

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

免疫学实验

朱道银 吴玉章 主编



科学出版社

www.sciencep.com

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

免疫学实验

主 编 朱道银 吴玉章

副 主 编 吴雄文 唐恩洁

编 委 (按姓氏笔画排序)

尹丙姣(华中科技大学)

陈 全(重庆医科大学)

申元英(大理学院)

罗军敏(遵义医学院)

朱道银(重庆医科大学)

赵明才(川北医学院)

李成文(泸州医学院)

唐恩洁(川北医学院)

李晋涛(第三军医大学)

陶 崑(重庆医科大学)

杨晓燕(重庆医科大学)

黄 黎(泸州医学院)

吴玉章(第三军医大学)

鲍依稀(重庆医科大学)

吴雄文(华中科技大学)

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书的编写指导思想是打破传统实验教学模式,不受学生专业与层次的限制,以能力培养为主线,推进学生自主学习、研究性学习。对实验教学内容进行分类、整合,形成了基础实验操作技术、经典验证性实验、综合性实验、临床免疫实验、创新性实验五篇,共 27 章,85 个实验。完全能够满足各层次、各专业免疫学教学的需求。在基础实验操作技术中介绍了现代免疫学常用方法技术,例如细胞培养、基因克隆、动物模型的建立等,为创新性实验提供了铺垫。在创新性实验中,提出了有一定覆盖面和代表性的设计选题范例或方向,写作手法以启迪思维为主,但不失指导性与示范性,体现了我们注重学生能力培养所做的探索。临床免疫实验中介绍了目前临床常用的免疫学检验方法在疾病诊断、防治中的应用,例如微粒子酶免疫分析技术、电化学发光免疫测定、荧光偏振免疫测定法等。

本教材由教学经验和实验室经验丰富的教师编写,力求原理讲解清楚,方法介绍明白,不少内容是作者的经验之谈。全书约 32 万字,插图 57 幅。适用于五年制、七年制各专业基础免疫学和临床免疫学实验教学,也可供相关专业的教师、研究生以及从事临床检验、卫生防疫、免疫学研究的实验技术人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学实验/朱道银,吴玉章主编. —北京:科学出版社,2008
(高等医药院校基础医学实验教学系列教材)
ISBN 978-7-03-021940-4

I. 免… II. ①朱…②吴… III. 医药学:免疫学-实验-医学院校-教材
IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 067911 号

策划编辑:李国红 / 责任编辑:邹梦娜 李国红 / 责任校对:宋玲玲
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008 年 6 月第一次印刷 印张:14 1/2

印数:1—5 000 字数:325 000

定价:26.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈文林〉)

《高等医药院校基础医学实验教学 系列教材》编写指导委员会

主 任 雷 寒(重庆医科大学)
副主任 董 志(重庆医科大学)
张绍祥(第三军医大学)
委 员 王亚平(重庆医科大学)
李 和(华中科技大学同济医学院)
侯一平(四川大学华西基础医学与法医学院)
文 斌(川北医学院)
梁文妹(贵阳医学院)
李著华(泸州医学院)
范奇元(遵义医学院)
王燕蓉(宁夏医学院)
罗殿中(广西医科大学)

系列教材总策划 徐 晨(重庆医科大学)

总 序

医学是一门实践性极强的科学,医学实验教学在整个医学教育中占有极为重要的地位,因此,提高医学实验教学的质量将有助于提高整体医学教育水平。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是提高医学实验教学质量的重要环节。传统医学实验教学的主要任务是让学生验证理论知识、增加感性认识,但缺乏对学生创新能力的培养,因而实验难度不高,实验条件比较简单。随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展,必将对现代医学实验教学提出更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然的趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系改革力度,这对培养适应 21 世纪医学卫生事业发展的的高素质医学人才有重要意义。近年来,国内很多医科院校对传统医学教学实验建设模式进行较大力度的改革,积累了不少经验,很多经验值得借鉴。

围绕跨世纪医学生的培养目标,转变旧的传统观念,打破现行课程框架,重新构建新型基础医学实验教学体系的改革势在必行。现代高等医药院校实验教学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,充分认识并落实实验教学在学校人才培养和教学工作中的地位,形成理论教学与实验教学统筹协调的理念和氛围。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。要把学生从二级学科狭隘的“项目”实验教学提高到基于一级学科平台的“方法”实验教学,最大限度地拓展学生的专业视野。要实现以上目标,除了对实验室进行整合外,其核心内容就是实验教学教材。为了能够编写出一套适合中西部地区高等医药院校医学教育现状的实验教学教材,在科学出版社的大力支持下,《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会以重庆医科大学为主体,协同全国 26 所高等医药院校相关专业的专家教授共同编写了这套实验教学系列教材。全套共十本,包括《人体大体形态学实验》、《人体显微形态学实验》、《人体机能学实验》、《病原生物学实验》、《免疫学实验》、《生物化学与分子生物学实验》、《医用化学实验》、《医学物理学实验》、《法医学实验》和《核医学实验》。

本系列实验教材的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,借鉴国外同类实验教材的编写模式,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,按照基础医学实验教学逻辑和规律,将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验等板块进行编写。

本系列教材编写对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、基础、口腔、麻醉、影

像、药学、检验、护理、法医、生物医学工程、卫生管理、医学信息等专业需求,涵盖全部医学生的基础医学实验教学。各层次学生可按照本专业培养特点和要求,通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合修选实验课程学分。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,加上我们的认识深度和编写水平有限,本系列教材在编写过程中可能存在偏颇之处,请广大医学教育专家谅解,欢迎同行们提出宝贵意见。

《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会

2008年3月

前 言

医学免疫学是生命科学的前沿学科,也是医学生的主干必修课程之一。免疫学理论与技术的迅猛发展,使其与其他基础学科、临床学科的交叉融合更加深入,免疫学研究成果在临床的应用越来越广泛。现代免疫学技术已渗透到生命科学的各个领域,有力地推动了基础医学、临床医学乃至整个生命科学的不断发展。

随着 21 世纪高等教育教学改革的深入,实验教学的理念发生了一系列深刻的变化。实验教学是对学生探索精神、科学思维、实践能力和创新能力培养的重要途径,因此要从根本上改变实验教学依附于理论教学的传统观念,一改过去旧的实验印证理论模式,充分调动学生主动学习的积极性,注重能力培养,启迪学生创造性思维。免疫学的实验教学改革和其他学科一样,仍在思考与探索之中。正是基于实验教学观念的变化,为适应新形势的需要,我们编写了本教材,希望她能在免疫学的实验教学改革中发挥作用、接受检验。

本书的编写指导思想是打破传统实验教学模式,不受学生专业与层次的限制,以能力培养为主线,推进学生自主学习、合作学习、研究性学习。对教学内容进行了大胆的分类、整合,形成了基础实验操作技术、经典验证性实验、综合性实验、临床免疫实验、创新性实验五个篇。特别是在创新性实验篇中,体现了我们注重学生能力培养所做的探索。

基础实验操作技术包含了现代免疫学的基本技术及科研中常用方法技术,特别是为创新性实验提供了基本技术。经典验证性实验是免疫学最基本的、以验证理论为主的方法技术,能在单元教学时间内完成,适合各专业本科学生教学,主要培养学生的基本操作技能。综合性实验涉及多种技术,大多不能在单元教学时间内完成,属选修性质的实验,培养学生的独立工作能力和综合分析能力。临床免疫实验介绍了部分临床常用免疫学检测技术及其诊断意义,主要培养检验专业学生的实际操作能力,或为某些专业研究生提供特别的实验技术。创新性实验以培养学生基本的科学研究能力为主,对象是研究生或本科生科研小组。本篇不设置具体的实验方案与内容,在讲解一般原则的基础上,提出有一定覆盖面和代表性的设计选题范例或方向,写作手法以启迪思维为主,但不失指导性与示范性。五篇共 27 章,包括 85 个实验,完全能够满足各层次、各专业免疫学教学的需求。

本教材由教学经验和实验室经验丰富的教师编写,力求原理讲解清楚,方法介绍明白,不少内容是作者的经验之谈。适用于五年制、七年制各专业医学免疫学和检验系临床免疫学实验教学,也可供相关专业教师、研究生,从事临床检验、卫生防疫、免疫学研究的实验技术人员使用。

本书编写过程中得到了各参编院校领导和同行的大力支持,在此表示诚挚的谢意。

实验教学改革正在探索之中,本书的编写也是学习、交流、提高认识和不断创新的过程,不当之处在所难免。真诚希望广大师生和同行们在使用过程中提出宝贵意见和建议,以便在今后的修订中更臻完善。

朱道银 吴玉章

2008 年 2 月

目 录

第一篇 基本实验操作技术

第1章 血液标本的采集	(1)
实验一 人血液标本的采集	(1)
实验二 动物血液标本的采集及动物处死方法	(2)
第2章 细胞计数及活性测定	(6)
实验三 细胞计数的方法	(6)
实验四 细胞活力测定	(7)
第3章 细胞培养	(9)
实验五 细胞培养用器材的准备与无菌操作	(10)
实验六 原代细胞培养	(12)
实验七 细胞传代培养	(14)
实验八 细胞的冻存与复苏	(16)
第4章 动物模型的建立	(18)
实验九 免疫功能低下动物模型	(18)
实验十 移植性肿瘤动物模型	(19)
第5章 实验动物给药方法	(21)
实验十一 实验动物的捉持与固定	(21)
实验十二 实验动物的给药方法	(23)
第6章 目的基因的克隆与表达	(27)
实验十三 RT-PCR 扩增小鼠 IL-2 基因	(27)
实验十四 小鼠 IL-2 原核表达质粒的构建	(30)
实验十五 重组 mIL-2 的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定	(34)
实验十六 重组 mIL-2 的亲合层析纯化及浓度测定	(37)

第二篇 经典验证性实验

第7章 凝集反应	(41)
实验十七 玻片凝集试验	(41)
实验十八 试管凝集试验	(43)
实验十九 间接凝集试验	(44)
实验二十 协同凝集试验	(46)
第8章 沉淀反应	(48)
实验二十一 单向琼脂扩散	(48)
实验二十二 双向琼脂扩散	(50)

实验二十三	对流免疫电泳	(51)
实验二十四	免疫电泳	(53)
实验二十五	火箭免疫电泳	(55)
实验二十六	交叉免疫电泳	(56)
实验二十七	免疫比浊	(57)
第9章	补体参与的免疫反应	(60)
实验二十八	溶血试验	(60)
实验二十九	血清总补体活性测定	(61)
实验三十	补体依赖的细胞毒试验	(62)
第10章	免疫标记技术	(64)
实验三十一	酶联免疫吸附试验	(66)
实验三十二	酶联免疫斑点(ELISPOT)技术检测淋巴细胞分泌活性	(68)
实验三十三	间接免疫荧光法检测人外周血T细胞亚群	(72)
实验三十四	胶体金的制备	(73)
实验三十五	免疫金的制备	(75)
实验三十六	胶体金斑点层析技术检测早期妊娠	(78)
实验三十七	中性粒细胞吞噬功能的化学发光测定	(80)
第11章	免疫细胞的分离纯化	(81)
实验三十八	沉降法分离外周血白细胞	(81)
实验三十九	密度梯度离心法分离外周血单个核细胞	(83)
实验四十	小鼠脾细胞的制备	(85)
实验四十一	小鼠胸腺细胞的制备	(86)
实验四十二	小鼠骨髓树突状细胞的制备	(86)
实验四十三	小鼠腹腔巨噬细胞的制备	(88)
第12章	吞噬细胞功能测定	(89)
实验四十四	硝基四氮唑蓝还原试验	(89)
实验四十五	细菌计数法测定中性粒细胞吞噬功能	(90)
实验四十六	巨噬细胞吞噬功能测定	(91)
实验四十七	中性粒细胞趋化功能测定	(92)
第13章	超敏反应	(96)
实验四十八	豚鼠过敏反应	(96)
实验四十九	皮肤速发型超敏反应	(97)
实验五十	血清总IgE测定	(99)
实验五十一	特异性IgE的测定	(100)

第三篇 综合性实验

第14章	多克隆抗体的制备	(102)
实验五十二	免疫血清的制备	(102)
实验五十三	免疫血清的鉴定与纯化	(104)

第 15 章 单克隆抗体的制备	(109)
实验五十四 动物的选择与免疫	(110)
实验五十五 细胞融合	(112)
实验五十六 杂交瘤的筛选与克隆	(115)
实验五十七 单克隆抗体的制备与鉴定	(119)
实验五十八 单克隆抗体 Fab 片段的制备	(122)
第 16 章 免疫印迹	(125)
实验五十九 免疫印迹技术	(125)
第 17 章 免疫细胞检测	(131)
实验六十 溶血空斑试验	(131)
实验六十一 APAAP 桥联酶标法检测 T 细胞亚群	(133)
实验六十二 流式细胞术检测 T 细胞亚群	(135)
第 18 章 免疫细胞功能检测	(138)
实验六十三 淋巴细胞增殖试验	(138)
实验六十四 混合淋巴细胞反应	(140)
实验六十五 NK 细胞活性测定	(141)
实验六十六 细胞毒性 T 淋巴细胞活性测定	(143)
第 19 章 细胞因子的检测	(146)
实验六十七 白细胞介素-2 活性的检测	(146)
实验六十八 肿瘤坏死因子的生物学活性检测	(148)
第 20 章 细胞凋亡的检测	(150)
实验六十九 凝胶电泳法检测小鼠胸腺细胞凋亡	(150)
实验七十 末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法检测细胞凋亡	(152)
实验七十一 流式细胞术检测细胞凋亡	(154)

第四篇 临床免疫实验

第 21 章 感染性疾病的免疫学检测	(157)
实验七十二 IgM 捕获法检测 TORCH 感染特异性 IgM 抗体	(157)
实验七十三 双抗原夹心 ELISA 法检测人类免疫缺陷病毒抗体	(159)
实验七十四 ELISA 法检测乙型肝炎病毒抗原及特异性抗体	(161)
实验七十五 IgM 捕获法检测甲型肝炎病毒特异性 IgM 抗体	(163)
第 22 章 肿瘤标志物的检测	(165)
实验七十六 微粒子化学发光免疫法检测甲胎蛋白	(165)
实验七十七 微粒子化学发光免疫法检测癌胚抗原	(167)
实验七十八 微粒子化学发光免疫法检测其他肿瘤相关抗原	(169)
第 23 章 自身免疫性疾病的检测	(171)
实验七十九 斑点酶免疫法检测抗 ENA 抗体	(171)
实验八十 ELISA 检测抗甲状腺球蛋白抗体	(173)

第 24 章 内分泌疾病的免疫学检测	(175)
实验八十一 电化学发光免疫法检测甲状腺激素.....	(175)
实验八十二 电化学发光免疫法检测雌二醇.....	(178)
第 25 章 血液药物浓度的检测	(179)
实验八十三 荧光偏振免疫法测定血液环孢素浓度.....	(179)
实验八十四 荧光偏振免疫法测定血液卡马西平浓度.....	(182)
实验八十五 微粒子酶免分析法测定血液地高辛浓度.....	(183)

第五篇 创新性实验

第 26 章 实验的选题、设计、实施与总结	(185)
第 27 章 创新性实验参考选题	(193)
附录 1 常用实验仪器设备简介	(200)
附录 2 常用试剂配制	(207)

第一篇

基本实验操作技术

第1章 血液标本的采集

在免疫学的相关研究和临床检验中,常常需要收集人和实验动物的血液进行实验研究和检验分析,因此,正确采集人和实验动物的血液标本是免疫学最基本和最重要的操作技术。在标本采集前,应考虑检测的需要,决定采血方法、所需血量及选用合适的抗凝剂。本章主要介绍人和实验动物血液标本的采集,以及实验动物的处死方法。

实验一 人血液标本的采集

【实验目的】

掌握静脉采血的方法,了解皮肤采血法。

【实验原理】

采集的血液标本主要分为全血、血浆及血清等。

1. 全血 保留血液的全部成分,由血细胞和血浆组成。抗凝全血主要用于免疫细胞的分离、血细胞检查等。
2. 血浆 抗凝全血离心除去血细胞后的成分,用于血浆生理性和病理性化学成分的测定。
3. 血清 血液离体自然凝固后析出的液体部分,除纤维蛋白原等凝血因子在凝血时被消耗外,其他成分与血浆基本相同,更适用于大多数临床免疫学检查。

【实验材料】

真空采血管(普通血清管、柠檬酸钠或肝素抗凝管)、一次性双向采血针(常用7号)、持针器、止血带、三棱针或专用“采血针”、碘酊、消毒干棉签。

【实验方法】

血液标本的采集分为静脉采血法、皮肤毛细血管采血法和动脉采血法。动脉采血法由于其风险性较高,在临床上一一般很少使用。真空负压静脉采集血标本是近年来采用的一种

新静脉采血方法,此方法简便易行。

1. 静脉采血法 静脉采血时通常采用肘部静脉作为采血部位,如果肘部静脉不明显,还可用手背静脉或内踝静脉。婴幼儿由于肘部静脉较细和配合性差可从股静脉采血和颈外静脉采血,但要准备充分,注意其风险性。以真空负压静脉采血法为例做介绍。

选择合适的静脉,在穿刺点上方约 6cm 处系止血带,消毒,嘱被采血者握拳使静脉充盈。把一次性双向采血针安在持针器上,手持持针器,进行静脉穿刺,一次性双向采血针一端刺入血管。穿刺成功后,将真空采血管沿持针器后端稍用力推入,使双向采血针另一端针头刺破真空采血管的管盖,进入真空采血管,血液顺着压力差流入真空采血管内。待血液停止流动后,固定针头不动,取下该真空采血管,将其余备好的真空采血管依次推入、取出,最后拔出穿刺针,用干棉签按压针眼处片刻,整理用物。

2. 皮肤采血法 皮肤采血法主要用于需血量微小的检查项目。所获得的末梢血不单纯是毛细血管血,实际是微动脉、微静脉和毛细血管的混合血,并依采血时挤压的力度不同含有少量细胞间质和细胞内液。

轻轻按摩患者的采血部位(左手无名指指尖内侧),使局部组织自然充血,用碘酒、酒精消毒皮肤。干燥后,紧捏采血部位两侧,右手持一次性消毒采血针迅速刺入,深度以 2~3mm 为宜,稍加挤压血液自动流出。第 1 滴血液因混入组织液相对较多,多弃去不用。用微量吸管吸取血液至要求的刻度(化学、免疫学检验用尼龙毛细管吸取),然后用无菌干棉球压住穿刺点以止血。皮肤采血多选择左手无名指指尖内侧或耳垂作为采血部位。

【注意事项】

1. 血标本采集应规范操作。采血前患者应保持平静,一般应在清晨时间取血。
2. 皮肤采血应避开有炎症、化脓、冻伤等皮肤损害部位采血。皮肤出汗应先用干棉球擦干,以免稀释血液。采血时,不要用力挤压皮肤,血液应自然流出。
3. 静脉采血时,止血带压迫时间应小于 1min。研究证实若止血带结扎超过 2min,大静脉血流受阻而使毛细血管内压上升,可有血管内液与组织液交流,能使相对分子质量小于 5 000 的物质逸入组织液。随着压迫时间的延长,局部组织发生缺氧而引起血液成分的变化增大。
4. 需要血浆或血清标本时一定要防止溶血发生。在采集、转移、保管和分离血细胞时要防止溶血。发生溶血的主要原因有容器不清洁、接触水或化学溶剂、强力振荡和分离血细胞时操作不慎等。
5. 血标本的正确采集是获得准确、可靠实验结果的关键。在标本采集前,应仔细考虑实验的需要,决定采血方法、所需血量及选用合适的抗凝剂。

实验二 动物血液标本的采集及动物处死方法

【实验目的】

掌握免疫学试验中常用动物的血液采集方法,了解常用实验动物的处死方法。

【实验材料】

1. 实验动物 小鼠、大鼠、家兔、犬。

2. 器材 兔箱、兔固定台、犬固定台、大鼠固定板、剪刀、手术刀、注射器、玻璃毛细管、血色素吸管、止血带。

3. 试剂 1%肝素生理盐水溶液、饱和草酸钾溶液、3.8%的柠檬酸钠溶液生理盐水。

【实验方法】

(一) 大鼠与小鼠的采血方法

1. 鼠尾采血 当所需血量很少时采用本法。固定动物并露出鼠尾,将尾部浸入45~50℃温水中数分钟,使尾静脉充血,擦干,再用酒精棉球消毒。剪掉尾尖(约0.2~0.3cm),拭去第一滴血。然后用血色素吸管定量吸取尾血。采血完毕用干棉球压迫止血。亦可不剪尾,用7~8号注射针头连上注射器直接刺破尾静脉采血。

2. 眼眶静脉丛采血 当需用中等量的血液,而又避免动物死亡时采用本法。左手拇指及食指紧紧握住大鼠或小鼠颈部,压迫颈部两侧使眶后静脉丛充血,但用力要恰当,防止动物窒息死亡。右手持玻璃毛细管从右眼或左眼内眦部以45°角刺入,刺入深度小鼠约2~3mm,大鼠4~5mm。若遇阻力稍后退调整角度后再刺入,如穿刺适当,血液能自然流入毛细管内。得到所需的血量后,即除去加于颈部的压力,拔出玻璃毛细管,用干棉球压迫止血。

3. 断头采血 当需用大量的血液,而又不需继续保存动物生命时采用本法。左手握住动物,右手持剪刀,快速剪掉头颈部,倒立动物让血液滴入容器。需注意防止断毛落入容器中。

(二) 家兔采血方法

1. 耳缘静脉采血 本法为最常用的取血方法之一,可多次反复取血。将家兔固定于兔箱中,拔掉拟采血耳缘部细毛,用手指轻轻弹耳或电灯照射兔耳,使耳部血管扩张,然后消毒,直接用注射器进针耳缘静脉抽取血液,也可左手压迫耳根,用针头刺破静脉或以刀片在血管上切一小口,让血液自然流出。采血完毕用干棉球压迫止血。

2. 心脏穿刺采血 将家兔仰卧位固定在兔台上或由助手捉持,在左胸第2~4肋部剪毛,常规消毒。于第3~4肋胸骨左缘心跳最明显处穿刺,针头刺入心脏后即见血液涌入注射器。采血完毕迅速将针头拔出,这样心肌上的穿刺孔较易闭合,针眼处用酒精棉球压迫止血。体重2kg的家兔每隔2~3周可重复采血10~20ml。

3. 股动脉采血 将家兔仰卧固定在兔台上,左手拉直动物后肢,右手持注射器,以血管搏动为指标,将针头刺入股动脉。若已刺入动脉,即有鲜红色血液流入注射器。抽血完毕迅速拔出针头,用干棉球压迫止血。

(三) 犬的采血方法

1. 后肢外侧小隐静脉和前肢皮下头静脉采血 本法最常用,且方便。后肢外侧小隐静脉位于后肢胫部下1/3的外侧浅表的皮下,由前侧走向后上侧,前肢皮下头静脉位于前肢脚爪上方背侧的正前方。抽血前,将犬固定在犬固定台上或使犬侧卧,由助手固定好。剪去抽血部位的毛,常规消毒。一人用力压迫静脉近心端或用止血带绑紧,使静脉充盈,另一人持注射器进行静脉穿刺。取得所需血量后拔出针头,以干棉球压迫止血。

2. 耳缘静脉采血 当需少量血液或做血常规检查时,可用此法。剪毛后先用手指轻轻弹犬耳或电灯照射犬耳,使耳部血管扩张,然后消毒,直接用注射器进针耳缘静脉抽取血液,

也可左手压迫耳根,用针头刺破静脉或以刀片在血管上切一小口,让血液自然流出。采血完毕用干棉球压迫止血。

(四) 实验动物的处死方法

1. 大鼠和小鼠的处死方法

(1) 脊椎脱臼法:右手抓住鼠尾用力向后拉,同时左手拇指与食指用力向下按住鼠头。将脊髓与脑髓拉断,鼠便立刻死亡,这是小鼠最常用的处死方法。

(2) 断头法:用剪刀在鼠颈部将鼠头剪掉,迅速将鼠身倒置放血,由于剪断脑脊髓和大量失血,会很快死亡。但易引起肺淤血,因此,重点观察肺部病变的实验,不宜采用此法。

(3) 击打法:右手抓住鼠尾,提起,用力摔击其头部,鼠痉挛后立即死亡。或用小木锤用力击打鼠头部也可致死。

(4) 急性失血法:可采用鼠眼眶动脉和静脉急性大量失血方法使鼠立即死亡。左手拇指和食指尽量将鼠头部皮肤捏紧,使鼠眼球突出。右手持弯头小镊,在鼠右侧眼球根部将眼球摘去,并将鼠倒置,头向下,此时血液很快从眼眶内流出。

(5) 化学致死法:吸入 CO,大、小鼠在 CO 浓度为 0.2%~0.5% 环境中即可致死。

另外,皮下注射土的宁(小鼠 0.76~2.0mg/kg,大鼠 3.0~3.5mg/kg),吸入乙醚、氯仿均可致死。

2. 家兔和犬的处死方法

(1) 空气栓塞法:向动物静脉内注入一定量的空气,使动物发生空气栓塞,形成严重的血液循环障碍而死亡。一般家兔注入 20~40ml 空气,犬注入 80~150ml 空气即可致死。本法优点是处死方法简单、迅速,缺点是由于动物死于急性循环,各脏器淤血十分明显。

(2) 急性失血法:先使动物麻醉,暴露股三角区或腹腔,再切断股动脉或腹主动脉,立即喷出血液。用一块湿纱布不断擦去切口周围处的血液和血凝块,同时不断地用自来水冲洗流血,使切口处保持通畅,动物在 3~5min 内即可死亡。采用本法动物十分安静,对脏器无损害,但器官贫血比较明显,是目前活杀采集病理标本较好的方法。

另外,对家兔也可用木锤用力锤击其后脑部,损坏延脑,造成死亡。也可注入一定量的化学药物,如氰化钾溶液、甲醛溶液、土的宁等造成死亡。

【注意事项】

1. 实验动物一次采血量过多或采血过于频繁,都可影响动物健康,造成贫血甚至死亡。

2. 采血方法的选择,主要取决于实验的目的和所需血量的多少,所需血量较少时可刺破组织取毛细血管的血,当需血量较多时可做静脉采血,若需反复多次静脉采血时,应自远心端开始。

3. 若需抗凝全血,在注射器或试管内需预先加入抗凝剂,常用的抗凝剂有

(1) 草酸钾:常用于供检验用血液样品的抗凝。在试管内加饱和草酸钾溶液 2 滴,均匀浸湿管壁后,放入烘箱(80℃)烤干,包好备用。每管能使 3~5ml 血液不凝固,供钾、钙含量测定的血样不能用草酸钾抗凝。

(2) 肝素:取 1% 肝素溶液 0.1ml 于试管内,均匀浸湿试管内壁,放入烘箱(80~100℃)中烤干。每管能使 5~10ml 血液不凝固。市售的肝素注射液每毫升含肝素 12.500U,相当于肝素钠 125mg。

(3) 柠檬酸钠:3.8%的柠檬酸钠溶液 1 份可使 9 份血液不凝固,用于红细胞沉降速率测定。因其抗凝作用较弱而碱性较强,不适用于供化验用的血液样品。

【思考题】

1. 皮肤采血法为什么多选择左手无名指?
2. 使用真空采血管有哪些优点和用途?
3. 常用的大鼠与小鼠的采血方法有哪些?

(罗军敏)

第2章 细胞计数及活性测定

细胞计数法是用来计数细胞悬液中细胞数量的一种方法,一般采用血细胞计数板进行操作。细胞计数主要用于控制实验体系中反应细胞的数量。

细胞活性测定是测定样本中活细胞所占的百分比,也称细胞活力测定。如检查组织中分离细胞的细胞活力,以了解分离的过程对细胞是否有损伤作用;或检查冻存后复苏细胞的细胞活力,以了解细胞冻存和复苏后的效果。

本章主要介绍白细胞计数、培养细胞的计数,细胞活性测定的台盼蓝染色法和MTT法。

实验三 细胞计数的方法

【实验目的】

掌握用血细胞计数板作细胞计数的原理与方法。

【实验原理】

凡是分散的细胞悬液都可用血细胞计数板作细胞计数。将一定体积稀释的细胞悬液注入血细胞计数板,在显微镜下计数,经换算即可求出样品的细胞浓度。再根据实验要求配制成所需要的细胞浓度。

【实验材料】

1. 显微镜、改良 Neubauer 计数板、试管、吸管、微量吸管、滴棒。
2. 白细胞稀释液 2%冰乙酸溶液中加入 10g/L 结晶紫(或亚甲蓝)3 滴。
3. 分散的细胞悬液样品 分离的单个核细胞、培养细胞等。

【实验方法】

1. 稀释样品 用吸管吸取白细胞稀释液 0.38ml 于小试管中。用微量吸管吸取细胞悬液 20 μ l,将吸管插入小试管中白细胞稀释液的底部,轻轻放出样品,并吸取上层白细胞稀释液清洗吸管 2~3 次。将试管中样品与稀释液混匀。

2. 充池 将小试管中的细胞悬液混匀,用滴棒蘸取细胞悬液 1 滴,充入改良 Neubauer 计数池中,室温静置 2~3min,待细胞完全下沉。

3. 计数板 由一块厚玻璃制成,板上刻度分为 9 个大方格面积为 1mm²。中央大方格用于红细胞计数,被双线等分成 25 个中方格,每个中方格又划分为 16 个小方格(图 2-1)。

4. 计数 在低倍镜下计数四角 4 个大方格内的白细胞总数。

计数板与盖玻片组成计数池,计数池深度为 0.1mm。计完数后,需换算出每毫升悬液中的细胞数。由于计数板中每一方格的面积为 0.01cm²、高为 0.01cm,这样它的体积为 0.000 1cm³即 0.1mm³。由于 1ml=1000mm³,所以每一大方格内细胞数 $\times 10\ 000$ =细胞数/ml,故可按下式计算: