



卫生部“十一五”规划教材 全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校医学研究生规划教材

医学免疫学 实验技术

主 编 柳忠辉



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



卫生部“十一五”规划教材 全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校医学研究生规划教材

医学免疫学 实验技术

主 编 柳忠辉

副主编 吴雄文

编者(以姓氏笔画为序)

丁天兵(第四军医大学)	张红军(牡丹江医学院)
于益芝(第二军医大学)	张学军(天津医科大学)
马远方(河南大学医学院)	陈 全(重庆医科大学)
台桂香(吉林大学白求恩医学院)	陈雪玲(石河子大学医学院)
毕胜利(北华大学医学院)	柳忠辉(吉林大学白求恩医学院)
李殿俊(哈尔滨医科大学)	徐志凯(第四军医大学)
吴长有(中山大学中山医学院)	徐 薇(复旦大学医学院)
吴玉章(第三军医大学)	曹雪涛(第二军医大学)
吴雄文(华中科技大学同济医学院)	曾耀英(暨南大学)



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

图书在版编目 (CIP) 数据

医学免疫学实验技术/柳忠辉主编. —北京: 人民卫生出版社, 2008. 3

ISBN 978-7-117-09761-1

I. 医… II. 柳… III. 医药学: 免疫学-实验-研究生-教材 IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 205952 号

本书本印次封底贴有防伪标。请予识别。

医学免疫学实验技术

主 编: 柳忠辉

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 北京市顺义兴华印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 17 插页: 2

字 数: 403 千字

版 次: 2008 年 3 月第 1 版 2008 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-09761-1/R·9762

定 价: 38.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)



图 5-4 巨噬细胞 Follistatin 免疫酶染色

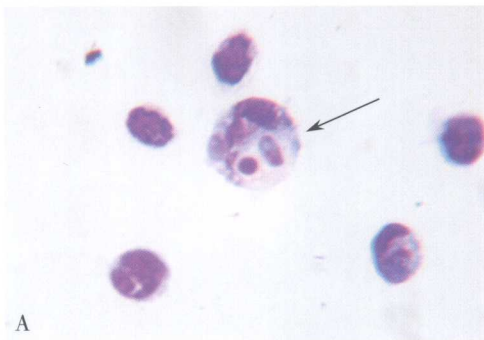


图 13-1 巨噬细胞吞噬鸡红细胞

A. 未刺激对照组; B. LPS 刺激组

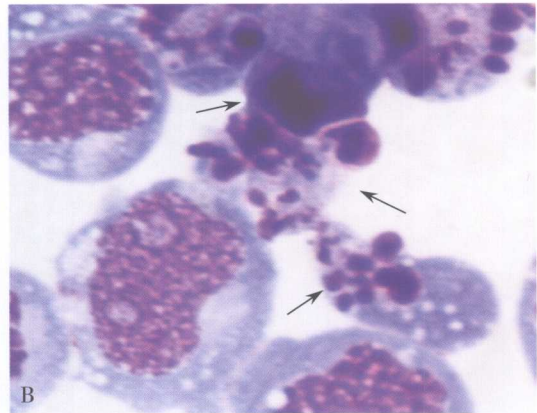
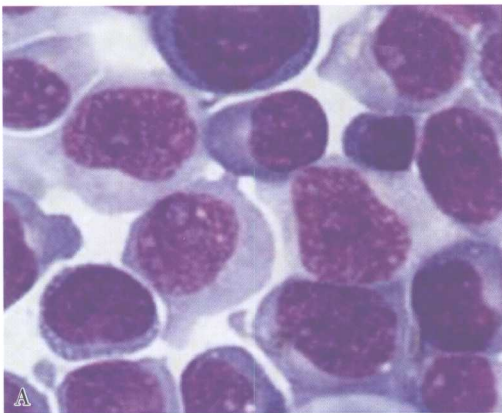


图 14-2 瑞氏-吉姆萨染色的 Jurkat 细胞凋亡的形态变化

(A:阴性对照;B:无血清处理;箭头:细胞核浓缩及断裂)

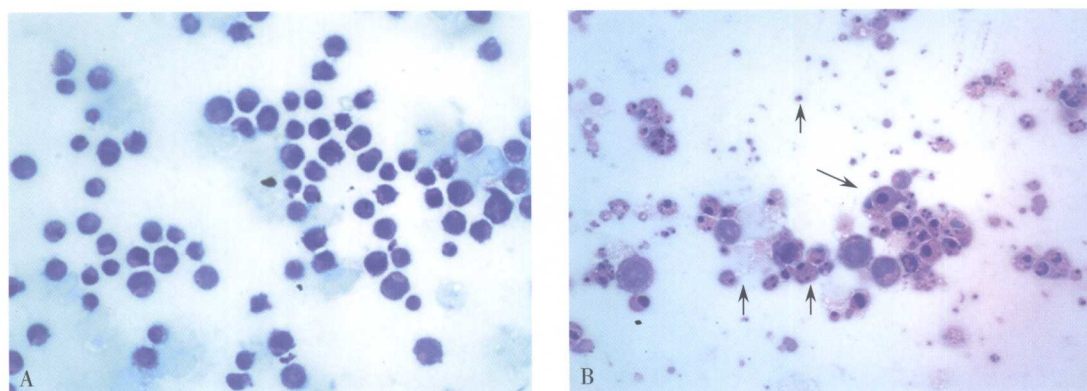


图 14-3 HE 染色的 Jurkat 细胞凋亡的形态变化
(A: 阴性对照; B: 氢氧化钠处理; 箭头: 细胞核浓缩断裂及凋亡小体)

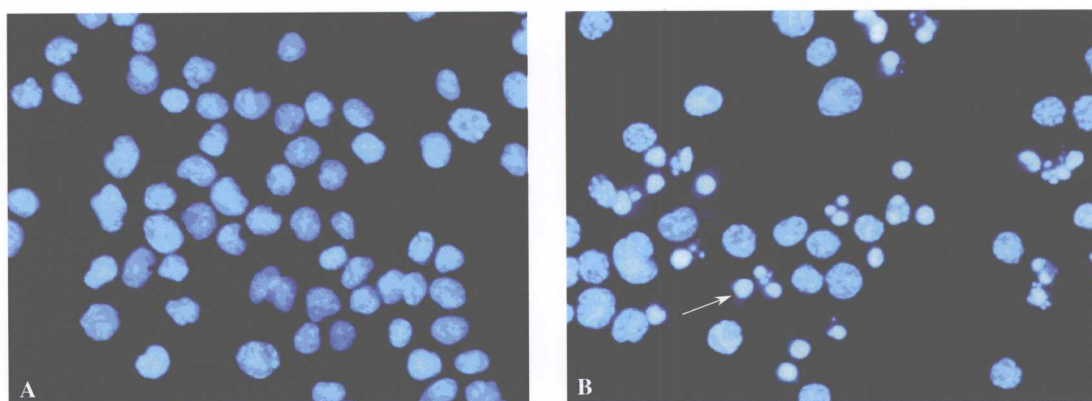


图 14-4 Hoechst 33258 染色的 Jurkat 细胞凋亡中核形态变化
(A: 阴性对照; B: 放线菌素 D 作用的细胞; 白色箭头: 断裂的染色质及浓缩的细胞核)

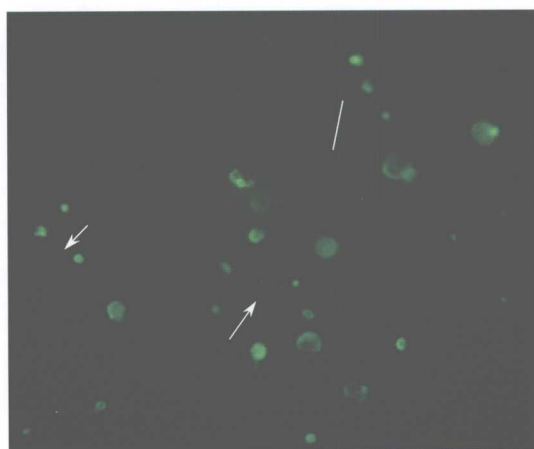


图 14-5 Annexin V-FITC 染色的 Jurkat
细胞凋亡特征(←凋亡细胞)

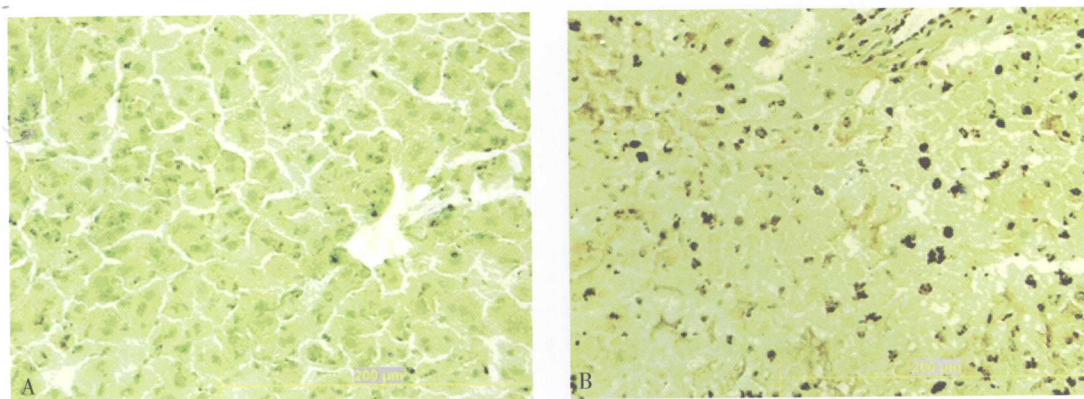


图 14-8 TUNEL 法检测小鼠肝脏细胞凋亡
(A:正常肝脏组织;B:注射抗 Fas 功能性抗体的小鼠肝脏组织)

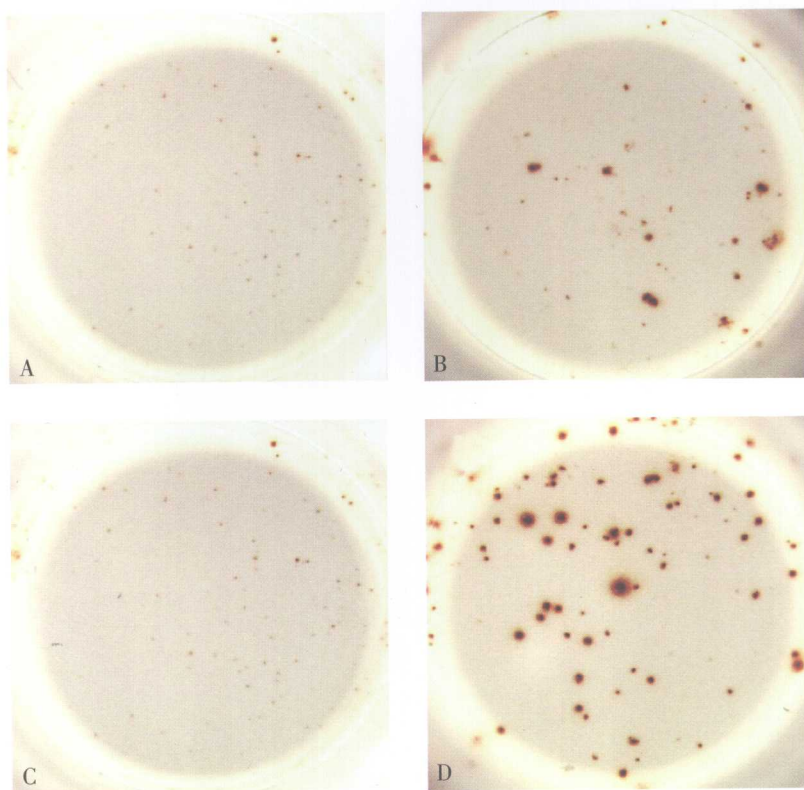


图 15-4 ELISPOT 检测 BCG 诱导正常人 PBMCs 产生 IFN- γ
A: PPD(-)BCG(-); B: PPD(-)BCG(+); C: PPD(+)BCG(-); D: PPD(-)BCG(+)

出版说明

随着医学研究生培养规模的不断壮大,国内研究生培养硬件及软件水平的相对落后与培养高素质研究生之间的矛盾日益突出,如何解决这一矛盾成为我们国家医学研究生培养迫切需要解决的问题。

为了适应新时期国内研究生教育和教学的需要,全国高等医药教材建设研究会、卫生部教材办公室自2004年开始,针对各高校研究生院(处)、研究生导师、在校和毕业后研究生有计划、分期分批地进行了大量、大规模的调研和专家论证工作。在深入探讨“研究生规划教材在研究生培养过程中应该发挥的作用;研究生教材与五年制教材、八年制教材、专科医师培训教材、专著之间的区别与联系”的基础上,根据我国医学研究生教育的实际需要,率先组织策划了这套全国高等学校医学研究生规划教材。

在内容的组织上,该套教材突破传统应试教育教材系统全面的特点,紧扣研究生培养目标,着眼于学生进一步获取知识、挖掘知识和实践创新能力的培养。全套教材包括公共基础课和临床专业课两个系列:公共基础课系列主要围绕研究生科研过程中,从最初的科研设计到最终论文发表的各个环节可能遇到的实际问题展开。临床专业课系列以临床诊疗的回顾·现状·展望为线索,通过对具有转折点意义的诊疗理论、技术或方法探索过程的回顾,目前诊疗中的困惑、局限与不足以及诊疗实践中应注意问题等现状的分析,以及所在学科领域研究热点及发展趋势的展望来探讨新的解决问题的切入点,启发和培养临床创新思维。

该套教材的临床专业课系列主要适用于临床型的硕士生、博士生及相应的临床工作者;公共基础课系列适用于医药卫生各专业的硕士生、博士生及相应的医药卫生工作者。

教材目录

一、公共基础课系列

医学科研课题的设计与申报	主编 龚非力	中英文医学科论文的撰写与投稿	主编 张学军
医学信息搜集的途径与方法	主编 李卓娅	医学免疫学实验技术	主编 柳忠辉
医学实验技术的原理与选择	主编 聂绍平	组织化学与免疫组织化学	主编 李 和
医学实验动物学	主编 李幼平	断层解剖学	主编 周 莉
人类疾病动物模型	主编 秦 川	医学免疫学	主编 刘树伟
统计分析在医学课题中的应用	主编 施新猷	实验室生物安全	主编 曹雪涛
	主编 苏 卫		主编 叶冬青
	主编 蒋知俭		

二、临床专业课系列

呼吸内科学	主编 钟南山	泌尿外科学	主编 杨 勇
心血管内科学	主编 王 辰	妇产科学	主编 李 虹
消化内科学	主编 胡大一	儿科学	主编 曹泽毅
肾内科学	主编 马长生	神经内科学	主编 桂永浩
血液内科学	主编 胡品津	精神病学	主编 申昆玲
内分泌内科学	主编 刘新光	眼科学	主编 刘 鸣
风湿内科学	主编 谌贻璞	耳鼻咽喉头颈外科学	主编 谢 鹏
普通外科学	主编 周 晋	传染病学	主编 江开达
骨科学	主编 黄 河	急诊医学	主编 崔 浩
胸心外科学	主编 陆召麟	老年医学	主编 王宁利
神经外科学	主编 宁 光		主编 孔维佳
血管淋巴外科学	主编 陈顺乐		主编 李兰娟
	主编 邹和健		主编 黄子通
	主编 赵玉佩		主编 张 建
	主编 姜洪池		主编 范 利
	主编 田 伟		
	主编 陈安民		
	主编 胡盛寿		
	主编 王忠诚		
	主编 汪忠镐		

前言

免疫学作为现代生命科学的前沿学科之一,伴随着细胞生物学、分子生物学技术的迅猛发展以及基因重组技术的广泛应用,现代免疫学技术也在不断地推陈出新,并逐步渗透到生命科学研究的每一个领域。

现代免疫学技术利用其特有的高特异性的优势,结合微量化与高灵敏性检测的特点,从而带动了多学科研究的进步。现今人们几乎可以用免疫学方法检测所有的蛋白质;集单克隆抗体、荧光标记、光学及计算机等多种技术于一身的流式细胞仪,开辟了细胞学研究的新时代,它已经成为细胞发育、分化、凋亡以及干细胞研究等不可缺少的实验工具。

由于免疫学技术的快速发展,人们很难在短时间内灵活掌握和应用这些技术,因此研究者急需一本既简单、明了又具有指导性的参考书。一本好的实验技术书既不能单纯介绍理论知识,也不能仅仅介绍实验操作程序,而应该具有举一反三的实用性及指导性。不仅能让读者知道采用哪些实验方法解决哪些具体问题,更重要的是在实验中出现了问题如何去解决。为了更好地将免疫学技术介绍给每位研究者,本书作为一部研究生免疫学实验技术教材及参考工具书,试图在前人编写经验的基础上有所突破,使其更具科学性和实用性。因此本书编写宗旨立足于既注重研究生免疫学实验基本技能培训的需要,又兼顾广大科研工作者研究的需要,力求简明、实用、新颖并富有科学性。本书编者均为工作在科研第一线的、具有多年相关研究经验的免疫学工作者,在实验方法写作时从研究实际出发,提出研究中常见的问题和研究手段,尽可能使初学者减少实验选择失误及操作失误的几率。

本书以免疫学教学与科研实践为基础,在兼顾免疫学基本技术的同时,融入了近年来出现的新技术、新方法。全书共分为十六章,第一章重点叙述免疫学方法的应用,第二章至第十六章分别讲述各类免疫学技术,在书后附录中还列举了免疫学常用试剂的配制。本书在讲述实验原理和实验流程的同时,分别列举了各类典型实验,并重点阐述了每种实验技术的具体操作问题及解决方法。本书集实验教学的实用性和科学研究的前瞻性于一体,既适合免疫学研究生、本科生教学,也可作为参考书籍供从事免疫学研究的相关人员使用。

本书的主要特点是每个实验都融入了编者在实践中的自身体会和经验,详细阐明了每个实验的影响因素,在不同条件下如何改进实验方法,提出了实验中可能出现的问题及解决策略。同时还列举了具体实验,并给出了大量可供参考的图片,使每个实验更具有可操作性及指导性。本书在第一章还就如何选择免疫学手段解决研究课题等问题进行了简述。上述问题都是实验者最想了解但是一些书籍又很少涉及的问题。

由于本书为我国第一部全国性研究生规划教材,编者在书写、语言和见解上都存在一定的差异,问题之处在所难免,希望广大读者在使用实践中,提出宝贵意见,并对不足之处给予批评指正。

最后,编者对参与本书绘图的吉林大学白求恩医学院刘海岩博士以及在编写中给予大力支持的第三军医大学李晋涛博士、中山大学中山医学院黄俊琪博士、河南大学医学院以及北华大学医学院等表示衷心的感谢。

编者

2007年11月

目录

第一章 绪论——免疫学技术应用策略	1
一、抗体的应用	1
二、抗原-抗体反应技术的应用	2
三、免疫细胞分离及功能测定技术的应用	3
四、分子免疫学技术	5
第二章 抗体的制备及鉴定	6
第一节 单克隆抗体的制备及鉴定	6
一、杂交瘤技术和单克隆抗体的基本概念	6
二、制备单克隆抗体前的准备工作	7
三、细胞融合	13
四、细胞融合后的选择性培养	15
五、单克隆抗体的筛选与检测	16
六、杂交瘤细胞克隆化	17
七、杂交瘤细胞及单克隆抗体鉴定的几种方法	18
八、杂交瘤细胞的冻存与复苏	24
九、单克隆抗体的大量制备	26
十、单克隆抗体的纯化	27
第二节 多克隆抗体的制备及鉴定	30
一、抗原	30
二、动物	30
三、佐剂	30
四、免疫方案	30
五、抗体的鉴定	31
六、抗体纯化	31
七、血清的冻存	32
八、多克隆抗体制备方法举例	32
第三章 非放射性免疫标记技术	34
第一节 酶免疫测定	34
一、实验原理	34
二、试剂与材料	35

三、实验流程	36
四、问题及其解决策略	37
第二节 免疫荧光	38
一、实验原理	38
二、主要技术条件	38
三、实验流程	39
四、应用举例——间接法检测抗核抗体	40
第三节 免疫胶体金	41
一、实验原理	41
二、胶体金标记技术在免疫学中的应用	42
三、应用举例——胶体金技术用于妊娠检测	43
第四章 放射免疫标记技术	45
第一节 放射性同位素标记抗原	45
一、常用标记方法	45
二、放射性标记物的分离纯化	48
第二节 放射免疫分析技术	48
一、实验原理	48
二、主要技术条件	49
第三节 免疫放射分析	50
第四节 免疫细胞受体放射分析	51
第五节 应用举例	53
一、人卵泡休止素放射免疫分析	53
二、人卵泡休止素免疫放射分析	54
三、问题及其解决策略	55
第五章 免疫细胞化学技术	56
第一节 免疫细胞化学技术	56
一、免疫细胞化学技术的基本环节	56
二、抗体的选择	59
三、免疫细胞化学技术的主要影响因素	62
四、操作步骤和常见问题	62
第二节 免疫细胞化学的衍生技术	69
一、双标记染色法	69
二、免疫细胞化学技术与放射自显影技术的联合使用	70
三、细胞表面蛋白的染色	70
四、应用免疫细胞化学技术进行细胞分选	70
五、应用免疫细胞化学技术进行定量检测	71
六、生物素-链霉亲和素在免疫细胞化学技术的应用	71

第三节 应用举例	72
一、巨噬细胞抗卵泡抑素抗体染色——ABC 法	72
二、免疫酶染色技术-APAAP 法	72
第六章 蛋白质抗原 T 细胞表位的鉴定	75
第一节 CTL 表位的鉴定	75
一、抗原特异性 CTL 细胞克隆的建立	75
二、抗原多肽片段的获得	76
三、多肽亲和测定	77
四、CTLs 的体外诱导	78
五、CTL 活性检测	79
第二节 Th 细胞表位的鉴定	81
一、抗原特异性 CD4 ⁺ T 细胞克隆的建立	81
二、抗原多肽片段的获得	81
三、肽结合试验	82
四、肽特异性 CD4 ⁺ T 细胞的诱导	83
五、细胞增殖试验	83
六、MHC 限制性确定	83
七、细胞因子分析	83
第三节 MHC 分型	84
一、血清学方法	84
二、PCR-SSP	85
第四节 应用举例	85
第七章 免疫印迹	90
第一节 蛋白质抗原电泳分离	90
一、样本处理	90
二、凝胶选择	91
三、蛋白标准品选择	92
四、SDS-PAGE 基本流程	93
第二节 蛋白质的转膜	93
一、半干式电转印	94
二、湿式电转印	95
三、点印迹	97
第三节 免疫检测	97
一、抗体的选择	97
二、封闭	97
三、抗体杂交	98
四、检测	98

第四节 蛋白印迹在免疫学中的应用.....	100
第五节 应用举例.....	100
Follistatin 表达的 Western blot 鉴定	100
第六节 DNA /RNA 印迹的免疫学检测技术.....	101
一、DNA 印迹	101
二、RNA 印迹	103
三、Southern 和 Northern Blot 在免疫学中的应用	104
第八章 免疫沉淀及沉降技术	106
第一节 免疫沉淀.....	106
一、细胞裂解.....	107
二、沉淀抗原抗体复合物.....	108
三、实验方法.....	108
四、免疫沉淀的应用举例.....	110
第二节 免疫共沉淀.....	111
第三节 沉降技术(pull-down)	113
第九章 免疫细胞分离	115
第一节 单个核细胞的分离.....	115
一、材料和仪器.....	116
二、实验流程.....	116
三、问题与解决策略.....	116
第二节 单核-巨噬细胞的分离	117
一、材料和仪器.....	118
二、实验流程.....	118
第三节 T、B 淋巴细胞选择性分离和纯化	118
一、尼龙棉柱法富集 T 淋巴细胞	119
二、补体介导细胞毒剔除 B 细胞及辅佐细胞富集 T 细胞	120
三、通过补体细胞毒作用剔除小鼠 T 淋巴细胞或其亚群	121
第四节 NK 细胞的分离纯化	121
一、材料和仪器.....	121
二、实验流程.....	121
三、问题及解决策略.....	122
第五节 中性粒细胞分离.....	122
一、材料和仪器.....	122
二、实验流程.....	122
第六节 树突状细胞的诱导培养和分离.....	123
一、小鼠骨髓来源的 DC	123
二、人外周血单核细胞来源的 DC	125

三、人 CD34 ⁺ 干细胞来源的 DC	125
第七节 免疫磁珠分选免疫细胞及其亚群	126
一、材料和仪器	126
二、实验流程	126
三、问题及解决策略	127
第十章 流式细胞术	128
第一节 流式细胞术的原理	128
第二节 细胞表面分子分析	131
第三节 可溶性分子的检测	133
第四节 T 淋巴细胞行为和功能分析	134
第五节 细胞分选原理及其应用	137
一、小鼠 T 淋巴细胞活化实验	138
二、CFDA-SE 标记检测小鼠淋巴细胞增殖实验	139
三、小鼠胸腺细胞凋亡的检测	141
四、细胞内细胞因子染色技术分析人外周血淋巴细胞分化水平	142
第十一章 免疫细胞增殖试验	144
第一节 细胞培养与冻存	144
一、细胞传代培养	144
二、冻存与复苏	145
第二节 细胞增殖检测方法	146
一、台盼蓝拒染法	146
二、BrdU 检测法	147
三、 ³ H-TdR 掺入法	148
四、MTT 比色法	149
第三节 T、B 淋巴细胞增殖试验	149
一、T 淋巴细胞增殖试验	150
二、B 淋巴细胞增殖试验	150
第四节 免疫相关细胞的增殖试验	150
一、细胞因子依赖的细胞株增殖	150
二、混合淋巴细胞培养	151
三、细胞因子依赖的其他免疫细胞增殖	151
第五节 应用举例	153
一、植物血凝素诱导 T 淋巴细胞增殖	153
二、混合淋巴细胞培养	154
第十二章 细胞毒实验技术	156
第一节 NK 细胞活性测定	156

一、效应细胞的制备	156
二、靶细胞的制备	156
三、效-靶细胞作用及检测方法	157
第二节 细胞毒性 T 细胞功能测定	160
一、效应细胞-特异性 CTL 的诱导和制备	160
二、靶细胞的制备	162
三、特异性抗原诱导的细胞毒性 T 细胞功能测定	162
第三节 应用举例	166
一、LDH 法检测人外周血 NK 细胞杀伤活性	166
二、 ^{51}Cr 释放法检测人抗原特异性细胞毒性 T 细胞功能	166
第十三章 免疫细胞吞噬功能测定	168
第一节 单核/巨噬细胞系吞噬功能测定	168
一、体内法与体外法	168
二、巨噬细胞的制备	169
三、吞噬微粒的选择	170
四、吞噬效率的测定	170
第二节 中性粒细胞吞噬功能测定	172
第三节 应用举例	173
一、巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验	173
二、中性粒细胞吞噬功能的检测	174
第十四章 免疫细胞凋亡	176
第一节 细胞凋亡的形态学研究方法	177
一、光学显微镜观察	177
二、荧光显微镜观察	179
三、电子显微镜观察	181
第二节 细胞凋亡的生物化学研究方法	183
一、凋亡细胞的 DNA Ladder	183
二、末端标记法	185
三、免疫印迹检测凋亡细胞的 caspase 活化	187
四、免疫印迹检测凋亡细胞线粒体细胞色素 C 的释放	189
第三节 流式细胞术检测细胞凋亡的常用方法	191
一、亚二倍体分析法	192
二、Annexin V/PI 双染法	193
三、线粒体膜电位检测	195
四、TUNEL 法	197

第十五章 细胞因子检测	201
第一节 细胞因子及其受体检测方法概述	201
一、生物学活性检测法	201
二、免疫学检测法	202
三、分子生物学检测法	202
第二节 常见的细胞因子生物学活性检测	204
一、IL-1 生物学活性检测	204
二、IL-2 生物学活性检测	205
三、IL-10 生物学活性检测	206
四、干扰素的生物学活性检测	207
五、肿瘤坏死因子的生物学活性检测	208
第三节 细胞内细胞因子检测法	209
第四节 ELISPOT 技术	212
第十六章 经典免疫学实验	216
第一节 凝集反应	216
一、直接凝集反应	216
二、间接凝集试验	217
三、应用举例	221
第二节 沉淀反应	221
一、液体内沉淀反应	222
二、凝胶内沉淀试验	224
三、应用举例	226
第三节 补体的测定	226
一、补体总活性测定(CH50)	227
二、脂质体均相免疫溶破试验	229
三、补体旁路途径溶血活性的测定(ACH50)	230
四、单个补体成分的测定	230
五、应用举例	231
第四节 循环免疫复合物的测定	232
一、抗原特异性检测方法	232
二、抗原非特异性检测方法	232
三、应用举例	235
第五节 B 细胞溶血空斑试验	236
一、琼脂溶血空斑法	236
二、液相单层溶血空斑法	237
三、应用举例	237