



21世纪高等教育规划教材
生物学系列

医学免疫学实验教程

YIXUE MIANYIXUE SHIYAN JIAOCHENG

■ 主编 伍 杨 熊茂来



教育部直属师范大学
华中师范大学出版社

SHENGWUXUE

21 世纪高等教育规划教材·生物学系列

医学免疫学实验教程

主 编：伍 杨 熊茂来

副主编：邓明会 向绍蓉

编 委：(按姓氏拼音排列)

邓明会 付绍玲 刘锦红

柳开典 伍 杨 向绍蓉

熊茂来 袁作芬

华中师范大学出版社

内容简介

本书分为上、下二篇,共十三章,86个实验项目。上篇为实验室设备及管理,包括实验室设计、实验室规则、实验室安全、实验室主要仪器设备介绍等内容;下篇为免疫学实验技术,收录了86个实验项目,系统介绍了医学免疫学实验技术,除传统经典实验外,还介绍了免疫学新技术、新方法,每一实验按实验原理、实验材料、实验方法、结果判断、注意事项、应用与评价栏目编写,实验方法详尽,操作性强。本书充分体现了科学性、实用性和先进性的特点,可供临床医学、护理学、检验专业本科、专科的免疫学实验教学选用,也可作为教师、医学类研究生、医院检验科、防疫站及免疫学相关专业科研人员参考使用。

新出图证(鄂)字 10 号

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验教程/伍 杨,熊茂来主编. —武汉:华中师范大学出版社,2008.8

ISBN 978-7-5622-3747-1

(21世纪高等教育规划教材·生物学系列)

I. 医… II. ①伍… ②熊… III. 医药学:免疫学-实验-教材 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 075027 号

医学免疫学实验教程

主编:伍 杨 熊茂来 ©

责任编辑:方 芳

责任校对:张 曦

封面设计:罗明波

编辑室:第二编辑室

电话:027-67863220

出版发行:华中师范大学出版社

社址:湖北省武汉市珞喻路 152 号

邮编:430079

电话:027-67863040(发行部) 027-67861321(邮购)

传真:027-67863291

网址:<http://www.ccupress.com>

电子信箱:hscbs@public.wh.hb.cn

经销:新华书店湖北发行所

印刷:恩施自治州新闻出版印刷厂

督印:章光琼

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:15

字数:384千字

版次:2008年8月第1版

印次:2008年8月第1次印刷

印数:1-4000

定价:32.00元

欢迎上网查询、购书

前 言

医学免疫学实验技术是医学免疫学教学中非常重要的教学内容、教学方法和教学形式。通过实验,可以对学生进行医学免疫学基本实验技能的训练,加深和巩固对免疫学基本理论的理解。通过客观地观察、分析和记录实验结果,培养学生实事求是的科学态度,提高分析问题和解决问题的能力,为进一步学习和进入医学免疫学研究领域作技术准备,为今后的临床实践和科研工作打下坚实的基础。为此我们根据教育部关于:“教材建设精品化,教材要适应多样化教学需要”的精神,组织编写了这本《医学免疫学实验教程》。

本教材力求内容完整、系统、科学,体现精、新、实的特点。它的编写原则是:既要与规划理论教材保持原则上的一致性,又要反映免疫学的新技术、新发展趋势。培养学生独立思考、独立实验的能力。全书共分两篇,86个实验项目,每一实验按实验原理、实验材料、实验方法、结果判断、应用与评价、注意事项编写,实验方法详尽、操作性强,便于学生、实验技术人员和教师的选用。各实验项目附有思考题,以帮助学生更好地学习、理解和掌握免疫学实验技术的原理、技术要点和临床应用,提高学习效果。

本书适用于临床医学、护理学、检验类专业本科、专科的免疫学实验教学,也可供教师、医学类的硕士研究生、医院检验科、防疫站、科研人员以及从事免疫学相关专业的技术人员参考。

鉴于编者的知识水平、教学经验所限,书中难免会有遗漏或不足,恳请各位同仁和读者批评指正,以便今后再版时不断完善和提高。

编者

2008.8.6

目 录

上篇 免疫学实验室设备和管理

第一章 实验室一般介绍	(3)
第一节 开设医学免疫学实验的目的	(3)
第二节 实验室规则	(3)
第三节 实验室的安全防护	(4)
第四节 常用实验器材的清洁及准备	(5)
第五节 水的纯化	(7)
第六节 无菌操作的基本要领	(7)
第二章 实验室常用仪器设备介绍	(9)

下篇 免疫学实验技术

第三章 非特异性免疫检测	(23)
第一节 吞噬细胞功能检测	(23)
实验一 中性粒细胞吞噬细胞功能检测	(23)
实验二 中性粒细胞活性检测	(24)
实验三 巨噬细胞吞噬功能测定	(25)
实验四 白细胞杀菌功能测定	(26)
第二节 NK 细胞功能测定	(29)
实验五 NK 细胞功能测定	(29)
第三节 非特异性免疫功能检测	(31)
实验六 血脑屏障作用	(31)
实验七 溶菌酶测定	(32)
第四章 抗原-抗体反应	(34)
第一节 凝集试验	(34)
实验八 直接凝集试验	(34)
实验九 间接凝集试验	(37)
实验十 间接凝集抑制试验	(43)
实验十一 协同凝集试验	(45)
第二节 沉淀反应	(47)
实验十二 单向免疫扩散试验	(47)
实验十三 双向免疫扩散	(48)
实验十四 免疫电泳	(50)
实验十五 火箭免疫电泳	(51)

实验十六 免疫浊度测定	(53)
实验十七 对流免疫电泳试验	(54)
第三节 补体参与的抗原抗体反应	(56)
实验十八 补体结合试验	(56)
第五章 淋巴细胞检测	(59)
第一节 T 淋巴细胞功能检测	(59)
实验十九 外周血单个核细胞的分离	(59)
实验二十 E 花环形成试验	(61)
实验二十一 T 淋巴细胞转化试验	(63)
实验二十二 细胞毒性 T 细胞功能测定	(66)
实验二十三 T 细胞亚群的测定	(68)
实验二十四 白细胞趋化实验	(70)
第二节 B 细胞功能检测	(72)
实验二十五 细胞内免疫球蛋白的检测	(72)
实验二十六 溶血空斑试验	(73)
实验二十七 溶血分光光度测定法	(74)
第六章 常用免疫标记技术	(75)
第一节 免疫荧光染色技术	(75)
实验二十八 荧光抗体的制备	(75)
实验二十九 免疫荧光染色技术	(77)
第二节 免疫酶标技术	(80)
实验三十 酶标抗体的制备	(80)
实验三十一 酶联免疫吸附试验	(81)
实验三十二 定性酶联免疫吸附试验	(82)
实验三十三 定量酶联免疫吸附试验	(84)
实验三十四 生物素-酶标记亲和素系统	(85)
第三节 放射免疫分析技术	(87)
实验三十五 ^3H -胸腺嘧啶核苷检测技术	(87)
第七章 免疫分子的检测	(89)
第一节 细胞表面分子的检测	(89)
实验三十六 细胞表面抗原的检测	(89)
实验三十七 细胞膜受体的检测	(90)
实验三十八 细胞黏附分子的测定	(91)
第二节 细胞因子的检测技术	(95)
实验三十九 白细胞介素 1 检测	(95)
实验四十 白细胞介素 2 检测	(98)
实验四十一 白细胞介素 3 检测	(100)
实验四十二 白细胞介素 4 检测	(101)
实验四十三 白细胞介素 5 检测	(102)
实验四十四 白细胞介素 6 检测	(103)

实验四十五 白细胞介素 8 检测	(104)
实验四十六 肿瘤坏死因子的生物活性检测	(105)
实验四十七 GM-CSF 的活性检测	(106)
实验四十八 干扰素检测	(107)
实验四十九 趋化性细胞因子的检测	(108)
第三节 血清补体、Ig 检测	(112)
实验五十 血清总补体活性测定	(112)
实验五十一 血清总 IgE 测定	(114)
实验五十二 循环免疫复合物测定	(115)
实验五十三 放射过敏原吸附技术	(116)
第八章 超敏反应检测	(118)
实验五十四 豚鼠过敏反应试验	(118)
实验五十五 皮肤过敏反应试验	(119)
实验五十六 皮肤迟发型超敏反应试验	(120)
第九章 抗体的制备	(122)
第一节 单克隆抗体技术	(122)
实验五十七 B 淋巴细胞杂交瘤技术	(122)
实验五十八 人单克隆抗体的制备	(127)
第二节 双特异性抗体的制备	(132)
实验五十九 双特异性抗体的制备	(132)
第三节 抗血清的制备	(135)
实验六十 溶血素的制备	(135)
实验六十一 兔抗人血清的制备	(136)
实验六十二 抗血清的纯化	(137)
第十章 基因工程抗体	(141)
实验六十三 嵌合抗体的制备	(141)
实验六十四 单链抗体的制备	(145)
实验六十五 噬菌体抗体库技术	(148)
第十一章 免疫细胞化学技术	(154)
第一节 与免疫细胞化学相关的组织学和细胞学技术	(154)
实验六十六 组织和细胞标本的取材和制备	(154)
第二节 免疫酶细胞化学技术	(159)
实验六十七 酶标抗体免疫细胞化学染色法	(159)
实验六十八 非标记抗体免疫酶细胞化学染色法	(161)
第三节 免疫荧光细胞化学技术	(168)
实验六十九 免疫荧光细胞化学的染色方法	(168)
第四节 亲和组织化学技术	(172)
实验七十 生物素-亲和素免疫细胞化学技术	(172)
实验七十一 葡萄球菌蛋白 A 技术	(175)
实验七十二 凝集素组织化学技术	(176)

第五节 免疫金银技术.....	(178)
实验七十三 胶体金的制备.....	(178)
实验七十四 免疫金染色法.....	(179)
实验七十五 免疫金银法.....	(180)
实验七十六 彩色免疫金银法.....	(181)
第六节 免疫胶体铁细胞化学技术.....	(182)
实验七十七 免疫胶体铁细胞化学技术.....	(182)
第十二章 免疫印迹.....	(184)
实验七十八 可提取性核抗原(ENA)抗体的检测	(189)
实验七十九 重组 Follistatin 的表达检测	(190)
第十三章 分子生物学部分试验.....	(192)
实验八十 质粒 DNA 制备	(192)
实验八十一 质粒 DNA 的提取	(193)
实验八十二 DNA 限制性内切酶消化	(195)
实验八十三 DNA 琼脂糖电泳	(195)
实验八十四 DNA 连接、转化.....	(196)
实验八十五 聚合酶链反应(PCR)试验.....	(197)
实验八十六 Southern 印迹杂交	(199)
附 录.....	(209)
附录 I 基因工程疫苗.....	(209)
附录 II 免疫学实验常用试剂的配制.....	(214)
附录 III 离心速度、相对离心力和离心时间的计算	(227)
附录 IV 加样器的校准.....	(228)
附录 V 实验动物的管理.....	(230)
参考文献.....	(232)

上 篇

免疫学实验室设备和管理

第一章 实验室一般介绍

第一节 开设医学免疫学实验的目的

医学免疫学不仅是一门独立的前沿学科,也是一门与医学等其他学科具有广泛联系的交叉学科,免疫学技术已成为医学领域得到广泛应用的实验技术,基础和临床医学研究均有赖于免疫技术作为重要的研究手段。每个从事医学学习、教学和科研的人员,在掌握基本的经典医学免疫学实验技术的基础上,了解和学习一些新的医学免疫学实验方法是十分必要和有益的。

医学免疫学实验技术是医学免疫学的重要组成部分。通过实验,可以对学生进行医学免疫学基本实验技能方面的训练,加深和巩固对免疫学基本理论的理解;通过客观地观察、分析和记录实验结果,培养学生实事求是的科学态度,提高他们分析问题和解决问题的能力,为进一步学习和进入医学免疫学的研究领域作技术准备,为今后的临床实践和科研工作打下坚实的基础。

为了体现“三基”(基础理论、基本知识、基本技能)、“三特定”(特定对象、特定要求、特定限制)和“五性”(思想性、科学性、启发性、先进性、适用性)的原则,不同专业可根据其特点和专业的性质,选择性地开设实验内容,以便更有利于教学的开展。

第二节 实验室规则

一、实验前的准备

实验前作好预习,了解实验内容、实验目的、操作中的注意点及其理论依据等,以避免或减少错误的发生。

二、实验时要坚持严肃性、严密性与严格性

1. 进实验室必须穿好工作衣,必要时还需戴手套、口罩、帽子。离开实验室时脱下工作衣,要反折。
2. 必要的文具、实验教程、笔记本等可带入实验室,但必须远离操作地点。
3. 实验室内要保持安静,不要大声喧哗,严禁打闹。禁止饮食、吸烟、或用嘴湿润标签等。
4. 要遵照实验教程所列步骤依次进行,并善于分配和运用时间。
5. 爱护实验器材,如有损坏应及时报告老师,需赔偿者按规定办理。
6. 根据需要,物品存放温箱或冰箱时,要轻开轻关,并迅速关闭,以免影响温度。
7. 实验过程中应听从教师的指导,严格按照实验操作规程进行,以获得正确的实验结果。
8. 实验结果必须如实地记录下来,然后进行分析,得出结论。如遇有和理论不符合的实验结果,应尽量探究其原因,训练自己的科学思维方式,找出解决问题的方法。

三、实验完成后的工作

1. 要写出实验报告。

2. 每次实验结束后,按老师要求,整理实验教具,清理实验台面,用过的玻璃片或废弃不用的培养物等放到指定的地点。保持实验室内清洁卫生。

3. 实验完毕,要有专人负责关好门窗,水源及照明设备,脱去工作衣,反折好。用消毒液浸泡手,再用自来水冲洗干净,方可离开实验室。

第三节 实验室的安全防护

目前,实验室人员面临的最常见的危险是破碎玻璃、尖锐器具、危险化学品、火、辐射等。而且还有各种各样的可能的病原体感染的危险。所以,应坚持安全工作标准,重视安全问题,除严格遵守操作规则外,应有一些安全防护知识以及对意外伤害的一些简单处理措施。

一、常规操作的安全问题

1. 破碎与尖锐器材

玻璃器皿的碎片和尖锐器材常引起工作人员受伤。所以,巴斯德吸管、针头、解剖刀片等须仔细处理。这些器件应分别置于可封闭的铁罐里,以免与其他可重新使用的玻璃器皿混合。容量吸管的颈部在反复酸泡、高压消毒后易破裂,不要试图将不配套的橡皮球套上以免刺伤,颈部破裂的吸管应弃去。

2. 化学药品伤害的处理

(1) 皮肤受强酸或其他酸性药品伤害时,先用大量清水清洗,再用5%碳酸氢钠冲洗,最后用生理盐水洗净,并敷以碳酸氢钠溶液纱布条。

(2) 皮肤受强碱或其他碱性药物伤害时,先用大量清水清洗,再用5%硼酸或2%醋酸清洗。重者可用2%醋酸湿敷。

(3) 石炭酸灼伤,先用清水冲洗,再用肥皂水清洗,然后包以凡士林纱布。

(4) 酸或酸性物质溅伤眼睛后,应立即用温盐水或大量干净水冲洗眼睛至少10 min,再用4%硼酸溶液冲洗,然后用生理盐水冲洗,并滴以抗菌素眼药水或眼膏,防止感染。

(5) 强碱溶液溅伤眼睛,迅速用干净水冲洗(不可用酸性液去中和碱性液),然后请眼科医生检查。

(6) 一般气体无显著的危害,除非大量漏逸, CO_2 和 N_2 可引起窒息,氧则可助燃。如有泄漏发生则疏散人员,打开窗户通风。

3. 火险

火灾具有强烈的破坏性,下列几点,应特别注意:

(1) 实验室内不要大量存放易燃、易爆的化学药品。

(2) 点燃酒精灯时,要用火柴、小棍、纸条等引点,不可与另一酒精灯或其他火源直接点火。酒精灯、喷灯等未熄灭前不可添加燃料。

(3) 易燃物品不可用烤箱烘烤,易燃物品加热时,要用石棉板隔热或在水浴中进行,不可直接在火焰上加热。

(4) 倘若防备不慎引起火灾,要迅速采取果断措施防止火势蔓延扩大。小面积着火,用湿的布类、棉垫等覆盖在火焰上;如系酒精、乙醚、汽油等着火,切勿用水,应以沙土等灭火;电器

着火,要首先切断电源,然后用砂袋等扑灭,不要用泡沫灭火器灭火;如为身上衣服着火不能乱跑,要迅速就地打滚扑灭。

4. 辐射

免疫实验室主要的辐射源于消毒用的紫外灯,UV 线可灼伤皮肤。在开始无菌操作时一定要关掉 UV 灯,千万不要在 UV 灯直射下操作以免损伤眼睛。进行同位素标记、掺入等实验时,还须注意避免同位素的污染,必须符合该技术的操作规范。

二、培养物的危险性

在进行细胞培养时,由于细胞的来源不同,有些细胞系可能具有与一些病原物或致癌病毒一样的危险性。操作人员应注意自我防护,无关人员的进入须受限制,进入实验室要穿上工作服,离开时脱掉工作服并洗手。严禁在实验室饮食、抽烟。实验完毕,培养物应由专人处理,不可随意扔掉。

第四节 常用实验器材的清洁及准备

医学免疫实验所使用的玻璃器皿、橡皮塞和滤器的清洁与否,直接关系到实验的成败。因此,必须严格遵守各种实验器材的处理常规。

一、玻璃器皿的处理

1. 新玻璃器皿的处理方法

用自来水或洗衣粉水洗去表面灰尘,因含有游离碱,应先在 1% 盐酸溶液中浸泡过夜,再用自来水冲洗干净、晾干。

2. 使用后的玻璃器皿的处理方法

(1) 含有培养物的玻璃器皿,应放于煮锅中,加水煮沸 30 min,趁热倾去污水,换上洗衣粉水浸泡、清洗,最后用自来水清洗三次,晾干。

含有液体石蜡等油脂的培养物的玻璃器皿,须另放于备用煮锅中,煮沸后倾去污水,再用水煮沸二、三次,每次倾去污水。其后的清洁过程同上述。

(2) 吸过有传染性标本的吸管,用后应立即插入盛有 3% 来苏水液的广口玻璃筒内。洗涤前须先煮沸。吸过无传染性标本的吸管,则插入广口长玻璃筒的水中。洗涤时先用洗衣粉水清洗后,再用自来水清洗。装血清或蛋白质的试管等,其洗涤法同上。清洗后的吸管、试管等均应使其直立,自行晾干。

(3) 某些实验所用的玻璃器皿,在一般清洗后,还须要用酸清洁,以去除在玻璃壁上的各种物质。经酸清洁后的玻璃器皿,一般须用自来水清洗十次,再用蒸馏水冲洗三次。清洁液的配制:先将 60 g 重铬酸钾加温溶化于 300 ml 蒸馏水中,待冷却后,缓慢地加入粗硫酸 460 ml;切不可将重铬酸钾溶液加入硫酸中!

(4) 洗净的玻璃器皿倒立于干燥箱内烘干。

(5) 用消毒袋或锡箔包装后置于无尘处待消毒处理。

使用时应注意:

① 切不可将未洗净的玻璃器皿直接放入清洁液浸泡,以免使清洁液失效。

② 浸泡时间至少 4h,最好能浸泡过夜。

③ 发现清洁液发绿,表示清洁液已失去氧化能力,应弃之,重配。

④操作时应带厚橡皮手套。

3. 玻片的清洗

涂片检查后的玻片,应放于盛有消毒液(84 消毒液)中,再用肥皂水洗刷后,通过清水冲洗即可。

检查清洗过的玻璃器皿是否清洁,是以水在玻璃面上呈一薄膜而不出现水滴为准,无菌的玻璃器皿一般用 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干烤 1 h。

二、橡皮塞和橡皮管的清洁消毒

1. 新橡皮塞(管)的处理方法

- (1) 在 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液中煮沸 15 min,用自来水洗涤多次。
- (2) 再以 4% HCl 溶液煮沸 15 min,用自来水洗涤多次。
- (3) 以蒸馏水冲洗 5 次,晾干后包装, 103.4 kPa , $121.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 3 分钟。

2. 使用后的橡皮塞(管)处理

- (1) 污染的橡皮塞先煮沸消毒。
- (2) 用自来水冲洗干净。
- (3) 再用蒸馏水冲洗 5 次,晾干包装, 103.4 kPa , $121.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、高压蒸汽灭菌 3 min。

三、有机玻璃制品的消毒与清洗

目前常用有机玻璃制成的带孔平板作某些血清学试验。此种制品不能耐受高热,且某些消毒剂例如来苏水液也会使之变性,故通常用如下方法:

- (1) 试验用过的血凝板先在 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液中浸泡过夜,并洗去血细胞。
- (2) 取出后用自来水冲洗 8~10 次。
- (3) 再在 3% HCl 溶液中浸泡 15 min。
- (4) 用自来水冲洗多次,蒸馏水漂洗 5~6 次,倒净孔内蒸馏水,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱内晾干。

四、滤器的清洁与灭菌

实验室常用的除菌滤器有玻璃滤器和蔡氏滤器。

1. 新购置的玻璃滤器的处理方法

- (1) 用自来水冲洗干净,再用清洁蒸馏水冲洗。
- (2) 加入预温至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ (以双蒸水配制)液 100 ml~200 ml,下接滤瓶,一次抽滤干净。
- (3) 随即用蒸馏水抽滤,直至抽滤液完全为中性为止。为了加快纠正 pH,在用蒸馏水抽滤起始时,可加少许 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 或 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_4\text{OH}$,至近于中性时,再用蒸馏水抽滤。

2. 使用后玻璃滤器的处理方法

G5 滤器使用后立即用蒸馏水冲洗干净,并用蒸馏水 200 ml 抽滤一次,烘干后供下次使用。对于每次使用后 G6 滤器及使用 10 次后的 G5 滤器,均应立即用水冲洗,再加 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 抽滤一次。当盐酸溶液尚未完全抽尽前,取下该滤器浸入酸清洁液内,约经 48 h 取出。再用蒸馏水抽滤至近中性,烘干即可。

3. 蔡氏滤器

- (1) 每次使用前,夹入新石棉板(光面向下),但注意不可扭紧固定螺旋。包装后,与滤瓶分别经 103.4 kPa , $121.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 15 min。
- (2) 每次使用后,应弃去用过的石棉板。必要时应煮沸灭菌,洗净金属器,晾干。

五、灭菌前的准备

(1) 干热灭菌时,平皿可不用纸包裹。

(2) 吸管及毛细吸管 用普通棉花少许塞于吸口端,以防将传染物吸入口中。毛细吸管装入大号试管中加棉塞。干热或高压蒸气灭菌。

(3) 注射器 用纱布包裹后,再用皮纸或包布包裹,针头则装入试管中,加棉塞。也可用铝盒装注射器,干热或高压蒸气灭菌。现有灭菌过的一次性的注射器,可向厂家购买。

(4) 试管 须塞以棉花塞,方法较多,只列举一种,将普通棉花撕成大小合适、厚薄均匀的方块,由一边卷向另一边,边卷边将两侧毛边向内折入,再卷一、二周,以便最外层的棉絮黏附在一起,两端及周围力求光滑。

要求棉塞塞入试管与管口间无空隙,拨出后易于保持原形,便于重塞,松紧适合试管口径,长度应不短于试管口径二倍,使棉塞约 $2/3$ 入管内, $1/3$ 外露,可用高压蒸气灭菌或干热灭菌。

(5) 烧瓶 用普通棉花作成棉塞,再用皮纸与玻璃纸包扎后,用线绕两圈扎紧,但不打结。

第五节 水的纯化

一些免疫学实验需要进行细胞培养,细胞培养的各个环节对无菌条件的要求虽有不同,但对水的质量要求是一致的,可信赖高质量的纯水供应是所有细胞培养成功操作的必要条件。如果水的质量低劣,最终会影响到细胞生长和实验结果的准确性。所以高纯度水的制备是很重要的,要求达到无臭、无色、无菌和无离子。纯水的最低要求是含氯化钠不多于 $6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,含内毒素水平每毫升不高于 10 单位。

配制溶液时应采用新的、具有电阻为 $1.5\text{ }\Omega\sim 2.0\text{ }\Omega$ 的重蒸馏水。蒸馏水贮放时间不宜太长。在准备室选择一处洁净、无尘、清静的地方安放制备净水装置。所得净化水贮备在专用的干净玻璃瓶内,最好用硼砂硅玻璃瓶,标记上制备的日期。

净化水的常用制备方法:

一、双重玻璃蒸馏器

采用全套玻璃器皿制造,通过电热丝提供热源的蒸馏装置,最好采用石英玻璃蒸馏器。市售有不同规格的双重玻璃蒸馏器。

二、去离子法与玻璃蒸馏器法结合

水中杂有各种金属离子、油脂及酸类,以及 O_2 、 CO_2 、 H_2S 、 Cl_2 等。这些物质通过交换树脂的处理可以除去。常用的是将强酸性阳离子交换树脂和强碱性阴离子交换树脂混合装入离子交换柱内,将水流通过离子交换柱即得纯净的去离子水,可用来冲洗器皿,去离子水再经过蒸馏得净化水,用于配制溶液。

三、逆相渗透净水法

是一种新型的净水装置。此套装置可根据需要直接输送水进行净化。

第六节 无菌操作的基本要领

免疫学实验中有许多需要进行无菌操作,在操作中做到最大限度的无菌。为此,所有工作

要进行得有条不紊和可靠安全。

1. 培养前准备

对每次培养所需物品和时间要胸中有数,作好充分准备;安排实验程序,使之紧凑合理。

2. 洗手着装

由于超净台的使用,一般无需穿隔离衣帽、戴口罩;但对手臂皮肤应仔细清洗。如果超净台风力不足,操作时最好不要交谈并戴口罩,以防呼吸气流造成污染。

3. 超净台内应合理布局

避免培养瓶、贮液瓶等和风向相逆,动作要准确敏捷,防止手触及器皿的无菌部分。

4. 火焰消毒

安装吸管帽,开启或封闭瓶口等操作时,都要经过火焰灼烧并在火焰附近进行。应避免玻璃器皿受热不均而破裂,避免用灼热器皿直接接触细胞造成死亡。

5. 实验器具不混用

吸取营养液、细胞悬液等液体时,应专管专用,尽量不混用,以防扩大污染或造成不同细胞间的污染。

6. 工作自始至终要保持一定的顺序性

组织和细胞在未做处理前,勿过早暴露于空气中。同样,培养液等在未用前不要过早开瓶,用后如不重复使用,应立即封闭瓶口,培养瓶等开瓶后均应保持斜位或平放,避免长时开口直立。

第二章 实验室常用仪器设备介绍

一、超净工作台

超净工作台具有使用方便,占据空间少等优点。超净工作台按气流方向不同分为外流式(气流水平地从内向外流)和侧流式(气流垂直地从上向下两侧流动)两类。有整机和组合式,有单人和双人操作之分,可根据需要选择。

1. 准备工作

在无菌操作之前,使超净台内空气循环,紫外线照射至少 10 min,以建立无菌环境。开始操作之前,还要用杀菌剂(酒精溶液广泛使用但须防火,洗必太溶液更好)擦洗工作台所用物件表面。

2. 操作程序

进行细胞培养过程中要始终保持良好的无菌技术。如果有液体溅出,须仔细用含杀菌剂的棉球擦去。

超净台内不要存放太多物品,因为空台时滤菌效率最高,物品的存放会引起气流的无序,因此移走不必要的物件是明智的。如果特殊操作需要大量的器材,应尽可能放置于工作台的后部,这样可减少对气流的干扰。

大多数超净台都有紫外灯可在停止工作时用来消毒超净台表面。但是不可在紫外灯照射下工作,因为 UV 线会灼伤皮肤、损伤眼睛。繁忙的实验室,还应防止不同培养物的交叉污染。因此,切勿在超净台内同时处理两种培养物。在处理完一种培养物后应清除所有器材,清洗工作表面,紫外线照射并空气循环 10 min 以上,再接着处理另一种培养物。

另外,即使一天间使用超净台有所间断,最好仍使空气循环连续不断,这样可维持工作表面的洁净,内部的气溶胶能被迅速干燥,可避免微生物生长。

3. 关闭程序

操作完成后、清除工作台内的所有器材,用杀菌剂清洗台面,打开紫外灯并维持空气循环大约 10 min,然后关闭即可。

二、高压消毒锅——湿热消毒法

消毒不仅只是杀灭微生物,而且具有减少有抗性孢子的效果。一般说,消毒有热消毒法包括干燥高温、高压蒸汽消毒,过滤除菌,射线消毒以及化学的方法等。采用哪种消毒方法由待消毒物体的性质及实验室要求而定。

1. 消毒方法

湿热消毒即高压蒸汽消毒,是最有效的方法。消毒时,消毒品不能装得过满,要有利于热湿蒸汽的侵入和空气的流出。一般用棉布袋包装。加热升温前,要打开排气阀。加热排出残留消毒器的冷空气,空气排除后关闭排气阀,开始升压,至所需压力时,调节加热器,使压力恒定,并开始计算时间。消毒过程中要经常检查压力是否恒定。注意不要因放气系统堵塞失灵造成意外。消毒时间是从压力达到 15 磅,温度达到 115℃ 时算起,一般需 30 min。消毒后,调节活塞使压力在 7 min 左右均匀下降至零,避免液体激烈沸腾。

2. 已消毒器材的存放