

高等院校双语实验技术指导

章晓联 主编

by Zhang Xiaolian

免疫学

双语实验技术指导

Current Protocols in Immunology
A Laboratory technology in both
English and Chinese



科学出版社

www.sciencep.com

高等院校双语实验技术指导

免疫学双语实验技术指导

Current Protocols in Immunology
A Laboratory Technology in both
English and Chinese

章晓联 主 编

by Zhang Xiaolian

科 学 出 版 社

北 京

内 容 提 要

本书针对新形势下免疫学教学改革,为了适应目前中国加入 WTO 之后与国际接轨,高等院校普及双语教学的需要而编写。本教材为免疫学实验技术教材,共设实验 35 项。本书既介绍了免疫学中的一些经典、传统的实验内容,又增添了目前能开展的较先进的实验技术。

本书可供高等医学院校临床医学(五年制、七年制)、口腔医学、预防医学、法医学、护理学(五年制)学生使用;也适用于非医学专业高等院校免疫学专业研究生使用。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学双语实验技术指导 Current Protocols in Immunology

A Laboratory Technology in both English and Chinese/章晓联

主编. —北京:科学出版社,2003

高等院校双语实验技术指导

ISBN 7-03-012303-4

I. 免... II. 章... III. 医药学:免疫学-实验-医学院校-

教学参考资料 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 088761 号

责任编辑:潘志坚 / 责任校对:连秉亮

责任印制:刘 学 / 封面设计:一 明

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>

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004 年 1 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2004 年 1 月第一次印刷 印张:14 1/4

印数:1—5 000 字数:277 000

定价:25.00 元

《免疫学双语实验技术指导》编辑委员会

主 编 章晓联

主 审 刘君炎

副主编 田野平 吴雄文 刘 春 何金生

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 磊(三峡大学医学院)

尹丙姣(华中科技大学同济医学院)

田野平(第二军医大学)

刘 春(武汉大学医学院)

刘胜武(武汉大学医学院)

李 群(安徽医科大学)

吴雄文(华中科技大学同济医学院)

何金生(安徽医科大学)

张秋萍(武汉大学医学院)

章晓联(武汉大学医学院)

序

《免疫学双语实验技术指导》一书,是一本供高等医学院校大学生、研究生以及教师使用和参考的免疫学双语实验技术指导教材。为了适应中国加入 WTO 之后与国际接轨以及高等院校普及双语教学的需要,主编在总结多年的实验教学的基础上,组织多名既出国留学过,具有很好的英语基础和英语能力,又同时具备在一线教学中具有丰富的医学免疫学教学经验的教授们,编写了这本免疫学双语实验技术指导。本书与国内外已出版的同类书籍比较,它的特点及独到之处是所有内容既有英文,又有中文,且英中文对照,完全满足双语教学的需要,是一本高等医学院校学生及教师很好和急需的教材和参考书,也是国内外第一本医学免疫学双语(中文、英文)实验技术教学指导书籍。同时,本书也可作为非医学专业免疫学系的学生和教师使用及参考。

本书共设实验 35 项,每项实验条理清楚、简明实用、结构完整,每项实验技术既有原理、材料及方法的介绍,又有结果分析、注意事项和思考题,并且配备大量图片,使得内容清晰易懂。按照教学大纲的要求,既介绍了医学免疫学、免疫学中的一些经典、传统的实验内容(如凝集反应,沉淀反应,补体结合试验等),又增添了目前能开展的较先进的实验技术(如免疫印迹、HLA 基因配型分型技术、细胞因子活性的检测、流式细胞仪的多种检测方法应用等)。书后附常用试剂的配方等便于查阅。

本书的编者在繁忙的工作之余,花了一年的精力,编写了这本双语教材。我相信,本书的出版将对免疫学双语教学的发展起积极的推动作用。

沈培春 院士

二零零三年五月

目 录

第一篇 体外抗原抗体反应.....	1
1.1 传统的抗原抗体反应	5
1.1.1 凝集反应	5
实验一 直接凝集反应——玻片凝集试验.....	5
实验二 直接凝集反应——试管凝集试验	10
实验三 间接凝集反应——测定类风湿因子的乳胶凝集试验	14
1.1.2 沉淀反应.....	17
实验四 环状沉淀试验	17
实验五 单向琼脂扩散试验	22
实验六 双向琼脂扩散试验	28
实验七 对流免疫电泳试验	32
实验八 火箭电泳试验	36
实验九 免疫电泳试验	39
1.1.3 补体参与的抗原抗体反应.....	44
实验十 血清总补体溶血活性(CH_{50})测定	44
实验十一 溶血空斑试验	49
1.1.4 抗体的制备.....	55
实验十二 多克隆抗体的制备	55
实验十三 单克隆抗体的制备	63
1.2 免疫标记技术	72
实验十四 酶联免疫吸附试验(ELISA)	72
实验十五 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹技术	79
实验十六 间接免疫荧光法	84

第二篇 检测免疫细胞功能的实验	87
2.1 免疫细胞的分离与纯化	91
实验十七 外周血单个核细胞分离	91
实验十八 树突状细胞的制备	96
2.2 细胞免疫功能的检测	101
实验十九 吞噬细胞吞噬功能的检测	101
实验二十 硝基蓝四氮唑(NBT)还原试验	105
实验二十一 小鼠脾脏 NK 细胞活性测定	110
实验二十二 E-花环形成试验	115
实验二十三 淋巴细胞转化试验	119
实验二十四 APAAP 桥联酶标法测定 T 细胞亚群	124
实验二十五 单向混合淋巴细胞反应	129
实验二十六 细胞毒性 T 淋巴细胞活性测定	135
第三篇 细胞因子的检测	137
实验二十七 白细胞介素-1 活性的检测	142
实验二十八 肿瘤坏死因子的生物学活性检测	148
第四篇 实验动物免疫细胞功能的检测	151
实验二十九 豚鼠的过敏性休克反应实验	157
第五篇 免疫学新技术	161
5.1 HLA 分型技术	167
实验三十 PCR-SSP HLA 分型技术——检测 HLA-B27 基因	167
5.2 细胞凋亡的检测技术和流式细胞术	174
实验三十一 细胞凋亡的 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析	174
实验三十二 流式细胞术亚二倍体 DNA 峰检测细胞凋亡法	180
实验三十三 流式细胞术 Hoechst 33342/PI 双染色检测细胞凋亡	184

实验三十四	Annexin V-FITC 试剂盒检测 Jurkat 细胞早期凋亡	189
实验三十五	流式细胞术检测 CD4 ⁺ T 细胞上 CXCR4 的表达	195
附录	常用试剂和培养液	206

Contents

Part One	Antigen and Antibody Reaction <i>in vitro</i>	1
1.1	Classical Antigen and Antibody Reaction	3
1.1.1	Agglutination Reaction	3
Exp. 1	Direct Agglutination Reaction — Slide Agglutination Test	3
Exp. 2	Direct Agglutination Reaction — Tube Agglutination Test	7
Exp. 3	Indirect Agglutination Reaction — Latex Agglutination Test for Detection of RF	12
1.1.2	Precipitation Reaction	15
Exp. 4	Ring Precipitation Test	15
Exp. 5	Single Radial Immunodiffusion (SRID) Test	18
Exp. 6	Double Immunodiffusion Test	25
Exp. 7	Countercurrent Electrophoresis Test	30
Exp. 8	Rocket Electrophoresis Test	34
Exp. 9	Immunoelectrophoresis Test	37
1.1.3	Antigen and Antibody Reaction Involved by Complement	41
Exp. 10	Total Hemolytic Complement (CH_{50}) Assay	41
Exp. 11	Hemolytic Plaque Assay	46
1.1.4	Preparation of Antibody	52
Exp. 12	Preparation of Polyclonal Antibody	52
Exp. 13	Preparation of Monoclonal Antibody	57
1.2	Immunolabeling Technique	68
Exp. 14	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	68
Exp. 15	SDS-PAGE and Western Blot	75
Exp. 16	Indirect Immunofluorescence Assay	82

Part Two Cellular Immune Function Assay	87
2.1 Separation and Purification of Immune Cells	89
Exp. 17 Separation of Mononuclear Cells from Whole Peripheral Blood	89
Exp. 18 Generation and Isolation of Dendritic Cells	93
2.2 Assays of Cellular Immune Functions	98
Exp. 19 Measurement of Phagocytosis by Phagocytes	98
Exp. 20 Nitro Blue Tetrazolium Test	103
Exp. 21 Measurement of Mouse Spleen NK Cells Activity	107
Exp. 22 Erythrocyte Rosette forming Cell Test, ERFC	113
Exp. 23 Lymphocyte Transformation Test	117
Exp. 24 Detection of T Lymphocyte Subgroup with the APAAP	121
Exp. 25 One-way Mixed Lymphocyte Reaction	126
Exp. 26 Measurement of CTL Activity	132
Part Three Assays of Cytokine	137
Exp. 27 Bioassay for Interleukin-1 (IL-1) Activity	139
Exp. 28 Measurement of Tumor Necrosis Factor (TNF) Biological Activity	145
Part Four Immune Assays of Experimental Animal	151
Exp. 29 Hypersensitivity of Immediate Type in Guinea Pig Systemic Anaphylaxis	153
Part Five New Techniques in Immunology	161
5.1 HLA Typing Techniques	163
Exp. 30 HLA Typing for B27 with PCR-SSP	163
5.2 Methods of Analyzing Apoptotic Cells and Cytometry	170
Exp. 31 DNA Agarose Gel Electrophoresis Method of Analyzing Apoptotic Cells	170

Exp. 32	Subdiploid DNA Peak Assay of Analyzing Apoptotic Cells by FCM	177
Exp. 33	Hoechst 33342/PI Double Staining DNA Assay of Analyzing Apoptotic Cells by FCM	182
Exp. 34	Detection of Early-Stage Apoptosis in Jurkat Cells Using Annexin V-FITC Kit	186
Exp. 35	Flow Cytometry Analysis for Expression of CXCR4 on CD4 ⁺ T Cells	192
Appendices Commonly Used Reagents and Media		198

Part One Antigen and Antibody
Reaction *in vitro*

第一篇 体外抗原抗体反应

1.1 Classical Antigen and Antibody Reaction

1.1.1 Agglutination Reaction

Exp. 1 Direct Agglutination Reaction— Slide Agglutination Test

【Principle】

Agglutination (凝集反应) is the interaction of insoluble particles (e. g. intact bacteria and cells) and specific antibodies to these antigens, that results in some visible agglutinates after certain time and under certain concentration of electrolyte (Fig. 1-1).

Slide agglutination test(玻片凝集试验)is the direct agglutination carried out on the slides. Directly mixed an antibody with a particle antigen under the certain concentration of electrolyte. The result is positive when there is visible agglutinate, otherwise it is negative.

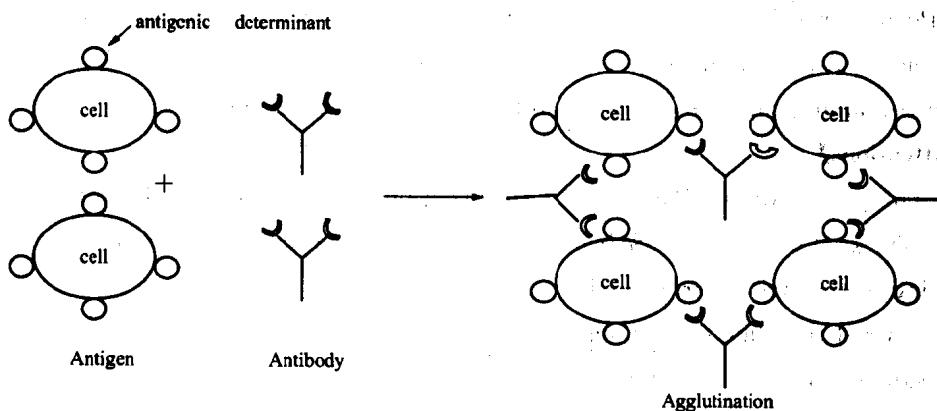


Fig. 1-1 Agglutination reaction

【Application】

Slide agglutination is a qualitative test. It may be used mostly to determine blood type (ABO types) or if antibody to bacteria is present in blood as indication of infection with these bacteria. This experiment is to determine the antibody to *Salmonella* present in the diagnostic serum.

【Materials】

1. Antibody: diagnostic serum, 1 : 10 diluted
2. 18~24 h agar bacteria cultures; *Salmonella* bacteria (antigen 1); *Escherichia*

coli bacteria (antigen 2)

3. Saline (0.9% NaCl); slide; applicator ring (stick), etc

【Procedures】

1. Label the clean slide as “1” and “2”.
2. Add two rings of saline on the slide “1” and “2” individually with applicator ring.
3. Add one ring of *Salmonella* bacteria into the saline on the slide “1”, mix well; Add one ring of *Escherichia coli* bacteria into the saline on the slide “2”, mix well.
4. Add one ring of the diagnostic serum on the slide “1” and “2” individually and mix well.
5. Observe the results in 1 ~ 2 min.

【Results】

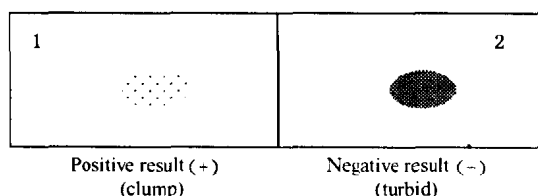


Fig. 1-2 Slide agglutination

Positive result appears agglutination of white particle; Negative result keeps turbid, showing as in Fig. 1-2. Record the results and discard the slides into the can containing saponated cresol solution after the experiments.

【Attentions】

1. The applicator ring needs to be sterilized on the fire before and after you get each kind of bacteria. *Salmonella* bacteria are pathogenic. Keep the processing in the strict sterile condition.
2. Discard the slide containing alive bacteria into the can containing 5% ~ 10% saponated cresol solution.
3. Only small amount of bacteria are needed for the slide agglutination; Mix the antigen-antibody mixture well, otherwise it will affect the results.
4. Much smaller amount of antibody suffice to produce agglutination than that needed for precipitation.

【Questions】

1. What is the characteristic of the interaction between antigen and antibody? And what are the factors affecting the combination of antigen and antibody?
2. Why do you discard the slides into the can containing saponated cresol solution after the experiments?

(Zhang Xiaolian)

1.1 传统的抗原抗体反应

1.1.1 凝集反应

实验一 直接凝集反应——玻片凝集试验

【原理】

凝集反应是颗粒性抗原(如完整的细菌、细胞)与相应抗体,在适当浓度的电解质存在下,经过一定时间,出现肉眼可见的凝集(见图 1-1)。

玻片凝集试验是在玻片上进行的直接凝集反应。玻片凝集试验是将抗体直接与颗粒性抗原物质(如细菌、红细胞等)混合,在有适当电解质存在的条件下,如两者对应便发生特异性结合而形成肉眼可见的凝集物,即为阳性;如两者不对应便无凝集物出现,即为阴性。

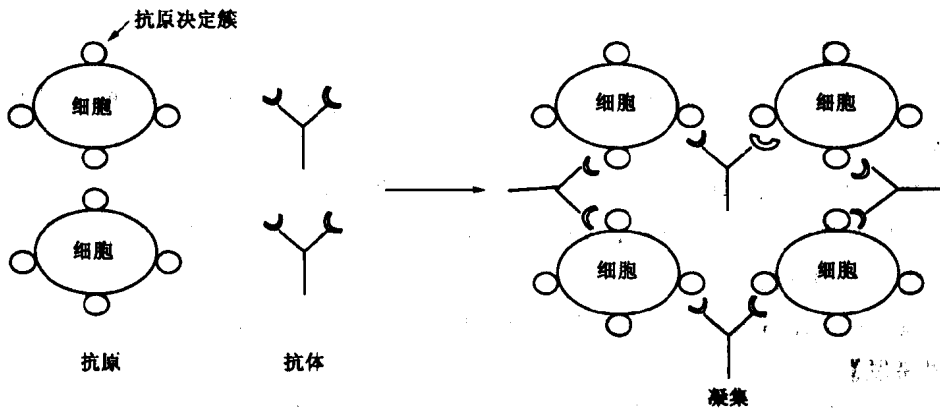


图 1-1 凝集反应

【应用】

玻片凝集试验属定性试验,主要用于细菌的鉴定、分型和人 ABO 血型的鉴定等。本实验是通过鉴定细菌的玻片凝集试验,来鉴定伤寒杆菌免疫动物后的血清。

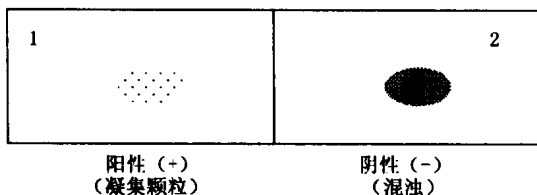
【材料】

1. 抗体:1:10 稀释的诊断血清
2. 18~24 h 琼脂细菌培养物:伤寒杆菌(抗原 1)、大肠埃希菌(抗原 2)
3. 生理盐水(0.9% NaCl)、玻片、接种环(针)等

【方法】

1. 取一洁净玻片,用笔划分二格,并标明为“1”、“2”。
2. 用接种环无菌手续取生理盐水,置玻片上,每格两环。

3. 用接种环无菌手续刮取伤寒杆菌少许,置“1”格内的生理盐水中,研磨均匀。同法取大肠埃希菌置“2”格的生理盐水中。
4. 用接种环无菌取诊断血清,于“1”、“2”格中各置一环,并同菌混匀。轻轻摇晃玻片。
5. 1~2 min 后观察凝集现象。

【结果】**图 1-2 玻片凝集**

出现凝集颗粒,其周围混合悬液由混浊变为澄清透明者为阳性;如仍呈均匀混浊状者则为阴性(见图 1-2)。记录结果,最后将所用玻片放入置有甲酚皂消毒液的玻片缸中。

【注意事项】

1. 接种环取每一种细菌前和后需要在火上烧一次。伤寒杆菌为致病菌,要严格无菌操作。
2. 将含有活菌玻片放置含有 5%~10% 甲酚皂溶液的消毒缸中。
3. 刮取细菌时,量不可过多;细菌在生理盐水中,应充分研磨均匀。否则,影响凝集现象的观察。
4. 凝集反应出现凝集所需抗体量比沉淀反应所需抗体量少得多。

【思考题】

1. 抗原抗体反应的特点及影响因素? 什么因素影响抗原抗体的结合?
2. 为什么玻片凝集试验后的玻片必须放入甲酚皂消毒液中?

(章晓联)