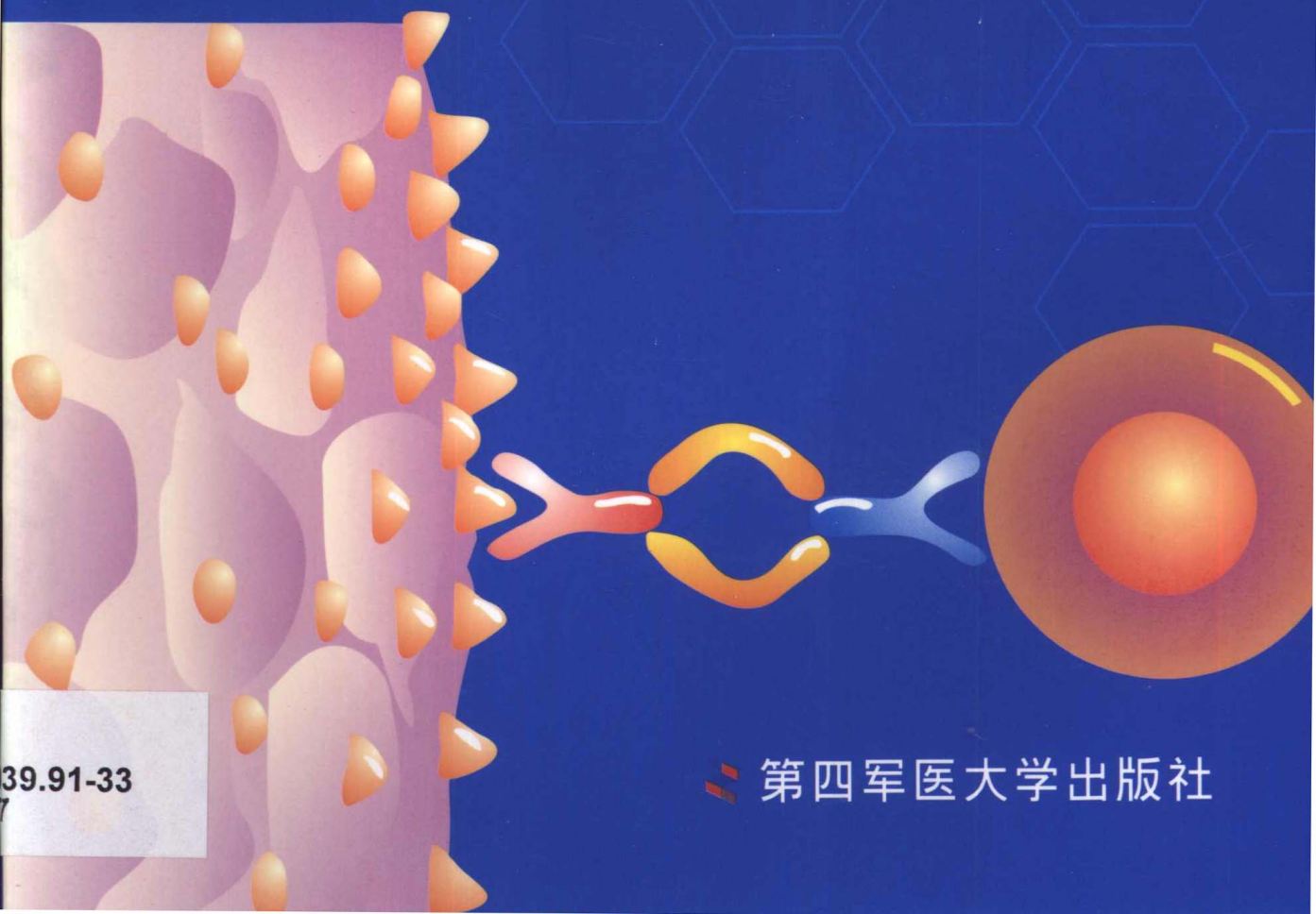


XIBAO HE FENZI MIANYIXUE SHIYAN JISHU

细胞和分子免疫学 实验技术

主编 金伯泉



39.91-33

第四军医大学出版社

Q939.91-33

567

细胞和分子免疫学实验技术

主 编 金伯泉

第四军医大学出版社

内容提要

该书较全面、具体地介绍现代细胞和分子免疫学常用的实验技术。主要包括免疫血清的制备,免疫球蛋白的纯化、标记和应用;免疫细胞的分离技术,免疫荧光染色和流式细胞术分析;淋巴细胞增殖功能和杀伤功能的测定,细胞因子生物学活性以及免疫学方法检测。此外还简要介绍了生物传感器在免疫学中的应用。每种实验技术在简要说明其理论依据或原理的同时,就实验技术步骤、试剂和器材以及注意事项都一一作了说明。本书适用于免疫学以及免疫学相关专业硕士研究生实验指导或课题研究,对于从事基础和临床免疫学的研究人员也有参考使用的价值。

图书在版编目(CIP)数据

细胞和分子免疫学实验技术/金伯泉主编. —西安:第四军医大学出版社,2002. 11
ISBN 7-81086-027-5

I. 细… II. 金… III. 细胞学:免疫学-实验;分子免疫-实验 IV. Q939.91-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 078841 号

第四军医大学出版社出版发行

(西安市长乐西路 17 号 邮政编码:710032)

电话:029-3376765(发行部) 029-3376763(总编室)

传真:029-3376764 E-mail:fmmp03@fmmu.edu.cn

第四军医大学印刷厂印刷

*

开本:787×960 1/16 印张:9.5 字数:190千字

2002年11月第1版 2002年11月第1次印刷

印数:1~3000册 定价:16.00元

ISBN 7-81086-027-5/Q·2

(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社负责调换)

《细胞和分子免疫学实验技术》编写组

主 编 金伯泉

副主编 朱 勇

编 者 (以姓氏笔画为序)

户 义	孙 忱	庄 然	刘 峯	刘京梅
刘雪松	朱 勇	李 琦	李恩善	李影娜
许晓光	陈丽华	金伯泉	张 贇	杨 琨
欧阳为明	欧阳笑梅	赵 宁	贾 卫	党娜娜
黄传书	董邦权	曹云新	薛江楠	

前 言

1990年，我国开始将免疫学从微生物学和免疫学学科中独立出来，免疫学专业成为独立的硕士、博士学位授权点学科。为了满足硕士研究生教学的需要，将免疫学实验技术方法与其他学科交叉结合，提高硕士研究生综合实验技能，我们于1990年编写了《医学基础免疫学》实习指导，在使用期间修改补充多次，在实验课教学中取得了良好的教学效果。近年来，免疫学理论和实验技术方法进展很快，许多新的免疫膜分子、细胞因子和胞浆信号分子被发现，对T细胞和B细胞亚群功能的认识更为精细，Th1和Th2亚群平衡与疾病的关系已广泛应用于临床免疫学，对NK细胞、NK T细胞以及树突状细胞的表面标志和功能的研究有了突破性进展。为了适应免疫学发展的形势，在以往《医学基础免疫学》实验指导的基础上，增加了不少新的内容，编撰了这本《细胞和分子免疫学实验技术》。

全书约18万字，分为十五章。第1至5章侧重体液免疫，第6至14章侧重于细胞免疫，第15章简要介绍了生物传感器在免疫学中的应用。本书所介绍的实验技术有以下三个特点：一是与硕士生所用的理论教材《细胞和分子免疫学》内容有较紧密的衔接，使硕士生免疫学教学更加系统；二是书中实验技术绝大多数为我室常规方法，操作步骤、注意事项比较具体；三是较符合国内大多数院校、科研单位免疫学专业或相关专业研究生教学或从事课题研究的实际情况。

本书是我教研室多年实验工作的积累，也是全体同仁共同努力的结晶。苗咏梅女士在全书的录入和编排中做了大量富有成效的工作。但由于水平受限，时间仓促，不仅内容上涵盖不全，而且难免有错误之处，真诚希望读者提出宝贵的批评和建议。

金伯泉
2002年12月

目 录

第一章 免疫血清的制备	1
一、兔免疫血清的制备.....	1
二、利用 NC 膜结合抗原制备多克隆抗体.....	4
三、新型免疫佐剂（小鼠用）ImmunEasy 的应用.....	6
第二章 小鼠淋巴细胞杂交瘤单克隆抗体技术	9
一、细胞融合前准备.....	9
二、细胞融合及杂交瘤的选择.....	11
三、抗体的检测.....	13
四、杂交瘤的克隆化和冻存.....	13
五、单克隆抗体的大量生产.....	15
六、单克隆抗体的鉴定.....	16
七、影响因素、失败原因分析.....	16
第三章 免疫球蛋白纯化技术	18
一、盐析法纯化人血清免疫球蛋白.....	18
二、辛酸-硫酸铵法纯化单克隆抗体.....	20
三、DEAE-Sephadex A-50 柱层析纯化免疫球蛋白.....	22
四、Q Sepharose Fast Flow 柱层析纯化小鼠腹水 IgG1.....	24
五、SPA-Sepharose CL-4B 亲和层析纯化 IgG 及 IgG 亚类.....	26
六、高效液相色谱纯化小鼠腹水中单克隆抗体.....	28
七、单克隆抗体亲和层析柱纯化重组人 $\alpha 2a$ 干扰素（rHu IFN- $\alpha 2a$ ）.....	29
第四章 免疫球蛋白标记技术	31
一、辣根过氧化物酶（HRP）标记抗体.....	31
二、异硫氰酸荧光素（FITC）标记抗体技术.....	36
三、藻红蛋白（PE）标记抗体技术.....	37
四、生物素标记抗体技术.....	39
五、 ^{125}I 标记单克隆抗体技术.....	42

第五章 标记抗体的应用	44
一、酶联免疫吸附试验 (ELISA)	44
二、生物素-亲合素放大的酶联免疫吸附试验 (BA-ELISA)	46
三、荧光素-抗荧光素抗体放大的 ELISA	49
四、免疫沉淀和免疫印迹 (Western Blotting)	50
(I) 免疫沉淀	51
(II) 免疫印迹 (Western Blotting)	53
五、化学发光免疫分析	55
六、 ¹²⁵ I 标记单克隆抗体竞争结合试验	58
第六章 细胞分离技术	61
一、Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞	61
二、Percoll 不连续密度梯度沉淀法分离纯化细胞	65
三、免疫磁珠法分离细胞	66
第七章 溶血空斑形成试验	70
第八章 常用检测免疫细胞膜分子的免疫组化技术	72
一、亲和免疫细胞化学技术 SABC	72
二、碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶 (APAAP) 免疫组化染色技术	
检测淋巴细胞表面标记	74
第九章 免疫荧光染色和流式细胞术 (FCM) 分析	78
一、间接免疫荧光染色和 FCM 分析	78
二、直接免疫荧光染色 (单色、双色、多色) 和 FCM 分析	80
三、细胞周期检测	81
四、应用 Annexin V 荧光染色检测细胞凋亡	82
五、胞内细胞因子以及 Th1/Th2 和 Tc1/Tc2 的检测	84
六、流式细胞术检测细胞黏附功能	88
第十章 淋巴细胞增殖功能的测定	90
第十一章 人脐带静脉内皮细胞的分离培养与增殖试验	92
第十二章 杀伤细胞功能的检测	95
一、自然杀伤细胞 (NK) 和淋巴因子激活杀伤功能 (LAK) 的检测	95
二、混合淋巴细胞培养	98
三、重导向杀伤功能的检测	99
第十三章 细胞因子生物学活性的检测	102
一、白细胞介素-1 (IL-1) 生物学活性检测	102

(I) ConA 刺激小鼠胸腺细胞检测 IL-1 生物学活性	102
(II) 应用 EL-4 和 CTLL 检测 IL-1 生物学活性	103
(III) IL-1 依赖 D10 G4. 1 细胞系检测 IL-1 生物学活性	105
二、白细胞介素-2 (IL-2) 生物学活性检测	106
三、白细胞介素-4 (IL-4) 生物学活性检测	108
四、白细胞介素-6 (IL-6) 生物学活性检测	110
(I) IL-6 依赖的 7TD1 细胞检测 IL-6 生物学活性	110
(II) M1 细胞系检测 IL-6 生物学活性	111
五、白细胞介素-10 (IL-10) 生物学活性检测	112
六、白细胞介素-15 (IL-15) 生物学活性检测	114
七、干扰素 (IFN) 生物学活性检测	115
八、凋亡诱导配体生物学活性检测	117
(I) 肿瘤坏死因子 (TNF) 生物学活性检测	117
(II) TRAIL 生物学活性检测	119
第十四章 细胞因子及其受体的免疫学方法检测	121
一、夹心 ELISA 检测可溶性白细胞介素-2 受体 (sIL-2R)	121
二、夹心 ELISA 检测人白细胞介素-4 (IL-4)	122
三、夹心 ELISA 检测人白细胞介素-6 (IL-6)	124
四、夹心 ELISA 检测人白细胞介素-8 (IL-8)	126
五、夹心 ELISA 检测人 γ 干扰素 (IFN- γ)	127
六、夹心 ELISA 检测人 α 2a、 α 2b 干扰素	129
七、夹心 ELISA 检测人肿瘤坏死因子 (TNF- α)	130
八、夹心 ELISA 检测人可溶性 TRAIL (sTRAIL)	131
九、夹心 ELISA 检测可溶性 DR4/DR5	133
十、酶联免疫斑点法 (ELISpot) 检测单个细胞水平上产生细胞因子频率	134
第十五章 检测生物大分子相互作用的生物传感器技术	137
附录: ELISA 试剂及器材	141

第一章 免疫血清的制备

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，则需同时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的抗原的纯度。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，免疫方案包括抗原的剂量、免疫途径、免疫次数以及注射抗原的间隔时间等，也是影响免疫血清效价的重要因素。

一、兔免疫血清的制备

（一）原理

具有免疫原性的抗原可刺激机体相应 B 细胞增殖、分化形成浆细胞并分泌特异性抗体。由于抗原分子表面的不同抗原决定簇为不同特异性的 B 细胞克隆所识别，因此由某一抗原刺激机体后产生的抗体，实际上为针对该抗原分子表面不同抗原决定簇的抗体混合物（即多克隆抗体）。另外，抗体的产生具有回忆应答的特点，这是由于记忆性 B 细胞和记忆性 T 细胞参与再次应答所致。在基础免疫的基础上，多次重复注射免疫原，不仅可获得高效价抗体，同时由于抗体亲和力的成熟，抗体的亲和力可明显提高。

（二）免疫方案

免疫方案根据抗原的性质不同而异。下面以制备家兔抗人 IgG 免疫血清为例作一叙述，以供参考。

1. 用剪刀剪去家兔两后脚掌的部分兔毛，用碘酒和酒精消毒皮肤。
2. 第一次免疫：用 2 ml 注射器吸取弗氏完全佐剂（FCA）乳化的抗原（人 IgG），（下称 FCA-IgG）液 1 ml，每侧脚掌皮下各注入 0.5 ml。

3. 第二次免疫：间隔 10~14 d 后，于两侧腭窝及鼠蹊部肿大的淋巴结内注入弗氏不完全佐剂（FIA-IgG），每个淋巴结注 0.1 ml，其余注入淋巴结附近的皮下共 1 ml。如淋巴结未肿大或肿大不明显时，直接注入两侧腭窝及鼠蹊部皮下。

4. 间隔 7~10 d 后，从耳静脉采血 0.5~1.0 ml，分离血清，以双相琼脂扩散试验测定免疫血清的抗体效价（即试血）。效价至少应达到 1:16 以上时才能放血；也可采用 ELISA 方法检测血清效价，由于 ELISA 法十分敏感，抗体效价往往可达到 1:105 以上。

5. 若效价未达到要求，可用不加佐剂的抗原液（人 IgG）耳静脉内注射免疫，即于 1 周内注射 3 次，分别为 0.1 ml、0.3 ml 及 0.5 ml。间隔 1 周再试血。如效价达到要求应立即放血。另外，也可在第 2 次免疫后，以 FIA 乳化的抗原（人 IgG）（简称 FIA-IgG）再免疫 1~2 次。注射部位、剂量和间隔均同第 2 次，再试血测定抗体效价，如效价达到要求立即放血。

（三）放血

心脏采血法

1. 家兔仰面，四肢缚于动物固定架上（或由助手抓住四肢固定）。
2. 剪去左胸部兔毛，消毒皮肤。
3. 用左拇指摸到胸骨剑突处，食指及中指放在右胸处轻轻向左推心脏，并使心脏固定于左胸侧位置。然后，以左拇指触摸心脏搏动最强的部位。
4. 用 50 ml 注射器（连接 16 号针头），倾斜 45°，对准心搏最强处刺入心脏抽血直至死亡。

5. 将抽取的血液立即注入无菌三角烧瓶中，待凝固后分离血清。

颈动脉放血法

1. 家兔仰卧固定同上。头部略放低以暴露颈部，剃毛及消毒皮肤。
2. 沿颈部中线切开皮肤约 10 cm，分离皮下组织，直至暴露出气管两侧的胸锁乳突肌。
3. 分离胸锁乳突肌与气管间的颈三角区疏松组织，暴露出颈总动脉后并游离之。
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，近心端的动脉用血管夹夹住。
5. 用尖头小剪刀在两根丝线间的动脉壁上剪一小口，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. 松开血管夹，使血液流入灭菌三角烧瓶中。一般一只家兔可放血 80~100 ml。

(四) 分离血清

将三角烧瓶的血置 37℃ 温箱 1 h，再置 4℃ 冰箱内 3~4 h。待血液凝固血块收缩后，用毛细滴管吸取血清，以 3 000 rpm 离心 15 min，取上清，加入防腐剂（终浓度 0.01% 硫柳汞或 0.02% 叠氮钠），分装后置 -20℃ 冰箱中保存备用。

(五) 结果鉴定

以双相琼脂扩散试验或间接 ELISA 检测血清的抗体效价。

(六) 材料

1. 动物：健康成年家兔，雄性，体重 2~3 kg。
2. 器材：剪刀、镊子、注射器（2 ml、50 ml）、附针头（9 号、6 号）、称量瓶（10 ml）、量筒、动物固定架、灭菌三角烧瓶（200 ml）、手术器械一套、血管夹、黑丝线、塑料放血管等。

3. 试剂

- (1) 灭菌生理盐水。
- (2) 纯化人 IgG（10 mg/ml）。
- (3) 消毒酒精及碘酒。
- (4) 羊毛脂。
- (5) 石蜡油。
- (6) 活卡介苗（BCG）（75 mg/ml）。

(7) 弗氏不完全佐剂（FIA）制备：称羊毛脂 10 g，逐滴加入优质石蜡油 40 ml，依一个方向边滴边研磨，分装于疫苗瓶中（每瓶 10 ml），高压灭菌（8 磅 20 min）后保存备用。

(8) 弗氏完全佐剂乳化抗原（FCA-IgG）的制备：将 FIA 预温（60℃ 30 min），吸取 3 ml 于研钵中，逐滴加入活 BCG（75 mg/ml）0.5 ml 及纯化的人 IgG 2.5 ml（2.4 mg/ml），边滴入边研磨，依一个方向直至形成均一性的乳状液，取 1 滴滴于冷水面上不散开为达到“油包水”合格要求。

(七) 注意事项

1. 免疫用实验动物的抗体反应性个体差异性较大，因此免疫时至少应选用两只以上动物。另外，不能使用妊娠动物。
2. 免疫用的抗原必须经 FCA 或 FIA 充分乳化后才能注射，否则将明显影响抗原的

免疫效果。上述制备乳化抗原的方法较费时、费力，可采用 H-81 微型振荡混合器法或三腔管研磨法制备。前者是将抗原液与佐剂按比例混合后，置于混合器上使之剧烈振荡；后者是将免疫用的佐剂和抗原液按比例混合后，吸入注射器内，再将注射器连接于三腔管上反复抽吸研磨。这两种方法约 1 h 即可使抗原充分乳化。

3. 佐剂一方面可提高特异性免疫反应的效果，获得高效价的免疫血清，但若抗原不纯时，可使抗原中极微量的杂蛋白产生抗体，使免疫血清的纯度受到影响。另外，有些实验动物种系对 BCG 过敏，尤其是豚鼠，其次是家兔，当再次注射完全佐剂时，有时可以引起变态反应而导致免疫失败。为此，第二次免疫注射时，应减少佐剂中 BCG 的含量或改用不完全佐剂，以减少和防止变态反应的发生。

4. 抗原的剂量取决于抗原的种类。免疫原性强的抗原所用剂量相应减少，免疫原性弱的抗原所用剂量相对较多。抗原的用量一般以体重计算。在使用佐剂的情况下，一次注入的总剂量以 0.5 mg/kg 体重为宜。如不加佐剂时剂量可加大 10 倍。另外，免疫周期长者可少量多次注射，免疫周期短者可较大量少次注射。

5. 免疫方法上也可采用皮下多点注射法免疫动物。即于家兔脊柱两旁选 4~6 点皮下注射，同时于两侧肩部（或臂部）和鼠蹊部各注一处。每点注 0.2 ml，间隔 2 周后，再于上述部位选不同点同上法注射。

6. 目前 FCA 和 FIA 均有商品化产品出售。

(李恩善)

二、利用 NC 膜结合抗原制备多克隆抗体

随着人类基因组计划草图的完成，人类后基因组计划的不断深入，蛋白质分子生物学功能的研究显得越来越重要。一般应用基因工程技术表达目的分子后，可通过制备目的分子相应的多克隆抗体，进行目的分子蛋白水平定位和功能试验。将蛋白分子经 SDS-PAGE 分离后，转移至硝酸纤维素（nitrocellulose, NC）膜上，剪下含目的蛋白的 NC 膜条带，以 NC 膜作为抗原载体代替佐剂，可直接用于制备多克隆抗血清。

（一）试剂和器材

1. 动物：新西兰兔，健康，雄性，体重 2~3 kg。
2. 试剂
 - （1）无菌 PBS。
 - （2）0.2% 丽春红溶液，溶于 3% 三氯乙酸。
 - （3）蛋白电泳和转移试剂。

3. 器材：硝酸纤维素膜，蛋白电泳仪和转移装置，眼科剪，1.5 ml 离心管，离心机。

(二) 操作步骤

1. 抗原准备

(1) 将含有目的分子的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，转移至 NC 膜上。

(2) 将蛋白转移完毕的 NC 膜浸在丽春红溶液中 1~2 min，显示出目的条带，立即用双蒸水洗去丽春红，至清晰显示出目的条带。小心剪下目的蛋白条带处 NC 膜，尽量避免非目的蛋白污染。

(3) 将剪下的 NC 膜放置在加有 PBS 的 1.5 ml 离心管中，用 PBS 洗去丽春红，至无色。

(4) 加入 0.5 ml PBS，用眼科剪将 NC 膜剪成非常细小的碎片。

(5) 可用组织匀浆器将 NC 膜进行研磨。

(6) 用无菌 PBS 调整 NC 膜悬液体积，分装，-70℃ 冻存备用。

2. 免疫方案

(1) 选取体重 2 kg 雄性新西兰白兔，一般一种抗原免疫两只。

(2) 溶解一份 NC 膜悬液，按照每只新西兰白兔 2~2.5 ml 无菌 PBS 或生理盐水稀释，于脊柱两侧或肩胛背区皮下多点注射，每个注射点约 0.2 ml。一般可在腹股沟部位注射一个点。

注射时，用食指和拇指轻柔提起皮肤，另一只手进行注射，仔细检查未扎穿兔皮肤时，开始注射；抽出针头后，按压注射部位，防止抗原 NC 膜悬液漏出。每次注射前，注意混悬注射器中的 NC 膜悬液。

(3) 间隔 3 周，进行第二次和第三次注射。第三次注射后 10 d，兔耳缘静脉采血，检测效价。一般间接 ELISA 检测效价约 10^{-5} 左右。兔颈动脉放血收集血清，-20℃ 以下冻存备用。

(三) 注意事项

1. 由于动物对抗原刺激的免疫反应存在个体差异，为提高制备高效价抗血清效率，一种抗原一次可免疫 2 只新西兰白兔。

2. 为了提高抗原的纯度，可先进行目的蛋白的纯化，如 FPLC 纯化后，再进行电泳和转膜。

3. 每只兔约需 200 μg 抗原，第一次免疫量可加倍。依据标准分子量参照估计目的蛋白条带的含量。采用伯乐公司微型电泳和转移装置，一般转移 3 张 NC 膜（30 道样品

左右), 有明显蛋白条带, 可免疫两只新西兰白兔。

4. NC 膜必须剪碎研磨后制备成细小的悬液, 使之能顺利通过 5 ml 注射器针头。

5. 原核细胞表达蛋白包涵体形式不经复性可直接电泳转移后作为免疫原制备多克隆抗血清。

(贾 卫)

三、新型免疫佐剂 (小鼠用) ImmunEasy 的应用

佐剂属于非特异性免疫增强剂。其种类繁多, 如卡介苗、脂多糖、氢氧化铝、明矾、矿物油, 以及近年来开始应用的脂质体和 CpG 寡核苷酸等。佐剂主要通过延长抗原在体内的滞留时间 (如矿物油和明矾等) 以及非特异地增强机体对特异性抗原的免疫应答 (如单磷酸脂和 CpG 寡核苷酸) 两种机制来增强机体对抗原的免疫应答。弗氏完全佐剂则兼有这两种机制。ImmunEasy 是一种小鼠用新型免疫佐剂, 其主要成分是 CpG 寡核苷酸。与传统的弗氏佐剂相比, ImmunEasy 有着高效、安全、使用方便、省抗原、省时等优点。

(一) 原理

含有非甲基化 5'-CG-3'二核苷酸的六碱基序列, 如 5'-GACGTT-3'、5'-GGCGTT-3'和 5'-AACGTT-3', 等统称为 CpG 基序 (CpG motif), 含有 CpG 基序的寡脱氧核苷酸统称为 CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG-ODN)。非甲基化的 CpG 双核苷酸在脊椎动物 DNA 中的出现频率远低于在细菌 DNA 中的出现的频率, 这被称为 CpG 抑制现象。脊椎动物的免疫系统正是通过识别 CpG 基序来辨别细菌 DNA 等外源性 DNA, 并作为感染信号之一来启动免疫应答的。

CpG 寡核苷酸能够诱导强烈的 Th1 型免疫应答。它能够直接使 B 细胞多克隆活化, 并通过与树突状细胞及巨噬细胞膜表面的 Toll 样受体 9 (TLR9) 结合, 以 MyD88、MAPK、JNK、NF- κ B 依赖的信号传递途径诱导其活化, 并分泌 IL-6、IL-12 和 TNF- α 等细胞因子; 其中 IL-6 进一步诱导了 IgM 的分泌, IL-12 和 TNF- α 则进一步活化 NK 细胞和 CD4⁺T 细胞, 诱导它们产生 IFN- γ 和 M ϕ 活化因子 (MAF), 而 IFN- γ 又进一步促进了 B 细胞和 M ϕ 细胞的活化。从而导致 B 细胞的多克隆增殖、IgG 2a 及 IgM 的优势分泌以及 CTL 的活化。

当 CpG 寡核苷酸作为免疫佐剂与抗原一同注入小鼠体内, 特别是 CpG 寡核苷酸和抗原为结合状态时, 可明显促进小鼠树突状细胞及巨噬细胞对抗原的呈递, 并诱导强烈的抗原特异性 Th1 型免疫应答。

不同的 CpG DNA 序列可活化不同种动物的免疫系统，本文提到的小鼠用新型免疫佐剂 ImmunEasy 是专门为免疫小鼠所设计的一种免疫佐剂。

(二) 试剂和器材

1. ImmunEasy 小鼠用免疫佐剂，pH 为 7.0 ~ 8.0 之间的 PBS 或 0.9% NaCl。
2. 微量加样器，eppendorf 管，1 ml 一次性注射器（如胰岛素或结核菌素注射器）。

(三) 操作步骤

第一次免疫小鼠的方法如下：

1. 计算出免疫小鼠所需的抗原总量，并吸取入 eppendorf 管中。每只小鼠每次可免疫 1 ~ 20 μg 抗原。

2. 计算出免疫小鼠所需的 ImmunEasy 佐剂的总量，并在使用前轻柔旋转混匀，然后立即用加样器取出所需量。一般 1 μg 抗原有 10 μl 佐剂；若抗原量 < 1 μg ，则用 10 μl 佐剂；若抗原量 $\geq 10 \mu\text{g}$ ，则用 100 μl 佐剂。

3. 在已盛有抗原的 eppendorf 管中，加入计算好剂量的 ImmunEasy 佐剂，并用加样器轻柔抽吸 5 次，充分混匀。为了使每只小鼠每次免疫的抗原、佐剂混合物总体积在 50 ~ 100 μl 之间，必要时，可用 PBS 或 0.9% NaCl 稀释抗原。举例说明，如果用 2 μg 抗原免疫小鼠，则用 30 μl 的 PBS 或 0.9% NaCl 稀释抗原，然后加入 20 μl 的佐剂，使抗原、佐剂混合物总体积为 50 μl ，恰好是免疫一只小鼠适当的体积。

4. 抗原、佐剂混合物室温（15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ ）下孵育 15 min。

5. 用加样器轻柔抽吸 5 次抗原、佐剂混合物，充分混匀。

6. 将抗原、佐剂混合物吸入死腔很小的一次性胰岛素注射器或结核菌素注射器中。

7. 当免疫一只小鼠的抗原、佐剂混合物总体积小于 100 μl 时，将其注射入小鼠单侧股四头肌中；若总体积大于 100 μl ，则将总体积均分后注射入小鼠的两侧股四头肌中。皮下和皮内注射与肌肉注射有着同样免疫效果，但要注意防止液体外流。不提倡足垫注射法。

第一次免疫后 2 ~ 4 周，可进行第二次加强免疫，方法同第一次免疫。第二次免疫后 10 d，用间接 ELISA 法测小鼠免疫血清抗体效价，当效价达 10^{-5} 时，可腹腔注射与第一次免疫等量的抗原以加强免疫，3 d 后，进行融合。

(四) 注意事项

1. 小鼠用免疫佐剂 ImmunEasy 应在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，切不可冷冻。
2. 抗原、佐剂混合物须在免疫前新鲜配制，每只小鼠每次免疫的混和物总体积不

应超过 200 μl ，其总体积不应超过 200 μl 。

3. 免疫动物所用材料（缓冲液、玻璃器皿、eppendorf 管、注射器等）均应无内毒素污染。

4. 稀释抗原的缓冲液的 pH 值应在 7.0 ~ 8.0 之间。

（五）附录

商品化 ImmunEasy（小鼠用）新型佐剂（Cat. No. 303101）由 QIAGEN 公司生产。

（许晓光）

第二章 小鼠淋巴细胞杂交瘤单克隆抗体技术

1975年, Köhler 和 Milstein 发现将小鼠骨髓瘤细胞和绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞进行融合, 形成的杂交细胞既可产生抗体, 又可无限增殖, 从而创立了单克隆抗体杂交瘤技术。这一技术上的突破不仅为医学与生物学基础研究开创了新纪元, 也为临床疾病的诊、防、治提供了新的工具。

制备单克隆抗体包括动物免疫、细胞融合、选择杂交瘤、检测抗体、杂交瘤细胞的克隆化、冻存以及单克隆抗体的大量生产, 要经过几个月的一系列实验步骤。下面按照制备单克隆抗体的流程顺序, 逐一介绍其实验方法。

一、细胞融合前准备

(一) 免疫方案

选择合适的免疫方案对于细胞融合的成功, 获得高质量的 mAb 至关重要。一般要在融合前两个月左右确立免疫方案开始初次免疫, 免疫方案应根据抗原的特性不同而定。

1. 颗粒性抗原免疫性较强, 不加佐剂就可获得很好的免疫效果。下面以细胞性抗原为例的免疫方案: 免疫细胞数为 $1 \times 10^7/0.5$ ml 生理盐水每只小鼠, 腹腔注射。

- 1) 初次免疫, 间隔 2~3 周。
- 2) 第二次免疫, 间隔 3 周。
- 3) 第三次免疫 10 d 后, 取血测效价。
- 4) 加强免疫 3 d 后, 取脾融合。

2. 可溶性抗原免疫原性弱, 一般要加佐剂。常用佐剂: 福氏完全佐剂, 福氏不完全佐剂。要求抗原和佐剂等体积混合在一起, 研磨成油包水的乳糜状, 放一滴在水面上不易马上扩散呈小滴状表明已达到油包水的状态。商品化福氏完全佐剂在使用前须振荡, 使沉淀的分枝杆菌充分混匀。

- 1) 初次免疫, Ag 5~50 μg /只, 加福氏完全佐剂皮下多点注射, 一般 0.8~1 ml、