

兽医免疫学 实验指导

○ 温建新 主编

Shouyi Mianyixue
Shiyan Zhidao



中國農業大學出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

兽医免疫学实验指导

温建新 主编

中国农业大学出版社

• 北京 •

内 容 简 介

本书结合教学工作实际,共编写 11 个实验项目,每个实验说明实验目的、实验原理、实验内容方法、实验要求及注意事项,并附有一定量的思考题。实际实验时可根据教学计划安排的实验学时数选择相关实验进行。本实验指导按照教学大纲的要求,实验力求实用性、科学性和先进性,既精选传统的实验内容又增添了部分目前能开展的较先进实用的实验技术。本书依教学过程安排实验次序,可帮助学生巩固基础理论知识,培养学生基本技能,提高教学效果。

图书在版编目(CIP)数据

兽医免疫学实验指导/温建新主编. —北京:中国农业大学出版社,2016.8
ISBN 978-7-5655-1699-3

I. ①兽… II. ①温… III. ①兽医学-免疫学-实验 IV. ①S852.4-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 212719 号

书 名 兽医免疫学实验指导

作 者 温建新 主编

策 划 赵 中

责任编辑 田树君

封面设计 郑 川

责任校对 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62818525,8625

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

E-mail cbsszs@cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2016 年 12 月第 1 版 2016 年 12 月第 1 次印刷

规 格 787×980 16 开本 10.5 印张 190 千字

定 价 23.00 元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编审人员

主 编 温建新

副主编 刘光亮 刘文华

编写人员 温建新(青岛农业大学)

刘文华(青岛农业大学)

任慧英(青岛农业大学)

邹 玲(青岛农业大学)

张 璐(青岛农业大学)

刘 慧(青岛农业大学)

周 霞(石河子大学)

刘光亮(中国农业科学院兰州兽医研究所)

赵光伟(西南大学)

肖一红(山东农业大学)

苏 艳(新疆农业大学)

主 审 刘光亮 段新华

前 言

免疫学是兽医院校必设的基础课程之一,按教学大纲要求兽医免疫学的实验课时占总学时的 1/4 左右,说明该学科具有理论与实践紧密结合的特点及实验教学在学科中的重要性。学习本实验课的目的是验证和巩固其理论知识学习和掌握本课程的基本操作技术,同时培养学生观察、思考和分析问题的能力。

作为应用名校建设工程的内容要求,实验指导在内容设置上要求学生不仅要掌握基础理论、基本知识,而且要学习和掌握各项基本技能。据此,我们编写出《兽医免疫学实验指导》一书,力求规范实验教学,从整体提高教学水平和教学质量。并加强生产实践能力的培养和训练,这也是本实验指导的特色之一。

本书结合教学工作实际,共编写 11 个实验项目,每个实验说明实验目的、实验原理、实验内容方法、实验要求及注意事项,并附有一定量的思考题。实际实验课时可根据教学计划安排的实验学时数选择相关实验进行。本实验指导按照教学大纲的要求,实验力求实用性、科学性和先进性,既精选传统的实验内容又增添了部分目前能开展的较先进实用的实验技术。本书依教学进程安排实验次序,可帮助学生巩固基础理论知识,培养学生基本技能,提高教学效果。免疫学和免疫学技术的发展日新月异,兽医学教育的改革不断向纵深发展,限于编者的学术及认识水平,本书难免存在缺点和不足。为此,希望广大师生对本书提出宝贵意见,以便及时加以改进。

编 者
2016 年 8 月

目 录

第一部分 免疫学的基本实验技术

实验一 实验动物的基本操作技术	3
第一节 常用实验动物的编号方法	4
第二节 常用实验动物的捉拿固定方法	7
第三节 常用实验动物的免疫途径	11
第四节 常用实验动物的取血方法	16
实验二 抗原的制备技术	27
第一节 抗原的提取	27
第二节 免疫原的制备	38
实验三 抗体的制备技术	41
第一节 抗血清的制备	41
第二节 单克隆抗体的制备	46
实验四 常用佐剂的制备技术	56
实验五 细胞免疫检测技术	58
第一节 淋巴细胞分离技术	58
第二节 E-玫瑰花环形成实验	61
第三节 淋巴细胞转化实验	64
第四节 细胞毒性 T 淋巴细胞活性测定	70
第五节 酸性 α -醋酸萘酯酶测定	73
第六节 MTT 法检测 T 淋巴细胞转化实验	75

第七节	细胞内细胞因子染色	77
第八节	酶联免疫斑点法(ELISPOT)	79
第九节	流式细胞仪技术	83
第十节	流式细胞仪技术检测 T 淋巴细胞亚群	85
第十一节	免疫荧光技术	88
第十二节	NK 细胞活性测定	92
第十三节	巨噬细胞吞噬功能测定	93
第十四节	ELISA 检测细胞因子含量	95
第十五节	间接免疫荧光技术检测淋巴细胞亚群	96
实验六	免疫组织化学技术	98
第一节	组织的固定与取材	98
第二节	组织脱水、透明、浸蜡和包埋	101
第三节	石蜡切片制备	104
第四节	免疫组织化学技术	106
实验七	免疫血清学技术	111
第一节	平板凝集实验	111
第二节	双向琼扩实验	112
第三节	对流免疫电泳实验	115
第四节	酶联免疫吸附实验(ELISA)	117
第五节	斑点酶联免疫吸附试验	122
第六节	免疫酶组化技术	124
第七节	病毒血凝与血凝抑制试验	126
第八节	中和试验	128
实验八	酶标抗体的制备	134
第一节	戊二醛二步法	134
第二节	简易过碘酸钠法	135

第二部分 免疫制剂制备的实例

实验九 胶体金制备技术	139
实验十 抗原和免疫血清的制备实例	145
第一节 颗粒性抗原的制备	145
第二节 可溶性抗原的制备(菌脂多糖的制备实例)	146
第三节 抗菌血清的制备	147
第四节 红细胞抗体(溶血素)的制备	149
实验十一 菌种保藏	150
参考文献	155

第一部分 免疫学的基本实验技术

实验一 实验动物的基本操作技术

实验二 抗原的制备技术

实验三 抗体的制备技术

实验四 常用佐剂的制备技术

实验五 细胞免疫检测技术

实验六 免疫组织化学技术

实验七 免疫血清学技术

实验八 酶标抗体的制备

实验一 实验动物的基本操作技术

动物实验是指在实验室内,使用实验动物获得有关生物学、医学等方面的新知识或是为了解决具体问题而进行的科学研究。通过对动物本身生命现象的研究,进而推用到人类,来探索人类的生命奥秘,控制人类的疾病和衰老,延长人类的生命,这是实验动物科学发展的最终目的。

实验动物科学,现在已经成为现代科学技术不可分割的一个组成部分,已形成一门独立的综合性基础科学门类。这门科学的重要性在于,一方面,它作为科学研究的重要手段,直接影响着许多领域研究课题成果的确立和水平的高低;另一方面,作为一门科学,它的提高和发展,又会把许多领域课题的研究引入新的境地。因此,实验动物科学技术的重要性可概括为下面三句话:它是现代科学技术的重要组成部分,是生命科学的基础和条件,是衡量一个科研单位乃至一个国家科学研究水平的重要标志。

在很多领域的科学研究中,实验动物充当着非常重要的安全试验、效果试验、标准试验的角色。许多动物各系统的功能与人类是相似的,如犬具有发达的血液循环和神经系统,在毒理方面的反应和人类比较接近,适于做实验外科学、营养学、药理学、毒理学、行为学等方面的研究。两栖类的蛙和蟾蜍,大脑很不发达,虽然不能用于高级神经活动的研究,但在做简单的反射弧实验时,则很合适,因为最简单的反射中枢位于脊髓,而两栖类脊髓已发展到合乎实验要求的程度,其结构简单明了,易于分析。

动物实验是免疫学实验中的一种基本实验技术,通过对动物实验技术进行相关了解和学习,掌握基本操作方法,为今后的研究实验奠定基础。本实验主要介绍实验动物最基本的操作方法:常用实验动物的编号方法、常用实验动物的捉拿固定方法、常用实验动物的免疫途径、常用实验动物的取血方法。

第一节 常用实验动物的编号方法

实验时为了分组和个体间辨别的方便,通常需要对实验动物进行编号。实验动物编号标记法的基本原则是清晰、持久、简便、适用、易辨认。主要采用的方法有颜料涂染法、烙印法、号牌法和耳号法,其中以颜料涂染法最常用。

一、颜料涂染法

使用颜料涂染进行标记时,通常选择3%~5%苦味酸溶液(呈黄色)、0.5%中性品红(呈红色)、2%硝酸银(呈咖啡色)溶液和煤焦油的酒精溶液(呈黑色)等颜料进行编号标记。

对实验动物的皮毛进行标记编号的原则是:先左后右,从上到下。一般把涂在左前腿上的记为1号,左腰部记为2号,左后腿记为3号,头顶部记为4号,腰背部记为5号,尾基部记为6号,右前腿记为7号,右腰部记为8号,右后腿记为9号。如果动物编号超过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,例如红色为十位数,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,依此类推(图1-1)。

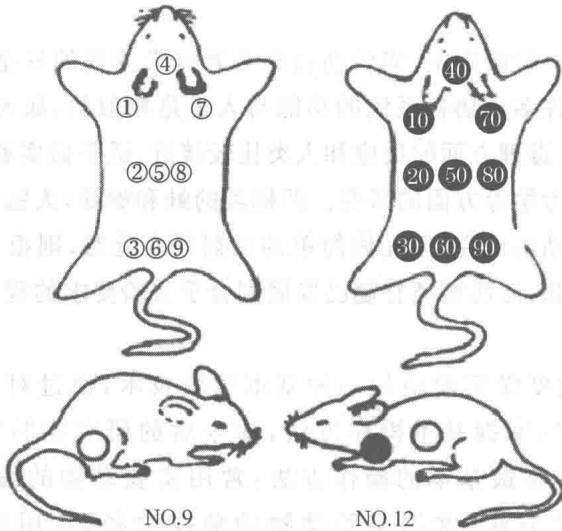


图 1-1 毛皮编号标记方法

鼠尾标记编号法:标记时用棉签蘸取上述溶液,涂于鼠尾部,用来表示不同的号码(图 1-2)。

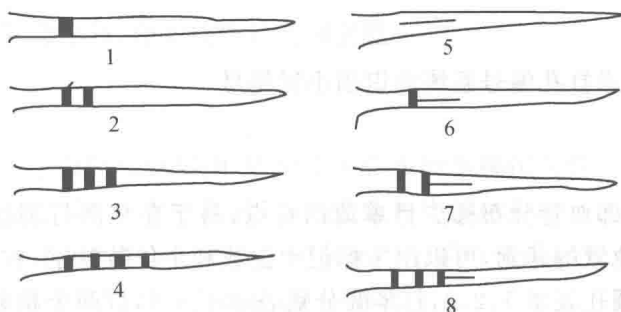


图 1-2 鼠尾标记编号法

二、烙印法

烙印法是用刺数钳在动物无体毛或明显部位(如耳、鼻部和四肢等部位)刺上编号,然后用棉签蘸着溶有乙醇的黑墨汁在编号上涂抹。烙印前,最好对烙印部位预先用 75%乙醇消毒,以免造成皮肤局部感染。

三、号牌法

号牌法是指将标有编号的金属制号码牌固定在实验动物的耳部皮肤上,大动物可挂在颈上或笼箱上。

四、耳号法

有卡耳号法和标牌法两种方法,通常采用卡耳号法。

1. 卡耳号法

猪、牛、羊、鹿等一般采用此种标记方法。即将实验动物两耳的不同部位卡成豁口,然后将每个豁口所代表的数加起来,所得即是该实验动物的耳号。通常采用国际上猪的卡耳号法,左耳号代表数字大,右耳的小,是对称的大小关系。具体言之,左耳上缘每卡一个豁口为 10,下缘每卡一个豁口为 30,耳尖一个豁口为 200,耳廓中间卡一个圆孔为 800;而右耳相对部位的豁口即代表 1、3、100、400。

2. 标牌法

它是用特制的标牌卡在实验动物的耳下缘,再用特制的笔将编号写在标牌上

即可,永久不褪色。北京市奶牛研究所可提供标牌和特制用具。

五、小鼠耳号法试验

【实验目的】

掌握小鼠耳缘打孔编号系统并识别小鼠编号。

【实验原理】

利用小鼠耳部血管分布稀少且单薄的特点,易于在耳部打洞标记。同时利用小鼠左耳、右耳位置的区别,可以用来标记十位数和个位数数字;右耳耳缘背部、中部、腹部一侧打圆孔表示1、2、3,打半圆分别表示4、5、6,打两个相邻半圆分别表示7、8、9;左耳耳缘背部、中部、腹部一侧打圆孔表示10、20、30,打半圆分别表示40、50、60,打两个相邻半圆分别表示70、80、90,详见图1-3。

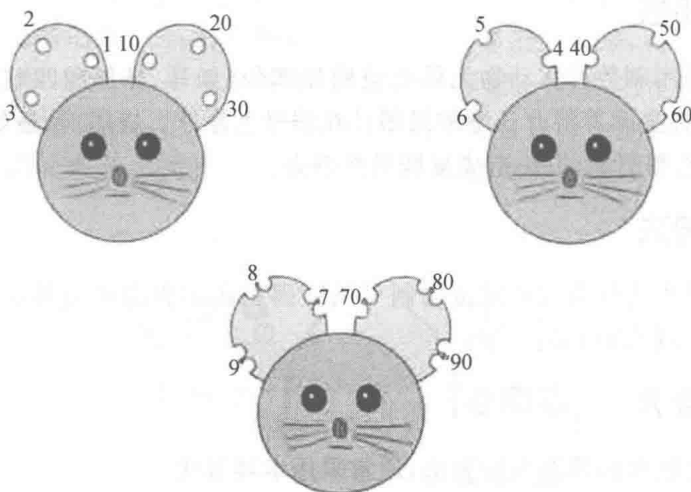


图 1-3 小鼠耳号编号系统示意图

【实验材料】

小鼠耳号打孔器、小鼠、乳胶手套、镊子。

【操作方法】

(1)将小鼠笼、打孔器和镊子在实验台上有序摆放。

(2)双手戴上乳胶手套,用镊子将小鼠从笼中取出,左手拇指和食指固定小鼠颈背部皮肤,将小拇指按压住小鼠尾部于手心。

(3)右手持小鼠耳号打孔器,在小鼠右侧耳缘按照图 1-3 所示的标识快速打孔,标记为 1~9;在小鼠右侧耳缘按照图 1-3 所示的标识快速打孔标记为十位数 10~90。

(4)将小鼠尾部松开,轻柔地将其放回鼠笼中。

【注意事项】

(1)左手固定小鼠时确保牢固,以防小鼠转头咬伤操作人员。

(2)打孔时需避开耳部血管位置,以防血管损伤或感染。

(3)在标记 7、8、9 和 70、80、90 时,切忌两个半圆形孔距离太近,以免长时间饲养后中部连接处掉落形成单个半圆孔,从而造成 4、5、6 和 40、50、60 混淆。

(4)打孔时,操作尽量迅速,以减少小鼠的痛苦与反抗。

【思考题】

1. 在给小鼠耳部打孔之前,是否需要采用 75%乙醇或碘酊消毒?为什么?

2. 如果小鼠耳部所打的圆孔边缘断裂或两个半圆孔中间连接部位脱落,该如何鉴别小鼠的编号?

第二节 常用实验动物的捉拿固定方法

正确地捉拿、固定动物,是整个实验工作的基础,从而可以保证实验的顺利进行。抓取固定动物的方法依实验内容和动物的种类而定。掌握正确捉拿、固定动物的目的就是防止实验者被动物咬伤抓伤,所以在抓取固定动物之前,首先要对实验动物的一般习性进行了解。在抓取固定实验动物时,要小心仔细,不能粗暴,这也是为了维持动物的正常生理活动,从而不影响实验观察结果。

一、动物的捉拿固定方法

一般在实验中,最常用的动物有小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、蟾蜍、蛙和犬。现分别就其捉拿与固定方法依次予以介绍。

(一)小鼠的抓取固定

小鼠较温顺,一般不会咬人。在抓取时先用右手抓取鼠尾提起,置于鼠笼上或实验台上,或者置于较粗糙的台面上,在其向前爬行时,右手向后拉尾(图 1-4),用左手拇指和食指抓住小鼠的两耳和颈部皮肤,将小鼠放在左手心中,把后肢拉直,

并用左手无名指按住鼠尾,小指按住后腿即可。

也可用手中固定方式: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 1-5)。这样,可进行灌胃,皮下、肌肉和腹腔注射等实验操作。取尾血及尾静脉注射时,可将小鼠固定在金属或木制的固定器上。

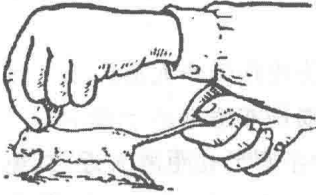


图 1-4 捉拿小鼠的方法(一)

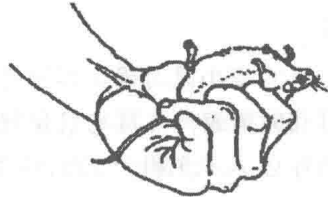


图 1-5 捉拿小鼠的方法(二)

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蜡板上。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 1-6)。

(二)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,可实验前戴上帆布手套抓取,避免咬伤。方法基本与捉拿小鼠相同,左手拇指和食指抓紧两耳和头颈部皮肤,余下三指捏紧背部皮肤(图 1-7),如果大鼠后肢挣扎厉害,可将鼠尾放在小指和无名指之间夹住,将整个鼠固定在左手中,右手进行灌胃,腹腔、肌肉及皮下注射等操作。也可伸开左手之虎口,敏捷地从后面一把抓住。若进行手术或解剖,则应事先将其麻醉或处死,然后用棉线活结缚四肢,用棉线固定门齿,背卧位固定在大鼠固定板上。需取尾血及尾静脉注射时,可将其固定在大鼠固定盒里,将鼠尾留在外面供实验操作。

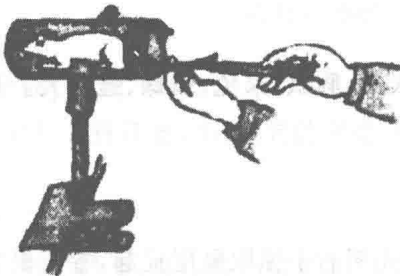


图 1-6 小鼠静脉注射

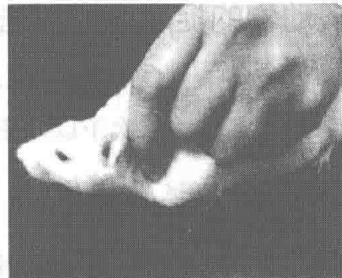


图 1-7 大鼠的抓取

(三)豚鼠的抓取固定

豚鼠胆小、易受惊吓,所以抓取时必须按照快、准、稳的原则。一般先用右手手掌迅速扣住鼠背,抓住其肩胛上方,以拇指和食指环握颈部(图 1-8)。对于体型较大或怀孕的豚鼠,可用另一只手托住臀部(图 1-9)。

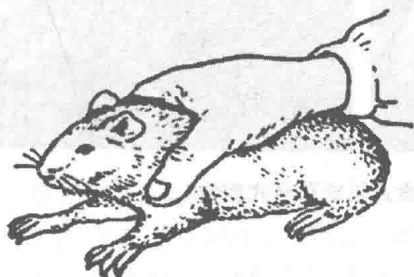


图 1-8 豚鼠的抓取与固定



图 1-9 捉拿豚鼠的方法

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,使鼠体伸直呈一条直线。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。

(四)兔的抓取固定

一般用右手把两耳轻轻地压于手心内,同时抓住兔颈部的被毛与皮肤,并轻轻提起,左手托住兔的臀部或腹部,让其躯干的大部分重量集中在左手上(图 1-10)。不能抓双耳或抓提腹部,这样可以避免对动物造成损伤。然后按实验要求对兔进行固定。



图 1-10 家兔的抓取方法

家兔的固定一般分为盒式和台式固定(图 1-11),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,固定方式分仰卧位和俯卧位,动物采用仰卧位固定时,四肢用粗棉线活结绑住固定,拉直四肢,将绳绑在兔台四周的固定棒上,家兔头用固定夹固定或用棉线钩住家兔门齿