

肺炎链球菌荚膜多糖特异性抗体多型调理吞噬杀菌实验

(UAB-MOPA, E. 02 版, 2014 年 12 月)

Moon H. Nahm Robert L. Burton

美国 NIH 呼吸道病原菌参比实验室
WHO 肺炎链球菌血清学参比实验室
美国阿拉巴马大学伯明翰分校病理和微生物系
美国阿拉巴马州伯明翰市 35294-2170
www.vaccine.uab.edu

编译

乔瑞洁 刘佳 赵志强
中国兰州生物制品研究所

校正

谢贵林
中国兰州生物制品研究所

林纪胜 于纪桂
美国 NIH 呼吸道病原菌参比实验室
WHO 肺炎链球菌血清学参比实验室
美国阿拉巴马大学伯明翰分校病理和微生物系
美国阿拉巴马州 35294-2170

2016 年 1 月

目录

目录.....	1
介绍.....	2
程序.....	3
1. 菌种.....	3
A. 主代菌种库的保存.....	3
B. 工作菌种库的制备.....	3
C. 工作菌种库的鉴定.....	4
D. 工作菌种库的接受标准.....	7
2. HL-60 细胞.....	7
A. 主代细胞库的建立.....	8
B. 工作细胞的起始培养.....	8
C. 工作细胞的增殖培养.....	9
D. HL-60 细胞的分化.....	9
E. HL60 细胞表型的鉴定.....	9
F. HL60 细胞的接受标准.....	13

3. 待测样品	14
A. 样品收集	14
B. 样品处理	14
C. 热灭活	14
D. 样品中杀菌物质的检测（抗生素）	14
E. 质量控制血清库的制备	15
4. 补体	15
A. 补体的分装	16
B. 补体筛选 1（CH50）	16
C. 补体筛选 2（UAB-MOPA）	19
D. 补体批次接受标准	22
5. 胎牛血清	22
A. 热灭活和分装	22
B. 胎牛血清筛选	22
C. 胎牛血清批次的接受标准	25
6. UAB-MOAP 过程	25
7. 数据处理	29
A. 数据转换	29
B. 实验结果可接受的标准	30
C. 单个样品数据的可接受标准	30
8. 实验注释	30
9. 参考文献	32
10. 材料、试剂、溶液和设备	33
A. 塑料用具和玻璃用具	33
B. 溶液和试剂	34
C. 细菌培养基	34
D. 化学试剂	35
E. 设备和软件	35
F. 细胞系	36
G. 细菌	36
H. 流式试剂	37
I. 溶液配方	37
11. 细胞计数	40

介绍

调理吞噬实验已经成为评估肺炎球菌疫苗免疫原性的重要工具（1）。为了便于该实验的广泛应用，我们完成了详细的以四个血清型为基础的多型调理吞噬杀菌实验操作规程（UAB-MOPA）。本操作规程描述的是多型实验，但略做调整也可用于单型（例如，不同的系列稀释度和每个样品孔的数量）。如果需要更多的信息，可以查阅发表刊物（2，3）和相关网站（www.vaccine.uab.edu）。

为了便于数据分析，我们开发了以 Excel[®] 为基础的数据分析程序。它可以将菌落计数转换为“调理指数”。通过向 Robert L. Burton（robburton@uab.edu）提出书面要求，可以从该参比实验室获得该程序“Opsotiter 3”。

我们和美国 NIST（US National Institute of Standard and Technology）合作，开发了一种有效的可通过数字影像计数菌落的软件。该软件命名为“NICE”（NIST’s

Integrated Colony Enumerator) , 可以免费获得。网址 <ftp://ftp.nist.gov/pub/physics/mlclarke/NICE/>。如需更多信息, 联系 nice@nist.gov。

学术研究者非商业用途需要 MOPA 菌株, 可以从 BEI Resources (www.beiresources.org) 获得; 商业用途, 请与阿拉巴马大学伯明翰分校 Dr. Debbie Bidanset (Debbie@uab.edu) 联系。请注意, 在 BEI 注册是获得菌株必需的。BEI 联系方式:

BEI Resources
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110-2209
Email: contact@beiresources.org
Web site: www.beiresources.org
Telephone: 1-800-359-7370

以上目录列出的程序是建立多型调理吞噬杀菌实验所必需的。其中, UAB-MOPA 操作程序是基本的, 其它的程序(工作菌种制备/鉴定、补体批次筛选等)偶尔会用到。

感谢 Nahm 实验室的工作人员们 10 多年来为该规程付出的不懈努力, 同时感谢提供帮助和提出中肯建议的其他人员, 以及 NIH 和 WHO 提供的经费支持。

肺炎球菌是人类的病原菌, 必须保障生物安全, 应根据当地的法规正确操作。

如果还有问题, 请与 Moon H. Nahm 博士 (nahm@uab.edu) 或 Robert L. Burton 先生 (robburton@uab.edu) 联系。

缩写: **OBB**, 调理缓冲液 B; **HI**, 热灭活; **THYA**, **THY** 琼脂; **THYB**, **THY** 液体培养基; **NSK**, 非特异性杀菌; **TTC**, 三苯基氯化四氮唑; **OD**, 光密度; **HBSS**, Hanks 平衡盐溶液; **CFU**, 菌落形成单位; **QC**, 质量控制

程序

题目: 菌种库

修改历史: 2008 年 2 月 1 日; 2008 年 6 月 23 日; 2012 年 9 月 20 日; 2014 年 11 月 14 日

1. 菌种

肺炎球菌是人类的病原菌, 必须保障生物安全, 应根据当地的法规正确操作。

A. 主代菌种库的保存

为了保持肺炎链球菌菌种的原始属性, 来自 **BEI Resources** 的主代菌种管绝不能融化。主代菌种应贮存在 -80°C 冰柜。制备工作菌种时, 将主代菌种管从冰柜中取出, 从管中快速取一点小冰碴, 在血琼脂平板上划线之后(详见下面), 立刻将菌种管放回冰柜。

B. 工作菌种库的制备

从主代菌种管中可以传出、制备、冻存许多管工作菌种, 每支工作菌种分装管化冻后只能用于一次实验。下面是准备 48 管工作菌种的方法。如果需要更多, 可以

相应增加 50 ml 离心管数目。每管移出的培养物不要超过 10ml。

1. 将主代菌种管从冰柜中取出，从管中快速取一点小冰碴，在血平皿上划线之后，**立刻将菌种管放回冰柜。**
2. 将血平皿倒置，在 37°C 过夜孵育（注释 13）。肺炎球菌在血平皿上能够产生 α 溶血环，可以看到绿色的 α -溶血环在菌落周围。
3. 转移~20 个单菌落到含 50 ml THY 液体培养基的 50 ml 离心管中（注释 14）。在 37°C 水浴孵育 3~8 小时，直到上部 150 μ l 培养液的 OD₆₀₀ 达到~0.6-0.9。
4. 收集上部的 10 ml 培养液，转移到新的 50 ml 管中，加入 4 ml 80% 的灭菌甘油和 10 ml 新鲜的 THY 液体培养基。
5. 混匀后，取 0.5 ml 分装入 1.5 ml 的微型离心管（~48 管）中。将最后一支分装管标记，后面用于纯度检测。
6. 随机选择一管（排除最后一管），不冻存，用于做冻存前、后细菌浓度比较（见后面）。将剩余的分装管放入一个标记的硬纸质冻存盒（暂不盖上盖），放进 -70°C 冰箱里。在所有的分装管冷冻完毕之后（最好过夜），盖上标记好的盖子。储存于 -70°C 待用，可以保存 18 个月。

C. 工作菌种库的鉴定

工作菌种库在使用前，必须通过鉴定。如果符合以下标准，才可以用于实验。

1. 用标准分型方法（荚膜肿胀实验，凝集实验，乳粒凝集实验，ELISA，等）确认菌株的血清型。
2. 从最后一支分装管中，取 10 μ l 菌液在血平皿上划线，观察是否有其它微生物污染。37°C 过夜培养后，应只见周围有绿色 α 溶血环的肺炎球菌菌落。
3. 确定冻存工作菌种的抗生素抗性和敏感性
 - a. 准备 OBB。
 - b. 用微波炉 50% 的能量档融化覆盖层培养基（测试每株细菌需要大约 180 ml），轻轻、小心转动以保证所有的琼脂都融化。覆盖层培养基也可在实验当天准备、灭菌，可以省去用微波炉融化的步骤。分装 13 ml 于 15 ml 的无菌试管中，置于 50°C 水浴中待用（培养基温度平衡至 50°C 后方可使用）。
 - c. 干燥 THYA 平板（10 cm \times 10 cm，每株菌需 13 个平板）。在通风的工作台里打开盖子，放置 30-60 分钟（注释 4）。平板干燥后，盖上盖，防止过于干燥。室温下存放直至使用。平板上必须标记菌株的名称以及抗生素名称（见下面）。
 - d. 快速取出一 -70°C 冻存的工作菌种管，在 37°C 水浴轻轻连续晃动融化。
 - e. 系列稀释细菌（一式三份），可以在 96 孔 U 型底组织培养板中方便操作如下：
 - i. 10 倍稀释细菌：在 96 孔 U 型底组织培养板板的 A 行第一至三列中，加入 30 μ l 细菌和 270 μ l OBB，混匀。在 B 至 H 行，1 至 3 列中加 240 μ l OBB。
 - ii. 5 倍系列稀释细菌：从 A 行取出 60 μ l 细菌加入 B 行的 240 μ l OBB 中；继续 5 倍系列稀释，直至做够 8 个稀释度（ $10 \sim 7.8 \times 10^5$ 倍）。

- f. 从三列、每个稀释度取 10 μ l, 平行点在同一个 THYA 平板上(总共需要 13 个平板)。
- g. 将 THYA 平板放置于室温, 允许液体吸入琼脂 (10~20 分钟)。
- h. 从水浴中取出一支装有 13 ml 覆盖层培养基的试管, 加入 13 μ l TTC 储存液, 混匀, 加 12 ml 于一个 THYA 平板上。这是“无抗生素”对照板。
- i. 从水浴中取三支装有覆盖层培养基试管, 每管中加入 13 μ l TTC 储存液, 第一管中加入 6 μ l optochin 储存液, 混匀, 加 12 ml 于一个 THYA 平板上面, 标记平板为“0.5 \times optochin”; 第二管中加入 13 μ l optochin 储存液, 混匀, 加 12 ml 于一个 THYA 平板上面, 标记平板为“1 \times optochin”; 第三管中加入 26 μ l optochin 储存液, 混匀, 加 12 ml 于一个 THYA 平板上面, 标记平板为“2 \times optochin”。
- j. 从水浴中取三支装有覆盖层培养基试管, 重复上述操作, 用于 trimethoprim。
- k. 从水浴中取三支装有覆盖层培养基试管, 重复上述操作, 用于 streptomycin。
- l. 从水浴中取三支装有覆盖层培养基试管, 重复上述操作, 用于 spectinomycin。
- m. 所有的覆盖层加完之后, 总共有 13 个平板。

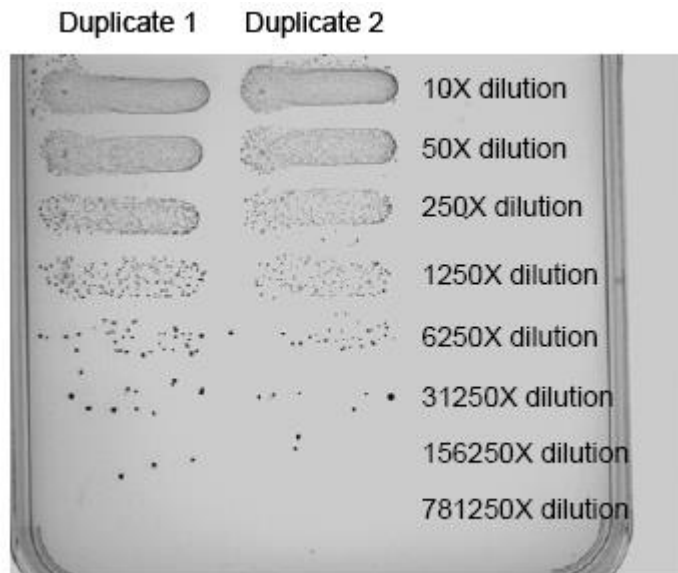
Plate #	Antibiotic
1	No antibiotic
2	optochin, 0.5X
3	optochin, 1X
4	optochin, 2X
5	spectinomycin, 0.5X
6	spectinomycin, 1X
7	spectinomycin, 2X

Plate #	Antibiotic
8	streptomycin, 0.5X
9	streptomycin, 1X
10	streptomycin, 2X
11	trimethoprim, 0.5X
12	trimethoprim, 1X
13	trimethoprim, 2X

- n. 上层琼脂凝固后, 倒置平板于烛缸中 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜 (注释 13)。
 - o. 菌落计数。
 - p. 在无抗生素对照板上, 在有 50~150 个菌落的稀释度处, 计算三个点样点菌落数的平均数。通过比较不同抗生素浓度下的平板和无抗生素的平板上的菌落数, 确定菌株对抗生素的敏感性。抗生素抗性菌株必须对 2 \times 的相应抗生素有抵抗力 (与无抗生素的平板相比, 减少的菌落数要少于 20%), 而对其它抗生素即使在 0.5 \times 的浓度下就应该比较敏感 (与无抗生素的平板相比, 减少 >95% 的细菌)。
4. 确定工作菌种的工作稀释度。在用作 UAB-MOPA 靶菌之前, 每批工作菌种必须在 MOPA 实验条件下做稀释, 确定一个能够在 THYA 平板上每个点样点产生 80~120 个 CFU 的稀释度。
 - a. 准备 OBB。
 - b. 使用微波炉 50% 的能量档融化覆盖层培养基 (~150 ml 足够用于 12 株待测菌)。轻轻、小心的转动琼脂, 以保证所有的琼脂块完全融化, 之后将瓶子置于 50 $^{\circ}$ C 水浴中(温度平衡至 50 $^{\circ}$ C 方可使用); 也可以在实验的当天准备 覆盖层培养基, 灭菌, 省去用微波炉的步骤。
 - c. 干燥 THYA 平板 (10 cm \times 10 cm) (每一株菌需要 1 个平板), 在通风的工作台里打开盖子, 放置 30-60 分钟 (注释 4)。平板干燥以后, 盖上盖, 防止过于干燥, 保存于室温直至使用。

- d. 在新的 96 孔 U 型底组织培养板 16 个孔中（2 列）中，加入 20 μ l OBB（替代实验中所用的 20 μ l 血清）。这是“实验板”。
- e. 准备分化的 HL60 细胞：
 - i. 将 DMF 分化的 HL-60 细胞（分化 5 或 6 天），从培养瓶（一瓶足够用于检测 12 个菌株）中转入 50 ml 离心管中。
 - ii. 离心 HL-60 细胞，~350g（1200 rpm，Sorvall RT7，RTH-250 转子），室温下 5 分钟。
 - iii. 弃上清，将细胞重悬浮于 50 ml 1 \times HBSS（不含钙、镁离子），~350g 离心，室温下 5 分钟。
 - iv. 弃上清，将细胞重悬浮于 50 ml 1 \times HBSS（含钙、镁离子），~350g 离心，室温下 5 分钟。
 - v. 弃上清，将细胞重悬于 OBB 中，使终浓度为 1 \times 10⁷ 细胞/ml（存于室温直至使用）。细胞计数见活性细胞计数操作中“细胞计数”规程。
 - vi. 计数细胞时，用台盼兰染色法，分别记录活细胞和死细胞数，计算活细胞比例。活细胞数 \geq 90%，方可用于调理吞噬实验。
- f. 快速解冻工作菌种及洗细菌：
 - i. 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中，轻轻转动冷冻菌种管直至细菌化开。
 - ii. 在微型离心机中，12000 rpm 离心 2 分钟。
 - iii. 小心除去上清。
 - iv. 加入 1 ml OBB，混匀。
 - v. 12000 rpm 离心 2 分钟。
 - vi. 小心去除上清。
 - vii. 用 OBB 悬浮细胞，还原到原体积（如 0.5 ml）。
- g. 在新 96 孔 U 型底组织培养板上系列稀释细菌。这是“稀释板”。
 - i. 10 倍稀释细菌：在微量稀释板的 A 行第一、二列中，加入 15 μ l 细菌 135 μ l OBB，混匀。在 B 至 H 行，一、二列中加入 120 μ l OBB。
 - ii. 5 倍系列稀释细菌：从 A 行取出 60 μ l 菌液，加入 B 行的 240 μ l OBB 中，混匀；继续 5 倍系列稀释，直至完成 8 个稀释度（10^{-7.8}~10⁻⁵ 倍）。
- h. 从“稀释板”的第一列中取出 10 μ l 菌液，移至“实验板”的第一列，第二列同样操作。
- i. 在微型摇床上，700 rpm，室温孵育 30 分钟。
- j. 这期间，从冰箱中取出适量补体（每株测试菌株需约 0.3 ml），置于室温下解冻（补体完全化开后，立即置于碎冰上，直至使用）。
- k. 孵育 30 分钟后，将 HL60 细胞悬液与补体以 1 ml 细胞和 0.25 ml 补体的比例混合（这个量可用于一株细菌）。
- l. 每孔加 50 μ l 细胞和补体混合液（16 孔/每株细菌）
- m. “实验板”在微型摇床上单层放置，不要叠放。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中，700 rpm 孵育 45 分钟。期间，为了维持 CO₂ 的浓度，不要开启孵箱门。
- n. 孵育之后，将板置于碎冰上~20 分钟，以终止吞噬反应。
- o. 用排枪混合每孔内的反应物，从每一列的 8 孔中取 10 μ l 反应混合液，从 THYA 平板的左侧滴加在平板上，立即向右倾斜平板，液滴流成约 2~3 cm 长条；将第二列 8 个孔的 10 μ l/每孔反应混合液加在 THYA 平板的中间。必须立即倾斜平板，防止液滴流到一起。

- p. 在室温孵育 10-20 分钟，允许液体吸入琼脂。
- q. 从水浴中取出盛有 150 ml 覆盖层培养基的瓶子，加入 150 μ l TTC 储存液，混匀，取 12 ml 加在平板上面。
- r. 室温孵育~20 分钟使琼脂凝固。
- s. 将平板倒置于烛缸中 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- t. 菌落计数，计算平均值。
- u. 确定最适的稀释度，使菌落点的理想菌落数在 80~150 之间。如下图所示，最佳的稀释度在~3000 倍（1250 倍产生的菌落数太多，而 6250 倍产生的菌落数太少）。



- 5. 后面 UAB-MOPA 程序中的描述，可决定工作菌种是否可用。对每一批工作菌种，按前面所确定的稀释倍数，用至少两种质控血清，至少检测三次。而质控血清应该用合格工作菌种检测过多次（最好多于 30 次独立实验）。

D. 工作菌种库的接受标准

工作菌种必须满足以下标准，方可作为 UAB-MOPA 靶菌。

1. 通过取最后一支冻存的菌株在羊血琼脂平板上划线来鉴定冻存菌的纯度。
2. 血清型经荚膜肿胀实验、multibead assay、ELISA 等方法确认。
3. 工作菌种应该对相应的抗生素 2 \times 浓度有良好抗性，而对其它三种抗生素即使在 0.5 \times 浓度下也足够敏感。
4. 工作稀释度 \geq 200。
5. 使用新的工作菌种，用至少两个质控血清，至少用 UAB-MOPA 测定三次，其平均调理指数，应在以前工作菌种确定的范围之内（均值 \pm 2 SD）

题目：HL60 细胞

修改历史：2008 年 2 月 1 日；2008 年 5 月 28 日

2. HL60 细胞

HL60 属于人细胞系。因此，应当考虑生物安全问题，根据当地的指导原则进行操作。在培养 HL60 细胞之前及期间，周期性检查培养箱，确保合适的 CO₂ 水平和湿度

(注释 6)。CO₂ 水平应利用外源性检测设备(例如, Pittsburgh Bacharach 生产的 FYRITE[®] 气体分析仪) 确认。合适的湿度则需要水盘盛满蒸馏水保证。适宜的湿度很关键, 有两个原因: 首先, 可以降低细胞培养和实验平板等的水份蒸发量; 第二, 有些 CO₂ 感应器需要合适的湿度维持其正常功能。

A. 主代细胞库的建立

从 ATCC 得到原始细胞系后, 应通过解冻、增殖培养、再冻存建立一个主代细胞库 (~60 管)。在增殖培养、建立主代细胞库的过程中, 正确的维护、培养对保证细胞质量非常关键。正确的维护包括: 监测 CO₂ 浓度水平 (注释 6)、保持细胞密度低于 5×10^5 /ml 及合适的湿度 (注释 6)。关于冻存细胞的设备, 极力推荐使用可控速冷冻系统 (例如 Thermo-Forma 的 Cryomed systems)。无论使用哪种冷冻系统, 样品在整个冷冻过程中降温的速度为 ~1°C/分钟。

1. 加 10 ml CM3 到 15 ml 离心管中。
2. 在 37°C 水浴中快速解冻 HL60 细胞 (ATCC 原始管), 将其加入到含 10 ml CM3 的离心管中。
3. 室温下离心 5 分钟, ~350g (1200 rpm, Sorvall RT7, RTH-250 转子), 尽可能地去掉上清 (注释 5)。
4. 用 CM3 悬浮细胞 (培养液量根据 ATCC 提供信息而定), 将其转移到 150 cm² 细胞培养瓶中 (不超过 70 ml), 将细胞瓶平放于培养箱中 (37°C, 5% CO₂, 注释 6)。
5. 3 或 4 天后, 向细胞瓶中加入 50 ml 新鲜的 CM3。在 150 cm² 细胞培养瓶中, 培养液不要超过 120 ml。
6. 用血细胞计数板监测细胞密度。细胞密度达到 ~ 5×10^5 /ml 时, 加入新鲜的 CM3 调整细胞密度至 ~ 2×10^5 /ml, 培养液不要超过 120 ml; 当超过 120 ml 时, 增加细胞瓶。
7. 当有 10 瓶细胞 (120 ml/瓶), 且细胞密度约 ~ 5×10^5 /ml 时 (通常 ~3 周), 冻存细胞。
 - a. 准备新鲜冻存培养基: 35 ml FBS (56°C, 灭活 30 分钟)
7 ml DMSO
28 ml RPMI1640
 - b. 将所有细胞瓶中细胞液转移至 50 ml 离心管中 (~24 管), 留下少量细胞液 (~1-2 ml) 进行无菌实验。
 - c. ~350g (1200 rpm, Sorvall RT7, RTH-250 转子), 离心 5 分钟。
 - d. 尽可能地移去上清, 弃掉。
 - e. 每个 50 ml 离心管中加入 2.5 ml 冻存培养基, 轻轻悬浮细胞, 将所有 24 管中的细胞收集在一起, 放入 150 cm² 细胞瓶中, 约 60 ml。
 - f. 将其分装至冻存管, 每管 1 ml (每管中含 ~ 10^7 细胞), 分装后的冻存管放在碎冰上, 直至全部分装完成。
 - g. 留最后一管做微生物污染检测, 将剩余的放入控速冷冻系统中, 开启冷冻程序, 以 1°C/分钟速率降温。
 - h. 冷冻结束后, 将小管转移至液氮罐中。
8. 用标准的支原体组织培养检测技术, 对上述离心前留下的细胞培养液, 进行支原体污染检测; 同时在血平皿上划线检测其它微生物的污染。

B. 工作细胞的起始培养

为了保持效应细胞的一致性, 应该每隔 3-4 个月, 从主代细胞库中复苏一支新的细胞。

1. 加 10 ml CM3 到 15 ml 离心管中。
2. 从液氮罐中取出一支 HL60 细胞的冻存管，在 37°C 水浴中轻轻转动，快速解冻细胞，解冻后，迅速将细胞加到含 10 ml CM3 的离心管中。
3. 室温下离心，~350g (1,200 rpm, Sorvall RT7, RTH-250 转子)，5-10 分钟。尽可能地移去上清（注释 5）。
4. 将细胞沉淀悬于 70 ml CM3 中，转移到 150 cm² 细胞瓶中，平放于细胞培养箱 (37°C, 5% CO₂, 注释 6)。
5. 培养 3-4 天后，加入 50 ml CM3。
6. 每 3-4 天，移去 50 ml 细胞液，加入 50 ml 新鲜的 CM3。
7. 培养~2 周后，开始用 CM1 培养细胞（每 3-4 天，移去 50ml 细胞液，加入 50ml 新鲜的 CM1）。
8. 在细胞培养至少 3~4 周之后，按下述常规增殖方法进行培养。在星期三或星期五开始会更方便于以后的实验操作。如果在星期三进行，计数细胞，调节旧培养液中的细胞浓度到 8×10^5 /ml，每 150 ml 培养瓶中分 40 ml 该浓度细胞液，加入 80 ml 新鲜的 CM1；如果在星期五进行，计数细胞，调节旧培养物中的细胞浓度到 8×10^5 /ml，每 150 ml 培养瓶分 20 ml 细胞液，并加入 60 ml 新鲜的 CM1。
9. 按以下步骤进行增殖。

C. 工作细胞的增殖培养

以下程序是为每周分化 2 次细胞设计的，这样有利于保持培养细胞的传代次数。在星期三分化的细胞，可用于下星期一、二的实验（分别分化 5 和 6 天）；同样，在星期五分化的细胞，可用于下星期三、四的实验（分别分化 5 和 6 天）；分化 6 天以后的细胞废弃。

星期一：每瓶细胞加入 40 ml CM1 (原瓶中有细胞液 80 ml)，终体积 120 ml/瓶，细胞浓度~ 3×10^5 /ml。

星期三：混匀瓶中细胞液，分别从每瓶中取出 80 ml，留下 40 ml，收集取出的细胞，可用于分化（参考下面）；如果不需要则废弃。然后加入 80 ml CM1，维持细胞瓶中液体体积为 120 ml/瓶。把培养瓶放回到培养箱中继续增殖，此时细胞浓度~ 3×10^5 /ml。

星期五：混匀瓶中细胞液，从每瓶中取出 100 ml，留下 20 ml，收集取出的细胞，用于分化（参考下面），如果不需要则废弃；然后加入 60 ml CM1，维持细胞瓶中液体体积为 80 ml/瓶，把培养瓶放回到培养箱中继续增殖，此时细胞浓度~ 2×10^5 /ml。

D. HL60 细胞的分化

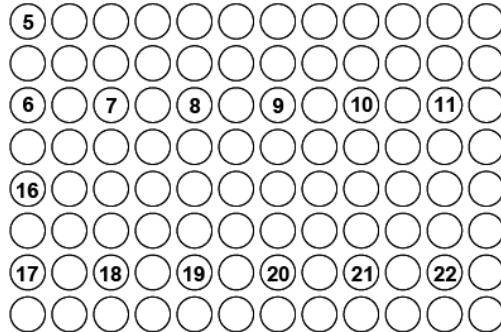
1. 室温下离心 HL60 细胞，~350g (1,200 rpm, Sorvall RT7, RTH-250 转子)，5 分钟。尽可能地移去上清（为保证完全除去抗生素）。
2. 用 CM2（含 0.8% DMF）轻轻重悬细胞沉淀，细胞计数，调节细胞浓度到 4×10^5 /ml。
3. 每个细胞瓶内加入 100 ml 细胞悬浮液。
4. 在培养箱 (37°C, 5% CO₂, 注释 6) 中，平放培养 5-6 天，此期间不要加入培养基，细胞超过 6 天则废弃。
5. 通常分化四瓶细胞可足够用于 7 块 96 孔 U 型底组织培养板的调理吞噬实验，HL60 细胞与细菌的比例为 200: 1。

E. HL60 细胞表型的鉴定

我们建议每 2-4 个星期鉴定一次 HL60 细胞的表型。如果发现 QC 血清的滴度有改变（滴度降低，不完全杀菌等），就需要增加鉴定频率。我们也建议用 FACS（流式细

胞仪) 同时分析分化和未分化的细胞, 未分化细胞可以用作对照。

1. 标记 4 个 15 ml 离心管 A、B、C 和 D。标记 22 个 FACS 管从 1-22。按下图标记 V 型底的 96 孔板 (当细胞从板中转移到 FACS 管时, 这些编号与相应的 FACS 管对应)。



管号	样品	使用目的	细胞需量
A	未分化细胞	表面标记	2×10^6
B	未分化细胞	活性	1×10^6
C	分化细胞	表面标记	2×10^6
D	分化细胞	活性	1×10^6

2. 混匀细胞瓶中 HL60 细胞, 细胞计数。我们建议同时检测分化和未分化细胞。
3. 吸取细胞到标记好的离心管中 (一般~3 ml 分化细胞液, ~4 ml 未分化细胞液中含有 2×10^6 细胞)。
4. 管 B 和 D 室温存放待用。
5. 管 A 和 C, 4°C , 350g, 离心 5 分钟。
6. 离心细胞时, 按下表稀释抗体, 见注释 15 (稀释抗体在 4°C 避光保存备用)。

	Volume (microliters)	
	Antibody	FACS buffer
CD11b PE	6	24
CD35 PE	3	27
CD71 PE	3	27
IgG1 Isotype PE (1/5)	6	24
IgG1 Isotype PE (1/80)	1	79
IgG2a Isotype PE	2	32

7. 移去管 A 和 C 中的上清。
8. 向管 A 和 C 中加入 10 ml FACS 缓冲液, 4°C , 350g, 离心 5 分钟。
9. 移去管 A 和 C 中的上清, 加入 1 ml FACS 缓冲液, 重悬细胞沉淀。
10. 管 A 中取 $50 \mu\text{l}$ 细胞, 加到 96 孔 V 型板上的 5、6、7、8、9、10 和 11 孔中; 从管 C 中取 $50 \mu\text{l}$ 细胞, 加到 16、17、18、19、20、21 和 22 孔中。
11. 向孔 6, 17 中加入 $10 \mu\text{l}$ 稀释的 CD11b PE, 轻轻混匀。
12. 向孔 7, 18 中加入 $10 \mu\text{l}$ 稀释的 CD35 PE, 轻轻混匀。
13. 向孔 8, 19 中加入 $10 \mu\text{l}$ 稀释的 CD71 PE, 轻轻混匀。
14. 向孔 9, 20 中加入 $10 \mu\text{l}$ 稀释的同型 IgG1 PE (1/5 稀释), 轻轻混匀 (孔与孔之间换枪头)。
15. 向孔 10, 21 中加入 $10 \mu\text{l}$ 稀释的同型 IgG1 PE (1/80 稀释), 轻轻混匀 (孔与孔之间换枪头)。

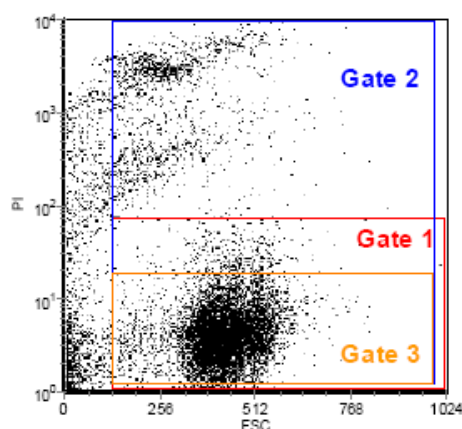
16. 向孔 11, 22 中加入 10 μ l 稀释的同型 IgG2a PE (1/17 稀释), 轻轻混匀 (孔与孔之间换枪头)。
17. 5, 16 孔中不加抗体, 作为不染色的对照孔。
18. 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 分钟。
19. 每孔加入 150 μ l FACS 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C, 350g, 离心 5 分钟。准备 FACS/PI 缓冲液, 加 30 μ l PI 原液到 6 ml FACS 缓冲液中 (PI 终浓度为 5 μ g/ml)。
20. 用不同的枪头移去每孔的上清, 切勿使孔之间交叉污染。
21. 用 250 μ l FACS/PI 缓冲液悬浮细胞。
22. 分别用干净的枪头转移孔内溶液, 第 5 孔到第 5 号 FACS 管, 第 6 孔到第 6 号 FACS 管等等, 如此类推, 将所有孔中液体都转移到相应的 FACS 管中。4 $^{\circ}$ C 避光放置, 直至上样收集 (尽量在 2 小时之内)。
23. 开始对管 B 和 D 进行操作, 首先加入预冷的 1 \times PBS 到 10 ml。
24. 离心管 B 和 D, 4 $^{\circ}$ C, 350g, 5 分钟。准备 50 μ g/ml PI 溶液 (3 μ l PI 贮备液加入 57 μ l 1 \times Annexin V 结合缓冲液), 室温避光保存待用。
25. 移去管 B 和 D 中的上清。
26. 向管 B 和 D 中加入 10 ml 预冷的 1 \times PBS 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C, 350g, 离心 5 分钟。
27. 移去管 B 和 D 中的上清, 悬浮细胞于 1 ml 1 \times Annexin V 结合缓冲液中。
28. 从管 B 中, 各取 100 μ l 细胞悬浮液加入到 FACS 管 1, 2, 3, 4 中; 从管 D 中, 各取 100 μ l 细胞悬浮液加入到 FACS 管 12, 13, 14, 15 中。
29. 向 FACS 管 2 和 13 中, 加入 5 μ l Annexin V FITC。
30. 向 FACS 管 3 和 14 中, 加入 10 μ l 稀释的 PI 溶液。
31. 向 FACS 管 4 和 15 中, 加入 5 μ l Annexin V FITC 和 10 μ l 稀释的 PI 溶液。
32. FACS 管 1 和 12 中, 不加试剂, 作为无染色对照。
33. 室温避光孵育 15 分钟。
34. 向 FACS 管 1-4, 12-15 中, 加入 300 μ l 1 \times Annexin V 结合缓冲液。避光放置, 直到用流式细胞仪进行检测 (尽量在 1 小时之内分析)。

实验用管总结

Description	Buffer	FACS Tube #
Unstained	AV Binding Buffer	1
Annexin V FITC	AV Binding Buffer	2
PI	AV Binding Buffer	3
Annexin V FITC and PI	AV Binding Buffer	4
No Antibody	FACS/PI Buffer	5
CD11b PE	FACS/PI Buffer	6
CD35 PE	FACS/PI Buffer	7
CD71 PE	FACS/PI Buffer	8
IgG1 PE Isotype 1/5 (control for CD11b)	FACS/PI Buffer	9
IgG1 PE Isotype 1/80 (control for CD35)	FACS/PI Buffer	10
IgG1 PE Isotype 1/5 (control for CD71)	FACS/PI Buffer	11
Unstained	AV Binding Buffer	12
Annexin V FITC	AV Binding Buffer	13
PI	AV Binding Buffer	14
Annexin V FITC and PI	AV Binding Buffer	15
No Antibody	FACS/PI Buffer	16
CD11b PE	FACS/PI Buffer	17
CD35 PE	FACS/PI Buffer	18
CD71 PE	FACS/PI Buffer	19
IgG1 PE Isotype 1/5 (control for CD11b)	FACS/PI Buffer	20
IgG1 PE Isotype 1/80 (control for CD35)	FACS/PI Buffer	21
IgG1 PE Isotype 1/5 (control for CD71)	FACS/PI Buffer	22

数据分析

1. 在 FSC-FL3(PI)点图上，按下图设三个门。门 1 用于未分化细胞的表面标记分析，门 3 用于分化细胞的表面标记分析，门 2 用于分化细胞和未分化细胞的活性分析。

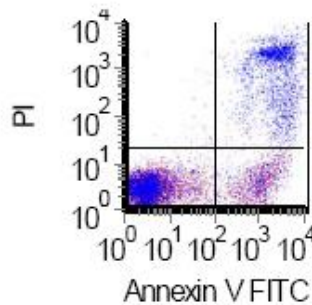


2. 表面标记分析:

- 对未分化细胞制作 7 个 FL2 直方图 (分别是未染色, CD11b, CD35, CD71, IgG1 同型 1/5, IgG1 同型 1/80, IgG2a 同型), 对分化细胞制作同样七个直方图。
- 为每个直方图加入相应的数据文件, 圈定门, 门 1 是未分化细胞, 门 3 是分化细胞。
- 在正确的同型对照图上, 创建 1 个标记 M1, 使得~1%的细胞为阳性。
- 对每个表面标记用相应的 M1 记录阳性细胞的比例 (分化和未分化细胞)。

3. 活性分析:

- 对未分化细胞创建 2 个 FL1-FL2 点图(一个是未染色, 一个是 Annexin V FITC/PI), 对分化细胞也创建 2 个同样的点图。注意: 仅含 Annexin V FITC 和仅含 PI 的 FACS 管, 用于获取数据时做补偿调节用, 在数据分析中不使用。
- 圈定门 2 的细胞, 向每个点图加入对应的数据文件。
- 按下图做十字象限。



- 记录阳性细胞的比例 (未染色的细胞应该~0%): 右上象限 (AnV FITC+/PI+) 为坏死细胞, 右下象限 (AnV FITC+/PI-) 为凋亡细胞。左上象限的比率应为~0%。

F. HL60 细胞的接受标准

HL60 主细胞库必须满足以下标准:

- 无可测到的微生物, 包括支原体污染。
- 细胞培养物应具有参考文献 4 (R.Fleck, et al) 中所描述的的显微镜下特征。
- 进行正确的文件记录, 保存原始资料文件。

如果符合以下所有标准, 分化的 HL60 细胞可用作 UAB-MOPA 实验效应细胞。

- 细胞培养应具有参考文献 4 (R.Fleck, et al) 中所描述的的显微镜下特征。
- 活细胞比例 $\geq 90\%$ (台盼蓝染色) 或者 $\geq 65\%$ (PI 染色)。
- 细胞表面 CD35 的表达 $\geq 55\%$ 。
- 细胞表面 CD71 的表达 $\leq 20\%$ 。
- 凋亡细胞, 由 AnV FITC+/PI-确定, 在细胞总量中 $\leq 25\%$ 。

3. 待测样品

在 UAB-MOPA 实验前，样品需要筛选是否含有杀菌物质（最有可能是抗生素），也需要进行热灭活（破坏内源性补体的活性）。

A. 样品收集

UAB-MOPA 检测的样品是血清，而不是血浆，而且应该根据当地有关的规定操作人血清。

B. 样品贮存

短期贮存（小于一周），样品可以保存于 4℃；否则，应该保存在-80℃。无论何时移动样品，确保信息记录在样品簿中。

C. 热灭活

样品可以在做 UAB-MOPA 之前完成热灭活。

1. 从-80℃冰柜取出样品置于室温。
2. 调整水浴温度至 56℃。
3. 样品完全溶化后，彻底混匀，放在 56℃水浴中 30 分钟。
4. 从水浴中取出样品，冷却至室温。
5. 在 4℃短期贮存样品（<30 天），在-80℃长期贮存样品。

D. 样品中杀菌物质的检测（抗生素）

因为有人可能在血清收集期间进行抗生素治疗，每一份样品应该检测是否含有抗生素。或者，如果检测多种血清型时，当样品中所有的血清型都能检测到比较高的滴度时，这些样品需要检测是否含抗生素。

1. 使用上面所描述的准备 UAB-MOPA 工作菌种的操作程序，准备冻存的 R36A 工作细菌库。这可以提前完成。
2. 用微波炉 50%的能量挡融化覆盖层培养基（~13 ml 足够用于 12 个血清的检测），轻轻、小心转动以保证所有的琼脂都融化，将其置于 50℃水浴中待用。或者，覆盖层培养基可以在实验当天配制并灭菌，这样可以省去用微波炉融化的步骤。
3. 干燥 THYA 平板（1 个 THYA 平板可用于 12 个血清的检测）。在通风的工作台里打开盖子，放置 30-60 分钟（注释 4）。平板干燥以后，盖上盖子，防止过于干燥。保存于室温直至使用。
4. 取出 R36A 工作菌种一支，在 37℃水浴中不断晃动，使其快速解冻。
5. 将棉花签浸入细菌悬液，然后均匀地涂在 THYA 平板上（注释 8）：在整个平板表面划线，然后将平板转 45 度，在整个平板表面划线；然后再将平板转 45 度，在整个平板表面划线。
6. 让菌液在 THYA 平板上吸收 5-10 分钟。
7. 点 5 μl 未稀释的待测血清于 THYA 平板上，点与点之间留~2-3cm 的宽度。如

果血清样品的量有限，可以预先稀释 2 或 4 倍，点 5 μ l 的样品。一个 THYA 平板上可以点 12 个样品，样品之间至少留 2 cm 的距离。

8. 让血清完全吸收。
9. 加 12 ml (~50 $^{\circ}$ C) 含有 25 μ g/ml TTC 的覆盖层培养基。
10. 在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 条件下培养过夜。
11. 如果是未稀释的血清，点血清的位置周围抑制了细菌生长，就指示有抗生素存在（通常抑制圈 \geq 1cm）。含有抗生素的样品，应在灭活或除去抗生素后再做进一步检测。

E. 质量控制血清库的制备

理想化的实验，每一次实验中包含多个质控血清。这些质控血清对每一个血清型都有从高到低的调理指数范围。制备质控血清库时，**不能加入任何保护剂（包括叠氮钠）**。

血清库必须分装冻存。一旦一份分装血清融化以后，可保存于 4 $^{\circ}$ C 一个月，但不能够重新冻存。

对制备质控血清库的血清，要求如下：

- 不含有抗生素。
- 对需要检测的血清型不呈现“不规则”的杀菌曲线。
- 如果可能的话，质控血清与未知的检测样品来源的年龄相对应（婴幼儿、成人、老年人等）。
- 如果可能的话，质控血清与未知的检测样品来源的疫苗种类相对应（多糖疫苗、结合疫苗等）。
- 合并 5 份血清就足以提供 2~3 年的用量。
- 不含有叠氮钠和其它保护剂。
- 一些传染性疾病的指标为阴性（HIV-1 和-2、HTLV-1 和-2、B 型、C 型肝炎、西尼罗河病毒、查加斯氏病毒、梅毒）。

题目：补体

修改历史：2008 年 2 月 1 日； 2008 年 5 月 28 日； 2008 年 6 月 23 日； 2009 年 9 月 1 日； 2011 年 11 月 1 日

4. 补体

补体成分对温度极其敏感。因此，当操作补体以及分装补体时，应当特别谨慎。当存储瓶里的补体从厂家运过来时，要确保仍然是冰冻的，而且运输包装里仍有干冰（如果没有，立刻联系厂家）。快速将瓶子放进-80 $^{\circ}$ C 冰箱里预定的地方。

注意事项：

- 在冰上或冷水浴中融化补体，一定不要用温水或热水。
- 将补体存放在-80 $^{\circ}$ C 冰箱深处离冰箱门尽可能远的地方。
- 当一份分装好的补体融化后，不要再次冻存剩余的，应废弃。

不同批次补体的效力和非特异性杀菌有很大的批间差异。因此，要对将来的补体进行仔细的筛选。补体的筛选可以用 CH50 实验，但最终需对全部血清型使用 UAB-MOPA4 进行测试（至少 3 次）。计算质控血清的调理指数和非特异性杀菌率（NSK），而且应该与以前的合格补体结果进行比较。

A. 补体的分装

1. 从-80℃冰箱中取出 100 ml 瓶装储存补体。
2. 在冷水 (~20℃) 细流下融化补体, 并时时晃动。
3. 标记 12 支离心管 (15 ml 灭菌离心管), “UAB-MOPA 使用补体、批次、日期”, 将这些管子放于冰盒内。
4. 当补体完全融化后, 立刻将瓶子放于冰上。
5. 快速向冰上预冷的管子里加入 8 ml 补体。
6. 在最后一份补体分装完之后, 从中取出 10 μ l 涂布于血平皿进行无菌检测。37℃ 培养过夜, 观察是否有微生物污染。
7. 对于 UAB-MOPA 的对照 A, 需要将补体热灭活, 程序如下:
 - a. 取 10 ml 补体至无菌试管内。
 - b. 56℃ 水浴 30 分钟。
 - c. 将灭活的补体分装到 1.5 ml 的无菌离心管内, 每管 0.2 ml。
 - d. -80℃ 保存待用。

B. 补体筛选 1 (CH50)

CH50 实验用于测定一个血清样品中补体的总活性。待测血清与未经抗体调理过的绵羊红细胞或经调理的绵羊红细胞 (用溶血素即兔抗绵羊红细胞抗血清调理) 共同孵育。溶血素作为绵羊红细胞的抗体结合到绵羊红细胞上后, 会激活补体的级联反应, 最终形成膜攻击复合物, 穿透绵羊红细胞膜, 然后释放血红蛋白。对照绵羊红细胞无显著的裂解。孵育后, 离心反应混合液, 上清的光密度 (OD_{405nm}) 值用来衡量血红蛋白的释放程度 (Protocol adapted from *Manual of Clinical Immunology*, 5th edition, Noel R. Rose, et al, ASM publication, 1997)。

1. 准备工作用溶血素:

- a. 向冻干溶血素小管里加 2 ml 水。
- b. 轻轻旋转小管, 直至溶血素全部溶解。
- c. 56℃ 热灭活溶血素 30 分钟。
- d. 将 2 ml 溶血素转移到 200 ml 的瓶子里, 然后加入 198 ml 0.9% NaCl。
- e. 将溶血素分装到 8 个 50 ml 离心管中, 每管 25 ml。
- f. 储存在-80℃冰箱里待用。

2. 准备对照绵羊红细胞 (ctRBC) 和致敏 (调理) 的绵羊红细胞 (sRBC):

- a. 配制 1×GVB 溶液, 放置于冰浴。冰浴贯穿整个实验, 将未用的缓冲液放回冰上, 因为实验最后还需要用到冰浴的缓冲液。
- b. 充分混合绵羊血, 分别向两个 50 ml 离心管内转移 10 ml, 然后向每管加入 40 ml 1×GVB。
- c. 1300g (2500rpm Sorvall H1000B 转子), 2℃, 离心 5 分钟。
- d. 吸取上清, 丢弃。
- e. 继续用 50 ml 1×GVB 洗涤 RBC (1300g, 2℃, 5 分钟), 直至上清干净 (一般在第一次离心后, 再洗 1-2 次即可)。
- f. 重悬细胞于 40 ml 1×GVB 中, 调节细胞浓度到 $\sim 1 \times 10^9$ /ml。
 - i. 取出 150 μ l 细胞悬液, 加到 2.1 ml 水中。

- ii. 用分光光度计在 541nm 处测其 OD 值, 浓度为 $1 \times 10^9/\text{ml}$ 的细胞悬液 OD_{541} 值约为 0.7。
 - iii. 调节细胞悬液体积: 终体积 (ml) = $57.1 * \text{OD}_{541}$ 。终体积应为 ~50 ml。如果终体积少于 40 ml, 则废弃细胞, 重新准备一批。
- g. 融化一管工作用溶血素 (25 ml), 加入 25 ml $1 \times \text{GVB}$ 。
 - h. 将有 RBC 的管子、50 ml $1 \times \text{GVB}$ 管子和稀释的溶血素管子一起放入 37°C 水浴中至少 10 分钟, 预热。
 - i. 将预热过的等体积的 $1 \times \text{GVB}$ 加到 A 管 (对照 RBC, ctRBC), 迅速将预热过的等体积的溶血素加到 B 管 (致敏 RBC, sRBC), 混匀, 置于 37°C 水浴中, 孵育 20 分钟, 每 5-10 分钟倒置混匀一次。
 - j. 离心细胞, ~1300g, 2°C, 5 分钟。
 - k. 吸取上清, 丢弃。
 - l. 重悬细胞于 100 ml 冰浴的 $1 \times \text{GVB}$ 溶液中 (细胞浓度 $\sim 5 \times 10^8/\text{ml}$)。将细胞放置于 4°C 可保存 2 星期。
3. CH50 实验: 以下操作方法可用于测试 6 个样品。
- a. 配制 $1 \times \text{GVB}$ 溶液, 置于冰浴。冰浴贯穿整个实验, 未用的缓冲液立即放回冰上。
 - b. 标记反应板 (96 孔圆底组织培养板):

板 1: 实验对照板

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Replicate 1	Replicate 1	Replicate 1	Replicate 1	Replicate 1	Blank						
B	Replicate 2	Replicate 2	Replicate 2	Replicate 2	Replicate 2	Blank						
C	Replicate 3	Replicate 3	Replicate 3	Replicate 3	Replicate 3	Blank						
D	Replicate 4	Replicate 4	Replicate 4	Replicate 4	Replicate 4	Blank						
E	Replicate 5	Replicate 5	Replicate 5	Replicate 5	Replicate 5	Blank						
F	Replicate 6	Replicate 6	Replicate 6	Replicate 6	Replicate 6	Blank						
G	Replicate 7	Replicate 7	Replicate 7	Replicate 7	Replicate 7	Blank						
H	Replicate 8	Replicate 8	Replicate 8	Replicate 8	Replicate 8	Blank						
	0% Lysis ctRBC		100% Lysis		0% Lysis sRBC		100% Lysis		Buffer Alone			

板 2: 血清对照板 (无 RBC)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
C	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
D	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
E	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
F	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
G	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
H	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6	

板 3: ctRBC 板

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
C	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
D	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
E	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
F	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
G	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
H	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6	

板 4: sRBC 板

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
C	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
D	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
E	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
F	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
G	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
H	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6	

- c. 室温解冻补体样品。在样品融化之后，立刻放于冰上保存。
- d. 向板 1 的第 1、3、5 列，A 至 H 行，加入 50 μ l 1 \times GVB 溶液。
- e. 向板 1 的第 2、4 列，A 至 H 行，加入 50 μ l 水。
- f. 向 2、3、4 板的第 1 至 12 列，B 至 H 行，加入 50 μ l 1 \times GVB 溶液。
- g. 样品可以不稀释直接检测。如果样品量不够检测所用，可以用 1 \times GVB 溶液进行预稀释（2 倍或 4 倍）。
- h. 向 2、3、4 块板的第 1、2 列，A 行，加入 100 μ l 样品 1；向 2、3、4 块板的第 3、4 列，A 行，加入 100 μ l 样品 2；以此类推，一直加到样品 6。
- i. 在 2、3、4 板上对样品进行两倍系列稀释。在 A 行中混匀溶液，然后吸取 50 μ l 混合液向 B 行中转移，混匀；然后 B 行向 C 行再转移 50 μ l 混合液，以此类推。从 G 行到 H 行，混匀 H 行中的液体后，吸取 50 μ l，弃去。将板子放于冰上待用。
- j. 从储存瓶中取出 5 ml ctRBC，加到标记好的 15 ml 离心管中；从储存瓶中取出 5 ml sRBC，加到第二个标记好的 15 ml 离心管中；分别加 10 ml 预冷的 1 \times GVB 到每个 15 ml 离心管中，1300g (2500 rpm, Sorvall H1000B 转子)，离心，2 $^{\circ}$ C，

- 5 分钟。
- k. 吸取上清，废弃；加入 15 ml 预冷的 1×GVB，1300g 离心，2°C，5 分钟。
 - l. 重悬细胞于 5 ml 预冷的 1 × GVB 中，调节细胞浓度~ 2×10^8 /ml:
 - i. 取 150 μ l 细胞悬液，加入到 2.1 ml 水中。
 - ii. 用分光光度计在 541nm 处测量 OD 值。
 - iii. 调节细胞悬液的体积:

$$\text{终体积 (ml)} = 35.7 * \text{OD}_{541}$$
 终体积应为~12 ml。
 - m. 在板 1 的第 1、2 列，A 至 H 行，以及板 3 的所有孔，加入 50 μ l ctRBC。
 - n. 在板 1 的第 3、4 列，A 至 H 行，以及板 4 的所有孔，加入 50 μ l sRBC。
 - o. 在板 1 的第 5 列，A 至 H 行，以及板 2 的所有孔，加入 50 μ l 1×GVB。
 - p. 37°C，在微型板振荡器上，~500 rpm (speed 5 on Lab-line Instrument, model 4625)，振荡 60 分钟。
 - q. 取出板子，向板 1 的第 2、4 列，A 至 H 行，加入 150 μ l 预冷的水。其余所有每个孔中加入 150 μ l 预冷的 1 × GVB 溶液，预冷。
 - r. 1300g 离心，2°C，5 分钟。
 - s. 立刻吸取上清 150 μ l (小心不要打散细胞沉淀) 到 ELISA 板中 (平底 96 孔) 板。
 - t. 读 OD₄₀₅。
 - u. 数据分析:
 - i. 打开“CH50 分析模板 V.02.xls”。
 - ii. 向相应的空格中复制粘贴原始 OD 值。
 - iii. 在相应的空格中键入需要的实验信息 (名称，实验名称，样品名称等)。
 - iv. 保存文件，打印摘要页和原始数据页。

C. 补体筛选 2 (UAB-MOPA)

以下的操作适用于检测一个批次的补体，针对 4 个血清型，5 个质控血清。

1. 配制 OBB。
2. 干燥大 (~12 cm × 12 cm) THYA 平板。在通风的工作台里打开盖子，放置 30-60 分钟 (注释 4)，需要 8 个平板。平板干燥之后，盖上盖以防过于干燥，放置室温待用。按如下信息标记平板：实验平板，排数，菌株名称 (或覆盖层所加抗生素)。
3. 如果以前没有提前完成，那么此时可以为实验“对照 A”准备热灭活补体 (灭活补体可以提前准备并存放于 -80°C 待用):
 - a. 取一管补体，室温放置待完全解冻。
 - b. 56°C 水浴孵育 30 分钟。
 - c. 使用前让补体冷却至室温。
4. 用微波炉 50% 的能量档融化覆盖层培养基 (需要~210 ml)。轻轻、小心转动以确保所有的琼脂块融化。覆盖层培养基也可以在实验当天准备、灭菌，省去用微波炉融化的步骤。在 4 个无菌瓶子中各分装 55 ml，放在 50°C 水浴里待用 (琼脂温度平衡至 50°C 方可用)。
5. 按下面程序准备 96 孔 U 型底组织培养板:

- a. 向第 1、2 列的 A 至 H 行加入 20 μ l OBB；只向第 3 至 12 列的 A 至 G 行加入 20 μ l OBB。
- b. 向第 3、4 列的 H 行加入 30 μ l 经热灭活的 QC 血清 1，向第 5、6 列的 H 行加入 30 μ l 经热灭活的 QC 血清 2，继续按此形式加完 QC 血清 5。
- c. 从第 3 列至 12 列，进行 3 倍系列稀释：从 H 行向 G 行转移 10 μ l 血清，小心混匀，避免产生气泡，从 G 行再向 F 行转移 10 μ l，以此类推。在从 B 行向 A 行转移 10 μ l 混匀后，从 A 行中吸取 10 μ l 液体，弃掉。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control A	Control B	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
B	Control A	Control B	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
C	Control A	Control B	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
D	Control A	Control B	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
E	Control A	Control B	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
F	Control A	Control B	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
G	Control A	Control B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
H	Control A	Control B	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
			QC Serum 1		QC Serum 2		QC Serum 3		QC Serum 4		QC Serum 5	

对照 A	含有细菌+补体 (HI) +HL60, t=75 分钟	用于计算非特异性杀菌率
对照 B	含有细菌+补体+HL60, t=75 分钟	用于计算实验条件下 CFU/spot 最大值。用于计算非特异性杀菌率

6. 准备分化的 HL60 细胞：

- a. 将 DMF 分化的 HL60 细胞从培养瓶中转移到 50 ml 离心管中（1 瓶足够用于 2 个实验板）。
- b. 室温下离心，350g（1200rpm，Sorvall RT7，RTH250 转子），5 分钟。
- c. 去上清，悬浮细胞于 50 ml 1 \times HBSS 缓冲液（无 Ca²⁺, Mg²⁺），然后室温下离心，~350g，5 分钟。
- d. 去上清，加入 50 ml 1 \times HBSS 缓冲液（有 Ca²⁺, Mg²⁺）悬浮细胞，然后室温下离心，~350g，5 分钟。
- e. 去上清，用 OBB 调整细胞浓度为 1 \times 10⁷/ml。用本规程中列出的“细胞计数”方法进行活细胞计数。
- f. 对细胞计数时，用台盼蓝染色确定活细胞比例。记录活细胞和死细胞的数量。活细胞比例应 \geq 90%，才可以供实验使用。

7. 快速解冻 4 种工作菌种及洗细菌：

- a. 在 37 $^{\circ}$ C 水浴箱里轻轻转动菌种管，使之融化。
- b. 在微型离心机内，12,000g，2 分钟。
- c. 小心去除上清，弃掉。
- d. 每管加入 1 ml OBB，悬浮细菌，混匀。
- e. 12,000g，离心 2 分钟。
- f. 小心去除上清，弃掉。
- g. 用初始体积 OBB 重悬细菌沉淀（例如，0.5 ml）。

8. 准备细菌混合液，将适当量的 4 种工作菌种加入含 10 ml OBB 的离心管中（每株细菌终浓度约为 50,000 CFU/ml）。向每个孔中包括对照孔加入 10 μ l 细菌混合液。

9. 在微型振荡器上，700 rpm，室温下反应 30 分钟。

10. 在此期间，从冰箱里取出待测的补体（需要约 1.3 ml 活性补体，0.1 ml 灭活补体）。将补体放于室温自然解冻（补体一旦融化，立刻置于冰上待用）。

11. 在 30 分钟反应期间，将 4.8 ml HL60 细胞悬液转移至干净无菌的 15 ml 离心管里，也转移 400 μ l HL60 细胞悬液到 1.5ml 离心管中，都置于室温待用。
12. 30 分钟反应之后，将 100 μ l 灭活补体加到含 400 μ l HL60 细胞悬浮液的管子里，混匀，向第一列 A 至 H 行每孔加入 50 μ l。
13. 将 1.2 ml 具活性补体加入到含 4.8 ml HL60 细胞悬浮液的管子里，混匀，向第 2 至 12 列的 A 至 H 行每孔加入 50 μ l。
14. 将 96 孔 U 型底组织培养板单层放置在微型振荡器上，不要堆叠板子，700 rpm，在 37°C，5% CO₂ 条件下，孵育 45 分钟。为了维持 CO₂ 的浓度，在此期间不要打开培养箱门。
15. 孵育结束后，将板子置于冰上~20 分钟，终止噬菌反应。
16. 从每个反应混合物的孔中取 10 μ l 分别点在一套的 4 个 THYA 平板上。从 H 行开始，用 12 孔排枪混合每孔的混合物，取 10 μ l 液体，在 THYA 平板的左侧滴加 10 μ l 液体，立即倾斜平板，使液体流成一条 (~2-3 cm)。对 G、F、和 E 行重复以上操作（每块板可点 48 孔）。必须立即倾斜平板以防止液滴流到一起。D、C、B 和 A 行点到第二套的 4 块板上。
17. 室温放置~20 分钟，让液体吸收入琼脂（注释 7）。
18. 从水浴中取出第一瓶 52 ml 覆盖层培养基，加入 52 μ l TTC 储存液和 52 μ l optochin 储存液，混匀，加 25 ml 于每套 4 个平板中的第一块上面，应该有 2 块平板加这种覆盖层。
19. 从水浴中取出第二瓶 52 ml 覆盖层培养基，加入 52 μ l TTC 储存液和 52 μ l streptomycin 储存液，混匀，加 25 ml 于每套 4 个平板中的第二块上面，应该有 2 块平板加这种覆盖层。
20. 从水浴中取出第三瓶 52 ml 覆盖层培养基，加入 52 μ l TTC 储存液和 52 μ l spectinomycin 储存液，混匀，加 25 ml 于每套 4 个平板中的第三块上面，应该有 2 块平板加这种覆盖层。
21. 从水浴中取出第四瓶 52 ml 覆盖层培养基，加入 52 μ l TTC 储存液和 52 μ l trimethoprim 储存液，混匀，加 25 ml 于每套 4 个平板中的第四块上面，应该有 2 块平板加这种覆盖层。
22. 将平板在室温放置~20 分钟，覆盖层培养基凝固后，将平板倒置，在烛缸中，37°C 孵育 16-18 小时（注释 13）。在有 optochin 平板上生长的菌落为 optochin 抗性菌株，在 streptomycin 平板上生长的细菌为 streptomycin 抗性菌株，等等。
23. 使用人工或自动计数器计数菌落（注释 11 中的菌落计数选择）。
24. 计算调理指数和 NSK（注释 18）。调理指数可以用杀菌率为 50% 时的血清稀释度来表示。因为每一种细菌在对照 B 中的值可能是不同的，所以，每一株细菌必须独立分析。当分析结束时你应该有四个文件。（每种血清型一个文件。）过程如下：
 - a. 打开分析模板 “Opsotiter 3”
 - b. 选择模板中 “Raw data” 页。
 - c. 填入实验信息（黄色的格子要求必需填写）。
 - i. 在相应格子填入菌落数，注意对照 A 和 B 的位置。这步可以人工填写，也可以从另一文件拷贝和粘贴。如果从其他文件转换，要确保格式一样。
 - ii. 在规定格子填入实验信息。
 - iii. 对实验参数做必要调整，通常不做改变。
 - iv. 在规定格子填入样品信息（名字和预稀释倍数）。
 - d. 保存文件，打印出 “RawData” 和 “Report” 页。
 - e. 关闭文件，然后重新打开模板分析另一组数据。不要用已经分析过的文件作为模板来分析另外一组数据。

25. 在每个质控血清用待测补体检测至少 2 次后，计算每个质控血清、每个血清型的平均调理指数。每一次试验也要计算 NSK。

D. 补体批次接受标准

预期补体接受标准：

1. 新补体的 CH50 值应该在中间的第 70 个百分位数，例如：不要使用 CH50 值在低于或高于第 15 个百分位数的补体。
2. 新补体检测中对照（非致敏）RBC 的值要低于 4。根据我们的经验，大部分乳兔补体（3~4 周龄）对照 RBC 没有可以测到的 CH50。
3. 对于大部分血清型，非特异性杀菌率小于等于 30%。对于有些血清型（如 6A, 6B, 和 7F），非特异性杀菌率可能会高一些；~70%的非特异性杀菌率对于这些血清型是可以接受的。
4. 对于每个 QC 血清，新补体的平均调理指数（至少测定两次）应落在已确定的调理吞噬滴度范围之内（均值 ± 2 SD）。

题目：胎牛血清

修改历史：2008 年 2 月 1 日； 2008 年 6 月 23 日； 2011 年 11 月 1 日； 2012 年 9 月 20 日

5. 胎牛血清 (FBS)

我们最近发现实验中大部分批次的补体对 14 型 NSK 比较高，至少有一部分要归因于实验中使用的 FBS。14 型的高 NSK，在使用所有批次 FetalClone I FBS 时均可见。当使用来自 HyClone 和 Atlanta Biological 的其它级别的胎牛血清时，大部分批次的补体对 14 型的 NSK 可以忽略。所以，我们在 MOPA 实验中配制 OBB 时不使用 FetalClone I FBS（尽管在 HL-60 细胞的培养中我们仍然使用该 FBS），而开始使用 Hyclone Defined FBS。鉴于其它血清型（例如 6B 和 7F）仍存在高 NSK，对不同批次的 FBS 应该进行筛选。

A. 热灭活和分装

1. 从 -20°C 中取出 FBS 置于 37°C 的水浴中，一旦血清完全溶化，从水浴中取出冷却至室温。
2. 在一个与装 FBS 大小和规格相同的瓶子里，加入 500 ml 水并平衡至室温。这个瓶子将用于监测瓶子内的温度（“温度监测瓶”），可以使用旧的空的 FBS 瓶。
3. 将瓶子放在 56°C 水浴中，在“温度监测瓶”中放一个温度计，水浴用的水应该在瓶内液体的上方~1cm，并且在瓶颈之下。
4. 当温度监测瓶中的水温达到 56°C 时，开始计时。
5. 56°C 水浴 30 分钟之后，从水浴中取出装 FBS 的瓶子。冷却至室温。
6. 分装热灭活的血清至 50 ml 灭菌的离心管中，~45 ml/管。短期贮存（<1 个月），分装管可以置于 4°C；如需长期贮存，分装管必须保存在 ≤ -20 °C。

B. 胎牛血清筛选

下面的操作可用于检测一批次的 FBS，针对 4 个血清型，使用 5 个质控血清。

1. 用待测 FBS 配制 OBB。

2. 干燥大 (~12 cm×12 cm) THYA 平板。在通风的工作台里打开盖子，放置 30-60 分钟（注释 4），需要 8 个平板。平板干燥之后，盖上盖以防过于干燥，放置室温待用。按如下信息标记平板：实验平板，排数，菌株名称（或覆盖层所加的抗生素）。
3. 如果以前没有提前完成，那么此时可以为实验“对照 A”准备热灭活补体（灭活补体可以提前准备并存放于 -80℃ 待用）：
 - a. 取一管补体，室温放置待完全解冻。
 - b. 在 56℃ 水浴中孵育 30 分钟。
 - c. 使用前让补体冷却至室温。
4. 用微波炉 50% 的能量档融化覆盖层培养基（需要~210 ml）。轻轻、小心转动以确保所有的琼脂块融化。覆盖层培养基也可以在实验当天准备、灭菌，省去用微波炉融化的步骤。在 4 个无菌瓶子中各分装 55 ml，放在 50℃ 水浴里待用（琼脂温度平衡至 50℃ 方可用）。
5. 按下面程序准备 96 孔 U 型底组织培养板：
 - a. 向第 1、2 列的 A 至 H 行加入 20 μl OBB；只向第 3 至 12 列的 A 至 G 行加入 20 μl OBB。
 - b. 向第 3、4 列的 H 行加入 30 μl 经热灭活的 QC 血清 1，向第 5、6 列的 H 行加入 30 μl 经热灭活的 QC 血清 2，继续按此形式加完 QC 血清 5。
 - c. 从板 A 的第 3 列至 12 列，板 B 到 E 的所有列进行 3 倍系列稀释。确保每换行时都要换枪头。
 - i. 使用平板振荡器，振荡平板（800-1000rpm）5 秒钟。
 - ii. 转移 10 μl 血清从 H 行到 G 行，丢弃枪头。
 - iii. 使用平板振荡器，振荡平板（800-1000rpm）5 秒钟。
 - iv. 使用新的枪头，转移 10 μl 血清从 G 行到 F 行，丢弃枪头。
 - v. 使用平板振荡器，振荡平板（800-1000rpm）5 秒钟。
 - vi. 这样稀释至 A 行。振荡平板后，从 A 行丢弃 10 μl 液体。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control A	Control B	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
B	Control A	Control B	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
C	Control A	Control B	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
D	Control A	Control B	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
E	Control A	Control B	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
F	Control A	Control B	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
G	Control A	Control B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
H	Control A	Control B	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
			QC Serum 1		QC Serum 2		QC Serum 3		QC Serum 4		QC Serum 5	

对照 A	含有细菌+补体 (HI) +HL60, t=75 分钟	用于计算非特异性杀菌率
对照 B	含有细菌+补体+HL60, t=75 分钟	用于计算实验条件下 CFU/spot 最大值。用于计算非特异性杀菌率

6. 准备分化的 HL60 细胞：
 - a. 将 DMF 分化的 HL60 细胞从培养瓶中转移到 50 ml 离心管中（1 瓶足够用于 2 个实验板）。
 - b. 室温下离心，350g（1200rpm，Sorvall RT7，RTH250 转子），5 分钟。
 - c. 去上清，用 50 ml 1×HBSS 缓冲液（无 Ca²⁺，Mg²⁺）悬浮细胞，室温下离心，~350g，5 分钟。
 - d. 去上清，加入 50 ml 1×HBSS 缓冲液（有 Ca²⁺，Mg²⁺），室温下离心，~350g，5 分钟。

- 分钟。
- e. 去上清，用 OBB 调整细胞浓度为 1×10^7 /ml。用本规程中列出的“细胞计数”方法进行活细胞计数。
 - f. 对细胞计数时，用台盼蓝染色确定细胞的活细胞比例。记录活细胞和死细胞的数量。活细胞比例应 $\geq 90\%$ ，才可以供实验使用。
7. 快速解冻 4 种工作菌种及洗菌：
- a. 在 37°C 水浴箱里轻轻转动菌种管，使之融化。
 - b. 在微型离心机内， $12,000\text{g}$ ，2 分钟。
 - c. 小心去除上清，弃掉。
 - d. 每管加入 1 ml OBB，混匀。
 - e. $12,000\text{g}$ ，离心 2 分钟。
 - f. 小心去除上清，弃掉。
 - g. 用初始体积 OBB 重悬细菌沉淀（例如，0.5 ml）。
8. 准备细菌混合液，将适当量的 4 种工作菌种加入含 10 ml OBB 的离心管中（每株细菌终浓度约为 $50,000 \text{ CFU/ml}$ ）。向每个孔中包括对照孔加入 $10 \mu\text{l}$ 细菌混合液。
9. 在微型振荡器上， 700 rpm ，室温下反应 30 分钟。
10. 在此期间，从冰箱里取出待测的补体（需要约 1.3 ml 活性补体，0.1 ml 灭活补体）。将补体放于室温自然解冻（补体一旦融化，**立刻**置于冰上待用）。
11. 在 30 分钟反应期间，将 4.8 ml HL60 细胞悬液转移至干净无菌的 15 ml 离心管里，也转移 $400 \mu\text{l}$ HL60 细胞悬液到 1.5 ml 离心管中，都置于室温待用。
12. 30 分钟反应之后，将 $100 \mu\text{l}$ 灭活补体加到含 $400 \mu\text{l}$ HL60 细胞悬浮液的管子里，混匀，向第一列 A 至 H 行每孔加入 $50 \mu\text{l}$ 。
13. 将 1.2 ml 具活性补体加入到含 4.8 ml HL60 细胞悬浮液的管子里，混匀，向第 2 至 12 列的 A 至 H 行每孔加入 $50 \mu\text{l}$ 。
14. 将 96 孔 U 型底组织培养板**单层**放置在微型振荡器上，不要堆叠板子， 700 rpm ，在 37°C ， $5\% \text{ CO}_2$ 条件下，孵育 45 分钟。为了维持 CO_2 的浓度，在此期间不要打开培养箱门。
15. 孵育结束后，将板子置于冰上~20 分钟，终止噬菌反应。
16. 从每个反应混合物的孔中取 $10 \mu\text{l}$ 加入一套 4 个 THYA 平板。从 H 行开始，用 12 孔排枪混合每孔的混合物，取 $10 \mu\text{l}$ 液体，在 THYA 平板的左侧滴加 $10 \mu\text{l}$ 液体，**立即**倾斜平板，使流成一条（~2-3 cm）。对 G、F、和 E 行重复以上操作（每块板可供 48 孔）。**必须立即倾斜平板以防止液滴流到一起**。D、C、B 和 A 行点到第二套 4 块板上。
17. 室温放置~20 分钟，让液体吸收入琼脂（注释 7）。
18. 从水浴中取出第一瓶 52 ml 覆盖层培养基，加入 $52 \mu\text{l}$ TTC 储存液和 $52 \mu\text{l}$ optochin 储存液，混匀，加 25 ml 于每套 4 个平板中的第一块上面，应该有 2 块平板加这种覆盖层。
19. 从水浴中取出第二瓶 52 ml 覆盖层培养基，加入 $52 \mu\text{l}$ TTC 储存液和 $52 \mu\text{l}$ streptomycin 储存液，混匀，加 25 ml 于每套 4 个平板中的第二块上面，应该有 2 块平板加这种覆盖层。
20. 从水浴中取出第三瓶 52 ml 覆盖层培养基，加入 $52 \mu\text{l}$ TTC 储存液和 $52 \mu\text{l}$ spectinomycin 储存液，混匀，加 25 ml 于每套 4 个平板中的第三块上面，应该有 2 块平板加这种覆盖层。
21. 从水浴中取出第四瓶 52 ml 覆盖层培养基，加入 $52 \mu\text{l}$ TTC 储存液和 $52 \mu\text{l}$ trimethoprim 储存液，混匀，加 25 ml 于每套 4 个平板中的第四块上面，应该有 2 块平板加 这种覆盖层。

22. 将平板在室温孵育~20 分钟，上层胶凝固后，将平板倒置，在烛缸中，37℃孵育 16-18 小时（注释 13）。在有 optochin 平板上生长的菌落为 optochin 抗性菌株，在 streptomycin 平板上生长的细菌为 streptomycin 抗性菌株，等等。
23. 使用人工或自动计数器计数菌落（注释 11 中的菌落计数选择）。
24. 计算调理指数和 NSK（注释 18）。调理指数可以用杀菌率为 50% 时的血清稀释度来表示。因为每一种菌在对照 B 中的值可能是不同的，所以，每一株细菌必须独立分析。当分析结束时你应该有四个文件。（每种血清型一个文件。）过程如下：
 - a. 打开模板：“Opsotiter 3”
 - b. 选择模板中“Raw data”页。
 - c. 填入实验信息（黄色的格子要求必需填写）。
 - i. 在相应格子填入菌落数，注意对照 A 和 B 的位置。这一步可以人工填写，也可以从另一文件拷贝和粘贴。如果从其他文件转换，要确保格式一样。
 - ii. 在规定格子填入实验信息。
 - iii. 对实验参数做必要调整，通常不做改变。
 - iv. 在规定格子填入样品信息（名字和预稀释倍数）。
 - d. 保存文件，打印出“RawData”和“Report”页。
 - e. 关闭文件，然后重新打开模板分析另一组数据。不要用已经分析过的文件作为模板来分析另外一组数据。
25. 在每个质控血清用待测补体检测至少 2 次后，计算每个质控血清、每个血清型的平均调理指数。每一次试验也要计算 NSK。

C. 胎牛血清批次的接受标准

如果待检胎牛血清符合以下要求，就可以被接受。

1. 对每一种质控血清，使用待测 FBS 所得的平均调理指数 ($n \geq 2$)，与以前的合格的 FBS 相比，在可接受的范围之内 (均值 ± 2 SD)。
2. 对多数血清型，FBS 引起 $NSK \leq 30\%$ 。对某些血清型（例如，6A、6B 和 7F）FBS 引起的 NSK 可能高些；对这些血清型，NSK 在 70% 以下时，可以接受。

题目：UAB-MOPA 程序

修改历史：2008 年 2 月 1 日；2013 年 8 月 1 日；2014 年 11 月 14 日

6. UAB-MOAP 过程

下面的操作程序针对一次试验做 7 个 96 孔 U 型底组织培养板。多于 41 个样品，应分成两次试验（例如，先完成 7 个 96 孔 U 型底组织培养板后，再进行后面的 7 个 96 孔 U 型底组织培养板）。UAB-MOPA 里的待测样品必须如前面所述的那样进行热灭活。

靶细菌按下表分组：

	Strain 1	Strain 2	Strain 3	Strain 4
Cassette A	OREP4	SPEC6B	STREP14	EMC23F
Cassette B	OREP18C	SPEC19F	EMC9V	TREP6A
Cassette C	OREP3	SPEC1	STREP5	TREP19A
Cassette D	OREP7F	SPEC6C	STREP33F	TREP22F
Cassette E	OREP17F	SPEC9N	STREP8	TREP11A
Cassette F	OREP10A	SPEC6D	STREP2	TREP12F
Cassette G	empty*	SPEC20B	empty*	TREP15B

为了维持细胞和靶细菌的比例，两个带有合适抗生素抗性的不相关菌也包含在内，例如 OREP3 和 STREP8。

1. 准备 OBB（100 ml 应该够用）。
2. 干燥大的 THYA 平板（~12 cm×~12 cm），在通风的工作台里打开盖子，放置 30~60 分钟（注释 4）。需要 56 个平板。平板干燥以后，盖上盖子，防止过于干燥。放在室温直至使用。平板上标记以下的信息：实验 96 孔 U 型底组织培养板号、行和细菌名称（或覆盖层里加的抗生素名称），例如：一个板子标记“C, H-E OP”，表示 96 孔 U 型底组织培养板 C 中的行 H、G、F 和 E，含有 optochin 抗性菌株。
3. 使用微波炉的 50% 能量档融化覆盖层培养基（7 个 96 孔 U 型底组织培养板大约需要 1500 ml），轻轻、小心转动以保证所有的琼脂都融化；或者，覆盖层培养基可在实验当天准备、灭菌，这样就可以省去用微波炉融化的步骤。在四个灭菌的瓶子中各加 370 ml 琼脂，置于 50℃ 水浴中待用。
4. 如果之前没准备好热灭活（HI）的补体，现在就可以准备，用于实验的“对照 A”（已灭活、分装的补体可存在 -80℃ 直至使用）。
 - a. 取出补体，在室温下完全融化。
 - b. 在 56℃ 水浴 30 分钟。
 - c. 在使用前让热灭活补体冷却至室温。
5. 按照下表所示排列方式准备 96 孔 U 型底组织培养板。下面程序描述了血清始于 4 倍稀释，做 8 个 3 倍系列稀释的过程。其它的格式参见注释 12。
 - a. 在 A 板 A 到 H 行的第 1、2 列，加 20 μl OBB。
 - b. 在 A 板 A 到 G 行的第 3 至 12 列，加 20 μl OBB；在 B、C、D、E、F 和 G 板上 A 至 G 行的 1 至 12 列，加 20 μl OBB。
 - c. 在 A 板 H 行的 3、4 列，加入 30 μl 血清样品 1；在 A 板 H 行的 5、6 列，加入 30 μl 血清样品 2；以此类推，按照模板完成加血清样品。
 - d. 从板 A 的第 3 列至 12 列，板 B 到 E 板的所有列进行 3 倍系列稀释。确保每换行时都要换枪头。
 - i. 使用平板振荡器，振荡平板（800-1000rpm）5 秒钟。
 - ii. 转移 10 μl 血清从 H 行到 G 行，丢弃枪头。
 - iii. 使用平板振荡器，振荡平板（800-1000rpm）5 秒钟。
 - iv. 使用新的枪头，转移 10 μl 血清从 G 行到 F 行，丢弃枪头。
 - v. 使用平板振荡器，振荡平板（800-1000rpm）5 秒钟。
 - vi. 这样稀释至 A 行。振荡平板后，从 A 行丢弃 10 μl 液体。

样品排列方式如下：

Plate A													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Control A	Control B	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	
B	Control A	Control B	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	
C	Control A	Control B	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	
D	Control A	Control B	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	
E	Control A	Control B	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	
F	Control A	Control B	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	
G	Control A	Control B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	
H	Control A	Control B	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	
			Sample 1			Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5	

Plates B, C, D, and E												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
B	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
C	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
D	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
E	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
F	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
G	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
H	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
	Sample 6 (12, 18, or 24)		Sample 7 (13, 19, or 25)		Sample 8 (14, 20, or 26)		Sample 9 (15, 21, or 27)		Sample 10 (16, 22, or 28)		Sample 11 (17, 23, or 29)	

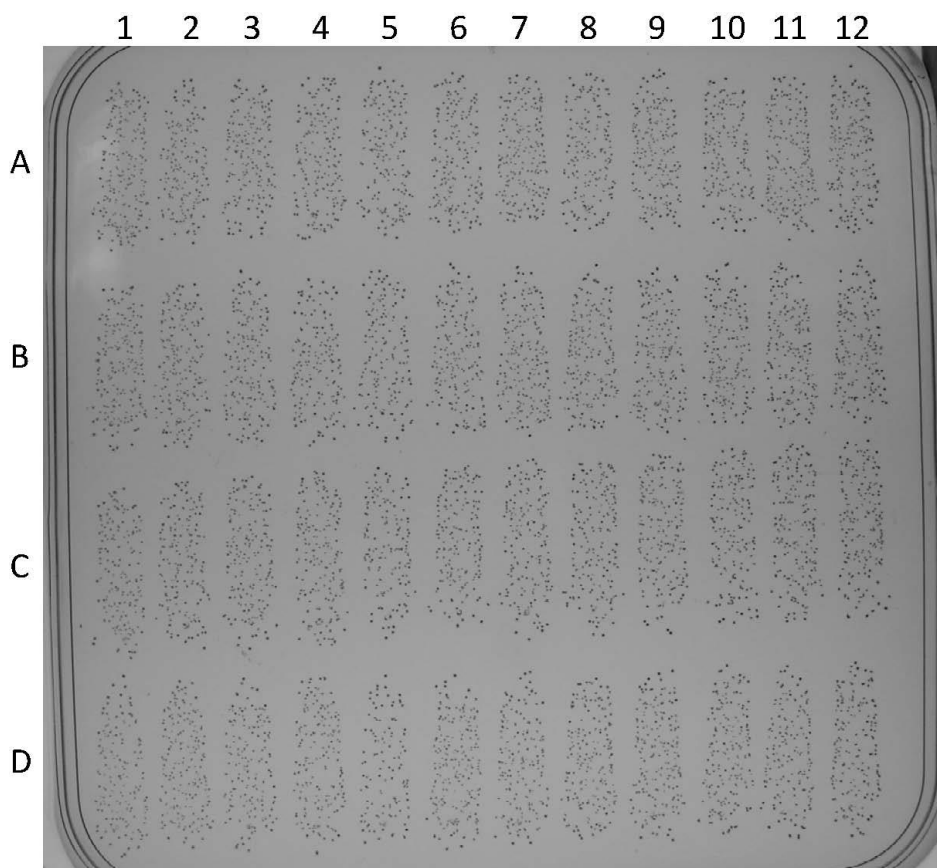
Control A	Contains bacteria + complement (HI) + HL60, t=75 minutes	Used to calculate non-specific killing.
Control B	Contains bacteria + complement + HL60, t=75 minutes	Used to calculate maximum CFU/spot in assay conditions. Used to calculate non-specific killing.

6. 准备分化的 HL60 细胞：
 - a. 将 DMF 分化的 HL-60 细胞（分化 5~6 天），从培养瓶（5 瓶足够用于 7 个平板）中转入 50 ml 离心管中。
 - b. 离心 HL60 细胞，~350g，室温下 5 分钟。
 - c. 弃上清，将细胞悬浮于 50 ml 1×HBSS（不含钙、镁离子）中。室温下离心 5 分钟，350g。
 - d. 弃上清，将细胞悬浮于 50 ml 1×HBSS（含钙、镁离子）中。室温下离心 5 分钟，350g。
 - e. 弃上清，将细胞以 1×10^7 的浓度重悬于 OBB 中（存放于室温直至使用）。按照“细胞计数”程序部分进行活细胞计数。
 - f. 细胞计数时，用台盼兰排除法检测活细胞。记录活细胞数和死细胞数，活细胞比例必须 $\geq 90\%$ ，才可用于实验。

7. 快速解冻四株冻存的工作菌种及洗菌：
 - a. 在 37°C 水浴轻轻转动菌种管直至溶解。
 - b. 在离心机中 12,000g 离心 2 分钟。
 - c. 小心除去上清。
 - d. 在试管中加入 1 ml OBB，混匀。
 - e. 在离心机中 12,000g 离心 2 分钟。
 - f. 小心去除上清。
 - g. 加入 OBB（如 0.5 ml）还原原体积，混匀。

8. 将每株菌取一定的体积（使用以前计算好的稀释倍数），加入 10 ml OBB 中（使每株菌的浓度约为 50,000 CFU/ml），混匀；在每孔中加入 10 μ l 混合细菌，包括所有的对照孔。
9. 将 96 孔 U 型底组织培养板放在小型振荡器上，室温振荡 30 分钟（700 rpm）。
10. 在这期间，从冰箱中取出需要量的补体（~0.2 ml 热灭活补体和 ~8 ml 活性补体）。在室温下融化（一旦融化，立即将其置于冰上待用）。

11. 在 96 孔 U 型底组织培养板 30 分钟反应完成后, 接着准备 HL60/灭活补体混合物: 将 0.4 ml HL60 细胞悬液与 0.1 ml 灭活补体混合。在 A 板第一列的所有孔中加 50 μ l 这种含有热灭活补体的混合物。
12. 准备 HL60/活性补体混合物: 将 30.4 ml HL60 细胞和 7.6 ml 补体混合。在 A 板除第一列之外及其它板的每孔中加 50 μ l 这种含有活性补体混合物。
13. 将 96 孔 U 型底组织培养板单层放在小型振荡器上, 在 37°C, 5%CO₂ 条件下, 700 rpm, 孵育 45 分钟。不要叠放 96 孔 U 型底组织培养板板。在这一步孵育过程中为了保持 CO₂ 的浓度, 不要开启孵箱门。
14. 孵育之后, 将板冰浴 20 分钟, 以终止吞噬反应。
15. 从每个孔中分别取 10 μ l 反应混合物, 加到 4 个 THYA 平板。从 H 行开始, 用排枪混匀, 从该行 12 孔中, 每孔取 10 μ l 反应混合物, 在 THYA 平板第一行 (底部) 点种菌液, **立即倾斜平板, 使液体成为流成一条, ~2-3 cm; G、F 和 E 行, 类推 (每个平板上 48 个点)。必须立即倾斜平板以防止液滴流到一起。D、C、B 和 A 行, 点在另外 4 个平板上。**
16. 完成点种菌液后, 在室温孵育 10~20 分钟, 让菌液吸收到琼脂板上 (注释 7)。
17. 从水浴中取出第一瓶 350 ml 覆盖层培养基, 加入 350 μ l TTC 和 350 μ l optochin 储存液, 混匀, 取 25 ml 加到每套 4 个平板中的第一块上面, 应该有 14 块平板加这种覆盖层培养基。
18. 从水浴中取出第二瓶 350 ml 覆盖层培养基, 加入 350 μ l TTC 和 350 μ l streptomycin 储存液, 混匀, 取 25 ml 加到每套 4 个平板中的第二块上面, 应该有 14 块平板加这种覆盖层培养基。
19. 从水浴中取出第三瓶 350 ml 覆盖层培养基, 加入 350 μ l TTC 和 350 μ l spectinomycin 储存液, 混匀, 取 25 ml 加到每套 4 个平板中的第三块上面, 应该有 14 块平板加这种覆盖层培养基。
20. 从水浴中取出第四瓶 350 ml 覆盖层培养基, 加入 350 μ l TTC 和 350 μ l trimethoprim 储存液, 混匀, 取 25 ml 加到每套 4 个平板中的第四块上面, 应该有 14 块平板加这种覆盖层培养基。
21. 将平板在室温放置 20 分钟, 上层琼脂凝固后, 将平板反过来放置, 在烛缸中 37°C 孵育 16~18 小时 (注释 13)。在有 optochin 覆盖层平板上生长的菌落为 optochin 抗性菌株, 在有 streptomycin 覆盖层平板上生长的菌落为 streptomycin 抗性菌株, 类推。
22. 过夜培养之后, 板子上的菌落应该如下图所示:



23. 使用自动计数仪器或人工计数菌落数目（注释 11 中的菌落计数选择）。
24. 数据分析之后，THYA 板灭菌处理。

题目：数据资料

修改历史：2008 年 2 月 1 日； 2011 年 11 月 1 日

7. 数据处理

A. 数据转换

调理指数可以以期望的杀菌百分数（通常 50%）为计算标准，对血清稀释倍数进行线性内插入方法计算，分析模板“Opsotiter 3”（注释 18）。

由于每个型别的细菌在对照 B 中的菌落数不同，所以每个型别的细菌分开分析。当分析结束时，应该有 4 个文件（每个血清型一个）。

1. 打开分析模板“Opsotiter 3”。
2. 选择模板中的“RawData”工作单。
3. 输入实验信息（黄色格是必需填写内容）。
4. 输入菌落计数原始数据，注意对照 A 和 B 的位置。这一步可以由拷贝和粘贴功能完成。如果从另一文件电子粘贴，必须保证格式一致。
5. 输入相应的实验信息到表中。
6. 对实验参数做出必要改变。通常不要经常变动。

7. 输入样品信息（名称和预稀释倍数）。
8. 保存文件，打印出“RawData”和“Report”页。所有文件，存在安全、备份地方。
9. 在分析另一个文件时，重新打开模板。不要以分析过的一个文件为模板，分析另一个文件。
10. 将数据交由实验监督员审阅，决定需要重复的样品（注释 16）。

B. 实验结果可接受的标准

如果符合以下的标准，那么整个实验中得到的数据是可靠的（注意：单个样品的数据满足以下条件才可以接受）：

1. 没有微小菌落的存在。微小菌落是指比正常细菌克隆小 5-10 倍的细菌，它的出现通常是对抗生素不完全敏感的指示。
2. 每点上菌落数目在 80 和 150 之间。
3. 所有血清型的非特异杀菌 ≤ 70%。
4. 质控血清的滴度应该在可接受的范围之内（均值 ± 2SD）。如果三个质控血清中，有两个在范围之内，那么实验数据就是可接受的。

C. 单个样品数据的可接受标准

单个血清样本，如果以上和以下所有的标准都能够符合的话，OI 是可接受的。

1. 没有测到杀菌物质（如抗生素）。
2. 根据实验室监督员的判断，实验的双孔精确度可以接受。
3. 样品杀菌曲线正常。我们目前正在确定规则和不规则曲线的定义。见注释 16 临时方案。

题目：实验注释

修改历史：2008 年 2 月 1 日；2008 年 6 月 23 日；2011 年 11 月 1 日；2012 年 9 月 20 日

8. 实验注释

注释 1：乳兔补体和/或 HL60 细胞都会影响存活细菌的数量。因此，在确定用于 OPKA 的每株工作菌种的稀释倍数时，在体系中应该加入补体和细胞。

注释 2：UAB-MOPA 方法的简要描述

血清	20 μl	未稀释或预稀释
细菌	10 μl	共 2000 CFU/孔 (每个血清型 500 CFU/孔 × 4 个血清型)
HL60 细胞/补体 (4:1 混合)	50 μl	400,000 HL60 细胞/孔，补体终浓度 12.5%
终体积	80 μl	

注释 3：TTC 加热后会变红，不要在高压灭菌前加入或用微波炉再融。在向覆盖层培养基中加入 TTC 时，要待其冷却到 ~50°C。

注释 4：干燥 THYA 平板的时间非常重要。尽管干燥所需时间根据空气温度、湿度不同而异（我们实验室一般是 ~21°C，70% 湿度），一般 30~60 分钟足够。干燥不足的平板会

在点菌点的周围产生过多的菌落，影响菌落的计数；过于干燥的平板会在点种菌液后倾斜平板时液滴流到一起。

注释 5：尽可能多的移去冷冻培养基中的 DMSO 非常重要，因为 DMSO 会引起 HL60 细胞分化。

注释 6：CO₂ 浓度维持在 5% 非常重要，因为 HL60 细胞对 CO₂ 浓度的微小的变化都敏感。建议定期用外源仪器设备检查 CO₂ 浓度。另外，适当的湿度也重要，应确保培养箱内的水位维持厂商说明的水平。

注释 7：通常，为使多余液体吸收，平板放在工作台上，暴露于室内空气中。但是，如果发生严重污染（例如，空气质量差造成），平板应放于超净工作台；这种情况下，吸收时间应当缩短。

注释 8：血平皿可能也会用到。如果用血平皿，不要加覆盖层。

注释 9：按如下修改，这个操作方法可用于单一血清型实验：

- a. 单一血清型实验，细菌稀释到~100,000 CFU/ml（UAB-MOPA，细菌稀释至~50,000 CFU/ml）。向每孔中加入 10 μl 稀释的细菌，从而使效应细胞：菌靶的比率为 400：1（UAB-MOPA 用的是 200：1）。
- b. 实验完成时，将终反应液取 5 μl 加到一个 THYA 平板上（UAB-MOPA，分别取 10 μl 加 4 块平板）。
- c. 因为只有一种血清型，不需要抗生素，所以覆盖层中不用加抗生素（TTC 仍旧加）。

注释 10：肺炎链球菌是一种人类病原菌，必须在生物安全 2 级（BSL2）条件下操作。所有接触细菌的物品均视为有生物危害性，应当按当地规定进行处理。

注释 11：可以将 THYA 平板用数字相机拍照或者扫描，将图片电子邮寄给有菌落计数软件的相关人员（参考文献 6）。我们与美国国家标准技术研究所合作开发出一种利用数字影像计数菌落的软件，该软件为“NICE”。，可以通过 Email 获得使用软件的细节。

注释 12：其它的实验模式包括稀释 11 次血清，不同的系列稀释倍数（例如 2 倍代替 3 倍），或者 8 倍敏感度。更多信息可以从 www.vaccine.uab.edu 获得。

注释 13：我们用 10 加仑的玻璃鱼缸作为蜡烛罐。将平板放入缸内，点燃蜡烛，用铝膜盖住缸口，用胶带紧紧封住。为了保证一致、合适的生长，缸内放置物不要超过 50% 的容量。

注释 14：使用高压对 THY 液体培养基灭菌，得到培养基的质量不一致，所以推荐用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌。

注释 15：由于不同的抗体克隆以及同一克隆的不同批次可能产生不同的结果，所以最佳抗体浓度应当由使用者确定。提供的浓度是克隆和批次特异的。

注释 16：单独样品临时接受标准：

标准曲线

目前标准曲线的最佳定义是一条 S 型杀菌曲线，以下任何一种都不是标准曲线。

U 曲线

呈现 U 型杀菌曲线的样品，其最大杀菌率在 40%-70%（包括 40% 和 70%）之间的，需要复试。如果第二次数据和第一次数据吻合，则采用第一次数据；如果第二次数据和第一次数据的差距超出 3 倍以上，需要进行第三次测定；如果第三次数据和第一次数据相吻合（3 倍以内），或者和第二次数据相吻合，则分别采用第一次或第二次数据。如果第三次数据和第一，二次数据都不吻合，那么 OI 将标记为“TND”。

N 曲线

呈现 N 型杀菌曲线的样品，其右侧滴度的最大杀菌率在 40%-70% 之间的，需要复试。如果第二次数据和第一次数据吻合，则采用第一次数据；如果第二次数据和第一次数据的差距超出 3 倍以上，需要进行第三次测定；如果第三次数据和第一次数据相吻合（3 倍以内），或者和第二次数据相吻合，则分别采用第一次或第二次数据。如果第三次数据和第一，二次数据都不吻合，那么 OI 将标记为“TND”。

无关数据

在 UAB-MOPA 中，经常会有一个样品仅仅需要为细菌组内一个血清型复试。有时，我们可以根据样品需测的血清型，重新组合细菌进行测定。尽管这样，我们大部分时间会得到血清型并不需要复试的数据。在这种情况下，根据上面的原则处理（第一次，第二次，第三次，等等）。

注释 17：巴比妥是 4 类控制药物，需要处方。巴比妥应当在安全区域室温保存。

注释 18：“Opsotiter 3”以 Excel®为基础，用于分析调理吞噬杀菌实验结果，特别是遵循 UAB MOPA 操作规范的实验结果。菌落计数结果粘贴到“Opsotiter 3”中之后，“Opsotiter 3”采用线性回归曲线内插入法，推算 50% 杀菌的血清稀释度，作为样品的调理指数。“Opsotiter 3”将样品的调理指数和其它输入实验信息表格化成简单报告，以助于管理实验信息。“Opsotiter 3”也能产生样品剂量反应曲线。

注释 19：我们发现奥普托辛的活性在不同批次之间有差异。因此，每一个新批次都要检测其效果，并调整相应的用量。在使用 1/2 实验浓度时，应该杀死敏感菌株，使用 2 倍实验浓度时对抗性菌株无影响。根据我们的经验，使用的浓度从 2 mg/L 到 8 mg/L。由于奥普托辛在水中 8 mg/ml 时都是可溶的，所以能够准备 1000x 的溶液。如果要获得更多的信息，请访问 <http://www.vaccine.uab.edu/optochin.pdf>。

题目：参考文献

修改历史：2008 年 2 月 1 日； 2013 年 8 月 1 日

9. 参考文献

- 1) Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, and Nahm MH. Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. Clin. Vacc. Immuno. 2006 Feb; 13(2):165-169.

- 2) Kim KH, Yu J, Nahm MH. Efficiency of a pneumococcal opsonophagocytic killing assay improved by multiplexing and by coloring colonies. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003 Jul; 10(4):616-21.
- 3) Burton RL and Nahm MH. Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (UAB-MOPA) for pneumococcal antibodies. Clin. Vacc. Immuno. 2006 Sep; 13(9):1001-1009.
- 4) Fleck RA, Romero-Steiner S, and Nahm MH. Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2005 Jan; 12(1):19-27.
- 5) Romero-Steiner S, et al. Multilaboratory evaluation of a viability assay for measurement of opsonophagocytic antibodies specific to the capsular polysaccharides of streptococcus pneumoniae. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003 Nov ; 10(6) :1019-1024.
- 6) Putman M, Burton RL, and Nahm MH. Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit. J. Immunol. Meth. 2005 July ; 302(1-2):99-102.
- 7) Burton RL, and Nahm MH. Development of a fourfold multiplexed opsonophagocytosis assay for pneumococcal antibodies against additional serotypes and discovery of serological subtypes in Streptococcus pneumoniae serotype 20. Clin Vaccine Immunol 2012;19:835-41.

题目：实验材料

修改历史：2008年2月1日； 2012年9月20日； 2013年8月1日

10. 材料、试剂、溶液和设备

下面所列的内容中是在 UAB 使用厂家和目录号。其它厂家的产品也可能适用，但没有在 UAB 试过。

A. 塑料用具和玻璃用具

名称	厂家	目录号
Tissue culture flask, vent cap(T150, 150 cm ²)	Falcon	355000
Microtiter plate (round bottom,tissue culture treated, for UAB-MOPA protocol)	CoStar	3799
Microtiter plate (ELISA plate, flatbottom, for CH50 assay)	CoStar	9017
Square Petri dish (100×15 cm)	Nunc	4021
Sterile reagent reservoir	CosStar	4870
Cryovial (2 ml, self standing)	VWR	66008-284
Microcentrifuge tubes (1.5 ml)	Fisher	05-406-16
Centrifuge tubes (50 ml)	Fisher	05-539-6

Centrifuge tubes (15 ml)	Corning	430790
Pipets (50 ml)	Falcon	357550
Pipets (25 ml)	Falcon	357535
Pipets (10 ml)	Falcon	357551
Pipets (5 ml)	Falcon	357543
Filter, 0.22 micrometer, syringe top	Millipore	SLGP033RS
Assorted pipet tips	Any	Any
Cotton-tipped applicators	General Medical Corp	24-806-25
Inoculation loops, disposable	Nunc	254437
Filter, 0.2 micrometer, bottle top	Millipore	SCGPT05RE
Glass bottles (1L, 500 ml, 250 ml, 100 ml)	Any	Any
Fiberboard boxes for freezing (2 inch)	Fisher	11-678-24A

B. 溶液和试剂

名称	厂家	目录号
Penicillin/Streptomycin stock (100×)	Invitrogen	15140-148
GlutaMax-1 (100X)	Invitrogen	35050-061
RPMI 1640	CellGro	MT 10-040-CM
Bovine Serum (Fetalclone I, for HL60 cells)	HyClone	SH30080.03
Fetal Bovine Serum (defined FBS, for OBB)	HyClone	SH30070.03
10× HBSS (without Ca, Mg, phenol red)	Invitrogen	14185-052
10× HBSS (with Ca and Mg, without phenol red)	Invitrogen	14065-056
Baby Rabbit Complement (3-4week, see complement section for lot acceptance criteria)	Pel-freez Biologicals (Rogers, AR, USA)	31061
Sheep blood (in alsevers solution)	Colorado Serum Company	CS1113

C. 细菌培养基

名称	厂家	目录号
Todd Hewitt Broth	Becton-Dickinson	249240
Yeast Extract	Becton-Dickinson	212750
Bacto Agar	Becton-Dickinson	214010
Blood Agar Plates	Remel	1202

D. 化学试剂

名称	厂家	目录号
Gelatin	Sigma	G-9391
Glycerol	Sigma	G-7893
N,N-dimethylformamide (DMF)	Fisher	D131-1
2,3,5,-triphenyltetrazolium chloride(TTC)	Sigma	T-8877
Streptomycin sulfate	Sigma	S-6501
Optochin (Ethylhydrocupreine HCl)	Sigma	E-9876
Spectinomycin	Sigma	S-9007
Trimethoprim	Sigma	T-7883
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma	D-2650
Sodium azide	Sigma	S-2002
Calcium chloride	Sigma	C-4901
Magnesium chloride, 1M solution	Fluka	63020
Sodium chloride	Fisher	S271
Barbital sodium C-IV (see Note 17)	Sigma	B-0500
Hemolysin	Sigma	S-1389
Hydrochloric acid	Fisher	A144
Trypan blue solution (0.4%)	Sigma	T-8154

E. 设备和软件

名称	厂家	目录号
Assorted pipettors	Any	Any
Mini-orbital shaker (with rpm display, you will need two: one at room temperature and one at 37°C with 5% CO ₂)	Bellco Biotechnology	7644-20115
CO ₂ incubator, 37°C, 5% CO ₂)	Thermo-Fisher	13-255-25
Water bath (56°C)	Any	Any
Water bath (50°C)	Any	Any
Water bath (37°C)	Any	Any
Microwave oven (1.65 kW)	General Electric Model	JES1358WJ01
Controlled-rate freezer	Thermo Forma	Cryomed Systems
Cryobiological storage system	hermo Forma	T8031
Water purification system	Millipore	Synergy 185
Laminar flow hood (biological safety cabinet)	Any	Any
Colony counter and software	Synbiosis	ProtoCOL
Calculation programs	www.vaccine.uab.edu	
Autoclave	Any	Any
Computer (PC) with MS Excel®	Any	Any
Microplate reader (with 405 nm filter)	Bio-Tek Instruments	ELx808
Spectrophotometer (with 541 nm filter)	Bio-Rad	Smart Spec

Centrifuge (with 15-ml and 50-ml tube adaptors)	Kendro	RT7 Plus
Flow cytometer (with Cell Quest)	Becton Dickinson	FACS Caliber
Flow cytometry analysis software	DeNovo Software	FCS Express

F. 细胞系

名称	厂家	目录号
HL60 cell line	ATCC	CCL-240

G. 细菌

名称	厂家	目录号
R36A(用于抗生素检测)	ATCC	27336

UAB-MOPA 中所用到的靶细菌来源于 BEI (www.beiresources.org)

BEI Catalog #	Strain Name	Description	Reference
NR-13388	SPEC1	Spectinomycin resistant variant of L82006 (serotype 1)	2
NR-31700	STREP2	Streptomycin resistant variant of DBL2 (serotype 2)	7
NR-13389	OREP3	Optochin resistant variant of Wu2 (serotype 3)	2
NR-13390	OREP4	Optochin resistant variant of DS2382-94 (serotype 4)	2
NR-13391	STREP5	Streptomycin resistant variant of DBL5 (serotype 5)	2
NR-13392	TREP6A	Trimethoprim resistant variant of EF6796 (serotype 6A)	2
NR-13393	SPEC6B	Spectinomycin resistant variant of BG25-9 (serotype 6B)	2
NR-20805	SPEC6C	Spectinomycin resistant variant of BGO-2197 (serotype 6C)	7
NR-20806	SPEC6D	Spectinomycin resistant variant of MNZ920 (serotype 6D)	7
NR-13394	OREP7F	Optochin resistant variant of DS2617-97 (serotype 7F)	2
NR-31701	STREP8	Streptomycin resistant variant of DS5675-06 (serotype 8)	7
NR-31702	SPEC9N	Spectinomycin resistant variant of DS1398-00 (serotype 9N)	7
NR-13395	EMC9V	Streptomycin resistant variant of 1081748 (serotype 9V)	2
NR-31703	OREP10A	Optochin resistant variant of DS3032-06 (serotype 10A)	7
NR-31705	TREP11A	Trimethoprim resistant variant of DS3160-06 (serotype 11A)	7
NR-31704	TREP12F	Trimethoprim resistant variant of DS4031-06 (serotype 12F)	7
NR-13396	STREP14	Streptomycin resistant variant of DS2214-94 (serotype 14)	2
NR-33666	TREP15B	Trimethoprim resistant variant of DS0556-97 (serotype 15B)	7
NR-31706	OREP17F	Optochin resistant variant of DS3022-06 (serotype 17F)	7
NR-13397	OREP18C	Optochin resistant variant of GP116 (serotype 18C)	2
NR-13398	TREP19A	Trimethoprim resistant variant of DS3519-97 (serotype 19A)	2
NR-13399	SPEC19F	Spectinomycin resistant variant of 2217-94 (serotype 19F)	2
NR-33664	SPEC20B	Spectinomycin resistant variant of DS3014-06 (serotype 20B)	7
NR-31707	TREP22F	Trimethoprim resistant variant of DS3433-06 (serotype 22F)	7
NR-13400	EMC23F	Clinical isolate (1212458), naturally resistant to trimethoprim (serotype 23F)	2

NR-33665	STREP33F	Streptomycin resistant variant of DS3052-06 (serotype 33F)	7
----------	----------	--	---

H. 流式试剂

名称	厂家	目录号
Anti-human CD11b PE	BDIS	555388
Anti-human CD35 PE	BDIS	559872
Anti-human CD71 PE	BDIS	555537
IgG1 PE Isotype	BDIS	556650
IgG2a PE Isotype	BDIS	555574
Propidium Iodide Solution	Sigma	P4864
Annexin V FITC	BD Pharmingen	51-65874X
10× Annexin V Binding Buffer	BD Pharminge	51-66121E
Microtiter plate (V-bottom)	Nunc	249570
FACS tubes	Falcon	352008

I. 溶液配方

- 水
配制试剂所用的水必需是超纯水。
- CM1 (HL60 细胞增殖用)

RPMI1640	1000 ml
FetalClone I FBS (56°C加热 30 分钟)	114 ml
GlutaMax-1	11.4 ml
Penicillin/streptomycin	11.4 ml
- CM2 (HL60 细胞分化用)

RPMI 1640	1000 ml
FetalClone I FBS (56°C加热 30 分钟)	114 ml
GlutaMax-1	11.4 ml
DMF	9.1 ml

不要加 **Penicillin/streptomycin**
- CM3 (复苏 HL60 冻存细胞用)

RPMI 1640	1000 ml
FetalClone I FBS (56°C加热 30 分钟)	256 ml
GlutaMax-1	12.8 ml
Penicillin/streptomysisn	12.8 ml
- Todd-Hewitt-Yeast broth (THYB)

Todd-Hewitt	30 g
Yeast extract	5 g
H ₂ O	1000 ml

用 0.22 μm 的滤膜除菌过滤后, 保存于 4°C, 见注释 14。
- Todd-Hewitt-Yeast extract agar plate (THYA 平板)

Todd-Hewitt	12 g
-------------	------

- | | | |
|------------------|--------|--|
| Yeast extract | 2 g | |
| Bacto agar | 6 g | |
| H ₂ O | 400 ml | |
- 高压灭菌，冷却至 56°C。在水平台面上，用 25 ml 吸管分装，吸 25 ml 加到平板上（12 cm×12 cm），RT 下放置 20 分钟。平板放于密封的塑料袋中，4°C 可保存一个月。
7. Overlay agar（上层琼脂）
- | | | |
|------------------|--------|--|
| Todd-Hewitt | 24 g | |
| Yeast extract | 4 g | |
| Agar | 6 g | |
| H ₂ O | 800 ml | |
- 高压灭菌，室温保存；或者，在实验当天准备，高压灭菌，保存于 50°C 水浴中（在水浴中至少 1-2 小时，确保温度至 50°C）。
8. TTC stock（TTC 贮存液）
- | | | |
|------------------|--------|------------|
| | 1000× | [25 mg/ml] |
| TTC | 1.25 g | |
| H ₂ O | 40 ml | |
| 补水至 | 50 ml | |
- 用 0.22 μm 滤膜除菌过滤后，保存于 4°C。溶液呈淡黄色；若颜色变红，废弃，重新准备。TTC 使菌落变红容易计数。
9. Streptomycin stock（链霉素贮存液）
- | | | |
|------------------|-------|-------------|
| | 1000× | [300 mg/ml] |
| Streptomycin | 3 g | |
| H ₂ O | 5 ml | |
| 补水至 | 10 ml | |
- 用 0.22 μm 滤膜除菌过滤，分装 1 ml/管，-20°C 可保存 3 个月。
10. Optochin stock
- | | | |
|------------------|-------|-----------|
| | 1000× | [8 mg/ml] |
| Optochin | 80 mg | |
| H ₂ O | 5 ml | |
| 补水至 | 10 ml | |
- 用 0.22 μm 滤膜除菌过滤，分装 1 ml/管，-20°C 可保存 3 个月。
11. Trimetheprim stock
- | | | |
|--------------|--------|------------|
| | 1000× | [25 mg/ml] |
| Trimetheprim | 250 mg | |
| DMSO | 5 ml | |
| 补 DMSO 至 | 10 ml | |
- 分装 1 ml/管，-20°C 可保存 3 个月。
12. Spectinomycin stock
- | | | |
|---------------|-------|-------------|
| | 1000× | [300 mg/ml] |
| Spectinomycin | 3 g | |
| DMSO | 5 ml | |
| 补 DMSO 至 | 10 ml | |
- 分装 1 ml/管，-20°C 可保存 3 个月。
13. 1% 灭菌明胶溶液
- | | | |
|------------------|--------|--|
| 明胶 | 1 g | |
| H ₂ O | 100 ml | |

高压灭菌，室温保存。

14. 80% (大约) 甘油

甘油 100 g
H₂O 20 ml

15. Opsonization Buffer B

灭菌 H₂O 80 ml
10×HBSS (with Ca²⁺, Mg²⁺) 10 ml
1% 明胶溶液 10 ml
Defined FBS (56°C 灭活 30 分钟) 5.3 ml
现配现用，仅用 1 天。

16. 1×HBSS (Hanks' 平衡盐溶液)

灭菌 H₂O 450 ml
10×HBSS (with Ca²⁺, Mg²⁺) 50 ml

17. 10% NaN₃ (10% 叠氮钠)

H₂O 40 ml
NaN₃ 5 g
完全溶解后，加水至 50 ml。

18. 10×PBS (含叠氮钠)

在 800 ml 水中，加入下表所列试剂。试剂完全溶化后，加水调至 1L。PBS 仅用于 FACS。因为含有叠氮钠，所以不要用于细菌培养。

试剂	重量 (克)
NaCl	80.00
KH ₂ PO ₄	3.14
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	20.61
KCl	1.60
NaN ₃	10.00

19. 1×PBS (含叠氮钠)

加 100 ml 10×PBS (含叠氮钠) 到 900 ml 水中。

20. FACS buffer (含叠氮钠)

加 100 ml 10×PBS (含叠氮钠) 和 30 ml FBS (热灭活)，到 870 ml 水中。

21. CaCl₂ (0.3M)

H₂O 40 ml
CaCl₂ 1.66 g
完全溶解后，加水至 50 ml。

22. NaCl (0.9%)

H₂O 200 ml
NaCl 2.25 g

完全溶解后定容至 250 ml。

23. 5×明胶巴比妥缓冲液 (Gelatin veronal buffer GVB)

H ₂ O	750 ml
NaCl	41.5 g
Barbital sodium C-IV	5.1 g
gelatin	5 g

用磁力搅拌器，在 90°C 下搅拌。所有的试剂溶解以后 (~30-60 分钟)，取下来，加入 2 ml 10% NaN₃，1 ml 0.3M CaCl₂，2 ml 1M Mg Cl₂。当溶液冷却至室温后，混匀，并测定 PH 值，应该是在 ~9，用 6M HCl 调 PH 至 7.35 ± 0.05 (大概用 2.5 ml)。加水至 1L。室温下可贮存一个月。

11. 细胞计数

1. 准备 5× 稀释的样品：将 40 μl 台盼蓝与 10 μl 样品混合。
2. 将样品加在血细胞计数板上的一个计数池中，样品通过毛细管作用充满整个计数池。不要加过量。
3. 数活细胞 (不被台盼兰着色的细胞) 的数目和非活细胞 (吞噬了台盼兰染料的细胞) 的数目，计数四个角的四个大格和中间的一个大格 (在血细胞计数板上一共有 9 个大格)。细胞数目记在实验记录上。
4. 计算细胞浓度：细胞数目/ml = 所有 5 个格的细胞数目 × 10⁴。