

YI XUE MIAN YI XUE
WEI SHENG WU XUE
SHI YAN YU JI TI

高等医药院校教材

医学免疫学·微生物学实验与习题

·朱道银 胡继鹰 主编
·武汉大学出版社



95
R392-33
7
2

高等医药院校教材

医学免疫学·微生物学实验与习题

主 编:朱道银 胡继鹰
副主编:刘毅华 孙汶生 夏忠弟
武延隼 张育华 邵嘉会
编 委:(以姓氏笔画为序)
曲 迅 刘琥琥 陈淑珍
陈德峰 杨淑文 杨致邦
夏佩莹 潘克英

X453/15



武汉大学出版社



C

163883

(鄂)新登字 09 号

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学·微生物学实验与习题/朱道银,胡继鹰主编

——武汉:武汉大学出版社,1994.6

ISBN 7-307-01763-6

I 医…

II ①朱… ②胡…

III ①医学免疫学—实验 ②医学免疫学—习题

③医学微生物学—实验 ④医学微生物学—习题

IV R392 R37

武汉大学出版社出版发行

(430072 武昌 珞珈山)

湖北省供销社学校印刷厂印刷

1994年6月第1版 1994年6月第1次印刷

开本:787×1092毫米 1/32 印张:11.375

字数:278千字 印数:1-7000

ISBN 7-307-01763-6/R·30 定价:7.80元

前 言

医学免疫学和医学微生物学是医科学的两门重要基础课程,根据国家教委颁布的“课程基本要求(本科)”,这两门课的实验教学应占其总学时的35~40%,因此,搞好实验课的教学是保证整体教学水平,提高教学质量的重要方面。为了完善这两门课的实验教材建设,规范实验教学的内容,我们14所院校经过协商,联合编写了这本书。

本书分为上下两篇,上篇为实验部分,根据各校教学情况共编写了38个实验项目。其以“实用性、科学性、先进性”为原则,详细介绍了实验的目的、原理、用品、方法及结果分析。其中某些实验,还对需注意的问题如影响实验结果的因素及安全防护等作了提示。下篇为习题部分,是为配合这两门课的理论课学习而编的。本部分参考卫生部推荐教材郑武飞主编的《医学免疫学》(人民卫生出版社,1989)和陆德源主编的《医学微生物学》(第三版)(人民卫生出版社,1989)以及近年出版的有关教材,共编排了790余道多选题和70余道论述题,除供学生复习或自修外,也可供教师命题参考。本书之所以将免疫学和微生物学两门课的内容编在一起,主要是由于参编本书的大多数院校这两门课目前仍由同一教研室承担,便于教学安排。将实验与习题编在一起,旨在使理论与实践相结合,利于学生的“三基”培养。实验是验证理论,培养学生基本技能的手段,习题练习则是高效率地巩固和掌握基本理论和基本知识的方法。实验和习题合编为一本书,可增加本书的实用性,有利于提高教学效果。

本书由全国14所院校参加编写,即山东医科大学(孙汶生、张利宁)、广东医学院(刘琥琥)、广西中医学院(陈德峰)、天津医科大学(刘毅华、李建英)、长治医学院(武廷勇)、齐齐哈尔医学院(王惠艳)、牡丹江医学院(杨淑文、李鹰)、泸州医学院(张育华)、青海医学院(邵嘉会、刘彦平)、蚌埠医学院(夏佩莹、胡钟源)、泰山医学院(曲迅、于爱莲、郭居新)、重庆医科大学(朱道银、杨致邦、秦思栋、田一玲、杨晓燕、杨春)、湖南医科大学(陈淑珍、夏忠弟)、湖北中医学院(胡继鹰、潘克英)(以校名第一笔划为序)。书稿完成后,先由朱道银、胡继鹰、刘毅华、孙汶生、武廷勇、夏忠弟、夏佩莹、张育华等8位老师作初审,最后由朱道银、胡继鹰终审定稿。其间书稿的组织事务、技术整理及制图工作主要由胡继鹰完成。

在本书的编写过程中,始终得到了全国许多同仁的热情支持,尤其是上海第二医科大学陆德源、童善庆教授在百忙中对编写大纲提出了非常宝贵的修改意见,蚌埠医学院黄谷良教授、泸州医学院林美淳教授,也多次来信来函,对本书的编写表示关心和支持并提出建议。此外本书的出版也得益于武汉大学出版社及所有参编院校教务部门的协助和支持,为此我们一并表示衷心感谢。

编写本书,本意是想通过校际间的交流、协作来规范医学免疫学和医学微生物学实验课的教学内容,提高实验教学水平,但由于我们的学术水平有限,加上编写时间仓促,很难如愿以偿。尤其是实验内容,由于各校条件有别,专业要求不同,在编写中难免会顾此失彼,为此特表示歉意并恳请各位同仁在使用中予以斧正。

朱道银 胡继鹰

1994年4月于武昌

目 录

上篇 实验部分

实验规则	1
实验一 免疫血清的制备	2
实验二 凝集反应	5
实验三 沉淀反应	10
实验四 补体结合试验	14
实验五 白细胞的吞噬及溶菌酶试验	19
实验六 巨噬细胞(白细胞)移动抑制试验	21
实验七 淋巴细胞转化试验	22
实验八 玫瑰花环形成试验	24
实验九 变态反应试验	27
实验十 免疫标记技术	28
实验十一 显微镜的结构与使用	32
实验十二 细菌的形态结构观察	35
实验十三 基础培养基的制备	39
实验十四 细菌的分离与培养	41
实验十五 细菌代谢产物的观察	45
实验十六 自然界与人体的细菌检查	49
实验十七 消毒灭菌法	50
实验十八 细菌的药物敏感性试验	53
实验十九 噬菌体分离鉴定与特异性溶菌试验	55
实验二十 细菌的变异性试验	57
实验二十一 细菌的动物感染与动物的细菌检查	59
实验二十二 细菌的致病性试验	61
实验二十三 病原性球菌的检查	64
实验二十四 肠道杆菌及弧菌的检查	67
实验二十五 幽门螺杆菌的检查	72
实验二十六 厌氧性细菌的检查及厌氧培养	75
实验二十七 白喉杆菌的检查	77
实验二十八 结核分枝杆菌的检查	80
实验二十九 支原体、衣原体、立克次氏体的检查	81
实验三十 螺旋体的检查	83
实验三十一 病原性真菌和放线菌的检查	85
实验三十二 病毒的形态结构观察	88

实验三十三 病毒的培养方法	90
实验三十四 病毒的血凝、血凝抑制试验及中和试验	94
实验三十五 流感病毒的分离与鉴定	98
实验三十六 乙肝病毒 HBsAg 和 HBeAg 的检测	99
实验三十七 药物的微生物学检查	101
实验三十八 水的卫生细菌学检验	104

下篇 习题部分

习题体例及说明	107
第一章 医学免疫学基础	111
第二章 细菌学总论	133
第三章 细菌学各论	142
第四章 真菌及其它原核生物	155
第五章 病毒学	160
多选题参考答案	168
英汉免疫学与微生物学基本词汇	171
药品试剂配方索引	175
主要参考文献	176

上篇 实验部分

实验规则

实验是验证理论,对学生进行基本技能训练和培养科学研究能力的手段,为保证实验效果,同时避免病原微生物的实验室内传染,保障实验操作者的安全,特制定如下规则。

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的指定位置。

三、进入实验室应穿白大褂,离室时脱下反叠带走。在实验室内应保持安静,遵守秩序,不得高声谈笑,随便走动或拆卸仪器、搬弄标本。

四、实验室内严禁吸烟,进食,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、如遇不慎而打破菌种管或使有菌材料污染皮肤、衣物、桌面等情况,应立即报告指导教师,切勿隐瞒或自行处理。

六、实验中所被污染过的器材、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,节约试剂材料,不得将实验室任何物品私自带走。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)应放入或倒入指定的地方和容器内。每一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,应用消毒液(2%来苏尔)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。如是借用的物品和仪器要及时归还。

(胡继虞 朱道银)

实验一 免疫血清的制备

【实验目的】

1. 熟悉伤寒免疫血清的制备原理、方法及效价判定。
2. 了解溶血素、兔抗人全血清的制备程序。
3. 了解家兔的采血方法。

【实验用品】

1. 材料及实验动物:伤寒杆菌 901 标准株菌种、绵羊红细胞、人血清、家兔。
2. 药品试剂:0.4%甲醛生理盐水、生理盐水、碘酒、酒精棉球、弗氏完全佐剂和不完全佐剂、石炭酸。
3. 器具:恒温箱、水浴箱、平皿、柯氏瓶、小试管、吸管、注射器及针头。

【内容和方法】

一、伤寒免疫血清的制备

1. 原理

伤寒杆菌有 O 和 H 两种常用于临床诊断和实验室分型鉴定的抗原。O 抗原为细胞壁脂多糖,是性质稳定的菌体抗原,耐热。H 抗原属鞭毛蛋白质,不稳定,经甲醛固定后可成为遮盖菌体成分的表面抗原。利用上述特性制备的伤寒 O 和 H 抗原,免疫动物后,可获得抗 O 和抗 H 的抗血清。

2. 方法

(1)H 抗原和 O 抗原的制备:①将伤寒杆菌标准 901 菌株划线接种于普通平板上(方法见实验十四),置 37℃ 温箱培养 24 小时后挑选光滑型菌落接种于柯氏培养瓶中再以 37℃ 增菌培养 24 小时。

②制备 H 抗原:用 0.4% 甲醛生理盐水冲洗刮下增菌培养后的菌苔,移入三角烧瓶,置 4℃ 冰箱中 3~5 天固定杀菌。经培养检验无活菌后用生理盐水对照 MC Farland 比浊管将其稀释成 5~10 亿/ml 的 H 抗原悬液。比浊方法见表 1-1。

表 1-1 MC Farland 标准比浊管组成及相关菌数表

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

③制备 O 抗原:用生理盐水冲洗增菌培养后的菌苔,经 100℃ 水浴 2 小时杀菌,检验无菌生长后再用生理盐水按上法稀释成 5~10 亿/ml 的 O 抗原悬液。

以上抗原液不用时需放 4℃ 冰箱保存。

(2)免疫动物

选择 2~2.5 公斤重的健康家兔 4 只,分成两组,每组 2 只,按表 1-2 程序分别用伤寒 H 和

O 抗原进行免疫注射。

表 1-2 伤寒 H 抗原和 O 抗原免疫程序

免疫日程(天)	1	5	10	15
兔耳静脉注射量(ml)	0.5	1.0	2.0	3.0

(3) 试血

免疫动物后 21 天试血。即从兔耳静脉取血 2~3ml(抽血时可用二甲苯棉球擦拭血管处,待血管充分扩张后再插入注射器),于试管内分离血清,将血清与伤寒菌做一试管凝集反应(方法见实验二)。若效价达到 1:320 以上,即可收获血清。

(4) 免疫血清收获

收获免疫血清可采用家兔心脏采血或颈动脉放血。心脏采血时先将兔固定好,用拇指在其第 3 和第 4 肋骨间触到跳动最强烈的部位,以碘酒和酒精依次消毒后将注射针头刺入心脏。如果插入部位准确,可感觉针尖搏动,稍抽针筒,血液即流出。如不见血液流出,可调节针头深度或方向再行刺入。2 公斤以上家兔每 2~3 周可采血 10~20ml。

颈动脉采血时需首先将兔固定于解剖台上,用乙醚麻醉,再剪去颈部毛,用碘酒、酒精消毒后沿正中线切开颈部皮肤 4~5cm,分离皮下组织,找出颈动脉并仔细将颈动脉与迷走神经剥离开,结扎动脉上部,下端用止血钳夹住,在正中央剪一小口并对准试管口,然后放开止血钳,使血液喷流入试管中。

用上法采到的血液,待凝固后吸出血清,经 2000r/min 离心 20 分钟,除去沉淀的红细胞。置 56℃ 水浴中 30 分钟灭活,加 0.1% 叠氮钠防腐,分装小瓶密封,冰箱保存备用。

二、兔抗绵羊红细胞血清的制备

1. 原理

绵羊红细胞免疫家兔后可产生抗绵羊红细胞的抗体,这种抗体能与绵羊红细胞结合并产生凝集,在有补体参与时,能使红细胞溶解,因此该抗体也称溶血素。用绵羊红细胞免疫家兔,可从其血清中获取溶血素。

2. 方法

(1) 以无菌操作法从绵羊颈静脉取血,将血注入带有玻璃珠的无菌瓶中,振荡数分钟脱纤维抗凝,然后一次取该血 5ml,用生理盐水洗涤 3 遍,每次洗完以 1500r/min 离心 10 分钟去清液。

(2) 洗完后用生理盐水配成 20% 绵羊红细胞生理盐水悬液,置 4℃ 冰箱保存备用,注意切勿使之溶血。

(3) 选择健康家兔,按表 1-3 进行免疫注射。

表 1-3 绵羊红细胞免疫家兔程序

日期(天)	1	3	5	7	9	12	15
剂量(ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	2.0	2.0
途径	皮下	皮下	皮下	皮下	皮下	耳静脉	耳静脉

(4)于免疫注射后的第 20 天试血,若溶血素效价达 1 : 2000 以上时,即可收获血清(溶血素效价测定见实验四,血清收获方法同上述伤寒免疫血清)。收获的血清需加 0.1%叠氮钠防腐,4℃冰箱保存。

三、兔抗人全血清制备

1. 原理

以人血清为抗原,免疫家兔,可获得抗正常人血清蛋白的抗体。这种免疫血清在获得时为高效价需与抗原一起注入增加免疫原性的佐剂,并采用多次、多点注射方法。由此获得的全血清抗体,常用于测定免疫球蛋白的种类和纯度。

2. 方法

(1)配制佐剂:称取羊毛脂 8g,量石蜡油 57ml,置 160~170℃干烤箱内灭菌后用无菌研钵研磨均匀,置 4℃冰箱过夜,观察是否分层,如次日仍均匀粘稠,即成为弗氏不完全佐剂。将其再放入无菌研钵,在无菌条件下一边研磨,一边加入卡介苗,以 10ml 弗氏不完全佐剂计,应加卡介苗 150mg。研磨时按一个方向均匀进行,磨毕置冰箱过夜,如不分层即可使用,此为弗氏完全佐剂。

(2)抽取人静脉血 2ml,置清洁试管内分离血清,然后将各份血清混合(最好 30 份以上,以求抗原完备),低温冰冻保存。

(3)取上述血清 2.5ml,逐渐研磨加入弗氏完全佐剂 2.5ml,依一个方向研磨成油乳状即为抗原-弗氏完全佐剂。

(4)再取血清 2.5ml,逐滴加入弗氏不完全佐剂 2.5ml,以上述方法磨匀成油乳状,制成抗原-弗氏不完全佐剂。

(5)以抗原-弗氏完全佐剂和抗原-弗氏不完全佐剂和混合血清分四次免疫家兔,每次间隔一周。每次于皮下注射 5~7 个皮下点,用量 5ml,具体见表 1-4。

表 1-4 兔抗人免疫注射程序表

次 数	1	2	3	4
剂量(ml)	5	5	5	5
成 分	抗原-弗氏完全佐剂	抗原-弗氏不完全佐剂	混合血清	混合血清
部 位	背部皮下	背部皮下	背部皮下	背部皮下

3. 效价滴定及血清保存

(1)试血:于家兔耳静脉取血 1~2ml,分离血清,用双向琼脂扩散法滴定效价并用免疫电泳法检测抗血清谱系(方法见实验三)。如效价在 1 : 16 以上,谱系完全时即可放血收血清。

(2)免疫血清收获及保存:放血可采用心脏采血法,分离血清后以 0.1%叠氮钠防腐,分装小瓶低温冰冻保存备用。

【实验报告与思考题】

- 1. 免疫血清制备的原理是什么? 如何获得高效价的免疫血清?
- 2. 制备伤寒 H 抗原为什么要用甲醛生理盐水,而制备 O 抗原要用普通生理盐水并加热?

(王惠艳 胡继鹰)

实验二 凝集反应

【实验目的】

1. 了解凝集反应的原理、基本类型及其用途。
2. 熟悉玻片凝集试验、试管凝集试验、间接凝集试验的实验方法和结果分析。

【实验用品】

1. 材料试剂：伤寒杆菌、大肠杆菌 18~24 小时琼脂斜面培养物、伤寒杆菌 H 血清、伤寒杆菌 H 菌液、待测孕妇尿液、HCG 阳性孕妇尿液、1:10 稀释伤寒杆菌诊断血清、ABO 血型标准血清、类风湿免疫诊断试剂(用变性 IgG 致敏的乳胶颗粒)、HCG 致敏乳胶试剂、兔抗 HCG 诊断血清、待检血清、生理盐水。

2. 器具：洁净载玻片、巴氏吸管、乳胶皮头、接种环、酒精灯、特种铅笔(或记号笔)、小试管、牙签、采血针、75%酒精棉球、无菌干棉球、试管架、1ml、5ml 刻度吸管、37℃ 恒温箱(或 37℃/56℃ 水浴箱)、显微镜。

【内容和方法】

一、玻片凝集试验

1. 原理

将已知的抗体直接与未知的颗粒性抗原物质(如细菌、立克次体、钩端螺旋体或红细胞等)混合,在有适当电解质存在条件下,如两者对应便发生特异性结合而形成肉眼可见的凝集物,即为阳性;如两者不对应便无凝集物出现,即为阴性。该法属定性试验,主要用于检测抗原,如 ABO 血型鉴定、菌种的鉴定和分型等。

2. 方法

(1)取载玻片一张(平置实验台上),用特种铅笔或记号笔划分为三格,并标明 1、2、3。

(2)取巴氏吸管一支,套上乳胶皮头后,吸取 1:10 稀释的伤寒杆菌诊断血清于第 1、2 格内,每格滴加 1~2 滴。另取一支巴氏吸管,吸取生理盐水 1~2 滴入第 3 格内。

(3)将接种环在酒精灯火焰上烧灼灭菌,冷却后取少许伤寒杆菌培养物与第 3 格中的生理盐水混合并涂抹成均匀悬液。然后用同法取少许伤寒杆菌培养物与第 1 格中的诊断血清混合并涂抹均匀。烧灼接种环,待冷却后取少许大肠杆菌培养物与第 2 格中的诊断血清混合并涂抹成均匀悬液。静置数分钟后观察结果。

3. 结果观察与判定

如上述混合悬液由均匀混浊状变为澄清透明,并出现大小不等的乳白色凝集块者即为阳性;如混合物仍呈均匀混浊状则为阴性。如肉眼观察不够清楚,尚可将玻片置于显微镜下用低倍镜观察。

本次实验结果第 1 格应出现大小不等的乳白色凝集物(阳性),第 2、3 格无凝集物,混合液仍呈均匀混浊状(阴性)。

4. 注意事项

(1)伤寒杆菌为肠道致病菌,在实验中务必严格无菌操作,遵守实验规则,用后的载玻片应

3. 即放入指定的容器内,接种环必须作灭菌处理。

(2)取细菌培养物时不宜过多,与诊断血清混合涂抹时,必须将细菌涂散、涂均匀,但不宜涂得太宽,以免很快干涸而影响结果观察。

二、人类 ABO 血型鉴定试验(玻片法)

1. 原理

人类 ABO 血型抗原有 A 和 B 两种,A 型血红细胞上有 A 抗原,B 型血有 B 抗原,AB 型有 A 和 B 两种抗原,而 O 型 A 和 B 两种抗原均无。据此,如分别将抗 A 和抗 B 血清与待测红细胞混合,抗 A 或/和抗 B 血清与红细胞表面上的相应抗原结合而引起红细胞凝集,据其凝集情况便可判定出受试者的血型。(见表 2-1)。

表 2-1 血型鉴定试验结果与判定

凝集 反 应 血型	诊断血清	
	抗 A	抗 B
A	+	-
B	-	+
AB	+	+
O	-	-

“+”:表示凝集,“-”:表示无凝集。

2. 方法

(1)用酒精棉球消毒无名指尖或耳垂,待酒精干后用无菌采血针刺破表皮,用吸管取血 1~2 滴加入含 1ml 生理盐水的小试管中与生理盐水混匀(约为 5%红细胞悬液)。取血后,应立即用无菌干棉球压迫针眼止血。

(2)取凹玻片或载玻片一张,用特种铅笔划分为两格,并注明 A 和 B 字样。

(3)用巴氏吸管吸取抗 A 血清一滴加在 A 格内,用另一支巴氏吸管吸取抗 B 血清一滴加在 B 格内(可用 2ml 的一次性注射器代替巴氏吸管)。

(4)另用巴氏吸管取待测 5%红细胞悬液,于 A 格和 B 格内各加一滴。然后分别用牙签将抗血清与红细胞悬液搅拌均匀(也可轻轻晃动载玻片以促其充分混匀),以加速其凝集。将玻片置于实验台上静置数分钟后在白色背景下观察凝集情况。

3. 结果观察与判定

如混合液由均匀红色混浊状逐渐变为透明,并出现大小不等的红色凝集块者,即为红细胞凝集;若混合液仍呈均匀混浊状,则表明红细胞未发生凝集。血型判定可参照表 2-1 所示。

如肉眼观察难于判定是否有凝集,可在显微镜下用低倍镜观察予以确认。

4. 注意事项

(1)试验用凹玻片或载玻片务必注明 A 和 B。

(2)所用抗 A、抗 B 血清必须是在有效期内(注意试剂包装说明的有效期限)。

(3)待检红细胞悬液不宜过稀或过浓。

(4)要及时观察结果,以防时间过长使标本干涸而影响结果观察和判定。

三、试管凝集试验

1. 原理

该法是用已知的颗粒性抗原来检测未知抗体及其相对含量,为定量测抗体的试验。方法是用生理盐水将待测血清在试管中进行连续倍比稀释,然后于各管中加入等量的已知抗原悬液,37℃过夜或56℃水浴2小时后,观察有无凝集并根据凝集情况判定血清抗体的效价。

本法主要用于某些传染病的辅助诊断及流行病学调查,如伤寒、副伤寒及布氏杆菌病的诊断等。

2. 方法

(1)取清洁小试管8支并依次置于试管架上,用特种铅笔或记号笔按顺序标明1~8号。

(2)将1ml刻度吸管套上乳胶皮头,吸取生理盐水0.9ml加至1号试管,2~8号试管各加0.5ml。

(3)用1ml刻度吸管取0.1ml抗伤寒杆菌H血清加至1号试管。

(4)用1ml吸管在1号管内连续吸吹三次,使血清与生理盐水充分混匀,然后吸取0.5ml加至2号试管,随后按上法进行倍比稀释直至7号试管,最后从7号管中吸出0.5ml混合液弃去。至此,1~7号试管的血清稀释度依次为1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640。而8号试管中只有0.5ml生理盐水,此管系阴性对照管(见图2-1)。

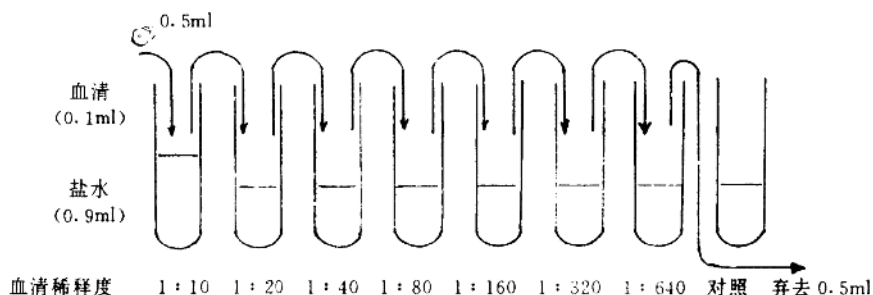


图 2-1 血清等倍稀释法示意图

(5)用5ml吸管吸取伤寒杆菌H菌液,于1~8管中各加0.5ml。此时,每支试管中的样品含量均为1ml。1~7管的血清最终稀释度则分别为1:20、1:40、1:80、1:160~1:1280。

(6)持试管架轻轻振荡摇动,以使血清与菌液混合均匀。然后置37℃恒温箱内过夜,或56℃水浴箱内保温两小时后观察结果。

3. 结果及判定效价

(1)对照管(第8管):上清液混浊,管底有沉淀的细菌,如斜置试管可见其流动,若轻轻振荡便分散呈混浊状。

(2)试验管:按1→7号管依次观察。阳性者管底有不规则状凝集物,较松散,如轻微振荡试管即可悬浮起来,形似棉絮状,但易碎散。阴性者则与对照管(第8管)相同。

(3)凝集程度的判别与记录。

卅:表示细菌全部凝集。试管底部有大量凝集物,上清液澄清透明。

卅:表示绝大部分细菌凝集,凝集物较多或与卅者相当,上清液澄清。

++:表示有部分(约 50%)细菌发生凝集,凝集物较前两者少,但仍明显,上清液基本澄清。

+:凝集物很少,需仔细观察才能发现,上清液基本上混浊。

-:表示无凝集。与阴性对照管相同。

(4)判定凝集效价(滴度):以凝集物明显可见,且血清稀释度又最高的那一号试管的血清最终稀释度为血清效价。

4. 注意事项

(1)实验操作应认真仔细,如向试管内插放吸管宜轻,以免戳穿试管底;取或加样应准确;稀释血清时应仔细的逐管进行,以防跳管。

(2)观察结果时,最好不要振摇试管,以免将凝集物摇散振碎而影响他人观察。

四、间接凝集试验

1. 原理

本试验是将已知的可溶性抗原吸附或偶联在与免疫无关、有一定大小的颗粒性物质(载体颗粒)表面上,然后再与相应抗体混合,并在有适当电解质存在条件下,由抗原抗体的特异性结合而发生肉眼可见的载体颗粒凝集。该试验可用于细菌、病毒、钩体、梅毒螺旋体抗体,以及某些自身抗体(如抗核抗体、抗肾抗体、抗甲状腺抗体等)的检测。

可用作载体的物质有红细胞(如 Rh⁺、O 型红细胞、绵羊红细胞、兔红细胞等)、聚苯乙烯乳胶颗粒、活性炭以及硅胶铝颗粒等。若所用载体为红细胞,即称间接血凝试验,如载体为乳胶颗粒,则叫间接乳胶凝集试验(见后述)。

2. 方法(类风湿因子测定)

(1)用生理盐水将待测血清稀释成 1:20。

(2)用巴氏吸管吸取 1:20 的待测病人血清一滴滴在载玻片上,然后加一滴类风湿免疫诊断试剂。

(3)持玻片轻轻晃动使之充分混匀。5 分钟内出现均匀的乳白色凝集颗粒者为阳性,无凝集者即为阴性。

3. 注意事项

应在 5 分钟内观察结果。因放置过久可出现假阳性。

五、间接乳胶凝集抑制试验

1. 原理

将待测样品与已知抗体混合并作用一定时间后,再将其与相应抗原致敏的乳胶颗粒混合。如待测样品中含有相应抗原,便可与加入的抗体结合。当再加入致敏乳胶颗粒后,就没有相应的抗体与乳胶颗粒表面的抗原结合而发生凝集,这就是乳胶凝集抑制试验(如图 2-2)。所以,

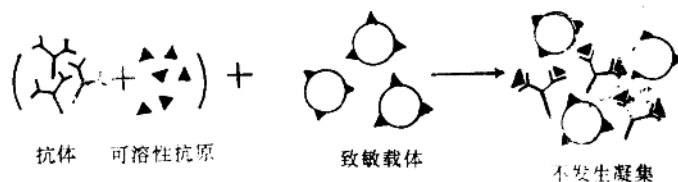


图 2-2 间接凝集抑制试验

不发生凝集者为阳性,表明待测样品中含有相应抗原;发生凝集者为阴性,提示待测样品中无相应抗原。

本法主要用于检测抗原。如乳胶妊娠试验,就是先将待测孕妇尿液(含有人绒毛膜促性腺激素,HCG)与已知抗 HCG 作用,从而抑制了抗 HCG 与致敏乳胶颗粒表面上的 HCG 结合,于是乳胶凝集被抑制。

2. 方法(参见表 2-2)

(1)取凹玻片一张置实验台上,用特种铅笔将之划分为三格,并注明甲、乙、丙。

(2)用巴氏吸管取生理盐水一滴加至乙格中,然后取待测孕妇尿一滴加在甲格中,另用一巴氏吸管取 HCG 阳性孕妇尿一滴加在丙格中。

(3)于甲、乙、丙格中各滴加一滴兔抗 HCG 血清。分别用牙签将反应液充分搅拌均匀,静置 30 秒至 1 分钟。

(4)于甲、乙、丙格中各滴加一滴 HCG 致敏乳胶试剂,分别用牙签搅拌混匀。静置 10 分钟左右后观察结果。

表 2-2 乳胶妊娠试验程序

	甲	乙	丙
	待测尿	生理盐水	HCG 阳性尿
	抗 HCG	抗 HCG	抗 HCG
	致敏乳胶	致敏乳胶	致敏乳胶
结果	+或—	+	—

3. 注意事项

(1)所用诊断试剂必须是在有效期内。用前应充分摇匀。

(2)搅拌反应液的牙签不能共用。

(3)加样不宜过多;玻片应平置,以防两格之反应液溢流相混。

【实验报告与思考题】

1. 记录玻片凝集试验的材料、方法、结果(最好用文字加图示),试予以讨论。
2. 记录血型鉴定试验的材料、方法与结果。
3. 记录试管凝集试验的材料、方法、结果及测定效价(可用表格方式表示)。
4. 记录类风湿因子乳胶凝集试验的材料、方法和结果。试对结果作讨论分析。
5. 记录乳胶妊娠试验的材料、方法和结果及判定。试对结果予以分析讨论。
6. 玻片凝集试验与试管凝集试验有何区别?直接凝集试验与间接凝集试验有何不同?

(秦思栋 杨晓燕)

实验三 沉淀反应

【实验目的】

1. 掌握琼脂单向扩散、双向扩散的基本原理、方法、结果分析及临床用途。
2. 熟悉免疫电泳的基本原理、方法。
3. 了解火箭免疫电泳的基本原理和方法。

【实验用品】

1. 材料、试剂:1.5%盐水琼脂、人 Ig(IgG、IgA、IgM)抗血清、标准参考血清;待检血清或唾液、AFP 免疫血清、脐带血清、兔抗人血清、1%琼脂糖、0.05mol/L pH8.6 巴比妥缓冲液。
2. 器具:恒温水浴锅、温箱、三角烧杯、吸管、琼脂板(塑料)、微量加液器、打孔器(直径 3mm)、座标纸、标尺、铅笔、电泳仪、聚丙烯塑料条、注射器及针头。

【内容和方法】

一、琼脂扩散试验

1. 单向扩散

(1)原理:单向扩散系定量试验,通常以已知抗体测定未知抗原。试验中首先将一定的抗血清(抗体)混合于琼脂内,制成含抗体的琼脂板,再于琼脂板上打孔,将一定量的抗原加入孔中。抗体与琼脂混合后,不会再扩散,只有孔中抗原向四周扩散,这样在抗原与抗体比例合适处即形成白色沉淀环,由于只有抗原扩散故称之为单向扩散。沉淀环的直径大小与抗原的浓度成正比。以不同浓度的标准抗原与固定浓度的抗血清反应后测得沉淀环的直径作为纵坐标,以抗原浓度为横坐标可绘制标准曲线,量取待检抗原的沉淀环直径,即可从标准曲线中求得其含量。该试验主要用于检测标本中的各种 Ig 含量和血清中补体成分的含量。

(2)方法:①参考血清的稀释:取冻干 Ig 参考血清 1 支,加入 0.5ml 蒸馏水溶解,用 0.01mol/L pH7.2~7.4 PBS 倍比稀释成 1:10~1:160 5 种浓度。

②免疫琼脂板的制备:将适宜浓度的人 Ig 抗血清与预先融化好的 1.5%琼脂在 56℃水浴中混匀,每板内灌注 3.3ml,制成免疫琼脂板(IgG、IgA、IgM),并作好标记。然后用直径 3mm 的打孔器在琼脂板上打孔,每孔间距为 1.5cm。孔内琼脂用注射器针头挑出。

③加样:用微量移液器取 10μl 各种不同浓度的参考血清准确加入免疫板的孔内,每一浓度均加两个孔,然后用上述加样方法,取 10μl 适宜稀释度的待检血清,加入免疫反应板的孔内。

④反应:将加样的琼脂板置湿盒内,于 37℃条件下反应 24~48 小时后,取出反应板,用标尺测其沉淀环直径并记录。

⑤标准曲线的绘制:以各浓度标准抗原的沉淀环直径为纵坐标,相应孔中抗原 Ig 浓度含量为横坐标,在座标纸上绘制标准曲线(见图 3-1)。

⑥待检标本 Ig(IgG、IgA、IgM)含量的计算:以待检标本的沉淀环直径查标准曲线,将查得的 Ig 含量乘其稀释倍数,即得该标本 Ig 含量。

⑦几种试剂的配制:1.5%的琼脂:称取 1.5g 琼脂,用含 0.01%柳硫汞的生理盐水 100ml

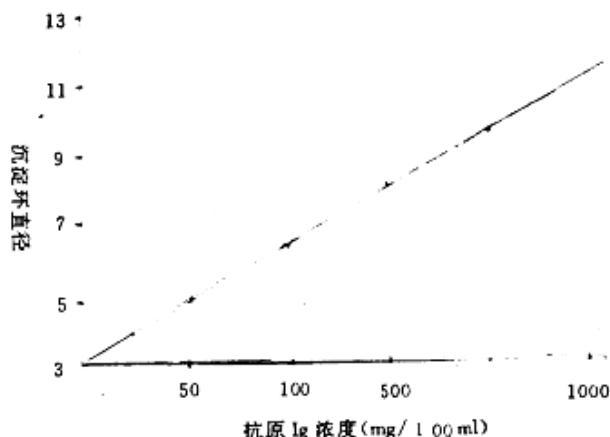


图 3-1 琼脂单向扩散试验的标准曲线图

溶解,加热使之呈液体状。0.01mol/L pH7.2 PBS 的配制:先配制 0.2mol/L Na_2HPO_4 及 NaH_2PO_4 溶液,取 72ml 0.2mol/L Na_2HPO_4 与 28ml 0.2mol/L NaH_2PO_4 混合,然后用 0.85% NaCl 溶液稀释 20 倍即成。

(3)注意事项:①制备琼脂板时温度不宜过高使抗体变性失活,亦不宜太低,以免使琼脂凝固不匀。

②沉淀环的直径以 mm 为单位测量。

2. 双向扩散

(1)原理:双向扩散为定性试验。将可溶性抗原与相应抗体分别加入琼脂板上相对应的孔内,两者相互扩散,在比例适宜处形成沉淀线。如抗原与抗体无关则无沉淀线出现。此实验可用于检测抗原或抗体的纯度,亦可用已知的抗原(抗体)来测未知的抗体(抗原)。临床上常用于检测甲胎球蛋白(AFP),作为原发性肝癌等的辅助诊断。

(2)方法:①琼脂反应板的制备:取融化好的 1%盐水琼脂 3.3ml,置琼脂板内,待冷即制成琼脂反应板。

②打孔:用打孔器在琼脂板上打孔,孔距 6mm,呈梅花形排列,即中间 1 孔,周围 6 孔,将孔内琼脂用针头挑出。

③加样:用微量加样器取 10 μ l AFP 免疫血清加入中央孔内,上下孔各加 10 μ l 脐带血清作为阳性对照。其余孔加等量的待检血清。

④反应:将加好样的琼脂反应板置湿盒内,于 37℃温箱内反应 24 小时。

⑤结果分析:待检标本如出现沉淀线,且与阳性对照的沉淀线吻合,则为阳性反应。如无沉淀线出现或是与阳性对照沉淀线交叉的沉淀线则为阴性(图 3-2)。

(3)注意事项:①加样时,注意不要将琼脂划破,以免影响沉淀线的形状。

②反应时间要适宜。时间过长,沉淀线可解离至假阴性。时间过短,则沉淀线不出现。

③加样时抗体、阳性血清及待检标本应各用一支加样器,以免混淆,影响实验结果。

二、免疫电泳

1. 原理

免疫电泳是免疫扩散与电泳相结合的免疫学分析技术,具有极高的分辨力。主要用于抗原