



简明

免疫学技术

朱正美 刘辉 主编



科学出版社

www.sciencep.com

简明免疫学技术

朱正美 刘 辉 主编

本书由

大连市人民政府
大连医科大学 资助出版

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书共分7篇,第1~3篇主要介绍人体获得性免疫的常用实验检测技术;第4、5两篇介绍了人类白细胞抗原的实验检测和获得性免疫调节剂的筛选方法;第6篇介绍部分糖生物学研究中应用的免疫实验方法。上述各类实验中除介绍实验所用仪器、药品或试剂及操作方法外,还介绍了与实验有关的经验、部分试剂的来源,为临床检验和基础医学研究工作提供了很大方便;第7篇专门介绍了有关常用免疫学实验的质量控制和数据处理方法。附录中详细介绍了缓冲液、免疫酶反应底物、培养液、血清及添加物的成分和配制方法、蛋白质定量的实验方法及各种检测法的比较,还有主要免疫试剂供应商的网站目录。

全书简明实用,查询方便,是临床检验人员和基础医学教学及研究人员必备的一本教科书和工具书。

图书在版编目(CIP)数据

简明免疫学技术/朱正美,刘 辉主编.-北京:科学出版社,
2002.7

ISBN 7-03-009799-8

I. 简… II. ①朱… ②刘… III. 医药学-免疫技术 IV. R392.33

中国版本图书馆CIP数据核字(2001)第073334号

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>

新 蕾 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年7月第一版 开本:787×1092 1/16

2002年7月第一次印刷 印张:18 1/2

印数:1-4 000 字数:418 000

定价:29.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换(北燕))

《简明免疫学技术》编写人员

主 编 朱正美 刘 辉

副主编 燕 秋 杜昱光

编 委 (按姓氏笔画为序)

刘启贵 刘 辉 朱正美 张卓然

杜怀东 杜昱光 夏 泉 袁 宏

黄 敏 程桂芝 葛常辉 燕 秋

前 言

目前免疫学呈现向多学科渗透的发展趋势。许多学科也都试图采用免疫学的理论和技术来深入研究本学科的问题。特别是免疫学技术具有的特异性 and 高效性特点, 深受各学科研究者的重视, 被广泛采用。由于免疫学技术发展迅速、种类繁多, 非免疫专业的实验室常难以在较短的时间内找到切合实际、有可操作性的免疫学方法, 为此, 我们经常接到有关的咨询, 在我们自己的实验工作中也常有类似的需要。由此, 我们萌生编写一本供非免疫学专业人员需要的简明免疫学技术的想法, 这想法得到了科学出版社的支持, 促成了我们愿望的实现。

免疫学技术分为对体内免疫物质的检测和对体外抗原物质的检测两大类。前者又包括体液免疫检测与细胞免疫检测技术。本书系统介绍上述各类方法, 同时选择介绍相关的基础技术, 如有关抗原纯化、抗体制备方法及细胞培养技术等。本书编写力求文字简明和可操作性强, 从实用和需要出发。尽量避免庞杂的理论叙述和过多的专业方法评述。为此, 先强调介绍两个概念:

1. 抗原: 是刺激机体产生免疫反应的物质, 其分子量一般应在 10ku 以上, 如蛋白质、多糖等。有的分子量在 0.3ku 左右的小分子物质经过适当处理也可作为抗原, 称为半抗原。这里要说明的是, 要符合抗原条件的物质才有可能建立免疫学方法进行检测。

2. 抗体: 是能与抗原结合的球蛋白。这种结合是特异性的, 或可说是“一对一的”。一般认为这种特异性反应的特异程度优于核苷酸探针技术。

本书在技术的选择上强调介绍公认成熟的技术, 对于已有成熟技术可替代的经典方法则不做介绍。对于尚未广泛采用或有争论的新技术也未收录。本书实际上是在大连医科大学免疫学教研室和生物化学教研室的有关免疫学技术常规的基础上编辑、整理而成的。因此, 所录技术大多经过实践验证, 同时也介绍了有关经验和有关试剂供应来源, 为开展相应方法提供方便。考虑到由此可能产生的一定的局限性, 为此, 我们提供必要的参考文献, 以补充上述不足。两个教研室的博士生和硕士生编写本书的过程中做了大量工作并参加了有关章节的编写, 在每项技术后均有具体署名, 读者可直接咨询。在此, 我们诚恳希望读者在应用中提出意见, 使本书发展完善。

编 者

2002 年 3 月于大连

目 录

前言

第 1 篇 细胞免疫技术

第 1 章 细胞分离及分型	3
第 1 节 外周血单个核细胞的分离.....	3
第 2 节 B 细胞分离.....	5
第 3 节 T 细胞分离.....	7
第 4 节 自然杀伤细胞的制备.....	8
第 5 节 单核细胞的分离.....	10
第 6 节 人表皮朗汉斯细胞的分离.....	12
第 7 节 多形核白细胞的分离.....	15
第 8 节 流式细胞仪分型技术.....	17
第 2 章 细胞的体外制备	20
第 1 节 树突状细胞的体外制备.....	20
第 2 节 LAK 细胞的培养.....	21
第 3 节 TIL 细胞的培养.....	23
第 4 节 T 细胞克隆的制备.....	24
第 5 节 人 NK 细胞克隆的制备.....	27
第 3 章 细胞增殖测定	30
第 1 节 [³ H]-脱氧胸苷掺入检测法.....	30
第 2 节 MTT 比色法.....	32
第 4 章 细胞毒作用的测定	35
第 1 节 补体依赖的细胞介导的细胞毒作用.....	35
第 2 节 细胞介导的细胞毒作用.....	37
第 5 章 细胞凋亡分析	40
第 1 节 细胞凋亡形态学分析.....	40
第 2 节 细胞凋亡生化指标观察.....	45
第 3 节 流式细胞仪法.....	47
第 6 章 细胞激活的有关实验	52
第 1 节 钙流测定.....	52
第 2 节 蛋白质酪氨酸残基的磷酸化检测.....	55
第 3 节 超氧化物释放的测定.....	58

第4节	炎症介质释放试验	59
第5节	TNF α 的检测(生物学检测法)	61
第6节	IL-2的检测(生物学检测法)	62
第7节	细胞因子 mRNA 的检测	64
第8节	促细胞分裂剂激活单个核细胞	67
第7章	细胞培养的一般技术	70
第1节	细胞株的传代培养	70
第2节	支持物培养法培养贴壁细胞	74
第3节	细胞培养污染的检测与去除	75

第2篇 免疫化学技术

第8章	抗血清制备	87
第1节	抗原纯化及制备的基本方法	87
第2节	动物免疫方案	100
第3节	免疫动物的采血与血清制备	102
第9章	单克隆抗体的制备	107
第1节	概述	107
第2节	用于鼠细胞融合的配对细胞的培养和选择	110
第3节	通过细胞融合得到 B 细胞杂交瘤	112
第4节	阳性杂交瘤克隆的筛选及通过有限性稀释法再克隆	114
第5节	通过 EBV 制备人单克隆抗体	117
第6节	体外细胞免疫	119
第7节	实验室规模的抗体制备	121
第8节	单克隆抗体的纯化	124
第10章	抗体的纯化	127
第1节	硫酸铵沉淀法	127
第2节	DEAE 离子交换层析法	129
第3节	羟磷灰石层析纯化抗体	131
第4节	抗体的辛酸纯化法	133
第5节	Sephadex 凝胶过滤纯化抗体	134
第6节	免疫球蛋白 G 的亲和层析纯化法(蛋白 A 或蛋白 G 法)	136
第7节	应用酶解从 IgG 制备 F(ab') ₂ 的方法	137
第8节	从 F(ab') ₂ 制备 Fab'	140
第9节	免疫球蛋白 A 纯化	142
第11章	抗体分子标记技术	146
第1节	抗体的 ¹²⁵ I 标记法	146
第2节	抗体的酶标记法	148
第3节	抗体的生物素化标记法	150
第4节	抗体的荧光标记法	152

第 5 节	生物合成过程的标记	153
第 6 节	免疫胶体金标记抗体及检测抗原	155
第 3 篇 体液免疫检测技术		
第 12 章	酶联免疫检测技术	161
第 1 节	间接法测抗体	161
第 2 节	双抗体夹心法测抗原	163
第 3 节	竞争法测抗原	165
第 4 节	酶联免疫试验的量反应分析	167
第 5 节	酶联免疫试验质反应分析	168
第 13 章	免疫印迹技术	170
第 1 节	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	170
第 2 节	免疫印迹(Western blotting)	174
第 14 章	免疫荧光技术	177
第 1 节	直接免疫荧光法测抗原	177
第 2 节	间接免疫荧光法测抗体	178
第 3 节	标本的制备	180
第 15 章	补体测定技术	183
第 1 节	CH ₅₀ 法测总补体活性	183
第 2 节	补体旁路活化途径的溶血活性(AP-H ₅₀)测定	185
第 3 节	C ₃ 含量测定	186
第 16 章	免疫复合物测定	188
第 1 节	聚乙二醇沉淀法测定免疫复合物	188
第 2 节	C _{1q} 固相法测定免疫复合物	189
第 3 节	固相抗 C ₃ ELISA 法测定免疫复合物	190
第 4 篇 人类白细胞抗原(HLA)测定		
第 17 章	HLA 检测技术	195
第 1 节	HLA 的抗体分型技术	195
第 2 节	HLA 的 PCR 分型技术	196
第 18 章	HLA 的抗体筛选技术	199
第 1 节	淋巴细胞毒交叉配合试验	199
第 2 节	免疫磁珠流式细胞仪方法	201
第 5 篇 有关免疫调节剂筛选及评估机体免疫状态的实验		
第 19 章	非特异免疫功能的检测	205
第 1 节	小白鼠碳粉廓清试验	205
第 2 节	小白鼠腹腔巨噬细胞吞噬试验	206
第 3 节	溶菌酶测定法(光学法)	207

第4节	溶菌酶测定法(平板法).....	209
第20章	特异性免疫功能的检测	211
第1节	血清溶血素测定.....	211
第2节	抗体形成细胞的测定.....	212
第3节	特异性淋巴细胞转化试验.....	214
第21章	有关免疫实验的动物模型	216
第1节	免疫功能低下动物模型.....	216
第2节	大鼠同种被动皮肤过敏反应.....	217
第3节	Ⅱ型变态反应动物模型.....	218
第4节	Ⅲ型变态反应动物模型.....	219
第5节	二硝基氟苯诱导小鼠的迟发型变态反应.....	220
第6篇 糖生物学研究中一些常用免疫学方法		
第22章	小分子糖抗原的分离、鉴定和抗体的制备	225
第1节	糖脂的分析和鉴定.....	225
第2节	鞘糖脂(GSL)抗体的制备和鉴定.....	228
第3节	人工合成糖偶联物抗原与其抗体制备.....	231
第4节	拟糖脂抗原合成.....	234
第23章	免疫球蛋白糖链的检测	239
第1节	免疫球蛋白G中糖型G(0)的检测	239
第2节	免疫球蛋白A1中异常糖链的检测	241
第3节	应用糖特异性单克隆抗体检测糖蛋白抗原.....	242
第4节	应用标记寡糖探针检测组织细胞表面凝集素样结合物.....	244
第5节	糖配体与蛋白质受体相互作用的毛细管亲和色谱.....	246
第7篇 免疫学实验的质量控制及数据处理		
第24章	免疫学实验的质量控制	253
第1节	实验的可靠性分析.....	253
第2节	实验的定量能力分析.....	255
第3节	实验相似度的鉴定.....	256
第25章	免疫学数据的特点与统计分析	258
第1节	正常值确定.....	258
第2节	研究群体对照.....	259
附录1	常用缓冲溶液的配制方法	260
附录2	蛋白质定量	263
附录3	常用蛋白质检测和定量方法比较	266
附录4	细胞蛋白质提取	267
附录5	SDS-PEAG 凝胶染色及干燥	269

附录 6 免疫酶反应底物	272
附录 7 培养液、血清及添加物	274
附录 8 Hanks 液配方	277
附录 9 常用凝集素的单糖结合特异性和寡糖结合特异性	278
附录 10 主要免疫试剂供应商网站介绍	282

第 1 篇

细胞免疫技术

第 1 章

细胞分离及分型

第 1 节 外周血单个核细胞的分离

一、基本原理

本实验是利用不同的细胞之间其密度不同的性质,通过速度沉降法来分离制备外周血中的单个核细胞。

二、试剂与器材

- (1) 外周抗凝血。
- (2) 含 1%~5%胎牛血清的 PBS 液(无 Ca^{2+})。
- (3) 聚蔗糖(密度为 1.077g/ml,商品)。
- (4) 锥虫蓝染液(溶解在 PBS 液中,4g/L)。
- (5) 50ml 聚丙烯管。
- (6) 胎牛血清(56℃,30 分钟加热灭活)。
- (7) 毛细滴管。
- (8) 离心机(配旋转桶转子装置)。
- (9) 10ml 吸管,吸球。
- (10) 光学显微镜,细胞计数板。
- (11) 超净台。

三、操作步骤

(一) 分离过程

(1) 室温下将 25ml 的抗凝血与 25ml 的 PBS 液(含 1%~5%胎牛血清)在一个 50ml 的管中混合。

(2) 将 2 倍体积稀释的抗凝血轻轻铺在 1 倍体积的聚蔗糖液面上(例如,30ml 的稀释抗凝血轻轻铺在 15ml 的聚蔗糖液面上)。见图 1-1-1。

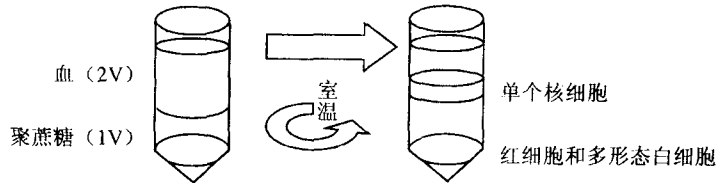


图 1-1-1 单个核细胞分离示意图

- (3) 室温下于旋转转子中($800\sim 1000$) $\times g$,离心 30 分钟(慢慢增加速度,无制动停转)。
- (4) 使用毛细滴管在界面边缘上仔细收集单个核细胞。
- (5) 将收集到的细胞转移到一个 50ml 的锥形离心管中进行细胞洗涤。
- (6) 在管中加入适量 PBS 液(含 1%~5% 胎牛血清),使液体体积达到 50ml。
- (7) 重新悬浮细胞,于 $18\sim 20^{\circ}\text{C}$, $290\times g$,离心 10 分钟,弃上清液。
- (8) 重复上述洗涤细胞步骤两次。
- (9) 将细胞重新悬浮于适当的培养液中。

(二) 锥虫蓝染色分析(测定细胞存活率)

- (1) 将 $50\mu\text{l}$ 的细胞悬液与 $50\mu\text{l}$ 的锥虫蓝染液在微量试管中混匀。
- (2) 室温静置 30 分钟。
- (3) 将 $15\mu\text{l}$ 上述混合液滴入细胞计数板中。
- (4) 在光学显微镜下观察细胞。计数活细胞数(未染色)和死细胞数(染成蓝色)。

(三) 结果

- (1) 本实验回收的细胞中外周血单个核细胞占 90% 以上(细胞存活率应大于 90%),粒细胞占 0%~5%,血小板小于 0.5%,红细胞占 0%~7%。
- (2) 收集的外周血单个核细胞大约占初始细胞数目的 40%~60%。

四、实验要点

- (1) 实验过程中与血或细胞悬液直接接触,请遵守操作规则,进行无菌操作。
- (2) 选择适宜的抗凝剂(枸橼酸钠、肝素、EDTA 等)。
- (3) 抽血后在 2 小时内使用。
- (4) 整个过程在室温下进行。
- (5) 注意将稀释后的血轻轻地沿管壁铺在聚蔗糖液面上,避免破坏其界面。
- (6) 在一个较大容积(50ml)的试管中洗涤细胞,以便更好地除去多余的聚蔗糖和血小板。

(7) 在收集单个核细胞时,预先将毛细滴管中的气体排空,再将毛细滴管轻轻插入单个核细胞层,沿管壁轻轻旋转吸取细胞,千万不能吹打,以免影响细胞的收集效果。

(黄 敏 纪 芳)

第2节 B 细胞分离

一、基本原理

本法可快速从扁桃体中分离单个核细胞。由于扁桃体是淋巴器官,含有60%~70%的B淋巴细胞,本法适用于从扁桃体分离 $(1\sim 2)\times 10^9$ 个B淋巴细胞。

二、试剂与器材

- (1) 从慢性扁桃体炎手术中切除的扁桃体(不超过6小时)。
- (2) 绵羊红细胞。
- (3) 小鼠单克隆抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗CD14、抗CD16、抗CD56 血型。糖蛋白的抗体混合液与磁珠相连的抗小鼠IgG 抗体。
- (4) 工作液:庆大霉素PBS液(150mg/L)。
- (5) 培养液:RPMI 1640+10%胎牛血清+青霉素(10万U/L)+链霉素(100mg/L)。+2mmol/L L-谷氨酰胺。
- (6) 聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)。
- (7) 生理盐水(9g/L)。
- (8) 流式细胞仪。
- (9) 培养皿。
- (10) 镊子、剪刀。
- (11) 金属网过滤器。
- (12) 20ml 注射器。
- (13) 50ml 烧杯。
- (14) 磁铁。
- (15) 低温离心机。
- (16) 37℃,5%CO₂,含一定湿度的孵箱。
- (17) 振荡器。

三、操作步骤

(一) 从扁桃体分离细胞

- (1) 用工作液充分洗涤扁桃体。

(2) 在皮氏培养皿中将扁桃体剪碎,然后,将这些碎块转移到放置在振荡器上的过滤器中。

(3) 用玻璃注射器内芯将过滤器中的扁桃体捻碎,且不时加入工作液,使最终体积为150~200ml。

(4) 室温下 $350\times g$,离心5分钟,洗涤细胞两次,洗涤后将细胞悬浮在100 μ l的培养液中,调整细胞浓度至 1×10^{11} 个/L。

(二) E-玫瑰花环(除去T细胞)

(1) 将上述所得细胞与预先用生理盐水洗过的沉积绵羊红细胞以50:1(V/V)混合。

(2) 在50ml离心管中将25ml上述混合液轻轻铺在12.5ml聚蔗糖的液面上。

(3) 室温下 $180\times g$,离心15分钟,再用 $550\times g$,离心30分钟。

(4) 回收位于聚蔗糖和培养液界面之上的B淋巴细胞。洗涤细胞3次,室温下在工作液中 $400\times g$,离心5分钟。

(三) 利用磁珠筛除细胞

(1) 将单克隆抗体混合液(每种抗体的最终稀释浓度为5~10mg/L)和细胞(1×10^{11} 个/L)在培养液中充分混合。

(2) 4°C 孵育30分钟,此期间轻轻振荡。

(3) 用工作液于 4°C , $300\times g$,离心10分钟,洗涤细胞两次。将细胞悬浮于培养液中,调整细胞浓度至 $(5.0\sim 7.5)\times 10^{10}$ 个/L。

(4) 按磁珠:细胞(个数:个数)5:1的比例在细胞悬液中加入磁珠,以筛除部分细胞(其数目大约占从扁桃体中分离出的细胞总数的10%)。

(5) 4°C 孵育30分钟,此期间轻轻振荡。

(6) 放置磁铁,将此步骤重复两次。

(四) 质量控制

细胞荧光测定法检测回收B淋巴细胞的纯度,所得细胞98%以上是CD19⁺、CD20⁺的B淋巴细胞。

四、实验要点

可用腹水替代单克隆抗体混合液进行细胞筛选。腹水稀释度为1/100。

(黄 敏 纪 芳)

第3节 T细胞分离

一、基本原理

外周血单个核细胞可作为T细胞的来源,约含70%~80%的T细胞,15%~20%B细胞,大约10%单核细胞及少量NK细胞(自然杀伤细胞)。T细胞纯化的第一步是除去被塑料吸附的单核细胞。然后,经红细胞花环沉淀法富集T细胞和NK细胞。如果必要,所余下的NK细胞可用特异的抗体清除。

二、试剂与器材

- (1) 培养液:RPMI 1640含1mmol/L丙酮酸,2mmol/L L-谷氨酸,10万U/L青霉素及100mg/L链霉素,并加以10%或20%的胎牛血清(FCS)(经热灭活)。
- (2) 0.17 mol/L NH_4Cl 缓冲液。
- (3) 0.9% NaCl。
- (4) 聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll isopaque)液。
- (5) 新鲜消毒绵羊红细胞(有商品供应)。
- (6) 0.28 mol/L AET(2-amin oethylisothiuronium bromide)液,pH9.0。
- (7) 消毒离心管。
- (8) 组织培养瓶。
- (9) CO_2 培养箱。
- (10) 层流通风橱。
- (11) 离心机。

三、操作步骤

(一) 通过塑料吸附清除单核细胞

- (1) 从血液中通过聚蔗糖-泛影葡胺液分离的外周血细胞,以培养液稀释到 2×10^9 个/L,在加入10%FCS后移入5ml/25cm²的培养瓶,37℃培养1小时。
- (2) 弃上清液,用盐水清洗培养瓶两次。

(二) 绵羊红细胞致敏

- (1) 10ml 绵羊红细胞用盐水洗3次。
- (2) 沉集的红细胞再悬浮于AET液,37℃培养15分钟(反复进行5次)。
- (3) 780×g,离心4分钟。用盐水洗4次。最后一次洗毕,充分去除上清液(不可残留溶血液)。