



· 导读版 ·

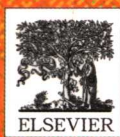
Immunology

(The Experimenter Series)

实验者系列:

免疫学

Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper, Daniel Myrte



原版引进



科学出版社

www.sciencep.com

The Experimenter Series
实验者系列

IMMUNOLOGY

免 疫 学

Werner Luttmann
Kai Bratke
Michael Küpper
Daniel Myrtek

科学出版社
北 京

图字：01-2006-7329 号

This is an annotated version of

Immunology

(A translation of Der Experimentator: Immunologie by Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper, Daniel Myrtek, ISBN 3827414504 © 2004 Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

Copyright © 2006, Elsevier Inc.

ISBN-13: 978-0-12-088544-2

ISBN-10: 0-12-088544-1

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

AUTHORIZED EDITION FOR SALE IN P. R. CHINA ONLY

本版本只限于在中华人民共和国境内销售

图书在版编目(CIP)数据

免疫学：英文/（德）吕特曼（Luttmann, W.）等编著. 影印本. —北京：科学出版社，2007

（实验者系列丛书）

ISBN 978-7-03-018219-7

I. 免… II. 吕… III. 免疫学-英文 IV. Q939.91

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 148099 号

责任编辑：孙红梅

责任印制：钱玉芬/封面设计：耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年1月第一版 开本：787×1092 1/16

2007年1月第一次印刷 印张：17 1/4

印数：1—3 000 字数：409 000

定价：48.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈科印〉）

前 言

成功出版两册“实验者系列丛书”后，到了该出版免疫学实验者丛书的时候了，很难想象科学研究没有抗体这一重要的研究工具。抗体和它的特异性抗原在本书中起重要作用。

《实验者系列——免疫学》的新设计要感谢我们的新出版商（Elsevier）。实验者系列丛书的原意是用非典型的方法，替代同样的常规方法。从蛋白质生物化学家“Rehm”一直到分子生物学家“Mulhard”，本丛书覆盖了广泛的生物学领域，在已建立并取得成功的实验概念下，我们考虑了许多已建立的方法和新方法，以及它们的优缺点。像以前一样，我们给出有用的实验小贴士。

作为本书的作者，我们很愿意从读者那里得到建设性的反馈意见。让我们知道你们喜欢什么，不喜欢什么，你们的意见中哪些被遗漏了，哪些不能理解，哪些给出错误的印象，我们欢迎各种否定或肯定的意见，但是请照顾作者们的感受。

所有意见可直接发给作者：**Immuno-Experimentator@gmx.de**

Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper
Medical University Clinic
Department of Pneumology
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock
Germany

Daniel Myrtek
Medical University Clinic
Department of Pneumology
Kilianstr. 5
79106 Freiburg
Germany

（沈倍奋 译）

术 语

ACD (Anticoagulant): 抗凝剂, 含 2.5% 柠檬酸, 2.34% 葡萄糖和 2.16% 柠檬酸钠。

佐剂 (adjuvant): 一种能增强免疫原性的物质, 它与抗原一起用于产生抗体, 即在免疫动物时可加强免疫反应, 例如有卡介苗的佛氏佐剂、石蜡油和乳化剂。

亲和力 (affinity): 测量表位与对位之间的单价结合能, 它代表部分亲合力。

凝集反应 (agglutination): 由抗原-抗体反应引起的特殊抗原 (如细胞、细菌、病毒) 的成团, 如果抗体结合到颗粒性抗原结构上, 并以交叉连接的方式结合就会发生凝集反应。

变态反应原 (allergen): 通常由 IgE 介导的免疫原 (如花粉、动物毛、灰尘、食物和药物), 它能引起过敏反应。

杀菌素 (Alexin): 见补体。

两性电解质 (ampholyt): 它们能像碱或酸一样反应 (如金属氢氧化物、氨基酸)。

抗独特型抗体 (antibody, anti-idiotypic): 特异性针对另一个抗体的抗原结合部位的抗体。

单克隆抗体 (antibody, monoclonal): 从单一 B 细胞克隆来的单特异性抗体, 仅针对抗原上的一个表位。

多克隆抗体 (antibody, polyclonal): 来自各种 B 细胞克隆的抗原特异性抗体, 针对抗原上各种表位。

抗凝剂 (anticoagulants): 当它与血液混合后, 抑制血液凝集的物质。

抗原 (antigen): 能被免疫系统作为外来物所识别的物质, 通常引起一个免疫反应, 抗原这一术语源于它触发针对它们的抗体形成这一特性, 蛋白质以及其他高分子物质, 如多糖、核酸和许多合成物都有抗原功能。

抗原解蔽 (antigen demasking): 通过适当处理 (如加热、酶、微波) 使固定或包埋过程中被“压紧”的抗原重新恢复免疫反应。

抗血清 (antiserum): 含抗体的血清。

酶蛋白 (apoenzyme): 全酶的蛋白部分。

凋亡 (apoptosis): 遗传控制的细胞自杀程序 (程序性细胞死亡), 它使机体靶向性清除不需要的细胞或退化的细胞, 而不释放引起组织损伤的胞浆物质。

腹水 (ascites): 腹腔中的渗出液。

自发荧光 (autofluorescence): 生物材料自身的荧光, 由它们的天然荧光物质, 如核黄素引起, 自发荧光的强度随细胞大小和胞浆量增加而增加。在白细胞中, 粒细胞和单核细胞的自发荧光较淋巴细胞强。

自身免疫病 (autoimmunopathy): 一类针对自身抗原的自身抗体或自身免疫细胞引起的病。

自体溶解 (autolysis): 死细胞通过自身释放的酶, 而不是微生物污染引起的自身消化

现象。

亲合力 (avidity): 抗原和抗体间总结合能, 即特异性亲和力与可能的价数, 以及与抗原结合的免疫球蛋白间 Fc 的缔合作用之和。

珠子 (bead): 在各种方法中使用的限定大小的微颗粒 (如由玻璃、聚苯乙烯或磁铁材料制成的珠状物)。

漂白 (bleaching): 荧光染料的退色。

血浆 (blood plasma): 抗凝的血经离心, 去除血球后的液体部分, 与血清不同的是, 血浆仍含有纤维蛋白原以及所有凝血系统的其他成分。

血清 (blood serum): 凝聚的血通过沉降提取的液体部分, 它不含纤维蛋白原。

布雷非德菌素 (Brefeldin A): 抑制新生蛋白从内质网转运到高尔基体, 它能损害胞内体和溶酶体之间的交流, 常用于蛋白质生物合成和分泌试验。

浅黄色膜 (Buffy coat): 白细胞凝聚层。

成帽 (capping): 在免疫学中, 细胞表面结构的聚集或浓集, 如受体聚集在细胞表面的一极, 称为成帽。在缓冲液中加入 NaN_3 和在 4°C 下处理细胞可以减少成帽现象。在分子生物学中, 在 mRNA 成熟过程中, 一个另外的碱基序列加到 mRNA 的 5' 端, 也称成帽。

CBMC (Cord blood mononuclear cells): 脐带血单个核细胞, 从脐带血而来的单个核细胞。

CD 命名法 (CD-nomenclature): 分化群; 一种对细胞抗原或它们的抗体命名的系统。每一群由同样抗原特异性的抗体组成。

色原 (chromogen): 一种染料的前体, 经过一定的反应, 可变成真正的染料。在免疫学方法中, 可溶性色原加到待测的酶标抗原中, 被过氧化氢酶或碱性磷酸酶水解后, 不溶性有色反应产物沉淀在抗原区, 显示抗原位置。

辅酶 (coenzyme): 酶的非蛋白组分。它可结合到酶蛋白上使全酶具有催化活性。

胶体 (colloid): 在分散剂中, 直径为 $1\sim 100\text{ nm}$ 的分散颗粒。随着颗粒流动性的减小, 胶体以凝胶形式存在。

补体 (complement): 补体也称杀菌素或防御素, 至少由 20 种不同的血浆蛋白组成, 是一个多功能系统 (补体系统), 它们在免疫防御中起重要作用。补体系统的激活是以严格的顺序进行 (补体级联反应)。

复染 (counterstaining): 除原位免疫染色定位外, 通过第二次染色, 使之与本底之间的差异更显著。

交叉反应 (cross-reactivity): 抗体除了本身的特异性外, 还能与其他抗原反应, 发生这一现象的原因是不同抗原有共同的表位。抗体亲和力低, 表位很相似; 另外的原因是抗原在固定、包埋及解蔽过程中引起改变。

细胞因子 (cytokine): 一组在体内寿命很短的多肽, 它们可影响各种靶细胞的增殖和功能。更确切地说, 它们由免疫细胞产生, 并影响免疫细胞, 即免疫应答的性质、强度和持续时间受细胞因子分泌的调控。细胞因子的浓度范围 $10\sim 10\,000$ 分子/细胞。

细胞离心甩片 (cytospin): 通过细胞离心机使细胞甩到载玻片上的方法。

配位键 (dative bond): 又称为配位共价键, 其特点是共用的一对电子出自同一原子。

衍生物 (derivative): 由基本物质派生出来的物质。

衍生化 (derivatization): 物质的化学修饰, 即引入新的分子成分。

去垢剂 (detergents): 天然或合成的有机物质, 它们能降低水或其他液体的表面张力, 使之容易乳化或使表面湿润。去垢剂有离子型和非离子型, 除 SDS 是离子型去垢剂外, 常用的吐温 20、Triton-X100 和 NP40 均为非离子型去垢剂。

EDTA (EDTA): 乙二胺四乙酸, 一种螯合剂, 可在溶液中作为离子捕获器。

包埋 (embedding): 在组织学和细胞学中, 将脱水 and 固定的样品 (如组织、细胞) 放入适当的包埋介质 (如石蜡、环氧树脂、甲基丙烯酸盐) 中, 使之达到一定的坚固度, 从而可以进行切片或超薄切片。

内吞作用 (endocytosis): 细胞通过细胞膜内陷吸收物质的作用, 包括胞饮作用和吞噬作用。

内皮细胞 (endothelial cells): 形成组织内腔的扁平细胞。它位于血液和血管肌肉组织之间的界面上, 保证物质和水分与周围组织的交换。内皮细胞可通过它表面的分子和分泌的可溶性因子, 来调节血压、血液凝集、血液循环, 以及调节修复和免疫学过程。

能量共振转移 (energy resonance transfer): 如果两个荧光分子彼此在空间上很接近, 第一个分子的发射波长符合第二个分子的吸收波长, 第一个分子的荧光信号能完全被第二个分子吸收, 发射后者的荧光。这一现象被用于各种方法, 如流式细胞分析术、吞噬试验、实时定量 PCR。

表位 (epitope): 抗体结合的抗原区域, 也称抗原决定簇。

表位解蔽 (epitope demasking): 见抗原解蔽。

表达 (expression): 表达有不同的含义, 一般理解为功能蛋白的合成: 包括基因表达、转录以及成熟 mRNA 翻译成蛋白质 (蛋白质生物合成)。也可理解为有机体与表型相关的基因型的发展。

Fab 片段 (Fab fragment): 木瓜蛋白酶处理 IgG 后的单价片段, 它具有抗体结合部位, 但没有 Fc 部分。一些抗原特异的 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段已有商品, 可用作第一抗体检测抗原, 由于没有 Fc, 因此减少了非特异性本底。

F (ab')₂ 片段 (F (ab')₂ fragment): 胃蛋白酶处理 IgG 后的二价片段, 它显示两个抗体结合部位, 但没有 Fc 部分。

假象 (falsification): 证明假说有误。

Fc 片段 (Fc fragment): 抗体重链恒定区, 它能介导效应功能 (如激活补体、调理作用), 能被结晶, 抗体的 Fc 能够结合到相应的 Fc 受体上, Fc 受体可在各种细胞表面表达, 特别是单核细胞和巨噬细胞。在免疫学方法中, 由于这一原因引起非特异性本底。Fc 部分对用 Protein A 标记是很有用的。

成纤维细胞 (fibroblasts): 形成纤维组织或结缔组织的细胞, 它们能分化成各种结缔组织细胞。

固定 (fixation): 通过固定剂, 加热或干燥, 使细胞、组织、器官和微生物等保持原有的结构。

荧光染料 (fluorochrome): 一种化学物质, 它吸收一定波长的光后, 可发射出波长更长的光。

F/P 比值 (F/P quotient): 荧光染料交联到抗体上以后, 荧光染料与蛋白质的定量比例, 该比例大于 6, 即表示可能有较强的非特异性结合。

糖苷 (glycoside): 单糖的半缩醛羟基与另一化合物发生缩合而形成的缩醛称糖苷。糖苷分子中提供半缩醛羟基的糖部分称糖基, 与之缩合的非糖部分称糖苷配基或配基, 两者间的连接键可以通过 O-苷、S-苷。

粒度 (granularity): 细胞或颗粒的特征。在流式细胞术分析中可以通过直角散射光测量, 粒度取决于具有不同折射指数的颗粒的边缘, 类似于暗视野显微镜中观察到的图像, 它们由细胞特异的膜和一些细胞内颗粒引起。

血凝素 (haemostaseology): 用于凝集的诊断。

半抗原 (hapten): 能作为表位展示的一种低分子物质, 但如果不与载体连接, 它本身没有免疫原性。

血液学 (hematology): 与血液的生理、病理相关的内科学分支。

组胺 (histamine): 组氨酸经酶脱羧后产生的生物胺, 作为组织激素发现于皮肤、肺、肝、脾、骨骼肌、胃肠黏膜以及嗜碱性粒细胞和肥大细胞中。也存在于蜂毒和蜜蜂等昆虫的唾液腺, 以及菠菜、麦角和荨麻等植物中。

组蛋白 (histones): 细胞核中与 DNA 相连的碱性蛋白质, 它们可与 DNA 形成复合物, 在核小体形成中起重要作用。

HLA (Human leucocyte antigen): 人白细胞抗原, 属于人组织抗原系统, 在许多疾病中起重要作用, 可以作为诊断的参考。

全酶 (holoenzyme): 完整的酶, 由酶蛋白和辅酶或辅基组成。

自稳态 (homeostasis): 生物体自身调节保持稳定的术语。

水合作用 (hydration): 水分子吸附到水溶液中的离子或分子上的术语, 如蛋白质形成胶体的现象。

超免疫法 (hyperimmunization): 在抗体制备中, 反复给抗原, 增加动物免疫反应。

个体基因型 (idiotyping): 在抗体分子可变区中的高变区形成了抗体结合部位, 这些高变区的氨基酸决定了抗体的个体基因型。

沉浸 (immersion): 在组织学中, 用液体浸透组织称为沉浸。

免疫检测 (immune detection): 用抗原特异的抗体来检测抗原。

免疫印迹 (immunoblot; Western blot), 用免疫化学方法检测物质。

免疫细胞化学 (immunocytochemistry): 在细胞或亚细胞水平进行原位免疫定位。

免疫荧光技术 (immunofluorescence technique): 荧光标记抗体用于检测细胞或其他靶目标的分子或结构。一般可分为直接法和间接法。

免疫原性 (immunogenic): 引发免疫反应的性质。

免疫球蛋白 (immunoglobulin): 免疫后生物体浆细胞产生的糖蛋白。

免疫组织化学 (immunohistochemistry): 在组织水平进行原位免疫定位。

免疫学 (immunology): 研究免疫性和它的作用。

包含体 (inclusion bodies): 细胞内凝聚的过表达蛋白, 部分被膜围绕, 它们常常折叠

不正确，因此生物活性低或丧失生物活性。

惰性 (inert): 反应迟钝。

原位免疫定位 (in situ immunolocalization): 用免疫学反应 (如免疫组织化学或免疫细胞化学方法) 显示细胞和组织的原位结构。

内化 (internalization): 膜上的受体缩回细胞内。

等电点 (isoelectric point): 使两性电介质 (如氨基酸和蛋白质) 表面不带电荷的 pH 值。在该 pH 下, 碱性和酸性基团被同等解离, 分子上的净电荷为零, 溶解度也最小, 并且没有离子在电场中迁移。

同工酶 (isoenzyme): 显示同样的催化效应, 但在其他性质 (如蛋白结构或等电点) 上有所不同的酶, 可以通过免疫化学或生物化学的方法分开。

同型 (isotyping): 与个体基因型不同, 在抗体恒定区部分决定类的变化, 各类免疫球蛋白的亚类称同型。

层流 (laminary): 没有搅动。

白三烯 (leukotrienes): 白细胞中含的介质, 具有三个共轭双键的花生四烯酸衍生物, 它们在脂氧化酶途径中经酶氧化而形成, 是过敏反应和炎症反应的介质, 类似组胺。

淋巴瘤细胞 (lymphoblast): 由于接触特殊的抗原或丝裂原, 淋巴细胞形态变大, RNA 和蛋白质生物合成增加。

异染色 (metachromasy): 光学显微镜中的染色阴影现象。

有丝分裂原 (mitogen): 刺激细胞有丝分裂, 并使它们增殖的物质。如植物血凝素 PHA、刀豆蛋白 ConA、美洲商陆 PWM 及细菌脂多糖 LPS。

重量摩尔浓度 (molality): 每公斤溶剂中溶质的浓度 (mol/kg)

容量摩尔浓度 (molarity): 每升溶液中溶质的浓度 (mol/L)。

金叶树苷 (monesin): 从链霉菌产生的离子载体。在细胞内 monesin 可抑制新合成的蛋白从内质网转运到高尔基体。

单克隆 (monoclonal): 一个浆细胞克隆来源的。

髓系 (myeloid): 骨髓来源的。

坏死 (necrosis): 由于局部缺氧、化学原因 (细菌毒素) 或物理原因 (热、冷、射线) 使细胞代谢崩溃造成。

成瘤 (neoplastic): 生长调节受阻形成的恶性增生 (如肿瘤细胞)。

当量浓度 (normality): 1 升溶液中所含溶质的克当量数, 现已很少用这种表示法。

正常血清 (normal serum): 从非免疫动物而来的血清。

调理素 (opsonins): 生物体自身产生的物质, 起调理作用。包括抗体、补体和黏连蛋白。

调理作用 (opsonization): 调理素与相应进入机体的外来物 (如细菌、真菌) 结合, 使巨噬细胞或中性粒细胞的吞噬作用增加, 从而有助于抵御感染。

同渗重摩 (osmolality): 在 1 kg 溶剂中所溶解的有渗透作用的微粒浓度 (osm/kg)。

同渗容摩 (osmolarity): 每升溶剂中所溶解的有渗透作用的微粒浓度 (osm/L)。例如 1 mol/L 葡萄糖溶液 = 1 osm/L, 1 mol/L NaCl = 2 osm/L。

木瓜蛋白酶 (papain): 从番木瓜汁中得到的水解 SH 的蛋白酶, 它可水解 IgG 分子为两个 Fab 片段和一个 Fc 片段。

抗体结合部位 (paratope): 抗体的抗原结合区。

成斑 (patching): 细胞表面结构交联成片, 然后凝集成帽。

PBL: 有不同含义, 文献中为外周血淋巴细胞, 同样也可以是外周血白细胞 (包括单核细胞和粒细胞)。

PBMC (Peripheral blood mononuclear cells): 外周血单个核细胞, 即从外周血来的单个核细胞 (MNCs), 通常指淋巴细胞和单核细胞, 不包括多核和分叶核粒细胞。

胃蛋白酶 (pepsin): 从胃液来的酸性蛋白酶 (肽基肽水解酶), 它水解肽键, 可使 IgG 分子水解为 1 个 Fc 片段和 1 个二价 F(ab')₂ 片段。

灌注 (perfusion): 在组织学中, 用液体彻底冲洗器官。

渗透性 (permeability): 在生物学中, 有孔结构阻碍物质通过的性质, 特别是膜 (如细胞膜、基底膜、内皮), 渗透性和迁移速度取决于孔和颗粒大小。

吞噬作用 (phagocytosis): 颗粒性物质被吸收到细胞内。

胞饮作用 (pinocytosis): 液体性物质被吸收到细胞内。

PMNC: 多形核和多核粒细胞。

多克隆 (polyclonal): 由不同浆细胞产生的克隆。

预分析 (预试验) (pre-analysis): 在正式实验前, 进行所有步骤的演练, 包括实验材料的制备、运送、储存和准备。

增值 (proliferation): 通过有丝分裂产生子代。

辅基 (prosthetic group): 结合在酶蛋白上的辅酶 (辅助因子)。

淬灭 (quenching): 在广义的化学-物理现象中, 反应被抑制或停止称为淬灭。酶反应中底物的加入或最终产物过剩能抑制催化作用。根据能量共振转移的原理在荧光系统中, 也可能产生发射光的淬灭, 为了达到这一目的, 可将淬灭剂加到起始溶液中, 它的吸收波长范围相应于被淬灭荧光物质的发射波长, 发射被非荧光淬灭剂抑制, 结果测不到荧光, 这一原理用于吞噬试验以及实时定量 PCR。

RCF (Relative centrifugal force): 以 g 测量的相对离心力。

血清学 (serology): 与血清生理、病理的免疫特性相关的免疫学或血液学分支。

脱落 (shedding): 细胞表面结构的释放, 例如受体释放到介质。将细胞置 4℃, 并加叠氮钠可以减少脱落。

硅烷化 (silanization): 用 APES 涂到壁上增加黏附性。

液泡膜 (tonoplast): 植物细胞中, 胞浆和空泡间的膜。

示踪物 (tracer): 放射性同位素标记物, 如 RLA。

Tyrodé's 溶液 (Tyrodé's solution): 含 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.02% CaCl₂, 0.01% MgCl₂, 0.005% NaH₂PO₄, 0.1% 葡萄糖, 0.1% NaHCO₃。

确认 (verification): 证实假设的真实性和精确性。

生活力 (viability): 生物体的生命力, 通常理解为细胞悬液中的活细胞数。

导 读

自经典免疫学建立之后，随着现代生物学和生物技术的不断发展，免疫学的研究已进入了一个崭新的时代。因此，免疫学是一门既古老又崭新的学科，涉及医学各个领域，是医学的基础。现代免疫学与分子生物学、生物信息学、医学、药学、物理学和化学等学科相互渗透，产生了许多免疫学分支学科和交叉学科。它们不仅促使免疫学理论的突破，也带动了免疫学技术的发展。

《实验者系列——免疫学》是继该系列的《分子生物学和基因组学》及《蛋白质生物化学和蛋白组学》之后出版的第三本。全书共分十章，除第十章为统计学外，其余均为免疫学研究相关的实验技术。第一章介绍“抗体”。抗体是血浆中的可溶性免疫球蛋白(Ig)，抗体分子呈“Y”型，由两条相同的重链和两条相同的轻链经二硫键连接。重链和轻链分别由可变区和恒定区组成，每个可变区中有三个高变区，它们往往是与抗原结合的主要部位，因此，这些部位也称互补决定区(CDR区)。抗体由抗原免疫动物后获得，抗原可以是蛋白质，或多肽、多糖、核酸、脂类，甚至是连接在蛋白上的小分子化合物。常用于制备抗体的动物有小鼠、大鼠、兔、绵羊、山羊、马、鸡，免疫时必须要用佐剂。从免疫动物血清中得到的是多克隆抗体，用杂交瘤技术可以得到单克隆抗体。抗体纯化方法主要有：硫酸氨沉淀法、Protein A或Protein G亲和层析法、疏水层析、羟基磷灰石层析、离子交换层析、凝胶过滤等。纯化抗体的鉴定，首先是测蛋白含量和纯度(可用SDS-PAGE法测纯度)，而后测抗体亚型。抗体可以通过不同的化学试剂交联到酶(辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶等)、荧光染料(FITC、PE、APC等)、生物素(Biotin)、胶体金和放射性同位素上，用于各种免疫学试验。

第二章讲述“细胞分离”。在免疫学试验中常常需要分离细胞，而且希望得到纯度尽可能高的细胞群。主要采用离心技术，根据细胞大小和密度进行分离。其中差速离心是在均匀介质中，通过逐渐增加离心速度或低速和高速交替进行离心，使沉降速度不同的颗粒物质，在不同离心速度及时间下分批分离。它适合于分离沉降系数相差较大的颗粒。密度梯度离心是样品在一惰性梯度介质中，进行离心沉降或沉降平衡。在一定离心力下，颗粒物质被分配到梯度中某些特定位置上，形成不同区带，从而使分离效果更好。分离细胞常用的介质有Ficoll-Hypaque，应根据被分离的细胞类型选择相应密度的分离液，例如分离淋巴细胞，一般用密度为1.066~1.077的分离液。离心淘洗法是根据细胞密度、形状和大小进行分离，分辨率较高，可以将外周血单个核细胞分成淋巴细胞和单核细胞。另一种分离细胞的方法是借助细胞表面特异性分子，例如基于T细胞表面的CD2分子(绵羊红细胞受体，E受体)可以富集T细胞，与B细胞区分开，也可以利用B细胞表面的特性，用尼龙毛黏附B细胞，而与T细胞分离。免疫磁珠分离法近年来用得越来越多，磁性微球(磁珠)表面可以交联各种抗体，用于细胞、细胞亚类的分离。现在已有一些商品化的试剂盒出售。

第三章“流式细胞术”，利用流式细胞仪(也称荧光激活细胞分选器，FACS)进

行细胞表面分子、细胞 DNA 含量以及钙离子浓度等的测量。流式细胞仪的基本结构可分为四个部分：流动室（由样品管、鞘液管和喷嘴等组成）和液流系统；激光光源和光学系统；光电管和检测系统；计算机和分析系统。待测细胞首先要制成单细胞悬液，经特异性荧光染料染色后加入样品管中，在气体压力推动下进入含鞘液的流动室，在鞘液的约束下，细胞排成单列由喷嘴喷出，与水平方向的激光光束垂直相交，该区域称测量区。被荧光染料染色的细胞受激光照射后发出荧光，同时产生散射光，除了荧光信号被探测外，光散射信号可在前向角进行探测，这种前向角光散射反映了细胞体积大小。细胞发出的荧光信号和散射光信号被光电管接收并放大，转换成电信号，储存后供计算机进一步分析。常用于流式细胞仪分析的荧光染料有 FITC, PE, PerCP, APC, PerCP/Cy5.5, APC/Cy7, Cy7 等。可以用不同荧光染料标记的不同抗体对细胞进行多参数同步分析。样品制备在流式细胞仪应用中很重要，本书介绍了细胞表面抗原染色、细胞内抗原染色和细胞内细胞因子测量等方法；同时也介绍了流式细胞仪的启动、不同发射光谱间的补偿、多参数测量时荧光染料的组合等内容；并简单叙述了测量结果的分析方式：直方图、二维点图、密度图、二维等高图和假三维图；同时对自动进样器和细胞分选器进行了简单介绍。

第四章“定量免疫试验”首先介绍定量免疫试验的原理，如竞争试验、夹心试验及选择的依据，然后分别叙述了每种方法的具体问题，如放射免疫试验中的放射性同位素标记、分离方法、放射性测量和数据分析；酶联免疫吸附试验（ELISA）中的包板、封闭、洗涤、酶和底物及具体操作；酶联斑点试验（ELISPOT Assay）的原理、应用及与其他方法的比较；微粒免疫试验（PIA）的原理，以及它们可用于多个抗原同时测量。这些定量免疫试验可以通过增加标记物的浓度增加灵敏度。此外，还介绍了两种多酶级联反应增加测量的灵敏度。

第五章“免疫印迹”是将经电泳分离的蛋白质物质转移到膜上，然后用免疫反应检测和定量。在样品制备时可采用不连续 SDS-PAGE 使分辨率提高，形成的蛋白条带清晰，有利于以后的转膜。但由于有变性剂存在，有些抗原决定簇会被破坏，因此，可以选择其他的分离方法，如等电聚焦、天然凝胶电泳。将被分离的蛋白转到膜上可以有很多方法，湿法转移是最经典的，现在也有半干转移法。判断蛋白是否完全转移到膜上，可将转移后的电泳胶进行染色，观察是否有残留的蛋白。在用抗体对转在膜上的蛋白进行染色前，为了消除或降低非特异性本底，必须进行膜的封闭。可供选择的封闭液有多种，一般需要经试验决定。膜上的蛋白可用抗体进行检测，常用间接染色法，一抗是特异性针对膜上样品的抗体，然后与酶标二抗反应，显色用的底物，要根据抗体上标记的酶决定，一般辣根酶用 DAB，碱磷酶用 BCIP/NBT。本章中对电泳、转移、检测中误差来源和对照设置进行了讨论。另外，不经分离的蛋白也可直接进行印迹，即斑点和狭缝印迹。这一方法的优点是可以筛选大量样品。

第六章“原位免疫定位”是在细胞或组织原位显示抗原的技术，包括了免疫细胞化学、免疫组织化学和免疫组织学。原位免疫定位的原理是利用特异性抗体显示原位细胞或组织的不同组分，这一方法的关键是如何获得最大的信号/噪音比，特异性地显示待检成分，而本底尽可能低。对于细胞悬液，可采用甩片机，将细胞离心甩到载玻片上；也可以做细胞涂片，固定后进行免疫检测；或将细胞包埋起来，像组织块一样处理。在

免疫组织化学分析中，典型步骤包括：准备、固定、包埋、切片、后处理、免疫检测、封片。本节中对每一步要注意的地方均做了叙述：如准备阶段，对载玻片的要求，如何处理。由于抗体分子比较大，很难渗透未处理的新鲜组织，此外，为了保持组织的原有结构，不受微生物的降解或其他原因而使抗原变性或丢失，因此，固定是很重要的一步，除了常用的浸透法固定外，还可用灌注法固定，后者更适合于器官或完整的生物体。用于原位免疫定位的固定剂种类较多，常用的固定剂有：甲醛、多聚甲醛、乙醇、丙酮和碳二亚胺等，需根据抗原性质加以选择。在原位免疫定位中，免疫检测主要是利用抗原-抗体反应，因此，方法上有直接法和间接法之分，后者还可分为二步法、三步法、APAAP法和ABC法等，目的是通过放大效应提高灵敏度。标记抗体可以用荧光素、酶或颗粒，根据实验目的、待测样品和实验设备选择合适的标记物。如果用免疫电泳进行组织分析，则需要考虑用电子密度高的标记物（如铁蛋白、金等）标记抗体，因其在固定剂的选择、包埋和切片上均与一般光学显微镜不同。

第七章“免疫沉淀”，抗原-抗体复合物的下沉称免疫沉淀。经典的免疫沉淀包括单向免疫扩散、双向免疫扩散（Ouchterlony法）、放射状免疫扩散（Mancini法）和免疫电泳等。各种免疫电泳方法都是将电泳和免疫沉淀相结合，如：单向免疫电泳、交叉免疫电泳、火箭免疫电泳等。目前这些经典的免疫沉淀方法已逐渐被 Western Blot、ELISA、RIA、PIA 等方法取代。今天的免疫沉淀作为一种分析方法，利用抗原-抗体特异性结合后，与固相化的 Protein A 或 Protein G 结合，通过离心将待分析的抗原沉淀下来，然后做进一步分析（如：SDS-PAGE）。免疫沉淀可以检测细胞群体中的抗原、蛋白抗原的相对分子量、测定蛋白抗原翻译后的修饰以及蛋白质-蛋白质间的相互作用等。

第八章介绍“细胞存活、吞噬、死亡”。一般判断细胞“死”、“活”常用的方法是染料排斥反应，如台盼蓝染色、PI染色等，但需要注意的是，这些染料均有细胞毒性，与细胞一起孵育时间不能太长，否则死细胞数会增加。常用的MTT法是利用活细胞中某些酶活性的测定，来反映细胞活性。MTT是四甲基偶氮唑盐，呈黄色，活细胞内的线粒体脱氢酶可将其还原为蓝色的甲臞，可以通过分光光度法进行定量。由于酚红影响甲臞的测定，因此用于这一试验的介质最好不含酚红。ATP试验原理是：ATP是细胞的能源，只存在于活细胞中，因此，可以用来测定细胞活性。该试验的灵敏度很高，但要注意实验过程中的污染问题。细胞增殖试验常用 ^3H 胸腺嘧啶核苷（ ^3H -TdR）掺入法，或5-溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）标记法，掺入的BrdU可以通过特异性抗体的免疫试验检测。BrdU标记法同样适用于 *in vivo* 的增殖研究。吞噬试验也是检测免疫细胞功能的方法之一，一般用吞噬细胞吞噬颗粒的多少来衡量，做好这一试验的关键是：溶液中要有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等二价阳离子；经过预试验确定吞噬细胞与颗粒的比例，一般在1:5~1:100范围内；吞噬细胞与颗粒要混合均匀；要防止和减少吞噬细胞与试管壁的黏附。观察被吞噬颗粒的多少，可以用显微镜、流式细胞仪、光度计，或被吞噬的颗粒是细菌时，可采用微生物学的试验方法。“细胞介导的细胞毒”这部分内容包括NK、CTL等细胞介导的细胞毒，经典的测定方法是 ^{51}Cr 释放试验，当靶细胞与含 ^{51}Cr 的介质共培养后， ^{51}Cr 进入胞浆，与蛋白共价结合，待细胞死亡后就释放出来，可通过测定放射性进行定量。另一种细胞毒试验是乳酸脱氢酶（LDH）释放试验，LDH是活细胞

胞浆内的酶，正常情况下不能透过细胞膜，当靶细胞受到效应细胞攻击而受损时，细胞膜通透性改变，LDH 释放到介质中，可通过酶学试验进行定量。细胞凋亡是生物体内无用的、老化的和一些损伤细胞自动死亡的一种形式，它受基因控制，有别于细胞坏死。检测细胞凋亡的方法很多，细胞核染色法是利用能与 DNA 结合的染料，如碘化吡啶 (PI)、DAPI、吖啶橙等，然后用显微镜或荧光显微镜观察单个凋亡细胞，用荧光染料染色的细胞也可用流式细胞仪测定凋亡。由于凋亡细胞的染色体 DNA 被裂解为 200 bp 或其多聚体组成的寡核苷酸片段，在凝胶电泳上形成梯状条带，用这种方法可测定细胞早期凋亡。核小体定量 ELISA 是另一种利用染色体 DNA 降解成核小体检测细胞凋亡的方法，它是一种夹心 ELISA，用生物素标记的组蛋白抗体和辣根酶标记的 DNA 抗体，酶联板用链亲和素包被。TUNEL 技术也称原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶标记技术，凋亡细胞由于内源性核酸内切酶的激活，核 DNA 被切割成许多断裂点，暴露出大量 3'-羟基末端，在末端脱氧核糖核苷酸转移酶作用下，将标记的 dUTP 进行缺口末端标记，则可在原位特异地显示凋亡细胞。Annexin V 方法是利用凋亡早期细胞膜内的磷脂酰丝氨酸转到细胞膜表面，它能与荧光标记的 Annexin V 特异结合，可用流式细胞仪检测。Caspase 活性测定也能反映细胞凋亡。

第九章“特殊的免疫学试验”，血型测定包括 ABO 血型和 Rh 血型。HLA 分型在临床免疫学中具有重要位置，它有助于某些疾病的诊断，也可用于器官移植的配型。经典的分型方法是微量淋巴细胞毒试验 (LCT)，它基于淋巴细胞表面有较多 HLA 分子，当加入特异性抗 HLA 的分型抗体后，相应的抗原-抗体结合后激活补体，在显微镜下观察淋巴细胞的死活，判断其表面是否具有与分型血清中抗体相对应的抗原。如果用吖啶橙/溴化乙锭染色，则死细胞呈红色，活细胞呈绿色，也可以用其他染料如 CFDA/EB，实验中必须设各种对照。

第十章“实验误差统计”，统计学是进行实验研究必须的工具，它对实验结果的分析 and 实验设计都十分重要，本章简述了统计学中的描述统计和推论统计，前者对资料的数量特征及分布规律进行测定和描述，如离散度、相关性等。后者是任何对数据（即样本）的处理导致预测或推论群体的统计学，它包括数据采集、从科学问题到假设、适当统计方法的选择等。

由于免疫学及其相关学科发展十分迅速，导致新的实验方法不断出现。“实验者系列——免疫学”所介绍的实验方法虽然不完全是最新的，而且也没有涉及当今免疫学的所有领域，但是在书中介绍的方法是最实用和可靠的。本书不仅阐述了这些方法的原理，而且有些地方还详细地介绍了实验步骤，分析了实验成败的原因，与其他方法的比较。特别是以“小贴士”方式提醒实验者注意实验中可能出现的问题，如何解决，如何保护操作者的安全等。因此，本书对于从事与免疫学相关的基础医学、临床医学及生物学各领域研究的学生、教师、研究人员都会有较大的参考价值。

沈倍奋

军事医学科学院基础医学研究所

中国工程院院士

2006 年 10 月

Foreword

After two successful publications in the *Experimenter* series, it was time to close the gap on immunology. It is hard to imagine this science without the important tool that has sprung from it: the antibody. Together with its always specific antigen, the antibody plays the major role in this volume.

Experimenter: Immunology has a new design thanks to our new publisher (Elsevier). However, the original mandate of the *Experimenter* series, to deliver an atypical “moist” methodology instead of the conventional dry one, remains the same. Starting with the protein biochemist “Rehm” and continuing with the molecular biologist “Mülhardt,” this volume covers a wide area of biology. Following the established and successful experimenter concept, we consider the many established methods, as well as new ones, along with their advantages and disadvantages. And as before, we impart useful experiential tips.

The team of authors would be delighted to get constructive feedback from our readers. Let us know what you did or didn't like, what in your opinion was unjustly omitted, what was incomprehensible, and what just gave the wrong impressions. We welcome all kinds of negative or positive comments, but please bear in mind—even authors have feelings!

Comments of all types can be directed to the authors at:

Immuno-Experimentator@gmx.de

Addresses of the authors:

Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper
Medical University Clinic
Department of Pneumology
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock
Germany

Daniel Myrtek
Medical University Clinic
Department of Pneumology
Kilianstr. 5
79106 Freiburg
Germany

Abbreviations

ABC	avidin-biotin complex
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AET	2-aminoethylisothiuronium bromide
AMCA	aminomethylcoumarin acetate
AP	alkaline phosphatase
APAAP	alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase
APC	antigen-presenting cells
BAL	bronchoalveolar lavage
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate
BSA	bovine serum albumin
CBMC	cord blood mononuclear cells
CN	4-chloro-1-naphthol
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DTT	dithiothreitol
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
HLA	human leucocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
i.d.	intradermal
IEM	immune electron microscopy
ILM	immune light microscopy
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenous
LSAB	labeled streptavidin-biotin
ME	mercaptoethanol
MNC	mononuclear cells
NBT	nitro blue tetrazolium chloride
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAP	peroxidase anti-peroxidase
PBL	inconsistent use: peripheral blood lymphocytes peripheral blood leucocytes
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline

PEG	polyethylene glycol
PHA	phytohemagglutinin
PLP	periodate-lysine-paraformaldehyde
PMNC	polymorphonuclear and polynuclear granulocytes
PMS	phenazinmethosulphate
PVP	polyvinylpyrrolidon
RCF	relative centrifugal force
R-PE	R-phycoerythrin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSD	sum of the squared deviations
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-cell receptor
TRITC	tetramethylrhodamine thiocyanate
s.c.	subcutaneous
SSC	side scatter
SDS	sodium dodecyl sulphate
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine