

21世纪生物学

基础课系列实验教材

张文学 主编

免疫学实验技术

 科学出版社
www.sciencep.com

21 世纪生物学基础课系列实验教材

免疫学实验技术

张文学 主编

图书在版编目(CIP)数据

免疫学实验技术 / 张文学主编. — 北京: 科学出版社, 2007

(21 世纪生物学基础课系列实验教材)

ISBN 978-7-03-020323-2

I. 免… II. 张… III. 免疫学—实验—高等学校—教材

IV. R395-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 122208 号

责任编辑: 刘学军
责任印制: 刘学军
封面设计: 刘学军
版式设计: 刘学军
文字编辑: 刘学军
校对: 刘学军
插图: 刘学军
责任校对: 刘学军
责任印制: 刘学军

科学出版社

北京

100071

http://www.science.cn

江苏徐州

南京理工大学出版社

南京理工大学出版社

科学出版社

北京

21.00 元

内 容 简 介

本书针对高等师范院校免疫学实验课而编写。包括传统的实验内容和一些较先进的实验技术,可分为验证性实验、综合性实验和设计性实验三种类型。每个实验包括实验目的、实验原理、实验器材、实验方法和注意事项等部分。书后附有免疫学实验中各种试剂的配制方法、注意事项等相关内容。

本书可作为高等师范院校相关专业实验用教材,也可供相关人员参考阅读。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学实验技术/张文学主编. —北京:科学出版社,
2007

(21 世纪生物学基础课系列实验教材)

ISBN 978-7-03-020292-5

I. 免… II. 张… III. 医药学:免疫学-实验-高等学校-教材 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 155306 号

责任编辑:陈 露 许 健/责任校对:连秉亮

责任印制:刘 学 /封面设计:耕者设计工作室

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

南京理工出版信息技术有限公司照排

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 9 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2007 年 9 月第一次印刷 印张:14 3/4

印数:1—3 200 字数:285 000

定价:24.00 元

《免疫学实验技术》编写人员

主 编 张文学

副主编 张新胜

编 委 (以作者姓氏笔画为序)

王坤英 李 莉 张文学 张新胜

陈凤曾 贾永芳 唐超智

前 言

免疫学是高等师范院校生命科学学院学生的必修课,实验是该课程的重要组成部分。随着国家提倡的素质教育进程的深入,实验课的重要性越来越突出。《免疫学实验技术》一书编写的目的就是满足高等师范院校免疫学实验教学的需要。本教材包括 44 个实验,可分为验证性实验、设计性实验和综合性实验三种类型,使用者可根据教学大纲规定的学时和学生的具体情况灵活选择。对于每个实验,我们编写了实验目的、实验原理、实验器材、实验方法和注意事项等内容,并在书后附有免疫学实验中各种试剂的配制方法、注意事项等相关内容,故本书的一大特点就是实用方便。

本教材由河南师范大学生命科学学院的张文学、张新胜、王坤英、贾永芳、李莉、唐超智和信阳职业技术学院陈凤曾共同编写。张新胜编写实验 1 到实验 6 和实验 8 至实验 12,贾永芳编写实验 16、19、20、21 与实验 24 到实验 37,陈凤曾编写实验 7、13、17、18 与附录一、二、三,王坤英编写实验 15、22、43、44 与附录四、五、六、七、八,唐超智编写实验 14,李莉编写实验 38 到 42,全书由张文学统稿。

由于编者水平所限,书中难免有不足之处,恳请读者指正。

目 录

Contents

前言	1
实验 1 实验动物的抓取、固定和注射方法	1
实验 2 实验动物的取血方法	5
实验 3 吞噬细胞的吞噬试验	10
实验 4 溶菌酶的测定	18
实验 5 血清补体的测定	20
实验 6 凝集反应	22
实验 7 沉淀反应	35
实验 8 补体的制备与补体单位的滴定	52
实验 9 溶血素的制备与溶血素单位的滴定	53
实验 10 血清溶血素含量的测定	55
实验 11 补体参与的反应	56
实验 12 红细胞 C3b 受体花环形成实验	59
实验 13 IgG 的提取、纯化及兔抗人 IgG 免疫血清的制备	60
实验 14 单克隆抗体技术	64
实验 15 人单克隆抗体的制备	72
实验 16 双特异性抗体的制备	75
实验 17 石蜡切片制作方法	82
实验 18 免疫标记技术	86
实验 19 小鼠免疫系统形态结构	99
实验 20 免疫系统显微结构	101
实验 21 大颗粒淋巴细胞和肥大细胞的形态观察	104
实验 22 溶血空斑试验	106
实验 23 反向空斑形成实验	108
实验 24 淋巴细胞转化实验	110
实验 25 白细胞移动抑制试验	113
实验 26 淋巴细胞分离技术	114
实验 27 混合淋巴细胞反应	117



实验 28	E 玫瑰花环试验	119
实验 29	淋巴细胞 α -醋酸萘酯酶的检测	121
实验 30	T 细胞亚群检测	123
实验 31	T 细胞和 B 细胞的分离技术	126
实验 32	EAC 花环形成实验	133
实验 33	抗体生成细胞的测定——定量溶血分光光度法	135
实验 34	小鼠红细胞花环实验	136
实验 35	豚鼠过敏性休克试验	138
实验 36	单向辐射红细胞溶解实验	139
实验 37	皮肤超敏反应试验	140
实验 38	NK 细胞的分离	141
实验 39	小鼠脾脏 NK 细胞活性测定	145
实验 40	细胞因子活性的检测方法	148
实验 41	循环免疫复合物的检测	157
实验 42	人白细胞抗原(HLA)的分型	169
实验 43	免疫 PCR	184
实验 44	细胞凋亡的 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析	188
附 录		191
附录一	常用血液抗凝剂的配制及用法	191
附录二	常用消毒液的配制及用途	193
附录三	常用化学脱毛剂的配制和小鼠品系	195
附录四	常用试剂和溶液的配制	196
附录五	常用固定剂、封固剂和粘贴剂的配制	211
附录六	染色液和显色底物的配制	216
附录七	玻璃容器的洗涤及各种清洁液的配制	221
附录八	常用计量单位及换算	223
参考文献		226

实验 1 实验动物的抓取、固定和注射方法

【实验目的】

1. 学习实验动物的抓取和固定方法。
2. 练习对实验动物的几种注射方法。

【实验原理】

免疫学实验离不开实验动物,如为了制备抗体或观察药物对机体免疫功能的影响,需将抗原或药物注入动物体内。这就涉及如何抓取、固定动物和怎样给动物注射的问题。掌握实验动物的正确抓取、固定和注射方法是进行免疫学实验的基础。

【实验器材】

1. 器具

注射器及针头、剪刀、碘酒棉球、酒精棉球、消毒干棉球、酒精灯、消毒煮沸器、电炉、纱布、镊子、灌胃针头(可用 7 号针头磨平,边缘磨光、磨圆代替)。

2. 材料

家兔、小鼠、豚鼠、无菌生理盐水。

【实验方法】

1. 皮下注射法(sc,以豚鼠为例)

(1) 助手用一手夹持动物肩部,并用大拇指钩住下颌部,将动物提起,另一手在下方将动物托起,手心向上,用食指、中指及无名指夹住后腿(图 1.1)。

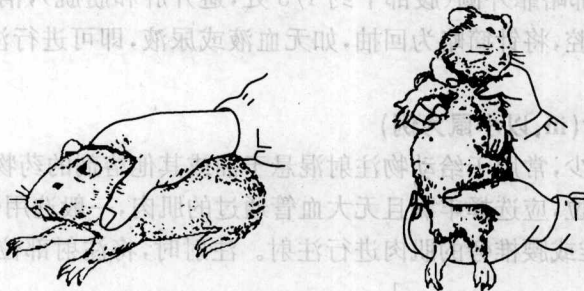


图 1.1 豚鼠抓取方法示意图

- (2) 用碘酒和酒精棉球消毒豚鼠注射部位。注射者将皮肤提起,用预先准备好的内装无菌生理盐水的注射器针头刺入皮下,注射 0.5 ml。注入时阻力不大,而且放下皮肤后皮下呈扩散状隆起者为正确注射(图 1.2)。

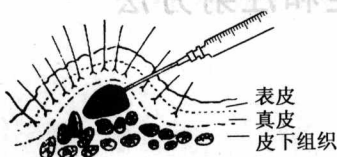


图 1.2 皮下注射法示意图

2. 皮内注射法(ic,以豚鼠为例)

- (1) 助手按上法将豚鼠抓紧。
(2) 注射者在其腹部任选约 2 cm² 的面积剪

毛,消毒皮肤。

- (3) 将 5 号针头连接在 1 ml 的注射器上,吸取无菌生理盐水,针孔向上平刺入皮内,注入 0.1~0.2 ml,如准确注射在皮内,则注射部位形成坚实的水泡(图 1.3)。

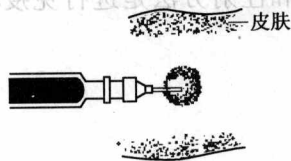


图 1.3 皮内注射法示意图



图 1.4 小鼠的抓取方法示意图

3. 腹腔注射(ip,以小鼠和家兔为例)

小鼠:

- (1) 用右手拖鼠尾,使其爬行于较粗糙的台面上(可用试管篓倒扣于桌面代替),再突然用左手拇、食指抓紧小鼠颈项及其两耳(图 1.4),翻转后用左手无名指及小指夹住鼠尾及后肢。

- (2) 消毒腹壁,把 0.3 ml 无菌生理盐水注入其腹腔。

家兔:

- (1) 将家兔四肢固定在解剖台上,腹部朝上。

- (2) 在下腹部略靠外侧(腹部下约 1/3 处,避开肝和膀胱),消毒该处皮肤,将针头垂直刺入腹腔,将针筒略为回抽,如无血液或尿液,即可进行注射。注入 1 ml 无菌生理盐水。

4. 肌肉注射(in,以小鼠为例)

此法用得较少,常用于给动物注射混悬于油或其他溶剂的药物。

肌肉注射部位,应选择丰满且无大血管通过的肌肉,一般选用臀部。亦常取大腿内(外)侧、颈椎或腰椎旁的肌肉进行注射。注射时,将注射部位的被毛剪去(小动物可不剪毛)。注射器连接 6 $\frac{1}{2}$ 号针头,由皮肤表面垂直刺入肌肉,略回抽如无回血,即可注射。

给小鼠作肌肉注射时,用左手抓住鼠两耳及头部皮肤,右手取连有接 $5\frac{1}{2}$ 号针头的注射器,将针头刺入大腿外侧肌肉,注入0.2 ml 无菌生理盐水。

5. 静脉注射(iv,以家兔和小鼠为例)

家兔:

(1) 抓兔时,轻开笼门,勿让兔受惊。将手伸入笼内,于兔前面阻拦其跑动,当兔匍匐不动时,用右手抓住颈部皮肤将兔提起,左手随之托住其臀部(图1.5)。

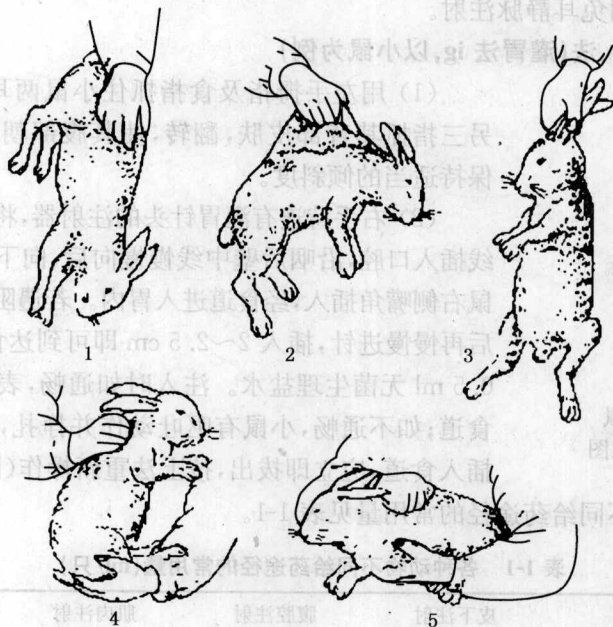


图1.5 抓兔方法示意图

1、2、3为不正确的抓取方法:方法1易伤两肾,方法2易造成皮下出血,方法3可伤两耳;4、5为正确的抓取方法:抓住颈后皮肤,并用手托起。

(2) 将家兔固定于特制木箱中或由助手按在桌上(一手轻轻按其颈部,一手轻扶耳根,使耳向前)。剪去或拔去兔耳缘部被毛。

(3) 用棉球或少许纱布蘸取 $45\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温水于耳翼边缘的血管上,或用手指轻弹并轻揉兔耳,使静脉充血,助手以一手将耳根固定。

(4) 注射者以左手持该耳,以右手用注射器将预先准备的0.5 ml 无菌生理盐水由血管注入,针头刺入时与静脉几乎相平行。如注射正确,则针下阻力很小,亦可见血管变色;如阻力较大或皮下隆起即停止注射,重新刺入血管,或另选部位;注入液体时应将针头与耳同时固定,以免针头退出血管。

(5) 注射完毕用消毒干棉球压住注射部位,然后拔出针头,再压片刻以防

出血。

小鼠：

(1) 将小鼠置于小试管架中，鼠尾自网眼中露出。

(2) 将鼠尾浸于盛有 45~50℃ 温水的试管中 1~2 min，或用棉花蘸温水揉擦尾部使尾静脉充血，可见三根暗红色的尾静脉。

(3) 选最明显的一条尾静脉，用左手三指捏住鼠尾，在距尾尖 2~3 cm 处（此处皮薄静脉浅，易刺入）进针，针头与尾静脉几乎相平行，注入 0.3 ml 无菌生理盐水。其余操作同兔耳静脉注射。

6. 胃内注入法（灌胃法 ig，以小鼠为例）



图 1.6 小鼠灌胃方法示意图

(1) 用左手拇指及食指抓住小鼠两耳及头部皮肤，另三指抓其背部皮肤，翻转，使其腹部朝上，头部向上，保持适当的倾斜度。

(2) 右手持连有灌胃针头的注射器，将针头对准正中线插入口腔，沿咽后壁中线慢慢向后、向下插入。亦可沿鼠右侧嘴角插入，经食道进入胃内。若遇阻力则后退稍许后再慢慢进针，插入 2~2.5 cm 即可到达食道下端，注入 0.5 ml 无菌生理盐水。注入时如通畅，表明针头已插入食道；如不通畅，小鼠有呕吐动作并挣扎，则表明针头未插入食道，应立即拔出，按上法重新操作（图 1.6）。

各种动物不同给药途径的常用量见表 1-1。

表 1-1 各种动物不同给药途径的常用量 (ml/只)

动物	灌胃	皮下注射	腹腔注射	肌肉注射	静脉注射
小鼠	0.4~0.6 (0.8~1.0)	0.2~0.4 (0.5)	0.2~0.4 (0.5)	0.1~0.2	0.2~0.4 (0.5)
家兔	20~30 (100)	1~2	3~6	0.2~0.6	4~6
豚鼠	3~4 (4~6)	0.5~1	2~5	0.2~0.5	2~4

注：() 内的数字为一次给予的能耐受的最大量 (ml/只)

【注意事项】

1. 选择大小适宜、注射针筒与筒芯号码一致的注射器，并先吸入清水，试验其是否漏水，漏水的注射器不能使用，因其注射量不准确，且易引起污染及传染。

2. 视选择的动物及注射途径的不同而选用大小合适的针头，并先试验是否通气或漏水。

3. 消毒时将筒芯从筒中拔出,用脱脂纱布以相同的方向先包针筒后包筒芯,置煮沸消毒器中,选好针头,包好纱布置煮沸消毒器另一端,同时放入镊子一把,加入自来水,以覆盖注射器为度,煮沸 10 min(从水沸之时算起)。

4. 消毒完毕后,用镊子取出注射器,置筒芯于针筒中,针头牢固地装在针筒的针嘴上,使其斜面与针筒上的刻度方向一致,吸入注射材料,准备注射。

5. 吸入注射材料后,应将注射器内的空气排尽,若注射材料具有传染性,在排气时应以酒精棉球包住针头,以免传染材料流出。

6. 小鼠腹腔注射时应将小鼠的头部向下,以避免针头刺入内脏。针斜刺入皮肤后,转直,再向下直刺少许即可进入腹腔,其目的是使两个针眼不在一条直线上,可避免拔出针头时注射材料流出污染皮肤及造成注射剂量不足,在注射传染材料时,应特别注意。

7. 注射完毕后,如注射材料具有传染性,应以消毒器中的水抽吸几次,然后取下针头,抽出筒芯放入消毒器中与抽吸洗过的水一并煮沸消毒,煮毕后洗净注射器及针头置干燥箱中烘干后,分别收藏备用。

8. 灌胃法的要点是小鼠要固定好,头和颈部保持极平;进针方向正确,一定要沿正中线或右口角进针,再顺着食道慢慢插入,不可硬往里插,否则注入肺内会造成死亡。

实验2 实验动物的取血方法

【实验目的】

1. 熟悉各种动物的取血方法。
2. 了解常用实验动物的处死方法。

【实验原理】

进行免疫学实验,经常涉及从实验动物体内取血,如:为了制备抗体或观察药物对机体免疫功能的影响,常将抗原或药物注入动物体内,停一段时间后从动物体内取血观察分析。从动物体内取血的方法有数种,方法的选择依实验的需要和动物的特点而定。掌握正确的实验动物取血方法对某些免疫学实验是非常重要的。

【实验器材】

1. 器具

注射器、针头、剪刀、镊子、橡皮管、酒精棉球、动脉夹、酒精灯、固定盒、固定板、

刀片、无菌尖嘴滴管、无菌平皿、无菌干棉球、10%的可卡因、乙醚、氯仿、棉纱手套、手术台、纱布、弯头剪刀、无菌烧瓶、塑料管、黑丝线、无菌三角瓶和试管等。

2. 材料

小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、鸡、羊、6%液体火棉胶、血液抗凝剂(见附录一)。

【实验方法】

1. 尾静脉取血(以小鼠为例)

(1) 将小鼠装入固定盒内,露出尾巴,或将小白鼠置于倒扣在桌面的小试管篓内,鼠尾自网眼伸出。

(2) 用纱布蘸取约 50℃ 的温水揉擦小鼠尾部,亦可将鼠尾直接浸入盛温水的试管中,使尾静脉充分充血,擦干水,用剪刀剪去尾尖,静脉血即可流出。

(3) 用手轻轻从尾根部向尾尖部挤,可取得数滴血。

(4) 用无菌干棉球压迫止血,伤口处涂上 6% 的火棉胶以形成薄膜保护伤口。每次采血,可按上法剪去一小段鼠尾。

本法适用于需血量少但又需多次间隔采血的实验。也可以用交替切割三根尾静脉的方法取血,即采血时用刀片切破一小段静脉,用无菌尖嘴滴管吸取由伤口流出的静脉血,每次可取血约 0.4 ml。取血后用无菌干棉球压迫止血,一般经 3 天伤口可结痂痊愈,此法特别适用于大鼠。

2. 眼眶动脉和静脉取血(以小鼠为例)

(1) 左手抓住小鼠,并用拇指和食指尽量将其颈部皮肤捏紧使鼠的眼球突出,动作要快。

(2) 右手用一小镊子于小鼠的眼球根部将眼球摘去。

(3) 将血滴于试管内,达到所需量时,用无菌干棉球压迫眼眶止血。

此法取血量较多,一只小白鼠一次可取血 0.5 ml 左右(大鼠每次可采血 0.5~1 ml),这样采血动物可存活,数天后可从另一眼眶取血。

3. 眼眶后静脉丛取血(以小鼠为例)

(1) 左手捉住小鼠,并用食指和拇指握住颈部使眼球外突。由于对颈部的压力而使脑血管淤血,可使感觉暂时丧失(可滴入 10% 的可卡因,使眼部痛觉麻痹)。

(2) 取一根长约 8 cm 的无菌玻璃毛细吸管(内径约 1 mm),用抗凝剂湿润其内壁,将毛细吸管尖端插入内侧眼角,并和鼻侧眼眶壁平行向喉部方向推进约 4~5 mm 即可达眼眶后静脉丛,血液自然进入吸管内。

(3) 达所需量时,左手放松,出血即停止,拔出毛细吸管(图 2.1)。

此法一次可取较多血液(小鼠约 0.2 ml,大鼠约 0.5 ml),并可在数分钟内于同一穿刺孔内重复取血。

大鼠眼眶后静脉丛取血方法见图 2.2。

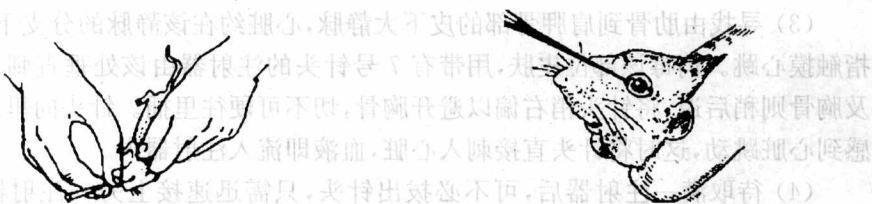


图 2.1 小鼠眼眶后静脉丛取血方法 图 2.2 大鼠眼眶后静脉丛取血方法

4. 断头取血(以大鼠为例)

(1) 一人戴上棉纱手套,右手握住大鼠的头部,左手握其背部,使颈部露出。

(2) 另一人持剪刀剪掉鼠头,立即将鼠颈向下提起动物,将血滴入容器内。

小鼠断头取血与大鼠同,但不必戴手套且一人操作即可。用此法取血量多,一只小鼠可采 0.8~1.2 ml 血,大鼠 5~10 ml。

5. 背中足静脉取血(以豚鼠为例)

(1) 一人抓住豚鼠,将其左或右后肢膝关节伸直。

(2) 另一人消毒豚鼠的脚背面并找出背中足静脉,以左手的拇指和食指拉住其趾端。

(3) 右手持注射器刺入静脉,徐徐抽取血液,达所需量时,用无菌干棉球压迫止血并拔出针头,此法取血可达 1~3 ml。

6. 心脏取血(以家兔、鸡为例)

家兔心脏取血:

(1) 将兔仰卧固定于手术台上,用弯头剪刀剪去左前胸相当于心脏部位的兔毛,剪下的兔毛放入一盛少量水的废液杯中。

(2) 用酒精棉球消毒局部皮肤。

(3) 用左手触摸左侧由下向上第 3~4 肋间,选择心跳最明显处进针,进针部位一般为第三肋间隙,胸骨左缘 3 mm 处。当针头接近心脏时,就会有心跳的感觉,此时将针头向里插入少许即进入心室。

(4) 如确实刺入心脏,血液会因心搏的力量自然进入注射器,徐徐抽取血液,待取满一注射器后,拔出针头,并用干棉球按压针刺处,以防出血。

(5) 取下针头,将血液轻轻注入无菌平皿或试管内。以免血球破裂引起溶血。

此法常用于制备抗血清及补体。豚鼠的心脏采血与家兔相同,但进针部位一般在胸骨左缘第 4~6 肋间隙。

鸡心脏取血:

(1) 用绳子扎紧鸡腿及翅膀。用棉花或纱布蘸取热水湿润左侧胸部,拔去相当于心脏部位的羽毛。

(2) 将鸡的左侧向上横卧于固定板上,鸡头向左侧固定。

(3) 寻找由肋骨到肩胛骨部的皮下大静脉,心脏约在该静脉的分支下侧,以食指触摸心跳。消毒该部位皮肤,用带有 7 号针头的注射器由该处垂直刺入。如触及胸骨则稍后退,将针头稍右偏以避免胸骨,切不可硬往里插。针头向里刺入后可感到心脏跳动,这时将针头直接刺入心脏,血液即流入注射器内。

(4) 待取满一注射器后,可不必拔出针头,只需迅速接上另一注射器继续取血。每只成年公鸡取血 30 ml 不致死亡,经 3~6 个月可再次采血。

(5) 取下针头,将注射器内的血液轻轻注入容器内。

7. 耳中央动脉取血(以家兔为例)

(1) 将兔置于固定盒内,用手揉擦兔耳,或用热水敷(敷后擦干水分)使兔耳充血。

(2) 在兔耳中央有一条较粗、颜色较鲜红的血管为中央动脉。以左手固定兔耳,右手持注射器,于动脉末端沿着与动脉平行的向心方向刺入血管,即可见血液进入针筒。此法一次可抽 15 ml 血。取血后应用无菌干棉球压迫止血。

因兔耳中央动脉易发生痉挛收缩,故抽血前必须使兔耳充分充血,使动脉血管扩张后立即进行抽血,否则时间一长血管发生痉挛收缩,取血困难。另外取血时针头不要太细,常用 6 号针头。进针部位不能太近耳根部,因耳根部软组织厚,血管较深易刺穿血管造成皮下出血,一般从中央动脉末端开始进针。也可当兔耳中央动脉充分充血后,于近耳尖中央动脉分支处,用刀片轻轻将血管切破,血即流出,用装有抗凝剂的试管接血,此法一次可取较多血液。取血后应注意用无菌干棉球压迫止血。

8. 耳缘静脉取血(以家兔为例)

操作方法基本与耳中央动脉取血方法相同。但所用的针头略小(一般用 5.5 号针头)。此法一次可取 5~10 ml 血。

9. 翼根静脉取血(以鸡为例)

(1) 将鸡腿用绳子扎紧,展开鸡翅,露出腋窝部。拔去该部位羽毛,便可见明显的翼根静脉。

(2) 消毒该部位皮肤,并用左手拇指和食指压迫此静脉向心端,使血管扩张。

(3) 右手取连有 5.5 号针头的注射器,针头沿翼根向翅膀方向沿着静脉平行地刺入血管,慢慢抽取血液。一般一只成年公鸡一次可抽取 10~20 ml 血液。常用约 2 kg 的雄性来航鸡抽血,因它的血管清晰,容易抽得血液。

10. 颈静脉采血(以绵羊为例)

(1) 由一人骑在羊背上,一侧身依着墙边。双手扶住羊下颚及耳朵,将羊头向上仰,以使其颈皮伸直,或用绳子将羊捆绑,由一人用双手握住羊下颌,向上固定住头部。

(2) 在颈侧部用弯头剪刀剪去羊毛,局部用酒精消毒。

(3) 于颈部近心端处缚以橡皮管使颈静脉扩张,右手取连有粗针头的注射器沿静脉以 30° 的角度由头端向心脏方向刺入血管,血即进入针筒,松开橡皮管,缓缓抽取血液。

实验2 实验动物的取血方法

(4) 取血完毕,拔出针头。采血部位以无菌干棉球压迫止血,同时取下针头,迅速地血液注入装有抗凝剂的容器中,摇匀;或将血液注入盛有玻璃珠的无菌烧瓶内,振摇数分钟,以脱去纤维蛋白来防止凝血。

(8) 各种动物采血致死量和非致死量见表 2-1。

表 2-1 常用动物的采血量

动 物	采血致死量(ml)	采血非致死量(ml)
小白鼠	0.5~1.0	0.3~0.4
豚 鼠	10~20	5~10
家 兔	60~80	20~30
鸡	40~50	15~30

11. 颈动脉放血(以家兔为例)

(1) 将兔仰卧并固定其四肢,头部略放低暴露其颈部。

(2) 剪去颈部兔毛,消毒后沿颈中部纵切皮肤约 10 cm 长。

(3) 用止血钳将皮分开、夹住,小心剥离皮下结缔组织,露出肌层后用止血钳分开肌肉,即可见搏动的颈动脉,剥离颈动脉旁的迷走神经。

(4) 在颈动脉的远心端,用黑丝线结扎紧,然后在近心端用动脉夹夹住(动脉夹头部用塑料管或其他包裹,以免损伤动脉),在二者之间约留 4 cm 长的血管。

(5) 消毒后,用一黑丝线穿过血管,提起血管后垫上小指,用无菌小剪刀在动脉壁上剪一斜缺口,取长约 25 cm(直径为 1.6 mm)的塑料管,将一端剪成斜面,并将此端插入颈动脉中,用上述穿过血管的黑丝线结扎固定塑料管。将塑料管的另一端放入无菌三角瓶内。

(6) 轻轻放开动脉夹,血自行流入三角瓶,当血流缓慢时,可将动物固定架的后肢端抬高,以增加放血量。颈动脉放血可收集兔血 100 ml 以上。

此法多用于分离血清以制备抗体。

【注意事项】

1. 抽血所用的针头、注射器应干燥,否则会引起溶血。

2. 抽血所用的注射器和针头,用过后应立即冲洗或浸泡,否则血液凝固会造成针筒与筒芯黏着,针头堵塞。注射器清洗干净后,应注意配套放好,烘干。

3. 颈动脉放血后期家兔会因心脑血管缺血进行挣扎,此时应用手固定好兔头部,以免因兔挣扎而使塑料管从颈动脉中滑出。

附:实验动物的处死方法

免疫学实验常常要用动物的新鲜脾脏、胸腺等器官,那么就要先将动物处死,以便取出有关器官进行实验。实验用过的动物也需处死,以便将其掩埋或焚烧。

下面介绍大鼠、小鼠、家兔和豚鼠常用的处死方法：

1. 大白鼠、小白鼠处死方法：

(1) 脊椎脱臼法：右手用力向后拉住小鼠尾巴，同时左手拇指和食指用力向下按住鼠头，即可使其脊椎脱臼，立即死亡(图 2.3)

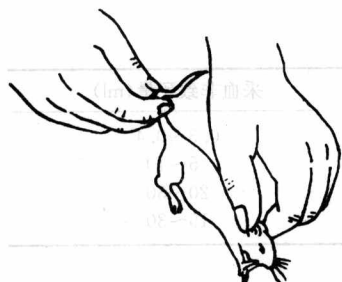


图 2.3 小鼠颈椎脱臼方法

(2) 断头法：用剪刀将鼠头剪下。

(3) 击打法：用手抓鼠尾将其提起，用力摔击其头部，或用工具击打鼠头而致死。

(4) 急性失血法：用去眼球放血法放血致死。

(5) 化学致死法：将鼠放入含 0.2%~0.5% CO 的容器中，或使其吸入乙醚、氯仿致死。

2. 豚鼠、家兔的处死方法：

(1) 空气栓塞法：于家兔等动物的静脉内注入 20~40 ml 空气，即可死亡。由于空气进入静脉后，随心脏的跳动使血液与空气相混致血液成泡沫状，随血液循环到达全身，造成动脉阻塞，而使动物很快死亡。

(2) 急性失血法：切断动物的股动、静脉，并用湿纱布不断擦去股动脉切口处的血液和血块，使切口畅通，3~5 min 可使动物致死。

(3) 破坏延脑法：用木棍用力锤击动物的后脑部，损坏其延髓使其致死。

(4) 化学药物致死法：静脉内注入 10% KCl 溶液约 10 ml，使动物心肌收缩力丧失，心脏急性扩张停跳而死。另外，静脉内注入 10% 的福尔马林溶液 10~20 ml 可使动物血液内蛋白质凝固引起血循环障碍及缺氧而死。

实验 3 吞噬细胞的吞噬试验

I 中性粒细胞的吞噬作用

【实验目的】

熟悉和掌握中性粒细胞吞噬试验的方法与用途。

【实验原理】

血液中的中性粒细胞即小吞噬细胞，通过趋化、调理、吞入和杀菌等几个步骤，能吞噬和消化衰老、死亡细胞及病原微生物等异物。本实验将白色葡萄球菌和中性粒细胞混合，并提供适当的条件，观察中性粒细胞吞噬白色葡萄球菌的现象，判