

免疫学实验技术汇编

R371-33

W W

66846

免疫学实验技术汇编收集了我院近年来在科研工作中采用的部分实验方法，包括细胞免疫技术 18 篇，体液免疫技术 23 篇，共 41 篇约 73000 字。内容较广，方法具体，并简要说明了方法的原理与注意事项。可供生物学，免疫学与医学工作者参考。

C0153430



编 审 吴 蔚

周 佳 敏

苏 新

刘 静 仪

李 成 文

前

言

我院从事免疫学和应用免疫学方法的单位不少，但相互间研究情况不甚了解。往往同一方法在院内一个单位已建成而其他单位还不知道，不能借鉴，造成了人力和时间的浪费。因而有编写一本精炼和实用的方法学的必要。这个汇编不求方法齐全，而以我们过去建立，现在仍在应用的方法学为主。这一建议得到院和科技部领导的支持和从事免疫学同志的支援，参加编写的有42位同志，执笔人有23位。五所李成文、周佳敏同志做了大量的组织和编辑工作。

在编写过程中我们注意到方法的实用性，即按照每一方法操作都应得到结果，其次我们也强调，由原来建立此方法的同志执笔，如该同志不属免疫组，则由学习该方法的同志执笔后请原建立方法同志审阅。方法的原始文献也尽量列出，以便查阅。

由于水平所限和时间仓促，错误难免。我们衷心希望同行的批评和指正，如有更好的方法提供则我们竭诚欢迎。我们的想法是每二三年能增编一次，推陈出新，使这本汇编能为免疫学工作者服务，这是我们的愿望，也是我们今后努力的方向。

吴

蔚

一九八二年八月六日

	页
1. 外周血淋巴细胞分离	1
2. 人外周血 T、B 淋巴细胞分离—尼龙棉分离法	3
3. 用 E 玫瑰花形成试验分离人 T 淋巴细胞	9
4. 抗小鼠 T 淋巴细胞抗体的制备	12
5. 小鼠 T 淋巴细胞的分离和纯化	16
6. 微量补体依赖淋巴细胞毒试验	21
7. 外周血淋巴细胞酸性脂酶 (ANAE) 染色测定法	24
8. 混合细胞培养法	28
9. 豚鼠 E 玫瑰花形成试验	33
10. 溶血空斑试验检测抗体形成细胞	36
11. 用 QHS 法测定抗体形成试验	40
12. 小鼠胸腺摘除手术	42
13. 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能测定法—滴片法	45
14. 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬杀菌功能检查法	47
15. 小鼠腹腔巨噬细胞的纯化	50
16. 豚鼠皮肤发泡及泡液中巨噬细胞功能检查法	55
17. 豚鼠和小鼠淋巴细胞转化试验	56
18. 用抗体致敏的金黄色葡萄球菌 Cowan I 株鉴定 B 淋巴细胞	62

19. 兔血清 IgG 的简便快速纯化法	65
20. 人 IgG 重、轻链的制备技术	67
21. 胃酶水解免疫球蛋白 G 提取 F (aD) ₂ 法	70
22. 人血清 IgM 的提取	72
23. 人血清 IgM μ 链的提取	77
24. 人血清 IgE 的亲合层析提取	80
25. 微量快速考马斯亮兰蛋白质定量法	83
26. 逆单相琼脂凝胶扩散抗体定量法	86
27. 人血清 IgE 的放射免疫单扩散定量法	90
28. 用间接红血球凝集试验析测小鼠抗体反应功能	97
29. 薄层聚丙烯酰胺凝胶分析聚焦电泳	101
30. 分析等电点聚焦电泳——蛋白质等电点的测定	105
31. 聚丙烯酰胺凝胶电泳的快速染色法	107
32. SDS —聚丙烯酰胺凝胶电泳与蛋白质的分子量的测定	112
33. 荧光抗体的制备技术	118
34. 异硫氰酸四乙基罗丹明荧光素的标记	125
35. 辣根过氧化物酶标记抗体及免疫组织化学染色技术	127
36. 应用微量酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测腺病毒抗体或抗原	132
37. 聚丙烯酰胺凝胶珠免疫吸附剂制备技术	137
38. ConA — Sepharose 亲和层析法	141

32AH—Sephacrose 4B 亲合层析柱的制备	144
40 亲合层析技术	145
41 超过滤技术及其应用	150

1. 外周血淋巴细胞分离

分离淋巴细胞的方法很多，常用的方法如下：

一、低速离心或静止分离：37℃静止一小时或100g，离心10分钟。所获得的淋巴细胞活性较好但回收率低。纯度差。

二、3%明胶沉降：以15℃为宜，回收率和纯度不易控制。

三、用6%高分子右旋糖酐（分子量70,000）沉降：全血用右旋糖酐稀释一倍或两倍，在37℃条件下沉降一小时。必要时再重复一次。回收率50~70%，纯度为60~70%。

四、密度梯度离心：

原理：根据细胞悬液中各种成份的比重不同，采用不同密度梯度分层液分离细胞，使一定比重的细胞成份按相应密度梯度分布。回收率80~90%，纯度90%。

$$\text{沉降速度} = \frac{2 r^2 (Q - Q_0) g}{9 \eta}$$

式中： r = 颗粒半径； Q = 颗粒比重； Q_0 = 溶液比重； g = 离心力； η = 溶液的绝对粘度； k = 形状因子；即颗粒的摩擦系数与其同容积的球形颗粒摩擦系数的比值。

步骤：

一、取淋巴细胞分层液（比重1.077）1.5~2.0毫
~1~

升置于容积10毫升试管中。

二、肝素抗凝的全血加2倍体积Hank液混匀。

三、用滴管将稀释后的全血轻轻地铺于淋巴细胞分层液介面上。

血液和分层液的比例为1:1,勿使界面破坏。

四、离心分层:3000 rpm·20分钟。

五、小心除去上清,吸出白细胞层的细胞(主要是淋巴细胞)用Hank液清洗3次,第1、2次清洗时1500 rpm·离心10分钟,第3次1000 rpm·离心10分钟。

六、重新悬浮细胞,计数并调整细胞浓度为 2×10^6 /毫升。

七、细胞活力测定:取计数后的细胞悬液2滴加1%台盼兰1滴,混匀置37℃温箱作用10分钟,轻轻吸弃上清,取沉淀的细胞置于玻璃片上,用显微镜检查。活细胞不着色,损伤细胞呈灰兰色。

孔 繁 华

2. 人外周血 T · B 淋巴细胞分离 (尼龙毛分离法)

原理：尼龙毛即聚乙酰胺纤维，由于 B 淋巴细胞和单核细胞表面膜结构的特征，易与尼龙毛产生亲和粘附现象，不易被溶液冲下。利用这一特征，可将 T 淋巴细胞与 B 淋巴细胞分开。

器材和试剂：

一、尼龙毛

二、聚乙烯塑料柱 (直径 6 毫升，长 16 厘米)

三、RPMI-1640 培养液，灭活的小牛血清

四、淋巴细胞分离液 (比重 1.077) 上海市化学试剂二厂生产

五、肝 素

六、Hanks 液 (PH 6.8 ~ 7.4)

实验方法：

一、新鲜肝素抗凝的全血分离淋巴细胞：方法同外周血淋巴细胞分离。

二、将上述分离的淋巴细胞，加 20% 小牛血清 - RPMI 1640 培养液至 0.5 毫升，待上柱。

三、取保存于冰箱冻结器中的尼龙柱，室温中溶化后，从斜角封口处剪去 1 毫米左右的开口 (流速为 2 毫升/8 ~ 10 秒)。再以 37℃ 予温的 20% 小牛血清 - 1640 培养液 5 毫升冲洗尼龙柱。将上述的 0.5 毫升的细胞悬液加入柱中，立即平放，(不能使细胞

悬液流出)，再加0.2~0.3毫升培养液于尼龙柱中的尼龙毛上，作为封口（防止细胞悬液干涸）。置37℃温箱培养45分钟（20分钟将柱翻转一次）。

四、取出尼龙柱，以予温培养液5毫升冲洗柱，收集未粘附的T淋巴细胞。再用10~15毫升培养液洗柱，弃去冲洗液，然后捏住斜口加入培养液，以拇指和食指轻轻挤压塑料管，挤出B细胞，不断加入培养液至5毫升，然后捏住斜口，用滴管推紧尼龙毛，挤出并装入5毫升B细胞中。

五、离心T、B两管淋巴细胞悬液，去上清，沉淀T、B细胞计数。把细胞配成 2.0×10^6 /毫升，待用。

六、注意事项：

(一)淋巴细胞需从新鲜的外周血中分离。

(二)为了提高淋巴细胞分离液回收率，应尽量避免红细胞混入。

(三)制做的尼龙柱要松紧适当，均匀和连续性，无气泡。

(四)加入柱上的细胞要布满尼龙毛。

(五)T细胞收集后，再用20%小牛血清-1640培养液冲柱要多冲些时间，以提高B细胞纯度。

(六)捏下B细胞的手法要适当，柔软而快速，不宜过重。以免B细胞破损和单核细胞也被捏下。

(七)溶液的PH不宜过碱，应在6.8~7.0之间。

(八)温度：室温在18~20℃左右为宜。

七、评 价：

(一)此方法比较快速、简便。

(二)能分离出比较纯的 T、B 淋巴细胞。细胞纯度在 90% 以上。

(三) T、B 淋巴细胞无损伤，活性 T 为 98% 以上，B 为 95% 以上。

(四)适用于大量 T、B 淋巴细胞分离。

(五)可加凝血酶或脱纤维法除血小板。

试剂的配制：

一、尼龙毛柱制备法：

取塑料管（半透明聚乙烯塑料管，长 12~14 厘米，直径 0.6 厘米）用烘热之火钳封一斜角（45℃）。称取尼龙棉 80~100% 尽力提松，使其松散均匀，放入盛有 PH 7.0 的 Hank's 液的平皿中浸透，用眼科镊子或细长滴管连续地将尼龙毛填进塑料管（勿产生气泡），柱高 6 厘米，加满溶液放冰箱冻结器中保存，每柱可过滤 $30 \sim 50 \times 10^6$ 毫升淋巴细胞。

二、Hank's 液配制：

(一)甲 液：

NaCl	80克	溶于400毫升双蒸水中	混合后加双蒸水至500毫升加氯仿1毫升防腐
KCl	4克		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1克		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1克		
CaCl ₂ (单溶)	1.4克	溶于50毫升双蒸水中	

~ 5 ~

(二)乙 液：

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.5克	溶于400毫升 双蒸水中	混合后加双蒸 至500毫升 仿1毫升防
KH_2PO_4	0.6克		
葡萄糖	10.0克		
0.4%酚红溶液50毫升			

(三)Hank's工作液

甲 液 10毫升

乙 液 10毫升

双蒸水 180毫升

(四)配制后分装250毫升/瓶，8磅20分钟灭菌冰箱保存备用

(五)临用前，用灭菌的60% NaHCO_3 溶液调至所需PH。

三、淋巴细胞分层液：上海试剂二厂生产，比重当温度在20℃
为1.077。

分层液的配制方法：

9%聚蔗糖：称聚蔗糖8.1克+双蒸水90毫升搅拌至全溶。

33.9%泛影葡胺：60%泛影葡胺20毫升+双蒸水15.8
毫升混匀。

分离液：溶液a 9%聚蔗糖 84毫升

溶液b 33.9%泛影葡胺 35毫升

称比重：约在1.070~1.080克

G。滤器过滤或8磅15分钟灭菌，肉汤内培养三天，如无菌，

4℃冰箱备用。

分离液制备时的计算公式：

$$V_b = \frac{V_a (Cl_a - Cl_x)}{Cl_x - Cl_b}$$

V_a : 溶液 a 体积

Cl_a : 溶液 a 密度

Cl_b : 溶液 b 密度

Cl_x : 要求密度 (分离液)

V_b : 溶液 b 体积

20% 小牛血清—1640 培养液：

RPMI 1640 粉 (进口) 800 毫克

双蒸水 76 毫升

再加灭活小牛血清 15-20 毫升

* * * * *

参 考 文 献

一、上海市中心血站 HLA 分型实验室，微量淋巴细胞毒试验及其反应，中华血液学杂志(2)1:48, 1981。

二、Terasek P I and Modelland J D:

Nature 204/4962:998-1000 1964。

~7~

三、Perclue S, Teresaki P I 等 : Tissue
Antigens 9(5): 259—266 1977

四、李正道博士讲学资料: HLA 测定, 四川医学院袁必文、
周鸣生整理: 1981年5月。

孔 繁 华

3、用E玫瑰花结形成试验分离人T淋巴细胞的方法

原理：

根据人T和B两种淋巴细胞的特点不同，用E玫瑰花结沉淀法来分离T淋巴细胞。因T淋巴细胞膜表面有绵羊红细胞受体，能与绵羊红细胞结合形成玫瑰花结，而B细胞缺乏这种受体。当E玫瑰花结形成后，用梯度离心的方法，使E玫瑰花结形成细胞沉于管底，未形成E玫瑰花结细胞则悬浮于细胞稀释液和分离液的界面，收集此界面上的细胞，通过处理使其表面吸附的羊红细胞解离或溶解，从而获得纯度较高的T淋巴细胞。

器材与试剂：

一、细胞分离液：比重 1.077 ，见人外周血T、B淋巴细胞分离。

二、无钙镁Hanks液(PH $7.2-7.4$)；按常规方法配制，但不加 $MgSO_4$ ， $MgCl_2$ 及 $CaCl_2$ ，临用前 5.6% $NaHCO_3$ 调整 $7.2-7.4$ 。

三、 0.83% Tris- NN_4Cl 液：见“抗小鼠T淋巴细胞抗体的制备”。

四、 0.8% 戊二醛固定液： 25% 戊二醛用PH 7.2 PBS稀释。

五、 2% 绵羊红细胞(SRBC)的制备

抽取绵羊颈脉血，置于 $3-4$ 倍量的阿氏液中，于 $4^\circ C$ 冰箱贮存，

限用2周。临用前以无钙镁Hanks液洗涤3次，每次1000rpm分钟，然后按红细胞的压积的体积配成2%浓度的SRBC悬液。

方法与步骤：

一、未稍血淋巴细胞的分离

取正常人肝素抗凝血用Hanks液以1:3稀释后，混匀，用滴管慢慢沿试管壁加到预先放置的比重为1.077克/毫升的聚蔗糖-泛影葡胺细胞分离液上（血样：分离液为1:1.5），然后在室温下400g离心20分钟吸出血细胞稀释液与分离液之间界面上的淋巴细胞，用无钙、镁的Hanks液洗三次备用。

二、T和B淋巴细胞分离

取上述淋巴细胞悬液，按1:50的比例加入绵羊红细胞（淋巴细胞：绵羊红细胞=1:50），摇匀于37℃水温箱中保温10分钟后，取出离心（200g，5分钟），放入4℃冰箱2小时，使形成玫瑰花结。然后将此形成玫瑰花结的细胞，用适量的Hanks液稀释后，再将其加到含有聚蔗糖-泛影葡胺细胞分离液的试管中进行第二次分离，离心速度和时间同前，离心后取出沉在试管底部玫瑰花结形成细胞，用Hanks液洗三次。然后用等量的0.8% Tris-NH₄Cl液混匀，在37℃下孵育5分钟，将淋巴细胞表面附着的绵羊红细胞溶解，再用Hanks液洗三次，得到沉于管底的细胞液，即为分离后的T淋巴细胞。

最后分别测定分离后 T 淋巴细胞的纯度，活性和回收率。

结果判断：

按本法分离所得到的 T 淋巴细胞纯度为 $94 \pm 4\%$ ，B 细胞混入率仅为 1%。

此外，在本 测定 30 例正常人末稍血的结果中，有 17 例（约占总数的 57%）分离后的 T 淋巴细胞纯度在 96% 以上。

主要参考文献

1. Boyum A: *Scand J Clin Lab Invest*,

Supp 21: 97 1968

2307 医院实验室：《肿瘤防治研究》 1: 19 1978

李 春 海 牟 小 威