

普通高等教育“十二五”规划教材
全国高等医药院校规划教材

微生物学与 免疫学实验教程

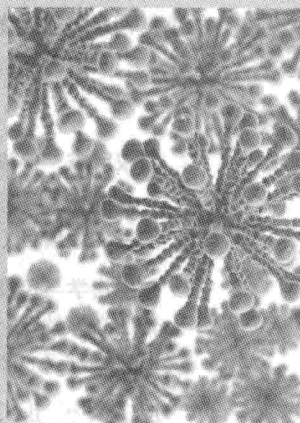


主编 郭焱 许礼发 李妍

清华大学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
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 郭焱 许礼发 李妍

清华大学出版社
北京

内容简介

本教材共分免疫学实验、病原微生物学实验、药物微生物学检查、附录四个部分。实验内容与规划教材相匹配,以基本技能实验为主,体现重基础的原则,同时增加了当前免疫学研究常用的前沿技术;实验项目多样化,适合多层次学生使用,可供不同专业、不同层次授课对象选用;避免了微生物学与免疫学相同技术的重复;增加了药物微生物学检查,可供高等医药院校本科生、研究生和相关专业教师使用。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

微生物学与免疫学实验教程/郭焱,许礼发,李妍主编. —北京:清华大学出版社,2014

普通高等教育“十二五”规划教材·全国高等医药院校规划教材

ISBN 978-7-302-35301-0

I. ①微… II. ①郭… ②许… ③李… III. ①医学微生物学—实验—高等学校—教材②医学—免疫学—实验—高等学校—教材 IV. ①R37—33②R392—33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第018862号

责任编辑:罗健 王华

封面设计:戴国印

责任校对:王淑云

责任印制:宋林

出版发行:清华大学出版社

网 址: <http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址:北京清华大学学研大厦A座 邮 编:100084

社总机:010-62770175 邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质量反馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印装者:北京密云胶印厂

经 销:全国新华书店

开 本:185mm×260mm

印 张:8.75

字 数:231千字

版 次:2014年3月第1版

印 次:2014年3月第1次印刷

印 数:1~2500

定 价:19.80元

产品编号:054828-01

编者名单

主 编 郭 焱 许礼发 李 妍

副主编 姜 成 鞠晓红 刘 斌

编 者 (以姓氏拼音为序)

顾红缨 (长春中医药大学)

郭 焱 (长春中医药大学)

侯殿东 (辽宁中医药大学)

黄红兰 (吉林大学)

黄 晶 (吉林大学)

姜 成 (福建中医药大学)

鞠晓红 (吉林医药学院)

阚俊明 (长春中医药大学)

李 欣 (长春中医药大学)

李 妍 (吉林医药学院)

刘 斌 (长春中医药大学)

刘 芬 (福建中医药大学)

朴松兰 (长春中医药大学)

史文婷 (长春中医药大学)

宋福春 (安徽理工大学)

王艾琳 (北华大学)

王冰梅 (长春中医药大学)

王淑敏 (长春中医药大学)

王月华 (吉林医药学院)

许礼发 (安徽理工大学)

于伟光 (长春中医药大学)

赵 雷 (长春中医药大学)

赵良中 (吉林医药学院)

周晓晶 (长春中医药大学)

随着生命科学的发展,微生物学与免疫学已渗透到生命科学的各个领域,成为生命科学及相关学科与科研不可缺少的部分,微生物学与免疫学实验也是医学、药学、生物技术等专业本科生必修的基础实验课程。为了适应现代科学技术的发展,适应高校教学改革,提高教学质量,培养开拓、创新型高级人才,我们根据多年的教学经验和生命科学发展趋势,在传统微生物学与免疫学实验的基础上,探讨新的实验教学方法,编写了本实验教程。本实验教材可供高等医药院校各专业、各层次学生选用。

本实验教程由免疫学实验、病原微生物学实验、药物微生物学检查及附录四个部分组成。第一部分除了介绍免疫学基本技术操作外,还系统介绍了当前免疫学研究常用的免疫荧光、免疫组织化学、免疫印迹、免疫胶体金、化学发光免疫分析等技术的原理、种类、应用和前沿发展状况;第二部分和第三部分所选实验与规划教材相匹配,对每个实验的基本原理、试剂配制、实验步骤、实验器材等都做了较为详细的叙述。通过较系统的训练,培养学生的逻辑思维、综合应用及动手能力,建立提高学生实践技能和科研能力培养的课程体系,为今后科研工作打下良好的基础。

在编写过程中,我们既要考虑配合课堂理论学习,又要注意训练学生的基本操作和基本技能,同时也增加了反映新技术、新方法的内容。我们力求保证每个实验的科学性、实用性和可靠性,对其中基本原理、试剂配制、实验步骤、实验器材等都做了较为详细的叙述。我们还对常用的实验仪器使用方法、样品的制备、试剂的配制等做了详细的介绍,使学生使用时更方便、易懂。

本教材是由编写团队在总结多年微生物与免疫实验教学的基础上,总结经验,不断完善并进一步修订而成的,但由于水平有限,在实验选材、编排上难免有不妥之处,恳请读者在使用中提出宝贵意见。

编者

2014年1月

第 1 部分 免疫学实验

1 抗原抗体反应	2
1.1 凝集反应	2
实验 1 直接凝集试验 (玻片法) ...	2
实验 2 直接凝集试验 (试管法) ...	3
附 1: 间接凝集试验	4
附 2: 间接凝集抑制试验	5
1.2 沉淀反应	6
实验 3 单向琼脂扩散试验	6
实验 4 双向琼脂扩散试验	7
实验 5 对流免疫电泳试验	7
附 3: 免疫电泳试验	8
1.3 补体测定	9
实验 6 补体介导的溶血反应	9
1.4 免疫标记技术	10
实验 7 酶联免疫吸附试验 (直接法)	10
附 4: 酶联免疫吸附试验 (间接法)	11
附 5: 酶联免疫吸附试验 (夹心法)	12
实验 8 间接免疫荧光试验	13
实验 9 免疫胶体金试验	15
2 免疫细胞检测技术	17
2.1 免疫细胞的分离	17
实验 10 外周血单个核细胞的 分离	17
实验 11 T、B 淋巴细胞的分离 ...	18

附 6: 免疫细胞分选 (免疫磁珠法) ...	19
2.2 免疫细胞数量的检测	20
实验 12 E 花环形成试验	20
2.3 免疫细胞功能的检测	21
实验 13 中性粒细胞吞噬功能 检测	21
实验 14 巨噬细胞吞噬功能检测 ...	22
实验 15 淋巴细胞转化试验 (MTT 法)	23
附 7: 淋巴细胞转化试验 (^3H -TdR 标记法)	24
实验 16 细胞毒性 T 细胞杀伤功能 测定	25
实验 17 NK 细胞活性测定	26
附 8: 免疫印迹试验	27
附 9: 免疫组织化学试验	29
附 10: 化学发光免疫分析试验	30
附 11: ELISA 法检测 HBsAg	32

第 2 部分 病原微生物学实验

3 微生物学基本技能实验	36
3.1 微生物学实验室常用仪器 设备	36
实验 18 微生物实验常用仪器 设备	36
实验 19 光学显微镜油镜的使用 ...	39
3.2 细菌形态学检查	40
实验 20 细菌的基本形态、特殊 结构观察	40

实验 21 革兰染色法	40	实验 44 其他病原微生物的形态及 培养物观察	70
实验 22 细菌动力检查法	41	4.2 病原微生物的其他检测方法	72
3.3 细菌的人工培养	42	实验 45 血浆凝固酶试验	72
实验 23 制备常用培养基	42	实验 46 抗链球菌溶血素“O”试 验(乳胶凝集法)	73
实验 24 细菌培养技术	43	实验 47 肥达反应	73
实验 25 细菌生长现象观察	46	实验 48 结核分枝杆菌抗酸 染色法	75
3.4 细菌的生化反应	47	实验 49 病毒鸡胚培养法	75
实验 26 糖发酵试验	47	实验 50 流感病毒的红细胞凝集 试验	77
实验 27 吲哚试验	48	附 13: 粪便标本中肠道杆菌的分离 鉴定	78
实验 28 甲基红(M.R)试验	49	第 3 部分 药物微生物学检查	
实验 29 乙酰甲基甲醇(V-P) 试验	50	实验 51 注射药物的无菌检查	84
实验 30 柠檬酸盐利用试验	51	实验 52 口服药物的微生物学 检查	84
实验 31 硫化氢试验	51	实验 53 外用药物的微生物学 检查	87
实验 32 硝酸盐还原试验	52	实验 54 细菌内毒素的检测	90
实验 33 石蕊牛乳试验	53	附 14: 药品微生物限度检查	91
实验 34 明胶液化试验	54	附 15: 土壤中抗生素产生菌的分离	93
3.5 细菌的药物敏感性试验	54	第 4 部分 附录	
实验 35 细菌对抗生素的敏感性 试验(纸片扩散法)	54	附录 1 实验室安全及防护知识	98
实验 36 细菌对中草药的敏感性 试验(打孔法)	57	附录 2 免疫血清制备、鉴定、纯化 及保存	99
实验 37 细菌对中草药的敏感性 试验(试管稀释法)	58	附录 3 常用培养基的制备	102
3.6 分子微生物学实验	59	附录 4 常用染色液的配制	111
实验 38 细菌 DNA 的提取	59	附录 5 常用溶液的配制	114
实验 39 质粒 DNA 的提取	60	附录 6 微生物菌种的保藏	120
实验 40 DNA 重组技术	61	附录 7 常用实验动物及基本技术	122
实验 41 PCR 技术	62	附录 8 显微镜技术	126
附 12: 细菌培养及检测程序	64	参考文献	130
4 病原微生物学实验	67		
4.1 病原微生物的形态检测	67		
实验 42 病原性球菌的形态及培 养物观察	67		
实验 43 肠道杆菌的形态及培养物 观察	69		

第 1 部分

免疫学实验

1 抗原抗体反应

1.1 凝集反应

实验 1 直接凝集试验（玻片法）

【目的要求】 掌握玻片直接凝集试验的原理、操作方法，并能应用该原理进行结果判断及实际应用。

【基本原理】 在适当电解质存在的条件下，将病原微生物或红细胞等颗粒性抗原与相应的已知抗体混合于载玻片上：如两者相对应，则发生特异性的结合，形成肉眼可见的块状凝集物，则为阳性；如两者不相对应，则不发生特异性结合，浑浊均匀，不形成肉眼可见块状凝集物，则为阴性。该试验属定性试验，主要用于未知抗原的检测，常用于人类红细胞 ABO 血型鉴定和细菌的分型、鉴定。

以人类红细胞 ABO 血型鉴定试验为例，人类红细胞 ABO 血型抗原分为两种，即 A 抗原和 B 抗原。红细胞膜上含有 A 抗原为 A 型血，红细胞膜上含有 B 抗原为 B 型血，红细胞膜上含有 A 和 B 两种抗原为 AB 型血，红细胞膜上 A 和 B 两种抗原都不含有为 O 型血。将已知标准抗 A 和抗 B 血清分别与受检者待测红细胞混合，观察有无红细胞凝集块出现：若抗原与抗体相对应，特异性结合，发生凝集，则肉眼可见红细胞块状凝集；反之，则不凝集。由此来判定受检者红细胞膜上是否存在 A 抗原和（或）B 抗原。

【主要材料与设备】

- (1) 受检者标本。
- (2) 抗 A 和抗 B 标准血清（常于血清内加适当染料以示区别，A 型为红色，B 型为蓝色）、生理盐水。
- (3) 刺血针、载玻片、小试管、酒精棉球、消毒干棉球、毛细吸管、牙签（或小玻棒）、光学显微镜、特种铅笔（油性记号笔）、消毒缸等。

【方法】

- (1) 用特种铅笔（油性记号笔）在洁净载玻片上将其划分为两等份，在每等份角上分别用“A”、“B”二字标注。
- (2) 用酒精棉球消毒受检者的手指尖端皮肤（或耳垂），待干后，用刺血针刺破皮肤，取 1~2 滴血放入盛有 1ml 生理盐水的试管中混匀，制成浓度约为 1% 的红细胞悬液。
- (3) 在载玻片 A、B 格内分别滴加抗 A 标准血清和抗 B 标准血清各 1 滴。
- (4) 用毛细滴管吸取浓度约为 1% 的待检红细胞悬液，分别各加 1 滴于载玻片上的抗 A 标准血清和抗 B 标准血清中。用牙签（或小玻棒）分别将 1% 待检红细胞悬液与抗 A 标准血清或抗 B 标准血清搅拌混匀（注意不能交叉使用牙签），为使其充分混匀，也可轻轻晃动载玻片。使用过的牙签（或小玻棒）要置于消毒缸内。

(5) 1%待检红细胞悬液与抗 A 标准血清或抗 B 标准血清搅拌混匀后，将载玻片平置于实验台上，5~10min 后在白色背景下观察有无肉眼可见的凝集块出现。若肉眼观察不够清楚，可在低倍显微镜下观察。

【结果】 待检红细胞悬液与抗 A 标准血清或抗 B 标准血清混合液由均匀浑浊逐渐变得透明，并有肉眼可见的红色凝集块出现，则为阳性；如果混合液始终浑浊不透明，无肉眼可见的红色凝集块出现，则为阴性。血型鉴定试验结果及判定标准见表 1-1。

表 1-1 血型鉴定试验结果判定标准

血型	血型诊断血清	
	抗 A	抗 B
A 型	+	-
B 型	-	+
AB 型	+	+
O 型	-	-

注：“+”表示凝集；“-”表示无凝集。

【注意事项】

- (1) 待检红细胞悬液不宜过稀或过浓，以免影响结果判断。
- (2) 使用的载玻片要清洁，并用特种铅笔（油性记号笔）做好 A、B 标记，防止结果误判。
- (3) 观察试验结果要及时，以免标本放置时间过长致标本干涸而影响对结果的观察和判定。
- (4) 用牙签（或小玻棒）将待检红细胞悬液与抗 A 标准血清或抗 B 标准血清混匀后，要更换牙签（或小玻棒）再混合另一种血清，以免结果误判。

实验 2 直接凝集试验（试管法）

【目的要求】 掌握试管凝集反应的原理和方法以及凝集效价的判定方法。

【基本原理】 试管凝集试验指用一系列试管内的生理盐水对待测血清进行倍比稀释，然后分别在各管内加入等量已知的颗粒性抗原悬液，并与之混匀，经过一定时间的静置后，观察试管底部是否产生肉眼可见的凝集团块。根据凝集程度，对待测血清中未知抗体的相对含量（效价）进行判断。即用已知的颗粒性抗原来测定待测标本中抗体及其相对含量（效价）。

【主要材料与设备】

- (1) 1%绵羊红细胞生理盐水混合悬液。
- (2) 1 : 10 抗绵羊红细胞免疫血清（稀释前须在 56℃ 条件下灭活 30min）。
- (3) 试管、试管架、生理盐水。
- (4) 1ml 刻度吸管（微量移液器）、吸液橡皮乳头、恒温培养箱等。

【方法】

- (1) 将做好标记的 8 支试管，按顺序排列于试管架上，然后每支试管加入生理盐水 0.5ml。
- (2) 在第 1 支试管中，用吸管吸取 1 : 10 抗绵羊红细胞免疫血清 0.5ml 并充分混匀。
- (3) 用吸管从混匀后的第 1 支试管中吸取 0.5ml 加入第 2 支试管，然后将第 2 支试管混匀后，再吸取 0.5ml 加入第 3 支试管，依次逐个试管进行倍比稀释，直到第 7 支试管混匀后吸取 0.5ml 并弃去。第 8 支试管不加抗绵羊红细胞免疫血清，以生理盐水作为对照。倍比稀释后的 1~7 支试管中抗绵羊红细胞免疫血清的稀释度分别为 1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320、1 : 640、1 : 1280。

(4) 每支试管分别加入充分混匀的1%绵羊红细胞悬液0.5ml。混匀后,第1~7支试管的抗绵羊红细胞免疫血清的最终稀释度分别为1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560。

(5) 将混匀后的试管放置于37℃恒温箱孵育1h后取出观察并记录实验结果。

【结果】 首先观察第8支试管(对照管),应无抗绵羊红细胞免疫血清,此管应不发生凝集,红细胞由于静置1h,在重力作用下自然沉淀,在管底呈边缘规则的圆盘形。然后从第1支试管开始观察管内沉淀物,来判断凝集程度。不凝集者以“—”表示;“++++”、“+++”、“++”、“+”表示凝集强度。“—”:红细胞边缘规则的圆盘形沉于管底,无凝集;“+”:红细胞呈较大圆盘形沉于管底且其边缘有少量凝集颗粒;“++”:中央呈较小的圆盘形沉于管底且其边缘有明显的凝集颗粒;“+++”红细胞贴于管底且边缘不整齐;“++++”:边缘呈锯齿状,不规则铺于管底,完全凝集。

凝集效价的判定:以能出现“++”凝集现象的血清最高稀释度为该免疫血清的凝集效价(滴度)。

【注意事项】

- (1) 血清倍比稀释时要防止跳管,应按照顺序逐管稀释。
- (2) 为去除补体的活性对凝集结果的影响,免疫血清稀释前,需要在56℃条件下加热30min,使补体灭活。
- (3) 为防止凝集物摇散,观察结果前不要摇动试管。
- (4) 免疫血清的凝集效价(滴度)的判断以血清最高稀释度或血清最终稀释度为准。

附1:间接凝集试验

【目的要求】 掌握间接凝集试验的原理、方法及应用。

【基本原理】 可溶性抗原与相应抗体结合不形成肉眼可见的凝集颗粒。将可溶性抗原(或抗体)包被于与反应无关的载体颗粒表面(常见载体颗粒如乳胶颗粒、红细胞等),形成致敏的载体颗粒,再与相应的抗体(或抗原)结合,在适宜电解质存在的条件下,出现凝集现象称为间接凝集反应。以类风湿因子(rheumatoid factor, RF)检测试验为例:临床免疫检验中测定的RF的主要类型为IgM型,还可是IgA或IgG类抗体,是机体产生的抗变性IgG的自身抗体,也是抗人或动物IgG Fc段的抗体。将IgG吸附于聚苯乙烯胶乳颗粒,若待测血清中有RF,可与含有IgG的聚苯乙烯胶乳颗粒发生反应,出现肉眼可见的凝集颗粒;相反,若不含有RF,则不出现凝集颗粒。这种方法灵敏度和特异性均不高,只能定性检出血清中的IgM型RF。

【主要材料与设备】

- (1) 新鲜待测血清。
- (2) RF(含IgG聚苯乙烯)胶乳颗粒试剂。
- (3) 阳性对照试剂、阴性对照试剂。

【方法】

- (1) 取出并核对检测试剂(RF胶乳颗粒试剂、阳性对照试剂、阴性对照试剂)。
- (2) 在3个反应板中分别滴加未稀释新鲜待测血清1滴(20μl),并标记为1号、2号、3号反应板,然后在1号反应板加RF胶乳颗粒试剂1滴,2号反应板加阳性对照试剂1滴,3号反应板加阴性对照试剂各1滴,并轻轻摇动使其与血清充分混匀。
- (3) 2min后,观察各反应板有无颗粒样凝集物沉淀。

【结果】 2min后,阳性对照出现白色颗粒样凝集物沉淀,阴性对照液体内无颗粒样凝集物沉

淀。待测血清若含有 RF，则出现白色颗粒样凝集物沉淀；若不含有 RF，则无沉淀。

【注意事项】

- (1) 试剂盒置于 2~10℃ 条件下保存，切忌冷冻。
- (2) 使用前要将试剂预置，使其温度达到室温，分别观察有无肉眼可见絮状沉淀，若有，则不能使用。

附 2：间接凝集抑制试验

【目的要求】 掌握间接凝集抑制试验的原理、操作方法及其用途。

【基本原理】 本实验主要用于待测样品中可溶性抗原的检测。用已知的抗体检测待测样品中有无相应的可溶性抗原：若含有相应的可溶性抗原，抗原与对应抗体特异性结合，再加入含有相同抗原的致敏颗粒（作为载体），不发生凝集现象，为阳性；若不含有相应的可溶性抗原，抗原与抗体不发生结合，再加入含有相同抗原的致敏颗粒（作为载体），已知抗体可与含有相同抗原的致敏颗粒（作为载体）特异性结合，发生凝集现象，为阴性。本试验常用于妊娠早期诊断或某些传染病的辅助诊断等。以妊娠早期诊断（乳胶妊娠试验）为例：正常人尿液中不含有绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin, HCG）。将含有 HCG 的待测的孕妇尿液加入一定量的已知 HCG 抗体，再加入含有相同抗原的乳胶颗粒（吸附有 HCG 抗原的乳胶颗粒），无肉眼可见凝集颗粒，试验为阳性，即待测样品中的 HCG 抑制了 HCG 抗体与 HCG 抗原乳胶颗粒的结合；反之，则为阴性。

【主要材料与设备】

- (1) 待检尿液、孕妇尿液（含 HCG）、正常尿液（或生理盐水）。
- (2) 抗血清（兔抗人 HCG 抗体）、聚苯乙烯胶乳抗原（吸附有 HCG 抗原的乳胶颗粒）。
- (3) 黑色玻璃板（或载玻片）、滴管、记号笔、牙签、光学显微镜等。

【方法】

- (1) 用记号笔标记含有 3 个直径为 2.5~3.0cm 漆圈的黑色玻璃板，且圈 1 检测待检尿液，圈 2 检测孕妇 HCG 阳性尿液，圈 3 检测正常尿液（或生理盐水）。
- (2) 用洁净的滴管分别吸取待检尿液、孕妇 HCG 阳性尿液、正常尿液（或生理盐水）于圈 1、圈 2、圈 3 内，然后在各圈内分别滴加 1 滴抗血清（兔抗人 HCG 抗体），用牙签混匀各圈内液体，轻轻连续摇动 1~2min。
- (3) 各圈再各滴加 1 滴聚苯乙烯胶乳抗原（吸附有 HCG 抗原的乳胶颗粒），用牙签混匀，轻轻连续摇动 2~5min 后观察结果（表 1-2）。

表 1-2 乳胶妊娠试验

	圈 1（试验圈）	圈 2（阳性对照圈）	圈 3（阴性对照圈）
结果	凝集或不凝集	不凝集	凝集

【结果】 阳性对照圈检测样本为孕妇 HCG 阳性尿液，不出现凝集颗粒，呈乳胶状，说明检测样本中含有 HCG；阴性对照圈检测样本为正常尿液（或生理盐水）出现肉眼可见的凝集颗粒，说明检测样本中不含有 HCG；试验圈检测样本为待检尿液，如出现均匀一致的凝集颗粒，则为阴性，待检样本中不含有 HCG，为非妊娠尿；如不出现凝集颗粒，则为阳性，待检样本中含有 HCG，为妊娠尿。

【注意事项】

- (1) 不同样本混匀用的牙签和滴管不能交叉使用，防止结果误判。

(2) 所用试剂〔如抗血清(兔抗人 HCG 抗体)、聚苯乙烯胶乳抗原(吸附有 HCG 抗原的乳胶颗粒)〕使用时要摇匀且必须在有效期内使用。

(3) 如肉眼不能观察到凝集颗粒,可在光学显微镜低倍镜下观察样本。

(4) 试验操作方法严格按照规定步骤,不能混淆待测标本和试剂的加入顺序,否则影响结果判断。

1.2 沉淀反应

实验3 单向琼脂扩散试验

【目的要求】 了解单向琼脂扩散试验的原理和操作方法。

【基本原理】 该实验系定量试验,将某种抗体混合于琼脂内,然后倾注于载玻片上,制成含抗体的琼脂板,然后在琼脂板上琼脂层打孔,再加一定量的抗原于孔内,孔内抗原向四周扩散,而琼脂内抗体不再扩散。当抗原与相应已知抗体在琼脂内比例合适时,形成肉眼可见的白色沉淀环(由抗原抗体复合物构成),其直径(或面积)与抗原浓度成正比。以沉淀环直径为纵坐标,抗原浓度为横坐标,分别用不同浓度的标准抗原制成标准曲线,待测抗原含量可根据其沉淀环直径大小,从标准曲线上中求得。本试验主要用于检测补体成分和免疫球蛋白(IgG、IgA 等)的含量。

【主要材料及设备】

(1) 抗原:待测血清、参考血清(用以制成标准曲线)。

(2) 抗体:羊抗人 IgG 单价诊断血清。

(3) 生理盐水、3%生理盐水琼脂、微量加样器、载玻片、直径 3mm 打孔器、温箱、湿盒等。

【方法】

(1) 含抗体琼脂板的制备:取羊抗人 IgG 单价诊断血清,如诊断血清单向扩散效价为 1:80,则将 0.3ml 诊断血清加入 11.7ml 生理盐水中,制成 1:40 的诊断血清稀释液,混合均匀后,置于 56℃ 水浴中恒温 2~3min。然后将制备好的 3% 生理盐水琼脂加热溶化(沸水浴或微波炉加热溶化),置于 56℃ 水浴中,待恒温后,加入等量 1:40 的诊断血清稀释液,混匀后,迅速浇注载玻片上,每片约 3.5ml,待载玻片冷却凝固,此时抗体琼脂板中抗血清按 1:80 比例稀释。

(2) 稀释待测血清:用生理盐水将待检血清 1:40 稀释。

(3) 打孔:在制备的凝固抗体琼脂板上用直径 3mm 打孔器打孔,孔间距约 15mm,注射器针头挑琼脂时,勿将孔缘损坏。

(4) 加样:用加样器吸取已稀释待测血清 10 μ l,每份标本加 2 个孔,每孔加满但不能溢出。

(5) 温育:将加样后的载玻片置于湿盒内,放于 37℃ 恒温箱中,24~48h 后观察结果。

【结果】 用标准尺精确测量肉眼可见白色沉淀环的直径,取待测样品 2 孔的平均值,若沉淀环不太圆,可记录其直径的最大值和最小值的平均数。从标准曲线上查得相应 IgG 含量。

【注意事项】

(1) 制备抗体琼脂板时,必须将诊断血清与琼脂充分混匀,浇板时速度要均匀,不能使琼脂冲出载玻片外,制备的抗体琼脂板要平整、均匀,无气泡,布满整个载玻片。

(2) 诊断血清与琼脂混匀过程中,温度要控制在 56℃,温度过高,会使抗体变性或降低其活性,温度过低,会使琼脂凝固不能浇板或诊断血清与琼脂不能充分混匀。

(3) 打孔时要避免水平移动,防止琼脂板裂开或脱离载玻片。

(4) 本试验是定量试验, 必须严格控制可能影响检测结果的各种因素, 如琼脂的浓度、浇板的均匀度、稀释抗原的浓度等。

实验4 双向琼脂扩散试验

【目的要求】 了解双向琼脂扩散试验的原理和操作过程。

【基本原理】 将可溶性抗原与相应抗体分别加入到琼脂凝胶板上相对应的小孔内(一般相邻近的小孔), 抗原和相应抗体分别向周围扩散。当抗原与相应抗体相遇时发生特异性结合, 两者在最适浓度比例时形成清晰的白色沉淀线。根据沉淀线是否出现, 可用已知抗原(或抗体)来鉴定未知的抗体(或抗原), 常用于对抗原或抗体的定性分析、纯度测定, 也可对其进行半定量检测。

【主要材料与设备】

- (1) 羊抗人 IgG 诊断血清、15g/L 盐水琼脂。
- (2) 待测血清、阳性血清(阳性对照)。
- (3) 直径 3mm 打孔器、微量加样器、载玻片、吸管、湿盒、温箱等。

【方法】

(1) 琼脂板的制备: 将载玻片水平放置于桌面上, 用 5~10ml 吸管吸取 15g/L 盐水琼脂 3.5ml, 浇注于载玻片上。

(2) 打孔: 待浇注琼脂凝固后, 用直径 3mm 打孔器打孔, 孔型一般为梅花形, 孔间距约 5mm, 用注射器针头挑琼脂时, 勿将孔缘损坏。

(3) 加样: 用加样器吸取羊抗人 IgG 诊断血清 10 μ l, 加入中间孔, 而周围孔用加样器分别加入待测血清和阳性对照各 10 μ l。每孔加满但不能溢出。若对抗体的效价进行测定, 抗体要做倍数稀释后加入周围孔, 而待测抗原加入中央孔。

(4) 温育: 将加过样的琼脂板置于湿盒中, 放于 37℃ 恒温箱内, 24h 后观察结果。

【结果】 若抗原与相应抗体之间出现一条白色沉淀线, 说明抗原和抗体仅含有一种相应成分, 若有多条白色沉淀线, 提示抗原和抗体含有多种相应成分。若对待测血清抗体效价进行测定, 以出现沉淀线的最高稀释倍数作为该抗体的效价。

【注意事项】

(1) 浇板时, 速度要均匀, 不能太快, 防止琼脂倾出载玻片, 也不能太慢, 否则, 易使琼脂凝结, 导致表面凹凸不平, 同时尽量避免气泡的产生。

(2) 打孔时, 尽量避免水平移动, 导致琼脂裂开或脱离载玻片, 用注射器挑琼脂时, 要避免孔的边缘损坏, 加样要满但不能溢出。

实验5 对流免疫电泳试验

【目的要求】 掌握对流免疫电泳的原理与操作方法; 熟悉其应用范围。

【基本原理】 该试验是在双向免疫扩散基础上加电泳的一种定向免疫扩散技术。在 pH 8.4 以上的缓冲液中, 多数蛋白质类抗原带负电荷, 在电场力的作用下向阳极移动; 抗体大多数属于丙种免疫球蛋白, 相对分子质量大, 电场力作用下移动慢, 且等电点高, 仅带微弱负电荷, 因电渗力的作用向负极倒退。琼脂板上打两排孔, 靠阳极端一侧加抗体, 靠近阴极端一侧加抗原, 在电场力和电渗力的作用下, 抗体和抗原分别向阴极和阳极定向移动, 当抗原和抗体比例适当时在两孔间形成白色沉淀线。本试验可用于抗原、抗体的快速诊断和定性鉴别。以血清甲胎蛋白(α fta

fetoprotein, AFP) 检测为例。

【主要材料与设备】

- (1) 待测血清。
- (2) 巴比妥缓冲液 (0.05mol/L, pH8.6)。
- (3) 甲胎蛋白诊断血清、肝癌病人 AFP 阳性血清。
- (4) 直径 3mm 打孔器、微量加样器、载玻片、吸管、电泳仪、电泳槽等。

【方法】

(1) 制备琼脂板：用巴比妥缓冲液 (0.025mol/L、pH8.6) 配制 1.2%~1.5% 琼脂，然后加热溶化琼脂 (水浴法)，将洁净载玻片平置于桌面，用吸管吸取 3.5ml 浇注载玻片上。

(2) 打孔：待琼脂冷凝后用直径 3mm 打孔器打孔 2 排 4 个孔，孔间距 4~5mm，孔底可补以少量琼脂，使琼脂与载玻片紧贴。

(3) 加样：用微量加样器吸取甲胎蛋白诊断血清加入阳极端一侧 2 孔，每孔 $10\mu\text{l}$ ，阴极端一侧 2 孔分别加入待测血清、肝癌病人 AFP 阳性血清，每孔 $10\mu\text{l}$ 。

(4) 电泳：加好样后，将琼脂板置于电泳槽上，加入抗体、抗原的孔分别朝阳极、阴极端，其两端分别用 4 层湿纱布与巴比妥缓冲液 (0.05mol/L、pH8.6) 相连，控制电泳仪的电流为 10mA (载玻片宽 2.5cm，每 1cm 宽需电流 4mA)，每 1cm 长需端电压约 6V，电泳时间 45~60min。关闭电源，取出琼脂板，观察电泳结果。

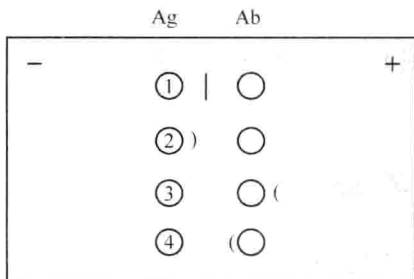
【结果】 电泳毕，将琼脂板置黑色背景上方，观察抗原与抗体孔之间有无白色沉淀线，若抗原 (待测标本) 与抗体之间有白色沉淀线，该待检血清为 AFP 阳性血清；相反，则为阴性。

【注意事项】

- (1) 加样时，尽量避免气泡产生及加样孔边缘的破损，影响结果。
- (2) 电泳过程中，抗原端和抗体端的阴极和阳极不能接错，否则，在两孔间不产生白色沉淀线。
- (3) 电泳时，受电泳时间、电场强度、缓冲液 pH 值等因素的影响，避免假阳性的出现。
- (4) 若孔间距增大，电泳时间要适当地延长。

附 3：免疫电泳试验

【基本原理】 免疫电泳是区带电泳和免疫双扩散的结合。在琼脂糖凝胶内，蛋白质抗原经电



泳后，按其相对分子质量大小和所带电荷多少，分成若干区带 (5~8 条带)。再在样本中蛋白质迁移轴的两侧或两样本之间挖一长槽，注入已知抗体，经一段时间的双向扩散后，抗原抗体在比例最恰当的位置相结合，形成可见的沉淀线 (图 1-1)。根据沉淀线的位置和数量确定某种蛋白质抗原的存在与否和纯度。

【目的要求】

- (1) 通过实验的过程，了解免疫电泳的一般步骤和方法。
- (2) 了解免疫电泳技术的原理。

图 1-1 免疫电泳原理及结果判读

(3) 初步了解免疫电泳技术的临床应用。

【主要材料和设备】

- (1) 1.5% 琼脂糖：用电泳槽缓冲液配制。
- (2) 电泳槽缓冲液：0.05mol/L, pH8.6 巴比妥缓冲液。

(3) 丽春红染液与脱色液: 1.0g 丽春红溶于 1.0mol/L 醋酸 500ml、0.10mol/L 醋酸钠 500ml 中。脱色液为醋酸 10ml、乙醇 25ml 和蒸馏水 65ml 的混合液。

(4) 抗原: 正常人血清。

(5) 抗体: 兔抗人血清。

(6) 载玻片、打孔器、聚苯乙烯塑料条、微量加样器、电泳仪、吸管等。

【方法】

1. 人工操作法

(1) 琼脂糖凝胶的制备: 取大小适宜的载玻片, 清洁液浸泡, 流水及蒸馏水浸洗后晾干。将载玻片置于水平台上, 浇注已于沸水浴中溶化的琼脂糖凝胶, 一般按每 1cm^2 载玻片浇注 $0.16\sim 0.17\text{ml}$, 使凝胶的厚度为 $1.6\sim 1.7\text{mm}$ 。室温放置使凝胶凝固。根据分析目的不同进行打孔。

(2) 加样: 于样品孔内注入待测样品, 与孔缘平齐但无溢出。加样时可加入少许指示剂。

(3) 电泳: 于琼脂板两端用 2~3 层纱布搭桥, 纱布垂入电泳槽缓冲液中, 通电电泳, 稳定电压 $80\sim 100\text{V}$, 电泳 $45\sim 90\text{min}$ 。以指示剂泳动至离抗体槽正极端 1.0cm 处, 即可停止电泳。根据分析目的不同, 于抗体槽中注入相应的抗血清。将琼脂板置于湿盒内, 室温扩散。6~8h 及 24h 观察一次, 至沉淀线充分显现为止。

(4) 沉淀线的观察: 可直接用肉眼观察。为做记录, 可以照相或将琼脂板于生理盐水中、自来水中交替浸泡, 洗去未反应的蛋白。充分洗净后于琼脂凝胶板面上盖一块用水浸湿的涤纶棉布, 于室温晾干。根据需要将干板浸于选定的染液中染色、脱色, 即可显出清晰的着色沉淀线。

2. 全自动仪器法

(1) 标本准备: 选择样本盘, 将要测定的标本依次加入样本盘内, 标本准备完成后置于样品槽内。

(2) 凝胶准备: 取出试剂盒配套的 SPE 琼脂糖凝胶片, 去掉凝胶表面保护板, 放入凝胶槽内。

(3) 标本测定: 按仪器操作说明书进行, 仪器将依次自动完成电泳、染色、孵育、脱色、干燥、扫描步骤。

【结果】 如出现可见的沉淀线, 即表示该样品中含有相应的抗原。

【注意事项】

(1) 加样时不要让样本溢出孔外。

(2) 避免血清溶血, 否则会影响结果。

(3) 未封盖血液样本由于水分蒸发, 可能导致结果不准确。

1.3 补体测定

实验 6 补体介导的溶血反应

【目的要求】 了解补体介导的溶血反应的原理和操作方法。

【基本原理】 该试验以红细胞为抗原, 相应的抗体(溶血素)主要为 IgM 和 IgG (IgG1、IgG2、IgG3 亚类), 抗原与相应抗体结合, 形成抗原抗体复合物, 该复合物可活化补体的经典途径, 最终红细胞上形成膜攻击复合物, 导致红细胞的溶解, 出现溶血现象。

【主要材料与设备】

(1) 2% 绵羊红细胞 (sheep red blood cell, SRBC) 生理盐水悬液 (抗原), 抗 SRBC 抗体

(溶血素, 适当稀释), 补体 (豚鼠新鲜血清, 适当稀释)。

(2) 生理盐水。

(3) 试管、试管架、吸管、37℃水浴箱等。

【方法】

(1) 取 4 支洁净的小试管, 用记号笔分别标记管号 1、2、3、4, 其中实验管为 1 号管, 溶血素对照管为 2 号管, 补体对照管为 3 号管, SRBC 对照管为 4 号管, 标记好放置于试管架上, 然后加入各成分 (表 1-3)。

表 1-3 补体介导的溶血试验

管号	1 (实验管)	2 (溶血素对照管)	3 (补体对照管)	4 (SRBC 对照管)
2%SRBC (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
2 单位溶血素 (ml)	0.25	0.25	—	—
2 单位补体 (ml)	0.25	—	0.25	—
0.85%生理盐水 (ml)	0.25	0.5	0.5	0.75

(2) 将加过样的 4 支试管摇匀后, 放入 37℃水浴箱内, 30min 后观察并记录结果。

【结果】 若试管内出现溶血, 管内液体透明呈红色, 记录可用“+”表示; 若不出现溶血, 管内液体浑浊呈浅红色, 记录可用“-”表示。

【注意事项】

(1) 试验所用 SRBC、抗 SRBC 抗体、补体必须新鲜。

(2) 每个试管加样所用的吸管不能混用, 各分量要准确。

(3) 试验所用试管、吸管等玻璃器皿必须要干燥和清洁。

1.4 免疫标记技术

实验 7 酶联免疫吸附试验 (直接法)

【目的要求】 了解酶联免疫吸附试验直接法的原理, 熟悉其操作过程。

【基本原理】 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 是种固相酶免疫测定方法。其基本原理是先将已知抗原或抗体结合在某种固相载体表面, 保持其免疫活性, 并使抗原或抗体与某种酶联结成酶标抗原或酶标抗体, 这种酶标抗原或抗体既保留了其免疫活性, 又保留了酶活性; 测定时, 将待测标本 (抗原或抗体) 和酶标记抗体或抗原按一定步骤与吸附在固相载体上的抗原或抗体发生反应。用洗涤的方法去除固相载体上的游离物质, 剩下结合在固相载体上的抗原或抗体与酶标记抗体或抗原形成的复合物, 再加入酶反应底物后, 在供氢体的参与下, 发生显色反应。显色的深浅与标本中待检物的量直接相关, 可根据显色反应的颜色深浅进行定性或定量分析。ELISA 法既可用于抗原的测定, 也可用于抗体的测定。常见的方法有直接法、间接法、夹心法和竞争法等。本实验以 ELISA 直接法为例进行学习。

【主要材料与设备】

(1) 抗原溶液 (纯化的人 IgG)。

(2) 包被溶液 (0.05mol/L、pH9.6 碳酸盐缓冲液): Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加蒸馏水至 1000ml。