

高等医学院校教材

供基础医学、临床医学、预防医学、护理学、药学类专业用

医学免疫学 实验教程

THE EXPERIMENTAL TUTORIAL OF MEDICAL IMMUNOLOGY

主编 熊平源 王 强



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

医学免疫学 实验教程

主编 王 强

● 实验教程

高等医学院校教材

供基础医学、临床医学、预防医学、护理学、药学类专业用

医学免疫学实验教程

THE EXPERIMENTAL TUTORIAL OF MEDICAL IMMUNOLOGY

主 编 熊平源 王 强

副主编 郭凯文 胡艺兰 陈 慧 金 玉

编 委 (按姓氏笔画为序)

马 杰 万京华 于爱莲 王 强 邓维秀

白惠卿 边藏丽 李 萍 李昌美 张雄鹰

金 玉 陈 慧 陈育民 胡艺兰 郭明雄

郭凯文 熊平源



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验教程/熊平源,王强主编. —武汉:武汉大学出版社,
2011. 11

高等医学院校教材

ISBN 978-7-307-09239-6

I. 医… II. ①熊… ②王… III. 医药学:免疫学—实验—教材
IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 202124 号

责任编辑:黄汉平 责任校对:黄添生 版式设计:马 佳

出版:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:cbs22@whu.edu.cn 网址:www.wdp.com.cn)

印刷:通山金地印务有限公司

开本:787×1092 1/16 印张:8.5 字数:210千字 插页:1

版次:2011年11月第1版 2011年11月第1次印刷

ISBN 978-7-307-09239-6/R·151 定价:19.00元

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有质量问题,请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

“医学免疫学”是医学院校必设的基础课程之一，按教学大纲要求，“医学免疫学”的实验课时约占总学时的1/3，说明该学科具有理论与实践紧密结合的特点，同时也体现了实验教学在学科中的重要性。本课程要求学生不仅要掌握基础理论，而且要学习和掌握各项基本技能。据此，我们编写了《医学免疫学实验教程》一书，力求规范实验教学，从整体上提高教学水平和教学质量。

本《医学免疫学实验教程》结合教学工作实际，并参考有关兄弟院校实验教材，共编写了49个实验项目，每个项目按实验目的、实验原理、实验材料、实验方法、实验结果及注意事项的格式编写，并紧扣实验内容附有相关思考题。编写内容力求“文字简明、语言精练、格式规范、准确无误”。可帮助学生巩固基础理论知识，培养学生基本技能，提高教学效果。

本实验教程主要供五年制临床医学、预防医学以及四年制护理学、药学专业“医学免疫学”实验教学使用，也可供医学高职专科生及硕士研究生实验教学选用。附录中编入的内容主要供实验室工作人员及实验课教师参考借鉴。

医学教育的改革不断向纵深发展，免疫学和免疫学技术的发展日新月异，限于编者的学术水平，本书难免存在缺点和不足。我们衷心希望广大师生在教学实践中提出宝贵意见，以便及时改进。

熊平源

2011年7月

目 录

医学免疫学实验课的目的和要求	1
医学免疫学实验室守则	2
第一章 固有免疫实验	3
实验 1 溶菌酶的溶菌作用	3
实验 2 中性粒细胞吞噬功能实验	5
实验 3 硝基四氮唑蓝 (NBT) 还原实验	7
实验 4 巨噬细胞吞噬功能实验	8
实验 5 巨噬细胞移动抑制实验	10
实验 6 NK 细胞活性测定	12
第二章 抗原抗体参与的实验	15
实验 7 直接凝集反应	15
实验 8 间接凝集实验	19
实验 9 间接凝集抑制实验	20
实验 10 类风湿因子乳胶凝集实验	22
实验 11 人类 ABO 血型鉴定实验	23
实验 12 单向免疫扩散实验	25
实验 13 双向琼脂扩散实验	27
实验 14 对流免疫电泳	29
实验 15 火箭免疫电泳	31
实验 16 免疫电泳	33
实验 17 免疫印迹技术	36
第三章 补体参与的实验	38
实验 18 溶血空斑实验	38
实验 19 补体结合实验	40
实验 20 总补体活性测定	42
实验 21 循环免疫复合物的检测	45
第四章 淋巴细胞检测实验	47
实验 22 B 淋巴细胞膜表面免疫球蛋白 (SmIg) 测定	47
实验 23 SPA 花环实验	49

实验 24	外周血淋巴细胞分离法	50
实验 25	E 花环形成实验	52
实验 26	T 淋巴细胞亚群的检测	54
实验 27	淋巴细胞转化实验	56
实验 28	抗体介导的细胞毒实验	58
实验 29	微量淋巴细胞毒实验	60
实验 30	混合淋巴细胞培养法	62
实验 31	细胞毒性 T 细胞杀伤功能测定	63
第五章	免疫标记技术	65
实验 32	免疫荧光技术	65
实验 33	酶联免疫吸附实验	68
实验 34	生物素-亲和素技术	71
实验 35	斑点金免疫渗滤实验	74
实验 36	斑点免疫层析实验	76
实验 37	酶免疫组化技术	78
实验 38	酶标免疫定量测定	79
实验 39	放射免疫分析技术	81
第六章	免疫分子检测实验	84
实验 40	SPA 协同凝集实验	84
实验 41	免疫浊度实验	86
实验 42	辛酸-硫酸铵法提取血清中的 IgG 抗体	88
实验 43	白细胞介素-2 活性测定	90
第七章	超敏反应实验	93
实验 44	植物血凝素皮肤实验	93
实验 45	豚鼠速发型过敏反应	94
实验 46	豚鼠结核菌素实验	95
实验 47	小鼠 DNFB 实验	96
实验 48	小鼠 DTH 实验	97
实验 49	肥大细胞脱颗粒实验	98
【附录 I】	显微镜的结构、使用与保护	99
【附录 II】	流式细胞术简介	102
【附录 III】	实验动物的抓取、固定和注射方法	105
【附录 IV】	免疫学实验常用试剂的配制	106
【附录 V】	常用玻璃器皿及玻片洗涤法	110
【附录 VI】	常用实验小鼠简介	112
【附录 VII】	常用生物制品介绍	115

【附录Ⅷ】 免疫血清的制备 117

【附录Ⅸ】 溶血素的制备 119

【附录Ⅹ】 兔抗人血清的制备 121

【附录Ⅺ】 单克隆抗体的制备 124

主要参考资料..... 127

医学免疫学实验课的目的和要求

“医学免疫学”是一门重要的基础医学课程。在学习免疫学的过程中，不仅需要掌握本学科的基础知识、基本理论，同时不能忽视免疫学作为实验性科学而不断发展的事实。因而，我们在教学过程中，注重对学生进行免疫学技术操作及实验能力的培养。免疫学实验课是整个免疫学教学中重要的有机组成部分。

一、实验课的目的

1. 加深和巩固对系统理论知识的理解和体会。
2. 熟悉和掌握免疫学实验的基本技能。
3. 培养正确的科学态度和思维分析能力。

二、实验课的要求

1. 为提高实验课效果，每次实验前必须认真预习，了解实验原理、材料与方法、注意事项以及预期的实验结果。
2. 加强基础训练，每次实验过程中应注意基本技术、基本操作、基本训练。坚持严肃性、严格性和严谨性。
3. 要仔细观察示教实验和录像实验。
4. 自行操作要认真、准确。
5. 为提高科学思维、分析、总结能力，每次实验结束后必须认真、及时地记录结果，进行分析，得出结论，完成实验报告。

医学免疫学实验室守则

为保证实验效果，加强实验室内人员认真、负责的态度，保障实验操作者的安全，特制定如下守则：

一、学生在实验课前，应认真预习所要进行实验的内容，明确实验目的，了解实验原理，熟悉所要使用的仪器、药品的性质及操作程序，如有疑问，应事先请教指导教师。

二、尽量不带个人生活、学习用品入实验室，必须要带的物品如书本、文具等应放在远离实验操作区的指定位置。

三、进入实验室应穿白大褂，离开时将白大褂脱下并反折叠带走，在实验室内应保持安静，遵守秩序，不得大声喧哗、随便走动或拆卸仪器，搬弄标本。

四、实验室内禁止吸烟、进食及饮水，严禁用嘴吸移液及湿润标签，尽量不要用手触摸头面部及身体其他暴露部位。

五、如遇不慎打破器皿或出现实验材料污染皮肤、衣物、桌面等情况，应及时报告指导教师，切勿隐瞒或自行处理。

六、实验中被污染过的器材、物品及其他盛过有菌物的容器，应用完后立即投入已准备的消毒剂（如来苏尔、氯胺液）中，不可随意扔放。

七、注意观察分析实验结果，独立思考解决实验中所遇到的问题，要严格按操作程序进行实验。

八、要爱护公共财物，节约水电及试剂材料，不得将实验物品私自带出实验室。如遇仪器、用品损坏，应报告指导教师并按规定予以赔偿。

九、实验结束后，应清理实验用品，实验废弃物（包括实验动物尸体）应收入或倒入指定的地方和容器内。每一位同学均应服从卫生值日安排，认真负责地做好清洁卫生。

十、离开实验室前，应用肥皂清洗双手或用 84 消毒液将双手浸泡 5 ~ 10 分钟，然后用清水洗净。最后离开的同学应注意关水、关电、关窗、关门。如有借用的物品和仪器要及时归还。

第一章 固有免疫实验

实验 1 溶菌酶的溶菌作用

(The role of lysozyme bacteriolysis)

【目的】

证实体液中溶菌酶的存在及溶菌酶对革兰氏阳性菌的溶解作用。

【原理】

溶菌酶 (lysozyme) 是一种小分子蛋白质, 属乙酰氨基多糖酶。它的等电点高 (pH 11.0), 能与细菌牢固地结合, 并裂解肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1, 4 糖苷键, 使细菌溶解死亡。溶菌酶的主要作用对象是革兰阳性菌。革兰氏阴性菌肽聚糖层少, 又有外膜保护, 故在一般情况下不受溶菌酶的影响。

溶菌酶广泛分布于机体的组织、体液与分泌液, 其中泪液含量最高, 为血清含量的 100 ~ 150 倍。临床慢性支气管炎、局部免疫功能降低, 及唾液中溶菌酶低于正常, 各种类型的白血病患者血清和尿中溶菌酶含量有所增加。

【材料】

1. 唾液、泪液 (或乳汁)、标准溶菌酶 (1ng/ml)、生理盐水、2% ~ 5% 琼脂盐水。
2. 细球菌 (*M. lysodeikticus*)。
3. 毛细吸管、打孔器 (或滤纸片)、无菌平皿等。

【方法】

1. 取一无菌平皿, 倾入 5ml 细菌悬液, 再倾入 5ml 已融化的 2.5% 琼脂盐水, 迅速混匀, 平放待凝。

2. 用打孔器按图 1-1 所示打孔, 挑去孔内琼脂, 用毛细吸管分别加唾液、泪液 (或乳汁)、标准的溶菌酶和生理盐水 (或用无菌圆形滤纸片分别蘸取上述四种液体, 按图 1-1 所示贴于平皿表面)。

3. 37℃ 培养过夜, 观察结果。

【结果】

孔周或滤纸片周围出现的透明圈即为溶菌环。注意比较溶菌环的大小。

【注意事项】

1. 加样时, 避免样品溢出孔外, 孔内不应有气泡。
2. 做定量检测时, 先用标准品制备标准曲线, 然后根据环的直径及标准曲线求出样

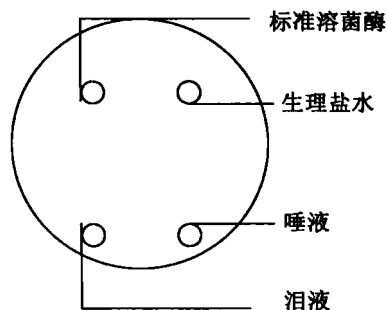


图 1-1 溶菌酶实验示意图

品含量。

3. 标准曲线绘制后，每次检验样品时，最好在同一个平皿上备有标准品对照，以资比较。

【思考题】

溶菌酶的溶菌作用有什么生物学意义？

实验2 中性粒细胞吞噬功能实验

(Neutrophil phagocytosis test)

【目的】

1. 熟悉白细胞吞噬的原理和方法。
2. 理解机体的非特异性免疫机制。

【原理】

机体内具有吞噬功能的细胞大致分为两大类，即小吞噬细胞和大吞噬细胞。小吞噬细胞一般指血液中的中性粒细胞，大吞噬细胞则是存在于组织中的巨噬细胞和血液中的大单核细胞。它们构成机体的天然防御机能。本实验通过体外或动物体内的细胞吞噬试验，以证实机体的非特异性免疫机制。

【材料】

1. 器材：显微镜、载玻片、厚凹玻片、接种环、采血针、滴管、湿盒、恒温培养箱、注射器、针头、打孔器、平皿、酒精灯、火柴。
2. 材料、试剂：3.8% 枸橼酸钠、2% 碘酒、75% 酒精、瑞氏染液、蒸馏水、6% 可溶性淀粉、1% 鸡红细胞悬液、溶壁微球菌（100mg/ml）、1/15mol/L 磷酸盐缓冲液（pH6.4）、琼脂、标准溶菌酶（100μg/ml）、新鲜鸡蛋清（1:10）、生理盐水、香柏油。
3. 菌种：白色葡萄球菌 24h 斜面培养物。
4. 动物：小白鼠。

【方法】

1. 取厚凹玻片一片，在凹孔中用滴管加入一滴 3.8% 枸橼酸钠溶液。
2. 依次用碘酒、酒精消毒手指或耳垂及采血针后，从消毒部位采取三大滴血加入凹孔中混匀。
3. 将接种环烧灼灭菌后，刮取少许白色葡萄球菌置于凹孔血液中搅匀。
4. 将上述凹玻片放入湿盒，于 37℃ 温箱中作用 45min，注意每 15min 混匀一次。
5. 取出凹玻片，用烧灼灭菌的接种环将凹孔中血液搅匀后取血 3~4 环于载玻片上，用另一载玻片推成薄血片。接种环烧灼灭菌后放回原处。
6. 待血片自干后，用瑞氏染液染色。用吸管取瑞氏染液数滴滴于上述血片上先染色 1min。然后加等量缓冲液，轻轻晃动混匀，继续染 5min 后水洗，用吸水纸吸干后镜检。

【结果】

油镜检查：先寻找白细胞，观察胞浆中是否有吞噬的细菌。如结果正确，可见胞浆呈淡蓝色，细菌呈深蓝色，红细胞呈褐色，胞核呈紫红色。

观察 100 个嗜中性粒细胞，计数吞噬细菌的白细胞数与所吞噬的细菌总数，分别求出吞噬百分率和吞噬指数。

$$\text{吞噬百分率} = \frac{\text{吞噬有细菌的嗜中性粒细胞}}{100} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{100 \text{ 个吞噬细胞吞噬的细菌总数}}{100}$$

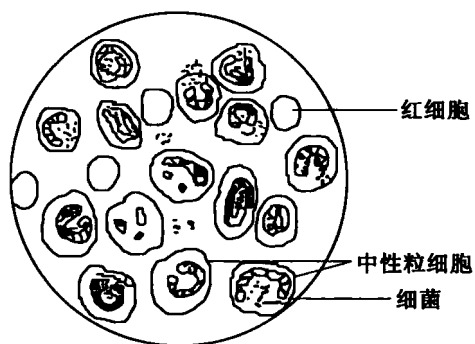


图 2-1 中性粒细胞

【注意事项】

1. 所用器材要洁净。
2. 越接近片子末梢细胞数越多，计数时应取片子前、中、后三段计数，以提高准确性。

【思考题】

简述中性粒细胞吞噬实验的理论意义与实际意义。

实验3 硝基四氮唑蓝 (NBT) 还原实验

(Nitro blue tetrazolium (NBT) reduction test)

【目的】

了解中性粒细胞的硝基四氮唑蓝 (NBT) 还原实验的方法和原理。

【原理】

细菌感染时机体正常的中性粒细胞能量消耗剧增、耗氧量增加、糖代谢活跃。因氧化还原反应，糖氧化过程中所脱的氢可被吞噬的或渗透到中性粒细胞胞质内的 NBT 染料接受，使淡黄色的 NBT 还原成蓝黑色的甲臆，以折光性强的点状或斑块状颗粒沉积于细胞内。镜下检查 NBT 阳性细胞数量，便可推知中性粒细胞的杀菌功能。

【材料】

1. NBT 染液：取 0.28gNBT 加入 100ml 生理盐水，用超细玻璃滤器过滤，分装，4℃ 保存。
2. 0.77% 沙黄 O 染液。
3. 肝素：用无菌生理盐水配制 25U/ml 肝素溶液。
4. 培养液：取 0.5ml 正常人血清加入 0.3ml 无菌生理盐水和 0.6mlNBT 染液。
5. 甲醇、无菌生理盐水等。
6. 碘酒与酒精棉球、温箱、凹玻片、湿盒、注射器、吸管等。

【方法】

1. 取肝素抗凝外周静脉血 0.1ml 和培养液 0.1ml 加于凹玻片孔中混匀，置湿盒于 37℃ 保温 20min，中间摇动一次，再置室温 15min。
2. 取一滴混悬液于载玻片一端推成薄片，空气中快速干燥。
3. 甲醇固定 1 ~ 2min。
4. 用 0.77% 沙黄 O 染液染色 5min，水洗，干后油镜下检查。

【结果】

凡中性粒细胞胞质内含有斑点状或块状的甲臆颗粒沉积者为 NBT 阳性细胞，计数 100 ~ 200 个中性粒细胞，计数 NBT 阳性百分率。

【注意事项】

1. NBT 染液应过滤，不要残留颗粒。
2. 所用器皿应洁净，避免玻璃表面杂物参加 NBT 的还原作用。
3. 单核细胞还原 NBT 的能力很强，在计算 NBT 阳性细胞时应除外。

【临床意义】

正常人参考值应在 10% 以下；全身细菌感染病人 NBT 阳性细胞在 10% 以上；病毒感染、无菌血症的局部感染或循环中无细菌产物（如内毒素）时，NBT 值正常。慢性肉芽肿等吞噬细胞功能缺陷病无 NBT 阳性细胞，故可作为诊断该病的指标。

实验4 巨噬细胞吞噬功能实验

(Macrophage phagocytic function test)

【目的】

检测巨噬细胞能否吞噬异物的试验，可通过巨噬细胞吞噬异物的数目来推测其免疫功能的强弱，是检测机体非特异性免疫功能的一种方法。

【原理】

巨噬细胞具有对异物（细菌、绵羊红细胞、鸡红细胞等）吞噬和消化功能，在机体固有免疫中发挥重要作用。

小鼠腹腔内注射淀粉肉汤溶液，可刺激小鼠产生无菌性炎症，诱导巨噬细胞的聚集，活化。3~4天后向小鼠腹腔内注入鸡红细胞悬液，30min后解剖收集腹腔巨噬细胞，染色、镜检可观察其对鸡红细胞的吞噬现象，亦可见到巨噬细胞中的鸡红细胞所发生的形态改变。通过计算吞噬百分比或吞噬指数可测定巨噬细胞的吞噬功能。

【材料】

1. 小白鼠。
2. 6% 淀粉肉汤溶液。
3. 1% 鸡红细胞悬液。
4. 缓冲液：Hanks 液。
5. 染料：美蓝。
6. 显微镜等。

【方法】

1. 3天前给小鼠腹腔注射6%淀粉肉汤1ml，诱导无菌性炎症。
2. 即日腹腔注射1%鸡RBC 1ml，30min后注射2ml Hanks液，轻揉小鼠腹部。
3. 颈椎脱臼法处死小鼠，解剖小鼠暴露腹腔，于腹腔靠上部位，用镊子轻轻夹起腹膜，将腹膜剪一小口，用尖吸管尽可能多地冲洗出小鼠腹腔的吞噬细胞。
4. 收集腹腔液，置一洁净试管内，加1~2滴1%碱性美蓝染色。
5. 用尖吸管将腹腔液吹打均匀（尽量避免产生气泡）并视腹腔液内细胞浓度多少，于载玻片上推片或涂片，自然干燥或37℃温箱干燥。
6. 油镜镜检。

【结果】

用油镜观察，分别计数100个巨噬细胞中吞噬鸡RBC的吞噬细胞数及100个吞噬细胞中吞噬的鸡RBC总数，并观察鸡红细胞的消化程度，按下列公式计算出吞噬百分比和吞噬指数，并判断巨噬细胞的消化程度：

$$\text{吞噬百分率} = \frac{\text{吞噬鸡 RBC 的巨噬细胞数}}{100 \text{ 个巨噬细胞}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{100 \text{ 个巨噬细胞吞噬鸡 RBC 总数}}{100 \text{ 个巨噬细胞}}$$

鸡红细胞的被消化程度分为4级：

I 级：未消化，胞核浅红或浅黄带绿色，胞核浅紫红色。

II 级：轻度消化，胞核浅黄绿色，核固缩，成紫蓝色。

III 级：重度消化，胞核淡染，胞核呈浅灰黄色。

IV 级：完全消化，巨噬细胞内只见形状类似鸡红细胞大小的空泡，边缘整齐，胞核隐约可见。

【注意事项】

1. 充分揉搓腹腔，尽可能将吞噬细胞冲洗下来。
2. 用尖吸管吸取腹腔液时，尽量避开腹腔脏器，避免损伤血管引起出血，影响实验结果。

【思考题】

1. 哪些细胞具有吞噬作用？有何区别？
2. 小鼠体内如何形成吞噬细胞？
3. 观察到小鼠体内吞噬细胞如何用免疫学理论进行解释？