

HLA的测定

李正道博士講学資料

袁必文 整理
周鸣生

四川医学院

1981年5月

说 明

本书是根据李正道博士1980年11月来川医讲学资料翻译整理，内容包括 HLA 有关的理论知识（HLA 研究简史、命名原则、遗传学和生物化学）；组织相容性试验方法，HLA 测定的临床应用；HLA 抗血清的获得；HLA 分型实验室筹建设计等，内容丰富，方法具体，对 HLA 研究单位和医院器官移植组织配型实验室非常适用。

由于本书未经本人审阅，加之我们水平有限，缺点错误在所难免，殷切希望同志们提出宝贵意见。

四川医学院微生物学教研室

1981年5月

129131

目 录

I. 历史回顾和命名	(1)
A. HLA研究 简史	(2)
B. 命名 原则	(3)
II. HLA的遗传学和生物化学	(6)
A. 遗传学	(6)
B. 不同地域的HLA差异	(8)
C. 生 物 化 学	(8)
III. 组织相容性试验方法	(11)
A. 前 言	(11)
B. 细胞分离原理	(11)
C. 用于HLA-A、B、C分型的淋巴细胞制备	(11)
D. 脾脏淋巴细胞的制备	(15)
E. 用于HLA-DR分型的B淋巴细胞制备	(16)
F. 用于白细胞凝集反应的粒细胞制备	(18)
G. 冷冻细胞的制备	(18)
H. 用于HLA分型的标准微量淋巴细胞毒试验	(19)
I. 白细胞凝集反应交叉配型试验	(24)
J. 单向混合淋巴细胞反应	(25)
K. HLA-D分型	(30)
IV. HLA测定的临床应用	(30)
A. 器官和骨髓移植	(31)
B. 亲子鉴定中的HLA测定	(34)
C. HLA与疾病的相关	(36)
D. 相关强度的计算	(37)
E. 有关HLA和疾病相关的学说	(38)
F. 单一供者的血小板输血	(38)
G. 对“无反应”的病人应用HLA相容的血小板	(40)
H. 对“非无反应”的病人应用单一供者的血小板	(40)
V. HLA抗血清的获得	(41)
A. 商业来源	(41)
B. NIH血清库	(41)

C.同行之间交换	(41)
D. HLA试剂筛选程序.....	(41)
E.小型实验室的HLA抗体筛选.....	(42)
F.中型实验室的HLA抗体筛选	(42)
G.大型实验室HLA抗体的筛选和获取.....	(43)
H.最佳试剂的获得	(43)
I.新的抗原特异性测定.....	(44)
J.HLA - DR试剂的获取.....	(44)
VI. HLA 分型实验室筹建设计	(45)
A.人员配备	(46)
B.空间和设备要求	(46)
C.生物试剂	(48)
D.混合淋巴细胞培养和D位点分型的特殊规划.....	(48)
VII.例题	(49)
例 1: HLA 血清分型的判断	(50)
例 2: HLA 血清分型 (“裂解现象”)	(51)
例 3: DR 血清分型	(52)
例 4: 家系调查, 单倍型的指定.....	(54)
例 5: 亲子关系排除.....	(60)
例 6: 亲子关系不能排除.....	(61)
例 7: 交叉配型混合淋巴细胞培养反应.....	(62)
例 8、9、10: 抗体筛选.....	(63)

HLA 的 测 定

I、历史回顾和命名

HLA 基因复合体是位于人类第 6 对染色体短臂上一组紧密连锁的基因群 (图 1)。其基因产物最是从多次输血的病人血清中, 以后又从经产妇血清中, 查出白细胞凝集素而得到证实的。当初曾考虑这些抗原与红细胞同种异型抗原相似, 是遗传决定的存在于白细胞上的同种异型抗原, 但是很快就明确了 HLA 抗原不仅存在于白细胞上, 实际上, 除成熟的红细胞以外, 体内绝大多数有核细胞上都有 HLA 抗原。虽然对这些基因产物的生物学功能尚不完全清楚, 但是了解它们是同种异体之间移植排斥的重要抗原 (因此称之为组织相容性抗原——Histocompatibility antigen); 同时, 也是同种异体之间输血时, 已致敏的机体血小板发生免疫破坏的主要原因。新近还证明, 在机体建立免疫反应时, 这些基因产物, 在细胞之间相互作用的调节上, 起着关键性的作用。

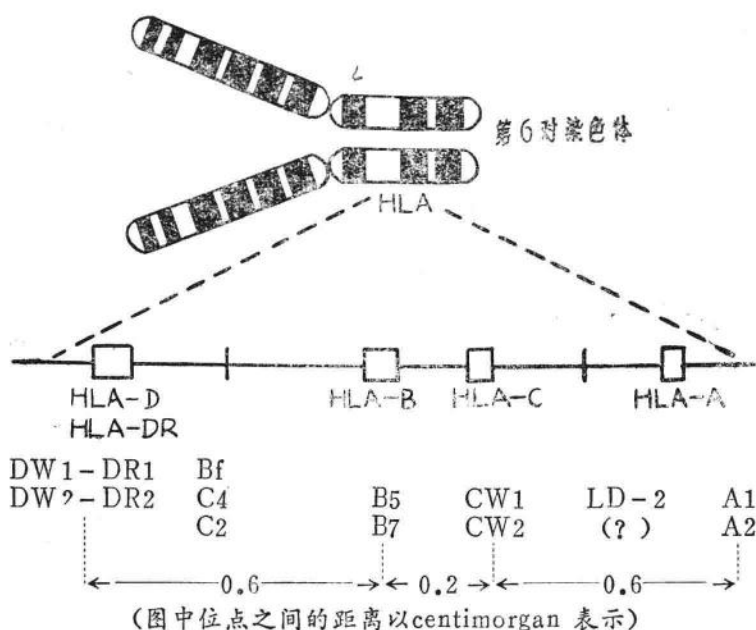


图 1、HLA 基因复合体。

所有研究过的哺乳类和禽类, 都具有一个类似于人类 HLA 复合体的主要组织相容性复合体 (Major Histocompatibility Complex, 简称MHC)。这些MHC的发现来自移植研究的观察, 即 MHC 能提供移植抗原; 同时, 在纯系小鼠之间进行移植时, 如果这些小鼠的MHC抗原在遗传学上是相互配合的, 则可以明显延长移植物的存活时间。MHC在所有的物种都表现出明显的多态性 (Polymorphism), 每个位点都有不少可以变换的等位基因。关于MHC的作用。最初只了解与移植有关, 但是许多研究者相信必然还有其它的功能存在。60年代后期, McDevitt 及其同事观察到, 正常纯系动物对特异抗原的免疫反应性, 在一定

程度上取决于MHC区域中的遗传因素，因而证实了MHC的确还具有其它功能。这些控制免疫反应性的基因称为免疫反应(Ir)基因。它们在MHC中分布的区域称为I区。Ir基因在人类虽然尚未最后肯定，但很可能是存在的。已观察到的某些疾病与HLA的联系，至少与免疫反应的遗传控制有关。

所以HLA复合体的主要功能应当包括免疫反应的调节在内。有些基因产物在初次免疫反应的识别相中重要，有些还对免疫效应提供靶抗原。这些作用，可以协助解释为什么这些抗原在同种异体移植排斥和血小板的免疫破坏中是重要的抗原，同时也可能解释与HLA复合体有关的某些疾病的易感性。

A、HLA研究简史

1954年Dausset首先发现多次输血的病人血清中含有白细胞凝集素，认为这些凝集素并不是自然抗体，而是进入受者体内的白细胞，带有受者不具有的抗原，刺激受者产生的同种异型抗体。这一设想得到不同研究者强有力地支持。

1958年Dausset观察到七个多次输血病人的血清，能凝集60%左右法兰西人群的白细胞而不凝集病人自身的白细胞，因而发现第一个人类白细胞抗原，称之为Mac抗原，即现在了解的HLA-A2和HLA-A28复合物。

大约在同一时期，Payne和van Rood证明经产妇血清中存在白细胞凝集素。Payne还发现非溶血性输血反应发热的病人血清中，常常含有白细胞凝集素。

1962年van Rood利用电子计算机，解决了从复杂的血清反应中分析特异性的难题，并且利用计算机分析法，鉴定出一个二等位基因抗原系统“4”(即现在的HLA-B抗原系统)。van Rood还发现白细胞抗原存在于人类绝大多数组织细胞上。

1964年Terasaki和McClelland推荐了在技术上非常重要的微量淋巴细胞毒试验，虽然已有不同的改良法，但是直到现在，在HLA分型中仍然起着主要的作用。

随着第一个白细胞抗原的发现和适宜的实验技术建立以后，用血清学方法鉴定的抗原特异性迅速增加。1964年Payne等人鉴定出另外一个二等位基因抗原系统“LA”(即现在的HLA-A抗原系统)。

1967年证明，已发现的全部HLA特异性都属于同一个遗传体系。首先是Ceppellini和Kissmeyer提出，HLA系统是由两个紧密连锁的基因位点所组成，分别控制着上述两个不同的抗原系统。这一设想，被家系研究中发现的两个位点之间的交换(crossing over)与重组(recombination)，以及对不同子代遗传图谱的分析对比所证实。在第四届国际组织相容性抗原专题讨论会上，肯定了“A”和“B”两个独立的基因位点。

1970年Sandberg等发现，用血清学方法鉴定的HLA抗原中，还存在第三个位点系统(即现在的HLA-C位点系统)，并且明确了它对移植的价值。第四个位点系统的发现，与混合淋巴细胞培养(MLC)反应密切相关。早在1967年，Amos等即发现HLA相同的两个同胞体的MLC为阳性反应，提示在HLA复合体中还存在另一个位点(即现在的HLA-D位点)。到1973年，已进展到可以用纯合细胞测定MLC抗原。

1975年，在第六届国际专题讨论会上，同时肯定了HLA-C位点和HLA-D位点系统的存在。

早在1974年即有一些研究者发现，用血清学方法鉴定的基因产物，与用混合淋巴细胞培

养鉴定的D位点抗原极为一致。1977年弄清了这些与D位点相关的（DR）抗原，主要分布在单核细胞和B淋巴细胞上。

1977年，在第七届国际专题讨论会上，确定了用血清学方法鉴定的HLA—DR 抗原系统的存在，并且肯定了HLA—DR位点与HLA—D位点密切相关。

B、命名原则

根据世界卫生组织国际组织相容性抗原命名委员会的决定，将上述这些位点相互关联的基因区域称为 HLA。各个位点的命名，在 HLA 代号之后以字母表示，例如 HLA—A，HLA—B，HLA—C，HLA—D和HLA—DR。每个位点各包含许多等位基因，其不同的特异性，在位点之后以数字编号表示，例如HLA—A1，HLA—B5等。对尚未最后确定的特异性，以专题讨论会（Workshop）的缩写字母 W表示，例如HLA—BW21，HLA—DRW6等。

表 1 显示已发现的HLA特异性，以及它们在美国白人中抗原频率的近似值。注意 A和B位点特异性的编号不连续，这是因为多数特异性是在 A和B 两个位点划分之前建立的，划分后仍沿用旧号。还应注意BW4和BW6，它们过去称为4A和4B，在大量白细胞抗原建立时未编入特异性系列中，因为当时是以它们作为白细胞抗原系统“4”的代号。现在了解 BW4和BW6特异性比较宽广，常与B位点的其它特异性同时存在，可以看成是 B位点的共同特异性（Public specificity）。有人提出，BW4和BW6是给HLA—B 特异性抗原的前体物质编码的基因，在此基础上，再经过特异性等位基因的作用而产生最终的基因产物。在 BW4 和qW6两种共同特异性中，BW6更为宽广，与其相关的 B 特异性约65%；而 BW4者只35%左右。与BW4和BW6有突出联系的等位基因，列于图 2 和图 3 中。在人群中，BW4和BW6的三种组合形式都可以出现，但抗原频率不一，BW4—BW4为 13%，BW4—BW6为 50%，BW6—BW6为37%。

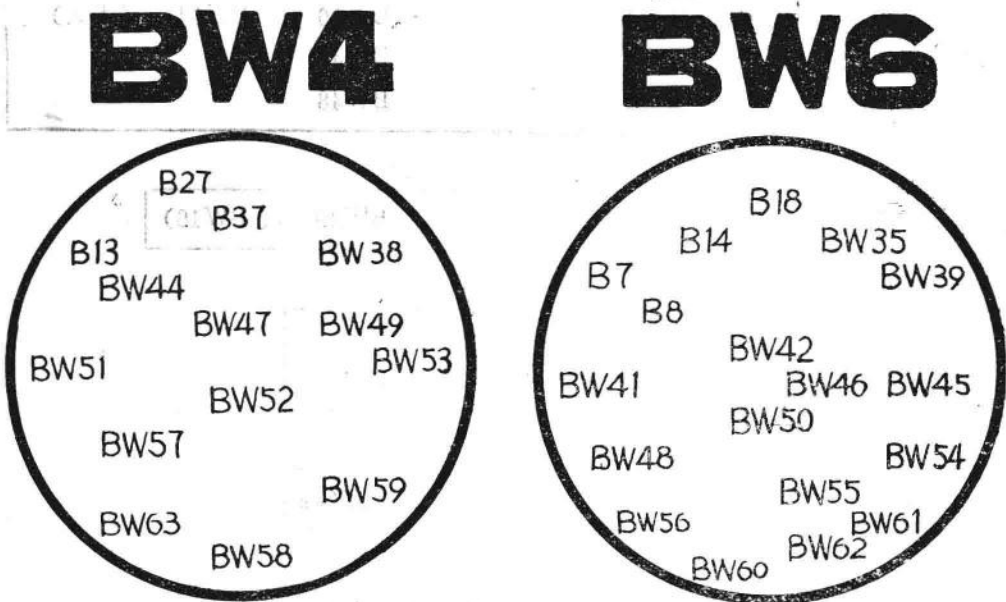


图2、与BW4和BW6共同特异性相关联的B 特异性

BW4

BW6

BW51 , BW52 (B 5)
BW53

B18
BW35

BW63 (B15)
BW57 , BW58 (B17)

BW62 (B15)
BW46

B27

B7
BW55 , BW56 (BW22)
BW42
BW54

BW44 (B12)
BW49 (BW21)

BW45 (B12)
BW50 (BW21)

B13
B47

BW60 , BW61 (B40)
BW41
BW48

BW38 (BW16)

BW39 (BW16)

BW59

B8
B14

B37 (_{w4})

B37 (_{w8})

图3、 与 BW4和 BW6共同特异性相关的 B特异性
(方格范围内为有交叉反应的抗原组)

表1

已发现的 HLA 特异性

HLA-A	GF*	HLA-B	GF	HLA-C	GF
A1	.148	B7	.088	CW1	.039
A2	.257	B8	.084	CW2	.050
A3	.116	B13	.027	CW3	.106
A11	.062	B14	.037	CW4	.121
AW23 (9)**	.024	B15	.057	CW5	.062
AW24 (9)	.088	B18	.050	CW6	.091
A25 (10)	.020	B27	.038	CW7	
A26 (10)	.041	BW35	.093	CW8	
A28	.044	B37	.015		
A29 (19)	.041	BW38 (W16)	.032	HLA-D	GF
AW30 (19)	.026	BW39 (W16)	.019	DW1	.069
AW31 (19)	.028	BW41	.015	DW2	.075
AW32 (19)	.042	BW42	.003	DW3	.882
AW33 (19)	.017	BW44 (12)	.113	DW4	.053
AW34	.005	BW45 (12)	.009	DW5	.056
AW36	.003	BW46	.001	DW6	.103
AW43	.040	BW47	.004	DW7	.103
		BW48	.005	DW8	.031
		BW49 (W21)	.023	DW9	.014
		BW50 (W21)	.012	DW10	.026
		BW51 (5)	.062	DW11	?
		BW52 (5)	.017	DW12	.048
		BW53	.078		
		BW54 (W22)	.000	HLA-DR	GF
		BW55 (W22)	.024	DR1	.083
		BW56 (W22)	.006	DR2	.133
		BW57 (17)	.034	DR3	.111
		BW58 (17)	.012	DR4	.114
		BW59	.003	DR5	.104
		BW60 (40)	.040	DRW6	.025
		BW61 (40)	.016	DR7	.126
		BW62 (15)	.050	DRW8	.037
		BW63 (15)	.007	DRW9	?
		BW4		DRW10	?
		BW6			

* GF 代表高加索人中的基因频率。

** 括弧中的号码表示裂解前更宽的特异性。

基因频率和抗原频率的计算公式如下：

$$G = 1 - \sqrt{1 - f}$$

$$f = 2G - G^2$$

G = 基因频率

式中：f = (观察到的) 抗原频率

II、HLA 的遗传学和生物化学

A、遗传学

欲了解HLA复合体的遗传学，可以将组织相容性基因位点比喻为绳索上穿的一串念珠，每个念珠代表一个位点，在染色体上占据一个位置。遗传时这串念珠必须完整地传给下一代，也就是说，这些位点的基因在染色体上是连锁在一起，作为一个整体而遗传的。由于人类的染色体成对存在，而HLA的等位基因又是共显性的（co-dominant），其编码抗原都能在细胞上表达出来，所以，理论上在一个个体身上可以测出10个基因产物，然而常常由于某一位点的纯合性，或存在有尚不能测定的空白抗原，或由于其它技术等原因而不一定能同时测得10个抗原。

在同一染色体上，这些位点的基因组合称为一个单倍型（haplotype）。单倍型在染色体分离（segregation）时是独立的，而位于单倍型中的基因，在染色体分离时却往往连锁在一起，作为整体而行动，除非染色体基因发生交换与重组，连锁的基因才会分开。图4显示一个婚配的例子及其可能的子代。注意父系和母系的单倍型分离和婚配后组合的情况，以及各个单倍型上的基因连锁遗传的情况。在这一例的子代中，单倍型完全相同的机会为1/4；完全不同的机会亦为1/4；只一个单倍型相同的机会则为1/2。

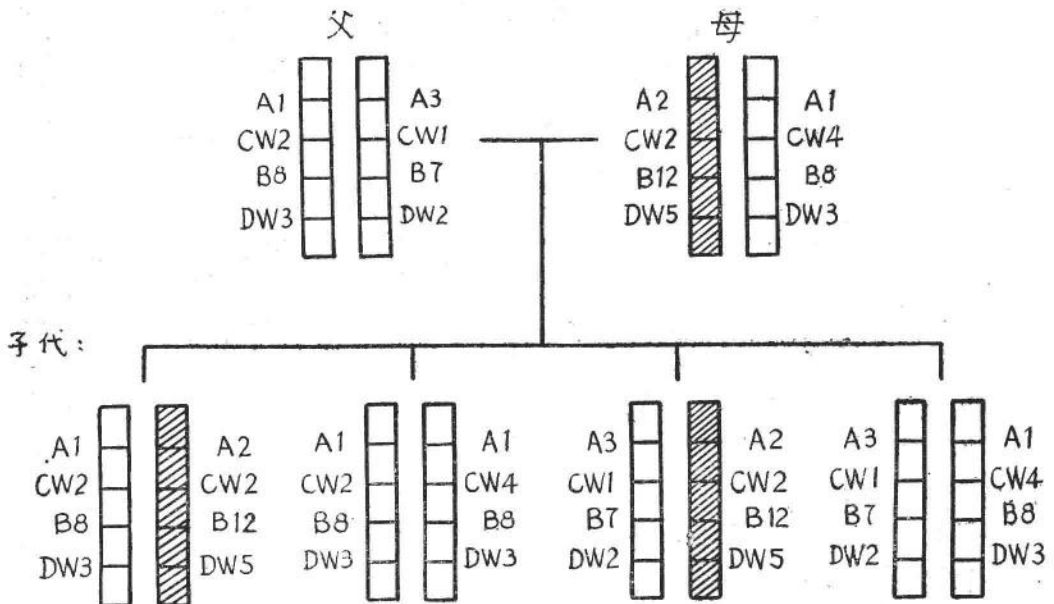


图4、亲代婚配后子代可能的单倍型组合。

重要的原则是，一个亲代和子代只能共有一个单倍型，因为子代必须从另一个亲代获得另一个单倍型，才能组合成子代的染色体对。所以在杂合的人群中，亲子之间完全配合的可

能性是非常渺茫的。共有一个单倍型的机会，还可以在父母辈或祖（外祖）父母辈亲属，以及堂（表）兄弟姊妹中出现。当找寻移植供者或血液供者时，这些也是重要来源。

虽然 A、B、C、D、DR 位点的基因紧密连锁，仍有报告在一定数量的家庭中发生基因交换与重组者。大量的研究资料报导，在人类4614个有丝分裂中出现了40个交换与重组。一般是基因位点距离愈远者，发生交换的可能性愈大。标定两个位点之间的距离，也是通过其重组频率的高低来决定，例如A与B位点之间的重组频率为0.0097，表明两个位点之间的跨距为0.97 cM (centimorgan)。B和D位点之间相距大约0.5 cM，C位点介于A和B位点之间，估计距A位点0.7 cM，距E位点0.2 cM。新近报告有某些家庭在D与DR位点之间出现交换与重组，但其频率很低，尚未最后确定。图5为交换与重组的例子。

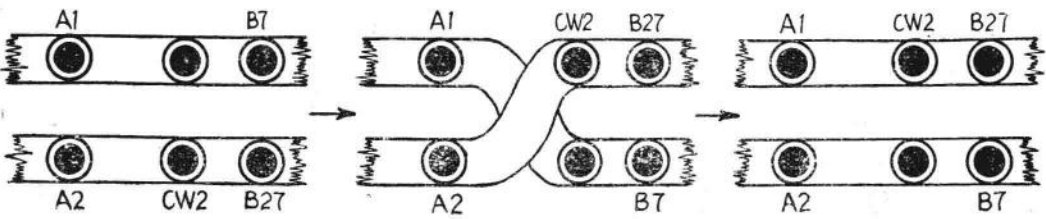


图5、交换与重组。（注意一对染色单体上的基因，在减数分裂时发生互相交换，重新组合为一对染色体）

在同一染色体上，有些HLA基因较之预期的机率更为经常出现，这是一种连锁不平衡现象 (linkage disequilibrium)。最有名的例子为A1 B8单倍型，A1和B8经常同时存在。这种在基因水平上的连锁不平衡，同样反映在人群中A1和B8抗原的相关。虽然A1抗原只有31%的随机频率，但是在B8阳性的人群中，约有82%也具有A1抗原。表2显示某些HLA基因较强的连锁不平衡关系。由于连锁不平衡现象，通过各位点基因随机频率的简单乘积是难以决定一个单倍型的频率的，而需要代之以实际观察到的频率。表2中同时列出了实际观察到的高加索人某些基因的频率以及随机频率相乘的预期频率，后者明显低于前者。

表2 某些HLA基因的连锁不平衡关系

单 倍 型			频 率 %	
A	B	D	观察到的	预期的*
A1	B8		9.8	2.1
A3	B7		5.4	2.1
	B8	DW3	8.6	1.4
	B7	DW2	3.9	1.8

* 预期的单倍型频率为两个位点基因随机频率的乘积。

HLA不同位点抗原之间的强烈相关,还应当提到DR位点与D位点抗原之间的相关关系,其密切的程度,往往在实际测出DR位点的某些抗原型别时,即可直接推断相应的D位点抗原。但是这种强烈相关,并不完全能规律性地出现,同时在技术上也缺乏齐备的DR抗血清,所以对于D位点抗原的测定,不宜依赖这种推测。目前还须研究弄清D位点与DR位点之间的本质联系。

B、不同地域的HLA差异

1972年第五届国际组织相容性分型专题讨论会曾初步清理过世界上不同地域的HLA表现。发现不同地域和人种有其HLA特点。

高加索人的特点是A1和B8抗原存在较普遍,其次是A3和B7抗原。欧洲高加索人的A3和B7频率,从欧洲北部向南部逐渐降低;而B5和BW35频率,从北部到南部却逐渐增高。在非洲黑人中,B17抗原最为常见。亚洲人则以高频率的A9、B40和BW22为特征。A2抗原在几乎所有已研究过的人群中都可以测出,但是以美洲印第安人最高,约80%。不同人种也发现缺少某些抗原或频率极低(见表3)。研究中还逐步明确了有些抗原只存在于某一人群中,例如AW34、AW36、AW43和BW42、BW53均为黑人抗原;BW46为中国人抗原;BW48为爱斯基摩人抗原;BW54为日本人抗原。此外,某些抗原如A1、A22*、B15、B17、BW22,可以用人血清同种异型抗体在猩猩中查到;而另一些抗原包括A2,则在猩猩中未查出。

表3 不同人种中缺少的或低频率的HLA-A和B位点基因

黑 人	高加索人	东 方 人	
A11	AW34	A1	B8
AW33	AW36	A3	B13
B37	AW43	AW23	B14
BW38	B37	A25	B18
BW54	BW41	A28	B27
BW55	BW42	A29	B37
BW56	BW49	AW30	BW38
BW60	BW50	AW32	BW41
BW62		AW34	BW42
BW63		AW36	BW49
		AW43	BW50
			BW57
			BW58

C、生物化学

有关HLA的生化学性质研究较为缓慢,因为HLA的提纯比较困难,不容易获得足够化学分析用的纯净材料。现在了解,HLA-A、B、C抗原分子由两条多肽链组成(图6)。一条重链,为糖蛋白,带有抗原决定簇,已明确抗原决定簇位于分子的多肽部分而不在碳水化合物部分。

* 原文为A22,可能有误。

合物侧链部分；另一条轻链，为 β_2 微球蛋白。

糖蛋白重链嵌入胞膜中，含有约3%的碳水化合物，分子量45000左右，可以被酶水解为两部分，一部分分子量35000，带有抗原决定簇和碳水化合物侧链；另一部分继续留在胞膜中。

如果用去垢剂提取法，可以获得较为完整的重链。有证据证明，在重链内存在有一个或两个链内二硫键。

β_2 微球蛋白是一类功能尚不清楚的蛋白质，分子量11000—12000，在血清中存在少量，在细胞表面以HLA分子的轻链形式存在，不嵌入细胞膜，与重链以非共价键方式结合，其结构与免疫球蛋白重链恒定区某些部分相似。 β_2 微球蛋白与HLA的特异性未证实有联系，但是它能控制细胞上HLA抗原性的表达。

利用荧光抗体技术，可以了解HLA存在于细胞膜表面的自然状况。这种技术即已知的成帽现象(capping)，先加入HLA的二价抗体孵育，然后再加入荧光标记的抗球蛋白，即能诱导这种抗原抗体复合物集结成帽状。成帽并不完全是被动的过程，因为它伴有能量代谢改变，并且所成的帽可以借助内吞作用而进入胞内，使细胞表面几乎不留下原有的相应抗原，这一现象称为剥脱(stripping)。通过成帽和剥脱过程，显示出属于同一等位基因系中两个不同的抗原(例如A1和A2)将分别地成帽和剥脱。此外，属于不同等位基因系的两个抗原(例如A1和B8)，也将独立地成帽和剥脱。这些研究结果提示，不同的HLA特异抗原在细胞膜上是以不同的分子存在的。

HLA—D和DR分子的分布，较HLA—A、B、C分子局限，仅仅发现存在于巨噬细胞、B淋巴细胞、皮肤的Langerhans细胞和精子。

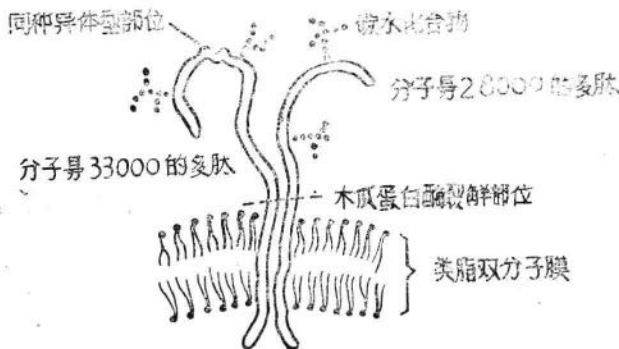


图7、HLA—DR抗原结构模式图。

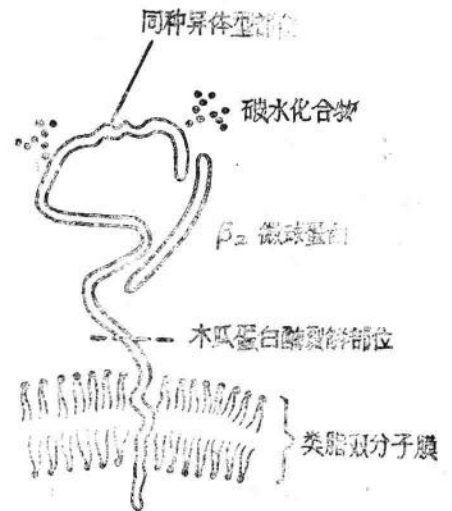


图6、HLA—A、B、C抗原结构模式图

它们的构造还没有完全确定，但是已了解是由非共价连结的、分子量为28000和33000的两条多肽链组成(图7)。两条链均含碳水化合物，其中较重的一条具有多态性。D和DR抗原能刺激T细胞强烈增殖和抗体的产生，刺激T细胞的激活决定簇称为D而刺激抗体产生的则称为DR。

血清学交叉反应是一种现象，

在这种提象中,直接针对某一HLA决定簇的抗血清,同时也与其他HLA决定簇发生反应,例如抗-A28常常与A2反应;抗-A11和A3反应等。这些交叉反应尚未能圆满解释,已有的解释认为交叉反应抗原彼此共有重要的结构成分,但各自又保留有特异的、可区别部分。图8~图10显示HLA某些抗原之间的交叉反应及强度。

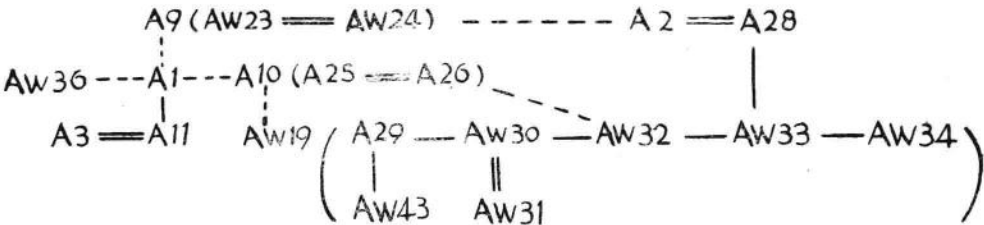


图8、HLA—A抗原之间的交叉反应。
 (——: 强烈交叉反应
 ———: 常有交叉反应
 - - - - : 偶有交叉反应)

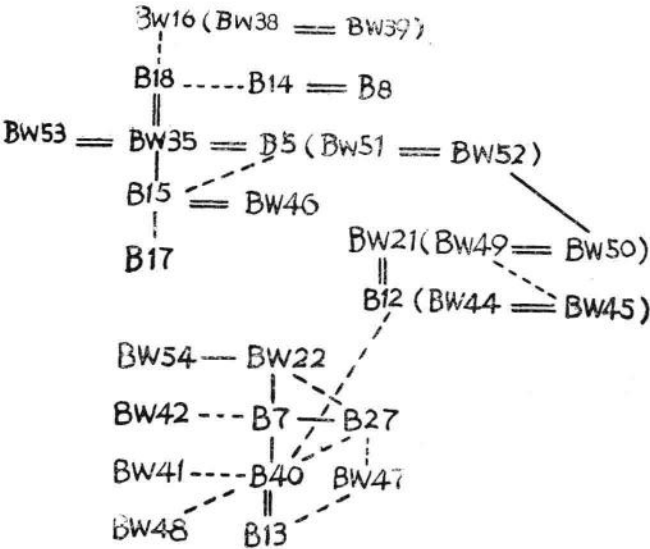


图9、HLA—B抗原之间的交叉反应

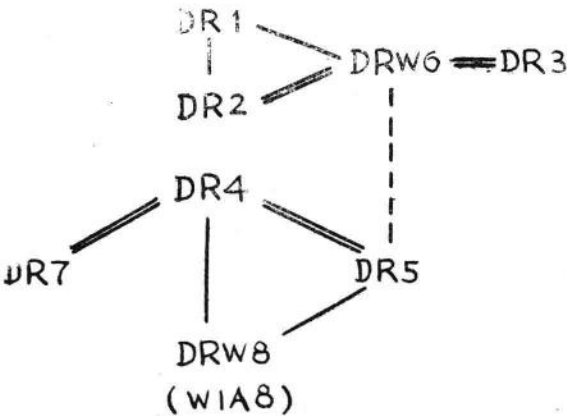


图10、HLA—DR抗原之间的交叉反应。

Ⅲ、组织相容性试验方法

A、前言

组织相容性实验室所进行的少数特殊实验，在许多普通实验室都未开展。因为这些特殊实验由于以下种种原因耗费颇大：1) 标本少，临床上仅仅用于少部分病人；2) 试验需用纯化的细胞制剂；3) 手工操作，每次需要花费3~6小时的实验时间；4) 抗血清和定型细胞试剂尚缺乏商品供应，必须通过大量的筛选来获取。

多数实验室根据情况选用下面三种基本试验方法：1) 微量淋巴细胞毒试验；2) 混合淋巴细胞培养；3) 白细胞凝集试验。微量淋巴细胞毒试验用于HLA—A、B、C分型、HLA—DR分型、细胞毒抗体交叉配型，以及HLA抗体的筛选和检定。白细胞凝集试验主要用于输粒细胞时的交叉配型，以及对非溶血性输血反应发热的判断。混合淋巴细胞培养用于交叉配型或HLA—D位点分型。由于各项试验结果关键取决于细胞制备的好坏，所以下面讨论细胞分离技术。

B、细胞分离原理

外周血一般含有五种细胞成分：淋巴细胞，单核细胞，粒细胞，红细胞和血小板。利用它们彼此之间理化性质的差异，可以有效地分离开来。重要的性质包括大小，密度，吞噬能力和粘附能力。此外，还可以根据细胞膜上是否存在某种抗原或受体，采用不同的选择性分离法。这些性质如何用于细胞的分离纯化，将在有关的技术操作部分更详细地讨论。

C、用于HLA—A、B、C分型的淋巴细胞制备

HLA—A、B、C抗原分布广泛，存在于所有的有核细胞和血小板的细胞膜上。成熟的红细胞上一般查不出这些抗原。在历史上，不同的方法和不同类型的细胞，都被用来检测过HLA特异抗原，包括血小板补体结合试验，白细胞凝集试验和细胞毒试验。现在常规的HLA分型，几乎都采用染色排除的微量淋巴细胞毒试验。此试验有赖于HLA抗体结合于相应的HLA抗原上，然后通过补体的活化而产生细胞膜的损伤。淋巴细胞受损的多少，根据染料着色的比例来判断。

粒细胞和单核细胞对此试验有影响，因为它们能非特异地吞噬染料而造成细胞损伤的假象。明显的粒细胞和血小板沾染能引起假阴性反应，因为它们争相与HLA抗体结合，减少了结合到淋巴细胞上的抗体。红细胞的沾染构成另一类问题，即在低倍镜下很难将它们与小淋巴细胞鉴别开。因此，微量淋巴细胞毒试验的关键是分离淋巴细胞时，应当尽可能避免其它血细胞（红细胞，血小板，粒细胞和单核细胞）沾染。

1、外周血淋巴细胞的制备

a、器材

Fisher离心机

血液分量搅拌器 (Hematech Aliquot Mixer)

37℃ 孵育箱

标准显微镜

17×100mm带塞塑料培养管

带塞Fisher离心管

细胞计数设备

b、试剂

外周静脉血 5~10ml

1%甲基纤维素

羰基铁

Hanks平衡盐溶液 (HBSS)

含5%胎牛血清 (FCS) 的McCoy's培养液

台盼兰

Ficoll-Isopaque白细胞分离液 (LSM), 室温时比重1.077~1.080

c、方法

(1) 按照标准方法采集5~10ml外周静脉血, 放于不含酚的肝素或枸橼酸葡萄糖 (ACD) 中抗凝, 或者采用脱纤维血。

(2) 取HBSS配制的1%甲基纤维素1ml, 加于盛有250mg羰基铁粉的17×100mm塑料管中。

(3) 加5ml抗凝血于上述试管中。

(4) 紧塞管口, 放于血液分量搅拌器上, 在37℃不断搅拌15分钟。

(5) 斜放试管, 在37℃静置孵育15分钟。

(6) 用巴氏吸管吸出2ml富含细胞的血浆层, 各取1/3 (约0.67ml) 分别仔细重迭在3个Fisher试管内的0.3ml LSM液面上。如果需要更多的淋巴细胞, 可另取富含细胞的血浆层同法处理。

(7) 在Fisher离心机中仔细离心1500×g, 3分钟。注意缓缓加速以免界面相混。

(8) 用巴氏吸管在血浆与LSM界面层仔细吸出淋巴细胞, 加于含有0.5ml HBSS的Fisher离心管中。

(9) 混合清洗, 1000×g离心1分钟。

(10) 吸去上清液, 将沉淀重新混悬于1ml含5%FCS的McCoy's培养液内。

(11) 细胞计数, 并测定活性。调整细胞浓度至 2×10^6 个/ml。

d、结果说明

如果应用采集后不超过4~6小时的新鲜血标本, 经过此种方法分离后, 平均每ml血标本应当收获 1×10^6 个淋巴细胞。其中几乎不含红细胞和血小板, 粒细胞不到5%, 没有单核细胞, 并且90~100%的淋巴细胞均具有活性。如果有红细胞或粒细胞明显沾染, 可以将细胞悬液重新加于LSM上, 重复上面(6)~(11)的分离步骤。

e、附注

(1) 抗凝剂: 肝素作为抗凝剂, 不应含防腐剂酚, 因为酚对细胞有毒性。大多数实验室喜欢用不含防腐剂的肝素, 特别对需要保存过夜的标本喜欢用。ACD抗凝剂也使用, 并且为有些实验人员所欢迎, 因为他们觉得ACD对保存细胞的活性更好一些。最后, 脱纤维血也有其优点, 虽然最后得到的淋巴细胞数目少些, 但是在脱纤维过程中清除了全部血小板。它的

主要缺点是，送到HLA实验室来的脱纤维血标本，往往脱纤维的效果很差。

(2) 细胞保存：以全血方式保存的标本，细胞活性变化显著。主要取决于采血时的条件，标本运送时的温度，以及标本采自健康人或病人。一般在采血后11小时内，均可从全血标本中分离出有活性的淋巴细胞。此后，活性将不同程度地下降。如果标本需要保存过夜，最好分出淋巴细胞，保存在准备的培养液中。这样的细胞可以保存一周而不会有明显的活性丧失。在室温保存的全血标本，其淋巴细胞活性，也可以通过加入等量含有肝素的培养液而得到延长。必须较长期（数周或数月）保存的标本，应当冷冻和保存在低温中，最好保存在液氮的气相中。CO₂干冰（温度可降至-100℃~-200℃）也可以保存细胞，并且方便运送。

(3) 羧基铁和甲基纤维素：将细胞和羧基铁一起孵育于37℃的目的，是去除吞噬细胞（粒细胞和单核细胞）。这些吞食羧基铁后的细胞密度增大，在密度梯度离心中即可与淋巴细胞分开。大量血小板也存在于羧基铁沉淀内而被去除。甲基纤维素促进红细胞形成钱串状，便于与白细胞分离开。

(4) Ficoll-Isopaque离心：Ficoll是一种高分子量的蔗糖聚糖，Isopaque（和Hypaque）是含碘的有机物，也用作肾脏静脉造影时x射线的对比介质。作为细胞分离的介质，Ficoll提供粘滞性，促进红细胞的钱串形成；而Isopaque则增加介质的密度。室温下当Ficoll和Isopaque混合的比重达到1.077时，这种分离液即比淋巴细胞、血小板和单核细胞重，而比粒细胞和红细胞轻。在适当的离心力和时间条件下，粒细胞、红细胞和吞食了铁粉的单核细胞，都将随着离心力穿过分离液层而沉于管底。淋巴细胞和剩下的血小板仍然留在血浆与分离液的界面层中。以后再经过低速离心清洗，可以从淋巴细胞中除去绝大多数血小板。与分离有关的常见问题有：

①超载现象：界面范围内细胞相对过多，将影响分离而增加界面层的红细胞和粒细胞沾染。这是一个物理学问题，因为没有足够的空间供给细胞分离，结果导致“圆木拥塞（log jamming）”现象。

②分离中操作粗暴（例如突然加快离心速度或迅速刹车等）将引起细胞搅混。

③此项技术（以及许多其它技术）通常不适于来自尸体供者的外周血标本，因为其中常含有吞噬功能已损伤的大量粒细胞。

(5) 细胞活性低：活性低于90%的淋巴细胞制剂，可以用其它方法处理而得到改善。用分离液再离心较长时间，可以使损伤了的细胞下沉管底，因为这些细胞的膜已漏损，而使密度较大的介质易于进入细胞，细胞的密度也因而增大。更有效的方法是加DNA酶处理短时间，然后重选于分离液上再离心分离，活性不高的细胞，将被杀死和溶解或沉于管底。这样，细胞总数将减少而活性却大大增加。

(6) DNA酶处理技术：

①离心使细胞沉淀。

②将细胞重新混悬在带盖塑料管内0.9ml含FCS的McCoy's培养液中。

③缓缓加入0.1ml浓度为1mg/ml的DNA酶，轻轻混匀。

④置试管于白细胞旋转仪上，37℃旋转孵育15分钟。

⑤将细胞混合物加于Fisher试管中的分离液上，1500×g离心3分钟。