

免疫毒理学实验技术

● 主 编 薛 彬

北京医科大学 联合出版社
中国协和医科大学

免疫毒理学实验技术

主 编 薛 彬
编写人员 薛 彬 雷志明
 魏雪涛 周 弘

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社

(京)新登字147号

图书在版编目(CIP)数据

免疫毒理学实验技术/薛彬主编·—北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1995.10

ISBN 7-81034-539-7

I. 免… II. 薛… III. 免疫学:毒理学-实验 IV. ①R39
2-33②R99-33

中国版本图书馆CIP数据核字(95)第11446号

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社出版发行

(100083 北京学院路38号 北京医科大学院内)

北京密云华都印刷厂印刷 新华书店经销

* * *

开本850×1168 1/32 印张 5.25 字数 135千字

1995年10月第1版 1995年10月北京第1次印刷 印数 1—2000册

定价:9.30元

前 言

免疫毒理学是毒理学的一门分支学科，发展十分迅速，本书为适应广大从事毒理学、免疫毒理学、药理学、预防医学人员教学与科研需要而编写。全书共分十五章，前十二章为免疫毒理学研究中最常用的方法，后三章介绍国外推荐的免疫毒性检测方案、免疫毒理学实验设计和免疫毒性检测程序及安全性评价。由于篇幅所限，本书对一些最新技术未能加以介绍，这是一件憾事，将在再版时予以弥补。

在编写过程中，同济医科大学刘毓谷教授、北京医科大学张锐教授，对全书进行了审阅并提出宝贵意见，谨致衷心谢意。

限于笔者的业务水平和时间，错误与不足之处在所难免，恳请大家提出批评指正。

北京医科大学 薛 彬

1995年5月

目 录

第一章 细胞悬液的制备与细胞分离技术	(1)
第一节 鼠细胞悬液的制备	(1)
一、脾细胞	(1)
二、胸腺细胞	(2)
三、淋巴结细胞	(3)
四、腹腔细胞(巨噬细胞)	(5)
附 用细胞计数板做细胞计数	(5)
第二节 外周血中淋巴细胞的分离纯化	(7)
一、沉降法	(7)
二、密度梯度离心分离法	(8)
第三节 T、B淋巴细胞的分离	(10)
一、尼龙毛(纤维)分离法	(10)
二、E花环密度梯度离心分离法	(12)
第二章 T淋巴细胞功能的检测	(14)
第一节 外周血T淋巴细胞酸性 α -醋酸萘酯酶 (ANAE)的测定	(14)
第二节 T淋巴细胞E花环形成试验	(16)
一、总T玫瑰花试验	(17)
二、活性T玫瑰花试验	(18)
第三节 T淋巴细胞增殖功能测定	(19)
一、ConA刺激淋转试验 颜色反应法(MTT法)	(19)
二、ConA刺激淋转试验 同位素参入法	(22)
三、ConA刺激淋转试验 形态学方法	(23)
第四节 混合淋巴细胞反应	(25)
第五节 迟发型变态反应	(27)

一、足跖厚度增加法	(27)
二、放射性测定法	(28)
三、伊文思蓝比色法	(29)
第三章 B淋巴细胞功能的检测	(32)
第一节 抗体生成细胞检测法 (溶血空斑实验)	(32)
一、Jerne改良玻片法	(32)
二、Cunningham小室法 (小室液相法)	(36)
三、定量溶血分光光度测定法 (QHS法)	(38)
第二节 用半抗原偶联抗原检测抗体形成细胞	(39)
第三节 血清溶血素测定	(40)
一、半数溶血值 (HC_{50}) 的测定	(40)
二、用血凝法测溶血素滴度	(42)
第四节 人血清中免疫球蛋白含量测定	(43)
第四章 K和NK细胞活性的测定	(46)
第一节 K细胞活性的测定	(46)
一、空斑形成法	(46)
二、同位素 ^{51}Cr 测定法	(48)
第二节 NK细胞活性的测定	(49)
一、乳酸脱氢酶 (LDH)测定法	(49)
二、同位素 ^{51}Cr 测定法	(51)
第五章 巨噬细胞和中性粒细胞功能检测	(53)
第一节 巨噬细胞吞噬功能测定	(53)
一、巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验	(53)
二、孔雀绿比色法测定巨噬细胞吞噬功能	(55)
三、中性红比色法测定巨噬细胞吞噬功能	(57)
第二节 碳粒廓清试验	(58)
第三节 巨噬细胞功能- Fc 受体检测 (EA花环法)	(60)
第四节 溶菌酶的测定	(61)
第五节 中性粒细胞吞噬功能的测定	(63)
第六章 红细胞免疫功能的检测	(66)
第一节 红细胞膜 C_{3b} 受体及免疫复合物含量测定	(66)

一、红细胞C ₃ b受体花环及免疫复合物花环法	(66)
二、酵母多糖血凝法	(68)
三、补体致敏酵母菌血凝法	(69)
第二节 血清中红细胞免疫调节因子活性的测定	(70)
第三节 红细胞免疫粘附肿瘤细胞能力的测定	(72)
第七章 细胞因子的检测	(75)
第一节 白细胞介素1 (IL-1) 的检测	(75)
第二节 白细胞介素2 (IL-2) 的检测	(77)
一、小鼠脾脏细胞增殖法	(77)
二、CTLL细胞株法	(78)
第八章 宿主抵抗力检测	(80)
第一节 肿瘤细胞攻击实验	(80)
一、FYB6肿瘤细胞攻击实验	(80)
二、肺部转移瘤B16F10攻击实验	(81)
第二节 对细菌和寄生虫的抵抗实验	(82)
一、对李斯特菌的抵抗实验	(82)
二、对链球菌的抵抗实验	(83)
三、对毛线虫的抵抗实验	(84)
第九章 外来化合物致敏作用的检测	(86)
第一节 速发型过敏反应的检测方法	(86)
第二节 皮肤致敏实验	(88)
一、局部封闭涂皮法 (BT)	(88)
二、皮内注射法 (DT)	(89)
三、皮内和涂皮相结合的方法 (GPMT)	(90)
第三节 小鼠耳肿胀实验	(91)
第十章 胸窝淋巴结实验	(93)
一、直接法	(93)
二、间接法	(94)
三、过继转移法	(95)
第十一章 常用免疫标记技术	(98)
第一节 免疫荧光技术	(98)

一、直接免疫荧光法	(98)
二、间接免疫荧光法	(100)
第二节 放射免疫分析技术	(101)
一、放射过敏原吸附试验(RAST)	(102)
二、放射单向免疫扩散法	(103)
第三节 免疫酶技术	(104)
第四节 生物素—亲和素技术	(107)
一、BAS-酶免疫检测方法(BAS-ELISA)	(108)
二、其他不同标记材料BAS检测法	(110)
第十二章 细胞内游离钙浓度和钙调素活性的测定	(112)
第一节 细胞内游离钙浓度的测定	(112)
第二节 钙调素活性的测定	(114)
第十三章 国外推荐的免疫毒性检测方案	(119)
第一节 外来化合物对小鼠的免疫毒性检测方案	(119)
一、美国NIEHS提出的方案	(119)
二、美国NTP提出的方案	(121)
三、日本推荐的免疫毒性检测方案	(122)
第二节 外来化合物对大鼠免疫毒性的检测方案	(123)
第三节 外来化合物对人群免疫毒性的检测方案	(124)
第四节 免疫毒性检测指标的敏感性与预测性分析	(126)
第十四章 免疫毒性检测程序及安全性评价	(131)
第一节 免疫毒性检测程序	(131)
第二节 免疫毒性检测在安全性评价中应注意的几个 问题	(132)
第十五章 免疫毒理学实验设计	(136)
第一节 免疫毒理学研究中应考虑的问题	(136)
第二节 检测免疫功能的实验模型	(138)
第三节 实验中的质量控制	(139)
附录一 各种溶液及常用细胞染液的配制	(142)
附录二 人与动物常用有关免疫检测新旧单位参考值	(155)

第一章 细胞悬液的制备与 细胞分离技术

用于免疫系统体外测定的细胞，通常可直接从鼠类的几个淋巴器官中获得，而且用此法获得的细胞纯度很高。但是，在体外进行人体免疫细胞的研究时，要想直接获得某种单一的细胞是非常困难的，通常我们是从外周血中利用细胞分离技术来获得细胞的。所以，掌握好细胞的分离技术是实验的基础，非常重要。

第一节 鼠细胞悬液的制备

用于体外免疫试验的鼠类细胞，可从以下几个器官中获得：脾脏、胸腺、腹腔和淋巴结。在本节中，主要介绍如何从上述的组织脏器中获取细胞的技术。

一、脾细胞

【材料】

小鼠或大鼠

Hanks液(pH7.2~7.4)

眼科剪刀和镊子

培养皿($\phi 3 \sim 3.5\text{cm}$)

不锈钢筛网(200目)或匀浆器

【操作步骤】

1. 用颈椎脱臼法处死小鼠，并放入盛有75%乙醇的烧杯中，使小鼠全身浸湿，这样可避免毛和皮屑到处飞散。
2. 取出小鼠放在滤纸上，使其侧卧，鼠腹部与操作者相对。

用剪刀和镊子在小鼠侧腹部做一横切口，两手的手指握住切口两边，撕开皮肤，直到腹壁完全暴露为止。

3. 用镊子挑起覆盖在脾脏侧的腹膜，用剪刀剪开。然后，用镊子分开腹膜提起脾脏，将脾脏与其血管和结缔组织剥离，立即放入盛有Hanks液的培养皿中。

4. 将脾脏放在200目的不锈钢筛网上，用1ml塑料注射器芯研磨脾脏，使成单个细胞悬液。

5. 将脾细胞悬液经4层纱布过滤到离心管中。用Hanks液洗三次，每次离心（1000r/min）10分钟。计数细胞，并调整细胞浓度。

【注意事项】

1. 制备无菌细胞悬液时，所用器械均需事先消毒灭菌。
2. 根据小鼠的品系和体重的不同，每只小鼠的脾脏可获得 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 的有核细胞。
3. 研磨脾脏时动作要轻，尽量避免损伤细胞。

二、胸腺细胞

【材料】

小鼠，3~6周龄。其他参见前述。

【操作步骤】

1. 将小鼠用摘除眼球法（眶后静脉丛）放血至死。用75%乙醇浸湿小鼠全身，使小鼠仰卧于滤纸上。用剪刀将剑突至下颌的皮肤剪开，向两侧剥离皮肤，沿两侧向上剪断肋骨至颈部。用镊子掀起胸骨，使胸腺充分暴露。

2. 用一把镊子将胸腺轻轻提起，再用另一把镊子夹住胸腺的根部，并将胸腺完整取下，放入盛有Hanks液的培养皿中。

3. 胸腺细胞悬液的制备，同脾细胞悬液的制备。

【注意事项】

1. 不可用颈椎脱臼法处死小鼠，以防胸腺区积血。

2. 胸腺随年龄的增长而减小。3~6周龄小鼠的胸腺约含 $(1\sim 2)\times 10^8$ 个细胞, 而6~16周龄的小鼠则含 $(0.5\sim 1.0)\times 10^8$ 个细胞, 4个月以上小鼠的胸腺只含有 5×10^7 个细胞或更少。

三、淋巴结细胞

淋巴结广泛分布于机体中(见图1-1)。通常我们不会取出全部的淋巴结, 而是有针对性地选择某一部位的淋巴结。小鼠的颈、腋下、腹股沟以及膈窝淋巴结易于找到, 并且都是双侧性的。肠系膜淋巴结, 因为比较大(约含 2×10^7 个细胞), 所以也易于找到和取出。

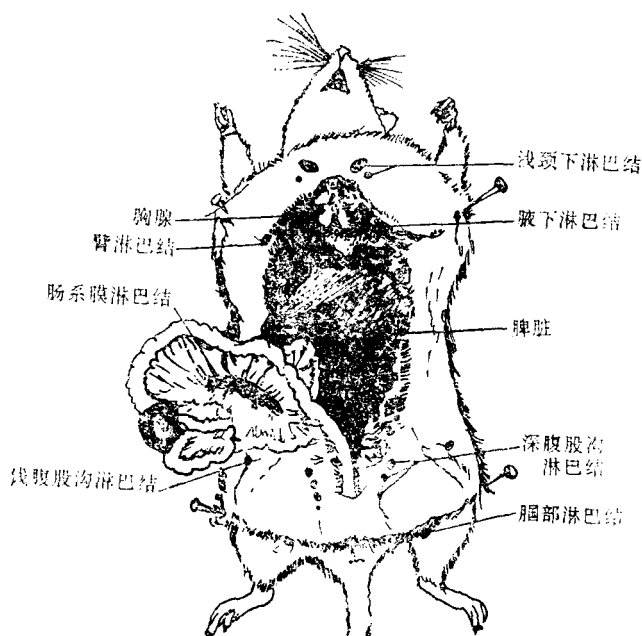


图1-1 小鼠体内部分淋巴结的位置示意图

【材料】

软木板和大头针。其他参见前面(一、二)所述。

【操作步骤】

1. 用颈椎脱臼法处死小鼠，并用75%乙醇消毒。将其仰卧在软木板上，使四肢伸展并用大头针固定。

2. 用剪刀和镊子剥开胸、腹部皮肤，向反方向展开并用大头针固定。

3. 用镊子轻轻剥离组织寻找淋巴结，通常淋巴结埋在结缔组织和脂肪中。与柔软的脂肪和结缔组织相比，淋巴结为坚硬光滑的半透明肿块。

4. 摘取肠系膜淋巴结，需打开腹腔，用镊子提起肠管，暴露肠系膜，淋巴结即可在升结肠的系膜上找到（通常是一个的，细长形）。

5. 摘取腭窝淋巴结时，将小鼠俯卧在操作台上。用镊子提起膝关节背面的腭窝处松弛的皮肤，用剪刀做一切口。双手握住切口两边皮肤，并向大腿和小腿方向撕开（动作要轻），暴露整个腭窝部位。

6. 用镊子小心剥开外层肌肉，可找到约芝麻粒大小的半透明圆形肿物，即为腭窝淋巴结。

7. 用镊子取出淋巴结，并放入盛有少量Hanks液的24孔培养板或培养皿中。用1ml塑料注射器芯直接研磨，并制成单个细胞悬液。

【注意事项】

1. 撕扯腭窝处皮肤时，要轻缓，手指不可触及皮下的肌肉，否则有可能使淋巴结连同皮下脂肪一起被扯去，并且很难再找到。

2. 在研磨淋巴结时，尽量少放Hanks液以利于研磨。待研磨均匀后，立即加入Hanks液。

3. 在脚掌注射弗氏佐剂或某种化合物后，淋巴结可增大若干倍，甚至十倍以上。

四、腹腔细胞（巨噬细胞）

【材料】

小鼠

Hanks液(pH7.2)

0.34mol/L的蔗糖溶液

手术剪刀和镊子

5~10ml注射器若干支

【操作步骤】

1. 用颈椎脱臼法处死小鼠，并用75%乙醇消毒小鼠腹部皮毛。将小鼠仰卧在滤纸上，用镊子提起腹部松弛的皮肤，用剪刀剪一横切口。双手捏住切口两边，并将皮肤撕开，使腹膜完全暴露。

2. 将腹膜用镊子提起，用注射器向腹腔内注入0.34mol/L蔗糖溶液或Hanks液约4ml。轻揉腹部，然后小心地抽取腹腔液（尽量回收）。

3. 将回收的腹腔液用Hanks液洗三次，每次离心（1000r/min）10分钟。每只小鼠可得 $(1\sim3)\times10^6$ 个细胞。

【注意事项】

1. 在吸取腹腔液时，注射器针头的斜面应朝上。

2. 针头在腹腔中移动时，一定要小心，以免刺破肠壁而污染细胞悬液。

3. 用0.34mol/L蔗糖溶液冲洗腹腔，可避免细胞结成团块和粘附。

附 用细胞计数板做细胞计数

用细胞计数板可计数白细胞与红细胞。在显微镜下可以看到细胞计数板上有许多大小不同的格子（见图1-2）。用图中标有1, 2, 3, 4的四个大方格（每个大方格中包括16个小格）计数白细胞。用

标有5的大方格计数红细胞。在盖玻片下的计数区深度为0.1mm，边长为1mm，每个大格的体积是 10^{-4} ml。

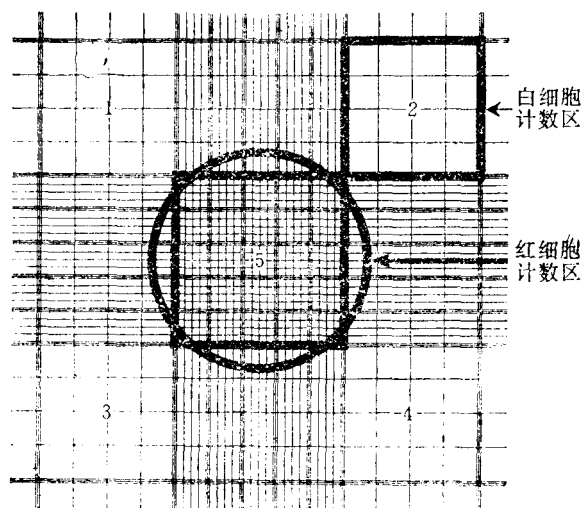


图1-2 血球计数板

(一) 白细胞计数

【材料】

细胞计数板和盖玻片

白细胞稀释液 (1%冰醋酸水溶液)

手握计数器

【操作步骤】

将计数板和盖玻片用纱布擦干净，并将盖玻片盖在计数板的计数区上。用微量加样器将适当稀释后的细胞悬液加入计数区(室)内，不要让液体溢出到浸出槽中。在显微镜下计数四个大方格中的细胞，然后求出每个大格中的平均细胞数。

$$\text{细胞数/ml} = \text{每个大格平均细胞数} \times \text{稀释倍数} \times 10^4$$

(二) 红细胞计数

【材料】

细胞稀释用生理盐水，其余同白细胞计数。

【操作步骤】

对细胞做适当稀释(全血可做1:200的稀释)，将细胞悬液加入计数区(室)中。计数红细胞用中间的大格(其中包括25个小格)，计数25个小格中的5个格内的红细胞数(即4个边角和中间1个格)。

细胞数/ml = 5个格内的细胞数 $\times 5 \times$ 稀释倍数 $\times 10^4$

【注意事项】

1. 将细胞悬液加入计数板的小室时，让液体刚好充满小室为好。如加入液体溢出或不足，应清除后重做，否则会影响计数的准确性。

2. 细胞加入计数室后，不可马上计数，应待细胞下沉后(1~2分钟)再计数。

第二节 外周血中淋巴细胞的分离纯化

在体外对人体免疫细胞的检测，常常需从外周血中分离淋巴细胞。根据血液中各种细胞的大小和密度不同，细胞分离的方法有多种。不同的分离方法，可得到不同类别和纯度的细胞，应根据实验要求选用。本节主要介绍沉降法和分层液密度梯度离心分离法。

一、沉降法

【原理】

红细胞与淋巴细胞的比重不同，红细胞的比重大，沉降速度快，淋巴细胞相对沉降较慢，在试管中红细胞沉在底层，淋巴细胞停留在红细胞层上的血浆中，从而可将红细胞和淋巴细胞分离。分离方法有自然沉降分离法和用高分子聚合物促进细胞凝集沉降分离法。

(一) 自然沉降分离法

【材料】

肝素（用生理盐水配制成500 U/ml）

Hanks液(pH7.2~7.4)

【操作步骤】

1. 抗凝血的采集

根据将要采集血液的量，向试管内加入适量的肝素液(30 U/ml)，然后将采集的血液加入试管中轻轻混匀，应避免产生气泡。

2. 细胞的分离

将装有抗凝血的试管，置于37℃温浴1小时左右。然后取出试管，并用尖滴管吸取红细胞与血浆界面处的白细胞层，用Hanks液洗二次，每次离心(1000 r/min)10分钟，即得富含淋巴细胞的细胞悬液。

(二) 用高分子聚合物促进红细胞凝集沉降分离法

【材料】

肝素（同前）

Hanks液(pH7.2~7.4)

3%的明胶溶液

【操作步骤】

取3%的明胶溶液与肝素抗凝血于试管中1:3混合，小心混匀（勿出气泡），置37℃温浴45~60分钟，用尖滴管吸取富含白细胞的血浆层，其余步骤同前。

二、密度梯度离心分离法

【原理】

淋巴细胞与单核细胞的比重为1.075~1.090；红细胞与粒细胞则为1.092。将血液加在一种密度在1.075~1.090之间的细胞分层液上，用水平离心机做密度梯度离心。各类细胞则按各自的密度梯度分布，淋巴细胞不进入较密的介质中(留在分离液上)；

而红细胞和粒细胞及一些死细胞则通过较密的介质（分离液）形成沉积。

【材料】

泛影葡胺(hypaque)

聚蔗糖(Ficoll)

Hanks液(pH7.2~7.4)

RPMI1640培养液（含10%的小牛血清）

【操作步骤】

1. 淋巴细胞分离液的配制

① 人淋巴细胞分离液（比重1.077）

取34%的泛影葡胺（比重1.200）1份与9%的聚蔗糖（比重1.020）2.4份混合，用波美比重计测定比重（比重1.077）。目前已有商品化的人淋巴细胞分离液，使用非常方便。

② 小鼠淋巴细胞分离液（比重1.090）

取34%的泛影葡胺（比重1.200）1份与9%的聚蔗糖（比重1.020）1.57份混合，混匀后用波美比重计测定比重（比重1.090）。

2. 淋巴细胞的分离和纯化

① 将肝素抗凝血用Hanks液做倍比稀释，然后向试管中加入等量的淋巴细胞分离液，用尖头滴管吸取稀释后的血液，沿管壁缓缓加于分离液的液面上。

② 将离心管放入水平离心机中离心（2000r/min）25分钟，红细胞和粒细胞沉于离心管的底部，淋巴细胞停留在分离液与血浆层的界面处。用尖头滴管吸出淋巴细胞层，用Hanks液洗三次，每次离心（1000r/min）10分钟。在显微镜下计数细胞，按要求调整细胞浓度。

③ 将分离出的淋巴细胞（ 10^7 /ml），置于含10%小牛血清RPMI1640培养液的培养皿中，在37℃二氧化碳培养箱中孵育45~60分钟，每隔15~20分钟轻轻摇动一次，使单核细胞充分粘附于培养皿上，然后吸出培养皿中的细胞悬液，再用RPMI1640