



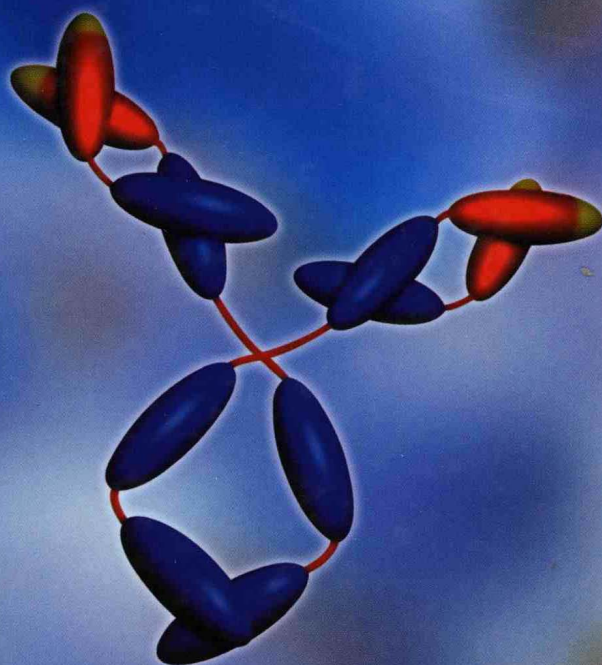
生命科学实验指南系列



Short Protocols in
Immunology

精编免疫学 实验指南

[美] J.E. 科利根 B.E. 比勒 D.H. 马古利斯 编著
E.M. 舍瓦奇 W. 斯特罗贝尔
曹雪涛 等 译



科学出版社
www.sciencep.com

生命科学实验指南系列

精编免疫学实验指南

Short Protocols in Immunology

[美] J. E. 科利根 B. E. 比勒 D. H. 马古利斯 编著
E. M. 舍瓦奇 W. 斯特罗贝尔

曹雪涛等 译

科学出版社

北京

图书在版编目 (CIP) 数据

现代机床夹具设计/吴拓编著. —北京: 化学工业出版社, 2009. 1

ISBN 978-7-122-04242-2

I. 现… II. 吴… III. 机床夹具-设计 IV. TG750.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 186301 号

责任编辑: 贾 娜

装帧设计: 韩 飞

责任校对: 李 林

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 21½ 字数 580 千字 2009 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 49.00 元

版权所有 违者必究

译者序

免疫学是生命科学与医学领域的前沿学科，特别是从 20 世纪 50 年代以来，免疫学基础理论和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，使得免疫学成为当今生命科学中的一门带动性、支持性学科，其探索的重大科学问题与机体健康的维持和疾病的防治密切相关。众所周知，免疫学技术的每一次进步均极大地推动了免疫学理论研究的重大突破和框架体系的发展，也为生物高技术产业化发展做出了巨大贡献，因此，免疫学技术的发明与应用是极为重要的，特别是当前生命科学发展日益迅猛，多个前沿领域的研究需要多学科渗透与合作，将免疫学技术与其他相关学科的技术进行交叉融合显得尤为重要。

Wiley 实验室手册 (*Current Protocols*, John Wiley & Sons, Inc. 出版) 是全球权威的生命科学实验技术指南，其方案经不同实验室广泛验证，并紧跟科研和技术发展的最前沿，定期更新。由著名免疫学家 John E. Coligan 等主编的《现代免疫学方法》(*Current Protocols in Immunology*, CPI) 即是其中之一，自 1991 年出版至今，平均每年更新一次，成为免疫学领域广为使用并得到好评的标志性的综合实验技术手册。本书《精编免疫学实验指南》(*Short Protocols in Immunology*) 是 CPI 的精华版，内容涵盖了免疫学常用实验技术体系的理论背景、基本原理、标准方案和最新发展，其实验操作简明规范、步骤清晰、要点突出、可行性强。该指南不仅是免疫学研究人员特别是研究生的科研工具，而且对于生命科学其他领域的研究者也有很高的参考价值。因此，科学出版社的编辑邀请我们翻译此书时，我们欣然接受。

第二军医大学免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室的中青年研究人员承担了本书的翻译工作。他们多年来在相关领域从事一线研究工作，积累了丰富的理论和实践经验。在繁忙的教学和科研工作之余，他们花费了大量的时间和精力投入此书的翻译，通力合作，终成此稿。对他们在翻译此书过程中所表现出的科学精神、创业激情、团队力量，深表欣慰。感谢科学出版社的编辑引进并将本书推荐给我们组织翻译，感谢他们在编辑和文稿校对等方面所做的大量工作。最后，对在本书翻译和出版过程中提供帮助的所有同行同事们表达诚挚的谢意。

本书的翻译对译者的学术水平和翻译水平提出很高的要求，这对于参与此书翻译的每一个成员都是一项挑战。中译本在内容上忠于原著，力求科学、准确、流畅。囿于时间和知识水平等的限制，虽反复斟酌但难以尽善尽美，疏漏之处在所难免，敬请各位专家和广大读者批评和指正。

希望《精编免疫学实验指南》中译本的出版，能对国内免疫学研究及相关学科领域的进一步发展起到推动作用。

曹雪涛

2008 年 6 月 12 日于第二军医大学

前言

本实验指南是《现代免疫学方法》(*Current Protocols in Immunology*, CPI) 的精华版。本指南详细完整地介绍了 CPI 中的主要技术和方法。本书的对象是免疫学研究人员和已学过免疫学理论的本科生和研究生, 本书对其他相关科研工作者也有很好的参考价值。

尽管掌握了本书的技术有利于读者用免疫学方法设计和完成实验, 但本书并不能代替免疫学的高级培训计划, 也不能代替免疫学教科书。此外, 为了更好地了解免疫学的术语和概念, 读者应当在管理规范化的免疫学实验室中学习, 以获得基本技术和安全方面的培训。

本实验指南的框架

本指南以章计。各章中有单元, 每个单元介绍一种方法并包括一个以上完整的操作方案(附有材料、操作步骤和参考文献)。本指南的框架与 CPI 相同, 虽然各章中的单元排列与 CPI 略有不同, 但单元的题目是相同的。

本指南中许多试剂和方法是共用的。为了避免操作方案过度复杂和重复, 本指南采用各单元和方案间的相互引用。附录 2 和附录 3 介绍了一些处理动物和细胞的常用技术。如果读者需要了解更多的相关技术, 可参考 CPI 或其他方法学书籍, 例如 *Current Protocols in Molecular Biology*、*Current Protocols in Cell Biology* 和 *Current Protocols in Protein Science* 等。

实验方案

本指南的各单元中常有多组方案, 每个方案又有一系列步骤。各单元中首先列出基本方案, 基本方案是总体介绍或应用最广泛的技术。备选方案用不同的设备或试剂达到同样的实验结果, 由于所选材料不同, 方法也与基本方案有所差异。辅助方案介绍的是执行基本方案或备选方案所需要的其他步骤, 这些步骤分开描述是因为它们可能被本指南的其他部分引用, 或它们的操作过程独立于基本方案和备选方案。

试剂和溶液

每一个方案所需试剂和溶液都列在步骤的前面, 包括共用的储存溶液、常用的缓冲液和培养基以及各方案需要的特殊溶液。附录 1 列出所有溶液的配方。需要特别注意的是, 在不同单元中, 一些溶液的名称相同(如溶解缓冲液), 但配方不同。因此, 必须用相应的配方制备所需的试剂。为避免混淆, 在附录 1 中, 每一个试剂的名称后面都有附加说明列出使用该配方的单元。但常用溶液和缓冲液(如 TE 缓冲液)没有附加说明。

注: 在本指南的所有方案和附录中, 均必须用去离子双蒸水配制各种试剂和溶液。需要无菌操作的方案会特别注明。

设备

在每个方案的材料中，均列有该方案所需的特殊设备和器材。本指南虽未列出各方案所需的全部物品，但列出了实验室不常用的、特殊规格的或需要特别准备的设备和器材。实验室所需的常用设备列于后表，这些设备广泛应用于本指南。

产品供应商

本指南介绍了化学试剂、生物试剂和设备的产品供应商。某些注明的品牌已证明是质量最好的或者是市场上仅有的商品，或者是该方案的作者指定在方案中使用的品牌。后一种情况有助于新手在实验中应用。有经验的研究者也可以用他们熟悉的品牌做同样的实验。

参考文献

本指南仅在每个单元的最后列出该单元最基本的参考文献。如果读者想了解更多本指南中各方法的背景和应用，可参考 CPI。

安全注意事项

按照本指南各方案进行实验操作时，读者应避免直接接触下列危险物质：①放射性物质；②化学毒品或致癌剂或致畸剂；③病原性或感染性生物制剂，包括健康人和患者来源的标本；④重组 DNA 构建物。本指南仅做了有限的提醒。读者必须遵循良好的实验室规范，审慎操作和预防危险。读者有责任了解操作危险物质时的危险性，严格执行厂商、地方和国家安全部门订立的安全操作规程。必须有安全许可证才能使用放射性物质，而且要遵守国家的放射安全规定。所有活体动物的实验必须遵循动物安全规范。

有些免疫学实验有感染人类疾病的潜在危险，这些实验需要在有一定生物安全级别的实验室进行。生物安全级别 1 (BL-1) 针对普通环境中普遍存在的微生物，需要执行标准的微生物学规范，包括使用机械的移液设备、每天消毒工作环境、穿工作服、适当的洗手以及禁止在实验室进食和吸烟等。BL-2 针对正常健康个体中有中等致病性的病原体，实验室需要更严格的洁净条件，要有一些专门设备（如生物安全柜）和对实验室废弃物的高压灭菌等。BL-3 针对能引起严重疾病的微生物，要求实验室内部完全密闭，有单向气流，有双门进入系统等。必须在生物安全柜中操作各种组织；样本离心要在密闭的、带有安全盖的离心管中进行；必须穿特殊工作服并戴手套。BL-4 针对那些即使偶然接触也能威胁生命疾病的微生物，安全措施包括：进入工作区时按程序更换特种工作服、废弃物的消毒、严格训练所有实验室工作人员、使用 II 类生物安全柜（可物理性分隔放置样本）。如使用低等级的生物安全柜则必须连接正压通风个体生命支持系统。除了需要偶然处理大量组织样本或处理能产生气溶胶的样本以外，大多数使用含有血源病原体样本的实验室只要求 BL-2 安全级别。BL-3 实验室用于研究更危险的病原体，包括 HIV。针对特定病原体的、更详细的实验室安全级别和预防措施请参考下列标准：《微生物学和生物医学实验室生物安全》(Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Health and Human Services Publication # 88-8395, U. S. Government

Printing Office, Washington, D. C.) 和《BL-2/3 的研究实验室中安全操作 HIV》(Working Safely with HIV in the Research Laboratories Biosafety Level 2/3. Occupational Safety and Health Branch, Division of Safety, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)。

致谢

John Wiley & Sons 公司的编辑人员对本指南提供了支持和帮助, 包括 Tom Downey、Amy Fluet、Scott Holmes、Susan Lieberman、Maria Monte、Kathleen Morgan、Allen Ranz、Joseph White 和 Elizabeth Harkins。感谢前 CPI 编辑 Ada Kruisbeek 博士的奉献, 她的策划对本实验指南和 CPI 都是非常重要的。感谢 CPI 丛书的编辑 Richard Coico, 他对 CPI 内容的实时更新起了关键作用, 使本实验指南具有新的活力。感谢我们实验室的同事以及全世界各地学院实验室和商业实验室的同仁, 他们为本手册提供了方法和材料, 贡献了许多有价值的免疫学经验。

实验室标准设备

高压灭菌设备	离心机及配套转子, 低速冷冻离心机
β 液体闪烁计数仪 (β 液闪仪) 和 γ 计数仪	($<3000\text{r/min}$), 一些实验需要超速离心机 ($20\,000\sim80\,000\text{r/min}$)、大容量低速离心机 (如 Beckman J-6M) 或带有 96 孔板套筒的、能离心 96 孔板的离心机
Geiger 计数仪	微量离心机
辐射防护装备	生物安全柜, 带组织培养罩或层流罩; 空气过滤器和气流维持装置以防培养细胞和研究者之间交叉污染
同步细胞收集器, 用于收集微孔培养的 ^3H TdR 标记的细胞	超净台, 细胞培养用
过滤装置, 将酸性沉淀物收集到硝酸纤维素膜或其他滤膜上	显微镜和倒置显微镜
X 射线胶片暗盒和增感屏	CO_2 培养箱, 除了特别提及, 保持饱和湿度, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 浓度
暗室和显影盘, 或 X-Omax 自动 X 射线显影机	37°C 培养箱
灯箱, 用于观察 X 射线胶片	通风橱, 操作挥发性或腐蚀性化学物质
凝胶电泳装置, 根据需要配置不同规格的水平电泳仪和垂直电泳仪	冰箱, 4°C , -20°C
电源, 300V , 200mA 的电源, 用于琼脂糖电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳	超低温冰箱, -70°C
干胶仪	液氮和液氮罐
UV 透照仪	微波炉, 用于加热融解琼脂或琼脂糖烤箱
宝利莱一次成像照相机, 用于染色凝胶的拍照	分析天平和制备天平
塑料袋封口器	

微量滴定板读板仪（酶联仪）和荧光酶联仪	块，用于试管和微量离心管孵育
pH 计	血细胞计数板
紫外分光光度计、可见光分光光度计和比色皿	制冰机
真空干燥仪	计算机和打印机
真空吸引器	裁纸板，大规格
多头（细胞）收集器	移液器和移液枪头，不同规格，可调；或多道移液器
组分收集器	涡旋振荡器
冷冻干燥机	摇床
磁力搅拌器和搅拌子	温控水浴锅，37℃或所需温度
便携式加热块，可控稳定加热的金属	水纯化系统，或玻璃蒸馏水系统，制备实验用水

器 具

烧杯和烧瓶，各种规格	Parafilm 封口膜
玻璃瓶（如 Wheaton 公司）	pH 试纸
洗瓶	吸管，有刻度，无菌，或巴氏吸管
本生灯	塑料盒，各种规格
套管	透明胶带纸和纸质胶带纸
细胞刮，无菌（如 Costar 公司）	尖嘴钳
夹具	试管和试管架，各种规格
一次性手套和石棉手套	放射性废物桶，液体和固体分别储存
冰桶	剃刀和刀片
实验工作服，包括一次性的	解剖刀和刀片
记号笔	环形架
微量离心管，1.5ml	橡皮圈
载玻片和盖玻片	橡皮塞
研钵和研杵	防护眼镜

推荐的基础读物

Abbas, AK and Lichtman, AH. 2003. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. WB Saunders, Philadelphia.

Delves, PJ and Roitt, IM. (eds.) 1998. The Encyclopedia of Immunology, 2nd ed. Academic Press, San Diego, Calif.

Golding, JW. 1996. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 3rd ed. Academic Press, San Diego, Calif.

Goldsby, RA, Kindt, TJ, Osborne, BA and Kuby, J. 2003. Immunology, 5th ed. WH Freeman, New York.

Janeway, CA, Travers, P, Walport, M, and Shlomchik, MJ. 2004. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 6th ed. Garland, New York.

Mestecky, J, Lamm, ME, Strober, W, Bienenstock, J, McGhee, JR, and Mayer, L. 2004. Mucosal Immunology, 3rd ed. Academic Press, San Diego, Calif.

Paul, WE. 2003. Fundamental Immunology, 5th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia.

Rich, RR, Fleisher, TA, Shearer, WT, Kotzin, BL, and Schroeder, HW Jr. (eds.) 2001. Clinical Immunology: Practice and Principles, 2nd ed. Mosby Publisher, St Louis.

Roitt, I, Brostoff, J, and Male, D. 2001. Immunology, 6th ed. Mosby Publisher, St. Louis.

John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, and Warren Strober.

[孙卫民 (前言)]

目 录

译者序

前言

第一章 免疫应答导论	1
单元 1.1 酶联免疫吸附试验	1
基本方案 间接 ELISA 法检测特异性抗体	2
备选方案 1 直接竞争 ELISA 法检测可溶性抗原	4
备选方案 2 抗体夹心 ELISA 法检测可溶性抗原	5
备选方案 3 双抗体夹心 ELISA 法检测特异性抗体	7
备选方案 4 夹心 ELISA 法检测同种型	9
备选方案 5 直接细胞 ELISA 法检测细胞表面抗原	9
备选方案 6 间接细胞 ELISA 法检测抗细胞表面抗原的特异性抗体	11
辅助方案 十字交叉连续稀释分析法 (criss-cross serial-dilution analysis) 测定试剂最适 浓度	12
单元 1.2 多克隆抗血清的制备	14
基本方案 使用弗氏佐剂制备多克隆抗体的免疫接种法	15
备选方案 使用其他佐剂制备多克隆抗体的免疫接种法	16
辅助方案 从血液中制备血清	17
单元 1.3 单克隆抗体的制备	18
基本方案 1 单克隆抗体制备中的免疫接种	19
基本方案 2 细胞融合与杂交瘤分选	20
辅助方案 1 杂交瘤培养上清的筛选分析	23
辅助方案 2 杂交瘤的建系	23
辅助方案 3 有限稀释克隆法	24
辅助方案 4 克隆和扩增用培养基的制备	25
单元 1.4 单克隆抗体培养上清与腹水的制备	26
基本方案 1 单克隆细胞培养上清的制备	26
备选方案 1 单克隆细胞培养上清的大规模制备	27
备选方案 2 杂交瘤或细胞系细胞的大规模制备	27
基本方案 2 含有单克隆抗体的腹水制备	28
单元 1.5 免疫球蛋白 G (IgG) 的纯化	29
基本方案 1 硫酸铵沉淀和凝胶过滤层析	29
基本方案 2 蛋白 A 交联琼脂糖凝胶亲和层析	31
备选方案 1 蛋白 G 交联琼脂糖凝胶亲和层析	32
备选方案 2 抗大鼠 κ 链单克隆抗体交联琼脂糖凝胶亲和层析	33

单元 1.6 免疫球蛋白 G (IgG) 片段的水解	34
基本方案 1 木瓜蛋白酶水解 IgG 成 Fab 片段摸索性试验	34
基本方案 2 木瓜蛋白酶水解 IgG 获取 Fab 片段的大量制备	35
基本方案 3 胃蛋白酶水解 IgG 成 F (ab') ₂ 片段的摸索性试验	36
基本方案 4 胃蛋白酶水解 IgG 获取 F (ab') ₂ 片段的大量制备	37
备选方案 用预先活化的木瓜蛋白酶水解 IgG 制备 F (ab) ₂	38
单元 1.7 免疫球蛋白 M (IgM) 和免疫球蛋白 D (IgD) 的纯化	39
基本方案 1 用透析和凝胶过滤层析法纯化 IgM	39
备选方案 1 硫酸铵沉淀法纯化 IgM	39
备选方案 2 甘露聚糖结合蛋白亲和纯化 IgM	40
备选方案 3 IgM 纯化试剂盒	41
基本方案 2 凝集素亲和层析法纯化小鼠 IgD	41
单元 1.8 抗体可变区 (V 区) 的克隆、表达和修饰	42
基本方案 1 通过使用冗余引物克隆和表达免疫球蛋白可变区	43
辅助方案 TA 载体的制备	48
基本方案 2 用 ELISA 法鉴定转染细胞分泌的抗体分子	49
基本方案 3 转染细胞分泌抗体分子的鉴定	50
单元 1.9 核酸免疫	52
基本方案 1 小鼠注射接种 DNA	53
基本方案 2 小鼠基因枪接种 DNA	55
辅助方案 1 包裹 DNA 的金粉颗粒的制备	56
辅助方案 2 制备包裹有 DNA 的金粉颗粒的样品管	57
辅助方案 3 基因枪接种中氮气压力和颗粒大小的最优化	59
第二章 小鼠淋巴细胞功能的体内体外分析	61
单元 2.1 小鼠单个核细胞的分离	63
基本方案 从脾脏、胸腺和淋巴结制备细胞悬液	63
辅助方案 1 去除脾脏细胞悬液中的红细胞	63
辅助方案 2 一步梯度法去除死细胞	64
单元 2.2 磁珠法分离 T 细胞和 B 细胞	64
基本方案 1 用 AUTOMACS 系统进行总 T 细胞、CD4 ⁺ 细胞或 CD8 ⁺ T 细胞的自动分离	64
基本方案 2 使用 AUTOMACS 系统进行 B 细胞的自动分选	65
基本方案 3 使用 AUTOMACS 系统进行辅助细胞的自动分选	66
备选方案 1 用磁性分选柱手工操作分离淋巴细胞	66
基本方案 4 用 AUTOMACS 系统自动分选 CD4 ⁺ CD25 ⁺ 抑制性细胞	67
备选方案 2 用磁性分选柱手工操作分离 CD4 ⁺ CD25 ⁺ 抑制性细胞	68
单元 2.3 树突细胞的分离	69
基本方案 1 塑料黏附和 EA 玫瑰花结富集 DC	70
辅助方案 胶原酶消化制备脾脏细胞悬液	72

基本方案 2 用小鼠骨髓前体细胞培养树突细胞 (DC)	73
单元 2.4 从小鼠脾脏分离小鼠天然杀伤细胞	75
基本方案	75
单元 2.5 B 细胞功能的检测	77
基本方案 1 抗原特异性的抗体产生	77
基本方案 2 Jerne-Nordin PFC 测定法	81
基本方案 3 Cunningham-Szenberg PFC 测定法	83
备选方案 1 改良 Jerne-Nordin PFC 测定法用于型特异性反应	85
备选方案 2 改良 Jerne-Nordin PFC 测定法用于测定多克隆抗体反应	85
辅助方案 1 制备琼脂糖包被的玻片	85
辅助方案 2 制备 Cunningham-Szenberg 小室	86
辅助方案 3 三硝基苯半抗原 (TNP) 偶联 SRBC	86
辅助方案 4 蛋白质 A 偶联 SRBC	87
辅助方案 5 制备 TNP-卵白蛋白	88
辅助方案 6 用 Percoll 梯度离心纯化静息 B 细胞	88
单元 2.6 B 淋巴细胞活化的早期事件	90
基本方案 1 BCR 诱导的 B 细胞内钙变化	90
基本方案 2 蛋白质酪氨酸磷酸化的分析	91
基本方案 3 细胞大小与 B 细胞活化分子表达的分析	92
单元 2.7 B 细胞功能的增殖检测方法	93
基本方案 抗 IgM 与 LPS 刺激的 B 细胞增殖	93
备选方案 1 用 8-巯基喹啉 (8-MG) 刺激 B 细胞多克隆活化	94
备选方案 2 用蛋白激酶 C 激活剂及钙离子载体刺激 B 细胞多克隆活化	95
备选方案 3 硫酸葡聚糖与 poly (I : C) 刺激 B 细胞多克隆活化	95
备选方案 4 细胞数量增加的定量	95
单元 2.8 BrdU 检测 T 细胞和 B 细胞增殖	96
基本方案	96
单元 2.9 采用细胞内荧光染料 CFSE 检测淋巴细胞的迁移和增殖	97
基本方案 淋巴细胞的 CFSE 标记	97
辅助方案 流式细胞仪分析 CFSE 标记的细胞	99
单元 2.10 细胞毒性 T 淋巴细胞的诱导及检测	101
基本方案 1 从 CTL 前体中诱导细胞毒性	101
基本方案 2 铬释放法分析 CTL 活性	103
辅助方案 1 次要组织相容性抗原的小鼠体内应答	105
辅助方案 2 病毒抗原体内免疫小鼠	105
辅助方案 3 TNP 修饰靶/刺激细胞	106
辅助方案 4 病毒感染靶/刺激细胞	106
备选方案 1 多克隆 CTL 活性的诱导	106
备选方案 2 CTL 再定向杀伤活性的检测	107

单元 2.11 T 淋巴细胞增殖实验	107
基本方案 1 未致敏 T 淋巴细胞的活化	107
备选方案 1 用抗体激活未致敏的 T 细胞	109
备选方案 2 混合淋巴细胞增殖实验	110
辅助方案 1 从抗原呈递细胞或刺激细胞悬液中剔除 T 淋巴细胞	110
辅助方案 2 辅助/刺激细胞的灭活	111
基本方案 2 致敏 T 细胞的活化	112
基本方案 3 $CD4^+CD25^+$ T 细胞的活化和抑制功能的检测	113
备选方案 3 $CD4^+CD25^+$ T 细胞抑制功能的两步法检测: 短期活化和扩增 $CD4^+CD25^+$ T 细胞并分析其抑制功能	114
单元 2.12 T 细胞克隆的建立	115
基本方案 1 产生和维持同种反应性 Th 和 CTL 克隆	115
基本方案 2 用可溶性蛋白抗原诱导 Th 克隆	116
辅助方案 1 制备刀豆蛋白 A 活化的上清 (Con A 上清)	118
辅助方案 2 制备混合淋巴细胞培养上清 (MLC 上清)	118
辅助方案 3 制备 PMA 激活的 EL-4 淋巴瘤细胞上清 (EL-4 上清)	119
辅助方案 4 用显微操作的方法克隆	119
单元 2.13 制备小鼠 T 细胞杂交瘤	120
基本方案 细胞融合和 T 细胞杂交瘤的选择	120
辅助方案 1 筛选表达 CD3-TCR 原始杂交瘤	123
辅助方案 2 筛选抗原特异性的杂交瘤	124
单元 2.14 检测凋亡和其他形式的细胞死亡	125
基本方案 1 用活细胞或荧光染料定量细胞活性	125
基本方案 2 DNA 裂解片段的定量	126
备选方案 计数放射性标记的 DNA 定量细胞中 DNA 片段	127
辅助方案 1 用 ^{125}I UdR 和 ^{51}Cr 放射性标记细胞核	127
辅助方案 2 用 ^3H TdR 放射性标记细胞核	128
第三章 细胞活化的生物化学	129
单元 3.1 淋巴细胞活化过程中肌醇磷脂周转的分析	130
基本方案 1 通过道威克斯 (DOWEX) 离子交换层析分析 $[^3\text{H}]$ 肌醇磷酸	130
备选方案 通过 HPLC 方法分析 $[^3\text{H}]$ 肌醇磷酸	131
基本方案 2 通过薄层层析方法分析肌醇磷脂	132
单元 3.2 抗磷酸化酪氨酸的印迹检测	133
基本方案 抗磷酸化酪氨酸印迹检测的准备及分析	133
备选方案 使用 ^{125}I 标记蛋白 A 进行检测	135
单元 3.3 免疫复合物方法检测酪氨酸蛋白激酶	135
基本方案 酪氨酸蛋白激酶的免疫沉淀和自身磷酸化检测	136
备选方案 1 蛋白激酶对外源底物的磷酸化检测	138
备选方案 2 蛋白激酶对外源底物的磷酸化检测	138

单元 3.4 识别特异性酪氨酸磷酸化多肽抗体的制备	139
基本方案 1 多克隆抗磷酸肽抗体的制备	139
基本方案 2 制备抗磷酸肽的单克隆抗体	141
辅助方案 1 肽的合成	144
辅助方案 2 肽段偶联到 Affi-Gel 10 亲和性基质	144
辅助方案 3 磷酸酪氨酸偶联到 Affi-Gel 10 亲和基质	145
单元 3.5 T 细胞中丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 活性分析	146
基本方案 1 免疫复合物蛋白激酶测定	146
基本方案 2 固相蛋白激酶法检测 JNK 活性	147
基本方案 3 SDS-PAGE 后原位检测 JNK 蛋白激酶活性 [“胶内”(IN-GEL) 激酶测定]	149
基本方案 4 利用磷酸化位点特异性抗体检测 MAPK 的活化	150
辅助方案 制备 GST-MAPK 底物融合蛋白	151
单元 3.6 脂筏的分离和应用	153
基本方案 通过蔗糖梯度浮选法制备去污剂抗性的膜并通过免疫印迹对蛋白质进行分析	153
备选方案 用离心法制备去污剂抗性的膜	156
辅助方案 1 脉冲追踪方法分析去污剂抗性的膜蛋白	157
辅助方案 2 通过放射性标记检测去污剂抗性的膜蛋白的全部组分	157
辅助方案 3 定量高效薄层色谱法 (HP-TLC) 进行 DRM 脂质分析	158
辅助方案 4 DEAE 葡聚糖凝胶的制备	161
辅助方案 5 C18 反相色谱柱的制备	162
辅助方案 6 用甲基- β -环式糊精去除胆固醇来破坏脂筏	163
辅助方案 7 甲基- β -环式糊精 (MBCD) 处理去除胆固醇的动力学测定	163
辅助方案 8 使用 MBCD-胆固醇复合物进行细胞胆固醇去除	164
第四章 免疫荧光和细胞分离	166
单元 4.1 细胞制备和试剂	166
基本方案 1 单细胞表面抗原的免疫荧光标记	166
基本方案 2 固定和渗透单细胞的细胞内抗原的免疫荧光标记	167
辅助方案 1 用异硫氰酸荧光黄 (FITC) 偶联抗体	169
辅助方案 2 长臂生物素偶联抗体	170
备选方案 1 未固定细胞胞内抗原的免疫荧光检测	170
备选方案 2 用 7-氨基放线菌素 D (7-AAD) 标记死细胞	171
单元 4.2 流式细胞仪分析技术-BD 公司出品的流式细胞仪	172
基本方案 FITC 偶联抗体的单色分析	173
辅助方案 1 用校准微球和 FACSCComp 软件进行仪器检测	175
辅助方案 2 单色分析区分活细胞和死细胞	176
备选方案 1 FITC 和 PE 偶联抗体的双色分析	177
辅助方案 3 双色分析区分活细胞和死细胞	177

备选方案 2 三色分析	178
备选方案 3 四色分析	178
第五章 细胞因子及其受体	181
单元 5.1 IL-2 和 IL-4 的检测	183
基本方案 采用 CTLL-2 细胞检测小鼠 IL-2 和 IL-4	183
备选方案 1 采用 CTLL-2 细胞检测人 IL-2	186
备选方案 2 采用 CT. 4S 细胞检测小鼠 IL-4	186
备选方案 3 采用 CT. h4S 细胞检测人 IL-4	187
辅助方案 1 白细胞介素或 T 细胞生长因子 (TCGF) 单位的计算	187
辅助方案 2 小鼠 CTLL-2 细胞的维持	188
辅助方案 3 小鼠 CT. 4S 细胞的维持	189
辅助方案 4 小鼠 CT. h4S 细胞的维持	189
单元 5.2 IL-10 的检测	190
基本方案	190
单元 5.3 IL-12 的检测	191
基本方案 人和小鼠 IL-12 p75 异二聚体的 ELISA 检测方法	192
备选方案 人和小鼠 IL-12 p40 亚基的 ELISA 检测	193
单元 5.4 IL-13 的检测	193
基本方案	193
单元 5.5 IL-15 的检测	194
基本方案	194
单元 5.6 IL-18 的检测	196
基本方案	196
单元 5.7 γ 干扰素的检测	197
基本方案	197
单元 5.8 流式细胞仪检测细胞内因子	199
基本方案 细胞内因子的荧光标记	199
辅助方案 1 PMA 和 ionomycin 激活 T 细胞	200
辅助方案 2 抗原活化 T 细胞	201
辅助方案 3 固定和冻存 PBMC	202
辅助方案 4 PBMC 的细胞表面标记	202
辅助方案 5 用荧光标记的抗细胞因子抗体标记活化细胞内的细胞因子	203
单元 5.9 流式细胞仪检测细胞因子受体	204
基本方案 用抗受体单克隆抗体检测人和小鼠的细胞因子受体	204
备选方案 1 用标记的细胞因子检测细胞因子受体	206
备选方案 2 多参数分析检测淋巴细胞亚群细胞因子受体的表达	207
辅助方案 1 单克隆抗体和细胞因子的滴定	208
辅助方案 2 评价检测试剂	209
单元 5.10 用流式细胞仪检测细胞因子的分泌和分离分泌细胞因子的细胞	210

基本方案 细胞因子分泌实验	210
备选方案 1 PBMC 分泌细胞因子的快速检测	212
备选方案 2 全血细胞分泌细胞因子的快速检测	213
单元 5.11 ELISPOT 方法检测分泌细胞因子的细胞	214
基本方案	214
单元 5.12 α -、 β -和 γ -干扰素诱导的抗病毒活性的检测	218
基本方案 小鼠干扰素诱导的抗病毒活性的检测	218
辅助方案 1 病毒培养体系的建立	220
辅助方案 2 抗体中和实验	220
备选方案 人干扰素诱导的抗病毒活性的检测	221
单元 5.13 趋化因子超家族的生物学反应	221
基本方案 1 微型趋化实验检测趋化因子对粒细胞的趋化	221
备选方案 1 微型趋化实验检测趋化因子对单核细胞的趋化	226
备选方案 2 微型趋化实验检测趋化因子对淋巴细胞的趋化	227
辅助方案 细胞外基质蛋白包被聚碳酸酯膜	228
基本方案 2 趋化因子诱导的淋巴细胞内游离钙离子的检测	228
第六章 天然免疫	231
单元 6.1 小鼠巨噬细胞的分离	232
基本方案 1 小鼠腹腔巨噬细胞的分离	232
基本方案 2 小鼠骨髓巨噬细胞的分离和培养	233
单元 6.2 小鼠巨噬细胞的表型检测	234
基本方案 直标法检测小鼠巨噬细胞的表型	235
备选方案 间接法检测小鼠巨噬细胞的表型	236
单元 6.3 人单核/巨噬细胞的表型检测	237
基本方案	237
单元 6.4 小鼠巨噬细胞的活化	239
基本方案 小鼠巨噬细胞的活化	239
辅助方案 炎性小鼠巨噬细胞的活化	240
单元 6.5 巨噬细胞一氧化氮的检测	241
基本方案	241
单元 6.6 巨噬细胞吞噬功能和杀伤功能的检测	242
基本方案 1 巨噬细胞吞噬功能的检测	243
辅助方案 利用 FITC 区分胞外黏附和胞内吞噬的细菌	244
基本方案 2 巨噬细胞杀伤功能的检测	244
辅助方案 单核细胞增多性利斯特氏菌的制备	245
单元 6.7 巨噬细胞抗肿瘤活性的检测	246
基本方案 [^{111}In] 释放法检测巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤作用	246
辅助方案 [^{111}In] 标记肿瘤靶细胞	249
单元 6.8 Fc γ 受体介导的黏附作用和吞噬作用的检测	251

基本方案	Fc γ 受体介导的吞噬作用	251
辅助方案	Fc γ R介导的黏附作用	253
单元 6.9	干扰素介导的抗肿瘤作用	254
基本方案		254
单元 6.10	人 NK T 细胞的分离和扩增	255
基本方案 1	NK T 细胞的鉴定	255
基本方案 2	免疫磁珠法分离 NK T 细胞及后续扩增	256
备选方案 1	NK T 细胞的流式分选及扩增	258
备选方案 2	NK T 细胞的克隆	258
辅助方案	NK T 细胞的二次刺激和克隆	259
第七章	抗原加工处理和呈递	261
单元 7.1	抗原呈递细胞的选择和制备	261
基本方案	通过利斯特氏菌刺激制备腹腔巨噬细胞	262
备选方案 1	连续注射利斯特氏菌和豚蛋白胨后制备腹腔巨噬细胞	263
辅助方案 1	小鼠腹腔注射用利斯特氏菌的制备	263
备选方案 2	Con A 刺激的腹腔巨噬细胞的制备	264
备选方案 3	骨髓来源的巨噬细胞的制备	264
辅助方案 2	制备 L929 条件培养基	265
备选方案 4	制备 LPS 刺激的 B 细胞	266
单元 7.2	外源性抗原向 T 细胞的呈递	266
基本方案	一种抗原加工处理和呈递的检测体系	267
备选方案 1	用固定后的贴壁型抗原呈递细胞检测加工处理过的抗原肽	268
备选方案 2	用固定后的非贴壁型抗原呈递细胞检测加工处理过的抗原肽	269
备选方案 3	蛋白抗原致敏的细胞固定后检测抗原加工和处理	269
第八章	人类免疫学研究	271
单元 8.1	外周血和脐带血中分离单个核细胞	271
基本方案	Ficoll-Hypaque 梯度离心法分离单个核细胞	272
辅助方案	贴壁法去除单个核细胞中的单核细胞和巨噬细胞	272
单元 8.2	T 细胞亚群的分离纯化	273
基本方案	间接淘洗法分离 T 细胞亚群	273
备选方案	抗体依赖补体介导的细胞毒作用分离 T 细胞亚群	274
辅助方案 1	应用神经氨酸酶处理的绵羊红细胞玫瑰花环形成法分离 T 细胞	275
辅助方案 2	应用 AET 处理的绵羊红细胞玫瑰花环形成法分离 T 细胞	276
单元 8.3	免疫磁珠法纯化 T 细胞	276
基本方案		276
单元 8.4	免疫磁珠法分离 B 细胞亚群	278
基本方案		278
单元 8.5	单核细胞/巨噬细胞的分离	280
基本方案 1	贴壁法分离单核细胞	280