

供医学及生物学相关学科本科生及研究生使用

常用免疫学实验技术

主编 柳忠辉 邵启祥

常用免疫学实验技术

Changyong Mianyixue Shiyān Jishu

供医学及生物学相关学科本科生及研究生使用

主 编 柳忠辉 邵启祥

副主编 李 一 夏 圣 周 洪 崔雪玲

编 者 (按姓氏笔画排序)

王铁楠 (吉林大学第一医院)

台桂香 (吉林大学白求恩医学院)

齐 妍 (吉林大学白求恩医学院)

李 一 (吉林大学白求恩医学院)

杨 巍 (吉林大学白求恩医学院)

张学军 (天津医科大学)

周 洪 (南京医科大学)

施冬艳 (南京医科大学)

夏 圣 (江苏大学基础医学院)

崔雪玲 (吉林大学白求恩医学院)

付海英 (吉林大学白求恩医学院)

刘永茂 (吉林大学白求恩医学院)

闫东梅 (吉林大学白求恩医学院)

李 楠 (吉林大学白求恩医学院)

杨晓帆 (南京医科大学)

邵启祥 (江苏大学基础医学院)

柳忠辉 (吉林大学白求恩医学院)

袁红艳 (吉林大学白求恩医学院)

倪维华 (吉林大学白求恩医学院)



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

内容简介

本书秉承科学性与实用性特点,吸纳新的免疫学技术,使该书更能适应现代免疫学实验技术教学与科学研究。本书兼顾了广泛应用的免疫学基本技术,融入了近年出现的新技术、新方法,包括16章及附录,第一至七章重点叙述抗体技术及其应用,第八至十六章讲述细胞免疫学技术,附录列举了免疫学常用试剂的配制。本书在讲述实验原理和实验流程的同时,分别列举了各类典型实验,书中还重点阐述了每种实验技术的问题及解决方法。本书集免疫学实验技术教学的实用性和科学性于一体,既适合医学专业本科生、研究生教学,也可作为参考书供免疫学研究的相关人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

常用免疫学实验技术 / 柳忠辉, 邵启祥主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2013. 3
ISBN 978-7-04-036952-6

I. ①常… II. ①柳… ②邵… III. ①医学-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(2013)第 029519 号

策划编辑 瞿德兹 责任编辑 瞿德兹 封面设计 李卫青 责任印制 毛斯璐

出版发行	高等教育出版社	咨询电话	400-810-0598
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	网 址	http://www.hep.edu.cn
邮政编码	100120		http://www.hep.com.cn
印 刷	国防工业出版社印刷厂	网上订购	http://www.landaco.com
开 本	787mm×1092mm 1/16		http://www.landaco.com.cn
印 张	10.5		
字 数	240 千字	版 次	2013 年 3 月第 1 版
插 页	1	印 次	2013 年 3 月第 1 次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	19.60 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 36952-00

前 言

由于现代免疫学技术的快速发展,使人们很难在短时间内掌握和运用相应的免疫学技术。因此,一本好的实验教程,不仅要阐述实验原理的基本理论知识、介绍实验操作流程,更要具有举一反三的实用性及指导实验研究的作用。本次教材编写,不仅吸纳了新的免疫学技术内容、新的实验方法,更具有举一反三的实用性及科学性等特点,使得本书不仅适合学生学习免疫学实验技术需要,更可以作为一本参考书供研究者使用。本书的编者均工作在科研与教学一线,每个实验内容书写时都结合了作者自身的经验和体会,不仅讲述了基本的实验过程,更详细阐明了每个实验的影响因素,在不同条件下如何改进实验方法,提出了实验中可能出现的问题及解决策略,尽可能使每个实验都具有可操作性及指导性。因此,本书既适合医学专业本科生、研究生教学,也可供免疫学研究者作为参考书。

由于编写时间仓促,作者在书写、语言和见解上的差异,本书存在问题在所难免,希望广大读者在使用中提出宝贵意见,并对不足之处给予批评指正。最后,编者对给予本书支持的吉林大学研究生院表示衷心的感谢。



2012 年 12 月于长春

目 录

第一章 抗体制备	1
第一节 多克隆抗体制备	1
第二节 单克隆抗体制备	6
第二章 酶免疫测定技术	10
第三章 放射性标记技术	16
第一节 放射性同位素标记抗原	16
第二节 放射免疫分析技术	18
第三节 免疫放射分析	20
第四节 应用举例	21
第四章 经典免疫学检测技术	24
第一节 凝集反应	24
第二节 沉淀反应	27
第三节 补体测定	29
第四节 循环免疫复合物测定	31
第五章 抗原纯化与鉴定	33
第一节 抗原粗分离	33
第二节 抗原精制	34
第三节 抗原鉴定	41
第四节 应用举例	42

第六章 免疫印迹	45
第七章 免疫沉淀	54
第八章 免疫细胞化学技术	64
第一节 免疫细胞化学染色	64
第二节 应用举例	71
第九章 免疫细胞分离	73
第一节 外周血细胞分离	73
第二节 单核/巨噬细胞分离	77
第三节 淋巴细胞选择性分离	80
第四节 NK 细胞分离	83
第五节 中性粒细胞分离	85
第六节 树突状细胞分离	86
第十章 流式细胞术	88
第十一章 淋巴细胞转化试验	94
第十二章 细胞毒试验技术	98
第一节 NK 细胞活性测定	98
第二节 细胞毒性 T 细胞功能测定	101
第三节 补体依赖性细胞毒试验	102
第十三章 吞噬细胞功能测定	104
第一节 中性粒细胞吞噬功能测定	105
第二节 巨噬细胞吞噬功能测定	107
第十四章 细胞因子活性检测	111
第一节 IL-1 生物学活性检测	111
第二节 IL-2 生物学活性检测	114

第三节 IL-4 生物学活性检测	116
第四节 IL-8 生物学活性检测	118
第五节 IL-10 生物学活性检测	120
第六节 肿瘤坏死因子生物学活性检测	121
第七节 干扰素生物学活性检测	123
第十五章 ELISPOT 技术	126
第十六章 免疫细胞凋亡	131
第一节 细胞形态学检测法	131
第二节 寡核苷酸片段检测法	135
第三节 流式细胞术检测法	140
附录 常用试剂配制及应用	142
主要参考文献	156

第一章 抗体制备

抗体具有特异性识别抗原的能力，利用抗原抗体反应的特异性可以检测可溶性、细胞表面以及组织中的抗原。因此，抗原抗体检测技术的首要问题是如何获得特异性、高效价的抗体。根据抗体产生细胞情况，将抗体分为单克隆抗体及多克隆抗体，前者是由单一 B 细胞克隆产生的抗体，通常利用体外方法获得；后者是由多个 B 细胞克隆产生的抗体，可通过抗原免疫动物获得，故也称之为多克隆抗体血清。

第一节 多克隆抗体制备

一、动物免疫

1. 抗原 抗原种类繁多，常见的抗原有：①微生物抗原，如病毒、细菌、支原体、立克次体、螺旋体及真菌等；②组织抗原，来源于各种细胞产生的多肽、蛋白质以及多糖成分。根据其存在形式又分为可溶性抗原以及颗粒性抗原，前者如血清白蛋白，后者如红细胞。可溶性抗原免疫时通常需要添加佐剂，而颗粒性抗原可以直接免疫。

(1) 抗原纯度：通常要达到亲和层析或十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS - PAGE) 纯，而为了获得特异性、高效价的抗体，免疫用抗原最好达到高效液相纯度 95% 以上。

(2) 抗原用量：抗原用量在一定范围内与抗体效价呈正相关，但抗原量过小、过大均可产生免疫耐受，因此，抗原用量直接关系到抗原免疫的成败。通常情况下，应用完全弗氏佐剂免疫动物时，蛋白质类抗原剂量以 1 mg/kg 体重左右为宜。

(3) 抗原的处理

① 颗粒性抗原，如细菌菌体、红细胞等可制备成悬液，直接免疫，菌体数以 1×10^{10} 个/mL 为适。

② 可溶性完全抗原 (蛋白质抗原)，需要与佐剂混合、乳化后免疫动物。抗原乳化方法有多种，如采用注射器研磨法，可取 2 支 5 mL 注射器，以双接头注射针头连接，反复推拉，混合至油包水状态，乳化完全的抗原滴在清水中不会扩散，可视为合格，用于免疫。

③ 半抗原 (多糖、多肽、激素、化学药品等)，不能直接免疫动物，需与载体偶联

后才能免疫动物，制备抗体。载体应不影响抗原检测，常用载体有钥孔血蓝蛋白（keyhole-limpet hemocyanin, KLH）、牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）、卵清蛋白（ovalbumin, OVA）；半抗原与载体常用偶联剂有戊二醛、过碘酸钠及碳化二亚胺（carbodiimide）等。载体蛋白以 KLH 最好，该蛋白不仅免疫效果好，而且与哺乳动物蛋白没有亲缘关系，不会引起免疫交叉反应。但 OVA 和 BSA 在实验室临时制备抗体时更常用。

* 注：碳化二亚胺法偶联半抗原与载体蛋白。

取 BSA 5 mg 与半抗原 5 mg 溶解在 0.5 mL 蒸馏水中，10 mg 碳化二亚胺也在 0.5 mL 蒸馏水中溶解，将上述溶解的液体混合，4℃避光搅拌过夜，生理盐水反复透析除去碳化二亚胺，即为偶联抗原，按每只家兔 250~500 μg 半抗原免疫。

2. 佐剂 是指与抗原一起免疫或预先给予，可以增强抗原免疫原性或改变抗原免疫应答类型的物质。佐剂种类繁多，但人用和动物免疫用佐剂不同，如人用佐剂有氢氧化铝、卡介苗（BCG）、短小棒状杆菌（CP）等，作用较为温和；而动物免疫常应用强效佐剂，如矿物油、脂质体及 CpG 寡核苷酸等。在制备动物免疫用抗原时，最常用的是弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂。弗氏完全佐剂主要含有羊毛脂、液状石蜡和灭活卡介菌，通常羊毛脂与液状石蜡比例为 1:2，也可用 1:1 等。卡介菌一般在临用时添加（2~4 mg/kg 体重）。佐剂与抗原常常等量混合，充分乳化后形成油包水型，再免疫动物。

3. 动物选择 根据需要抗体量选择动物，实验室常用的免疫动物主要有小鼠和兔。免疫动物的选择主要考虑以下几个方面。

（1）应选择与抗原亲缘关系远的动物，特别是在制备抗免疫球蛋白（Ig）抗体时。被免疫动物与抗原物质亲缘关系越远，免疫成功率越高，免疫应答越强，抗体产生水平也高。

（2）青壮年期的雄性动物更常用，发育成熟，健壮，生理状态良好。家兔初始免疫的体重通常在 2~2.5 kg，小鼠 18 g 左右为宜。

4. 免疫方法

（1）免疫途径：可采用肌内、皮内、皮下、静脉、腹腔和淋巴结注射等多种免疫方式，但以小剂量、多点、小鼠背部皮内或皮下免疫最为常见。颗粒性抗原（红细胞悬液、细菌悬液）可选择小鼠腹腔注射或尾静脉免疫。

（2）可溶性抗原免疫：可溶性蛋白抗原是较常用的免疫原，通常采用 3 次免疫法，即初次免疫后 3 周左右，进行加强免疫，再间隔 2 周左右加强免疫一次，一般于末次免疫后，小鼠眶静脉或家兔耳缘静脉采集少量血，分离血清，测定抗体效价，抗体效价达到预定后即可大量采集免疫动物血清。但抗体的效价直接与抗原性质有关，一般良好的蛋白质抗原，其血清效价都可以达到 1:6400。如果抗体效价过低，可追加 1~2 次免疫，如果此时仍不能达到采血的抗体效价要求，应该考虑更换动物重新免疫，或进行抗原修饰后重新免疫。

（3）颗粒性抗原免疫：根据研究目的确定免疫次数，如溶血空斑试验，只需 1 次免疫，而要达到高效价，则需多次免疫，如第 1 周小鼠腹腔注射 2 次，随后每周加强注射 1

次，加强免疫后 4~5 天采血，做凝集试验，抗血清效价 > 1:2 000，即可大量采集抗血清。

5. 免疫动物采血 动物加强免疫的第 5~7 天采血。如家兔，采血前禁食 12 h，但不禁水。采血时将动物仰卧固定，麻醉后切开皮肤、分离颈动脉，用 2 支止血钳夹住颈动脉（中间留约 5 cm），切开颈动脉直接放血（一只家兔可放血 100 mL 左右）。将采集的血液 37℃ 放置 1 h，再放 4℃ 过夜，可使血清充分析出。3 500 r/min 离心 15 min，血清分装 -80℃ 保存。抗体应避免反复冻融，效价可保持 2 年以上。

6. 多克隆抗体制备实例

（1）颗粒性抗原：采集雄性绵羊抗凝血（10% 枸橼酸钠 10 mL 可抗凝新鲜血液 100 mL），离心弃血浆，生理盐水洗红细胞 3~4 次，至无溶血为止。然后按表 1-1 配制稀释液。

表 1-1 红细胞浓度稀释与免疫次数

免疫次数	1	2	3	4	5	6	7
红细胞浓度	10%	20%	30%	40%	40%	40%	40%
剂量 (mL)	4	4.5	5.5	6.5	7	7	7

选择体重 2 kg 以上的健康家兔，采用兔耳静脉注射法免疫，前 5 次免疫间隔 48 h，后 2 次每日免疫 1 次，末次免疫后 5~6 天测血清抗体效价，当抗血清溶血效价达 1:2 000 以上即可采血，若低于 1:2 000，可再免疫 1~2 次。

（2）人 IgG 可溶性抗原：人 IgG（5 mg/mL）与弗氏完全佐剂按 1:1（V/V）混合、乳化，采用背部皮下多点注射（10 点以上）法，初次免疫抗原量 1 mg/只，3 周后免疫 1 次，再间隔 2 周加强免疫 1 次，末次免疫的第 5 天测血清抗体效价，达到 1:6 400 以上，即可采血。

二、抗体的纯化

免疫动物制备的多克隆抗体，因含有大量的杂蛋白质而影响抗体的应用，因此，要将有效的抗体进行纯化后使用。抗体纯化的方法主要包括常用的盐析法、凝胶柱层析、离子交换剂层析、免疫亲和层析等。下面主要介绍盐析法以及凝胶柱层析。

1. 盐析法 蛋白质由于相对分子质量和携带的电荷等不同，可在不同浓度的高盐液体内分级析出，根据这一原理，在免疫血清中加入不同浓度的硫酸铵，可使免疫球蛋白逐步析出，即可获得高纯度免疫球蛋白。

（1）试剂与材料

1) 饱和硫酸铵溶液：取 500 mL 蒸馏水，加入约 400 g 硫酸铵，水浴加热至 70℃，磁力搅拌器充分搅拌，直到加入的硫酸铵不再溶解，以氨水（也可用 NaOH）调至 pH 7.2，室温保存。

2) 0.9% 氯化钠溶液。

3) 磁力搅拌器, 500 mL 烧杯, 透析袋。

4) 兔抗人 IgG 免疫血清。

(2) 基本流程: 取免疫血清 10 mL, 加等量生理盐水稀释, 置磁力搅拌器上, 边搅拌边逐滴加入饱和硫酸铵溶液 20 mL, 至 50% 饱和硫酸铵浓度。4 ℃ 放置 1 h, 4 000 r/min, 4 ℃ 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀物加生理盐水 20 mL 溶解。再次加入饱和硫酸铵 10 mL, 至饱和硫酸铵浓度大于 33%, 4 000 r/min, 4 ℃ 离心 30 min, 弃上清液, 重复此步骤 2 次。最后将离心沉淀物加生理盐水 4 mL 溶解, 装入透析袋。

将盛装盐析物溶液的透析袋置入大烧杯中, 蒸馏水 4 ℃ 下透析 4 h, 换用生理盐水透析 48 h, 此过程应反复换液数次, 目的是除去 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 。也可采用葡聚糖 (sephadex) G25 层析除盐, 该法除盐较彻底、快速, 但抗体浓度将被稀释。

【关键点】

(1) 全部实验操作应避免在超过 20 ℃ 温度环境中进行, 最好在 4 ℃ 冷室中操作, 以防免疫球蛋白变性和降解。

(2) 磁力搅拌器搅拌血清时, 速度不宜过快, 以防产生多量泡沫影响饱和硫酸铵溶液的加入。

(3) 如果盐析的免疫球蛋白来源于小鼠, 饱和硫酸铵溶液的终浓度不宜低于 45%, 尤其是单克隆抗体纯化时, 饱和硫酸铵溶液终浓度以 50% 为宜, 过低会导致大量单克隆抗体 (IgG) 丧失。

2. 凝胶柱层析 凝胶本身是一种多孔网状结构分子筛, 其线性基质含多个羟基, 具有亲水性, 在交联剂作用下交联形成不溶于水的三维空间网络结构。蛋白质溶液流经凝胶柱时, 大分子蛋白质不能穿过凝胶网孔进入凝胶粒内部, 而留在凝胶粒间隙的溶液中, 随洗脱液最先流出。而小分子蛋白质则进入凝胶粒内部, 由于受到凝胶粒阻留, 流速较慢。故可根据蛋白质组分相对分子质量大小不同, 将蛋白质组分由大到小依次分离出来。

(1) 试剂及材料

1) 抗体样品: 经饱和硫酸铵沉淀、初步分离的 IgG。

2) 0.05 mol/L pH 8.0 磷酸缓冲液 (PB): 0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液 94.7 mL, 0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液 5.3 mL 混合后, 蒸馏水稀释至 400 mL。

3) 葡聚糖 G200 干胶 20 g。

4) 材料: 层析仪 1 套, 2.5 cm × 100 cm 层析柱, 1 000 mL 烧杯 2 个, 5 mL 吸量管 1 支, 8 mL 试管 100 支。

(2) 基本流程

1) 凝胶处理: 葡聚糖 G200 使用前应用水使其充分膨胀, 一般需要膨胀 72 h。为节约时间, 也可煮沸 2~4 h, 并重复漂洗 2~3 次。

2) 装柱: 柱内径和高度之比 1:20~1:50 之间的层析柱, 与蠕动泵、紫外监测仪相连, 并向柱内加入 1/3 高度的缓冲液, 将溶胀的葡聚糖 G200 凝胶用缓冲液调成糊状, 沿

柱内壁填充到柱内，待其部分自然沉降后，吸出部分上清，再加入凝胶，反复数次，直至凝胶距柱上口 6~8 cm，在凝胶上放一直径略小于内径的圆形滤纸片，使其平铺在凝胶柱面上。目的是防止加样或加缓冲液时破坏凝胶柱界面的平整，并能防止样品中的颗粒进入凝胶柱。按 0.2 mL/min 流速连续冲洗，使柱充分平衡后上样，葡聚糖 G200 一般需要平衡 4 h 以上。

3) 加样：吸去滤纸片上层缓冲液，加入 2 mL 经饱和硫酸铵沉淀的抗体样品，待样品完全进入层析凝胶柱后，再加满洗脱缓冲液。

4) 洗脱：用 0.05 mol/L pH 8.0 磷酸缓冲液，以 0.1 mL/min 速度洗脱，记录洗脱图谱，分步收集洗脱组分 (2 mL/管)。

5) 检测：收集的样品采用紫外分光光度计法检测蛋白含量，蛋白主峰为 IgG，可进一步检测 IgG 免疫学活性和纯度。

【关键点】

(1) 装柱过程切忌有气泡和断层，若有断层，需倾倒出，重新装柱。

(2) 加样时，注意缓冲液界面恰好在滤纸片上，及时加样，不能出现因放液过快，而使凝胶柱干涸现象，一旦如此则凝胶不能继续使用。

(3) 整个层析过程时间较长，要求在 4℃ 环境中操作，以防蛋白活性下降。

3. 应用举例——重组蛋白抗体制备

(1) 试剂及材料

1) 重组 BSA - 促肾上腺皮质激素 (ACTH) 肽。

2) 弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂。

3) A 蛋白亲和层析凝胶。

(2) 操作程序

BSA - ACTH 肽与弗氏完全佐剂等体积混合、充分乳化



家兔背部皮下多点免疫，每只家兔注射总抗原量合 BSA - ACTH 肽 300~500 μg



免疫 3 周后，取等量 BSA - ACTH 肽与弗氏不完全佐剂等体积乳化，加强免疫一次



间隔 2 周加强免疫一次



最后一次免疫的第 5 天，兔耳缘静脉采血。间接酶联免疫法 (ELISA) 测定抗体效价 >1:6 400，即可从兔颈动脉采集全部血液，分离血清



取 10 mL 抗血清，经 45%~50% 饱和硫酸铵沉淀 2 次，0.9% NaCl 溶液溶解抗体，再经盐水充分透析 48~72 h



取透析的抗体与 1 mL A 蛋白 4 ℃ 旋转混合 30 min



将凝胶移至微量柱上，20 倍柱床体积的 1 × PBS 充分洗涤 A 蛋白柱 *



4 倍柱床体积的 0.1 mol/L pH 2.4 甘氨酸 - HCl 缓冲液洗脱抗体，
每 10 滴（约 0.4 mL）收集 1 管，管内预先加入等体积 0.2 ~ 0.5 mol/L
pH 7.5 的 PB 缓冲液，收集含蛋白管（约 5 管），混合



超滤除盐、浓缩，以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS）调体积至 2 mL，
测抗体效价，分装，-70 ℃ 保存。此法可获得高纯度抗 IgG 抗体

* 注：凝胶经充分洗净后，其流出液在波长 280 nm 测定光吸收值应 < 0.02。

三、抗体保存

1. 避免高温、低 pH 无论是纯化的抗体，还是免疫后的抗血清，实验室保存条件和方法对其效价影响非常大。保存不当，可使抗体腐败变质、杂菌污染或效价下降而失去应用价值。由于抗体是大分子蛋白，因此，一定要注意避免蛋白质的变性和降解问题，即过高温或极端 pH 的出现。

2. 避免反复冻融 抗体作为大分子蛋白质，在低浓度时极易发生空间结构的变化，因此应尽可能以高浓度分装成小量，-80 ℃ 保存，至少也要在 -20 ℃ 以下冻存。尽可能避免多次冻融，一般来说，冻融一二次对效价影响不大，溶解后的抗体可暂时保存在 4 ℃，在 1 个月内应用。为避免多次冻融影响效价，可将纯化的抗体加上 50% 甘油保存在 -30 ℃。

3. 防腐剂 可用于抗体保存的防腐剂有叠氮钠（0.02%）、硫柳汞（0.01%）和苯酚（0.5%）等。加入防腐剂后可放入 4 ℃ 普通冰箱保存约 1 年。但荧光抗体或辣根过氧化物酶标记抗体不宜用叠氮钠防腐，因为叠氮钠对荧光素（异硫氰酸荧光素）有淬灭作用，对酶也有毒性作用。

4. 真空冷冻干燥保存 这是一种理想的纯化抗体保存方法。抗体分装于安瓿内（通常 1 ~ 2 mL），置低温真空干燥器内，真空条件下使样品逐渐脱水干燥，然后密封。冻干后免疫血清或纯化抗体可在 -20 ℃ 保存数年。

第二节 单克隆抗体制备

1975 年，英国剑桥大学的 Köhler 和 Milstein 利用 B 细胞杂交瘤制备单克隆抗体（monoclonal antibodies, mAb），其原理是利用单一 B 细胞克隆分泌特异性抗体和骨髓瘤细胞在体外长期增殖的特性，将上述两种细胞融合形成杂交瘤细胞。该杂交瘤细胞可在体外长期稳定地生长，并分泌独特型抗体，此即单克隆抗体制备技术。杂交瘤细胞培养

的关键是 HAT 选择性培养，骨髓瘤细胞因缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT)，而在 HAT 培养基 [即含次黄嘌呤 (H)、氨基蝶呤 (A)、胸腺嘧啶核苷 (T) 的培养基] 中不能生长，B 细胞虽然具有次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶，可以在 HAT 中存活，但 B 细胞不能传代生长。杂交瘤细胞由于具备了骨髓瘤细胞和 B 细胞的双重特点，可以在 HAT 培养基中长期存活。因此，通过 HAT 选择培养，即可筛选出杂交瘤细胞株。

一、试剂与器材

1. 细胞融合剂聚乙二醇 (PEG) 相对分子质量 4 000，每安瓿 1 g，10 磅 15 min 高压灭菌后，-30 ℃ 保存。使用时酒精灯直接融化，待温度降至 60 ℃ 时，迅速加入 1 mL 无血清 RPMI - 1640 培养液，混匀，即为融合用 50% PEG，40 ℃ 保温备用。

2. RPMI - 1640 培养液 RPMI - 1640 10.4 g + NaHCO₃ 2 g + 双抗溶液 5 mL + 0.2 mol/L L - 谷氨酰胺 1 mL，加双蒸水至 1 000 mL，调整 pH 至 7.2。过滤除菌，4 ℃ 保存。

3. 100 × 氨基蝶呤 (A) (4×10^{-5} mol/L) 氨基蝶呤 (相对分子质量 440.4) 1.76 mg 添加 90 mL 双蒸水，加入 1 mol/L NaOH 0.5 mL，溶解后加入 1 mol/L HCl 0.5 mL，双蒸水加至 100 mL，-30 ℃ 保存。

4. 100 × 次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷 (HT) (H: 1×10^{-2} mol/L; T: 1.6×10^{-3} mol/L) 次黄嘌呤 136.1 mg 和胸腺嘧啶核苷 38.8 mg，加双蒸水至 100 mL，50 ℃ 水浴中充分溶解，过滤除菌，-30 ℃ 保存。用前可置 40 ℃ 加温助溶。

5. 100 × 8 - 杂氮鸟嘌呤 (8 - AG) 储存 8 - 杂氮鸟嘌呤 200 mg (相对分子质量 152.1) 用 1 mL 4 mol/L NaOH 溶解，再加 1 mol/L HCl 中和，补双蒸水至 100 mL，过滤除菌，分装，-30 ℃ 保存。

6. 主要设备 CO₂ 培养箱、超净工作台、倒置显微镜、除菌滤器、酶联免疫测定仪。

7. 手术器材 手术剪刀、镊子、眼科剪刀、眼科镊子、止血钳。

8. 其他器材 血细胞计数板、离心管、培养皿、平底细胞培养板。

9. 胎牛血清 (FCS)，小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0 或 NS - 1。

二、实验流程

1. 动物免疫 BALB/c 小鼠，雌性，6 ~ 8 周龄，体重 $18 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ 。常规免疫，当效价达到 1:1 600 以上时，取同量抗原尾静脉或腹腔加强免疫，最后一次加强免疫 3 天后取免疫小鼠脾细胞进行细胞融合。

2. 饲养细胞的制备 正常 BALB/c 小鼠经 75% 乙醇消毒腹部，切开腹膜，用注射器腹腔注射 4 ℃ 预冷的无血清培养液 4 ~ 5 mL，轻揉腹部数次，用吸管吸取细胞悬液，用无血清培养液离心洗涤 (1 000 r/min, 5 min) 2 次。重新悬浮细胞于 20% FCS - RPMI - 1640 培养液中，调细胞数至 $2 \times 10^5/\text{mL}$ ，将细胞加至 96 孔培养板，每孔 100 μL 。

3. 骨髓瘤细胞培养 复苏的骨髓瘤细胞于 10% FCS - RPMI - 1640 培养液中培养

1 周, 在融合前 3 天, 每天更换一半培养液, 使骨髓瘤细胞保持在对数生长期。融合当天用 RPMI - 1640 培养液洗涤、离心骨髓瘤细胞 ($1\,000\text{ r/min}$, 5 min) 2 次, RPMI - 1640 培养液重新悬浮细胞。台盼蓝染色, 镜下计数活细胞数大于 95%, 取 $(1\sim2)\times10^7$ 个骨髓瘤细胞。

4. 细胞融合 将制备的脾细胞悬液 (1×10^8) 和骨髓瘤细胞 [$(1\sim2)\times10^7$] 按 5:1~10:1 的比例混合, 加入 20 mL RPMI - 1640 培养液, 离心洗涤 2 次 ($1\,000\text{ r/min}$, 5 min)。第二次离心后, 尽可能吸净残留液体, 使细胞沉淀团块松散。于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴内, 在 1 min 内缓慢加入 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 预温的 50% PEG 1 mL, 静置 1 min。于 1 min 内, 加 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 预温 RPMI - 1640 培养液 2 mL。于 3 min 内, 加 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 预温 RPMI - 1640 培养液 25 mL。 $1\,000\text{ r/min}$, 离心 5 min。倾去上清, 轻弹试管底部, 使细胞略松散, 加 HAT 培养液轻轻悬浮沉淀细胞, 调细胞浓度至 $1\times10^6/\text{mL}$ 。

5. 杂交瘤细胞选择性培养和筛选 将细胞接种于 96 孔板中 (实验前一天加好饲养细胞的培养板), 每孔 0.1 mL, $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养。融合后每隔 3~5 天更换 HAT 培养液一次, 共 3~4 次, 采用换半液法换液, 即每次吸出培养液中的一半液体后再加入等量新培养液。融合后 1 周左右可出现克隆, 当 14~21 天集落大于 3 mm 或大于视野 1/2 时, 利用间接酶联免疫法筛选分泌单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞克隆。

6. 杂交瘤细胞的克隆化培养 将检出的分泌单克隆抗体的阳性孔杂交瘤细胞按有限稀释法稀释细胞, 即用 HAT 培养液稀释细胞至 2~5/mL, 10~20/mL 和 50/mL, 于 96 孔细胞培养板中每孔加入细胞 0.1 mL, 各浓度按 12 孔、8 孔、4 孔的数量接种。亚克隆化培养 10~14 天后, 收获单一杂交瘤细胞克隆孔的上清, 用间接 ELISA 法检测抗体分泌情况, 挑选单个阳性克隆生长的阳性孔再进行 2~3 次亚克隆, 直到亚克隆化时全部克隆孔细胞培养上清抗体检出阳性率达 100% 为止。

7. 单克隆抗体大量制备 选用 BALB/c 雌性小鼠, 腹腔内注射 0.5 mL 液状石蜡或淀粉 3 天左右, 腹腔注射杂交瘤细胞, 每只鼠 $1\times10^6/\text{mL}$ 。

8. 单克隆抗体的纯化 羟基磷灰石柱层析法: 羟基磷灰石经 0.01 mol/L pH 6.8 PB 漂洗 3 次后装柱, 柱床为 $1.6\text{ cm}\times10\text{ cm}$ 。1 倍柱床体积的 1 mol/L NaCl 洗涤, 4 倍柱床体积的 0.01 mol/L pH 6.8 PB 洗涤平衡。加入 1~5 mL 收集的腹水上清 (除去上层的不溶物质及沉淀物)。0.01~0.3 mol/L pH 6.8 PB 300 mL 线性梯度洗脱, 部分收集器分部收集, 流速为 0.7~0.9 mL/min, 5 min 收集 1 管, 第 3 管为纯化的 IgG 单克隆抗体。经生理盐水充分透析后, 冷冻干燥, 分装, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。

单克隆抗体常用的纯化还可采用以下方法: 收集的腹水上清经 50% 饱和硫酸铵沉淀, 再采用 A 蛋白亲和层析柱纯化, 即得 IgG 型单克隆抗体。

9. 单克隆抗体的鉴定

(1) 单克隆抗体亚类的鉴定: 可采用标准的抗 Ig 亚类单克隆抗体, 利用琼脂扩散试验鉴定抗体亚类, 如属于 IgG1 还是 IgG2 型单克隆抗体。

(2) 单克隆抗体特异性的鉴定: 采用包被不同抗原的酶标板, 利用间接酶联免疫法

检测抗体的交叉反应性。

(3) 单克隆抗体效价和亲和力测定：可采用间接 ELISA 法测定。

【关键点】

(1) PEG 相对分子质量 400 ~ 6 000 都可使用，但以 4 000 融合效率最高。

(2) 饲养细胞制备：取小鼠腹腔巨噬细胞制备饲养细胞时，腹腔冲洗液以 4 ~ 5 mL 较合适，保证饲养细胞在 96 孔细胞培养板中每孔 $(1 \sim 2) \times 10^4$ 的浓度，最好于融合前 1 ~ 2 天铺 96 孔细胞培养板。血清质量好时，细胞融合也可不用饲养细胞。但杂交瘤细胞亚克隆化时，应加饲养细胞。

(3) 骨髓瘤细胞的准备：为防止骨髓瘤细胞发生 HGPRT 酶的逆转，应定期用 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 8 - AG 处理骨髓瘤细胞，或于融合前用 HAT 培养液检定骨髓瘤细胞的敏感性，发现较多骨髓瘤细胞逆转，再用 8 - AG 处理；当融合率低而又找不到其他原因时，应该考虑骨髓瘤细胞的质量，可试换骨髓瘤细胞。

(4) 细胞融合：一只免疫小鼠脾细胞尽可能接种 10 块以上 96 孔板，80% 以上的孔有 1 ~ 3 个克隆最合适，既可减少工作量，又不易丢失阳性克隆。

(5) 加板：刚刚融合的手机切忌强力吹打，以防细胞损伤、分离，降低融合率。克隆化过程中，应逐渐用普通 RPMI - 1640 培养液以 1/2 的速度替代 HT 培养液并递减牛血清的浓度至 10% 左右。

(6) 亚克隆化：可以在显微镜下直接挑取单一克隆进行亚克隆化，以有效较少工作量，也更易获得阳性克隆。

(7) 细胞冻存：最好采用 50% 牛血清加二甲基亚砷 (DMSO) 进行细胞冻存，有利于细胞复苏。

(崔雪玲 邵启祥 柳忠辉)

第二章 酶免疫测定技术

酶免疫测定 (enzyme immunoassay, EIA) 是将抗原抗体反应的高度特异性和酶的催化放大作用相结合, 发展建立的一种非放射性免疫标记分析方法。该方法利用酶与相应底物作用使之显色, 并通过仪器测定显色结果, 进而达到对抗原进行定性、定量或定位分析的目的。EIA 中所用的酶类既不能影响抗原或抗体免疫反应的特异性, 也不能改变酶自身的活性, 常用的有辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (AP)。

酶免疫测定技术根据测定过程中是否需要将结合的酶标记物与游离的酶标记物分离而分为非均相和均相两类 (图 2-1)。前者需分离游离型和结合型酶标记物, 且常应用固相载体以利于抗原-抗体结合物与游离物

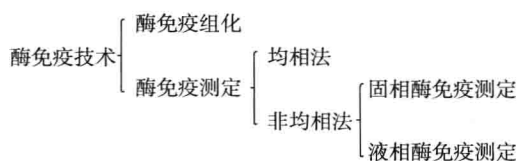


图 2-1 酶免疫技术分类

的分离, 主要形式为酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA); 后者在测定过程中不需将游离型和结合型酶标记物分离, 直接应用酶作用底物的信号放大效应, 也称酶放大免疫测定法 (enzyme-multiplied immunoassay technique, EMIT)。EMIT 通过抗原-抗体结合反应使标记抗体的示踪物活性发生改变, 待抗原-抗体结合与酶-底物反应平衡后, 即可直接测定反应结果, 整个过程在均一的液相中进行。酶免疫测定技术可用于激素、药物等半抗原的检测, 也能测定大分子蛋白质、病毒及细胞性抗原成分。由于 ELISA 通过利用酶催化底物反应的生物放大作用, 提高了抗原-抗体反应检测的敏感性, 且有灵敏度高、特异性强、稳定、操作简捷、快速、无污染等优点, 因此在实验室中应用最广泛。本章仅介绍酶联免疫吸附试验。

一、实验原理

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是应用酶标记的抗体 (或抗原) 检测包被在固相载体表面未知抗原 (或抗体) 的方法。先把抗原 (或抗体) 结合到固相载体表面, 并保持其免疫活性; 酶标记的抗体既保留其免疫学活性, 又保留酶的活性。测定时将待测标本中的抗原 (或抗体) 包被于固相载体表面, 再加入酶标记的抗体 (或抗原) 与之结合形成酶标记抗体-抗原复合物; 用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原-抗体复合物与液体中游离的酶标抗体分开, 此时固相载体上的酶活性与标本中受检物质的量成正相关; 加入底物后, 底物被酶催化呈现显色反应, 显色的强弱可反映酶标抗体-抗原复合物的量,