

医学专科院校实验教材

病原生物学和免疫学 实验指导

主编 李 睿

张业霞

主审 台凡银



YZLI 0890092356

北京大学医学出版社

医学专科院校实验教材

病原生物学和免疫学 实验指导

主 编 李 睿 张业霞

副主编 王宗军 李泽武 张秀华 李 莉 侯翠萍

主 审 台凡银

编 委 (以姓氏拼音为序)

侯翠萍(菏泽市立医院)

王宗军(菏泽医学专科学校)

侯刚健(菏泽医学专科学校)

阎德华(菏泽医学专科学校)

贾昌亭(菏泽市立医院)

张秀华(菏泽市立医院)

李 莉(菏泽医学专科学校)

张业霞(菏泽医学专科学校)

李 睿(菏泽医学专科学校)

赵体灵(菏泽市立医院)

李泽武(菏泽医学专科学校)

郑淑媛(菏泽市立医院)

裴亚东(菏泽市卫生局)

朱树国(菏泽市立医院)

台凡银(菏泽医学专科学校)



YZLI 0890092356

北京大学医学出版社

BINGYUAN SHENGWUXUE HE MIANYIXUE SHIYANZHIDAO

图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物学和免疫学实验指导/李睿, 张业霞主编

—北京: 北京大学医学出版社, 2010.3

ISBN 978-7-81116-143-4

I. ①病… II. ①李… ②张… III. ①病原微生物—
实验—医学院校—教学参考资料 ②医药学: 免疫学—实验
—医学院校—教学参考资料 IV. ①R37-33 ②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 021636 号

病原生物学和免疫学实验指导

主 编: 李 睿 张业霞

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 莱芜市圣龙印务有限责任公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 韩忠刚 许 立 责任校对: 杜 悦 责任印制: 郭桂兰

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 11 字数: 289 千字

版 次: 2010 年 3 月第 1 版 2010 年 3 月第 1 次印刷 印数: 1-4000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-143-4

定 价: 18.50 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

为促进医学教育的发展、适应教学改革的需要,我们决定在临床医学专科教材《病原生物学和免疫学》出版的基础上,编写一本与此教材相适应的配套实验教材,即《病原生物学和免疫学实验指导》。

为了编好本实验教材,我们就本书的编写原则、指导思想、内容的编排模式,甚至涉及某一个实验单元的写法都做了深入讨论。同时,我们还参考了部分写得比较完整的实验指导教材。这些实验教材各有特色、互为补充,为编好本教材提供了良好的条件。

本实验教材的内容和顺序基本上按理论教材编排,除绪论外,全书共分四个部分,即医学免疫学、细菌与真菌学、病毒学和人体寄生虫学,其中医学免疫学实验十五个,细菌与真菌学实验十九个,病毒学实验六个,人体寄生虫学实验七个。为方便学生的学习,在本教材的编写中力求基本理论与基本技术操作的有机结合,把过去的寄生虫学将技术操作一揽子写于书后附录中,改为把技术操作分别写入相关的实验中,以便于学生通过实验操作,更进一步地领会和理解教材的基本理论。另外,在相关的实验后还附加了常用试剂的配制等内容,可作为学生今后临床实践和科研工作的参考。为便于学生通过实验过程及结果分析,获得更深层次的知识,培养严谨的科学态度,每个实验后均附有相应的思考题。

在教学改革中,很多院校在实验内容上作了较大的调整,造成各院校的实验课程安排不尽相同,甚至相差很大。在使用本教材的过程中,可根据本校的教学实际,选定、裁减或合并实验内容,并根据内容调整实验次数。但也正因为如此,我们在内容的编写方面考虑得比较宽。因而本教材既可作为临床医学专科的实验指导书,也可作为其他医学专业的教学用书,也是临床检验人员、临床实习人员、进修人员、卫生防疫人员必要的专业参考书。

本书为菏泽医学专科学校与菏泽市立医院的协编教材。

本书中的图片很多引自原北京医科大学中国协和医科大学联合出版社出版的《医学寄生虫学》教学光盘,在此对原作者和出版社表示衷心的感谢!

在本教材的编写中,各位作者本着对学生负责的态度,认真、仔细地编写每一节实验内容,付出了辛勤的劳动。但由于水平有限,缺点和错误在所难免,恳请广大师生和读者提出宝贵意见。

编者

2010年2月

目 录

绪 论

一、病原生物学和免疫学实验目的要求	1
二、实验室规则	1
三、实验室意外的紧急处理	2
四、显微镜的使用和维护	2

第一部分 医学免疫学

实验一 抗原与免疫血清的制备	6
实验二 凝集反应	9
实验三 沉淀反应	15
实验四 补体测定技术	18
实验五 酶免疫标记技术	20
实验六 免疫荧光技术	22
实验七 免疫胶体金斑点试验	24
实验八 放射免疫分析法	26
实验九 外周血中淋巴细胞的分离纯化	28
实验十 免疫细胞数量检测	29
实验十一 免疫细胞功能检测	32
实验十二 CTL 细胞株法测定 IL-2	38
实验十三 免疫病理及检测	38
实验十四 HLA 分型技术	43
实验十五 生物制品示教	45

第二部分 细菌与真菌学实验

实验一 细菌形态结构观察	47
实验二 常用培养基制备	48
实验三 细菌的分布及消毒灭菌	51
实验四 细菌的培养及生长现象观察	53
实验五 细菌涂片标本的制备及革兰染色法	58
实验六 药敏试验	60
实验七 细菌的变异	62
实验八 机体的抗感染免疫	64
实验九 细菌的致病性	66
实验十 病原性球菌	68

实验十一	肠道杆菌	74
实验十二	细菌的生化反应	78
实验十三	弧菌与弯曲菌	84
实验十四	厌氧性细菌	86
实验十五	分枝杆菌与放线菌	89
实验十六	动物源性细菌	90
实验十七	其他细菌	92
实验十八	支原体、衣原体、立克次体、螺旋体	94
实验十九	真菌	97

第三部分 病毒学实验

实验一	病毒的形态观察与培养	100
实验二	流行性感冒病毒的检测	104
实验三	乙型肝炎病毒抗原抗体系统的检测	107
实验四	乙型肝炎病毒 DNA 的检测 (PCR 法)	110
实验五	EB 病毒 VCA - IgA 检测	111
实验六	HIV 抗体检测	112

第四部分 人体寄生虫学

实验一	线虫	116
实验二	吸虫	127
实验三	绦虫	136
实验四	阿米巴	142
实验五	鞭毛虫	146
实验六	孢子虫	149
实验七	医学节肢动物	154
实验室常用仪器的使用		166

绪 论

一、病原生物学和免疫学实验目的要求

实验室是供学生进行实验的重要场所。在实验室内,通过实验观察和技术操作,使学生进一步理解、巩固和掌握理论课内容,掌握病原生物的检验、鉴定等基本技术及其免疫学检验技术,为今后的临床实践及科研工作打下坚实的基础。

为达到上述实验目的,要求学生做到以下几点:

1. 实验前应做好预习,明确每次实验的目的、内容、理论依据,尽量避免或减少错误发生。
2. 认真听取指导老师的课前讲解、示教。
3. 在实验中要按实验指导认真操作,独立思考,仔细观察并做好记录。有关基本技能的训练,要按照操作程序反复练习,以达到一定的熟练程度。
4. 在病原生物学的实验中,尤其是在微生物学的实验过程中,学生应建立无菌概念,掌握无菌操作技术。
5. 实验报告要强调科学性,实事求是地记录、绘制。如实验结果与理论不符,应认真分析和探讨其原因,培养自己的分析能力和解决问题的能力,不断提高实验质量。

二、实验室规则

病原生物包括微生物和寄生虫两个部分。对于这种特有的实验对象,尤其是对其中的病原微生物,任何疏忽都会导致严重的后果。不仅自身有可能招致感染,且有可能导致环境污染,并将病原生物传给他人。因此必须严格贯彻“无菌概念”,必须遵守病原生物学实验室规则:

1. 进入实验室前必须穿好白大衣,离开实验室脱下反折,白大衣应经常清洗消毒。
2. 书包、衣物等物品勿带入实验室。必要的文具、实验用具、笔记等物带入后,应放在指定位置。
3. 在实验室不做与实验无关的事情。不能高声呼叫、谈笑、喧哗或随意走动,禁止随地吐痰,并严禁饮食、吸烟,保证实验室的良好秩序。
4. 注意安全、保护环境。使用危险品或具有感染性的病原体时,应严格按照操作规程进行。严禁随意丢弃具有感染性的病原体、感染性材料、培养物、污染物、动物尸体及排泄物。正确使用各种消毒容器。
5. 必须小心地避免有菌材料的溅出,若不慎污染了工作台、手、眼、衣物和地面等处,应立即报告老师,以便及时做出适当处理。
6. 注意节约,爱护设备和仪器,如不慎损坏了实验仪器或实验标本,应及时报告指导老师,按照学校规定处理。

7. 每次实验后均应用肥皂洗手,必要时用消毒液泡手,如实验中使用了致病性较强的微生物,则需用消毒液擦洗工作台面,并用紫外线灯照射。

8. 实验完毕后,清理台面、检查标本、器材,并按原位放好或送还标本室;将需培养的标准及时放入培养箱。值日生应做好实验室清洁,关好门、窗、水、电后方可离开。

三、实验室意外的紧急处理

在实验的过程中,要严防事故的发生,如发生意外伤害事故,应及时报告,并予以紧急处理,办法如下:

1. 皮肤伤害 先除去异物,用蒸馏水或生理盐水洗净后,涂2%红汞或2%碘酊。
2. 烧伤 局部涂凡士林、5%鞣酸或2%苦味酸。
3. 化学药品腐蚀伤
 - (1) 强酸:先用大量清水冲洗,再用5%碳酸氢钠溶液洗涤中和。
 - (2) 强碱:先用大量清水清洗,再用5%醋酸或5%硼酸溶液中和。若受伤部位是眼部,经上述步骤处理后,再用橄榄油或液体石蜡1~2滴滴眼。
4. 菌液误入口中 立即将菌液吐入消毒容器内,并用1:10000高锰酸钾溶液或3%双氧水漱口,并根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。
5. 菌液污染桌面 将适量的2%~3%甲酚皂溶液(来苏水)或0.1%苯扎溴铵(新洁尔灭)倒于污染处,浸泡30min抹去。若手上沾有活菌,亦应浸泡上述消毒液3min,然后用肥皂和清水洗净。
6. 火警 发生火警时须沉着、冷静处理,切勿慌张,应立即关闭电闸或煤气阀门。如乙醇(酒精)、乙醚、汽油等有机溶液起火,切忌用水扑救,可用沙土等物扑灭。

四、显微镜的使用和维护

在病原生物学的形态检查中,如蠕虫的虫卵、原虫和细菌等,必须借助光学显微镜和电子显微镜才能观察到,但最常用的是普通光学显微镜(以下称显微镜)。因此,掌握显微镜的使用和维护是进行病原生物学实验研究的基本技能。

(一) 显微镜的构造 显微镜的构造分机械和光学两大部分(图1)

1. 机械系统 用于支持镜体和调焦。
 - (1) 镜筒:上端装接目镜,下端与物镜转换器相连。
 - (2) 物镜转换器:又称旋转盘,是安装在镜筒下方的一圆盘结构,可以按顺时针或逆时针方向旋转,其上均分布有3~4个圆孔,用以装载不同放大倍数的物镜。
 - (3) 镜臂:是支持镜筒和镜台的弯曲状结构,是取用显微镜时的握持部位。
 - (4) 镜台:也称载物台,是放置被检测标本片的平台,镜台上有标本移动器(推进尺),可使标本片前后左右移动。镜台的中央有圆形的通光孔,来自下方的光线经此孔照射到标本上。
 - (5) 调焦器:也称调焦螺旋,是用于调节物镜与被检物体之间的焦距,一般设有粗调螺旋和细调螺旋,前者作概略调焦,后者作精密调焦。
 - (6) 镜柱:是连接镜臂与镜座的短柱。

(7) 镜座：位于最底部，是整台显微镜的基座，用于支撑和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有光源。

2. 光学系统 光学系统包括目镜、接物镜、聚光器、反光镜等。

(1) 目镜：也称接目镜，安装在镜筒的上端。每个目镜一般由两个透镜组成。其上刻有放大倍数，如 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 。镜中常装有一条黑色细丝作为指针，以便指示物像供人观察。

(2) 接物镜：也称物镜。每个物镜由数片凸透镜组合而成，其下端接近被检标本。接物镜一般有低倍镜、高倍镜和油镜三种。它们安装在物镜转换器上，各有一些标志，如低倍镜： 10×0.25 (10/0.25)，10 表示放大倍数，0.25 表示数值孔 (口) 径 (NA)；高倍镜 40×0.65 (40/0.65)；油镜： 100×1.25 (100/1.25)。

(3) 聚光器：位于载物台通光孔的下方，由聚光镜和光圈组成，其主要功能将光线集中到要观察的标本上。聚光器由 2~3 个透镜组合而成，其作用相当于一个凸透镜，可将光线汇集成束。在聚光器的左下方，有一调节螺旋，可使其上升或下降，升高可使光线增强，反之光线变弱。光圈也称彩虹光阑或孔径光阑，位于聚光器的下端，是控制进入聚光镜光束大小的可变光阑。它由十几张金属薄片组合排列而成，其外侧有一小柄，可使光圈的孔径开大或缩小，以调节光线的强弱。有的显微镜在光圈下方装有滤光片环，可放置不同颜色的滤光片。

(4) 反光镜：位于聚光镜的下方，有平、凹两面，可以自由转动方向，使光源射出的光线反射到聚光器。

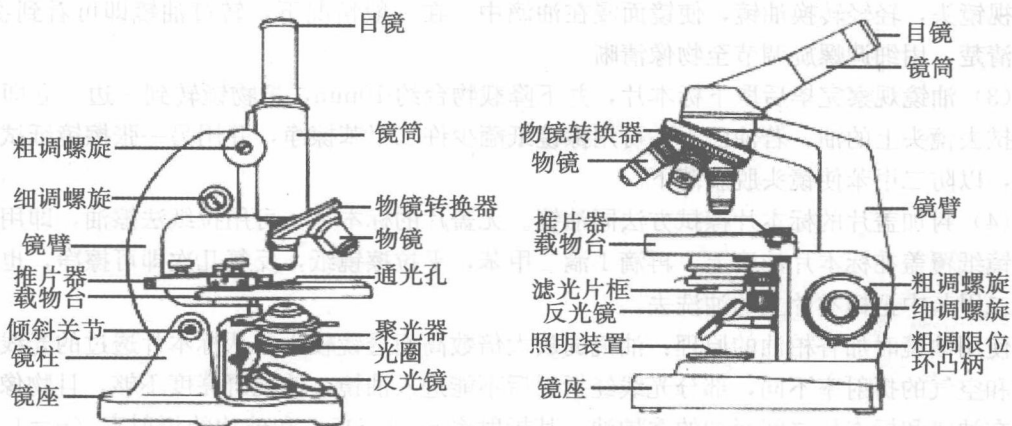


图 1 普通光学显微镜结构示意图

(二) 显微镜的使用

1. 低倍镜的使用

(1) 准备：打开实验台上的工作灯，转动粗调螺旋。将载物台略下降（或镜筒略升高），使物镜和载物台距离稍拉开。再旋转物镜转换器，将低倍镜对准载物台中央的通光孔，当镜头完全到位时，可听到轻微的“咔嗒”声。

(2) 调光：打开光圈，上升聚光器，双眼向目镜内观察，同时调节反光镜的角度，使视野内的光线均匀、亮度适中。

(3) 放片：把所需要观察的标本片放到载物台上，并用移动器上的弹簧夹固定好，然后

把观察的标本部位移到通光孔的正中央。

(4) 调焦：从显微镜侧面注视低倍镜，同时用粗调螺旋使载物台缓慢上升（或镜筒下降），直到低倍镜镜头距玻片标本约 5mm 时，再从目镜里观察视野，同时用左手慢慢转粗调螺旋，使载物台缓缓下降（或镜筒缓缓上升），直至视野中出现物像为止。如物像不清晰，可转动细调螺旋，直至视野中的物像清晰为止。

2. 高倍镜的使用

(1) 依照上述操作步骤，先用低倍镜找到物像。

(2) 将观察物移至视野中央，同时转动细调螺旋，使被观察的物像清晰。

(3) 眼睛从侧面注意物镜，转动物镜转换器，使高倍镜镜头对准通光孔。

(4) 眼睛向目镜内观察，同时微微转动细调螺旋，直至视野内的物像清晰。

有时，在低倍镜准焦情况下，直接换高倍时会发生高倍镜与标本片碰撞，有时标本转不过来，此时应将载物台下降或使镜筒升高，直接用高倍镜调焦。方法是从侧面注视物镜，调节粗调螺旋，使高倍镜头下降至与标本片距离最短，再观察目镜视野，慢慢调节细调螺旋，使镜头缓缓上升，直至物像清晰为止。

3. 油镜的使用

(1) 用低倍镜或高倍镜找到所需观察的标本物像，并将要进一步放大的部位移至视野中央。

(2) 转动物镜转换器，移开低倍镜或高倍镜，在标本片的中央滴 1 滴香柏油，眼睛从侧面注视镜头，轻轻转换油镜，使镜面浸在油滴中。在一般情况下，转过油镜即可看到物像，如不清楚，用细调螺旋调节至物像清晰。

(3) 油镜观察完毕后取下标本片，并下降载物台约 10mm，把物镜转到一边，立即用擦镜纸拭去镜头上的油，若油已干，可用擦镜纸蘸少许二甲苯擦净，并用另一张擦镜纸拭去二甲苯，以防二甲苯使镜头脱胶落下。

(4) 封加盖片的标本片擦拭方法同油镜。无盖片的标本片，可用拉纸法擦油，即用一小块擦镜纸覆盖在标本片油滴上，再滴 1 滴二甲苯，平拉擦镜纸，反复几次即可擦净，也可直接在二甲苯中把标本片上的油洗去。

使用油镜时加香柏油的原理：油镜的放大倍数高而透镜较小。从标本片透过的光线，因玻片和空气的折射率不同，部分光线经折射后不能进入油镜，使视野亮度不够，且物像不清晰。在油镜和标本片之间滴加的香柏油，其折射率 $n=1.515$ ，和玻片的折射率（ $n=1.520$ ）相仿，使进入油镜头的光线增加，使物像清晰（图 2）。

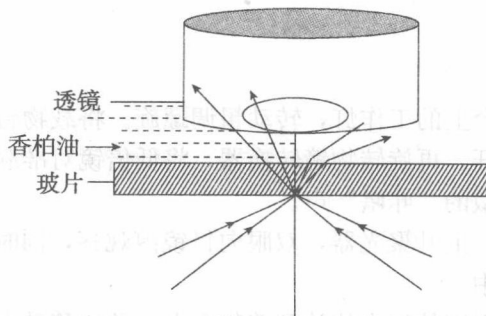


图 2 油镜原理示意图

(三) 显微镜使用应注意的事项和维护

1. 使用显微镜时应小心爱护, 不得随意拆卸。
2. 取显微镜时应一手紧握镜臂, 一手托住镜座, 切忌一手斜提, 前后摆动, 以避免零部件滑落。
3. 显微镜应置于离实验台边缘约 6cm 处, 以免显微镜翻倒落地。课间离开座位时, 应将倾斜关节复原, 镜头转离通光孔位置。
4. 要熟悉粗、细调螺旋转动方向, 并能配合使用, 调节焦距时, 眼睛必须注视物镜头, 以免压坏标本和损坏镜头。
5. 观察带有液体的临时标本要加盖片, 应将显微镜充分放平, 以免液体污染镜头和显微镜。
6. 显微镜不得与强酸、强碱、乙醚、氯仿和酒精等化学药品接触, 如不慎污染时, 应立即擦干净。
7. 要经常保持显微镜的清洁。显微镜的光学部分只能用擦镜纸轻轻擦拭, 不可用纱布、手帕、普通纸张或手指擦拭, 以避免磨损镜面。
8. 显微镜使用完毕, 将三个接物镜转成“八”字形, 将聚光器下降, 放入显微镜箱内。切不可把显微镜放在直射光线下暴晒。

(李 睿)

第一部分 医学免疫学

实验一 抗原与免疫血清的制备

【目的】

1. 了解抗原与免疫血清的制备程序。
2. 通过试验进一步理解什么是抗原和抗体。

一、常用抗原的制备

1. 细菌悬液的制备

细菌悬液可作诊断试剂，如肥达反应中的诊断菌液；也可用来免疫动物制备诊断血清，如沙门菌 A-F 多价血清、志贺菌诊断血清等。

细菌悬液制备程序大致如下：

选择标准菌种→细菌培养→刮取菌苔→用无菌生理盐水洗涤→革兰染色镜检，验证无杂菌→无菌生理盐水稀释至适当浓度→加温处理细菌→检查合格→分装、保存备用。

制备各种细菌悬液，常需按不同要求将细菌配制成不同的浓度。应用稀释菌液与标准比浊管比浊的方法，可判断每毫升菌液中所含细菌的数量。现介绍经典的麦克法兰（Mc Farland）标准比浊法（表 1-1-1）。

表 1-1-1 Mc Farland 标准比浊管的组成及其相当的菌数表（系指中等大小细菌）

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1%氯化钡溶液（ml）	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1%硫酸溶液（ml）	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
相当菌数（亿/ml）	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

（1）按表 1-1-1 制备一套标准比浊管：正确混合不同量的 1%硫酸（化学纯）溶液和 1%氯化钡（化学纯）溶液于一系列色泽口径一致的试管中。用经酸碱处理的橡胶塞紧管口，用石蜡密封。置试管架上，保存于暗处。

（2）取 0.5ml 待测细菌盐水悬液（去除粗块），用 9.5ml 生理盐水稀释，与标准比浊管比较。所得标准管的细菌浓度乘以稀释倍数，即为该菌液所含细菌数量的近似值。

（3）这套标准比浊管只适用于测定细菌在盐水悬液中的浓度。如要测定肉汤悬液的细菌浓度，则须用肉汤配制无菌的硫酸和氯化钡混合液。

2. 红细胞悬液的制备

红细胞悬液可作为抗原免疫动物制备溶血素；在一些血清学试验中也常用到红细胞悬液，如 CH50 测定、抗“O”试验等。

制备红细胞悬液的程序一般是：用生理盐水洗涤红细胞，除去其表面的附着物，然后配成所需要的浓度。洗涤红细胞的方法是：先将抗凝血以 2000r/min 离心 5min，吸去血浆层。在管中加 2~3 倍的生理盐水用毛细滴管轻轻地反复吹吸混匀，再以 2000r/min 离心 5min，弃上清液，如此反复三次。最后一次可适当延长离心时间至 10min。这样洗涤后的红细胞，上清液透明无色。弃上清液后，用生理盐水将红细胞配成实验要求所需的浓度备用。

红细胞洗涤次数不宜太多，以三次为宜，否则红细胞脆性增加，影响试验结果。若是用于制备溶血素的红细胞，应无菌操作。

二、常用免疫血清的制备

1. 兔抗羊免疫血清的制备

【材料】

家兔、绵羊血清、无菌生理盐水、注射器及针头、无菌试管及吸管等。

【方法】

(1) 用无菌注射器从绵羊颈静脉采血并分离血清。

(2) 选择体重为 2~3 公斤的健康雄性家兔，按表 1-1-2 剂量和程序进行免疫：

表 1-1-2 兔抗羊免疫血清的制备

日 期	抗原及剂量	免疫途径
第 1 天	羊血清 1ml	耳静脉
第 3 天	羊血清 2ml	耳静脉
第 5 天	羊血清 3ml	耳静脉
第 7 天	羊血清 3ml	耳静脉
第 9 天	羊血清 3ml	耳静脉

(3) 末次注射 7 天后，由耳静脉采血并分离血清，滴定效价在 1 : 500 以上即可心脏无菌采血并分离免疫血清置冰箱备用。

2. 抗菌血清的制备

【原理】

用抗原免疫动物可刺激其 B 细胞分化增殖为浆细胞，进而分泌特异性抗体，这种含有特异性抗体的血清即为免疫血清。

【材料】家兔、乙型副伤寒杆菌、琼脂斜面培养基、0.3% 甲醛盐水、无菌生理盐水、无菌注射器及针头、试管等。

【方法】

(1) 将生物学性状典型的肖沙门菌接种于琼脂斜面培养基上，置 37℃ 恒温箱中培养 16~18h 后，用 0.3% 甲醛盐水将菌苔洗下，制成浓悬液，再置 37℃ 恒温箱中 24h 以杀菌。

(2) 上述菌液进行无菌试验后用无菌生理盐水稀释至浓度为 9 亿/ml。

(3) 择体重为 2~4 公斤的健康雄性家兔，用上述菌液按表 1-1-3 剂量和程序进行耳静脉注射免疫。

表 1-1-3 抗菌血清的制备程序

日期 (天)	1	5	10	15
剂量 (ml)	0.25	0.5	1.0	2.0

(4) 末次注射后 4~6 天, 耳静脉采血 1ml 分离血清, 用上述菌液作试管凝集试验, 确定抗菌血清的效价, 一般凝集效价在 1:2000 以上即可放血, 分离血清后分装保存。

3. 免疫球蛋白的分离提取与纯化

盐析法 (salt fractionation)

【原理】

蛋白质在不同浓度的盐溶液中相对溶解度不同。血清 γ 球蛋白在一定浓度盐溶液中易沉淀, 而白蛋白则不易沉淀, 据此可将二者分离。

【材料】

硫酸铵, 正常人血清, 28% 氨水, 透析袋, 生理盐水, Sephadex-G50 凝胶。

【方法】

(1) 配制饱和硫酸铵溶液: 取 500ml 蒸馏水, 加热至 70~80℃, 将 400g 硫酸铵溶于水, 搅拌 20min, 冷却。硫酸铵结晶沉于瓶底, 上清即饱和硫酸铵。用 28% 氨水调节 pH 为 7.0。

(2) 用 50% 饱和硫酸铵提取血清中 β 、 γ 球蛋白: 方法是一份血清加一份生理盐水加二份饱和硫酸铵, 混匀后静置 30min, 离心 10000r/min, 10min, 将上清液 (含白蛋白) 去掉, 取沉淀物 (含 β 、 γ 球蛋白), 溶于少量生理盐水中。

(3) 用 33% 饱和硫酸铵提取 γ 球蛋白: 方法是将上述提取物二份加一份饱和硫酸铵, 其余操作同上。

(4) 将提取物再用饱和硫酸铵提取两次。

(5) 将提取物装入透析袋, 在生理盐水中透析, 也可用 Sephadex-G50 凝胶过滤, 以除去其中所含的硫酸铵。

⚠ 注意事项

饱和硫酸铵必须逐滴加入, 边加边搅拌, 以防止形成团块或降低沉淀的特异性。

【结果】

经盐析法提取的蛋白质为粗提的免疫球蛋白, 若要获得纯化的免疫球蛋白, 必须经凝胶过滤或离子交换层析提纯。

🧐 思考题

1. 通过本试验你能否加深对抗原抗体概念的理解?
2. 以上试验在医学上有何用途?

(王宗军)

实验二 凝集反应

一、直接凝集试验

【目的】

1. 通过细菌与其相应抗体的反应，掌握玻片法和试管法凝集试验的原理。
2. 熟悉凝集试验的方法和临床意义。

【原理】

颗粒性抗原与相应抗体在适当的条件下相混合，直接出现可见的凝集小块，称为直接凝集反应。

(一) 玻片凝集试验

【材料】

1. 标本 任一常见细菌的平板或斜面培养物。
2. 试剂 与细菌对应的诊断血清（可用生理盐水作适当稀释以免发生前带现象）、生理盐水等。
3. 器材 玻片、接种环等。

【方法】

1. 于洁净玻片的一端加生理盐水一滴，另一端加诊断血清一滴。
2. 用接种环挑取待检细菌分别涂于生理盐水和待检血清中，充分混匀。
3. 室温下静置数分钟观察结果。

【结果】

生理盐水对照应不发生凝集，为均匀混浊的乳状液。在诊断血清中，细菌与相应抗体反应则出现肉眼可见的凝集块，为阳性结果。如与对照相同则为阴性。

本方法为定性试验，敏感性较低。但操作简便，反应迅速，目前仍然是细菌菌种鉴定和 ABO 血型鉴定的常规实验。

⚠ 注意事项

1. 每一待检菌均需作生理盐水对照，当细菌发生 (S-R) 变异时，可发生自凝。对照发生凝集，试验结果无效。
2. 在玻片两端涂布细菌时，注意一定要先在生理盐水中涂，后在诊断血清中涂，以免将血清误带入盐水中。
3. 试验后的细菌仍有传染性，应将玻片放入消毒缸内。
4. 做 ABO 血型鉴定时，室温过低（低于 10℃）可出现冷凝集，造成假阳性结果。

(二) 试管凝集试验

【材料】

待检血清，伤寒沙门菌 H 和 O 诊断菌液 (7×10^8 /ml)、抗伤寒沙门菌 O 和 H 抗血清（用生理盐水做 1:10 稀释）、生理盐水。

恒温水浴箱、试管架、试管、吸管等。

【方法】

1. 取洁净试管 8 支，排列于试管架上，依次编号；于各试管中均加入生理盐水 0.5ml。

2. 吸取 1 : 10 稀释的被检血清 0.5ml, 加入第一管中, 充分混合, 吸出 0.5ml 放入第二管; 混合后取出 0.5ml 于第三管中……; 如此直至第七管, 混匀后吸出 0.5ml 弃去。第八管不加血清, 作为生理盐水对照。第一管至第七管的血清初始稀释度为: 1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320、1 : 640、1 : 1280。这种稀释方法称为连续倍比 (2 倍) 稀释法, 是免疫学试验中常用的一种稀释方法。

3. 每管加入诊断菌液 0.5ml, 此时每管内的血清稀释度又增加了一倍。

4. 摇匀后, 放 37℃ 18~24h 后观察结果。操作程序见表 1-2-1。

表 1-2-1 试管凝集操作程序 (单位: ml)

管号	1	2	3	4	5	6	7	8 (对照)
生理盐水	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1 : 10 血清	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
诊断菌液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
终稀释度	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560	—

【结果】

判断凝集试验的结果, 要有良好的光源和黑暗的背景, 先不振摇, 观察管底凝集物和上清浊度。然后轻轻摇动试管, 注意观察凝集颗粒的松软、大小、均匀度等性状及液体的混浊程度。

- 1. 盐水对照管应无凝集现象, 轻轻摇动试管, 细菌分散均匀混浊。
- 2. 在试验管, 伤寒沙门菌 O 抗原凝集物呈颗粒状沉于管底, 轻摇时不易开起和离散。H 抗原凝集物呈絮状, 疏松而大块地沉于管底, 轻摇易开起和离散。根据凝集程度以 “+” 表示反应的强弱。

“4+” 很强, 细菌全部凝集, 凝块完全沉于管底, 液体澄清。

“3+” 强, 细菌大部分凝集, 液体稍混浊。

“2+” 中等强度, 细菌部分凝集, 液体较混浊。

“+” 弱, 仅少量细菌凝集, 液体混浊。

“-” 不凝集, 液体混浊度与对照管相同。

- 3. 血清抗体效价判定, 以出现 “2+” 凝集反应的最大血清稀释度作为待检血清中抗体效价。

⚠ 注意事项

1. 抗原抗体比例适当时才能出现肉眼可见的反应。一般情况下, 随着血清浓度的逐渐稀释, 凝集反应越来越弱。但在抗体浓度过高时, 反无凝集现象出现, 此为前带现象。出现该情况时, 须加大抗体稀释度重新试验。

2. 注意温度、电解质、振摇对试验结果的影响。抗原抗体加入后, 要充分混匀, 以增加抗原抗体的接触。

本试验是一种经典的定量凝集试验, 敏感性不高, 但操作方法简单, 至今仍在使用。用于临床的试管凝集反应主要有诊断伤寒和副伤寒病的肥达 (Widal) 试验、诊断斑疹伤寒和

恙虫病等立克次体病的外斐 (Weil Felix) 试验、诊断传染性单核细胞增多症的嗜异性凝集试验等。

思考题

1. 抗体效价的定义。
2. 引起非特异性凝集的原因有哪些？

二、间接凝集试验

【目的】

本试验以诊断伤寒的间接血凝为例，掌握间接血凝试验的原理，熟悉其方法及临床意义。

【原理】

将可溶性抗原吸附于一种与免疫无关的有一定大小的载体微粒表面，再与相应抗体在适宜的条件下相互作用，由于抗原抗体反应出现肉眼可见的颗粒凝集现象，这种方法称为间接凝集试验。如将抗体吸附于颗粒表面用以检测抗原，则称为反相间接凝集试验，试验方法与间接凝集试验相同。实验室常用的载体有红细胞、胶乳颗粒、活性炭、SPA 菌体等。以红细胞为载体颗粒的间接凝集试验称为间接血凝试验。

【材料】

伤寒沙门菌可溶性抗原、抗伤寒沙门菌 O 901 免疫血清、 2×10^8 /ml 绵羊红细胞 (SRBC) 悬液、 0.01mol/L pH 7.2 PBS。

试管、吸管、 37°C 水浴箱等。

【方法】

1. O 抗原的制备 将伤寒沙门菌 O901 接种于普通琼脂培养基上，置 37°C 培养 18~24h，用无菌生理盐水洗下，配成 1×10^{10} /ml 的菌悬液，置 100°C 水浴 2h， 3500r/min 离心 30min，吸取上清液，置 4°C 冰箱备用。

2. 致敏 SRBC 的制备 取抗原与等量 2×10^8 /ml SRBC 混合， 37°C 水浴 2h (每 15min 振摇一次)，取出后离心，用生理盐水洗三次，最后用 PBS 缓冲液配成 1×10^8 /ml 的致敏 SRBC。

3. 试验操作程序 按表 1-2-2 将 O901 抗血清用 PBS 作连续倍比稀释，然后加入致敏 SRBC 悬液，混匀后置 37°C 水浴 2h 观察结果。

表 1-2-2 间接血凝试验操作程序 (单位: ml)

管号	1	2	3	4	5	6	7	8 (对照)
PBS	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
O901 抗血清	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1%致敏 SRBC	0.5	0.5	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	1:640	1:1280	—