

普通高等教育“十三五”规划教材

免疫学实验技术 原理与应用

Principles and Applications of
Immunology Experimental Techniques

主编 ◎ 王 睿

普通高等教育“十三五”规划教材

免疫学实验技术 原理与应用

Principles and Applications of
Immunology Experimental Techniques

主 编◎王 睿

副主编◎吕 芳 李玉娟

参 编◎任 浩 万 众



 北京理工大学出版社

BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

内 容 简 介

本书分为“免疫标记技术”“基于组织学技术方法的免疫分析技术”“基于电泳技术方法的免疫分析技术”“抗体的制备、纯化及标记技术”“层析技术”“用于免疫细胞分析的通用技术”“各类免疫细胞分离、功能检测技术”及“免疫学实验技术的综合应用”8个部分。从分子、细胞、动物等几个层面分别介绍免疫学实验技术的基本原理及操作步骤。在实验技术的选择上,力求结合科研实践及发展前沿,在内容撰写时,力求言简意赅、通俗易懂,同时,在每节附有免疫学技术在科研应用中的实际案例,期望帮助学生开阔视野、提高知识的应用能力。“免疫学实验技术的综合应用”章节包含了4个先后接续的实验,可作为一个完整的课题型实验应用于免疫学实验课的实际教学中。本书可作为高等院校生物学及医学相关专业本科生、研究生的免疫学实验课教材使用。

版权专有 侵权必究

图书在版编目(CIP)数据

免疫学实验技术原理与应用/王睿主编. —北京:北京理工大学出版社,2019.3
ISBN 978-7-5682-6845-5

I. ①免… II. ①王… III. ①医药学-免疫学-实验-高等学校-教材
IV. ①R392-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第046668号

出版发行/北京理工大学出版社有限责任公司

社 址/北京市海淀区中关村南大街5号

邮 编/100081

电 话/(010) 68914775 (总编室)

(010) 82562903 (教材售后服务热线)

(010) 68948351 (其他图书服务热线)

网 址/<http://www.bitpress.com.cn>

经 销/全国各地新华书店

印 刷/三河市华骏印务包装有限公司

开 本/787毫米×1092毫米 1/16

印 张/9.25

彩 插/4

字 数/175千字

版 次/2019年3月第1版 2019年3月第1次印刷

定 价/40.00元

责任编辑/王玲玲

文案编辑/王玲玲

责任校对/周瑞红

责任印制/李志强

图书出现印装质量问题,请拨打售后服务热线,本社负责调换

前言

作为生物医学研究领域中最发展最为迅速的学科之一，免疫学已成为生物医药专业本科生及研究生教育中非常重要的专业课。目前，国内虽有众多免疫学基础理论及实验教材出版，但大多着眼于医药专业学生的需求，鲜见结合生物医学科研实践、为即将从事生命科学基础研究的学生所编写的实验技术类教材。但作为一门实践学科，免疫学基础理论的学习如果脱离实验研究，将很难实现学生对核心知识的真正掌握及未来对理论知识的灵活运用。因此，编写一本适合生物学、生物技术、生物工程、生物医学工程等专业学生的免疫学实验技术教材，十分迫切和必要。

目前已出版的免疫学实验技术类书籍主要包括两大类。一类以精讲免疫学技术原理为主，如中国科学家曹雪涛教授主编的《免疫学技术及其应用》、美国科学家 J. E. 科利根教授主编的《精编免疫学实验指南》等。这类书籍力求全面、详细地介绍各类免疫学实验技术和方法，内容非常翔实，篇幅往往以百万字计，更适合作为一线科研工作者的实验参考工具书。另一类则是以介绍免疫学实验技术的基本原理、基本操作为主，但这类书籍有关免疫学实验原理的介绍较为简略，因此，这类书籍可作为本科生实验课程的缩略版参考资料。

以上两类书籍均不太适用于综合类院校生物专业本科生及研究生免疫学实验课程的需求。本教材编者本着 OBE 教学理念，基于我校及兄弟院校生物相关专业本科生及研究生的学习背景，结合学生未来职业发展需求，以免疫学原理在实际生物医学科研中的应用为总体编写思路，在参考同类优秀教材基础上，完成了本

教材的编写。本教材的主要特点为，较为详尽地介绍了各类免疫学技术的实验原理及实验操作步骤，并在大部分实验技术章节中添加了已公开发表的免疫学技术在实际科研工作中的应用案例，从而帮助学生拓宽视野、更加深入地理解相关的免疫学实验技术原理、提升免疫学实验技术的应用能力。本书第8章以一个实际的科研应用为出发点，由4个前后接续的免疫学实验所构成，可作为生物类院校“免疫学实验课”综合应用环节的参考。本书编者由衷希望本书能够成为适于各综合性高校生物专业的通用教材，同时也能兼供医学专业学生参考。

感谢北京理工大学教务处和生命学院的相关领导、同事们对本书编写工作的大力支持和指导。在本书撰写过程中，北京理工大学生命学院吕芳副教授及李玉娟副教授在层析技术章节及各章节中涉及的动物实验操作技术、免疫分子检测分析技术等部分完成了大量的文字撰写、资料查阅、图片处理及后期文字校对等工作；北京理工大学生命学院任浩同学及万众同学在每章节“知识窗”部分完成了文献查阅、部分文字撰写等工作；北京理工大学生命学院陈△文、那扎开提·帕力哈提等同学完成了本教材的格式整理、文字校对等较为繁杂的工作，在此对几位老师及同学的辛勤付出表示感谢。本书中插图大多参考自免疫学专家、名师编著的同类教材，本书编者结合自身需求略加修改，在此谨对这些教材的编者表示衷心感谢。附录中实验耗材和仪器设备的图片均来源于各大相关生物公司网站，在此一并表示感谢！

由于编者学识有限，教材编写过程中难免出现不足之处，真诚希望各位同行及读者不辞吝教、批评指正！

目 录

CONTENTS

第 1 章 免疫标记技术	001
1.1 酶免疫技术	001
1.2 放射免疫技术	007
1.3 化学发光免疫分析技术	012
第 2 章 基于组织学技术方法的免疫分析技术	014
2.1 免疫组织（细胞）化学技术	014
2.2 免疫电镜技术	017
2.3 免疫荧光技术	020
第 3 章 基于电泳技术方法的免疫分析技术	025
3.1 免疫印迹技术	025
3.2 免疫共沉淀技术	033
第 4 章 抗体的制备、纯化及标记技术	037
4.1 多克隆抗体的制备	038
4.2 单克隆抗体的制备及纯化	040
第 5 章 层析技术	048
5.1 凝胶过滤层析	048
5.2 离子交换层析	050
5.3 亲和层析	054
5.4 具体实验举例	056

第6章 用于免疫细胞分析的通用技术	062
6.1 流式细胞分析检测技术	062
6.2 免疫细胞凋亡检测技术	071
第7章 各类免疫细胞分离、功能检测技术	082
7.1 淋巴细胞的分离纯化	082
7.2 T淋巴细胞增殖反应	090
7.3 巨噬细胞的分离、体外培养及功能检测技术	096
7.4 树突状细胞的分离、体外培养及功能检测技术	104
7.5 自然杀伤性细胞的分离及功能检测技术	109
第8章 免疫学实验技术的综合应用	117
8.1 CIA小鼠模型的制备	118
8.2 CIA小鼠关节炎及外周血中炎症因子的测定	121
8.3 CIA小鼠适应性免疫功能的测定	125
8.4 CIA小鼠膝关节中巨噬细胞的测定	129
附录I 免疫学实验中的常用工具及耗材	132
附录II 常用实验设备	134

第 1 章

免疫标记技术

1.1 酶免疫技术

酶免疫分析法 (Enzyme Immunoassay, EIA) 是以酶标记的抗体 (或抗原) 作为主要试剂, 将抗原抗体反应的特异性和酶催化底物反应的高效性、专一性结合起来的一种标记免疫检测技术。该法将具有高效催化活性的酶分子通过化学方法与抗体 (或抗原) 相结合, 使其同时具备化学反应性, 当与待测抗原 (或抗体) 结合后, 通过酶催化底物产生肉眼可见的颜色反应, 从而达到免疫检测的目的。该方法是一种特异而敏感的技术, 检测灵敏度可达到每毫升微克 (μg) 甚至纳克 (ng) 级别。

该方法试剂稳定、无放射性污染, 且通过与其他先进仪器及技术结合使其分析形式日趋多样化, 简易灵活, 因而在食品、医学、生物研究等多领域中广泛应用于已知或未知抗原 (或抗体) 的定性、定量分析。

酶免疫测定技术根据抗原抗体发生特异性识别结合反应后, 是否需要分离结合的与游离的酶标记物, 分为均相测定法 (Homogenous) 和异相测定法 (Heterogeneous)。如果反应后不需要进行分离而直接检测, 则为均相测定法; 如果需要进行分离后分别检测, 则为异相测定法。根据发生反应所依托的介质, 异相测定法又可以分为液相和固相两种。

目前最为常用的酶免疫技术为固相异相测定法中的酶联免疫吸附试验 (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay, ELISA)。该法将抗原或抗体吸附于固相载体上, 检测

过程中将待测抗体（或抗原）及酶标记物按先后顺序依次加入反应体系中，使其与固相载体上的抗原（或抗体）反应形成抗原抗体复合物，然后洗去未结合的游离酶标记物及游离抗原（或抗体），测定已结合的酶标记物的酶活性，从而确定样品中待测抗体（或抗原）的含量。

1.1.1 ELISA 技术的实验原理

ELISA 包括直接法、间接法、双抗夹心法、竞争法及抗酶抗体法等几种类型。本节主要介绍比较常用的间接法、双抗夹心法和竞争法的基本原理。

1. 间接法

该法是用来检测待测抗体最常用的方法。具体原理为将已知抗原吸附于固相载体上，加入待测样品（如含有待测抗体的动物血清），待测抗体与抗原结合，洗涤未结合抗体，再加入酶标二抗（用酶标记的能够特异性识别结合待测抗体的第二抗体），形成抗原－待测抗体－酶标二抗复合物，当进一步在反应体系中加入酶的反应底物后，有色产物的形成量与待测抗体的量成正比。实验原理如图 1-1 所示。

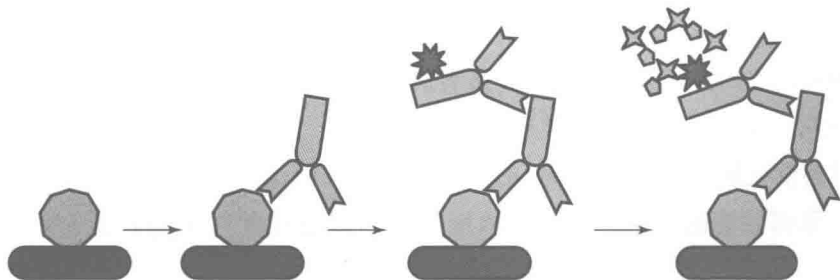


图 1-1 间接法 ELISA 实验原理

资料来源：钱旻主编《免疫学原理与技术》

2. 双抗夹心法

此法用于检测待测抗原。假设待测抗原表面有多个抗原决定簇 A、B、C 等，首先将能特异性结合待测抗原上 A 抗原决定簇的抗体（简称抗体 A）包被于固相载体，然后加入待测样品（如含有待测抗原的动物组织或器官的组织匀浆液），使抗原抗体特异性识别结合，洗涤未结合的无关抗原后，再加入酶标记的能特异性识别结合待测抗原上 B 抗原决定簇的抗体（简称抗体 B），形成“抗体 A－待测抗原－酶标抗体 B”共同构成的复合物。当加入酶反应的底物

后，有色产物的形成量与待测抗原的量成正比，如图1-2所示。

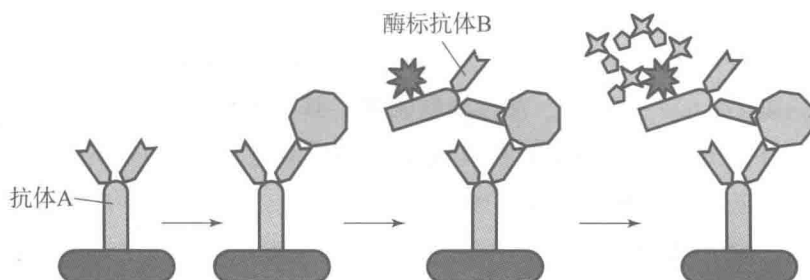


图1-2 双抗夹心法 ELISA 实验原理

资料来源：钱旻主编《免疫学原理与技术》

3. 竞争法

竞争法既可用于检测抗原，又可用于检测抗体。以检测抗原为例，将能与待测抗原特异性结合的抗体包被于固相载体上，加入待测抗原和一定量的已知酶标抗原，使二者竞争性地与包被的抗体结合，如待测抗原的量大于酶标抗原，酶标抗原与包被的抗体结合得少，进而形成的标记复合物也少，反之亦然，因此最终有色产物的形成量与待测抗原含量成反比，如图1-3所示。

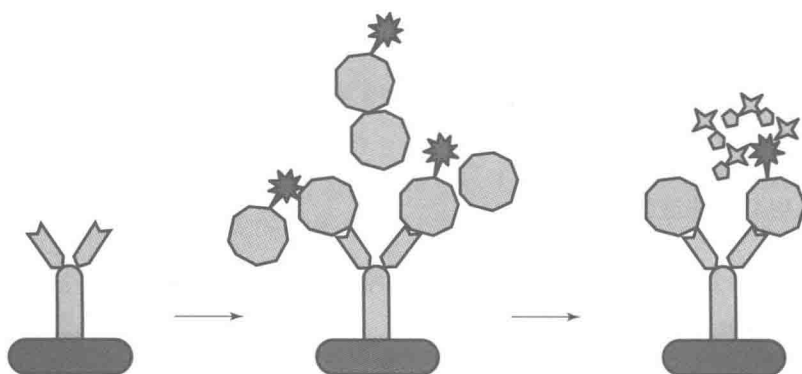


图1-3 竞争法 ELISA 实验原理

资料来源：钱旻主编《免疫学原理与技术》

1.1.2 ELISA 实验准备

1. 酶标抗体的制备

常用的酶标抗体可通过在生物试剂公司购买得到。如需制备酶标抗体，则需根

据实验需要选择适宜的酶及标记方法。

目前常用于标记的酶有辣根过氧化酶 (Horseradish Peroxidase, HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, AKP)、 β -半乳糖苷酶 (β -Galactosidase)、葡萄糖氧化酶 (Glucose Oxidase, GOD)、酸性磷酸酶等。其中 HRP 和 AKP 最为常用。HRP 的作用底物为 H_2O_2 ，在适宜 pH 及供氢体 (即色原底物，如 OPD、TMB 及 ABTS 等) 存在的情况下，可发生迅速而专一的显色反应，如使用 OPD，则显橘黄色，TMB 显黄色，ABTS 显蓝绿色。AKP 是通过催化磷酸酯水解释放出无机磷酸而显色，或通过水解产生的磷酸与钼酸反应生成磷钼酸，然后在还原剂的作用下对生成的蓝色终产物进行测定。

2. 固相载体的选择

目前大多数实验室中最常用的固相载体为 96 孔聚苯乙烯酶标板，该材料具有价格低廉、蛋白吸附力强、操作简便等优点。另外，还可选择纤维素、交联右旋糖苷、聚丙烯酰胺等材料制成的酶标板。

3. 抗原或抗体的包被

通常抗原或抗体通过物理吸附作用被结合在固相载体上。目前常用的包被条件如下：用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 (例如，15 mmol/L Na_2CO_3 ，35 mmol/L $NaHCO_3$ ，0.1% NaN_3) 将抗原或抗体稀释至 1 ~ 100 $\mu g/mL$ ，4 $^{\circ}C$ 湿盒中包被过夜或 37 $^{\circ}C$ 湿盒中包被 3 h。

4. ELISA 清洗液的配制

通常使用的 ELISA 清洗液为 PBS-T 缓冲液，即 1 $\times$ PBS (pH 7.2) - Tween20 (体积分数 0.05%)。

5. ELISA 实验结果的判定及表示方法

ELISA 实验可通过目测法完成结果的定性判定，进一步可通过酶标仪测定光吸收值，以 OD 值表示定量结果。可先用梯度浓度的标准待测抗原的 OD 值绘制标准曲线，可由标准曲线方程计算得到未知样品中待测抗原的浓度。

例如，使用 IL-17 (白细胞介素-17) ELISA 试剂盒检测人血液样品中 IL-17 的含量，测定前用 IL-17 标准品蛋白进行 ELISA 测定后，用 OD 值绘制的标准曲线如图 1-4 所示。

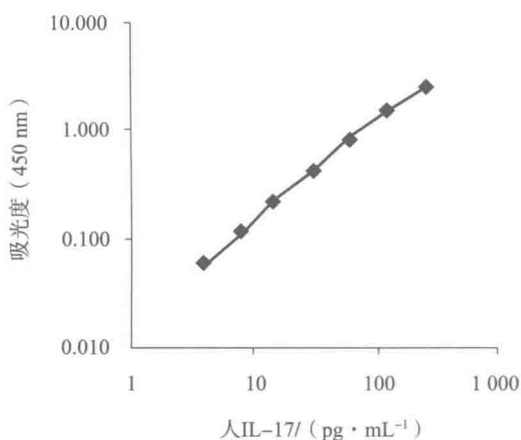


图 1-4 ELISA 样品测定前需要绘制的标准曲线

1.1.3 ELISA 实验方法举例——间接法测定抗体

1. 实验仪器、耗材及试剂

- ①经纯化的已知抗原。
- ②待测抗体溶液。
- ③HRP 标记的二抗。
- ④包被液(配方可参考前文“抗原或抗体的包被”)。
- ⑤ELISA 清洗液(配方可参考前文“ELISA 清洗液的配制”)。
- ⑥封闭液: 10% 小牛血清或 2% BSA/PBS-T (BSA 即牛血清白蛋白)。
- ⑦底物缓冲液: pH 6.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液(Na_2HPO_4 56.77 g、柠檬酸 5.6 g, 加水 800 mL 溶解, 定容至 1 000 mL, 4 ℃ 保存)。
- ⑧终止液: 2 mol/L H_2SO_4 。
- ⑨酶标仪。
- ⑩塑料冲洗瓶。
- ⑪微量加样器。
- ⑫96 孔微量滴定板。

2. 实验步骤

- ①将已知抗原用 ELISA 包被缓冲液稀释至合适浓度(如 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每孔加入 100 μL 包被 96 孔微量滴定板(过量包被, 每孔加入 0.5 μg 抗原, 高于酶标板每孔

的最大吸附量 50 ~ 100 ng 抗原, 形成饱和吸附), 封口膜封口, 置于湿盒中, 4 ℃ 包被过夜。

②用 PBS - T 洗板 3 次, 每次 5 min, 弃净洗液。

③每孔加入 200 μL 封闭液, 湿盒中室温孵育 2 h 或 37 ℃ 孵育 1 h。此步骤用于封闭孔中非特异的吸附位点。

④倒掉封闭液, 用 PBS - T 洗板 3 次, 每次 5 min, 弃净洗液。

⑤加标准曲线样品: 用 2% BSA/PBS - T 对标准品抗体进行倍比稀释, 浓度分别为 1 000、500、250、125、62.50、31.25、15.63、7.80 ng/mL, 加入标准曲线加样孔, 每孔 100 μL 。

⑥加待测样品: 将待测样品用 2% BSA/PBS - T 按一定比例稀释 (如 1:10²、1:10³、1:10⁴、1:10⁵ 等) 后, 加入待测样品加样孔, 每孔 100 μL 。

⑦以上两孔做同一待测样品的平行孔, 前两孔作为阴性对照, 仅加入 100 μL 2% BSA/PBS - T, 其余孔依次加入梯度稀释的标准样品、待测样品, 置于湿盒中, 37 ℃ 孵育 1 h。

⑧倒掉抗体溶液, 用 PBS - T 洗板 3 次, 每次 5 min, 弃净洗液。

⑨加入酶标二抗 (预先用 PBS - T 把酶标二抗做一定比例稀释), 每孔 100 μL , 置于湿盒中, 37 ℃ 孵育 1 h。

⑩倒掉酶标二抗, 用 PBS - T 洗板 3 次, 每次 5 min, 弃净洗液, 然后在吸水纸上拍干。

⑪显色: 每孔加入 100 μL 一定比例稀释的酶反应底物显色液, 避光处静置 10 ~ 30 min。若显色时间过短, 可能会降低实验的灵敏性, 时间太长, 则本底反应会增高, 最长不可超过 45 min。

⑫每孔加入 100 μL 终止液终止反应。

⑬在酶标仪中以一定波长测定光吸收值。

⑭以测定的 OD 值绘制线性回归标准曲线, 其中标准蛋白浓度为横坐标, 其对应的 OD 值为纵坐标, 其相关系数 R^2 应大于 0.95, 并用标准曲线的直线方程计算待测样品中抗体的浓度。

知识窗

酶免疫技术在生物医学研究中的应用实例

作为目前生物学研究中最常见及成熟的技术之一, 酶免疫技术, 特别是酶联免疫吸附 (ELISA), 被应用于大部分分子生物学实验中。在 ELISA 的工作原理基础

上，有科学家发明了将 ELISA 与聚合酶链式反应（PCR）结合起来的 PCR - ELISA 技术。这个技术将标记后的核酸扩增产物与微孔中特定捕获探针杂交之后进行免疫检测，可以实现精确的核酸定量。2014 年，S. Santiago - Felipe 及 A. Maquieira 等（见参考文献 [3]）研究者使用重组酶聚合酶扩增（Recombinase Polymerase Amplification, RPA）代替 PCR 的 RPA - ELISA 技术，通过对食物中不同过敏原 DNA 的测定，从而实现对食物的安全检测。整个检测消耗时间较短（40 min 即可完成）、实验温度较低（40 ℃），对仪器要求很低，目视检测结果即可了解不同食物的安全性。图 1 - 5 所示为不同种类食品对不同安全检测项目的重组酶聚合酶扩增 - 酶免疫测试结果。图中检测孔内颜色越黄，则其对应的食品内过敏原含量越高。

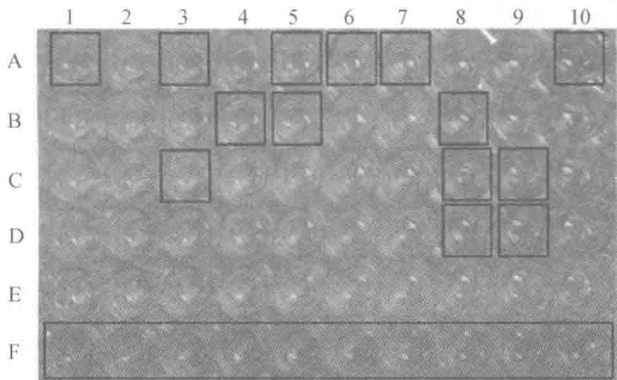


图 1 - 5 不同种类食品中安全相关因素的 RPA - ELISA 测试结果（本图彩印版见后附）

（A ~ F 每一行对应一种待测食品，

1 ~ 10 每一列对应一种不同安全性检测项目（如过敏原、转基因食品等）

参 考 文 献

[1] 曹雪涛. 免疫学技术及其应用 [M]. 北京：科学出版社，2010.

[2] 钱旻. 免疫学原理与技术 [M]. 北京：高等教育出版社，2011.

[3] Santiago - Felipe S, Tortajada - Genaro L A, Puchades R, et al. Recombinase polymerase and enzyme - linked immunosorbent assay as a DNA amplification - detection strategy for food analysis [J]. Anal Chim Acta, 2014 (811): 81 - 87.

1.2 放射免疫技术

放射免疫技术最早源于 1959 年 3 位美国科学家 Roger Guillemin、Andrew

V. Schally 和 Rosalyn Yalow 利用放射线物质检测胰岛素的偶然实验发现,他们将放射性核素可探测的灵敏度、精确性与抗原抗体反应的特异性相结合,从而创建了这类免疫测定技术。因为这个重大的发现和创新,他们共同获得了 1977 年的诺贝尔生理学或医学奖。从严格定义角度来讲,3 位科学家当年所创立的方法叫作放射免疫分析法(Radioimmunoassay, RIA),是以放射性核素标记的抗原与反应体系中未标记抗原竞争结合特异性抗体为基本原理来测定待测样品中抗原量的一种方法,是一种放射性竞争结合分析。1968 年, Miles 和 Hales 在此基础上开发出了用同位素标记的抗体直接检测抗原物质的非竞争性免疫放射分析法(Immunoradiometric Assay, IRMA),将放射免疫技术的灵敏度在 RIA 的基础上又提高了 10 ~ 100 倍,且扩展了检测范围,增强了反应的特异性。

总体来说,放射免疫技术具有灵敏度高、特异性强、操作简便、样品用量少等优点,目前广泛应用于生物医学、临床诊断、农业科学、生态学、环境科学等多学科、多领域研究中,对各种微量或超微量($10^{-9} \sim 10^{-15}$ g/mL)元素、激素、小分子药物及肿瘤标记物等几乎所有生物活性物质的定量分析。但由于放射线辐射和污染等缺点,限制了放射免疫技术的使用范围。

放射免疫技术常用的放射性物质有 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P 等,各种同位素均有其各自优缺点,实验室往往根据自身需要及条件做相应的选择,如 ^3H 半衰期长、能量低、易于防护、不易影响标记物质的化学性质,但标记条件要求高,需专门机构方可完成等。

下面以放射免疫分析法测试人血清中甲胎蛋白(AFP)为例,详细介绍 RIA 的实验过程。

1.2.1 放射免疫分析法测试人血清中的甲胎蛋白

1. 实验原理

放射免疫分析法首先基于抗原抗体特异性结合的原理。抗原与抗体结合会形成抗原-抗体复合物,当抗原被放射性物质标记后,便和抗体形成了“标记抗原-抗体”复合物。如果一个反应体系中既有标记抗原,又有非标记抗原,则两种抗原会竞争性地与抗体相结合,生成的“标记抗原-抗体”复合物与非标记抗原的含量在一定范围内成反比。实验原理如图 1-6 所示。

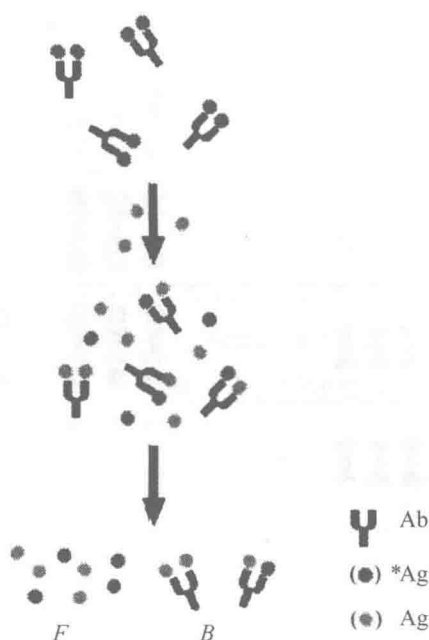


图 1-6 放射免疫分析法实验原理

资料来源：曹雪涛主编《免疫学技术及其应用》

本实验中， ^{125}I 标记的人 AFP 抗原（*AFP）会与人血清中的 AFP 竞争性结合抗 AFP 抗体（如图 1-7 所示），当反应体系中 *AFP 与抗 AFP 抗体（Ab）的量恒定时，形成 *AFP - Ab 复合物（此时结合态 *AFP 的量用 B 表示）的多少取决于体系中 AFP（未被 ^{125}I 标记）的量，如果 AFP 多，则 *AFP - Ab 复合物生成量就少，游离 *AFP（此时游离态 *AFP 的量用 F 表示）就多，反之亦然。如果分别测定 *AFP - Ab 复合物和游离 *AFP 的放射性强度，就可计算出结合态 *AFP（ B ）与游离态 *AFP（ F ）的比值（ B/F ），或计算出其结合率（ B/T ）（ T 为 B 与 F 的总和），这与标本中的抗原量呈函数关系。基于以上原理，预先用标准品 AFP 绘制标准曲线，进而通过对待测样品进行检测，从而根据标准曲线计算出样品中 AFP 的含量。

2. 应用举例

（1）实验仪器、耗材及试剂

- ①人 AFP 标准品。
- ② ^{125}I 标记的人 AFP。
- ③抗人 AFP 抗体。

Ag*	Ag	Ab	Ag-Ab	游离Ag	B/F	B/T
					6/2	6/8
					4/4	4/8
					3/5	3/8
					2/6	2/8

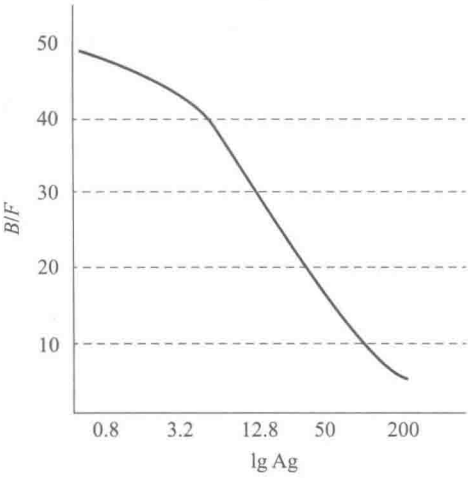


图 1-7 人 AFP 抗原的放射免疫分析检测原理

资料来源：钱旻主编《免疫学原理与技术》

- ④待测人血清样品。
- ⑤生理盐水。
- ⑥分离剂（可选择抗人 AFP 抗体的二抗、聚乙二醇、活性炭等）。
- ⑦试管。
- ⑧加样器。
- ⑨离心机。
- ⑩放射免疫测量仪。

(2) 实验步骤