

高等医药院校基础医学实验教学规划教材

医学免疫学实验

主 编 彭吉林 郭 阳



科学出版社

《高等医药院校基础医学实验教学规划教材》

编写指导委员会

主 任	涂汉军				
副 主 任	魏文芳	严世荣			
委 员	(按姓氏笔画排序)				
	王汉琴	朱名安	刘 涛	严世荣	李国华
	张 鹏	赵万红	郭 阳	涂汉军	魏文芳
丛 书 主 编	朱名安	赵万红			
丛书副主编	王汉琴	郭 阳	张 鹏		
编 委	(按姓氏笔画排序)				
	王汉琴	石 蕾	朱名安	刘长俊	李文春
	杨 虹	杨树国	张 鹏	国宏莉	尚 静
	金志雄	赵万红	姚柏春	郭 阳	郭怀兰
	唐 微	黄 琪	曾凡龙	鄢红春	

总序

随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展和高校教学模式的改革,现代高等医学教育更加强调培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。这就要求从根本上改变实验教学依附于理论教学的传统观念,要从人才培养体系的整体出发,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系,使实验教学与理论教学既有机结合又相对独立。同时,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,改革传统的以教研室为单位的教学实验室模式,整合完善现代医学实验室功能和管理,从而提高医学实验教学质量。

本系列实验教材由湖北医药学院组织编写,共9种,包括《医学大体形态学实验(人体解剖学分册)》《医学大体形态学实验(系统解剖学与局部解剖学分册)》《医学显微形态学实验》《病原生物学实验》《医学免疫学实验》《医学生物化学与分子生物学实验》《医学细胞生物学与医学遗传学实验》《预防医学实验》和《医用化学实验》。系统介绍了系统解剖学、局部解剖学、组织胚胎学、病理学、医学免疫学、病原生物学、生物化学与分子生物学、医学细胞生物学和医学遗传学、预防医学和医用化学的实验研究所必需的知识与技术。编写理念是将实验教学按照建设国家实验教学示范中心要求的实验教学模式,借鉴国内外同类实验教材的编写方法,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。内容上将基础医学实验教学按照基础医学实验体系进行重组和有机融合,按照实验教学逻辑和规律,将实验内容按模块层次进行编写,基本上包括:①实验操作及常用仪器使用;②基本实验或经典验证性实验;③综合性实验;④研究创新性实验等。不同层次学生可按照本专业培养特点和要求,对不同板块的必选实验项目和自选实验项目进行适当取舍。

其基本理念和设计思路具有以下特点:

1. 明确目标,准确定位 本系列实验教材编写过程中增加了临床应用多、意义较大的实验内容,适当选编新的内容,力求突出基础医学知识在医学相关专业临床工作中的应用。

2. 突出能力,结合专业 以“自主学习能力、临床执业能力”培养为根本,将各学科的相关知识与临床实践应用“链接”为一体,增强学生学习兴趣,突出应用能力培养,提高学生自主学习能力和学习效果。教材重视生命科学研究中如何发挥学生观察、分析与思辨能力的培养,主要任务是使大学生通过动手,得到实验技术的基本操作技能训练、科学思维和创新能力的培养,同时也要使他们初步了解或掌握先进技术和方法,与迅速发展的学科前沿接轨。

3. 增减内容,突出重点 本系列实验教材在编写过程中,坚持基本理论和基本知识以“必须、实用、够用”的原则。实验内容去旧增新,删繁就简。将原来一些经典实验与现代科学思维相结合,适当压缩,并进行内容和教学方法的改革。对原书的插图进行了精选。对所开设的每一个实验要求达到的培养目标作了清晰而明确的阐述。

4. 整体优化,彰显特色 教材在整体结构上,既考虑到教与学的传统习惯,力求整体上系统化,又考虑到教材内容的创新,体现教材的思想性和先进性;在教材内容的编写

上突出专业特色,体现专业特点,强化知识应用,部分教材增加实验流程图以及实验要点和实验结果图的应用,使规划教材具有更广泛的适应性;在结构及内容编排上条理清楚,层次分明,充分体现规范化特点。为扩大学生的知识面,启发其思维,根据每个部分的内容在临床工作中的应用情况,精选相关内容与临床密切相关的学科知识和有应用前景的新进展和新技术,将各相关学科有机结合在一起,具有基础扎实、应用性强、科研创新性突出的优势。

本规划教材的使用对象以本科临床医学专业为主,兼顾预防、麻醉、口腔、影像、药学、检验、护理、康复、生物科学与生物技术、公共事业管理、信息管理与信息系统等专业需求,涵盖全部医学生的基础医学实验教学。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,本规划教材可能存在偏颇之处,也会有不足和疏漏,敬请广大医学教育专家和同学提出宝贵意见,以便修订再版。

湖北医药学院

《高等医药院校基础医学实验教学规划教材》编委会

2014年7月

前 言

免疫学是一门向多学科（尤其生命科学、医学）渗透、迅猛发展的学科，它的发展促进了免疫学实验技术的不断更新和丰富，从而推动了生物科学等学科的发展。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。湖北医药学院为本科生开设免疫学和免疫学实验课程已多年，在学校加强实验教学的要求下，我们组织编写了这部适应我校特色的免疫学实验教材。为提高实验教学质量，提升学生实践和创新能力，本实验教材力求让学生较好地掌握免疫学实验技术和方法，了解本学科一些新的实验研究方法。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，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综合实验和创新性实验（如免疫印迹、Th 细胞亚群检测、中和抗体检测等）。

湖北医药学院教务处、基础医学院的各级领导、老师、同事对本书的编写和出版给予了极大支持，在此表示衷心感谢！

由于免疫学实验方法的不断更新和丰富，编者学识有限，书中不足之处在所难免，真诚希望同行和读者能够批评指正，以便改进。

湖北医药学院

编 者

2014年5月

目 录

第一章 动物实验的基本操作	1
第一节 实验动物的抓取固定	1
第二节 动物实验注射给药法	3
第三节 动物实验的采血方法	5
第四节 实验动物的处死方法	7
第二章 免疫学常用实验仪器	9
第一节 酶标仪	9
第二节 流式细胞仪	10
第三节 酶联斑点分析仪(ELISPOT 分析仪)	11
第四节 低温水平离心机	12
第五节 电泳仪	14

基 本 实 验

第三章 非特异性免疫实验	16
第一节 溶菌酶的溶菌作用	16
第二节 补体参与的实验	17
第三节 吞噬细胞的吞噬作用及吞噬杀菌功能测定	21
第四节 NK 细胞功能测定	25
第四章 免疫细胞的分离及功能检测	29
第一节 免疫细胞的分离	29
第二节 细胞免疫功能的检测	42
第三节 体液免疫功能的评价	49
第五章 经典抗原抗体反应	52
第一节 凝集反应	52
第二节 沉淀反应	59
第六章 免疫标记技术	69
第一节 免疫酶技术	69
第二节 免疫荧光技术	74
第三节 放射免疫测定技术	77
第四节 免疫胶体金技术	78
第七章 细胞因子的检测	82
第一节 细胞因子检测方法概述	82
第二节 常见细胞因子的检测	82
第八章 细胞凋亡的检测	89
第一节 细胞凋亡的形态学研究方法	89

第二节 细胞凋亡的生物化学研究方法	93
第三节 流式细胞术检测细胞凋亡的常用方法	98

综合性实验

第九章 抗体制备技术	104
第十章 免疫印迹	111
第十一章 免疫共沉淀	115
第十二章 免疫 PCR 技术	117
第十三章 HLA 分型技术	120
第十四章 超敏反应动物模型	123

创新性实验

第十五章 肺结核患者外周血中 Th1/Th2 细胞亚群的鉴定和分析	127
第十六章 血清中流感病毒中和抗体的检测	129
附录 常用试剂和溶液的配制	133
参考文献	140

第一章 动物实验的基本操作

动物实验是免疫学实验中的一种基本实验技术。动物实验的基本操作包括实验动物的抓取固定、标记编号、注射给药、取血及处死方法等。

第一节 实验动物的抓取固定

实验动物的抓取固定方法依实验内容和动物的种类而定。正确的抓取固定动物，既可防止被动物咬伤，又不损害动物健康，有利于实验顺利完成。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、大胆敏捷、熟练准确，同时要爱惜动物，使动物少受痛苦，不能粗暴恐吓动物。

一、小鼠抓取固定

小鼠性情较温顺，一般不会咬人，比较容易抓取固定。通常用右手提起小鼠尾巴将其放在鼠笼盖或其他粗糙表面上，在小鼠向前挣扎爬行时，用左手拇指和食指捏住其双耳及颈部皮肤，将小鼠置于左手掌心，无名指和小指夹其背部皮肤和尾部，即可将小鼠完全固定(图 1-1)。在一些特殊的实验中，如进行尾静脉注射时，可使用特殊的固定装置进行固定，如尾静脉注射架或粗的玻璃试管。如要进行手术或心脏采血应先行麻醉再操作，如进行解剖实验则必须先行无痛处死后再进行实验。



图 1-1 小鼠的抓取与固定



图 1-2 大鼠的抓取

二、大鼠的抓取固定

大鼠比小鼠牙尖性猛，可带上帆布手套抓取，避免被咬伤。进行灌胃、腹腔、肌肉及皮下注射时，可采用左手固定法：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(图 1-2)。做手术时，事先麻醉或处死，然后用细棉线绳活缚腿，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。

三、豚鼠的抓取与固定

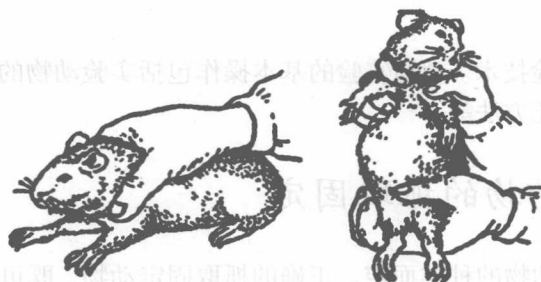


图 1-3 豚鼠的抓取固定

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 1-3)。

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。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 1-4)，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固定和台式固定(图 1-5)。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 1-4 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 1-5 家兔的盒式固定与台式固定

第二节 动物实验注射给药法

一、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(图1-6)。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。大鼠、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。



图 1-6 小鼠腹腔注射法

二、皮下注射

一般选择皮下组织较疏松的部位注射。大鼠、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5~10mm,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。注射完毕,干棉球局部压迫,防注射液外漏。小鼠用4号针头,家兔等用6号针头。



图 1-7 小鼠皮内注射

三、皮内注射

大鼠、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,将针头与皮肤约成30°角刺入皮下,使针头向上挑起并稍刺入,即可注射(图1-7),注射部位鼓起一小丘。

四、肌肉注射

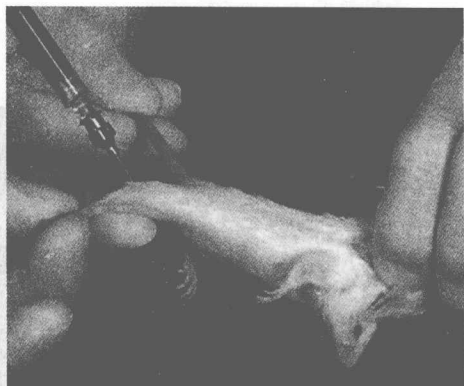


图 1-8 小鼠肌肉注射

大鼠、小鼠、家兔、犬等一般选择肌肉丰满而无大血管通过的臀部、大腿内外侧肌内注射。局部消毒，使注射针与肌肉约成 60° 角，迅速刺入肌肉，回抽无回血方可进行注射(图1-8)。大鼠和小鼠选用5号针头，家兔、猫、犬选用6号针头。

五、静脉注射

1. 大鼠、小鼠尾静脉注射 大鼠、小鼠尾部有四根血管，其中腹侧的一根为动脉，背部的一根为静脉，两侧各有一根静脉。两侧静脉较易固定，用来静脉注射。先固定，暴露尾部，使血管扩张，用左手无名指从下面托起尾巴，以拇指和小拇指夹住尾巴的末梢，右手持4号注射针，从尾末端沿与静脉平行方向进针，针头刺入后轻推药液，若无阻力，表示针头已在静脉中，可继续缓缓推入药液；若轻推药液后阻力较大，且有白色隆起，说明注射到皮下，需拔出针重新刺入。注射完毕用干棉球按压止血或把尾巴向注射侧弯曲以止血(图1-9)。

2. 豚鼠背中足静脉注射 固定动物，找到静脉，局部剪毛，消毒(为方便注射甚至可剪破皮肤)，右手持4号注射针沿向心方向刺入血管，回抽有回血即可注射，注射后干棉球压迫止血，胶布包裹伤口。

也可耳缘静脉注射。耳缘静脉较细注射难度大，固定很重要。操作者先使静脉充盈，用左手食指和中指夹住静脉近心端，拇指和小指夹住耳边缘部分，无名指和小指在耳下作垫，右手持4号注射针从静脉末端顺血管平行方向刺入，回抽如有回血，放松对耳根部血管的压迫，固定针头缓慢注入药液。

3. 家兔耳缘静脉注射 将兔盒式固定，找到耳缘静脉，拔去局部被毛，酒精擦拭使血管充盈。注射、止血方法与豚鼠基本相同。若注射成功，注射器针栓可轻松推动，可见药液在血管内流动(图1-10)。

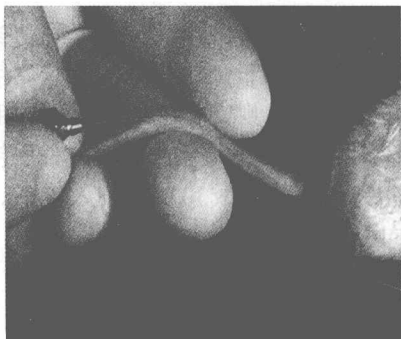


图 1-9 小鼠尾静脉注射



图 1-10 家兔耳缘静脉注射

第三节 动物实验的采血方法

一、小鼠和大鼠的采血方法

1. **割(剪)尾采血** 固定, 尾部用 45~50℃ 的温水或酒精擦拭, 使尾静脉充盈扩张。消毒, 割去尾尖 1~2mm (小鼠) 或 3~5mm (大鼠), 让血液自由滴入试管或用血红蛋白吸管吸取(图 1-11)。采血结束, 伤口消毒, 棉球压迫止血。或在尾部做一横切口, 割破尾动脉或静脉收集血液。取血量少, 小鼠 0.1mL/次, 大鼠 0.3~0.5mL/次。每只鼠可采血 10 次以上。

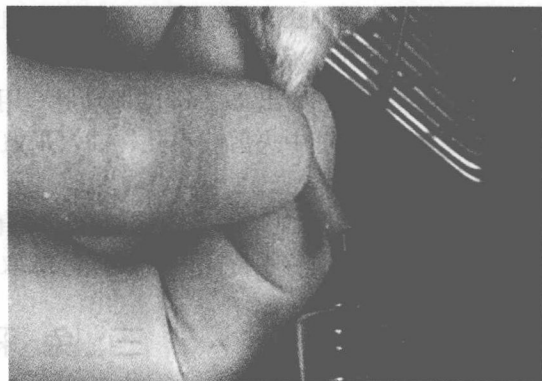


图 1-11 小鼠剪尾取血

2. **尾静脉穿刺采血** 固定, 充盈尾静脉, 消毒, 注射针沿与静脉平行方向, 从尾末端进针穿刺, 抽取血液。

3. **眼眶后静脉丛采血** 将取血管浸入 1% 肝素, 干燥后使用。操作者一手固定动物, 拇指和食指尽量将鼠头部皮肤捏紧, 或轻轻压迫颈部两侧, 使鼠眼球突出, 眶后静脉丛充血, 另一只手持取血管, 以 45° 角从内眼角刺入, 深度为小鼠 2~3mm, 大鼠 4~5mm。当感到有阻力时即停止推进, 将针退出 0.1~0.5mm, 边退边抽。采血后, 去颈部压力, 拔出采血管。可短期内重复采血, 采血量小鼠为 0.2~0.3mL/次, 大鼠 0.5~1.0mL/次。

4. **摘眼球法** 左手固定动物, 压迫眼球, 尽量使眼球突出, 右手用镊子或止血钳在眼球根部迅速摘除眼球, 眼眶内很快流出血液(图 1-12)。

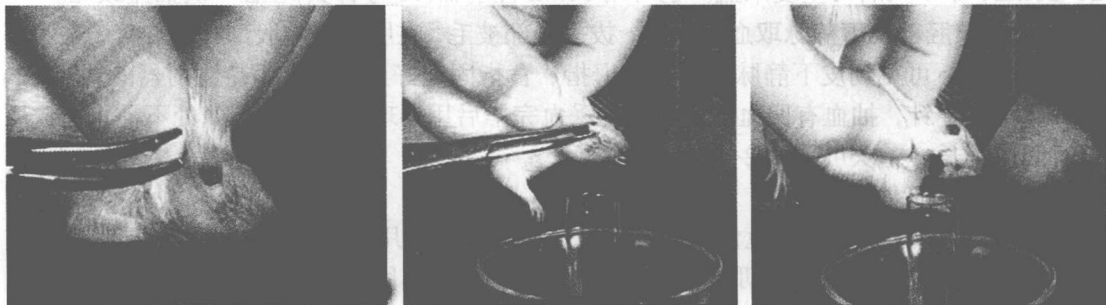


图 1-12 小鼠摘眼球取血

5. **断头采血** 采血者左手的拇指和食指从背部握住鼠的颈部皮肤, 用剪刀迅速剪掉头部, 立即将头朝下, 提起动物, 血液即流入试管中。采血量小鼠为 0.8~1.2mL, 大鼠 5~10mL。

6. **颈(股)动静脉采血** 将鼠麻醉, 剪去一侧颈部外侧被毛, 做颈动静脉分离手术, 用注射器采血即可。

二、豚鼠采血法

1. **耳缘剪口采血** 使耳充血,消毒,用锐器割破耳缘,切口边缘涂抹 20%枸橼酸钠,阻止血凝,血自切口自动流出进入盛器。每次采血约 0.5mL。

2. **心脏采血** 可由助手握住前后肢进行采血。选心脏搏动最强部位进针穿刺,血液即流入针管。针头宜细长,以免术后穿刺孔出血。

3. **股动脉采血** 固定,剪去腹股沟被毛,局部麻醉,切开长 2~3cm 的皮肤,钝性分离软组织,暴露并游离出 1~2cm 的股动脉。用镊子提起股动脉,远心端结扎,近心端用止血钳夹住,在动脉壁中央剪一小孔,插入采血细管,放开止血钳,血液即可流出。一次可采血 10~20mL。

4. **背中足静脉取血** 助手固定动物,伸直膝关节。术者消毒脚背面,以左手拇指和食指拉住豚鼠的趾端,右手持注射针刺入静脉取血,完毕后用棉球压迫止血。

三、兔采血法

1. **耳缘静脉采血** 固定,局部去毛,用手指摩擦兔耳,使静脉扩张,消毒,在耳缘静脉末端刺破血管待血液漏出取血,或将针头逆血流方向刺入耳缘静脉取血,完毕,用棉球压迫止血,一次最多采血 5~10mL,可反复取血。

2. **兔耳中央动脉采血** 兔耳中央较粗、颜色鲜红的为中央动脉。先使兔耳充血,左手固定兔耳,右手持 6 号针头注射器从动脉末端沿与血管平行地向心方向刺入,即可见动脉血进入针筒,取血完毕后注意止血。一次约采血 15mL。

3. **心脏取血** 固定,剪去左胸部兔毛,消毒。在胸骨左缘第 3、4 肋骨间心尖搏动最强处垂直刺入心脏,血液可自动泵入注射器。若针头已进入心脏但抽不出血时,可以前后进退调节针头的位置,切不可使针头在胸腔内左右摆动以防止伤及心、肺。一次可取血 20~25mL, 6~7 天后可重复采血。也可用 50mL 注射器(16 号针头)心脏一次抽血致死。

4. **后肢胫部皮下静脉取血** 固定,拔去胫部被毛,在胫部上端股部扎橡皮管,在胫部外侧浅表皮下可见到皮下静脉。用左手拇指、食指固定好血管,右手持注射器(5 号针头)与静脉平行进针,抽血有回血即可采血。采血完毕后用棉球压迫止血,此处不易止血,压迫时间应稍长。一次可采血 2~5mL。

5. 大血管采血

(1) **颈外静脉采血**: 将兔台式固定,充分暴露颈部。用左手朝心端绷紧颈部皮肤,右手持注射器沿颈部平行方向朝头端方向刺入,有回血后,固定好注射器,缓慢采血。一次可取血 10mL 以上。取血完毕,用干纱布压迫止血。

(2) **股动脉、股静脉采血**: 固定后,左手扪股三角区,触及动脉搏动部位,尽量由远心端进针,向近心端方向穿刺,刺中可见血液流入针筒。如采静脉血,在扪到动脉搏动的部位进针后,当针头触及索状感股动脉时,将针头稍朝内侧移动,再迅速穿刺,即可穿刺到股静脉。采血完毕,用棉球压迫止血。

第四节 实验动物的处死方法

实验动物的处死必须按照人道主义原则,以安乐死的方法处死动物。实验用过的动物处死后要妥善处理(掩埋或焚烧)。下面介绍免疫学实验中常用实验动物小鼠、大鼠、豚鼠及家兔等的处死方法。

一、大鼠、小鼠的处死方法

1. 颈椎脱臼断髓法 此法是切断脊髓与脑髓的联系,使动物迅速死亡。将动物放在鼠笼盖或粗糙的表面上,左手拇指和食指用力向下按住鼠头,右手用力向后拉鼠尾,使颈椎脱臼,鼠立即死亡(图1-13)。大鼠断髓处死时,不仅需要相对较大的力量,还需要掌握好技巧,不可盲目用力,可以旋转用力拉大鼠。

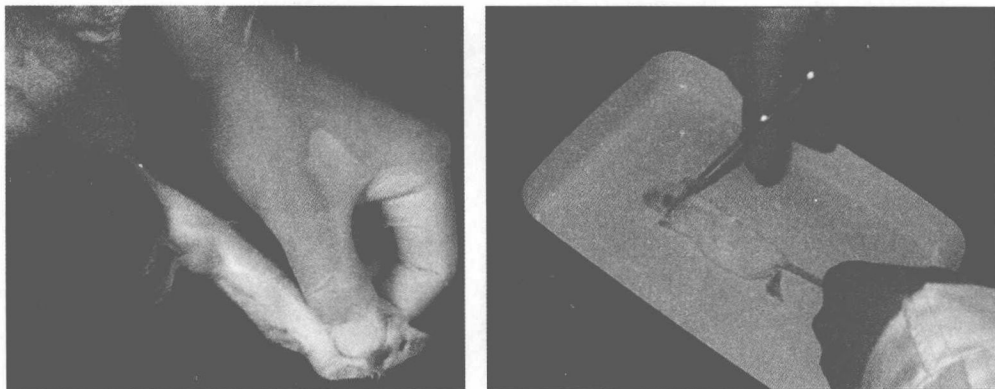


图 1-13 小鼠颈椎脱臼法

2. 断头法 用大剪刀在颈部将鼠头剪断,动物大量失血立即死亡。此法处死动物时间短,脏器含血量少,若需采集新鲜脏器标本,可采用此法。

3. 急性失血法 一次性放出大量血液,使动物死亡。可采用颈总动脉大量失血、去眼球放血而致死的方法。

4. 化学药物致死法 此法适用于各种动物。最好采用吸入 CO_2 致死法, CO_2 不燃,无气味,使用安全且处死动物效果确切。将小动物先装入鼠盒中,再放入透明塑料袋内,把输送 CO_2 的胶管末端放入袋内,封好塑料袋,向内充满 CO_2 ,动物很快即会倒下,再充气数秒,拔出胶管封袋口,放置一段时间动物即死亡。

5. 击打法 此法适用于大鼠、家兔等。抓住动物尾部,提起,用力摔击头部,或用木槌用力捶其后脑部,动物痉挛后即处死。

二、豚鼠、家兔的处死方法

1. 空气栓塞法 向动物静脉内注入一定量的空气使之发生栓塞而死,空气剂量为20~50mL。缺点是由于动物死于急性循环衰竭,各脏器淤血十分明显。虽被广泛使用,但

从保护动物角度出发,使用时需慎重。

2. **急性失血法** 可采用切断股动静脉,使其大量失血而死。一般在股三角区横切约10cm的切口即可切断股动静脉,要用湿纱布不断地擦去切口处的血凝块使切口保持通畅,3~5min动物可致死。

3. **破坏延脑法** 用工具用力捶击动物的后脑部,损伤延脑致死。

4. 化学药物致死法

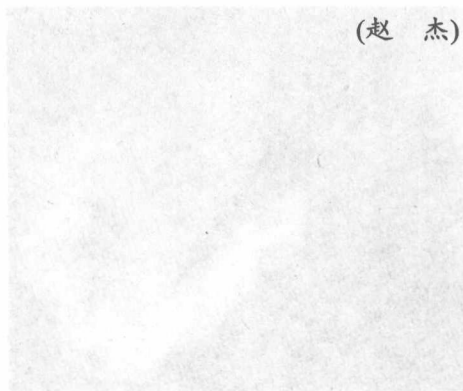
(1) 吸入CO₂致死法:将动物置带盖容密闭容器内,吸入CO₂致死。

(2) 静脉注射10%氯化钾溶液10~20mL,使心肌失去收缩能力,心脏急性扩张,心脏迟缓性停跳而死。

(3) 皮下注射致死量的士宁溶液:豚鼠3.0~4.4mg/kg,家兔0.5~1.0mg/kg。

(4) 静脉注射10%甲醛溶液10~20mL,使血液内蛋白质凝固,动物由于全身血液循环严重障碍和缺氧而死。

(5) 过量的麻醉剂(如戊巴比妥钠)处死动物,但因麻醉剂使用控制严格,不能广泛应用。



(赵杰)

第二章 免疫学常用实验仪器

第一节 酶 标 仪

【主要原理】

光是电磁波, 波长 100~400nm 称为紫外光, 400~780nm 的光可被人眼观察到, 大于 780nm 称为红外光。酶标仪测定的原理是在特定波长下, 检测被测物的吸光值。光通过被检测物, 前后的能量差异即是被检测物吸收掉的能量, 特定波长下, 同一种被检测物的浓度与被吸收的能量成定量关系。检测单位用 OD 值表示, OD 是 optical density(光密度)的缩写, 表示被检测物吸收掉的光密度, $OD = \log(1/trans)$ 其中 trans 为检测物的透光值。根据 Bouger-amberT-beer 法则, OD 值与光强度成下述关系: $E = OD = \log I_0/I$, 其中 E 表示被吸收的光密度, I_0 为在检测物之前的光强度, I 为从被检测物出来的光强度。OD 值由下述公式计算: $E = OD = C \times D \times E$, 其中 C 为检测物的浓度; D 为检测物的厚度; E 为摩尔因子。每一种物质都有其特定的波长, 在此波长下此物质能够吸收最多的光能量, 如果选择其他的波长段, 就会造成检测结果的不准确。因此在测定检测物时, 选择特定的波长进行检测, 称为测量波长。但是每一种物质对光能量还存在一定的非特异性吸收, 为了消除这种非特异性吸收, 再选取一个参照波长, 以消除不准确性。在参照波长下, 检测物光的吸收最小。检测波长和参照波长的吸光值之差可以消除非特异性吸收。

【主要操作规程】

(1) 开启酶标仪电源, 待酶标仪自检完成, 仪器的液晶显示窗出现 PLATE READING 及闪动光标(若仪器提示不能通过自检或出现其他错误信息, 请立即停止下列操作并将错误信息详细记录, 报告专业人员维修)。

(2) 开启计算机。

(3) 打开酶标仪专用程序(此时在操作界面左下方显示“Ready”字样)。

(4) 打开“File”菜单, 选择“New Reading”的“New Endpoint Protocol”项(此时酶标仪转为计算机控制模式); 在“Reading Parameters”处, 设置各项参数: 单波长测定选择“Single”, 双波长测定选择“Dual”, 选择“Measurement Filter”项确定测量滤光片波长值, 选择“Reference Filter”项确定参比滤光片波长值。

(5) 检查确认所设各参数无误, 将酶标板放入仪器内(左上角为 A1)关闭测量室的盖板(注意: 不能将酶标板的盖子放入仪器内)。

(6) 点击“Run”键, 仪器开始测定, 测定完成后, 显示出与酶标板规格一致排列的各孔 OD 值。

(7) 可将数值用“Copy”命令复制后粘贴至 Excel 电子数据工作表上, 或打开“File”菜单, 运行“Export”命令, 选择相应的数据文件格式, 按自己确定的路径和文件名进行保存。

(8) 取出酶标板, 按关闭程序→关闭计算机→关闭酶标仪的顺序关机。

第二节 流式细胞仪

【基本原理】

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是借助荧光活化细胞分类仪(fluorescence-activated cell sorter, FACS)对细胞快速鉴定和分类,并进行多参数定量测定和综合分析的技术。样品与经多种荧光素标记的抗体反应,因荧光素发射光谱的波长不同,信号能同时被接收,故能同时分析细胞表面多个膜分子表达及其水平。该法可检测各类免疫细胞、细胞亚类及其比率。此外,借助光电效应,微滴通过电场时出现不同偏向,可分类收集所需细胞。待测标本制备成单细胞悬液通过荧光染色后进入充满鞘液的流动室,鞘液压力与样品流压力是不同的,当二者的压力差异达到一定程度时,鞘液裹挟着样品流中细胞排成单列逐个经过激光聚焦区。如果将细胞中感兴趣的部分特异性地标记上荧光染料,那么这些染料将在细胞通过激光检测区时发出特定波长的荧光,通过一定波长选择通透性的滤色片,可将不同波长的散射光、荧光信号区分开来,并送到不同的光电倍增管中,经过一系列的信号转换、放大,数字化处理,就可以在计算机直观地统计染上各种荧光染料的细胞各自的百分率。选择不同的单克隆抗体及荧光染料,可以利用 FCM 同时测定一个细胞上的多种不同特征;如果对具有某种特征的细胞有兴趣,还可以利用流式的分选功能将其分选出来,以便进一步培养、研究。

【主要操作规程】

- (1) 打开电源,对系统进行预热。
- (2) 打开气体阀,调节压力,获得适宜的液流速度;开启光源冷却系统。
- (3) 在样品管中加入去离子水,冲洗液流的喷嘴系统。
- (4) 利用校准标准样品,调整仪器,使在激光功率、光电倍增管电压、放大器电路增益调定的基础上,0° 和 90° 散射的荧光强度最强,并要求变异系数为最小。
- (5) 选定流速、测量细胞数、测量参数等,在同样的工作条件下测量样品和对照样品;同时选择计算机屏上数据的显示方式,从而能直观掌握测量进程。
- (6) 样品测量完毕后,再用去离子水冲洗液流系统。
- (7) 因为实验数据已存入计算机硬盘(有的机器还备有光盘系统,存储量更大),因此可关闭气体、测量装置,而单独使用计算机进行数据处理。
- (8) 将所需结果打印出来。

【注意事项】

- (1) 光电倍增管要求稳定的工作条件,暴露在较强的光线下以后,需要较长时间的“暗适应”以消除或降低部分暗电流本底才能工作;另外还要注意磁屏蔽。
- (2) 光源不得在短时间内(一般要 1h 左右)关上又打开,使用光源必须预热并注意冷却系统工作是否正常。
- (3) 液流系统必须随时保持液流畅通,避免气泡栓塞,所使用的鞘流液在使用前要经过过滤、消毒。
- (4) 注意根据测量对象的变换选用合适的滤片系统、放大器的类型等。
- (5) 特别强调每次测量都需要对照组。