



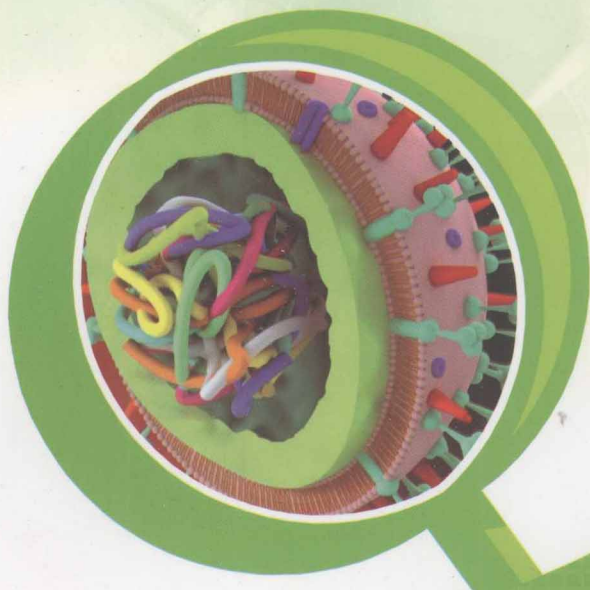
全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材
供临床医学、基础医学、医学检验、护理学等专业使用

丛书主编 秦晓群

免疫学实验

MIANYIXUE SHIYAN

主编◎余平



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>



教育部推荐教材
普通高等教育“十一五”国家级规划教材
医学免疫学、微生物学、寄生虫学、预防医学专业教材

第2版 第1次印刷

免疫学实验

（供医学专业用）

主编：XXX



人民卫生出版社



全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材
供临床医学、基础医学、医学检验、护理学等专业使用

丛书主编 秦晓群

免疫学实验

MIANYIXUE SHIYAN

主 编 余 平

副主编 钱中清 唐小云 王 静

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 静 (青岛大学医学院)

王芙艳 (中南大学湘雅医学院)

李 霞 (牡丹江医学院)

余 平 (中南大学湘雅医学院)

汪洪涛 (蚌埠医学院)

内 容 简 介

本书是全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材。

本书以基础性实验为主,并设有综合性实验和设计性实验。本书共9章,主要介绍目前应用较为广泛的免疫学新技术,内容包括:非特异性免疫实验,特异性抗体的制备,抗原抗体反应,免疫标记技术,细胞的分离、纯化和鉴定,免疫细胞检测技术,人类白细胞抗原分型技术,超敏反应实验,以及设计性实验的选题、设计与实施等内容。

本书适用于五年制本科和八年制各专业医学免疫学实验教学,也可供医院检验科、疾控中心和从事免疫学研究的相关技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学实验/余 平 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2012.1
ISBN 978-7-5609-7566-5

I. 免… II. 余… III. 医药学:免疫学-实验-医学院校-教材 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 254856 号

免疫学实验

余 平 主编

策划编辑:柯其成

责任编辑:柯其成

封面设计:陈 静

责任校对:代晓莺

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)87557437

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉科利德印务有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:8

字 数:192千字

版 次:2012年1月第1版第1次印刷

定 价:20.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究



全国高等医药院校国家级实验教学示范中心 “十二五”规划教材编委会

主任委员 秦晓群

委员 (按姓氏笔画排序)

于 军	第四军医大学	张晓莉	牡丹江医学院
马志健	海南医学院	陈昌杰	蚌埠医学院
马晓松	深圳大学医学院	陈增保	新疆医科大学
王 军	首都医科大学	罗自强	中南大学湘雅医学院
王迎伟	南京医科大学	金宏波	哈尔滨医科大学
王晓梅	深圳大学医学院	周代锋	海南医学院
孙玉萍	新疆医科大学	秦晓群	中南大学湘雅医学院
吴雄文	华中科技大学同济医学院	高殿帅	徐州医学院
吴宜艳	牡丹江医学院	高国全	中山大学中山医学院
宋高臣	牡丹江医学院	康 毅	天津医科大学
张 晓	成都医学院		

总序

preface

为了进一步推动高等学校加快实验教学改革,加强实验室建设,培养大学生的实践能力和创新精神,提高教育质量,更好地满足我国经济社会发展和创新型国家建设的需要,教育部于2005年5月启动了高等学校实验教学示范中心建设和评审工作。同时,要求各实验教学示范中心认真总结教学经验,凝练优质实验教学资源,加强实验教学研究,不断开拓创新,探索实验教学改革新思路,引领实验教学改革方向,为全国高等学校实验教学提供示范。在此质量工程实施过程中,一批优秀的国家级医学实验教学示范中心应运而生。

在医学基础课教学中,实验教学占有极其重要的位置,它在培养学生实际动手能力、综合分析问题和解决问题的能力以及科研创新能力等方面发挥着独特的作用。实验教材是实验教学的基础,也是实验教学的载体。但目前各高等学校的实验教材建设明显滞后,主要存在以下几个问题:①实验教材建设落后于理论教材,作为高等学校三大建设之一的教材建设多年来一直受到高度重视,但这里的教材建设一般是指理论教材的建设,而实验教材在大多数高等学校一直不受重视,实验课教材大多是自编的实验指导,不能满足实验教学的需要;②实验教材没有形成自己的体系,许多实验教材只注重了与理论知识体系配套,而忽视了自身的系统性、科学性和完整性,成为了理论教材的附属品,没有形成自己独立的教材体系,表现为实验课大多是为了配合理论课教学,偏重于验证理论,缺乏综合性与设计性的教学内容;③实验教材缺乏创新,表现为验证性实验偏多,缺乏设计性、综合性实验课题,验证性实验可以对学生强化课堂所学的理论知识起到积极作用,但不能充分激发学生的创造性思维,不能较好地培养学生分析问题、解决问题的能力,不利于学生综合素质、创新意识和创新能力的培养;④实验教材管理混乱,由于历史原因,高等学校实验教材在管理上较为混乱,缺少实验教材建设规划,也没有教材使用的统一要求,教材使用相对无序,既有本校教师编写的自印讲义、实验指导书,也有从校外选用的实验教材,从而助长了实验教学的随意性。

为了顺应高等医学教育实验教学改革的新形势和新要求,在认真、细致调研的基础上,在国家级实验教学示范中心医学组的专家们和部分示范院校领导的指导下,华中科技大学出版社组织了全国27所重点医药院校的近200位老师编写了这套全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材。本套教材由12个国家级实验教学示范中心的教学团队引领,有副教授及以上职称的老师占85%,教龄在20年以上的老师占



70%。教材编写过程中,全体主编和参编人员进行了充分的研讨和细致的分工,各主编单位高度重视并大力支持教材的编写工作,编辑和主审专家严谨和忘我的工作,确保了本套教材的编写质量。

本套教材充分反映了各国家级实验教学示范中心的实验教学改革和研究的成果,教材编写体系和编写内容均有所创新,在编写过程中重点突出以下特点。

(1) 教材课程的设置分为三个模式,即传统型课程模式、整合型课程模式、创新型课程模式。

(2) 教材内容体现“三个层次”,即基本训练(基础知识、基本技能训练)、综合型实验、研究型/创新型实验(以问题为导向性的实验)。

(3) 既体现基础性,又具有先进性;既体现学科内涵和实验内容的更新,又有反映新技术、新方法、新设备的现代实验技术和手段。

(4) 强调学生的自主性,加强创新能力培养。

本套教材得到了教育部国家级实验示范中心医学组和各院校的大力支持与高度关注,我们衷心希望这套教材能为高等医药院校实验教学体系改革作出应有的贡献,并能对其他院校的实验教学提供有益的借鉴和参考。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善和提高。

全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材
编写委员会
2012年1月

前言



近年来,随着免疫化学、细胞生物学和分子生物学的不断发展,以及各种高新技术在免疫学中的应用,许多高度特异、灵敏并能进行自动化检测 and 数据分析处理的新实验方法得以建立。以抗原抗体反应为基础的现代免疫学实验技术不断更新、发展,成为生命科学各个领域实验研究的重要手段。运用免疫学实验技术对免疫原性物质的定性、定量检测不仅推动了对免疫学现象的研究,而且扩大了免疫学与医学其他领域的联系。目前,免疫学实验技术已广泛用于各种传染病、免疫缺陷病、超敏反应、自身免疫病、移植排斥反应及肿瘤等的诊断、疗效评价及发病机制的研究。

本书以基础性实验为主,并设有综合性实验和设计性实验。本书共 9 章,主要介绍目前应用较为广泛的免疫学新技术,内容包括:非特异性免疫实验,特异性抗体的制备,抗原抗体反应,免疫标记技术,细胞的分离、纯化和鉴定,免疫细胞检测技术,人类白细胞抗原分型技术,超敏反应实验,以及设计性实验的选题、设计与实施等内容。在编写的过程中,我们力求内容完整、系统、科学,强调实用性和可操作性,注重能力培养。各章节内容的划分并不是绝对的,而是相互交叉和融合的。在实际教学中,各院校可根据不同专业、不同层次的学生和实验条件灵活安排、优化组合和设计,以达到最佳教学效果和培养目标。每一实验技术所选的标本、实验步骤和方法,可根据各院校实验条件和常规做法而加以修改和完善。

本书的编者均是具有丰富经验的教学一线教师,书中介绍的实验都是编者亲自操作过的,因此本书具有较大的参考价值。本书既有利于读者对免疫学理论知识的认识和巩固,又有利于对其临床思维能力、科研创新能力及分析问题、解决问题能力的培养。

本书适用于五年制本科和八年制各专业医学免疫学实验教学,也可供医院检验科、疾控中心 and 从事免疫学研究的相关技术人员参考。

编 者

2011 年 11 月

目 录



◇ 第一章 非特异性免疫实验	/1
实验一 唾液溶菌酶活性测定	/1
实验二 CH_{50} 法血清总补体活性测定	/3
实验三 补体旁路活化途径的溶血活性(AP-H_{50})测定	/5
◇ 第二章 特异性抗体的制备	/7
实验一 免疫血清的制备	/7
实验二 免疫血清的鉴定和保存	/9
实验三 单克隆抗体的制备	/11
◇ 第三章 抗原抗体反应	/16
第一节 凝集反应	/16
实验一 细菌的玻片凝集实验	/16
实验二 ABO 血型鉴定实验	/18
实验三 细菌的试管凝集实验	/19
实验四 类风湿因子免疫胶乳实验	/20
实验五 反向间接凝集法检测 AFP	/21
实验六 抗“O”实验	/23
实验七 抗球蛋白(Coombs)实验	/24
第二节 沉淀反应	/26
实验八 单向琼脂扩散实验	/26
实验九 双向琼脂扩散实验	/27
实验十 对流免疫电泳	/29
实验十一 免疫电泳	/30
实验十二 免疫透射比浊实验	/32
实验十三 免疫印迹技术	/33

◇ 第四章 免疫标记技术	/35
第一节 免疫酶技术	/35
实验一 ELISA:双抗体夹心法测 HBsAg	/35
实验二 生物素-亲和素技术:BAS-ELISA 测定抗-HBs	/38
实验三 酶免疫组化技术:酶免疫组化测定 EBV-VCA-IgA	/40
第二节 免疫荧光技术	/42
实验四 间接免疫荧光法检测抗核抗体 (antinuclear antibody, ANA)	/42
实验五 细胞膜免疫球蛋白(SmIg)测定	/45
第三节 化学发光免疫分析技术	/46
实验六 酶标记化学发光法测 AFP	/46
第四节 免疫胶体金标记技术	/48
实验七 胶体金免疫层析法(GICA)检测早孕实验	/48
◇ 第五章 细胞的分离、纯化和鉴定	/51
实验一 Ficol-Hypaque 密度梯度离心法分离人 PBMC	/51
实验二 Percoll 不连续密度梯度沉淀法分离 与纯化 NK 细胞	/53
实验三 免疫磁珠法分离淋巴细胞	/55
实验四 小鼠腹腔巨噬细胞的分离	/56
实验五 小鼠胸腺细胞的制备	/58
实验六 小鼠骨髓树突状细胞的制备	/59
实验七 尼龙毛法分离人外周血 T、B 淋巴细胞	/61
◇ 第六章 免疫细胞检测技术	/63
第一节 淋巴细胞亚群的检测	/63
实验一 E 花环实验	/63
实验二 T 细胞亚群测定	/65
第二节 免疫细胞功能检测	/69
实验三 淋巴细胞增殖实验	/69
实验四 B 淋巴细胞溶血空斑实验(PFC)	/74
实验五 中性粒细胞吞噬实验	/76
实验六 巨噬细胞吞噬实验	/77
实验七 NK 细胞自然杀伤活性的测定	/78



实验八	LAK/NK 细胞的制备和活性测定	/80
实验九	细胞因子的检测	/81
◇	第七章 人类白细胞抗原分型技术	/86
第一节	血清学分型技术	/86
实验一	HLA 抗原血清学分型	/86
第二节	细胞学分型技术	/88
实验二	双向 MLC 方法	/89
实验三	单向 MLC 方法	/90
第三节	DNA 分型技术	/92
实验四	基因组 DNA 的提取	/94
实验五	PCR/SSP 技术	/95
实验六	PCR/SSCP 技术	/97
实验七	PCR/SSO 技术(正向杂交)	/99
◇	第八章 超敏反应实验	/101
实验一	豚鼠过敏实验	/101
实验二	皮肤过敏实验	/102
实验三	血清总 IgE 测定	/104
◇	第九章 设计性实验的选题、设计与实施	/107
第一节	设计性实验的选题和设计	/107
第二节	设计性实验举例	/109
例 1	Balb/c 小鼠 SLE 模型的建立	/109
例 2	海藻多糖对树突状细胞功能的影响	/110
例 3	卡介苗对小鼠细胞免疫功能影响的实验研究	/112
例 4	肺结核患者外周血辅助性 T 细胞亚群变化 与结核病的关系	/114
例 5	地塞米松对肿瘤细胞凋亡的影响	/115

第一章

非特异性免疫实验

非特异性免疫又称固有免疫,是生物体在长期进化中,在与危害机体的病原微生物或其他异物的相互斗争过程中建立起来的一种天然防护能力,它是体内一切免疫防护力的发展基础。非特异性免疫功能的检测主要包括对补体、吞噬细胞及 NK 细胞的检测,本章将介绍一些常用的检测实验。

实验一 唾液溶菌酶活性测定

实验目的

- (1) 证实体液中溶菌酶的存在及其对革兰阳性菌的溶解作用。
- (2) 掌握用平板打孔测定法测定溶菌酶活性的方法。

实验原理

溶菌酶存在于机体的泪液、唾液、痰液、鼻涕及白细胞和血清中。溶菌酶是一种小分子蛋白,分子量约 14 kD,由 129 个氨基酸组成,是一种碱性蛋白质。溶菌酶能切断细菌胞壁多肽结构中的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4 糖苷键,破坏肽聚糖支架,破坏细胞壁。细菌细胞壁的重要功能之一是保护细菌,即抗低渗,肽聚糖是革兰阳性菌细胞壁的主要成分,革兰阳性菌失去细胞壁的保护作用后,在低渗环境中可发生溶解。而革兰阴性菌胞壁肽聚糖层只有 1~2 层,肽聚糖外的脂多糖、外膜和脂蛋白结构是其细胞壁的主要成分,故在一般情况下溶菌酶不易直接溶解革兰阴性菌。

测定体液、分泌液中溶菌酶的含量及其变动情况,可以作为了解机体防御功能的一个侧面指标。该方法简便,不需特殊设备。正常人血清溶菌酶的含量不超过 5~10 mg/L,唾液溶菌酶含量在 1.5~1.9 mg/L 之间,尿中通常查不出。各种类型的白血病,特别是单核细胞性白血病时,患者血清溶菌酶含量升高尤为明显。

体液或分泌物中溶菌酶活性,可通过检查其对指定敏感菌株的裂解作用来进行测定。测定方法有平板打孔测定法和光学测定法两种。光学测定法只适用于测定较窄范围浓度的溶菌酶,因此常需将待检品的浓度预先作适当的调整,使之在限定范围之内。平板打孔测定法可在一个较宽的浓度范围内获得满意的结果。本实验以平板打孔测定法为例。



实验材料

(1) 溶壁微球菌 本菌是从空气中分离出的一种革兰阳性菌,对人不致病,对营养要求不高,在普通琼脂培养基上生长良好,菌落呈黄色,每月传代一次或冻干保存,用于制备溶壁微球菌琼脂平板。

(2) 溶菌酶标准品 称取溶菌酶标准品,用 $1/15 \text{ mol/L}$ 的 PBS 配制成 5 mg/L 、 25 mg/L 、 100 mg/L 的标准液,使用前保存在 4°C 冰箱中,用于阳性对照及制备标准曲线。

(3) 唾液(或血清) 用无菌平皿收集唾液,可在同学间收集。

(4) 其他 无菌打孔器(孔径 3 mm)、无菌毛细吸管、小米尺等。

实验方法

(1) 溶壁微球菌琼脂平板的制备如下。

① 溶壁微球菌在使用前于琼脂斜面培养基上传代一次,然后再接种于琼脂平板 37°C 培养 24 h 。用无菌蒸馏水洗下菌苔, 2000 r/min 离心 30 min ,弃上清液。再加蒸馏水轻轻混匀, 2000 r/min 离心 30 min ,弃上清液,称沉淀物的湿重,用无菌蒸馏水配成 100 g/L 的浓菌液(菌液应在临用前配制,不宜存放过久),加热杀死,备用。

② 称取琼脂粉 1 g ,加入 $1/15 \text{ mol/L}$ pH 值为 6.4 的 PBS 100 mL ,即成 1% 琼脂。

③ 取已配制好的菌液 1 mL ,加到 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 已熔化的 1% 琼脂中,摇匀,倾注平板(直径为 $7\sim 9 \text{ cm}$ 的平板,加 1% 琼脂 15 mL),冷凝后,置于 4°C 冰箱,保存备用。

(2) 用无菌打孔器在溶壁微球菌琼脂平板上打孔,孔间距 $5\sim 20 \text{ mm}$,用牙签挑去孔内琼脂。

(3) 用毛细吸管吸取新鲜收集的唾液并加入琼脂孔内,每孔加一滴,每滴约为 0.025 mL 。

(4) 置于 $25\sim 30^\circ\text{C}$ 环境中 $18\sim 24 \text{ h}$,观察结果。

(5) 在测定的同时,将各种浓度的溶菌酶标准液加于小孔中,同法测定溶菌环直径,用半对数纸,以溶菌酶浓度为纵坐标(对数坐标)、溶菌环直径为横坐标,绘制标准曲线。从标准曲线上查出每毫升待检品所含溶菌酶的质量(以微克计)。

实验结果

加唾液孔和标准溶菌酶孔周围的溶壁微球菌被溶解,可见圆形透亮区,即溶菌环。溶菌环的大小与溶菌酶的含量成正比。用小米尺或三角板量取小孔周围溶菌环直径,并作记录,可从标准曲线上查出待检样品溶菌酶的含量。

注意事项

测量标准品与待检样品溶菌环大小的间隔时间应尽量缩短,最好能在同一块板上备有标准样品的对照,以便于比较。

**思考题**

当体液或分泌液中溶菌酶减少或缺乏时,临床上常易引起哪些部位感染和哪类病原菌感染?

(唐小云)

实验二 CH₅₀法测定血清总补体活性

实验目的

- (1) 掌握 CH₅₀法测定总补体活性的原理及方法。
- (2) 了解本实验的用途。

实验原理

绵羊红细胞(sheep red blood cells, SRBC)与相应的抗体(溶血素)结合后,可激活待检血清中的补体而导致 SRBC 溶血。补体含量与溶血程度呈 S 形曲线正相关。当溶血程度接近 100% 时,补体量的变化对溶血的程度影响不大,而溶血程度在 30%~70% 时,只要补体量稍有变化,就可对溶血程度产生很大影响,因此以产生 50% 的溶血所需补体的量作为一个 CH₅₀ 单位。人血清总补体活性正常值为 50~100CH₅₀ U/mL。

CH₅₀ 实验方法简便,但需要时间较长,且敏感性较低,补体的溶血活性与反应体系的 pH 值、离子浓度、反应温度等有关。SRBC 浓度与补体溶血活性亦有关。因此在进行实验时需对反应的各个环节进行严格控制。

实验材料

- (1) 待检新鲜血清,作 1:20 稀释。
- (2) 5% SRBC 悬液。
- (3) 溶血素(抗 SRBC 抗体),一般为 3 个 U。
- (4) 致敏 SRBC:5% SRBC 加等量溶血素,置于 37 °C 水浴 10 min。
- (5) 缓冲液:取 NaCl 75.00 g, 1 mol/L HCl 177 mL,三乙醇胺 28.00 mL, MgCl₂ · 6H₂O 1.00 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.2 g。先将 NaCl 溶于 700 mL 蒸馏水中,再加入 HCl 和三乙醇胺。将 MgCl₂ · 6H₂O 和 CaCl₂ · 2H₂O 分别用 2 mL 蒸馏水溶解后,逐一加入,再用蒸馏水定容至 1 L,于 4 °C 保存。临用前取上述溶液 1 份加 9 份蒸馏水。
- (6) 离心机、试管、吸管、恒温水浴箱、分光光度计、比色杯等。



实 验 方 法

(1) 50%溶血标准管的配制:取 5% SRBC 悬液 0.5 mL,置于刻度离心管内,2 000 r/min离心 10 min。弃去上清液后加蒸馏水至 2.0 mL,使其全部溶血。加 2.0 mL 1.7% NaCl 缓冲盐水混匀,恢复等渗,加入 5% SRBC 0.5 mL,混匀后与其他试管一起温育。

(2) 取洁净试管 10 支,依次编号,排在试管架上。

(3) 按照表 1-1 加入各试剂,混匀,将试管置于 37 °C 水浴 30 min。

表 1-1 CH₅₀法测定总补体活性操作表

试管编号	1:20 稀释血清/mL	缓冲液/mL	致敏 SRBC/mL	CH ₅₀ /(U/mL)
1	0.10	1.40	1.0	200
2	0.15	1.35	1.0	133
3	0.20	1.30	1.0	100
4	0.25	1.25	1.0	80
5	0.30	1.20	1.0	66.6
6	0.35	1.15	1.0	57.1
7	0.40	1.10	1.0	50
8	0.45	1.05	1.0	44.4
9	0.50	1.00	1.0	40
10	—	1.50	1.0	—

(4) 2000 r/min 离心 5 min 后与 50%溶血标准管比较,判定结果。

实 验 结 果

将 50%溶血标准管与各测定管进行初步目视比色,选择与标准管颜色相近的两管,也可于 721 分光光度计上在波长 542 nm 处测 OD 值,选择最接近 50%溶血标准管 OD 值的一管,根据此管中加入的血清量和血清稀释倍数计算出 50%溶血的总补体值。

$CH_{50}(U/mL) = 1 / \text{引起 } 50\% \text{ 溶血管的血清用量}(mL) \times \text{稀释倍数}$ 。

注 意 事 项

- (1) 待检血清必须新鲜,如放置于室温 2 h 以上,可使补体活性下降。
- (2) 试管口径大小一致,清洁透明,便于观察。
- (3) 50%溶血标准管配制必须用同批实验用绵羊红细胞,并同时放入冰箱。
- (4) 补体性质不稳定,所以需对实验的条件和各个环节加以严格控制。



思考题

- (1) 何谓一个 CH_{50} 单位? 何谓溶血素?
- (2) 如何计算每毫升血清所含的 CH_{50} 单位数?

实验三 补体旁路活化途径的溶血活性($AP-H_{50}$)测定

实验原理

兔红细胞可以使 B 因子活化,因此可激活人补体旁路活化途径,导致兔红细胞溶解。在反应系统中加入乙二醇双氨基四乙酸(ethylene glycol-bis-aminotetracetate, EGTA)可整合血浆 Ca^{2+} , EGTA 与 Mg^{2+} 结合能力很弱,故补体经典活化途径被封闭。根据兔红细胞的溶血程度,可测定补体旁路活化途径的总补体活性。

实验材料

(1) 巴比妥缓冲液($5\times$): NaCl 85 g, 巴比妥酸 5.75 g, 巴比妥钠 3.75 g, 蒸馏水 1 500 mL。

(2) 0.1 mol/L EGTA- Mg^{2+} 溶液: EGTA 38.00 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 20.30 g, NaOH 7.00 g, 溶于蒸馏水中,以 1 mol/L NaOH 调节至 pH 值为 7.5,加蒸馏水至 1 L。

(3) 0.03 mol/L EGTA-GVB $^{2+}$: 0.1 mol/L EGTA- Mg^{2+} 300 mL, 0.1 mol/L $CaCl_2$ 5 mL, 巴比妥缓冲液($5\times$)180 mL, 2% 明胶 50 mL, 加蒸馏水至 1 L, 调节至 pH 值为 7.5。

(4) 0.1 mol/L EDTA- Na_3 原液: EDTA- Na_3 37.23 g, NaOH 4.00 g。分别将 EDTA- Na_3 溶于 500 mL 蒸馏水中, NaOH 溶于 100 mL 蒸馏水中,将 NaOH 溶液加入 EDTA- Na_3 溶液中混合,用 1 mol/L NaOH 调节至 pH 值为 7.5,加蒸馏水至 1 L。

(5) 0.01 mol/L EGTA-GVB $^{2+}$ 应用缓冲液: 0.03 mol/L EGTA-GVB $^{2+}$ 667 mL, 巴比妥缓冲液($5\times$)360 mL, 0.1 mol/L EDTA- Na_3 原液 200 mL, 2% 明胶溶液 100 mL, 蒸馏水加至 2 L。

(6) 兔红细胞(rabbit red blood cell, RRBC)悬液的制备: 无菌操作下采兔耳静脉或心脏血,用阿氏液保存于 4 °C 冰箱。可用 2 周。用前以 EGTA-GVB $^{2+}$ 应用缓冲液洗涤 2 次,并用该缓冲液配制成 3×10^8 个/mL 细胞悬液。

实验方法及实验结果

按表 1-2 在各试管中加入反应物,37 °C 水浴 40 min 后,加入 EGTA-GVB $^{2+}$ 应用缓冲液 6.3 mL, 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,在分光光度计上读取 $OD_{452\text{ nm}}$ 值,然后计算每毫升血清样本 $AC-H_{50}$ 单位。补体旁路活化途径补体活性单位($AP-H_{50}$ 单位) = $1/\text{引起 } 50\% \text{ 溶血管的血清用量 (mL)} \times \text{稀释倍数}$ 。正常值为 $18.9 \pm 2.2 (X \pm 1 \text{ SD}) \text{ U/mL}$ 。



表 1-2 补体旁路活化途径的溶血活性测定操作表

管号	EGTA-GVB ²⁺ /mL	1:2 稀释待检血清/mL	3×10^8 个/mL RRBC
1	0.25	0.25	0.20
2	0.30	0.20	0.20
3	0.35	0.15	0.20
4	0.37	0.13	0.20
5	0.40	0.10	0.20
6	0.42	0.08	0.20
7	0.50	—	0.20

注 意 事 项

补体 C3、C5~C9、P 因子、D 因子、B 因子都参与补体旁路活化途径,所以其中任何成分的异常均可导致补体旁路活化途径溶血活性的改变。

**思考题**

补体旁路活化途径的溶血活性(AP-H₅₀)测定的实验原理是什么?

(唐小云 鞠宝玲)

**参考文献**

- [1] 张晓莉. 医学免疫学实验教程[M]. 北京:北京大学医学出版社,2010.
- [2] 柳忠辉. 医学免疫学实验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2008.