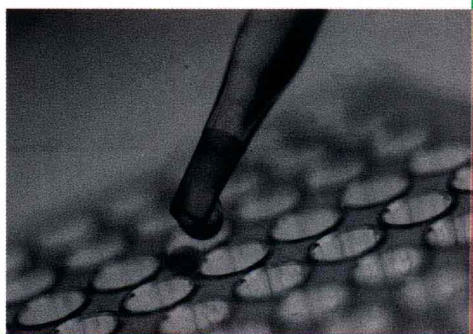


高等医药院校基础课实验系列教材

医学免疫学 实验教程



YIXUE MIANYIXUE
SHIYAN JIAOCHENG

廖纪元 王希君 主编



科学出版社

第 2 版 医学免疫学实验教程 第 2 版

医学免疫学 实验教程

YIXUE JIYUANXUE SHIYAN JIAOCHENG
Second Edition

第 2 版 第 2 版 第 2 版

第 2 版 第 2 版 第 2 版

高等医药院校基础课实验系列教材

医学免疫学实验教程

廖纪元 王希君 主编

科学出版社

北 京

版权所有,侵权必究

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303

内 容 简 介

本书主要介绍免疫分子与免疫细胞的检测,涉及部分经典免疫学实验如沉淀反应、凝集反应、免疫标记技术,科研基础性实验如免疫细胞分离、培养及功能测定技术,以及动物模型建立、创新研究型实验的立题等内容。全书共分5篇,第一篇为实验概述,第二篇为分子免疫学实验,第三篇为细胞免疫学实验,第四篇为动物免疫学实验,第五篇为研究创新型实验。

本书可供高等医药院校临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理等专业学生使用,也可供相关教学、研究人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验教程/廖纪元,王希君主编. —北京:科学出版社,2012.8

高等医药院校基础课实验系列教材

ISBN 978-7-03-035436-5

I. 医… II. ①廖… ②王… III. 医学—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(2012)第 201866 号

责任编辑:杨瑰玉/责任校对:王望容

责任印制:彭 超/封面设计:苏 波

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>

武汉市科利德印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

开本:787×1000 1/16

2012年8月第 一 版 印张:7 1/2

2012年8月第一次印刷 字数:165 000

定价:15.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

本书编委会

主 编 廖纪元 王希君

副 主 编 周惠萍 刘红云 曾 洁

主 审 姚旌旗

编 委 （以姓氏笔画为序）

万滋衡 王希君 刘红云 周惠萍

曾 洁 廖纪元 潘清荣

前 言

医学免疫学是医学类专业主干学科之一,与其他医学学科有着广泛的交叉。本学科理论知识发展迅速,实验技术不断更新。在全面推进素质教育,培养创新人才的理念指引下,为适应高等院校医药人才培养的需要,锻炼学生实践操作、创新思维以及基础科研能力,我们依据本校的实际情况,结合学科发展现状,特编写此实验教程。

本书的各位编者均从事医学免疫学教研工作多年,在免疫学实验教学过程有着丰富的实践积累。本书在借鉴其他医药院校实验教学经验的同时,参考临床实际,坚持“理论与实践、实践与临床、实践与基础科研”相结合为编写原则。基于理论,兼顾知识的系统性和完整性;结合实际,参考临床实用免疫学技术,对医学免疫学实验内容进行了整合与更新,保留了经典基础理论性实验,增加了临床免疫学检测相关实验以及创新设计型实验。同时,从生物安全角度出发,对部分实验中可能存在的安全隐患因素进行了更改和修正。

本书主要介绍免疫分子与免疫细胞的检测,涉及部分经典免疫学实验如沉淀反应、凝集反应、免疫标记技术,科研基础性实验如免疫细胞分离、培养及功能测定技术,以及动物模型建立、创新研究型实验的立题等内容。全书共分5篇,第一篇为实验概述,第二篇为分子免疫学实验,第三篇为细胞免疫学实验,第四篇为动物免疫学实验,第五篇为研究创新型实验。教材的编写期盼能够达到以下目的:能够在医药学科本专科专业的实验教学中,适合教师“教”,适合学生“学”;能够给医学免疫学同行带来一些思路;能够给临床检验医师提供一定的参考。

本书主要供高等医药院校的基础、临床、预防、口腔、影像、护理、药学、检验等专业的本专科学生使用,也可供医学免疫学教学、科研及临床相关工作者参考。

由于编者学识水平有限、经验不足,成书仓促,本教材难免存在不足和疏漏之处,敬请广大同仁批评指正。

编 者
2012年6月

目 录

第一篇 概 述	1
一、实验室规则	3
二、实验意外事故的紧急处理	3
三、油镜的使用与保护	4
第二篇 分子免疫学实验	7
实验一 特异性抗体的制备	9
一、兔抗羊红细胞免疫血清(溶血素)的制备	9
二、兔抗人 IgG 免疫血清的制备	11
实验二 免疫血清的鉴定与纯化	13
一、兔抗 SRBC 免疫血清(溶血素)的鉴定	13
二、免疫血清的纯化	15
实验三 凝集反应	18
一、直接凝集反应	18
二、间接凝集反应	22
实验四 沉淀反应	27
一、单向免疫扩散试验	27
二、双向免疫扩散试验	29
三、对流免疫电泳试验	31
四、火箭免疫电泳试验	33
五、免疫电泳试验	34
六、免疫比浊试验	36
实验五 免疫标记技术	38
一、免疫荧光技术	38
二、酶联免疫吸附实验(间接法)	40
三、酶联免疫吸附实验(双抗原夹心法)	41
四、酶联免疫吸附实验(双抗体夹心法)	43
五、放射免疫技术	44
实验六 补体参与的免疫反应	47
一、补体溶血反应	47
二、血清总补体溶血活性(CH ₅₀)测定	48
实验七 溶血空斑形成试验	51
实验八 细胞因子检测	53
白细胞介素-2 的诱生与生物学活性检测	53

第三篇 细胞免疫学实验	57
实验九 细胞计数方法	59
实验十 人外周血单个核细胞的分离	61
实验十一 小鼠脾细胞的制备	64
实验十二 小鼠腹腔巨噬细胞的分离与制备	66
实验十三 T 细胞、B 细胞的分离	68
一、E 花环分离法	68
二、尼龙棉柱法分离法	69
实验十四 E 花环形成实验	72
实验十五 淋巴细胞亚群的检测	74
实验十六 淋巴细胞增殖反应	76
一、MTT 比色法	76
二、 ^3H -TdR 掺入法	77
实验十七 混合淋巴细胞培养	79
实验十八 NK 细胞活性的检测	81
一、乳酸脱氢酶释放法	81
二、放射性核素 ^{51}Cr 释放法	82
实验十九 中性粒细胞吞噬功能测定	84
第四篇 动物免疫学实验	87
实验二十 免疫实验相关动物模型的建立	89
一、免疫功能低下动物模型的建立	89
二、荷瘤动物模型的建立	90
实验二十一 豚鼠过敏反应的观察	92
第五篇 设计性实验	95
一、设计性实验的选题、设计与实施	97
二、设计性实验参考选题	101
附录 免疫学实验常用试剂的配制	104
参考文献	111

第

一

篇

概 述

一、实验室规则

实验是验证理论、对学生进行基本技能训练和培养科学研究能力的手段。为保证实验效果,同时避免病原微生物的实验室内传染,保障实验操作者的安全,特制定以下规则:

(1) 学生在实验课前,应认真预习实验内容,明确实验目的,了解实验原理、操作程序,如有疑问,应事先请教指导教师。

(2) 尽量不带个人生活、学习用品入实验室,必须要带的物品如书本、文具应放在远离实验操作的指定位置。

(3) 进入实验室应穿工作服,离开时将工作服脱下并反折后带走,在实验室内应保持安静,遵守秩序,不得大声喧哗、随意走动或拆卸仪器、搬弄标本。

(4) 实验室内禁止吸烟、进食及饮水,严禁用嘴吸移液及湿润标签,尽量不要用手触摸头面部及身体其他暴露部位。

(5) 如遇不慎打破菌种管或误使有菌材料污染皮肤、衣物、桌面等情况,应及时报告指导教师,切勿隐瞒或自行处理。

(6) 实验中所被污染过的器材、物品及其他盛过有菌物的容器,用完后应立即投入已准备的消毒剂中,不可随意扔放。

(7) 严格按操作程序进行实验,认真观察、分析实验结果,以实事求是的科学态度记录在实验报告中。如实验结果与理论不一致,应分析原因,培养自己独立思考、分析问题和解决问题的能力。

(8) 要爱护公共财物,节约水电及试剂材料,不得将实验物品私自带出实验室。如遇仪器、用品损坏,应报告指导教师并按规定予以赔偿。

(9) 实验结束后,整理桌面,清理实验用品,实验废弃物(包括实验动物尸体)应收入或倒入指定的地方和容器内。实验完毕洗手后方可离开实验室。每一位同学均应服从卫生值日安排,认真负责地做好清洁卫生。最后离开的同学应注意关好水电、门窗。

二、实验意外事故的紧急处理

严格按照老师所要求的操作进行实验,若不慎发生意外事故,应立即报告指导老师,进行紧急处理。

(1) 皮肤创伤:先除尽异物,用无菌生理盐水洗净后涂以2%红汞或2%碘酒,必要时进行包扎。

(2) 灼伤:涂以无菌的液体石蜡、5%鞣酸或2%苦味酸。

(3) 化学物品腐蚀伤:若为强酸,先用大量清水冲洗,再以5%碳酸氢钠或5%氢氧化铵溶液洗涤中和;强碱腐蚀伤则先以大量清水冲洗后,再用5%醋酸或5%硼酸溶液洗涤中和。若眼部受伤,经上述步骤处理后,再滴入无菌橄榄油或液体石蜡1~2滴。

(4) 吸入菌液,应立即吐入盛有消毒剂的容器内,以大量清水或0.1%高锰酸钾、3%双氧水漱口,并根据不同菌种服用相应抗生素以预防感染。

(5) 菌液溅洒桌(地)面,应立即以抹布浸沾 0.2%~0.5% 84 消毒液,覆盖污染部位,经半小时后方可抹去。若菌液污染手部,应立即浸泡于消毒液内 10~20 min,再用肥皂刷洗。

三、油镜的使用与保护

【目的要求】

熟练掌握显微镜油镜的使用和维护方法。

【实验原理】

在免疫学中主要使用的是油镜,油镜是因为在使用时需用香柏油等做介质而得名。光学显微镜的放大倍数与玻璃透镜的大小有关。观察时由聚光器聚集的光源要通过载玻片、空气,才能进入物镜中。油镜放大倍数较高,透镜小,镜孔也小,入射的光线少。光线通过不同密度的介质物体(玻片→空气→透镜)时,部分光线会发生折射而散失,进入物镜的光线减少,致使观察视野暗淡,物像不清。如在透镜与玻片之间滴加和玻璃折射率($n=1.52$)相仿的香柏油($n=1.515$),则使进入油镜的光线增多,视野亮度增强,物像清晰。如图 1-1 所示。

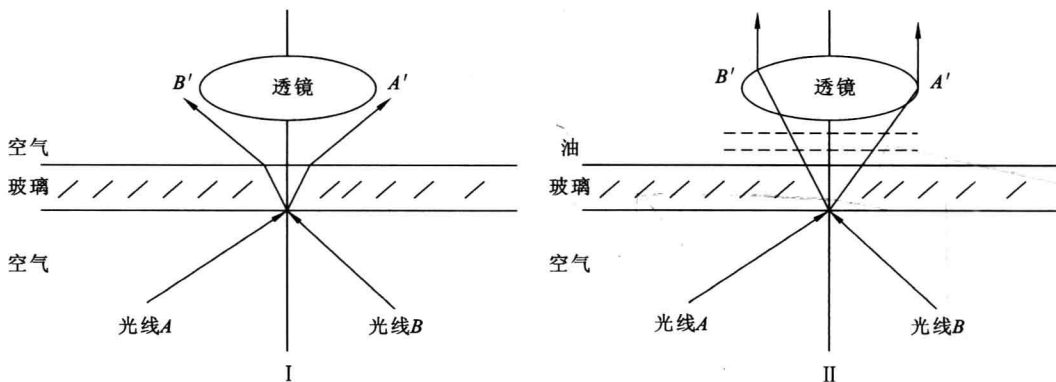


图 1-1 油镜的原理示意图(I为加油前,II为加油后)

【实验器材】

标本片、显微镜、香柏油、擦镜纸、二甲苯(或酒精乙醚混合液)。

【实验方法】

1. 将集光器升至最高,光栅增至最大。标本片(涂面向上)放在载物台上,用标本推进器或压片夹固定。

2. 低倍镜找出标本的范围,然后在待检部位上加一滴香柏油(不要多加,使呈滴状,切勿散开),转动镜头转换器,将油镜头置于工作位置,然后从侧面观察并缓慢转动粗螺

旋,使载物台缓缓上升,至油镜头浸入油中轻轻接触玻片为止(注意调节粗螺旋时不要用力过猛、过急,以免损坏镜头或压坏标本)。然后视线移至目镜,通过目镜观察,同时再缓缓转动粗螺旋下降载物台,当见到模糊图像时,改转动细螺旋调出清晰的物像。然后一边移动标本片,一边观察,寻找理想的视野仔细观察。

3. 观察标本时,两眼宜同时睁开,减少眼睛疲劳。最好用左眼观察,右眼配合绘图和记录。

4. 观察完毕,取下标本片,立即用擦镜纸顺一个方向旋转擦拭镜头上的油。若油已干,应先用二甲苯滴在擦镜纸上擦拭镜头,再用另一干净擦镜纸拭去镜头上沾有的二甲苯(因透镜片是用胶质粘固的,二甲苯能溶解胶质,日久镜片将移位或脱落)。

5. 显微镜擦净后,降低物镜并将其转成八字形,集光器下降,反光镜推平,光圈关上,归还至显微镜存放处。

【注意事项】

油浸物镜的工作距离很短,一般在 0.2 mm 以内,再加上一般光学显微镜的油浸物镜没有“弹簧装置”,因此使用油浸物镜时要特别细心,避免由于“调焦”不慎而压碎标本片并使物镜受损。

【思考题】

1. 使用油镜时,为什么选用香柏油作为物镜与玻片间的介质?是否可以用水或其他种类的油剂代替香柏油,为什么?

2. 油镜用毕后,为什么必须把镜油擦净?用过多的二甲苯擦镜头有何危害?

(王希君 万滋衡)

第

二

篇

分子免疫学 实 验

实验一 特异性抗体的制备

抗原可刺激机体诱导特异性抗体的产生,并与之特异性结合。由于抗原与抗体的反应存在特异性,故可用已知抗原检测未知抗体或用已知抗体检测未知抗原。抗体主要存在于血清中,所以,抗原抗体发生的特异性反应也称为血清学反应。

在抗原抗体的血清学反应中,抗体的质量直接影响到实验结果的特异性和灵敏度,因此,优质的抗体应该具备高亲和力、高效价和高特异性。制备高质量的抗体需要有理想的免疫原、健康适宜的动物和科学的免疫方法。免疫学检测中常用的抗体主要来自于免疫动物的多克隆抗体(抗血清)和采用杂交瘤技术制备的单克隆抗体。

本实验基于多克隆抗体的制备技术,主要介绍兔抗羊红细胞免疫血清(溶血素)以及兔抗人 IgG 免疫血清的制备。

一、兔抗羊红细胞免疫血清(溶血素)的制备

【目的要求】

1. 熟悉颗粒性抗原的制备方法。
2. 熟悉多克隆抗体制备的基本原理和方法。

【实验原理】

按照预先制定的免疫方案,将抗原物质经适宜途径免疫动物后,经过一定时间,动物体内可产生特异性抗体并释放入血液,当血中的抗体达到一定效价时采血分离血清,所获得的血清即为特异性免疫血清(又称为抗血清)。由于抗原具有多种表位,可激活多个 B 细胞克隆活化并产生抗体,这种抗血清又称为多克隆抗体。抗原的免疫原性和纯度、动物应答的能力以及免疫程序(抗原剂量、免疫途径、佐剂等因素)等是影响免疫血清质量的重要因素。

绵羊红细胞(SRBC)对于家兔等异种动物属于外来性抗原,免疫健康家兔后可诱导家兔体内 B 细胞活化,产生 SRBC 的特异性抗体。在补体参与的情况下,SRBC 抗体与 SRBC 发生特异性结合,生成抗原抗体复合体,该复合体可诱导补体的活化,导致 SRBC 的溶解,故 SRBC 抗体又称为溶血素。

【实验器材】

1. 健康成年家兔(雄性,体重 2~3 kg)、健康成年绵羊。
2. 阿氏液(Alsever's Solution)、生理盐水、碘伏、75%医用酒精。
3. 动物固定架、剪刀、负压采血管、采血针、量筒、棉球、毛细滴管、离心管、三角烧瓶(200 ml)、离心机、冰箱等。