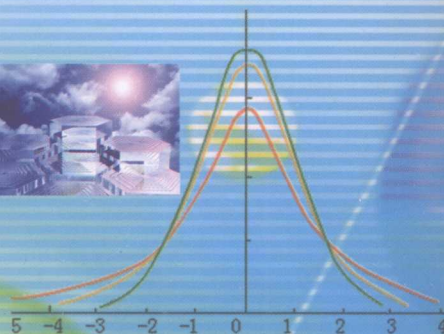


全国高等医药院校规划教材

微生物学与免疫学 实验教程

刘琥琥 主编



科学出版社

www.sciencep.com

全国高等医药院校规划教材

微生物学与免疫学 实验教程

主 编 刘琥琥

编 者 王卓娅 邓祖军 刘琥琥 周玉珍

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书根据不同主题将 155 个实验项目有机组合编写成 17 个综合性实验,分上、下两篇。本书特别重视基本技能训练,编写了 12 个免疫技能实验(上篇实验一)和 72 个微生物技能实验(下篇第一部分)。在上篇,沿着固有免疫、特异性免疫、超敏反应这条主线,用 19 个理论验证性实验编写成三个综合实验(实验二~四)。下篇第二部分为微生物鉴定实验,其中实验十三~十五用 37 个实验全新编写成三个系统性实验,可全过程指导学生完全独立地进行细菌常规鉴定。本书最多可供 54 实验学时使用。

本书供高等院校临床、预防、基础、口腔、药学、护理、中药学和生物技术各专业本、专科学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学与免疫学实验教程 / 刘琥琥主编. —北京:科学出版社,2009
(全国高等医药院校规划教材)
ISBN 978-7-03-025465-8

I. 微… II. 刘… III. ①病原微生物-实验-医学院校-教材 ②免疫学-实验-医学院校-教材 IV. R37-33 R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 153274 号

策划编辑:周万灏 李国红 / 责任编辑:周万灏 李国红 / 责任校对:鲁 素
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 8 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 8 月第一次印刷 印张:11 插页:1

印数:1—5 000 字数:256 000

定价:22.00 元

如有印装质量问题,我社负责调换

编写说明

免疫学与微生物学是临床医学、预防医学、药学、中药学和生命科学各专业学生的两门重要专业基础课程。免疫学与微生物学的理论体系是在长期科学实验基础上建立和发展起来的,其实践性很强。因此,搞好实验课教学是加强理论课教学、提高教学质量的重要环节。进入 21 世纪后,这两门课程的教材已经在内容上有了进一步的改进,为了配合新教材,充实实验教学内容,使学生有一本内容较全面、实用性较强的实验课教材,我们新编了《微生物学与免疫学实验教程》,供临床医学、预防医学、药学、中药学和生物技术各专业的本、专科学生使用。

编写本实验教程的目的有二:

一是作为理论课的实验补充教材。由于篇幅所限,理论教科书中所涉及的不少实验,对其原理、操作技术、应用与实际意义等内容,常常是阙如或一带而过。因此,本书简明扼要地讲解了常见免疫学与微生物学实验的原理、操作技术、实际应用和意义,以帮助学生加深对理论知识的理解。

二是作为实验操作指导。本书所编写实验的材料准备、操作步骤和技术,绝大多数都由作者多次亲自动手操作过,并结合了我们多年教学科研的实践经验,实用性很强。对一些操作要点、难点、涉及实验成功与实验室安全的关键之处还做了特别提示,能很好地帮助学生安全顺利地进行实验,并获得正确实验结果。

为了深化实验教学改革,增强学生动手能力,培养更多的科学研究型学生,本实验教程编写的 17 个实验都是综合性实验,每一个实验都将涉及某一方面或一个共同主题的有关实验有机地组织在一起,以利于学生在更高层面上、通过实验对某些理论知识较全面深入地了解。本书还特别编写了三个有关细菌鉴定的系统性综合实验(实验十三~十五),从编写实验计划、实验材料准备直至撰写实验报告,全过程指导学生完全独立完成有关细菌常规鉴定实验,锻炼学生独立操作和解决实际问题的能力,并对科研过程有初步认识和了解。

在本实验教程编写过程中,我们还参考了多本兄弟院校的实验教材及其他文献和著作,努力使本书成为更有助于学生学习掌握理论知识和实验基本技能的辅助教材。但由于编者水平有限,缺点和错误在所难免,恳请各位同仁和同学批评指正。

编者

2009 年 8 月

目 录

实验室守则	(1)
-------------	-----

上篇 免疫学实验

实验一 常规免疫学诊断技术	(4)
一、凝集试验	(4)
二、琼脂扩散试验	(7)
三、琼脂凝胶免疫电泳	(10)
四、免疫标记技术	(14)
五、补体结合试验(半量法)	(17)
六、非特异性免疫诊断技术	(19)
实验二 非特异性免疫防御功能	(26)
一、血-脑屏障作用	(26)
二、吞噬功能	(27)
三、溶菌酶溶菌试验	(28)
四、血清总补体活性测定(CH_{50})	(29)
五、补体溶菌实验	(31)
实验三 特异性免疫防御功能	(33)
一、免疫血清的制备	(33)
二、血清特异性抗体效价测定	(35)
三、细菌毒素中和实验	(37)
四、分离外周血单个核细胞	(38)
五、E 花环形成试验(微量法)	(39)
六、T 淋巴细胞转化试验	(41)
七、B 淋巴细胞溶血空斑试验	(42)
实验四 超敏反应	(44)
一、动物 I 型超敏反应	(44)
二、新生儿溶血病诊断试验	(45)
三、循环免疫复合物检测(PEG 比浊法)	(46)

四、结核菌素试验	(47)
----------------	------

下篇 微生物学实验

第一部分 基本技能实验

实验五 细菌人工培养技术	(49)
一、微生物实验室安全与无菌操作技术	(49)
二、培养基制备	(51)
三、细菌培养法	(53)
实验六 微生物形态与结构观察技术	(61)
一、普通光学生物显微镜	(61)
二、微生物细胞形态与结构观察法	(64)
三、测量细菌大小	(70)
实验七 细菌生理性状检测技术	(74)
一、细菌生长实验	(74)
二、含碳化合物分解代谢试验	(76)
三、含氮化合物分解代谢试验	(80)
四、细菌动力观察	(81)
实验八 微生物控制技术	(85)
一、实验室微生物污染状况检测	(85)
二、微生物控制技术	(90)
实验九 细菌遗传性状检测技术	(95)
一、细菌表型变异	(95)
二、细菌基因型变异	(97)
三、诱变育种与筛选	(98)
实验十 药物体外抗菌实验技术	(102)
一、琼脂扩散法(agar diffusion test)	(102)
二、连续(试管)稀释法	(108)
实验十一 微生物致病性实验与小鼠实验技术	(111)
一、小鼠实验技术	(112)
二、微生物侵袭力观察实验	(115)
三、细菌毒素致病性实验	(117)

实验十二 药品卫生微生物学检验技术	(119)
一、药品无菌检查	(119)
二、药品微生物限度检查	(120)
三、热原质检查法(动物法)	(124)

第二部分 微生物鉴定实验

实验十三 革兰阳性球菌鉴定	(127)
一、配制培养基	(128)
二、分离培养	(128)
三、纯培养	(129)
四、生物学性状鉴定	(129)
五、致病性试验	(131)
六、甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌鉴定(碘淀粉平板法)	(133)
七、撰写鉴定报告	(134)
实验十四 肠杆菌科细菌鉴定	(136)
一、配制培养基	(136)
二、分离培养	(138)
三、纯培养	(138)
四、生物学性状鉴定	(139)
五、内毒素毒性试验	(141)
六、药物敏感试验	(142)
七、病后免疫力检查——肥达试验	(142)
八、撰写鉴定报告	(144)
实验十五 厌氧芽孢梭菌属细菌鉴定	(145)
一、配制培养基	(145)
二、厌氧分离培养	(146)
三、纯培养	(148)
四、生物学性状鉴定	(148)
五、致病性试验	(149)
实验十六 真菌	(150)
一、真菌培养	(150)
二、真菌形态观察	(152)

三、真菌致病性.....	(153)
实验十七 病毒	(155)
一、病毒培养法.....	(155)
二、病毒的检测.....	(158)
三、抗病毒特异性抗体检测.....	(162)
主要参考文献	(168)
彩图	

实验室守则

学生在实验室有时可能接触感染性病原微生物,为了防止实验室污染和人员感染、确保安全以及实验课顺利进行,学生进入实验室后必须严格遵守以下规定:

1. 进入实验室时必须穿好白大衣,不许穿拖鞋,无关物品不许带入室内。
2. 实验室内严禁携带任何食品和饮料,严禁吸烟。
3. 保持肃静,严禁喧哗打闹和随意走动,切勿互相碰撞,以免出现意外事故。
4. 应按照实验教程在教师严格指导下进行实验。对实验材料(特别是灭菌材料及含活菌材料)和实验操作有不明白之处,应仔细阅读实验教程或询问任课老师,待明白后再正确使用和操作,以期获得正确实验结果并确保安全。
5. 牢固树立安全意识,在使用感染性实验材料过程中应遵守以下规定:
 - (1) 接触过感染性材料或活菌的吸管、玻片等实验器材,用后应立即投入盛有来苏水溶液的消毒缸内浸泡,其余废弃物及器材应放在指定地方统一处理。
 - (2) 如不慎将感染性材料污染桌面、地面、书本和衣物时,桌面或地面应立即用 2% 来苏水冲洗,书本应用紫外线灯照射半小时,衣物应用苯扎溴铵溶液浸泡洗净。
 - (3) 若手上沾有活菌,应立即将手在 2% 来苏水溶液中浸泡 5min 左右,再用清水冲洗干净;若不慎将活菌吸入口中,应立即吐到来苏水缸内,然后用 2% 硼酸水充分漱口,必要时内服抗菌药物;若活菌溅入眼睛内,应立即用 1% 蛋白银或相关眼药水冲洗眼睛。
6. 实验结束后,需孵育的培养物应放至指定的温箱,要按规定时间及时认真观察、正确记录和分析实验结果,并按时独立完成实验报告。所有微生物培养物观察完毕后务必送洗涤室灭菌处理,不得随手乱放,更不得带出实验室。
7. 爱护公物,注意节约实验材料和水电,如损坏实验仪器和器材,应立即向任课老师报告并进行登记,按学院有关规定进行赔偿。
8. 保持室内整洁,下课后应归放整理好实验器材,用 2% 来苏水溶液擦洗实验桌面和地面,用消毒液泡手并冲洗干净,脱下白大衣反折好,关好水电开关和门窗后,方可离开实验室。

上 篇

免疫学实验





实验一 常规免疫学诊断技术

目的要求

1. 熟悉血清学反应的基本原理、反应条件、反应现象及实际应用意义。
2. 掌握凝集反应和琼脂扩散的实验操作和结果判定方法。
3. 了解其他免疫学诊断技术的基本原理、操作方法和结果判定方法。

实验内容

一种抗原分子只能与由它刺激产生的对应抗体高度特异结合而发生反应。抗原特异性取决于抗原表位的化学基团性质、数目及其立体构型,而抗体特异性则取决于 V 区的抗原结合部位与相应抗原表位空间构象吻合的程度。由于抗原与抗体的结合具有高度特异性,因此我们可利用已知抗体鉴定标本中的未知抗原(或反过来)。

应用免疫学理论和技术进行诊断是医学免疫学的一项基本内容,而常规免疫学诊断技术即是利用体外抗原-抗体反应(也称为血清学反应)原理设计的。目前,最为常用的免疫学诊断技术包括凝集反应、沉淀反应、琼脂凝胶免疫电泳、免疫荧光标记、酶免疫技术以及补体结合实验等。

在进行体外抗原-抗体反应时,只有当抗原和抗体分子比例最合适时,抗原与抗体结合充分,形成的抗原-抗体复合物大且多,上清液中几乎无游离的抗原或抗体存在,此时称为抗原-抗体反应的等价带(即平衡区),出现明显可见反应现象。当抗原量太少而抗体量太多(抗体过剩)时无沉淀物形成,称为前带现象;而当抗体量太少抗原量太多(抗原过剩)时,称为后带现象。前带现象与后带现象均不会出现可见反应。

测定抗原抗体分子比例是否合适,在进行沉淀反应时,一般用抗原稀释法,即抗体恒量而抗原做系列稀释(如下述单向琼脂扩散实验);在进行凝集反应时,一般用抗体稀释法,即抗原恒量而抗体做系列稀释(如下述外斐反应);或者用更为精确的抗原与抗体方阵滴定法。

一、凝集试验

当抗原或抗体其中一种物理状态为颗粒时,抗原与对应抗体特异性结合后,在电解质溶液中颗粒逐渐聚集,形成可见凝集块,称为凝集反应(agglutination reaction)。此反

应可分为直接凝集反应和间接凝集反应。

1. 直接凝集反应 在适宜电解质溶液中,天然颗粒性抗原悬液与其对应抗体发生特异性结合,抗体可将颗粒性抗原交叉联接,形成肉眼可见的凝集块,称为直接凝集反应(direct agglutination reaction)(图 1-1)。

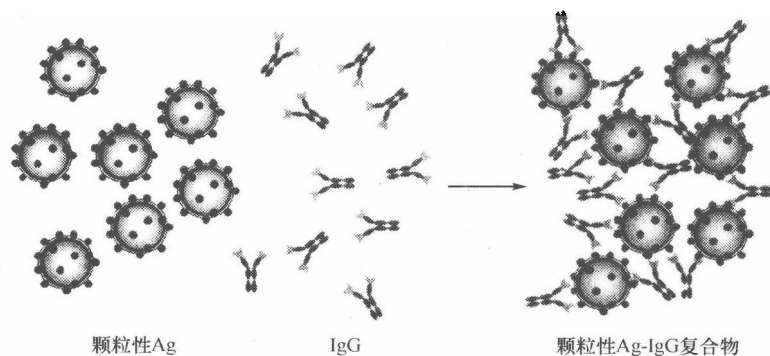


图 1-1 直接凝集反应原理示意图

2. 间接凝集反应 将可溶性抗原吸附于适当的微小颗粒载体表面,称之为抗原性致敏颗粒;若将抗体 Fc 段吸附于颗粒载体表面,则称之为抗体性致敏颗粒,此颗粒表面的 Ig-V 区仍可以与对应抗原特异性结合。常用的颗粒载体有红细胞(间接血凝反应)、胶乳颗粒、明胶颗粒、SPA⁺金黄色葡萄球菌(协同凝集反应)等。

在适宜电解质溶液中,致敏颗粒与相应抗体(或抗原)特异结合后,可出现凝集现象,称为间接凝集反应(indirect agglutination reaction)。间接凝集反应可分为(正向)间接凝集反应、反向间接凝集反应、间接凝集抑制反应和协同凝集反应等四类。

(1) (正向)间接凝集反应:诊断试剂为标准抗原的致敏颗粒,如果被检样品与抗原致敏颗粒混合后出现凝集现象,说明标本中含有对应抗体,此为凝集阳性反应。

(2) 反向间接凝集反应:诊断试剂为诊断抗体的致敏颗粒,如果被检样品与抗体致敏颗粒混合后,凝集阳性反应说明标本中含有与诊断抗体对应的抗原。

(3) 间接凝集抑制反应:诊断试剂为标准抗原致敏颗粒及其对应诊断抗体。先将被检样品与诊断抗体混合反应,再加入标准抗原致敏颗粒。若检测样品中含有与标准抗原相同的抗原,则没有诊断抗体与抗原致敏颗粒结合,不会出现凝集现象,此为阳性反应,说明被检样品中含有目标抗原。

(4) 协同凝集试验:诊断试剂为诊断抗体致敏的 SPA⁺金黄色葡萄球菌。大多数金黄色葡萄球菌细胞壁上有葡萄球菌 A 蛋白(SPA)。SPA 是 C 末端连接在金黄色葡萄球菌细胞壁上的一条肽链,其胞膜外肽链部分有 4 个可与人类或动物的 IgG-Fc 段结合的活性区段。当 SPA 与 IgG-Fc 结合后, IgG-Fab 仍保持与相应抗原分子特异性结合的能力,利用这一特性检测各种可溶性抗原的方法,称为协同凝集试验(coagglutination test)。

在凝集反应中, IgM 的凝集作用很强,与对应抗原形成的凝集块大,易于肉眼观察;而 IgG 凝集作用较差,若与抗原分子比例不太合适时,可能出现不完全凝集反应,即所形成的 Ag-IgG 复合物小而肉眼不可见。此外,因 Z 电位(Zeta potential)可使颗粒互相排

斥,适当增加电解质浓度可降低 Z 电位,促使凝集块形成。

(一) 人 ABO 血型鉴定——玻片凝集试验

玻片凝集试验(slide agglutination test)是在载玻片上进行的直接凝集反应,通常是将已知抗体(诊断血清)与适量未知颗粒性抗原(如细菌、红细胞等)悬液在载玻片上混匀,若出现凝集现象,说明未知抗原与已知抗体特异对应,为定性试验,常用于细菌种属鉴定、人类 ABO 血型鉴定(determine blood type)等。

1. 材料

- (1) 样品:自身手指血。
- (2) 诊断试剂:抗 A 血型定型试剂、抗 B 血型定型试剂。
- (3) 其他:无菌采血针、无菌毛细吸管、灭菌生理盐水(分装小试管:0.5ml/支)、载玻片、2.5%碘酒棉球、75%乙醇溶液棉球、灭菌干棉球等。

2. 方法

(1) 采血:用 2.5%碘酒棉球消毒待检者的手指尖端,用 75%乙醇溶液棉球脱碘,待干或用干棉球擦干。用采血针刺破手指,挤出血,用无菌毛细吸管采血 1~2 滴放入小试管内,与生理盐水混匀成红细胞悬液。

(2) 取清洁玻片 1 张,用油性笔在两边上角标注“A”或“B”,分别在 A 或 B 对应位置上各加 1 滴抗 A 或抗 B 血型定型试剂。

(3) 用毛细滴管吸取待检红细胞悬液,分别各加 1 滴于抗 A 或抗 B 血型定型试剂中。

(4) 手持玻片前后倾斜摇动,以使红细胞悬液与血型定型试剂充分混匀(注意切勿使“A”和“B”两边液体相混)。

3. 结果 边摇边观察有无凝集发生,发生凝集时可见液体澄清,红细胞凝集成小血块;无凝集者红细胞呈均匀分散(彩图 1)。若 10 分钟后仍无凝集,判断为阴性结果。如观察不清,可置低倍镜下检查。记录检查结果,参考表 1-1 判断被检者血型。

表 1-1 血型鉴定结果

抗 A 血型定型试剂	抗 B 血型定型试剂	血型
+	-	A
-	+	B
+	+	AB
-	-	O

注:“+”表示凝集;“-”表示不凝集

(二) 试管凝集试验

试管凝集试验(tube agglutination test)是定性和半定量试验,常用已知抗原检测血清中的相应特异性抗体及其含量,以辅助诊断疾病。一般将被检测血清样品在试管内作递减系列稀释,然后在每支试管中加入定量的已知颗粒性抗原(如标准菌种)悬液。若出

现凝集现象,说明被检血清样品中含有与已知抗原特异对应的抗体,把出现凝集程度为“++”的血清最高稀释倍数作为样品中抗体的效价(或滴度),是定性和半定量试验,如外斐反应、肥达反应等。参见本实验内容六。

二、琼脂扩散试验

可溶性抗原与其相应抗体结合形成肉眼可见的沉淀线或环,称为沉淀反应(precipitation reaction)。根据操作方法和反应介质不同,分为液体中沉淀试验和琼脂扩散试验(agar diffusion test)。目前,琼脂扩散试验应用最广。

琼脂(agar)是从石花菜、紫菜、江篱等大型海藻类植物中提取出来的藻胶类物质,由琼脂糖(agarose)和琼脂果胶(agarpectin)组成。琼脂糖是一种由1,3连接的 β -D-半乳糖和1,4连接的3,6-脱水 α -D-半乳糖交替组成的线状多聚糖,琼脂果胶是许多结构相似的小分子异质混合物,带硫酸根和羧基组分,凝胶能力差且会造成电内渗。琼脂具有亲水性,极少引起生物大分子变性和吸附,是理想的惰性载体。而且,由于几乎完全不被细菌、真菌等水解,因此是微生物固体培养基的最佳固形剂。

琼脂(粉)在水中加热到90℃以上溶化成液状,温度下降至约45℃以下时凝结成半固体状的凝胶。在浓度适宜的琼脂凝胶中,琼脂糖纤维聚集成胶束,胶束之间形成微孔状网格,将水分固化。抗原及抗体等蛋白质分子由于相对分子质量较小,可在凝胶网孔之间的液体中自由扩散。当抗原与抗体结合形成免疫复合物时,由于相对分子质量常在百万以上,受凝胶网格孔径的限制,不能自由运动,因此在抗原与抗体相遇处停滞,形成沉淀物。

常用的有双向扩散和单向扩散试验。

(一) 双向琼脂扩散试验

在琼脂板上间距适当地打一对孔(或者梅花孔、双排孔、三角孔等),在孔中分别加入可溶性抗原或抗体(图1-2A),当两者自由扩散相遇时可特异性结合,在抗原抗体分子比例合适处可成肉眼可见的沉淀线(图1-2B),称为双向琼脂扩散(double immunodiffusion)试验。由于不同的抗原抗体在琼脂中扩散的速度不同,而一对抗原抗体系统只能形成一条沉淀线,所以在琼脂凝胶中,每一条沉淀线均代表着一对特异对应的抗原和抗体。因此,该法主要优点是能够对抗原成分进行精细分析。

1. 血清甲胎蛋白(AFP)检测

(1) 材料

1) 样品:待检患者血清。

2) 试剂:AFP诊断血清,脐带(AFP阳性)血清,健康人(AFP阴性)血清,
1.2%生理盐水琼脂凝胶。

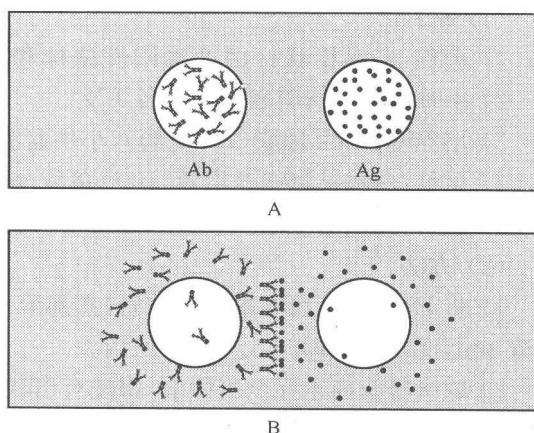


图1-2 双向琼脂扩散原理示意图

3) 器材:玻璃平皿($\Phi 60\text{mm}$),打孔器($\Phi 5\text{mm}$),微量加样器等。

(2) 方法

1) 制备琼脂凝胶板:取洁净 $\Phi 60\text{mm}$ 玻璃平皿 1 块,加已煮沸溶化的 1.2% 琼脂凝胶 10ml,铺成约 4mm 厚的琼脂凝胶板。待凝胶凝固后用打孔器按图 1-3 所示样式打孔,孔内径 5mm,孔间距 5mm。通过火焰微微加热,将凝胶与皿底之间的空隙封闭,防止样品溶液在孔底流散。

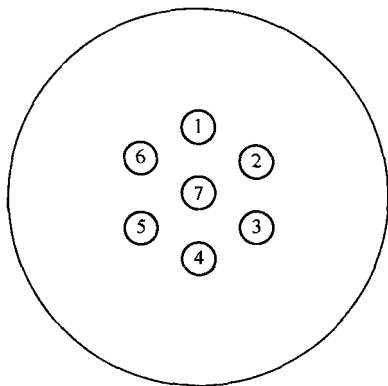


图 1-3 双向琼脂扩散加样图

⑦ 甲胎蛋白免疫血清;①④ 甲胎蛋白抗原阳性血清;⑥ 阴性对照血清;②③⑤ 待检患者血清

2) 加样:用微量加样器吸取 50 μl AFP 诊断血清加入中央 7 号孔内;1 和 4 号孔各加入脐带血清 50 μl ,作为 AFP 阳性对照;6 号孔加入健康人血清 50 μl ,作为 AFP 阴性对照;其余 3 孔分别各加入待检患者血清 50 μl (图 1-3)。

3) 将平皿置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 24 小时后观察结果。

(3) 结果:在琼脂凝胶板上,1、4 两孔为 AFP 阳性对照,在它们与中心孔之间各应出现 1 条白色沉淀线(阳性沉淀线)。其余各孔与中心孔之间,如有沉淀线且与阳性对照线平滑吻合,表明两条沉淀线为同一,即受检血清 AFP 阳性。如虽有沉淀线但与阳性对照线不吻合,则表明两条沉淀线非同一,为其他抗原抗体的沉淀线,判断为 AFP 阴性。如果 48 小时后待检血清与中心孔间仍无沉淀线形成,亦为 AFP 阴性(彩图 2)。

(4) 检测意义:甲胎蛋白(AFP)主要是胎儿时期产生的胚胎性蛋白,出生后不久血中就检查不出或者含量极低($<40\text{ng/ml}$)。AFP 在肝病、原发性肝癌或胚胎性癌等发生时在血液中出现并增加。非妊娠期被检者血液 AFP 定性检测结果如为阳性(正常情况应该是阴性),建议进一步进行定量检测。

2. 白喉棒状杆菌毒力试验(Elek 平板毒力试验)

(1) 材料

1) 菌种:白喉棒状杆菌产毒阳性菌株和产毒阴性菌株、待测白喉棒状杆菌 37 $^{\circ}\text{C}$ 、18~24 小时吕氏血清斜面培养物各 1 支。

2) 培养基:Elek 琼脂(15ml/管),小牛血清(或兔血清)。

3) 试剂:白喉抗毒素水溶液(1000 单位/ml)。

4) 器材:无菌滤纸条(60mm $\times$ 15mm),无菌空培养皿($\Phi 90\text{mm}$)。

(2) 方法

1) 将 Elek 琼脂培养基(15ml/管)煮沸溶化,待冷至 50~55 $^{\circ}\text{C}$ 时,无菌操作加入小牛血清 3ml,混匀后立即倾入无菌平皿内。

2) 琼脂凝胶尚未完全凝固前,将浸有白喉抗毒素溶液的灭菌滤纸条平铺在平板中央(在未贴前,滤纸条上过剩的抗毒素溶液应使滴尽),再放 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 1 小时,烘干表面水分。

3) 用接种环分别刮取白喉棒状杆菌产毒阳性及阴性菌株、待测白喉棒状杆菌的大量菌苔,如图 1-4 所示划线接种于滤纸条两侧,接种线紧靠滤纸条边缘并与纸条垂直,平板置 37℃ 培养 24、48、72 小时后观察结果。

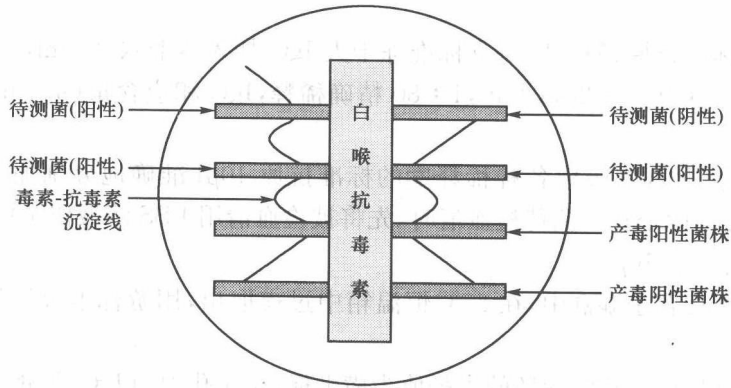


图 1-4 Elek 平板毒力试验

(3) 结果:肉眼直接观察,白喉棒状杆菌产毒阳性菌株,因能产生白喉毒素,在距离滤纸条约 1cm 处,形成一条喷泉式白色沉淀线。待检标本如为产毒菌株,会出现与阳性菌株沉淀线相吻合的白色沉淀线。不出现沉淀线则为阴性菌株,与已知阴性菌株结果相同(图 1-4)。

(二) 单向琼脂扩散试验

单向琼脂扩散(single radial immunodiffusion)是指可溶性抗原或抗体分子,其中一种固定在琼脂凝胶中,另一种则自由扩散。一般是将一定量的抗体混合于溶化的琼脂凝胶内倾注于玻璃板上,待胶凝固后打孔,将标准抗原与未知抗原分别加于孔中,使其在凝胶中向四周扩散。抗原与相应抗体在琼脂胶内结合后形成白色沉淀环,沉淀环直径的大小与抗原浓度成正比。用不同浓度的标准抗原(参考血清)扩散后制成标准曲线,根据所测样品沉淀环直径即可从标准曲线中求出样品抗原的含量。若将抗原固定在琼脂凝胶中,而抗体在琼脂凝胶中自由扩散,则称为反向单向琼脂扩散。

1. 材料

(1) 样品:待检人血清。

(2) 试剂:羊抗人 IgG 诊断血清(单扩效价 1 : 80),标准冻干人 IgG(标准抗原),pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液),3% 琼脂凝胶(用 pH7.2 PBS 溶液配制,内加 1% NaN₃防腐)。

(3) 器材:玻璃板(60mm×100mm),打孔器(Φ3mm),吸管,微量加样器,半对数坐标纸,湿盒,56℃ 水浴箱等。

2. 方法

(1) 配制诊断血清:按实际测定效价,用 PBS 溶液将羊抗人 IgG 血清作 1 : 160 稀释,保温于 56℃ 水浴中。