



医学本科院校精品规划实验教材

供临床医学、医学检验、
护理等专业使用

医学免疫学实验教程

YIXUE MIANYIXUE SHIYAN JIAOCHENG

◎ 主编 汤贤英 罗军敏



第四军医大学出版社



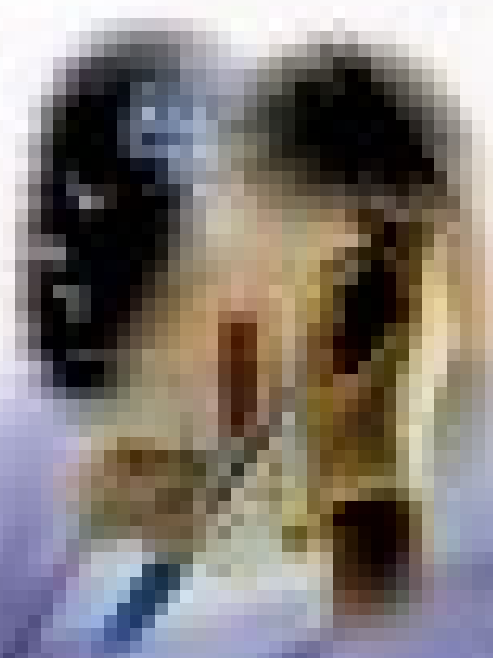
中华人民共和国教育部推荐教材

第二版

医学免疫学实验教程

THE IMMUNOLOGY EXPERIMENTAL COURSE

王 健 潘爱华 李学军



人民卫生出版社

医学免疫学实验教程

主 审 孙万邦
主 编 汤贤英 罗军敏
编 委 (按姓氏笔画排序)
田 丹 徐 林
秦娜琳 覃 明

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验教程/汤贤英,罗军敏主编. —西安:第四军医大学出版社,2009.7
ISBN 978-7-81086-640-8

I. 医… II. ①汤… ②罗… 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(2009)第111255号

医学免疫学实验教程

主 编 汤贤英 罗军敏
责任编辑 曹江涛
执行编辑 张永利
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路17号(邮编:710032)
电 话 029-84776765
传 真 029-84776764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 陕西奇彩印务有限责任公司
版 次 2009年7月第1版 2009年7月第1次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 9
字 数 150千字
书 号 ISBN 978-7-81086-640-8/R·528
定 价 15.00元

(版权所有 盗版必究)

前 言

医学免疫学实验技术被广泛应用于临床及科学研究中，成为推动免疫学和其他学科发展的有力工具。免疫学实验教学课程的开设，不但有助于学生更好地理解 and 掌握医学免疫学的基础理论、基本知识和基本技能，更能适应现代高等医药院校实验教学的需要，培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。

本教材由遵义医学院免疫学教研室教学经验丰富的教师编写。全书共分十二章，包含了抗原抗体的基本检测方法（凝集反应、沉淀反应、补体结合实验等），当今广泛应用的免疫标记技术，过敏原的检测及常用生物制品介绍等。每个实验包括实验目的、实验原理、实验材料、实验方法和注意事项等。同时，本教材附录部分开设了综述的撰写，并附综述范文以培养学生查阅文献、归纳、分析整理资料的能力；并列举了部分常规仪器的使用方法。

本教材可作为高等医药院校医学本科、研究生等免疫学专业实验用教材；亦可供临床医师、卫生防疫、医学检验以及从事医学免疫学的教师和研究参考。由于编者水平所限，本教材在内容、文字、编排等方面存在疏漏和错误之处，诚请广大读者提出宝贵意见。

本书的编写得到孙万邦、姚新生等老师的悉心指导和帮助，在此一并致谢。

罗军敏 汤贤英
2008 年 10 月

目 录

第一章 人外周血液标本的采集	(1)
第二章 淋巴细胞的分离	(4)
第三章 抗原或抗体的基本检测方法	(11)
第一节 抗原抗体反应	(11)
第二节 凝集反应	(13)
第三节 沉淀反应	(17)
第四节 补体参与的反应	(25)
第四章 免疫标记技术	(31)
第一节 免疫荧光技术	(31)
第二节 免疫酶标记技术	(40)
第三节 放射免疫技术	(54)
第五章 流式细胞术检测 T 细胞亚群	(59)
第一节 流式细胞术基本原理	(59)
第二节 T 细胞亚群的检测	(68)
第六章 人淋巴细胞功能的检测技术	(71)
第七章 非特异性免疫功能的常用检测技术	(79)
第八章 细胞因子与细胞因子受体的检测	(87)
第九章 I、IV 型超敏反应变应原的检测	(95)
第十章 抗体制备技术	(99)
第一节 免疫血清的制备	(99)
第二节 单克隆抗体的制备与应用	(102)
第三节 IgG 的分离与纯化	(105)
第十一章 常用生物制品介绍	(109)
第一节 常用生物制品介绍	(109)
第二节 转移因子的简介与制备	(111)
第十二章 免疫印迹	(116)
附录一 常规仪器使用方法	(125)
附录二 综述的撰写	(129)
附录三 综述范文	(131)
附录四 免疫学实验室规则	(137)
参考文献	(138)

第一章 人外周血液标本的采集

实验目的

1. 掌握真空负压静脉采血法和分离血清的方法；
2. 掌握离心机的使用方法。

实验内容

1. 人外周全血标本的采集；
2. 人血清的采集。

在免疫学的相关研究和临床检验中，常常需要收集人和实验动物的血液进行相关实验研究和检验分析。因此，正确采集人和实验动物的血液标本是免疫学最基本和最重要的操作技术。常采集的人血液标本主要包括全血、血浆及血清。其中，全血保留了血液的全部成分，由血细胞和血浆组成，主要用于临床血液学检查，如：血细胞计数、分类和形态学检查等；血浆是全血抗凝后，离心除去血细胞后的成分，主要用于血浆生理性和病理性化学成分测定；血清是血液离体后，经自然凝固后析出的液体部分，除纤维蛋白原等凝血因子在凝血时被消耗外，其他成分与血浆基本相同，更适用于多数临床免疫学检查。根据采血量、采血对象及实验要求的不同，在标本采集前，须仔细考虑检测的需要，确定采血方法、所需血量及选用合适的抗凝剂。本章主要介绍真空负压静脉采血法和血清的分离方法。

一、人外周全血标本的采集

血液标本的采集是分析质量控制的重要环节，可分为毛细血管采血法、静脉采血法、动脉采血法和真空负压静脉采血法。其中最常用的采血方法是静脉采血法，其采血量大，常用于所需细胞或血清数量多的实验或临床检测；毛细血管采血法采血量少，主要用于所需血量少的实验，如血型鉴定、婴儿黄疸的检测；而真空负压静脉采血法是近年来采用的一种新的静脉采血方法，此法简便易行。

（一）毛细血管采血法

【材料】

1. 灭菌采血针（三棱针或专用“采血针”）。
2. 酒精棉球、碘酒棉球。
3. 洁净载玻片、微量吸管等。

【方法】

1. 确定采血部位 通常为成人的耳垂或左手无名指指尖内侧，耳垂采血具有方便、无

痛及不易感染的优点；指尖采血则具有血量丰富且易采集的特点。婴幼儿一般在大趾或足跟采集血液。

2. 血液采集 轻轻按摩采血部位（左手无名指指尖内侧），使局部组织自然充血。用2%碘酒棉球消毒，干后用75%酒精棉球脱碘。干燥后，左手指紧捏采血部位两侧，右手持一次性消毒采血针迅速刺入，深度以2~3mm为宜，稍加挤压血液自动流出。第1滴血液因混入组织液相对较多，多弃去不用。用微量吸管吸取血液至要求的刻度（化学、免疫学检验用尼龙毛细管吸取），然后用无菌干棉球压住穿刺点以止血。

（二）真空负压静脉采血

【材料】

1. 真空采血管（普通生化管、枸橼酸钠或肝素抗凝管，见试管标签）。
2. 双向采血针（常用7号针头）。
3. 止血带、酒精棉球等。

【方法】

1. 确定采血部位 通常为成人肘静脉，若肘静脉不明显，可选择手背静脉或内踝静脉。婴幼儿由于肘部静脉较细和配合性差可从股静脉采血或颈外静脉采血，但要准备充分，注意其风险性。现以肘静脉为例采集血液。

2. 血液采集 在肘弯上方5~10cm扎上止血带，握拳，肘下垫一棉垫，如静脉明显凸起时，常规消毒，左手拇指固定静脉穿刺部位的下端，右手持采血针（针头斜面向上），沿血管走向呈15°~30°角进针，直接刺破皮肤至静脉腔中，见回血后，固定针头，将双向采血针另一端针头刺破真空采血管的管盖，使血液顺着压力差流入真空采血管内，抽至所需量，取下真空采血管，将其余备好的真空采血管依次推入、取出，解下止血带，用无菌棉球压住进针处拔针。如静脉不明显时，可用左手轻拍肘弯或轻轻揉搓，使其充血，或嘱其重复几次握拳运动，使其充盈后采血；肥胖者，可用左手食指在肘前轻压，再抬起如触到有弹性感，即为肘前静脉，在此处用食指指甲轻压上一痕迹，再行无菌消毒，直刺血管进行采血。

【注意事项】

1. 血液标本的采集应操作规范。采血前被采血者应保持平静，一般应在清晨时间取血。

2. 毛细血管采血应避开在有炎症、化脓、冻伤等皮肤破损部位采血。皮肤出汗应先用干棉球擦干，以免稀释血液。采血时，不要用力挤压皮肤，血液应自然流出。

3. 真空负压静脉采血

（1）采血针见回血后，另一端针头方可刺破真空采血管的管盖。若提前刺破管盖，可导致管内负压消失。此外，采血针见回血后，需固定针管以防血肿形成。

（2）止血带压迫时间不宜过长，最好不超过半分钟，避免淤血和血液浓缩，见回血后即松止血带。

4. 需要血浆或血清标本时一定要防止溶血发生。在采集、转移、保管和分离血细胞时要防止溶血。造成溶血的主要原因有容器不清洁、接触水或化学溶剂、强力振荡和分离血细胞时操作不慎等。

5. 血液标本的正确采集是获得准确、可靠实验结果的关键。在标本采集前，应仔细考虑实验的需要，决定采血方法、所需血量及选用合适的抗凝剂。

二、人血清标本的采集

【材料】

1. 普通生化管、双向采血针、消毒棉球等。
2. 毛细吸管、离心管、eppendorf 管、离心机等。

【方法】

1. 确定采血部位 同真空负压静脉采血法。
2. 血液采集 同真空负压静脉采血法，采外周血 3 ~ 4ml 于普通生化管中，斜面放置试管，静置 30min。
3. 离心血液 血液完全凝固后，用竹签将血块轻轻剥离管壁，2000rpm 离心 20min，用毛细吸管吸取上清（血清）于 eppendorf 管中保存，-20℃ 冰箱贮存备用。

【注意事项】

1. 注意各个操作环节，严防溶血。
2. 血清如需多次使用，应少量多管分装保存，以免反复冻融影响实验结果。

问题与思考

1. 简述血清与血浆的区别，二者在临床检验及基础研究中有何应用。
2. 选择毛细血管采血法和真空负压静脉采血法的依据是什么？
3. 血液标本在采集、运输及保存方面需要注意些什么？

（汤贤英）

第二章 淋巴细胞的分离

实验目的

1. 掌握分离淋巴细胞的密度梯度离心法；
2. 熟悉其他细胞分离方法。

实验内容

1. 外周血单个核细胞的分离；
2. T、B 淋巴细胞的选择性分离；
3. 淋巴细胞片的制备。

用体外方法对机体各种具有免疫反应的细胞分别作鉴定、计数和功能测定，是观察机体免疫状态的一种重要手段。为此，须将各种参与免疫反应的细胞从血液或组织中分离出来。由于实验目的和方法的不同，对分离的免疫细胞的纯度或活性的要求亦不同，其中获得高纯度的目的细胞是免疫学实验的一个最基本的前提。分离细胞选用的方法力求简便可行。本章将详细介绍淋巴细胞的分离。

一、外周血单个核细胞的分离

人外周血液中单个核细胞（peripheral mononuclear cells, PMNC）包括淋巴细胞和单核细胞，PMNC 是免疫学实验最常用的细胞，也是进行 T、B 细胞分离纯化过程的重要中间细胞。因此，获取高纯度和活性的 PMNC 常常是许多免疫学实验成功的先决条件。

人 PMNC 的方便来源是外周血，分离的原则是收率较高，根据不同试验有相对纯度，尽最大可能保持细胞应有的活性。分离的技术可根据细胞的物理性状和表面标志设计，根据不同实验目的可采用密度梯度离心法、吸附分离法和其他特殊分离法。本文介绍常用的密度梯度离心法分离人外周血淋巴细胞的原理及方法。

【原理】

人外周血中各种细胞的密度不同，人红细胞密度为 1.093，粒细胞为 1.092，淋巴细胞为 1.074 ± 0.001 。密度梯度离心法的原理主要是根据各类血细胞比重的差异，利用比重介于某两类细胞之间的细胞分离液对血液离心，使一定比重的血细胞依相应的密度梯度分布于不同的独立带，从而达到分离的目的。

常用的分层液为 Ficoll，Ficoll 是一种合成性蔗糖聚合物的商品名，无毒，但高浓度溶液往往不等渗，且黏性高，易使细胞聚集，常使用 60g/L 低浓度溶液（密度 1.020）加入泛影葡胺（Hypaque），应用浓度为 340g/L（密度 1.200），以泛影葡胺适当比例与 Ficoll 混合，可配制成比重合适的细胞分层液（密度 1.077 ± 0.001 ），称为 Ficoll - Hypaque 分层

液或称淋巴细胞分离液。

【材料】

1. 抗凝管、采血针、碘伏及酒精棉球等。
2. 淋巴细胞分离液（有商品供应，比重 1.077 ± 0.001 ）。
3. 无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的 Hank's 液（D-Hankl's），RPMI 1640 培养液。
4. 刻度吸管、毛细吸管、离心管、离心机、天平等。

【方法】

1. 稀释抗凝血 无菌采集静脉血 2ml 于抗凝管中，轻轻摇动试管，混匀，5min 后加入等量 Hank's 液，手动轻轻摇匀。

2. 分离淋巴细胞 取淋巴细胞分离液 2ml 于灭菌离心管内（稀释血液与分离液体积比为 2:1），用刻度吸管吸取稀释的血液，在分离液液面上方 1~2cm 处，沿管壁缓慢加至淋巴细胞分离液的液面上，如图所示（图 2-1，离心前），注意保持两种液体界面清晰。将试管平衡后置水平式离心机，1500rpm 离心 20min，离心后细胞分布如图所示（图 2-1，离心后），绝大多数淋巴细胞悬浮于血浆与分离液的界面上，呈白膜状。

3. 洗涤淋巴细胞 将毛细吸管插至白膜层，沿试管壁边缘仔细吸取界面处淋巴细胞层至一刻度离心管内，加入 5 倍体积的 Hank's 液或 PBS 液（含 1% 牛血清白蛋白，BSA）于刻度离心管内，手动旋转试管使液体混匀，1000rpm 离心 10min，弃上清，沉淀即主要为淋巴细胞。

4. 细胞计数 加入 RPMI 1640 培养液 1ml，混匀后进行计数（计数方法详见本章附一）。若需立即进行下一步的实验，可调整相应的细胞浓度。

5. 细胞保存 若需以后进行相关的实验，则需冻存细胞（细胞冻存详见本章附三）。

（备注：如做淋巴细胞转化或其他培养，所用试剂、器材应是无菌的。此外，尚需细胞存活率检测，细胞存活率检测见本章附二。）

【注意事项】

1. 加稀释血液于分离液管中时，应沿管壁缓慢加入，注意保持两种液体界面清晰，加完后勿摇动。

2. 吸取界面处的细胞时应仔细，勿吸取红细胞等其他细胞，以免影响分离细胞的纯度。

3. 此法分离单个核细胞纯度可达 95%，有时可混有少量多形核粒细胞及红细胞；细胞得率可达 80% 以上，其高低与室温有关。

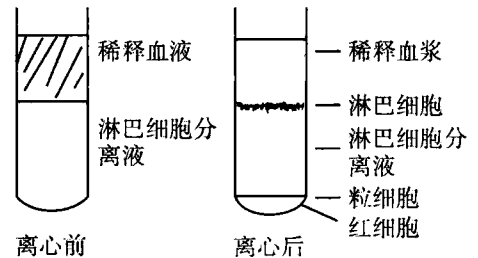


图 2-1 血细胞在密度梯度分离前后的分布示意图

二、T、B 淋巴细胞的选择性分离

为了深入研究 T、B 细胞的生物学特性和功能，需从淋巴细胞群中分离出单一的 T 细胞或 B 细胞。T、B 细胞以及 T 细胞亚群的分离纯化技术是基于这些细胞膜表面标志（表面受体或表面抗原）及黏附能力等不同而建立的。常用的方法有 E 花结形成法、尼龙棉柱法、免疫吸附法、免疫磁珠分离法等。此外，应用流式细胞仪可以分离出均质性的单一细

胞类型或细胞亚群（详见流式细胞术章节）。

（一）花环沉降法分离 T 细胞

【原理】

人类 T 细胞表面上有能与绵羊红细胞相结合的受体（E 受体，CD2），能与经溴化二氨基异硫基异硫脲氢化物（AET）处理的绵羊红细胞结合，形成稳定的、细胞体积和比重较大的 E 花环（AET-E 花环），据此特性可将 T、B 细胞加以分离。如采用密度梯度离心法，用淋巴细胞分离液分离时，AET-E 花环沉于管底，在分离液界面的淋巴细胞为 B 细胞；沉于管底的 AET-E 花环经低渗溶液溶解花环周围的 SRBC，即可获得纯的 T 细胞。

【材料】

1. AET 溶液。
2. 绵羊红细胞悬液。
3. 淋巴细胞分离液。
4. 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液（10% FCS - RPMI 1640 培养液）、Hank's 液。
5. 生理盐水。
6. 淋巴细胞悬液。
7. 离心管、试管、毛细吸管、水浴箱、离心机等。

【方法】

1. 用 AET 处理绵羊红细胞（绵羊红细胞的预处理） 取绵羊红细胞悬液，加入等量 Hank's 液，轻轻摇匀，1500rpm 离心 5min，将红细胞表面的白细胞及上清吸出弃掉，反复 3 次。取一份压积的绵羊红细胞，加入 4 份新配制的 AET 液混合，置于 37℃ 水浴作用 15min，不断摇匀。加入冷生理盐水，混匀，1500rpm 离心 5min，弃上清液，反复 5 次。观察无溶血，细胞凝集后，加入 10% FCS - RPMI 1640 培养液，混匀，1500rpm 离心 5min（在 1 份绵羊红细胞中加 9 份 10% FCS - RPMI 1640 培养液制成 AET-SRBC 悬液）。

2. 调整细胞浓度 AET-SRBC 悬液用 10% FCS - RPMI 1640 培养液稀释至 1% AET - 绵羊红细胞。单个核细胞浓度用 10% FCS - RPMI 1640 培养液调整为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。

3. E 花环形成 取 1ml 单个核细胞与等量 1% AET - RBC 混合，37℃ 水浴 15min 后，1000rpm 离心 5min，再静置于 4℃ 冰箱作用 45min。

4. 分离细胞 用毛细吸管轻轻吹吸，使细胞散匀，将细胞轻轻沿管壁铺于具有等量淋巴细胞分离液的试管液面上，2000rpm 水平式离心 20min，沉于管底者为 AET - 绵羊红细胞花环。

5. 收集细胞 取管底细胞，加入 Hank's 液，混匀后 2000rpm 离心 10min，沉淀中加入 3ml 双蒸水，立即加入 1ml 3.5% 氯化钠溶液，1000rpm 离心 5min，沉淀即为 T 细胞。

【注意事项】

1. 血液标本采集后应立即分离淋巴细胞，在室温下不能超过 3h。
2. 采取的无菌羊血应立即分离红细胞，加 Alsever's 液，置 4℃ 冰箱保存。
3. CD2 分子在大颗粒淋巴细胞中也有 10% ~ 80% 的表达，用此法分离的淋巴细胞难免混杂大颗粒淋巴细胞，必要时可用 Percoll 非连续密度梯度离心法将 T 细胞与大颗粒淋巴

细胞加以分离。

(二) 尼龙棉柱法分离 T、B 细胞

【原理】

B 细胞在 37℃ 时易黏附于尼龙棉（聚酰胺）纤维上，而 T 细胞不具此能力，从而可分离 T、B 细胞。

【材料】

1. Hank's 液。
2. 10% FCS - RPMI 1640 培养液。
3. 单个核细胞悬液 1ml，浓度为 $(2 \sim 3) \times 10^7/\text{ml}$ 。
4. 聚乙酰塑料管或 1ml 注射器、试管、毛细吸管、尼龙棉纤维等。

【方法】

1. 将尼龙毛置烧杯内，加双蒸水煮沸 10min，置漏斗内滴干。重复上述过程 6 次，最后两次用去离子水。称取尼龙毛 50 ~ 70mg，细致地撕开，使其松散均匀，用 Hank's 液浸透后装入聚乙烯塑料管或注射器，柱高约 2cm。

2. 用 Hank's 液和 10% FCS - RPMI 1640 培养液各 5ml 洗柱，流速约 1 ~ 2ml/10s。

3. 取单个核细胞，用 10% FCS - RPMI 1640 培养液制成细胞悬液 $[(2 \sim 3) \times 10^7/\text{ml}]$ ，将 1ml 细胞悬液上柱，关闭阀门，置 37℃ 温箱孵育 1h。

4. 用预温 37℃ 的 10% FCS - RPMI 1640 培养液 5ml 洗脱柱，收集洗脱液，2000rpm 离心 20min，沉淀即为 T 细胞，纯度达 90% 左右。

5. 用冷的 10% FCS - RPMI 1640 培养液 5ml 冲洗柱床，边洗边挤压塑料管，收集洗脱液，2000rpm 离心 20min，沉淀即为 B 细胞，纯度达 80% 左右。

【结果】

可通过免疫荧光染色来判断 T、B 细胞的纯度。

【注意事项】

1. 有报道，有些 T 细胞亚群可滞留在柱内。
2. 尼龙毛可回收利用。用过的尼龙毛可用生理盐水漂洗，然后放入 0.1mol/L 盐酸内过夜后洗涤。将尼龙毛置烧杯内，加双蒸水煮沸 10min，置漏斗内滴干。重复上述过程 6 次，最后两次用去离子水。

三、淋巴细胞抗原片的制备

【方法】

1. 调整细胞浓度 将分离得到的淋巴细胞以 RPMI 1640 培养液配成 $1 \times (10^5 \sim 10^6) / \text{ml}$ 细胞悬液。

2. 制备细胞片（细胞涂片） 用毛细吸管吸取细胞悬液一滴，轻轻将细胞悬液铺于玻片中央，约 1cm^2 ，以冷风吹干，以冷丙酮固定 5 ~ 15min，冷风吹干。

3. 细胞片保存 细胞片密封置 -20℃ 以下低温保存备用。

问题与思考

- 1. 分离淋巴细胞的方法有哪些，其分离原则是什么？
- 2. 分离好的细胞如何保存？

附一：细胞计数方法

【原理】

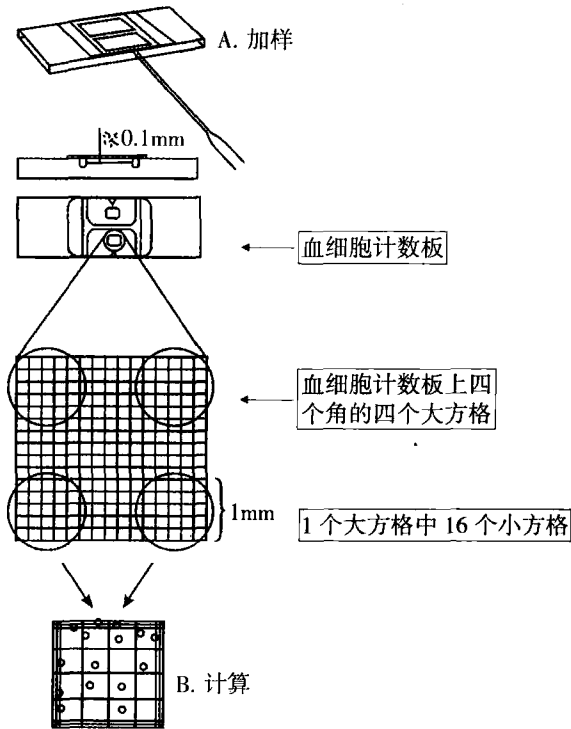
细胞计数法是用来计数细胞悬液中细胞数量的一种方法。一般利用计数板（血球计数板）进行。该法既可用于外周血细胞的计数，又可用于细胞接种浓度和数量的计数。不论计数的对象如何，均须制备分散的细胞悬液。本次实验主要介绍细胞培养时的细胞计数。

【材料】

- 1. 细胞计数板、毛细滴管等。
- 2. 淋巴细胞悬液。

【方法】

- 1. 加样 将淋巴细胞悬液混匀，吸取 10 μ l 加入到 40 μ l RPMI 1640 培养液中，混匀后再吸取少许加入到血细胞计数板上，静置片刻。
- 2. 细胞计数 置显微镜下计算淋巴细胞数。具体计数方法如下：
计算血细胞计数板上四个角的四个大方格中淋巴细胞总数（图 2-2）。



B. 血细胞计数
计算血细胞计数板上四个角的四个大方格中单个核细胞总数。
(只计算上边和右边的压边细胞，
左边和下边的不计算)

图 2-2 血细胞计数板图解

计算：按下列公式求出单个核细胞总数

$$\text{单个核细胞总数} = \frac{\text{四个大方格中单个核细胞总数}}{4} \times \text{稀释倍数} \times \text{细胞悬液毫升数} \times 10^4$$

附二：细胞活性检测

【原理】

细胞群体中总有一些细胞因各种原因而死亡，在总细胞样本中活细胞所占的百分比叫做细胞活力。测定细胞样本中活细胞所占的百分比，称为细胞活力测定（或细胞活性测定）。细胞活力测定可用于检查组织中分离细胞的细胞活力，以了解分离过程是否对细胞有损伤作用；检查复苏后细胞的细胞活力，以了解细胞冻存和复苏后的效果。其检测方法有台盼蓝染色法和 MTT 比色法。台盼蓝染色法是利用台盼蓝染料能进入死细胞，使死细胞着色，而活细胞不着色的特性，进行细胞染色，从而可以区分死细胞与活细胞。本次实验主要介绍台盼蓝染色法。

【材料】

1. 普通显微镜、血球计数板、试管、吸管。
2. 0.4% 台盼蓝。
3. 细胞悬液。

【方法】

1. 将细胞悬液 0.5ml 加入试管中。
2. 加入 0.5ml 0.4% 台盼蓝染液，染色 2~3s。
3. 取少许悬液加入血细胞计数板，置显微镜高倍镜下观察。

【结果判定】

活细胞不着色，折光性强，镜下呈无色透明状。死细胞由于染料可渗入细胞内，故死细胞被染成蓝色，死细胞体积较大，无光泽。

镜下计数 200 个细胞中的死亡细胞数，按下式计算其存活率。正常情况下，细胞存活率应在 95% 以上。

$$\text{细胞存活率} = (\text{细胞总数} - \text{死亡数}) / \text{细胞总数} \times 100\%$$

活力测定可以和细胞计数合起来进行，但要考虑到染液对原细胞悬液的加倍稀释作用。

附三：细胞冻存

【原理】

细胞冻存是细胞保存的主要方法之一。利用冻存技术将细胞置于 -196°C 液氮中低温保存，可以使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来，在需要的时候再复苏细胞用于实验。而且适度地保存一定量的细胞，可以防止因正在培养的细胞被污染或其他意外事件而使细胞丢种，起到了细胞保种的作用。除此之外，还可以利用细胞冻存的形式来购买、寄赠、交换和运送某些细胞。细胞冻存时向培养基中加入保护剂——终浓度 5% ~

15%的甘油或二甲基亚砷（DMSO），可使溶液冰点降低，加之在缓慢冻结条件下，细胞内水分透出，减少了冰晶形成，从而避免细胞损伤。采用“慢冻快融”的方法能较好地保证细胞存活。标准冷冻速度开始为 $-2^{\circ}\text{C} \sim -1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，当温度低于 -25°C 时可加速，到 -80°C 之后可直接投入液氮内（ -196°C ）。复苏细胞时则直接将装有细胞的冻存管投入 40°C 热水中迅速解冻。

【材料】

1. 冻存管、离心管、500ml 烧杯、胶布、搪瓷杯、75% 酒精棉球。
2. 培养基（RPMI 1640 或 DMEM）、小牛血清、0.25% 胰蛋白酶溶液、二甲基亚砷（DMSO）或甘油、液氮。
3. 4°C 冰箱、 -70°C 冰箱、液氮容器、微量加样器、水浴锅、离心机。

【方法】

1. 取待冻存的细胞悬液，800rpm 离心 5min，弃上清液收集细胞。
2. 加入适量冻存液（10% 甘油 + 90% 培养基，或者 10% DMSO + 90% 培养基）制成细胞悬液。细胞浓度宜大， $3 \times 10^6/\text{ml}$ 左右，并可适量增加牛血清浓度至 20%。
3. 细胞悬液装入冻存管中。用胶布封裹，做好标记（写上细胞种类、时间及冻存条件等）。
4. 冻存管在 4°C 下存放 30min，转放 -20°C 1.5 ~ 2h，再转入 -70°C 4 ~ 12h 后即可转移到液氮内（ -196°C ），注意进行登记。

（汤贤英）

第三章 抗原或抗体的基本检测方法

第一节 抗原抗体反应

抗原抗体反应：抗原与相应的抗体在体内或体外发生特异性结合，生成免疫复合物的反应，称为抗原抗体反应。因抗体主要存在于血清中，在抗原或抗体的检测中多采用血清做试验，故抗原抗体反应亦称为血清学反应，现统称为抗原抗体反应。

抗原抗体反应可发生于体内，也可发生于体外。体内反应可介导吞噬、溶菌、杀菌、中和毒素等作用；体外反应则根据抗原的物理性状、抗体的类型及参与反应的介质（例如电解质、补体、固相载体等）不同，可表现为凝集、沉淀、补体参与的反应，细菌表现为溶菌反应，红细胞表现为溶血反应等各种不同的反应现象。

一、抗原抗体反应的基本原理

抗原与抗体能够特异性结合是基于两种分子间的结构互补性与亲和性，这两种特性是由抗原的抗原表位和抗体的抗原结合部位决定的。抗原抗体反应可分为两个阶段，第一阶段为抗原与抗体发生特异性结合的阶段，此阶段反应快，仅需几秒至几分钟，但不出现可见反应；第二阶段为可见反应阶段，抗原抗体复合物在环境因素（如电解质、pH、温度、补体）的影响下，进一步交联和聚集，表现为凝集、沉淀、溶解、补体结合介导的生物现象等肉眼可见的反应，此阶段反应慢，往往需要数分钟至数小时。实际上这两个阶段无严格区分，而且两阶段的反应所需时间亦受多种因素和反应条件的影响，若反应开始时抗原抗体浓度较大且两者比例适合，则很快能形成可见反应。

（一）亲水胶体转化为疏水胶体

抗体是球蛋白，大多数抗原亦为蛋白质，它们溶解在水中皆为胶体溶液，不会发生自然沉淀。这种亲水胶体的形成机制是因蛋白质含有大量的氨基和羧基残基，这些残基在溶液中带有电荷，由于静电作用，在蛋白质分子周围出现了带相反电荷的电子云。抗原抗体的结合使电荷减少或消失，电子云也消失，蛋白质由亲水胶体转化为疏水胶体。此时，如再加入电解质，则进一步使疏水胶体物相互靠拢，形成可见的抗原抗体复合物。

（二）抗原抗体结合力

有四种分子间引力参与并促进抗原抗体间的特异性结合。

1. 电荷引力（库伦引力或静电引力） 这是抗原抗体分子带有相反电荷的氨基和羧基基团之间相互吸引的力。例如，一方在赖氨酸解离层带阳离子化的氨基残基（ $-\text{NH}_3^+$ ），另一方在天门冬氨酸电离后带有阴离子化的羧基（ $-\text{COO}^-$ ）时，即可产生静电引力，两者相互吸引，可促进结合。这种引力和两电荷间的距离的平方成反比。两个电荷越接近，静电引力越强。反之，这种引力便很微弱。

2. 范德华引力 这是原子与原子、分子与分子互相接近时发生的一种吸引力，实际上