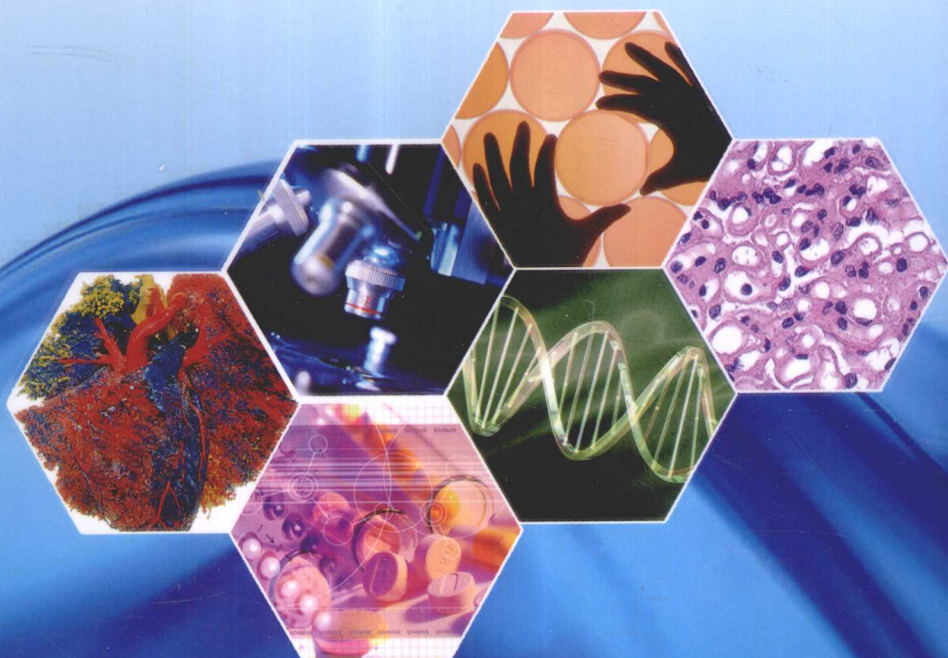


全国高等院校医学实验教学计划教材

编审委员会主任委员 文格波
编写委员会总主编 姜志胜

医学免疫学实验

主 编 胡四海 曾铁兵



 科学出版社
www.sciencep.com

全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波

编写委员会总主编 姜志胜

医学免疫学实验

主 编 胡四海 曾铁兵

副主编 李忠玉 赵飞骏

编 委 (按姓氏笔画排序)

尹卫国 刘双全 刘安元 阳志勇

杨胜辉 李忠玉 余敏君 赵飞骏

胡四海 胡耀华 郭 靖 唐双阳

程 文 曾铁兵 谢良伊

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

医学免疫学实验方法繁多,技术日新月异。医学免疫学实验教学改革正在研究与探索之中。本着“夯实基础、鼓励创新”的基本原则,我们对医学免疫学实验内容进行了重新分类和组合,新增了部分有利于培养学生综合素质及创新能力的实验,形成了“基本实验操作技术”、“基本性实验”、“综合性实验”和“研究创新性实验”共四篇,17章,51个实验。

本实验教材概念准确、文字简明、层次清晰,所选实验项目基本上是经过我们多年教学和科研实践证明的、切实可行的实验。编者是常年工作在教学和科研第一线、教学经验丰富、科研功底扎实的中青年骨干教师,保证了本教材的科学性、先进性和实用性。

本教材适用于医学、生物科学、药学等专业本科和专科学生使用,也可供长学制学生、研究生以及从事临床检验、卫生防疫的实验技术人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验/胡四海,曾铁兵主编. —北京:科学出版社,2010.7

(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-028227-9

I. 医… II. ①胡… ②曾… 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(2010)第127964号

策划编辑:邹梦娜 李国红 / 责任编辑:邹梦娜 / 责任校对:刘小梅

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>

骏 杰 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年7月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010年7月第一次印刷 印张:9 1/4 插页:2

印数:1—4 000 字数:210 000

定价:25.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

全国高等院校医学实验教学规划教材 编审委员会

主任委员 文格波
副主任委员 吴移谋 廖端芳
委员 (以姓氏笔画为序)
田 英 吕昌银 严悦卿 李娜萍
苏 琦 肖建华 张新华 陈 熙
陈国强 欧阳四新 罗学港 周国民
胡 弼 姜志胜 姜德诵 唐朝枢
涂玉林 曾庆仁 谭立志

编写委员会

总 主 编 姜志胜
副总主编 贺修胜 甘润良
编 委 (以姓氏笔画为序)
万 炜 王汉群 任家武 刘秀华
齐永芬 李严兵 李娜萍 李朝红
张 艳 张建湘 张春芳 欧阳钧
易光辉 金海燕 屈丽华 胡四海
侯冰宗 桂庆军 龚永生 梁 瑜
程爱兰
秘 书 周文化 唐志晗

序一

医学是一门实践性很强的学科,而医学实验教学是医学教育的重要组成部分,是保证和提高医学人才培养质量的重要环节和必要手段。教育部、卫生部《关于加强医学教育工作提高医学教育质量的若干意见》中提出“高等学校要积极探索医学实践教学体系,加强实践能力培养平台的建设,积极推进实验内容和实验模式的改革,提高学生分析问题和解决问题的能力”,进一步明确了医学实验教学的重要性。

随着现代医学模式的转变、医学教育标准的推行和我国卫生服务发展要求的变化,进一步提高医学教育质量,构建具有中国特色社会主义医学教育体系,已成为高等医学教育界高度关注的重大课题。在这一背景下,我国医学实验教学的改革近年来也进行了积极探索和实践,许多高校通过树立以学生为本、知识传授、能力培养、素质提高、协调发展的教育理念和以能力培养为核心的实验教学观念,建立有利于培养学生实践能力和创新能力的实验教学体系,建设满足现代实验教学需要的高素质实验教学队伍,建设仪器设备先进、资源共享、开放服务的实验教学环境等有力措施,全面提高实验教学水平。

此次,南华大学医学院协同国内相关高校共同编写了《全国高等院校医学实验教学规划教材》,在推进医学实验教学教材建设上迈出了新的一步。这套教材涵盖了解剖学、显微形态学、医学免疫学、病原生物学、机能学以及临床技能学的实验教学内容。全套教材贯彻了先进的教育理念和教学指导思想,把握了各学科的总体框架和发展趋势,坚持了“四个结合”,即理论与实验结合、基础与临床结合、经典与现代结合、教学与科研结合,注重对学生探索精神、科学思维、实践能力、创新能力的培养,不失为一套高质量的精品教材。

愿《全国高等院校医学实验教学规划教材》的出版进一步推动我国医学实验教学的发展。

中国高等教育学会基础医学教育分会理事长

北京大学医学部副主任



2010年2月

序二

医学实验教学在整个医学教育过程中占有极为重要的地位,提高医学实验教学质量必将有助于提高医学教育的整体水平。随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展,大量先进的医学实验教学理念与方法进入实验教学体系,医学教育内容与环境发生了日新月异的变化。近年来,国内很多医学院校对传统医学实验教学模式进行积极改革和有益尝试,积累了值得借鉴的经验。2008年,国家教育部、卫生部联合印发《本科医学教育标准——临床医学专业(试行)》,对本科临床医学专业毕业生的思想道德与职业素质、知识、技能培养目标提出了更高的明确要求。

在这一背景下,南华大学《全国高等院校医学实验教学规划教材》编写委员会组织相关学科专业的专家教授,共同编写了这套实验教学规划教材。全套教材共九本,包括:《系统解剖学实验》、《局部解剖学实验》、《显微形态学实验(组织学与胚胎学分册)》、《显微形态学实验(病理学分册)》、《医学免疫学实验》、《病原生物学实验(医学微生物学分册)》、《病原生物学实验(人体寄生虫学分册)》、《机能实验学》、《临床技能学》。

本套规划教材的编写,吸收了南华大学等多个高校多年来在医学实验教学方面的改革创新成果,强调对学生基础理论、基本知识、基本技能以及创新能力的培养,打破现行课程框架,构建以技能培养为目标的新型医学实验教学体系,注重知识的更新,反映学科的前沿动态,体现教材的思想性、科学性、先进性、启发性和实用性。借鉴国内外同类实验教材的编写模式,内容上将医学实验教学依据医学实验体系进行重组和有机融合,按照医学实验教学的逻辑和规律进行编写。

本套规划教材适用对象以本科临床医学专业为主,兼顾预防医学、医学检验、口腔医学、麻醉学、医学影像学、护理学、药学、卫生检验等专业需求,涵盖基础医学全部课程的实验教学。各层次、各专业学生可按照其专业培养的特点和要求,选用相应的实验项目进行教学与学习。

本套规划教材的编写出版,得到了科学出版社和南华大学的大力支持,凝聚了各位主编和全体编写、编审人员的心血和智慧。在此,一并表示衷心感谢。

由于医学实验教学模式尚存差异,加上我们的水平有限,本套规划教材难免存在缺点和不当之处,敬请读者批评指正。

总主编



2010年2月

前 言

免疫学是当代生命科学三大前沿学科之一,免疫学技术已广泛渗透到医学科学的许多领域,成为推动医学科学乃至整个生命科学向前发展的强有力工具。

随着高等教育教学改革不断深入,实验教学的理念正在发生着深刻变化,正在着力改变实验教学依附于理论教学的传统观念,注重对学生探索精神、科学思维、实践能力、创新能力和综合素质的培养,把实验教学作为培养创新型人才的一个重要环节。医学免疫学实验教学改革也不例外,正在研究探索中。本着“夯实基础、鼓励创新”的基本原则,我们对医学免疫学实验内容进行了重新分类和组合,保留了部分经典的基础性实验,新增了部分有利于培养学生综合素质及创新能力的综合性实验和研究创新性实验,形成了“基本实验操作技术”、“基本性实验”、“综合性实验”和“研究创新性实验”共四篇 17 章 51 个实验。

医学免疫学实验方法繁多,技术日新月异。对于实验内容的取舍,我们主要考虑其代表性、先进性和成熟性,成熟性即指所选实验项目基本上是经过我们多年教学和科研实践证明的、切实可行的实验。此外,保留了部分经典的免疫学实验项目,用于对学生进行基本技能培训;在此基础上,编入了一些综合性实验和研究创新性实验,以培养学生综合分析问题和解决问题的能力,培养学生的科学思维和创新能力,这类实验大多不能在单元教学时间内完成,适宜作为学生的选修实验。对于实验内容的编排体例,按照实验原理、实验器材、实验方法、实验结果、注意事项和思考题六个方面的顺序排列,学生看起来一目了然;学生可从“注意事项”中预先注意到试验中可能出现的问题,从而防患于未然;学生通过对“实验原理”的理解,对所做试验不但能知其然,还能知其所以然;学生通过做“思考题”,有助于消化课堂上所学的深奥的免疫学理论知识,促进学生自主学习。在部分免疫学实验中,还编绘了相关的图表,以加深学生对实验内容的理解。

本书的编者分别来自南华大学、中南大学、湖南中医药大学、吉首大学和湖南省人民医院,他们常年工作在教学和科研第一线,教学经验丰富,科研功底扎实,为本书的顺利完稿奠定了坚实的基础。

本书编写过程中参阅的部分教材和专著书目列于书后,在此向相关作者表示衷心感谢。由于实验教学改革仍处于不断探索之中,某些实验的定性尚无一定之规,书中实验的分类和定性只是我们一家之见,仅供参考。由于编者水平有限,书中难免有错误和不足之处,恳请广大师生和同行专家批评指正。

胡四海 曾铁兵

2009年11月

目 录

第一篇 基本实验操作技术

第一章 免疫原及佐剂的制备	(1)
实验一 颗粒性抗原的制备	(1)
实验二 可溶性抗原的制备	(2)
实验三 用半抗原制备免疫原	(4)
实验四 佐剂的制备	(5)
第二章 血液标本的采集	(7)
实验五 人血液标本的采集	(7)
实验六 动物血液标本的采集	(9)
第三章 细胞计数及活性测定	(13)
实验七 细胞计数方法	(13)
实验八 细胞活力测定	(14)
第四章 免疫细胞分离与制备技术	(17)
实验九 人外周血单个核细胞的分离	(17)
实验十 T、B淋巴细胞的分离	(19)
实验十一 NK细胞的分离	(22)
实验十二 小鼠脾细胞的制备	(23)
实验十三 小鼠腹腔巨噬细胞的制备	(24)

第二篇 基本性实验

第五章 凝集反应	(27)
实验十四 直接凝集反应	(27)
实验十五 间接凝集反应	(31)
第六章 沉淀反应	(39)
实验十六 凝胶内沉淀试验	(39)
实验十七 免疫电泳技术	(42)
实验十八 液相内沉淀试验	(45)
第七章 补体参与的免疫反应	(47)
实验十九 溶血试验	(47)
实验二十 补体活性测定	(48)
实验二十一 补体依赖的细胞毒试验	(50)
第八章 细胞凋亡检测	(52)
实验二十二 凋亡细胞的形态学检测	(52)
实验二十三 凋亡细胞的生化特征检测	(53)
实验二十四 凋亡细胞的流式细胞术检测	(55)
第九章 超敏反应试验	(59)

实验二十五	结核菌素试验	(59)
实验二十六	实验动物过敏症	(60)
实验二十七	皮肤速发型超敏反应	(61)
实验二十八	血清 IgE 测定	(62)

第三篇 综合性实验

第十章	免疫标记技术	(64)
实验二十九	免疫酶测定法	(64)
实验三十	免疫荧光技术	(66)
实验三十一	放射免疫技术	(68)
实验三十二	膜载体免疫测定	(70)
实验三十三	间接 ABC-ELISA 法检测兔抗人 Ig	(73)
第十一章	细胞免疫学实验	(75)
实验三十四	E 花环形成试验	(75)
实验三十五	T 淋巴细胞增殖试验	(77)
实验三十六	白细胞移动抑制试验	(81)
实验三十七	CTL 杀伤功能测定(⁵¹ Cr 释放法)	(83)
实验三十八	NK 细胞杀伤活性检测	(85)
实验三十九	吞噬细胞吞噬杀菌作用及溶菌酶的溶菌作用	(87)
实验四十	白细胞介素-2 的活性测定	(93)
实验四十一	肿瘤坏死因子的生物学活性测定	(96)
第十二章	体液免疫实验	(98)
实验四十二	抗血清(多克隆抗体)的制备	(98)
实验四十三	B 淋巴细胞溶血空斑试验	(103)

第四篇 研究创新性实验

第十三章	单克隆抗体的制备	(105)
实验四十四	单克隆抗体的制备与鉴定	(105)
第十四章	免疫印迹技术	(116)
实验四十五	免疫印迹技术	(116)
第十五章	LAK 细胞的制备	(119)
实验四十六	LAK 细胞的制备和活性检测	(119)
第十六章	HLA 分型技术	(121)
实验四十七	HLA 的血清学分型法	(121)
实验四十八	HLA 的细胞学分型法	(123)
实验四十九	HLA 的 DNA 分型法	(126)
实验五十	骨髓移植的 HLA 配型	(128)
第十七章	树突状细胞的诱生与鉴定	(130)
实验五十一	树突状细胞的诱生与鉴定	(130)
参考文献		(132)
附录	免疫学实验常用试剂及配制方法	(133)

第一篇 基本实验操作技术

第一章 免疫原及佐剂的制备

免疫原(immunogen),即完全抗原,也就是通常所称的抗原。免疫原指能诱导机体产生抗体和致敏淋巴细胞,并能与抗体或致敏淋巴细胞在体内外发生特异性结合而发生反应的物质,也就是说免疫原同时具有免疫原性和抗原性。仅具备抗原性的物质称为不完全抗原或半抗原。半抗原不具有免疫原性,必须与大分子物质(如蛋白质)连接后才具有免疫原性。

制备合格的免疫原是制备合格的抗体的前提条件。免疫学试验中所谓的合格抗原是指单一成分的、较纯的抗原。许多物质可成为免疫原,但极少是单一成分,所以必须将某一抗原从复杂的组分中分离提取出来,即进行纯化后才可作为免疫原,制备相应的抗体。颗粒性抗原和可溶性大分子抗原均具有免疫原性,经纯化后可直接用做免疫原。佐剂预先或与抗原一起注入机体,可增强机体对该抗原的免疫应答或改变免疫应答的类型。

实验一 颗粒性抗原的制备

颗粒性抗原主要是指细胞抗原、细菌抗原和寄生虫虫体抗原等。可溶性抗原与载体颗粒(红细胞、胶乳颗粒等)结合,也可形成颗粒性抗原。颗粒性抗原悬液呈浑浊状或乳浊状,免疫时多采用静脉内免疫法,较少使用佐剂作皮内注射。

【实验目的】 了解常用颗粒性抗原的种类及制备方法。

【实验方法】

1. 细胞抗原的制备 最常用的细胞抗原为制备溶血素用的绵羊红细胞,这种抗原制备比较简单。下面以制备绵羊红细胞抗原为例:

直接取新鲜绵羊红细胞,以无菌生理盐水洗涤3次(每次离心2000r/min,10min),最后配成 10^6 /ml浓度的细胞混悬液,即可直接进行免疫。

2. 细菌抗原的制备 细菌抗原包括菌体抗原(O抗原)、鞭毛抗原(H抗原)、菌毛抗原等,多用细菌培养后的菌液或固体培养物经集菌处理后获得。

(1) O抗原的制备(以伤寒杆菌为例)

1) 取伤寒杆菌菌株的典型光滑型菌落,接种于SS平板培养基,均匀涂布,37℃温箱培养24h。

2) 取出培养平板,用适量生理盐水刮洗下菌苔,置于含无菌玻璃珠和生理盐水的三角烧瓶中,充分摇动混匀菌体;100℃孵育2~2.5h,杀菌及破坏H抗原。

3) 将菌液移入离心管,5000r/min离心10min,吸弃上清;用无菌生理盐水洗涤沉淀,5000r/min离心10min,吸弃上清。

4) 无活菌试验合格后,用生理盐水配成 $8 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ 菌/ml的细菌悬液,加入苯酚

至终浓度为 0.5%，即为 O 抗原。

(2) H 抗原的制备(以伤寒杆菌为例)

1) 取伤寒杆菌菌株的典型光滑型菌落,接种于 SS 平板培养基,均匀涂布,37℃温箱培养 24h。

2) 取出培养平板,用适量 0.4%甲醛生理盐水冲洗刮下菌苔,移入无菌三角烧瓶中,37℃水浴 24h(或 4℃、3~5d 固定杀菌)。

3) 无活菌试验合格后,用无菌生理盐水配成 $8 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ 菌/ml 的细菌悬液,即为 H 抗原,于 4℃冰箱保存备用。

(3) 菌毛抗原的制备:将经过 20h 培养的志贺菌标准株湿菌 1g,置于 30ml 30%的蔗糖溶液中,激烈振荡(620 次/min)或搅拌 30min 后,10 000r/min 离心 15min。取出含有菌毛的上清液,于 4℃ 50 000r/min 离心 6h,即可分离出菌毛,经甲醛固定后即成菌毛抗原。

3. 虫卵抗原的制备 日本血吸虫虫卵抗原可制备成悬液供免疫用。

冻干虫卵的制备:取纯净新鲜虫卵 1 份,加 1.5%甲醛 10~20 份,作用 15min,期间搅拌 2 次,自然沉淀后弃去上清液。虫卵用 10~20 倍蒸馏水洗涤 2 次,每次 5min。将沉淀的虫卵移入菌种管中,置 -70℃速冻,拿出后进行冷冻真空干燥,封口后保存于室温或 4℃冰箱中备用。

【思考题】

(1) 伤寒杆菌既有 H 抗原,又有 O 抗原,怎样保证所制备的 O 抗原不会受到 H 抗原的影响、制备的 H 抗原不会受到 O 抗原的影响?

(2) H 抗原和 O 抗原的化学成分是什么?

实验二 可溶性抗原的制备

蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、细菌毒素、酶、补体、核酸等均为良好的可溶性抗原,这些抗原大多来源于人和动物的组织细胞,或来源于培养的组织或细胞,通常需要将这组织或细胞机械破碎,或通过酶消化,再经一定的方法提取和纯化,才能获得所需的可溶性抗原。

【实验目的】 了解不同类别可溶性抗原的制备方法。

【实验方法】

1. 组织和细胞粗抗原的制备 这类抗原多来源于人类和动物的组织或细胞,所用组织必须是新鲜的或低温($< -40^\circ\text{C}$)保存的。这些材料在获得可溶性蛋白质抗原之前,必须先进行处理,以便于进一步纯化。

(1) 立即去除器官或组织的包膜、结缔组织和大血管。

(2) 用生理盐水灌洗脏器,除去血管内残留的血液。

(3) 在冰浴中将洗净的组织剪成小块后粉碎(匀浆)。粉碎的方法有两种:①高速组织捣碎机法:在组织中加生理盐水(约 1/2)后装入捣碎机筒内捣碎(约 1 000r/min),用生理盐水以 10 000r/min 离心洗涤,间断进行 3~4 次,每次不超过 1min(防止时间过长会产热);②研磨法:用玻璃匀浆器或乳钵研磨,经过旋转、挤压将组织粉碎。研磨法可用于韧性较大的组织,如皮肤、空腔器官等。为了更有效地磨碎组织,有时在研磨时加入淘洗过的海砂。

(4) 将上述组织匀浆液经过 3 000r/min 离心 10min 后留取上清液。

(5) 上清液通过 10 000~20 000r/min 离心 30min,以除去细胞碎片,作为提取可溶性抗

原的材料(此时上清液应澄清)。

例如,血吸虫虫卵粗抗原的制备:取出冻干虫卵,用匀浆器充分研磨后,用生理盐水配成1:100(V/V)的虫卵悬液,于-70℃冰箱反复冻融5次或4℃ 48h超声粉碎,然后在4℃以10 000~12 000r/min离心30min,上清液即为虫卵粗抗原。

2. 组织或培养细胞可溶性抗原的制备 组织细胞粗抗原一般通过上述机械破碎后取得;也可通过酶消化获得,所用的酶大多为胃蛋白酶或胰酶,通过酶解将细胞间质蛋白消化,获得游离的单个细胞。细胞抗原一般分为三个组分:膜蛋白抗原、细胞质抗原(主要细胞器)和细胞核及核膜抗原。三种抗原的制备都需将细胞破碎,方法有如下几种:

(1) 冻融法:将待破碎的细胞置-15~-20℃冰箱内完全冻结,然后在30~37℃缓慢融化,如此反复2次,大部分组织细胞及细胞内的颗粒可被融破。此法适用于组织细胞,对微生物细胞的作用较差。

(2) 冷热交替法:在细菌或病毒中提取蛋白质及核酸时采用。将含细菌或病毒的材料投入沸水浴中,90℃左右维持数分钟,立即置冰浴中迅速冷却,绝大部分细胞被破碎。

(3) 超声破碎法:利用超声波的机械振动而使细胞破碎,所使用的超声波频率从1kHz~20kHz不等。超声破碎时需间歇进行,以免超声时间过长,因产热而导致抗原的破坏。一般一次超声1~2min,总时间为10~15min。此法适用于微生物和组织细胞的破碎。

(4) 酶处理法:溶菌酶在碱性条件(pH8.0)时能破坏革兰阳性的溶壁微球菌的 β -1,4糖苷键而溶解细胞壁。纤维素酶主要溶解真菌的细胞壁;蜗牛酶能溶解酵母菌和植物的细胞壁。

(5) 表面活性剂处理法:表面活性剂在适当的温度、pH和低离子强度的条件下,能与脂蛋白形成微泡,改变细胞膜的通透性而导致细胞溶解。常用的有十二烷基磺酸钠(阴离子型)、二乙氨基十六烷基溴(阳离子型)、吐温(非离子型)、Triton-100、去氧胆酸钠等。

3. 免疫球蛋白片段的制备 免疫球蛋白本身具有免疫原性,免疫动物后可制备相应的抗体,这种抗体称为抗抗体(第二抗体),常用于免疫球蛋白的检测。五类免疫球蛋白均可用前面介绍的纯化方法提取出来。若将这些免疫球蛋白分解成片段,如Fc段、Fab段、轻链等作为免疫原制备抗血清,则可制得相应的特异性抗体。制备方法如下:

(1) 非共价键解离法:免疫球蛋白肽链亚单位之间以氢键、静电引力等非共价键结合,这些键结合力较弱,可经两种方法将其断开制备片段。第一种方法是改变pH:一般将pH调至pH3~4(羧基滴定范围)和pH9~10(赖氨酸-酪氨酸滴定范围),当加入酸或碱使pH低于3或高于10时,肽链亚单位就会解离;第二种方法就是利用强变性剂,如8mol/L脲或6mol/L盐酸胍,可使肽链亚单位解离。

(2) 二硫键解离法:连接免疫球蛋白轻链与重链、重链与重链的共价键是二硫键,解离二硫键可将轻链与重链、重链与重链分开。解离的方法多采用氧化法和还原法。氧化法的优点是二硫键被切开后,肽链不能重新形成二硫键,便于肽链纯化;缺点是甲硫氨酸被氧化成亚砷,色氨酸侧链被破坏。还原法是将二硫键还原成巯基,但这个巯基极不稳定,易再重新结合成二硫键,必须及时用碘乙酸或碘代乙酰胺进行羧甲基化以封闭巯基。还原法目前较常用。

(3) 溴化氰裂解法:溴化氰与蛋白质中的蛋氨酸(甲硫氨酸)侧链的硫醚基起反应,生成溴化亚氨内酯,此产物与水反应,将肽链断裂。

(4) 酶裂解法:酶裂解法有极好的专一性,不同的免疫球蛋白片段可用不同的酶进行裂

解。如木瓜酶将 IgG 裂解可获得 1 个 Fc 段和 2 个相同的 Fab 段；胃蛋白酶将 IgG 裂解可获得 1 个 $F(ab')_2$ 片段和数个小片段。用木瓜酶水解得到的 Fc 段可作为抗原，制备抗重链血清；用胃蛋白酶水解获得的 $F(ab')_2$ 片段常作为抗体试剂应用。

【思考题】

- (1) 你认为颗粒性抗原和可溶性抗原的主要区别是什么？
- (2) 你有办法把可溶性抗原转变为颗粒性抗原吗？
- (3) 抗抗体(第二抗体)在临床上有哪些应用？
- (4) 免疫球蛋白的酶解片段有哪些实际应用？

实验三 用半抗原制备免疫原

半抗原(hapten)又称不完全抗原，指只有抗原性而无免疫原性的物质，如多糖、多肽、甾体激素、核苷、脂肪胺、类脂质、某些药物(如抗生素)和化学物品等小分子物质。这些小分子物质(通常指分子量小于 4kD)本身无免疫原性，当与载体(carrier)结合后可获得免疫原性。半抗原与载体结合形成的免疫原，既可诱导动物产生针对半抗原的抗体，也可诱导产生针对载体的抗体。

【实验目的】 了解常用载体的种类及用半抗原制备免疫原的方法。

常用载体的种类：有蛋白质、多肽聚合物、大分子聚合物和某些颗粒等。

1. 蛋白质 是一类结构复杂的大分子胶体物质，是一种良好的载体。常用的有牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兔血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白和血蓝蛋白等，其中牛血清白蛋白因其溶解度大、免疫活性强和容易获得而最为常用。蛋白质和半抗原结合是通过游离氨基、游离羧基、酚基、巯基、咪唑基、吡啶基和胍基等活性基团的缩合。

2. 多肽 为人工合成的多肽聚合物，常用的是多聚赖氨酸(polylysine)。多聚赖氨酸的分子量高达十几万到几十万，与半抗原结合免疫动物后，可诱生动物产生高滴度、高亲和力的抗体。

3. 大分子聚合物 聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素和活性炭等大分子聚合物，均可与半抗原结合，加入弗氏完全佐剂可有效诱导动物产生抗体。

因半抗原种类、动物类别、载体种类及结合方法的不同，制得的免疫原对动物免疫所产生的免疫效果也不尽相同。实际应用时，应尝试多采用几种载体或方法，以获得最佳效果。

【实验方法】 半抗原与载体的连接方法有物理法和化学法。

1. 物理法 通过电荷和微孔吸附半抗原。物理吸附的载体有淀粉、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、硫酸葡聚糖、羧甲基纤维素等。

2. 化学法 利用某些功能基团把半抗原连接到载体上。

(1) 带有游离氨基或游离羧基以及两种基团都有的半抗原：如多肽激素类(脑啡肽、胃泌素、促肾上腺皮质激素、前列腺素等)，可直接与载体连接。连接方法有下面几种：

1) 碳化二亚胺法：碳化二亚胺是一种化学性质非常活泼的双功能试剂，既可与半抗原的羧基结合，也可与半抗原的氨基结合。连接方法非常简便，只需将半抗原和载体蛋白按一定比例混合在适当的溶液中，然后加入水溶性碳化二亚胺，搅拌 1~2h，置室温反应 24h，最后经透析除去未反应的半抗原即可。

2) 戊二醛法：戊二醛也是常用的带有两个活性基团的双功能交联剂，它借两端的醛基与载体和半抗原的氨基以共价键连接。

3) 氯甲酸异丁酯法:又称为混合酸酐法,是利用半抗原上的羧基和载体蛋白上的氨基将二者连接起来,方法简便,多用于类固醇半抗原的制备。

(2) 无羧基和氨基的半抗原:带有羟基、酮基、醛基的半抗原,如醇、酚、糖、多糖、核苷以及甾族激素等,它们因无羧基和氨基,不能直接与载体连接,需要用化学方法使其转变为带有游离羧基的衍生物,再经碳化二亚胺法或氯甲酸异丁酯法与载体连接,获得载体-半抗原。依据半抗原的性质有如下4种方法:

1) 琥珀酸酐法:琥珀酸酐是琥珀酸的脱水产物,遇水又可恢复。将带有羟基的半抗原和琥珀酸酐在无水的吡啶中反应,就可得到带有羧基的半抗原琥珀酸衍生物。

2) 重氮化的对氨基苯甲酸法:先将对氨基苯甲酸与亚硝酸钠反应,反应产物再作用于带有酚基的半抗原,制得带有羧基的半抗原衍生物。

3) 一氯醋酸钠法:带有酚基的半抗原可用一氯醋酸钠法,生成带有羧基的半抗原衍生物。

4) (羧甲基)羧胺法:带有酮基的半抗原与O-(羧甲基)羟胺反应,转变为带有羧基的半抗原衍生物。

【思考题】

(1) 什么是半抗原,什么是完全抗原,二者有什么区别和联系?

(2) 你有办法把半抗原转变为完全抗原吗?

(3) 上述实验中提到的免疫原是半抗原还是完全抗原?

(4) 具有免疫原性的物质一般都是完全抗原,你认为这种说法对吗?为什么?

实验四 佐剂的制备

【实验目的】 了解佐剂的种类及常用佐剂的制备方法。

【佐剂的种类】 主要有如下几类:

1. 无机佐剂

(1) 氢氧化铝:分子式为 $\text{Al}(\text{OH})_3$,为白色单斜晶体,比重2.42。在 300°C 时失去水分,不溶于水和乙醇,溶于热盐酸、硫酸和碱类。

(2) 明矾:分子式为 $\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$,又称钾铝矾,为含有结晶水的硫酸钾和硫酸铝的复盐,无色八面晶体。有酸涩味,比重1.75,熔点 92°C 。

2. 有机佐剂 包括微生物及其代谢产物,如结核杆菌、卡介苗、短小棒状杆菌、百日咳杆菌、脂多糖(LPS);细胞因子(IL-2、IL-12)等。

3. 合成佐剂 人工合成的多聚肌苷酸:胞苷酸(poly I:C)、人工合成的多聚腺苷酸:尿苷酸(poly A:U)等。

4. 油剂 如弗氏佐剂、花生油乳化佐剂、矿物油、植物油等,以弗氏佐剂(Freund's adjuvant, FA)在动物实验中最常使用。

FA分为弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)和弗氏不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)两种。FA是一种对大多数抗原都有效的佐剂, CFA用于基础注射,而IFA用于辅助注射(以避免分枝杆菌蛋白引起的过敏反应)。但由于FA的一些副作用限制了它在实验动物上的使用,例如在注射部位形成肉芽肿和无菌性脓肿,腹腔注射引起腹膜炎等。由于这些严重的副作用,FA绝对不允许用于人的疫苗接种免疫,也不提倡用于动物的免疫接种。

5. 纳米佐剂 纳米佐剂指粒径为 $0.1\sim 100\text{nm}$ 的聚合物胶体。将纳米颗粒应用于疫苗

制备,可赋予疫苗某些新的性质:①靶向性:更有效地提呈抗原;②缓释性:使进入体内的疫苗抗原缓慢释放,提高抗原的生物利用度。

【实验方法】 几种常用佐剂的制备方法。

1. 弗氏佐剂 弗氏不完全佐剂(IFA):将油剂(液状石蜡或植物油,一般用液状石蜡)与乳化剂(无水羊毛脂或吐温-80,常用羊毛脂)混合而成,组分比可为1:1、2:1、3:1、4:1或5:1,可根据需要而定,一般为2:1。弗氏完全佐剂(CFA):在IFA中加活卡介苗(终浓度为2~20mg/ml)或死的结核分枝杆菌,即为CFA。制备的佐剂经高压灭菌后低温保存备用。

免疫动物前,先将弗氏佐剂与抗原按一定比例混合,制备成“油包水”乳液。佐剂和抗原体积比一般为1:1;蛋白质抗原浓度为1~100mg/ml,血清作1:2或1:4的稀释。佐剂与抗原乳化可按下面方法进行。

(1) 研磨法:先将佐剂加热并取适量放入无菌的玻璃研钵内,待冷却后再缓缓滴入等体积的抗原溶液,边滴边按同一方向研磨,滴加抗原的速度要慢。待抗原全部加入后,继续研磨一段时间,使之成为乳白色黏稠的油包水乳剂。本法适于制备大量的佐剂抗原,缺点是研钵壁上黏附大量乳剂,抗原损失较大。

(2) 注射器混合法:将等量的弗氏佐剂和抗原溶液分别吸入两个注射器内,两注射器之间以一细胶管相连(注意排净空气),然后交替推动针管,直至形成黏稠的乳剂为止。本法优点是容易做到无菌操作,适用于制备少量的抗原乳剂。

(3) 超声波乳化法:将抗原和佐剂按所需量加入离心管中,置于超声波粉碎器上,粉碎头浸入液面下0.5cm,离管底0.5cm左右。每次乳化10~15s,置冰箱冷冻室1min左右,反复乳化3~4次即可乳化完全。将管内已乳化的悬液吸入一容器,管内残余悬液经800r/min离心5~10min后,收集到同一容器内备用。此法简便、快速,节省材料。

乳化效果鉴定:制备好的乳化剂经鉴定后才能使用。鉴定方法是将乳化剂滴入冷水中,若保持完整不分散,成滴状浮于水面,即乳化完全,为合格的油包水乳剂。(注:现在有商品化的CFA和IFA供应)。

2. 氢氧化铝佐剂 取5%硫酸铝溶液250ml,在强烈搅拌下加入5%氢氧化钠100ml,用生理盐水离心洗涤沉淀2次,再悬入生理盐水中至250ml。取该佐剂适量,与等体积抗原(蛋白质抗原含量为25mg/ml,血清作1:2稀释)混合后免疫动物。

3. 明矾佐剂 钾铝矾(硫酸铝钾)在一定pH条件下产生氢氧化铝胶体吸附抗原而产生佐剂效应。制备方法是生理盐水溶解蛋白质抗原,在搅拌下缓慢滴入一定量10%硫酸铝钾溶液,用NaOH调pH到6.5,此时溶液变成乳状悬液,以4000r/min离心15min,弃上清液,沉淀用生理盐水洗涤二次,加入硫柳汞防腐,4℃保存备用。明矾佐剂一般用于肌肉注射,皮下注射容易引起肉芽肿和脓肿。

4. 脂质体 脂质体包封抗原后,可使抗原延缓释放,并且脂质体颗粒有免疫刺激作用,可提高抗原免疫动物的效果。

【思考题】

- (1) 免疫佐剂的作用机制主要有哪些方面?
- (2) 弗氏佐剂是否能用于人体?请说明理由。
- (3) 目前能用于人体的佐剂有哪些?

第二章 血液标本的采集

在免疫学实验中,常常需要采集人或实验动物的血液进行研究。正确采集血液标本是免疫学最基本的实验操作技术,也是获得准确、可靠实验结果的前提。血液采集技术和方法均要求保持血液标本的完整性和代表性,血液标本采集前,应根据实验目的选择合适的采血方法和合适的抗凝剂。本章主要介绍人和实验动物血液标本的采集。

实验五 人血液标本的采集

【实验目的】 掌握静脉采血法,熟悉皮肤采血法。

【血液标本的类型】 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。血液经抗凝处理后的全部血液称为抗凝全血,常用于免疫细胞的分离和血细胞的检查等。

2. **血浆** 全血抗凝之后经离心除去血细胞后的成分,为淡黄色液体,用于血浆生理性和病理性化学成分的测定。血浆除钙离子外,含有其他全部凝血因子,特别适合于血栓与止血检查。

3. **血清** 血液离体后不经抗凝处理、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,更适用于多数临床化学和临床免疫学检查。

4. **分离或浓集的细胞成分** 有些临床实验特别是近年来新出现的一些医学检验项目,要求采集特定的细胞成分,如相对浓集的粒细胞、纯化的淋巴细胞、分离的单个核细胞、富集的血小板、浓集的白血病细胞等。

【实验器材】 真空采血管(普通血清管、柠檬酸钠或肝素抗凝管)、一次性使用静脉采血针、止血带、一次性专用采血针、络合碘、无菌干棉签、无菌干棉球等。

【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。动脉采血法因其风险性较高,在临床上一般很少使用。

1. **静脉采血法** 当检查项目使用血量较多时通常采用静脉采血法(venipuncture for blood collection)。静脉血能准确反映全身血液的真实情况,且不易受气温和末梢循环的干扰,更具代表性。位于体表的浅静脉均可作为采血部位,通常采用肘部静脉。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,可从股静脉或颈外静脉采血,但要准备充分,注意其风险性。

负压采血法:又称封闭式采血法(tube for blood collection),是近年来在传统的静脉采血法基础上进一步发展和完善的一种新的、简便易行的静脉采血法。其原理是封闭的试管内有定量的负压,使血液定量进入试管内(图 2-1,彩图 1,图 2-2,彩图 2)。

常选择肘正中静脉或贵要静脉处采集静脉血,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。将一次性采血针一头胶套取下,以 $15^{\circ}\sim 30^{\circ}$ 角度刺入血管,见回血后,固定针柄;将双向采血针另一端针头刺入真空采血管的管盖,使血液顺着压力差流

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,完毕松止血带,最后拔出穿刺针,用无菌干棉签按压针眼处片刻以止血。

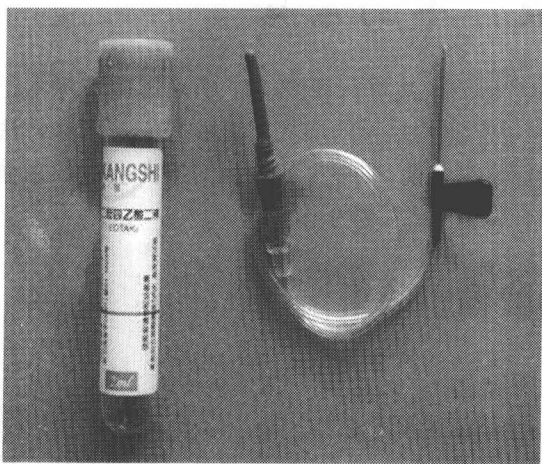


图 2-1 负压采血法器具

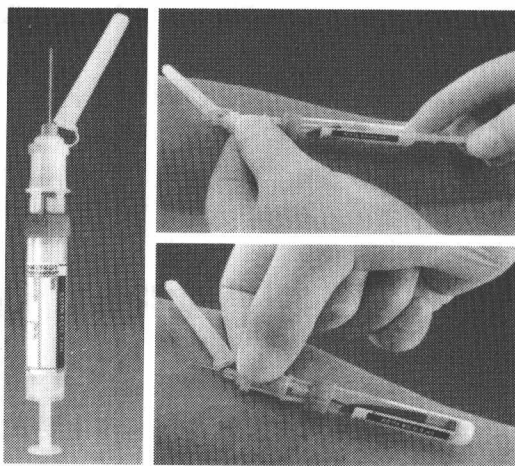


图 2-2 负压采血法

负压采血法的优点:

- (1) 血样无容器之间的转移,减少了溶血现象而有效保护了血液有形成分。
- (2) 减少了二次污染机会,保证待检血液标本原始性状的完整性,使检验结果更为真实。
- (3) 如果使用血量或检查项目较多时,只要更换封闭的负压试管就可连续采血。
- (4) 采集的血液标本转运方便,特别适用于病房和野外流动采血,能避免对医护人员的感染和患者血液标本间的交叉污染。

2. 皮肤采血法(skin puncture for blood collection) 主要用于需血量微小的检查项目,所得到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。

采血部位:成人常用手指或耳垂采血。耳垂采血痛感较轻,操作方便,但血循环较差,受气温影响较大,检查结果不够恒定,现在不提倡使用。手指采血操作方便,可获相对较多血量,检查结果也比较恒定。世界卫生组织(WHO)曾推荐必要时可用左手无名指指端内侧血做血液一般检验。婴幼儿因手指太小可用脚大趾或足跟部位采血。严重烧伤患者,应选择皮肤完整处采血。

采血器:采用特制三棱针或专用“采血针”,特别是后者有利于采血技术的质量控制,严禁用注射针头代替采血针。为避免交叉感染,必须严格实行一人一针一管(毛细吸管)。

采血方法:轻轻按摩采血部位,使局部组织自然充血,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,常弃去不用。用微量吸管吸取血液至所要求的刻度,然后用无菌干棉球压住针刺点以止血。

【注意事项】

- (1) 采血前患者应保持平静,一般应在清晨时间空腹取血。