好铅笔和红、蓝、黄、绿、褐色等彩笔和绘图本, 不得使用圆珠笔或钢笔。

(2) 认真观察和分析病原生物的主要形态特点并仔细、真实地绘图记录, 画面须整洁, 字迹清楚。

(3) 绘图时根据标本的特点选择下列方法:

① 铅笔点线图 铁苏木素染色和无色标本应选择铅笔点线图, 用点和线勾画标本结构图, 线要流畅, 点要圆, 可利用点的疏密表示病原生物的立体感(不用衬阴画法)。

② 彩图 除铁苏木素染色外, 其他染色和有颜色的标本要求绘彩图, 按所观察标本的实际颜色绘制。

(4) 按标本大小比例绘图: 构造复杂和体积较小的标本图可画大些, 以展示其结构; 构造简单和较大的标本可画小些, 画清楚结构, 以不影响标注为准。

四、实验室常用物品的准备与消毒灭菌

(一) 常用实验物品的清洁方法

1. 玻璃器材 自来水冲洗→洗涤剂浸泡 24 小时以上→自来水冲洗 10 次左右→去离子水冲洗 3 次→晾干后包装灭菌(注: 用过的玻璃器材应先消毒灭菌, 余同上。新玻璃器材先用自来水洗, 再用 0.5% 碱水煮沸 15 分钟, 余同上处理)。

2. 橡胶类制品 自来水冲洗→去离子水煮沸 5 分钟→晾干后包装灭菌。

3. 金属器械 煮沸 15 分钟→自来水冲洗→立即擦干防锈(如果金属器械上带有动物组织碎屑, 先用 5% 石炭酸洗去碎屑, 余同上处理)。

4. 塑料及有机玻璃制品 使用后 2% ~ 3% 盐酸溶液浸泡过夜→棉签蘸去污剂→自来水冲洗→去离子水冲洗 2 ~ 3 次→晾干备用(细胞培养板须用两层塑料袋包装密封后以 120 万 rad ⁶⁰Co 照射后方能使用)。

(二) 常用实验物品的包装方法

1. 平皿 用纸包装好, 放入金属盒内。

2. **试管、锥形瓶** 均用棉塞塞好,并用不透水的厚纸包扎于棉塞外。试管应直立扎成捆,避免灭菌时倾倒。

3. **吸管** 吸口端塞入少许棉花(不可太松或太紧),然后每支分别用纸斜向从吸管端开始卷好,并在吸口端将包装纸打结,放入有盖的金属筒内。

4. **注射器** 将内芯取出,与外套一起用纱布包好或用纸包好;针头装入垫有棉花的试管内,试管口塞好棉塞。

(三) 常用实验物品的灭菌方法

1. 上述清洁包装好的物品(塑料和有机玻璃物品除外),均可用高压蒸汽灭菌法灭菌。

2. 玻璃器皿也可用于烤法灭菌,温度 160°C 、时间2小时。

3. 金属器械也可用煮沸法灭菌。临时急用可蘸酒精烧灼灭菌:即器械浸泡于95%酒精中,用时取出经酒精灯火焰烧灼,待器械上的酒精自行燃烧完后即可使用(忌直接在火焰上烧灼或干烤)。

(四) 常用灭菌器

1. 电热高压蒸汽灭菌器 (autoclave)

(1) **工作原理** 全自动高压蒸汽灭菌器使用时在两层金属桶之间加水,内桶放置待灭菌的物品,盖上金属盖。通电后在密闭的环境中水被加热变为蒸汽,蒸汽不能外溢,使灭菌器内的压力升高,温度也随之升高,从而达到消毒的目的。

(2) **适用范围** 用于耐高温、耐高压、潮湿的物品灭菌(如普通培养基、生理盐水、手术敷料、器械等),为最常用、效果最可靠的灭菌方法。通常灭菌压力 105.43kPa ($1.05\text{kg}/\text{cm}^2$),温度 121.3°C ,时间15~20分钟。

(3) **操作流程** 高压蒸汽灭菌器加水至规定水位→内桶置入待消毒物品→合盖并拧紧螺栓→加热(接通电源)→排冷空气[当桶内压力为 33.78kPa ($0.34\text{kg}/\text{cm}^2$)时排冷空气]→压力表回“0”后关上排气阀→继续加热至灭菌所需的压力、温度、时间→断电、关机、冷却→开盖(压力表指示回“0”方可打开盖)。

(4) 注意事项

①消毒时高压锅内桶所置物品不应超过内桶的 $2/3$,以免妨碍蒸汽对物品的穿透。

②注意排尽高压锅内的冷空气,方可继续加热,否则灭菌器内的实际温度达不到设定值会影响消毒效果。

③灭菌完毕后严禁立即减压、排气、开盖,必须待压力表回“0”才能开盖。

④定期检查灭菌效果:常用硫磺粉(熔点 115°C)或苯甲酸(熔点 120°C)置于试管中放入灭菌器一同灭菌,观察上述物质是否熔化,判断灭菌效果。

2. 电热恒温干燥箱 (干烤箱, hot air sterilizer)

(1) **工作原理** 电热恒温干燥箱由电热器、温度控制器及箱体构成。当电热器加热超过设定温度时,温度控制器就中断电路,加热自动停止;当温度低于设置温度时,

电路接通自动加热。

(2) 适用范围 适用于耐高温但不耐湿热的物品, 以及湿热不易穿透的物品如油脂、液状石蜡、玻璃制品、瓷器等物品的灭菌。

(3) 使用方法 将已经清洁、包装好的待灭菌的物品置烤箱内, 闭门通电, 设置所需温度与时间, 开始加热, 达到设定的温度和时间后断电。

常用灭菌温度与时间: 150℃ 150 分钟; 160℃ 120 分钟; 170℃ 60 分钟; 180℃ 30 分钟。

(4) 注意事项

① 灭菌温度不得超过 180℃, 否则纸质包装物和棉花将被烧焦。

② 断电后必须使箱内温度下降至室温方可开箱门, 否则有引起箱内包装物以及棉花起火的危险。

③ 为了保证消毒效果, 箱内消毒物品不宜放置过多、过紧。

3. 滤菌器

(1) 工作原理 滤菌器是由不同孔径的滤板或滤膜构成, 滤孔的直径有 0.45 μm 、0.22 μm 、0.1 μm 。其工作原理: 当待消毒液体通过滤菌器时, 在正压(或负压)作用下细菌等微生物被阻隔在滤板或滤膜上, 从而达到除去液体中细菌的目的。

(2) 滤菌器分类 按工作原理, 滤菌器分为正压滤菌器和负压滤菌器(图 1-1)。

① 负压滤菌器 常用的是赛氏滤菌器和玻质滤菌器。

② 正压滤菌器 即薄膜滤菌器(membrane filter)。目前常用的是一次性针头滤菌器, 可直接安装在注射器上使用。

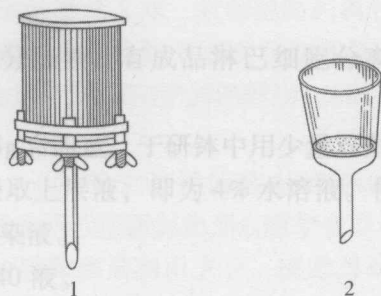


图 1-1 负压滤菌器

1. 赛氏滤菌器; 2. 玻质滤菌器

(3) 注意事项

① 使用负压滤菌器(赛氏滤菌器或玻质滤菌器)前必须对其严格清洗[毛刷蘸洗涤剂洗刷干净→自来水冲洗后再用蒸馏水冲洗干净→晾干(赛氏滤菌器放置新滤膜)→经高压灭菌]方可使用。

② 一次性针头滤菌器使用时不可回抽注射器。

③ 除菌常用滤膜孔径为 0.22 μm , 只能除去液体中细菌, 不能除去病毒、细菌 L 型、支原体、衣原体等病原体。

五、思考与讨论

1. 哪些实验器材可采用高压蒸汽灭菌？使用高压蒸汽灭菌器应注意哪些问题？
2. 哪些器材可使用干烤灭菌？干烤灭菌时应注意哪些问题？
3. 吸管的吸口端为什么要塞入少许棉花？

附：清洁液的配制

重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$)	100g
水	1000ml
浓硫酸 (粗)	250ml

先将重铬酸钾置塑料桶中，加水搅拌溶化，置桶于冷水中，慢慢加入浓硫酸，并不断搅拌混匀，即成。此液可多次使用，颜色变暗绿色即失去清洁能力，不能再使用。



(1) 高压蒸汽灭菌器结构示意图

①消毒时高压锅内物品不应超过容积的3/4，以免妨碍蒸汽对物品的穿透。

②注意排尽高压锅内的冷空气，方可继续加热，否则灭菌器内的实际温度达不到设定值会影响消毒效果。

③灭菌时，应将待灭菌物品放入灭菌器内，并盖紧盖子。

④灭菌时，应将待灭菌物品放入灭菌器内，并盖紧盖子。灭菌时，应将待灭菌物品放入灭菌器内，并盖紧盖子。

2. 电热恒温干燥箱 (干烤箱, hot air oven) 的构造及工作原理。

①电热恒温干燥箱的构造及工作原理。电热恒温干燥箱的构造及工作原理。电热恒温干燥箱的构造及工作原理。

第二章 免疫学基础实验

第一节 免疫细胞检测技术

实验1 外周血单核细胞的分离

【实验原理】

本试验采用聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)混合液作为分层液,密度介于 $1.075 \sim 1.092 \text{g/L}$ 之间。离心后不同密度的血细胞在分层液中呈梯次分布:红细胞和多核白细胞密度较大(1.092g/L),位于最下层;而单核细胞的密度为 $1.075 \sim 1.090 \text{g/L}$,位于分层液的上方。

【实验材料】

1. 聚蔗糖-泛影葡胺分层液:有成品淋巴细胞分离液供应,密度为 $(1.077 \pm 0.001) \text{g/L}$ 。
2. 台盼蓝染液:称取4g台盼蓝,于研钵中用少量双蒸水研磨,加双蒸水至100ml,1500rpm,离心15分钟,吸取上层液,即为4%水溶液。使用前,用1.8%氯化钠溶液稀释1倍,即为2%台盼蓝染液。
3. Hanks或RPMI-1640液。

【操作步骤】

1. 采集静脉血若干毫升,注入盛有肝素的无菌小瓶中(每1ml全血用0.1ml 125~250U/ml肝素溶液抗凝),加盖后立即轻轻摇匀,使血液抗凝。
2. 加入等体积的Hanks或PBS液,使血液对倍稀释,可降低红细胞的凝聚。
3. 吸取淋巴细胞分层液(每10ml稀释血加5ml分层液)置于10ml离心管中,然后将离心管倾斜 45° 角,将稀释血液在距分层液界面上1cm处沿试管壁缓慢加至分层液上面(亦可将吸管口插入离心管底部,将分层液缓慢加在稀释血液的下面),应注意保持两者界面清晰,勿使血液混入分层液内。
4. 将离心管置水平式离心机内,在 $18^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$ 下,2000rpm,离心20分钟。离心后,管内可分为4层。

5. 用毛细吸管沿管壁轻轻吸出灰白色的单核细胞，移入另一支离心管中，或先吸去上层的血浆层、稀释液及血小板，再用一支毛细吸管仔细吸取单核细胞，放入离心管中。

6. 将所得到的外周血单核细胞悬液用 5 倍体积的 Hanks 或 RPMI - 1640 液洗涤 2 次，依次以 2000rpm、1500rpm 在室温下（18℃ ~ 25℃）离心 10 分钟，可去掉大部分混杂的血小板（图 2-1）。

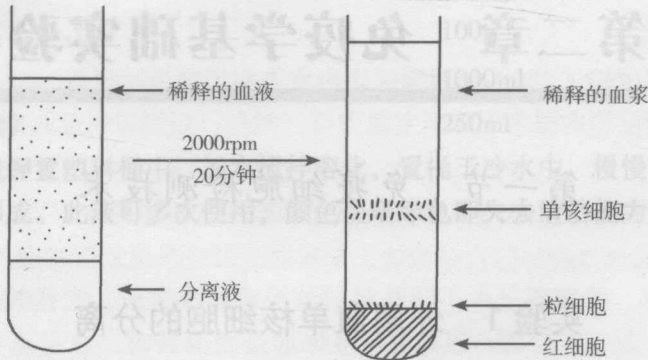


图 2-1 Ficoll - Hypaque 离心法分离血液细胞成分

7. 用完全 RPMI - 1640 液调整细胞悬液浓度，计数细胞后再调整所需细胞液浓度。一般每毫升健康成人血可分离出 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个单核细胞。

8. 用台盼蓝染液检查所分离的细胞活性：取 2 滴细胞悬液加 1 滴 2% 台盼蓝染液，5 ~ 10 分钟后取样做湿片高倍镜检。活细胞不着色，死细胞染成蓝色。计数 200 个细胞，计算活细胞百分率（活性率），一般活性率应在 95% 以上。

【注意事项】

1. 细胞分层液的密度是影响分离效果的关键之一，最适密度在室温下应为 $(1.077 \pm 0.001) \text{ g/L}$ ；避光 4℃ 下保存，取出后逐渐升至室温后混匀，方可使用。

2. 若从未抗凝血中分离单核细胞，可先用链激酶溶解血凝块，然后再按上述方法分离细胞。

3. 分离组织中的单核细胞亦可采用上述方法。

实验 2 淋巴细胞的分离

【实验原理】

单核细胞和多核白细胞具有黏附在塑料或玻璃表面及吞噬羟基铁粉等特性，而淋巴细胞则不能，由此可将其从悬液中分离出来。

【实验材料】

1. 聚蔗糖 - 泛影葡胺分层液：有成品淋巴细胞分离液供应，密度为 $(1.077 \pm 0.001) \text{ g/L}$ 。