

《食品免疫学》实验指导书

编者：王新

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

实验一免疫相关的细胞形态的观察

目的要求：

观察与免疫相关的几种细胞的形态，了解它们在机体免疫反应中的作用。

实验原理：将血液样品制成单层细胞的图片标本，经瑞氏(Wright)染色后，不同免疫细胞中

的颗粒可以呈现不同的颜色。根据细胞中颗粒的颜色、大小及多少，再结合细胞大小及细胞核的形态，就可以将免疫细胞进行分类计数。

实验器材：显微镜、血液涂片（瑞氏染色）、酒精棉球、镊子、经脱脂洗净的载玻片等。

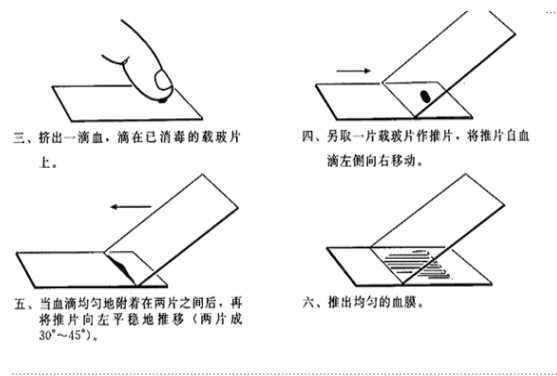
实验试剂：瑞氏（Wright）染液。

方法：油镜观察

实验步骤：

1、采血 动物采血时先将耳部剪毛，酒精消毒后，刺破动物耳部皮肤，挤去第一滴不要（因含单核细胞较多）。

2、涂片 挤出第二滴血置于载玻片上的一端，再取另外一张边缘光滑的载玻片，斜置于血涂片的前缘，先向后稍移动轻轻触及血液，使血液沿载玻片端展开成线状，两玻片的角度以 30—40 度为宜（角度过大血膜较厚，角度小则血膜薄），轻轻将载玻片向前推进，即涂成血液薄膜（如下图），推进时速度要一致，否则血膜成波浪形，厚薄不均。



3、染色 待涂片在空气中完全干燥后，滴加数滴瑞氏染液盖满血膜为止，染色 1—3min。然后滴加等量的缓冲液（PH6.4）或蒸馏水冲去染液，吸水纸吸干，镜检。

4、封片 经染色的涂片完全干燥后，用中性树脂封片。（我们不作）

5 观察 分别用低倍、高倍和油镜观测血涂片，分辨不同的血细胞类型。

（A）红细胞：淡红色，无核的圆形细胞，因红血球为双凹形，故边缘部分染色较深，中心较浅，直径 7—8 微米。

（B）颗粒白血球

嗜中性颗粒白血球：体积略大于红细胞，细胞核被染成紫色分叶状，可分 1—5 叶，核叶之间联以染色质细丝，染色质染成粉色，其中充满细小的大小均匀的颗粒被染成紫红色。直径 10—12 微米。

嗜酸性颗粒白血球：略大于嗜中白血球，细胞核染成紫色，通常为 2 叶，胞质充满嗜酸

性大圆颗粒，被染成鲜红色。直径 10—15 微米。

嗜碱性颗粒白血球：体积略小于嗜酸性白血球，细胞质中有大小不等被染成紫色颗粒，颗粒数目较嗜酸性白血球的颗粒少，核为 1—2 叶染成淡兰色。直径 10—11 微米。

(C) 无颗粒白血球

淋巴细胞：涂片中可观察到中、小型两种。小淋巴细胞与红血球大小相似，圆形。其中含致密的核，染成深紫色。周围仅有一薄层嗜硷性染成淡蓝的细胞质。中淋巴细胞较大，有较宽层的细胞，核圆形。6-8 微米。

单核细胞：体积最大，细胞圆形。胞质染成灰蓝色。核呈肾形或马蹄形，染色略浅于淋巴细胞的核。直径 14-20 微米。

(D) 肥大细胞的观察

胞体较大，呈卵圆形，胞质内充满粗大均等的嗜硷性颗粒。其中含肝素、组织胺等物质。常成群地分布于血管的周围。

(E) 浆细胞的观察





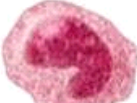


细胞呈圆形或卵圆形，胞质丰富，呈嗜硷性。核圆形，着色深，多偏于细胞的一侧，染色质核膜呈车轮分布。正常组织浆细胞少，慢性炎症时增多。浆细胞合成和分泌抗体，对免疫有重要意义。

(F) 巨噬细胞：又称组织细胞，细胞形态不规则。常伸出短而钝突起，有很强的吞噬能力。

(G) 观察完血液后，进行免疫器官（脾脏，淋巴结等）的观察。



血细胞

红细胞	白细胞				血小板	
	粒细胞			单核细胞		淋巴细胞
	中性细胞	嗜酸性粒细胞	嗜碱性粒细胞			
						

附：

瑞特氏染色：

1. 染色液配置

称取瑞特氏染料 0.1 克溶于 60ml 甲醇中，过滤。贮褐色瓶中备用。（配置时，要先将瑞特氏染料置研钵体内边研边滴加甲醇，使染料溶液得更好。）

2. 瑞特氏染色法：

取小鼠骨动脉血，涂制玻片。干后用玻璃笔在涂处之两侧划线（限制染液流掉）。于划线内部滴加染液 3-4 滴，经 3-5 分钟后，再滴加等量的蒸馏水，轻轻晃动混合。经 5 分钟后，用蒸馏水洗净，待干后用油镜检查

实验二 多克隆抗体的制备

【实验目的】

1. 加深对抗体基本知识的了解。

一、多克隆抗体的制备

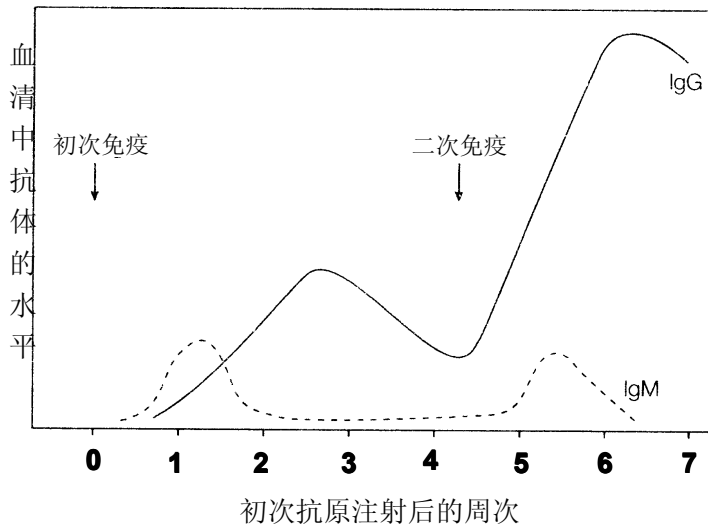
【实验原理】

当将抗原注射入实验动物体内时，一系列抗体生成细胞会不同程度的与抗原结合，受抗原刺激后在血液中产生不同类型的抗体，这种由一种抗原刺激产生的抗体称为多克隆抗体。多克隆抗体中不同的抗体分子可以以不同的亲和能力与抗原分子表面不同的部分—抗原决定簇相结合。

将抗原导入敏感动物体内后，可刺激网状内皮细胞系统，尤其是淋巴结和脾脏中的淋巴细胞大量增殖。如图所示，实验动物对初次免疫和二次免疫的应答有明显的不同。通常初次免疫应答往往比较弱，尤其是针对于易代谢，可溶性的抗原。首次注射后大约 7 天，在血清

中可以观察到抗体但抗体的浓度维持在一个较低的水平，在大约 10 天左右抗体的滴度会达到最大值。但同种抗原注射而产生的二次免疫应答的结果明显不同，和初次免疫应答相比抗体的合成速度明显增加并且保留时间也长。

免疫应答的动力学结果取决于抗原和免疫动物的种类，但初次和二次免疫应答之间的关系是免疫应答的一个重要特点。三次或以后的抗原注射所产生的应答和二次应答结果相似：抗体的滴度明显增加并且血清中抗体的种类和性质发生了改变，这种改变被称为免疫应答的成熟，具有重要的实际意义。通常在抗原注射 4-6 周后会产生具有高亲和力的抗体。



【实验材料】

1. 实验动物

成年兔。

2. 实验器材

特制兔盒；刀片；25G 针头；1ml 注射器；20 ml 血液收集管；药铲；离心机以及塑料离心管；加样器及加样管；烧杯。

3. 实验试剂

(1) 抗原；乙醇；20mM 磷酸缓冲溶液 pH7.2。

(2) 福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂：

福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂的成分

成分		完全佐剂	不完全佐剂
石蜡油	6 份	+	+
无水羊毛脂	4 份	+	+
杀死的分枝杆菌	3-5 mg	+	-
磷酸缓冲溶液	10 份	+	+

(福氏完全佐剂的制备：使用前在福氏不完全佐剂中加入适量杀死的分枝杆菌)

【实验方法】

1. 抗原的制备

抗原制备的主要目的在于在免疫动物体内产生最强、最适当的抗体。由于纯化的抗原适合产生抗体，因此在注射前通常采用一些经典的方法，比如柱层析、分级萃取、亚细胞分离等进行抗原的分离和纯化。如果多肽抗原在 SDS/PAGE 中为可见的单一带，抗原从凝胶中的抽提可作为纯化的最后一个步骤。

2. 预放血

轻轻的将兔子放在特制兔盒中，处于放松状态的兔子采血会较容易。按压兔子耳根部直至血管突出，然后将针头插入耳部血管的中上部，观察到进针后小心推出活塞收集血液 1ml - 5ml。结束收集后，退出针头并按压伤处以制止血流，再用乙醇消毒。取收集的血液在 37°C 恒温箱中放置 30 分钟以防止激活补体系统，再将试管在 4°C 放置过夜使血液凝固。用药铲将血凝块从管壁上拨落，将血液转移至塑料离心管中，4°C，10,000g 离心 10 分钟，收集上清液在 4°C 保存。

3. 注射抗原

(1) 准备两只成年兔，将 100 μ g 抗原/兔溶于 1ml 磷酸缓冲溶液中待用。在 1ml 福氏不完全佐剂中加入分枝杆菌制成完全佐剂，并加入 1ml 抗原溶液，剧烈震荡使之充分乳化，用 3ml 注射器抽取该乳化液，接上 25G 针头，排除注射器中的气泡。从笼中取出兔子放在平坦处，在 4 个不同的部位进行皮下注射，两处在后背，两处在大腿处。抚去注射处的兔毛并用乙醇消毒暴露的皮肤。捏出皮肤，将针头以相对皮肤 15 度的角度进针，进针深度为 1cm-2cm，小心不要刺入肌肉中，在 4 个不同部位分别各注射约 500 μ l 抗原溶液。注射结束后，将针在注射处放置几秒钟后再轻轻拔出，并用乙醇在注射处消毒。在 4 个部位重复上述操作。用相同方法免疫另一只家兔。

(2) 每 4-6 周注射抗原，并在注射后的 7 天-10 天按照步骤 2 收集血液。将收集的血液与注射前收集的血液进行比较，检查是否有抗体产生。待确定产生抗体后可大量收集血液，但每只兔子收集血液不能多于 40ml 以防止休克。

4. 收集血液

(1) 将家兔轻轻放入固定架上，二甲苯涂于耳部血管的上中部，用刀片倾斜 45°在该处切出 0.23cm-0.3cm 的切口使血液能自由的流出。用消毒后的管收集滴出的血液，若在结束之前出现凝固可用温水轻擦切口处，再继续收集。收集适量血液后可用消毒后的纱布轻擦患处，轻按患处 10 秒-20 秒确定血流停止后方可结束。

(2) 将血液在 37°C 恒温箱中放置 30 分钟，再在 4°C 放置过夜。用药铲将血凝块从管壁上拨落，将血液转移至塑料离心管中，4°C，10,000g 离心 10 分钟，收集上清液即为抗血清，可在 -20°C 保存数年。

实验三 沉淀反应

可溶性抗原与相应的抗体混合，在电解质存在的条件下，两者比例适合，即可有沉淀物出现，叫沉淀反应（Precipitation）。由于沉淀反应抗原多系胶体溶液。沉淀物主要是由抗体蛋白所组成。

为了求得抗原与抗体的适宜比例，保证有足够的抗体，而且抗原分子小，具有较大的反

应面积，因此操作上通常是稀释抗原，不稀释抗体。

沉淀反应的种类有环状沉淀、絮状沉淀、荚膜膨胀、琼脂扩散及免疫电泳等。此外还有放射性同位素标记、酶标记等测定法。

（一）环状沉淀反应

当抗原与相应抗体形成一个接触面时，如二者比例适当，接触面上可形成一个乳白色的环状物即为阳性沉淀反应。

材料：

1. 免疫血清：卵清蛋白抗体
2. 抗原：卵清蛋白
3. 小沉淀管、毛细吸管、橡皮头、生理盐水。

方法：

1. 取小沉淀管 2 只，以毛细吸管吸取抗人血清约 0.2 毫升，加入第一管，加时注意不能有气泡。
2. 以毛细吸管吸取生理盐水 0.2 毫升加入第二管。
3. 用毛细吸管吸入血稀释 0.2 毫升加入各管，加时应注意使抗原溶液缓缓由管壁流下，轻浮于血清面上，使成一明显界面，切勿使之相混。
4. 置室温中 10—20 分钟，观察液面有无乳白色沉淀环，若有则为阳性。

（二）.琼脂扩散试验

琼脂扩散是抗原抗体在凝胶中所呈现的一种沉淀反应。

抗体在含有电解质的琼脂凝胶中相遇时，便出现可见的白色沉淀线。这种沉淀线是一组抗原抗体的特异性复合物。如果凝胶中有多种不同抗原抗体存在时，便依各自扩散速度的差异，在适当部位形成独立的沉淀线，因此广泛地用于抗原成分的分析。琼脂扩散试验可根据抗原抗体反应的方式和特性分为单向免疫扩散、双向免疫扩散、免疫电泳、对流免疫电泳、单向及双向火箭电泳试验。

（1） 单向琼脂扩散试验

方法：

1. 将适当稀释（事先滴定）的诊断血清与予溶化的 2%琼脂在 60℃水浴预热数分钟后等量混合均匀制成免疫琼脂板。
2. 在免疫琼脂板上按一定距离（1.2—1.5 厘米）打孔，见图 1。

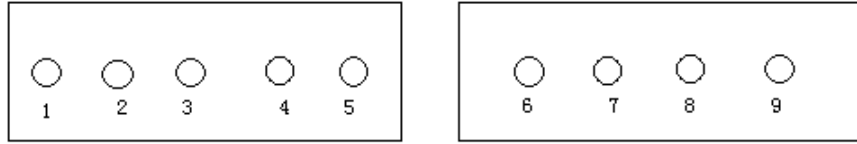


图 1 单向琼脂扩散试验抗原孔位置示意图
1-5 孔加参考血清，6-7 孔加待检血清

3. 向孔内滴加 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32 稀释的参考血清及 1: 10 稀释的待检血清，每孔 10 微升，此时加入的抗原液面应与琼脂板一平，不得外溢。

4. 已经加样的免疫琼脂板置湿盒中 37℃温箱扩散 24 小时。

5. 测定各孔形成的沉淀环直径(mm),用参考血清各稀释度测定值绘出标准曲线，再由标准曲线查出被检血清中免疫球蛋白的含量。

(2) 双向琼脂扩散试验

材料：抗体与抗原与环状沉淀反应相同。

方法：

1. 取一清洁载玻片，倾注 3.5—4.0 毫升加热熔化的 1%食盐琼脂制成琼脂板。
2. 凝固后，用直径 3 毫米打孔器，孔间距为 5 毫米。孔的排列方式如图 2 所示。

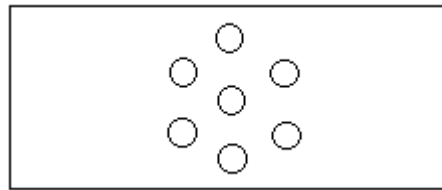


图 2 双向琼脂扩散原抗体孔位置示意图

3. 用微量进样器于中央孔加抗体，于周围孔加各种抗原。加样时勿使样品外溢或在边缘残存小气泡，以免影响扩散结果。

4. 加样后的琼脂板收入湿盒内置 37℃温箱中扩散 24—48 小时。

5. 结果观察：若凝胶中抗原抗体是特异性的，则形成抗原—抗体复合物，在两孔之间出现一清晰致密白色的沉淀线，为阳性反应。若在 72 小时仍未出现沉淀线则为阴性反应。实验时至少要做一阳性对照。出现阳性对照与被检样品的沉淀线发生融合，才能确定待检样品为真正阳性。

6. 结果分析：琼脂扩散结果受许多因素影响。

①抗原特异性与沉淀线形状的关系：在相邻两完全相同的抗原与抗体反应时，则可出现两单沉淀线的融合。反之，如相邻抗原完全不同时，则出现沉淀线之交叉；两种抗原部分相

同时，则出现沉淀线的部分融合。见图 3。

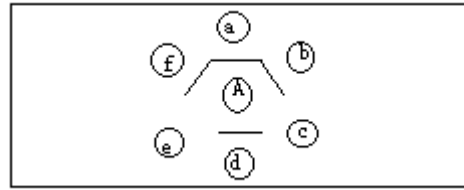


图 3 双扩散试验结果示意图

A: 已知抗体 a、b: 阳性对照

c、d、e、f: 被检材料

②抗原浓度与沉淀线形状的关系：两相邻抗原浓度相同，形成对称相融合的沉淀线；如果两抗原浓度不同，则沉淀线不对称，移向低浓度的一边。见图 4。

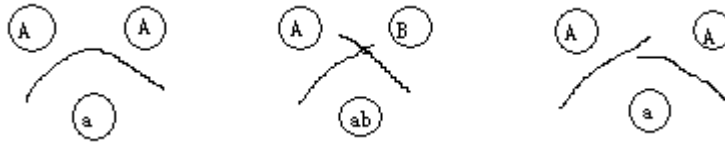


图 4 抗原特异性与沉淀线形状的关系

a、b: 抗体 A、A'、B: 抗原

A、B 完全不同 A、A'部分相同

③温度对沉淀线的影响：在一定范围内，温度扩散快。通常反应在 0-37℃ 下进行。在双向扩散时，为了减少沉淀线变形并保持其清晰度，可在 37℃ 下形成沉淀线，然后置于室温或冰箱（4℃）中为佳。

④琼脂浓度对沉淀线形成速度的影响：一般来说，琼脂浓度越大，沉淀线出现越慢。

⑤参加扩散的抗原与抗体间的距离对沉淀线形成的影响：抗原、抗体相距越远，沉淀线形成的越慢，所以在微量玻片法时，孔间距离以 0.25-0.5cm 为好，距离远影响反应速度。当然孔距过远，沉淀线的密度过大，容易发生融合，有碍对沉淀线数目的确定。

⑥时间对沉淀线的影响：沉淀线形成一般在 1-3 天出现，14-21 天出现的数目最多。玻片法可在 1-2 小时出现，一般观察 72 小时，放量过久可出现沉淀线重合消失。

（三）对流免疫电泳试验

对流免疫电泳是在琼脂扩散基础上结合电泳技术而建立的一种简便而快速的方法。此方法能在短时间内出现结果，故可用于快速诊断，敏感性比双向扩散技术高 10-15 倍。

血清蛋白在 PH8.6 条件下带负电荷，所以在电场作用下都向 E 极移动。但由于抗体分子在这样的 PH 条件下只带微弱的负电荷，而且它的分子量又较大（为 r 球蛋白）。所以游

动慢。更重要的是抗体分子受电渗作用影响较大，也就是说电渗作用大于它本身的迁移率。所谓电渗作用是指在电场中溶液对于一个固定固体的相对移动。琼脂是一种酸性物质，在碱性缓冲液中进行电泳，它带有负电荷，而与琼脂相接触的水溶液就带正电荷，这样的液体便向负极移动。抗体分子就是随着带正电荷的液体向负极移动的。而一般的蛋白质（如血清抗原）也受电渗作用的影响，使泳动速度减慢，但它的电泳迁移率远远大于电渗作用。这样抗原就达到了定向对流，在两者相遇且比例合适时便形成肉眼可见的沉淀线。

材料：

- 1 抗体与抗原与环状沉淀反应相同。
2. PH8.6,离子强度 0.05M 的巴比妥缓冲液配置

巴比妥钠	10.3 克
巴比妥	1.84 克
蒸馏水	1000 毫升

3. 缓冲琼脂板：将纯化的琼脂用 PH8.6 离子强度 0.025 的巴比妥缓冲液（用 0.05M 的巴比妥缓冲液稀释一倍即可）配成 1.5%的琼脂，加入 0.01-0.02%流柳汞防腐，保存冰箱内备用。

4. 电泳仪
5. 其他：生理盐水、打孔器、微量进样器。

方法：

1. 琼脂板的制备根据需要可选用大玻板（6 厘米×9 厘米）和（小玻片）两种。大玻板约需琼脂 10 毫升，小玻片约需 3.5 毫升，凝固后按图打孔，方法同琼脂扩散试验。

2. 加样：左侧孔内加患者血清（原血清及 10 倍稀释血清各占一孔），右侧内加抗血清，每片应有阳性对照。

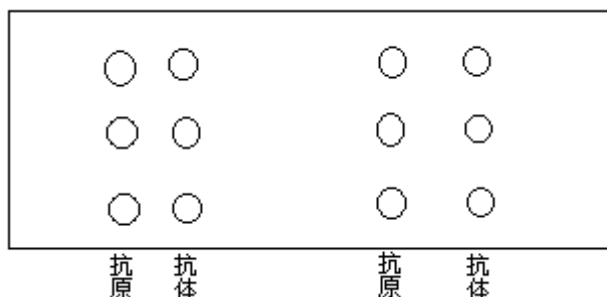


图 5 对流免疫电泳抗原孔、抗体孔位置示意图

3. 电泳

用国产普通电泳仪。其内加 0.05mPH8.6 的巴比妥缓冲液，加至电泳槽高度的三分之二

处，注意两槽内液面尽量水平。将加好样品的玻板置于电泳槽上，抗原端接负极，抗体端接正极，用 2—4 层滤纸浸湿作盐桥，滤纸与琼脂板联接处为 0.5 厘米。以板宽度计算电流，以板的长度计算电压。要求电流量为 2—3 毫安/厘米，即大板为 20 毫安，小板为 10 毫安。电压为 4—6 伏/厘米。通电 45 分钟—2 小时后观察结果。

4. 结果观察：在黑色背景上方，用散射光多个角度观察，在对孔之间有白色沉淀线即为阳性对照应出现明显的白色沉淀线。如果抗原，两极微沉淀条纹不清晰，于 37℃ 保温数小时可增强沉淀条纹的清晰度。

5. 影响结果的因素

(1) 抗原抗体的比例：抗原抗体比例适应时容易出现沉淀带，反之不易发生。当抗体浓度恒定时，被检血清含甲胎蛋白浓度高时，作 10 倍、20 倍或更高倍数稀释可以提高阳性率。随稀释度的增加，抗原抗体的比例发生变化，沉淀线由靠近抗血清孔向逐步移向两孔中间，并可出现不典型的沉淀线如弧形、八字须形、斜线形，这些也是阳性，应予注意。

(2) 几组电泳缓冲液其电泳结果以巴比妥钠—盐酸缓冲液灵敏度最高。巴比妥—巴比妥钠次之。Tris 缓冲液更差。

(3) 电压与电流时电泳时间需要长些：电压电流增大时，电泳时间可更短。但电压过高则孔径变形，电流过大抗原抗体蛋白易变性，干扰实验结果。一般选择每厘米 5 毫升，电泳时间改为 1.5 小时。

(四) 免疫电泳实验

免疫电泳实验是先将抗原物质在琼脂凝胶中做电泳分离，然后于凝胶槽中加入抗体血清。使抗原抗体进行双向扩散，在比例适宜部位形成特异的抗原抗体沉淀弧线。每条沉淀弧线代表一组抗原抗体复合物，故可用抗原成分分析；且可以根据其迁移率与抗体所出现的特异反应进行鉴定。

材料：

1. 抗体与抗原与环状沉淀反应相同。

2. 1.5% 离子琼脂（系用巴比妥缓冲液配制的）

3. 电泳仪

4. 巴比妥缓冲液：

巴比妥 1.84 克

巴比妥钠 10.3 克

蒸馏水 1000 毫升

pH8.6，离子强度 (M) 0.05

5. 其它：载物玻片，直径 3 毫米打孔器，20mm × 2mm 玻璃铸型，微量进样器。

方法：

1. 取载物玻片（7.5 × 2.5 厘米）加上 3.5 毫升 1.5% 琼脂凝胶，制成 2 毫米厚的琼脂板。
2. 按图位置，在琼脂板未凝固时，放入抗血清槽铸型，注意勿使铸型全部浸入琼脂中，待凝固后再打孔。
3. 加待检标本：用微量进样器往孔中加 1—5 微升。
4. 电泳：电压 9—7 伏/厘米，泳动 15—20 小时。
5. 电泳后取出抗血清槽铸型，加入抗血清，进行双扩散，一般在 24 小时内沉淀弧出全。
6. 观察结果：或描绘、拍照或进行染色，染色后的标本便于结果分析及保存。

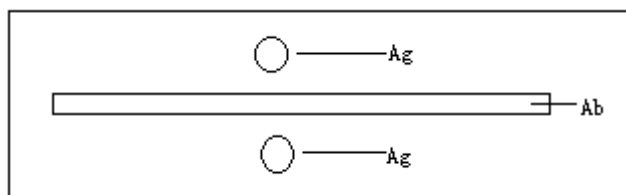


图 6 免疫电泳抗原孔和抗体槽位置示意图

（五）火箭电泳试验

火箭电泳实际是一种定量免疫电泳。其原理为：在电场作用下，抗原在含定量抗体的琼脂介质中泳动，二者比例在合适时在较短时间内形成状似火箭或锥形的沉淀线，而此沉淀线的高度常与抗原量成正比关系，因此本法可以测定样品中抗原的含量。

材料：

1. 抗体与抗原与环状沉淀反应相同。
2. pH8.6，离子强度 0.05M 巴比妥缓冲液配制（见对流免疫电泳试验）
3. 其它：琼脂粉，微量进样器，打孔器，玻璃板，电泳仪

方法：

1. 抗体琼脂板的制备

同单向扩散法，但注意稀释液应用 pH8.6 离子强度 0.05M 的巴比妥缓冲液。

2. 打孔见下图



图 7 火箭电泳抗原孔位置图

3. 将用缓冲液稀释的适宜浓度的参考血清及适当稀释的抗原（人血清）分别加入各孔

中，每孔 10 或 20 微升，要求加量准确而不外溢。

4. 把加完样的免疫琼脂板放入电泳槽中进行电泳，电压 4—6 伏/厘米，电泳时间 1—5 小时，直到大部分抗原孔前端出现顶端尖窄而完全闭合的火箭状沉淀线，关闭电源。

5. 取下琼脂板，以抗原孔中心为起点，量出各火箭状沉淀线的高度。同单向琼脂扩散法绘制标准曲线，查出待检血清中 Ig 含量。