



普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

病毒与免疫学实验教程

康友敏 张永亮 主 编 李大伟 封文海 王 宾 主 审

VIROLOGY AND
IMMUNOLOGY
EXPERIMENTATION



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

病毒与免疫学实验教程

康友敏 张永亮 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书由中国农业大学、北京大学、河南大学、四川农业大学和中国医学科学院的教师共同编写完成。本实验教程汇集了各位参编教师多年一线教学和科研积累的素材,并根据当前教学和科研的实际需要编写而成。病毒学部分重点介绍了病毒学实验技术的基本原理、方法、操作步骤及结果分析,内容包括病毒的培养、提纯,形态学观察及血清学、分子水平的检测方法,共17个实验;免疫学实验结合了编者多年的研究经验及当前免疫学最新进展,介绍了实验动物、免疫细胞培养、抗体制备、补体实验及淋巴细胞纯化及功能检测方法,共37个实验。

本书可供理、工、农、医学及师范类院校生物学专业本科生、研究生使用,也可作为病毒学与免疫学及相关领域研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

病毒与免疫学实验教程 / 康友敏, 张永亮主编. —北京: 科学出版社, 2014.6

微生物学实验教程系列 普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-041111-2

I. ①病… II. ①康… ②张… III. ①人体病毒学-实验-高等学校-教材 ②医学-免疫学-实验-高等学校-教材 IV. ①R373-33 ②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 129083 号

责任编辑: 刘 畅 / 责任校对: 桂伟利
责任印制: 阎 磊 / 封面设计: 迷底书装

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>

北京中新伟业印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年6月第 一 版 开本: 720 × 1000 B5

2014年6月第一次印刷 印张: 15 1/2

字数: 309 000

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

微生物学实验教程系列编委会

主 委	任 员	李季伦	中国农业大学
		李季伦	中国农业大学
		陈文新	中国农业大学
		邢来君	南开大学
		陈冠军	山东大学
		赵良启	山西大学
		顾桂芬	中国农业大学
		楼慧强	中国农业大学
		何 群	中国农业大学
		李 颖	中国农业大学
		李大伟	中国农业大学
		王贺祥	中国农业大学
		封文海	中国农业大学
		宋 渊	中国农业大学
		袁红莉	中国农业大学
		文 莹	中国农业大学

《病毒与免疫学实验教程》编委会名单

主 编 康友敏 张永亮
主 审 李大伟 封文海 王 宾
编写人员 （按姓氏汉语拼音排序）

杜小刚 四川农业大学
封文海 中国农业大学
胡艳欣 中国农业大学
康友敏 中国农业大学
李大伟 中国农业大学
孙晓麟 北京大学
王 宾 复旦大学
王军朋 河南大学
王 颖 中国农业大学
肖 冲 中国医学科学院
徐 进 中国农业大学
张永亮 中国农业大学
张宗英 中国农业大学
周 磊 中国农业大学
周 涛 中国农业大学

总 序

中国农业大学生物学院微生物学科创建于 1958 年, 由原北京农业大学植保系和土化系的微生物学教研组合并组建而成, 是我国高等院校第一个农业微生物学专业。1981 年被国务院学位委员会列为第一批博士点, 1993 年被评为农业部重点学科, 2001 年被评为国家级重点学科。

本学科特色是研究、挖掘和利用丰富的微生物资源, 为农业生产服务。研究方向包括根瘤菌资源调查和系统发育学、固氮酶的生化机制及遗传调控、真菌生理及遗传学、药用及食用真菌学、微生物发酵工程、土壤和环境微生物学, 并在此基础上, 加强了微生物分子遗传, 增加了病毒学、免疫学和生物质能源等研究方向。1985 年, 原在植保系的微生物专业参与了中国农业大学生物学院的组建, 建立了微生物系, 于 2003 年更名为“微生物及免疫学系”。目前本系开设的本科生课程包括: 微生物生物学, 原核生物进化与系统分类学, 真菌生物学, 微生物生理学, 微生物遗传学, 微生物发酵工程, 食用菌学, 资源与环境微生物学, 病毒学及免疫学, 每门课程均有理论课和实验课。

本系俞大绂教授等老一代学者及多位已经退休的老师在微生物学教学思想、课程设置及团队建设等方面, 为学科发展作出了巨大的贡献, 也为后人的工作奠定了良好的基础。在教学中突出的特色是理论课程与实验课程的紧密结合, 特别是对于本专业入门的实验课程, 积极推进将“死标本”的观察转变为学生自行分离和观察活体标本, 使学生们从被动地接受知识转变为主动地参与学习, 有利于促进学生们掌握实验技能, 并锻炼思考和分析能力。这种教学理念和模式一直沿用至今。目前本系担任教学工作的是一支中、青年教师结合的队伍, 他们责任心强、思想活跃、虚心进取, 不断进行教学改革, 积极探讨在新的形势下, 如何正确解决“基础与创新”、“理论与实践”、“教学与科研”的关系, 认真履行着教师的职责。

本套实验教程的基本资料均来自教师们多年的积累。本系历来坚持教学与科研并重的原则, 在多年的发展过程中, 逐步规划将教师的科研方向与所承担的课程内容紧密相关, 保证教学内容中基础知识与前沿知识相结合, 很多实验设计出自任课教师的科研积累。大家齐心协力, 勇于创新, 不断更新实验教学内容, 使各门实验课程的教学工作一直受到学生的好评。

本系承担的 9 门本科生微生物学实验课程一直没有编写正式出版的教材。最近, 在大家的努力和领导的支持下, 各位主编在近年完成实验课教学大纲修订的前提下,

汇集了来自其他兄弟院校教师们的智慧，终于完成 9 本实验教程的编写，这是大家共同努力的结果。

衷心感谢南开大学邢来君教授、山东大学陈冠军教授、山西大学赵良启教授欣然接受我们的邀请，不仅为本套教材的审稿付出辛勤劳动，同时作为本套实验教程编委会成员，为保证教材的质量献计献策。感谢中国农业大学生物学院领导的支持和“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助，感谢来自兄弟院校全体参编教师们的认真合作。感谢科学出版社为编辑和出版本套教材所付出的努力。希望这套实验教程的出版，为本学科和相关学科读者的学习和工作带来有益的参考，也希望广大读者提出批评和建议，以便我们今后作出修改。



2014 年 1 月

前 言

本书的编写参考了现代病毒学与免疫学研究的技术原理和方法，以病毒及免疫系统的体液和细胞免疫为主线，分别在病毒的形态观察、病毒培养及检测技术和免疫细胞分离纯化、免疫细胞功能及抗体检测等方面予以介绍。既强调了研究方法的科学性，又通过详细的操作步骤，体现了研究方法的实用性及可操作性，并结合研究经验对关键步骤作了重点提示，每个实验提供了可供读者参考的实验结果。本书还提供了目前病毒学及免疫学研究中常用的试剂配制方法，以供读者参考。

全书由康友敏和张永亮统筹整理，由李大伟教授（中国农业大学）、封文海教授（中国农业大学）和王宾教授（复旦大学）主审。本教程病毒学实验一至七由张永亮编写；实验八至十由周磊、徐进和张永亮编写；实验十一至十五由张宗英、周涛、王颖和张永亮编写；实验十六、实验十七由周涛和张永亮编写。病毒学实验部分由张永亮统稿。免疫学实验十八由肖冲、郭琦瑞和康友敏编写；实验二十、实验二十一由孙晓麟、郭琦瑞和康友敏编写；实验二十二至二十四由高文娟和康友敏编写；实验二十五、实验二十七、实验二十八及实验四十四由王军朋编写；实验三十、实验三十一由胡艳欣编写；实验三十二、实验三十三由杨倩、杜银平和封文海编写；实验三十七、实验三十八由孙晓麟编写；实验四十九由杜小刚编写；实验十九、实验二十六、实验二十九、实验三十四至三十六、实验三十九至四十二、实验四十五至四十八和实验五十至五十四由康友敏编写；试剂配制由高文娟和康友敏整理。免疫学实验部分由康友敏统稿。

本书的撰写得到中国农业大学生物学院“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助；感谢科学出版社给予的全力支持与帮助。在此也向为本实验指导编写提供材料的中国农业大学生物学院博士研究生曹修岭、郭雪坤、杜银平、杨倩、郭琦瑞和硕士研究生高文娟及本科生杨阳表示衷心感谢！

编者希望把病毒和免疫学科研和教学中常用的实验方法提供给从事相关研究的教师和学生参考使用，然而限于作者水平，仍然存在不足之处，还望广大读者提出批评和建议，以便本书再版时作出修订。

编 者

2014年4月

目 录

总序

前言

第一部分 病毒学实验

第一章 病毒的提纯及浓度测定	3
实验一 植物病毒的提纯	3
实验二 紫外分光光度法测定提纯病毒的浓度	11
实验三 动物病毒的提纯和感染单位测定	15
第二章 病毒的形态学观察	20
实验四 负染法观察提纯的病毒	23
实验五 免疫电镜法检测发病叶片中的病毒	24
实验六 超薄切片法观察组织中的病毒及细胞病理学变化	26
实验七 免疫胶体金检测细胞中病毒的分布	28
第三章 RNA 病毒侵染性 cDNA 克隆的构建	33
实验八 烟草花叶病毒侵染性 cDNA 克隆的构建	33
实验九 猪繁殖与呼吸综合征病毒感染性 cDNA 克隆的构建	42
实验十 单引物扩增技术获得病毒基因组全序列	49
第四章 病毒的分子生物学检测技术	57
实验十一 RT-PCR 检测植物叶片中的特定病毒	62
实验十二 病毒的斑点杂交检测	67
实验十三 病毒的 Northern blotting 检测技术	71
实验十四 病毒的实时荧光定量 PCR 检测	75
实验十五 反转录环介导的等温扩增技术检测病毒	86
第五章 病毒的血清学检测技术	94
实验十六 植物病毒抗血清效价的测定	96
实验十七 琼脂双扩散反应检测植物病毒	98

第二部分 免疫学实验

第六章 实验动物	103
实验动物简介	103

实验十八 实验动物采血方法	114
实验十九 实验动物免疫方法	116
实验二十 常用免疫学实验动物模型的建立	120
第七章 细胞培养技术	133
实验二十一 细胞的传代与细胞计数	136
实验二十二 细胞的冻存与复苏	139
实验二十三 树突细胞的诱导及培养	142
第八章 抗体制备及检测技术	144
实验二十四 兔抗血清制备	144
实验二十五 单克隆抗体的制备	146
实验二十六 抗体的纯化	153
实验二十七 血凝和血凝抑制实验	154
实验二十八 酶联免疫吸附实验	156
实验二十九 免疫电泳实验	159
实验三十 蛋白免疫印迹实验	162
实验三十一 免疫组织化学实验	164
实验三十二 细胞免疫荧光实验	167
第九章 补体实验	170
实验三十三 补体与补体单位的滴定实验	170
实验三十四 溶血素制备与补体参与的溶血反应	172
实验三十五 补体介导的细胞毒实验	175
第十章 淋巴细胞分离纯化	177
实验三十六 制备免疫细胞悬液	177
实验三十七 密度梯度离心法分离外周血液中的白细胞	181
实验三十八 脾脏不同免疫细胞磁珠分选实验	183
第十一章 免疫细胞荧光染色流式细胞仪检测	188
实验三十九 免疫细胞表面分子检测	188
实验四十 胞内细胞因子表达检测	192
实验四十一 Annexin V/PI 双荧光染色检测细胞凋亡	194
第十二章 免疫细胞功能实验	197
实验四十二 淋巴细胞转化实验	197
实验四十三 混合淋巴细胞反应	199
实验四十四 T 细胞增殖实验——MTT 法	201
实验四十五 T 细胞增殖实验—— ³ H-TdR 掺入法	204
实验四十六 T 细胞增殖实验——CFSE 染色法	206
实验四十七 体外 CTL 实验	208

实验四十八 体内 CTL 实验	211
实验四十九 酶联免疫斑点实验	214
实验五十 B 细胞增殖实验	216
实验五十一 B 细胞溶血空斑实验	218
实验五十二 NK 细胞杀伤活性实验——乳酸脱氢酶释放法	220
实验五十三 NK 细胞杀伤活性检测——MTT 比色法	222
实验五十四 NK 细胞杀伤活性实验—— ^{51}Cr 释放法	223
附录一 常用血液抗凝剂的配制及用法	226
附录二 常用消毒液的配制及用途	228
附录三 常用试剂和溶液的配制	229

第一章 病毒的提纯及浓度测定

实验一 植物病毒的提纯

一、实验目的

1. 学习植物病毒提纯的原理和方法。
2. 掌握不同形态植物病毒的提纯操作。

二、实验原理

为了研究病毒的结构、组分等形态学特征及复制、运动等生物学性质，首先要对病毒进行纯化并准确地测定其浓度。病毒的纯化和测定技术对人们研究病毒具有非常重要的意义，其发展完善使得病毒学作为一门现代学科得以长足发展。

病毒的纯化利用了病毒的多种性质。病毒粒子的主要成分为蛋白质，其结构通常比正常细胞的组分稳定，并且具有表面蛋白。因此，许多用于分离蛋白质和细胞器的技术也可用于病毒的分离。其中，应用最为广泛的 4 种技术是：①差速和密度梯度离心法；②病毒沉淀法；③杂质变性法；④细胞组分的酶消化法。此外有时也用到吸附法、电泳法、柱层析法及抗血清处理法等。

1. 差速和密度梯度离心法

高速（超速）离心机是病毒纯化中的必备仪器，常见的转头包括角转头和水平转头两种类型（图 1-1），当样品在上述两种不同类型的转头中离心时，沉淀形成的位置会有所不同（图 1-2）。

由于各种离心机转子的半径或者离心管至旋转轴中心的距离不同，所产生的离心力也不同，因此在文献中常用“相对离心力”或“数字 $\times g$ ”表示离心力。只要 RCF 值不变，一个样品可以在不同的离心机上获得相同的结果，RCF 就是实际离心场转化为重力加速度的倍数。

$$RCF = \frac{F_{\text{离心力}}}{F_{\text{重力}}} = \frac{m\omega^2 X}{mg} = \frac{\omega^2 X}{g} = \frac{(2\pi n / 60)^2 \cdot X}{980} = 1.118 \times 10^{-5} \cdot n^2 \cdot X$$

式中， X 为离心转子的半径距离（cm）； m 为样品的质量（g 或 kg）； g 为地球重力加速度（980cm/S²）； n 为转子每分钟的转数（r/min）。

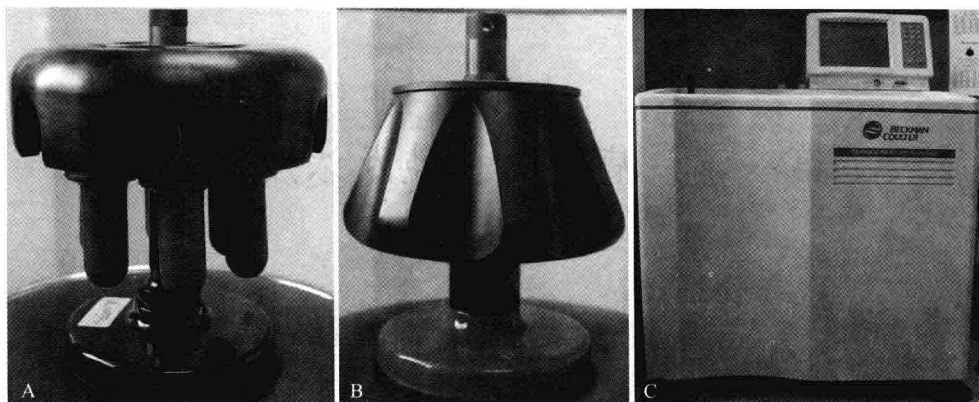


图 1-1 超速离心机水平转头和角转头示意图

A. Beckman SW28 型水平转头, 静止条件下, 离心管自然垂直放置, 离心时, 离心管呈水平状态; B. Beckman Type70 角转头, 无论离心还是静止时, 离心管均呈现一定的倾斜角度; C. Beckman 超速离心机 (Optima L-100 XP)

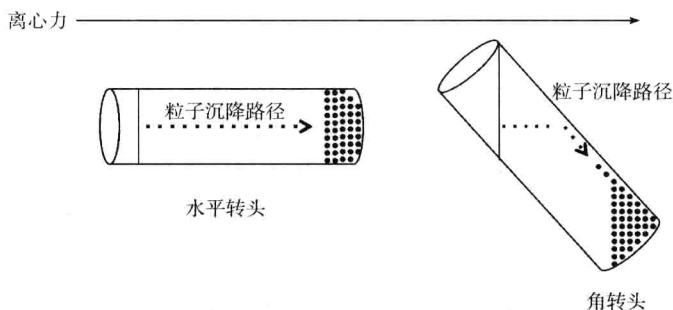


图 1-2 水平转头和角转头的离心力方向及离心后沉淀所在位置示意图

水平转头离心后形成的沉淀呈平面状, 角转头离心后形成的沉淀呈现出一定的弧度

差速离心法是基于不同大小和密度的粒子在沉降速度上存在差别, 从而分离不同蛋白质组分的方法, 通常是将被分离的样品交替进行低速离心与高速 (或超高速) 离心 (图 1-3)。对于沉降速度差别在一个或几个数量级的粒子, 可用本法提取。差速离心常用于病毒样品的浓缩和粗提, 虽然分辨率不高, 但能够快速处理大量样品。对于沉降系数在同一个数量级内的各种粒子 (与病毒大小相近的细胞亚单位及细胞碎片), 差速离心的方法并不适用。

速率区带离心法是根据被分离物质在强大离心力中沉降速度不同而进行分离的方法。该法使用的介质密度应该小于被分离物质的密度 ($\rho_m < \rho_p$)。介质可以为均一密度, 也可以为梯度密度。当被分离的物质沉降到与介质密度相等的区域时就不再沉降。不同分子形成不同的区带, 成为速率区带。常用的介质有蔗糖、甘油、聚蔗糖等。在差速区带离心中, 颗粒物质根据各自大小和密度得以分离, 通常病毒越大

沿密度梯度沉降得越快（图 1-4）。

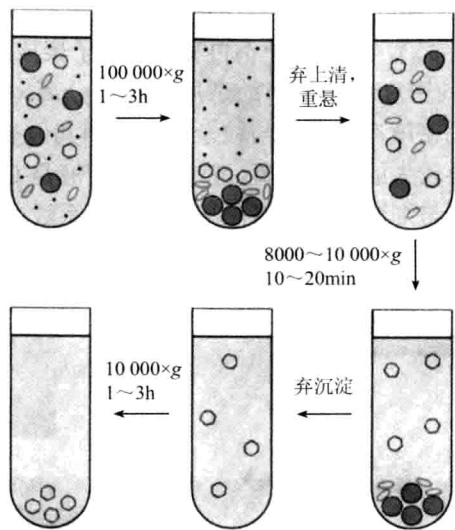


图 1-3 利用差速离心法分离病毒的一般流程（Prescott *et al.*, 2002）

起初在离心管中含有细胞破碎后的匀浆混合物，其中包括病毒粒子（棱形）。通过离心将较大的细胞颗粒和病毒沉淀下来，将可溶性上清弃掉后重悬沉淀，低速离心使其恰好除去比病毒重的物质，然后高速离心，使病毒沉淀。重复以上步骤可进一步纯化病毒颗粒

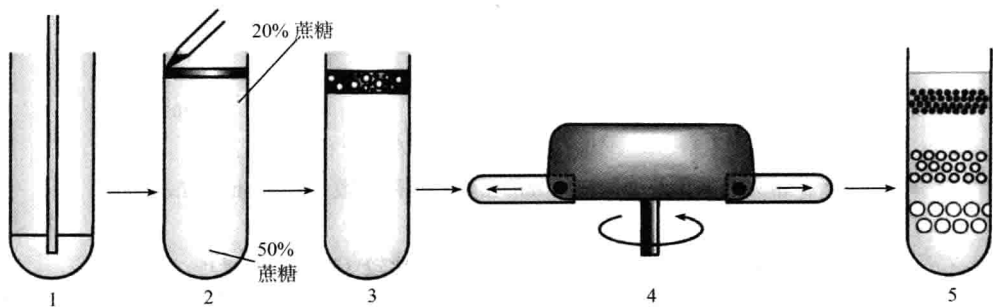


图 1-4 梯度离心示意图（Prescott *et al.*, 2002）

首先制备蔗糖（sucrose）线性梯度，然后将差速离心后的样品铺于梯度介质之上，通过离心，各组分由于其沉降系数和密度的不同而被分离。在速率区带离心中，各组分的分离基于其沉降系数的不同，由于速率区带中离心管底部的介质密度要小于待分离颗粒的密度，因此，离心时间相对较短，以避免所有的颗粒组分沉降到离心管底部。但在等密度梯度离心中，离心管底部介质的密度要大于所有待分离的组分，因此，离心时间通常较长，以使各组分到达与其密度相等的位置

等密度离心法是在离心前预先配制介质的密度梯度，待分离的样品铺在梯度液顶上或与梯度液预先混合。离心开始后，当梯度液由于离心力的作用逐渐形成管底

浓而管顶稀的线性梯度，原来分布均匀的粒子也发生重新分布。将经差速离心纯化的病毒标本平铺于梯度上离心，在离心力的作用下颗粒物质分别沉降到与它们各自密度相等的位置（即 $\rho_p=\rho_m$ ），此时粒子不再移动，粒子聚成纯组分的区带（图 1-4）。这样就可以将病毒从与其密度相差很小的杂质颗粒中分离出来。等密度梯度离心所形成的区带与样品粒子的密度有关，而与粒子的大小和其他参数无关。此法一般应用于大小相近，而密度差异较大的物质分离。常用的梯度液是 CsCl。从图 1-5 中可以看出不同的病毒之间及病毒与细胞组分之间在密度和沉降系数（sedimentation coefficient）上均有不同。因此，这两种类型的梯度离心对病毒的纯化都是非常有效的方法（表 1-1）。

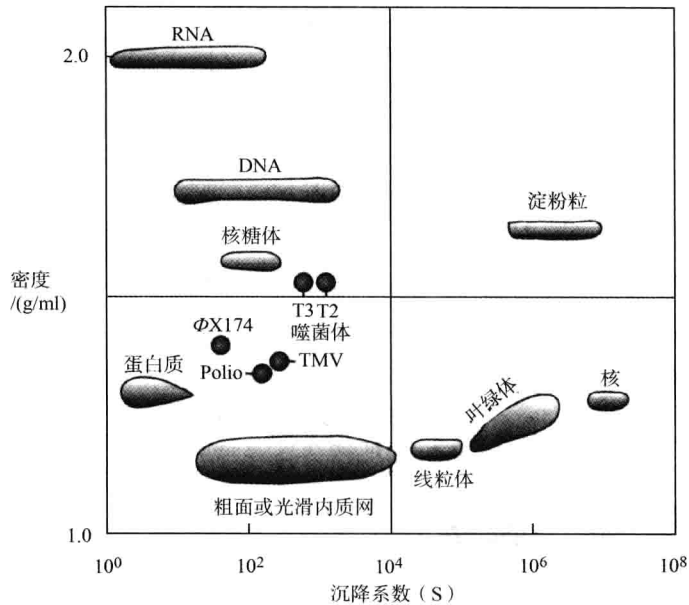


图 1-5 一些常见的病毒及细胞内组分的密度和沉降系数 (Prescott *et al.*, 2002)

表 1-1 速率区带离心和等密度梯度离心法比较 (殷震和刘景华, 1997)

	速率区带离心	等密度梯度离心
原理	沉降与颗粒质量成正比，以物质沉降速度的不同进行分离	沉降与颗粒的密度成正比，以物质的浮密度不同进行分离
介质	密度小，如蔗糖、甘油、聚蔗糖，蔗糖浓度 10%~67%，密度 1~1.3286g/ml 预制梯度，不连续	密度大，如 CsCl 和 Cs ₂ SO ₄ ，浓度 0~1.355g/ml，密度为 1~1.9025g/ml，自成连续梯度
离心力场	强，离心速度高，使被分离物质易沉降	稍强，速度相对低，使 CsCl 形成梯度，建立沉降扩散平衡
离心过程	样品向离心管底沉降	不论样品起始时在什么位置，离心时样品停留于介质的等密度部位
离心时间	较短，一般为几小时到几十小时	较长，十几小时到数天

在进行梯度溶液的制备时，选择合适的介质很重要。一种理想的梯度材料应具

备以下几点：与被分离的生物材料不发生反应，即完全惰性；易与所分离的生物粒子分开；可达到要求的密度范围，且在所要求的密度范围内；黏度低，渗透压低，离子强度和 pH 变化较小；不会对离心设备发生腐蚀作用；容易纯化，价格便宜或容易回收；浓度便于测定，如具有折光率；对于超速离心分析工作来说，它的物理性质、热力学性质应该是已知的（表 1-2）。这些条件是理想条件，完全符合各个性能的梯度材料几乎是没有的。常用的介质及其密度如下。

蔗糖：水溶性大，性质稳定，渗透压较高，其最高密度可达 1.33g/ml，且由于价格低，容易制备，是现在实验室里细胞器、病毒、RNA 分离的常用梯度材料。但由于有较大的渗透压，不宜用于细胞的分离。

聚蔗糖：商品名 Ficoll，常采用 Ficoll-400 也就是相对分子质量为 400 000。Ficoll 渗透压低，但它的黏度却特别高，为此常与泛影葡胺混合使用，以降低黏度。主要用于分离各种细胞，包括血细胞、成纤维细胞、肿瘤细胞、鼠肝细胞等。

氯化铯：是一种离子性介质、水溶性大，最高密度可达 1.91g/ml。由于它是重金属盐类，在离心时形成的梯度有较好的分辨率，被广泛地用于 DNA、质粒、病毒和脂蛋白的分离，但价格较贵。

卤化盐类：KBr 和 NaCl 可用于脂蛋白分离，KI 和 NaI 可用于 RNA 分离，其分辨率高于铯盐。NaCl 梯度也可用于分离脂蛋白，NaI 梯度可分离天然或变性的 DNA。

Percoll：此为商品名，它是一种 SiO₂ 胶体外面包了一层聚乙烯吡咯酮（PVP）。渗透压低，黏度高，对生物材料的影响小。在冷却和冻融情况下稳定，在酸性和高离子强度下不稳定。它可用于细胞、细胞器和病毒的分离。大多数病毒的浮密度在 1.1~1.4g/ml，其制备悬浮介质的密度为 1.0~1.7g/ml，可满足大多数病毒密度梯度离心的要求。

表 1-2 平衡梯度离心时介质的密度与质量百分比的关系（殷震和刘景华，1997）

介质质量的百分比/% 介质密度/(g/ml)	10	20	30	40	50	60
LiCl	1.054	1.113	1.178	1.250	—	—
LiBr	1.073	1.160	1.261	1.381	1.529	1.716
KBr	1.072	1.158	1.257	1.371	—	—
NaBr	1.078	1.172	1.281	1.410	—	—
RbBr	1.079	1.174	1.285	1.419	1.582	—
CsCl	1.079	1.174	1.286	1.420	1.582	1.785
CsBr	1.081	1.180	1.297	1.440	1.616	—
Cs ₂ SO ₄	1.086	1.190	—	—	—	—
乙酸钾	1.048	1.100	1.155	1.213	1.242	1.333
柠檬酸钾	1.066	1.140	1.221	—	—	—
酒石酸钾	1.066	1.139	1.218	1.305	1.400	—
甘油	1.021	1.045	1.071	1.097	1.124	1.151
蔗糖	1.038	1.081	1.127	1.176	1.230	1.289

注：“—”代表无实验数据。