



TEXTBOOKS
NATIONAL PROJECT

国家级继续医学教育项目教材

免疫学及实验技术新进展

章晓联 主编

中华医学会组织编著



中华医学电子音像出版社
CHINESE MEDICAL MULTIMEDIA PRESS



| 国家级继续医学教育项目教材

免疫学及实验 技术新进展

章晓联 主编

中华医学电子音像出版社
CHINESE MEDICAL MULTIMEDIA PRESS

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

免疫学及实验技术新进展/章晓联主编. —北京: 中华医学电子音像出版社,
2018. 6

ISBN 978-7-83005-171-6

I. ①免… II. ①章… III. ①医学-免疫学-实验-研究 IV. ①R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 066127 号

网址: www.cma-cmc.com.cn (出版物查询、网上书店)

免疫学及实验技术新进展

MIANYIXUE JI SHIYAN JISHU XINJINZHAN

主 编: 章晓联

策划编辑: 史仲静 冯晓冬

责任编辑: 史仲静 王翠棉

校 对: 龚利霞

责任印刷: 李振坤

出版发行: 中华医学电子音像出版社

通信地址: 北京市东城区东四西大街 42 号中华医学会 121 室

邮 编: 100710

E-mail: cma-cmc@cma.org.cn

购书热线: 010-85158550

经 销: 新华书店

印 刷: 廊坊市团结印刷有限公司

开 本: 889mm×1194mm 1/16

印 张: 24.25

字 数: 620 千字

版 次: 2018 年 6 月第 1 版 2018 年 6 月第 1 次印刷

定 价: 98.00 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

编者

主 编 章晓联

副主编 马春红 魏 林 黄 曦 王佑春

编 者 (以姓氏汉语拼音为序)

- 白 虹 天津医科大学
- 陈 朗 武汉大学基础医学院
- 陈 强 武汉大学医学研究院
- 邓郁青 河北医科大学基础医学院
- 窦亚峰 武汉大学基础医学院
- 方 敏 华中科技大学同济医学院
- 冯 勇 武汉大学基础医学院
- 高劲松 中山大学南方学院
- 韩 莉 三峡大学医学院基础医学院
- 洪 海 中山大学医学院基础医学院
- 胡艺兰 武汉科技大学基础医学院
- 黄 曦 中山大学医学院基础医学院
- 隗 维 斯坦福大学医学院外科系亚洲肝脏中心 Stanford University,
School of Medicine, Department of Surgery, Asian Liver Center
- 李 舒 武汉大学基础医学院
- 梁晓红 山东大学基础医学院
- 刘光辉 武汉大学中南医院过敏科
- 刘 敏 武汉大学基础医学院
- 刘 胜 武汉大学基础医学院
- 刘 森 三峡大学医学院
- 刘万红 武汉大学基础医学院

- 刘 焰 武汉大学基础医学院
罗凤玲 武汉大学基础医学院
马春红 山东大学基础医学院
马运峰 西安交通大学基础医学院
潘 勤 武汉大学基础医学院
潘 璆 武汉大学基础医学院
彭 超 武汉大学中南医院过敏科
邱文洪 江汉大学医学院基础医学院
瞿少刚 南方医科大学
王宝菊 华中科技大学同济医学院附属协和医院
王 坤 武汉大学中南医院
王 瑾 武汉大学基础医学院
王佑春 中国食品药品检定研究院
魏 林 河北医科大学基础医学院
徐姗姗 武汉大学中南医院过敏科
殷 雷 武汉大学生命科学学院
曾瑞红 河北医科大学基础医学院
占玲俊 医科院医学实验动物研究所
张肆肆 武汉大学中南医院过敏科
章晓联 武汉大学基础医学院
赵颖岚 南方科技大学
郑 芳 华中科技大学同济医学院基础医学院
周媛媛 武汉大学基础医学院
朱 彬 华中科技大学同济医学院附属协和医院

主编简介



章晓联，女，二级教授，博士生导师。现任武汉大学基础医学院免疫学系系主任、湖北省过敏及免疫相关疾病重点实验室主任，病毒学国家重点实验室教授、博士生导师，武汉大学“珞珈学者”特聘教授。1997 年获得香港科技大学博士学位；1997—2001 年在美国马里兰大学作为博士后和研究专家；2005 年获得中国青年女科学家提名奖；2009 年入选国家“新世纪百千万人才工程”；2010 年获得国家杰出青年基金；2013 年获得湖北省首届医学领军人才荣誉称号；2013 年获得国务院政府特殊津贴。现任中华医学会微生物及免疫学会副主任委员，中国免疫学会理事；第十三届全国政协委员，湖北省武汉大学教学名师。

主要从事人类重要胞内病原微生物感染免疫及糖免疫学研究，主持和承担国家“十一五”“十二五”“十三五”重大传染病专项课题、973 课题、国家基金委杰出青年基金、重点及面上项目等。发表论文 150 篇，SCI 论文 103 篇，被 *Nature* 等高水平期刊他引 1000 余次，单篇被引最高 122 次。获湖北省自然科学一等奖、二等奖，中华医学科技二等奖，教育部自然科学二等奖；研究成果曾被 *Nature*、*Faculty of 1000* 等多次专题报道和评价；获授权发明专利 31 项。国际会议大会邀请报告 20 余次。主编出版《医学免疫学》《病毒免疫学》《感染免疫学》《免疫学双语实验技术指导》等教材和著作 7 部。

内 容 提 要

本书是一本立足于新世纪面向教学、科研和临床应用的免疫学实验最新进展的书籍。阐述了免疫学及相关实验技术的研究进展，内容涉及抗原-抗体体外反应、免疫细胞和免疫细胞功能的实验研究、免疫学新技术研究，同时还系统地介绍了常用的免疫学实验技术。本书内容具有系统性、实用性，既可以作为高等院校和科研院所的本科生和研究生教材，也可作为广大科研工作人员的实用参考书。

序 言

随着科学的发展,尤其进入新世纪以来,免疫学突飞猛进,出现了很多新的理论和新的技术,免疫学实验也与时俱进,紧跟时代的步伐。《免疫学及实验技术新进展》是一本立足于新世纪面向教学、科研和临床应用的免疫学实验最新进展的书籍。邀请参加编写的都是从事一线免疫学教学和科研,有着丰富的教学和科研指导经验,深厚扎实的理论基础,能够引领免疫学发展的方向,无论是在科研还是教学方面都取得了丰硕成果(教学、科研、教材编写等)的从事免疫学的专业人员。

本书编写的特点如下。

1. 本书具有免疫学及实验新技术的系统性、先进性和前沿性。免疫学迅猛发展,技术日新月异。本书既包括常用的经典免疫学实验技术,也介绍了一些新技术及其理论,以及常用的重要实验操作指南。全书共5篇,38章。

2. 本书还包括了一些免疫学最新发展的交叉学科实验技术及国际上最新的免疫学技术,如CAR-T免疫治疗、免疫与表观遗传学修饰、细胞自噬研究进展和流式细胞术、糖免疫学、非编码RNA与免疫相关技术和荧光标记假病毒成像技术等,在免疫研究中的应用。

3. 本书既可以作为高等院校和科研院所的本科生和研究生教材,也可作为广大科研工作者非常实用的科研参考书。本书系统介绍了各类免疫细胞的分离与功能分析技术(如不同器官特异性免疫细胞、记忆性T细胞、Treg/Breg、ILC等)、抗体和补体反应、过敏反应实验和多种感染免疫动物模型等。

本书的编写凝聚了编者的学识、经验、精力和艰苦工作,对他们的付出表示衷心感谢!我们真心希望这本紧扣时代发展的免疫学实验技术教材能满足广大读者教学、科研、临床应用的需要,同时也恳请广大专家和读者对本书中的不足之处提出宝贵意见。期待本书能在今后的实践中不断充实、提高和完善。

武汉大学基础医学院 章晓联

2017年12月23日

出版说明

医疗卫生事业发展是提高人民健康水平的必然要求，医药卫生人才队伍建设是推进医药卫生事业改革发展、维护人民健康的重要保障。继续医学教育作为医学终身教育体系的重要组成部分，是实施人才强卫战略和卫生人力资源开发的主要途径和重要手段。

《国家级继续医学教育项目教材》系列于 2006 年经全国继续医学教育委员会批准，由中华医学会组织编写，具有以下特点：一是权威性，由全国众多在本学科领域内有较深造诣和较大影响力的专家撰写；二是时效性，反映了经过实践验证的最新学术成果和研究进展；三是实用性、指导性和可操作性，能够直接应用于临床；四是全面性和系统性，以综述为主，代表了相关学科的学术共识。

纵观《国家级继续医学教育项目教材》系列，自 2006 年出版以来，每一分册都是众多知名专家智慧的结晶，其科学、实用的内容得到了广大医务工作者的欢迎和肯定，被全国继续医学教育委员会和中华医学会共同列为国家继续医学教育推荐教材，同时连续被国家广播电视总局定为“十一五”“十二五”“十三五”国家重点出版物。

本套教材的编辑与出版得到了全国继续医学教育委员会、国家卫生和计划生育委员会科技教育司、中华医学会及其各专科分会与众多专家的支持和关爱，在此一并表示感谢！

限于编写时间紧迫、经验不足，本套教材会有很多不足之处，真诚希望广大读者谅解并提出宝贵意见，我们将在再版时加以改正。

《国家级继续医学教育项目教材》编委会

目 录

第一篇 抗原-抗体体外反应

第 1 章	凝集反应和沉淀反应研究进展	(3)
第 2 章	补体系统及实验研究进展	(17)
第 3 章	抗体的制备及抗体药物研究进展	(27)
第 4 章	免疫标记技术研究进展	(36)

第二篇 免疫细胞及实验研究进展

第 5 章	T 细胞亚群及实验研究进展	(49)
第 6 章	调节性 T 细胞及实验研究进展	(54)
第 7 章	B 细胞亚群/调节性 B 细胞实验研究进展	(63)
第 8 章	记忆性 T 细胞及实验研究进展	(71)
第 9 章	自然杀伤细胞和固有淋巴细胞实验研究进展	(79)
第 10 章	$\gamma\delta$ T 细胞及实验研究进展	(89)
第 11 章	巨噬细胞及实验研究进展	(103)
第 12 章	树突状细胞及实验研究进展	(117)

第三篇 免疫细胞功能的实验研究进展

第 13 章	免疫细胞的分离与纯化技术研究进展	(129)
第 14 章	免疫细胞功能检测	(144)
第 15 章	细胞因子及其检测方法研究进展	(155)
第 16 章	淋巴细胞增殖实验进展	(176)
第 17 章	细胞死亡及检测技术进展	(184)
第 18 章	自噬与免疫的研究进展	(193)
第 19 章	过敏反应研究进展	(205)
第 20 章	感染免疫动物模型实验研究进展	(220)

第四篇 免疫学新技术研究进展

第 21 章	HLA 分型及 HLA 抗体筛选技术研究进展	(237)
第 22 章	免疫检查点研究进展	(243)
第 23 章	流式细胞术研究进展	(256)
第 24 章	CAR-T 免疫治疗研究进展	(264)
第 25 章	糖免疫学研究进展	(272)
第 26 章	O-GlcNAc 蛋白糖基化修饰与免疫	(283)
第 27 章	假病毒技术在免疫学研究中的应用	(291)

第 28 章	非编码 RNA 与免疫相关实验研究进展	(299)
第 29 章	免疫信息学研究进展	(309)

第五篇 常用免疫学实验技术

第 30 章	抗原-抗体体外反应	(329)
第 31 章	巨噬细胞的分离、纯化与诱导	(337)
第 32 章	T 细胞亚群相关实验技术	(340)
第 33 章	树突状细胞相关实验技术	(344)
第 34 章	荧光和胶体金免疫标记技术	(349)
第 35 章	酶联免疫吸附试验	(356)
第 36 章	发光免疫标记技术	(361)
第 37 章	流式细胞仪常用实验方法	(365)
第 38 章	HLA 的型别检测实验技术	(368)

第一篇

抗原-抗体体外反应

第 1 章

1890 年德国学者 Behring 和 Katasato 用白喉外毒素免疫动物后发现, 动物血清中产生一种能中和白喉外毒素的物质, 称其为抗毒素。后来又在免疫动物或传染病患者血清中发现多种能与微生物及其产物发生特异性结合的物质, 统称为抗体 (antibody, Ab)。含有抗体的血清称为免疫血清, 而能诱导抗体产生的物质称为抗原 (antigen, Ag)。19 世纪 90 年代后期, 随着抗原抗体概念的建立, 人们观察到许多体外抗原抗体反应现象, 并相继创建了多种体外抗原或抗体的检测技术。特异性抗体主要存在于血清中, 因此, 体外的抗原抗体反应又称为血清学反应。根据参与的成分及反应特点, 主要分为凝集反应、沉淀反应、补体参与的反应、中和反应等类型。随着现代免疫学、细胞生物学、分子生物学等相关学科的发展, 基于抗原抗体特异性反应的免疫学检测技术也不断创新, 广泛应用于临床诊断、生物学机制研究、食品卫生检查及动物检疫等。

一、凝集反应

1896 年, Widal 利用伤寒杆菌抗原与伤寒患者的血清发生特异性凝集的现象有效地诊断伤寒。1900 年, Landsteiner 发现人 ABO 血型, 此后建立了血型凝集鉴定方法。

颗粒性抗原 (如完整的细菌、细胞、螺旋体等, 或可溶性抗原与载体颗粒结合成致敏颗粒) 与相应抗体发生特异性反应, 在适当浓度、电解质、温度的条件下, 经过一定时间, 出现肉眼可见的凝集物 (图 1-1)。这类抗原抗体反应称为凝集反应 (agglutination reaction)。凝集反应分两个阶段: 抗原抗体的特异性结合阶段; 出现肉眼可见的凝集现象阶段。主要方法有直接凝集反应、间接凝集反应等。

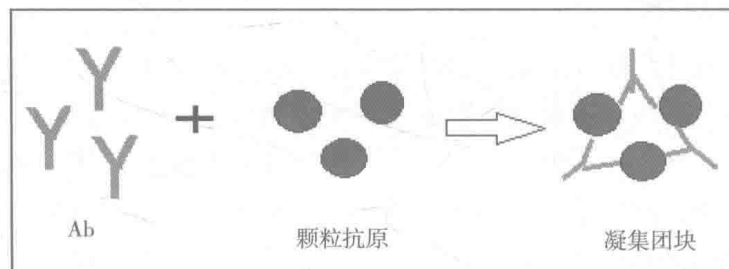


图 1-1 凝集反应

（一）直接凝集反应

细胞、细菌和螺旋体等本身即为颗粒性抗原，在适当电解质参与下可直接与相应抗体结合出现凝集，称为直接凝集反应（direct agglutination）。分为玻片法和试管法两种。

1. 玻片凝集试验（slide agglutination test） 玻片凝集试验为定性试验，用已知抗体检测未知抗原。一般用已知抗体作为诊断血清加一滴在玻片上，再加一滴待检颗粒性抗原，如菌液或红细胞悬液，两者混匀，轻轻摇晃玻片，数分钟后即可用肉眼观察凝集结果，出现颗粒凝集并其周围混合悬液由浑浊变为澄清透明者为阳性，如仍呈均匀浑浊状者为阴性，并可在低倍镜下观察判断凝集强弱（图 1-2）。主要用于人 ABO 血型的鉴定、细菌的鉴定，此法简便、快速，适于大量标本检测。

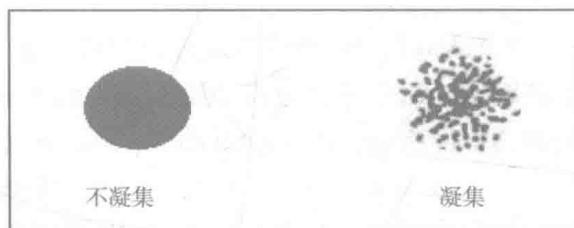


图 1-2 玻片凝集试验（ABO 血型鉴定）

2. 试管凝集试验（tube agglutination test） 试管凝集试验为半定量方法，用已知颗粒性抗原检测血清中是否有相应抗体及抗体的相对含量。先将试管内待检血清用生理盐水连续成倍稀释，然后加入等量颗粒抗原混合，置 56℃ 水浴中 2~4 h（或置 37℃ 水浴箱中过夜），然后观察有无凝集及凝集强度。如管底沉积物呈圆形，边缘整齐，轻轻振荡，颗粒抗原即分散而呈浑浊现象，此为不凝集，阴性。凝集强度“++”指抗原部分凝集，液体半澄清，凝集颗粒小，但仍清晰可见。凡能与定量抗原产生明显凝集现象（++）的血清最高稀释倍数，即为该血清的凝集效价，也称滴度，以表示血清中抗体的含量。诊断伤寒、副伤寒病的肥达反应、诊断布氏菌病的瑞特反应，以及输血时常用于供受者的红细胞和血清的交互配血试验均属试管凝集法。多用于协助临床诊断或流行病学调查研究。

近年来肥达反应、瑞特反应有了改进，微量孔法代替传统的试管法，操作更简单快速，试剂用量少，反应时间短。

（二）间接凝集反应

可溶性抗原与相应抗体直接反应不出现凝集现象。将可溶性抗原（或抗体）先吸附于一种与免疫无关的颗粒状载体的表面，形成致敏颗粒（或免疫微球），然后与相应抗体（或抗原）作用，由于载体颗粒增大了反应面积，当颗粒上的抗原（或抗体）与微量抗体（或抗原）结合后，在有电介质存在等适宜条件下，即可发生肉眼可见的凝集，称为间接凝集反应（indirect agglutination）（图 1-3）。间接凝集反应具有敏感性高、快速、简便等优点，也可半定量检测各种抗体和可溶性抗原，在临床上用于辅助诊断钩体病、血吸虫病、类风湿关节炎等。

用作载体的微球可用天然的微粒性物质，如人（O 型）和动物（绵羊、鸡、家兔等）的红细胞、活性炭颗粒或硅酸铝颗粒等；也可用人工合成或天然高分子材料制成，如聚苯乙烯胶乳微球

等。红细胞载体颗粒主要吸附的是多糖类抗原，而对蛋白质抗原或抗体的吸附能力较差，且红细胞致敏后易出现溶血、污染等问题。聚苯乙烯胶乳载体吸附的抗体或抗原蛋白易脱落。载体的不稳定最终影响凝集结果的判断。新型凝集载体微米级二氧化硅因稳定、载体颜色可选、快速、简便、经济等优点具有广阔应用前景。

以载体颗粒吸附的成分来分，有正向或反向间接凝集试验；根据载体性质不同，分为间接血凝试验、间接乳胶凝集试验、间接明胶凝集试验等。

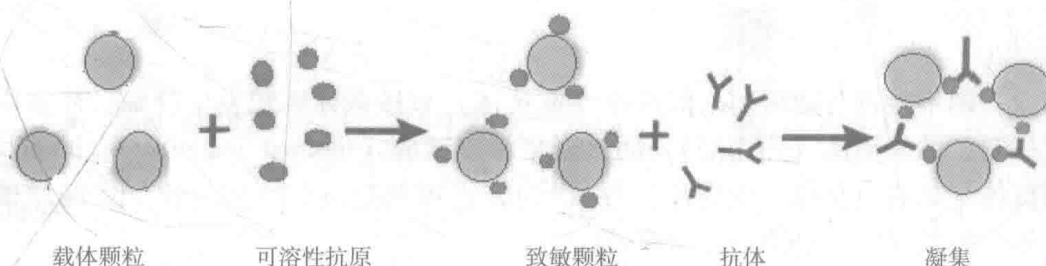


图 1-3 间接凝集试验

1. 正向间接凝集试验 (positive indirect agglutination test, 简称间接凝集试验) 将可溶性抗原吸附于载体表面，成为致敏微球，然后与相应的抗体反应，从而使载体被动凝聚，出现可见的凝集现象。用于检测细菌、病毒和寄生虫等感染后产生的抗体。

(1) 间接血凝试验：如梅毒螺旋体抗体微量血凝试验。用梅毒螺旋体提取物致敏红细胞，用微量孔血凝分析法检查相应的抗梅毒螺旋体特异性抗体，其滴度在 1:80 以上则可判定为抗体阳性，此试验的特异性与敏感性均高。间接血凝试验结果阴性：红细胞沉积于管底；阳性+：红细胞沉积于管底，周围有散在少量凝集；阳性++：红细胞形成片层凝集，面积较小，边缘较松散；阳性+++：红细胞形成片层凝集，面积多于++；阳性++++：红细胞形成片层凝集，均匀布满孔底，或边缘皱缩如花边状。

(2) 间接胶乳凝集试验：胶乳凝集试验分试管法和玻片法两种，如用已知的人 IgG 致敏乳胶颗粒检测患者血清中的类风湿因子。

(3) 间接明胶凝集试验：将全病毒抗原及重组抗原吸附在粉红色明胶颗粒上，以检测相应抗体，如检测抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 抗体以诊断艾滋病等。

(4) 间接活性炭凝集试验：能定性或半定量检测梅毒的快速血浆反应素 (RPR) 试验，用活性炭颗粒 (直径 3~5 μm) 吸附心磷脂抗原，此致敏颗粒若与待检血清中的反应素即抗心磷脂抗体结合，就形成黑色凝集块，肉眼即可识别，试验在专用纸上的反应圈 (内径 18 mm) 内进行。本试验敏感性高而特异性较低，易出现假阳性，应结合临床病史或以梅毒螺旋体特异性抗体试验验证后做出诊断。目前一般作为筛选，观察疗效，复发及再感染。

2. 反向间接凝集试验 (reverse indirect agglutination test) 是将抗体附在与免疫无关的载体颗粒上，再与可溶性的抗原发生凝集的试验 (图 1-4)。利用抗体致敏颗粒检测可溶性抗原，如检测血清中的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 及甲胎蛋白 (AFP) 等可溶性蛋白质抗原，可做疾病早期诊断。

(三) 间接凝集抑制试验

先让抗体与可溶性抗原作用，若待测可溶性抗原 (或抗体) 与抗体 (或抗原) 是对应的，

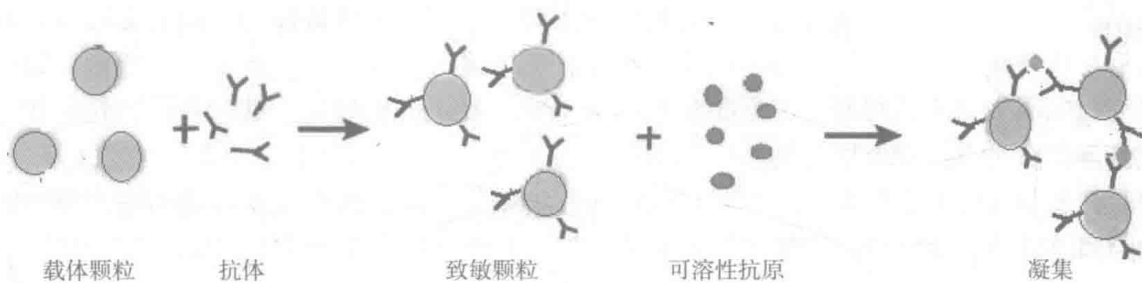


图 1-4 反向间接凝集试验

即先发生结合，则不能再与随后加入的抗原（或抗体）致敏载体颗粒发生凝集，使本应出现的凝集现象被抑制，结果阳性（图 1-5）。间接凝集抑制试验（indirect agglutination inhibition test）可用于检测抗体（如自身抗体、变态反应性抗体），也可测定抗原，如乳胶凝集抑制试验，检测人绒毛膜促性腺激素用于早期妊娠诊断。

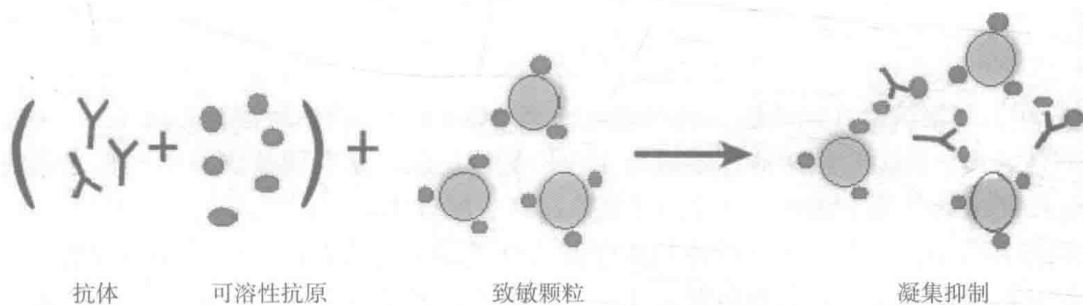


图 1-5 间接凝集抑制试验

（四）抗球蛋白试验

抗球蛋白试验（antiglobulin test）方法是在 1946 年由英国剑桥免疫学家 Robin Coombs 与两位医师 Arthur Mourant 及 Rob Race 建立的，又称 Coombs 试验。是检测血液中不完全抗体的一种敏感方法。如人红细胞表面吸附有 IgG（称为不完全抗体），虽不能产生凝集现象，但抗人球蛋白抗体（抗 IgG 分子的 Fc 段），可以和红细胞上的抗体分子 Fc 段结合，起着搭桥的作用，使红细胞被动发生凝集，结果阳性，正常人均为阴性。如红细胞表面吸附的抗体是 IgA 或 IgM，要用对应的抗 IgA 和抗 IgM 抗体检测。目前，实验用的抗体由原来的多抗细分为多种单抗，实验操作从纯手工的普通试管法，和半手工的微柱凝胶卡，到全自动的固相法。在分析 Coombs 试验结果时，要结合患者病史及各实验室的参考值。抗人球蛋白试验分为直接试验与间接试验（图 1-6）。

1. 直接抗球蛋白试验（direct antiglobulin test） 直接试验是检测红细胞上有无不完全抗体，或检测体内被抗体致敏的红细胞。标本必须是抗凝血样，避免血液离体后被补体致敏，造成假阳性。操作时在小试管内加 5% 红细胞标本 1 滴，用足量生理盐水洗涤 3~4 次，然后按试剂说明书加 1~2 滴最适浓度的多特异性抗球蛋白试剂，混匀后以转速 1000r/min 离心 1min，立即轻轻摇起读取结果。直接试验用于自身免疫性溶血性贫血（AIHA）和新生儿溶血病的诊断，以及溶血性输血反应的检查。

2. 间接抗球蛋白试验（indirect antiglobulin test） 间接试验是检查血清中游离的不完全抗体。在试管中加血清 2 滴，再加 1 滴相关的红细胞 5% 悬液，37℃ 孵育 45~60min，用足量生理盐