

武汉大学
出版社
WUHAN DAXUE
CHUBANSHE

免疫学 实验



林清华 编

Q93R.91-33

LQH

免疫学实验

林清华 编



武汉大学出版社



A0294961

294961
294981

图书在版编目(CIP)数据

免疫学实验/林清华编. —武汉: 武汉大学出版社, 1999. 5
ISBN 7-307-02715-1

I. 免… II. 林… III. 免疫学—实验 IV. Q939. 91-
33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 01487 号

武汉大学出版社出版

(430072 武昌 珞珈山)

湖北省武汉第二印刷厂印刷

(430100 武汉市蔡甸区正街 176 号)

新华书店湖北发行所发行

1999 年 5 月第 1 版 1999 年 5 月第 1 次印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 12.75

字数: 329 千字 印数: 1—3000

ISBN 7-307-02715-1/Q·66 定价: 14.50 元

本书如有印装质量问题, 请寄承印厂调换

ה'תשנ"ב - תשנ"ג

本书可供综合性大学、医学院校及其他院校有关专业本科生免疫学实验教学使用,也可供有关专业的研究生、教师参考。

前 言

随着生物科学特别是细胞生物学和分子生物学的迅速发展,免疫学研究不断深入,免疫学知识日渐丰富。利用免疫学特性建立起来的免疫学技术和方法又推动了生物科学的发展。于是,免疫学和免疫学实验不仅成为医学院校学生的必修课,而且也成为理科生物科学类学生的必修课程。

早在1981年,武汉大学微生物学系即为本科生开设了免疫学和免疫学实验课程。编者作为免疫学以及免疫学实验的主讲教师,与同仁合作编写了免疫学实验教材。此后,编者对实验内容进行了多次修改和补充。在本书正式出版之前,编者根据自己近20年来的教学科研实践,结合免疫学的教学内容,参阅了国内外最新资料,对原有的实验教学内容作了较大的修改和许多重要补充。现在的这本免疫学实验教材分11个部分,介绍了68个实验,内容丰富,覆盖面广。其中有与免疫学理论教学相配合的印证性实验,也有在生物学各研究领域受到高度重视、应用范围广泛的免疫标记技术,如免疫荧光、酶免疫测定、放射免疫测定、胶体金标记等实验方法。另外,还介绍了印迹方法中应用最广的技术——免疫印迹。

本教材力求让学生能正确地理解免疫学实验原理和较好地掌握免疫学实验技术和方法。为此,不仅在实验内容上力求全面,而且在同一实验中尽量介绍几种不同的方法,或者在介绍某一方法时,对其它方法也加以提示和说明,以利开阔学生视野并便于他们对不同的方法进行分析比较。同时在每一实验后面都附有“注意

事项”,意在帮助学生掌握实验操作中的关键要领。此外,每一实验的后面还附有“作业与思考题”,目的在于培养学生综合与分析问题的能力。

书中的插图由陈宝联绘制;武汉大学生命科学学院和微生物学及免疫学系的各级领导、老师、同事对本书的编写和出版给予了很多支持;出版社余运萍等老师为本书的出版付出了辛勤的劳动,在此一并表示衷心感谢。

由于免疫学实验方法众多,且日新月异,限于编者水平,书中错误和不妥之处在所难免,诚请读者批评指正。

编 者

1998.7

目 录

实验室规则	1
第一部分 动物实验的一般操作	3
实验一 实验动物的抓取、固定和注射方法.....	3
附:动物编号标记方法	13
实验二 实验动物的取血方法	15
附:实验动物的处死方法	22
第二部分 抗体的制备、纯化与鉴定	24
实验三 单克隆抗体的制备	24
实验四 抗血清的制备	33
实验五 抗血清的纯度鉴定与保存	41
实验六 IgG 的分离和纯化	44
第三部分 吞噬细胞功能测定方法	49
实验七 巨噬细胞吞噬功能试验	49
实验八 白细胞吞噬功能试验	54
实验九 巨噬细胞表面受体测定	57
实验十 小白鼠碳廓清试验	61
实验十一 溶菌酶试验	64
实验十二 巨噬细胞酸性磷酸酶的测定	68
实验十三 硝基蓝四氮唑(NBT)还原试验	73

第四部分 凝集反应试验方法 77

实验十四 玻片凝集反应试验 78

实验十五 试管凝集反应试验 81

实验十六 交叉凝集试验 86

实验十七 SPA 协同凝集试验 89

实验十八 间接血凝试验 93

附: 甲胎蛋白诊断血球制备方法 98

实验十九 间接凝集抑制试验..... 101

实验二十 血型鉴定及交叉配血试验..... 104

实验二十一 病毒血凝及血凝抑制试验..... 110

实验二十二 抗球蛋白试验..... 115

第五部分 沉淀反应检测方法 119

实验二十三 环状沉淀试验..... 120

实验二十四 单向琼脂扩散试验..... 123

实验二十五 双向琼脂扩散试验..... 127

实验二十六 琼脂免疫电泳试验..... 133

实验二十七 对流免疫电泳..... 138

实验二十八 火箭免疫电泳..... 142

实验二十九 交叉免疫电泳..... 146

第六部分 补体的检测和补体参与的反应 150

实验三十 补体的溶血和溶菌试验..... 151

实验三十一 总补体活性(CH_{50} 单位)的测定 155

实验三十二 血清 C_3 含量的测定 161

实验三十三 补体结合试验..... 165

实验三十四 补体依赖性细胞毒试验..... 174

第七部分 细胞免疫功能检测方法	178
实验三十五 E 玫瑰花环试验	179
实验三十六 豚鼠 T 淋巴细胞玫瑰花环形成试验	184
实验三十七 淋巴细胞转化试验	188
实验三十八 白细胞移动抑制试验	196
实验三十九 白细胞粘附抑制试验	200
实验四十 淋巴细胞 α -醋酸萘酯酶的检测	204
实验四十一 红细胞 C_{3b} 受体花环形成试验	207
第八部分 体液免疫功能检测方法	210
实验四十二 EAC 花环形成试验	210
实验四十三 小白鼠红细胞花环试验	214
实验四十四 免疫特异性玫瑰花环试验	217
实验四十五 空斑形成细胞测定	220
实验四十六 定量溶血分光光度测定法	225
实验四十七 半数溶血值(HC_{50})的测定	228
第九部分 超敏反应	231
实验四十八 动物过敏性休克试验	232
实验四十九 皮肤超敏反应试验	235
实验五十 家兔嗜碱性粒细胞脱颗粒试验	242
第十部分 免疫标记技术	246
实验五十一 B 淋巴细胞荧光抗体检测法	247
实验五十二 T 淋巴细胞免疫荧光检测法	250
实验五十三 酶联免疫吸附试验	254
实验五十四 SPA-酶联免疫吸附试验	261
实验五十五 酶免疫测定法检测抗核抗体	264

实验五十六	ENA 多肽谱法检测抗核抗体	267
实验五十七	免疫金银染色法	269
实验五十八	微孔滤膜免疫金银染色法	275
实验五十九	胶体金一步法检测人绒毛膜促性腺激素	279
实验六十	混合淋巴细胞培养— ³ H-TdR 掺入法	282
实验六十一	人血清 IgE 放射免疫测定	286
实验六十二	NK 细胞活性检测——同位素标记法	290
实验六十三	CTL 功能检测—— ⁵¹ Cr 释放法	293
实验六十四	免疫印迹	298
第十一部分	细胞因子的诱生及检测方法	303
实验六十五	小白鼠 IL-1 的诱生和活性检测	304
实验六十六	IL-2 的诱生和检测方法— ³ H-TdR 掺入法和 MTT 比色法	309
实验六十七	肿瘤坏死因子的诱生及活性检测	315
实验六十八	干扰素活性检测	319
附录一	常用血液抗凝剂的配制及用法	322
附录二	常用化学脱毛剂的配制	326
附录三	常用化学消毒液及洗涤液的配制及用途 ...	328
附录四	试剂和溶液的配制	331
附录五	染色液、脱色液及固定液的配制	349
附录六	一些常用数据表	354
一、硫酸铵饱和度常用表		354
二、免疫球蛋白及一些抗原的分子量和消光系数		357
三、免疫酶技术中常用的酶-底物系统		359
四、实验室中常用酸碱的比重和浓度的关系		360

五、常用固态化合物的浓度配制参考表..... 361

附录七 玻璃容器的洗涤及各种清洁液的

配制 362

附录八 免疫学常用略语 364

参考文献 393

实验室规则

免疫学实验的教学目的不仅是使学生验证部分理论知识和加深理解课堂讲授内容，更重要的是在掌握系统理论知识的基础上，学习及掌握免疫学实验的基本操作技术，培养学生观察、思考、分析和解决问题的能力，以及严肃认真的科学态度。为保证实验效果，特制定如下规则：

一、学生在上实验课前，应对实验内容进行充分的预习，明确实验目的、内容，了解实验原理，熟悉所要使用的仪器、药品的性质及操作程序，做到心中有数。

二、要注意保持科学实验的严肃性、严格性与严密性。在实验时应认真地观察教师的演示，严肃认真地按规定步骤操作并积极思考实验中的每一环节。

三、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，训练自己的科学思维能力。

四、实验室内应保持安静，遵守纪律，不得高声谈笑、随便走动、拆卸仪器、玩弄动物。

五、实验室内禁止吸烟、进食、饮水、用嘴吸吸管及湿润标签；不准随地吐痰。

六、如有传染性的材料流洒于桌面、地上或衣服上时，应用3%来苏尔或3%石炭酸液覆盖其上，浸半小时后再行拭去或洗涤。

七、如发生割破皮肤或被动物咬伤、抓破等意外时，应立即

报告教师处理。

八、要爱护公共财物，节约试剂材料，不得将实验室任何物品私自带走。如将仪器、用品损坏，应报告教师并按规定处理。

· 九、实验结束后，应清理实验用品，实验废弃物（如实验动物尸体等）应放入或倒入指定的地方和容器内。服从卫生值日安排，认真负责地做好清洁卫生。

十、离开实验室前应将手洗净，注意关好水、电、门、窗等。

十一、每次实验的结果，应以实事求是的态度填写入实验报告本中，连同思考题，及时汇交教师批阅。

第一部分 动物实验的一般操作

在免疫学教学、科研工作中，经常要用实验动物来进行各种实验。通过对动物实验的观察和分析来研究和解决科研工作中的各种问题。因此，动物实验已成为免疫学、医学、生物学各学科研究工作中必不可少的一种实验技术。从事实验研究的科技人员，必须对各种常用实验动物的生物学特性、用途、健康要求等基本知识有确切的了解，才能正确地选择和使用实验动物，获得可靠而准确的实验结果。

动物实验技术的操作方法较多，包括实验动物的抓取和固定方法、麻醉方法、被毛的去除方法、注射方法、取血方法、血液常用指标的检查方法等等，在此不一一赘述。

本部分介绍免疫学实验常用的动物——小白鼠、大白鼠、家兔、豚鼠的生物学特性和在免疫学实验方面的用途、健康要求，并介绍动物实验中最基本的操作方法——实验动物的抓取、固定、注射方法、取血方法、编号方法等。

实验一 实验动物的抓取、固定和注射方法

一、目的要求

1. 学习实验动物的抓取和固定方法。

2. 练习对实验动物的几种不同途径的注射方法。
3. 了解免疫学实验常用动物的生物学特性、用途及其健康要求。

二、免疫学常用实验动物简介

家兔 (rabbit)

家兔属哺乳纲，啮齿目，兔科。品种多，常用品种有中国本兔、大耳白兔、新西兰兔、青紫蓝兔等。

家兔性情温顺，但胆小、惊疑，喜干燥、凉爽和安静的环境。耐寒不耐脏，不耐炎热和潮湿。有啃木、扒土习惯。常在夜晚活动和进食，为草食性动物。

家兔寿命 4~9 年。性成熟期 5~8 个月。孕期一个月，一年产仔 3~5 胎，每胎 1~5 只。哺乳期 30~50 天。

家兔易饲养，抗病力强，繁殖率高，故在科研工作中应用较广。在免疫学实验中常用于制备抗血清，取血分离的血清作为补体用于细胞毒试验中。在医学和医学微生物实验中用途广泛，如用于检查致热原反应、溶血性葡萄球菌等实验。

实验时应挑选：两耳直立且血管明显，眼睛有神，肛门干净，被毛有光泽，不蓬松，紧贴身体，体表无伤口、无体癣的家兔。

大白鼠 (rat)

大白鼠属哺乳纲，啮齿目，鼠科，大鼠属。其品种较多，国际上公认的近交系大鼠约有 130 种，此外尚有许多突变系大鼠。常用品种有 Wistar 大鼠、Sprague-Dawley (SD) 大鼠、F₃₄₄ 大鼠等。大白鼠全身披白毛，但脚掌无毛且尾上稀少，尾上有环形角质鳞片。大白鼠受惊时表现凶恶，会咬人，实验时应特别注意。雄鼠经常互相殴斗、咬伤，饲养时应加以隔离。其食性广，食量大，抗病力强。白天休息，夜间活动，宜饲养在安静、通风、干燥的环境中。

大白鼠的寿命约2~3年，性成熟期2~3个月，孕期20天，哺乳期21天，一年内产仔4~7胎，每胎5~9只。

在免疫学、医学实验中，大白鼠是最常用的动物之一。广泛用于高级神经活动实验，应激反应和肾上腺等内分泌实验。也用于营养学方面的研究。利用大白鼠可复制成多种肿瘤动物模型，是肿瘤实验研究的常用动物。另外，在延缓衰老作用的实验中，常用于生存期试验。

实验时应挑选：肌体健壮有力，眼睛鲜红有神，运动快捷，被毛有光泽并紧贴身体，尾巴圆润且血管发育良好，体表无伤口，肛门干净、无稀便的大白鼠。

小白鼠 (mouse)

小白鼠属哺乳纲，啮齿目，鼠科，小鼠属。其品种和品系极多，为实验动物中品系最多的动物。目前世界上常用的近交品系小鼠（纯系小鼠）约250多个，突变品系约有350多个。免疫学研究常用的品系有：C₃H、C₅₇BL、BALB/C等。另有Swiss品种小鼠，为非近交品系鼠。昆明系小鼠，为封闭群杂种小鼠。小白鼠的嘴脸部有长的触毛，眼大尾长，尾上有短毛和环形角质鳞片。喜夜间活动。对外界环境适应性较差，不耐饥、饱、冷、热。宜饲养在清洁、安静、光线略暗且温度在18~20℃的环境中。

小白鼠的寿命约为2年，性成熟期约40~60天，孕期20~25天，一年内产仔4~9胎，每胎2~12只，哺乳期25~30天。

由于小白鼠已培育出许多品系的纯系小鼠，实验的准确性和重复性好，而且小白鼠繁殖周期短且繁殖率高、生长快，饲料消耗少，性情温顺易捉（但捉拿不当，会咬人，实验时应注意），个体小、易操作，是免疫学和医学实验中用途最广泛和最常用的动物。特别适用于需要大量动物来进行的实验，如免疫增强剂、免疫抑制剂及抗癌药物等的筛选、半数致死量的测定、细胞免疫、体液免疫、免疫遗传、抗衰老等各个方面的试验与研究；尤

其是纯系小鼠在遗传、肿瘤、免疫等研究中及各种药物、血清、疫苗等生物鉴定工作中应用广泛。

实验时应挑选：发育正常，眼睛鲜红有神，被毛浓密有光泽，不蓬乱而紧贴身体，尾部血管清晰、无肿胀和溃烂，体表无伤口，肛门干净、无稀便，运动快且有力的小白鼠。

豚鼠 (guinea pig)

豚鼠又名天竺鼠，荷兰猪。原产南美巴西、乌拉圭等地的旷野中，现世界各地均有饲养。豚鼠属哺乳纲，啮齿目、豚鼠科。目前世界上近交品系约有 12 个，常用的有纯系 2 号和纯系 13 号。一般动物室饲养的是非纯种短毛豚鼠，这种豚鼠又有三色豚鼠（被毛的颜色为黄、黑、白相间）、两色豚鼠和单色豚鼠之分，白色的体质不如其他颜色的强壮。豚鼠性情温顺、胆小，不咬也不抓人。宜饲养在凉爽、干燥、清洁、安静的环境中。白日活动，食量较大。其听觉和嗅觉发达、行动敏捷。

豚鼠因其脚形似豚，故名。其出生后即可独立活动，生后 2~5 天可断乳饲养。寿命平均为 7 年，性成熟期约为 5~6 个月，孕期约 65 天，一年产仔 3~5 胎，每胎一般为 2~3 只，哺乳期为 30 天。

由于豚鼠繁殖快，且饲养管理要求不高，为实验室中的常用动物。在免疫学实验中，一般用于采心血以制备补体；在血清学、细菌学及超敏反应的实验中应用较广。但因豚鼠容易感染、皮厚不易注射，血管、神经不容易分离，故某些急性功能方面的实验不太适用。

实验时应挑选：发育正常，骨骼粗壮结实，被毛光亮洁净密实且紧贴全身，无脱毛现象，运动敏捷、活泼，眼睛明亮无分泌物的豚鼠。

在免疫学实验中，常常用到实验动物。进行实验时，首先要限制动物的活动，使动物保持安静状态，才便于抓取和固定。固定动物的方法依实验内容和动物种类而定。在抓取、固定动物