

西北民族大学“十一五”规划教材

免疫学

MIANYIXUESHIYANZHIDAO

实验指导

主 编 王冬梅

副主编 董开忠 宋峻岩



兰州大学出版社

西北民族大学“十一五”规划教材

主编 王冬梅 副主编 章书 兰州大学出版

2008.9

ISBN 978-7-311-03108-4

免疫学实验指导

M IANYIXUESHIYANZHIDAO

江苏工业学院图书馆

藏书章

主 编 王冬梅

副主编 章书 朱峻青

(本教材已列入国家出版规划)

兰州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

免疫学实验指导/王冬梅主编. —兰州:兰州大学出版社,
2008.9

ISBN 978-7-311-03108-4

I.免... II.王... III.医药学:免疫学—实验—高等
学校—教学参考资料 IV.R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 143618 号

策划编辑 陈红升
责任编辑 敬兆林
封面设计 张芳芳

书 名	免疫学实验指导
作 者	王冬梅 主编 董开忠 宋峻岩 副主编
出版发行	兰州大学出版社 (地址:兰州市天水南路 222 号 730000)
电 话	0931-8912613(总编办公室) 0931-8617156(营销中心) 0931-8914298(读者服务部)
网 址	http://www.onbook.com.cn
电子信箱	press@onbook.com.cn
印 刷	兰州通泰印刷有限责任公司
开 本	880×1230 1/32
印 张	6.875
字 数	250 千字
版 次	2008 年 9 月第 1 版
印 次	2008 年 9 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978-7-311-03108-4
定 价	20.00 元

(图书若有破损、缺页、掉页可随时与本社联系)

前 言

免疫学是一门向多学科渗透并迅猛发展的学科,其发展促进了免疫学实验技术的不断更新和丰富,推动了生命科学中多学科的发展。免疫学和免疫学实验技术已成为广大生命科学、医学专业学生的必修课程。

为了适应学科的迅速发展和教学改革的要求,在西北民族大学的支持下,我们组织编写了这部免疫学实验教材,其主要任务是让学生较好地掌握免疫学的基本实验技术和方法,了解本学科的一些先进的实验技术和方法,从而提高实验教学质量,提升学生的创新意识。

在本书的编写中,编者按照教学大纲的要求,根据自己的教学实践经验,参阅了大量免疫学领域的相关资料和文献。在实验内容上力求全面,所编写的这本免疫学实验指导教材共分 14 个章节,包括近 60 个实验项目,不仅介绍了免疫学中的一些经典、传统的实验内容,而且增添了目前较为先进的实验技术(如细胞因子的检测、免疫标记技术、流式细胞术、免疫磁珠分离法等)。有的同一实验项目介绍了几种不同的实验方法,以便学生参考,开阔视野。注重实验技术的可操作性,每项实验包括实验原理、材料、方法及注意事项等,条理清楚,结构完整,简明实用,所配图片使内容清晰易懂。书后附有常用试剂的配制,方便查阅。

在此,对西北民族大学教务处、实验中心、生命科学与工程学院及医学院的领导、同事对本书的编写和出版给予的支持表示衷心的感谢,

尤其是刘翊中、冯玉萍、程燕、李琼毅、雒晓芳、赵晋、胜利、蔡勇等同志对本书的编写与出版给予了大力的支持与帮助,我们表示特别的谢意。

由于编者的学术水平和编写能力有限,教材中疏漏和错误之处在所难免,真诚希望同行和读者能够批评指正,以便改进。

编者

2008年6月

目 录

实验室规则	(1)
第一章 实验动物的基本操作	(2)
第一节 实验动物的抓取固定	(2)
第二节 实验动物的编号标记方法	(5)
第三节 实验动物的注射给药法	(7)
第四节 实验动物的采血方法	(10)
第五节 实验动物的处死方法	(13)
第二章 凝集反应	(15)
实验一 直接凝集反应	(15)
实验二 间接凝集反应	(22)
实验三 凝集吸收	(29)
实验四 病毒血凝和血凝抑制试验	(30)
第三章 沉淀反应	(33)
实验一 单向琼脂扩散试验测血清 IgG 含量	(33)
实验二 双向琼脂扩散试验	(36)
实验三 免疫电泳试验	(39)
实验四 对流免疫电泳	(42)
实验五 火箭免疫电泳	(45)
第四章 补体的检测和补体参与的反应	(48)
实验一 补体的溶血试验	(48)
实验二 血清补体 C3 含量测定(单扩法)	(50)
实验三 血清总补体溶血活性(CH_{50})测定	(51)
实验四 补体依赖性细胞毒试验	(54)

实验五 补体结合反应	(56)
第五章 吞噬细胞功能的检测	(63)
实验一 巨噬细胞吞噬功能试验(大吞噬)	(63)
实验二 中性粒细胞吞噬功能试验(小吞噬)	(65)
第六章 免疫球蛋白的纯化	(69)
实验一 盐析法纯化免疫球蛋白 IgG	(69)
实验二 柱层析纯化免疫球蛋白 IgG	(72)
第七章 免疫血清的制备	(76)
实验一 兔免疫血清的制备	(76)
实验二 单克隆抗体的制备	(81)
第八章 免疫细胞的分离	(89)
实验一 外周血中白细胞的分离	(89)
实验二 密度梯度离心法分离 PBMC	(91)
实验三 T、B 淋巴细胞及 T 细胞亚群的分离纯化	(93)
实验四 PBMC 中单核和巨噬细胞的分离	(97)
实验五 人外周血树突状细胞的分离	(99)
实验六 NK 细胞分离	(101)
第九章 细胞免疫的检测	(104)
实验一 E 花环形成试验	(104)
实验二 淋巴细胞转化试验	(107)
实验三 淋巴细胞酸性 α -醋酸萘酯酶的检测	(111)
实验四 红细胞 C3b 受体花环形成试验	(113)
实验五 NK 细胞活性测定	(114)
实验六 MTT 比色法测定 LAK 细胞活性	(119)
实验七 单向混合淋巴细胞培养	(122)
第十章 体液免疫功能检测	(125)
实验一 抗体形成细胞的检测	(125)
实验二 EAC 玫瑰花环形成试验	(130)
第十一章 免疫印迹	(133)
实验一 SDS-PAGE 分离纯化蛋白质	(133)

实验二	蛋白质免疫印迹·····	(137)
第十二章	细胞因子水平测定·····	(140)
实验一	白细胞介素 2 的生物学活性测定·····	(140)
实验二	夹心 BA-ELISA 检测人 γ -IFN ·····	(144)
实验三	IL-2 mRNA 的 RT-PCR 检测 ·····	(147)
第十三章	免疫标记技术·····	(151)
第一节	免疫荧光技术·····	(151)
实验一	异硫氰酸荧光素标记抗体技术·····	(151)
实验二	直接免疫荧光法检测 B 淋巴细胞 ·····	(154)
实验三	间接免疫荧光法检测 T 淋巴细胞 ·····	(156)
第二节	免疫酶标记技术·····	(158)
实验一	辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体技术 ·····	(160)
实验二	过氧化物酶-抗酶复合物的制备·····	(163)
实验三	间接法 ELISA 测定单克隆抗体的效价 ·····	(165)
实验四	双抗体夹心法 ELISA 检测抗原 ·····	(166)
实验五	Dot-ELISA 检测抗原 ·····	(168)
实验六	SPA-ELISA 测定伤寒杆菌“O”抗原 ·····	(170)
实验七	APAAP 法检测 T 淋巴细胞表面标记 ·····	(171)
第三节	免疫胶体金技术·····	(174)
实验一	胶体金的制备·····	(174)
实验二	胶体金标记蛋白的制备·····	(177)
实验三	Dot-IGS/IGSS 检测牛结核血清抗体 ·····	(180)
实验四	斑点金免疫渗滤测定法·····	(182)
实验五	胶体金免疫层析法检测人 HCG ·····	(184)
第四节	放射性核素标记技术·····	(185)
实验一	蛋白质的放射性核素(^{125}I)的标记 ·····	(185)
实验二	竞争法 RIA 测定人血清 IgE ·····	(187)
实验三	IRMA 测定血清中促甲状腺素·····	(189)
第十四章	超敏反应·····	(191)
实验一	豚鼠过敏性休克试验·····	(191)

(实验二 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应(耳肿胀法)·····	(193)
附录·····	(195)
(附录一 常用试剂和溶液的配制·····	(195)
(附录二 免疫器官与免疫细胞·····	(207)
参考文献·····	(212)
(161)·····	章三十第
(171)·····	节一章
(181)·····	一第页
(191)·····	二第页
(201)·····	三第页
(211)·····	节二第
(221)·····	一第页
(231)·····	二第页
(241)·····	三第页
(251)·····	四第页
(261)·····	五第页
(271)·····	六第页
(281)·····	七第页
(291)·····	八第页
(301)·····	九第页
(311)·····	十第页
(321)·····	十一第页
(331)·····	十二第页
(341)·····	十三第页
(351)·····	十四第页
(361)·····	十五第页
(371)·····	十六第页
(381)·····	十七第页
(391)·····	十八第页
(401)·····	十九第页
(411)·····	二十第页
(421)·····	二十一第页
(431)·····	二十二第页
(441)·····	二十三第页
(451)·····	二十四第页
(461)·····	二十五第页
(471)·····	二十六第页
(481)·····	二十七第页
(491)·····	二十八第页
(501)·····	二十九第页
(511)·····	三十第页
(521)·····	三十一第页
(531)·····	三十二第页
(541)·····	三十三第页
(551)·····	三十四第页
(561)·····	三十五第页
(571)·····	三十六第页
(581)·····	三十七第页
(591)·····	三十八第页
(601)·····	三十九第页
(611)·····	四十第页
(621)·····	四十一第页
(631)·····	四十二第页
(641)·····	四十三第页
(651)·····	四十四第页
(661)·····	四十五第页
(671)·····	四十六第页
(681)·····	四十七第页
(691)·····	四十八第页
(701)·····	四十九第页
(711)·····	五十第页
(721)·····	五十一第页
(731)·····	五十二第页
(741)·····	五十三第页
(751)·····	五十四第页
(761)·····	五十五第页
(771)·····	五十六第页
(781)·····	五十七第页
(791)·····	五十八第页
(801)·····	五十九第页
(811)·····	六十第页
(821)·····	六十一第页
(831)·····	六十二第页
(841)·····	六十三第页
(851)·····	六十四第页
(861)·····	六十五第页
(871)·····	六十六第页
(881)·····	六十七第页
(891)·····	六十八第页
(901)·····	六十九第页
(911)·····	七十第页
(921)·····	七十一第页
(931)·····	七十二第页
(941)·····	七十三第页
(951)·····	七十四第页
(961)·····	七十五第页
(971)·····	七十六第页
(981)·····	七十七第页
(991)·····	七十八第页
(1001)·····	七十九第页
(1011)·····	八十第页
(1021)·····	八十一第页
(1031)·····	八十二第页
(1041)·····	八十三第页
(1051)·····	八十四第页
(1061)·····	八十五第页
(1071)·····	八十六第页
(1081)·····	八十七第页
(1091)·····	八十八第页
(1101)·····	八十九第页
(1111)·····	九十第页
(1121)·····	九十一第页
(1131)·····	九十二第页
(1141)·····	九十三第页
(1151)·····	九十四第页
(1161)·····	九十五第页
(1171)·····	九十六第页
(1181)·····	九十七第页
(1191)·····	九十八第页
(1201)·····	九十九第页
(1211)·····	一百第页

实验室规则

免疫学实验的教学目的是巩固和理解免疫学基本理论知识,学习和掌握免疫学实验的基本操作技术,为今后的教学、科研及相关工作打下一定的基础。为确保实验效果,要求同学们必须遵守以下规则:

1. 课前充分预习实验内容,明确实验目的、原理、方法及操作中的注意事项等,做到心中有数。

2. 进入实验室必须穿好白大褂,离开时脱下反叠。实验室内禁止吸烟、饮食、用嘴吸吸管和湿润标签等;不能用手抚摸头面,以防感染。

3. 实验室内保持安静、清洁,不得高声谈笑和随便走动。实验台上只能放实验指导、记录本和文具,其它个人物品放到指定地点。

4. 实验时,按照实验指导及教师的要求进行操作,坚持实验的严肃性、严格性、严密性,真实记录实验结果,对错误的结果要认真分析,找出原因,得出结论。实验结束后,认真撰写实验报告,及时交给老师批改。

5. 实验中如发生割破皮肤及实验材料破损事故,应立即报告教师,进行紧急处理。皮肤破伤可用 75% 酒精或碘伏消毒,被污染的桌面、地面和物品可用 3% 来苏水消毒。

6. 注意节约实验药品,爱护实验器材和公共财物,不得将实验室任何物品私自带走。如有实验器材等损坏,应报告教师并按规定处理。

7. 实验结束后,应清理实验用品,用过的有菌器材和实验动物尸体应放入指定地点,不得弃置在实验台上。将实验台收拾整齐,擦净桌面,洗手消毒后离开。

8. 值日生应搞好实验室的卫生,检查水、电、煤气等开关是否关好,确保实验室安全。

第一章 实验动物的基本操作

动物实验是免疫学实验中的一种基本实验技术。本章介绍实验动物最基本的操作方法——实验动物的编号、抓取固定、取血、注射和处死等方法。

第一节 实验动物的抓取固定

正确地抓取固定动物,是为了不损害动物健康,防止被动物咬伤,保证实验顺利进行。抓取固定动物的方法依实验内容和动物的种类而定。抓取固定动物前,要了解各种动物的一般习性。抓取固定时,要小心仔细,不能粗暴。

1. 小鼠的抓取固定

小鼠较温顺,一般不会咬人,抓取时先用右手抓取鼠尾提起,置于鼠笼或实验台向后拉,在其向前爬行时,用左手拇指和食指抓住小鼠的两耳和颈部皮肤,将鼠体置于左手心中,把后肢拉直,以无名指按住鼠尾,小指按住后腿即可。也可用手固定方式:左手小指钩起鼠尾,迅速以拇指和食指、中指捏住其耳后颈背部皮肤(图 1-1)。这样,可进行灌胃、皮下、肌肉和腹腔注射等实验操作。

手术解剖和心脏采血时,使动物先取背卧位(必要时先行麻醉),再用大头针将鼠前后肢依次固定在腊板上。尾静脉注射时,可用小鼠尾静脉注射架固定,根据动物大小选择好合适的固定架,打开鼠筒盖,手提鼠尾,将动物头部对准鼠筒口并送入筒内,调节鼠筒长短合适后,露出尾巴,固定筒盖即可(图 1-2)。

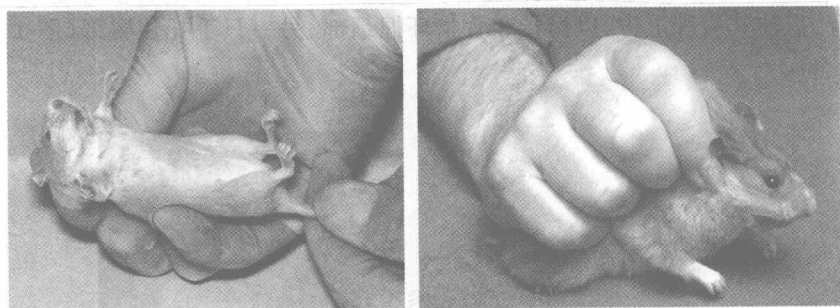


图 1-1 小鼠的抓取与固定

2. 大鼠的抓取固定

大鼠比小鼠牙尖性猛,不易用袭击方式抓取,可带上帆布手套抓取,避免咬伤。进行灌胃、腹腔、肌肉及皮下注射时,可采用左手固定法(图 1-3):用拇指和食指捏住鼠耳,余下三指紧捏鼠背皮肤,置于左掌心中,右手进行实验操作;也可伸开左手之虎口,敏捷地从后面一把抓住。做手术时,事先麻醉或处死,然后用细棉线缚腿,背卧位绑在大鼠固定板上;尾静脉注射时,用大鼠固定盒固定即可。

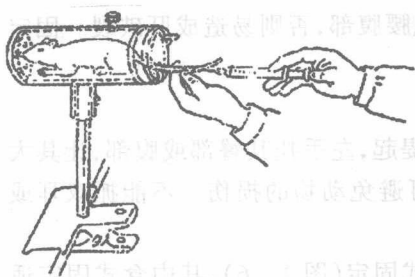


图 1-2 小鼠静脉注射

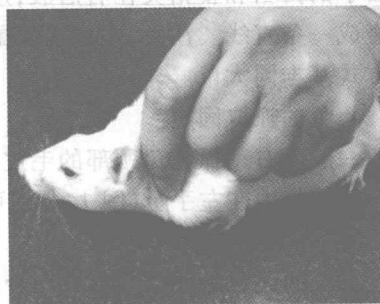


图 1-3 大鼠的抓取

3. 豚鼠的抓取与固定

豚鼠胆小易惊,抓取必须稳、准、迅速,一般先用手掌迅速扣住鼠背,抓住其肩胛上方,以拇指和食指环握颈部,另一只手托住臀部(图 1-4)。

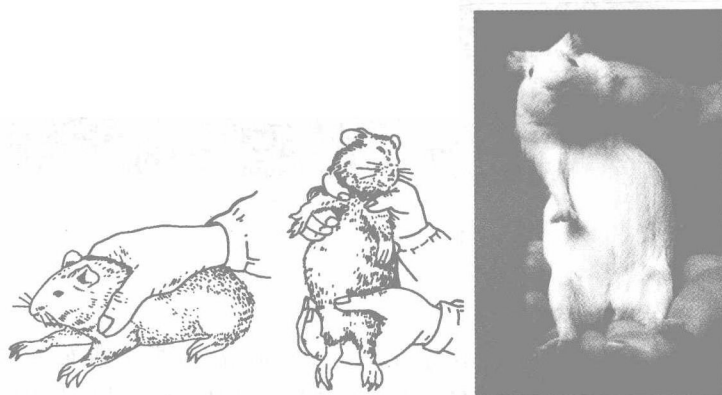


图 1-4 豚鼠的抓取固定

另一种抓取方法是:把左手的食指和中指放在颈背部的两侧,拇指和无名指放在肋部,分别用手指夹住左右前肢抓起来,然后翻转左手,用右手的拇指和食指夹住右后肢,用中指和无名指夹住左后肢,使鼠体伸直成一条直线。注意,不能抓豚鼠腰腹部,否则易造成肝破裂。固定的方式基本同大鼠。

4. 兔的抓取固定

一般以右手抓住兔颈部的毛皮提起,左手托其臀部或腹部,让其大部分体重集中在左手上(图 1-5),可避免动物的损伤。不能抓双耳或抓提腹部。

家兔的固定一般分为盒式和台式固定(图 1-6),其中盒式固定适用于兔耳采血、耳血管注射等情况;台式固定适用于手术时,动物仰卧,四肢用粗棉绳活结绑住,拉直四肢,将绳绑在兔台四周的固定棒上,头以固定夹固定或用一根粗棉绳挑过兔门齿绑在兔台铁柱上。



图 1-5 家兔抓取(1、2、3 均为不正确的抓取方法,4、5 为正确的抓取方法)



图 1-6 家兔的盒式固定与台式固定

第二节 实验动物的编号标记方法

实验动物的编号标记法应满足标号清晰、耐久、简便、适用的要求,方法有染色、耳缘剪孔和烙印法等,其中以染色标记法最常用。

染色标记法常使用 3~5% 苦味酸溶液(黄色)、0.5% 中性品红(红色)、2% 硝酸银(咖啡色)溶液和煤焦油的酒精溶液(黑色)等颜料进行编号标记。

皮毛标记编号原则是:先左后右,从上到下。一般把涂在左前腿上的计为 1 号,左腰部计为 2 号,左后腿计为 3 号,头顶部计为 4 号,腰背部计为 5 号,尾基部计为 6 号,右前腿计为 7 号,右腰部计为 8 号,右后腿计为 9 号。若动物编号超过 10 时,可使用两种不同的颜色标记,一种颜色作为个位数,另一种颜色作为十位数,这种交互使用可编到 99 号,如红色为十位数,黄色记为个位数,那么右后腿黄斑,头顶红斑,则表示是 49 号鼠,以此类推(图 1-7)。

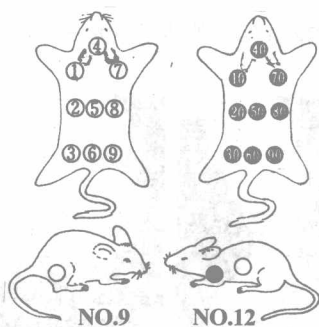


图 1-7 皮毛编号标记方法

鼠尾标记编号法:标记时用毛笔或棉签蘸取上述溶液,涂于鼠尾部,以示不同号码(图 1-8)。

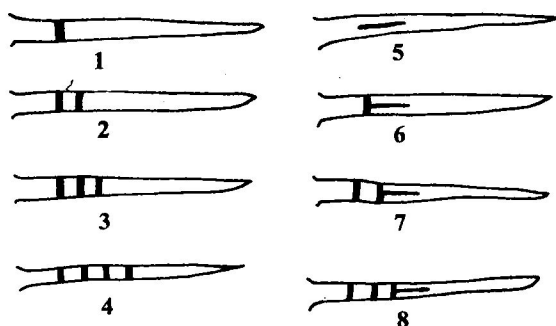


图 1-8 鼠尾标记编号法

第三节 实验动物的注射给药法

注射给药时,吸入注射材料后,应将注射器内的空气排尽,若注射材料具有传染性,则排气时应以酒精棉球包住针头,以免传染材料流出。

1. 腹腔注射

腹腔注射部位为下腹部腹中线左右两侧 1cm 处,为避免伤及内脏,抓取固定动物时应使头稍向后低,使内脏移向上腹(见图 1-9)。

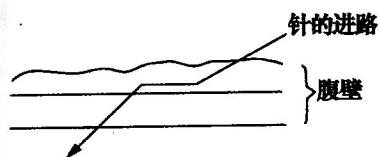
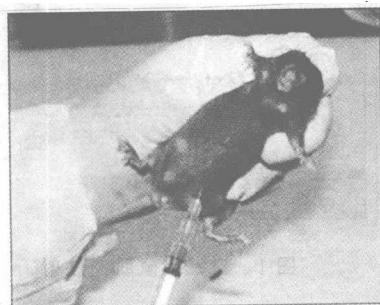


图 1-9 小鼠腹腔注射法

局部消毒后,右手持注射器将针头刺入皮肤,针头到达皮下后,稍向前推,再以 45° 刺入腹腔,回抽无回血或液体方可注入药液。腹腔注射通常均选取5号针头。大小鼠、豚鼠腹腔注射时,一般以左手固定动物,右手注射;对体重较大的大鼠或豚鼠、家兔等大动物,可由助手固定动物,暴露腹部,另一人进行注射操作。

2. 皮下注射

一般选择皮下组织较疏松的部位注射。大、小鼠、家兔、犬等注射部位有颈背、腋下、侧腹和后肢,猪为耳根部皮下,鸡为翼下部位。局部消毒,注射者将皮肤提起,将注射针头刺入皱褶底部,沿体轴推进 $5\sim 10\text{mm}$,若针尖易左右摆动,表明已刺入皮下,回抽无回流物即可注射,皮下呈扩散状隆起。注毕,干棉球局部压迫,防注液外漏。小鼠用4号针头,家兔等用6号针头。

3. 皮内注射

大、小鼠、豚鼠、家兔等动物皮内注射常选择背部脊柱两侧的皮肤,猪选取耳壳外面或腹侧皮肤注射。局部去毛、消毒,用左手将皮肤捏成皱襞,右手持针,将针头与皮肤约呈 30° 角刺入皮下,使针头向上挑起并稍刺入,即可注射(图1-10),注射部位鼓起一小丘。

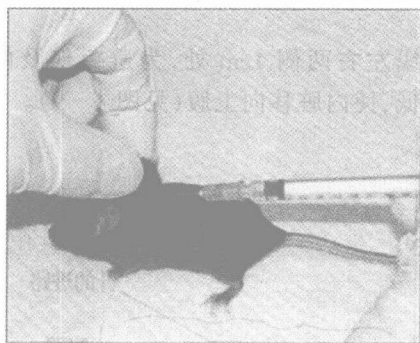


图1-10 小鼠皮内注射



图1-11 小鼠肌肉注射

4. 肌肉注射