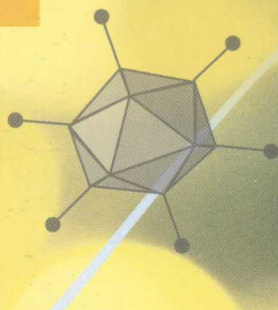




普通高等教育“十二五”规划教材

供中医、中西医结合、针灸推拿、护理、
骨伤、医学检验、中药、药学等专业用



免疫学基础与病原生物学 实验教程

卢芳国 范虹 主编



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
供中医、中西医结合、针灸推拿、护理、骨伤、医学检验、中药、药学等专业用

免疫学基础与病原生物学实验教程

卢芳国 范虹 主编

【内容】

1. 示教

- (1) 牛带绦虫成虫包囊标本、囊尾蚴(CTP)肉眼观察并镜下观察
- (2) 牛带绦虫头节玻片染色标本，头节方形，仅有四个吸钩，无顶突和小钩。
- (3) 牛带绦虫成熟卵
- (4) 牛囊尾蚴保虫体



【实验】

- 1. 绘牛带绦虫头节并标明结构(低倍镜)。
- 2. 绘牛带绦虫成熟卵并标明结构(低倍镜)。



【要求】

- 1. 熟悉棘球蚴的形态特征。
- 2. 了解细粒棘球蚴的形态特征。

科学出版社

【内容】

- 1. 示教 (1) 细粒棘球蚴成虫玻片染色标本，经明矾卡红染色制成。

R392-33
12

013071238

版权所有，侵权必究

举报电话：010-64030229；010-64034315；13501151303

内容简介

本书为高等医药院校本科基础教材。全书共分四篇，第一篇为医学免疫学实验技术，其中包括体液免疫功能、细胞免疫功能的检测实验和其他多种免疫学实验技术；第二篇为医学微生物学实验技术，介绍了细菌、支原体、衣原体、螺旋体、真菌和病毒的形态结构、培养、致病性与免疫性等方面的检测方法和相应疾病的诊断操作技术；第三篇为中药微生物学检查技术与抗菌作用的检测，介绍了注射剂、口服药物、外用药物的微生物检测以及中药抗菌作用的定性与定量检测技术；第四篇为医学寄生虫学实验技术，介绍了原虫、线虫、吸虫和绦虫的形态结构、致病性与免疫性的检测方法和相应疾病的诊断操作技术。

本书适用于高等医药院校中医、中西医结合、针灸推拿、护理、骨伤、医学检验、中药、药学、药物制剂等专业的教学，同时也可供临床检验和相关学科科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学基础与病原生物学实验教程/卢芳国,范虹主编. —北京:科学出版社,2013.8

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-038356-3

I. 免… II. ①卢… ②范… III. ①免疫学—实验—高等学校—教材
②病原微生物—实验—高等学校—教材 IV. ①R392—33 ②R37—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 192530 号

责任编辑：杨瑰玉/责任校对：王望容

责任印制：彭超/封面设计：蓝正

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>

武汉市科利德印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

开本：787×1092 1/16

2013 年 8 月第 一 版 印张：8 1/2

2013 年 8 月第一次印刷 字数：186 000

定价：18.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

88-5959
15

《免疫学基础与病原生物学实验教程》

编 委 会

主 编 卢芳国 范 虹

副主编 汤冬生 刘文泰

编 委 (以姓氏笔画为序)

马秀敏(新疆医科大学)

卢芳国(湖南中医药大学)

刘文泰(河北医科大学)

吴淑慧(河北医科大学)

张学敏(福建中医药大学)

范 虹(湖北中医药大学)

胡建中(湖南中医药大学)

黄 敏(湖北中医药大学)

梁裕芬(广西中医药大学)

雷 萍(辽宁中医药大学)

戴 军(河北医科大学)

王晓红(吉首大学)

朱应武(湖南中医药大学)

汤冬生(安徽中医药大学)

何一中(浙江中医药大学)

陈殿学(辽宁中医药大学)

周国兴(湖南中医药专科学校)

高清华(湖北中医药大学)

龚宗跃(湖南中医药专科学校)

程惠娟(安徽中医药大学)

蔡 锐(湖南中医药大学)

前 言

免疫学基础与病原生物学是医学院校重要的基础学科。随着该学科的发展,新的实验方法、实验技术层出不穷。加强实验教学、丰富实验教学内容是更进一步做好教学工作的有力手段。为满足教学需求,培养学生的实验操作技能,我们在总结、吸收多年实验教学经验的基础上,编写了本实验教材。

本书不仅介绍了一些经典的实验方法,同时也对近年来本学科科学研究和临床检验中所应用的一些新方法、新技术如流式细胞术、聚合酶链反应等做了介绍,供有条件的学校选用。此外,为便于读者自学,书中附加了多种试剂和培养基的制备方法。

本书通俗易懂,理论联系实际,有较强的科学性和实用性。在编写过程中得到了主编单位各级领导的支持,得到了湖南中医药大学伍参荣教授的关心和指导,在此表示感谢。

由于水平有限,时间仓促,本书中的疏漏和不足之处恐难避免,敬请读者提出宝贵意见,以便修订时完善。

本书编委会
2013年5月

目 录

实验室规则	1
第一篇 医学免疫学实验技术	
第一章 体液免疫功能检测实验	5
实验一 免疫血清的制备	5
实验二 免疫球蛋白的提取与鉴定	6
实验三 玻片凝集试验	8
实验四 试管凝集试验	9
实验五 间接血凝试验	10
实验六 环状沉淀试验——血迹鉴定	11
实验七 单向琼脂扩散法	11
实验八 双向琼脂扩散法	13
实验九 火箭免疫电泳	14
实验十 免疫电泳	15
实验十一 补体溶血反应	16
实验十二 溶血空斑试验	17
实验十三 EA花环试验	18
实验十四 B细胞表面免疫球蛋白测定	19
实验十五 酶联免疫吸附试验	19
第二章 细胞免疫功能检测实验	22
实验十六 巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验	22
实验十七 吞噬细胞刚果红吞噬试验	23
实验十八 外周血单个核细胞分离——密度梯度离心法	23
实验十九 E花环形成试验	24
实验二十 淋巴细胞转化试验——形态法	25
实验二十一 淋巴细胞转化试验——MTT法	27
实验二十二 人外周血T淋巴细胞亚群的检测	27
实验二十三 人外周血单个核细胞凋亡百分率的检测	29
实验二十四 耳肿试验	30

第三章 医学免疫学其他实验技术	31
实验二十五 白细胞介素 2 活性测定	31
实验二十六 大鼠 I 型被动皮肤过敏反应	32
实验二十七 血清中免疫复合物测定——PEG 法	33

第二篇 医学微生物学实验技术

第一章 细菌学总论实验	37
实验二十八 显微镜的使用与细菌形态、特殊结构观察	37
实验二十九 细菌的单染色法	38
实验三十 细菌的革兰染色法	39
实验三十一 活菌运动的观察	40
实验三十二 常用培养基的制备	41
实验三十三 细菌的接种技术与细菌生长情况的观察	42
实验三十四 细菌代谢产物的鉴定	46
实验三十五 物理因素对细菌的影响	48
实验三十六 化学因素对细菌的影响	51
实验三十七 细菌对药物的敏感性试验	53
第二章 细菌学各论实验	56
实验三十八 病原性球菌的形态、染色性及培养特性	56
实验三十九 葡萄球菌血浆凝固酶试验	56
实验四十 抗链球菌溶血素 O 试验	57
实验四十一 肺炎链球菌胆汁溶解试验	58
实验四十二 淋病奈瑟菌氧化酶试验	59
实验四十三 肠道杆菌的形态、染色性与培养特性	60
实验四十四 粪标本中致病性肠道杆菌的分离与鉴定	62
实验四十五 伤寒和副伤寒的血清学检查(肥达反应)	63
实验四十六 厌氧性细菌的形态、染色性与培养特性	64
实验四十七 牛奶发酵试验	65
实验四十八 破伤风痉挛毒素的毒力试验与抗毒素的中和试验	65
实验四十九 临床标本厌氧菌的分离与鉴定	66
实验五十 结核分枝杆菌的形态、染色性及培养特性	68
实验五十一 结核分枝杆菌的抗酸染色法	69
第三章 原核细胞型微生物实验	70
实验五十二 原核细胞型微生物的形态、染色性和培养特性观察	70
实验五十三 钩端螺旋体动力检查	71
实验五十四 溶脲脲原体脲酶试验	71

实验五十五 钩体的显微镜凝集试验	72
实验五十六 梅毒螺旋体的血清学试验	73
第四章 真菌学实验	76
实验五十七 真菌形态与菌落观察	76
实验五十八 真菌培养	77
实验五十九 浅部真菌感染临床标本的检查	79
实验六十 常见深部真菌感染临床标本的检查	80
第五章 病毒学实验	82
实验六十一 病毒的培养方法	82
实验六十二 红细胞凝集试验	89
实验六十三 血凝抑制试验	90
实验六十四 酶联免疫吸附试验检测 HBsAg	91
实验六十五 酶联免疫吸附试验检测抗 HBs	92
实验六十六 聚合酶链反应	92
第三篇 中药微生物学检查技术与抗菌作用的检测	
第一章 中药微生物学检查技术	97
实验六十七 注射剂的无菌检查	97
实验六十八 口服药物的微生物学检查	97
实验六十九 外用药物的微生物学检查	99
第二章 中药体外抗菌作用的检测	101
实验七十 中药体外抗菌作用的定性检测——琼脂扩散法	101
实验七十一 中药体外抗菌作用的定量检测——液体稀释法	103
第四篇 医学寄生虫学实验技术	
第一章 原虫实验	107
实验七十二 溶组织内阿米巴(痢疾阿米巴)	107
实验七十三 阴道毛滴虫	108
实验七十四 杜氏利什曼原虫(黑热病原虫)	109
实验七十五 蓝氏贾第鞭毛虫	110
实验七十六 刚地弓形虫	111
实验七十七 疟原虫	112
第二章 线虫实验	114
实验七十八 似蚓蛔线虫(蛔虫)	114

实验七十九	毛首鞭形线虫(鞭虫).....	115
实验八十	蠕形住肠线虫(蛲虫).....	115
实验八十一	钩虫(十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫).....	116
实验八十二	丝虫(班氏吴策钱虫和马来布鲁线虫).....	117
第三章 吸虫实验 119		
实验八十三	华枝睾吸虫(肝吸虫).....	119
实验八十四	布氏姜片吸虫(姜片虫).....	119
实验八十五	卫氏并殖吸虫(肺吸虫).....	120
实验八十六	日本血吸虫.....	121
实验八十七	日本血吸虫病动物模型制作.....	122
第四章 绦虫实验 124		
实验八十八	链状带绦虫(猪带绦虫).....	124
实验八十九	肥胖带绦虫(牛带绦虫).....	125
实验九十	细粒棘球绦虫(包生绦虫).....	125
第五章 原虫实验 126		
实验九十一	阿米巴原虫(溶组织内阿米巴).....	126
实验九十二	蓝氏贾第虫.....	126
实验九十三	结肠小袋纤毛虫.....	126
实验九十四	隐孢子虫.....	126
实验九十五	弓形虫.....	126
实验九十六	卡氏肺囊虫.....	126
实验九十七	微孢子虫.....	126
第六章 真菌实验 127		
实验九十八	白假丝酵母菌.....	127
实验九十九	新型隐球菌.....	127
实验一百	曲霉.....	127
实验一百零一	足菌腫.....	127
实验一百零二	荚膜组织胞浆菌.....	127
实验一百零三	球孢子菌.....	127
实验一百零四	粗球孢子菌.....	127
实验一百零五	皮炎芽生菌.....	127
实验一百零六	副球孢子菌.....	127
实验一百零七	马尔尼菲篮状菌.....	127
实验一百零八	卡氏肺囊菌.....	127
实验一百零九	隐孢子菌.....	127
实验一百一十	微孢子虫.....	127
第七章 寄生虫实验 128		
实验一百一十一	蛔虫.....	128
实验一百一十二	十二指肠钩虫.....	128
实验一百一十三	美洲板口线虫.....	128
实验一百一十四	布氏姜片吸虫.....	128
实验一百一十五	华枝睾吸虫.....	128
实验一百一十六	卫氏并殖吸虫.....	128
实验一百一十七	日本血吸虫.....	128
实验一百一十八	丝虫.....	128
实验一百一十九	链状带绦虫.....	128
实验一百二十	肥胖带绦虫.....	128
实验一百二十一	细粒棘球绦虫.....	128
实验一百二十二	溶组织内阿米巴.....	128
实验一百二十三	蓝氏贾第虫.....	128
实验一百二十四	结肠小袋纤毛虫.....	128
实验一百二十五	隐孢子虫.....	128
实验一百二十六	弓形虫.....	128
实验一百二十七	卡氏肺囊菌.....	128
实验一百二十八	微孢子虫.....	128
实验一百二十九	白假丝酵母菌.....	128
实验一百三十	新型隐球菌.....	128
实验一百三十一	曲霉.....	128
实验一百三十二	足菌腫.....	128
实验一百三十三	荚膜组织胞浆菌.....	128
实验一百三十四	球孢子菌.....	128
实验一百三十五	粗球孢子菌.....	128
实验一百三十六	皮炎芽生菌.....	128
实验一百三十七	副球孢子菌.....	128
实验一百三十八	马尔尼菲篮状菌.....	128
实验一百三十九	卡氏肺囊菌.....	128
实验一百四十	隐孢子菌.....	128
实验一百四十一	微孢子虫.....	128

**第一篇 医学免疫学
实验技术**

學選史學圖 第一集
木廷銀安

第一章 体液免疫功能检测实验

实验一 免疫血清的制备

【原理】

机体接受抗原刺激后可以发生免疫应答,产生相应的抗体和致敏淋巴细胞。一种抗原能否引起免疫应答,除了主要取决于抗原分子有无抗原决定基外,还与抗原的性质、剂量、免疫途径及次数有关。适当的抗原进入机体,经过一定的潜伏期后,抗体水平逐渐升高,在恰当时期取免疫后的动物血清,即为免疫血清(也称抗血清)。

【材料】

绵羊红细胞(SRBC)、家兔等。

【方法与结果】

1. 抗原的制备 无菌采集绵羊静脉全血(抗凝),静置使红细胞沉降后,用无菌生理盐水洗涤3次(每次离心2000 r/min,10 min),最后配成 10^6 /mL浓度的细胞悬液即可。

不同性质的抗原的处理方法不同,颗粒性抗原主要是指细胞抗原或细菌抗原。最常用的细胞抗原为制备溶血素用的绵羊红细胞。细菌抗原多用液体或固体培养物处理而制备。H抗原用有动力的菌株,菌液用0.3%~0.5%甲醛处理,而O抗原则需要100℃加温2~2.5 h后应用。Vi抗原则应在杀菌后再加0.5%~1%氯化钙溶液。有时虫卵也可做成抗原,如日本血吸虫卵抗原可制成悬液供免疫用。有些细胞膜成分,如组织细胞膜、血细胞膜经打碎后亦可制成颗粒抗原。颗粒抗原悬液呈乳浊状,多采用静脉内免疫法,较少使用佐剂。蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、细菌毒素、酶、补体等皆为良好的可溶性抗原,但因这些蛋白质多为复杂的蛋白组分,免疫前需进行纯化。蛋白质纯化方法在生物化学技术中已有详述。可溶性抗原免疫时,常加佐剂皮下注射。

2. 免疫动物 免疫效果与抗原的性质、剂量、免疫途径及免疫次数密切相关。本实验的具体免疫动物的方法(见表1-1)。

表 1-1 绵羊红细胞免疫家兔实验设计

免疫次序	免疫时间	注射部位	抗原剂量/(10^6 /mL)
1	第1天	皮下注射	0.4 mL
2	第10天	肌肉注射	0.4 mL
3	第17天	足底注射	0.4 mL
4	第24天	静脉注射	0.4 mL
5	第31天	皮下注射	0.5 mL

3. 免疫血清的制备

(1) 试血:一般在末次注射后的7~10天,家兔耳静脉采少量血制备血清,与相应抗原反应,进行试血。抗体效价 $>1:16$ 即可采血。

(2) 采血制备血清:无菌耳静脉或心脏采血(不抗凝),收集于无菌试管内静置,血液凝固后,用无菌细玻璃棒使血块与试管壁分离,置 37°C ,2h后,置 4°C 过夜。使血清充分析出,最终离心 2000 r/min ,20min,取上清即得。

【注意事项】

1. 免疫实验动物时,要少量多次注射。
2. 免疫实验动物时注意无菌操作,以防感染。
3. 实验中所用器皿要干燥、清洁。

附:免疫血清的保存

1. 4°C 保存 将抗血清除菌后,液体状态保存于普通冰箱,可以存放3个月到半年,效价高时,1年之内不会影响使用。保存时要加入 $0.15\% \sim 0.2\%$ 叠氮钠(NaN_3)以防腐。如若加入半量的甘油,则保存期可延长。

2. 低温保存 放在 $-40 \sim -20^{\circ}\text{C}$,一般保存5年效价不会有明显下降,但应防止反复冻融,反复冻融几次则效价明显降低。因此,低温保存应用小包装,以备取出后在短期内用完。

3. 冷冻干燥保存 最后制品内水分不应高于 0.2% ,封装后可以长期保存,一般在冰箱中5~10年内效价不会明显降低。

实验二 免疫球蛋白的提取与鉴定

【原理】

根据各类免疫球蛋白及其他血清蛋白的分子大小、电离密度、等电点以及在水溶液中的溶解度不同等特性,可以相互鉴别与分类。利用这些特性,还可以从液体中分离和提取各种免疫球蛋白。

【材料】

免疫血清、 50% 饱和硫酸铵、层析柱、Sephadex G-200、洗脱液(PBS或含NaCl的Tris-HCl缓冲液)等。

【方法与结果】

1. 免疫球蛋白的提取

(1) 盐析法(salt fractionation):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于沉淀,而白蛋白则不易沉淀,据此可将二者分离。

1) 饱和硫酸铵溶液的配制:取 500 mL 蒸馏水加热至 $70 \sim 80^{\circ}\text{C}$,将 400 g 硫酸铵溶于其中,搅拌20min,冷却。待硫酸铵结晶沉于瓶底,其上清即为饱和硫酸铵。在使用前用 28% 氨水调pH为7.0。

2) 用 50% 饱和硫酸铵提取血清中 α 、 γ 球蛋白:血清一份加生理盐水一份混匀,然后逐滴加入两份的饱和硫酸铵中,边加边搅拌(防止形成团块,降低沉淀物的特异性)。混匀

后静置 30 min 或置 4 °C 冰箱过夜。高速低温离心 10 000 r/min, 10 min, 将上清液(含白蛋白)弃去, 取沉淀物(含球蛋白), 溶于少量生理盐水中。

3) 用 33% 饱和硫酸铵提取 γ 球蛋白: 将上述提取物生理盐水溶液两份加一份饱和硫酸铵, 然后再高速低温离心 10 000 r/min, 10 min。其余操作同上。

4) 按同样方法再用 33% 饱和硫酸铵提取一次。

5) 将提取物装入透析袋, 在生理盐水中透析, 以除去其中所含的硫酸铵。经此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。

(2) 凝胶过滤法(gel filtration): 利用具有分子筛效应的多孔网状凝胶作为介质, 可分离提纯分子质量不同的大分子物质。在凝胶过滤过程中, 分子大的物质因不能进入凝胶网孔而沿凝胶颗粒间的空隙先流出凝胶柱外; 分子小的物质因能进入凝胶网孔而受阻滞, 流速缓慢而最后流出柱外, 这样就能将分子大小不同的物质分离。

1) 处理凝胶: 将 Sephadex G-200 用蒸馏水经充分膨胀后进行浮选。

2) 装柱: 在层析柱底部铺加一层尼龙纱, 然后将洗脱液饱和和凝胶粒子沿插入柱底的玻璃棒缓缓倾注于层析柱内。

3) 加样: 在凝胶柱表面再加一层尼龙纱, 沿管壁缓缓加入样品, 所加样品的体积不超过凝胶柱的 10%。

4) 洗脱: 洗脱液洗脱, 流速 20 mL/h。待样品洗脱下来(用 20% 磺酸水杨素检测), 用试管分段收集。

5) 蛋白测定: 在紫外分光光度计上选波长 280 nm, 测定各管样品的 OD 值, 以判读各管蛋白含量。

6) 凝胶的处理: 样品洗脱完毕后, 凝胶即已再生。一次装柱可反复使用多次。凝胶悬液可加防腐剂于冰箱内保存数月。

7) 结果分析: 正常人血清经凝胶过滤后可分出三个主要蛋白峰(图 1-1)。第一峰主要是 IgM, 其次是 α -巨球蛋白。第二峰主要是 IgG, 在第二峰开始部分含 IgA 和 IgD, 第三峰为白蛋白和相对分子质量 100 000 以下的蛋白质。

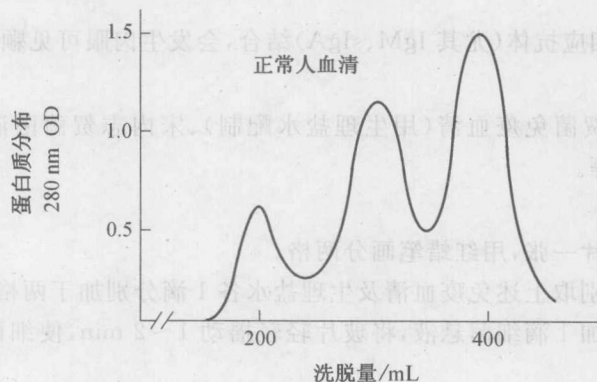


图 1-1 正常人血清经 Sephadex G-200 过滤后 Ig 的分布

2. 抗体的鉴定

(1) 鉴定抗体的类别:用已知的抗 IgG、抗 IgM、抗 IgA,通过双向免疫扩散法(详见实验八)鉴定所提抗体的类型。通过单向免疫扩散法(详见实验七)测定其含量。用混合的抗 IgG、抗 IgM、抗 IgA 与所提抗体反应,通过双向免疫扩散法,观察两孔之间形成沉淀线的条数,鉴定其抗体类别的纯度,若仅有一条沉淀线,说明所提抗体较纯。

(2) 鉴定抗体的特异性:用粗提或纯化抗原,通过双向免疫扩散法(详见实验八)鉴定所提抗体的抗原特异性。按双向免疫扩散技术打孔呈三角排列,上两孔分别加抗原粗提物(如抗原来自动物血清则直接加相应血清)和纯化抗原,下孔加抗血清,进行双扩散 18~24 h 后,仔细观察抗体孔与两个抗原孔之间出现的沉淀线。若与粗抗原及纯抗原之间皆出现一条沉淀线,且两者互相融合,则证明该为抗原特异性抗体;若与纯化抗原出现一条,而与粗抗原出现多条线,且其中一条沉淀线与纯抗原沉淀线相连接,说明除了含有针对纯化抗原的特异性抗体外,还有其他的杂抗体。

【注意事项】

1. 提取免疫球蛋白最好在 2~4 °C 条件下进行,防止抗体失活。
2. 层析柱应足够长,增加压力梯度,减缓流速。
3. 柱床表面应平整,无沟流及气泡,否则应重装。
4. 上样的体积不能过大,浓度不宜过高。
5. 加样及整个洗脱过程中,严防柱面变干。

实验三 玻片凝集试验

玻片凝集试验(slide agglutination test)一般均用于诊断未知抗原,如用已知的免疫血清鉴定未知的细菌和血型等。由于方法简便,并具有较高的敏感性和一定的特异性,故各实验室广泛应用。玻片凝集的反应时间短(在 2~5 min 出现凝集),因而免疫血清的浓度应相应提高(如免疫血清试管凝集效价在 1:1 280 以上时,此时应做 1:20 稀释)。本试验方法只能用于定性试验。

【原理】

颗粒性抗原与相应抗体(尤其 IgM、sIgA)结合,会发生肉眼可见颗粒凝集现象。

【材料】

1:20 抗宋内志贺菌免疫血清(用生理盐水配制)、宋内志贺菌菌液、生理盐水、载玻片、尖吸管、红蜡笔等。

【方法与结果】

1. 取洁净载玻片一张,用红蜡笔画分两格。
2. 用尖吸管分别取上述免疫血清及生理盐水各 1 滴分别加于两格内。
3. 在两格内各加 1 滴细菌悬液,将玻片轻轻摇动 1~2 min,使细菌与免疫血清及生理盐水充分混匀。
4. 在抗宋内氏志贺菌免疫血清一格出现细菌凝集,而另一格内无细菌凝集,则实验成立。如果两格内均出现凝集,说明菌液有问题;若两格均不凝集,说明免疫血清有问题

(不含相应抗体或为非凝集性抗体)。

【注意事项】

1. 凝集反应最好在温度为 20 °C 以上条件下进行。
2. 试验中所用吸管、玻片等必须清洁, 否则不容易出结果。

实验四 试管凝集试验

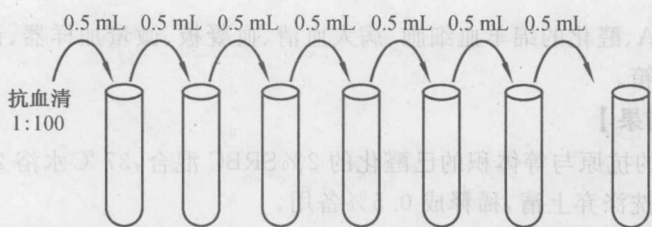
试管凝集试验(tube agglutination test)一般均以标准抗原(已知抗原)测定免疫血清或患者血清中抗体的效价。

【材料】

1:100 抗绵羊红细胞(SRBC)血清(配制前需经 56 °C, 30 min 灭活)、2% SRBC 生理盐水悬液和生理盐水等。

【方法与结果】

1. 取试管 7 支, 排列于试管架上并做好编号标记。
2. 每管各加生理盐水或 PBS 0.5 mL。
3. 取 1:100 抗 SRBC 血清 0.5 mL。加入第 1 管中混匀后, 从第一管中吸取 0.5 mL 液体加于第二管, 同法依次加入下一管, 直到倒数第二管, 混匀后吸出 0.5 mL 弃去(如图 1-2)。



1. 加 PBS	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
2. 加血清浓度	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	—	—
3. 加 2%SRBC	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
4. 血清最终稀释度	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1: 12 800	—	—

图 1-2 试管凝集试验倍比稀释法

4. 每个试管各加 2% SRBC 0.5 mL(注意:加 SRBC 前必须将细胞悬液充分混匀)。
5. 室温静置 2 h, 观察结果。观察前切勿摇动试管, 以免凝集分散。
6. 结果观察时首先应观察对照管, 对照管无凝集现象的前提下, 再观察 1~6 试验管凝集状况和强度。并以“++++、+++、++、+、—”表示凝集状况和强度。以血清最高稀释度出现“++”凝集现象者作为该免疫血清的效价(滴度)。例如, 在本次实验中第 5 管呈“++”, 第 6 管呈“+”或“—”, 对照管为“—”, 则该血清的抗体效价为 1:6 400。

++++: 完全凝集, 血球呈厚膜状铺于管底, 边缘呈锯齿状。