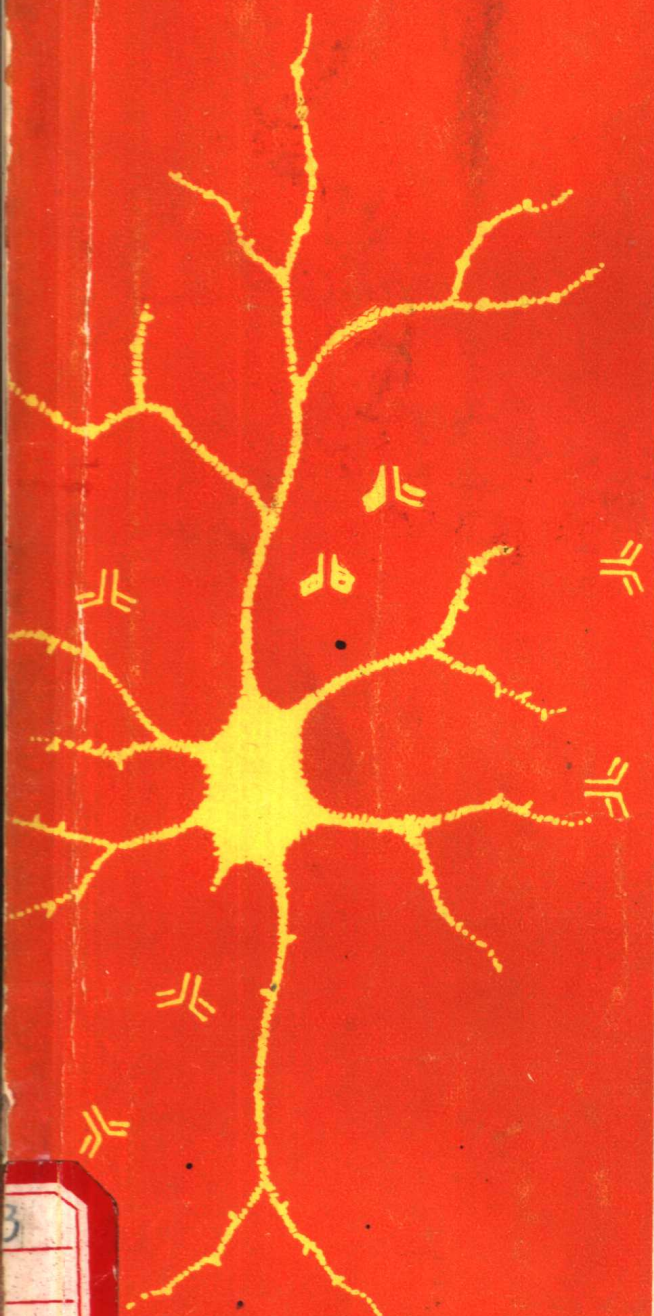


神经免疫 细胞化学



朱长庚 主编

科学出版社

神经免疫细胞化学

朱长庚 主编

朱长庚 邓德忠 卢金活
刘庆莹 刘汉涛 朱家祥 编写

艾民康 李继硕 审

科学出版社

1990

内 容 简 介

本书系统地介绍了免疫细胞化学的原理和方法,对抗原和抗体的制备、酶标、电镜等技术和免疫细胞化学在神经解剖学中的应用,以及免疫细胞化学在神经系统研究中的新进展和发展前景均有详尽的阐述,对教学、科研、临床应用具有参考价值。

本书可供神经解剖学和免疫学方面的教师、学生、科研人员及医生参考。

神经免疫细胞化学

朱长庚 主编

朱长庚 邓德忠 卢金活 编写
刘庆莹 刘汉涛 朱家祥

艾民康 李继硕 审

责任编辑 吴瑰琦

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号
邮政编码:100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1990年7月第一版 开本:787×1092 1/16
1990年7月第一次印刷 印张:17 1/2
印数:0001—1200 字数:399 000

ISBN 7-03-001692-0/R·79

定价:17.50 元

前 言

近 20 年来,由于新的研究技术的应用,神经解剖学有了迅速的发展。譬如,除了损毁和变性法外,应用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记法和放射自显影术 (ARG) 追踪神经元的传入、传出联系,应用荧光组织化学法显示中枢与周围神经元的单胺性质,应用荧光素双重标记法显示神经细胞轴突的侧支投射,应用电子显微镜(包括透射电镜、扫描电镜和冰冻蚀刻标本电镜观察)进一步在亚细胞水平揭示神经组织的三维空间超微结构等,使神经解剖学的研究跨进了新的历史时期,而免疫细胞化学技术的发展又为这一新的时期树立了一个划时代的里程碑。它具有特异性强、灵敏度高的优点,是探查和确定神经元的性质、定位、分布和联系的有力手段,而且还可以与上述各种方法相结合,形成各种“杂交技术”,为神经解剖学的新发展开辟了广阔的前景。

免疫细胞化学不仅是一种科学研究的手段,而且已经发展成为一门新兴的具有现代基础理论和广泛应用价值的学科。它不仅对神经解剖学的发展起着很大的促进作用,而且对许多医学生物学研究和临床应用都显示出巨大的推动作用。为了使有限的篇幅能有放的矢地发挥作用,本书编者搜集了国外、国内有关神经免疫细胞化学的资料,结合我们近几年来在这方面工作的实践体会编写了这部《神经免疫细胞化学》,希望对我国方兴未艾的神经免疫细胞化学的研究工作起到抛砖引玉的作用。

在本书编写过程中,得到科学出版社的大力支持和鼓励,以及同济医科大学各级领导和解剖学教研室全体同志的指导和帮助。尤其是艾民康、李继硕两位教授在百忙中对本书的初稿进行了认真、细致的审阅和修改,特此表示衷心感谢。

由于我们的水平有限,加之编写时间紧迫,本书一定还存在缺点或不足之处,敬请各位同道和广大读者多提宝贵意见,以便改正。

本书中各种神经递质在中枢神经系统内分布的额切面图系采自日本盐谷 弥兵卫编《目で見る脳の構造と活性物质》(厚生社,大阪,1985)一书并适当加以补充,特此说明。

编 者

1986 年 11 月 24 日

目 录

前言	i
第一章 免疫细胞化学的原理和方法	1
第一节 抗原和抗体	1
第二节 抗体和抗血清的制备	3
一、抗原的选择和纯化	3
二、免疫技术	3
第三节 免疫细胞化学方法	6
一、免疫荧光法	7
二、酶标记抗体法	7
三、非标记抗体过氧化物酶-抗过氧化物酶法	9
四、A 蛋白法	14
五、ABC 法	15
六、免疫电镜方法	16
七、双重免疫标记技术	20
八、多重免疫标记	23
第四节 免疫细胞化学与其他技术相结合	23
一、损毁(切断)法与免疫细胞化学技术相结合	24
二、HRP 逆行追踪技术与 PAP 法相结合	24
三、荧光素逆行标记技术与免疫荧光法相结合	26
四、放射自显影术与免疫细胞化学相结合	27
五、免疫电镜与电镜放射自显影术相结合	28
参考文献	29
第二章 免疫细胞化学在神经科学研究中的应用	32
第一节 区分神经细胞和神经胶质细胞及其结构成分	32
第二节 确定神经元的性质定位和分布	33
第三节 探查和发现新的神经递质	34
第四节 追踪神经纤维的投射区及其径路	35
第五节 在超微结构水平研究神经元的构造及突触联系的化学本质	36
第六节 研究神经递质共存	36
第七节 个体发育和种系发生研究	40
第八节 神经系统的机能和临床研究	40
参考文献	41
第三章 胆碱能神经元系统	44
第一节 神经元定位和分布	44
第二节 纤维投射	47

第三节 生理功能	48
参考文献	48
第四章 胺能神经元系统	50
第一节 儿茶酚胺能神经元	53
一、NA 能神经元	53
二、DA 能神经元	60
三、A 能神经元	65
参考文献	65
第二节 5-HT 能神经元	72
一、神经元胞体的定位和神经纤维的分布	72
二、种系和个体发生	77
三、投射径路	77
四、生理作用	79
参考文献	81
第三节 组胺能神经元	84
一、神经元胞体的定位和神经纤维的分布	85
二、投射径路	87
三、生理功能	88
参考文献	89
第五章 氨基酸能神经元系统	91
第一节 概述	91
一、氨基酸在脑中的含量	91
二、脑中氨基酸的区域分布	92
三、脑中氨基酸结构与功能的关系	93
四、氨基酸与其他神经递质间的相互作用	94
第二节 兴奋性氨基酸	94
一、区域分布	94
二、投射径路	95
三、功能	96
第三节 抑制性氨基酸	97
一、 γ -氨基丁酸	97
二、甘氨酸	102
三、牛磺酸	104
参考文献	104
第六章 肽能神经元系统	109
第一节 神经系内肽类物质的种类、分布和特点	109
一、广泛性	109
二、不均匀性	109
三、与传统的“神经核团”定位不一致	110
四、重叠与共存	110
五、肽能神经元的性质和特点	110

参考文献	112
第二节 P 物质能神经元	113
一、神经元胞体定位和神经纤维的分布	113
二、SP 的超微定位	119
三、投射径路	119
四、生理功能	122
参考文献	125
第三节 生长抑素能神经元	130
一、神经元胞体的定位和神经纤维的分布	130
二、种系和个体发生	135
三、投射径路	135
四、生理功能	137
参考文献	139
第四节 血管活性肠多肽能神经元	144
一、神经元胞体的定位和神经纤维的分布	144
二、种系发生和个体发生	149
三、投射径路	150
四、生理功能	150
参考文献	154
第五节 类阿片肽系统	156
一、前阿黑皮素和 β -内啡肽系统	157
二、前脑啡肽系统	167
三、前新内啡肽-强啡肽系统	171
参考文献	175
第六节 后叶加压素和催产素能神经元	177
一、神经元定位	177
二、纤维投射	182
三、生理功能	183
参考文献	184
第七节 神经紧张肽能神经元	185
一、神经元定位	185
二、纤维投射	188
三、生理功能	189
参考文献	189
第八节 血管紧张素 II 能神经元	190
一、神经元定位	191
二、纤维投射	192
三、生理功能	192
参考文献	193
第九节 胆囊收缩素和促胃酸激素能神经元	195
一、神经元定位	196
二、纤维投射	199

三、生理功能	200
参考文献	200
第十节 促黄体激素释放激素能神经元	202
一、神经元定位	202
二、投射径路	203
三、生理功能	204
参考文献	204
第十一节 促甲状腺激素释放激素能神经元	206
一、神经元定位	206
二、纤维投射	206
三、生理功能	206
四、其他神经递质对 TRH 的作用	208
参考文献	209
第十二节 胰多肽类和神经肽 Y 系统	210
一、神经元定位	210
二、纤维投射	214
三、生理功能	214
参考文献	215
第十三节 降钙素基因相关肽能神经元	216
参考文献	218
第十四节 蛙皮素能神经元	218
参考文献	221
第十五节 催乳激素	222
参考文献	223
第十六节 其他肽类物质	223
一、胰高血糖素	223
二、胰岛素	224
三、舒缓激肽	225
四、促肾上腺皮质激素释放激素	225
参考文献	227
第七章 下丘脑的肽能神经化学解剖学	229
第一节 神经内分泌细胞的定位和投射	229
第二节 下丘脑肽能神经元的功能	233
第三节 神经内分泌的神经控制	233
一、单胺能径路	233
二、胆碱能径路	234
三、氨基酸能径路	234
四、肽能径路	235
五、下丘脑神经支配的作用	235
六、下丘脑神经内分泌的神经控制部位	235
第四节 下丘脑神经分泌的释放途径	236

参考文献	237
第八章 神经递质病理学及临床意义	241
第一节 Alzheimer 型痴呆	241
一、经典神经递质的异常	241
二、肽类的异常	242
第二节 震颤性麻痹	243
一、DA	244
二、DA 以外的神经递质	245
第三节 Huntington 舞蹈病	248
一、单胺类	248
二、GABA	249
三、胆碱乙酰化酶	249
四、P 物质 (SP)	250
五、TRH	251
六、ENK 和 CCK	251
七、AII	251
第四节 精神病	252
一、精神分裂症	252
二、躁狂抑郁性精神病	254
第五节 脑卒中	255
一、实验性脑缺血时单胺类神经递质的变化	255
二、人脑梗塞时脑内单胺类神经递质的代谢紊乱	256
三、脑缺血时脑内单胺类代谢紊乱的机理	257
四、单胺类神经递质代谢紊乱在脑卒发展中的意义	257
第六节 癫痫	258
一、单胺类神经递质	258
二、ACh	259
三、氨基酸类神经递质	259
四、ENK	261
参考文献	261

第一章 免疫细胞化学的原理和方法

免疫是脊椎动物机体识别和清除抗原性物质以维持内部环境恒定的一种功能。特异性免疫反应由细胞免疫和体液免疫两部分组成。细胞免疫反应是通过致敏T细胞及其释放的淋巴因子来实现的。体液免疫反应则是由浆细胞产生和分泌抗体,再由特异性的抗体与相应的抗原发生反应来完成。因此,特异性抗体是检测相应抗原的有效手段。自1955年开始,组织学家就已经应用提纯的抗体来检测组织切片中的抗原物质^[1],即用甲种动物组织中存在的抗原物质直接作为抗原或经与载体蛋白结合后作为抗原,刺激乙种动物产生特异性抗体,再利用抗原-抗体反应通过乙种动物的特异性抗体检测甲种动物组织中的抗原物质。为了检测组织中的抗原-抗体反应,可将免疫反应与放射性同位素示踪法相结合,进行定性、定量及定位分析,这就是放射免疫技术。也可以将免疫反应与细胞化学相结合,形成不溶于水的有色反应产物,便于进行形态学观察及定性、定量、定位分析,这就是免疫细胞化学技术。所以,免疫细胞化学技术本身也是一种“杂交技术”。本章着重介绍免疫细胞化学的原理和应用于神经解剖学研究的免疫细胞化学方法。

神经组织免疫细胞化学技术的主要内容包括:神经组织抗原成分的提取,用抗原免疫动物,特异性抗体的分离、提纯,以及免疫细胞化学染色。

第一节 抗原和抗体

抗原(antigen)是能刺激机体产生免疫反应的物质。它具有免疫原性和免疫反应性。前者系指它能刺激机体免疫系统形成免疫物质(抗体和致敏淋巴细胞);后者系指它能与抗体和致敏淋巴细胞特异性地结合而发生反应。兼具免疫原性和免疫反应性的物质称完全抗原,大多数蛋白质是良好的完全抗原。只有免疫反应性而无免疫原性的物质称半抗原(hapten)或不完全抗原。绝大多数低分子量的多糖和所有的类脂均属半抗原。半抗原与载体蛋白结合后,就具有免疫原性,成为完全抗原。故完全抗原由两部分组成:载体(蛋白质)和半抗原。前者赋予抗原以免疫原性;后者赋予抗原以免疫反应性。

抗原具有与相应抗体或致敏淋巴细胞发生反应的特异性。这种特异性是免疫反应的最大特点。抗原特异性是由抗原分子表面的化学基团——抗原决定簇(antigenic determinant)的性质、数目和空间构型所决定的。抗原决定簇能被免疫活性细胞所识别,能与相应抗体的Fab段结合。

在神经生物学中可作为抗原的物质有:①酶,如多巴胺 β 羟化酶、胆碱乙酰化酶等;②神经肽类;③膜性结构成分;④神经递质,如单胺类等;⑤类固醇。

抗体(antibody)是免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig),其基本结构由4条肽链对称排列组成,即两条相同的重链(heavy chain, 由440个氨基酸组成)和两条相同的轻链(light chain, 由214个氨基酸组成)。根据重链稳定区的分子结构和抗原特异性的不同,

可将免疫球蛋白分为5类：即 IgG、IgA、IgM、IgD 及 IgE。1963年 Porter 对 IgG 的化学结构提出了一个模式图，后经许多学者证实，其他几类 Ig 也具有与 IgG 相似的基本结构(图 1-1)。

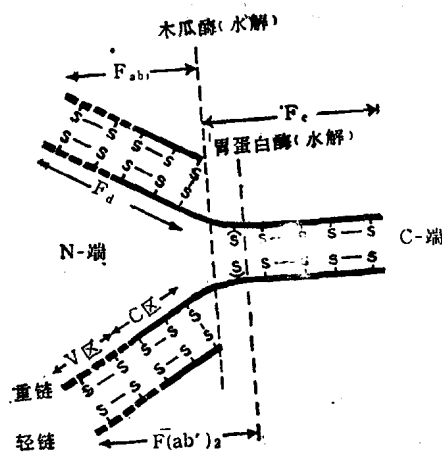


图 1-1 免疫球蛋白基本结构示意图

每条重链和轻链各有氨基端(N端)和羧基端(C端)。两条相同的重链借二硫键相互连接，呈“Y”形。两条相同的轻链分别借二硫键连接在重链N端的两侧。因此，Ig 都是对称性的大分子。在多肽链的N端，轻链的1/2与重链的1/4这一区域的氨基酸排列顺序随抗体特异性不同而有所变化，故称此区为可变区(variable region, V区)，它赋予抗体以特异性，能识别和结合抗原决定簇，抗原-抗体反应就在这里发生。在多肽链的C端，轻链的其余1/2及重链的3/4这个区域的氨基酸排列顺序比较稳定，故称为稳定区(constant region, C区)。

用木瓜酶(papain)可将 IgG 重链于219位氨基酸处切断，得到3个片段：两个相同的叫 Fab 段(fragment antigen binding, 抗原结合片段)，由一条完整的轻链和一条不完整的重链所组成。另一片段为 Fc 段(fragment crystalline, 可结晶片段)，由两条重链C端的一半组成。Fab 段是具有抗体活性的部分。Fc段容易结晶，不能与抗原结合，但具有各类 Ig 的抗原决定簇及 Ig 的其他生物学活性。应用胃蛋白酶(pepsin)水解，可将 IgG 重链间二硫键近羧基端切断，得到一个具有双价抗体活性的 F(ab')₂ 段，轻度水解后，使重链间的二硫键断裂，产生2个 Fab' 段。Fab' 段的免疫化学特性和功能与 Fab 段完全相同。

免疫球蛋白的功能区：Ig 的每条肽链内有链内二硫键把每条肽链连接成几个球形(或闭环)结构，每个球形结构代表不同的功能区(图 1-2A)——重链有VH、CH₁、CH₂、CH₃；轻链有VL及CL两个功能区。其中，VH和VL区内某些位置上的氨基酸残基的组成和排列次序特别容易变更，如在VH的第31—37, 51—68, 86—91和101—110四个部位；在VL的第25—35, 50—56, 89—91三个部位，称这些小区段为高变区。特异性抗原决定簇与Ig结合的位置就在Ig的高变区——V区球形顶端凹陷的立体结构。由于这种高变区中

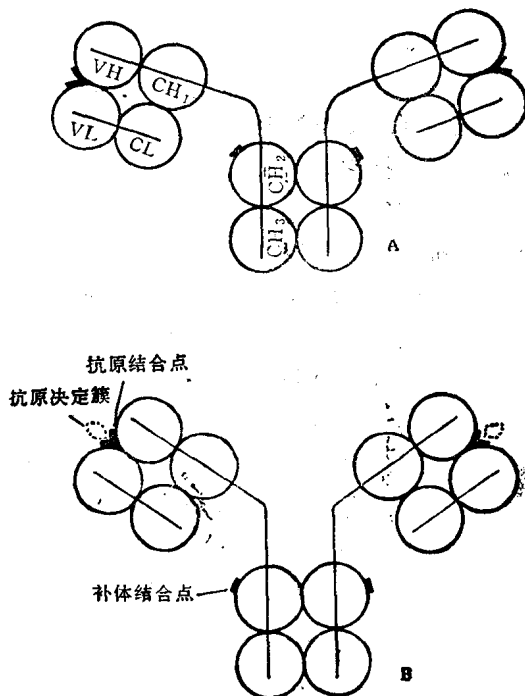


图 1-2 抗体分子的构型变化。
A. 未与抗原决定簇结合；B. 已与抗原决定簇结合，补体结合点暴露。

氨基酸侧链形成了一个连续的表面,提供了一个对抗原决定簇互补的结合部位(图1-2B)。于是每一种抗体就只能与其相应的抗原决定簇结合。电镜研究表明:未与抗原结合的IgG呈“T”形,与抗原结合后呈“Y”形。

免疫球蛋白普遍存在于血液、组织液及外分泌液中。它具有蛋白质的通性,不耐热,在60—70℃即被破坏;能被多种蛋白水解酶破坏,凡能使蛋白质凝固变性的物质均能破坏抗体活性;可被中性盐类沉淀,常用50%饱和硫酸铵或硫酸钠从免疫血清中提取抗体球蛋白。

第二节 抗体和抗血清的制备

一、抗原的选择和纯化

用作抗原的物质必须在进行免疫前加以选择和纯化。因为只有使用高质量的抗原才能产生高质量(特异性和效价)的抗血清。一般是用生化方法将抗原分子以高纯度自组织提取液中分离出来。如果使用粗组织提取液将产生对抗各种不同组织成分的异种抗血清(heterologous antisera)。除天然的纯组织提取液外,也可用人工合成的全分子或部分分子来制造特异性抗体。目前,许多神经组织的抗原物质已有商品出售(天然或人工合成产品),如神经肽类中的P物质、脑啡肽、生长抑素、后叶加压素、血管活性肠多肽、催产素、促黄体激素释放激素和单胺类的5-羟色胺以及神经递质的合成酶多巴胺- β -羟化酶和谷氨酸脱羧酶等,故一般不需要各实验室自己制造抗原。

二、免疫技术

1. 偶联(coupling)

在神经生物学中用于免疫细胞化学的抗体主要是对抗小分子物质的,因此,这些小分子半抗原(分子量小于5000)在免疫动物前必须偶联(或结合)到大分子的载体(蛋白质)上去,成为完全抗原,以增大分子量,刺激抗体形成,且较稳定,能在机体内存留较长时间。

偶联方法:常用较大的蛋白质分子,如白蛋白、甲状腺球蛋白、血蓝蛋白(hemocyanin)等借碳二亚胺(carbodiimide)或戊二醛(glutaraldehyde)偶联到半抗原上。Forssmann等^[2]推荐的偶联方法如下:

2mg 神经肽溶于0.5ml 0.05mol/L 磷酸钠缓冲液中

8mg 牛血清白蛋白溶于1ml 0.05mol/L 磷酸钠缓冲液中

50mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺溶于0.5ml 0.05mol/L 磷酸钠缓冲液中
将上述三种溶液充分混合搅拌1小时,然后对0.05mol/L 磷酸钠缓冲液透析(pH7.4, 24小时)。

2. 佐剂(adjuvant)

抗原和佐剂一起注射,能刺激更多的抗体形成,延长持续时间。常用的福氏(Freund)佐剂的配方为:①200mg 死结核杆菌(可用卡介苗),加入优质液体石蜡85ml,充分磨匀;②加入羊毛脂(用前在56℃温箱中融化)15ml,再充分研磨。以上为完全佐剂,若只用液体石蜡和羊毛脂则为不完全佐剂。

将等量的福氏完全佐剂和抗原液体用注射器充分混匀,使成乳状液,即可用于免疫注

射。

3. 制备高效价免疫血清

选择成年、健康、雄性的纯种动物较好,常用家兔和山羊,因动物反应良好,而且能提供足够数量的血清。也有人用小鼠,因可进行大量观察,取材方便。所用抗原(或半抗原)剂量决定于动物种类、抗原类型、免疫周期和所要求的抗体特异性。抗原性强的抗原量应小,过大反会引起免疫抑制。免疫周期长者可少量多次,短者应大量少次。在家兔总量为每公斤体重0.5—1mg(例如制造多巴胺- β -羟化酶抗血清),分次注射,间隔1—2周,第二次以后为加强免疫,用不完全福氏佐剂与抗原溶液混合注射。可采用皮下、皮内、肌肉、淋巴结或静脉注射,常用皮下多点注射。一般同时免疫几个动物,以便选择和比较。间断注射约7—10次,其间采血分离血清,测定抗体效价,决定终止免疫。测定抗体效价可用琼脂双向扩散法、环状沉淀试验、放射免疫分析或免疫细胞化学等方法。用环状沉淀试验效价在1:4 000以上,用琼脂双向扩散法测定效价在1:32以上即可采血,取血清进一步提纯。

4. 免疫球蛋白的提纯

免疫球蛋白含于免疫血清中,为得到较纯的抗体,必须加以提纯。

1) 柱层析法。是将硫酸铵盐析与 DEAE(diethyl aminoethyl, 二乙氨基乙基)纤维素柱层析结合起来的提取法。即利用各种血清蛋白在不同浓度的硫酸铵溶液中的溶解度不同,先用50%硫酸铵溶液溶解白蛋白,离心后弃去含白蛋白的上清液,再用33%硫酸铵溶液使球蛋白沉淀,将沉淀的球蛋白溶解于生理盐水中→对0.0175mol/L磷酸缓冲液透析→过分子筛Sephadex(葡聚糖凝胶)G50除盐→DEAE纤维素柱层析→收集、浓缩、测蛋白质含量(需达20mg/ml以上),备用。

上述过程中,Sephadex是由高分子化合物葡聚糖和环氧氯丙烷以醚桥相互交联的立体网状结构。吸水后体积膨胀,网眼张开。当含有大小不同的分子的溶液通过时,大分子被排阻于凝胶外,小分子则渗入网眼中。加入洗脱液后,溶液向下推移,最先流出的洗脱液中含有最大分子物质,最后流出液中最小分子物质,从而起到“分子筛”的作用,达到分离和提纯的目的。DEAE纤维素是将二乙氨基乙基结合在纤维素上而成,使纤维素颗粒带正电荷,当带负电荷的免疫球蛋白的酸性基团与其相遇时,就产生静电吸附。由于各种蛋白质的电荷量不同、等电点的差异以及分子大小的区别,它们与DEAE纤维素结合的强度不同,故可用一定浓度和酸碱度的缓冲液进行洗脱,将各种蛋白质分开、提纯。

2) 亲和层析法(affinity chromatography)^[3,4]。是近年来发展起来的特异性吸附层析技术。其基本原理是根据抗原和抗体可特异性地结合这一特性,首先将抗原(或抗体)用化学方法偶联到固相载体上,使之成为不溶性结构,再经层析法吸附液相中的相应抗体(或抗原),使结合成抗原-抗体复合物,然后再改变条件,使抗原-抗体复合物解离,洗脱出纯化的抗体(或抗原)。

常用的载体为琼脂糖凝胶珠(Sepharose),将它在pH11的条件下加入溴化氰(CN-Br),使其活化,然后在稍碱(pH9.0)条件下引入抗体,使琼脂糖珠和抗体之间形成肽键而固相化。过柱吸附的抗原浓度为1—2%,解吸附用0.2mol/L甘氨酸-HCl缓冲液(pH2.8),洗脱用0.01mol/L磷酸缓冲液。

亲和层析法有很多优点,利用解吸附法可获得极纯的抗体(或抗原)。

5. 单克隆抗体(monoclonal antibodies)

单克隆抗体技术是1975年英国 Köhler 和 Milstein 发明的一种新技术^[5-7]。其原理是将体外培养的骨髓瘤细胞与免疫的脾细胞相融合，产生杂交细胞。这种融合的杂交细胞系既有骨髓瘤细胞无限生长的能力，又有浆细胞合成单一抗体的能力。这种免疫细胞通过纯化，成为单克隆系（单一纯化的无性繁殖细胞系），就能产生大量专一的高纯度抗体，即单克隆抗体。具体步骤（图 1-3）是：

1) 动物选择。选择纯系BALB/c小鼠作为接种骨髓瘤细胞和进行免疫的动物。

2) 细胞制备。将经抗原免疫的小鼠处死，在无菌条件下取出脾脏，在缓冲的盐溶液——GKN 液中剪碎，吸取组织悬液入离心管，用吸管吹吸数次使组织悬液中的细胞分散，再经离心处理，除去上清液。然后将悬于 GKN 液中的 3×10^7 脾细胞 (3ml) 和 5×10^7 (5ml) 骨髓瘤细胞混合于 50ml 的锥底离心管中，加满缓冲液于 200g 离心 10 分钟，吸净上清液。

3) 细胞融合。在 1 分钟内逐滴加入 50% PEG 0.5ml，边加边摇动，静置 90 秒钟，再于 5 分钟内加入 5—10ml GKN 液，终止 PEG 的作用。

4) 选择性培养。静置 10 分钟，用吸管吹吸，使细胞团块分散后，用加有饲养细胞的 HAT 培养液，进行杂交瘤细胞的选择性培养。

5) 检测抗体，筛选杂交瘤细胞。通过选择性培养而获得的杂交细胞系中，仅少数能产生特异性抗体，故需检测培养液中的抗体，筛选出阳性孔或阳性细胞群落，进行克隆化培养。

6) 克隆化、扩大培养。克隆 (clone) 系指由一个细胞增殖而成的一群细胞。克隆化就是将单个阳性杂交瘤细胞分离出来再进行培养，使其成为单一纯化的无性繁殖细胞系。这种克隆化培养常需反复进行。所用方法以软琼脂平板和有限稀释法较为常用。杂交细胞克隆培养成功后，可再将细胞加以稀释，扩大培养并加以冰冻保存。

7) 单克隆抗体的大量制备、分离、纯化及鉴定。将杂交瘤的单克隆细胞接种于同系小鼠，可形成“杂交细胞瘤”，该动物的腹水及血清中就含有大量单克隆抗体。单克隆抗体的分离和纯化与一般体液抗体一样，即用硫酸铵沉淀、透析、DEAE 纤维素柱层析。腹水

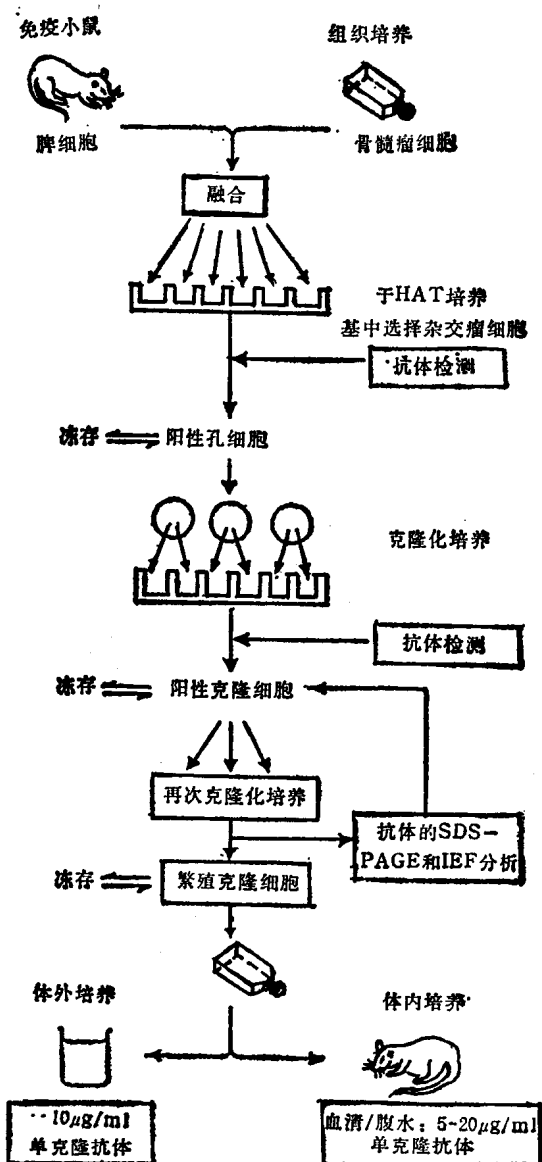


图 1-3 单克隆抗体制备实验流程示意图

则需先经高速离心和充分稀释,使成不太粘稠的清液后,再作沉淀处理。

8) 单克隆抗体的贮存。含单克隆抗体的血清或腹水,可分装成小剂量,最好于一70℃冻存,一20℃冻存也可维持较短时期。切忌反复融冻。在抗血清中加1%叠氮钠可于4℃保存几个月。

在上述单克隆抗体制备过程中需加说明的是:

1) GNK液的成分为 NaCl 8g, KCl 0.4g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.77g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.69g, Glucose 2g, Phenol Red(酚红)0.01g,加水至1000ml, pH7.2,在115℃高压灭菌15分钟,贮于室温。

2) 细胞融合杂交的全过程要在 RPMI-1640 培养液或 DMEM 培养液 (Dulbeccos modified Eagle's medium) 中加入胎牛血清,细胞才能生长良好。

3) PEG(polyethylene glycols,聚乙二醇)为促融剂,以分子量1000,浓度为40—50%效果最好。至于融合的机理,尚未完全明瞭。可能由于胞浆膜的融合形成两个或更多细胞核的异核体,进一步分裂,细胞核融合,形成杂交细胞。

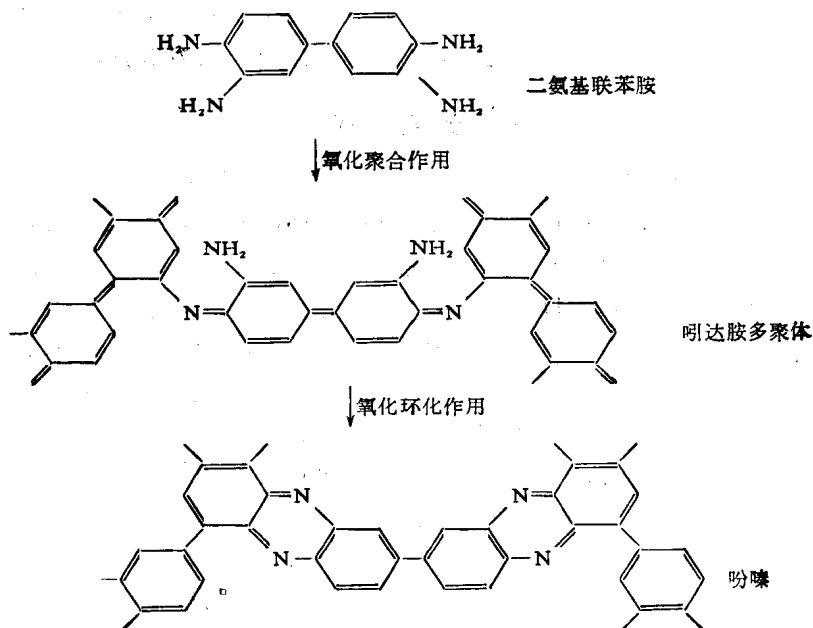
4) HAT 培养液是含有次黄嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶核苷(thymidin)的培养液。是一种选择性培养液。在融合杂交过程中,部分骨髓瘤细胞与部分脾细胞融合;也有部分骨髓瘤细胞与骨髓瘤细胞、脾细胞与脾细胞彼此互相融合;还有一些没有融合的骨髓瘤细胞和脾细胞。怎样控制条件只让杂交瘤细胞生长而其他细胞不继续生长甚至死亡呢?这就需要 HAT 培养液。因为叶酸类似物氨基蝶呤抑制叶酸还原为二氢叶酸和四氢叶酸,从而阻断了 DNA 合成的主要途径。而骨髓瘤细胞又缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)和胸腺嘧啶核苷激酶(TK),使 DNA 合成的补偿途径也不能进行。故未与脾细胞融合的骨髓瘤细胞在含有 HAT 的培养液中不能生存而死亡。未与骨髓瘤细胞融合的脾细胞是不适于在体外组织培养中生长的,故也将死亡。但这种脾细胞具有 HGPRT,它与骨髓瘤细胞融合后,使杂交瘤细胞既具有骨髓瘤细胞赋予的高度增殖能力,又具有脾细胞赋予的 HGPRT,从而能在 HAT 培养液中无限制地生长繁殖,达到选择性培养的目的。

5) 在细胞融合杂交过程中,单个或少数分散的细胞多不易存活,通常需要加入其他活细胞,即“饲养细胞”。常用的饲养细胞为小鼠腹腔巨噬细胞,后者在组织培养中并不繁殖。

由于单克隆抗体只与抗原分子上的一个决定簇结合,因此,与一般的多克隆抗体相比,有特异性高、专一性强的突出优点,从根本上解决了抗体特异性的问题。而且,杂交细胞瘤稳定,可产生一系列高产量的特异性抗体。还可用于寻找、探查和提纯高特异性抗原物质等。虽然由于单克隆抗体的高度专一性(只与一个抗原决定簇结合)而具有灵敏度不够高的缺点,但仍不失为一种最有力的免疫实验手段,在基础理论和临床实践的研究中有广泛的应用,它是生物医学中的一项重大突破。目前,已将单克隆抗体技术用于神经肽类(如P物质)和神经递质(如乙酰胆碱的合成酶胆碱乙酰化酶)等的研究。

第三节 免疫细胞化学方法

免疫细胞化学是用细胞化学的方法将组织中的抗原-抗体免疫反应显示出来的技



聚体^[10]。由于 HRP 是结合在抗体上的,因而可通过 DAB 的反应沉淀来定位抗原-抗体反应。酶标记抗体法也有直接、间接两种。此法的主要优点是反应产物能长期保存,并适于作电镜观察,但其灵敏度并不比免疫荧光法高。

在酶标记抗体法中,必须制备酶标记抗体。即使用一定的交联剂(常用戊二醛)将 HRP 与 IgG 结合起来。一般用戊二醛二步法较好^[11],就是先使 HRP 分子与戊二醛分子中的一个醛基结合,戊二醛的另一个醛基再与 IgG 分子的氨基相结合而形成酶标记抗体。具体步骤如下:

- 1) 配备少量含 1.25% 戊二醛的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.8)。
- 2) 将 HRP 溶入上述含戊二醛的磷酸盐缓冲液中(50mg/ml),置于室温反应 18 小时。
- 3) 过 Sephadex G-25 凝胶层析柱,收集。
- 4) 将收集液用超滤膜浓缩到 1ml,或装入透析袋,在冰箱内(4℃)用蔗糖浓缩到 1ml。
- 5) 以生理盐水配备 IgG 溶液(5mg/ml)。
- 6) 在 1ml 浓缩液中加入 1ml IgG 溶液。
- 7) 再加入 0.1ml 1mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.5),置冰箱(4℃)一昼夜。
- 8) 反应完毕,加入 0.1ml 0.2mol/L 甘氨酸溶液,置于室温 2 小时,封闭酶醛结合物和标记抗体上可能存在的醛基。
- 9) 边搅拌边滴加等体积 100% 饱和硫酸铵溶液,置于冰箱(4℃)半小时。
- 10) 离心(4 000 转/分) 15 分钟,弃上清液。
- 11) 用 50% 饱和硫酸铵液洗涤沉淀 2 次。
- 12) 用 0.5ml 0.02mol/L PBS(pH7.4) 溶解沉淀。