

全国高等学校教材

供基础、临床、预防、口腔等医学类专业用

医学免疫学实验指导

主编 朱彤波 李成文



人民卫生出版社

全国高等学校教材
供基础、临床、预防、口腔等医学类专业用

医学免疫学实验指导

主 编 朱彤波 李成文

副主编 杨 健 陈 玮 吴利先 官 杰

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 栩 (西南医科大学)

左凤琼 (四川大学华西基础医学与法医学院)

毕建虹 (四川大学华西基础医学与法医学院)

吕梅励 (四川大学华西基础医学与法医学院)

朱彤波 (四川大学华西基础医学与法医学院)

李 楠 (四川大学华西基础医学与法医学院)

李成文 (西南医科大学)

杨 健 (川北医学院)

吴利先 (大理大学基础医学院)

何斯荣 (重庆医科大学)

陈 玮 (成都医学院)

周云刚 (西南医科大学)

官 杰 (齐齐哈尔医学院)

胡丽娟 (四川大学华西基础医学与法医学院)

秦娜琳 (遵义医学院)

黄 黎 (西南医科大学)

彭晓东 (四川大学华西临床医学院)

董 薇 (四川大学华西基础医学与法医学院)

黎 光 (四川大学华西基础医学与法医学院)

秘 书 左凤琼 (四川大学华西基础医学与法医学院)

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学免疫学实验指导 / 朱彤波, 李成文主编. —北京: 人民卫生出版社, 2016

ISBN 978-7-117-22626-4

I. ①医… II. ①朱… ②李… III. ①医学-免疫学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. ①R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 102810 号

人卫智网	www.ipmph.com	医学教育、学术、考试、健康, 购书智慧智能综合服务平台
人卫官网	www.pmph.com	人卫官方资讯发布平台

版权所有, 侵权必究!

医学免疫学实验指导

主 编: 朱彤波 李成文

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京市卫顺印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 6

字 数: 150 千字

版 次: 2016 年 7 月第 1 版 2016 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-22626-4/R · 22627

定 价: 19.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

借由人民卫生出版社组织编写基础医学实验系列教材的机会,我们荣幸邀请到多位长期工作在医学院校教学第一线的教师与专家,他们有丰富的教学实践经验,熟知各基础医学科目,特别是医学免疫学的教学规律,并对增加医学生学习免疫学的兴趣、提升教学质量饶有心得,历时一年,数易其稿,编写出这本《医学免疫学实验指导》。

免疫学是了解、认识人类疾病的基础,免疫学实验更是现代生物技术的核心,对当代众多新兴生物科技和临床诊疗都产生了深远的影响。但免疫学知识体系的庞杂和概念的抽象,及其与众多学科的广泛交集也使许多初学者“学”而生畏。我们希望这本实验指导,可以帮助学生们通过具体的实验操作与观察,对课堂上学到的抽象的免疫学理论产生感性认识,从而加深他们对理论知识的理解,同时也锻炼他们的动手能力及科研思维。为此,我们在本书中力求将实验的编排与免疫学的理论体系对应起来,在本书前四章分别介绍“适应性免疫相关技术”“固有免疫相关技术”“应用型免疫技术”和“免疫学动物实验”,从抗原抗体的制备、检测,渐次递进到 T、B 细胞的分离与测定,再到固有免疫细胞和分子的检测。在此基础上,再介绍被广泛应用于现代临床与科研的基本免疫学技术和基本动物实验。最后,我们在第五章特别编写了“设计性免疫学实验”,引导学生们利用所学知识,对具体的临床症状作出合理判断,并自行设计免疫学实验加以验证,从而培养学生独立思考和灵活运用所学知识的能力。在对具体实验的选择上,我们除了保留一些经典的免疫学实验外,也适当增添了一些在当前临床与科研中使用较广,也相对易教易行、容易开展的现代免疫学实验,力求使学生们通过实验操作,初步了解免疫学的发展脉络和研究现状。

在本书的编写过程中,各位副主编、编委本着科学、负责的态度,逐字推敲,付出了艰苦的努力。编写秘书左凤琼整理了全书的书稿;四川大学华西基础医学与法医学院的硕士研究生王佩佩对本书的文、图进行了统一的编辑,在此我们一并致谢!

由于编者水平有限,文中错误之处在所难免,恳请各位读者不吝指出,以便我们修正。

朱彤波 李成文

2016 年 4 月

第一章 适应性免疫相关技术	1
第一节 抗原抗体制备技术	1
一、免疫原制备	1
二、多克隆抗体制备	3
三、单克隆抗体制备	7
四、基因工程抗体制备	13
第二节 抗原抗体检测	16
一、凝集反应	16
二、沉淀反应	21
第三节 免疫标记技术	25
一、免疫荧光技术	25
二、放射免疫技术	29
三、酶联免疫吸附试验	30
四、胶体金免疫层析试验	32
第四节 T、B淋巴细胞检测技术	33
一、外周血液单个核细胞的分离(Ficoll 密度梯度离心法)	33
二、T、B淋巴细胞的分离(尼龙毛柱分离法)	35
三、T淋巴细胞亚群的分离和鉴别	36
四、淋巴细胞功能检测	39
第五节 细胞因子检测	45
一、细胞病变抑制法测干扰素活性	46
二、白细胞移动抑制试验	48
三、酶联免疫吸附试验法检测白细胞介素-2	51
四、酶联免疫斑点试验检测干扰素- γ	52
五、逆转录聚合酶链反应检测人肿瘤坏死因子- α	55
第二章 固有免疫相关技术	59
第一节 细胞吞噬功能检测	59
一、中性粒细胞吞噬(小吞噬)试验	59
二、巨噬细胞吞噬(大吞噬)试验	60
第二节 NK 细胞活性测定	61
第三节 补体测定技术	62
一、50% 补体溶血试验	62
二、溶血试验	64
三、补体结合试验	64

第四节 溶菌酶的溶菌作用·····	66
第三章 应用型免疫技术·····	68
第一节 常用自动化仪器检测技术·····	68
一、免疫浊度分析技术·····	68
二、流式细胞仪分析技术·····	70
三、化学发光免疫分析技术·····	73
第二节 免疫细胞及组织化学技术·····	75
第三节 免疫印迹技术·····	76
第四章 免疫学动物实验·····	80
第一节 动物过敏实验·····	80
第二节 血脑屏障作用·····	80
第五章 设计性免疫学实验·····	82
第一节 病案概述·····	82
第二节 设计检验诊断·····	82
参考文献·····	85

第一章 适应性免疫相关技术

第一节 抗原抗体制备技术

一、免疫原制备

【实验目的】

掌握几种常见免疫原制备的基本过程。

【实验原理】

免疫原(抗原)是诱导机体产生抗体、并能与抗体发生反应的物质。就其化学成分而言,有蛋白质抗原、脂类抗原、多糖类抗原和核酸抗原等。就免疫原性而言,有完全抗原和半抗原。不同抗原免疫原性的强弱取决于抗原的分子量、化学活性基团、立体结构、物理形状和弥散速度等。

能否制得合格的抗体由许多因素决定,合格的免疫原的获得是其前提条件。下面介绍有代表性的免疫原的制备方法。

【实验器材】

1. 一般用 2~3kg 健康雄性家兔;商品性生产多用马和羊。
2. 手术台架、止血钳、剪刀、镊子、注射器、针头、离心管、纱布、胶布、研钵、塑料管、毛细液管。

【实验试剂】

1. 抗原用血细胞、细菌、免疫球蛋白等。
2. 生理盐水、5% 石炭酸、1% BaCl_2 溶液、1% H_2SO_4 溶液、0.4% 甲醛生理盐水、甲醛溶液、磷酸盐缓冲溶液(phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4)、液状石蜡、羊毛脂、卡介苗、 NaN_3 、碘酒及酒精棉球。

【实验步骤】

1. 颗粒性抗原的制备 颗粒性抗原主要是指细胞抗原或细菌抗原。最常用的细胞抗原为制备溶血素用的绵羊红细胞,最常用的细菌抗原为伤寒杆菌。有时虫卵也可做成抗原,如日本血吸虫卵可制成悬液供免疫用。有些细胞膜成分,如组织细胞膜、血细胞膜,经破碎后亦可制成颗粒性抗原。颗粒性抗原悬液呈乳浊状,多采用静脉内免疫,较少使用佐剂作皮内注射。

(1) 细菌抗原制备——O(菌体)抗原(菌液)制备

1) 取伤寒杆菌标准菌株的光滑型菌落,接种于普通培养基(或 SS 琼脂平板培养基),均匀涂布,37℃温箱培养 24 小时,取出培养瓶,用适量生理盐水洗下菌苔,移入含无菌玻璃珠的三角烧瓶中,充分振摇使菌体均匀分布,置 100℃水浴 2~2.5 小时杀菌及破坏 H 抗原,把细菌悬液移入离心管,4000r/min 离心 10 分钟,弃上清液,菌体用无菌生理盐水洗涤,再 4000r/min 离心 10 分钟,弃上清液,菌液做无活菌试验合格后,用无菌生理盐水稀释成 1×10^{10} /ml,加 5% 石炭酸,即成 O 抗原。4℃保存备用。

2) 麦氏比浊管制备:试剂用 1% BaCl₂ 溶液,1% H₂SO₄ 溶液。方法按表 1-1 所示配制标准比浊管,封固,注明管号,备用。

表 1-1 麦氏标准比浊管的配制

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% BaCl ₂ (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1% H ₂ SO ₄ (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
相当菌数(10 ⁹ /ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

3) 稀释方法:取一定量原菌液于试管中(该管口径与标准比浊管相等),与标准比浊管比浊,可通过滴加稀释液(生理盐水)调整其浊度与某标准管相当。则原菌液细菌数 = 稀释倍数 × 标准比浊管相当菌数。例:取原菌液 0.5ml 加稀释液 9.5ml,浊度与 2 号比浊管浊度相当,则原菌液细菌数 = 20 × 6 × 10⁹/ml = 1.2 × 10¹¹/ml。可进一步按免疫用菌液所需浓度算出应该加入稀释液量,以无菌生理盐水稀释。

(2) 细菌抗原制备——H(鞭毛)抗原的制备:在鞭毛典型的伤寒杆菌标准菌株划线接种培养的平板上,挑选典型光滑菌落接种于普通培养基,均匀涂布,置 37℃ 培养 24 小时。取出培养瓶,用 0.4% 甲醛生理盐水洗下菌苔,移入无菌三角烧瓶,置 37℃ 水浴 24 小时(或 4℃ 3~5 天固定杀菌),将处理过的菌液进行无活菌试验,证实无活菌存在,用生理盐水稀释成 1 × 10¹⁰/ml 的菌悬液,即成 H 抗原。置于 4℃ 冰箱保存备用。

(3) 绵羊红细胞(SRBC)抗原制备:取抗凝或脱纤维蛋白的绵羊血液加 1~2 倍生理盐水,经 2000r/min 离心 5 分钟,吸去上清。再加 2~3 倍生理盐水,用毛细滴管反复吹吸混匀,以 2000r/min 离心 5 分钟,吸去上清,如此反复洗涤 3 次。最后一次可离心 10 分钟,待绵羊红细胞密集于管底,上清液呈无色透明,弃去上清液,管底即为洗涤过的绵羊红细胞(100% 浓度)。根据需要配成不同浓度的红细胞悬液。

2. 可溶性抗原的制备 蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、细菌毒素、酶、补体等皆为良好的可溶性抗原。但因这些蛋白质多为复杂的蛋白组分,免疫前需进行纯化。

(1) 免疫球蛋白 G(IgG) 抗原制备

1) SPA 菌稳定液制备:将金黄色葡萄球菌接种在大型扁形瓶的琼脂斜面上,放 37℃ 温箱中培养 18~24 小时。第二天用少量生理盐水洗下菌体,4000r/min 离心 30 分钟,将沉淀的菌体再用生理盐水洗 2 次,然后用含 0.5% 甲醛溶液的 PBS(pH7.4) 制成 10%(V/V) 菌悬液,在室温下作用 3 小时(或 4℃ 冰箱中过夜)。将细菌悬液加热 56℃ 30 分钟,迅速冷却,再用 PBS 洗 3 次,最后用含 0.05%~0.1% NaN₃ 的 PBS 制成 10%(V/V) 菌悬液,即为 SPA 菌稳定液,放 4℃ 冰箱保存备用。

2) 人血清 IgG 致敏 SPA 菌液的制备:取正常人血清 1ml 加入 10% SPA 菌稳定液 4ml 混合后,置室温作用 30 分钟(中间振荡 3~5 次),然后用生理盐水洗菌液 7~8 次,沉淀菌体,用生理盐水制成 1 × 10¹¹/ml 菌液,4℃ 保存备用。

(2) 人全血清抗原制备:人全血清作为抗原免疫动物时,因其是可溶性抗原,常加佐剂,增强免疫应答。弗氏佐剂的制备与应用见下文。

3. 半抗原免疫原的制备 多肽、甾族激素、药物、脂肪胺、核苷等小分子物质仅能与相应的抗体发生特异性结合反应,而它们自己并不是免疫原,不能诱导体产生。只有将这种

半抗原与大分子物质结合后,才具有免疫原性,刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞。这种经过人工修饰的半抗原称为人工抗原,用于偶联半抗原的大分子物质称为载体。常用的载体有蛋白质类(如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、兔血清白蛋白等)、多肽聚合物(如多聚赖氨酸)、大分子聚合物(如羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等)。结合的方法有物理法和化学法。物理吸附的载体有淀粉、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、硫酸葡聚糖、羧甲基纤维素等,是通过电荷和微孔吸附半抗原。化学法是利用某些功能团把半抗原连接到载体上,这些载体包括血清蛋白、甲状腺球蛋白、铜蓝蛋白、卵蛋白和多聚赖氨酸等。

4. 佐剂 对可溶性抗原而言,为了增强其免疫原性或改变免疫反应的类型、节约抗原等目的,常采用加佐剂的方法以刺激机体产生较强的免疫应答。

(1) 佐剂的类型:目前实践中常应用的佐剂有弗氏佐剂、氢氧化铝、明矾、脂质体和液状石蜡等。也有采用结核杆菌等分枝杆菌、白喉杆菌以及细小棒状杆菌等。

1) 弗氏不完全佐剂(Freund incomplete adjuvant, FIA)制备:将羊毛脂、液状石蜡和生理盐水按 1:2:1 比例混合[羊毛脂:液状石蜡可为 1:(1~4)],高压灭菌后 4℃保存备用。

2) 弗氏完全佐剂(Freund complete adjuvant, FCA)制备:在 FIA 的基础上加入卡介苗,使其终浓度为 6 mg/ml。

(2) 抗原乳化:取健康人全血清与 FCA 以 1:1 的体积比例制成油包水状态,具体方法如下。

1) 研磨法:取 5ml FCA(用前适度加热)于无菌研钵中,逐滴加入人全血清抗原 5ml,边滴边按同一方向研磨,滴加抗原的速度要慢。待抗原全部加入后,继续研磨一段时间,使之成为乳白色黏稠的油包水乳剂。本法适于制备大量的佐剂抗原,缺点是研钵壁上黏附大量乳剂,抗原损失较大。

2) 注射器法:将 1.5ml FCA 和 1.5ml 人全血清抗原分别吸入两个注射器内,两注射器之间以一细胶管相连,注意排净空气,然后交替推动针管,直至形成黏稠的乳剂为止。本法优点是容易无菌操作,抗原损失少,适用于制备少量的抗原乳剂,但同时难以完全乳化。制备好的乳化剂需经鉴定才能使用。鉴定方法是将乳化剂滴入冷水中,若保持完整不分散,呈滴状浮于水面,即乳化完全,为合格的油包水剂,若立即散开则乳化不完全。乳化过的物质放置一段时间(在保存期内)出现油水分层也是未乳化好的表现。

二、多克隆抗体制备

【实验目的】

1. 掌握多克隆抗体产生的一般规律。
2. 熟悉常用的动物免疫方法及家兔心脏采血法。
3. 了解抗体浓度及纯度测定的基本方法。

【实验原理】

用含有多种抗原决定簇的抗原免疫动物,可刺激机体多个 B 细胞克隆产生针对多种抗原表位的不同抗体。所获得的免疫血清实际上是含有多种抗体的混合物,即多克隆抗体。

多克隆抗体(免疫血清)的制备是一项常用的免疫学实验技术。高效价、高特异性的免疫血清可作为免疫学诊断的试剂(如用于制备免疫标记抗体等),也可供特异性免疫治疗用。免疫血清的效价高低取决于实验动物的免疫反应性及抗原的免疫原性。如以免疫原性强的抗原刺激高应答性的机体,常可获得高效价的免疫血清。而使用免疫原性弱的抗原免疫时,

则加用佐剂以增强抗原的免疫原性。免疫血清的特异性主要取决于免疫用抗原的纯度。因此,如欲获得高特异性的免疫血清,必须预先纯化抗原。此外,抗原的剂量、免疫途径及注射抗原的时间间隔等,也是影响免疫血清效价的重要因素,应予重视。

(一) 抗人血清抗体的制备

【实验器材】

1. 动物选取体重 2~3kg、健康、成年雄性家兔或未妊娠的雌性家兔。
2. 棉签、一次性注射器、研钵、尼龙管、离心管、无菌平皿、兔台、恒温培养箱、净化工作台、离心机、冰箱等。

【实验试剂】

1. 健康人全血清。
2. 碘伏、戊巴比妥钠、0.02% NaN_3 、弗氏完全佐剂材料包括羊毛脂、液状石蜡、卡介苗。

【实验步骤】

1. 弗氏佐剂的制备及抗原乳化见免疫原制备(上一试验)。
2. 基础免疫 取实验用家兔,用碘酒和酒精消毒后,在家兔四足掌各注射 0.2ml,两侧后大腿肌肉各注射 0.3ml,两侧颈部皮下各注射 0.3ml 抗原-弗氏完全佐剂混合物(共计 2ml),进行初次免疫。
3. 加强免疫 基础免疫 4 周后,每只家兔两侧后大腿肌肉各注射 0.5ml 不含佐剂的人混合血清,重复 1~2 次。
4. 试血 末次加强免疫 1 周后,耳缘静脉采血,双向琼脂扩散法(方法见沉淀反应)测定有无抗体产生及其效价,如效价大于 1:16,即可在放血;如效价过低,可再加强注射。

试血时用量少,可从家兔耳静脉采血。方法是先摩擦刺激局部,使其充血,消毒后再涂少量凡士林以防止血液干固而不易收集,用小刀将耳静脉割一小口。血液收集于小试管中,最后用干棉球压迫止血。

5. 采血和分离血清 一般采用颈动脉放血法。

(1) 家兔仰卧于兔台上固定头部,用纱布固定四肢。头部略放低以暴露颈部。剃毛并消毒皮肤。

(2) 沿颈部中线用手术刀切开皮肤约 10 cm,分离皮下结缔组织,直至暴露出气管两侧的胸锁乳突肌(小心操作,如碰到小血管出血,可用止血钳止血)。

(3) 用直头止血钳分离胸锁乳突肌与气管间的颈三角区疏松组织,暴露出颈总动脉后用弯头眼科镊使之游离,剥离神经与结缔组织。

(4) 于动脉下套入两根黑丝线,分别置于远心及近心端。结扎远心端的丝线。近心端的动脉用血管夹夹住。

(5) 用小拇指垫在血管下,用尖头眼科手术剪在两根丝线间的动脉壁上剪一小口(勿剪断),插入塑料放血管。再将近心端的丝线结扎固定于放血管上,以防放血管滑脱。

(6) 松开止血钳,使血液流入容器中。一般一只家兔可放血 100~120ml。如果用三角瓶或平皿盛血,将器皿倾斜放置于 37℃烘箱 2 小时,转移到 4℃沉淀过夜,第二天早上用吸管吸取血清。如果用离心管收集,37℃烘箱放置 2 小时,转移到 4℃沉淀过夜,第二天早上离心,2000r/min 10 分钟。在血清中加入 NaN_3 至终浓度 0.02%,分装后 -20℃保存。

6. 免疫血清特异性鉴定、纯化和效价滴定 用相应的已知抗原鉴定待检标本。可溶

性抗原的抗体鉴定常采用双向琼脂扩散试验和免疫电泳技术;细菌抗体采用凝集试验。方法见相关试验。如免疫血清不纯,可用适当抗原吸收,除去其他抗体,提高免疫血清的特异性。吸收时先在免疫血清中加入适当抗原物质,混合后置 37℃作用 30~60 分钟,再置于 4℃ 24~48 小时,离心沉淀,吸取上清液即可。

免疫血清于吸收前后均应测定效价,尤其吸收后更应测定效价并加以注明,供用时参考。

7. 分装与保存 分装:同种免疫血清混匀,无菌操作分装到无菌青霉素小瓶中,每瓶 3~5ml。贴好标签,注明免疫血清种类(全称)、效价、年、月等。

抗血清保存方法:冷冻干燥,制品内水分不高于 0.2%;低温保存,放在 -20℃,避免反复冻融;4℃保存,加 0.1%~0.2% NaN_3 防腐。

【实验结果】

用人全血清免疫家兔制备的免疫血清,可通过沉淀反应、免疫电泳来评估免疫效果。制备得到的免疫血清外观应为澄清、无溶血、无血液有形成分残留和微生物污染,并做好标记。

【注意事项】

1. 动物选择 免疫血清的制备多选用家兔为免疫对象,若需大量制备免疫血清,可选用羊或马等大型动物。动物必须健康,且以成年雄性为佳,避免使用怀孕雌性动物。

2. 抗原的准备 全血清抗原应选择 3 人以上的混合血清,以避免个体差异;血清应新鲜,以保证血清中各种成分的活性。

3. 佐剂的准备 可溶性抗原的免疫应加入佐剂,颗粒性抗原通常不需要佐剂。佐剂与抗原混合时要充分乳化,以增强机体对抗原的免疫应答。

4. 免疫程序 一般而言,不使用佐剂的免疫间隔时间较短,2~3 天免疫一次;使用佐剂时免疫间隔时间可长些,2~4 周免疫一次。无论有无使用佐剂,最后一次免疫一周后采血。

5. 无菌操作技术 在抗原和佐剂的准备过程中、动物免疫和血清分离过程中,均应遵循无菌操作技术,以免实验动物被感染、死亡而终止实验,也是获得高质量免疫血清的关键。

(二) 伤寒杆菌抗血清的制备

【实验器材】

1. 动物选取体重 2~3kg、健康、成年雄性家兔或未妊娠的雌性家兔。

2. 棉签、一次性注射器、研钵、尼龙管、离心管、无菌平皿、兔台、恒温培养箱、净化工作台、离心机、冰箱等。

【实验试剂】

抗原为已制备的伤寒杆菌 O 抗原或 H 抗原($1 \times 10^{10}/\text{ml}$)。

【实验步骤】

1. 免疫程序见表 1-2。

表 1-2 伤寒杆菌抗原免疫方案

免疫日期(d)	免疫途径	抗原	免疫剂量(ml)
1	多点皮内	伤寒杆菌 O 或 H 抗原	1.0
6	静脉	伤寒杆菌 O 或 H 抗原	0.5
11	静脉	伤寒杆菌 O 或 H 抗原	0.5
16	静脉	伤寒杆菌 O 或 H 抗原	1.0
19	静脉	伤寒杆菌 O 或 H 抗原	2.0

2. 试血 末次免疫 7 天后即可试血,耳缘静脉或心脏采血,分离血清与伤寒杆菌 O 或 H 抗原作试管凝集试验测定效价(方法见凝集反应),凝集效价高于 1:1280 即可取血,若效价不足可继续加强免疫。

3. 放血 动物麻醉后,用注射器从心脏采血(或颈动脉放血),以最大限度地获得血清,方法见抗人血清抗体的制备。

4. 收集免疫血清 方法见抗人血清抗体的制备。

(三) 抗绵羊红细胞抗体的制备

【实验器材】

1. 动物选取体重 2~3kg、健康、成年雄性家兔或未妊娠的雌性家兔。
2. 棉签、一次性注射器、研钵、尼龙管、离心管、无菌平皿、兔台、恒温培养箱、净化工作台、离心机、冰箱等。

【实验试剂】

1. 绵羊红细胞。
2. Alserver 血细胞保存液、注射器。

【实验步骤】

1. 免疫方案 将家兔固定后消毒,按表 1-3 方案进行免疫。

表 1-3 抗绵羊红细胞抗体(溶血素)制备免疫方案

免疫日期(d)	免疫途径	抗原	免疫剂量(ml)
1	多点皮内	绵羊全血	0.5
3	多点皮内	绵羊全血	1.0
5	多点皮内	绵羊全血	1.5
7	多点皮内	绵羊全血	2.0
9	多点皮内	绵羊全血	2.5
12*	耳缘静脉	5%~10% SRBC	1.0
15*	耳缘静脉	5%~10% SRBC	1.0

* 易发生过敏而死。脱敏方法:可以在静脉注射前先以少量抗原注入腹腔,1 小时后再缓慢注入静脉

2. 试血 末次免疫 3~5 天后,自耳静脉采血,试管凝集法测血凝效价,达 1:2000 即可取血。

3. 取血 动物麻醉后,用注射器从心脏采血,以最大限度地获得血清(同前)。

4. 收集免疫血清 方法见抗人血清抗体的制备。

(四) 人 IgG 免疫血清的制备

【实验器材】

1. 动物选取体重 2~3kg、健康、成年雄性家兔或未妊娠的雌性家兔。
2. 棉签、一次性注射器、研钵、尼龙管、离心管、无菌平皿、兔台、恒温培养箱、净化工作台、离心机、冰箱等。

【实验试剂】

抗原为人血清 IgG 致敏 SPA 菌液(1×10^{11} /ml)。

【实验步骤】

1. 免疫方案 将家兔固定后消毒,免疫程序见表 1-4。

表 1-4 制备人 IgG 免疫血清的免疫程序

日期(d)	免疫途径	抗原剂量(ml)
1	皮下多点注射	1.5
15	耳缘静脉注射	1.0
22	耳缘静脉注射	2.0

注:在第二次免疫(15 天)时,为防止动物过敏死亡,可采取少量多次注射方法

2. 试血 末次免疫 3~5 天后,自耳静脉采血,试管凝集法测血凝效价,达 1:2000 即可取血。
3. 取血 动物麻醉后,用注射器从心脏采血,以最大限度地获得血清(同前)。
4. 收集免疫血清 方法见抗人血清抗体的制备。

【思考题】

1. 免疫血清制备的原理是什么?其主要步骤包括哪些?
2. 常见免疫动物的方法有哪些?
3. 影响免疫血清效价的因素有哪些?
4. 如何保存抗血清?

(左凤琼 董薇)

三、单克隆抗体制备

1975 年 Kohler 和 Milstein 首创了小鼠杂交瘤细胞(hybridoma)和单克隆抗体(monoclonal antibodies, McAb)技术,为免疫学相关研究领域以及其他学科的研究提供了全新的手段和工具。

【实验目的】

了解 McAb 制备原理和杂交瘤技术,熟悉 McAb 制备流程和基本方法。

【实验原理】

致敏 B 淋巴细胞能分泌特异性抗体,但不能在体外长期存活。骨髓瘤细胞可在体外大量增殖,但不能分泌特异性的抗体。通过细胞融合技术将小鼠骨髓瘤细胞与致敏 B 淋巴细胞融合,产生的杂交瘤细胞既具有肿瘤细胞易增殖的特性,又具有 B 淋巴细胞分泌特异性抗体的能力。由于每个 B 细胞只产生针对单一抗原表位的抗体,所以 B 细胞杂交瘤也只能分泌针对单一抗原表位的抗体,即 McAb。

【实验器材】

超净工作台、CO₂ 恒温培养箱、-80℃低温冰箱、倒置显微镜、恒温水浴箱、酒精灯、液氮罐、低温离心机、各种玻璃器皿(例如细胞培养瓶、试管、刻度吸管、弯头滴管、培养皿、烧杯等)、盐水瓶、带盖平底细胞培养板、塑料离心管、96 孔培养板、24 孔培养板、注射器和注射针头、眼科剪子、镊子、铜网、血细胞计数器、可调微量加样器、小滤器、小鼠解剖台、Balb/c 小鼠、Sp2/0 骨髓瘤细胞、冻存管、冻存盒或冻存布袋。

【实验试剂】

多种试剂已有商品化产品(内含缓冲液、防腐剂等),例如 HAT、HT 溶液和 PEG 等,也可

自行配制和贮存。

1. 100 倍浓缩谷氨酰胺溶液 (0.2mol/L)、7.5% NaHCO_3 溶液、HEPES 溶液 (1mol/L)、50% PEG、0.1% 台盼蓝染液、DMSO、秋水仙素溶液 (100mg/L)、0.075mol/L KCl 溶液、100 倍 8- 氮杂鸟嘌呤贮存液、固定液、10% Giemsa 染液。

2. 100 倍双抗溶液 青霉素 10^6 U/L 、链霉素 10 g/L 。

3. RPMI 1640 培养液原液 目前均使用商品化的 RPMI 1640 粉剂配制而成,具体配制方法按说明书操作即可,也有配好的商品化产品。

4. 不完全 RPMI 1640 培养液 RPMI 1640 培养液原液 96ml,100 倍浓缩谷氨酰胺溶液 1ml,100 倍浓度青霉素链霉素溶液 1ml,7.5% NaHCO_3 溶液 1ml,HEPES 溶液 1ml。

5. 完全 RPMI 1640 培养液 含 20% 小牛血清的不完全 RPMI 1640 培养液。

6. A 贮存液 100 倍氨基蝶呤 ($4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)。

7. HT 贮存液 100 倍次黄嘌呤和胸腺嘧啶 (H: $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$; T: $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$)。

8. HAT 培养液 完全 RPMI 1640 培养液 98ml,A 贮存液 1ml,HT 贮存液 1ml。

9. HT 培养液 完全 RPMI 1640 培养液 99ml,HT 贮存液 1ml。

【实验步骤】

制备 McAb 主要包括动物免疫、细胞融合、杂交瘤细胞的筛选与检测、杂交瘤细胞的克隆化、增殖、保存及复苏、单克隆抗体的性质鉴定等关键步骤。下面按照制备单克隆抗体的流程图(图 1-1),逐一介绍。

1. 动物免疫

(1) 取 2~4 只 6 周龄的雌性健康 Balb/c 小鼠同时免疫。可溶性抗原的用量一般为每次 $10 \sim 100 \mu\text{g}$; 颗粒性抗原,每次 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞。首次免疫需加入弗氏完全佐剂,用微量搅拌器充分混匀,背部皮下多点位注射。

(2) 2 周后进行第二次免疫(加强免疫),抗原的量减半,并改用弗氏不完全佐剂,注射部位和方法不变。加强免疫可进行多次,直至血清效价达到要求。

(3) 融合前 3 天进行最后一次免疫(冲击免疫),采用 $150 \mu\text{l}$ PBS 溶解抗原(抗原量与初次免疫相同),经小鼠尾静脉注射。也可经腹腔注射,但应加大抗原剂量。

2. 细胞融合

(1) 饲养细胞的准备

1) 融合前一天,取 Balb/c 小鼠,颈椎脱位法处死后,浸泡于 75% 乙醇中消毒 5 分钟。

2) 将小鼠固定于小鼠解剖台,腹部朝上,用无菌剪刀在其腹部皮肤剪一个小口,剥离腹部皮肤,暴露腹肌。

3) 用灭菌注射器将 HAT 培养基 5ml 注入小鼠腹腔内,右手固定注射器,使针头留置在

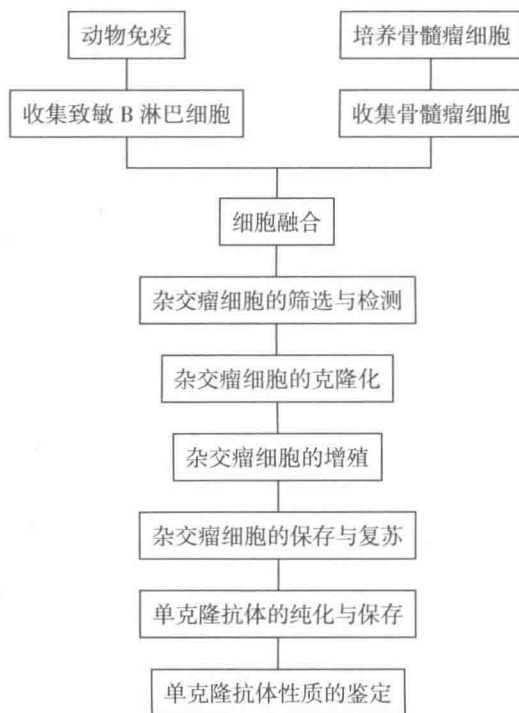


图 1-1 单克隆抗体的制备流程图

腹腔内,左手轻轻按摩其腹部,以促进巨噬细胞渗出。用注射器抽取腹腔内液体,如此反复两次。

4) 吸出的液体置于预冷的 50ml 离心管中,1000r/min 离心 10 分钟,弃上清液。

5) 将细胞悬于 20ml HAT 培养液中,细胞计数器计数,调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。

6) 将细胞悬液滴加入 96 孔培养板中,每孔 100 μl ,放置 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养备用。

(2) 细胞融合试验:细胞融合试验涉及免疫脾细胞悬液的制备,骨髓瘤细胞悬液的制备和细胞融合三个环节。

1) 免疫脾细胞悬液的制备

① 取已经免疫的 Balb/c 小鼠,摘除眼球取血,分离血清供检测抗体用;同时将小鼠处死,浸泡于 75% 乙醇 5 分钟。无菌手术开腹,取出脾脏,放入已盛有 5~10ml 不完全 RPMI 1640 培养液的平皿中轻轻洗 1 次,并仔细剥去周围的结缔组织。

② 将脾脏移入另一盛有 5ml 不完全 RPMI 1640 培养液的平皿中,置于 200 目不锈钢网上。用注射器内芯挤压研磨脾脏,并用平皿内的培养液轻轻冲洗铜网,使脾细胞全部通过网孔压挤到溶液中。

③ 将脾细胞溶液转至 50ml 离心管中,加入不完全 RPMI 1640 培养液至 30ml,混匀。1000r/min,离心 5 分钟,弃上清。沉淀细胞用不完全 RPMI 1640 培养液混匀,同法离心洗涤 1 次。

④ 取脾细胞悬液,加台盼蓝染液做活细胞计数后备用。

2) 骨髓瘤细胞悬液的制备

① 融合前 36~48 小时,将骨髓瘤细胞增殖培养于 100ml 细胞培养瓶中(一般按照一块 96 孔板的融合约需 2~3 瓶细胞进行准备),每瓶加 12~15ml 培养液,置 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养。

② 融合当天,用弯头滴管将细胞从瓶壁轻轻吹下,收集于 50ml 离心管内;1000r/min,离心 5 分钟,弃上清;细胞沉淀中加入 30ml 不完全培养液,同法再离心洗涤 1 次。

③ 将细胞沉淀重悬于 10ml 不完全培养液,取悬液,加台盼蓝染色做活细胞计数后备用。

3) 细胞融合试验

① 分别吸取 1×10^8 个脾细胞和 $(1\sim3) \times 10^7$ 个骨髓瘤细胞的悬液量,加入同一支 50ml 离心管中,补入预温的无血清 RPMI 1640 培养液至 50ml,使其充分混匀,1000r/min 离心 5 分钟,弃上清。

② 轻弹管底,使细胞沉淀呈糊状。将离心管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,吸取 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预温的 50% PEG₄₀₀₀ 1ml,逐滴加入离心管中,边滴加边振摇使细胞保持在混匀状态,1 分钟内加完后静置 90 秒。

③ 立即滴加预温至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 20ml 无血清 RPMI 1640,使 PEG₄₀₀₀ 稀释而停止作用。滴加方法是前 30 秒加 1ml,后 30 秒加 3ml,之后在 1 分钟内加完剩下的培养液。1000r/min 离心 5 分钟,弃上清。用无血清 RPMI 1640 洗涤 1 次。

④ 将细胞沉淀重悬于 10ml HAT 培养液中,轻微搅动混匀,加入有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中(100 μl /孔),置 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养。

(3) 融合后的选择性培养:一般采用 HAT 选择性培养基。该培养基是根据细胞内嘌呤核苷酸、嘧啶核苷酸的生物合成途径所设计的用于分离杂交瘤的特殊培养液,在普通的细

胞培养液中同时加入次黄嘌呤(hypoxanthine, H)、甲氨蝶呤(aminopterin, A)和胸腺嘧啶核苷(thymidine, T)。HAT 培养液保证了只有融合成功的杂交瘤细胞才能在该培养液中长期存活与增殖。

1) 将融合后的细胞接种于 96 孔板进行培养, 分别在第 2、4、7 天用加样器吸去每孔约 1/2 体积的培养液, 换入 1/2 体积的新鲜 HAT 培养液(即半量换液法), 放入培养箱中继续培养。

2) 一周后待对照孔中 Sp2/0 细胞均已死亡后, 改为 HT 培养液培养。

3) 大约在融合后 10~14 天, 待细胞克隆长至孔底的 25%~50% 时, 对杂交瘤细胞株进行筛选。

3. 杂交瘤细胞的筛选与检测 并非所有的杂交瘤细胞都能分泌针对目的抗原的特异性抗体, 因此要通过可靠、简便、快速的方法, 将那些能够分泌目的抗体的杂交瘤细胞筛选出来。常用的方法有酶联免疫分析法、放射免疫分析法和荧光免疫分析法。

4. 杂交瘤细胞的克隆化

(1) 克隆化前一天或当天, 制备饲养层细胞, 方法同前。

(2) 将培养液加入 24 孔板, 每孔 2ml。用弯头滴管将待克隆化的杂交瘤细胞从 96 孔板的小孔内轻轻吹下, 混匀后取 20 μ l (1:100) 或 50 μ l (1:40) 细胞悬液至 24 孔板中, 均匀分散。同时取 10~20 μ l 细胞悬液进行细胞计数, 计算转移至 24 孔板的细胞数。

(3) 用 RPMI 1640 培养液进行准确的连续稀释, 使细胞悬液成 10/ml。将细胞悬液分别加入已有饲养细胞层的 96 孔板中, 100 μ l/孔, 使每孔相应分别含 1 个细胞, 每排 8 孔或 10 孔。将细胞培养板放在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

(4) 培养 5~7 天, 仔细观察各孔中细胞的生长情况, 并在相应的盖板上作标记。一般在 5 天左右即可在倒置显微镜下观察到细胞克隆生长。

(5) 当细胞长满孔底的 1/3~1/2 时, 开始检测培养液中相应特异性抗体的活性, 方法同前。

(6) 选择抗体效价高, 呈单个克隆生长, 形态良好的细胞孔, 继续按上法再进行克隆和增殖培养, 并将所得的克隆细胞进行冷冻保存, 以便保种。

(7) 重复有限稀释, 直到所有仅一个细胞集落生长的培养孔上清均为抗体阳性则建株。

5. 杂交瘤细胞的增殖 一旦杂交瘤细胞成功地克隆化, 就可进行大量增殖以产生抗体。下面介绍动物体内诱生法。

(1) 小鼠预处理: 接种杂交瘤细胞前 1~2 周, 先给小鼠腹腔注射 0.5ml 降植烷或液状石蜡。预处理过的小鼠在 2~3 个月内均可使用。

(2) 接种杂交瘤细胞: 将培养的杂交瘤细胞吹洗下来, 1000r/min 离心 10 分钟, 弃上清, 用无血清培养液将杂交瘤细胞悬浮混匀, 将细胞数调至 1×10^8 /ml, 每只小鼠经腹腔注射 0.5ml。

(3) 采集腹水: 接种杂交瘤细胞约 7~12 天后, 可见小鼠腹部明显膨大。消毒后直接将 5ml 注射器的针头刺入小鼠腹部, 使腹水自然滴入离心管中, 用力晃动离心管防止腹水凝集。将收集的腹水经 1000r/min, 离心 5 分钟, 收集上清, 以 0.4 μ m 的小滤器过滤除菌, 分装后放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

6. 杂交瘤细胞的保存与复苏

(1) 杂交瘤细胞的保存: 杂交瘤细胞培养过程中应尽早将抗体阳性的杂交瘤细胞冻存起来, 放入液氮保存, 以防因体外传代培养的细胞突变或污染而丢失。常用的冻存保护剂有二

甲基亚砷(DMSO)和甘油,使用浓度在5%~15%,常用10%。

1) 将细胞悬液1000r/min离心10分钟,弃上清。

2) 细胞沉淀中加入1ml冻存液,混匀后移入冻存管,拧紧盖子,贴好标签,装入布袋中,置-70~-80℃低温冰箱,1天后转入液氮中,做好记录。

(2) 杂交瘤细胞的复苏:复苏时要求融解细胞速度要快,使细胞迅速通过最易受损的-5~0℃,防止细胞内形成冰晶引起细胞死亡。

1) 从液氮中取出冻存管,立即放在37℃水浴中解冻。

2) 解冻后立即用毛细吸管吸出细胞,将细胞移入37℃预热的5ml RPMI 1640 无血清培养液中,1000r/min离心10分钟,弃上清。

3) 细胞沉淀中加入含20%血清的RPMI 1640培养液,转入培养瓶,置5% CO₂,37℃孵箱培养,次日换液。

7. 单克隆抗体的纯化与保存

(1) 单克隆的纯化:单克隆抗体的纯化与多克隆抗体的纯化方法相同,腹水特异性抗体的浓度较抗血清中的多克隆抗体高,纯化效果会更好。按所要求的纯度不同采用相应的纯化方法。一般采用盐析、凝胶过滤和离子交换层析等方法。

(2) 单克隆抗体的保存:由腹水中获得的抗体,经离心去除细胞成分,再经冷冻超速离心,取上清液加0.1% NaN₃,少量分装,冷冻于-70℃可保存几年。腹水抗体也可冷冻干燥后低温(4℃)保存,可保存两年。融化后放置于4℃可保存1个月。短期使用的腹水抗体,4℃3~4个月仍保持稳定,培养上清加入0.1% NaN₃,贮于-20℃,2年不失去活性。纯化后的单克隆抗体,冷冻干燥保存于-70℃可保存几年。取出融解后,保存于2~8℃,1个月内可保持稳定。

8. 单克隆抗体性质的鉴定 为了更好地利用所获得的单克隆抗体,需要对单克隆抗体的性质进行鉴定,包括染色体分析、抗体的效价、亲和常数、特异性、免疫球蛋白的类型及亚类等。

(1) 杂交瘤细胞的染色体分析:正常小鼠脾细胞有40条染色体,且全部为端着丝点染色体;小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0染色体数目变异较大,为62~68条,且有中部着丝点染色体和亚中部着丝点染色体等标志染色体。当两种细胞融合后,得到的杂交瘤细胞的染色体应反映出两种亲本细胞染色体的特点,一是数量上接近两种亲本细胞染色体数目的总和;二是在结构上除了多数为端着丝点染色体外,还应出现少数中部着丝点等标志染色体。

(2) 抗体效价:抗体效价测定是指测定抗体的物理状态及其在体内的滞留时间,以其与抗原反应的多少来表示其免疫效果。常用的检测方法是ELISA法。

(3) 抗体亲和力测定:测定抗体亲和力的方法较多,但在实际时却受到种种限制。以ELISA为基础的测定方法,由于可满足基本要求,并且操作简便,无需特殊设备,因此受到广泛应用。

(4) 抗体的类别及亚类鉴定:杂交瘤细胞分泌的McAb其本质是小鼠不同类别及亚类的Ig,其中以IgG及其各亚类和IgM最为多见。抗体类别及亚类可用相应的抗血清进行鉴定,也可用商品化的ELISA鉴定试剂盒。主要方法有双向免疫扩散法、间接ELISA法和ELISA夹心法。

(5) 抗体特异性的鉴定:特异性鉴定是检测抗体是否还会与目的抗原之外的其他抗原反应。对于可溶性抗原,检测的方法可采用放射免疫竞争性试验(RIA法)及蛋白印迹杂交