



医学免疫学 实验技术

武汉大学医学院微生物与免疫学教研室

主 编 张秋萍 王 瑾 刘胜武



全 国 优 秀 出 版 社
武 汉 大 学 出 版 社

医学免疫学 实验技术

武汉大学医学院微生物与免疫学教研室

主 编 张秋萍 王 瑾 刘胜武

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验技术/张秋萍,王瑾,刘胜武主编. —武汉: 武汉大学出版社, 2002. 4

ISBN 7-307-03483-2

I. 医… I. ①张… ②王… ③刘… 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(2002)第 012438 号

责任编辑: 黄汉平 责任校对: 黄添生 版式设计: 支 笛

出版: 武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件: wdp4@whu.edu.cn 网址: www.wdp.whu.edu.cn)

发行: 新华书店湖北发行所

印刷: 武汉理工大学印刷厂

开本: 787×1092 1/32 印张: 2.875 字数: 61 千字

版次: 2002 年 4 月第 1 版 2002 年 4 月第 1 次印刷

ISBN 7-307-03483-2/R·67 定价: 5.00 元

版权所有, 不得翻印; 凡购买我社的图书, 如有缺页、倒页、脱页等质量问题者, 请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

医学免疫学是一门新兴学科,是生命科学发展的前沿领域。近 20 余年来,在分子生物学、细胞生物学、遗传学等多学科的渗透下,免疫学进展迅速,在理论、实验技术和临床应用等方面的发展日新月异。为了帮助学生理解和巩固所学的理论知识,开设实验教学是医学免疫学教学必不可少的重要环节。同时通过实验教学还可以培养学生的操作技能和分析问题、解决问题的能力及严谨的科学态度。

本书根据本科生医学免疫学的教学要求,分 26 个实验,介绍了体液免疫和细胞免疫体外检测的基本实验方法。通过这些实验,力求帮助学生更好地理解和掌握医学免疫学的基础理论、基本知识和基本技能。

由于编者水平有限,书中难免有不妥或错误之处,恳请读者批评和指正。

编 者

二〇〇一年九月

目 录

实验一	玻片凝集反应	1
实验二	试管凝集反应	3
实验三	间接乳胶凝集反应	6
实验四	环状沉淀反应	8
实验五	单向琼脂扩散	10
实验六	双向琼脂扩散试验	13
实验七	对流免疫电泳	16
实验八	免疫电泳	19
实验九	火箭免疫电泳	22
实验十	免疫印迹	25
实验十一	补体结合反应	31
实验十二	血清总补体活性测定(CH50 测定)	34
实验十三	溶血空斑试验	37
实验十四	E 花环形成试验	40
实验十五	淋巴细胞转化试验	44
实验十六	白细胞移动抑制试验	47
实验十七	酶联免疫吸附试验(ELISA)——间接法	50
实验十八	免疫荧光技术——间接法	53
实验十九	白细胞吞噬功能试验	55
实验二十	硝基兰四氮唑(NBT)试验	57
实验二十一	单克隆抗体检测 T 淋巴细胞亚群试验	60
实验二十二	免疫血清制备	63

实验二十三	免疫球蛋白(IgG)提取法	65
实验二十四	小鼠脾脏 NK 细胞活性测定	69
实验二十五	IL-2 活性检测——MTT 法	72
实验二十六	TNF 活性检测——结晶紫掺入法	75
附录	常用试剂配制	77

实验一 玻片凝集反应

玻片凝集反应是将已知的抗体直接与未知的颗粒性抗原物质(如细菌、红细胞等)混合,在有适当电解质存在的条件下,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。此法属定性试验,主要用于细菌和血型的鉴定等。

材料

1. 诊断血清:1:10 稀释的伤寒杆菌诊断血清。
2. 菌种:伤寒杆菌、大肠杆菌的 18~24 小时琼脂斜面培养物。
3. 生理盐水、玻片、接种环、酒精灯等。

方法

1. 取一洁净玻片,用笔划分二格,并标明为“1”、“2”。
2. 用培养环以无菌方法取生理盐水,置玻片上,每格两环。
3. 用培养环以无菌操作法刮取伤寒杆菌少许,置“1”格内的生理盐水中,研磨均匀,同法取大肠杆菌置“2”格的生理盐水中。
4. 用培养环以无菌方法取诊断血清,于“1”、“2”格中各置一环,并同细菌混匀,轻轻摇晃玻片,1~2 分钟后观察凝集现象。

结果判断

出现乳白色凝集颗粒,其周围混合悬液由混浊变为澄清透明者为阳性;如仍呈均匀混浊状者则为阴性。记录结果,最后将所用玻片放入有消毒液的玻片缸中。

注意事项

1. 伤寒杆菌为致病菌,要严格无菌操作。
2. 刮取细菌时,量不可过多。
3. 细菌在生理盐水中应充分研磨均匀。否则,影响凝集现象的观察。

思考题

1. 试述抗原抗体反应的特点及影响因素。
2. 为什么玻片凝集实验后的玻片必须放入消毒液中?

实验二 试管凝集反应

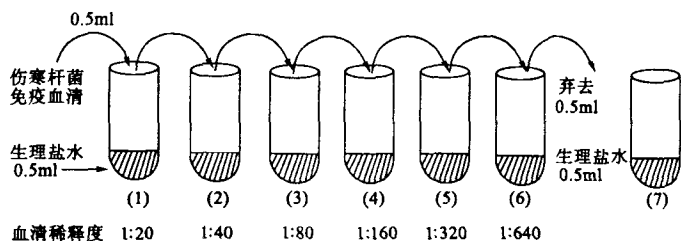
试管凝集反应是用已知的颗粒性抗原来检测未知抗体及相对含量。方法是用生理盐水将待测血清在试管中进行连续倍比稀释,然后于各管中加入等量的已知抗原悬液,经过一定时间后,观察有无凝集并根据凝集程度判定血清抗体的效价。

材料

1. 伤寒杆菌免疫血清(1:10 稀释)。
2. 伤寒杆菌抗原。
3. 生理盐水、吸管、试管、试管架等。

方法

1. 取小试管 7 支置于试管架上,并按顺序编号。
2. 用 5 ml 吸管取生理盐水,每管各加入 0.5 ml。
3. 用 1 ml 吸管吸取伤寒杆菌免疫血清 0.5 ml 加入第一管,然后用该吸管将上述免疫血清和试管中盐水吹吸三次,混匀。
4. 用同一吸管从第一管取出血清盐水混合液 0.5 ml 加入第二管,同样用该吸管吹吸三次混匀,然后取出 0.5 ml 加至第三管,依次类推,直至第六管,混匀后,取出 0.5 ml 弃去。此时第一管至第六管的血清稀释度分别为 1:20, 1:40, ..., 1:640。
5. 用 5 ml 吸管吸取伤寒杆菌菌液,从第七管到第一管,



血清稀释法

每管各加入 0.5 ml, 此时第一管至第六管的血清最后稀释度分别为 1:40, 1:80, ..., 1:1280, 第七管未加血清, 为对照管。

6. 菌液加毕, 振摇试管, 使血清与菌液充分混合, 置 56℃ 水浴中 2~4 小时 (或置 37℃ 水浴箱中过夜), 然后观察结果, “++” 即为该血清的凝集效价。

血清凝集效价: 凡能与定量抗原产生明显凝集现象 (++) 的血清最高稀释倍数, 即为该血清的凝集效价。血清效价代表血清中抗体的含量, 血清效价愈高, 说明所含抗体的量愈多。

结果判断

1. 先观察生理盐水对照管, 管底沉淀物呈圆形, 边缘整齐, 轻轻振荡, 细菌即分散而呈混浊现象, 此为不凝集。

2. 细菌与相应抗体结合在试管中的凝集现象表现为三个方面:

- (1) 管底有沉淀物。
- (2) 菌液由均匀混浊变为澄清。
- (3) 菌液中出现凝集颗粒。

3. 凝集强度的判断以 “+” 表示:

(1)“++++”:细菌全部凝集,液体澄清,轻摇有大片凝集块。

(2)“+++”:细菌部分凝集,液体微混浊,凝集块稍小。

(3)“++”:细菌部分凝集,液体半澄清,凝集颗粒小,但仍清晰可见。

(4)“+”:细菌少部分凝集,液体混浊,凝集颗粒隐约可见。

(5)“-”:未凝集,液体与对照管相同。

注意事项

1. 实验操作要认真仔细,向试管内插入吸管时宜轻,以免戳穿试管底;取样和加样应准确;稀释血清时应仔细且逐管进行,以防跳管。

2. 观察结果时,最好不要振摇试管,以免将凝集物摇散而影响观察。

思考题

1. 试述试管凝集反应的原理。

2. 加抗原时为什么从第七管加至第一管?

实验三 间接乳胶凝集反应

将可溶性抗原先吸附于一种与免疫无关的惰性颗粒载体的表面,然后与相应抗体结合,出现可见凝集现象,称间接凝集反应。用聚苯乙烯乳胶、红细胞或明胶等颗粒作为载体,分别称为间接乳胶凝集、间接血凝或间接明胶凝集反应。常用于定性或定量检测抗体,也可用已知抗体包被载体颗粒测抗原。下面介绍间接乳胶凝集玻片法。

材料

1. 10% 聚苯乙烯乳胶液:乳胶颗粒的直径为 $0.81\mu\text{m}$ 。
2. 丙种球蛋白:可用市售的血清丙种球蛋白。
3. pH8.6 甘氨酸缓冲盐水(GBS)。
4. 0.03% 牛血清白蛋白 GBS 缓冲液:取 30mg 牛血清白蛋白,溶解在 GBS100ml 中。
5. 致敏乳胶:致敏乳胶有商品供应,亦可按下法自制:取 10% 乳胶悬液,用 GBS 稀释 10 倍,加等量丙种球蛋白溶液 (1mg/ml),混合后置 37°C 30 分钟。6 000~8 000r/min 离心沉淀 10~15 分钟,弃上清液,用 0.03% 牛血清白蛋白 GBS 缓冲液洗涤 2 次,最后配成 1.0% 致敏乳胶, $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存,不能冰冻。
6. 待检血清、阳性对照血清、阴性对照血清。

方法

待检血清用 GBS 稀释 20 倍。在背面涂有黑漆的玻璃板上用蜡笔划分三区,各加稀释待检血清、阳性对照血清、阴性对照血清 1 滴。再分别加 1 滴致敏乳胶,用玻棒轻轻混匀,静置 10 分钟左右。

结果判断

出现均匀一致的细小凝集颗粒者为阳性;如未凝集,仍呈均匀乳胶悬液者为阴性。

注意事项

1. 本法快速敏感,但受多种因素影响,如乳胶粒子的大小、浓度、稀释液的 pH 以及致敏用的丙球蛋白量等。致敏时的 pH 以 8.0~9.6 为宜,pH 在 5.5~8.0 之间会引起乳胶粒子非特异性凝集。致敏乳胶所用的丙球蛋白量,对实验的成败是个关键,一般以 1mg/ml 为宜。

2. 致敏乳胶宜放在普通冰箱保存,不能冰冻,使用前要摇匀,并使其接近室温。保存期限无一定规定,如无自凝现象,一般均可使用。

思考题

1. 试述直接凝集反应与间接凝集反应的原理。
2. 试述间接凝集反应中用载体的意义。

实验四 环状沉淀反应

可溶性抗原(如血清蛋白、细胞裂解液或组织液等)与相应抗体特异性结合,在电解质存在的条件下出现肉眼可见的沉淀物,称沉淀反应,包括环状沉淀、絮状沉淀及琼脂凝胶扩散等反应。环状沉淀反应是将可溶性抗原加在已装有抗体的细玻管中,使抗原、抗体形成一清晰界面,如二者相对应,且比例适当,则在接触的界面形成白色环状沉淀物。常用来定性测抗原(如细菌分型、血迹鉴定)及定量测抗体效价。

材料

1. 抗体:兔抗人血清。
2. 抗原:人血清。
3. 生理盐水、毛细吸管、毛细玻管(内径 3~4mm,一端封闭)等。

方法

1. 取毛细玻管 2 支,在每支毛细玻管内用毛细吸管加兔抗人血清少许(高度约 1cm)。
2. 用毛细吸管将 1:100 稀释的人血清沿管壁慢慢加在其中一支玻管的兔抗人血清上,使二液间形成清晰可见的接触面。同法,将生理盐水加在另一支玻管的兔抗人血清上作为对照。
3. 二支玻管于 37℃ 或室温中静置 10~15 分钟。

结果判断

二液接触面出现白色沉淀环者为阳性。

注意事项

加抗原时,应沿毛细玻璃管壁慢慢加在兔抗人血清上,使二液间形成清晰可见的界面,否则,不易观察到沉淀环。

思考题

能否在毛细玻璃管中先加抗原再加抗体?

实验五 单向琼脂扩散

在含有抗体的琼脂板上打孔,加入待测抗原样品,抗原由孔中向四周作辐射状扩散,如抗原、抗体相对应,则在比例适当处形成一白色沉淀环,沉淀环直径大小与抗原的含量成正比。根据沉淀环的大小,从标准曲线中即可推算出样品中抗原的含量。常用于测定血清中 Ig 及补体 C₃ 的含量。

材料

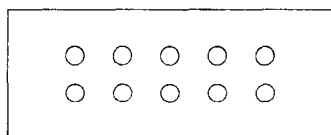
1. 抗原:待测人血清、已知含量的 IgG 参考蛋白。
2. 抗体:抗人 IgG 抗体。
3. 0.4% 生理盐水琼脂、3% 生理盐水琼脂。
4. 其他:微量加样器、琼脂板打孔器、载玻片、毛细吸管等。

方法

1. 制板:取一洁净载玻片,先用 0.4% 生理盐水琼脂铺底(用吸管取隔水融化的 0.4% 生理盐水琼脂,加二滴于玻片一端,用另一玻片如推血片样将琼脂推开冷却即可)、烘干,放置水平台面。吸取 2ml 已融化并冷却至 56℃ 的 3% 生理盐水琼脂,与 56℃ 预热的抗 IgG 抗体混合均匀(抗 IgG 稀释度视每批抗血清的效价而异),立即倾注入已铺底的玻片上,制成厚薄均匀的免疫琼脂板,其厚度以 1.5mm 为宜。

2. 打孔:待琼脂凝固后,按以下图型用打孔器在免疫琼脂

板上打孔。孔径为 3mm,孔距为 10~12mm。



单向琼脂扩散图形

3. 加样:将待测血清用生理盐水稀释成 1:40,用微量加样器准确吸取 10 μ l 样品,按编号顺序分别加入上排各孔内,每份待测血清 2 孔,以便取其平均值。将参考蛋白稀释成一系列不同浓度,各取 10 μ l 加入同一免疫板的下排各孔内以制标准曲线用。

4. 扩散:将加好样品的免疫琼脂板平放在铺有两层湿纱布的盒内,置 37 $^{\circ}$ C 温箱中扩散 24 小时。取出后在生理盐水中浸泡 2~3 小时,再用 1% 鞣酸浸泡 10 分钟,固定沉淀环大小。

结果判断

首先测量并记录各孔沉淀环的直径,然后以已知参考蛋白的 IgG 含量为纵坐标,相对应的沉淀环直径为横坐标,在半对数纸上绘制标准曲线,再根据待测样品的沉淀环直径的大小从标准曲线上查出相应的 IgG 含量,再乘以血清稀释倍数,即可得出该样品中 IgG 的实际含量。

注意事项

本法误差来源主要有:①抗原或标准溶液溢出加样孔;