

高等医药院校

医学免疫学与微生物学 实验教程

李明远 主编

-33

四川科学技术出版社

98
R392-33
12
2

高等医药院校

医学免疫学与微生物学 实验教程

主编 李明远

编委 蔡美英 贾文祥 任德莲 杨晓红

XH153/14



四川科学技术出版社

1998. 成都



3 0004 4260 2

高等医药院校

医学免疫学与微生物学实验教程

主 编 李明远
责任编辑 林思聪
封面设计 向际纯
版面设计 康永光
责任校对 缪栋凯 王初阳 郑 尧
责任出版 邓一羽
出版发行 四川科学技术出版社
成都盐道街3号 邮编 610012
开 本 787×1092 毫米 1/16
印 张 10 字数 250 千
刷 铁道部第二工程局印刷厂
版 次 1998 年 1 月成都第一版
印 次 1998 年 1 月第一次印刷
印 数 1—6000 册
定 价 11.00 元

ISBN 7-5364-3696-3/R·801

■ 版权所有·翻印必究 ■

■ 本书如有缺损、破页、装订错误,请寄回印刷厂调换。

■ 如需购本书,请与本社邮购组联系。
地址/成都盐道街3号
邮编/610012

编写说明

随着医学免疫学与微生物学的发展,新实验技术不断涌现。为适应学科的发展,满足教学的需要,培养学生理论联系实际,利于学生独立思考、独立操作和提高实验课教学质量,我们在查阅国内外有关资料,参考兄弟院校有关的实验教程,总结并吸收近年来实验课教学经验的基础上,结合本学科的特点,编写了这本《医学免疫学与微生物学实验教程》。

本教程根据学科的特点和发展,分为医学免疫学和微生物学两部分,共67个实验。每个实验之前,结合有关理论,编写一段概述,使学生既知其然,又知其所以然。实验中所列实验材料切实可行,方法明了具体,结果清楚准确。并在实验之后列有1~2道思考题,便于复习思考。

本教程把理论性、实用性和系统性相结合,尤其注重实用性,删除那些不开展或重复的内容,适当增加了一些成熟的新技术和新实验,力求实验的改进和更新。

本教程主要供高等医学和药学院校各专业的本科、专科学生学习使用,也可作为本学科的研究生、进修生、青年教师、师资班学员及培训技术人员的参考用书。

本教程由华西医科大学主编,参加编写的单位有泸州医学院和川北医学院。本书分别由华西医科大学微生物学教研室、华西医科大学免疫学教研室、泸州医学院微生物学与免疫学教研室和川北医学院微生物学与免疫学教研室的高年资教师承担审阅,尤其值得一提的是他们中有好些是退休的老教授,为本教程的顺利完成奠定了良好基础。

本教程是集体智慧的结晶,它浸透了编写教师辛勤劳动的汗水,凝集了师长、同事们的热情指导和帮助。还得到以上三所学校有关领导、编者所在单位以及四川科学技术出版社的大力支持,在此一并表示衷心地感谢。

如果本教程能为读者的事业有所作为,那将使我们感到无限欣慰。当然,限于我们的水平和经验,本教程虽经我们反复审阅和修改,但难免还有疏漏之处,殷切盼读者不吝惠教。

作者

1997年5月

医学免疫学与微生物学实验的目的和要求

医学免疫学与微生物学实验课,是医学免疫学与微生物学课程的重要组成部分。学习本实验课的目的:

(一)在系统学习医学免疫学与微生物学理论知识的基础上,使学生加深理解,并验证和巩固其理论知识,学习和掌握本课程的基本操作技术。

(二)培养学生观察、思考和分析问题的能力;独立学习和独立工作的能力,以及严格的科学作风,严肃的科学态度和严密的工作方法。

(三)为临床疾病(尤其是传染病)的预防、诊断和治疗打下良好的基础。

(四)让学生了解一些医学免疫学与微生物学的科学研究方法和基本技术。

(五)培养学生树立相互帮助和团结协作的精神。

为了达到上述目的,提高实验课效果,特提出下列要求:

(一)严格遵守实验室规则,树立无菌观点,掌握无菌操作技术。

(二)实验前做好预习,明确实验目的、要求、原理、主要方法步骤和注意事项,并做好必要的准备工作。

(三)实验时要仔细认真,对较复杂的实验应分工协作,对所做过的实验要达到掌握的程度。

(四)客观地、忠实地记录实验结果,联系理论分析结果。若实验结果与理论不符合时,要加以分析讨论,找出原因,必要时还应重复实验。

(五)防止发生各种事故。

医学免疫学与微生物学实验室规则

医学免疫学与微生物学的实验对象，大都是病原微生物，有传染的危险。因此，进入实验室必须严格遵守以下规则：

- (一) 进入实验室必须先穿好隔离服，必要时还要戴上口罩。
- (二) 除必要的书籍、笔记本和文具外，其他个人物品，一律不得带入实验室。
- (三) 在实验室内，禁止饮食、吸烟、用嘴湿润标签、大声喧哗或嬉戏。
- (四) 未经老师许可，不得擅自搬动示教片、器材或其他室内设施。
- (五) 按照实验要求，积极地计划安排要进行的实验，仔细认真地进行实验操作，严格遵守无菌操作规程，争取又快又准确地完成实验。
- (六) 实验用过的器材，必须放在指定地点或按要求处理，不能随便乱丢乱放。
- (七) 实验中万一发生有菌材料污染桌面或衣服、打翻菌液、割破手指等情况，应立即报告老师及时处理，切勿隐瞒或自作主张不按规定处理。
- (八) 要爱护实验室内的仪器，使用显微镜及其他贵重仪器，要按要求操作。对消耗材料、药品、试剂及水、电、气等，都要力求节约。
- (九) 实验完毕，应将实验器材放回原处，需培养的菌要放入孵箱内。清理桌面，做好室内清洁，保持室内的整齐。离开实验室前，关好门、窗、水、电、煤气，脱下隔离服，并将手洗净。
- (十) 未经许可，不得将实验室内任何物品，特别是菌种带出室外。

目 录

医学免疫学与微生物学实验目的和要求

医学免疫学与微生物学实验室规则

医学免疫学部分

实验 1	吞噬细胞的吞噬作用	1
实验 2	血清总补体测定	3
实验 3	淋巴细胞分离技术	5
实验 4	溶血空斑试验	8
实验 5	凝集反应	9
实验 6	沉淀反应	13
实验 7	补体结合试验	19
实验 8	溶血试验	22
实验 9	微量淋巴细胞毒试验	23
实验 10	循环免疫复合物的检测	24
实验 11	免疫标记和免疫荧光染色技术	25
实验 12	酶联免疫吸附试验	28
实验 13	放射免疫测定法	30
实验 14	淋巴细胞转化试验	31
实验 15	E 玫瑰花环试验	34
实验 16	白细胞移动抑制试验	35
实验 17	单克隆抗体检测 T 淋巴细胞亚群试验	37
实验 18	抗体依赖的细胞介导的细胞毒试验	39
实验 19	人体外周血中自然杀伤细胞活性检测	41
实验 20	豚鼠过敏试验	44
实验 21	肥大细胞脱颗粒试验	46

微生物学部分

实验 22	显微镜的使用和保护	48
实验 23	活菌运动的观察	50

实验 24	细菌的基本形态和特殊结构观察	51
实验 25	细菌的革兰氏染色法	52
实验 26	基础培养基的制备	54
实验 27	细菌接种法和生长情况观察	55
实验 28	细菌代谢产物的检查	57
实验 29	自然界中细菌的检查	60
实验 30	正常人体的细菌检查	61
实验 31	物理因素对细菌的影响	63
实验 32	化学因素对细菌的影响	66
实验 33	生物因素对细菌的影响	69
实验 34	细菌的形态和结构变异	72
实验 35	细菌质粒 DNA 的提取	74
实验 36	细菌的粘附试验	76
实验 37	细菌致病性酶类与毒素的检查	77
实验 38	细菌热原质的检查	80
实验 39	葡萄球菌属	81
实验 40	链球菌属	84
实验 41	变异链球菌	86
实验 42	肺炎链球菌	88
实验 43	淋病奈氏菌	90
实验 44	临床标本化脓性球菌的分离鉴定	92
实验 45	大肠埃希菌	94
实验 46	沙门菌属	95
实验 47	志贺菌属	98
实验 48	粪便标本中致病性肠道杆菌的分离和鉴定	99
实验 49	霍乱弧菌	101
实验 50	破伤风梭菌	103
实验 51	产气荚膜梭菌	104
实验 52	临床标本中厌氧菌的分离和鉴定	105
实验 53	白喉棒状杆菌	109
实验 54	结核分枝杆菌	111
实验 55	病毒的培养方法	113
实验 56	病毒的血清学试验	118
实验 57	病毒的快速诊断	120
实验 58	衣原体	123
实验 59	立克次体	124
实验 60	支原体	125

实验 61	螺旋体	127
实验 62	放线菌	132
实验 63	真菌	133
实验 64	药物的体外抗菌试验	137
实验 65	抗生素的效价测定	141
实验 66	注射用药的无菌检查法	143
实验 67	口服药品中的细菌总数测定	145

实验 1 吞噬细胞的吞噬作用 (phagocytosis of phagocytes)

吞噬细胞主要有两类：血液中的大单核细胞及由血管中游出并固定于各种组织中的巨噬细胞，与血液中的中性粒细胞。它们分别被称为大吞噬细胞和小吞噬细胞，能吞噬和消化衰老死亡细胞，以及病原微生物等异物，此作用可在特异性抗体及补体的调理下而得到加强。

一、中性粒细胞的吞噬作用及抗体的调理作用

细菌进入体内后，中性粒细胞可对其进行吞噬和消化。中性粒细胞膜表面有 IgG Fc 受体，当细菌与相应 IgG 结合后，通过 IgG Fc 段与膜上受体接合后，可加强中性粒细胞的吞噬作用，即抗体的调理作用。

〔材料〕

1. 福氏志贺菌免疫血清、正常兔血清、福氏志贺菌肉汤 24h 培养物、瑞氏 (Wright) 染色液。
2. 20g 左右小白鼠。
3. 无菌注射器、解剖用具、载玻片等。

〔方法〕

1. 取福氏志贺菌免疫血清及正常兔血清各 0.1ml，分别注射于两只小白鼠腹腔内。
2. 3h 后，将福氏志贺菌肉汤培养物注射于上述两只小白鼠腹腔中，每只 1.0ml。
3. 注射细菌后 30min 解剖小白鼠，取腹腔液涂片，瑞氏染色，油镜镜检，分别求出两只小白鼠中性粒细胞的吞噬百分率及吞噬指数。

〔结果〕

油镜下见中性粒细胞核深染且分叶，极易与其它细胞区别。随机计数 100 个中性粒细胞，分别计数吞噬有细菌的中性粒细胞数和所吞噬的细菌总数，参照如下公式，计算出吞噬百分率和吞噬指数。并比较二者的区别。

$$\text{吞噬百分率} = \frac{\text{吞有细菌的中性粒细胞数}}{100}$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{100 \text{ 个中性粒细胞中所吞噬的细菌总数}}{100}$$

二、巨噬细胞的吞噬作用

〔材料〕

1. 无菌 Hank's 液、8% 淀粉肉汤液、1% 鸡红细胞悬液与生理盐水、瑞氏染液。
2. 无菌注射器 (5ml) 和针头 (7 号), 平皿 (直径 < 9cm)、小试管、毛细吸管、解剖用具、水浴箱等。

3. 25g 左右小白鼠。

〔方法一〕

1. 实验前 3 天, 给小白鼠腹腔内注射 8% 淀粉肉汤液 1ml。
2. 实验当天, 给小白鼠腹腔注射 4ml Hank's 液, 轻揉腹部, 令其活动 10min。
3. 采用颈椎脱臼法处死小白鼠, 并仰卧固定。
4. 常规消毒皮肤, 左手持镊提起腹中部皮肤, 右手持剪刀剪一长 5mm 的小口, 从剪口处皮肤朝头尾部用力撕开皮肤, 暴露腹壁。
5. 提起其腹前壁, 避开血管剪一小口, 用毛细吸管吹吸混匀腹腔内液体, 并收集于试管内。
6. 加腹腔液 2~3 滴于一张洁净载玻片上, 用等量的 1% 鸡红细胞悬液滴于玻片上, 摇动混匀。
7. 置玻片于平皿内盖好, 37℃ 水浴 30min, 其间轻轻摇动玻片 2 次。
8. 取出后, 用生理盐水冲洗载玻片, 洗去未吸附的细胞。
9. 自然干燥, 瑞氏染色后, 油镜镜检。

〔方法二〕

1. 实验前 3 天, 给小白鼠注射无菌 8% 淀粉肉汤液 1ml。
2. 实验当天, 给小白鼠腹腔注射 Hank's 液 2ml, 轻揉腹部, 令其活动 10min。
3. 给小白鼠腹腔注射 1% 鸡红细胞悬液 1ml, 轻揉腹部, 令其活动。
4. 30min 后, 采用颈椎脱臼法处死小白鼠, 如上法解剖, 暴露腹腔。
5. 用镊子夹起部分肠管, 涂于洁净载玻片上, 制成涂片。
6. 自然干燥, 瑞氏染色后, 油镜镜检。

〔结果〕

镜下可见巨噬细胞核着色较深, 胞浆着色浅淡, 胞浆中吞有一个以上有核鸡红细胞。随机计数 100 个巨噬细胞, 分别计数吞有鸡红细胞的巨噬细胞数和所吞噬的鸡红细胞总数, 按前述公式分别计算出吞噬百分率和吞噬指数。

附: 瑞氏 (Wright) 染色法

待检标本自然干燥后, 加瑞氏染液数滴于标本涂膜上染色 1min, 再加等量蒸馏水, 与染液混匀, 继续染色 5~8min, 水洗, 干燥, 镜检。

思考题

吞噬细胞在机体抗感染中起什么作用? 如果吞噬功能丧失, 对机体有什么影响?

杨宗琪 编写
左祖英 审阅

实验2 血清总补体测定

(test of total hemolytic complement)

绵羊红细胞(抗原)被相应溶血素(抗体)致敏后,在补体参与下,即产生溶血现象。其溶血的程度与总补体活性有关,但非直线关系。以溶血百分率作纵坐标,相应的血清量作横坐标绘图,可得到典型的S型曲线(见图1)。曲线两端平坦,补体量的增减,对溶血程度影响不大,而在曲线中段(大约30%~70%溶血处)曲线斜度最陡,几乎呈一直线。当补体量稍有变动,即可对溶血程度发生很大影响。因此,以50%溶血作为终点,较以100%作为溶血终点更为敏感,用以精确检测血清中补体的含量,称为补体50%溶血(CH_{50})测定。

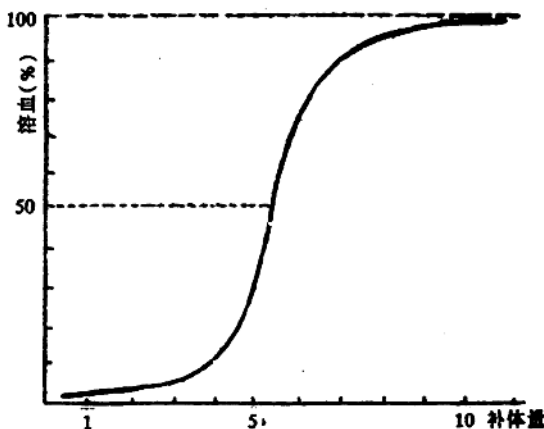


图1 溶血程度与补体含量的关系

临床上, CH_{50} 测定可用于某些变态反应性疾病的辅助诊断及其观察病情变化的指标,以及作为检测人体非特异性免疫的指标之一。标准的 CH_{50} 测定法操作和计算比较繁杂,但很精确;简化的测定法则较为简单,虽不很精确,但适用于临床,现介绍简化法。

〔材料〕

- 1.2%绵羊红细胞(SRBC)、生理盐水、蒸馏水、2U溶血素、待检血清。
- 2.1%致敏SRBC:取2U溶血素与2%SRBC等量混合,15min后,即可应用。
- 3.50%溶血标准管:2%SRBC悬液2ml,加蒸馏水8ml,使其全溶血为100%全溶血管。取全溶血管上清液0.5ml,加生理盐水0.5ml,即为50%溶血标准管。

- 4.水浴箱、小试管、试管架、1ml及2ml吸管。

〔方法〕

- 1.取洁净小试管7支,分别标记管号。
- 2.稀释血清:取待检血清0.2ml,加生理盐水1.8ml,混合即成1:10稀释,吸出0.5ml

血清放入第1管，然后将余下的1.5ml血清与等量生理盐水混合，稀释成1:20，从中吸出0.5ml放入第2管，将所余2.5ml血清与等量生理盐水混匀，即成1:40稀释血清，再按表1所列的量将1:40血清分别加于3~7管。

3. 按表1加入其余各种成分。

4. 37℃水浴箱中作用30min。

5. 离心沉淀1000rpm 5min后，与50%溶血标准管比较，判定结果。

表1 CH₅₀测定操作程序 (单位: ml)

试管号	稀释血清			生理 盐水	1%致敏 SRBC			结果 (单位)
	1:10	1:20	1:40					
1	0.5	-	-	0.1	0.4	37℃	与 50% 溶 血 标 准 管 比 较	20
2	-	0.5	-	0.1	0.4	水		40
3	-	-	0.5	0.1	0.4	浴		80
4	-	-	0.4	0.2	0.4	30		100
5	-	-	0.3	0.3	0.4	min		133
6	-	-	0.25	0.35	0.4	1000		160
7	-	-	0.2	0.4	0.4	rpm 5 min 后		200

〔结果判定〕

用分光光度计比色或目测色泽，以最接近50%溶血标准管的那一管定为CH₅₀效价管，按下式求出1ml血清的补体单位：

$$\text{血清中补体含量 (U/ml)} = \frac{1}{\text{血清用量 (ml)}} \times \text{稀释倍数}$$

假如效价管为第3管，则血清补体含量为 $\frac{1}{0.5} \times 40 = 80\text{U/ml}$ (表1中已列出各管的相应补体含量，故不必计算，从表中可直接查得)。

正常值：80~120U/ml血清。

〔注意事项〕

1. 待检血清必须新鲜。
2. 试验管及标准管试管的口径、厚度、透明度必须一致，以免影响观察结果。

思考题

1. 总补体活性测定为什么要用CH₅₀法，而不采用CH₁₀₀法？
2. 影响CH₅₀值偏低的实验因素可能有哪些？

杨宗琪 编写
左祖英 审阅

实验3 淋巴细胞分离技术

(isolation of lymphocytes)

淋巴细胞的分离方法很多,有物理的、化学的、细胞膜标志等分离方法。本着分离方法简便、细胞的获得率、纯度和活力高的原则,这里仅介绍淋巴细胞分层液分离法和T、B细胞分离法。

一、淋巴细胞分层液分离法

外周血细胞中红细胞与多形核白细胞的比重为1.092,淋巴细胞与单核细胞约为1.075~1.090,血小板约为1.032。市售的淋巴细胞分层液的比重为 1.077 ± 0.002 ,与淋巴细胞的比重相近,而比红细胞轻。通过离心后,不同比重的血细胞按其密度梯度分布,从而将各种细胞加以分离。

〔材料〕

1. 淋巴细胞分层液(聚蔗糖——泛影葡胺分层液),肝素(200U/ml),无 Ca^{++} 、 Mg^{++} Hank's液,2%的台盼蓝溶液。

2. 注射器、吸管、试管、离心管,血球计数板、水平离心机。

〔方法〕

1. 取抗凝血2ml(肝素20U/ml血),加Hank's液2ml对倍稀释。

2. 将上述稀释的抗凝血用毛细吸管沿管壁缓慢地加到有2ml淋巴细胞分层液的离心管中,使加入的血液重叠于分层液上,形成明显的分界面,注意不要摇动。

3. 置水平离心机2000rpm离心20min,小心取出,离心后的细胞分布如图2。

4. 用毛细吸管轻轻插入,并吸出白色云雾状的单个核细胞层,用Hank's液混匀,1500rpm离心15min,洗3次。

5. 细胞计数:将洗涤后的淋巴细胞加0.5ml含10%灭活小牛血清的Hank's液,制成细胞悬液。取0.1ml细胞悬液与2%醋酸等量混合,取一滴加入血球计数板,使其充满计数室,然后按白细胞计数法计数4个大格的细胞数。

$$\text{细胞数/ml} = \frac{4 \text{个大格细胞数}}{4} \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

6. 台盼蓝检查细胞活力:取2滴细胞悬液,加1滴台盼蓝,混匀。5min后,取样作检查,活细胞不着色,而死细胞呈蓝色,计算活细胞占细胞总数的百分率。

〔注意事项〕

1. 将稀释血加入分层液上时,一定要小心,动作要轻,切不可冲散分层液而使血液与之混合,以免影响分离效果。

2. 经此法分离的单个核细胞中,绝大部分为淋巴细胞,也有少数的单核细胞,会影响淋巴细胞的纯度,可用以下方法除去单核细胞。

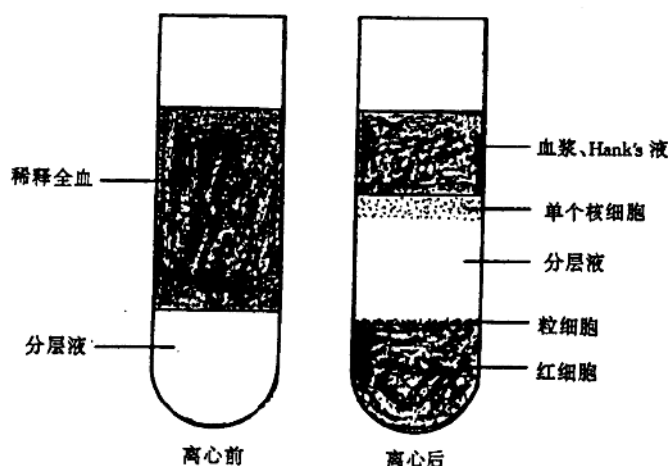


图2 血细胞在密度梯度分离前后的分布示意图

(1) 玻璃器皿吸附法：因单核细胞对玻璃具有粘附力，故将所分离的单个核细胞悬液倒入玻璃平皿中，置 37℃ 温育 30min，这时，单核细胞便粘附在玻璃平皿上。吸出未粘附的细胞悬液，便是单一的淋巴细胞。

(2) 玻璃纤维柱法：利用单核细胞容易吸附于玻璃纤维的特性，将单个核细胞悬液倒入装有玻璃纤维的柱层中，置 37℃，45min 后，用 37℃ 预温的 Hank's 液冲洗，收集洗脱的细胞，即是淋巴细胞。

二、T、B 淋巴细胞分离法

(一) T 细胞花环沉降分离法

绵羊红细胞 (SRBC) 能与人类的 T 细胞自发地形成 E 花环。经溴化二氨基异硫氢化物 (AET) 处理的 SRBC，能与 T 细胞迅速形成稳定而巨大的 E 花环 (AET-E)。用淋巴细胞分层液分离时，AET-E 花环沉于管底，在分层液界面的淋巴细胞均为 B 细胞。取沉于管底的 AET-E 花环，经低渗溶解花环周围的 SRBC，便可获得 T 细胞

〔材料〕

1. AET、SRBC、RPMI 1640 培养液，淋巴细胞分层液，Hank's 液。
2. 吸管、试管、离心管、离心机。

〔方法〕

1. AET-SRBC 制备

(1) AET 溶液：称取 AET 402mg，溶于去离子水 10ml，加 10 滴 4M 的 NaOH 溶液，调 pH 至 9.0。临用时新鲜配制。

(2) AET 处理 SRBC：取 1 份洗涤后压积 SRBC，加入 4 份新鲜配制的 pH9.0 的 AET 溶液，置 37℃ 水浴 15min，每 5min 振摇一次。取出加等渗溶液充分混匀，1800rpm 离心 5min，连续洗涤 5 次，如无溶血现象，用含小牛血清的 RPMI 1640 液再洗一次，最后配成 10% 的 AET-SRBC 悬液，置 4℃ 保存，不超过 5 天。

(3) 1% AET-SRBC 悬液：用含小牛血清的 RPMI 1640 液将 10% AET-SRBC 稀释至 1% 即成。

2. 按前法分离单个核细胞。

3. AET-E 花环试验: 将分离的单个核细胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) 与等量 1% AET-SRBC 混匀, 置 37°C 水浴 15min, 中间振摇 2 次。取出 1000rpm 离心 5min, 放 4°C 冰箱 45min。

4. T、B 细胞的分离: 将形成 AET-E 花环的细胞悬液, 再用分层液分离, 吸取界面白色云雾状的细胞层, 就是 B 细胞。取沉于管底的 AET-E 花环, 用 Hank's 液洗一次后, 加双蒸水 3ml 处理 3sec, 低渗溶解 AET-E 花环周围的 SRBC, 立即加 3.5% NaCl 溶液 1ml, 使还原为等渗液, 低速离心沉淀, 即得 T 细胞。然后再分别将 T、B 细胞计数, 配成实验所需的细胞浓度。

(二) 尼龙毛分离法

尼龙毛即聚酰胺纤维, B 淋巴细胞和单核细胞可粘附在尼龙毛表面, 而 T 细胞却不能。故利用此特性来分离 T、B 细胞。

〔材料〕

1. 尼龙毛、聚乙烯塑料软管 (直径 5~6mm, 长 16cm)、毛细吸管、滴管、离心机。

2. Hank's 液, 含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 凝血酶 (100U/ml)。

〔方法〕

1. 尼龙毛柱的制备: 将半透明聚乙烯塑料软管以烘热的老虎钳钳成一斜角 (一端为 $<30^\circ$, 另一端为 $<60^\circ$), 用加热封住塑料管的一端。称取尼龙毛 40~70mg, 仔细撕开, 使其疏松而均匀, 置于盛有 Hank's 液的平皿中浸透。用小镊子将其填塞于塑料管内, 排除气泡, 使尼龙毛柱高为 6cm, 一般可有效滤过 $20-30 \times 10^6$ 细胞数。制好后可冰冻保存, 用时取出融化。

2. 按前法分离单个核细胞。最后配成 $2-3 \times 10^7/\text{ml}$ 的细胞悬液。

3. 除去血小板: 在单个核细胞悬液中, 每毫升加入 1 滴凝血酶, 加盖来回摇动 2min, 直至明显出现肉眼可见的乳白色血小板絮状凝集块, 立即在水平离心机中 1000rpm 离心 30S, 沉淀即为血小板。取上层的淋巴细胞悬液, 1000rpm 离心 10min, 弃上清, 用含 20% 小牛血清的 RPMI1640 液回复至 0.5~1ml。细胞计数, 如细胞数超过 $5 \times 10^7/\text{ml}$, 可分两管, 每管 0.5ml, 过柱。

4. 细胞过柱: 从冰箱取出尼龙毛柱, 融化后, 从斜角封口处剪去 $\frac{1}{3}$, 斜边孔径为 2mm, 使原有管中的 Hank's 液流出, 流速调至每 8~10S 通过液体为 2ml。再用 37°C 预温的含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 液 5ml 洗柱, 洗完, 将上述细胞悬液 0.5ml 加入尼龙毛柱 (每柱可通过 $5 \times 10^7/\text{ml}$ 细胞)。平放尼龙毛柱, 以细长的滴管伸入柱内近尼龙毛的界面处, 加 0.2ml 预温的含小牛血清的 RPMI 1640 液后封口。 37°C 或 25°C 温箱平放温育 1~2h, 再用 37°C 预温的含小牛血清的 RPMI1640 液 5ml 洗柱, 洗下的悬液, 即为 T 细胞。用手捏住斜角开口处, 取室温或冷的含小牛血清 1640 液 5ml, 分次加入尼龙毛柱中, 每加一次, 以二手指轻轻挤压尼龙毛柱, 上下来回数次, 使尼龙毛柱内粘附的 B 细胞洗脱。将收集的 T、B 细胞离心压积, 计数, 调至实验所需浓度。

思考题

通过对各种淋巴细胞分离法的比较, 你认为哪些方法较好? 为什么?

左祖英 编写 杨晓红 审阅

实验 4 溶血空斑试验

(hemolysis plaque test)

溶血空斑试验,是体外检测抗体产生细胞(B细胞)的一种方法。试验的基本原理是将绵羊红细胞(SRBC)免疫过的小鼠脾脏制成细胞悬液,与一定量的SRBC混合,在补体的参与下,使抗体产生细胞周围的SRBC溶解,从而在每一个抗体产生细胞周围形成一个肉眼可见的空斑。

本试验目前主要分为两大类,即琼脂溶血空斑技术和液相单层溶血空斑技术,每一类又分为直接法和间接法两种。琼脂溶血空斑技术,是以一定浓度的琼脂为支持物,将一定浓度的SRBC和经SRBC免疫过的小鼠脾细胞悬液在45℃下混匀,倾注平皿,然后加入一定量的补体,经37℃温育后,在琼脂平皿中观察溶血空斑。

〔材料〕

1. 平皿(5.5×1.5cm)、剪刀、镊子、青霉素小瓶、水浴箱、孵箱。
2. 18~25g小鼠。
3. pH7.2的PBS(含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}):取PBS 100ml,经高压灭菌后,加入无菌10%硫酸镁溶液1ml,1%氯化钙溶液1ml,调pH至7.2。
4. SRBC悬液:按常规法洗涤SRBC,用PBS配成20%的浓度,计数后调整细胞浓度至 $2 \times 10^9/\text{ml}$ 。
5. 底层和顶层琼脂:用PBS将优质琼脂粉配成1.4%和0.7%两种浓度,溶化后将1.4%的琼脂分装中试管,每管5ml,将0.7%的琼脂分装小试管,每管1.5ml备用。
6. DEAE-右旋糖酐:分子量5万,用蒸馏水配成1%浓度备用。右旋糖酐有阻止琼脂的抗补体作用。
7. 补体:3只以上豚鼠混合血清,应用时用PBS稀释成1:30浓度(如不加DEAE-右旋糖酐,则采用原浓度或1:5浓度)。

〔方法〕

1. 免疫脾细胞的制备

(1) 免疫小白鼠:每只小白鼠经尾静脉注入 $2 \times 10^9/\text{ml}$ 的SRBC 0.2ml,或腹腔注射 $4 \times 10^8/\text{ml}$ 的SRBC 1ml。

(2) 制备脾细胞悬液:将免疫后4天的小鼠断颈处死,解剖取出脾脏,放入pH7.2含 Ca^{++} 、 Mg^{++} 的冷Hank's液中漂洗后,置青霉素小瓶中,用眼科手术剪剪碎,加入适量的Hank's液,用毛细吸管吹打,使细胞分散成悬液,静置3min,待大的组织块下沉后,取上层液至小试管中,1500rpm离心5min,弃上清后,加入3ml Hank's液,用毛细吸管吹打混匀,按白细胞计数法计算脾细胞数,最后用Hank's液调整细胞数至 $1 \times 10^7/\text{ml}$,放4℃冰箱备用。

2. 底层琼脂的制备:将每管含5ml、1.4%琼脂加热溶化后,倾倒入置水平位的平皿内,