

免疫学实验指导讲义

(第五版)

(供生命科学类专业学生用)

何俊民、桂馨 编

同济大学生命科学与技术学院

二〇二一年九月

实验室学生守则

- 一、 听从实验指导教师的指挥，服从实验指导教师的安排。
- 二、 实验前必须认真预习实验教材，明确实验目的、步骤和方法，保质保量按时完成实验。实验报告要独立完成，不得抄袭、臆造。
- 三、 禁止在实验室抽烟、吃零食或其他食品。
- 四、 禁止穿拖鞋、背心、裤衩进入实验室。要求着实验服做实验。
- 五、 禁止在实验室大声喧哗和随意走动。
- 六、 严格遵守仪器的实验操作规程，爱护实验室的一切物品，未经许可不许搬动或随意使用实验室内的仪器设备，更不许把实验室的物品带出实验室。对因不遵守实验室守则而造成实验室物品损坏者，除批评教育外，要视其损坏程度适当赔偿。
- 七、 爱护卫生，每次实验后清理、整洁实验台，清扫实验室。实验完毕，关好水、电、煤气、门窗。值日生负责检查。
- 八、 注意实验室安全，小心、正确地使用易燃易爆、腐蚀性和毒性试剂。
- 九、 实验废弃物置于指定地点，不能直接倒入水池或垃圾桶，如发生污染应及时向老师汇报。

同济大学生命科学与技术学院

免疫学实验安排

1. 经典免疫学综合实验（4 学时）：熟悉溶菌酶的溶菌实验与总补体 CH50 测定法；掌握凝集试验与沉淀试验。（熟悉单克隆抗体的制备及鉴定法）。
2. 免疫细胞功能测定实验（4 学时）：了解小鼠腹腔巨噬细胞制备与嗜中性粒细胞吞噬能力测定法；熟悉巨噬细胞吞噬能力测定法。
3. 细胞毒实验（4 学时）：了解 B 淋巴细胞的制备法；熟悉细胞毒活性的判定方法。
4. 标记免疫分析技术综合实验（4 学时）：掌握 ELISA 实验；熟悉间接血凝 TPPA 检测及胶乳凝集试验；了解免疫金标试验与放射免疫分析技术。

附录：

1. 多克隆抗体制备及效价鉴定
2. 实验相关仪器使用说明
3. 实验相关试剂配制方法

第一单元 经典免疫学综合实验

实验一 溶菌酶的溶菌作用 (Bacteriolysis effect of lysozyme)

溶菌酶是一种碱性蛋白，广泛分布于吞噬细胞、血清及泪液、唾液、鼻涕等分泌物中。

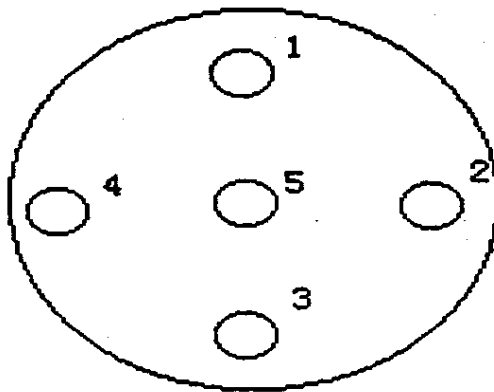
溶菌酶属于体液免疫因子的一种。它能作用于革兰阳性菌的细胞壁成分——肽聚糖，使细胞壁丧失其坚韧性，细菌发生裂解，从而杀伤细菌。但对革兰阴性菌细胞壁成分——脂多糖不起作用。

一、实验材料

溶壁微球菌菌液、1%琼脂高层管、无菌平皿、打孔器、无菌毛细滴管、无菌生理盐水等。

二、实验方法

1. 将溶壁微球菌菌液倾注入一无菌空平皿内。
2. 加热熔化 1%琼脂高层，待冷至 60℃左右，倾注入上述平皿内，与菌液混匀，静置待凝。



孔 1—4 为实验孔，加唾液；孔 5 为对照孔，加生理盐水。

图 1-1 溶菌酶溶菌实验

3. 按图 1-1 用打孔器在琼脂平板上打孔（内径 3mm）。
4. 将唾液吐入一无菌空平皿的盖或底内，斜置后用无菌微量吸头吸取无泡沫唾液 10μl，加入周边各孔内，每一样品加一孔（每人做复孔），注意勿外溢，中间孔加 10μl 生理盐水作对照。
5. 置 37℃温箱培养 15-18 小时。

三、实验结果：

观察小孔周围溶菌环并测量其直径，溶菌酶含量与溶菌环直径成正比。

(桂馨、何俊民)

实验二 补体参与的反应（Complement Involved Reaction）

补体在机体的天然抵抗力及免疫病理方面均起着重要作用。补体有溶菌、溶细胞、免疫调理、免疫粘附、中和病毒以及促进炎症反应等作用。补体除在机体的非特异性免疫中发挥重要作用外，当抗原与抗体结合后，它还可以通过经典途径被激活，发挥膜攻击作用从而使靶细胞溶解。如靶细胞为红细胞，则可发生溶血反应。

（一）血清总补体量测定（CH₅₀）

以绵羊红细胞为抗原与相应抗体结合后的复合物，在新鲜血清中补体的作用下，羊红细胞可被溶解，产生溶血现象。溶血的程度与血清中的补体量相关，因在 50% 溶血（CH₅₀）附近时，溶血度与补体量之间呈直线关系，故以 50% 溶血作为终点观察的指标最为敏感。正常人血清中总补体量保持一定范围，补体含量的变化常可为某些炎性疾病与补体缺陷病的诊断与预后提供依据。

临床常用 CH₅₀ 作为观测指标对人的血清总补体量作出评价，其意义主要有：

（1）增高：心肌炎、皮炎、多发性骨髓瘤、传染病和急性炎症。类风湿关节炎病人类风湿因子阴性 CH₅₀ 值可升高；类风湿因子阳性病人总补体可降低。

（2）减少：急性肾小球肾炎、免疫复合物型肾炎、急性粒细胞性白血病、全身性红斑狼疮等疾病。

（3）痢疾、结核、黄热病、伤寒、淋病、流脑等疾病早期 CH₅₀ 升高，晚期可降低。

一、实验材料：

1. 溶血素，系用羊红细胞免疫家兔后所获得的抗体。
2. 被检者血清。
3. 2% 羊红细胞，使用前用生理盐水洗涤后，配成所需浓度。
4. 生理盐水，1.8% NaCl，蒸馏水，小试管，移液器，Tip 头，离心机，水浴箱

二、实验方法：

1) 羊红细胞（SRBC）用生理盐水洗涤，2000 转/5 分钟离心，去上清，洗 3 次（以上清液基本无血色为标准，否则再洗一次）。最后一次尽量吸去上清，轻摇混匀血细胞，吸取适量加生理盐水配成 2% 羊红细胞。

2) 50% 溶血标准管配制：取 2% 羊红细胞 1ml，1000 转/10 分钟，弃上清，加蒸馏水 0.5ml 溶解羊红细胞。待完全溶解后加入 1.8% NaCl 0.5ml，充分混匀后再加 2% 羊红细胞悬液 1ml，充分混匀。取上述悬液 0.1ml 加生理盐水 0.5ml，与标本同置 37℃ 水浴及离心。

3) 按下表稀释被检血清及加各种试剂（单位：ml）：

表 1-1 血清总补体量测定

管号	1	2	3	4	5
稀释度	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64
生理盐水	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2
待测血清	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
溶血素 (2IU)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2% 羊红细胞	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

37℃ 水浴 45 分钟或 4℃ 24 小时后 2000 转/5 分钟

三、实验结果：

肉眼比色与 50% 溶血标准管最相近的一管的稀释度 × 5 即为该待测血清的总补体含量。

血清补体 CH₅₀ (IU/ml) = (1/血清用量) × 稀释度

正常人总补体含量为 80~160IU/ml。

(二) 补体的溶血作用--Hemolysis Function of Complement

当羊红细胞与相应抗体（溶血素）结合，加入含有一定量补体的血清时，羊红细胞可被溶解，此为补体介导的溶血反应。

一、实验材料

2%绵羊红细胞悬液、溶血素（兔抗羊红细胞抗体）、补体（几只豚鼠的混合血清）、生理盐水；小试管、吸管（1ml or 5ml）、毛细滴管、水浴箱、离心机。

二、实验方法

1、取 3 支小试管，按下表加入各物（容量单位为 ml）。

表 1-2 补体的溶血试验（1）

管号	2% 羊红细胞	溶血素 （二个单 位）	补体 （二个单 位）	生理盐水	结果
1	0.5	0.5	0.5	0.5	
2	0.5	0.5	—	1.0	
3	0.5	—	0.5	1.0	

2、将上述 3 支试管置 37℃水浴箱保温 15—30 分钟，观察有无溶血现象。若红细胞溶解，则混悬液变为红色透明液体。将不溶血的试管(2、3 管)低速(1000 转 / 分)离心沉淀 5 分钟，使红细胞沉淀。离心后，用滴管将管 2 的上清液移入管 4。用另一滴管将管 3 的上清液移入管 5。

3、按下表加入各物

表 1-3 补体的溶血试验(2)

管号	内容物	2% 羊红细胞	溶血素 （二个单位）	补体 （二个单 位）	生理 盐水	结果
2	沉淀	—	—	0.5	2.5	
3	沉淀	—	0.5	—	2.5	
4	管 2 上清液	0.5	—	0.5	—	
5	管 3 上清液	0.5	0.5	—	—	

4、再置 37℃水浴箱内 15~30 分钟后观察结果。

(桂馨、何俊民)

机体的获得性免疫

抗原抗体的特异性结合是免疫学理论和实验的中心内容，体液免疫系统通过抗体具有的高效率及特异性结合抗原的能力从而达到清除病原菌及调节免疫细胞功能的目的。抗原抗体间的特异性反应可以通过多种途径检测，这些检测方法在医学检验中被广泛应用。

实验三 凝集反应（Agglutination reaction）

颗粒性抗原（细菌、细胞等）或表面覆盖抗原的颗粒状物质（如聚苯乙烯胶乳、炭素等）与相应抗体混合，在电解质存在下，两者可发生结合，出现肉眼可见的凝集块，称作凝集反应。

根据反应性质的不同，凝集反应可分为直接凝集反应和间接凝集反应；根据实验器材和方法的不同，凝集反应又可分为玻片凝集反应和试管凝集反应。

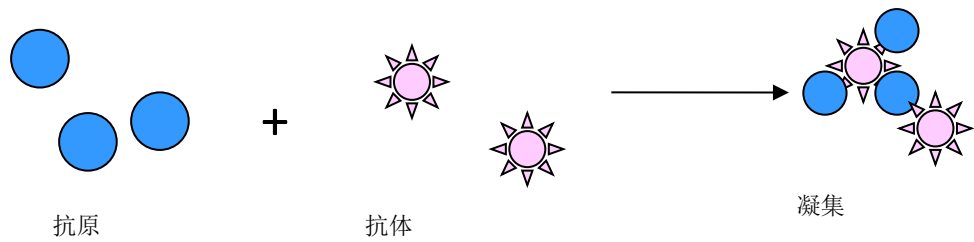


图 1-2 凝集反应原理示意图

（一）玻片凝集反应——Slide Agglutination

颗粒性抗原与相应抗体直接结合能产生凝集现象。本法是一种定性试验，方法简便，快速，常用已知血清鉴定细菌菌型和人体血型。

血型是指红细胞的血型，是根据红细胞膜外表面存在的特异性抗原（镶嵌于红细胞膜上的糖蛋白和糖脂）来确定的，这种抗原或凝集原是由遗传决定的。抗体或凝集素存在于血清中，它与红细胞的不同抗原起反应，产生凝集，最后溶解，由于这种现象，临床上在输血前必须注意鉴定血型，以确保安全输血。通常输血反应中大多数注意 ABO 血型系统。

ABO 血型鉴定是根据抗原抗体反应原理，用已知的凝集素去测定红细胞膜上未知的凝集原，从而确定其上特定抗原的类型，然后根据红细胞膜上的特异性抗原类型而确定血型。将受试者红细胞加入标准 A 型血清（含足量抗 B 凝集素）与加入标准 B 型血清（含足量抗 A 凝集素）中，观察有无凝集现象的发生，即可测知受试者红细胞膜上有无凝集原（A 或 B）的存在。根据红细胞膜上所含凝集原的种类的有无将血型分为 A、B、AB、O 四种基本血型。

ABO 血型中的抗原和抗体		
血型	红细胞所含的抗原	血清中所含的抗体
O	无 A 和 B	抗 A、抗 B
A	A	抗 B
B	B	抗 A
AB	A 和 B	无抗 A 及抗 B

血型确定后，尚须在同型血之间进行交叉配血，如无凝集现象方可进行输血。交叉配血是将受血者的红细胞与血清分别同供血者的血清和红细胞混合，观察有无凝集现象。当配血相合时，方可进行输血。

输血时，一般主要考虑供血者的红细胞不要被受学者的血清所凝集，其次才考虑受血者的红细胞不要被供血者的血清所凝集。交叉配血就是将供血者的红细胞与受血者的血清和受血者的红细胞

与供血者的血清分别混合，分别观察有无凝集反应。前者叫做交叉配血实验的主侧（也叫直接配血），后者叫做交叉配血的次侧（也叫间接配血）。只有主侧和次侧均无凝集，称为“配血相合”，才能进行输血；如果主侧凝集，称为“配血不合”或“配血禁忌”，绝不能输血；如果主侧不凝集而次侧凝集，可以认为“基本相合”，但输血时要特别谨慎，不宜过快过多，密切注视有无输血反应。

一、实验材料

- 1. ABO 血型鉴定试剂盒 内含抗 A 分型试剂和抗 B 分型试剂各 1 支。
- 2. 一次性采血针 1 枚、双凹片 1 块、75%酒精、灭菌棉、1.5ml 抗凝管、生理盐水、毛细吸管。

二、实验方法

- 1. 取洁净双凹片 1 块，并标记。
- 2. 将抗 A、B 分型试剂分别加 1 滴于标记有 A、B 的玻片两侧。
- 3. 用酒精棉球消毒被检者无名指尖端，以采血针刺破皮肤，稍加挤压，使血液流出。用毛细吸管吸取血液 20 μ l，加入 1.5ml 抗凝管中，用消毒干棉花止血。
- 4. 取待测抗凝血各一小滴（约 10 μ l）分别加入玻片已滴加抗 A、B 分型试剂处并混匀。
- 5. 观察红细胞有无凝集发生。如有凝集，可见红细胞凝集成块；无凝集，红细胞呈均匀分散。判定结果后把玻片放入消毒液中。

三、实验结果

记录受检者红细胞凝集情况，根据 ABO 血型鉴定表（下表），判断受检者的血型。

ABO 血型鉴定表		
抗 A 分型试剂侧	抗 B 分型试剂侧	血型
+	—	A
—	+	B
+	+	AB
—	—	O

“+”表示红细胞凝集，“—”表示红细胞未凝集

四、注意事项

- 1. 标准 A 型血清和 B 型血清绝对不能相混。标准血清存放时间不宜太长。
- 2. 肉眼看不清凝集现象时，应在显微镜下观察。
- 3. 制备红细胞悬液不宜太浓，否则易发生红细胞叠连而聚集。

（二）反应板(试管)凝集反应—Plate（Tube）Agglutination

本法操作稍复杂，但既能定性又能半定量。常用定量已知抗原测定不同稀释度的受检血清中相应抗体及其相对含量（滴度）。

一、实验材料

- 1. 伤寒杆菌“O”和“H”诊断菌液（已灭活）。
- 2. 1：10 伤寒杆菌“H”和“O”诊断血清。
- 3. 生理盐水、反应板、刻度吸管、水浴箱。

二、实验方法

- 1. 取反应板一块，用移液器吸取生理盐水，第 1-8 孔每孔 250 μ l（加两排）。
- 2. 用移液器吸取伤寒杆菌“O”诊断血清 250 μ l 加入第 1 排第 1 孔，于孔内吹吸 3 次，使血清与盐水充分混合，吸出 250 μ l 至第 2 孔，同法混匀后再吸出 250 μ l 至第 3 孔，如此稀释至第 7 孔，最后

第7孔吸出250μl弃去。第8孔不加血清作为对照。

3. 用移液器吸取伤寒杆菌杆菌“O”菌液，1-8孔每孔各加250μl。此时1-7各孔血清最后稀释度分别为1:40、1:80、1:160~1:2560。

4. 吸取伤寒杆菌“H”诊断血清250μl加入第2排第1孔，并按步骤“2”的方法予以稀释至第7孔。

5. 用移液器吸取伤寒杆菌杆菌“H”菌液，1-8孔每孔各加250μl。

轻轻振摇反应板，使血清与菌液充分混合，置45℃反应1小时（或室温18-24小时），取出观察结果。

注意事项：1. 1:10诊断血清只在第一孔加250μl，其余各孔血清均由第一孔倍比稀释；

2. 吸取抗体的吸管不应再用于吸取抗原；

3. 诊断菌液“O”对应“O”诊断血清；诊断菌液“H”对应“H”诊断血清；

4. 加诊断菌液时，吸管不应接触到孔中原有液体。

三、实验结果

1. 先观察盐水对照孔，孔内上层液体较混浊，久置后细菌沉淀于管底，呈圆形，边缘整齐。

2. “O”凝集呈薄膜状，边缘不整齐；“H”凝集呈棉絮状，较疏松，轻摇即浮起。

3. 凝集强弱的判定可用以下符号表示：

“++++”——完全凝集，管内液体完全澄清，凝集块完全沉于管底；

“+++”——大部分凝集，管内液体不完全澄清稍有轻度混浊，凝集块沉于管底；

“++”——一半凝集，液体半澄清，有肉眼可见的显著凝集块沉于管底；

“+”——小部分凝集，管内液体混浊，管底凝集块不明显；

“—”——不凝集，管内液体和对照管同样混浊，无凝集块。

血清凝集效价：以出现“++”的血清最高稀释倍数作为该血清凝集效价。如血清的最低稀释度（即第1管1:40）仍无凝集应报告血清效价低于1:40。如血清的最高稀释度（即第7管1:2560）仍显完全凝集现象，应报告血清效价大于1:2560。

（三）梅毒血清学试验（间接凝集试验）—*Treponema pallidum* Test (Indirect Agglutination Reaction)

将可溶性抗原（或抗体）先吸附于一种与免疫无关的载体颗粒表面，然后与相应抗体（或抗原）反应，出现凝集，称作间接凝集反应。常用的载体颗粒有红细胞、乳胶颗粒、活性炭粒等。

本试验的检测试剂采用梅毒抗原悬于含有特制的甲苯胺红溶液（载体）中制成，当加入相应抗体后，抗原抗体产生凝集现象。临床用于检测患者体内的梅毒抗体，以判断梅毒螺旋体感染。

一、实验材料

市售梅毒RPR试剂盒，内有：

1. 含梅毒抗原载体、阴性对照、阳性对照（含抗体）。

2. 反应卡片。

二、实验方法

1. 在反应卡片上分别加阴、阳性标准1滴，然后加梅毒抗原一滴，用牙签混匀；

2. 轻摇卡片3-5分钟，肉眼观察结果。

三、实验结果

阳性有细小颗粒状凝集，阴性无凝集。

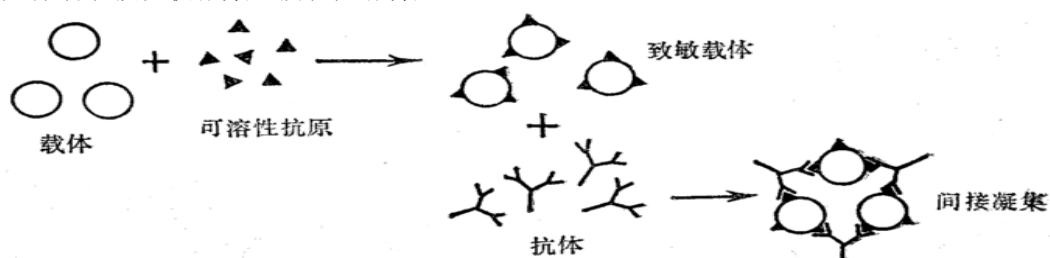


图 1-3 间接凝集试验示意图

（四）C-反应蛋白（乳胶凝集试验）—C-reaction Protein Reagent（Slide Latex Agglutination Reaction）

人 C 反应蛋白(C-reactive protein ,CRP)是指在机体受到感染或组织损伤时血浆中一些急剧上升的蛋白质（急性蛋白）。CRP 可以激活补体和加强吞噬细胞的吞噬而起调理作用，从而清除入侵机体的病原微生物和损伤，坏死，凋亡的组织细胞，在机体的天然免疫过程中发挥重要的保护作用。感染期的人 CRP 的含量比正常值高。

本试验的检测试剂采用 C-反应蛋白多抗包被乳胶制成，当加入相应抗原后，抗原抗体产生凝集现象。因此当 CRP 含量高的样本中加入接种 CRP 抗体的胶乳载体，混匀静置，出现白色凝集颗粒，阴性则为均匀胶乳液。

一、实验材料

1. 抗体包被的胶乳试剂
2. 被检材料：CRP 阳性血清
3. 正常血清对照用
4. 黑反应板 1 块

二、实验方法

1. 用清洁滴管在反应板上滴加一滴被检样品。
2. 滴加一滴胶乳抗原，缓慢摇动 3—5 分钟。

三、实验结果

在光线明亮处观察结果，出现均匀一致细小凝集颗粒者为阳性；不出现凝集，液体仍乳状为试验阴性。

(桂馨、何俊民)

实验四 沉淀反应（Precipitation reaction）

可溶性抗原（细菌毒素、血清、组织浸出液等）与相应抗体相遇，在电解质存在下，出现肉眼可见的沉淀物（环、线、弧、峰）的现象，称沉淀反应。

沉淀反应的方法中常用的有琼脂扩散试验。琼脂扩散试验是抗原抗体在凝胶中所呈现的一种沉淀反应。抗原抗体在含有电解质的琼脂凝胶中相遇时，便出现可见的白色沉淀线。这种沉淀线是一组抗原抗体的特异性复合物。如果凝胶中有多种不同抗原抗体存在时，由于其分子大小不等，扩散速度亦不同，在适合比例处相遇，形成白色沉淀线（或环、弧、峰等）。

琼脂扩散试验可根据抗原抗体反应的方式和特性分为单向免疫扩散、双向免疫扩散、免疫电泳、对流免疫电泳及火箭电泳试验。

（一）单向琼脂扩散试验—Single Agar Diffusion

单向琼脂扩散试验是一种定量试验。将适量的抗体混合于琼脂内，倾注于玻片上，凝固后，在琼脂层打孔。再将抗原加入孔内，使其向四周扩散，与抗体相遇。在二者比例适宜处，形成较多的抗原抗体复合物，呈现白色沉淀环。环的直径与抗原浓度成正比，如果先用不同浓度的标准抗原制成标准曲线，则可测出未知标本中各种免疫球蛋白和血清中各种补体成分的含量，敏感度较高。

一、实验材料

- 1、1.0%的琼脂。
- 2、待检病人血清（IgG）。
- 3、马抗人 IgG 免疫血清（1: 50 稀释）。
- 4、其他：反应板、打孔器、加样器、模板、湿盒等。

二、实验方法

- 1、将抗体血清按一定比例（预先滴定好）混合于已融化并维持 45°C 的琼脂中，然后在塑料板上制成 2mm 厚的琼脂板。
- 2、待琼脂凝固后，用直径 3mm 的打孔器在已凝固的琼脂板上打孔，孔间距离为 0.5-cm。
- 3、用加样器分别 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32 稀释的参考血清及 1: 10 稀释的待检血清 10 μ l 加入相应孔中。
- 4、把琼脂板置湿盒中，放平，置 37°C 温箱扩散 24 小时。
- 5、取出琼脂板观察结果。如图 1-5 所示。量出各孔周围沉淀环直径，于 Ig 标准曲线上查出沉淀环直径所对应的免疫球蛋白含量。

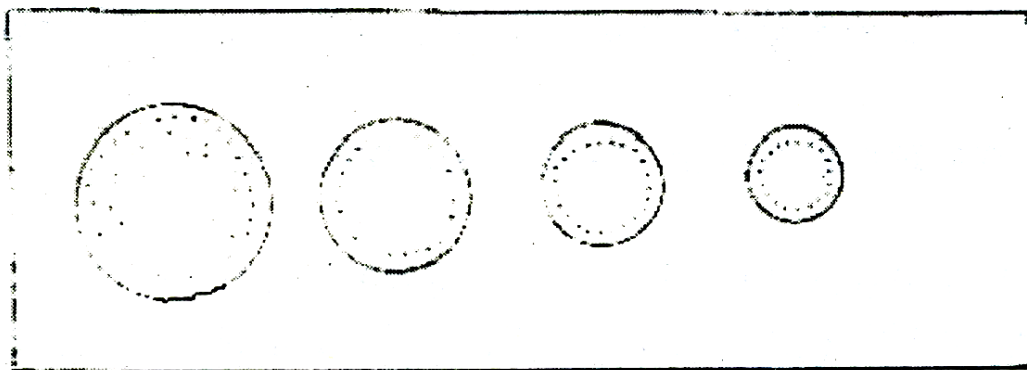


图 1-5 单向琼脂扩散试验示意图

附：Ig 标准曲线的制备：

1. 抗体稀释度的选择原则

- (1) 稀释度要高，要求能测出体液中 Ig 的正常值和最大限度的异常值。
 - (2) 出现 6mm 的沉淀环在中间。
 - (3) 免疫扩散后沉淀环边缘清晰。
2. 方法
- (1) 铺板，按上述原则将稀释的抗体混入凝胶中。
 - (2) 打孔。
 - (3) 加样，将 Ig 工作标准做不同稀释，然后每一稀释度加两个孔。
 - (4) 扩散，测出各孔周围沉淀环直径大小。
3. 标准曲线的绘制

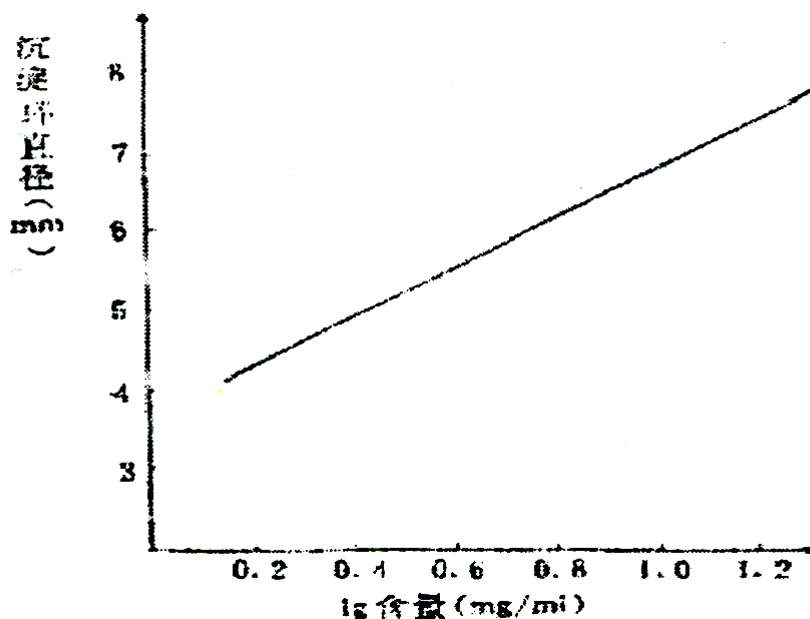


图 1-6 Ig 的标准曲线

- (1) 以标准抗原各稀释度的沉淀环直径为纵坐标。
- (2) 以标准抗原不同含量为横坐标，在坐标纸上直接绘制标准曲线。

(二) 双向琼脂扩散试验—Double Agar Diffusion

双向琼脂扩散试验是一种定性试验。将可溶性抗原与相应抗体分别加到琼脂板相应孔中，两者在琼脂板内向四周扩散，在比例适宜处形成白色沉淀线。本实验可用于分析和鉴定复杂的抗原成分、测定抗体或抗原的纯度等。

一、实验材料

- 1、可疑的四例原发性肝癌患者的血清。
- 2、抗甲胎蛋白诊断血清。
- 3、甲胎蛋白阳性血清。
- 4、1%的 NaCl 琼脂。
- 5、其他：反应板、加样器、3mm 打孔器、模板。

二、实验方法

- 1、制板：取一洁净的载玻片滴加溶化的 1.0% NaCl 琼脂 4ml 左右，制成厚度为 2mm 的琼脂板。
- 2、打孔：待琼脂凝固后，用 3mm 打孔器打孔，孔间距离为 5mm，孔的排列方法如图 1-7A。

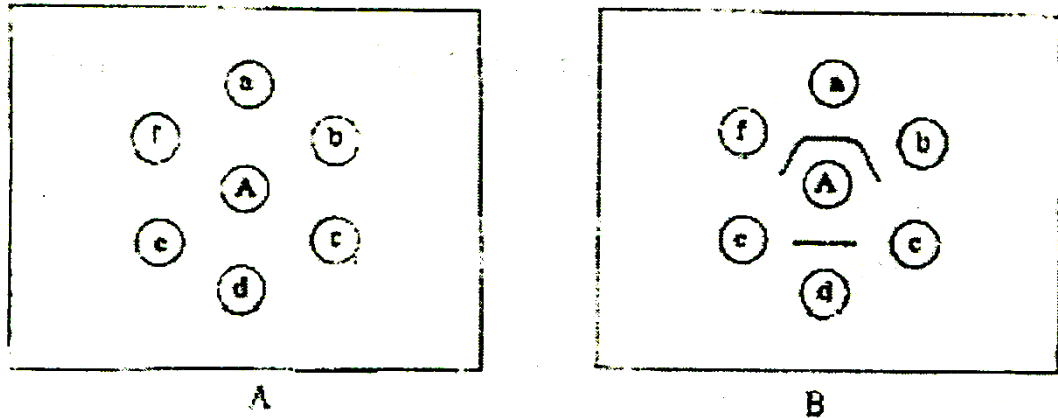


图 1-7 双向琼脂扩散示意图

3、加样：用微量加样器向中央孔 A 加入抗甲胎蛋白诊断血清，周围孔中分别加入被检血清，其量各为 10 μ l。

4、将琼脂平板放湿盒中，置 37 $^{\circ}$ C 温箱中 24 小时、48 小时、72 小时各观察结果一次，并记录之。

三、实验结果

若凝胶中抗原抗体是特异性的，则形成抗原——抗体复合物，两孔中间出现一清晰的沉淀线与已知的阳性对照的沉淀线发生融合为阳性反应，若在 72 小时后仍不出现白色沉淀线者为阴性反应，如图 1-7 B。

（三）对流免疫电泳—Counter Immunoelectrophoresis

在双向琼脂扩散试验的基础上结合电泳技术产生了另一种沉淀反应，称为对流免疫电泳。在 pH8.6 缓冲液的琼脂凝胶中，抗原和抗体一般均带负电荷，它们应向阳极泳动。但由于抗体通常只带微弱的负电荷，而且它的分子又较大，故易受电渗（在电场中溶液相对于琼脂由阳极到阴极的作用力）的影响：反而向阴极泳动。如果将抗原置电场的阴极端，抗体置电场的阳极端，电泳时两者相向运动，一定时间后在两孔间相遇，并在比例合适处形成白色沉淀线。该法较双向琼脂扩散试验有快速、敏感的优点。

一、实验材料

- 1、抗原：人血清、牛血清。
- 2、抗体：兔抗人血清。
- 3、生理盐水、pH8.6 巴比妥缓冲液、琼脂、载玻片、打孔器、滴管、电泳仪、电泳槽。

二、实验方法

- 1、用 0.05M pH8.6 巴比妥缓冲液配制 1% 琼脂，4 $^{\circ}$ C 保存备用。实验前于沸水中加热溶化琼脂，将溶化的琼脂在载玻片上铺板。
- 2、待琼脂凝固后，在琼脂板上如下图（图 1-8）打孔，孔间距约 4mm。
- 3、用滴管或移液器按图 1-8 分别将样品加于各个孔内（加样量每孔 20 μ l 左右），注意样品不要外溢。
- 4、将琼脂板置电泳槽中，抗原孔置阴极端，抗体孔置阳极端，将缓冲液浸湿的滤纸一头搭在琼脂板上，另一头浸于缓冲液中。接通电源，控制电压在 100V（6-10V / cm），反应一小时左右。

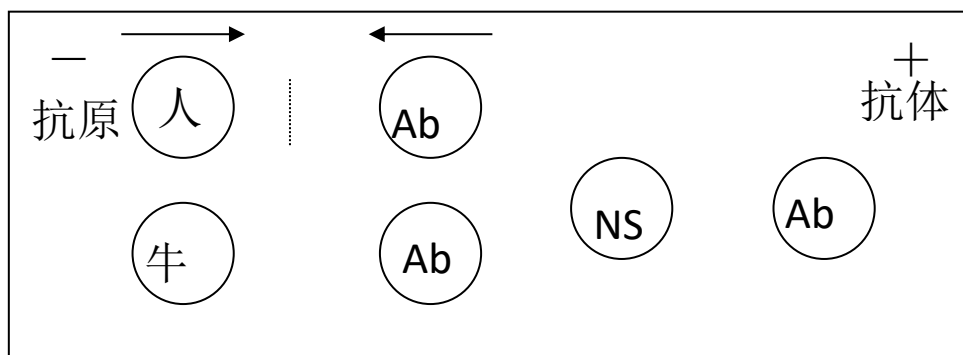


图 1-8 对流免疫电泳示意图

注意事项：抗原孔置阴极端，抗体孔置阳极端；加样时注意样品不要外溢。

三、实验结果

如在两孔间出现白色沉淀线为阳性反应，反之为阴性反应。

（四）火箭电泳试验（rocket electrophoresis）

火箭电泳实际是一种定量免疫电泳。其原理为：在电场作用下，抗原在含定量抗体的琼脂介质中向阳极泳动，二者比例在合适时在较短时间内形成状似火箭或锥形的沉淀峰，其高度常与抗原量成正比关系，因此本法可以测定样品中抗原的含量。

一、实验材料：

1. 诊断血清（抗体）：抗人 IgG 或 IgA 免疫血清
2. 待检血清（抗原）：人血清
3. 参考血清
4. 0.05M pH8.6 巴比妥缓冲液、琼脂粉、微量进样器、打孔器、玻璃板、电泳仪

二、实验方法：

1. 抗体琼脂板的制备

同单向扩散法，但注意稀释液应用 0.05M pH8.6 的巴比妥缓冲液。

2. 打孔见下图

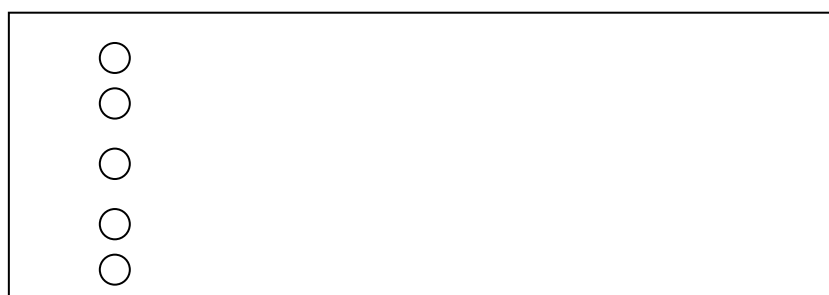


图 1-9 火箭电泳抗原孔位置图

3. 将用缓冲液稀释的适宜浓度的参考血清及适当稀释的抗原（人血清）分别加入各孔中，每孔 10 或 20 μ l，加量准且不外溢。

4. 把加完样的免疫琼脂板放入电泳槽中进行电泳，电压 4-6 伏/厘米，电泳时间 1-5 小时，直到大部分抗原孔前端出现顶端尖窄而完全闭合的火箭状沉淀峰，关闭电源。

5. 取下琼脂板，以抗原孔中心为起点，量出各火箭状沉淀峰的高度。同单向扩散法绘制标准曲线，查出待检血清中 Ig 含量。

（五）免疫电泳实验（immunoelectrophoresis）

免疫电泳实验是抗原物质在琼脂凝胶中做电泳分离后，于凝胶槽中加入抗体血清，使抗原抗体进行双向扩散，在比例适宜部位形成特异的抗原抗体沉淀弧线。每条沉淀弧线代表一组抗原抗体复合物，与已知抗原抗体形成的电泳图比较，即可分析抗原成分；且可以根据其迁移率与抗体所出现的特异反应进行鉴定。主要用于分析抗原、鉴定提取物纯度、研究抗体组分动态变化。

一、实验材料：

1. 待检标本（抗原）：正常人血清。
2. 抗体：正常人血清的家兔免疫血清。
3. 1.5%琼脂（用 pH8.6、0.05M 巴比妥缓冲液配制）
4. 电泳仪
5. 巴比妥缓冲液、载物玻片、直径 3 毫米打孔器、20mmx2mm 玻璃铸型、微量进样器。

二、实验方法：

1. 取载物玻片（7.5x2.5 厘米）加上 3.5 毫升 1.5% 琼脂凝胶，制成 2 毫米厚的琼脂板。
2. 按图 1-10 位置，在琼脂板未凝固时，放入抗血清槽铸型，注意勿使铸型全部浸入琼脂中，待凝固时再打孔。
3. 加待检标本：用微量进样器往孔中加 5 微升样品。
4. 电泳：电压 5-7 伏/厘米，泳动 1.5-2.0 小时。
5. 电泳后取出抗血清槽铸型，加入抗血清，进行双扩散，一般在 24 小时内沉淀弧出全。
6. 观察结果：或描绘、拍照或进行染色，染色后的标本便于结果分析及保存。

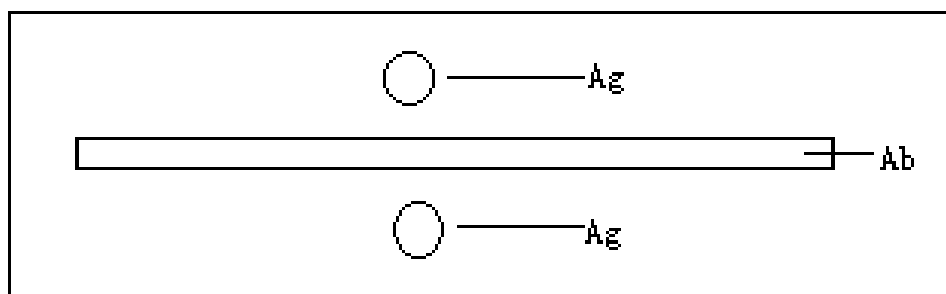


图 1-10 免疫电泳抗原孔和抗体槽位置示意图

（六）环状沉淀试验（ring test）

当抗原与相应抗体形成一个接触面时，如二者比例适当，接触面上可形成一个乳白色的环状物即为阳性沉淀反应，系定性试验。

一、实验材料：

1. 免疫血清：免疫兔抗人血清
2. 抗原：人血清
3. 小沉淀管、毛细吸管、橡皮头、生理盐水。

二、实验方法：

1. 取小沉淀管 2 只，以毛细吸管吸取抗人血清约 0.2 毫升，加入第一管，加时注意不能有

气泡。

2. 以毛细吸管吸取生理盐水 0.2 毫升加入第二管。

3. 用毛细吸管吸入血稀释 0.2 毫升加入各管，加时应注意使抗原溶液缓缓由管壁流下，轻浮于血清面上，使成一明显界面，切勿使之相混。

置室温中 10-20 分钟，观察液面有无乳白色沉淀环，若有则为阳性。

(桂馨、何俊民)

第二单元 免疫细胞功能测定

实验五 吞噬细胞的吞噬功能 (Phagocytosis function of phagocytes)

吞噬细胞根据形态大小,可分为两类:一类是小吞噬细胞,即血液中的嗜中性粒细胞;另一类是大吞噬细胞,包括血液中的单核细胞和组织中的巨噬细胞。它们对外来异物均有吞噬和消化作用,因此是机体非特异性免疫的重要组成部分。另外单核巨噬细胞还有抗原提呈功能,参与机体的特异性免疫。

(一) 嗜中性粒细胞吞噬功能测定

将新鲜抗凝外周血与一定量细菌混合,经 37℃ 孵育一定时间后,推片染色。在显微镜下观察中性粒细胞吞噬细菌的现象,可根据其吞噬细菌百分率和吞噬指数来判断嗜中性粒细胞的吞噬功能。

一、实验材料

- 1、静脉血、2% 枸橼酸钠、PBS 缓冲液 (pH6.4)。
- 2、葡萄球菌培养液 (蛋白胨 10 克,酵母粉 5 克,氯化钠 5 克,水 1000ml 混合,高压灭菌后备用)。
- 3、注射器和针头、吸管、毛细管、试管、载玻片及瑞特染液等。

二、实验方法

- 1、自静脉采血 0.2ml,放于含 2% 枸橼酸钠 0.2ml 的小试管中,混匀,防止凝血。
- 2、取葡萄球菌培养液 0.1ml,加于上述混悬液中,混匀。置 37℃ 温浴 30 分钟,于第 10、20 分钟各振荡一次,然后静置,于第 30 分钟取出。
- 3、用毛细管从白细胞层 (即沉积红细胞的表层) 吸取白细胞,制成血膜,自然干燥。
- 4、瑞特染液染色。
 - (1) 将瑞特染液数滴,滴于血膜上,染 1 分钟。
 - (2) 再加等量蒸馏水,轻轻摇动混合,染 5 分钟。
 - (3) 用蒸馏水洗去游离染液,待干。
- 5、油镜下寻找白细胞,计数。

三、实验结果

血片染色后,嗜中性粒细胞的胞浆为淡红色,细胞核为紫色;细菌则染成深紫色位于胞浆中。观察 100 个嗜中性粒细胞,计算吞噬百分率和吞噬指数,以表示嗜中性粒细胞的吞噬功能。

吞噬百分率 = $\frac{100 \text{ 个嗜中性粒细胞中吞有细菌的嗜中性粒细胞数}}{100 \text{ 个嗜中性粒细胞}} \times 100\%$

吞噬指数 = $\frac{100 \text{ 个嗜中性粒细胞中所吞噬细菌的总数}}{100 \text{ 个嗜中性粒细胞}}$

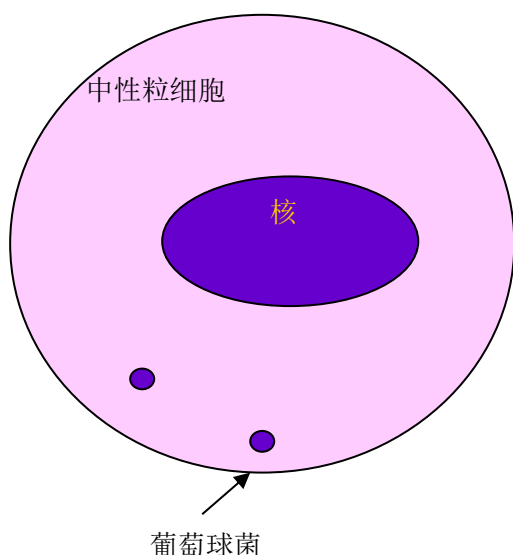


图2-1 小吞噬细胞吞噬示意图

（二）巨噬细胞吞噬功能测定（方法一）

巨噬细胞对颗粒性抗原物质具有强大的吞噬功能。在固有免疫的效应阶段发挥重要作用。将一定量的红细胞或白色念珠菌等颗粒性物质与巨噬细胞悬液共同孵育，即可见到吞噬现象发生。通过测定巨噬细胞吞噬异物的能力，可了解机体巨噬细胞功能状态。

一、实验材料

小鼠、3%硫代乙醇酸钠、酵母菌菌液、无菌注射器及针头。

3%硫代乙醇酸钠的制备：称取硫代乙醇酸钠 3 g，溶于 100 mL 的 0.9%氯化钠注射液中，121℃高压灭菌 20 min，放 4℃冰箱备用。

的制备：用已灭菌的液体 YPD 培养基 37℃恒温摇菌 24h，收集酵母菌液用 0.9%氯化钠注射液调至浓度参照麦氏标准比浊管为 1×10^9 cfu / ml，放 4℃冰箱备用。

二、实验方法

1、每只小鼠经腹腔注射 3%硫代乙醇酸钠溶液 3ml，诱导小鼠产生腹腔巨噬细胞。

2、96 h 后，每只小鼠腹腔注射酵母菌 0.6 ml，全部注射后轻柔腹部。

3、注射 30 min 后，小鼠颈椎脱臼处死，腹腔注射 0.9%氯化钠注射液 2 mL，轻轻按摩腹部后，消毒腹部皮肤后剪开腹中部皮肤一小口，用毛细吸管取出每组小鼠腹腔液，将每组每只小鼠取腹腔液滴于 3 张玻片，用另一张玻片推片，自然干燥后丙酮-甲醇溶液固定 5 min。将固定好的玻片滴加 Giemsa 染液 10 min 后，自来水冲干净，在显微镜油镜下观察小鼠腹腔巨噬细胞体内吞噬酵母菌的现象，并计算吞噬百分率和吞噬指数。

4、每隔 30 分钟，重复一次腹腔液涂片染色镜检。

三、实验结果

镜下计数 100 个巨噬细胞中吞噬酵母菌的巨噬细胞数及被吞噬酵母菌的总数。同时可观察酵母菌被消化的程度，以了解巨噬细胞的消化功能。

吞噬百分率 = $(100 \text{ 个巨噬细胞中吞有酵母菌的巨噬细胞数} / 100 \text{ 个巨噬细胞}) \times 100\%$

吞噬指数 = $100 \text{ 个巨噬细胞中所吞噬酵母菌总数} / 100 \text{ 个巨噬细胞}$

（三）巨噬细胞吞噬功能测定（方法二）

一、实验材料

中性红 0.5 g；蒸馏水 100 ml（也可用 0.9% NaCl）。混匀，可在 37 度加热 10 分钟促进溶解。过滤后常温保存，不得存储于低温，以防结晶沉淀。使用时再稀释 10 倍于 PBS。应在 30 分钟内使用，否则会出现结晶沉淀。

二、实验方法：

1、将密度为 5×10^5 个/mL 的巨噬细胞按 100 μ l/孔铺到 96 孔板，培养 24h 后，细胞染色前将吸干培养液，用 PBS 洗 2 次，加入 0.05% 的中性红染液（用 PBS 配制）100 μ l，处理细胞 4 分钟，时间过长细胞会死。

2、将中性红吸出，用 PBS 洗 2 次。在显微镜下检测细胞状态（非常重要，不可省略），细胞内应看到暗红色膜泡，如果显微镜有黄色滤光片，可看到更清晰的亮红色膜泡。视野中不应出现针状中性红结晶。

3、加入酸乙醇(含 50%乙醇， 1%乙酸， 49%水)溶解细胞，提取中性红。在 540nm 检测吸光度。按照光吸收数值来判断巨噬细胞的吞噬能力

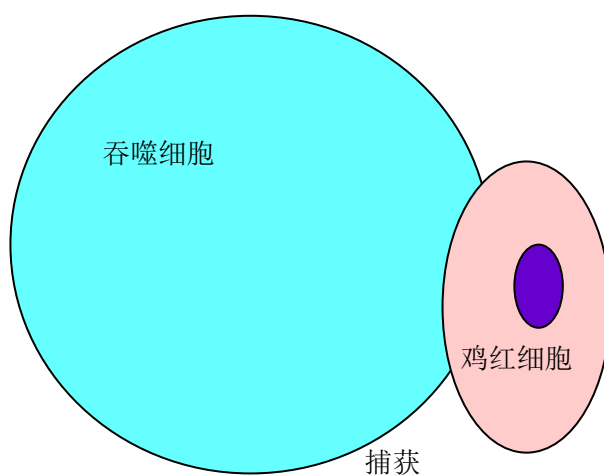


图2-3 大吞噬细胞吞噬示意图

(桂馨、何俊民)

第三单元 细胞毒实验

实验六 乳酸脱氢酶释放试验

自然杀伤细胞(NK, natural killer) 细胞属非特异性免疫细胞, 为机体的天然免疫系统中主要的效应细胞, 是与 T、B 细胞并列。该细胞介导天然免疫应答, 它不依赖抗体和补体, 且无 MHC 限制, 即能直接杀伤靶细胞, 如肿瘤细胞或被病毒感染的细胞等; 此外, 尚有免疫调节功能, 也参与移植排斥反应和某些自身免疫病的发生发展。NK 细胞活性可作为判断机体抗肿瘤和抗病毒感染的指标之一。例如在血液系统肿瘤、实体瘤、免疫缺陷病、艾滋病和某些病毒感染患者, NK 活性减低; 宿主抗移植反应者, NK 活性升高。

YAC-1 细胞为 Moloney 鼠科白血病病毒(Mo-M μ IV) 感染的鼠 T 淋巴瘤细胞, 对 NK 细胞敏感, 可用于检测 NK 细胞的杀伤活性。

一、实验原理:

乳酸脱氢酶(LDH) 存在于细胞内, 正常情况下, 不能透过细胞膜。当细胞受到损伤时, LDH 可从细胞内释放至培养液中。在释放出来的 LDH 的作用下, NAD⁺ 被还原生成 NADH, NADH 和 INT(2-p-iodophenyl-3-nitrophenyltetrazolium chloride)被硫辛酰胺脱氢酶(diaphorase)催化反应生成 NAD⁺ 和强生色物甲臞(formazan), 在 490nm 波长下产生吸收峰, 从而可以通过比色来定量乳酸脱氢酶的活性。吸光度与乳酸脱氢酶活性成线性正相关。利用读取的 A 值 (吸光度值), 可测得杀伤细胞毒活性。该酶联反应原理的示意图如下:

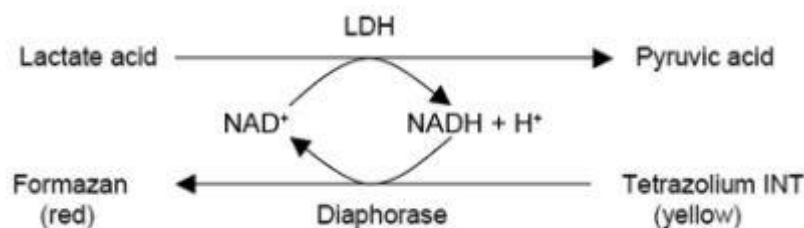


图 3-1 乳酸脱氢酶释放试验原理图

二、实验材料:

1. 75%酒精
2. 5ml 注射器芯
3. 100ml 烧杯
4. 无菌筛网 200 目
5. 无菌平皿
6. 1640 完全培养基
7. 无菌 U 型底 96 孔培养板 1 块/组
8. 无菌 15ml 离心管
9. 无菌直滴管
10. 细胞计数板
11. 无菌吸头(大、中、小) 3 盒
12. 无菌 EP 管若干
13. 眼科剪、小镊子 1 套
14. 小鼠
15. LDH 底物显色试剂
16. YAC-1 细胞
17. 台盼蓝

实验仪器：可调微量加样器，显微镜，细胞培养箱，酶标仪，离心机，超净台，细胞计数仪

三、实验方法：

①效应细胞的制备：

- 1.小鼠脱臼处死，75%酒精浸泡消毒 2-3 分钟。
 - 2.于超净台内取出脾组织，放入预先盛有 5ml 1640 培养液的平皿内。.
 3. 将脾脏剪切成 2~3mm² 的小块放在 200 目不锈钢细胞筛上，用针筒芯研磨碎，加 5ml 无血清 1640 培养基冲洗筛网，收集滤液至离心管。
 - 4.1000rpm，常温离心 10 分钟，弃上清，加 1ml1640 培养液重悬细胞。
- 取小鼠脾脏，两次后，用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基将细胞调成浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 的细胞悬液待用；

②靶细胞的制备：取生长良好的 YAC-1 细胞以 1000rpm ,5min 离心一次后，用含 10%小牛血清的 RPMI1640 完全培养基将其调成浓度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液待用；

③细胞计数：

- 1.取上述制备好的细胞悬液混匀后取出 20 μl ，加到盛有 980 μl 1640 培养基的 EP 管中，混匀后取出 20 μl 到一个新的 EP 管中，再向其中加入 20 μl 台盼蓝染料，混匀后取 20 μl 计入到细胞计数板上，用显微镜或细胞计数仪计数，方法见后。
- 2.调脾细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$ ，每组所需总量为 1ml。
- 3.调 YAC-1 细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$ ， 每组需 2ml。

注意：在稀释前一定要将原细胞悬液混匀，否则细胞长时间沉淀使细胞数不准。

④细胞培养：

- 1.按下表将各细胞加入 96 孔培养板中，各实验组均设 3 个平行孔，每块 96 孔培养板上均设一组空白对照组。

	1-3 孔
A 自然释放孔	100 μl YAC-1 100 μl 10%1640
B (E:T=100:1)	100 μl YAC-1 100 μl 脾细胞
C (E:T=50:1)	100 μl YAC-1 50 μl 脾细胞 50 μl 10%1640
D (E:T=25:1)	100 μl YAC-1 25 μl 脾细胞 75 μl 10%1640
E 最大释放孔	100 μl YAC-1 100 μl 1% Triton X-100
F 最大释放对照孔	100 μl 1% Triton X-100 100 μl 10%1640
G 培养基对照孔	200 μl 10%1640

- 2.将板做好标记放入 CO₂ 培养箱中，37℃ 5% CO₂ 培养 2 小时。

⑤结果测定：

- 1.在培养 2 小时后，1000rpm，5min 离心，取 100 μl 上清液移入酶标板条内，每孔内加入 LDH 底物显色试剂 60 μl ，室温(约 25℃) 避光混匀孵育 15min(可用铝箔包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动)。
- 2.结果测量：用酶标仪测定光密度值在 OD490nm 处测定吸光度。
- 3.结果判定：

$$SI = \frac{B、C、D \text{ 实验孔值} - A \text{ 自然释放孔值}}{MAX - S_{\text{自发}}} \times 100\%$$

MAX（靶细胞最大释放）=E-F，S_{自发}（靶细胞自发释放）=A-G

注：S_{自发}<0，做“0”处理。

四、实验结果要求：

1.算出不同 E: T 时的 SI 值，用 Excel 作图，横坐标为 E: T，纵坐标为 SI 值。把用酶标仪读出的原始数据和用 Excel 作的图一起贴到实验记录本上。

2.要对结果进行分析，写出影响结果的因素及注意事项。

(桂馨、何俊民)

第四单元 标记免疫分析技术综合实验

实验七 标记免疫分析实验

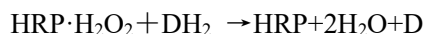
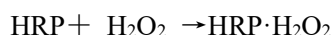
（一）酶联免疫吸附试验（Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA）

ELISA 是一种将抗原抗体免疫反应和酶标技术结合起来的检测方法。可敏感地检测液体中微量的抗体或抗原。本实验具有敏感性高、特异性强、简便易于观察的特点。其方法有间接法、双抗体夹心法等。本实验主要介绍检测 HBsAb 的双抗原夹心法。

一、实验原理：

用酶标记抗体或抗抗体进行抗原抗体反应，利用酶本身的特性，即在相应而适合的底物参与下，使基质水解显色，或使供氢体由无色的还原型变为有色的氧化型。显色后用肉眼或分光光度计判定结果，颜色的深浅反映待测样品中抗原或抗体的含量。它是将抗原和抗体的免疫反应和酶的催化反应相结合而建立起来的一种新技术，目前已广泛用于检测肝炎、激素等各类血清学试验。

HRP 催化过程反应式：



式中 DH_2 为供氢体，通称底物，但实际真正的底物为 H_2O_2 ， H_2O_2 与酶的活性中心结合成为活泼的氧化型酶，供氢体起氧化质子的作用，将氧化型酶还原成 HRP，而 DH_2 氧化成具有颜色的 D。

反应原理示意图：



图 4-1 测定组织抗原的酶标记抗体法（直接法）原理

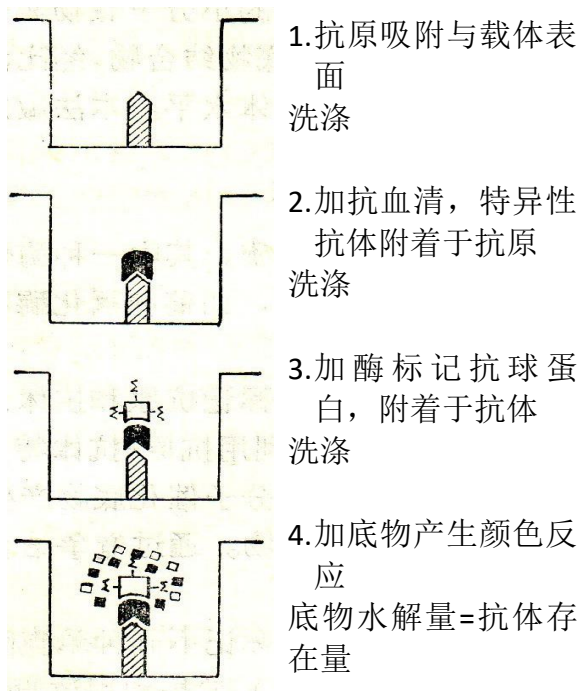


图 4-2 间接法原理

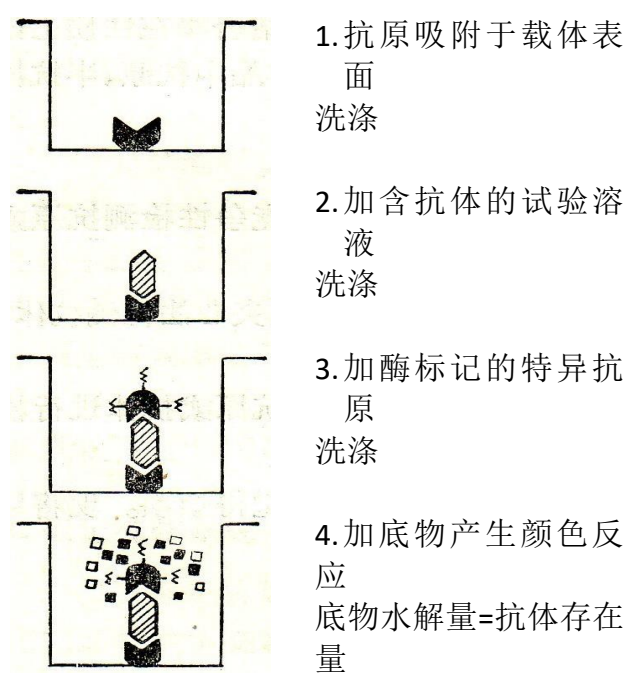


图 4-3 双抗原(抗体)夹心法原理

二、实验材料:

1. 市售试剂盒, 内含: 已包被 HBsAg 的聚苯乙烯微孔条、辣根过氧化物酶(HRP)标记的 HBsAg、底物液 (TMB)、显色剂 (H_2O_2)、洗涤液 (0.2M pH7.2 PBS 含 0.05% Tween20)、终止液 (2M H_2SO_4)、阴性血清、阳性血清
2. 待检血清
3. 微量加样器、塑料吸嘴

三、实验方法:

1. 加被检血清: 在各孔中分别加入待检血清 0.05ml、阳性血清、阴性血清各 1 滴, 第 1 孔加待检血清, 第 2 孔加阴性血清, 第 3 孔加阳性血清。
2. 加酶标抗原: 每孔 1 滴, 混匀, 置湿盒中放 37°C 60 分钟。
3. 洗涤: 倒净板中各孔液体, 加满洗涤液, 2 分钟后倒掉, 反复 3 次最后将板倒置在吸水纸上吸干水分。
4. 加底物液: 每孔 1 滴。
5. 加显色液: 每孔 1 滴, 混匀, 置室温暗处放 10 分钟。
8. 加终止剂: 每孔 1 滴, 混匀, 观察结果。

四、实验结果:

肉眼观察颜色情况, 蓝色为阳性; 在分光光度计上 450nm 读光密度。分别记录 1、2、3 的数值, 阳性读数与阴性读数比值 (P/N) > 2.0 有意义。为了准确确定其含量, 可查 HBsAg 标准曲线求其含量。

(二) 金标免疫试验 (Immuno-colloidal Gold Filtration Assay, IGFA)

一、实验原理:

胶体金颗粒呈桔红色, 利于观察颜色。蛋白质包被胶体金方法简便, 速度快, 重复性好。本实验将胶体金标记物包被在硝酸纤维素膜, 通过膜的毛细管作用进行反应, 省去加洗涤液、底物液、标记液, 操作更为简便。反应过程如图所示:

二、实验材料:

1. 胶体金早孕检测试纸

2. 待检尿液 1 号、2 号

三、实验方法：

撕去外包装，将 A 端（见图 4-4）浸入待检尿液少许，待完全湿透后取出观察结果。

四、实验结果：

阳性：B 点出现桔红色条带，且 C 点也出现桔红色条带

阴性：仅 C 点出现桔红色条带

如 B、C 点均不出现桔红色条带，则表明试剂失效，实验失败（见下图）

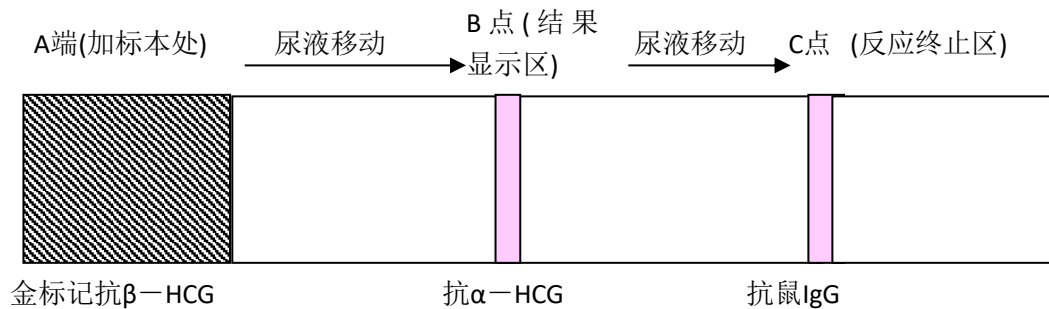


图 4-4 金标法原理

（三）放射免疫分析试验（Radioimmunoassay, RIA）

一、实验原理：

放射免疫分析试验是一种抗原抗体的竞争结合分析，其反应体系包括如下过程。

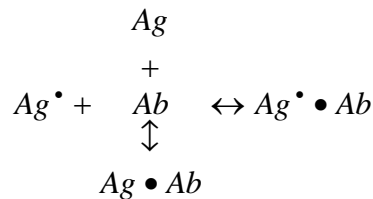


图 4—5 放射免疫分析法原理

上式中标记抗原 Ag^* 与抗体 Ab 发生结合反应，形成复合物 $Ag^* \cdot Ab$ ，并在一定时间后达至平衡。若此时存在非标记抗原 Ag ，则它也将与 Ab 结合，形成复合物 $Ag \cdot Ab$ 。由于 Ag^* 和 Ag 同抗体 Ab 具有同等亲和力，当 Ag^* 和 Ab 保持一恒定的量，且 Ag^* 和 Ag 的总量超过抗体 Ab 总结合位点数时， $Ag^* \cdot Ab$ 复合物的形成将与 Ag 量的增减呈反比。也就是说，未标记抗原将与标记抗原竞争抗体 Ab 上的有效结合位点。这样，当反应达到平衡后，将游离抗原（ Ag 和 Ag^* ）与结合抗原（ $Ag \cdot Ab$ 和 $Ag^* \cdot Ab$ ）分离，并分别测定其放射性，其游离部分放射活性（F）与结合部分放射活性（B）即可分别反映 Ag^* 和 $Ag^* \cdot Ab$ 的量。

在实际工作中，是将一系列标准抗原分别与一定量的标记抗原混合，同一定量的抗体反应，反应平衡后，分离 B 与 F 并分别测定其放射活性，由抗原浓度与 F% 或 B% 或 B/P 之间的函数关系，可得出剂量反应曲线或称校正曲线。这样，通过待测样品在相同实验条件下所得相应的测定值，即可由此曲线来推知其中的抗原含量（浓度）。

二、实验材料：

1. 市售试剂盒
2. 待检血液

三、实验方法：

详见《放射免疫分析技术》录像。

（何俊民）

实验八 梅毒螺旋体间接凝集试验（TPPA） （Particle Agglutination Test）

梅毒螺旋体（TP）存在于病人的血液或脑脊液中，不能在人工培养基或组织培养中生长。当病人感染梅毒螺旋体后3~4周，可在血液中检出针对梅毒螺旋体的特异性抗体，且该抗体在治疗后相当长时间内仍能检出。

一、实验原理：

间接凝集反应是将抗原成分吸附或结合在人工载体（如红细胞、明胶粒子）上，然后加入相应的抗体，由于抗体与抗原的特异结合，而把结合抗原的人工载体间接（被动）凝集起来，使微量可溶性抗原与抗体结合，成为肉眼可见的凝集现象。该方法是检测抗体的敏感方法。如用红细胞作为载体则称为间接血凝反应。如果将抗体球蛋白结合在红细胞表面用于检测相应抗原则成为反向间接血凝试验。

二、实验材料：

梅毒螺旋体抗体（TPPA）检测试剂盒，内含：

- 1) 梅毒螺旋体抗原致敏的颗粒悬液(使用前加 0.6ml 溶解液)
- 2) 未致敏颗粒悬液 (使用前加 0.6ml 溶解液)
- 3) 待测样品（阳性）
- 4) 样品稀释液

其他材料：

微量移液器、96 孔 U 型板、Tip 头

三、实验方法：

1. 在反应板的第1孔加100 μ l稀释液，第2到8孔：每孔加25 μ l稀释液。
2. 在反应板的第1孔加入25 μ l待测样品，从第2孔起进行倍比稀释，到第8孔混匀后吸取25 μ l丢弃。
3. 取第3孔加入25 μ l未致敏粒子，从第4孔至最后一孔各加入25 μ l致敏粒子。
4. 用平板混合器混匀反应板内试剂，室温（15~30℃）静置2小时后判读结果。

如下表所示加样：

Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8
血清稀释液(μ l)	100	25	25	25	25	25	25	25
样品或阳性对照血清(μ l)	25	25	25	25	25	25	25	25
样品稀释倍数	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
未致敏粒子(μ l)			25					
致敏粒子(μ l)				25	25	25	25	25
最终稀释倍数			1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280

四、结果判断：

目测：出现红细胞凝集者为阳性，不出现凝集者为阴性。各孔凝集结果以++++、+++、++、+、 \pm 、- 表示

- 不凝集：细胞沉积在板孔中央呈边缘光滑的钮扣状；

\pm 可疑凝集：细胞沉积在板孔中央呈边缘光滑的环状；

+ 凝集：细胞形成多边形或不规则环状沉积；

2+~4+ 强凝集：细胞形成边缘粗糙不规则形状或薄膜状覆盖到板孔底。

五、注意事项：

1. 致敏粒子以及未致敏粒子在使用之前均应该混合均匀。
2. 微量反应板中内容物充分混合再静置，静置过程中反应板加盖并禁止振摇。

(桂馨、何俊民)

实验九 多克隆抗体制备及效价鉴定

一、实验原理：

机体在抗原物质刺激下，B 细胞分化成的浆细胞能产生可与相应抗原发生特异性结合反应的免疫血清，即抗体。抗体产生途径见图示。

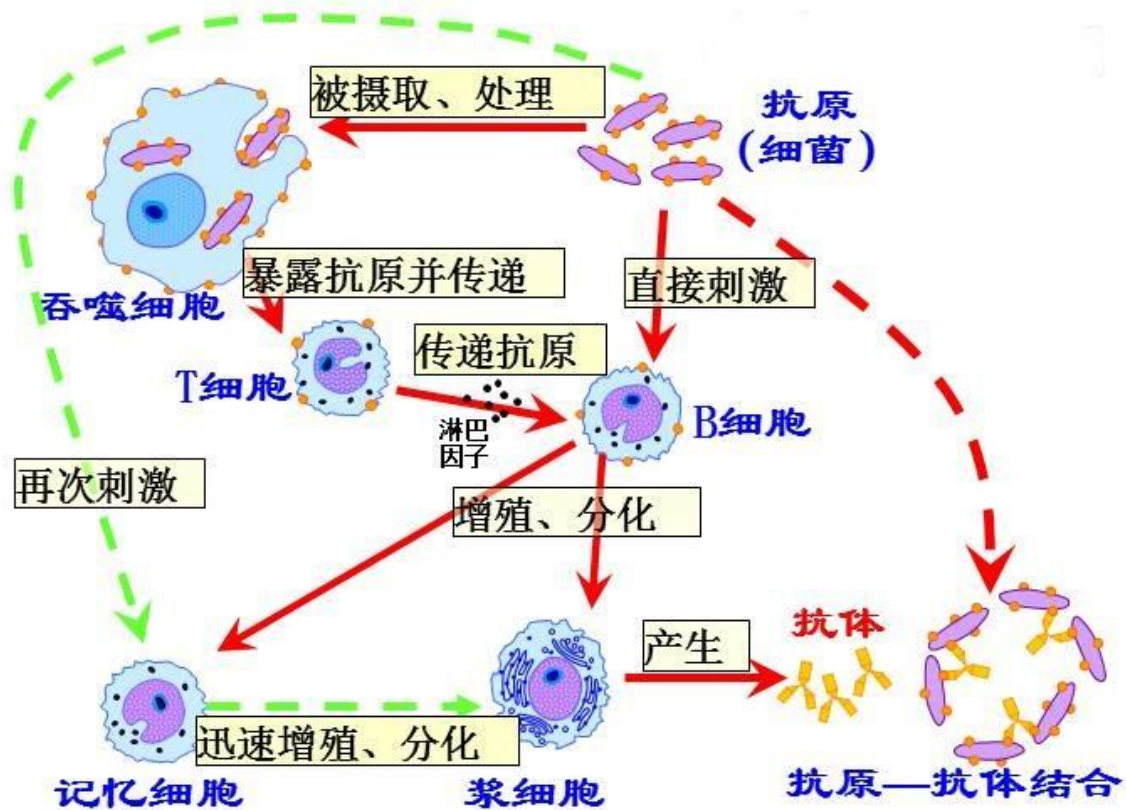


图 4-6 抗体产生途径

由于该抗原可以刺激机体多个 B 细胞产生针对不同抗原表位的抗体获得的血清为多种抗体的混合物，故称多克隆抗体。而用人工手段获得的多克隆抗体一般是由向动物体内注射异种抗原，获得抗血清制备而成。免疫所用的动物包括哺乳动物和禽类，主要是羊、马、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、鸡等。通过人工手段获得特异性抗体有很多用途。

首先是医疗领域：

- 1.用于疾病的诊断：a.病原微生物相关抗原、抗体的检测；b.肿瘤相关抗原检测 c.细胞因子检测；d.免疫细胞及其亚群的检测；e.激素的检测等。
- 2.应急预防：通过注射各种疫苗抗血清等，获得对于某些致病源的应急免疫（如破伤风等）。
- 3.治疗：人工制备的免疫球蛋白制剂对抗感染、抗移植排斥、抗炎、抗肿瘤有一定辅助作用。

其次在科研领域：作为探针应用于各种基于免疫学原理的实验技术（如免疫沉淀 IP、凝集、免疫印迹 WB、ELISA、流式细胞技术 FACS、免疫组化 IHC、免疫荧光 IF 等）。

二、实验材料：

BALb/c 小鼠、血蓝蛋白、注射器、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、PH7.4 PBS。

三、实验方法：

1.初免：

将所需免疫的抗原与弗氏完全佐剂 1:1 混匀成油包水状，装入 1ml 针筒，取 Balb/c 小鼠腹部皮下多点注射（打三个点）0.2ml/只（学生操作）。

2.二免:

两周后将所需免疫的抗原与弗氏不完全佐剂 1:1 混匀成油包水状, 装入 1ml 针筒, 取 Balb/c 小鼠腹部皮下多点注射 (打三个点) 0.2ml/只 (学生操作)。

3.加强:

检测前三天腹腔注射抗原 0.2ml/只 (教师操作)。

4.检测:

a.实验当天 (二免两周后) 小鼠眼眶取血, 离心, 取血清按 1:500、1:1000、1:2000、1:3000、1:4000、1:5000 稀释按 100 μ l/孔加入预先包被好的酶标板, 每个滴度做三个复孔。加入阳性对照 (1:1000 稀释的免疫小鼠血清) 和阴性对照 (PBS), 37°C, 60min;

b.PBST 洗涤 3 次, 每次加满洗涤液放置 30 秒后弃去洗涤液拍干, 每孔加入工作浓度的抗鼠酶标抗体 100 μ l, 37°C, 孵育 45min;

c.PBST 洗涤 3 次, 每次加满洗涤液放置 30 秒后弃去洗涤液拍干, 每孔加入 TMB 显色液 100 μ l, 37°C, 显色 5min;

d.每孔加入 50 μ l 终止液 (2M H₂SO₄), 在酶标仪 OD450 条件下进行读数, 以样品值/阴性值大于 2.1 判定为阳性。

注: 初免、二免、检测的时间间隔均为两周, 加强为检测前三天。

(桂馨、何俊民)

实验十 血脑屏障

小鼠尾静脉注射美兰：

一、实验材料：美兰染液、OT 针筒、小鼠、二甲苯。

三、实验步骤：用二甲苯擦拭小鼠尾静脉，吸取美兰 0.1ml 注入尾静脉，置二小时，处死，沿脊椎解剖至脑部，观察。

三、实验结果：小鼠整个胸腔被染成蓝色；脑部，未被染色。

(桂馨、何俊民)