

●国家“九五”重点图书
出版规划项目

▲全国高新技术丛书

临床医学免疫学丛书

丛书主编：裘法祖 武忠弼
吴在德 龚非力



湖北科学技术出版社

现代免疫学实验技术

XIANDAI MIANYIXUE SHIYANJISHU

沈关心 周汝麟 主编



临床医学免疫学丛书

丛书主编：裘法祖 武忠弼 吴在德 龚非力

现代免疫学实验技术

XIANDAI MIANYIXUE SHIYAN JISHU

沈关心 周汝麟 主编



国家“九五”重点图书
出版规划项目
全国高新技术丛书
湖北科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代免疫学实验技术/沈关心,周汝麟主编. —武汉:湖北科学技术出版社,1998.10

(临床医学免疫学丛书)

ISBN 7-5352-2093-2

I. 现… II. 沈… III. 医药学:免疫学-实验方法 IV. R392.33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 08117 号

临床医学免疫学丛书

现代免疫学实验技术

© 沈关心 周汝麟 主编

策 划:赵守富 刘健飞 蔡荣春
责任编辑:熊木忠

封面设计:王 梅
责任校对:蒋 静

出版发行:湖北科学技术出版社
地 址:武汉市武昌东亭路 2 号

电话:86782508
邮编:430077

印 刷:湖北省新华印刷厂
督 印:苏江洪 刘春尧

邮编:430034

787×1092mm 16 开 32.75 印张 6 插页
1998 年 10 月第 1 版

775 千字
1998 年 10 月第 1 次印刷

印数:0 001—3 000

ISBN 7-5352-2093-2/R·406

定价:95.00 元(精)

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

临床医学免疫学丛书

吴阶平题



《临床医学免疫学丛书》

主 编

裘法祖 武忠弼 吴在德 龚非力

副 主 编

(以姓氏笔画为序)

王椿森 叶嗣颖 李家文 阮幼冰
许贤豪 沈 迪 沈关心 陈 实
杨 镇 杨东亮 邹 萍 罗丽兰
周汝麟 董永绥

《现代免疫学实验技术》分册

主 编 沈关心 周汝麟

编写人员 (以姓氏笔画为序)

王 勇	王 硕	王晓林	冯 玮
朱志刚	朱慧芬	许化溪	孙自镛
刘 冰	刘 敏	刘绍春	刘铜林
刘喜富	沈关心	吴建民	李 鸣
李 珣	李卓娅	肖 飒	严 俊
苏 娜	邵静芳	张 悦	张卫国
周 春	周汝麟	周宜开	周振英
杨 静	杨木兰	杨渝珍	杨道锋
金慰鄂	姜晓丹	顾 征	徐 勇
黄庆华	黄华梁	梁智辉	熊 平
薛昭华			

序

免疫学是一门既古老又崭新的学科,涉及医学各个领域,并与理工农各学科相互渗透。近年来,基础免疫学和免疫学实验技术迅速发展,免疫学相关学科和交叉学科不断建立和充实,从而对整个基础医学的理论体系和临床实践起着极大的推动作用。

现代免疫学的发展具有以下几个主要特点:①免疫学向分子水平的发展深化了对免疫系统结构与功能的认识;②免疫系统与神经、内分泌系统相互关系的研究极大地丰富了对机体内环境稳定机制的认识;③免疫学向生物学、基础医学、临床医学及预防医学各学科的渗透促进了生物学及医学的发展,产生了许多免疫学分支学科和交叉学科,如免疫病理学、细胞免疫学、免疫遗传学、免疫药理学、免疫毒理学、肿瘤免疫学、移植免疫学、生殖免疫学和免疫预防学等;④免疫学的应用研究促进了生物学技术及生物制品的发展。当今免疫学正以一种典型的“基础研究—应用研究—高科技开发”的模式向前发展,并必将产生巨大的社会效益和经济效益,造福于人类。因此,普及与更新免疫学知识,将国内外免疫学的新进展、新理论、新成果、新技术较全面系统地整理,撰写一套丛书供国内同道参考,是一项非常必要而有意义的工作。有鉴于此,在湖北科学技术出版社的倡议下,由中科院院士裘法祖教授领衔,同济医科大学组织全国数百名专家教授编写了这套《临床医学免疫学丛书》。

该丛书共十一个分册,对免疫学的基础理论和临床实践进行了全面介绍。其内容包括免疫学最新进展,免疫学基础理论与临床医学及生物科学的相互关系,涉及免疫病理学、感染免疫学、内科免疫学、儿科免疫学、生殖免疫学、神经免疫学、肿瘤免疫学、移植免疫学、皮肤性病免疫学以及免疫学实验技术等分支学科的理论与实践。该丛书在内容的广泛性与新颖性、理论的系统性与科学性以及技术方法的先进性与实用性等方面均达到了较高水平。

期望该丛书的出版能受到医务工作者和医学院校师生的欢迎,对于从事其他生物科学研究的人员也能有所裨益。丛书各分册可作为临床工作人员的专业参考书,也可作为医学院校和生物学系研究生、本科生的选修教材。

卫生部部长

陈敏章

1998年1月

前言

随着医学科学的不断发展进步,人们对于诸多疾病的免疫学发病机制认识愈益深刻,为这些疾病的防治奠定了基础。由此,医学免疫学乃应运而生,并受到愈来愈广泛的重视,广大医务工作者和医学科学研究人员迫切希望扩大和加深免疫学知识,以促进自身的临床诊疗和科研工作。

有鉴于此,同济医科大学的有关专家教授们和湖北科学技术出版社共同发起,首次组织编写了这套《临床医学免疫学丛书》,共十一个分册,由基础、方法学到临床各相关专业,深入浅出地系统阐述了医学免疫学的基本内容,并对其当前的新进展和前景进行了较深入的探讨,是目前我国唯一的一套较完整的临床医学免疫学参考书,并被列为国家“九五”重点图书出版规划项目和全国高新技术丛书。

可以预言,这套丛书的出版将会受到广大读者,特别是广大临床医务工作者和医学科研人员的欢迎,并将会对提高临床诊疗工作和促进医学科研工作,作出自己的贡献。对此,我谨向全体编者和湖北科学技术出版社的辛勤工作和宝贵努力,致以由衷的感谢和深切的敬意。也希望广大读者共同关心这套丛书的出版问世,并提供宝贵意见,使其日臻完善。

值此《临床医学免疫学丛书》出版之际,谨识数语,藉申贺忱。

李法祖

目 录

第一章 抗原的制备技术

第一节 天然抗原的提取与纯化	(1)
一、抗原的提取	(1)
二、抗原的分离与纯化	(2)
三、纯化抗原的浓缩和保存	(3)
四、纯化抗原的鉴定	(4)
第二节 人工免疫原的制备	(4)
一、载体的类型	(4)
二、偶联剂与连接方法	(4)
第三节 合成肽抗原的制备	(5)
一、肽的合成与纯化	(5)
二、免疫原性肽的选择	(6)
三、载体蛋白的选择	(7)
四、连接方法的选择	(7)
五、合成肽与载体蛋白的连接	(8)
六、应用溴乙酰化制备环状、聚合肽及肽-载体结合物	(12)
第四节 基因工程抗原的制备	(14)
第五节 免疫刺激复合物作为佐剂的制备	(14)

第二章 抗体的制备技术

第一节 多克隆抗体的制备	(16)
一、免疫动物	(16)
二、抗血清的鉴定	(17)
三、抗血清的保存	(18)
四、抗合成肽类抗体的制备	(18)
第二节 杂交瘤技术制备单克隆抗体	(19)
一、细胞融合杂交瘤技术制备 McAb 的基本原理	(19)
二、骨髓瘤细胞的选择	(20)
三、小鼠 B 淋巴细胞杂交瘤技术	(20)

四、人 McAb 的制备	(26)
第三节 双特异性抗体的制备	(28)
第四节 抗体分子片段的制备	(30)
一、IgG 分子片段的制备	(30)
二、IgM 分子片段的制备	(32)
第五节 抗体的纯化	(32)
一、沉淀法	(33)
二、辛酸提取法	(33)
三、离子交换法	(34)
四、高效液相色谱法	(36)
五、亲和层析法	(36)
六、IgM 的纯化	(38)
七、IgA 的纯化	(38)

第三章 基因工程抗体技术

第一节 人-鼠嵌合抗体	(41)
一、嵌合基因的构建	(43)
二、轻、重链抗体嵌合基因共转染受体细胞	(43)
第二节 人源化抗体	(44)
第三节 小分子抗体	(47)
一、原理	(48)
二、构建	(50)
第四节 抗体库技术	(51)
一、抗体库技术概述	(51)
二、噬菌体呈递载体的构建	(53)
三、PCR 引物的设计	(54)
四、抗体库的构建	(56)
第五节 基因工程抗体的表达、纯化及活性测定	(59)
一、载体的构建及抗体的表达	(60)
二、抗体的纯化	(62)
三、抗体活性及亲和力的测定	(63)

第四章 抗原抗体反应

第一节 抗原抗体反应的基本原理	(65)
一、基本原理	(65)
二、抗原抗体反应的特点	(66)
三、抗原抗体反应的影响因素	(67)
第二节 经典的抗原抗体反应	(68)
一、凝集反应	(68)
二、沉淀反应	(73)
三、补体结合反应	(77)
四、中和试验	(77)
第三节 免疫电泳技术	(79)
一、免疫电泳	(79)
二、对流免疫电泳	(80)
三、火箭免疫电泳	(81)
四、免疫固定电泳	(82)
五、交叉免疫电泳	(83)
第四节 补体参与的抗原抗体反应	(85)
一、溶血试验	(85)
二、补体结合试验	(85)
三、免疫粘附试验	(88)
第五节 免疫微粒技术	(90)
一、胶乳微粒免疫检测技术	(90)
二、免疫磁性微粒分离与纯化技术	(92)
三、微粒技术在分子生物学研究中的应用	(92)

第五章 免疫标记技术

第一节 免疫荧光技术	(94)
一、经典的免疫荧光技术	(94)
二、现代免疫荧光分析技术	(99)
第二节 放射免疫技术	(104)
一、放射免疫测定	(104)
二、免疫放射测定	(108)
三、放射受体分析	(111)
第三节 免疫酶技术	(112)
一、酶标抗体的制备与质量鉴定	(112)
二、非均相(或异相)酶免疫测定	(116)
三、均相酶免疫测定	(123)
第四节 免疫电镜技术	(126)
一、免疫电镜技术常用标记物及其制备方法	(126)
二、免疫电镜技术的不标记抗体法	(129)

第五节 胶体金标记技术	(131)
一、基本原理	(131)
二、胶体金的制备	(131)
三、胶体金标记蛋白的制备	(133)
四、胶体金标记技术在免疫学试验中的应用	(135)
第六节 生物素与亲合素标记技术	(137)
一、生物素与亲合素的生物学特性	(137)
二、生物素标记技术	(138)
三、亲合素标记技术	(140)
四、生物素-亲合素系统的试验方法和原理	(141)
五、生物素-亲合素系统的实验应用	(142)

第七节 化学-生物发光及发光免疫分析	(145)
一、化学发光与生物发光	(145)
二、发光标记物和发光标记技术	(149)
三、发光免疫分析技术	(154)

第六章 免疫组织化学技术

第一节 免疫荧光细胞化学技术	(162)
一、免疫荧光染色方法	(162)
二、对照染色的设立	(164)
三、非特异性荧光及其消除方法	(164)
四、免疫荧光染色中的几个问题	(165)
第二节 免疫酶细胞化学技术	(165)
一、酶标记抗体免疫组化染色法	(165)
二、非标记抗体免疫酶组化染色法	(166)
三、免疫酶组化技术中常用的酶显色底物	(168)
第三节 亲合组织化学技术	(169)
一、生物素-亲合素技术	(169)
二、葡萄球菌 A 蛋白的应用	(170)
三、凝集素	(170)
四、链霉亲合素-生物素技术	(171)
第四节 免疫金银及铁标记免疫组化技术	(172)
一、免疫金染色法	(172)
二、免疫金银染色法	(172)
三、彩色免疫金银法	(173)
四、免疫胶体铁细胞化学技术	(173)

第七章 流式细胞术(FCM)在生物学中的应用

第一节 流式细胞术发展简史	(175)
一、流式细胞术仪器的发展	(175)
二、流式细胞术方法学的发展	(176)
第二节 流式细胞术的工作原理	(176)
一、概述	(176)
二、流式细胞术的工作原理	(176)
三、流式细胞术的技术特点	(178)
四、流式细胞术可检测的细胞参数	(178)
五、影响流式细胞术定量分析的因素	(179)
第三节 流式细胞术的荧光染色、检测和分析	(179)
一、概述	(179)
二、流式细胞术的荧光染色	(180)
三、样品的流式细胞术检测和分析	(183)
四、流式免疫荧光技术的应用	(186)
五、几种流式免疫荧光技术的具体方法	(187)
第四节 流式细胞分选术	(191)
一、分选方式	(191)
二、激光流式分选条件的选择	(193)
第五节 流式细胞术对细胞膜定位、细胞内钙离子和 pH 值的测定	(193)
一、细胞膜电位的测定	(193)
二、细胞内钙离子的流式细胞术测定	(194)
三、FCM 测定细胞内 pH 值	(194)
第六节 流式细胞术对细胞 DNA 的测定	(195)
一、流式细胞术 DNA 检测的组织来源	(195)
二、常用于流式细胞术 DNA 检测的荧光染料	(195)
三、流式 DNA 定量分析的染色原理	(196)
四、定量分析 DNA 的染色方法	(197)
五、细胞 DNA 检测的内参考标准	(198)
六、定量荧光细胞染色技术的评价标准	(198)
七、DNA 直方图引伸的主要参数	(199)

第八章 免疫球蛋白及其他免疫相关蛋白的测定

第一节 免疫球蛋白测定	(201)
一、IgG、IgA、IgM 的测定	(201)
二、IgD 的测定	(206)
三、IgE 的测定	(206)
四、异常免疫球蛋白的测定	(208)
第二节 常见自身抗体的检测原则与方法	(210)
一、抗甲状腺球蛋白抗体的检测	(211)
二、抗甲状腺过氧化物酶抗体检测	(212)
三、抗心磷脂抗体检测	(212)
四、抗肝特异性脂蛋白抗体检测	(213)
五、抗平滑肌抗体检测	(214)
六、抗线粒体抗体检测	(214)
七、类风湿因子测定	(215)
八、抗核抗体检测	(216)
九、抗双链 DNA 抗体检测	(216)
十、ENA 多肽抗体谱检测	(217)
十一、抗中性粒细胞胞浆抗体测定	(218)
十二、抗组蛋白抗体测定	(219)
十三、抗精子抗体检测	(220)
十四、抗子宫内膜抗体检测	(220)
十五、抗卵巢抗体检测	(221)
十六、抗透明带抗体检测	(221)
十七、抗乙酰胆碱受体抗体检测	(222)
十八、特异性神经元抗核抗体检测	(223)
第三节 血清中其他免疫相关蛋白的测定	(224)
一、急性反应期蛋白测定	(224)
二、 β_2 -微球蛋白测定	(225)
三、肌红蛋白测定	(226)
四、纤维连接蛋白测定	(227)
五、 α_2 巨球蛋白测定	(228)
六、甲状腺球蛋白测定	(229)
七、溶菌酶测定	(230)

第九章 补体测定技术

第一节 补体总活性的测定	(232)
一、血清补体总活性的测定	(232)
二、补体旁路途径溶血活性的测定	(233)
第二节 补体各成分的测定	(234)

一、免疫荧光技术·····	(296)	测定方法·····	(326)
二、微量细胞毒试验·····	(297)	七、红细胞促淋巴细胞与中性粒细胞对肿	
三、花环技术·····	(298)	瘤细胞免疫粘附能力的测定·····	(326)
四、免疫酶染色技术·····	(299)		
第四节 淋巴细胞功能测定·····	(300)	第十三章 实验动物免疫细胞功能的测定	
一、淋巴细胞增殖反应试验·····	(301)	第一节 鼠单个核细胞的分离纯化·····	(328)
二、淋巴细胞多克隆抗体产生的测定		一、鼠脾、胸腺和淋巴结单个核细胞的	
·····	(303)	分离·····	(328)
三、特异性抗原刺激人体内、外抗体		二、T细胞和B细胞的分离纯化·····	(329)
产生的测定·····	(306)	三、树突状细胞的分离·····	(330)
四、多克隆及抗原特异性细胞毒性T		第二节 鼠T细胞功能的测定·····	(331)
细胞功能的测定·····	(306)	一、鼠T细胞增殖试验·····	(331)
五、LAK/TIL细胞的制备与活性测定		二、细胞毒性T细胞活性的诱导及测定	
·····	(307)	·····	(332)
六、NK细胞活性测定·····	(309)	三、T细胞功能的定量测定(有限稀释	
第五节 中性粒细胞的分离与功能		法)·····	(335)
测定·····	(312)	四、胚胎胸腺细胞培养与T细胞分化	
一、中性粒细胞的分离方法·····	(312)	发育·····	(336)
二、中性粒细胞的功能测定·····	(313)	五、小鼠体内T细胞功能测定·····	(338)
第六节 单核-巨噬细胞的分离与		第三节 鼠B细胞功能的测定·····	(339)
功能测定·····	(315)	一、小鼠B细胞增殖试验·····	(339)
一、人单核细胞的分离方法·····	(315)	二、体内、外抗体合成的测定·····	(340)
二、单核-巨噬细胞的功能测定·····	(316)		
第七节 嗜碱性粒细胞的分离与功		第十四章 细胞凋亡及其检测方法	
能测定·····	(319)	第一节 细胞凋亡的概念·····	(342)
一、嗜碱性粒细胞的分离方法·····	(319)	一、细胞凋亡的基本概念·····	(342)
二、嗜碱性粒细胞的功能测定——嗜碱性粒		二、细胞凋亡与细胞坏死的区别·····	(342)
细胞颗粒试验·····	(320)	三、研究细胞凋亡的意义·····	(343)
第八节 组织肥大细胞的分离·····	(321)	第二节 细胞凋亡的检测方法·····	(344)
第九节 粘附分子的测定·····	(321)	一、形态学方法·····	(344)
一、可溶性粘附分子的测定·····	(321)	二、生物化学方法·····	(345)
二、细胞膜上粘附分子的测定·····	(322)	三、免疫学方法·····	(346)
第十节 红细胞免疫功能的测定·····	(323)	四、原位末端转移酶标记技术·····	(347)
一、红细胞C3b受体花环及免疫复合		五、靶细胞DNA片段的定量分析与杀	
物花环试验·····	(323)	伤细胞介导的细胞溶解试验·····	(348)
二、红细胞的SPA-酵母菌混合花环		六、流式细胞分析术·····	(349)
试验·····	(324)		
三、单克隆抗体Coombs试验·····	(324)	第十五章 免疫细胞内信息传递的检测	
四、血清中红细胞免疫调节因子活性		第一节 免疫细胞磷脂酰肌醇转换	
的测定·····	(325)	的分析·····	(353)
五、红细胞增强白细胞吞噬功能的简易		一、用Dowex阴离子交换层析分离 ^[3H] -	
形态学方法·····	(325)	磷酸肌醇·····	(353)
六、红细胞对肿瘤细胞免疫粘附能力的		二、HPLC分离磷酸肌醇·····	(354)

三、薄层层析(TLC)分离肌醇磷脂·····	(355)
第二节 细胞内 Ca^{2+} 浓度的测定·····	(356)
第三节 蛋白激酶 C 的活性测定·····	(357)
第四节 细胞内环核苷酸浓度的测定 ·····	(358)
第五节 磷酸化蛋白的研究分析·····	(359)
一、正磷酸盐标记细胞·····	(360)
二、磷酸化氨基酸分析·····	(361)
第六节 抗磷酸化酪氨酸印迹技术·····	(362)
一、用 AP 显色系统检测·····	(362)
二、 ^{125}I -标记的 SPA 检测法·····	(363)

第十六章 细胞培养技术

第一节 实验室一般条件和工作规则 ·····	(365)
一、实验室的一般条件·····	(365)
二、实验室的一般工作规则·····	(368)
第二节 细胞培养的基本条件·····	(368)
第三节 原代细胞培养·····	(369)
第四节 传代细胞培养·····	(370)
第五节 HTLV-转化细胞培养·····	(371)
一、HTLV-1 型或 2 型转化人 T 细胞 的方法·····	(372)
二、注意事项·····	(372)
第六节 EBV 转化细胞的培养·····	(373)
一、EBV 的制备·····	(373)
二、靶细胞的制备·····	(373)
三、EBV 转化靶细胞·····	(373)
第七节 T 细胞克隆技术·····	(374)
一、抗原特异性 T 细胞克隆的制备·····	(374)
二、抗原非特异性 T 细胞克隆的制备 ·····	(374)
三、鼠 T 细胞克隆的制备·····	(375)
第八节 T 细胞杂交瘤技术·····	(376)
一、淋巴瘤细胞系的选择·····	(376)
二、特异性 T 细胞的制备与活化·····	(377)
三、饲养细胞的选择与制备·····	(377)
四、T 细胞杂交瘤的筛选·····	(377)
第九节 控制和清除细胞培养中的 污染·····	(377)
一、抗菌素的应用·····	(378)
二、细菌和真菌污染的处理·····	(378)

三、培养细胞污染支原体的检测和 处理·····	(378)
----------------------------	-------

第十七章 HLA 分型技术

第一节 血清学分型技术·····	(381)
一、淋巴细胞分离法·····	(381)
二、HLA-A、B、C、DR、DQ 抗原分型法 ·····	(382)
第二节 细胞学分型技术·····	(383)
一、HLA-D 抗原的测定·····	(383)
二、HLA-DP 抗原的测定·····	(383)
第三节 DNA 分型技术·····	(384)
一、PCR-SSP·····	(384)
二、PCR-RFLP·····	(386)
三、PCR-SSCP·····	(386)
四、PCR-SSO·····	(387)

第十八章 蛋白质的分离和分析技术

第一节 淋巴细胞膜蛋白的制备·····	(389)
一、非离子型去污剂提取淋巴细胞膜 蛋白·····	(390)
二、匀浆器制备膜蛋白·····	(391)
第二节 应用抗体分离蛋白质·····	(392)
一、免疫亲和层析·····	(392)
二、免疫沉淀法·····	(394)
第三节 蛋白质的电泳分离·····	(397)
一、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离 的基本原理和重要参数·····	(397)
二、蛋白质的单向凝胶电泳·····	(398)
三、双向凝胶电泳系统·····	(402)
四、对角凝胶电泳(Diagonal 凝胶电泳) ·····	(404)
五、用于微序列分析的蛋白质分离方法 ·····	(404)
六、染色凝胶中蛋白质的分离纯化·····	(406)
第四节 蛋白质的测定·····	(408)
一、凝胶蛋白染色·····	(408)
二、免疫印迹法·····	(410)
三、可溶性或膜结合型蛋白质的碘标记 ·····	(412)
四、蛋白质的生物合成标记技术·····	(413)

第十九章 免疫学中常用的基因克隆与表达技术

第一节 RNA 的制备和分析	(417)
一、RNA 的提取	(417)
二、RNA 的 Northern 杂交分析	(421)
第二节 DNA 的分离与纯化	(423)
一、从液相中分离、纯化、浓缩 DNA	(423)
二、哺乳动物细胞基因组 DNA 的制备	(424)
三、细菌质粒 DNA 的制备	(425)
第三节 DNA 片段的分离与回收	(426)
第四节 基因组 DNA 的分析	(430)
一、尼龙膜 Southern 杂交(同位素标记)	(430)
二、地高辛(非同位素)标记	(432)
第五节 DNA 的限制性内切酶酶切、连接与转化	(433)
一、DNA 的限制性内切酶酶切	(433)
二、DNA 分子的体外连接	(434)
三、重组质粒的转化	(434)
四、质粒 DNA 阳性克隆的筛选	(435)
第六节 DNA 序列测定	(435)
一、测序反应原理	(436)
二、体外扩增 DNA 的直接测序(PCR 测序技术)	(436)
三、同位素标记法测序	(439)
四、银染色法测序	(440)
五、荧光标记法测序	(442)
第七节 克隆 DNA 的转染和表达	(443)
一、磷酸钙共转染法	(444)
二、DEAE-葡聚糖转染法	(446)
三、电穿孔转染	(448)
四、脂质体介导的转染	(449)
五、哺乳动物细胞的稳定基因转染	(450)
六、克隆基因的表达	(451)

第二十章 原位分子杂交技术

第一节 概述	(454)
一、核酸分子杂交的基本原理	(454)
二、基本方法	(455)
三、探针的种类	(456)

第二节 探针的标记技术	(456)
一、同位素标记	(456)
二、生物素标记	(457)
三、地高辛标记	(457)
四、荧光素标记	(458)
五、联合标记	(459)
六、常用的探针标记技术	(459)
第三节 原位杂交组化技术	(462)
一、组织切片与培养细胞原位杂交技术	(462)
二、PCR 与原位杂交技术	(464)
三、电镜水平的原位杂交技术	(465)
四、原位杂交与免疫细胞化学结合法	(467)

第二十一章 免疫学中常用的 PCR 技术

第一节 PCR 技术原理	(471)
第二节 PCR 反应体系的组成及其条件的优化	(472)
一、模板核酸	(472)
二、寡聚核苷酸引物	(472)
三、PCR 反应缓冲液	(473)
四、三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)	(473)
五、 Mg^{2+} 的浓度	(473)
六、耐热 DNA 聚合酶	(473)
七、循环参数	(474)
八、防止污染的对策	(474)
九、PCR 常见问题及处理	(475)
十、扩增的忠实性	(475)
第三节 PCR 分类	(475)
一、典型 PCR, 以 DNA 为模板	(475)
二、逆转录 PCR(RT-PCR)	(476)
三、免疫 PCR(IM-PCR)	(476)
第四节 不同来源标本 DNA 的 PCR 扩增	(477)
一、PCR 扩增模板 DNA 的制备	(477)
二、以 DNA 为模板的 PCR 扩增	(477)
第五节 定量 PCR	(478)
一、内参照定量 PCR	(478)
二、竞争 PCR 作 mRNA 定量	(479)
第六节 免疫 PCR(IM-PCR)	(481)
一、DNA 的生物素标记	(481)
二、免疫 PCR 操作步骤	(481)

三、注意事项	(482)
第七节 PCR 在淋巴细胞抗原受体研	
究中的应用	(483)
一、应用 PCR 扩增 T 细胞受体基因重排	(483)
二、用 PCR 检测白血病时 T 细胞受体 β 链基因重排	(484)
三、应用锚定 PCR 技术对 T 细胞受体 δ 链进行分析	(484)
四、PCR 扩增免疫球蛋白重链的 CDR3	

基因	(486)
----------	-------

中英对照专业词汇

附录

一、核酸、蛋白质常用数据及其换算	(500)
二、常用缓冲液和贮存液的配制	(502)
三、常用酸碱的技术参数	(504)
四、细胞染色技术	(505)
五、免疫学研究中常用的鼠系	(507)

第一章 抗原的制备技术

能刺激机体免疫系统使之产生特异性免疫应答,并能与相应免疫应答产物,即抗体和致敏淋巴细胞,在体内外发生特异性反应的物质称为抗原(antigen, Ag)或免疫原(immunogen)。前一种性能称为免疫原性(immunogenicity)或抗原性(antigenicity),后一种性能称为反应原性(reactogenicity)或免疫反应性(immunoreactivity)。凡具有这两种性质的物质称为完全抗原(complete antigen),如大多数蛋白质、细菌、病毒等。只具备反应原性而无免疫原性的物质称为半抗原(hapten)或不完全抗原(incomplete antigen)。大多数多糖、类脂和某些药物等均属于半抗原。抗原按其来源可分为外源性抗原和内源性抗原。外源性抗原又可分为天然抗原、人工抗原、合成抗原与基因工程重组抗原。基因重组抗原的制备首先需获得编码抗原的基因,然后进行克隆与表达,以及产品的纯化。绝大多数天然抗原不是单一成分,在制备抗体时需要进行纯化。将半抗原或合成多肽通过与载体蛋白连接制备成具有免疫原性的化合物,分别称之为人工抗原和合成抗原。

第一节 天然抗原的提取与纯化

一、抗原的提取

如免疫原来源于人类及动物的组织、细胞内及细胞膜的生物活性物质都需将细胞破碎,方可进一步纯化。

(一)组织细胞的破碎

1. 冷热交替法 将组织材料置 90℃左右水浴内作用数分钟后取出,立即投入冰浴中使之迅速冷却,可使大部分细胞破碎,再进一步用于蛋白质和核酸抗原的提取。

2. 反复冻融法 将待破碎的细胞置 -15 ~ -20℃冻结,然后缓慢解冻,如此反复数次,可使大部分细胞及胞内的颗粒破碎。

3. 超声破碎法 根据不同组织采用不同频率的超声波,处理 10 ~ 15min。应间歇进行,以免长时间的温度升高,导致抗原破坏。

4. 玻璃匀浆器法 是破碎少量柔软组织时常用的方法。

5. 自溶法 在一定的 pH 和适宜的温度条件下,利用组织细胞自身的酶系使其组织细胞裂解,释放细胞内容物。动物细胞自溶温度常选用 0 ~ 4℃。自溶时可加入少量防腐剂,如甲苯、氯仿等。

6. 酶处理法 溶菌酶可专一破坏细菌细胞壁,适用于裂解多种革兰阳性细菌。纤维素酶也可用于消化细菌和组织细胞。

(二)抗原的提取

有关核酸的提取见第十九章,现将蛋白

质和酶类抗原的提取方法概述如下。

蛋白质是由许多氨基酸组成的高分子物质,蛋白质种类繁多,不同的蛋白质由于其组成和结构的差异,其溶解度也各不相同。根据蛋白质的溶解特性,可选择不同的提取溶剂。

1. 水溶液提取 大部分蛋白质可溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液,其中稀盐和缓冲液对保持蛋白质的稳定性较好,溶解度大,是提取蛋白质常用的溶剂。一般多以 0.02 ~ 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液、0.15mol/L 氯化钠溶液提取。提取液的 pH 值要保证在蛋白质稳定的范围内,通常在其等电点的两侧。酸性蛋白在偏碱一侧,而碱性蛋白则在偏酸一侧。为防止生物活性蛋白质变性失活,温度以在 4℃ 以下为宜。

2. 有机溶剂提取 少数与脂类结合的蛋白质溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,如用 70% ~ 80% 乙醇提取麸蛋白;用 60% ~ 70% 酸性乙醇提取胰岛素;用丁醇提取一些与脂类结合较牢固的蛋白质和酶类。

二、抗原的分离与纯化

对于从组织细胞中提取出来的生物大分子及体液、组织间液内的蛋白质、多肽、酶类等必须进一步分离纯化才能获得抗原纯品。常用的方法有选择性沉淀法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法、电泳法、超速离心法、层析法等。其中选择性沉淀法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法用于蛋白质和酶的提取较多;有机溶剂提取多用于核酸的提纯;柱层析和梯度离心法可用于蛋白质和核酸的提取。本节主要简介蛋白质抗原纯化的基本方法。详细内容可参阅抗体的纯化及蛋白质的分离与纯化有关章节。

(一) 选择性沉淀

选择性沉淀是采用各种沉淀剂使不同的抗原成分沉淀,达到纯化的目的。

1. 核酸除去法 从微生物或组织细胞

中提取的抗原,其中常含有核酸成份。可采用提取沉淀剂,如氯化锰或硫酸鱼精蛋白沉淀等除去核酸。用提取沉淀剂与 DNA 酶或 RNA 酶在 4℃ 条件下共同作用 30 ~ 60min,可有效地除去核酸成分。

2. 盐析沉淀法 是经典的蛋白质和酶纯化分离技术。由于方法简便、有效,且不损伤抗原活性等优点,至今仍被广泛应用。其原理是蛋白质和酶在低盐浓度下的溶解度随着盐浓度的升高而增加;但当盐浓度不断上升时,蛋白质和酶的溶解度以不同程度下降并析出,此作用称为蛋白质的盐析。这一现象的发生是由于蛋白质分子内及分子间电荷的极性基团有静电引力,当水中加入少量盐类时,由于盐类离子与水分子对蛋白质分子上极性基团的影响,使蛋白质在水中溶解度增大,但当盐浓度增加到一定程度时,蛋白质表面的电荷大量被中和,水化膜被破坏,于是蛋白质就相互聚集而沉淀析出。盐析沉淀法就是根据不同蛋白质在一定浓度的盐溶液中溶解度不同而达到分离的方法。

(1) 抗原的粗提与浓缩 可用不同饱和度的硫酸铵将一复杂的组织细胞溶液分成若干组分,也可收集某一饱和度的盐析沉淀物组分为进一步纯化的粗提物。最常用的沉淀方法是以 33% ~ 50% 的饱和硫酸铵依次沉淀 3 次。盐析法还可起浓缩抗原的作用。如在液体中含量较少的抗原,可通过盐析沉淀,以利于进一步纯化。

(2) 脱盐 盐析法沉淀后,需脱盐才能获得较纯的蛋白质或酶类提取物。常用的脱盐方法是透析法。将蛋白质溶液装入透析袋中,然后用蒸馏水或缓冲液进行透析,盐离子可通过透析袋扩散到水或缓冲液中,而大分子蛋白质则不能通过透析袋,通过更换蒸馏水或缓冲液,直至袋内盐充分透析除去。透析应在 4℃ 冰箱内进行。此外,亦可用葡聚糖凝胶层析法脱盐。

3. 有机溶剂沉淀法 有机溶剂能降低溶液的电解常数,从而增加蛋白质分子上不同电