

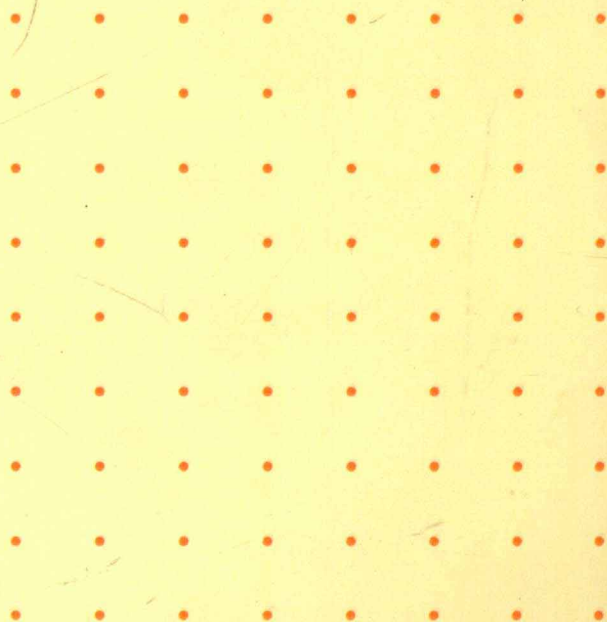
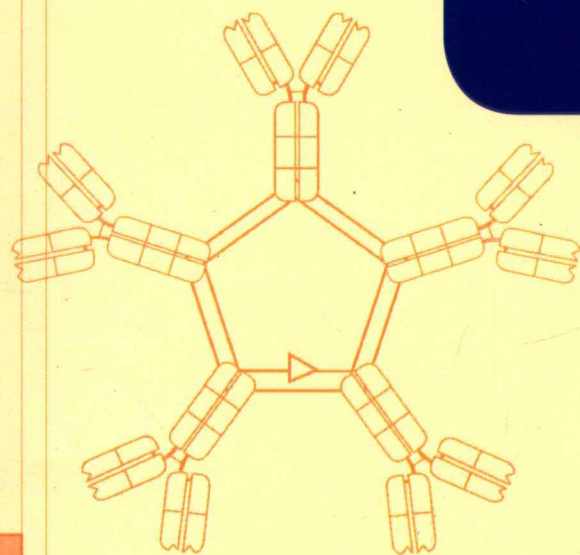


普通高等教育“十一五”国家级规划教材

Principles and Techniques of Immunology

免疫学原理 与技术 (实验指导)

主 编 杜 冰



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

Principles and Techniques of Immunology

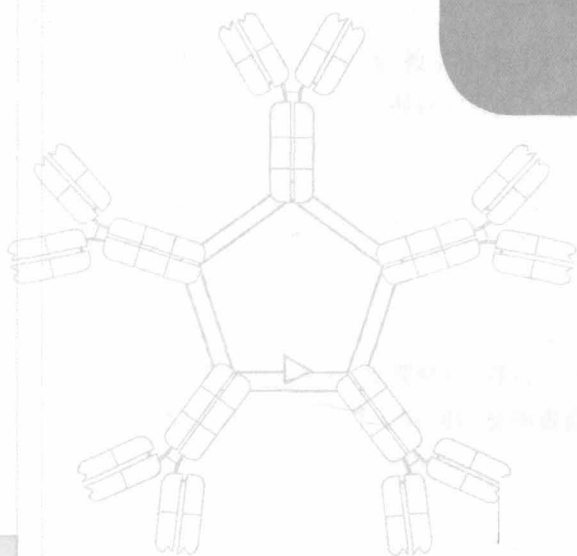
免疫学原理 与技术 (实验指导)

Miyouxue Yueli yu Jishu

主 编 杜 冰

编 者 (按姓氏笔画为序)

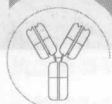
任 华 杜 冰 章 平



高等教育出版社·北京

HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

目 录



实验室规则	1	实验十三	免疫细胞花结实验——细胞表面标志的检测	29
实验一 大肠杆菌多克隆抗体的制备	2	实验十四	补体依赖的微量淋巴细胞毒实验——HLA 血清分型	32
实验二 多克隆抗体的分离和纯化	4	实验十五	抗体生成细胞的检测技术——体液免疫功能的评价	34
实验三 双向免疫扩散实验——抗体效价的滴定	7	实验十六	酶联免疫斑点实验——干扰素 γ 活性检测	36
实验四 火箭免疫电泳实验——抗原浓度的测定	9	实验十七	免疫共沉淀技术——蛋白质相互作用研究	38
实验五 SPA 协同凝集实验——颗粒性抗原的检测	11	实验十八	染色质免疫共沉淀——基因转录调控研究	40
实验六 红细胞凝集实验——ABO 血型的鉴定	13	实验十九	病毒蚀斑实验——I 型干扰素活性检测	43
实验七 补体溶血实验——补体活性的评价	15	实验二十	免疫组织化学技术——细胞的组织定位	45
实验八 免疫荧光技术——蛋白质的亚细胞定位	17	附录 1	免疫实验中动物的基本操作方法	48
实验九 流式细胞术——淋巴细胞表面标志的检测	20	附录 2	蛋白 A 和蛋白 G 与各种抗体亚类的结合性质表	57
实验十 酶联免疫吸附实验——分泌型蛋白的检测	22	附录 3	常用试剂配方	59
实验十一 免疫印迹技术——蛋白质抗原的检测	24			
实验十二 巨噬细胞吞噬实验——吞噬功能的评价	27			

实验室规则

实验室是老师和同学们进行科学研究，完成实验教学任务的场所，无关人员未经允许不得擅自进入，参与实验的人员进入实验室后必须严格遵守实验室的各项规章制度。

1. 进入实验室的人员必须衣着整洁，穿着统一的实验服装，禁止穿背心、运动短裤、拖鞋等进入实验室。
2. 要以科学、严肃的态度对待实验，遵守实验室各项规章制度，保持室内安静，禁止在实验过程中嬉戏、打闹及大声喧哗，影响他人的工作。
3. 不得在实验室中进行与实验和教学无关的活动，严禁将饮料和食物带入实验室，禁止在实验室饮食、抽烟。
4. 进行实验前，应对实验内容进行充分的预习和准备，了解实验原理，明确实验目的和操作步骤，熟悉所要使用的药品性质和仪器的操作流程。
5. 实验过程中必须严格遵守实验室的水电安全规程。注意节约用水，涉及需要使用带电设备的，务必注意用电安全，实验结束后及时关闭电源。
6. 严禁在实验室保存易燃、易爆物品，严格控制有毒、有害或腐蚀品的使用，防止药品、试剂间的交叉污染，有毒、有害物品使用后应倒入指定地点后统一处理。
7. 注重实验室的安全，发生突发事件后应首先向老师汇报，并及时采取补救措施，凡违反操作规程或不听从教师指导而酿成事故者，应按有关规定进行严肃处理。
8. 爱护公共财物，节约试剂材料，不得擅自将实验室任何物品带出。严格按照操作规范使用仪器，如将仪器、用品损坏，应报告教师并按规定处理。使用完仪器，及时清洁并做好记录。
9. 涉及实验动物的实验，务必遵守相关的动物操作守则，保护动物的权利，严禁无故虐待及伤害实验动物。
10. 必须真实地记录实验结果，认真地进行分析，得出结论。遇到与理论不符的结果，应探讨其原因，设计实验检验、排除。训练自己的科学思维能力。
11. 实验结束后，应清点实验用品，将实验用品按原位摆放；服从卫生值日安排，认真负责地做好清洁卫生。

科学实验是一个严谨细致的过程，需要实验人员全心投入，认真准备，只有严格遵守实验室规章制度，养成良好的实验习惯才可以取得理想的实验结果。

实验一

大肠杆菌多克隆抗体的制备

【目的要求】

复习巩固体液免疫应答的基本原理,熟悉抗血清的制备过程及常见实验动物的操作方法,能够根据科研及工作的实际需要制备理想的多克隆抗体。

【实验原理】

机体在受到抗原物质刺激后会产生一种能够与抗原发生特异性反应的,具有防御作用的免疫球蛋白,这种免疫球蛋白就是我们所说的抗体分子。随着免疫学技术的飞速发展以及对抗体研究的不断深入,抗体分子由于其特异性好、亲和力高等优点已经广泛地应用到了生命科学及医学研究的各个领域,因此开展特异性抗体的制备技术就具有十分重要的理论意义和应用价值。根据抗体生成的基本原理,抗血清的制备主要可以分为抗原的制备、动物的选择以及免疫途径的选择等几个关键步骤。首先,免疫原性强、纯度高的抗原是获得高效抗体的基础,只有高免疫原性的抗原才能够激活机体有效的免疫应答,才可能产生特定的抗体分子。同样抗原的纯度越高其产生非特异性抗体的几率就越小,从最大程度上保证产生抗体的特异性。其次,被免疫动物的选择又取决于抗血清制备的目的、用途及用量上的差异,另外实验动物本身的健康程度也是决定高效抗体产生的关键步骤之一。同时为进一步提高抗原的免疫效果,实际操作中需要根据抗原和动物本身的特点选择合适的免疫方式(皮下注射、皮内注射、腹腔注射等)及免疫佐剂,最大程度上提高抗血清制备的效果。

抗血清的制备是一个系统、复杂的过程,涉及蛋白质纯化、实验动物操作、免疫途径选择等多个方面,既包括抗原物质本身的因素还包括动物个体之间差异所带来的影响,因此在制备抗血清的过程中只有综合考虑各个方面的因素,不断优化条件,才能够获得高质量的抗血清。

【实验材料】

1. 材料和试剂

优质羊毛脂、液体石蜡油、卡介苗、大肠杆菌可溶性抗原、弗氏不完全佐剂、防腐剂(0.02%叠氮化钠或者0.01%硫柳汞)、甘油。

2. 设备和器材

设备:低速台式离心机、动物解剖台、高压蒸汽灭菌锅、冰箱。

器材:研钵、玻璃注射器、乳胶管、小试剂瓶、75%酒精棉球、解剖工具、脱脂棉等。

3. 实验动物

纯种新西兰大耳兔(雄性、2.5 kg左右)。

【操作步骤】

整个免疫的过程较为复杂,可以大致分为抗原的制备、动物的免疫以及血清分离等三个主要步骤。

1. 抗原的制备

大肠杆菌可溶性抗原的乳化:将弗氏不完全佐剂与等量抗原分别吸入两支注射器中,用约 5 cm 的乳胶管连接这两支注射器,来回交替推动针管,直至形成乳白色乳化液。检查乳化情况时可将这种乳化液滴一滴于冷水表面,如果在水面上不扩散,并成为油滴完整地停留在落下部位,即为乳化完全(如果水温太高,可用冰水来进行实验)。若在其中加入终浓度为 2~4 mg/ml 的卡介苗,则称为弗氏完全佐剂乳化抗原。

2. 动物的免疫

根据被免疫抗原性质的不同,免疫的策略也有所差异,需要根据免疫环境的不同进行选择,本次实验以大肠杆菌可溶性抗原为例进行介绍。

	第 1 天	第 11~15 天	第 20~25 天	第 29 天
注射途径	双后腿肌肉	颈背部皮下多点	耳缘静脉	耳缘静脉
抗原形式	弗氏完全佐剂乳化抗原	弗氏不完全佐剂乳化抗原	可溶性抗原	可溶性抗原
抗原剂量	1.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1.5 ml

为保证制备免疫血清的效果,一般在第三次免疫后第四次免疫前从耳缘静脉取血 0.5~1 ml,分离血清后利用双向免疫扩散实验检测抗体的效价,一般应达到 1:16 以上才符合抗血清制备的要求;若采用 ELISA 法进行检测,效价需达到 1:10⁵ 以上才能够放血。确定效价后再加强免疫 1~2 次后即可放血分离血清。

3. 血清的分离和保存

免疫结束后可采用心脏采血或者颈动脉放血的方法分离血清(具体操作步骤请见附录中关于实验动物的操作方法),一般来说采用颈动脉放血的方式一只家兔可以采血 80~100 ml。将血浆放置在 37℃ 恒温培养箱中 1 h,再置于 4℃ 冰箱中继续放置 4~6 h(也可放置过夜),待血液彻底凝固,血块收缩后,吸取上面的血清,3 000 r/min 离心 15 min,取上清加入防腐剂(0.02%叠氮化钠或者 0.01%硫柳汞)分装后放入 -20℃ 冰箱保存备用,也可尝试在保存液中加入 50%的甘油以避免反复冻融影响抗体的活性。

【注意事项】

1. 由于实验过程中动物个体差异较大,建议同时免疫两只以上的动物以防止免疫失败,同时尽量选择雄性的动物进行免疫,尤其是不能采用妊娠期间的动物。
2. 佐剂对可溶性抗原的乳化是实验的关键,应反复多次操作,以保证抗原能够被完全彻底地乳化,条件允许的话可采用微型震荡仪或者小型电动马达进行电动混合,可以大大缩短乳化的时间并提高效果。
3. 免疫抗原的剂量同样也是影响抗血清制备效果的重要因素,实验前应根据抗原本身性质的不同而选择合适的抗原剂量。
4. 在选择佐剂的时候一方面需要考虑佐剂可以提高抗原的免疫效果,另外一方面佐剂中的卡介苗等物质可能会引起动物的过敏反应而导致免疫失败,因此在免疫前需确定动物的过敏原。

【结果与讨论】

结合本实验中大肠杆菌可溶性抗原抗血清的制备方法,设计一种制备颗粒型抗原的抗体制备方案,并比较与本次实验之间的差异。

(杜冰)

实验二

多克隆抗体的分离和纯化

【目的要求】

复习巩固抗体的结构和理化特征,了解蛋白质纯化的分类和基本原理,熟练掌握硫酸铵沉淀法和离子交换柱法的基本操作步骤,能够对所制备的抗血清进行初步的分离、纯化。

【实验原理】

抗体分子由于其特有的功能和生物学特征在生命科学和医学领域发挥了十分重要的作用,目前已经被广泛地应用于诊断试剂的开发、抗体类药物的研制以及亲和分离的载体等多个领域。目前较为普遍的抗体制备方法主要包括多克隆抗体和单克隆抗体技术,其中单克隆抗体技术以其特异性好、稳定性高、易于重复等优点被人们广泛认可。然而不论是多克隆抗体技术还是单克隆抗体技术,要获得较为理想的抗体分子,都需要对抗血清或者培养上清进行有效的分离和纯化,因此建立起一套简单、稳定的抗体纯化技术就显得尤为重要。

抗体分子首先具有常见蛋白质分子的基本理化特征,因此许多传统的蛋白质纯化方法对于抗体来说也是非常有效的,如常见的盐析法、离子交换层析、分子筛以及疏水层析等技术就可以根据抗体分子的分子量、等电点、溶解度等特征对抗体进行纯化。与此同时,抗体分子作为一种特殊的球蛋白分子与普通的蛋白质相比也有其特殊性。例如,金黄色葡萄球菌 A 蛋白由于具有与抗体分子的非特异结合能力,可以采用 SPA 作为一种亲和载体,将血清中的抗体分子特异性地分离出来,相比于传统的蛋白质亲和分离方法,具有操作简单,成本低廉等特点,能够很好地对血清中的 IgG 类抗体进行分离纯化。抗体的分离纯化是一个复杂而系统的工程,并没有一个统一的标准或策略,必须要结合实际的情况进行合理安排,本实验以常见的兔抗血清中 IgG 分子的分离和纯化为例进行介绍。

【实验材料】

1. 材料和试剂

兔抗血清、无菌生理盐水、0.5 mol/L NaOH、0.5 mol/L HCl、2 mol/L NaCl、DEAE-Sephadex A-50、聚乙二醇、饱和硫酸铵溶液、萘氏试剂、0.02%的 NaN_3 、PBS 缓冲液。

2. 设备和器材

设备:低速台式离心机、层析冷柜、紫外分光光度计、电磁搅拌器、恒流泵。

器材:离心杯、层析柱、尼龙纱布、铁架台、透析袋、烧杯、量筒、滤纸等。

【操作步骤】

1. 盐析法初步纯化抗血清

取正常兔血清 100 ml 加入等量的生理盐水,充分混匀后,逐滴加入 200 ml 的饱和硫酸铵溶液,放置在 4℃ 冰箱中 4 h (为提高沉淀效果可适当延长时间)。将沉淀溶液装入 500 ml 离心杯中 3 000 r/min, 4℃, 离心 20 min。弃去上清,将沉淀用生理盐水溶解至 100 ml (体积可根据实际情况自



已掌握),再次缓慢逐滴加入 50 ml 饱和硫酸铵溶液,放置在 4℃ 冰箱中 4 h。再次 3 000 r/min, 4℃, 离心 20 min 后,弃去上清,沉淀用 0.01 mol/L PBS 缓冲液溶解成合适的体积。将最终溶液装入透析袋中进行透析,直到茌氏试剂测试后,透析外液无黄色出现。透析后溶液用紫外分光光度法测量蛋白浓度后分装保存。

2. 层析柱填料的预处理

称取 DEAE-Sephadex A-50 5 g 重悬于 500 ml 蒸馏水中,浸泡 1 h 后倾去上层的细小颗粒,加入 0.5 mol/L NaOH 75 ml,搅拌均匀后静置 30 min,装入带有双层滤纸的布氏漏斗中抽滤,并反复加入蒸馏水进行洗涤至洗脱液呈中性;将 DEAE-Sephadex A-50 重悬于 75 ml 0.5 mol/L HCl 中静置 30 min,用蒸馏水抽滤至中性;再次用 75 ml 0.5 mol/L NaOH 处理一遍,最后将填料保存在 0.1 mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液中备用。

3. 层析柱的制备

将柱底垫有尼龙纱布,出水口接有乳胶管的层析柱垂直固定于铁架台上,关闭下口开关后沿玻璃棒缓慢加入 0.1 mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液,使液面达到 1/4 柱高的位置,此时缓慢倒入预处理后的 DEAE-Sephadex A-50,待凝胶沉降达 2~3 cm 后放开出水口,同时继续倒入凝胶悬液至所需位置。关闭出水口,使填料自然沉降下来,最后在柱顶也加上一片圆形的滤纸片。

装柱完毕后用两倍柱体积的缓冲液以 12~14 滴/min 的速度充分平衡层析柱,待洗脱液与流出液的 pH 值和离子强度相同时停止平衡。

4. 抗体的分离和纯化

装柱完毕后,打开底部流速开关,使液面恰好与填料相切时立即关闭开关,用加样器沿柱壁缓缓加入盐析法初步纯化的抗血清,再次打开流速开关,使样品缓慢进入柱内后迅速关闭开口,用少量洗脱液清洗柱壁 2~3 次,再次加入一定体积的洗脱液,连接整个洗脱系统控制流速在 10~15 滴/min,进行洗脱。洗脱开始后立即进行样品的收集,每管收集 3~5 ml,共收集 10~15 管。

利用紫外分光光度计对每管中的蛋白质浓度进行检测,同时以 OD₂₈₀ 为纵坐标,管号为横坐标绘制洗脱曲线。将蛋白峰值出现附近的收集管合并后,用 PEG 浓缩,最后加入 0.02% 的 NaN₃,放置于 4℃ 冰箱中备用。

洗脱完毕后首先用蒸馏水洗去柱中参与的盐离子,然后按照预处理中的步骤对凝胶进行再生,放置于洗脱缓冲液中 4℃ 短期保存。

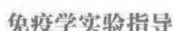
【注意事项】

1. 一般来说 pH 控制在蛋白质等电点的附近是最有利于蛋白质沉淀的,因此利用此法分离不同抗体分子是应根据其等电点的差异选择合适的沉淀 pH。

2. 高浓度的蛋白质会降低盐饱和浓度的阈值,同时也会使杂蛋白的共沉淀明显增加,影响蛋白质的纯度,因此在沉淀前都需要用生理盐水对血清或者腹水进行适当的稀释。

3. 加高层析柱的高度有利于蛋白质的纯化,但是受到流速的影响,层析柱过高造成的流速过低也会降低分离的效果,因此需要根据实际的情况对层析柱进行选择。

4. 层析柱制备的过程中,缓冲液平衡不彻底、装柱不平整、洗脱过程中的流速甚至是样品的上样体积都会影响抗体的纯化。



随着单克隆抗体技术的飞速发展,单克隆抗体被广泛地应用到了生命科学的各个领域,由于制备方法的不同,单克隆抗体一般来自于小鼠的腹水或者细胞的培养上清,请结合学过的生物学知识分析:相比抗血清的纯化,在分离纯化腹水和细胞培养上清的时候应该注意的操作事项。

实验三

双向免疫扩散实验——抗体效价的滴定

【目的要求】

熟练掌握免疫扩散法的操作步骤,了解其在抗血清效价的测定和抗原分析中的应用,并学会利用本实验对自己制备的抗血清效价进行测定。

【实验原理】

免疫扩散法的理论基础是抗原、抗体分子能够在琼脂糖凝胶的大孔径网状结构中自由扩散,在扩散过程中抗原和抗体分子相互结合形成抗原抗体复合物,随着复合物分子量逐步增加,大量的抗原抗体在沉淀部位聚集,不再继续扩散而形成肉眼可见的带状或线状沉淀。抗原抗体复合物的沉淀带是一种特异性的半渗透性屏障,它可以阻止免疫学性质与其相似的抗原抗体分子通过,而允许那些性质不相似的分子继续扩散,这样由不同抗原、抗体所形成的沉淀带就会在不同的位置出现。沉淀带的特征与位置不仅取决于抗原、抗体的特异性和浓度,而且与其分子的大小及扩散速度有关,当抗原、抗体存在多种成分时,将呈现多条沉淀线,因此可用来检查抗原和抗体的特异性、纯度或浓度,比较抗原之间的异同点。

【实验材料】

1. 材料和试剂

pH8.6, 0.1 mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液、1%预复琼脂(或琼脂糖)、1.5%琼脂糖凝胶、抗原及相应免疫血清、PBS 缓冲液、0.05%的氨基黑或 0.1%~0.5%考马斯亮蓝染液。

2. 设备和器材

设备:恒温培养箱(37℃)。

器材:6 cm 培养皿、模具、打孔器和挑针、滴管、湿盒、三角烧杯、玻璃搅拌、移液器等。

【操作步骤】

1. 预复琼脂玻板的制备

将熔化的 1%预复琼脂用滴管加入 6 cm 培养皿(若室温过低需提前预热培养皿)中,使之能够均匀地覆盖培养皿的表面,水平放于 37℃温箱内干燥(或自然干燥)待用。

2. 凝胶板的制备

将 1.5%的琼脂糖凝胶熔化后倒入水平放置的预复琼脂的培养皿中,制成厚度 3~4 mm 的琼脂糖凝胶板,待冷却后根据所需形状用打孔器打孔,打孔器可用末端平整的吸管代替,结合挑针,将孔中的凝胶块挑出,注意保持凝胶孔壁的完整,防止孔周围凝胶断裂,初次实验者可在培养皿边缘空白部位练习后再进行关键的打孔操作(注意琼脂糖凝胶不宜在室温下放置过久,尽量缩短操作时间,以免干燥)。

3. 免疫扩散及结果观察

将一定浓度的抗原加入中心孔、倍比稀释的抗体加入周围孔,留 1 孔加入稀释抗体的缓冲液



PBS,作为空白对照(如图3-1所示,注意:加样至孔满为止,不可外溢)。待孔内液体渗入凝胶后即可放于温盒中(如需要可重复加样,加样间隔时间应掌握在第一次加样后孔内液体尚未完全扩散的情况下加入,以免孔周围形成不透明的白色圈)。放置于37℃湿盒中,保温12~24 h,观察抗原抗体产生的白色沉淀线,血清的效价以一定抗原浓度下出现白色沉淀线的最高稀释度来表示。若为检测抗原的浓度,也可以在中间孔加入已知浓度的抗体,周围加上倍比稀释的抗原,最后根据沉淀线出现的位置来判断抗原浓度的大小。

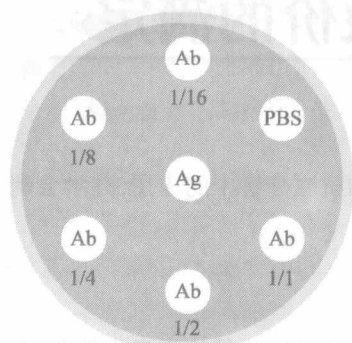


图3-1 双向扩散实验加样示意图

4. 标本的保存

为了保存标本,可染色处理,步骤如下:

(1) 用生理盐水浸洗待保存的玻板2~3天,每天换水1~2次,洗去多余的抗原抗体及其他蛋白质。

(2) 浸洗后于玻板的凝胶上加5%甘油或用0.5%琼脂填孔防裂,用湿的优质滤纸覆在凝胶上(两者之间不要有空气),37℃过夜使其彻底干燥。

(3) 打湿滤纸,轻轻揭下,洗净胶面。

(4) 用0.05%氨基黑(用5%醋酸配)染色10 min,再用5%醋酸脱色至背景无色为止,干燥保存。也可用0.1%~0.5%考马斯亮蓝(10%~20%醋酸配制)染色5~15 min,再用10%~20%醋酸脱色至背景无色,干燥保存。

【结果与讨论】

1. 次日观察并记录沉淀线的形态和位置,并讨论不同抗原浓度对沉淀线的影响。

2. 试讨论图3-2中6种情况下抗原和抗体的浓度差异以及在凝胶中的扩散率大小(用>、<、≈表示)

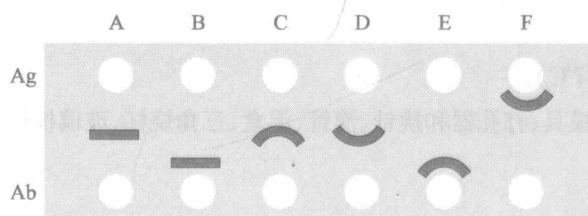


图3-2 沉淀线位置及特征分析

(杜冰)

实验四

火箭免疫电泳实验——抗原浓度的测定

【目的要求】

了解免疫电泳技术的基本原理,熟悉火箭免疫电泳的操作步骤以及在抗原测定和分析中的应用,学会利用火箭免疫电泳对未知抗原的浓度进行测定。

【实验原理】

火箭免疫电泳(rocket immunoelectrophoresis, RIE)是一种将抗原抗体的结合特异性和蛋白电泳的高效性有机结合起来的免疫学检测技术。电泳过程中抗体在凝胶中均匀分布且抗体分子在特定的缓冲液中基本不带电荷,因此抗体分子在电场中几乎不发生移动,相反抗原分子由于本身带有负电荷,在电场的作用下就会向正极发生定向移动。在泳动过程中当抗原与凝胶中的抗体达到合适的比例时,就会形成一个类似于火箭的不溶性免疫复合物沉淀峰,峰的高度或者面积与待测的抗原浓度呈正相关,因此可以根据所形成的火箭峰的高度或者面积对抗原的浓度进行半定量的检测。在凝胶中抗体总量不变的情况下,以已知抗原溶液的浓度作为横坐标,以相应的火箭峰的高度或者面积为纵坐标,绘制标准曲线,最终计算出未知抗原的浓度(图 4-1)。反之如果固定量的抗原是均匀分布在凝胶中的,利用这个方法则可以对未知的抗体含量进行检测。

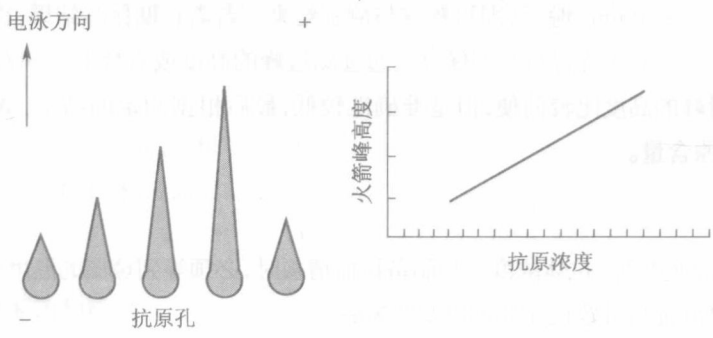


图 4-1 | 火箭免疫电泳原理图

【实验材料】

1. 材料和试剂

pH8.6, 0.1 mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液、1%和 1.5%琼脂糖凝胶、抗原及相应免疫血清、1%鞣酸溶液。

2. 设备和器材

设备:恒温培养箱、电泳仪。

器材:模具、胶带、单面刀片、打孔器和挑针、滴管、湿盒、移液器、滤纸等。



【操作步骤】

1. 抗原、抗体浓度的选择

分别选取不同浓度的抗原和抗体溶液进行预实验,选择电泳后能够出现清晰、锐利的锥形沉淀峰,且峰高在 2~5 cm 的抗原、抗体浓度为宜。

2. 预复琼脂板的制备

首先将玻璃板放入预先准备好的模具中,四周用胶带封住以防止凝胶泄露,然后将熔化后的 1% 琼脂糖凝胶滴加到模具中的玻璃板上,使之均匀覆盖在玻璃板表面即可,放置在水平桌面上使其充分冷却后放于温箱内干燥备用。

3. 抗血清琼脂板的制备

取一定量抗血清与熔化并冷却至 56℃ 左右的 1.5% 琼脂糖凝胶充分混合,然后迅速将其倒入预复琼脂板表面,放置在水平桌面上使其均匀冷却,最终使琼脂的厚度达到 1~2 mm。

4. 打孔、加样

待凝胶充分凝固后,拆去封住两端的胶带,用刀片将玻璃板连同上面的凝胶切出。在距离玻璃板边缘 10 mm 处,用直径约 3 mm 的打孔器以 5 mm 左右的间隔进行打孔。选取合适的抗原浓度进行加样,加样体积一般控制在 10 μ l 左右。

5. 电泳

加样后迅速将琼脂板置于电泳槽横梁上,将双层滤纸的一端贴在凝胶表面,另外一端连接到电泳槽内的缓冲液中(槽内缓冲液为 0.06 mol/L, pH8.6 巴比妥缓冲液)使凝胶和电泳液充分连通,注意将加样孔端连接在电场的负极,250 V 恒压电泳 1.5 h。

6. 结果判定

电泳结束后,取出琼脂板,分别用生理盐水、蒸馏水清洗表面残余的缓冲液及蛋白质,最后放入 1% 鞣酸溶液中浸泡 5~10 min,晾干,即可观察与测定结果。若需长期保存结果,也可以用常规蛋白质染色法进行染色,脱色后干燥进行长期保存。通过测量峰的高度或者峰的面积对抗原的浓度进行评价,相比之下测量峰的高度比较简便,但是准确性较低,最后根据测定的结果,从标准曲线中计算出待检标本中的抗原含量。

【注意事项】

1. 必须选择合适的抗原、抗体浓度。且制备抗血清板时,必须等到琼脂的温度降到 60℃ 以下时,才能加入抗血清,温度过高可致抗体球蛋白变性失活。

2. 电场必须均匀,电泳条件每次必须保持恒定。电流强度与电压的改变,均会影响沉淀峰的高度及结果的重复性。此外电泳槽所用缓冲液以巴比妥缓冲液为好,若采用硼酸缓冲液进行电泳时,样品泳动距离短,且电渗现象明显。

3. 每次电泳时,同一块抗血清琼脂板上要有标准抗原作对照,加样量必须准确,否则将影响测定结果。

【结果与讨论】

试结合本实验的内容,设计一种利用交叉免疫电泳的(CIEP)同时对多种不同性质的抗原进行检测的实验操作流程,注意比较与火箭免疫电泳操作间的差异。

(杜冰)

实验五

SPA 协同凝集实验——颗粒性抗原的检测

【目的要求】

熟悉凝集反应尤其是协同凝集反应的原理和操作流程,了解 SPA 协同凝集实验在颗粒性病原体检测中的重要应用,能够利用 SPA 协同凝集实验对未知抗原进行定性检测。

【实验原理】

SPA 即葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A)是金黄色葡萄球菌细胞壁中的一种表面蛋白。SPA 能与人及多种哺乳动物(如猪、兔、豚鼠等)血清中 IgG 类抗体的 Fc 端发生非特异性结合(详见附录 2),当 IgG 的 Fc 端与 SPA 结合后,两个 Fab 端暴露在葡萄球菌表面,仍保持其特异性的抗原结合能力,当与相应的细菌、病毒或可溶性抗原反应时,可借助特异性抗体 Fab 端与相应抗原互相连结而呈凝集现象。这种以 SPA 作为 IgG 抗体的载体而进行的凝集反应称为 SPA 协同凝集实验(SPA coagglutination test)。相比传统的凝集反应,SPA 协同凝集实验有效地提高了检测的灵敏度,加快了反应速度,在细菌及病毒等颗粒性抗原的检测及分型实验中发挥了十分重要的作用。

【实验材料】

1. 材料和试剂

金黄色葡萄球菌标准株 Cowan I(NCTC-8530)、普通 LB 液体及固体培养基、0.5%福尔马林溶液、无菌生理盐水、大肠杆菌可溶性抗原、大肠杆菌抗原免疫血清(免疫血清预先放 56℃水浴灭活 30 min)、NaN₃、PBS 缓冲液。

2. 设备和器材

设备:恒温水浴锅、低温高速离心机、显微镜。

器材:玻片、离心管、吸头、移液器等。

【操作步骤】

1. SPA 菌稳定液的制备

(1) 取冷冻保藏的 Cowan I 菌株接种于 LB 固体培养基表面,37℃倒置培养 18~24 h。挑取细菌单克隆接种在 200 ml LB 液体培养基中,置 37℃震荡培养 18~24 h。

(2) 以 5 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体,沉淀用 PBS 重悬后反复洗涤 3 次,然后用含有 0.5%福尔马林以及 0.2 g/L NaN₃ 的 PBS 把沉淀稀释成 10%的菌悬液,室温放置 3 h 或过夜。

(3) 次日将菌液置 56℃灭活 30 min 后,迅速冷却,用 PBS 离心洗 3 次,最后用 0.01 mol/L, pH7.6 的 PBS 稀释成 10%的 SPA 菌稳定液,分装后 4℃保存。

2. IgG 致敏 SPA 菌液的制备

取上述 10%SPA 菌稳定液 100 μl,加 10 μl 大肠杆菌免疫血清后混匀,置 37℃水浴 30 min,期间每隔 10 min 振荡 1 次,结束后以 8 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,并用 PBS 洗涤 3 次,最后加入 PBS 至 1 ml 制成致敏的 SPA 菌稳定液。同时取 10%SPA 菌稳定液 100 μl,用 PBS 稀释成 1 ml 后作为未

致敏 SPA 菌液对照。

3. SPA 协同凝集实验

用防水蜡笔将玻片分为 3 个不同区域,分别编号为 1、2、3,在第 1、2 区域中各加入 1 滴(约 30 μl) IgG 致敏的 SPA 菌液,第 3 区中加入 1 滴未致敏 SPA 菌液。然后在第 1、3 区分别加入 1 滴大肠杆菌抗原溶液,第 2 区中加 1 滴生理盐水,摇动玻片或分别用牙签混匀,几分钟内即可出现块状或颗粒凝集,10~15 min 内观察结果(图 5-1)。

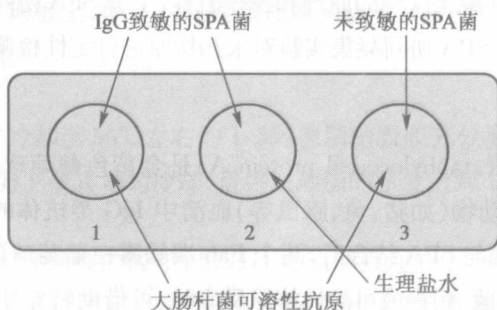


图 5-1 | SPA 凝集实验加样示意图

【注意事项】

1. 实验前必须仔细检查所用试剂本身有无自凝现象或出现细小颗粒,以免影响结果观察或导致错误结果。

2. 协同凝集实验的特异性取决于致敏免疫血清的特异性,其凝集反应的强弱取决于免疫血清效价,故应选用特异性强和效价高的免疫血清致敏 SPA 菌。

3. SPA 与各种属 IgG 的亲合力有所不同,与猪 IgG 亲合力强,依次为狗、兔、人、猴、豚鼠、小鼠和牛;与绵羊和大鼠的亲合力较弱,而与牛犊、马、山羊和鸡 IgG 不起反应。因此当 IgG 致敏 SPA 菌液时所用的免疫血清种属要选择适宜。

4. 为排除非特异性凝集所造成的假阳性,每次实验同时要用生理盐水、正常血清处理的 SPA 菌体、未致敏 SPA 菌体以及经同一免疫血清处理的 Wood 46 株菌(不表达 SPA 蛋白)作对照。

【结果与讨论】

结合已学过的免疫学实验技术,总结一下能够对待测抗原进行快速、准确测量的实验方法,并比较各种方法之间的优缺点。

(杜冰)

实验六

红细胞凝集实验——ABO 血型的鉴定

【目的要求】

熟悉 ABO 血型鉴定实验的基本原理,了解血型鉴定在临床医学中的广泛应用,能够同时利用正向和反向定型的方法鉴定 ABO 血型。

【实验原理】

ABO 血型系统是 20 世纪初由奥地利学者 Karl Landsteiner 首次发现和确定的人类血型系统。人类 ABO 血型主要根据红细胞膜上是否存有特异性抗原(凝集原)A 或 B 来判定并划分的,继而将人类的血型分为 A 型、B 型、AB 型、O 型四种。其中,A 型指红细胞膜上存有 A 抗原(凝集原),其血清中含有抗 B 抗体(凝集素);红细胞膜上具有 B 抗原,其血清中存在抗 A 抗体的被称为 B 型;AB 型的红细胞膜上含有 A 抗原和 B 抗原,而其血清中没有抗 A 和抗 B 抗体的存在;O 型血的个体其红细胞膜上既没有 A 抗原也没有 B 抗原,但其血清中同时存有抗 A 和抗 B 抗体。

鉴于抗原抗体反应的特异性和红细胞凝集的特性,人们可以利用已知 A、B 两种抗原的标准血清来鉴定未知的血型。具有 A 抗原的红细胞可被抗 A 抗体凝集;抗 B 抗体可使含 B 抗原的红细胞发生凝集。若血型不匹配,在输血时则会导致红细胞发生凝集,引起血管栓塞和溶血反应等严重后果。故在输血前必须做血型鉴定(表 6-1)。

血型鉴定可用红细胞凝集实验,通过正、反定型确定 ABO 血型。所谓正向定型即血清实验,用已知抗 A、抗 B 分型血清来确定红细胞上有无相应的 A 抗原和 B 抗原;所谓反向定型即细胞实验,是用已知 A 型血红细胞和 B 型血红细胞来检测血清中有无相应的抗 A 或抗 B 抗体。

表 6-1 ABO 血型鉴定表

诊断血清 + 待测者红细胞		受检者血型	待检者血清 + 诊断红细胞		
抗 B 血清			A 红细胞	B 红细胞	O 红细胞
—	—	O	+	+	—
+	—	A	—	+	—
—	+	B	+	—	—
+	+	AB	—	—	—

【实验材料】

1. 材料和试剂

待测红细胞,抗 A、抗 B 标准血清,人 A 型、B 型血细胞标准品,生理盐水。

2. 设备和器材

设备:显微镜。

器材:载玻片、采血针、采血毛细管、移液器、75%酒精棉球等。



【操作步骤】

1. 正向定型实验(玻片法)

- (1) 取清洁载玻片一张,用记号笔划为两格,在载玻片的左右两端,分别标注 A 和 B。
- (2) 将抗 A 标准血清和抗 B 标准血清各一滴分别滴加于 A、B 标记一侧的附近。
- (3) 用 75% 酒精棉球消毒无名指端的皮肤或耳垂,待酒精挥发后,用无菌采血针刺破表皮,用两支采血毛细管分别吸取待测血液,分别加在抗 A、抗 B 格内,将载玻片水平轻微转动数次,使标准血清与血细胞充分接触。室温,静置 1~2 min 后即可观察结果。

(4) 在白色背景下肉眼观察是否出现凝集反应。若混合液滴呈现不规则边缘,中间出现凝集小块或团状物,则表示凝集,若液滴呈现均质红色状态,则为不凝集。也可置于低倍显微镜下观察结果。

2. 反向定型实验(试管法)

- (1) 用吸管分别注入 2~3 滴待测血清在已经标记好的两支试管中。
- (2) 在 A 试管中加入 1 滴预制的含有 2%~4% 的 A 型标准红细胞生理盐水悬液后混匀。
- (3) 在 B 试管中加入 1 滴预制的含有 2%~4% 的 B 型标准红细胞生理盐水悬液后混匀。
- (4) 室温放置 5 min 后,将上述试管离心 15 s (3 000 r/min),静置观察结果。

【注意事项】

1. 采血时要尽量避免用力挤压手指或耳垂,以免发生溶血影响结果。
2. 如肉眼观察难以辨认,可使用显微镜观察凝血现象。

【结果与讨论】

由于临床检验的复杂性,经常会遇到一些特殊的血型亚型,造成正、反定型实验结果不一致的问题,请结合已有的免疫学知识讨论如何利用现代生物学技术对这些特殊的血型亚型进行检测。

(章平)