

医学免疫学与

微生物学实验

曹英林 周亚滨 主编



科学出版社



医学免疫学 与微生物学实验

曹英林 周亚滨 主编

科学出版社

2000

内 容 简 介

本书为医学实验教材,分为四篇:免疫学、细菌学、病毒学、其他微生物学,共设实验 33 项。它以教学大纲为依据,本着科学性、先进性、实用性的原则选择实验,较系统地阐述了医学免疫学微生物学实验的基本原理、实验材料、方法、结果分析及注意事项,为医学教学中较好的辅助教材。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学与微生物学实验/曹英林,周亚滨主编.-北京:科学出版社,2000.8

ISBN 7-03-008634-1

I. 医… II. ①曹… ②周… III. ①医药学:免疫学②微生物学:医药学 IV. R392

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 61444 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

新蕾印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2000 年 8 月第 一 版 开本:850×1168 1/32

2000 年 8 月第一次印刷 印张:5 5/8

印数:1—5 100 字数:136 000

定价:9.90 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

医学免疫学与微生物学实验

(供医、卫、口、护、药学专业使用)

主 编 曹英林 周亚滨

副主编 马春红 朱文森

编 者 (以姓氏笔画为序)

马春红	王晓燕	石永玉	朱文森
齐 眉	刘星霞	刘素侠	肖 颖
宋 静	周亚滨	栾 怡	曹英林
董杰德			

主 审 孙汶生 董杰德

前 言

为适应目前教学工作的需要,我们在总结多年实验教学的基础上,组织在第一线教学的中青年教学人员,编写了这本实验讲义。

本书实验内容分为免疫学、细菌学、病毒学、其他微生物四篇,共含 33 项实验。按照教学大纲的要求,本书力求实用性、科学性和先进性,既精选传统的实验内容,又增添了部分目前能开展的较先进实用的实验技术(如细菌质粒 DNA 抽提,APAAP 桥联酶标法测定 T 细胞亚群,PCR 法检测病原微生物等)。每项实验包括实验目的、原理、材料、方法、结果分析及注意事项等条目,同时后附思考题,以供学生独立思考、加深理解。

现代医学免疫学、现代医学微生物学同分子遗传学、分子生物学、微电子计算机科学、自动化检测分析技术的有机结合,使实验技术具有高特异性、高灵敏性,使检测微量化、标准化、自动化以至智能化。但是,由于目前实验教学的要求和学时所限,有些尚不能在学生实验中开展,因此本实验讲义未将这些新的实验技术选入。

本书适用于医学本科的临床医学、预防医学、口腔医学、护理医学、卫生检验专业、药学专业和医学专科的相应专业实验教学使用,也适用于临床医学专业专升本成人实验教学之用。

在本书编写中,孙汶生教授、董杰德高级实验师对有关内容作了审阅并提出许多宝贵意见。本书所用的全部绘图,承蒙王家政老师协助,在此一并表示由衷感谢。鉴于我们学术水平有限,编写时间仓促,不当之处敬请专家和同行们不吝指正。

编 者

2000 年 4 月 20 日

目 录

第一篇 免疫学

实验一	凝集反应.....	1
实验二	沉淀反应.....	8
实验三	补体结合试验	16
实验四	溶血空斑试验	21
实验五	免疫标记技术	23
实验六	淋巴细胞分离技术	33
实验七	T 淋巴细胞膜表面 CD2 分子的检测	37
实验八	淋巴细胞转化试验	40
实验九	T 淋巴细胞亚群检测	45
实验十	白细胞介素-2 生物活性测定	49
实验十一	吞噬细胞的吞噬试验	52

第二篇 细菌学

实验十二	细菌基本形态及特殊结构观察	56
实验十三	细菌的培养与代谢产物检查	64
实验十四	细菌的分布	75
实验十五	物理因素和化学消毒剂对细菌的影响	79
实验十六	药物的体外抗菌试验	84
实验十七	药物的微生物学检查法	87
实验十八	细菌对抗菌药物的敏感试验	90
实验十九	噬菌体的噬菌作用	93
实验二十	细菌的变异性试验	95

实验二十一	细菌的致病性试验	99
实验二十二	细菌质粒 DNA 的抽提	102
实验二十三	化脓性球菌的分离鉴定	105
实验二十四	肠道致病菌的微生物学检查	110
实验二十五	厌氧菌形态观察及培养方法	116
实验二十六	结核杆菌的培养及形态观察	120
实验二十七	用 PCR 方法检测病原微生物	123

第三篇 病毒学

实验二十八	病毒的分离培养方法及其生长状况的观察	125
实验二十九	红细胞凝集试验及凝集抑制试验	138
实验三十	中和试验	141
实验三十一	红细胞吸附及红细胞吸附抑制试验	143

第四篇 其他微生物

实验三十二	支原体、衣原体、立克次体、螺旋体的形态观察及血清学试验	145
实验三十三	真菌、放线菌的培养方法与形态观察	153
附录 I	常用的细菌培养基	158
附录 II	常用细菌染色方法	164
附录 III	常用的缓冲液	168

第一篇 免 疫 学

实验一 凝集反应

颗粒性抗原(如完整的细菌和细胞)与相应抗体结合,在一定条件下可发生肉眼可见的凝集现象,称为凝集反应(agglutination)。凝集反应可分为直接凝集反应和间接凝集反应两种。本实验介绍凝集反应的原理、基本类型及其用途,要求学生熟悉玻片凝集、试管凝集的实验方法和结果分析。

一、直接凝集反应

直接凝集反应是指颗粒性抗原与相应抗体在体外直接结合而出现凝集的反应。直接凝集反应又可分为:玻片凝集和试管凝集。

(一) 玻片凝集试验(人 ABO 血型鉴定)

指用已知抗体与未知颗粒性抗原在玻片上直接结合而出现的凝集反应。可用于细菌的鉴定、分型及 ABO 血型鉴定等。

【原理】

人类 ABO 血型抗原有两种: A 抗原和 B 抗原。A 型血红细胞表面有 A 抗原, B 型血红细胞上有 B 抗原, AB 型血红细胞上有 A、B 两种抗原, O 型血红细胞上则无这两种抗原。若分别将抗 A、抗 B 血清与待检红细胞混合, 抗 A 和(或)抗 B 血清与红细胞上的相应抗原结合可引起红细胞凝集, 据凝集状况便可判定出受试者的血型。

【材料】

- (1) 标准抗 A 血清、抗 B 血清。
- (2) 玻片、无菌三棱采血针、无菌牙签、吸管、酒精棉球等。

【方法】

(1) 取洁净载玻片一张, 用特种铅笔分为两格, 并注明 A、B 字样。

(2) 用一支吸管吸取抗 A 血清一滴, 加在 A 格内; 用另一支吸管吸取抗 B 血清一滴, 加在 B 格内。

(3) 用酒精棉球消毒无名指指尖或耳垂, 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 生理盐水的试管中迅速与生理盐水混匀(约为 5% 红细胞悬液)。再立即用无菌干棉球压迫止血。

(4) 另取巴氏吸管吸取上述待测 5% 红细胞悬液, 于 A 格、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, 以加速其凝集。

(5) 将玻片静置于实验台上数分钟后, 在白色背景下观察凝集情况。

【结果】

如果混合液由红色均匀混浊逐渐变为透明, 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, 则表明红细胞未发生凝集。血型判定参照表 1-1。

表 1-1 ABO 血型鉴定试验结果与判定

血 型 抗血清	A	B	AB	O
抗 A 血清	+	-	+	-
抗 B 血清	-	+	+	-

+: 表示凝集; -: 表示无凝集。

【注意事项】

- (1) 载玻片务必标明 A、B。
- (2) 所用抗血清必须是在有效期内。取两种抗血清的吸管不可混用。
- (3) 混匀抗血清与红细胞时, 牙签不可混用。
- (4) 及时观察结果, 以免干涸。

(二) 试管凝集试验

【原理】

用已知的定量抗原悬液与系列稀释的待检血清在试管内混合, 经一定时间静置保温后, 观察各管凝集程度。常用于定量测定血清中的抗体水平。

【材料】

- (1) 伤寒菌液(7 亿个/ml)。
- (2) 伤寒“H”免疫血清。

【方法】

- (1) 取试管 6 支, 标记好试管顺序。
- (2) 于第 1 管内加生理盐水 0.9ml, 其余各管加生理盐水 0.5ml。

(3) 取伤寒“H”免疫血清 0.1ml 加入第 1 管吹吸三次混匀后, 取出 0.5ml 加入第 2 管, 同样吹吸三次混匀后, 取出 0.5ml 加入第 3 管, 如此稀释至第 5 管, 由第 5 管中取出 0.5ml 弃之, 第 6 管不加血清, 作阳性对照, 见表 1-2。至此, 第 1~5 管中的血清稀

释度依次为 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160。

表 1-2 试管凝集加样顺序 (单位:ml)

试 管 号	1	2	3	4	5	6
生理盐水	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
伤寒免疫血清	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	弃 0.5
伤寒菌液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最终稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	对照

(4) 各管加入伤寒菌液各 0.5ml(这时血清稀释度加倍)。

(5) 摇震试管架混匀管内液体,置 56℃ 保温 1~2h 或 37℃ 保温 4~8h,观察结果。

【结果】

(1) 对照管(第 6 管):上清液混浊,管底可有沉淀的细菌,如斜置试管可见其流动,若轻轻振摇便分散呈均匀混浊状。应首先观察对照管。

(2) 试验管:按 1→5 管依次观察。阳性者管底有不规则状凝集物,较松散,若轻微振摇试管即可悬浮起来。阴性者与对照管相同。

(3) 凝集程度的判别与记录:

卅:液体澄清透明,细菌全部凝集于管底,轻轻摇动可见大的凝集块。

卅:液体稍混,细菌大多数凝集于管底,摇动后凝块较前者小。

++:液体中等混浊,液体中有明显的凝集物,凝集块较小。

+:液体混浊,仔细观察可以看到液体中有很小的凝集块。

-:与对照管相同。

(4) 判定凝集效价:出现明显可见凝集物(++)时的血清最高稀释度为血清效价。

【注意事项】

(1) 严格控制反应温度, 温度在 $37\sim 56^{\circ}\text{C}$ 之间时, 升高温度可以加快反应速度, 但温度过高, 易导致抗体破坏。

(2) 控制 pH 值在 $6\sim 8$ 之间, 若 $\text{pH} < 3$ 可引起非特异性酸凝集。

(3) 保持一定电解质浓度, 否则不易出现凝集。

(4) 观察结果前, 不要振摇试管。观察时应与对照管同时对比后再判断。

二、间接凝集反应

间接凝集反应是将可溶性抗原(或抗体)先吸附(或偶联)在与免疫无关、有一定大小的颗粒性物质(载体)上, 然后再与相应抗体(或抗原)反应而出现的凝集反应。常用作载体的物质有红细胞、聚苯乙烯乳胶颗粒、金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 等。根据载体的不同, 分别有不同的名称, 如血凝试验、胶乳凝集试验、协同凝集试验等。

胶乳凝集抑制试验

【原理】

抗原致敏的胶乳颗粒遇相应抗体结合而发生凝集。若该抗体先与相应抗原作用后再加入致敏的胶乳颗粒, 则不出现凝集, 称之为胶乳凝集抑制试验。

胶乳凝集抑制试验可进行妊娠诊断。妊娠妇女尿液中含有人绒毛膜促性腺激素(HCG), 将待测尿液(含 HCG)与相应抗 HCG 血清混合, 该尿液中的 HCG 与抗血清结合。此时再加入 HCG 致敏的胶乳颗粒, 因无剩余抗 HCG 血清, 而不能发生抗原抗体结合, 凝集被抑制, 称为妊娠试验阳性。未妊娠妇女尿液中没有 HCG, 则致敏胶乳颗粒与 HCG 抗血清结合, 发生凝集, 称为妊娠试验阴性(图 1-1)。

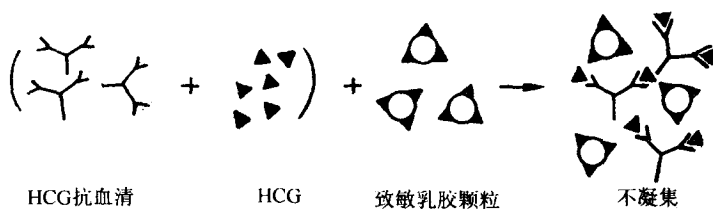


图 1-1 妊娠试验原理示意图

【材料】

- (1) 致敏胶乳抗原。
- (2) HCG 抗血清。
- (3) 妊娠妇女尿及正常妇女尿。
- (4) 妊娠试验板, 滴管。

【方法】

- (1) 在试验板的相邻两孔中分别加入 1 滴妊娠妇女尿和正常妇女尿。
- (2) 在上述两孔中分别加入 1 滴 HCG 抗血清, 缓慢摇动 1~3min。
- (3) 在上述两孔中分别加入 1 滴致敏胶乳抗原, 混匀, 缓慢摇动 3min 后报告结果。

【结果】

出现凝集者为妊娠试验阴性, 不出现凝集者为妊娠试验阳性。

【注意事项】

- (1) 受检标本和试剂应按规定顺序及时间加入, 否则无法判定结果。
- (2) 加 HCG 抗血清和胶乳抗原时应悬空滴加, 以免污染试剂瓶。
- (3) 加入试剂时液滴大小应均匀一致。

【思考题】

- (1) 试管凝集反应中,为什么要稀释抗体?
- (2) 试管凝集和玻片凝集有什么区别?
- (3) 胶乳颗粒凝集抑制试验的原理是什么?

(曹英林)

实验二 沉淀反应

可溶性抗原(细菌培养滤液、组织浸出液、血清蛋白等)与相应抗体结合,在一定条件下出现沉淀物的现象,称为沉淀反应(precipitation)。沉淀反应实验常稀释抗原,并以抗原稀释度作为沉淀反应的效价。常用的沉淀反应有环状沉淀反应、絮状沉淀反应、琼脂扩散及免疫电泳等。本实验主要介绍琼脂扩散、免疫电泳、对流免疫电泳的原理、方法、结果分析和临床用途。

一、琼脂扩散试验

琼脂属大分子多糖,100℃时熔化,低于45℃时凝固而形成网状结构,能允许抗原抗体在其中自由扩散。琼脂扩散试验是指可溶性抗原与相应抗体在琼脂内扩散,若二者对应且比例合适,则出现白色沉淀物。

(一) 单向琼脂扩散试验

【原理】

单向琼脂扩散试验系定量试验,通常以已知抗体测定未知抗原。试验中将定量的抗体混合于琼脂内倾注于玻片上制成琼脂板,凝固后打孔。再将待检抗原加入孔中,因抗体与琼脂混合凝固后,不会再扩散,只有孔中抗原向四周扩散,这样在抗原、抗体比例适合处形成白色沉淀环。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纵坐标,以抗原浓度为横坐标,绘制标准曲线。量取待检抗原的沉淀环直径,从标准曲线中求得其含量。本试验主要用于检测标本中各种免疫球蛋白

或血清补体含量。

【材料】

- (1) 人免疫球蛋白 IgG 的诊断血清(冻干羊抗人 IgG)。
- (2) 人免疫球蛋白标准血清,待检人血清。
- (3) 1.8%琼脂、玻片、打孔器、加样器、37℃恒温箱等。

【方法与结果】

(1) 制板:按抗血清效价的一半,用 56℃ 预热的生理盐水稀释抗血清,再加入等量的冷却至 56℃ 的琼脂轻轻混匀,灌板(3ml/板)。

(2) 打孔:以打孔器打孔,孔径 3mm,孔距 1cm,每板 2 排,每排 5 个孔,用针头把孔内琼脂块挑出。

(3) 按说明书要求稀释标准血清与待检血清。待检血清 1:50 稀释,标准血清系列稀释至:1:12.5, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200。

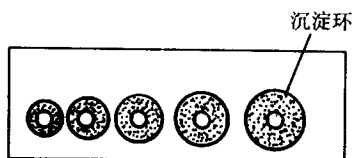


图 2-1 单扩标准孔结果示意图

(4) 加样:用微量加样器在第 1 排孔中依次加入不同稀释度的人标准血清各 10 μ l,第二排相邻两孔中加待检血清各 10 μ l。

(5) 将琼脂板放入湿盒,37℃ 24h 后测各沉淀环直径(图 2-1)。

(6) 以沉淀环直径为纵坐标,相应孔的 IgG 含量为横坐标,在半对数纸上制作标准曲线。根据待检血清沉淀环直径查标准曲线,将查得的 IgG 含量乘以标本的稀释倍数即为待检血清中的 IgG 含量(图 2-2)。

【注意事项】

- (1) 灌板时,一定将抗血清 56℃ 预温(但不要超过 56℃,否则

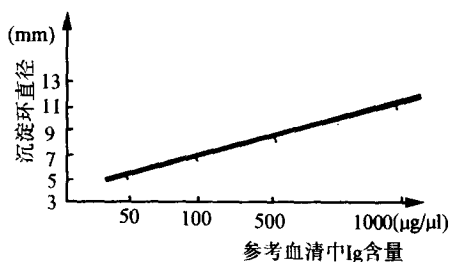


图 2-2 单扩标准曲线示意图

破坏抗血清),再与冷却至 56°C 的琼脂混匀,迅速灌板(所灌板应厚薄一致,无气泡)。

(2) 加样要准确、均一。

(3) 打孔时孔距不能小于 1cm 。

(二) 双向琼脂扩散试验

【原理】

双向琼脂扩散试验为定性试验。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。本试验常用于分析抗原抗体的纯度及相互关系。临床上常用于检测甲胎蛋白(AFP),作为原发性肝癌的辅助诊断。

【材料】

(1) 甲胎蛋白免疫血清。

(2) 脐带血清,待检血清。

(3) 玻片、琼脂、打孔器、加样器等。

【方法】

(1) 制板:将已熔化的 1% 盐水琼脂倒在玻片上, $3\text{ml}/\text{板}$ 。

(2) 打孔:用打孔器照图 2-3 打孔。

(3) 加样:中央孔加甲胎蛋白免疫血清,上下孔加脐带血清,其他孔内加待检血清,每孔均加 $10\mu\text{l}$ 。