

 全国医药职业教育检验类规划教材

QUANGUO YIYAO ZHIYE JIAOYU JIANYANLEI GUIHUA JIAOCAI

免疫学检验 实验指导

(供医学检验技术及相关专业用)

主编 杨元娟

 中国医药科技出版社

全国医药职业教育检验类规划教材

免疫学检验实验指导

(供医学检验技术及相关专业用)

主 编 杨元娟

江苏工业学院图书馆
藏书章



中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是全国医药职业教育检验类规划教材之一,为医药高职高专《免疫学检验》理论教材的配套实验教材。全书共分9个单元,介绍了25个临床常用的实验项目。第一单元为免疫血清的制备,第二单元为免疫凝集类实验,第三单元为免疫沉淀类实验,第四单元为补体与补体参与的反应,第五单元为酶免疫检测技术,第六单元为其他免疫标记技术,第七单元为细胞免疫检测技术,第八单元为非特异免疫功能测定,第九单元为其他免疫学实验,书末有试剂及溶液配制方法等内容。此教材注重规范性和可操作性,并增加了部分新实验、新技术。本书主要适用于医学检验专业的高职高专学生。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学检验实验指导/杨元娟主编. —北京:中国医药科技出版社, 2009. 8

全国医药职业教育检验类规划教材

ISBN 978 - 7 - 5067 - 4226 - 9

I. 免... II. 杨... III. 免疫学—医学检验—实验—高等学校: 技术学校—教学参考资料 IV. R446. 6 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 117697 号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100082

电话 发行: 010 - 62227427 邮购: 010 - 62236938

网址 www.cspyp.cn

规格 787 × 1092mm ¹/₁₆

印张 6 ¹/₄

字数 122 千字

版次 2009 年 8 月第 1 版

印次 2009 年 8 月第 1 次印刷

印刷 北京金信诺印刷有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978 - 7 - 5067 - 4226 - 9

定价 15.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

医学检验技术专业实验指导丛书编写委员会

主 任 段于峰
副主任 张纪云 黄斌伦 熊金成
李 进 甘小玲 黄泽智

秘 书 江兴林

编 者 (以姓氏笔画为序)

王益明 (浙江金华职业技术学院)

甘小玲 (重庆医药高等专科学校)

江兴林 (怀化医学高等专科学校)

李 进 (广西卫生管理干部学院)

李光武 (山东医学高等专科学校)

张纪云 (山东医学高等专科学校)

杨元娟 (重庆医药高等专科学校)

林逢春 (楚雄医学高等专科学校)

段于峰 (怀化医学高等专科学校)

桂 芳 (怀化医学高等专科学校)

黄泽智 (邵阳医学高等专科学校)

黄斌伦 (浙江金华职业技术学院)

熊金成 (楚雄医学高等专科学校)

编写说明

医学检验技术专业教育的目标是培养医学检验技术实用技能性人才,其核心能力是医学检验操作技能,实践教学处于主体地位。一直以来,医学检验技术专业没有公开出版、独立成册的全套实验教材,实践教学未得到应有的重视。为了突出高职教育实践教学,强化专业核心能力培养,在充分酝酿和取得共识的基础上,决定以湖南省教育厅教学改革立项课题《医学检验技术专业实践教学体系的改革研究与实践》研究为契机,开发、编写医学检验技术专业核心课程实验教材。

临床检验技术发展很快,方法不断更新,仪器化程度越来越高,随着医疗体制改革的深入,基层医疗将快速发展,常规检验仪器将得到较快的普及,手工操作越来越少,工作内容和工作方式发生改变。这种发展趋势下,高职医学检验专业如何选择教学内容,构建合适的实验、实训教材,以满足服务于工作任务的职业教学模式的需要,是对我们高职医学检验教育工作者的挑战。正是敢于面对挑战、勇于实践的实干精神和对医学检验职业教育的热情使我们七所高职高专院校医学检验系的领导和专家于2008年12月聚拢于怀化医学高等专科学校,举行了“医学检验技术专业系列实验教材建设研讨会”,并成立了编写委员会。会上,对教材的编写进行了深入、细致和全面的讨论,确定了教材编写的基本思路、基本内容和体例格式,并确定了编写人员。

本套实验教材共7本,包括《临床基础检验学实验指导》、《血液学检验实验指导》、《生物化学检验实验指导》、《微生物学检验实验指导》、《免疫学检验实验指导》、《寄生虫学检验实验指导》、《卫生理化检验实验指导》。全套教材的基本体例为章、实验、思考题;编写的基本思路是结合国家临床检验操作规程,促进实验实训规范化;在每一章之后附加与实验内容有关的练习题,有利于学生学习和掌握直接服务于医学检验技术的知识要点;书后增加综合性分析题,旨在促进研究性学习,达到训练和提高学生综合分析和解决问题的能力。

由于本套实验教材的使用量较小,出版发行所需成本较大,这种情况下,中国医药科技出版社倾注了极大的热情,使本套实验指导得以顺利出版,在此深表谢意。本教材在编写过程中参考了相关医学检验专业教材和《全国临床检验操作规程》,在此向相关作者表示衷心感谢。由于编写时间仓促,认识水平有限,本套丛书还存在诸多缺点和不足,希望广大师生多提宝贵意见,以便再版时进一步提高。

编写委员会
2009年5月

本书编委会

主 编 杨元娟

副主编 王法权

林逢春

作 者 (以姓氏笔画为序)

王法权 (山东医学高等专科学校)

杨元娟 (重庆医药高等专科学校)

林逢春 (楚雄医药高等专科学校)

陈芳梅 (广西卫生管理干部学院)

张 彩 (重庆医药高等专科学校)

俞北伟 (浙江省金华市人民医院)

赵晋英 (湖南省邵阳医学高等专科学校)

前 言

《免疫学检验》是医学检验（技术）专业的必修和主干课程之一，免疫学检验技术是专业核心能力的组成部分。为了适应当前对高职高专《免疫学检验》实验教学的需求，我们在编写委员会的安排组织编写了《免疫学检验实验指导》。

本实验指导是以全国高等医学院校医学检验技术专业高职高专规划教材《免疫学检验》为基础，结合《全国临床检验操作规程》（第3版）的相关内容来编写的，是对《免疫学检验》理论教材的补充。力求使教学内容能更好地满足高职高专导向、能力本位的培养目标和就业定位的要求，使学生通过实验课边做边学的实训练习，掌握《免疫学检验》最基本的技术和知识。编排上，注重内容的系统性、完整性、新颖性和实用性，结合临床免疫学检验技术发展的需要，扩充介绍了部分新实验、新技术。本书共分9章，介绍了25个临床常用实验项目，均按目的与要求、实验原理、试剂与器材、方法、结果记录、注意事项、参考范围、临床意义、方法评价和思考题等层次进行编写。在对实验方法进行表述时，尽量做到贴近临床，详尽介绍，并设附录，以便于操作和应用。

《免疫学检验实验指导》作为医学检验技术专业《免疫学检验》的实训教材，既可供全国高职高专医学检验技术专业师生学习使用，也可供医院检验科、防疫站等临床检验工作者在临床检验实际工作中的参考。

免疫学和免疫学检验技术的发展日新月异，必将带动医学检验技术专业教学的改革和创新。由于编者水平有限，时间仓促，书中难免有疏漏和不足，敬请专家和读者提出宝贵意见和建议。

编 者

2009年5月

目 录

实验室规则	(1)
第一单元 免疫血清的制备	(2)
实验一 抗体制备技术(溶血素的制备)	(2)
第二单元 免疫凝集类实验	(6)
实验二 直接凝集试验	(6)
(一)玻片凝集试验(菌种鉴定)	(6)
(二)试管凝集试验(肥达反应)	(8)
实验三 间接凝集反应(类风湿因子检测)	(12)
实验四 协同凝集试验(脑膜炎球菌快速鉴定)	(15)
附 间接凝集抑制试验简介(胶乳妊娠试验)	(18)
第三单元 免疫沉淀类实验	(19)
实验五 双向琼脂扩散试验	(19)
实验六 单向琼脂扩散试验(IgG、IgA、IgM 测定)	(21)
实验七 血清 IgG、IgA、IgM 定量测定(比浊法)	(24)
实验八 对流免疫电泳	(26)
实验九 循环免疫复合物测定(PEG 沉淀法)	(28)
实验十 免疫电泳技术分析人血清蛋白	(31)
第四单元 补体与补体参与的反应	(34)
实验十一 补体结合试验	(34)
实验十二 血清总补体溶血活性测定(CH_{50} 法)	(38)
第五单元 酶免疫检测技术	(41)
实验十三 ELISA 双抗体夹心一步法测 HBsAg	(41)
实验十四 ELISA 竞争法测抗-HBc	(44)
实验十五 ELISA 捕获法测抗-HAV-IgM	(47)

2 目 录

实验十六 ELISA 间接法测抗 - HCV - IgG	(49)
第六单元 其他免疫标记技术	(52)
实验十七 荧光免疫测定技术	(52)
实验十八 斑点金免疫渗滤试验	(54)
实验十九 斑点金免疫层析试验	(57)
实验二十 发光免疫技术	(59)
第七单元 细胞免疫检测技术	(62)
实验二十一 外周血单个核细胞的分离	(62)
实验二十二 E 花环形成试验	(64)
实验二十三 T 淋巴细胞转化试验	(67)
第八单元 非特异免疫功能测定	(70)
实验二十四 中性粒细胞吞噬功能检测(小吞噬试验)	(70)
第九单元 其他免疫学实验	(72)
实验二十五 动物(豚鼠) I 型超敏反应试验	(72)
病案综合分析	(74)
附录	(75)
附录一 免疫学实验常用试剂及溶液的配制方法	(75)
附录二 洗液的配制	(84)
附录三 微量加样器质控及校准标准操作程序	(85)
参考文献	(89)

实验室规则

免疫学实验所使用的实验材料，有些为病原微生物，在实验中如果防护不当，便有发生人身感染的可能。所以要求同学认真遵守下列各点：

1. 进入实验室后穿上工作衣，离开实验室时脱下反叠带走。尽量不带个人生活、学习用品入实验室，必要的用具带入后，应放在远离操作的位置。

2. 实验室内严禁吸烟、进食、饮水，严禁用嘴吸移液及润湿标签，尽量不要用手触摸头面部及身体其他暴露部位。

3. 在实验室内应保持安静、整洁、有秩序，不得高声谈笑、随便走动，以免影响他人实验。

4. 实验仪器的操作、使用，必须在教师的指导下，严格按照仪器的操作规范和使用要求进行，不得进行与实验无关的操作，以及随意开关、搬动、拆卸仪器。

5. 实验室内一旦发生意外，如吸入菌液、刺破皮肤、细菌污染桌面或地面等，应立刻报告教师，及时进行处理，切勿隐瞒或自行处理。

6. 被污染过且需要回收的吸管、滴管、试管、玻片等物品，应在使用完后立即投入已准备的消毒液中，不得放在桌面上或水槽内。

7. 动物尸体、有毒有害的废液及废弃物品，应按实验室的要求放置，以便集中处理；强酸、强碱不能倒入水槽，以免腐蚀下水管道。

8. 爱护公物，节约试剂材料，不得将实验室任何物品私自带走。如遇仪器、用品损坏，应报告指导教师并按规定予以赔偿。

9. 实验完毕，整理桌面，值日生打扫室内卫生，最后离开的同学应注意关好水电、门窗，洗手后离室。

第一单元 免疫血清的制备

抗体是机体接受抗原刺激后所产生的一类具有免疫特异性的球蛋白。抗原和抗体既是免疫学检测的两个重要指标，又是体外抗原抗体反应，即血清学反应中最基本的试剂。在免疫学实践中，为了制备抗体，常需要给动物注射抗原性物质（如细菌、病毒、类毒素、血清及其他蛋白质等），经过免疫一定时间后，动物血清中可以产生大量的特异性抗体。这种含有特异性抗体的血清称为免疫血清。免疫血清不仅广泛应用于传染病的诊断、预防和治疗等方面，而且对器官移植、肿瘤治疗及相关科研工作也具有重要意义。

免疫血清的制备是一个系统的综合性实验，包括制备抗原、免疫动物、采血、分离血清、免疫血清的纯化、鉴定等步骤。制备高效价和高特异性的抗体是免疫学的重要基本技术之一。抗体的产生通常与抗原的质和量、动物种类，以及接种途径和程序有密切关系。因此，在制备免疫血清时，要根据抗原的不同种类来选择适宜的动物种类和免疫方法。

实验一 抗体制备技术（溶血素的制备）

【目的和要求】

1. 掌握免疫血清制备的基本原理。
2. 熟悉免疫血清制备的基本操作。

【实验原理】

具有免疫原性的抗原可刺激机体相应的 B 淋巴细胞增殖、分化形成浆细胞，并分泌特异性抗体。由于抗原分子表面的不同抗原决定簇为不同特异性的 B 淋巴细胞克隆所识别，因此由某一种抗原刺激机体后产生的抗体，实际上为针对该抗原分子表面不同抗原决定簇的多种抗体的混合物（即多克隆抗体）。抗原进入机体的数量、途径、2 次免疫间隔时间、次数等都可以影响机体对抗原的免疫应答。

本实验用绵羊红细胞（SRBC）来自免疫家兔，心脏采血，分离血清，血清中可获得抗绵羊红细胞抗体（抗-SRBC）。SRBC 与抗-SRBC 抗体结合，有补体存在时，可出现红细胞溶解，因此抗-SRBC 抗体又称为溶血素。

【试剂与仪器】

1. 动物 健康成年雄性家兔（2~3kg）、健康绵羊。
2. 碘酒、75% 乙醇、无菌生理盐水、保存液（阿氏液）等。
3. 无菌三角瓶（内装玻璃珠）、离心管、吸管、注射器。

4. 离心机。

【方法】

1. 抗原的制备 (绵羊红细胞悬液的制备)

(1) 采血 用 2.5% 碘酒、75% 乙醇消毒绵羊皮肤, 从颈静脉抽血, 注入含有玻璃珠的三角瓶内, 摇动三角瓶, 脱纤维抗凝。绵羊血也可与灭菌的保存液 (Alsever 液) 等量混合, 置冰箱中, 可保存数周。

(2) 洗涤血球 无菌手续取抗凝绵羊血于离心管中, 加入适量生理盐水, 2000r/min 离心 5min, 弃上清液。再加入 2~3 倍的生理盐水, 并用毛细滴管反复吹打混匀, 2000r/min 离心 5min, 弃上清液。如此连续洗 3 次, 最后 1 次可离心沉淀 10min, 以使红细胞密集于管底。直至上清液透明无色再弃去上清液, 留密集红细胞备用。如果洗涤 4 次则红细胞变脆不适于使用。

(3) 用生理盐水将红细胞配成需要的浓度, 即为试验用的红细胞悬液。如需 10% SRBC 悬液时, 则吸取 1ml 洗涤后的红细胞加生理盐水 9ml 即成。

2. 免疫动物

(1) 取健康雄性家兔若干只 (根据需要而定), 具体的免疫程序见表 1-1。

表 1-1 绵羊红细胞免疫家兔程序

日期	剂量 (ml)	途径
第 1 天	10% SRBC 悬液 0.5	皮内
第 3 天	10% SRBC 悬液 1.0	皮内
第 5 天	10% SRBC 悬液 1.5	皮内
第 7 天	10% SRBC 悬液 2.0	皮内
第 9 天	10% SRBC 悬液 2.5	皮内
第 12 天	20% 红细胞悬液 1.0	静脉
第 15 天	20% 红细胞悬液 2.0	静脉

(2) 试血 末次免疫后第 7 天试血, 耳静脉采血 1ml, 分离血清, 作免疫溶血试验, 滴定溶血素效价达 1:2000 以上可放血, 分离血清, 放等量甘油防腐, 分装无菌安瓶, 贮于 4℃ 冰箱备用。若效价不够理想, 可再注射抗原, 再试血, 直至达到要求为止。

3. 放血 可以采用心脏采血法或颈动脉放血法。

(1) 心脏采用血法

①家兔仰面, 四肢缚于动物固定架上 (或由助手抓住四肢固定)。

②剪去左胸部皮肤的兔毛, 用碘酒、酒精消毒心前区皮肤。

③用左拇指摸到胸骨剑突处, 食指及中指放在右胸处轻轻向左推心脏, 并使心脏固定于左胸侧位置。在胸骨左缘外侧 1~2cm 左右、3~4 肋间处, 触摸到心脏搏动最强的部

4 第一单元 免疫血清的制备

位,选择心跳最明显处进针。

④用 50ml 注射器(连接 16 号针头),倾针 45° 角,对准心搏最强处刺入心脏抽血。

⑤将抽取的血液立即注入无菌三角烧瓶中,待凝固后分离血清。

(2) 颈动脉放血法

①家兔仰卧同上固定,头部略放低以暴露颈部,剃毛及消毒皮肤。

②沿颈部中线切开皮肤约 10cm,分离皮下组织,直至暴露出气管两侧的胸锁乳突肌。

③分离胸锁乳突肌与气管间的颈三角区疏松组织,暴露出颈总动脉后使之游离。

④于动脉下套入 2 根黑丝线,分别置于远心及近心端,结扎远心端的丝线,近心端的动脉用血管夹夹住。

⑤用尖头小剪刀在 2 根丝线间的动脉壁上剪一小口,插入塑料放血管。再将近心端的丝线结扎固定于放血管上,以防放血管滑脱。

⑥松开血管夹,使血液流入灭菌三角烧瓶中。一般 1 只家兔可放血 80~100ml。

4. 收获血清

将三角烧瓶中的血液置 37°C 温箱 1h,再置 4°C 冰箱内 3~4h。待血液凝固、血块收缩后,用毛细滴管吸取血清,于 3000r/min 离心 15min,取上清液,加入防腐剂(终浓度 0.01% 硫柳汞或 0.02% 叠氮钠),分装后置 4°C 冰箱中保存备用,或置 -20°C 以下冻存备用。

【结果判断】

收获的抗血清应是无菌、无溶血,其溶血素效价应高于 1:2000。

【结果记录】

【注意事项】

1. 注意无菌操作,并尽可能多采集血清。
2. 实验室制备抗体时,若血清的需要量不大,宜选择小动物免疫,便于管理。
3. 用细胞性抗原制备抗体时,多选用静脉注射途径免疫。免疫的次数、间隔时间以及试血时间均可随实验安排进行适当调整。

4. 免疫血清制备操作中要区别皮内注射和皮下注射。
5. 心脏采血时, 取血部位要准确, 不要划破家兔心脏。
6. 免疫用实验动物的抗体反应性个体差异较大, 因此免疫时至少应选用 2 只以上动物。另外, 不能使用妊娠动物。
7. 在免疫方法的选择上, 也可采用多点注射法免疫动物。即于家兔脊柱两旁选 6~7 点皮下注射, 同时于两侧肩部 (或臂部) 各注射一处。每点注射 0.2ml, 间隔 2 周后再于上述部位选不同点同上注射, 也可产生高效价的免疫血清。

【应用与评价】

溶血素可用于补体参与的溶血反应, 如 CH_{50} 测定和 C4 溶血活性测定。用溶血素和 SRBC 作指示系统, 可进行补体结合试验和抗补体试验。

【思考题】

1. 为什么要洗涤绵羊红细胞? 为什么在洗涤过程中要吸去红细胞表面的白细胞层?
2. 为什么要多次免疫动物?
3. 简述免疫血清制备的基本原理。

(赵晋英)

第二单元 免疫凝集类实验

实验二 直接凝集试验

(一) 玻片凝集试验(菌种鉴定)

【目的和要求】

1. 掌握玻片凝集试验的原理、方法、结果判断。
2. 熟悉玻片凝集试验的临床意义。

【实验原理】

用已知的诊断血清,与被检的未知细菌直接进行凝集试验,如出现特异性凝集,可确定被检细菌的种属或型别。

【试剂与仪器】

1. 诊断血清 有商品供应,严格按各种诊断血清的说明书使用。
2. 被检细菌 可挑取平板培养基上培养的菌落,或斜面培养基上的菌苔。
3. 生理盐水、载玻片、接种环。

【方法】

1. 基本步骤 见图2-1。

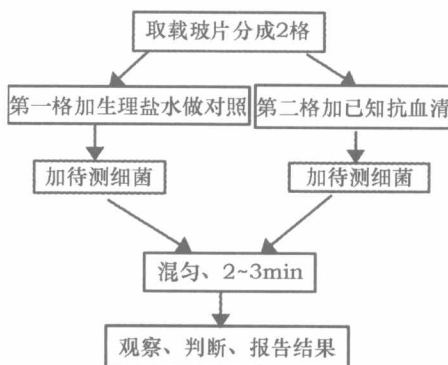


图2-1 玻片凝集试验基本步骤

2. 操作

(1) 取洁净的载玻片，用蜡笔分成2格，以灭菌接种环或无菌毛细吸管，蘸取或吸取生理盐水1环或1滴放于一侧作为对照，并用同样方法取1环或1滴诊断血清放于另一侧。

(2) 用灭菌接种环挑取被检细菌少许，分别涂于生理盐水和待测血清中（或先放在生理盐水中混匀，再蘸取混匀的菌悬液放入诊断血清中混匀）。

(3) 摇动玻片，2~3min后观察结果。

【结果判断】

1. 结果判断 若生理盐水中的细菌不凝，而诊断血清内的细菌迅速凝集，为阳性；若生理盐水和诊断血清中的细菌均不凝，为阴性；若生理盐水和诊断血清中的细菌都发生了凝集，则为假阳性，说明被检细菌有自凝现象或生理盐水中可能混入诊断血清。

2. 报告 例如，已知血清为抗某某菌血清，则可报告为：检出某某菌。

【结果记录】

【注意事项】

1. 诊断血清应保存于4℃冰箱中，超过有效期限的诊断血清不宜再用。

2. 挑取被检细菌时应为纯菌，不可混有杂菌。细菌需充分研磨均匀，无菌块，以免影响结果观察。

3. 在载玻片两端涂布细菌时，注意一定要先在生理盐水中涂，然后在诊断血清中涂，以免将血清误带入生理盐水中。

4. 必须做生理盐水对照。

5. 试验后的细菌仍有传染性，应将载玻片放入消毒缸内。

【参考范围】

与已知抗血清凝集者为阳性；反之为阴性。

【临床意义】

玻片凝集法多用于细菌的种属鉴定和分型，还可用于人类红细胞 ABO 血型的鉴定。

【应用与评价】

玻片凝集试验操作简单，反应迅速，设备器材要求不高，易被临床接受，但此方法仅能定性，且灵敏度较低。用途：适用于细菌的分型和 ABO 血型鉴定等。

【思考题】

1. 分析玻片凝集试验鉴定细菌的各个环节中可能出现的错误。
2. 列举出影响玻片凝集试验结果的主要因素。

（二）试管凝集试验（肥达反应）

【目的和要求】

1. 掌握肥达反应的实验原理、方法、操作步骤、结果观察。
2. 熟悉肥达反应的临床意义。

【实验原理】

肥达试验是用伤寒沙门菌的 O 抗原 (TO)、伤寒沙门菌的 H 抗原 (TH)、甲型副伤寒沙门菌鞭毛抗原 (PA) 和乙型副伤寒沙门菌鞭毛抗原 (PB) 分别制成的标准诊断菌液，来与患者血清做凝集试验，临床上用于辅助诊断伤寒、副伤寒。如果需要，有些地区可增加丙型副伤寒沙门菌鞭毛抗原 (PC) 或鼠伤寒沙门菌鞭毛抗原等其他沙门菌鞭毛抗原的诊断菌液。

【试剂与仪器】

1. 诊断菌液 市售的 TO、TH、PA、PB 标准诊断菌液。
2. 被检血清 可以不加温灭活。
3. 生理盐水、器材试管、试管架、吸管、恒温水浴箱等。

【方法】

1. 基本步骤 见图 2-2。