

借

全国高等学校配套教材
供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

医学免疫学实验

主 编 司传平
副主编 沈关心



人民卫生出版社

全国高等学校配套教材

供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

医学免疫学实验

主 编 司 传 平

副主编 沈 关 心

编者（以姓氏笔画为序）

马立人（华北煤炭医学院）	朱道银（重庆医科大学）
王 辉（新乡医学院）	余 平（中南大学湘雅医学院）
王润田（河北医科大学）	冷 静（广西医科大学）
冯永堂（潍坊医学院）	宋文刚（泰山医学院）
司传平（济宁医学院）	张明徽（清华大学医学院）
白慧玲（河南大学医学院）	张林杰（安徽医科大学）
吕昌龙（中国医科大学）	沈关心（华中科技大学同济医学院）
安云庆（首都医科大学）	林英姿（海南医学院）

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验/司传平主编. —北京:人民卫生出版社,2005.10

ISBN 7-117-07110-9

I. 医… II. 司… III. 医药学:免疫学—实验—医学院校—教材 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 115655 号

医学免疫学实验

主 编:司 传 平

出版发行:人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址:(100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址:[http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)

E - mail: [pmph @ pmph. com](mailto:pmph@pmph.com)

邮购电话:010-67605754

印 刷:北京人卫印刷厂

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/16 印张:9 插页:1

字 数:212 千字

版 次:2005 年 10 月第 1 版 2005 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号:ISBN 7-117-07110-9/R · 7111

定 价:15.00 元

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

前言

《医学免疫学实验》是全国高等医药教材建设委员会、卫生部规划教材《医学免疫学》第4版(陈慰峰主编)的配套辅助教材。

医学免疫学是生命科学的前沿学科,也是医学生的主干必修课程之一。随着免疫学理论和免疫学技术的迅猛发展,免疫学与其他基础、临床学科的交叉融合也愈来愈广泛、深入,现代免疫学技术已渗透到生命科学研究的每一个领域,并有力地推动了基础医学、临床医学、预防医学乃至整个生命科学的不断发展。

医学免疫学实验教学是免疫学教学必不可少的重要环节,要培养学生的科学态度、动手能力、综合分析问题、解决问题的能力及创新精神等,主要依靠实验教学来完成。近年来,随着高等教育的不断改革和创新人才教育的发展,能力培养已引起高等学校的普遍重视,并进而引起了一场新的教与学的思考、探索 and 改革。教育部《关于加强高等学校本科教学工作,提高教学质量的若干意见》指出,“实践教学对于提高学生的综合素质、培养学生的创新精神与实践能力具有特殊作用。高等学校要重视本科教学的实验环节,保证实验课的开出率,达到本科教学合格评估标准,并开出一批综合性、设计性实验。”并特别强调,要“进一步加强实践教学,注重学生创新精神和实践能力的培养。”然而,传统的免疫学实验教材和教学则主要以验证理论知识和掌握实验技术为主要目标,这一旧的教学模式已不能适应当今社会对高等医学人才能力、素质的更高要求,也不利于激发学生的学习积极性。

基于上述认识和实践,我们编写了这本能力培养型《医学免疫学实验》教材。该教材的编写凝聚了各位编者长期的免疫学实验教学经验,吸取了国内兄弟院校编写的有关教材和国外教材的精华,适当删除了部分重复、陈旧的实验内容,增加了部分新技术,充实了新内容,其突出特色是将免疫学实验教材由传统的知识技能型转变为以学生为中心的能力培养型,并对医学免疫学实验教学内容进行了大胆的重新组织、分类、整合,形成了基础性实验、综合性实验和设计性实验三大教学模块。

基础性实验包含了医学免疫学实验的基本操作和技能训练、经典的免疫学实验技术和方法,是经过精选的最基本的、最能代表免疫学学科特点的实验方法和技术,并包含少量与重要理论相关的验证性实验。通过学习使学生理解和巩固所学理论知识,掌握相应的实验方法和实验技能,为综合性实验奠定基础。

综合性实验是指实验内容涉及本课程的综合知识或与本课程相关课程知识的实验,是多种实验方法、技术和多层次的实验内容的整合。综合性实验的目的在于训练学生对所学免疫学知识和实验技术的综合运用能力、独立工作能力和对实验结果的综合分析能力,为设计性实验的顺利开展做好准备。

设计性实验也称为研究性实验,是免疫学实验教学和理论教学相结合,旨在培养学生发现问题、解决问题的能力和严谨的科学态度及创新能力。设计性实验一般是在完成基础性实验和综合性实验的基础上,给定实验目的、要求和所提供的实验条件,由学生自行查阅资料,设计实验方案,并在教师指导下,进行科学研究、撰写研究报告和科研论文、参加答辩,使学生得到科学研究的初步训练,为毕业论文研究工作打下基础。

该教材以基础性实验为主,以综合性实验作为提高,以设计性实验作为扩展。全书共38个实验和5个设计性实验参考选题,并附有5个附录,力求内容完整、系统、科学,强调实用性和可操作性,注重能力培养。三个模块的划分并不是绝对的,而是相互交叉和融合的。在实际教学中,各校可根据不同专业、不同层次的学生和实验条件灵活安排、优化组合和设计,以达到最佳教学效果和培养目标为准。三个模块实验内容所占比例和学时也应根据专业特点和层次而确定。每一实验技术所选标本、实验步骤和方法,可根据各校实验条件和常规做法而加以修改和完善。

本教材适用于五年制和七年制各专业医学免疫学实验教学,专科层次可选学部分内容,也可供教师、研究生、医学检验科、防疫站、科研人员和从事免疫学研究的技术人员参考。

本教材的编写得到了各参编院校和同行们的大力支持,沈关心、马立人和冯永堂教授对部分内容进行了认真的审阅,济宁医学院医学免疫学教研室高琦负责绘图,郭振红、明建扩、马群、戴军等分别对部分内容进行了校对,在此一并致谢!

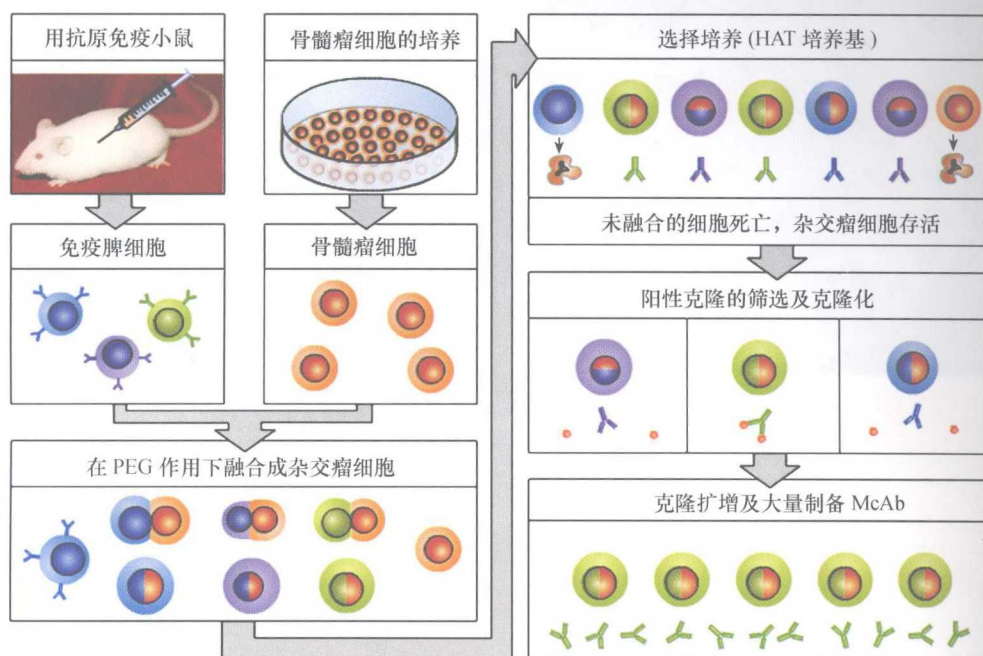
医学免疫学和免疫学技术的发展日新月异、突飞猛进,令人目不暇接。因此要求我们要不断学习、刻苦钻研。编写本教材的过程也是一个学习、交流、提高认识和追求创新的过程。由于我们的水平有限,书中难免会有疏漏和错误之处,真诚希望广大师生和同行们在使用过程中提出宝贵意见和建议,以使该教材在今后的修订中更臻完善。

2005年9月

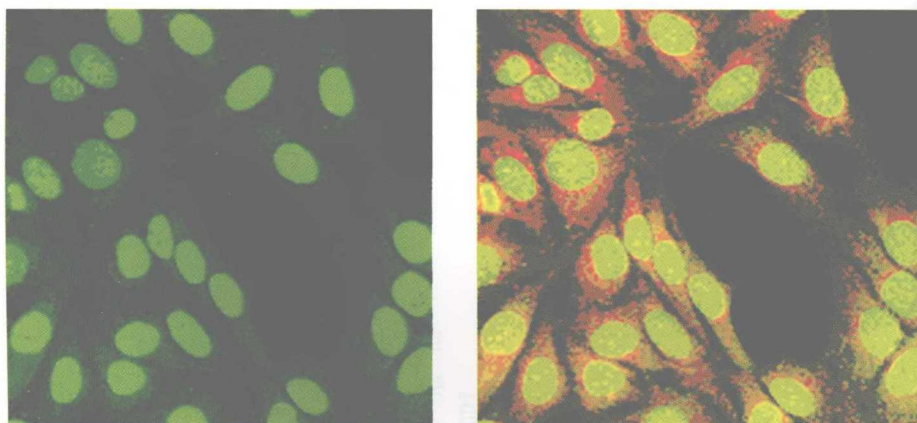
本书在编写过程中,参考了国内外许多免疫学教材和文献,在此一并致谢。本书在编写过程中,参考了国内外许多免疫学教材和文献,在此一并致谢。

本书在编写过程中,参考了国内外许多免疫学教材和文献,在此一并致谢。本书在编写过程中,参考了国内外许多免疫学教材和文献,在此一并致谢。

本书在编写过程中,参考了国内外许多免疫学教材和文献,在此一并致谢。本书在编写过程中,参考了国内外许多免疫学教材和文献,在此一并致谢。



彩图 2-2 单克隆抗体的制备示意图



彩图 6-1 抗核抗体的免疫荧光测定法

用 SLE 患者血清(含 ANA)与人上皮细胞株(Hep-2)反应,用 FITC 标记的抗人 IgG 抗体染色(绿色),再用伊文思兰(红色)复染(右图)

目 录

第一章 概述	(1)
一、医学免疫学实验的目的和要求	(1)
二、医学免疫学实验室规则	(1)
第一篇 基础性实验	
第二章 特异性抗体的制备	(3)
实验 1 免疫血清的制备	(3)
实验 2 免疫血清的鉴定及纯化	(5)
附：免疫血清的保存	(9)
实验 3 单克隆抗体的制备	(9)
第三章 凝集反应	(14)
实验 4 直接凝集反应	(14)
一、玻片凝集反应	(14)
二、试管凝集反应	(15)
实验 5 间接凝集抑制试验	(17)
第四章 沉淀反应	(20)
实验 6 单向免疫扩散试验	(20)
实验 7 双向免疫扩散试验	(22)
实验 8 对流免疫电泳试验	(24)
第五章 补体参与的反应	(26)
实验 9 补体的溶血反应	(26)
实验 10 血清总补体活性测定	(27)
实验 11 补体依赖的细胞毒试验	(29)
附：HLA 血清学分型法	(30)
第六章 免疫标记技术	(33)
实验 12 免疫荧光技术	(33)

实验 13 酶联免疫吸附试验	(35)
实验 14 酶联免疫斑点试验	(38)
实验 15 发光免疫标记技术	(40)
实验 16 免疫印迹技术	(42)

第七章 免疫细胞的分离与纯化

实验 17 人外周血单个核细胞的分离	(46)
实验 18 小鼠腹腔巨噬细胞的分离	(48)
实验 19 小鼠脾细胞的制备	(49)
实验 20 小鼠胸腺细胞的制备	(50)
实验 21 小鼠骨髓树突状细胞的制备	(51)
附: 人树突状细胞的制备	(53)

第八章 免疫实验相关动物模型的制备

实验 22 免疫功能低下动物模型的建立	(54)
实验 23 荷瘤动物模型的建立	(55)

第二篇 综合性实验

第九章 免疫细胞检测

实验 24 E 花环形成试验	(57)
附: 绵羊红细胞(SRBC)悬液的配制	(59)
实验 25 T 淋巴细胞亚群的测定	(59)
一、碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶免疫细胞化学法(APAAP 法)	(59)
二、流式细胞术检测法	(61)
实验 26 淋巴细胞增殖试验	(62)
一、形态学方法	(62)
二、 ^3H -TdR 掺入法	(64)
三、MTT 比色法	(65)
实验 27 混合淋巴细胞培养	(66)
实验 28 NK 细胞杀伤活性测定	(67)
实验 29 中性粒细胞吞噬功能测定	(68)
实验 30 硝基四氮唑蓝还原试验	(70)
实验 31 巨噬细胞吞噬功能测定	(71)
实验 32 巨噬细胞趋化试验	(72)
实验 33 溶血空斑形成试验	(74)
实验 34 细胞因子的检测	(76)
一、白细胞介素-2 的诱生与生物学活性检测	(77)
二、肿瘤坏死因子的免疫学检测法	(80)

第十章 超敏反应的免疫学检测	(82)
实验 35 豚鼠过敏反应观察	(82)
实验 36 皮肤过敏反应试验	(83)
附: 其他常用皮试液的配制	(84)
实验 37 皮肤迟发型超敏反应试验	(84)
实验 38 血清总 IgE 测定	(86)

第三篇 设计性实验

第十一章 设计性实验的选题、设计与实施	(89)
一、设计性实验的选题	(89)
二、实验设计的内容及步骤	(90)
三、设计性实验的组织实施	(91)
四、实验论文的撰写	(92)
五、论文答辩	(93)
六、设计性实验举例	(93)
第十二章 设计性实验参考选题	(96)
参考选题 1 细胞因子对荷瘤小鼠免疫功能的影响	(96)
参考选题 2 多糖类免疫调节剂对正常或免疫功能低下小鼠免疫功能的影响	(96)
参考选题 3 肿瘤患者细胞免疫功能测定	(97)
参考选题 4 自身免疫病患者免疫功能状态的测定	(98)
参考选题 5 新型免疫细胞亚群的分析	(99)

附录 I 免疫学研究常用实验动物及基本操作技术	(100)
一、实验动物的作用与意义	(100)
二、免疫学实验常用动物	(100)
三、实验动物的抓取与固定	(101)
四、实验动物给药方法	(102)
五、实验动物采血方法	(103)

附录 II 免疫学实验常用仪器设备使用方法	(105)
一、倒置显微镜	(105)
二、荧光显微镜	(106)
三、分光光度计	(108)
四、电泳仪	(111)
五、超速离心机	(112)
六、超净工作台	(113)
七、液体闪烁计数器	(114)

八、流式细胞仪	(115)
附录Ⅲ 免疫学实验常用器材及使用方法	(117)
一、试管	(117)
二、微量移液器	(117)
三、微型离心管	(119)
四、滤过器	(120)
附录Ⅳ 免疫学实验常用试剂及配制方法	(122)
一、缓冲液	(122)
二、培养液	(126)
三、ELISA 试剂	(128)
四、其他试剂溶液	(128)
附录Ⅴ 离心机转子的转速与相对离心力 RCF(g) 间的换算关系	(130)
一、相对离心力(RCF)算法	(130)
二、离心转速(r/min)算法	(130)
三、相对离心力列线图	(130)
参考文献	(133)

第一章 概述

医学免疫学是生命科学的前沿学科,也是整个生物医学研究的重要支柱之一。随着免疫学理论和免疫学技术的迅猛发展,免疫学与其他学科的交叉、融合也愈来愈广泛、深入,现代免疫学技术已渗透到生命科学研究的一个个领域,从而有力地推动了基础医学、临床医学和预防医学的不断发展。

医学免疫学是一门实践性、应用性很强的学科,其教学过程分为理论教学和实验教学两部分。实验教学作为免疫学教学的重要环节,直接影响到人才培养目标的实现,尤其是在培养学生的科学态度、实践技能 and 创新能力方面,具有举足轻重的地位,将成为学习后续课程、进行临床医学实践和生物医学科学研究的坚实基础。

一、医学免疫学实验的目的和要求

医学免疫学实验课程的开设,其目的不仅是使学生验证部分理论知识和加深对课堂讲授内容的理解,更重要的是在掌握系统理论知识的基础上,学习和掌握免疫学实验的基本技术和技能,培养学生观察、思考、分析和解决问题的能力,以及严肃认真的科学态度和创新精神,提高学生的综合素质。为实现这一培养目标,建立了免疫学基础性、综合性和设计性实验教学新体系。

1. 基础性实验 系统学习和掌握常用的经典免疫学实验方法和现代免疫学实验技术,包含少量与重要理论相关的验证性实验。通过此阶段的学习,使学生理解和巩固所学理论知识,掌握相应的实验方法和实验技能。

2. 综合性实验 是指实验内容涉及本课程的综合知识或相关课程知识的实验,往往由多种实验手段、技术和多层次的实验内容所组成。通过进行较复杂和具有一定难度的综合性实验,进一步训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、独立工作能力和对实验结果的综合分析能力。

3. 设计性实验 是在完成基础性实验和综合性实验的基础上,给定实验目的、要求和所提供的实验条件,由学生自行查阅资料,自选题目、设计实验方案,并在教师指导下,进行实验,最后以小论文形式写出实验报告,并进行答辩。其目的在于激发学生的创新性思维,培养学生的科研能力,提高学生的综合素质。

二、医学免疫学实验室规则

1. 学生在上实验课前,应对实验内容进行充分的预习,明确实验的目的、要求,了解实验原理和操作步骤,熟悉所要使用的仪器、药品的性质和注意事项,预测实验结果,做到胸中有数。

2. 要注意保持科学实验的严肃性、严格性和严密性。实验过程中,应仔细认真地观

察教师的演示,严肃认真地按规定步骤进行操作。

3. 仔细、耐心地观察实验过程中出现的各种现象,及时、真实客观地记录实验结果,并积极思考,认真分析,得出结论。

4. 积极参与小组设计性实验,树立团队精神,并发挥自己的聪明才智,创造性地开展科学实验。

5. 实验所用的仪器、器材和试剂须按要求摆放,严格按照操作程序进行操作,保证实验过程顺利进行,并取得预期效果。

6. 要爱护公共财物,节约试剂材料,不得将实验室任何物品私自带走。如将仪器、器材损坏,应及时报告教师,并登记备案。

7. 实验室内应保持安静,遵守纪律,不得高声谈笑、随便走动、拆卸仪器、玩弄动物。

8. 实验室内禁止吸烟、进食、饮水、用嘴吸吸管及湿润标签,不准随地吐痰。

9. 如有传染性材料、有毒材料流洒于桌面、地面或衣服上,或发生割破皮肤、被动物咬伤等意外时,要及时报告教师,做好妥善处理。

10. 实验结束后,应清理实验用品,物归原处。实验废弃物应放入或倒入指定的地方或容器内。服从卫生值日安排,认真负责地做好清洁卫生。

11. 离开实验室前应洗手,注意关好水、电、门、窗等。

12. 认真填写实验记录,按时提交实验报告。

教师应严格要求学生遵守实验室规则,不得高声喧哗、打闹,不得将实验室内物品私自带出,不得将实验室内物品带出。(司传平)

基础实验是学生进入大学后,在教师指导下,通过自己动手,对所学理论知识进行验证、巩固、加深理解,并培养学生实验技能、科学思维和创新能力。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

基础实验是培养学生实验技能、科学思维和创新能力的重要途径。通过基础实验,学生可以掌握基本的实验操作技能,了解实验仪器的使用,培养严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

第一篇 基础性实验

第二章 特异性抗体的制备

抗原与抗体的相互作用是免疫学检测的基础,抗体作为重要免疫分子,已广泛用于科学研究、临床诊断、治疗及预防中。在免疫学检测中,抗体的质量直接关系到实验方法的特异性和灵敏度。因此,高质量的抗体应该具备高特异性、高亲和力和高效价等特性。制备高质量的抗体必须有理想的免疫原、正常的动物和科学的免疫方法。

免疫学检测中常用的抗体主要有来自于免疫动物的多克隆抗体(抗血清)和采用杂交瘤技术制备的单克隆抗体。本章分别介绍这两类抗体的制备方法。

实验1 免疫血清的制备

(Preparation of Immunoserum)

【目的要求】 掌握免疫原和佐剂的制备方法;熟悉免疫血清制备的基本过程;了解动物实验的基本知识。

【原理】 将抗原物质经适当途径,按照预先制定的免疫方案免疫动物,经过一定时间,可刺激机体产生特异性抗体并释放入血液,当血中抗体达到一定效价时采血,分离血清,即为特异性免疫血清(又称为抗血清)。因抗原具有多种表位,可激活多个克隆的B细胞活化产生抗体,因此,这种免疫血清又称为多克隆抗体。

优质免疫血清的产生,主要取决于抗原的纯度和免疫原性,动物应答的能力以及免疫程序(如免疫途径、抗原剂量、注射次数、时间间隔、有无佐剂等因素)。本实验分别以绵羊红细胞(SRBC)和纯化的人IgG作为免疫原,以家兔为免疫动物,制备兔抗羊红细胞免疫血清(也称为溶血素)和兔抗人IgG免疫血清。

【材料】

1. 动物 健康成年家兔,雄性,体重2~3 kg;健康成年绵羊。
2. 试剂 阿氏(Alsever)液、生理盐水、纯化人IgG(10 mg/ml)、羊毛脂、液体石蜡、卡介苗(BCG)(75 mg/ml)、碘酒、75%酒精。
3. 器材 剪刀、镊子、无菌注射器(2 ml、50 ml)及针头(6号、9号)、量筒、无菌毛细滴管、无菌试管、离心管、三角烧瓶(200 ml)、动物固定架、手术器械一套、塑料放血管等。

【方法】

(一) 兔抗羊红细胞免疫血清(溶血素)的制备

1. 抗原制备

(1)用碘酒和75%酒精消毒绵羊皮肤,抽取颈静脉血液,注入含有等量阿氏液的三角烧瓶内,混匀。阿氏液既有抗凝作用,又适于储存SRBC。分装后置4℃冰箱内,可使用3周。

(2)无菌取上述绵羊血于离心管中,用无菌生理盐水洗涤红细胞,2 000 r/min,离心5 min,吸弃上清液和白细胞层,再用无菌生理盐水与SRBC混匀,2 000 r/min,离心5 min,重复3次。最后一次离心10 min,以使血细胞沉积于管底,弃去上清液。

(3)根据红细胞压积,用生理盐水配成20%SRBC悬液。

2. 免疫动物

(1)选择健康雄性家兔2~3只,由耳静脉采血1 ml,分离血清,与羊红细胞作凝集试验,测定有无凝集素,如无或仅有微量时,该动物即可用于免疫。

(2)用羊全血和SRBC悬液按照免疫方案(表2-1)免疫家兔。

表2-1 兔抗SRBC抗体制备免疫方案

免疫日期	第1天	第3天	第5天	第7天	第12天	第15天
注射途径	皮内	皮内	皮内	皮内	耳静脉	耳静脉
免疫原	全血	全血	全血	全血	20%悬液	20%悬液
剂量(ml)	0.5	1.0	2.0	1.0	1.0	2.0

(3)试血:末次注射后第7天,经耳静脉采血1 ml,分离血清,用试管凝集试验滴定溶血素效价,若效价在1:2 000以上,即可使用;若效价不够高,可追加免疫1~2次,再行效价测定。

3. 分离血清

(1)采用颈动脉放血法(见附录I:家兔颈动脉放血法)收集血液于无菌三角烧瓶中,令其凝固、贴壁。再置4℃冰箱过夜使血凝块收缩后,吸取上层澄清的血清。可用玻棒将血凝块与容器壁剥离,以获取更多血清。

(2)采集的血清经2 500 r/min,离心10 min,收集上层血清,弃沉淀。免疫血清经鉴定或纯化后,小量分装,-20℃以下冻存。

(二) 兔抗人IgG免疫血清的制备

1. 抗原制备

(1)弗氏不完全佐剂(FIA)的制备:称取羊毛脂8 g,放入无菌研钵,逐滴加入优质液体石蜡57 ml,沿一个方向边滴边研磨。研磨均匀后,分装于有盖试管或疫苗瓶中(每瓶10 ml),高压灭菌(8磅20 min)(1磅=0.453 6 kg)后,置4℃冰箱备用。次日观察是否分层,如果仍呈均匀粘稠状,即为FIA。

(2)弗氏完全佐剂(FCA)的制备:将FIA预温(60℃ 30 min),取一定量于无菌研钵内,在无菌条件下一边研磨,一边滴加卡介苗,通常每毫升FIA加卡介苗2.5 mg。研磨时按一个方向进行,研磨完毕置冰箱过夜,如不分层即可使用,此为FCA。

(3)取纯化的人IgG 5 ml(10 mg/ml)于无菌研钵内,逐滴加5 ml FCA或FIA,依一

个方向研磨直到形成均一性的乳状液,用无菌滴管取一滴于冷水面,不散开为达到“油包水”合格要求的 FCA 抗原(FCA-IgG)或 FIA 抗原(FIA-IgG)。

2. 免疫动物

(1)选择体重适宜的健康雄性家兔 2~3 只,用剪刀剪去家兔两后脚掌及背部部分兔毛,用碘酒、酒精消毒皮肤。

(2)第一次免疫:用 2 ml 注射器吸取 FCA 乳化的抗原(FCA-IgG)1.2 ml,于每侧脚掌皮下及背部皮下多点注射,每点各注射 0.1~0.2 ml。

(3)第二次免疫:间隔 10~14 d 后于皮下注射等量 FIA-IgG。

(4)间隔 10~14 d 后,静脉注射不加佐剂的抗原(人 IgG)5 mg。

(5)末次注射后 10~14 d,从耳静脉采血 1 ml,分离血清,用双向免疫扩散试验滴定免疫血清的抗体效价。效价在 1:16 以上,即可放血收集血清。若效价达不到要求,可由静脉追加注射 IgG 5 mg,1~2 次,再采血测定抗体效价,效价达到要求立即放血。

3. 分离血清 同“兔抗羊红细胞免疫血清的制备”。

【结果判断】收获的血清应无菌,且无溶血现象。兔抗 SRBC 免疫血清的溶血效价应高于 1:2 000;兔抗人 IgG 免疫血清的效价应高于 1:16。

【注意事项】

1. 抗原制备、免疫动物及采集血清等过程应注意无菌操作。

2. 免疫的途径、次数、间隔时间因抗原性状不同而异,应合理设计免疫方案,并根据具体情况加以调整。

3. 红细胞及细菌等颗粒性抗原比较容易诱导免疫应答,可直接用来免疫动物;而蛋白质等可溶性抗原则需要加入免疫佐剂,充分乳化,否则不易免疫成功。

4. 再次注射免疫原时,要防治过敏反应发生。

【思考题】

1. 制备兔抗 SRBC 免疫血清的过程与制备兔抗人 IgG 免疫血清有何异同?为什么?

2. 佐剂的种类有哪些?主要成分是什么?有何用途?

3. 某课题组拟制备兔抗乙肝表面抗原(HBsAg)免疫血清,请你帮助设计免疫方案。

(冷静)

实验 2 免疫血清的鉴定及纯化

(Identification and Purification of Immunoserum)

在大多数情况下,制备的免疫血清必须经鉴定和纯化后才能用于免疫学实验或免疫治疗。免疫血清的鉴定应根据抗原的性质、种类不同,选择适当方法进行。如抗羊红细胞免疫血清的鉴定可用凝集反应和补体溶血反应;而兔抗人 IgG 免疫血清的鉴定可选用双向免疫扩散试验、ELISA 法、SDS-PAGE 凝胶电泳等方法。抗体的纯化也有多种方法,通常应根据抗体的特点、纯度要求和实验室具体条件加以选择。常用的方法有盐析法、凝胶过滤、离子交换层析、亲和层析以及高效液相色谱等方法。

一、兔抗 SRBC 免疫血清(溶血素)的鉴定

【目的要求】掌握兔抗 SRBC 免疫血清鉴定的原理;熟悉该方法的操作及结果判断。

【原理】 SRBC 作为颗粒性抗原在体外与其相应抗体(兔抗 SRBC 免疫血清)结合,可出现肉眼可见的凝集块,即凝集试验阳性,说明免疫血清中含有特异性抗 SRBC 抗体。当 SRBC 在试管中与其相应免疫血清结合后,在补体作用下,将导致 SRBC 裂解,发生免疫溶血反应。当反应体系中的 SRBC 和补体一定时,其溶血反应程度与免疫血清中的抗体(溶血素)效价呈正比,此即为补体溶血试验,藉此可测定溶血素的效价。

【材料】

1. 免疫血清 实验 1 制备的溶血素。
2. 1%SRBC 悬液。
3. 补体 豚鼠新鲜血清。
4. 生理盐水。
5. 器材 无菌试管、无菌吸管、试管架、恒温水浴箱、玻片等。

【方法】

1. 取玻片一张,在两端分别加生理盐水和免疫血清各一滴,然后各加入一滴羊红细胞,轻摇玻片,经 1~2 min,若生理盐水侧红细胞仍均匀混浊,而在免疫血清侧红细胞凝集成团,出现小颗粒,即为凝集试验阳性,说明免疫血清中含有抗羊红细胞抗体。

2. 在玻片凝集试验阳性基础上,用补体溶血试验测定免疫血清的效价。

(1)按图 2-1 稀释溶血素。取 15 支小试管,编号列于试管架上,加入生理盐水,第 1

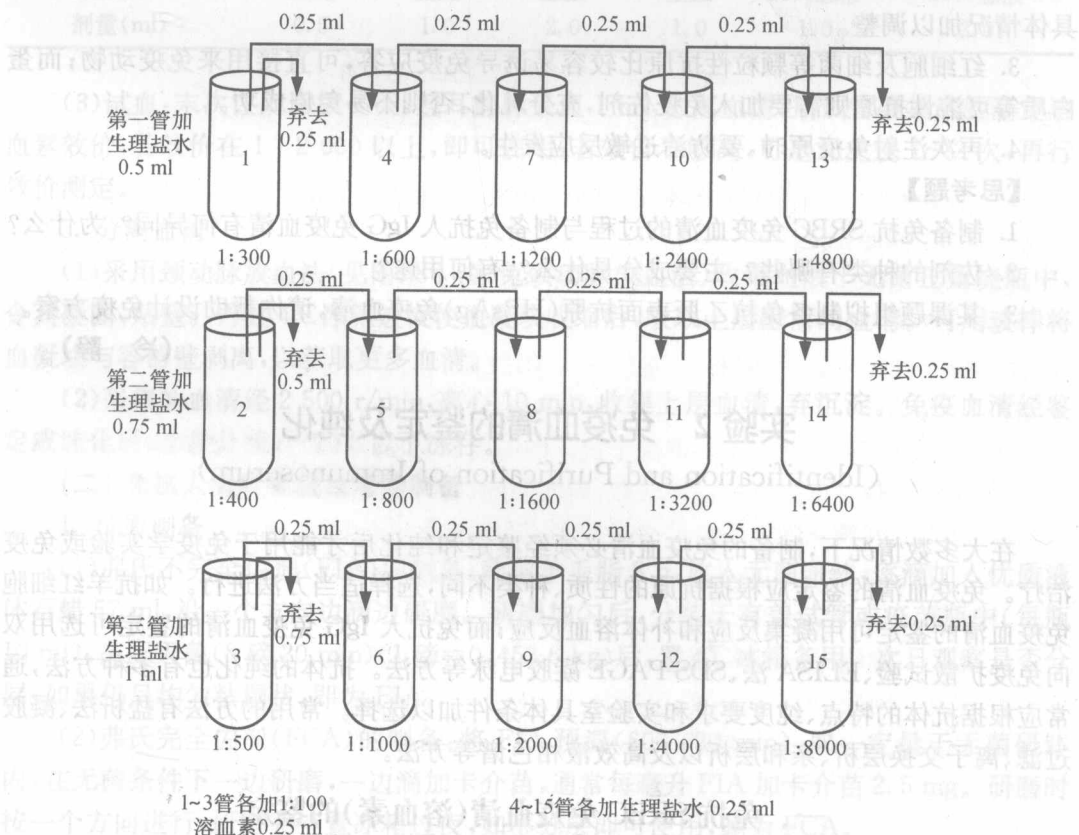


图 2-1 溶血素的稀释图

管 0.5 ml,第 2 管 0.75 ml,第 3 管 1 ml,第 4~15 管各 0.25 ml。溶血素做 1:100 稀释后,取 0.75 ml,分别加入 1、2、3 号管,每管 0.25 ml,即成 1:300、1:400、1:500 稀释之溶血素,然后再进行倍比稀释。

(2)按表 2-2 加入各成分,另设第 16 号对照管,混匀后置 37℃ 水浴箱 30 min,观察结果。

表 2-2 溶血素效价的滴定

试管	溶血素 0.25 ml	补 体 1:30(ml)	生理盐水 (ml)	1%羊血细胞 (ml)	假定结果
1	1:300	0.5	0.5	0.25	完全溶血
2	1:400	0.5	0.5	0.25	完全溶血
3	1:500	0.5	0.5	0.25	完全溶血
4	1:600	0.5	0.5	0.25	完全溶血
5	1:800	0.5	0.5	0.25	完全溶血
6	1:1 000	0.5	0.5	0.25	完全溶血
7	1:1 200	0.5	0.5	0.25	完全溶血
8	1:1 600	0.5	0.5	0.25	完全溶血
9	1:2 000	0.5	0.5	0.25	完全溶血
10	1:2 400	0.5	0.5	0.25	大部分溶血
11	1:3 200	0.5	0.5	0.25	半溶血
12	1:4 000	0.5	0.5	0.25	不溶血
13	1:4 800	0.5	0.5	0.25	不溶血
14	1:6 400	0.5	0.5	0.25	不溶血
15	1:8 000	0.5	0.5	0.25	不溶血
16	—	—	1.25	0.25	不溶血

【结果判定】 观察溶血现象,以呈现完全溶血的血清最高稀释度为溶血素效价,如表 2-2 中溶血素效价为 1:2 000。

【注意事项】

1. 实验所用补体应采用豚鼠新鲜血清。
2. 补体性质极不稳定,需对实验条件和各个环节加以严格控制。
3. 兔抗人 IgG 免疫血清的鉴定可采用双向免疫扩散法(见实验 7)。

【思考题】

1. 兔抗 SRBC 免疫血清的鉴定为什么采用玻片凝集试验?
2. 溶血素效价的滴定采用哪种方法? 应注意哪些事项?

二、免疫血清的纯化

提取某一类抗体或抗体片段的方法较多。纯化方法的选择及确定不同纯化方法的组合,应根据产品的最终用途和各实验室条件来确定。本实验介绍硫酸铵分级沉淀法纯化兔抗人 IgG 免疫血清中的 IgG 类抗体。