

全国高等学校“十二五”医学规划教材
(供临床·基础·预防·护理·检验·口腔·药学·法医·影像·麻醉等专业用)

免疫学实验教程

主编 新 燕 姚新生



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

全国高等学校“十二五”医学规划教材

(供临床·基础·预防·护理·检验·口腔·药学·法医·影像·麻醉等专业用)

免疫学实验教程

主编 新 燕 姚新生

主审 孙万邦

编者 (以姓氏拼音为序)

杜 联 峰	遵义医学院
彭 洪 涛	内蒙古医科大学
秦 娜 琳	遵义医学院
覃 明	遵义医学院
沈 敬 华	内蒙古医科大学
苏和巴特	内蒙古医科大学
新 燕	内蒙古医科大学
姚 新 生	遵义医学院



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

内容提要

本书为全国高等学校“十二五”医学规划教材，共12章。第1章至第8章介绍基本的免疫学技术和几个经典的免疫学实验，第9章至第12章主要介绍较新的免疫学技术和几个独立的免疫制剂实验。为方便学生掌握重点和复习，各章都有“问题与思考”。本书可供临床、基础、预防、护理、检验、口腔、药学、法医、影像、麻醉等专业本科生使用，亦可供生物学类本科生和研究生的公共实验技术课使用。

图书在版编目（CIP）数据

免疫学实验教程 / 新燕, 姚新生主编. -- 北京 :
高等教育出版社, 2013. 1
供临床、基础、预防、护理、检验、口腔、药学、法医、
影像、麻醉等专业用
ISBN 978-7-04-036493-4

I. ①免… II. ①新… ②姚… 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(2012)第316650号

策划编辑 席 雁

责任编辑 瞿德竑

封面设计 张 楠

责任印制 田 甜

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 秦皇岛市昌黎文苑印刷有限公司
开 本 787 mm × 1092 mm 1/16
印 张 9
字 数 180千字
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.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 2013年1月第1版
印 次 2013年1月第1次印刷
定 价 19.00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 36493-00

前 言

免疫学理论与应用技术的快速发展推动了生物学、医学、药学乃至整个生命科学的发展,成为当今生命科学中的一门带动性、支持性学科。免疫学技术的进步也取得了令人瞩目的成就,免疫学检测已经从细胞水平发展到分子水平、基因水平,免疫学新技术已经成为研究生命科学、药学以及临床实验检测不可缺少的工具。由于免疫学概念多、理论多,较为抽象,免疫学实验教学课程的开设,不但有利于帮助学生更好地理解 and 掌握医学免疫学的基础理论、基本知识和基本技能,而且有利于激发学生的学习兴趣,培养学生的实践能力、科学思维 and 创新能力。

本教材编写遵循的基本原则是:注重基本理论、基本知识的培养,突出基本技能训练。由于免疫学技术发展迅速,我们在介绍基本实验技术的同时,也介绍研究生实验常用的流式细胞检测技术、免疫印迹、细胞因子制备等非经典的实验内容。本教材共 12 章,主要包含了抗原或抗体的基本检测方法、免疫标记技术、淋巴细胞功能的检测技术、固有免疫功能的检测、细胞因子与细胞因子受体的检测、超敏反应的检测等,每个实验包括实验目的、原理、材料、方法和注意事项等。

本教材可作为高等医药院校本科生、研究生等免疫学实验用教材。前部分主要是为本科生开设的实验内容,后部分主要是为研究生开设的实验内容,对于某些开展创新性科研的大学生,这部分实验技术常被采用。本教材亦可供从事医学基础或临床的教师和研究人员参考。

由于高等教育出版社和各编写院校的教务处及教研室的大力支持,本教材编写工作才能顺利完成。本教材编委会学术秘书余妍老师在编写中做了文字统校等大量工作,在此一并致谢。

现代免疫学技术进展快速,选择哪些内容写入实验教材是我们要不断去探讨的问题。限于我们的学识水平和编写能力,教材中难免有不妥之处,恳切希望各校师生提出批评、建议,以期在今后教材修订中更趋完善。

编 者

2012 年 12 月

目 录

第一章 血液标本的采集和血清分离	1
第一节 人与常用实验动物血液标本采集	1
第二节 血清分离	5
第二章 淋巴细胞的分离	7
第一节 人外周血单个核细胞的分离	7
第二节 T、B 细胞的分离纯化	8
第三节 淋巴细胞片的制备	12
第三章 抗原或抗体的基本检测方法	15
第一节 抗原抗体反应基本原理	15
第二节 凝集反应	17
第三节 沉淀反应	22
第四节 补体参与的反应	28
第四章 免疫标记技术	34
第一节 免疫荧光技术	34
第二节 免疫酶技术	44
第三节 放射免疫技术	57
第四节 免疫酶组织化学技术	61
第五章 淋巴细胞功能的检测技术	68
第一节 淋巴细胞增殖试验	68
第二节 淋巴细胞的细胞毒性检测(特异性 CTL 功能的检测)	73
第三节 T 细胞分泌功能的检测	74
第四节 B 细胞抗体形成功能的检测	75
第六章 固有免疫功能的检测	77
第一节 溶菌酶的溶菌作用	77
第二节 小吞噬细胞吞噬功能的测定	78
第三节 巨噬细胞的吞噬功能测定	79
第四节 硝基四氮唑蓝(NBT)还原试验	80
第五节 NK 细胞活性测定	81

第七章 细胞因子与细胞因子受体的检测	84
第一节 白细胞介素 2(IL-2)ELISA 检测.....	85
第二节 IL-2 生物活性检测	88
第三节 可溶性白细胞介素 2 受体(sIL2R)检测	91
第八章 I 型、IV 型超敏反应的检测	94
第一节 动物过敏反应试验	95
第二节 I 型超敏反应的检测.....	96
第三节 IV 型超敏反应皮肤试验	100
第九章 流式细胞检测技术	103
第一节 流式细胞术基本原理和应用	103
第二节 流式细胞术检测 CD4 ⁺ T 细胞和 CD8 ⁺ T 细胞	110
第十章 抗体制备技术	113
第一节 多克隆抗血清的制备	113
第二节 单克隆抗体的制备与应用	117
第三节 IgG 提取、分离、纯化.....	123
第十一章 生物制品介绍及转移因子的制备	128
第一节 常用生物制品介绍	128
第二节 转移因子的制备	129
第十二章 免疫印迹法	132
第一节 蛋白质抗原电泳分离	132
第二节 蛋白质抗原转膜与免疫检测	134

- (2) 酒精棉球、碘酊棉球。
- (3) 洁净载玻片、微量吸管等。

【方法】

(1) 确定采血部位:通常为成人的耳垂或左手无名指指尖内侧。耳垂采血具有方便、无痛及不易感染的优点;指尖采血则具有血量丰富、易采集的特点。婴幼儿一般在大趾或足跟采集血液。

(2) 血液采集:轻轻按摩采血部位,使局部组织自然充血。消毒皮肤,干燥后,左手指紧捏采血部位两侧,右手持一次性消毒采血针迅速刺入,深度以2~3 mm为宜,稍加挤压使血液自动流出。第1滴血液因混入组织液相对较多,多弃去不用。用微量吸管吸取血液至要求的刻度(化学、免疫学检验用尼龙毛细管吸取),然后用无菌干棉球压住穿刺点以止血。

2. 真空负压静脉采血法

【材料】

- (1) 真空采血管(普通生化管、枸橼酸钠或肝素抗凝管)。
- (2) 双向采血针(常用7号针头)。
- (3) 止血带、酒精棉球等。

【方法】

(1) 确定采血部位:通常为成人肘静脉,若肘静脉不明显,可选择手背静脉或内踝静脉。婴幼儿由于肘部静脉较细和配合性差,可从股静脉或颈外静脉采血,但要准备充分,注意其风险。现以肘静脉采血为例进行介绍。

(2) 血液采集:在肘弯上方5~10 cm处扎上止血带,肘下垫一棉垫,嘱患者握拳,当静脉明显凸起时,常规消毒,左手拇指固定静脉穿刺部位的下端,右手持采血针(针头斜面向上),沿血管走向呈15°~30°角进针,直接刺破皮肤至静脉腔中,见回血后,固定针头,用双向采血针另一端针头刺破真空采血管的管盖,使血液顺着压力差流入真空采血管内,抽至所需量,取下这个真空采血管,将其余备好的真空采血管依次推入、取出,用无菌棉球压住进针处拔针。如静脉不明显时,可用左手轻拍肘弯或轻轻揉搓,使其充血,或嘱被采血者重复几次握拳运动,使其充盈后采血;肥胖者,可用左手食指在肘前轻压,再抬起,如触到有弹性感,即为肘前静脉。在此处用食指指甲轻压上一痕迹,再行无菌消毒,直刺血管进行采血。

【注意事项】

(1) 血液标本的采集应操作规范。采血前被采血者应保持平静,一般应在清晨取血。

(2) 毛细血管采血法:应避开有炎症、化脓、冻伤等皮肤损害的部位采血。皮肤出汗时应先用干棉球擦干,以免稀释血液。采血时,不要用力挤压皮肤,应让血液自然流出。

(3) 真空负压静脉采血法:①采血针见回血后,另一端针头方可刺破真空采血管的管盖。若提前刺破管盖,可致管内负压消失。此外,采血针见回血后,需固定针管以防血肿形成。②止血带压迫时间不宜过长,最好不超过30 s,避免

淤血和血液浓缩,见回血后即松止血带。

(4) 需要血浆或血清标本时一定要防止溶血发生。在采集、转移、保管和分离血细胞时要防止溶血。发生溶血的主要原因有容器不清洁、接触水或化学溶剂、强力振荡和分离血细胞时操作不慎等。

(5) 血液标本的正确采集是获得准确、可靠实验结果的关键。在标本采集前,应仔细考虑实验的需要,决定采血方法、所需血量及选用合适的抗凝剂。

二、常用实验动物血液标本的采集

动物血液标本的采集方法常依动物的种类不同而有所差异,下面以几种常用实验动物为例介绍其血液标本的采集。

【材料】

1. 实验动物 小鼠、大鼠、家兔、狗。

2. 器材 兔箱、兔固定台、狗固定台、大鼠固定板、剪刀、手术刀、注射器、玻璃毛细管、血色素吸管、止血带。

3. 试剂 1% 肝素生理盐水溶液、饱和草酸钾溶液、3.8% 枸橼酸钠生理盐水溶液。

【方法】

1. 大鼠与小鼠的采血方法

(1) 鼠尾采血:当所需血量很少时采用本法。固定动物并露出鼠尾,将尾部浸入 45~50℃ 温水中数分钟,使尾静脉充血,擦干,再用酒精棉球擦拭消毒。剪掉尾尖(0.2~0.3 cm),拭去第 1 滴血。然后用血色素吸管定量吸取尾血。采血完毕用干棉球压迫止血。亦可不剪尾,用 7~8 号注射针头连上注射器直接刺破尾静脉采血。

(2) 眼眶静脉丛采血:当需用中等量的血液,而又要避免动物死亡时采用本法。左手拇指及食指紧紧握住大鼠或小鼠颈部,压迫颈部两侧使眶后静脉丛充血,但用力要恰当,防止动物窒息死亡。右手持玻璃毛细管从右眼或左眼内眦部以 45° 角刺入,刺入深度为小鼠 2~3 mm,大鼠 4~5 mm。若遇阻力应稍后退调整角度后再刺入,如穿刺适当,血液能自然流入毛细管内。得到所需的血量后,即拔出玻璃毛细管,除去加于颈部的压力,用干棉球压迫止血。

(3) 断头采血:当需用大量的血液,而又不需继续保存动物生命时采用本法。左手握住动物,右手持剪刀,快速剪掉头颈部,倒立动物让血液滴入容器。需注意防止断毛落入容器中。

2. 家兔的采血方法

(1) 耳缘静脉采血:本法为最常用的取血方法之一,可多次反复取血。将家兔固定于兔箱中,拔掉拟采血耳缘部细毛,用手指轻弹兔耳或电灯照射兔耳,使耳部血管扩张,然后消毒,直接用注射器刺入耳缘静脉抽取血液;也可左手压迫耳根,用针头刺破静脉或以刀片在血管上切一小口,让血液自然流出。采血完毕用干棉球压迫止血。

(2) 心脏穿刺采血:将家兔仰卧位固定在兔固定台上或由助手捉持,在左胸

第2~4肋部剪毛,常规消毒。于第3~4肋胸骨左缘心跳最明显处穿刺,针头刺入心脏后即见血液涌入注射器。采血完毕迅速将针头拔出,这样心肌上的穿刺孔较易闭合,针眼处用酒精棉球压迫止血。体重2 kg的家兔每隔2~3周可重复采血10~20 mL。

(3) 股动脉采血:将家兔仰卧固定在兔固定台上,左手拉直动物后肢,右手持注射器,以血管搏动为指标,将针头刺入股动脉,若已刺入,即有鲜红色血液流入注射器。抽血完毕迅速拔出针头,用干棉球压迫止血。

3. 狗的采血方法

(1) 后肢外侧小隐静脉和前肢皮下头静脉采血:本法最常用,且方便。后肢外侧小隐静脉位于后肢胫部下1/3的外侧浅表皮下,由前侧走向后上侧;前肢皮下头静脉位于前肢脚爪上方背侧的正前方。抽血前,将狗固定在狗固定台上或使狗侧卧,由助手固定好。剪去抽血部位的毛,常规消毒。一人用力压迫静脉近心端或用止血带绑紧,使静脉充盈,另一人持注射器进行静脉穿刺。取得所需血量后拔出针头,以干棉球压迫止血。

(2) 耳缘静脉采血:当需少量血液或作血常规检查时,可用此法。剪毛后先用手指轻弹狗耳或电灯照射狗耳,使耳部血管扩张,然后消毒,直接用注射器刺入耳缘静脉抽取血液;也可左手压迫耳根,用针头刺破静脉或以刀片在血管上切一小口,让血液自然流出。采血完毕用干棉球压迫止血。

【注意事项】

1. 对实验动物一次采血量过多或采血过于频繁,都可影响其健康,造成贫血甚至死亡。

2. 采血方法的选择,主要取决于实验的目的和所需血量的多少,所需血量较少时可刺破组织取毛细血管的血,当需血量较多时可作静脉采血,若需反复多次静脉采血时,应自远心端开始。

3. 若需全血抗凝,在注射器或试管内需预先加入抗凝剂,常用的抗凝剂有:

(1) 草酸钾:常用于供检验用血液样品的抗凝。在试管内加饱和草酸钾溶液2滴,均匀浸湿管壁后,放入烘箱(80℃)烤干,包好备用。每管能使3~5 mL血液不凝固。供钾、钙含量测定的血样不能用草酸钾抗凝。

(2) 肝素:取1%肝素溶液0.1 mL于试管内,均匀浸湿试管内壁,放入烘箱(80~100℃)中烤干。每管能使5~10 mL血液不凝固。市售的肝素注射液每毫升含肝素12.500 U,相当于肝素钠125 mg。

(3) 枸橼酸钠:3.8%枸橼酸钠溶液1份可使9份血液不凝固,用于红细胞沉降速率测定。因其抗凝作用较弱而碱性较强,不适用于供化验用的血液样品。

三、实验动物的处死方法

1. 大鼠和小鼠的处死方法

(1) 脊椎脱臼法:左手拇指与食指用力向下按住鼠头,同时右手抓住鼠尾用力向后拉,将脊髓与脑髓拉断,鼠便立刻死亡。这是小鼠最常用的处死方法。

(2) 断头法:用剪刀在鼠颈部将鼠头剪掉,迅速将鼠身倒置放血。由于剪断脑脊髓和大量失血,鼠会很快死亡,但易引起肺淤血,因此,重点观察肺部病变的实验不宜采用此法。

(3) 击打法:右手抓住鼠尾,提起,用力摔击其头部,鼠痉挛后立即死亡,或用水槌用力击打鼠头部也可致死。

(4) 急性失血法:可采用鼠眼眶动脉和静脉急性大量失血方法使鼠立即死亡。左手拇指和食指尽量将鼠头部皮肤捏紧,使鼠眼球突出。右手持弯头小镊,在鼠右侧眼球根部将眼球摘去,并将鼠倒置,头向下,此时血液很快从眼眶内流出。

(5) 化学致死法:吸入 CO,大、小鼠在 CO 浓度为 0.2%~0.5% 的环境中即可死亡。

另外,皮下注射土的宁(小鼠 0.76~2.0 mg/kg,大鼠 3.0~3.5 mg/kg),吸入乙醚、三氯甲烷均可致死。

2. 家兔和狗的处死方法

(1) 空气栓塞法:向动物静脉内注入一定量的空气,使动物发生空气栓塞,形成严重的血液循环障碍而死亡。一般家兔注入 20~40 mL 空气,狗注入 80~150 mL 空气即可致死。本法优点是处死方法简单、迅速,缺点是由于动物死于急性循环障碍,各脏器淤血十分明显。

(2) 急性失血法:先使动物麻醉,暴露股三角区或腹腔,再切断股动脉或腹主动脉,即刻见血液喷出。用一块湿纱布不断擦去切口周围的血液和血凝块,同时不断地用自来水冲洗流血,使切口处保持通畅,动物在 3~5 min 内即可死亡。采用本法动物死亡时十分安静,对脏器无损害,但器官贫血比较明显,是目前活杀采集病理标本较好的方法。

另外,对家兔也可用木槌用力锤击其后脑部,损坏延脑,造成死亡。也可注入一定量的化学药物,如氰化钾溶液、甲醛溶液、土的宁等造成死亡。

【问题与思考】

1. 选择毛细血管采血法和真空负压静脉采血法的依据是什么?
2. 血液标本在采集、运输及保存方面需要注意些什么?

第二节 血清分离

【实验目的】

掌握血清分离的方法。

【材料】

1. 普通生化管、双向采血针、消毒棉球等。
2. 毛细吸管、离心管、eppendorf 管、离心机等。

【方法】

1. 确定采血部位 同真空负压静脉采血法。
2. 血液采集 同真空负压静脉采血法,采外周血 3~4 mL 于普通生化管中,

斜面放置试管,静置 30 min。

3. 离心血液 血液完全凝固后,用竹签将血块轻轻剥离管壁,以 2 000 r/min 转速离心 20 min,用毛细吸管吸取上清(血清)于 eppendorf 管中保存,-20℃冰箱贮存备用。

【注意事项】

1. 注意各个操作环节,严防溶血。
2. 血清如需多次使用,应少量多管分装保存,以免反复冻融影响实验结果。

【问题与思考】

简述血清与血浆的区别,二者在临床检验及基础研究中有何应用?

(秦娜琳 汤贤英 罗军敏)

第二章

淋巴细胞的分离

用体外方法对机体各种具有免疫反应的细胞分别作鉴定、计数和功能测定,是观察机体免疫状态的一种重要手段。为此,需将各种参与免疫反应的细胞从血液或组织中分离出来,可依据细胞表面标志、理化性质及功能等的差异进行设计和选择分离方法。本章将详细介绍淋巴细胞的分离。

第一节 人外周血单个核细胞的分离

人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)包括淋巴细胞和单核细胞,是免疫学实验最常用的细胞,也是进行 T、B 细胞分离纯化过程的重要中间环节。因此,获取高纯度和高活性的 PBMC 常常是许多免疫学实验的先决条件。人 PBMC 主要来源于外周血,其取材方便,含量丰富。分离 PBMC 的方法有物理法(如密度梯度离心法、细胞比重法等)、化学法(如低渗盐水法、氯化铵溶红细胞法等)。本节仅介绍目前最常用的葡聚糖-泛影葡胺(ficoll-hypaque)密度梯度离心法。此分离法简便,分离纯度高、产量多,而且不影响细胞的活性。

【实验目的】

掌握密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞。

【实验内容】

葡聚糖-泛影葡胺密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞。

【原理】

人血液中各有形成分的密度存在差异,利用密度为 1.077 而且近于等渗的葡聚糖-泛影葡胺混合液作为分离液,加入外周血进行离心,离心后不同密度的血细胞在分离液中呈梯度分布。血浆和血小板由于密度较小,故悬浮于分离液的上部;红细胞与粒细胞由于密度较大(1.092),故沉于分离液的底部;PBMC 密度(1.075~1.090)稍低于分离液,分布于血浆与分离液的交界处,界限清楚,层次分明。将该层细胞吸出,即为单个核细胞(主要是淋巴细胞)。用此方法分离 PBMC 纯度可达 95%,淋巴细胞约占 90%,其中 T 淋巴细胞占 80%,B 淋巴细胞占 4%~10%。

【材料】

1. 抗凝管、采血针、聚维酮碘及酒精棉球等。
2. 葡聚糖-泛影葡胺淋巴细胞分离液(相对密度 1.077 ± 0.001)。
3. 无钙、镁离子的 Hank's 液, RPMI-1640 培养液。
4. 刻度吸管、毛细吸管、离心管、离心机、天平等。

【方法】

1. 稀释抗凝血 无菌采静脉血 2 mL 于抗凝管中,轻轻摇动试管,混匀,5 min 后加入等量 Hank's 液,手动轻轻摇匀。

2. 分离淋巴细胞 取淋巴细胞分离液 2 mL 于灭菌离心管内(稀释血液与分离液体积比为 2:1),用刻度吸管吸取稀释的血液,在分离液液面上方 1~2 cm 处,沿管壁缓慢加至淋巴细胞分离液的液面上,如图所示(图 2-1,离心前),注意保持两种液体界面清晰。将试管平衡后置水平式离心机,以 1 500 r/min 转速离心 20 min,离心后细胞分布如图所示(图 2-1,离心后),绝大多数淋巴细胞悬浮于血浆与分离液的界面上,呈白膜状。

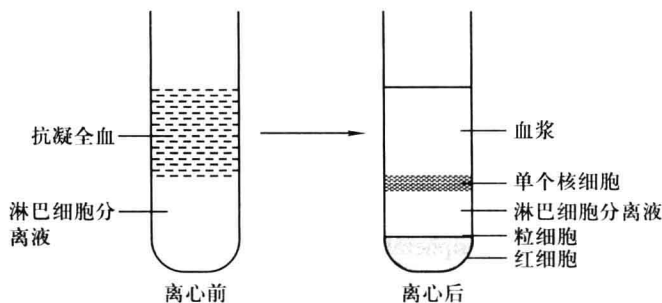


图 2-1 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞示意图

3. 洗涤淋巴细胞 将毛细吸管插至白膜层,沿试管壁边缘仔细吸取界面处淋巴细胞层,并将所吸液移至一刻度离心管内,加入 5 倍体积的 Hank's 液或 PBS 液(含 1% 牛血清清蛋白,BSA)于刻度离心管内,手动旋转试管使液体混匀,以 1 000 r/min 转速离心 10 min,弃上清,沉淀即主要为淋巴细胞。

4. 细胞计数 加入 RPMI-1640 培养液 1 mL,混匀后进行计数(计数方法详见本章附一)。若需立即进行下一步的实验,可调整相应的细胞浓度。

5. 细胞保存 若需以后进行相关的实验,则需冻存细胞(详见本章附三细胞冻存)(备注:如做淋巴细胞转化或其他培养,所用试剂、器材应是无菌的。此外,尚需做细胞存活率检查,见本章附二细胞活性检测。)

【注意事项】

1. 稀释血液于分离液管中时,应沿管壁缓慢加入,注意保持两种液体界面清晰,加完后勿摇动。

2. 吸取界面处的细胞时应仔细,勿吸取红细胞等其他细胞,以免影响分离细胞的纯度。

3. 此法分离单个核细胞纯度可达 95%,有时可混有少量多形核粒细胞及红细胞;细胞存活率可达 80% 以上,其高低与室温有关。

第二节 T、B 细胞的分离纯化

为了深入研究 T、B 细胞的生物学特性和功能,需从淋巴细胞群中分离出单

一的 T 细胞或 B 细胞。T、B 细胞以及 T 细胞亚群的分离纯化技术是基于这些细胞的细胞膜表面标志(表面受体或表面抗原)及黏附能力等不同而建立。常用的方法有花环沉降法、尼龙棉柱法、免疫吸附法、免疫磁珠法等。此外,应用流式细胞仪可以分离出均质性的单一细胞类型或细胞亚群(详见第九章流式细胞检测技术)。

【实验目的】

掌握免疫磁珠法分离淋巴细胞,熟悉其他分离方法。

【实验内容】

1. 免疫磁珠法分离淋巴细胞。
2. 花环沉降法分离 T 细胞。
3. 尼龙棉柱法分离 T、B 细胞。

一、免疫磁珠法分离淋巴细胞

【原理】

偶联在磁珠上的特异性单抗可特异性识别并结合细胞表面抗原,在外加磁场中,通过抗体与磁珠相连的细胞被吸附而滞留在磁场中,无相应表面抗原的细胞则由于不能与磁珠相连而没有磁性,不在磁场中停留,从而使细胞得以分离。根据磁珠结合的细胞与所要获得的细胞的关系,免疫磁珠法分离细胞可分为正选法和负选法。正选法即磁珠结合的细胞就是所要分离获得的细胞,负选法即磁珠结合不需要的细胞,游离于上清液的细胞为所需细胞。以下介绍免疫磁珠法分离 CD4⁺T 细胞。

【材料】

1. CD4-MicroBeads。
2. 缓冲液(pH 7.2 PBS, 0.5% BSA, 0.5mol/L EDTA)。
3. MS 柱子,离心管。

【方法】

1. 样品制备 收集待分离的淋巴细胞制成单细胞悬液,计数,以 1 500 r/min 离心 10 min,彻底去除上清。

2. 磁珠标记(以细胞数为 10^7 为例,若细胞数增加,相应增加各液体体积):

- (1) 加入 90 μ L 缓冲液重悬细胞;
- (2) 加入 10 μ L 磁珠;
- (3) 充分混匀,4~8℃孵育 15 min;
- (4) 清洗细胞:加入 1~2 mL 缓冲液,300 r/min 离心 10 min,彻底弃去上清;
- (5) 加入缓冲液重悬细胞至 $10^8/500 \mu$ L。

3. 磁珠分离

(1) 根据细胞数量选择合适规格的柱子及分离器(如细胞数为 10^7 ,选择 MS 柱子和 Mini/Octo/Vario/SuperMACS 分离器),将柱子置于磁场中;

(2) 润柱:加 500 μ L 缓冲液;

(3) 上样:样品上柱;

(4) 收集未沾染的细胞,用缓冲液冲洗柱子 3 遍(500μ L $\times$ 3 遍)并收集冲

洗液;

(5) 将柱子移入离心管;

(6) 用 1 mL 缓冲液洗脱标记细胞,即为 CD4⁺T 细胞,细胞计数。

【注意事项】

1. 待分选细胞中如有贴壁细胞,建议在分选前先经消化处理,使之成为单细胞悬液。

2. 抗体包被磁珠对死细胞常有非特异性结合,因而分选前应去除死细胞。

3. 待分离的细胞悬液应尽量是单细胞悬液,避免细胞黏附成团,影响分离效果。

4. 细胞悬液加入分离柱中时,应将滴管伸至底壁后加入,避免细胞悬液沿管壁流入,使管壁残留未分选细胞,以致后继洗柱过程中,因疏忽未被洗下,最后导致纯度不高。

5. 操作中尽量减少细胞丢失,注意选用合适的离心机和离心管,离心力按照说明书操作,300~400 r/min,10 min,离心管最好选用 10 mL 或者 15 mL 塑料尖底离心管。

6. 如果过一个分选柱纯度不理想,可以再过一个新的分选柱增加纯度(分选前靶细胞比例低于 1%,或者弱表达细胞必须过 2 个分选柱)。

7. 低频弱表达细胞,注意标记抗体不能与磁珠有竞争性抑制。最好选择 MACS 推荐抗体。

二、花环沉降法分离 T 细胞

【原理】

人类 T 细胞表面上有能与绵羊红细胞(SRBC)相结合的受体(E 受体, CD2),能与经溴化二氨基异硫基异硫脲氢化物(AET)处理的绵羊红细胞结合,形成稳定的、细胞体积和密度较大的 E 花环(AET-E 花环),据此特性可将 T、B 细胞加以分离。如采用密度梯度离心法,用淋巴细胞分离液分离时,AET-E 花环沉于管底,在分离液界面的淋巴细胞为 B 细胞;沉于管底的 AET-E 花环经低渗溶液溶解花环周围的 SRBC,即可获得纯的 T 细胞。

【材料】

1. AET 溶液。

2. 绵羊红细胞悬液。

3. 淋巴细胞分离液。

4. 含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液(10% FCS-RPMI-1640 培养液)、Hank's 液。

5. 生理盐水。

6. 淋巴细胞悬液。

7. 离心管、试管、毛细吸管、水浴箱、离心机等。

【方法】

1. 用 AET 处理绵羊红细胞(绵羊红细胞的预处理) 取绵羊红细胞悬液,

加入等量 Hank's 液,轻轻摇匀,以 1 500 r/min 离心 5 min,将红细胞表面的白细胞及上清吸出弃掉,反复 3 次。取一份压积的绵羊红细胞,加入 4 份新配制的 AET 液混悬,置于 37℃ 水浴 15 min,不断摇匀。加入冷生理盐水,混匀,以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,反复 5 次。观察无溶血,细胞凝集后,加入 10% FCS-RPMI-1640 培养液,混匀,以 1 500 r/min 离心 5 min(在 1 份绵羊红细胞中加 9 份 10% FCS-RPMI-1640 培养液制成 AET-SRBC 悬液)。

2. 调整细胞浓度 AET-SRBC 悬液用 10% FCS-RPMI-1640 培养液稀释至 1% AET-绵羊红细胞;单个核细胞浓度用 10% FCS-RPMI-1640 培养液调整为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 。

3. E 花环形成 取 1 mL 单个核细胞与等量 1% AET-RBC 混合,37℃ 水浴 15 min 后,以 1 000 r/min 离心 5 min,再静置于 4℃ 冰箱 45 min。

4. 分离细胞 用毛细吸管轻轻吹吸,使细胞散匀,将细胞轻轻沿管壁铺于具有等量淋巴细胞分离液的试管液面上,以 2 000 r/min 水平式离心 20 min,沉于管底者为 AET-E 花环。

5. 收集细胞 取管底细胞,加入 Hank's 液,混匀后以 2 000 r/min 离心 10 min,沉淀中加入 3 mL 双蒸水,立即加入 1 mL 3.5% 氯化钠溶液,以 500 r/min 离心 5 min,沉淀即为 T 细胞。

【注意事项】

1. 血液标本采集后应立即分离淋巴细胞,在室温下不能超过 3 h。
2. 采取的无菌羊血应立即分离红细胞,加 Alsever's 液,置 4℃ 冰箱保存。
3. CD2 分子在大颗粒淋巴细胞中也有 10%~80% 表达,用此法分离的淋巴细胞难免混杂大颗粒淋巴细胞,必要时可用 Percoll 非连续密度梯度离心法将 T 细胞与大颗粒淋巴细胞分离。

三、尼龙棉柱法分离 T、B 细胞

【原理】

B 细胞在 37℃ 时易黏附于尼龙棉(聚酰胺)纤维上,而 T 细胞不具此能力,从而可分离 T、B 细胞。

【材料】

1. Hank's 液。
2. 10% FCS-RPMI-1640 培养液。
3. 单个核细胞悬液 1 mL,浓度为 $3 \times 10^7/\text{mL}$ 。
4. 聚乙酰塑料管或 1 mL 注射器、试管、毛细吸管、尼龙棉纤维等。

【方法】

1. 将尼龙毛置于烧杯内,加双蒸水煮沸 10 min,置漏斗内滴干。重复上述过程 6 次,最后两次用去离子水。称取尼龙毛 50~70 mg,细致地撕开,使其松散均匀,用 Hank's 液浸透后装入聚乙烯塑料管或注射器,柱高约 2 cm。

2. 用 Hank's 液和 10% FCS-RPMI-1640 培养液各 5 mL 洗柱,流速 1~2 mL/10 s。

3. 取单个核细胞,用 10% FCS-RPMI-1640 培养液制成细胞悬液($3 \times 10^7/\text{mL}$),将 1 mL 细胞悬液上柱,关闭阀门,置 37℃ 温箱孵育 1 h。

4. 用预温 37℃ 的 10% FCS-RPMI-1640 培养液 5 mL 洗脱柱,收集洗脱液,2 000 r/min 离心 20 min,沉淀即为 T 细胞,纯度达 90% 左右。

5. 用冷的 10% FCS-RPMI-1640 培养液 5 mL 冲洗柱床,边洗边挤压塑料管,收集洗脱液,以 2 000 r/min 离心 20 min,沉淀即为 B 细胞,纯度达 80% 左右。

【结果】

可通过免疫荧光染色来判断 T、B 细胞的纯度。

【注意事项】

1. 本法所得 T 淋巴细胞纯度可达 90%,B 淋巴细胞纯度可达 80%。但尼龙纤维柱可能选择性滞留某些 T 细胞亚群。

2. 尼龙毛可回收利用。用过的尼龙毛可用生理盐水漂洗,然后放入 0.1 mol/L 盐酸内过夜后洗涤。将尼龙毛置烧杯内,加双蒸水煮沸 10 min,置漏斗内滴干。重复上述过程 6 次,最后两次用去离子水。

第三节 淋巴细胞片的制备

【实验目的】

掌握淋巴细胞片的制备方法。

【方法】

1. 调整细胞浓度 将分离得到的淋巴细胞以 RPMI-1640 培养液配成 $10^6/\text{mL}$ 细胞悬液。

2. 制备细胞片(细胞涂片) 用毛细吸管吸取细胞悬液 1 滴,轻轻将细胞悬液铺于玻片中央,约 1 cm^2 ,以冷风吹干,以冷丙酮固定 5~15 min,冷风吹干。

3. 细胞片保存 细胞片密封,置 -20℃ 以下低温保存备用。

【问题与思考】

1. 单个核细胞分离的临床意义是什么?
2. 为何常用密度为 1.077 ± 0.001 的分层液分离人单个核细胞?
3. 分离淋巴细胞的方法有哪些,其分离原则是什么?
4. 分离好的细胞如何保存?

附一:细胞计数方法

【原理】

细胞计数法是用来计数细胞悬液中细胞数量的一种方法。一般利用计数板(血细胞计数板)进行。该法既可用于外周血细胞的计数,又可用于细胞接种浓度和数量的计数。不论计数的对象如何,均须制备分散的细胞悬液。本次实验主要介绍细胞培养时的细胞计数。

【材料】

1. 细胞计数板、毛细滴管等。