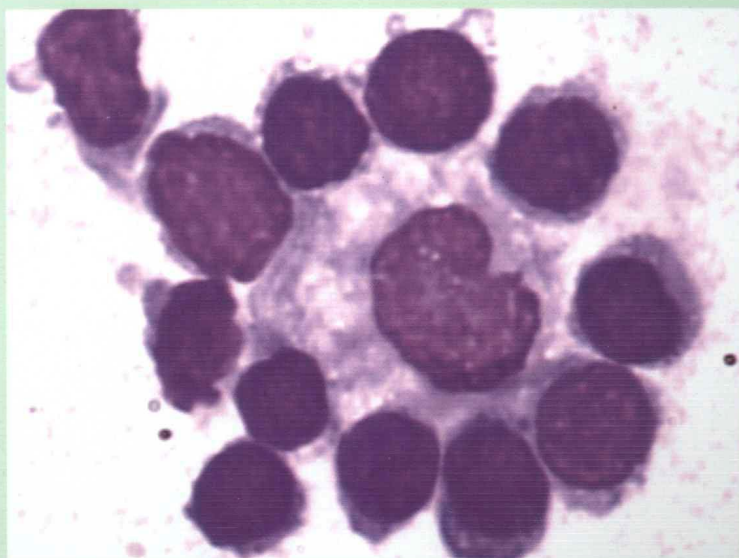


细胞免疫学 实验研究方法

Method of Experiment
and Investigation
in Cellular Immunology

◆ 主 编 / 孙黎飞



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

细胞免疫学 实验研究方法

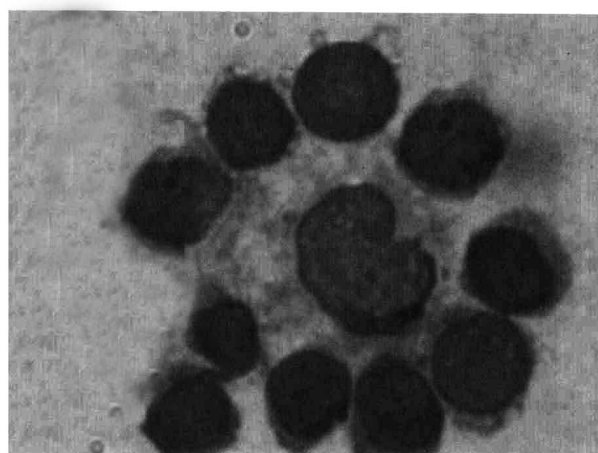
Method of Experiment and Investigation
in Cellular Immunology

主 编 孙黎飞

副主编 石 桦 黄 懿 张秋艳

编 委 马 琳 彭 奕 杨振东

许 刚 明 汇 党 琦



 人民军医 出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

细胞免疫学实验研究方法 / 张黎飞主编. —北京: 人民军医出版社, 2009. 7
ISBN 978-7-5091-2713-1

I. 细… II. 孙… III. 细胞学: 免疫学-实验-研究方法 IV. R391.12-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 087521 号

策划编辑: 郭伟疆 崔玲和 文字编辑: 顾 森 责任审读: 黄栩兵
出 版 人: 齐学进
出版发行: 人民军医出版社 经销: 新华书店
通讯地址: 北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编: 100036
质量反馈电话: (010) 51927290; (010) 51927283
邮购电话: (010) 51927252
策划编辑电话: (010) 51927272
网址: www.pmmp.com.cn

印刷: 潮河印业有限公司 装订: 恒兴印装有限公司
开本: 850mm × 1168mm 1/16
印张: 14.25 字数: 397 千字
版、印次: 2009 年 7 月 第 1 版 第 1 次印刷
印数: 0001 ~ 2000
定价: 188.00 元

版权所有 侵权必究
购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

内容提要

全书共 19 章，详细介绍了实验室基本设施、仪器设备、实验器材清洗消毒、试剂配制，细胞的提取、纯化、培养及与细胞免疫相关的生物学活性实验技术和研究方法。本书内容丰富、方法先进，并附有大量图解，操作简便易行，可作为普通高等医学院校本科生与研究生的实验辅助教材和工具书，也适用于临床检验和相关实验研究人员阅读参考。

前言

《细胞免疫学实验研究方法》一书涵盖了免疫细胞（包括造血干细胞和组织细胞）的分离、提取、纯化、培养、保存、增殖、活化和凋亡，以及细胞生物学活性的实验技术和研究方法，读者对象主要为普通高等医学院校本科生和研究生，可作为学习《医学免疫学》、《细胞生物学》和《医学遗传学》等课程的实验辅助教材和研究方法工具书，同时也适用于临床检验和相关实验研究人员阅读。

写这本书的初衷缘于笔者攻读研究生期间。那时，在上实验课和做课题时，相关的实验技术和研究方法都是师承口授，查阅文献，苦于没有一本系统的指导性工具书。研究生毕业后，笔者结合临床工作实践，参考了国内外文献，编写了这本书，希望能对相关人员提供一定的帮助。

本书由浅入深，从细胞免疫研究的原理到实验操作步骤和试剂配制方法，逐一详细阐述，并附有图解和图表，简明易懂，是笔者从事肿瘤与血液免疫学基础与临床工作多年的心得体会。许多实验技术的学习和研究方法的完善，得益于在第二军医大学免疫学教研室期间的学习实践。特别要感谢曹雪涛院士的言传身教和严谨治学，感谢田野苹教授的启迪和鼓励，感谢清华大学医学院免疫学实验室张明徽教授的鼎力相助。

鉴于笔者学识浅薄和经验受限，缺点和不足之处敬请同行专家批评指正。

孙黎飞

2009年1月17日

目 录

第 1 章 细胞免疫实验的设施和基本条件 / 1

第一节 常用无菌操作设施 / 1

第二节 常用实验室设备与器械 / 2

第三节 培养免疫细胞常用的器皿 / 6

第 2 章 培养器皿的清洗、包装与消毒 / 9

第 3 章 细胞培养用液 / 12

第一节 平衡盐溶液 / 12

第二节 常用细胞培养基和血清制备 / 18

第三节 其他常用培养液 / 20

第 4 章 制备免疫细胞悬液 / 22

第一节 实验所需的材料和试剂 / 22

第二节 制备单个核细胞悬液 / 23

第三节 去除细胞悬液中的红细胞 / 25

第四节 去除死细胞的方法 / 25

第五节 细胞计数 / 26

第六节 计算细胞活性 / 27

第 5 章 分离与纯化免疫细胞 / 28

第一节 分离人外周血细胞 / 28

第二节 分离和纯化 B 淋巴细胞 / 30

第三节 分离和纯化 T 淋巴细胞 / 34

第四节 纯化免疫细胞亚群 / 36

第五节 分离单核细胞 - 巨噬细胞 / 38

第六节 分离和纯化组织中的巨噬细胞 / 40

第七节 培养树突状细胞的方法 / 42

第 6 章 建立免疫细胞克隆 / 45

第一节 建立特异性 T 细胞株或 T 细胞克隆 / 45

第三节 制备人 T 细胞克隆 / 50

第五节 筛选单克隆细胞 / 54

第二节 利用小鼠脾细胞制备 T 细胞克隆 / 47

第四节 建立人 B 细胞克隆 / 53

第六节 细胞的培养冻存与复苏方法 / 55

第 7 章 造血干细胞的培养技术 / 58

第一节 配制骨髓细胞培养试剂 / 59

第三节 小鼠骨髓细胞集落形成试验 / 64

第二节 分离与纯化骨髓细胞 / 61

第四节 人骨髓和外周血造血干细胞的培养方法 / 68

第 8 章 用流式细胞仪检测免疫细胞 / 71

第一节 免疫细胞表面分化抗原和黏附分子 / 71

第三节 选择染色的方法和封闭免疫细胞的 Fc 受体 / 77

第五节 检测免疫细胞钙离子流入的方法 / 80

第七节 检测免疫细胞周期的方法 / 83

第二节 流式细胞术常用的染料和标记抗体 / 74

第四节 用流式细胞仪检测免疫细胞表面分子 / 79

第六节 检测免疫细胞活化的方法 / 81

第 9 章 免疫细胞的增殖实验 / 85

第一节 反映 DNA 合成的细胞增殖实验 / 85

第二节 反映免疫细胞能量代谢的增殖实验 / 88

第 10 章 免疫细胞的趋化活性和抗原提呈实验 / 91

第一节 免疫细胞趋化实验 / 91

第二节 专职抗原提呈细胞的抗原提呈实验 / 93

第 11 章 免疫细胞的细胞毒活性实验 / 96

第一节 抗体依赖细胞介导的细胞毒性实验 (ADCC) / 97

第二节 非抗体依赖细胞介导的细胞毒性实验 / 98

第三节 巨噬细胞活性实验 / 105

第 12 章 细胞凋亡实验 /110

第一节 概 论 /110

第三节 检测凋亡细胞的核小体与膜变异 /114

第二节 检测凋亡细胞的 DNA 碎片 /112

第四节 检测凋亡相关蛋白 /115

第 13 章 制备和修饰抗体 /119

第一节 选择和修饰免疫原 /119

第三节 免疫的程序 /123

第二节 选择动物和免疫佐剂 /123

第四节 单克隆抗体与杂交瘤技术 /124

第 14 章 检测与鉴定抗体的方法 /131

第一节 检测抗体免疫实验常用的器材与基本 条件 /131

第三节 常用检测抗原与抗体的免疫方法 /135

第五节 测定抗体的结合能力和蛋白质含量 /147

第二节 标记抗原和抗体 /131

第四节 免疫沉淀法和 Western 印迹实验 /140

第 15 章 检测单个 B 淋巴细胞分泌抗体 /151

第一节 溶血空斑试验 /151

第三节 抗半抗原方法 /156

第二节 酶联免疫方法检测单个淋巴细胞分泌 抗体功能 /155

第 16 章 纯化免疫球蛋白 /159

第一节 纯化免疫球蛋白 IgG/159

第三节 用亲和层析纯化半抗原抗体 /164

第五节 检测特异性抗原抗体的活性 /168

第二节 纯化免疫球蛋白 IgM/162

第四节 消化免疫球蛋白 /164

第 17 章 检测免疫细胞分泌的细胞因子 /169

第一节 概 论 /169

第二节 白细胞介素 -1/171

第三节 白细胞介素 - 2/173	第四节 白细胞介素 -3/175
第五节 白细胞介素 -4/177	第六节 白细胞介素 -5/178
第七节 白细胞介素 -6/179	第八节 白细胞介素 -7/181
第九节 白细胞介素 - 9/182	第十节 白细胞介素 -10/183
第十一节 白细胞介素 -11/185	第十二节 白细胞介素 -12/186
第十三节 白细胞介素 -13/188	第十四节 白细胞介素 -14/190
第十五节 白细胞介素 -15/190	第十六节 白细胞介素 -16/191
第十七节 白细胞介素 -17/191	第十八节 白细胞介素 -18/192
第十九节 白细胞介素 -8 和趋化因子家族 /192	第二十节 白细胞介素家族的新成员 /192
第二十一节 肿瘤坏死因子 /195	第二十二节 干扰素 /197
第二十三节 集落刺激因子 /202	第二十四节 免疫测定法检测细胞因子 /203
第二十五节 计算免疫细胞分泌细胞因子活性 单位的方法 /206	
第 18 章 细胞因子受体检测 /207	
第一节 概 论 /207	第二节 研究细胞因子受体的方法 /208
第 19 章 检测免疫细胞信号转导分子 /214	
第一节 检测免疫细胞核转录调节因子 /214	第二节 检测免疫细胞 cAMP/216
第三节 流式细胞仪检测免疫细胞内钙离子释 放 /217	
参考文献 /219	

细胞免疫实验的设施和基本条件

进行细胞免疫生物学活性研究的首要条件就是要获得、并能使其在体外保持模拟体内环境生长的免疫细胞，任何细菌、病毒及有害物质的刺激都能影响或改变培养细胞的生物学性质。因此，细胞在体外生长、传代的过程需要严格的无菌操作，才能确保培养的细胞在无菌的环境内生长。所以要求实验工作环境和培养条件必须空气清新、干燥和无烟尘，并保证无微生物污染和不受其他有害因素的影响。以下是普通实验室进行细胞培养必须具备的实验设施。

第一节 常用无菌操作设施

一、无菌操作室

无菌操作室的大小可根据实验室的需要而定，一般由更衣间、缓冲间和操作间三部分组成。操作间大小应适度，不宜太大或太小，最小也需能容纳两个人同时操作。缓冲间能保护无菌间的无菌环境，应适当宽敞，可放置 CO₂ 培养箱和小型离心机等。无菌操作间的净化要求应达到 GMP 认证的“百级净化”要求。

二、净化工作台

又称为超净工作台，是细胞培养最常用的基本无菌操作设施。其净化的原理是内设鼓风机，驱动空气通过高效过滤器净化后，让净化后的空气通过台面的空间，使工作场地构成无菌环境（图 1-1）。按照气流的方向不同，可将净化台分为：

1. 侧流式 净化后气流由净化台的左侧或右侧通过台面流向对侧。
2. 直流式 气流从下向上或从上向下流动。
3. 外流式 气流迎操作者面吹。

这三种净化台都能达到净化的效果，前两类能形成气流屏障保持台面无菌，但在净化气流和外界气体交界处可因气流的流动形成负压，使少许未净化气体混入，易发生污染。外流式气流向操作者迎面流动，外面的气流不易混入，但在做有害实验时，对操作者健康不利。在使用这一



图 1-1 双人单面超净台

类净化台时,可用有机玻璃把上半部遮住,让气流从下方通过。

根据净化台使用的滤垫微孔密度不同,不仅可滤掉细菌等微生物,对病毒的透过也有一定的防止作用。由于尘埃的堵塞,净化台内的滤垫应经常更换清洗,反之,则会降低净化作用。因此,净化台应放置在清洁无尘的无菌间内,在使用时要经常检查滤器是否淤滞,一旦发现气流变弱,如酒精灯火焰不摆动,或酒精灯火焰的方向不稳,均说明滤器阻塞,应及时更换。

三、生物安全柜

生物安全柜除了具有超净工作台的净化功能外,还具备过滤的空气排放系统,以避免进行无菌培养操作时,产生的化学气体和有害气体对操作人员的伤害。目前,许多实验室已经以生物安全柜取代净化台。

第二节 常用实验室设备与器械

一、常用实验设备

1. **细胞培养箱** 是模拟哺乳动物体内细胞生长环境研究的一种用于离体培养细胞的温控电热恒温箱,又称为 CO_2 培养箱(图1-2)。通过感应设置,箱内能恒定地提供5%浓度的 CO_2 ,使培养箱内保持一定的pH,通过箱内的水槽,还可以保持一定的湿度,避免培养液蒸发,给细胞创造一个比较理想的生长环境。蒸馏水为无菌水,应经常更换,同时放置抑制真菌生长的药物,以防水槽生霉。

2. **电热干燥箱** 用于烘干和干热消毒玻璃器皿。干热消毒时,温度要达到 160°C ,方可达到消毒目的。电热干燥箱一般带有鼓风机,鼓风机与升温应同时开始,可使箱内的温度均匀,待温度达到 100°C 时可停止鼓风。禁止先升温后鼓风,以防玻璃器皿突然遇到冷空气而炸裂。

3. **电热恒温水浴槽** 用于孵育血清和配制试剂时加温的水浴槽,温度一般设定为 37°C ;用于加热灭活血清的水浴槽,温度通常设定为 56°C 。水浴锅内的蒸馏水应经常更换,以防细菌和真菌生长。

4. **冰箱** 实验室的普通冰箱用以短时间储存各种细胞培养用的溶液、血清、酶、抗体和待培养的组织,而 -80°C 低温冰柜(图1-3)则用以储存时间在半年以内的细胞和组织,以及某些特定的抗体。冰箱内应保持清洁,禁止存放挥发、易燃和有毒的物质。低温冰箱内储存的细胞,应做好标记,以便取存物品时,缩短开冰箱门时间,以免影响冰箱的温度,对存储的细胞造成影响。

5. **显微镜** 实验室常用的显微镜主要为普通光学显微镜、倒置显微镜和荧光显微镜三种。普通光学显微镜用以细胞计数和观察染色与非染色细胞的一般形态,倒置显微镜(图1-4)可用于观察培养皿和培养瓶中的细胞,荧光显微镜可用于观察荧光标记的细胞情况。



图1-2 CO_2 培养箱

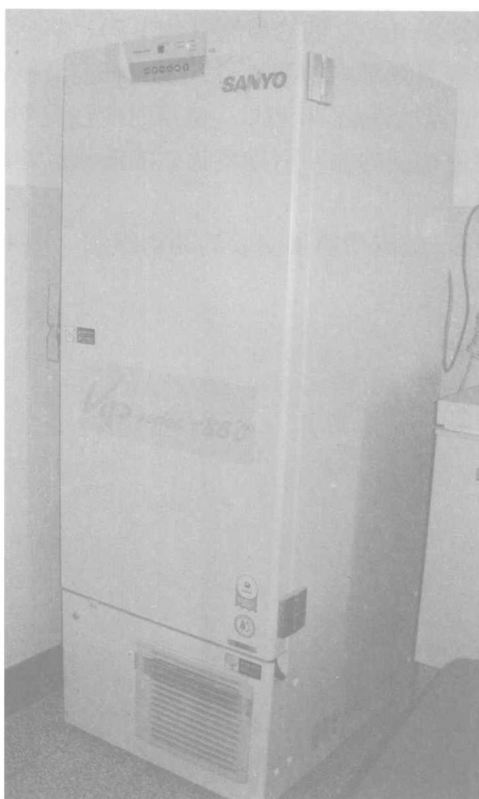


图 1-3 -80℃低温冰柜

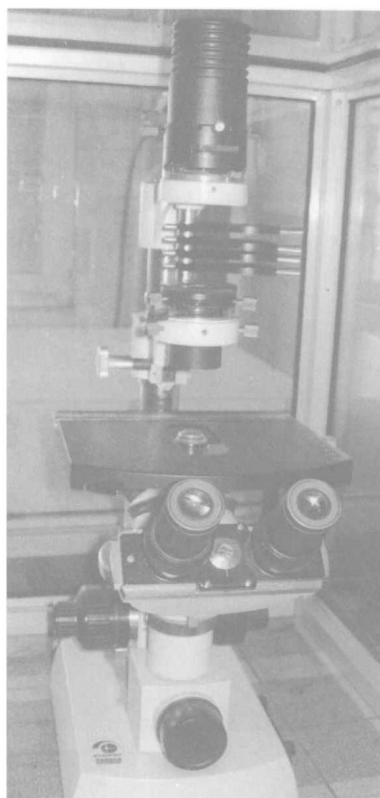


图 1-4 倒置显微镜

6. 纯水仪 细胞培养用水质量要求高，一般需要三蒸水，因此，一般实验室应至少备有玻璃蒸馏器（图 1-5）或纯水仪用于配制细胞培养用水。

7. 除菌器 由于高温消毒能破坏培养基、血清、消化酶、细胞因子、抗体和其他蛋白质中的营养成分，所以这些物质的除菌只能用过滤的方法进行。小型实验室可使用国产“正压过滤器”或 Costar 滤器系统（图 1-6）。对于规模较大的实验室，可选用 Zeiss 滤过装置。可根据其过滤的物质需要，选择不同型号、不同尺寸的微孔滤膜。

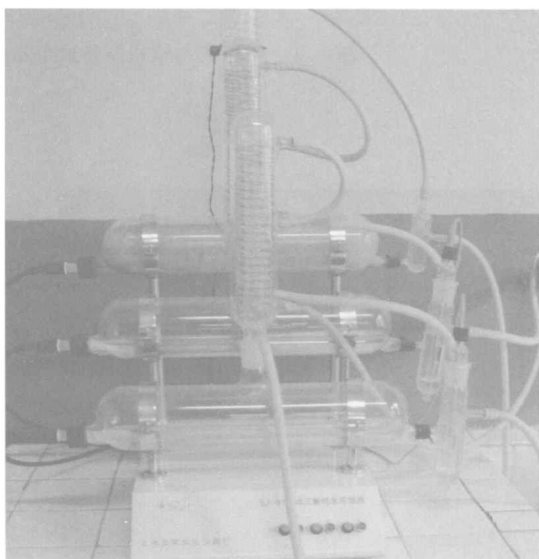


图 1-5 玻璃蒸馏器



图 1-6 Costar 滤器系统

4 细胞免疫学实验研究方法

8. 细胞冷冻储存器 长期保存细胞或菌种, 应选用温度 -196°C 的液氮罐 (图 1-7), 将所要储存的细胞或组织分装好, 做好记录, 储存在液氮罐内。经常观察液氮罐内的液氮量, 及时补充液氮, 以防液氮蒸发, 造成细胞死亡, 一般每两周需充液氮一次。液氮的温度低达 -196°C , 使用时应注意勿使其溅到皮肤上, 以免引起冻伤。向液氮储存器中注入液氮时, 要用特制的漏斗引导或长颈的液氮运输罐, 使液氮直达瓶底, 以防骤然低温引起液氮罐的瓶口焊接处裂开。

9. 组织捣碎机 为一种温控高速多用电动捣碎机, 用于捣碎所需要实验的动物组织 (图 1-8)。



图 1-7 -120°C 的液氮罐



图 1-8 组织捣碎机

10. 组织匀浆机 为电动高速低温组织匀浆机, 用于对所实验的组织捣碎后, 进行匀浆 (图 1-9)。

11. 超声细胞粉碎仪 利用强超声在液体中产生空化效应, 用于粉碎分离匀浆后分离的细胞或培养传代的细胞中, 分离其亚细胞结构和细胞内转染的病毒 (图 1-10)。

12. 酶联免疫检测仪 酶联免疫检测仪是一种酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 的专用仪器, 分为半自动和全自动两大类。其工作原理基本一致, 即利用比色法来分析抗原或抗体的含量 (图 1-11)。

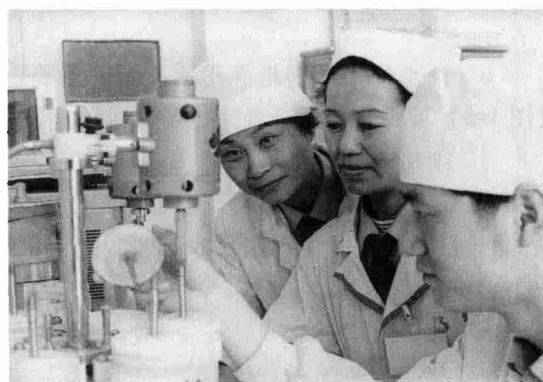


图 1-9 用组织匀浆机制备肿瘤组织

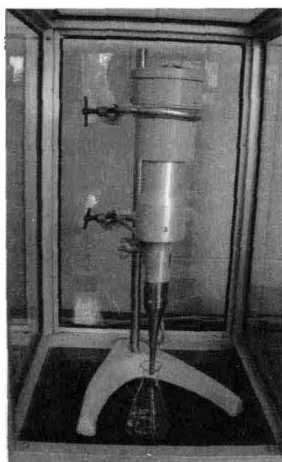


图 1-10 超声细胞粉碎仪



图 1-11 酶联免疫检测仪

13. 离心机 根据实验的要求不同,选择不同的离心机。普通的水平离心机或角转头离心机(图1-12)用于分离血液样本和离心普通试剂;细胞洗涤和分离应选用温度在4℃的低温离心机,离心裂解细胞内的病毒,则应选用超速低温离心机。

14. 加样器 加样器的种类很多,有可调式和固定式两种,又有单头和多头之分,加样的范围也从1μl到1 000μl不等,可根据实验室的需要选择备用。

15. 天平 实验室应具备普通天平和电子天平,根据称量物品时所要求的精确度,选择不同的天平称量(图1-13)。



图1-12 贝克曼大容量高速低温离心机



图1-13 电子天平

16. γ -计数器 用于检测核素标记细胞活性,用于免疫细胞增殖实验和细胞毒活性测定。

17. 电泳仪 分为蛋白质电泳和核酸电泳,可分别完成蛋白质分析和核酸电泳的分析(图1-14)。

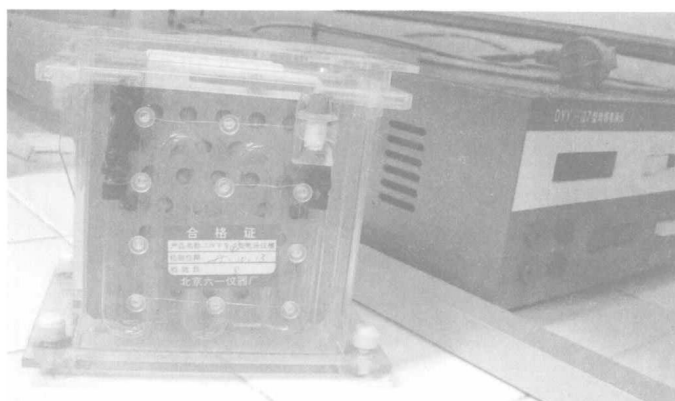


图1-14 转移电泳

18. 紫外分光光度计 用于检测核酸或蛋白质在紫外光谱区的吸光值,并藉此进行定量分析。(图 1-15 右)。

19. 基因扩增仪 用于免疫细胞的基因扩增和检测扩增的 DNA 片段的检测 (图 1-15 左)。

20. 化学发光分析仪 为酶促化学发光分析仪器,用于蛋白质(抗原、抗体和激素等)的化学发光免疫分析检测。

21. 涡旋振荡器和磁力搅拌器 用于配制细胞培养用液,以及分离和抗体纯化实验过程的搅拌混匀。

22. 细胞染色体病理分析系统 通过摄像镜头与采集卡把显微镜下的细胞图像传送至电脑的荧屏,用于放大、分析和打印图像诊断结果 (图 1-16)。



图 1-15 (左为 PE2400 基因扩增仪; 右为岛津紫外分光光度计)



图 1-16 细胞染色体病理分析系统

二、常用器械

免疫实验常用的器械有:解剖刀、解剖剪、眼科手术剪(直头和弯头的虹膜手术剪)、镊子、小尖镊子、持针器、止血钳等锋利尖锐的不锈钢器械,通常提前浸泡在 75% 乙醇中消毒备用。而碾磨瓶、不锈钢网(200 目)等,则须在应用之前包装后高压消毒备用。每次实验后应擦净血迹,晾干,置 75% 乙醇内浸泡消毒。注意保护刀锋,钝刀对组织有害,不利于细胞生长。

第三节 培养免疫细胞常用的器皿

免疫细胞培养器皿分为分离器皿和培养器皿两大类,主要用来分装血清和培养基,以及用于分离细胞和培养细胞(图 1-17)。



图 1-17 培养免疫细胞常用的器皿

一、分离血清常用器皿

1. 通常采用 400ml 或 200ml 无菌血袋，用于分离血清，也可用 100ml、250ml 和 500ml 的无菌玻璃瓶代替。
2. 无菌干燥青霉素瓶、瓶盖和封口膜，用于分装加热灭活后的无菌血清。以每次最小用量分装为宜，避免分装量过大，使实验剩余的血清在再次存储过程中造成污染，或因反复冻融破坏血清中的营养成分。
3. 常用 1ml、5ml 或 10ml 的无菌刻度吸管，用于分装血清和吸取细胞悬液。短玻璃吸管分为直头和弯头两种，直头用于吸加细胞悬液、加抗生素和为培养基调 pH 用；而弯头吸管多用于贴壁细胞传代时，酶消化后吹打细胞用。

二、制备细胞悬液常用的器皿

1. 不同规格的一次性无菌注射器和不同规格的针头，用于麻醉动物、解剖动物，以及冲洗小鼠骨髓。
2. 1ml、5ml、10ml、15ml 和 50ml 的玻璃离心管和锥形离心管，用于细胞的洗涤和抗体的标记。
3. 直径 8mm、10mm 的培养皿和无菌玻璃针芯，用于从组织中分离细胞。
4. 血细胞计数板、移液管、滴管、Eppendorf 管，用于细胞的计数、洗涤和离心。

三、培养细胞常用的器皿

1. 培养瓶 培养瓶有玻璃瓶和塑料瓶两种，主要分为250ml、200ml、75ml、50ml和25ml等规格，用于细胞的培养与传代。
2. 培养皿 直径有60mm、80mm和100mm等不同规格，可用于免疫细胞的培养和贴壁黏附实验。
3. 多孔培养板 分为6孔培养板、24孔培养板和96孔培养板等几种规格，主要用来进行细胞培养、单细胞克隆的筛选、细胞生长曲线的测定，以及细胞毒实验和免疫细胞增殖实验等研究。
4. 细胞冷冻储存管 有不同的规格，可根据培养细胞的需要选择，通常贮存细胞悬液的体积为1ml。
5. 其他 实验室还需要配备用于配制缓冲液和培养基的各种三角烧瓶、烧杯、量筒、漏斗、试管等玻璃器皿。