



中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等院校规划教材

病原生物学与免疫学实验

第4版

杨 健 胡为民 杨继文 主编



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等院校规划教材

病原生物学与免疫学实验

第4版

主 编	杨 健	胡为民	杨继文	
副 主 编	朱 红	杨尚君	潘万龙	
编 委	(以姓氏拼音为序)			
	常晋霞	陈 蓉	胡为民	李倩倩
	李雪璐	潘万龙	彭丽娟	王 燕
	杨继文	杨 健	杨尚君	杨艳红
	张仁刚	张晓丽	张晓英	周燕蓉
	朱 红	朱晓燕		

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

本书分为四部分,绪言主要介绍本门课程的教学目的和要求以及实验室规则和实验室生物安全;第一篇主要介绍三门课程的基本实验,包括医学免疫学、病原生物学和人体寄生虫学基本实验项目,内容包括一些新的实验技术;第二篇为综合性和设计性实验,该篇首先介绍了感染性疾病病原体的检测方法和常用的用于病原体检测的分子生物学实验技术,其次罗列了经典的感染性疾病临床病例,目的是在病例讨论基础之上,围绕病原体的检测,综合运用所学的基础知识和基本实验技能设计实验;第三篇是创新性实验相关内容,主要介绍了国家创新创业实验项目的目的和要求以及项目申报书的格式和内容,该篇主要针对一些对科学研究特别感兴趣的同学。

本教材适合医药院校临床、预防、寄出、口腔、麻醉、影像、护理、中医、药学、检验等各专业、各层次学生的病原学免疫学实验教学。

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学与免疫学实验 / 杨健,胡为民,杨继文主编. —4版. —北京:科学出版社,2015.8

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等院校规划教材

ISBN 978-7-03-045051-7

I. ①病… II. ①杨… ②胡… ③杨… III. ①病原微生物-实验-高等学校-教材 ②医药学-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(2015)第131489号

责任编辑:朱 华 / 责任校对:李 影

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

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>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006年9月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2015年8月第 四 版 印张:12 1/4 插页:8

2015年8月第十二次印刷 字数:278 000

定价:38.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

实验教学是高等教育的重要环节之一,医学实验教学不但可以帮助学生加深对基础理论知识的认识,增强学生的动手能力,同时也能培养学生的学习兴趣、探索精神和创新精神。我校从2001年起着手了实验教学改革,把医学微生物学、医学免疫学和人体寄生虫学整合为一门独立的课程,已经走过了14年的历程,完成了3版教材的编写和使用,第3版教材已经使用3年,在第3版教材的基础之上进行了修订和调整,完成了第4版教材的编写。

第4版教材定位于实用性、参考性、综合性、先进性和一定的系统性,与第3版的最大区别在于把实验相关原理融合到实验相应篇章,而不独立成章。第4版教材第一篇是基本实验,分章节分别叙述了三门课程的实验项目,包括验证性实验、综合性实验以及一些前沿的实验项目;第二篇是综合性、设计性实验,该篇以临床感染性疾病病例为基础,让同学能提前接触、了解临床感染性疾病相关病例,从而增加基础课的趣味性、增加学生的学习兴趣,同时,寓学习目的于病例之中。第三篇是创新性实验的相关内容,创新是社会发展的力量源泉,大学生创新能力的培养是高等教育工作的重要组成部分,该篇主要包括国家对于大学生创新性实验项目申请以及项目标书的相关内容,主要的目的是激发学生对科学研究的兴趣以及培养学生对科学研究的探索精神。

本实验教材适用于临床医学、检验医学、中西医结合、麻醉学、影像学、法医学、公共卫生管理、预防医学、护理学、口腔医学等专业本、专科学生使用。本实验教材的编写和出版得到了川北医学院微生物学与免疫学教研室、人体寄生虫学教研室、病原生物学与免疫学实验教学中心各位老师以及科学出版社的大力支持,在此表示诚挚的谢意。因学识水平和经验所限,本书中恐有疏漏甚至错误之处,恳请同行学者提出宝贵意见,以促进本教材的修改和完善。

川北医学院病原生物学与免疫学实验教学中心

2015年6月

目 录

绪言	(1)
一、病原生物学与免疫学实验目的和要求	(1)
二、实验室生物安全	(1)
三、实验室规章制度	(2)

第一篇 基本实验

第一章 免疫学基本实验	(3)
第一节 抗体的制备	(3)
一、多克隆抗体	(3)
实验 1-1 多克隆抗体的制备	(3)
实验 1-2 抗体的提取与纯化(盐析沉淀法)	(4)
二、单克隆抗体	(5)
第二节 凝集实验	(7)
一、直接凝集实验	(7)
实验 1-3 细菌的鉴定	(8)
实验 1-4 人 ABO 血型鉴定	(9)
实验 1-5 试管凝集实验(肥达反应)	(10)
二、间接凝集实验	(11)
实验 1-6 间接凝集实验	(12)
实验 1-7 间接凝集抑制实验(妊娠实验)	(12)
实验 1-8 协同凝集实验	(13)
第三节 沉淀实验	(14)
实验 1-9 单向琼脂扩散试验	(15)
实验 1-10 双向琼脂扩散试验	(16)
实验 1-11 免疫电泳	(17)
实验 1-12 对流免疫电泳	(18)
实验 1-13 火箭免疫电泳	(19)
第四节 补体相关实验	(21)
实验 1-14 血清总补体活性测定	(21)
实验 1-15 补体结合实验	(22)
第五节 免疫细胞相关实验	(26)
实验 1-16 外周血单个核细胞的分离	(26)
实验 1-17 巨噬细胞吞噬功能测定(大吞噬试验)	(28)
实验 1-18 中性粒细胞吞噬功能测定(小吞噬试验)	(29)
实验 1-19 NK 细胞活性测定	(30)
实验 1-20 E 玫瑰花环试验	(31)
实验 1-21 间接免疫荧光技术检测 T 细胞亚群(CD4)	(33)

试验 1-22 淋巴细胞转化实验	(34)
实验 1-23 ELISPOT	(35)
实验 1-24 溶血空斑试验	(38)
第六节 免疫标记技术	(40)
一、酶联免疫吸附实验	(40)
实验 1-25 免疫斑点实验	(41)
实验 1-26 间接 ELISA	(42)
实验 1-27 双抗体夹心法	(44)
二、胶体金标记技术	(45)
实验 1-28 胶体金的制备	(45)
实验 1-29 胶体金标记蛋白的制备	(46)
实验 1-30 胶体金标记技术常用方法	(47)
三、荧光抗体标记技术	(48)
实验 1-31 荧光抗体制备技术	(50)
实验 1-32 间接法检测抗核抗体	(50)
四、放射免疫标记技术	(51)
五、化学发光免疫技术	(52)
第七节 超敏反应	(53)
实验 1-33 豚鼠过敏试验	(53)
第二章 医学微生物学基本实验	(54)
第一节 细菌形态结构观察	(54)
实验 2-1 显微镜的使用	(54)
实验 2-2 悬滴法观察细菌的运动	(56)
实验 2-3 革兰染色法	(56)
实验 2-4 细菌特殊结构的染色法	(59)
第二节 细菌的人工培养	(62)
一、细菌的培养基	(62)
实验 2-5 细菌基础培养基的制备方法	(62)
二、细菌的接种及生长现象观察	(65)
实验 2-6 平板培养基接种法	(65)
实验 2-7 试管培养基接种法	(70)
实验 2-8 细菌计数	(74)
第三节 细菌代谢产物的检测	(79)
一、细菌分解代谢产物的检测	(79)
实验 2-9 碳水化合物代谢试验	(79)
实验 2-10 蛋白质与氨基酸代谢试验	(82)
实验 2-11 碳源与氮源利用试验	(84)
实验 2-12 其他酶类试验	(84)
二、细菌合成代谢产物的检测	(85)
实验 2-13 侵袭性酶的检测	(85)
实验 2-14 毒素的检测	(87)
第四节 理化因素对细菌生长繁殖的影响	(90)
实验 2-15 高压蒸汽灭菌法	(90)

实验 2-16 紫外线杀菌试验	(91)
实验 2-17 手指皮肤消毒试验	(91)
实验 2-18 药物敏感试验(纸片琼脂扩散法)	(92)
实验 2-19 药敏试验(稀释法)	(93)
实验 2-20 联合药物敏感试验	(97)
第五节 细菌的遗传变异	(98)
实验 2-21 细菌 R 质粒接合传递实验	(98)
实验 2-22 细菌鞭毛变异	(99)
第六节 特殊细菌的染色方法	(99)
实验 2-23 抗酸染色法	(99)
实验 2-24 异染颗粒染色法观察棒状杆菌	(100)
第七节 螺旋体观察	(102)
实验 2-25 Fontana 镀银染色法镜检钩端螺旋体	(102)
实验 2-26 刚果红负染色法观察奋森疏螺旋体	(103)
第八节 病毒学实验	(104)
实验 2-27 病毒蚀斑实验	(104)
实验 2-28 病毒血凝实验及血凝抑制试验	(105)
实验 2-29 病毒中和实验	(106)
第九节 真菌相关实验	(108)
实验 2-30 真菌形态结构观察	(108)
实验 2-31 真菌的培养	(109)
第三章 人体寄生虫学基本实验	(112)
第一节 人体寄生虫形态观察	(112)
实验 3-1 人体寄生虫形态观察	(112)
第二节 寄生虫常用诊断技术	(131)
实验 3-2 粪便直接涂片法检查蠕虫卵	(131)
实验 3-3 饱和盐水漂浮法检查粪便中钩虫卵	(132)
实验 3-4 幼虫孵化法	(133)
实验 3-5 肛门试纸法	(135)
实验 3-6 十二指肠分泌物检查	(136)
实验 3-7 阴道分泌物检查	(137)
实验 3-8 血液检查	(138)
实验 3-9 毛囊或皮脂腺(蠕形螨)检查	(140)
第三节 寄生虫感染特殊免疫学检测方法	(141)
实验 3-10 皮内试验	(141)
实验 3-11 血吸虫环卵沉淀实验	(142)
实验 3-12 诊断弓形虫感染的染色实验	(143)

第二篇 综合、设计型实验

第四章 感染性疾病的实验室检测概述	(145)
第一节 细菌感染的实验诊断	(145)
一、标本的采集	(145)
二、细菌的检测	(146)

三、细菌感染的血清学诊断	(147)
四、常见致病菌的鉴定流程	(147)
第二节 病毒感染的实验室诊断	(148)
一、标本的采集与送检	(148)
二、病毒的形态学检查法	(149)
三、病毒抗原的直接检出	(149)
四、检测病毒核酸	(150)
五、病毒感染的血清学诊断	(150)
六、病毒分离培养	(151)
第三节 真菌感染的实验室诊断	(153)
一、标本的采集	(153)
二、真菌的直接镜检	(153)
三、真菌的分离培养	(154)
四、血清学诊断	(154)
五、核酸杂交探针技术	(154)
第四节 寄生虫感染的实验室诊断	(154)
一、病原学检查方法	(154)
二、常用于寄生虫感染诊断的免疫学技术	(156)
三、寄生虫的核酸检测	(156)
第五章 综合、设计型实验相关分子生物学实验技术	(158)
实验 5-1 聚合酶链反应	(158)
实验 5-2 Southern 杂交	(160)
实验 5-3 蛋白质印迹	(163)
第六章 感染性疾病病例分析及病原体检测	(169)
第三篇 创新性实验相关内容	
一、创新性实验选题原则	(180)
二、实施原则	(180)
三、对学生的要求	(180)
四、文献检索	(181)
附一:国家级大学生创新创业训练计划指南	(181)
一、计划目标	(181)
二、计划内容	(181)
三、参与高校	(181)
四、计划管理	(182)
五、项目管理	(182)
六、学校工作	(182)
附二:大学生创新创业训练计划项目申报书	(184)
填写说明	(185)
参考文献	(188)

绪 言

一、病原生物学与免疫学实验目的和要求

(1) 通过实验观察和实验操作,巩固并加深对医学免疫学和病原生物学基本理论知识的理解。

(2) 掌握病原生物学与免疫学的基本操作技术;树立牢固的无菌观念,掌握生物安全的基本知识和病原生物学中常见的无菌操作技术,为以后的临床操作奠定坚实的基础。

(3) 熟悉感染性疾病常用的诊断方法和手段,了解病原生物学和免疫学实验技术的新进展。

(4) 培养学生具有从事科学实验的能力,能够独立观察实验结果、整理分析实验资料、总结书写实验报告和论文的能力。培养学生一定的创新能力,能够提出问题,分析问题并设计方案解决问题。培养学生严谨的科学态度和作风,培养学生不仅具有独立解决问题的能力,同时也培养学生团结协作精神。

二、实验室生物安全

国家根据病原微生物的传染性、感染后对个体或者群体的危害程度,将病原微生物分为四类(表 0-1):

表 0-1 病原微生物生物危害的类别划分

类别	划分标准	举例
一类	能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物,以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物	埃博拉病毒、沙粒病毒、天花病毒等
二类	能够引起人类或者动物严重疾病,比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物	如结核分枝杆菌、布鲁氏菌、圣路易斯脑炎病毒、肮粒等
三类	能够引起人类或者动物疾病,但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害,传播风险有限,实验室感染后很少引起严重疾病,并且具备有效治疗和预防措施的微生物	乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、沙门菌、志贺菌、梅毒螺旋体、葡萄球菌等
四类	在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物	如枯草杆菌、犬肝炎病毒等

一类、二类病原微生物统称为高致病性病原微生物。

根据微生物实验室开展工作的性质、接触的病原体生物危害程度、采取生物安全措施的不同分为 4 级(表 0-2):

表 0-2 病原微生物实验室分级

级别	主要用途	实验条件
一级	从事基础教学与研究,接触四类生物危害微生物	开放式工作台和规范的微生物操作技术

续表

级别	主要用途	实验条件
二级	从事实验健康服务、诊断、研究、接触三类生物危害微生物	除了开放式长形工作台还应配置生物安全柜,实验室应有生物危害标记,操作人员应身着防护服,有规范的病原微生物操作技术
三级	从事特殊诊断与服务,接触二类生物危害微生物	需要生物安全柜和其他操作所需的基本装置,实验室应有生物危害标记,操作人员身着特殊防护服,规范的微生物操作技术,人员进入受限,实验室内有定向气流
四级	从事危险病原体操作,接触一类病原微生物	应有配套的生物安全柜,人员身着带正压的连衣裤,实验室空气经过滤,配备带双门的高压灭菌器,除了三级防护措施外,人员进入实验室时,应经过密封的过渡舱,离开时应经风淋,生物废弃物应经特殊处理

三、实验室规章制度

病原生物学实验的对象大多为病原微生物,有的具有一定的感染性,因此要求进入实验室后必须严格遵守以下实验室规则:

(1) 每次进入实验室必须穿白大褂,不必要的物品不得带入实验室,必须带入的书籍和文具等应放在实验台下的抽屉里,以免受到污染。

(2) 实验室内禁止饮食、喝水、抽烟,不得高声谈笑或随便走动,务必关闭手机铃声,上课期间不得使用手机。

(3) 各种实验物品应按指定地点存放,用过的器材必须放入消毒缸内,禁止随意放于桌上及冲入水槽。

(4) 须送培养箱培养的物品,应做好标记后送到指定地点。

(5) 实验过程中发生差错或意外事故时,应立即报告老师,并在老师的指导下进行正确的处理,禁止隐瞒或擅自处理。如有传染性的材料污染桌面、地面等,应立即用规定浓度的消毒液浸泡污染部位,作用5~10min后方可抹去。如手被活菌污染也应使用合适浓度的消毒液浸泡5~10min后,再以自来水反复冲洗。

(6) 爱护室内仪器设备,严格按照仪器的操作规则使用,尤其是显微镜,使用油镜头后必须擦净镜油。节约使用实验材料,不慎损坏了器材等,应主动报告老师并进行相应清理。

(7) 实验完毕,应物归原处,并将桌面整理清洁,实验室打扫干净。最后以消毒液浸泡手5min,清水洗净后方可离开实验室。

第一篇 基本实验

第一章 免疫学基本实验

第一节 抗体的制备

抗体(antibody, Ab)是免疫系统在抗原的刺激下, B 淋巴细胞转化为浆细胞, 由浆细胞所产生的、能与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。抗体在疾病的诊断和防治中发挥重要作用, 人工制备抗体是大量获得抗体的重要途径。人工制备抗体的类型主要有多克隆抗体(polyclonal antibody, PcAb)、单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)和基因工程抗体(gene engineering antibody, GeAb)。本书主要介绍多克隆抗体和单克隆抗体的制备方法。

一、多克隆抗体

多克隆抗体(polyclonal antibody, PcAb)是指多种抗原决定簇的抗原免疫动物, 刺激机体多个 B 细胞克隆, 产生针对多种抗原表位的不同抗体, 所获得的抗体为多种抗体的混合物, 即多抗。为制备高效价、高特异性的多克隆抗体, 须有理想的免疫原、适宜的动物和可行的方法。本书主要介绍大肠埃希菌抗血清制备的多克隆抗体。

实验 1-1 多克隆抗体的制备

【实验目的】

制备高效价、高特异性的免疫血清, 可为免疫学诊断、特异性免疫治疗和免疫学实验提供常用的试剂。

【实验原理】

将抗原导入敏感动物体内后, 刺激其淋巴结和脾脏中的淋巴细胞等网状内皮细胞系统大量增殖。实验动物对初次免疫和二次免疫的应答不同。初次免疫应答较弱, 特别是对易代谢、可溶性的抗原。首次注射后 7d 左右, 在血清中可以检测到抗体, 其浓度维持在一个较低水平; 注射后 10d 左右抗体的滴度会达到最大值。这种抗体滴度增加, 血清中抗体种类和性质发生改变称为免疫应答的成熟, 在抗体的制备过程中具有重要的实际意义。通常在抗原注射 4~6w 后会产生具有高亲和力的抗体。免疫应答的动力学结果取决于抗原和免疫动物的种类, 但初次和二次免疫应答之间的关系是免疫应答的一个重要特点。三次或以后的抗原注射所产生的应答和二次应答结果相似。

【实验材料】

家兔、大肠埃希菌、SS 平板、固体斜面培养基、固体营养培养基、接种环、酒精灯、玻璃过滤器、37℃ 培养箱、摇床恒温水浴箱、离心机、振荡器、灭菌大试管、毛细管、玻片、0.5% 石炭酸溶液
此为试读, 需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com

液、硫柳汞溶液、饱和硫酸铵溶液、磷酸、盐缓冲液、盐酸溶液、氢氧化钠溶液、生理盐水。

【实验方法】

1. 抗原的制备 从正常人群的粪便中分离出的大肠埃希菌作革兰染色,革兰染色阴性,符合糖发酵实验阴性标准,SS 平板上菌落典型的菌才能作后续实验。将分离出的大肠埃希菌接种于固体斜面培养基纯培养。再将其接种于固体营养培养基平板,置 37℃ 培养箱培养 16~18h 后用无菌生理盐水洗下菌苔,充分摇匀。将此悬液作革兰染色镜检,如未检测到杂菌,将其加热至 80℃ 30min,玻璃滤器滤过,上面得 O 菌液,下面得 H 菌液,将菌液稀释至约 10 亿/mL 浓度,置 4℃ 冰箱待用。

2. 免疫方法 选择并标记雄性家兔 10 只,O 菌液与 H 菌液各注射 5 只。

3. 血清制备 末次注射后 5~7d,从兔耳静脉采血 2mL,分离血清。用试管凝集定量法测定抗体效价,如效价达 1:1 万以上,则以无菌操作从兔心脏抽血,分离血清,于 56℃ 保温 30min,以灭活补体。在血清中加入适量的 0.5% 石炭酸作防腐剂,分装成每小瓶 1~2mL,密封,做好标记,置于 4℃ 冰箱保存备用。

【实验结果】

将免疫后收集的血液与注射前收集的血液进行比较,检测是否有抗体产生及抗体的效价。用抗大肠埃希菌 H、O 血清,作玻片凝集试验,肉眼及镜下观察,该现象与伤寒杆菌凝集现象不易区分。将 H、O 混合后血清适当稀释代替伤寒病人血清,将大肠埃希菌 H、O 菌液代替伤寒菌液作肥达反应,其现象与临床肥达反应不易区分。

【注意事项】

- (1) 抗原的质量很关键,增强抗原的免疫原性不能破坏其本身的抗原表位;
- (2) 混合抗体的制备需要适当选择抗原簇以免制成的混合抗体不能检出规定的细菌而造成漏检;
- (3) 制备抗原须灭活细菌,抗体制备须研究抗原的注射剂量、注射时间和取血时间,避免抗原制备失败或抗体效价不理想;
- (4) 若血清抗体效价检测未达到要求,可加强免疫一次;
- (5) 免疫后的动物要密切监测动物的身体状况若出现过敏反应、皮肤溃烂等问题要及时处理。

实验 1-2 抗体的提取与纯化(盐析沉淀法)

一般抗体提取与纯化的操作程序是为多克隆抗体血清设计的,主要的方法有盐析法、凝胶过滤法、离子交换层析法与梯度离心法,在实际应用中多在抗体的产量与纯度之间考虑一合理的方法。本次实验选用盐析法,此法简便,产量高,但纯度稍差。

【实验目的】

用盐析法纯化抗血清。

【实验原理】

此法提取抗体,是根据蛋白质具有胶体性质,当蛋白质溶液中加入大量中性盐类时,夺取蛋白质水化层使其脱水,并中和蛋白质所带电荷,使蛋白质失去稳定因素而从溶液中沉淀出来,但并不引起蛋白质发生变性,此现象称盐析。由于各种蛋白质析出时所要求盐类浓度不同,因此在蛋白质溶液中加入不同浓度的中性盐,能使各种成分蛋白质分别析出,达

到分离提纯抗体的目的。

【实验材料】

饱和硫酸铵溶液(pH7.0)、免抗人 IgG 免疫血清、pH7.4 0.01mol/L PBS(含 0.14 mol/L NaCl)、奈氏试剂、透析袋、离心机、磁力搅拌器、小烧杯、离心管。

【实验方法】

(1) 每组于小烧杯中加入抗血清 5mL、PBS 5mL,在搅拌器上边搅拌边逐滴缓慢加入饱和硫酸铵 10mL,逐渐发生混浊。分装 2 支 10mL 离心管,4℃ 30min 或过夜。

(2) 3000rpm 20~30min(最好 4℃),去上清,共用 5mL PBS 将两支离心管的沉淀溶解并吸于一支离心管中。加饱和硫酸铵 2.5 mL 使其蛋白质沉淀,4℃ 30min(33% 硫酸铵饱和度)。此步重复 1~2 次。

(3) 3000rpm 20~30min,去上清,用少量 PBS 溶解,吸入透析袋内,用无 NaCl 0.01mol/L PBS 4℃ 透析去盐,每天换液 3 次(在磁力搅拌下透析更快),到除尽溶液中的 NH_4 为止,约需 2~3d。透析液 NH_4 的检测用奈氏试剂,如产生黄色沉淀证明 NH_4 存在。

(4) 可用葡聚糖 G-25 或 G-50 凝胶过柱除盐并进一步纯化。

(5) 紫外分光光度计读 OD_{280} 值,了解抗体蛋白质含量。小量分装,-20℃ 保存。

二、单克隆抗体

单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)是由淋巴细胞杂交瘤产生的、只针对复合抗原分子上某一单个抗原决定簇的特异性抗体。单抗在结构和组成上高度均一,抗原特异性及同种型一致,易于体外大量制备和纯化,故单抗具有纯度高、特异性强、效价高、少或无血清交叉反应、制备成本低等特性,已广泛应用于疾病的诊断、特异性抗原或蛋白的检测和鉴定、疾病的被动免疫治疗和生物导向药物的制备等。

要制备单克隆抗体需先获得能合成专一性抗体的单克隆 B 淋巴细胞,但这种 B 淋巴细胞不能在体外生长。而实验发现骨髓瘤细胞可在体外生长繁殖,应用细胞杂交技术使骨髓瘤细胞与免疫的淋巴细胞合二为一,得到杂种的骨髓瘤细胞。这种杂种细胞继承两种亲代细胞的特性,它既具有 B 淋巴细胞合成专一抗体的特性,也有骨髓瘤细胞能在体外培养增殖永存的特性,用这种来源于单个融合细胞培养增殖的细胞群,可制备抗一种抗原决定簇的特异单克隆抗体(图 1-1,彩图)。

(一) 抗原提纯与动物免疫

对抗原的要求是纯度越高越好,尤其是初次免疫所用的抗原。如为细胞抗原,可取 1×10^7 个细胞作腹腔免疫。可溶性抗原需加完全福氏佐剂并经充分乳化,如为聚丙烯酰胺电泳纯化的抗原,可将抗原所在的电泳条带切下,研磨后直接用以动物免疫。

选择与所用骨髓瘤细胞同源的 BALB/c 健康小鼠,鼠龄在 8~12w,雌雄不限。为避免小鼠反应而不佳或免疫过程中死亡,可同时免疫 3~4 只小鼠。

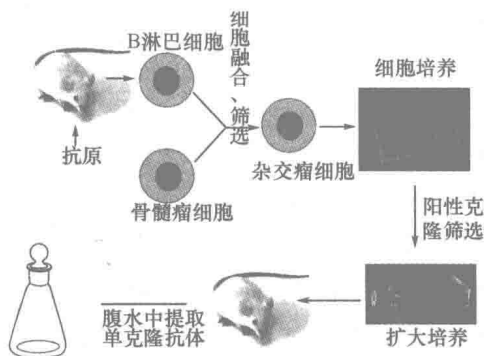


图 1-1 单克隆抗体制备过程示意图

免疫过程和方法与多克隆抗血清制备基本相同,因动物、抗原形式、免疫途径不同而异,以获得高效价抗体为最终目的。免疫间隔一般 2~3w。一般被免疫动物的血清抗体效价越高,融合后细胞产生高效价特异抗体的可能性越大,而且单克隆抗体的质量(如抗体的浓度和亲和力)也与免疫过程中小鼠血清抗体的效价和亲和力密切相关。末次免疫后 3~4d,分离脾细胞融合。

(二) 骨髓瘤细胞及饲养细胞的制备

选择瘤细胞株的最重要的一点是以待融合的 B 细胞同源。如待融合的是脾细胞,各种骨髓瘤细胞株均可应用,但应用最多的是 Sp2/0 细胞株。该细胞株生长及融合效率均佳,此外,该细胞株本身不分泌任何免疫球蛋白重链或轻链。细胞的最高生长密度为 $9 \times 10^5/\text{mL}$,倍增时间通常为 10~15h。融合细胞应选择处于对数生长期、细胞形态和活性佳的细胞(活性应大于 95%)。骨髓瘤细胞株在融合前应先用含 8-氮鸟嘌呤的培养基作适应培养,在细胞融合的前一天用新鲜培养基调细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,次日一般即为对数生长期细胞。

在体外培养条件下,细胞的生长依赖适当的细胞密度,因而,在培养融合细胞或细胞克隆化培养时,还需加入其他饲养细胞(feeder cell)。常用的饲养细胞为小鼠的腹腔细胞,制备方法为用冷冻果糖液注入小鼠腹腔,轻揉腹部数次,吸出后的液体中即含小鼠腹腔细胞,其中在巨噬细胞和其他细胞。亦有用小鼠的脾细胞、大鼠或豚鼠的腹腔细胞作为饲养细胞的。

在制备饲养细胞时,切忌针头刺破动物的消化器官,否则所获细胞会有严重污染。饲养细胞调至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,提前一天或当天置板孔中培养。

(三) 细胞融合

细胞融合是杂交瘤技术的中心环节,基本步骤是将两种细胞混合后加入 PEG 使细胞彼此融合。其后把培养液稀释,消除 PEG 的作用。将融合后的细胞适当稀释,分置培养板孔中培养。融合过程中有几个问题应特别注意。①细胞比例:骨髓瘤细胞与脾细胞的比值可从 1:2 到 1:10 不等,常用 1:4 的比例。应保证两种细胞在融合前都具有较高活性。②反应时间:在两种细胞的混合细胞悬液中,第 1min 滴加 4.5mL 培养液;间隔 2min 滴加 5mL 培养液,尔后加培养液 50mL。③培养液的成分:对融合细胞,良好的培养液尤其重要,其中的小牛血清、各种离子和营养成分均需严格配制。如融合效率降低,应随时核查培养基情况。

(四) 有限稀释法

筛选阳性株一般选用的骨髓瘤细胞为 HAT 敏感细胞株,所以只有融合后的细胞才能待续存活一周以上。融合细胞呈克隆生长,经有限稀释后(一般稀释至 0.8 个细胞/孔),按 Poisson 法计算,应有 36% 的孔为 1 个细胞/孔。细胞培养至覆盖 0~20% 孔底时,吸取培养上清用 ELISA 检测抗体含量。首先依抗体的分泌情况筛选出高抗体分泌孔,将孔中细胞再行克隆化,尔后进行抗原特异的 ELISA 测定,选高分泌特异性细胞株扩大培养或冻存。

(五) 单克隆抗体的制备和冻存

筛选出的阳性细胞株应及早进行抗体制备,因为融合细胞随培养时间延长,发生污染、染色体丢失和细胞死亡的概率增加。抗体制备有两种方法。一是增量培养法,即将杂交瘤细胞在体外培养,在培养液中分离单克隆抗体。该法需用特殊的仪器设备,一般应用无血清培养基,以利于单克隆抗体的浓缩和纯化。最普遍采用的是小鼠腹腔接种法。选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠,先用降植烷或液状石蜡行小鼠腹腔注射,一周后将杂交瘤细胞

接种到小鼠腹腔中去。通常在接种一周后即有明显的腹水产生,每只小鼠可收集 5~10mL 的腹水,有时甚至超过 40mL。该法制备的腹水抗体含量高,每毫升可达数毫克甚至数十毫克水平。此外,腹水中的杂蛋白也较少,便于抗体的纯化。接种细胞的数量应适当,一般为 5×10^5 /鼠,可根据腹水生长情况适当增减。

选出的阳性细胞株应及早冻存。冻存的温度越低越好,冻存于液氮的细胞株活性仅有轻微的降低,而冻存在 -70°C 冰箱则活性改变较快。细胞不同于菌种,冻存过程中需格外小心。二甲亚砜(DMSO)是普遍应用的冻存保护剂。冻存细胞复苏后的活性多在 50%~95% 之间。如果低于 50%,则说明冻存复苏过程有问题。

(六) 单克隆抗体的纯化

单克隆抗体的纯化方法同多克隆抗体的纯化,腹水特异性抗体的浓度较抗血清中的多克隆抗体高,纯化效果好。按所要求的纯度不同采用相应的纯化方法。一般采用盐析、凝胶过滤和离子交换层析等步骤达到纯化目的,也有采用较简单的酸沉淀方法。目前最有效的单克隆抗体纯化方法为亲和纯化法,多用葡萄球菌 A 蛋白或抗小鼠球蛋白抗体与载体(最常用 Sepharose)交联,制备亲和层析柱将抗体结合后洗脱,回收率可达 90% 以上。蛋白可与 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 结合,同时还结合少量的 IgM。洗脱液中的抗体浓度可用紫外光吸收法粗测,小鼠 IgG 单克隆抗体溶液在 $A_{280\text{nm}}$ 时,1.44(吸光单位)相当于 1mg/mL。经低 pH 洗脱后在收集管内预置中和液或速加中和液对保持纯化抗体的活性至关重要。

(陈 蓉)

第二节 凝集实验

凝集反应(agglutination test)一种血清学反应。颗粒性抗原(细菌或红细胞等)与相应抗体结合,在有电解质存在的条件下,经过一定时间,出现肉眼可见的凝集小块。参与凝集反应的抗原称为凝集原,抗体称为凝集素。凝集反应可分为直接凝集反应和间接凝集反应两类。

一、直接凝集实验

直接凝集反应:颗粒状抗原(如细菌、红细胞等)与相应抗体直接结合所出现的凝集现象。实验方法分为玻片法和试管法。

1. 玻片法 一种定性实验方法。可用已知抗体来检测未知抗原。若鉴定新分离的菌种时,可取已知抗体滴加在玻片上,将待检菌液一滴与其混匀。数分钟后,如出现肉眼可见的凝集现象,为阳性反应。该法简便快速,除鉴定菌种外,也可用于菌种分型、测定人类红细胞的 ABO 血型等。

2. 试管法 一种定量实验的经典方法。可用已知抗原来检测受检血清中有无某抗体及抗体的含量。用来协助临床诊断或供流行病学调查研究。操作时,将待检血清用生理盐水连续成倍稀释,然后加入等量抗原,最高稀释度仍有凝集现象者,为血清的效价,也称滴度,以表示血清中抗体的相对含量。诊断伤寒、副伤寒病的肥达氏反应(Widal test)、布氏病的瑞氏反应(Wright test)均属定量凝集反应。

实验 1-3 细菌的鉴定

【实验目的】

通过已知抗体(诊断血清)与未知抗原(细菌)的结合对所感染细菌进行定性诊断。

【实验原理】

颗粒性抗原(细菌、螺旋体、红细胞等)与相应的抗血清混合后,在电解质参与下,经过一定时间,抗原抗体凝聚成肉眼可见的凝集块,这种现象称为凝集反应。血清中的抗体称为凝集素(agglutinin),抗原称为凝集原(agglutigen)。若用已知的志贺菌诊断血清和沙门菌诊断血清与待检菌混合,发生凝集反应,即可判断待检菌为其中一种。

【实验材料】

- (1) 志贺菌多价诊断血清,沙门菌多价诊断血清。
- (2) 待检菌 24h 培养物(斜面或平皿)。
- (3) 生理盐水、滴管、载玻片、接种环、酒精灯等。

【实验方法】

- (1) 取洁净载玻片一张,用标记笔划分成三格,并依次编号。
- (2) 用滴管滴加一滴志贺菌多价诊断血清于第一格,一滴生理盐水于第二格,一滴沙门菌多价诊断血清于第三格。
- (3) 用灭菌接种环取待检菌培养物少许,与盐水及血清分别混合。注意每次取菌后与不同血清或盐水混合时,接种环均需烧灼灭菌,以免互相污染,影响结果的正确性。
- (4) 轻轻摇动载玻片,数分钟后,将载玻片稍微倾斜,对光观察。

【实验结果】

首先观察第二格(阴性对照)是否出现凝集颗粒,若出现则为非特异性凝集或操作过程中污染所致,本次实验无效。阳性为反应物内有大量均匀细沙状白色凝集物,阴性则无凝集物形成。若待检菌与沙门菌多价诊断血清不发生凝集,而与志贺菌多价诊断血清出现凝集,则该菌即为志贺菌属细菌;若待检菌与志贺菌多价诊断血清不发生凝集,而与沙门菌多价诊断血清出现凝集,则该菌为沙门菌属细菌(图 1-2,彩图)。

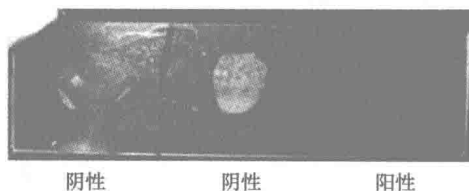


图 1-2 玻片凝集结果示意图

【注意事项】

- (1) 待检菌为肠道致病菌,实验过程中必须严格遵守无菌操作原则。
- (2) 结果观察后,将玻片放入盛有消毒液的指定容器内,切忌随意存放或冲洗。
- (3) 取待检菌培养物不宜过多,与诊断血清混合时,必须将细菌涂散,涂均匀,以免将未涂散的细菌误认为阳性的凝集物;但也不宜涂得太宽,以免很快干涸而影响结果观察。
- (4) 吸取不同血清时不可共用滴管,以免交叉污染,导致结果不准确。
- (5) 如环境温度过低,可将玻片背面与手背轻轻摩擦或在酒精灯火焰上空拖几次,以提高反应温度,加快结果出现。

实验 1-4 人 ABO 血型鉴定

【实验目的】

- (1) 学习鉴定 ABO 血型的方法。
- (2) 掌握 ABO 血型鉴定的原理。
- (3) 认识血型鉴定在输血中的重要性。

【实验原理】

ABO 血型系统是根据红细胞膜上多糖侧链所形成的抗原决定簇来命名的,根据侧链末端单糖的不同分为 A、B 两种抗原,A 型者(AA 或 AO)红细胞膜上为 A 抗原,B 型者(BB 或 BO)红细胞膜上为 B 抗原,O 型者红细胞膜上不含 A、B 抗原,将标准抗 A 和抗 B 血清分别与待测红细胞混合。如果抗原与抗体相对应,则引起红细胞凝集,反之则不凝集,据其凝集现象可判断血型。输入错误血型会导致溶血反应,母亲和胎儿血型不符也可能发生新生儿溶血症,因此血型鉴定非常有必要。

【实验材料】

- (1) 标准抗 A 血清、标准抗 B 血清。
- (2) 75% 乙醇溶液、酒精棉球、一次性采血针、消毒牙签、载玻片、消毒缸、显微镜等。

【实验方法】

- (1) 将载玻片洗净,擦干,不能留有水分,以防溶血。
- (2) 在载玻片上滴加抗 A 血清、抗 B 血清。旁边放置两个消毒牙签。
- (3) 用酒精棉球消毒无名指,等酒精挥发后,用采血针采血,将血液分别滴入血清中,再用牙签混合或不断轻轻晃动载玻片,使血清和红细胞充分混匀,1~2min 后肉眼观察凝集现象,如肉眼观察不清,可将载玻片置于低倍显微镜下观察结果,结果判定见表 1-1。

表 1-1 ABO 血型正向定型及结果判定

标准血清		血型
抗 A 血清	抗 B 血清	
+	-	A 型
-	+	B 型
-	-	O 型
+	+	AB 型

+:表示凝集;-:表示不凝集

【实验结果】

阳性:液体变清,并有红色凝集块出现(图 1-3,彩图)。

阴性:液体仍然混浊,无凝集块出现(图 1-3,彩图)。

【注意事项】

- (1) 记录结果之后,将玻片放入消毒缸内,切勿随意放置或冲洗。

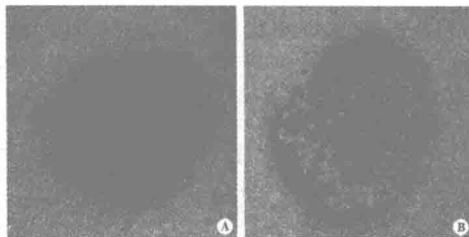


图 1-3 血型鉴定结果示意图