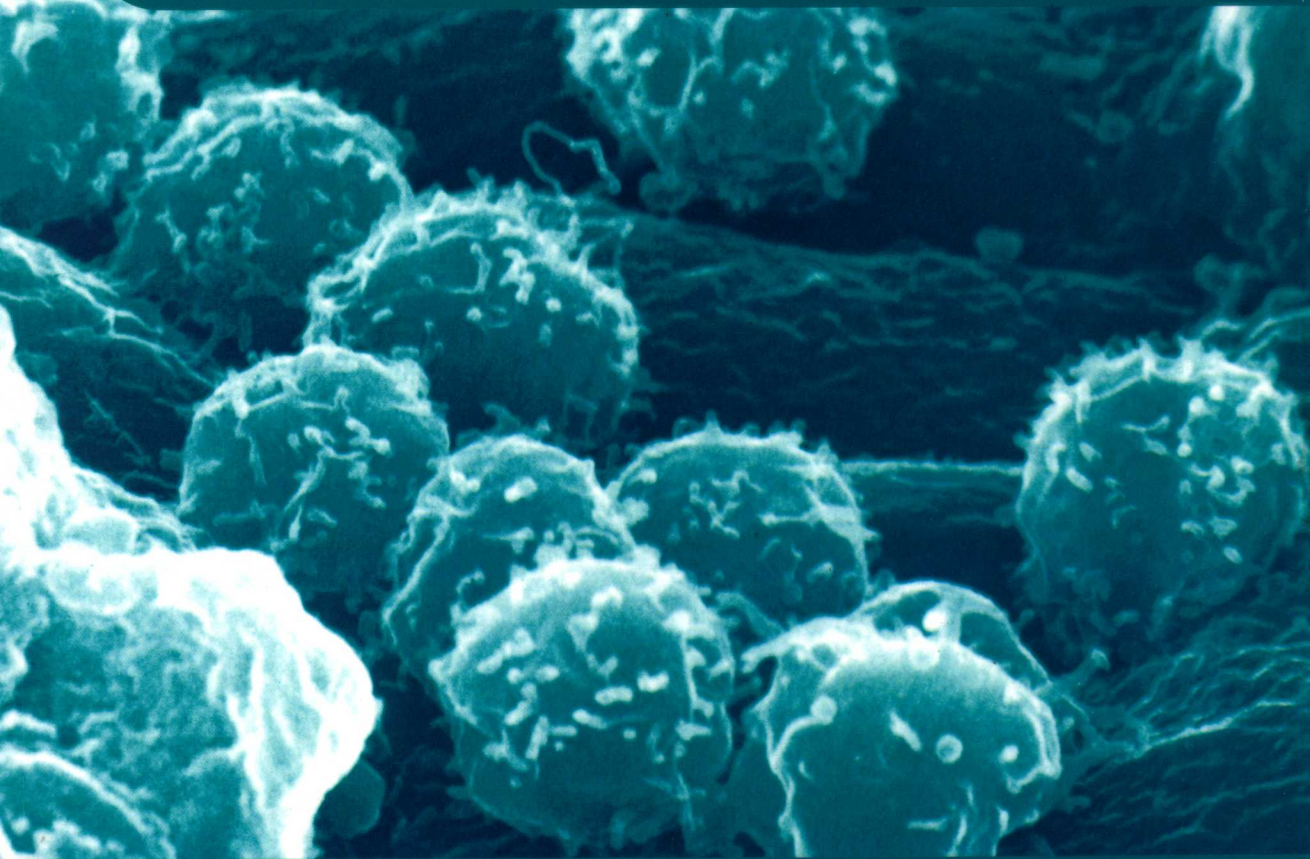


高等学校医学规划教材配套教材

(供基础 · 临床 · 预防 · 口腔及药学等专业用)



医学免疫学 常用实验技术

主编 吕昌龙 李 一 任 欢



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

普通高等教育医学类规划教材

（供基础医学、预防医学及临床医学专业用）

医学免疫学 常用实验技术

（第2版） 王 宁 主编

人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

高等学校医学规划教材配套教材

(供基础·临床·预防·口腔及药学等专业用)

医学免疫学常用实验技术

Yixue Mianyixue Changyong Shiyan Jishu

主 编 吕昌龙 李 一 任 欢

副主编 曹雅明 常雅萍 刘 平

编 者 (按姓氏拼音排序)

曹雅明	常雅萍	李 波	李 一
李殿俊	刘 平	刘北星	鲁仁杰
吕昌龙	吕雪莹	祁赞梅	任 欢
单风平	王大南	王金岩	徐红薇



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容提要

本书是《医学免疫学》(第6版)和《医学免疫学复习指南和题集》的配套教材。全书共分十章,内容包括免疫学常用实验动物的基本操作技术与免疫法、抗体的制备和检测、淋巴细胞功能的体内外检测、细胞因子及细胞因子受体的检测、补体的检测、固有免疫细胞的检测、抗原提呈检测、显微镜检测、干细胞和前体细胞的制备等。既保留了目前常用的、经典的免疫学技术,又重点介绍了具有实际应用价值的最新免疫学技术。

本书供高等医学院校基础、临床、预防、口腔及药学等专业本科生使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学常用实验技术 / 吕昌龙, 李一, 任欢主编. —北京: 高等教育出版社, 2011.7

ISBN 978-7-04-032225-5

I. ①医… II. ①吕… ②李… ③任… III. ①医药学: 免疫学—实验—高等学校—教材 IV. ①R392-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第130293号

策划编辑 杨 兵

责任编辑 杨 兵

封面设计 张 楠

责任印制 韩 刚

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 北京市朝阳展望印刷厂
开 本 787×1092 1/16
印 张 5.75
字 数 130 000
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landraco.com>
<http://www.landraco.com.cn>
版 次 2011年7月第1版
印 次 2011年7月第1次印刷
定 价 12.60元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 32225-00

► 前 言

半个多世纪以来,免疫学发展极其迅速,是现代生命科学领域的最前沿学科之一。现代免疫学技术以其高度特异性和灵敏性广泛应用于疾病的预防、诊断和治疗,以及生命科学的诸多研究领域。医学及相关专业的本科生掌握基本的免疫学实验技术将会为以后的工作奠定坚实的基础。

本书是高等教育出版社出版的吕昌龙教授主编的《医学免疫学》(第6版)和《医学免疫学复习指南和题集》的配套教材,由中国医科大学、吉林大学、哈尔滨医科大学和内蒙古民族大学免疫学教研室具有多年教学实践经验的副教授以上人员参加编写。其突出特点是精炼和实用。

本书内容除保留了目前常用的、经典的免疫学技术外,重点介绍了有实际应用价值的现代免疫学技术。本书第一章主要是帮助学生了解免疫学常用实验动物的一些基本知识和基本操作,是编者多年实验课教学的经验总结,对学生学习免疫学实验技术十分必要。第二至第十章紧密配合《医学免疫学》教材内容,不仅有益于学生对理论内容的深刻理解和,更重要的是通过实验技术的学习可拓宽学生的思维及对未知领域的探索兴趣。依据实验技术的复杂性和实际应用不同,可分别用于本科生和研究生。此外,书后的两个附录可为学生提供学习免疫学实验技术的相关资料,以便查阅参考。

书中有不当之处敬请读者批评指正。

吕昌龙

2011年5月

目 录

第一章 免疫学常用实验动物的基本操作技术与免疫法

第一节	动物抓取和固定	1
第二节	动物麻醉	2
第三节	动物注射	3
第四节	动物采血	4
第五节	动物淋巴器官及组织摘取	5
第六节	动物处死	5
第七节	动物免疫	6

第二章 抗体的制备和检测

第一节	多克隆抗血清的制备	8
第二节	单克隆抗体的制备	11
第三节	酶联免疫吸附实验检测抗体	18
第四节	双扩法检测特异性抗体	18

第三章 淋巴细胞功能的体外检测

第一节	单个核细胞的分离和分选	20
第二节	淋巴细胞的分离和分选	22
第三节	淋巴细胞数量和亚群分析	25
第四节	B 细胞功能检测	27
第五节	T 细胞功能检测	29

第四章 淋巴细胞功能的体内检测

第一节	迟发型超敏反应	33
第二节	接触性超敏反应	34

第五章 细胞因子及细胞因子受体的检测

第一节	细胞因子的检测	35
第二节	细胞因子受体的检测	43

第六章 补体的检测

第一节	CH ₅₀ 试验	46
第二节	AH ₅₀ 试验	47
第三节	MBL 测定	49

第七章 固有免疫细胞的检测

第一节	巨噬细胞的分离和吞噬功能测定	52
第二节	中性粒细胞的分离	54
第三节	NK 细胞的分离和功能测定	55

第八章 抗原提呈检测

第一节	抗原提呈细胞的选择和制备	58
第二节	外源性抗原提呈的测定	61

第九章 显微镜检测

第一节	荧光显微镜	62
第二节	免疫荧光染色法	63
第三节	免疫组化法	64

第十章 干细胞和前体细胞的制备

第一节	骨髓来源造血干细胞的制备	69
第二节	造血干细胞和前体细胞的分选	70
第三节	造血干细胞和前体细胞的鉴定	71

附录一	常用试剂	72
-----	------------	----

附录二	常用免疫学相关技术	80
-----	-----------------	----

参考文献		84
------	-------	----

第一章

免疫学常用实验动物的基本操作技术与免疫法

第一节 动物抓取和固定

抓取和固定动物就是使之保持相对固定体位,处于安静状态,充分暴露所需部位,顺利进行各种实验操作。同时也可避免动物咬伤实验者或造成动物伤害及其他意外事情发生。

一、小鼠

右手捏住小鼠尾巴,将小鼠提起并放于鼠笼盖或实验台上,当其向前爬行时,用左手拇指和食指抓住两耳间及头颈部皮肤,将小鼠置于左手内,用无名指或小指按压、固定尾巴,然后再按实验需要用手指夹住肢体固定。右手可行注射或其他操作(图1-1)。也可用小鼠固定器固定,用于尾静脉注射(图1-2)。

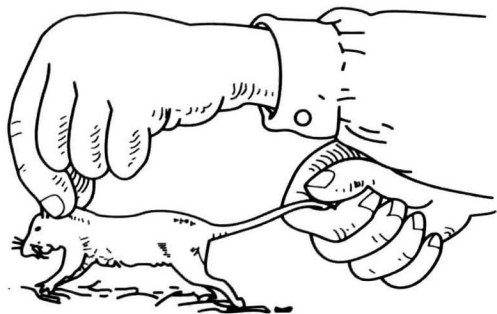


图 1-1 用手固定小鼠的方法



图 1-2 用固定器固定小鼠的固定法

二、大鼠

右手轻轻抓住大鼠尾巴向后轻拉,左手抓紧大鼠两耳间及头颈部皮肤,并将其固定在左手中,右手可行注射或其他操作(图1-3)。也可类似于小鼠用固定器固定进行尾静脉注射。

三、家兔

用一只手抓住家兔颈背部,另一只手拖住身体,然后进行固定。如进行背部实验操作,

可直接用手固定。一个人固定家兔,另一个人进行操作。如进行其他部位的实验操作,可用台式固定法和立体定位器固定法。

1. 台式固定法:将家兔仰卧于固定台上,前后肢均左右分开,用粗线绳缚扎于踝关节以上部位,分别固定在兔台两侧;用已固定在台板上的特制的头夹固定头部(图1-4)。该固定法常用于胸腹部的实验操作。

2. 立体定位器固定法:按图1-5所示将家兔放进立体定位器的内筒中,头部从内筒前部的孔中提出并进行固定,再将定位器的外筒套于内筒上进行固定。该固定法主要用于耳静脉的实验操作。

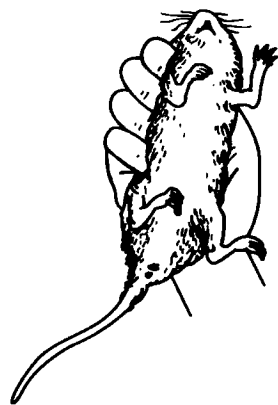


图1-3 用手固定大鼠的方法

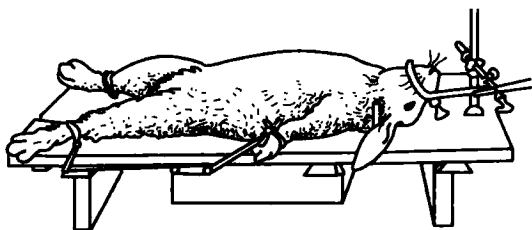


图1-4 家兔台式固定法

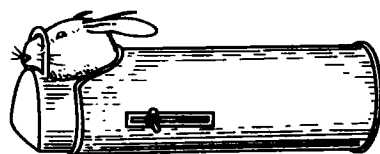


图1-5 立体定位器固定法

第二节 动物麻醉

麻醉(anesthesia)是为了消除动物在实验过程中所引起的疼痛和不适感,以保证实验顺利进行。动物实验中常用的麻醉剂有挥发性麻醉剂(包括乙醚和氯仿)和非挥发性麻醉剂(包括戊巴比妥钠、苯巴比妥钠、硫喷妥钠、氨基甲酸乙酯和水合氯醛)。

一、乙醚吸入麻醉

适用于各种动物,包括小鼠、大鼠、家兔等的麻醉。麻醉量与致死量间相差较大,因此安全度亦较大。动物麻醉深度易掌握,麻醉后苏醒较快。但需注意防止麻醉过深引起动物死亡。乙醚燃点很低,遇火极易燃烧,使用时一定要远离火源。具体方法如下:

用一个钟罩或一个密闭的玻璃箱作为挥发性麻醉剂的容器,取几个棉球,浸蘸乙醚并迅速置于钟罩或箱内使其挥发,然后把待麻醉动物放入,间隔4~6 min即可麻醉,再实施实验操作。同时准备蘸有乙醚的棉球,用于动物麻醉变浅时通过鼻吸入补充麻醉。本法最适于大、小鼠的短期操作性实验的麻醉,也可用于较大的动物。

二、大鼠静脉注射麻醉

最常用的是3%~5%的戊巴比妥钠注射液。此药作用发生快,持续时间3~5 h。取戊巴比妥钠3~5 g加入95%乙醇溶液10 ml,加温(不可煮沸)溶解后,再加入0.9%氯化

钠溶液至 100 ml。静脉注射时,前 1/3 剂量可推注,后 2/3 剂量则应缓慢注射,并密切观察动物的肌紧张状态,呼吸变化及角膜反射。

三、普鲁卡因局部注射麻醉

常用 1 % 或 2 % 普鲁卡因水溶液注入手术部位皮下或肌肉进行麻醉,可用于家兔的局部麻醉。

第三节 动物注射

在动物实验过程中,依据不同的实验目的、动物种类、药物类型等决定动物的给药途径与方法。动物的给药方法主要分为注射法和投入法两种,在此仅介绍免疫学实验常用的皮内注射法、皮下注射法、腹腔注射法和静脉注射法。

一、皮内注射法

皮内注射时需将注射的局部脱毛,消毒后,用左手拇指和食指按住皮肤并使之绷紧,在两指之间,用结核菌素注射器连 4 号细针头,紧贴皮肤表层刺入皮内,然后再向上挑起,并再稍稍刺入,即可注射药液,此时可见皮肤表面鼓起一白色小皮丘。

二、皮下注射法

注射时以左手拇指和食指提起皮肤,将连有 5(1/2) 号针头的注射器刺入皮下,即可注射药液。

三、腹腔注射法

用大、小鼠做实验时,以左手抓住动物,使腹部向上,右手将注射针头于左(或右)下腹部刺入皮下,使针头向前推 0.5 ~ 1.0 cm,再以 45° 角穿过腹肌,固定针头,缓缓注入药液,为避免伤及内脏,可使动物处于头低位,使内脏移向上腹。若实验动物为家兔,进针部位为下腹部的腹白线离开 1 cm 处。

四、静脉注射法

(一) 小鼠和大鼠

一般采用尾静脉注射法,将动物置于固定器内露出尾巴,尾巴用 45 ~ 50 °C 的温水浸润 30 s 或用乙醇擦拭使血管扩张,并可使表皮角质软化,以左手拇指和食指捏住鼠尾两侧,使静脉充盈,用中指从下面托起尾巴,以无名指和小指夹住尾巴的末梢,右手持注射器连 4 号细针头,使针头与静脉平行(小于 30°),从尾巴下端四分之一(约距尾尖 3 cm)处进针,此处皮薄易于刺入,先缓缓注入少量药液,如无阻力,表示针头已进入静脉,可继续注入。注射完毕后把尾部向注射侧弯曲以止血。如需反复注射,应尽可能从末端开始,以后向尾根部方向移动注射。

(二) 家兔

家兔耳部血管分布清晰。兔耳中央为动脉,耳外缘为静脉。内缘静脉位置深不易固

定,故不选用。外缘静脉表浅易固定,常选用。先拔去注射部位的被毛,用手指弹动或轻轻揉搓兔耳,使静脉充盈,左手食指和中指夹住静脉的近端,拇指绷紧静脉的远端,无名指及小指垫在下面,右手持注射器连6号针头从静脉的远端刺入,移动拇指于针头上以固定针头,放开食指和中指,将药液注入,然后拔出针头,用手压迫针眼片刻。

第四节 动物采血

实验动物采血方法的选择,主要取决于实验目的和所需血量以及动物种类。

一、大鼠、小鼠采血方法

(一) 剪尾采血法

需血量少时常用此法。动物麻醉后,将尾尖剪去约5 mm,从尾部向尾尖部按摩,血即从断端流出。也可用刀割破尾动脉或尾静脉,让血液自行流出。如不麻醉,采血量较小。采血结束后,消毒、止血。用此法每只鼠可采血10余次。小鼠可每次采血约0.1 ml,大鼠约0.4 ml。

(二) 摘眼球采血法

此法常用于鼠类大量采血。采血时,用左手固定动物,压迫眼球,尽量使眼球突出,右手用镊子或止血钳迅速摘除眼球,眼眶内很快流出血液。

(三) 大鼠颈(股)静脉或颈(股)动脉采血

可用于大鼠。将大鼠经麻醉后,剪去一侧颈部外侧被毛,作颈静脉或颈动脉分离手术,用注射器即可抽出所需血量;剪开腹股沟处皮肤,即可看到股静脉,把此静脉剪断或用注射器采血即可,股动脉较深需剥离出,再采血。

二、家兔的采血方法

(一) 耳缘静脉采血

将家兔固定,拔去耳缘静脉局部的被毛,消毒,用手指轻弹兔耳,使静脉扩张,用针头刺耳缘静脉末端,或用刀片沿血管方向割破一小切口,血液即流出。本法为家兔最常用的采血方法,可多次重复使用。

(二) 耳中央动脉采血

在家兔耳中央有一条较粗的、颜色较鲜红的中央动脉。用左手固定兔耳,右手持注射器,在中央动脉的末端,沿着与动脉平行的向心方向刺入动脉,即可见血液进入针管。由于兔耳中央动脉容易发生痉挛,故抽血前必须让兔耳充分充血,采血时动作要迅速。采血所用针头不要太细,一般用6号针头,针刺部位从中央动脉末端开始,不要在近耳根部采血。

(三) 心脏采血

使家兔仰卧,穿刺部位在第三肋间胸骨左缘3 mm处,针头刺入心脏后,持针手可感觉到家兔心脏有节律的跳动。此时如果还抽不到血,可以前后进退调节针头的位置,注意切不可使针头在胸腔内左右摆动,以防弄伤家兔的心、肺。

第五节 动物淋巴器官及组织摘取

淋巴器官包括中枢淋巴器官(胸腺、骨髓腔上囊)和外周淋巴器官(淋巴结和脾)。淋巴组织分布很广,存在形式多种多样,包括①弥散淋巴组织,为无特定结构弥散分布的淋巴细胞,常分布于咽、消化道及呼吸管等与外界接触的部位或黏膜内;②淋巴小结,为呈球形或卵圆形,轮廓清晰的致密淋巴组织,常孤立或成群存在,如肠黏膜内的孤立淋巴小结和淋巴集结。在此仅以小鼠为例介绍常用淋巴器官和组织的摘取方法。

一、胸腺的摘取

胸腺位于胸骨后胸腔前部纵膈内,有时胸腺可贴在胸骨上,呈红色或粉红色。小鼠于性成熟时胸腺最大(3、4周龄),以后逐渐萎缩被脂肪组织替代。将小鼠麻醉或颈椎脱臼处死,腹部朝上四肢伸开固定,消毒后用剪刀剪开胸骨两侧,将胸骨上翻,即可见胸腺,轻轻操作摘取。

二、脾的摘取

小鼠脾位于腹前部,胃的左侧。按上述方法固定小鼠,消毒后剖开腹部,推开小肠即可见红色条状脾,将脾摘下置于容器内。

三、骨髓的采取

将小鼠经颈椎脱臼法处死,剥离出胸骨或股骨,用注射器吸取少量的 Hank's 平衡盐溶液,冲洗出胸骨或股骨中全部骨髓液。如果是取少量的骨髓作检查,可将胸骨或股骨剪断,将其断面的骨髓挤在有稀释液的玻片上,混匀后涂片晾干即可染色检查。

四、淋巴结的摘取

正常情况下,小鼠淋巴结易于确定,性状类似小豌豆和蚕豆。淋巴结遍布全身各个部位,可分为浅表淋巴结和深部淋巴结。浅表淋巴结位于皮下和靠近骨骼肌群。深部淋巴结位于胸腔和腹腔内或靠近一些器官。因此,需按不同实验目的摘取不同部位或全身的淋巴结。

第六节 动物处死

当实验中途停止或结束时,实验者应站在实验动物的立场上以“人道”的原则去处置动物,原则上不使实验动物产生任何恐怖和痛苦,也就是要施行安乐死。安乐死是指实验动物在没有痛苦感觉的情况下死去。实验动物安乐死方法的选择取决于动物的种类和所做的实验。

一、颈椎脱臼法

颈椎脱臼法多用于大鼠和小鼠。右手抓住鼠尾用力向后拉,同时左手拇指与食指用力

向下按住鼠头。将脊髓与脑髓拉断,鼠便立即死亡。

二、药物致死法

药物致死法可用于多种动物。吸入一定量的一氧化碳、乙醚、氯仿等均可使动物致死。

三、急性失血法

急性失血法多用于兔和豚鼠。先将动物轻度麻醉,然后切断股动脉或静脉放血。动物在 3~5 min 内即可致死。采用此种方法,动物十分安静,对脏器无损伤,对采集病理标本是一种较好的方法。

第七节 动物免疫

对实验动物进行免疫的目的主要是为了制备免疫血清、单克隆抗体和检测某种物质对免疫功能的影响。免疫效果通常与抗原的免疫原性、接种剂量、接种途径、免疫次数、间隔时间等多种因素有关。

一、免疫接种途径

免疫接种途径包括鼻黏膜、皮内、皮下、肌内、腹腔、静脉、灌胃(经口)等。依据抗原种类(颗粒性抗原或可溶性抗原)和免疫目的不同,采用不同的接种途径,多数采用两条或多条途径联合的方式进行免疫接种,以便达到理想的免疫效果。免疫学实验动物常用接种部位及其接种的适宜液体量见表 1-1。

表 1-1 几种动物不同接种部位的液体常用量(ml)

免疫途径	小鼠	大鼠	豚鼠	家兔
皮下	0.1~0.5	0.5~1.0	0.5~2.0	1.0~3.0
肌内	0.1~0.2	0.2~0.5	0.2~0.5	0.5~1.0
腹腔	0.2~1.0	1.0~3.0	2.0~5.0	5.0~10.0
静脉	0.2~0.5	1.0~2.0	1.0~5.0	5.0~10.0
经口	0.2~1.0	1.0~4.0	1.0~4.0	—

二、免疫接种的抗原用量

(一) 颗粒性抗原

颗粒性抗原免疫原性强,如肿瘤细胞、淋巴细胞、细菌等抗原,不加佐剂直接进行免疫,就可获得较好的免疫效果。细胞性抗原用量为每次注射 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 细胞/鼠, $2 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$ 细胞/兔。

(二) 可溶性抗原

可溶性抗原,如蛋白质、荚膜多糖、病毒以及与蛋白质结合的半抗原等,一般不及颗粒性抗原免疫原性强,因此需与佐剂(如不完全弗氏佐剂)混合进行免疫。通常小鼠首次免疫

用抗原剂量为 50 ~ 100 μg /次,大鼠为 100 ~ 200 μg /次,兔为 1 ~ 100 mg/次;合成免疫原为 2 mg(半抗原为 20 ~ 200 μg)。首次免疫通常与完全弗氏佐剂混合接种。加强免疫的剂量可与首次剂量相同或首次剂量的 1/2,第一次加强免疫通常同不完全弗氏佐剂混合接种,而第三次之后的各次免疫一般不使用佐剂。

(王大南 吕昌龙)

第二章

抗体的制备和检测

抗体是与特定抗原具有特异性结合能力的免疫球蛋白。在当今的生物学和生物化学研究中,很多应用广泛的技术如免疫组织化学技术、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫沉淀和免疫印迹技术等,都依赖于制备高度特异性的抗体。制备抗体首先要考虑的是制备单克隆抗体还是多克隆抗体。单克隆抗体具有高度的均一性和精确的特异性,几乎可以用于多种指标检测,而且利用杂交瘤细胞克隆可以生产无限量的单克隆抗体,但是制备单克隆抗体的前期投入相对较多,耗时较长。多克隆抗体较多地应用于免疫沉淀和免疫印迹技术中,其制备时间一般较单克隆抗体短,对人力、物力、仪器设备的要求也较低。但是从动物体内获得的抗血清量有限,制备大量抗血清时需要免疫大动物或多只动物。研究者可根据实验要求和实验室条件等具体情况选择制备单克隆抗体或多克隆抗血清。

第一节 多克隆抗血清的制备

一、影响多克隆抗血清制备的因素

多克隆抗血清的制备就是用目的抗原免疫动物,当血清中特异性抗体浓度达到合适水平时采集血液,分离含有特异性抗体的血清的过程。制备好得多克隆抗血清,一般要考虑以下因素:

(一) 抗原的性质、纯度和量

用于制备抗体的抗原通常是蛋白质或肽,但是糖类、核酸、结合在合适蛋白质载体上的有机小分子(半抗原)、细胞、细胞与组织提取物等也都可以作为抗原。抗原的纯度越高越好,因为少量的污染物常常比目的抗原有更强的免疫原性,用其免疫获得的抗血清与污染物的结合的能力可能会强于与目的抗原结合的能力。对于蛋白质抗原来说,抗原材料的纯度应该尽可能达到生物化学纯度,但并非要达到绝对的氨基酸分析纯度,亲和层析或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的抗原即可用于免疫。抗原量在一定范围内与免疫应答强度呈正相关。抗原量过大或过小均易产生免疫耐受。

(二) 免疫动物的种属

免疫动物的选择主要取决于需要的抗血清量、抗原来源物种与免疫动物物种在物种进化过程中距离的远近,以及对抗体的特殊要求。对于常用的人和小鼠来源的抗原来说,家兔是最常用来免疫的动物,因为家兔与人和小鼠在遗传上差异较大。家兔每次采血可以获得大约25 ml 血清,对其健康无明显损害。某些实验可能要求使用小鼠作为免疫对象,这时免疫需要的抗原量较少,但是一次性采血一般只能获得0.5 ml 左右血清。大鼠和仓鼠多次采血可获得约5 ml 血清。确定免疫动物的种属后,一般选择生理状态正常、发育成熟的雄

性动物或雌性非妊娠动物进行免疫,家兔初始免疫的体重通常在 2~2.5 kg。

(三) 佐剂的选择

使用佐剂可以增强免疫应答。佐剂种类繁多,在多克隆抗体制备中以弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)和弗氏不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)最为常用。CFA 的配方较多,主要成分为羊毛脂、液体石蜡和灭活的卡介苗。羊毛脂与液体石蜡之比为 1:2 或 1:1,灭活的卡介苗一般在临用前按 2~4 mg/kg 体重加入。通常佐剂与抗原等量混合,充分乳化。IFA 不含卡介苗,其他同 CFA。

(四) 免疫途径和方法

免疫途径包括静脉、腹腔、肌内、皮内、淋巴结内和足垫等注射方式。对于较大动物,一般采用小剂量、多点、多途径的免疫方法。对于小鼠,一般采用腹腔注射。在基础免疫后 4~8 周应进行加强免疫,以后每隔 2~3 周进行一次加强免疫。加强免疫后的 1~2 周采集少量血液,分离血清,检测血清中特异性抗体水平,即试血。加强免疫次数取决于试血结果。

二、制备可溶性蛋白质抗原多克隆抗血清

(一) 原理

在佐剂存在的情况下,蛋白质抗原经肌肉内、皮内或皮下注射给动物可诱导特异性抗体产生,适当地加强免疫可以增加特异性抗体的效价。

(二) 主要材料与试剂

1. 合适的家兔、大鼠、小鼠、或仓鼠品系。
2. CFA(注意:CFA 是一种强力致炎剂,当其进入皮内或眼睛时,会引起皮肤脱落和失明,接触时要戴手套和防护眼镜)。
3. 纯化蛋白抗原(1~2 mg/ml 溶于 PBS 中)。
4. IFA。
5. 50 ml 一次性的聚丙烯离心管。
6. 3 ml 玻璃制注射器,以及 19,21,22 G 针头。
7. 塑料三通管。
8. 固定动物器具。

(三) 方法

1. 在免疫动物前采血并制备血清(血清制备见本章四),分装储存。该血清将作为免疫后检血清抗体水平的对照,以确保检测到的抗体活性为免疫诱导所致。

2. 振荡 CFA 以分散不可溶的结核分枝杆菌,将 2 ml CFA 加入 2 ml 纯化蛋白溶液中。

此剂量可以用来免疫 4 只家兔和 80 只小鼠。纯化蛋白用冷 PBS 溶解,不要使用含 Tris 的缓冲液溶解蛋白。用聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化蛋白抗原时,带有目的蛋白条带的凝胶片可以直接加入 PBS 中,与等量 CFA 混合乳化,其中的丙烯酰胺可以起到部分佐剂的作用。

3. 用带有 19 G 针头的 3 ml 玻璃注射器抽取 CFA/抗原混合物,尽量排出气泡,将注射器连接在三通管上,三通管另一端连接一个空的 3 ml 玻璃注射器,反复推压两个注射器,使

CFA/抗原混合物在两个注射器间快速运动,当混合物变为均一的白色液体时,去掉三通管,换上 21 G 针头。挤出一滴乳剂至 50 ml 冷水表面,好的乳剂在水面上聚集成滴;如果液滴扩散,则继续用三通管乳化,一般达到完全乳化需半小时左右。

这一过程产热,应时常在冰上冷却。

4. 固定动物,使用 22 G 针头,采用肌肉(i. m)、皮内(i. d)、皮下(s. c)等多种注射方式在多点注射佐剂/抗原乳液。免疫小的啮齿类动物(如大、小鼠)时,最好使用腹腔注射的方式。

弃掉未使用的免疫原。对于特别有价值的抗原,乳剂可以在 4 ℃ 储存几个星期并且在再次使用前重新乳化。但是在这种条件下,蛋白抗原可能发生变性。

5. 在初次免疫之后的 10 ~ 14 d 里采血,并制备血清。

6. 在初次免疫以后的 4 ~ 8 周给予第一次加强免疫,最早可以提前到在初次免疫后 2 周。按照步骤 2 ~ 3 制备加强免疫的抗原,但初次免疫使用 CFA 作为佐剂时,加强免疫应使用 IFA。

在初次皮内或是皮下免疫以后,最好用肌肉注射进行加强免疫,因为反复皮内注射会引起皮肤溃疡。

7. 在加强免疫后的 7 ~ 14 d 采血并制备血清。

8. 每隔 2 ~ 3 周可以进行再次加强免疫,并在每一次加强免疫后的 10 ~ 14 d 采血,制备血清,根据抗血清效价决定加强免疫次数。免疫双扩散试验测定抗血清效价大于 1:32,或 ELISA 法检测抗体效价大于 1:10 000 或浓度大于 1 mg/ml,表明抗体水平已经较高。如果抗体水平远低于上述水平,可继续加强免疫,一般需 4 ~ 5 次免疫,抗体效价即可达到合适水平,如果仍不能达到采血的抗体水平要求,应考虑重新免疫。

9. 在最后一次加强免疫后 7 ~ 14 d 采血。对家兔可采用一次放血法或少量多次放血法。用多次放血法采血时,两次采血应间隔 4 周,每次采血前应加强免疫一次。小动物一般采用一次放血法。

三、制备颗粒性抗原多克隆抗血清(以制备绵羊红细胞溶血素为例)

(一) 原理

颗粒性抗原,如动物的红细胞、细菌菌体等,可制备成悬液,在无佐剂的情况下,直接免疫动物,诱导抗体产生。适当地加强免疫可以增加血清中特异性抗体的效价。

(二) 主要材料与试剂

1. 雌性未孕小鼠或家兔。
2. 雄性绵羊抗凝血(10 % 枸橼酸钠溶液与采血量的体积比为 1:10,或阿氏液与采血量的体积比为 1:1)。
3. 50 ml 塑料离心管。
4. 巴斯德吸管。
5. 预冷的生理盐水。
6. 1 ml 微量加样器及吸头。
7. 3 ml 注射器以及 22 G 针头。