

医学免疫学

实验指导

临床医学、口腔医学

免疫学教研室

免疫学实验课的目的和要求

免疫学是医学科学领域中的一门重要学科。在学习免疫学的过程中，不仅需要掌握本学科的基础知识、基本理论，同样重要的是不能忽视免疫学作为实验性科学而不断发展的事实。因而，我们在教学过程中，注重对学生进行免疫学技术操作及实验能力的培养。免疫学实验课是整个免疫教学中重要的有机组成部分。

一、实验课目的：

1. 加深和巩固对系统理论知识的理解和体会。
2. 熟悉和掌握免疫学实验的基本技能。
3. 培养正确的科学态度和思维分析能力。

二、实验课要求：

1. 为提高实验课效果，每次实验前必须认真预习。了解实验原理、材料与方法、注意事项以及预期的实验结果。
2. 加强基础训练，每次实验过程中应注意基本技术、基本操作、基本训练。坚持严肃性、严格性和严谨性。
3. 示教实验和录像实验要仔细观察。
4. 自行操作要认真、准确。
5. 为提高科学思维、分析、总结能力，每次实验结束后必须认真地记录结果，进行分析，得出结论，完成实验报告。

实验室守则

1. 尊重教师、友爱同学，严肃认真，团结活泼。
2. 进入实验室应穿白大衣，保持安静，遵守秩序。
3. 爱护仪器。节约试剂。尤其是贵重仪器的使用，未经指导教师许可，不得擅自自动用。如遇器材损坏或其它意外情况应及时报告指导教师。
4. 保持实验室整洁、卫生，实验完毕后应整理好器材、物品，关好水、电、煤气，舍弃物应根据不同性质作适当处理，并将实验室打扫干净。桌椅放回原处。

目 录

第一章 抗原抗体反应.....	1
实验一 直接凝集试验—血型鉴定试验（玻片法）	2
实验二 间接凝集抑制试验	2
实验三 对流免疫电泳	3
实验四 双向琼脂扩散试验	4
第二章 免疫标记技术.....	6
实验五 酶联免疫吸附试验（ELISA）—双抗体夹心法 ..	7
第三章 免疫细胞的检测.....	9
实验六 外周血单个核细胞的分离—密度梯度离心法 ...	10
实验七 细胞膜表面抗原检测—补体依赖的微量淋巴细胞毒试验	12
附录：免疫细胞的检测（录像）	14
外周血单个核细胞的分离—密度梯度离心法	14
T、B淋巴细胞的分离—尼龙毛分离法	14
外周血T细胞的数量检测—E-花环形成试验	14
淋巴细胞转化试验	14

第一章 抗原抗体反应

抗原抗体反应是指抗原与相应抗体发生特异性的结合反应，可发生在体内，也可发生在体外。当抗原抗体反应在体内发生时，可导致溶菌、杀菌、中和毒素等作用；而抗原抗体在体外（玻片上、试管内）结合时，在电解质、补体等参与下，根据参加反应的抗原物理性状不同（颗粒性或可溶性），可出现不同类型的反应现象；如凝集反应、沉淀反应及补体参与的溶血反应等。由于抗体一般存在于血清中，在进行抗原抗体反应时，常采用血清做试验，故临床上把体外的抗原抗体反应常称作为血清学反应，对机体中各种抗体成分进行定量或定性分析，以观察机体产生抗体的能力以及特异性抗体及异常抗体的出现。可采用已知抗原（或抗体）检测未知抗体（或抗原），有助某些疾病的早期诊断。

一、目的要求

1. 掌握凝集反应、沉淀反应的基本原理。
2. 熟悉凝集反应、沉淀反应类型及特点。
3. 了解体外抗原抗体反应临床检测意义。

二、实验内容

1. 直接凝集反应
2. 间接凝集抑制试验
3. 对流免疫电泳
4. 双向免疫扩散试验（示教）

三、思考题

1. 影响凝集反应的因素有哪些？
2. 为什么在凝集反应中一定要加入电解质？
3. 为什么对流免疫电泳敏感度比双向琼脂扩散法高？

实验一 直接凝集试验—血型鉴定试验（玻片法）

（一）原理

颗粒性抗原（如红细胞、白细胞、细菌等）与相应抗体在体外适当环境条件下发生特异结合时，可产生肉眼可见的凝集现象。人类血清中存在着天然的针对红细胞抗原的特异性抗体（凝集素），而红细胞表面也具有各种不同的血型抗原（凝集原）。当红细胞与相应抗体混合后，在电解质参与下，因红细胞表面抗原与抗体结合而产生肉眼可见的凝集。这种现象称为直接凝集反应，可用于检测血型或检测相应的血型抗体。

（二）器材与试剂

1. 器材

（1）酒精棉球（2）采血针（3）试管（4）50~250 μ l 可调微量移液器（5）移液头（6）载玻片（7）牙签

2. 试剂

（1）抗 A、抗 B 标准血清（2）生理盐水

（三）操作步骤

1. 采血一滴，加入试管（含 1ml 生理盐水）稀释成红细胞悬液。
2. 取洁净载玻片一块；用记号笔在左上角标“A”，右上角标“B”。
3. 用移液器吸取抗 A 标准血清 50 μ l，置 A 角；抗 B 标准血清 50 μ l，置 B 角。
4. 用移液器吸取红细胞悬液，各加 50 μ l 于“A”角和“B”角。
5. 用 2 根牙签分别混合“A”角和“B”角之内容物。
6. 手执载玻片。前后摇动，促使血清与红细胞悬液充分混匀数分钟。放置室温 3~5 分钟左右。
7. 观察结果。

（四）注意事项

1. 正确掌握微量移液器的使用方法。
2. 加抗血清和红细胞时液体量要均匀，体积不易太大。
3. 摇动时应注意液体的流动，不要使 A、B 角液体混合。

实验二 间接凝集抑制试验

（一）原理

聚苯乙烯乳胶颗粒具有吸附蛋白质类生物高分子的性能。利用它作为载体，直接吸附抗原（如绒毛膜促性腺激素，HCG）成为致敏乳胶颗粒。将抗体先与标本中

的抗原结合，然后再加入致敏乳胶颗粒，如不出现凝集现象，说明标本中的抗原中和了抗体，结果为阳性；若标本中无抗原物质，则抗体与加入的致敏乳胶颗粒结合，出现凝集，结果为阴性。此法作为早期妊娠诊断的有效方法，具有快速、简便、准确等优点。

(二) 器材与试剂

1. 器材

(1) 载玻片 (2) 50~250 μ l 可调微量移液器 (3) 移液头 (4) 牙签 (5) 黑纸

2. 试剂

(1) 致敏 HCG 乳胶试剂

(2) 抗 HCG 抗体

(3) 孕妇尿

(4) 正常尿

(三) 操作步骤.

1. 取载玻片二块，一块加孕妇尿 50 μ l，另一块加正常尿 50 μ l。

2. 各加一滴抗 HCG 抗体，用牙签搅动，使其充分混匀，均匀分布于载玻片上。

3. 再加致敏 HCG 乳胶抗原一滴，轻轻摇动 10~15 分钟，在较强的光线下，边摇动边观察结果。

4. 阴性：出现均匀一致的细小凝集颗粒。阳性：仍现乳状液体，无凝集颗粒。

(四) 注意事项：

1. 待检标本和试剂的加入顺序，应照操作步骤进行，否则结果难以判断。

2. 观察结果应在较强的光线下进行，必要时可借助放大镜或显微镜观察。

3. 本试验一般作定性测定，液滴大小应均匀一致。

实验三 对流免疫电泳

(一) 原理

将抗原和抗体分别加入半固体琼脂孔内，在碱性缓冲液中进行电泳时，蛋白质抗原带负电荷，在电场中由阴极向阳极移动。抗体等电点较抗原高，在此缓冲液中带阴离子少，分子量大，泳动较慢，同时因电渗作用（电渗是电场中溶液对于固体的相对移动，琼脂是酸性物质含有较多的硫酸根，在碱性缓冲液中带负电，而与它接触的溶液带正电，因此液体向阴极移动，产生电渗），反而向阴极泳动，这样就使抗原、抗体在电场中相对移动，而形成对流。经过一定泳动时间后，在比例最适处，形成肉眼可见的白色沉淀线。由于电场作用，限制了抗原和抗体多方向的自由扩散，加速了泳动的速度，缩短了反应时间，提高了灵敏度。

(二) 器材与试剂

1. 器材

- (1) 电泳仪、电泳槽 (2) 载玻片 (3) 刻度吸量管 (4) 打孔器和图形卡
- (5) 毛细管 (6) 吸耳球 (7) 煮沸消毒水浴箱

2. 试剂

- (1) 1.2% 琼脂凝胶 (2) 生理盐水 (3) 抗原 (4) 抗体
- (5) pH8.6 0.1M 巴比妥缓冲液

(三) 操作步骤:

1. 取热熔的 1.2% 琼脂凝胶 3.5ml, 立即浇于载玻片上, 使琼脂平铺于整个玻片。待自然冷却凝固。
2. 用打孔器按图形打孔, 再用针尖挑去孔内琼脂。
3. 将抗原和抗体用生理盐水分别稀释成 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 等不同浓度。
4. 用毛细管按顺序将不同稀释度的抗原加入第 1 和第 3 行各孔中。将不同稀释度的抗体加入第 2 和第 4 行各孔中。每孔加满为止, (注意防止溢出孔外)。
5. 将琼脂凝胶玻片放入 pH8.6 0.1M 巴比妥缓冲液电泳槽中, 抗原端接负极, 抗体端接正极, 琼脂两端用四层纱布搭桥。
6. 电泳, 电压为 110V, 泳动时间 30—45 分钟。
7. 关闭电源。
8. 观察结果: 从电泳槽内取出琼脂板, 对光观察抗原与抗体之间有无白色沉淀线, 出现沉淀线最佳比例和最高稀释度是多少, 并绘出沉淀线的位置、数量、形态。

(四) 注意事项

1. 浇板时, 琼脂面要铺平。
2. 利用毛细管虹吸作用将样品吸入毛细管内。
3. 加样时避免样品溢出孔外。

实验四 双向琼脂扩散试验

(一) 原理

将抗原和抗体分别加到琼脂凝胶板上的小孔中, 使两者相互扩散, 经一定时间后, 若两者特异性结合, 在琼脂孔间形成白色沉淀线。

(二) 器材与试剂

1. 器材

- (1) 载玻片 (2) 刻度吸量管 (3) 打孔器和图形卡 (4) 50~250 μ l 可调微量移液器
- (5) 移液头 (6) 吸耳球 (7) 煮沸消毒水浴箱 (8) 有盖搪瓷湿盒

2. 试剂

- (1) 1.2% 琼脂 (2) 生理盐水 (3) 抗原 (4) 抗体

(三) 操作步骤

1. 用吸量管吸取热熔琼脂 3.5ml，平铺于载玻片上。
2. 待凝固后，按图形卡，用打孔器打孔，用针挑去孔内琼脂。
3. 将 100 μ l 抗体用生理盐水依次稀释成 1:2，1:4，1:8，1:16，1:32，1:64 等不同滴度。并用微量移液器分别加 10 μ l 于周围孔中。
4. 用微量移液器将抗原加 10 μ l 于中央孔。
5. 将玻片置于有盖搪瓷湿盒内，隔天观察结果，绘出沉淀线位置、数量、形态。

（四）注意事项

1. 浇板时，琼脂面要铺平、无气泡；浇好后要放置 2 分钟凝固。
2. 加样时避免样品溢出孔外。

第二章 免疫标记技术

免疫标记技术是指用一些可被检测出的微量标记物质(例如放射性同位素、酶、荧光素等)对抗体或抗原进行标记,并以此标记的抗体(抗原)作抗原抗体反应以进行检测的一种免疫学技术。此项技术具有高度的特异性和敏感性,可用于快速诊断及定性、定量乃至定位的检测。在很大程度上弥补了经典的血清学方法所受的限制。根据标记物质的不同,免疫标记技术主要可分为三大类,即酶免疫技术、荧光免疫技术和放射免疫测定法。

酶免疫技术是以酶标记的抗体或抗原作主要试剂的免疫学检测方法,又可分为酶免疫组织化学技术和酶免疫测定两类,前者应用酶标记抗体与组织切片上的相应抗原反应,然后与底物作用形成有色沉淀,再通过光学显微镜加以观察。后者则通过标记的抗体(抗原)与相应的抗原(抗体)结合并使底物显色,以检测标本含有的相应抗原(抗体),常用的是酶联免疫吸附试验(ELISA)。

荧光免疫技术是以荧光素标记抗体或抗原,与酶免疫技术相似,也可分成荧光免疫组化技术和荧光免疫测定两类。目前应用较广泛的是免疫组化技术,但该技术的应用需要特殊的荧光显微镜方能进行观察。

放射免疫测定是最早建立的标记免疫测定方法,其基本原理是利用标记抗原和非标记抗原对特异性抗体的竞争结合。该方法具有灵敏度高(可测定到 ng 甚至 pg 水平)、特异性强(可分辨结构类似的抗原)和准确性好(ng 量的回收率接近 100%)。在临床检验中是测定微量蛋白质、激素和药物等的首选方法。但因放射性同位素的使用需要特定的检测设备和防护设施,使其应用受到一定限制。

一、目的要求

1. 掌握酶 ELISA 的基本原理。
2. 熟悉 ELISA 夹心法的操作。
3. 了解主要的免疫标记技术的基本原理和应用。

二、实验内容

酶联免疫吸附试验(ELISA—夹心法)

三、思考题

1. 与其它免疫标记技术相比,酶免疫技术有哪些特点?
2. 酶联免疫吸附试验(ELISA)共有几种类型的检测方法?试比较这些方法各有什么特点?

实验五 酶联免疫吸附试验（ELISA）—双抗体夹心法

（一）原理

酶联免疫吸附试验（ELISA）是检测溶液中抗原或抗体的特异而灵敏的免疫学检测方法。双抗体夹心法是常用的一种检测抗原的方法，其原理为：（1）抗体结合于固相载体表面而不失其活性；（2）抗体与酶标记物交联后仍保持了免疫活性和酶活性；

（3）检测时，固相抗体首先与待测抗原结合，后者再和酶标抗体结合，随后加入相应底物后，可催化底物呈显色反应。反应液颜色的深浅与被测抗原的量相关。

在本实验中，以辣根过氧化物酶（HRP）标记抗体。当抗体与相应抗原结合后，标记的酶则可催化底物（四甲基联苯胺）起显色反应，形成蓝色产物，从而指示特异性抗原抗体反应的存在。

（二）器材与试剂

1. 器材：

（1）50~250 μ l 可调微量移液器与移液头（2）37 $^{\circ}$ C 培养箱、搪瓷盒（3）酶标专用架（4）洗瓶（含洗涤液）、吸水毛巾

2. 试剂：

（1）已包被抗体的酶标条（2）400 μ g/L 抗原溶液（3）抗原稀释液（4）待测标本 1、2（5）酶标抗体（6）洗涤液（pH7.2 PBS-Tween 20）（7）底物 A、B 溶液（8）终止液

（三）操作步骤：

1. 取已包被抗体的酶标条，扣入酶标专用架；分别在第 1~6 孔各加入抗原稀释液 100 μ l，第 6、7 孔各加入 400 μ g/L 抗原溶液 100 μ l，从第 6~2 孔进行对倍稀释（最后在第 2 孔吸出的 100 μ l 弃去）；在第 8、9 孔各加入 100 μ l 待测标本 1；在第 10、11 孔各加入 100 μ l 待测标本 2。置酶标板于 37 $^{\circ}$ C，保温 30 分钟。
2. 弃去孔内液体，以洗涤液注满孔内，置 3 分钟后甩干孔内液体，重复 3 遍。上述孔内再加入酶标抗体 100 μ l。置 37 $^{\circ}$ C，保温 30 分钟。
3. 弃去孔内液体，以洗涤液注满孔内，置 3 分钟后甩干孔内液体，重复 4 遍。
4. 各孔均加底物 A 和底物 B 溶液各 100 μ l，混匀。置 37 $^{\circ}$ C，10 分钟左右加入终止液 50 μ l 中止反应。
5. 将酶标板置酶标仪上比色，以第 1 孔调零，在 450nm 波长处读取光密度值（O.D 值）。
6. 结果判断：以 O.D 值为纵坐标，抗原标准浓度（0;12.5;25;50;100;200;400 μ g/L）为横坐标在半对数坐标纸上画出标准曲线，再根据样品的平均 O.D 值在标准曲线上查出各自的含量。

（四）注意事项

1. 熟练掌握微量移液器的使用方法。
2. 酶标板的正确洗涤：每次洗涤后都应尽量甩干孔中残液。加入洗涤液时应小心，勿使洗涤液溢出，流入周围孔中。

第三章 免疫细胞的检测

免疫细胞的检测技术是近代免疫学探索机体免疫系统奥秘的一把不可或缺的钥匙。在长期的科学研究工作中形成的免疫细胞检测技术主要包括两个部分，即对免疫细胞表面蛋白分子的检测和对各类免疫细胞功能的测定。此外，从实验研究需要出发，也建立起了许多分离细胞的技术。

免疫细胞表面蛋白分子的检测，是对免疫细胞分类、定量的重要依据。目前的检测技术主要依靠以抗原抗体特异结合原理为基础的膜抗原识别检测，如荧光抗体技术、酶标抗体技术以及补体依赖的细胞毒试验等。对一些特殊的膜蛋白也可用特殊的配体结合法来加以检测，例如花环形成试验等。

各类免疫细胞的功能检测试验中包括淋巴细胞转化试验、特异性与非特异性细胞毒试验、抗体形成细胞的检测试验以及细胞吞噬能力和胞内杀伤能力的功能检测。由于这些试验都需以特定细胞群体为试验对象，因此，随之派生了许多细胞分离方法，常见的有密度梯度离心分离技术、尼龙毛分离技术等。

本次实验录像介绍一些较经典的免疫细胞检测试验供同学们对这一检测技术有一个全面的了解，并希望由此达到下列教学要求。

1. 了解免疫细胞的各种分离技术的原理。
2. 了解免疫细胞表面蛋白检测的方法和原理。
3. 了解免疫细胞功能检测的方法和原理。

实验六 小鼠脾单个核细胞的分离—密度梯度离心法

一、原理

根据物理学颗粒沉降原理，不同密度的颗粒在其沉降运动中可因其比重的差别而处于不同的分布位置。利用此原理可设计一定比重的液体界面，将小鼠脾脏中各种不同比重的细胞通过离心沉降而达到使其彼此分离的目的。已知小鼠淋巴细胞和单核细胞的比重为 1.088 左右，而红细胞与粒细胞的比重均大于 1.088。因此，若用比重为 1.088 ± 0.001 的分离液则可通过密度梯度离心方法，在分离液界面上收集得到脾单个核细胞。

二、器材与试剂

1. 器材：

- (1) 水平式离心机
- (2) 显微镜、擦镜纸
- (3) 血球计数板、血盖片
- (4) 载玻片、盖玻片
- (5) 试管、滴管

2. 试剂：

- (1) 小鼠脾脏细胞悬液
- (2) 淋巴细胞分离液 (F) (比重： 1.088 ± 0.001)
- (3) 生理盐水 (0.9%氯化钠注射液)
- (4) 白细胞稀释液 (WD)
- (5) 0.5%锥兰溶液

三、操作步骤

1. 将 2ml 小鼠脾脏细胞悬液混匀，然后用滴管沿盛有 2ml 淋巴细胞分离液的试管壁轻轻铺于分离液面上。
2. 将该试管置水平式离心机中 1800rpm 离心 15min。
3. 用滴管小心直接插入白色絮状的细胞层，吸出界面层细胞，移入另一试管中。
4. 加入足量生理盐水，用滴管轻轻上下混匀，然后 1000rpm 离心 10min，弃去上清液，将沉淀细胞充分摇匀，然后用生理盐水再离心洗涤 1 次，弃去上清液后充分摇匀沉淀细胞。
5. 用生理盐水稀释沉淀细胞至 0.3ml (约加 6 滴)，混匀。
6. 取细胞悬液一滴加入等量白细胞稀释液于另一试管中充分混匀，用计数板在显微镜下计数，计算出淋巴细胞浓度 (个/ml)。
7. 检查细胞活力：取细胞悬液一滴，加入等量锥兰溶液于另一试管中，充分混匀后立即滴一滴细胞悬液于载玻片上，在显微镜下计数 100~200 个淋巴细胞中着色的死细胞数。

四、实验结果记录与分析

1. 淋巴细胞浓度 (个/ml)

$$\frac{\text{四个大方格细胞总数}}{4} \times 10 \times 2 \times 10^3$$

2. 计算细胞活力 (%)

$$\frac{\text{活细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

五、操作注意事项

1. 注意分离液与细胞悬液的比例，一般以 1:2~1:3 为宜。
 2. 分离时所取的离心速度与时间，因各离心机的离心半径而异，需事先通过预试验决定。
 3. 加入细胞悬液时应缓慢，注意保护分离液的界面，勿使混和，影响分离效果。
- 做细胞活力检查时，锥兰染色后应尽快计数完毕，时间过长则容易造成过染色。

实验七 细胞膜表面抗原检测—补体依赖的微量淋巴细胞毒试验

一、原理

抗体与淋巴细胞表面的膜抗原特异性结合后，免疫球蛋白的补体结合位点暴露。该抗原抗体复合物与补体结合而使其活化，通过一系列级联反应，形成攻膜复合体在细胞膜上穿孔，最终导致靶细胞的溶解死亡。在细胞被穿孔但尚未裂解前加入染料（如锥兰、伊红等），可使染料进入细胞内，而使细胞着色。同时这些细胞也表现出体积增大，折光性减弱、消失。相反，染料不能使活细胞染色，且活细胞折光性也无改变。通过光学显微镜的观察，可测得死细胞的百分率，以此来确定相应靶细胞上是否携带有特异性的膜抗原。

二、器材与试剂

1. 器材：

- (1) 显微镜
- (2) 细胞反应板、一次性注射器
- (3) 试管、滴管
- (4) 擦镜纸

2. 试剂：

- (1) RPMI-1640 细胞培养液
- (2) 抗淋巴细胞血清
- (3) 淋巴细胞悬液
- (4) 补体（兔血清）
- (5) 石蜡油
- (6) 细胞染色液（0.5%锥兰溶液）

三、操作步骤

1. 正确放置细胞反应板，轻轻倒入 8ml 石蜡油，避免气泡产生。
2. 按图在反应板上选好反应孔与对照孔（甲组或乙组，每组 3-5 孔）。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
甲组											乙组
对照孔	A	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	○	○	○	○	
	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
反应孔	C	Ⓜ	Ⓜ	Ⓜ	Ⓜ	Ⓜ	○	○	○	○	
	D	○	○	○	○	○	⊙	⊙	⊙	⊙	对照孔
	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	F	○	○	○	○	○	Ⓜ	Ⓜ	Ⓜ	Ⓜ	反应孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

3. 在对照孔中各加入一滴培养液，反应孔中各加入一滴抗体。
4. 混匀细胞悬液，在对照孔与反应孔中各加入一滴细胞悬液，使其中液体混匀。

5. 室温 (22±2℃) 作用 30 分钟。
6. 每孔加入补体 3 滴, 室温作用 45~60 分钟。
7. 每孔加入细胞染色液 3 滴, 染色 5~10 分钟。
8. 吸去盖板中的石蜡油与锥兰溶液, 镜下观察并判断结果。

四、操作注意事项

(一) 试剂要求

1. 补体: 补体质量是影响实验结果的关键因素之一, 一般采用新鲜的兔血清。每批补体使用前须测定是否存在天然细胞毒作用, 应选用无细胞毒作用者。同时应测定补体的效价。
2. 靶细胞: 根据实验目的选用相应的靶细胞。要求所选用的细胞活力好, 死细胞数不大于 10%; 细胞纯度高, 尽可能少含非靶细胞; 细胞浓度合适, 以 $1.5\sim 2.0 \times 10^6/\text{ml}$ 为宜。
3. 抗血清: 应用前必须离心, 去除杂质和脂肪的干扰。

(二) 反应条件

1. 时间: 时间过长、过短都可能造成假阴性或假阳性。
2. 温度: 温度不宜过高或过低, 两者均会影响实验结果。

(三) 加样操作

加样时要注意将针尖伸入石蜡油内, 但不直接碰到孔底, 此即所谓“软加”。这样可避免试剂浮于油层表面, 或使针尖沾上已加的样品而交叉污染。实验时, 加样应遵循先加对照孔, 后加反应孔的原则。

(四) 染色与读数

锥兰染色后, 细胞不能用甲醛固定, 所有结果应在 6 小时内读完。

五、实验结果记录与分析

1. 观察、记录结果: 按下表, 记录各孔死细胞百分率。

反应孔	1	2	3	4	5	对照孔	1	2	3	4	5
死细胞数 (%)						死细胞数 (%)					
记分						记分					

2. 判别待检标本是否阳性: 对照 CDC 统一记分法, 判别实验结果。

死细胞百分数	记分	意义
0~10	1	阴性 (-)
11~20	2	可疑阴性 (±)
21~40	4	弱阳性 (+)
41~80	6	阳性 (++)
81~100	8	强阳性 (++++)
	0	无效 (O)

附录：免疫细胞的检测（录像）

外周血单个核细胞的分离—密度梯度离心法

原理：根据物理学中颗粒沉降原理，不同密度的物质颗粒在其沉降运动中可因其比重的差别而处于不同的分布位置。利用此原理可设计一定比重的液体界面，将外周血中各种不同比重的细胞通过离心沉降而达到使其彼此分离的目的。已知人类淋巴细胞和单核细胞的比重大约在 1.075~1.090 之间，而红细胞与粒细胞的比重均大于 1.090。因此，若用比重为 1.077 ± 0.001 的分离液则可通过密度梯度离心方法，在分离液界面上收集外周血单个核细胞。

T、B 淋巴细胞的分离—尼龙毛分离法

原理：利用 B 淋巴细胞具有粘附尼龙毛（Nylon Wool，即聚酰胺纤维）表面的能力，且这种粘附通过挤压可以解离，T 细胞则不具有这种粘附能力。将淋巴细胞过尼龙毛柱后，可使 T、B 淋巴细胞相互分离。

外周血 T 细胞的数量检测—E-花环形成试验

原理：T 淋巴细胞表面具有绵羊红细胞（SRBC）的受体，即 CD2。当其细胞膜与绵羊红细胞相接触时，通过粘附作用，可使 SRBC 粘附于 T 细胞周围，形成玫瑰花样的形状，故称为 E-花环（Erythrocyte-Rosette），此法可作为特异性检测 T 淋巴细胞的方法。临床以此作为机体免疫功能、免疫状态以及判断预后、观察药物疗效的指标。

淋巴细胞转化试验

原理：T 淋巴细胞在体外培养时受到特异性抗原或非特异性有丝分裂原如植物血凝素（PHA）、刀豆蛋白 A（ConA）等激活剂刺激后，能转化成为体积大、代谢旺盛、并能增殖分裂的淋巴母细胞。伴随着形态变化的同时蛋白质与核酸的合成也增加。因此，可用形态学方法检测转化型细胞百分率、 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法及 MTT 法检测淋巴细胞增殖程度，来判断机体的细胞免疫功能。

$^3\text{H-TdR}$ 掺入法：TdR 为 DNA 合成前体，用同位素氚标记后，在细胞增殖期能掺入细胞新合成的 DNA 中。细胞增殖水平越高，掺入的放射性核素越高。放射性核素强度以 cpm 值表示，故细胞增殖水平与 cpm 值成正比。

MTT 法：MTT 作为细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶底物，其四氮唑环被活化的线粒体裂解形成蓝色甲臞颗粒，经异丙醇作用，颗粒溶解显色，显色深浅与细胞增殖水平呈正相关。