

免疫学实验

指导书

MIAN YI XUE SHI YAN
ZHI DAO SHU

主 编 陈永富

哈尔滨工程大学出版社

免疫学实验

指导书

MIAN YI XUE SHI YAN
ZHI DAO SHU

主 编 陈永富
副主编 钱国英 汪财生

哈尔滨工程大学出版社

内 容 简 介

本书配合生物技术、生物工程专业《免疫学基础》理论课开设。实验项目围绕实验动物展开,以《免疫学实验》中的基本理论、基本操作和基本技能为基础,由学生自主设计实验,借助于实验动物将所有的实验项目有机地联系在一起。实验体系为:以免疫学实验中的抗体检测、淋巴细胞检测为主线,以实验动物为聚点,从抗原的制备、免疫动物到免疫细胞、免疫抗体的检测为结果。适合于生物技术、生物工程专业学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

《免疫学实验》指导书/陈永富主编.—哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2009.2

ISBN 978-7-81133-350-3

I. 免… II. 陈… III. 医药学:免疫学-实验-高等学校-教学参考资料 IV.R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 018939 号

出版发行 哈尔滨工程大学出版社
社 址 哈尔滨市南岗区东大直街 124 号
邮政编码 150001
发行电话 0451-82519328
传 真 0451-82519699
经 销 新华书店
印 刷 成都蓉军广告印务有限责任公司
开 本 880mm × 1 230mm 1/32
印 张 4
字 数 100 千字
版 次 2009 年 2 月第 1 版
印 次 2009 年 2 月第 1 次印刷
定 价 13.00 元

<http://press.hrbeu.edu.cn>

E-mail: heupress@hrbeu.edu.cn

前 言

二十一世纪的教育是开发人的创造力、想象力，培养创造能力、创新型人才的教育。根据时代发展的需要，高等院校必须进行全面的教育改革，实现单一的验证理论向探索未知的转变；实现学科专业素质培养向综合素质教育的转变；实现侧重获取知识的教育向增强创造性教育的转变。近年来，随着生命科学的迅猛发展和教育改革的不断深入，实验教学改革也在不断深化，构建相关实验的课程项目体系、改革实验教学模式及建立科学合理的实验考评考核方式是应用型人才培养的必要措施。本指导书结合浙江万里学院教学改革项目《免疫学实验内容与考核模式的改革》的教改要求及近十年的实践教学经验而编写，作为《免疫学实验》的课改配套教材。

《〈免疫学实验〉指导书》配合生物技术专业《免疫学基础》理论课开设，力求理论与实践相结合。实验项目围绕实验动物展开，以免疫学实验中的基本理论、基本操作和基本技能为基础，借助于实验动物将所有的实验项目有机地联系在一起。实验体系为：以免疫学实验中的抗体检测、淋巴细胞检测为主线，以实验动物为聚点，以抗原的制备、免疫动物到免疫细胞、免疫抗体的检测为结果。具体方案为：以2~3人为一组，自由组合，指定小组长，每个小组有相应的实验动物，每组学生根据实验总要求，自行确定实验材料、自主设计实验技术路线，再参考实验指导书中的相关步骤与方法进行实验，也

可以查阅其他方法进行实验操作。

本书特色:1.明确整个免疫学实验项目综合体系;2.学生自主设计实验,围绕实验动物展开各个实验项目;3.实验研讨:学生之间互相分析讨论实验全过程;4.规范操作技能,强化动手能力,开发学生思维;5.附有各个实验考核要点,明确学生需掌握的操作要点。

本教材适合于生物技术专业学生使用,课时约 32 学时,部分实验选做或学生课外完成。

本教材由陈永富、钱国英、汪财生等老师编写,由陈永富老师统稿。教材编写过程中得到了学院教学院长朱秋华老师、系主任尹尚军老师的热忱关怀与帮助,对全书的结构与书稿的编撰给予了具体的指导,在此表示由衷的感谢。

本书作为生物技术专业课程实验教材,我们力求使之具备实用性、可操作性,与后续课程如“检测技术”等课程相结合。但是,限于我们的学识和水平,本实验指导一定还会存在许多不足和不当之处,敬请各位老师与同学提出宝贵意见。谢谢!

编 者

2008 年 9 月

目 录

前言	1
实验须知	1
实验一 抗原的制备	1
实验二 颗粒性（或可溶性）抗原制备免疫血清的提纯、 分离、鉴定与保存	5
实验三 淋巴细胞分离及转化技术	10
实验四 T淋巴细胞的分离技术	15
实验五 免疫球蛋白的分离与纯化	18
实验六 平板凝集反应	22
实验七 试管凝集试验	25
实验八 单向免疫扩散	28
实验九 双向琼扩试验	32
实验十 火箭免疫电泳技术	36
实验十一 对流免疫电泳	39
实验十二 墨汁吞噬试验	42
实验十三 病毒血凝及血凝抑制试验	45
实验十四 胶体金技术	49
实验十五 固相酶联免疫吸附试验	52
实验十六 免疫荧光试验	55
实验十七 直接免疫荧光法鉴别 B 淋巴细胞膜表面免疫球 蛋白	58
实验十八 实验动物的抓取、固定、注射方法	61
实验十九 免疫学常用试剂的配制	67
免疫学实验操作考核要点	70

实验须知

一、《免疫学实验》的目的与要求

《免疫学实验》课的目的是加强和巩固对课堂讲授的基本理论的理解和体会,学习和掌握免疫学实验的基本操作技术,为今后的实际工作和科研工作打下基础。为上好免疫学实验课,要求同学做到以下几点:

- 1.课前务必做好充分预习,明确实验目的、原理、方法及操作中的注意事项,写出实验预习报告和实验设计思路,做到心中有数。

- 2.在实验进程中,严格按照实验指导所列步骤和要求进行操作,坚持实验的严肃性、严格性、严密性。

- 3.真实记录实验结果,对错误的结果要认真分析,找出原因,得出结论。实验完成后,写出实验报告并及时交给老师批改。

- 4.严格遵守实验室规则,防止各种事故发生。

二、《免疫学实验》研讨课教学安排

(一) 分组原则

以一个自然班为分组基本单位,在原来的实验分组的基础上(每组2~3人),将3~4组组成一个实验课讨论小组。



每一实验课讨论小组由指导老师指定一名有责任心的同学担任该研讨小组组长。研讨组组长的职责是：确定讨论时间和讨论地点；研讨活动中的具体任务分解与分配；主持每次活动的发言；收集每个实验小组所提交的书面材料。

每个实验小组组长负责收集整理自己小组的实验过程、操作体会以及对实验结果的分析，形成书面材料，并代表本小组在课堂上发言。

记录员负责小组讨论时的记录工作。每份讨论记录中要包括时间、地点、主持人、参加人员、记录员、所讨论主题和小组的研讨材料。

一般组员必须服从组长讨论课的任务安排，不得拒绝。准时参加所在研讨小组的研讨活动，协助组长做好发言报告。

(二) 小组研讨活动的基本规则

研讨活动应符合专业的基本范畴，也可从多角度、多学科交叉对实验原理、基本操作、实验结果进行分析。

小组成员应就所讨论实验问题、现象，从不同层面、不同角度展开全面深入的讨论。每位小组成员均应参与讨论，发表自己的意见。

(三) 分组研讨活动流程及相关要求

每个实验后，都有相应的研讨主题，也可由学生自己提出相关的研讨内容。

由实验指导教师就所带的实验拟订若干备选研讨主题，再提交课程改革小组集体讨论确定。

主题选择主要涉及实验内容中的一些重要原理、操作难

点、对实验结果的分析探讨以及与别的学科交叉知识。

(四) 研讨任务的分配

指导教师向各实验研讨小组分配任务,由研讨小组组长组织实施,敦促每个实验小组完成讨论内容的准备。

(五) 研讨资料的收集

在指导教师指导下,各分组就研讨主题开展资料收集工作,将所收集的电子文稿或纸质资料交于指导老师。

每一组员应认真阅读归纳并总结所收集的资料。

(六) 研讨活动相关资料的汇集、整理与上交

由组长负责在实验研讨活动结束后,将有关的书面资料与电子文稿按要求加以汇集整理,并形成《实验研讨课书面材料汇编》,在规定时间内及时上交给指导老师。

材料汇编包括:封面与目录、分组研讨记录表。每个实验小组的讨论资料包括:手写资料、收集的资料(电子或纸质文稿)、研讨实验小组评分表、每个研讨小组整体评分表。

(七) 实验研讨小组评分内容

资料清单:从资料数量、质量、格式规范等几个方面进行考核,占实验研讨成绩的10%。

研讨主题:从研讨主题所涉相关资料及其他组员观点的归纳概括是否全面,分析是否详实,最终结论是否明确,论证是否充分,格式是否规范等方面进行考核,占实验研讨成绩的30%。



实验结果分析：从实验结果是否正确，对实验分析是否有理有据，能否运用自学的新的知识进行探讨等方面进行考核，占实验研讨成绩的 30%。

研讨现场评分：从语言是否清晰流畅，观点是否明确，分析是否合理，答问是否敏捷，多学科知识是否丰富等几方面进行考核，占实验研讨成绩的 20%。

书面材料汇编：从制作是否清晰，填写是否完整，汇编材料是否齐全，提交是否及时等几方面进行考核，占实验研讨成绩的 10%。

三、《免疫学实验》考核考评方式

实验预习与设计：实验网站预习，通过预习测评，通过测评才允许开始实验。

实验报告：上交每次实验报告，重点考核实验附录中的思考题。

实验操作考试：每个实验确定知识点与技能点，明确测评内容和要求，考试时由学生抽取 1 个考题，当场操作完成，当场评定打分。

实验原理理论考试：针对每个实验原理进行理论考试。

平时操作与出勤等：由教师巡回指导实验、监测学生操作，根据学生的准备、实验后的清理、结果分析等给予相应的成绩。

实验总成绩构成：实验研讨成绩（20%）、实验预习与设计（20%）、实验报告（10%）、实验操作考试（20%）、实验原理理论考试（20%）、平时表现与出勤等（10%）。

四、实验室规则

免疫学实验材料有些是病原微生物（如伤寒杆菌、乙肝病毒），虽经灭活，但仍应以致病微生物对待并加以预防，以防发生感染，要求同学认真遵守下列各点：

1. 尽量不带个人生活用品、学习用品进入实验室，必要的用具带入后，应放在远离操作的位置；

2. 进入实验室后穿上工作衣，离室时脱下反叠带走。在实验室内应保持安静、整洁、有秩序，不得高声谈笑，不得随便走动或拆卸仪器；

3. 实验室内严禁吸烟、进食、饮水，严禁用嘴吸移液及润湿标签，尽量不要用手触摸头、面部及身体其他暴露部位；

4. 如遇不慎而打破菌种管或使有菌材料污染皮肤、衣物、桌面等情况，应立即报告指导教师，切勿隐瞒或自行处理；

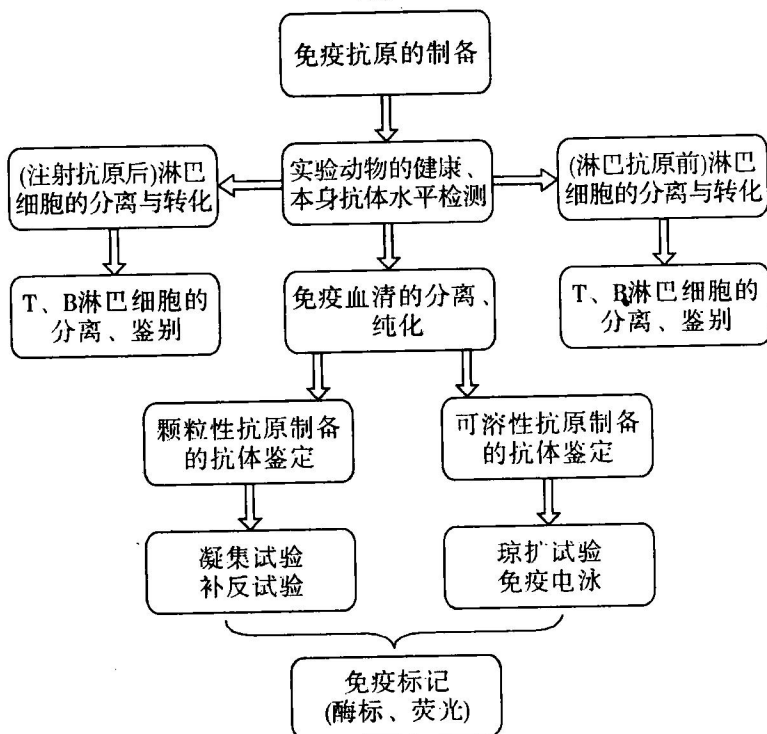
5. 被污染过且需要回收的吸管、滴管、试管、玻片等物应用完后立即投入已准备的消毒液中，不得放在桌面上或水槽内；

6. 爱护公物，节约试剂材料，不得将实验室任何物品私自带走。如遇仪器、用品损坏，应报告指导教师并按规定予以赔偿；

7. 实验完毕，整理桌面，值日生打扫室内卫生，最后离开的同学应注意关好水电、门窗。



免疫学综合设计性实验思路



实验一 抗原的制备

一、原 理

抗原分为颗粒性抗原、可溶性抗原。颗粒性抗原主要是指人、动物、微生物或寄生虫的细胞。可溶性抗原主要包括蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、酶类、补体、脂多糖、细菌外毒素和核酸，它们有相当部分来源于组织和细胞，成分复杂。制备这类免疫原时，首先须将组织和细胞破碎，然后再从组织和细胞匀浆中提取目的蛋白或其他抗原，提纯的抗原需鉴定后才能做免疫原。抗体的产生通常与抗原的质和量、动物种类以及接种途径有密切关系。因此在制备免疫血清时要根据抗原的不同，选择适宜的动物种类和免疫方法。



颗粒性抗原与可溶性抗原之间有何关系？二者能互相转化吗？

二、颗粒性抗原的制备

(一) 细菌性颗粒抗原（以鸡白痢沙门氏菌为例）

1. 材料：鸡白痢沙门氏菌、普通琼脂培



培养基、0.5%无菌甲醛生理盐水、Alsever 液、无菌生理盐水、离心机。

2. 方法

(1) 标准菌株的选择：所用的菌种鸡白痢沙门氏菌应具有典型形态菌落及生化反应。在生理盐水中不发生自身凝集，与特异血清有高度凝集者可作为菌种。

(2) 菌液的制备：将合格的鸡白痢沙门氏菌菌株接种于普通琼脂平板 37℃、24h。肉眼观察有无杂菌生长，必要时作镜检。用无菌甲醛生理盐水洗下菌苔，将洗下液体装入无菌试管内，置 37℃、18-24h 以杀菌，得到原液。用作无菌试验即将菌液接种琼脂培养基培养 4d，无活菌生长者才可使用。

(二) 细胞性颗粒抗原（以鸡红细胞为例）

10%~20%鸡红细胞制备：采健康鸡的颈静脉血，与 Alsever 液以 1:2 混合（Alsever 液起到抗凝与保护作用，全血与 Alsever 液充分混合后，置 4℃保存可使用 3 周左右）。取适量抗凝血于离心管中，用无菌生理盐水洗细胞 2~3 次（每次 2000rpm×5min）。取压积红细胞，用无菌生理盐水稀释至 10%~20%，即可用于免疫注射。



鸡白痢沙门氏菌具有哪些形态特征？
生化反应特性如何？
细菌能发生自凝吗？
为什么？



Alsever 液中有
哪些成分？为何有抗
凝与保护作用？

三、可溶性抗原的制备

(一) 1.5 mg/ml 牛血清白蛋白

取 0.15 g 牛血清白蛋白溶解于 100 mL 无菌蒸馏水中，彻底溶解即成。

(二) 菌脂多糖的制备

脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁的成分，所以抗脂多糖抗体的制备可用革兰氏阴性细菌菌体抗原来制备，这里介绍 2 种细菌脂多糖提取的方法。

1. 超声波处理法

获得的菌液经 2500 rpm×20 min 离心洗涤 1~2 次，将沉淀无菌生理盐水配成 2 倍于湿菌浓度的浓菌液。

用超声波发生器中频（约相当于 12000 cps）处理 20 min。处理液经 3000 rpm×30 min，吸取上清液即为脂多糖抗原。置 4℃ 冰箱保存备用。

2. 煮沸法

将培养后得到的浓菌液沸水浴煮沸 2h。置冰箱静置两星期以上（使菌体残渣自由下沉）。3000 rpm×30 min，取上清液即为粗脂多糖抗原，置冰箱中保存备用。



革兰氏阳性细菌菌体也有脂多糖吗？脂多糖与细菌的致病力、抗原性有什么关系？



为何上清液中就是粗脂多糖？提取脂多糖还有其它方法？细菌中还有哪些成分可以作为可溶性抗原？



四、作业与思考题

1. 颗粒性抗原与可溶性抗原在免疫动物时，有哪些相同处与不同处？
2. 其他条件相同，颗粒性抗原与可溶性抗原所制备抗血清效价有区别吗？

实验二 颗粒性（或可溶性） 抗原制备免疫血清的提纯、 分离、鉴定与保存

一、原 理

具有免疫原性的抗原可刺激机体相应 B 细胞增殖、分化形成浆细胞并分泌特异性抗体。由于抗原分子表面的不同决定簇为不同特异性的 B 细胞克隆所识别，因此由某一抗原刺激机体后产生的抗体，实际上为针对该抗原分子表面不同决定簇的抗体混合物。另外，抗体的产生具有回忆应答的规律性，体现为初次免疫注射与再次免疫注射后的抗体应答特点截然不同。这是由于记忆性 B 细胞参与再次应答所致。根据抗原的性质不同而异。

如此抗原制备的是一类什么抗体？
这类抗体有何特点？

二、材料及试剂

（一）动物：健康成年家兔，雄性，兔龄 9~24 个月，体重 2~3 kg。

（二）器材：剪刀、镊子、注射器（2 ml、