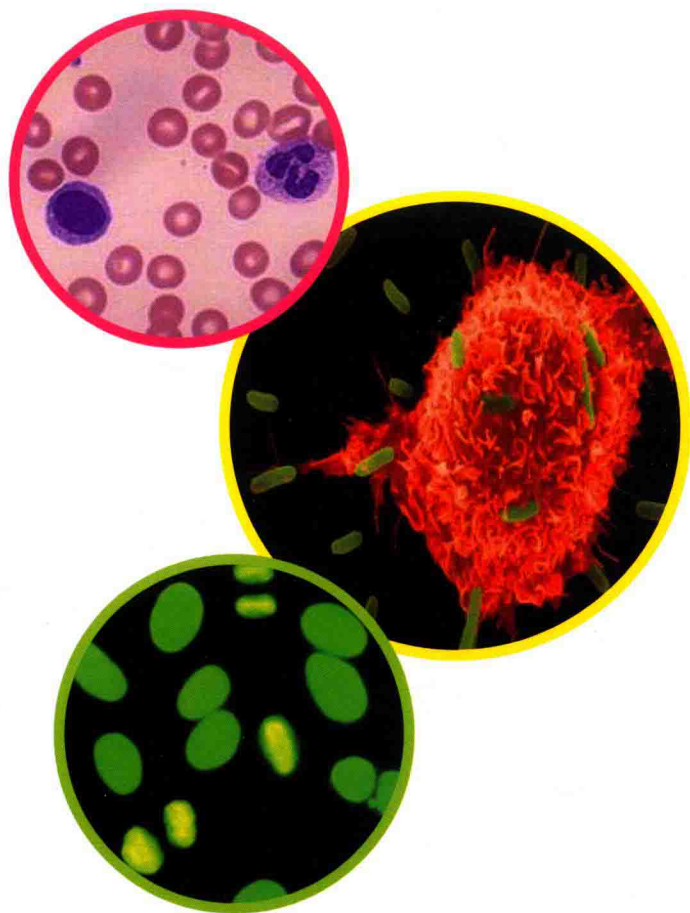


全国高等医药院校实验教材

医学免疫学实验

齐静姣 主编



清华大学出版社

全国高等医药院校实验教材

医学免疫学实验

齐静姣 主编

清华大学出版社
北京

内 容 简 介

本教材主要包括以下内容：抗体制备技术、抗原抗体反应、免疫标记技术、免疫细胞检测技术、细胞因子及其受体的检测、HLA 分型技术、免疫 PCR 技术、超敏反应的检测、免疫学常用实验动物技术、免疫学实验常用仪器、常用试剂的配制、常用免疫学检验正常值、试剂的浓度。

本教材可作为高等医药院校本科生及研究生医学免疫学课程的实验教材，也可供医学同行参考。

版权所有，侵权必究。侵权举报电话：010-62782989 13701121933

图书在版编目 (CIP) 数据

医学免疫学实验 / 齐静姣主编. — 北京：清华大学出版社，2018

(全国高等医药院校实验教材)

ISBN 978-7-302-49668-7

I. ① 医… II. ① 齐… III. ① 医药学—免疫学—实验—医学院校—教材 IV. ① R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 033857 号

责任编辑：罗 健 王 华

封面设计：常雪影

责任校对：赵丽敏

责任印制：李红英

出版发行：清华大学出版社

网 址：<http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址：北京清华大学学研大厦A座 邮 编：100084

社 总 机：010-62770175 邮 购：010-62786544

投稿与读者服务：010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质量反馈：010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 装 者：三河市国英印务有限公司

经 销：全国新华书店

开 本：185mm×260mm 印 张：8.25 字 数：232千字

版 次：2018年3月第1版 印 次：2018年3月第1次印刷

印 数：1~2500

定 价：29.80元

产品编号：076895-01

编者名单

主 编 齐静姣

编 者 (以姓氏拼音排序)

冯书营 李智涛 刘建成 刘熔增

齐静姣 祁秋阳 王肖引 赵 玲

医学免疫学是生命科学的前沿学科，也是医学生的主干必修课程之一。随着免疫学理论和技术迅猛发展，免疫学越来越广泛地与其他基础学科、临床学科交叉融合，并有力地推动了基础医学、临床医学、预防医学乃至整个生命科学的不断发展。

近年来，随着我国高等教育的不断改革和创新人才教育的不断深入，能力培养已引起高校的普遍关注。为进一步贯彻高校“十三五”规划，培养“厚基础、宽口径、重实践、求创新”的医学人才，将创新精神、创业意识和创新创业能力教育融入人才培养的全过程。多年来的教学实践使我们深深体会到实验教学是培养创新型人才的重要环节，是理论教学的重要补充和扩展。它不仅能对理论课内容加以验证，巩固课堂上所学的知识，提高学生的学习兴趣；更重要的是培养学生的科学态度、自主学习能力、独立思考能力、解决问题能力和综合应用能力。综观免疫学的发展历史，在实验研究中应用新的实验方法和技术往往可引起免疫学理论研究的突破。免疫学实验方法和技术在临床实践中的应用极大地提高了临床诊断的水平，不仅有利于临床疾病的防治工作，而且在生命科学诸多领域的实验研究中也发挥了独特的作用。

本教材共包括八章实验和附录内容。在教材的编写体例上，按照实验目的、原理、材料、实验步骤、实验结果、注意事项、临床意义、思考题几个方面的顺序编排，使学习者一目了然；实验项目基本上是教师多年教学和科研实践证明的切实可行的实验，并且增加了一些有利于学生综合素质和创新能力培养的综合实验，以及与临床疾病检测相关的实验内容，同时也关注实验操作中的关键环节和实验的基本技能的介绍。本教材概念准确、条理清楚、简明扼要，具有科学性、先进性、实用性和可操作性。本教材适用于高等医学院校本科生及研究生医学免疫学实验教学，以及相关医学研究的科技和医务工作者参考。

本教材由河南科技大学教师齐静姣、刘熔增、刘建成、冯书营、李智涛、赵玲、祁秋阳和洛阳市第六人民医院的检验技师王肖引共同编写完成。本教材在编写过程中参阅的部分文献列于书后，在此向相关作者表示衷心感谢。编写本教材的过程也是一个不断学习、交流、提高认识 and 追求创新的过程。由于编写时间仓促，编者的水平有限，书中难免会有疏漏和不妥之处，真诚希望广大师生和同行专家在使用过程中提出宝贵意见和建议，以便日后不断完善、充实与提高。

齐静姣

2017年9月

CONTENTS

目录

第1章 抗体制备技术	1
实验一 多克隆抗体的制备	1
一、抗体制备的流程	1
二、兔抗人全血清的多克隆抗体制备	3
三、兔抗羊红细胞的多克隆抗体制备	5
实验二 单克隆抗体的制备	6
实验三 抗体的纯化与保存	11
一、特异性抗体的纯化	11
二、IgG 的纯化	11
三、IgM 的纯化	15
四、SDS-PAGE 法检测免疫球蛋白纯度	16
五、抗体的保存	17
第2章 抗原抗体反应	18
实验四 凝集反应	18
一、ABO 血型的鉴定 (玻片法)	18
二、SPA 协同凝集试验——颗粒性抗原的检测	20
三、间接凝集抑制试验——妊娠检验	22
四、间接血凝试验	22
五、反向间接血凝试验	24
实验五 免疫沉淀反应	25
一、双向免疫扩散	25
二、单向免疫扩散	26
三、环状沉淀试验——血迹鉴定	28
四、琼脂凝胶对流免疫电泳	29
五、火箭免疫电泳试验	30
六、免疫浊度测定	32
实验六 补体结合试验	33
实验七 免疫印迹技术	35

第 3 章 免疫标记技术	39
实验八 酶免疫技术	39
一、酶联免疫吸附试验	39
二、酶免疫组织化学技术	42
实验九 荧光免疫技术	43
一、直接免疫荧光法——检测 B 细胞膜表面免疫球蛋白	43
二、间接免疫荧光法——检测痢疾杆菌	44
实验十 生物素 - 亲和素技术	46
第 4 章 免疫细胞检测技术	48
实验十一 人外周血单个核细胞分离及观察	48
实验十二 T 细胞功能检测	49
一、T 淋巴细胞转化试验	49
二、E 花环形成试验	51
三、流式细胞术检测法	52
四、CTL 介导的细胞毒试验	53
实验十三 B 细胞功能检测——溶血空斑试验	55
实验十四 固有免疫细胞功能检测	56
一、炎症模型建立及细胞吞噬现象观察	56
二、NK 细胞介导的细胞毒试验	58
第 5 章 细胞因子及其受体的检测	60
实验十五 白细胞介素 -1 的检测	60
实验十六 白细胞介素 -2 的检测	62
实验十七 白细胞介素 -2 受体的检测	63
一、可溶性白细胞介素 -2 受体的检测	64
二、膜结合型白细胞介素 -2 受体阳性细胞检测	65
实验十八 肿瘤坏死因子的检测	66
一、肿瘤坏死因子的含量检测	66
二、肿瘤坏死因子的活性检测	67
第 6 章 HLA 分型技术	69
实验十九 补体介导的细胞毒试验	70
实验二十 混合淋巴细胞培养	71
实验二十一 PCR-SSP 检测 HLA-B27	72
实验二十二 HLA 基因分型——限制性片段长度多态性法	73
第 7 章 免疫 PCR 技术	76
实验二十三 免疫 PCR 法检测人肿瘤坏死因子	76

第 8 章 超敏反应的检测	79
实验二十四 豚鼠过敏试验	79
实验二十五 青霉素过敏试验	80
实验二十六 血清 IgE 测定	81
一、血清总 IgE 测定	82
二、特异性 IgE 测定	83
实验二十七 自身抗体检测	83
一、抗核抗体检测	84
二、抗胰岛素抗体检测	85
实验二十八 循环免疫复合物检测	86
一、PEG 沉淀法检测循环免疫复合物	86
二、含甲状腺球蛋白免疫复合物的测定	87
实验二十九 类风湿因子的检测	88
一、胶乳凝集试验测定类风湿因子	88
二、ELISA 法测定类风湿因子	89
实验三十 结核菌素试验	90
实验三十一 植物血凝素皮肤试验	91
附录	93
附录 I 试剂的浓度	93
附录 II 常用免疫学检验正常值	94
附录 III 常用实验动物技术	96
附录 IV 免疫学实验常用仪器	99
附录 V 免疫学常用试剂的配制	103
附录 VI 实验室规则	106
附录 VII 医学免疫学实验报告册	107
参考文献	122

第 1 章 抗体制备技术

抗体 (antibody, Ab) 是机体 B 淋巴细胞受到抗原刺激后所产生的特异性球蛋白, 故亦称为免疫球蛋白。机体初次接触抗原后, 激发机体产生的特异性抗体亲和力低、持续时间短; 而当同一抗原再次刺激机体后, 则能产生高亲和力、高效价、持续时间长的抗体。由于抗体能与相应的抗原发生特异性结合反应, 因此特异性抗体是免疫学实验中常用的试剂, 不仅对于抗原的分析鉴定和定量检测极为重要, 而且广泛应用于临床疾病的诊断、治疗和预防中。在免疫学检测中应用的主要抗体是多克隆抗体和单克隆抗体, 多克隆抗体常用免疫动物的方法获得, 而单克隆抗体则采用杂交瘤技术制备。本章主要介绍这两种抗体的制备方法。

实验一 多克隆抗体的制备

多克隆抗体 (polyclonal antibody) 是机体针对抗原的不同表位所产生的抗体混合物。是用制备的纯化免疫原按照一定的免疫程序接种给所选择的动物, 在含有多种抗原表位的抗原刺激下, 该动物体内多个 B 细胞克隆被激活并产生针对这种抗原多种不同表位的抗体混合物。含有这些特异性抗体的动物血清称为免疫血清或抗血清, 而从免疫血清中纯化的免疫球蛋白则称为抗体。

一、抗体制备的流程

优质免疫血清的产生, 主要取决于抗原的纯度和免疫原性, 动物的应答能力以及免疫程序 (如免疫途径、抗原剂量、注射次数、时间间隔、有无佐剂等因素)。

因此制备高质量的抗体必须具备理想的免疫原、适宜的动物和切实可行的免疫方案。

(一) 免疫动物的选择

免疫用的动物主要为哺乳动物和禽类, 常选择家兔、绵羊、豚鼠及小鼠等。选择动物要依据抗体制备的条件而定。

1. 抗原与动物的种系 抗原的来源与免疫动物之间种系关系越远, 其抗原免疫原性越强, 越易产生免疫应答; 反之, 种系关系越近, 则抗原免疫原性越弱。如用鸡球蛋白免疫亲缘关系较近的鸭或鹅, 则免疫原性较差。

2. 动物的个体状况 动物的年龄与健康状况可影响产生抗体的效价, 年龄太小者易产生免疫耐受, 而年老体衰者免疫应答能力低下, 不易产生高效价的抗体。所以用于制备抗血清的动物必须是适龄、健壮、体重合乎一定要求的健康动物。免疫过程中应特别注意营养和卫生管理。

3. 抗体的用量和要求 动物的选择常根据抗体的用途和量来决定。制备量大的抗体常选择羊、马等大动物; 如所需抗体的量少, 宜用小动物, 如家兔、豚鼠等。对蛋白质抗原大部分动物均适合, 常用家兔和山羊。制备供补体试验用的抗体可选择豚鼠。

(二) 免疫方案

不同的抗原, 其免疫原性的强弱不一, 这取决于抗原的分子量、化学活性基团、立体结构、

物理形状和弥散速度等。在免疫动物时应考虑免疫原的剂量、免疫途径、次数和免疫间隔时间等因素对免疫效果的影响。

1. 免疫原的剂量 抗原的免疫剂量依照给予抗原的种类、注射途径、免疫次数以及受体动物的种类、免疫周期及所要求的抗体特性等而不同。免疫原剂量过大或过小都易引起免疫耐受。在中间剂量范围内,免疫原剂量适当加大,时间间隔延长,可产生较高效价的抗体。一般而言,小鼠首次免疫剂量为每次 $50\sim 400\mu\text{g}$,大鼠为每次 $100\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$,兔为每次 $200\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ 。加强免疫剂量为首次剂量的 $1/5\sim 2/5$ 。如要制备高度特异性的抗血清,可选用低剂量抗原短程免疫法;如欲获得高效价的抗血清,则宜采用大剂量抗原长程免疫法。

2. 免疫途径、次数和间隔时间 常根据抗原性质、免疫原性及动物的免疫反应性决定免疫途径、免疫次数和间隔时间等。抗原注射途径可根据不同抗原及实验要求,选用皮内、皮下、肌肉、腹腔、静脉或淋巴结等不同途径进行免疫。一般多采用动物的背部、足掌、淋巴结周围、耳后等处皮内或皮下多点注射。两次免疫注射的间隔时间应长短适宜,太短起不到再次反应的效果,太长则失去了前一次激发的敏感作用。一般第一次和第二次间隔 $10\sim 20\text{d}$,3次及以后间隔 $7\sim 10\text{d}$,加佐剂者应为2周左右。免疫的总次数一般为 $5\sim 8$ 次。

3. 佐剂的应用 佐剂可增强抗原的免疫原性,使无或弱免疫原性的物质变成有效免疫原。如用可溶性蛋白质抗原免疫家兔,在加用佐剂时一次注入剂量一般为 0.5mg/kg ,如不加佐剂,则抗原剂量应加大 $10\sim 20$ 倍。动物实验中最常使用的佐剂为弗氏不完全佐剂(Freund incomplete adjuvant, FIA)和弗氏完全佐剂(Freund complete adjuvant, FCA),前者是将抗原和油剂(液状石蜡或花生油)混合,再加入乳化剂(羊毛脂或吐温-80^①),使之成为油包水乳剂。在弗氏不完全佐剂中加入死的分枝杆菌即为弗氏完全佐剂。初次免疫时,最好用弗氏完全佐剂,以刺激机体产生较强的免疫反应。再次免疫时,则采用弗氏不完全佐剂。对可溶性抗原常需加用佐剂,以增强抗原的免疫原性,刺激机体产生较强的免疫应答。

(三) 免疫血清效价的鉴定

测定免疫血清效价是及时掌握对免疫动物采血时机的重要步骤,又称试血。

1. 颗粒性抗原相应抗体效价的测定 如细菌性抗原多用凝集反应测定,细胞性抗原可用补体依赖的细胞毒实验等方法测定相应的抗体。

2. 可溶性抗原相应抗体效价的测定 多采用沉淀反应及简便快速的方法如酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),更为灵敏的放射免疫测定法进行测定。

(四) 采血及分离血清

无论是免疫的大动物还是小动物,采血方法均可分为一次放血法和多次放血法两种。一次放血法,家兔等大动物可用颈动脉放血,豚鼠等小动物可通过心脏直接采血。多次少量放血法,大动物如家兔可通过耳静脉采血,小动物如豚鼠可经耳静脉采血,小鼠可经眶静脉或尾静脉采血。

采血后分离血清,可将血液放置于 37°C 下 $30\sim 60\text{min}$ 使之凝固,血凝块与采集器表面分开,置于 4°C 下过夜,使血凝块收缩,离心,移出血清,置于 56°C 下水浴 30min 灭活补体。

(五) 免疫血清的纯化

更加精细的免疫试验需要从抗血清中提取免疫球蛋白,此过程称为抗血清的纯化。纯化

^① 吐温-80: 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。

的步骤为：50% 饱和硫酸铵盐析出沉淀血清球蛋白，应用透析或分子筛法除盐。除盐后的球蛋白过阴离子交换柱（DEAE-纤维素），根据不同类别免疫球蛋白的等电点，选用不同 pH 和离子强度的缓冲液分别洗脱之；高渗或风干法浓缩免疫球蛋白，若使用冷冻干燥器则可获得干燥制品。

（六）免疫血清性质的鉴定

获得的免疫血清需要进行特异性检测、亲和力测定和效价滴定。针对颗粒性抗原的免疫血清效价，可通过凝集或溶细胞试验（如溶血素效价滴定）检测。可溶性抗原相应抗体的效价和纯度多选用环状沉淀、琼脂扩散和免疫电泳的方法检测。酶免疫测定、放射免疫分析及平衡透析等方法，可用于抗体的特异性和亲和力测定。抗血清鉴定的方法详见后述相应实验。

（七）免疫血清的保存

1. 冰冻保存 冰冻之前先用干冰急速冷冻，然后放 $-70\sim-20^{\circ}\text{C}$ 冰冻。该法保存期较长，可达 2~3 年，在保存期间尽量避免反复冻融，否则可使抗体变性，效价降低甚至完全失效，宜分小包装，是较常用的保存免疫血清的方法。

2. 冷冻干燥保存 此为较好的保存方法。将免疫血清干燥成粉分装于安瓿瓶中，急速低温冷冻干燥，火焰封口，置 -20°C 可保存 4~5 年。

3. 加入防腐剂保存 免疫血清中加入防腐剂后可放 4°C 保存，在 1~2 年内使用。常用的防腐剂有叠氮钠、硫柳汞和石炭酸，其应用终浓度分别是 0.01%、0.01% 和 0.5%。但标记荧光的抗体不能用叠氮钠防腐，因其对荧光素有淬灭作用。

二、兔抗人全血清的多克隆抗体制备

【实验目的】

掌握人全血清免疫原和佐剂的制备方法；熟悉多克隆抗体制备的基本过程；了解动物实验的基本知识。

【实验原理】

根据抗原的生物学和理化特性，用不同的方法制得高纯度的免疫原，再进行不同形式的处理（例如加入佐剂），可使其具有更强的免疫原性。将抗原物质经适当的途径，按照预先制定的免疫方案免疫动物，经过一定时间，可刺激机体产生特异性抗体并释放入血，当血中抗体达到一定效价时采血，分离血清，即可获得多克隆抗体。

【实验材料】

1. 实验动物 健康雄性家兔，体重 2~3kg，4~5 月龄。
2. 试剂 生理盐水、混合人血清、羊毛脂，液体石蜡、卡介苗（BCG）、2.5% 碘伏、75% 乙醇溶液、PBS。
3. 器材 烧杯、乳钵、1mL 吸管、5mL 吸管、量筒、5mL 注射器、试管、台式离心机、冰箱、台式天平。

【实验步骤】

1. 人全血清免疫原的制备 选取健康志愿者（学生）或献血员，静脉采血 5mL；置试管中于室温下使之自然凝集，凝集后离心取上清液（血清）约 2.5mL。将多人（至少 2~3 人）的血清混合，即为人全血清。

2. 佐剂的制备

（1）福氏不完全佐剂（FIA）的制备：先称取羊毛脂 2g，放入无菌乳钵内，再用吸管吸取液

体石蜡 4mL, 加入放有羊毛脂的乳钵中, 沿一个方向边滴加边研磨混匀。

(2) 福氏完全佐剂 (FCA) 的制备: 在上述的福氏不完全佐剂中再逐滴加入卡介苗 1mL, 沿一个方向边滴边研磨, 使菌体完全分散乳化。

3. 人全血清与佐剂的混合物 将人全血清 2mL 用生理盐水作 1:2 稀释。取稀释好的人全血清与福氏完全佐剂按 1:1 的比例混合, 制成油包水状态。具体方法有: ①研磨法, 取福氏完全佐剂置于无菌研钵中, 然后逐滴加入稀释好的人全血清, 边加边沿一个方向研磨直到形成均一性的乳化物, 用无菌滴管取一滴于冷水上, 不散开为达到“油包水”状态, 为合格的佐剂抗原的混合物。如果很快分散成云雾状或小颗粒, 则为不合格, 需继续研磨。②注射器法, 即用两个注射器对接, 使佐剂与抗原往返推拉, 直至乳化。另外, 也可将佐剂置磁力搅拌器上, 边搅拌, 边加抗原并继续搅拌, 使其完全乳化。

4. 免疫方法 家兔分 4 次进行免疫, 每次间隔 2~3 周。于家兔背部及腹股沟, 皮下多点注射, 一般注射 5~7 个皮下点。

第一次免疫, 取上述纯化后的抗原 (1mL/家兔) 用 PBS 作 1:2 稀释后, 加等体积 FCA 充分乳化, 于家兔背部及腹股沟, 皮下多点注射。

第二次免疫, 2 周后再以相同抗原加等体积 FIA 乳化后, 注入家兔背部或腹股沟皮下多点加强免疫。

第三次免疫和第四次免疫同第二次。

每次免疫后 7~14d 抽取少许静脉血, 分离血清, 以备检测免疫效果。于第 4 次免疫后 5~7d 试血。

5. 免疫效价的检测 于家兔耳静脉取血 1~2mL, 分离血清。用环状沉淀试验测定抗体效价达 1:5000 以上 (稀释抗原), 或用双向免疫扩散试验测定抗体效价达 1:16 以上 (稀释抗体), 即可从心脏或颈动脉放血, 或静脉采血, 分离血清, 进行抗体的纯化及检测。

6. 抗体的保存 免疫血清经 56℃、30min 加热灭活后, 加入适当的防腐剂, 适量分装, 做好标记, 置 -20℃ 以下低温保存。

【注意事项】

1. 抗原制备、免疫动物及采集血清等过程应注意无菌操作。
2. 人全血清抗原应该选择 3 人以上混合血清, 以避免个体差异性; 血清应新鲜, 以保持血清中各成分的活性。
3. 蛋白质等可溶性抗原在免疫时需要加入佐剂, 混合研磨时应充分乳化, 否则难以达到预期的免疫效果。在使用佐剂-抗原时, 若难以吸入注射器, 则可将连同装有佐剂的容器置热水上加热, 并选用较粗的注射针头。

4. 再次注射免疫原时, 要防止过敏反应发生。

5. 免疫时应采用多点注射以提高免疫的效果。

【临床意义】

随着医学科学技术的不断发展, 免疫血清的应用日益广泛, 虽然多有商品供应, 但部分诊断血清及科研用血清常需要自行制备, 因此制备高纯度、高效价的免疫血清是实验室工作的基本技术之一。

【思考题】

1. 制备兔抗人全血清的多克隆抗体为何要加入佐剂?
2. 佐剂有何用途? 其作用机制如何?
3. 抗血清的制备需要什么条件?

三、兔抗羊红细胞的多克隆抗体制备

【实验目的】

掌握颗粒性免疫原制备多克隆抗体的原理和方法。

【实验原理】

将绵羊红细胞（sheep red blood cell, SRBC）等颗粒性抗原纯化后经适当的途径免疫动物，可刺激动物体发生体液免疫应答，经过一定时间可产生相应的特异性抗体并释放入血，即为特异性的免疫血清。

【实验材料】

1. 实验动物 健康的绵羊，健康的雄性家兔。
2. 试剂 无菌生理盐水、2.5% 碘伏、75% 乙醇溶液、阿氏液。
3. 器材 100mL 注射器、16 号针头、胶管、三角烧瓶、玻璃珠、烧杯、试管、量筒、1mL 吸管、5mL 吸管、1mL 注射器、止血钳、手术剪、水平离心机、冰箱、台式天平。

【实验步骤】

1. 绵羊红细胞（SRBC）悬液的制备

（1）采羊血：取绵羊侧卧位，先用带子固定其头部和四肢，剪去羊颈侧的毛，再用 2.5% 碘伏和 75% 乙醇溶液消毒绵羊皮肤，而后用手压迫颈静脉，待其明显隆起后用 100mL 注射器自颈静脉无菌采血。

（2）去除血中纤维蛋白：采足所需血量（50~80mL）后，注入装有玻璃珠的三角烧瓶内，加塞后沿着一个方向摇动烧瓶，用玻璃珠脱去羊血中的纤维蛋白。或事先在烧瓶内加入适量肝素抗凝。

（3）取适量羊血立即做细胞悬液，其余放入阿氏液中保存（羊血与阿氏液之比为 1：2），置 4℃ 冰箱可有效保存 2 周。

（4）取玻璃试管 1 支，加入预先准备的羊血 2mL，再加入 4mL 生理盐水稀释，进行洗涤，离心 10min（转速 2000r/min），吸弃上清液；重复用生理盐水洗涤离心 3 次。最后一次离心后弃去上清液，管底沉淀的血细胞即为压积红细胞。

（5）将压积红细胞稀释为 5×10^8 /mL（5%）的细胞悬液，通常亦称为 SRBC 悬液，白细胞可忽略不计。（取压积红细胞 0.5mL+生理盐水 9.5mL=5% 的红细胞悬液）

2. 动物准备 取体重 2~3kg 的健康雄性家兔若干只（根据需要确定），先饲养观察数日，无疾病等特殊情况即可使用。将家兔分笼饲养，笼上挂标签，注明免疫原、免疫程序及免疫途径等。

3. 免疫方法 根据不同的免疫原，采用不同的免疫程序。绵羊红细胞（SRBC）悬液的免疫程序见表 1-1。

表 1-1 绵羊红细胞的免疫程序

免疫次序	免疫日程（d）	注射剂量（mL）	注射途径
1	1	0.5	皮下
2	3	1.0	皮下
3	5	1.5	皮下
4	7	2.0	皮下
5	9	2.5	皮下
6	12	1.0	耳静脉
7	15	1.0	耳静脉

第 20 天试血,凝集效价大于 1:2000 以上可放血。如效价不够,可追加免疫。

4. 采血获得抗血清 家兔采血有 3 种基本方法。①耳静脉采血法:少量采血时(如测试抗体效价等)应用此法;②心脏采血法:大量采血时应用,此法简便易行,可以使动物继续存活,如果进行加强免疫,饲养一段时间后可再行采血;③动脉放血法:可以最大限度地得到血清,但动物不能再存活。

采血获得的兔血,可置 37℃ 下促进血块收缩,并用毛细吸管吸取血清,经离心(转速 3000r/min)去除残留的红细胞,得到抗血清。

5. 抗血清的保存 抗体的保存以浓度 20~30mg/mL 为宜,加入万分之一的硫柳汞或千分之一的叠氮钠防腐,并加入等量的中性甘油,分装小瓶,-20℃ 以下保存,数月至数年内抗体效价无明显改变。

【注意事项】

1. 制备压积红细胞时,应无菌操作,避免剧烈震荡;试管应洗涤洁净,充分干燥,以免发生溶血。

2. 免疫程序并非固定不变,一般而言,不与佐剂一同免疫的抗原,免疫间隔时间较短,可每隔 2~3d 免疫一次。由于佐剂具有缓释作用,于佐剂一起免疫的抗原可隔 1~2 周。无论有无佐剂,最后一次免疫一周后采取血清。

3. 由于免疫期限及间隔时间较长,要注意脱敏,尤其在静脉免疫时。脱敏的原则是少量多次注射抗原,例如,在静脉注入抗原前,先将抗原少量注入腹腔,1h 后再作缓慢静脉注射。

【临床意义】

兔抗羊红细胞的多克隆抗体的制备,可用于溶血反应作为补体结合反应中的主要试剂,多为科研和实验教学的基本技术。

【思考题】

1. 制备兔抗 SRBC 免疫血清的过程与制备兔抗人全血清的有何不同?为什么?
2. 抗血清的保存方法有哪些?

实验二 单克隆抗体的制备

1975 年 Koehler 和 Milstein 创建了淋巴细胞杂交瘤技术,又称为抗体的细胞工程技术。它是将可产生特异性抗体但短寿的 B 细胞与无抗原特异性但长寿的骨髓瘤细胞融合,建立的可产生单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)的 B 淋巴细胞杂交瘤细胞和单克隆抗体技术。

利用杂交瘤技术制备单克隆抗体可根据以下原则:①淋巴细胞产生抗体的克隆选择学说,即一种克隆只产生一种抗体;②细胞融合技术产生的杂交瘤细胞可以保持双方亲代细胞的特性;③利用代谢缺陷补救机制筛选出杂交瘤细胞,并进行克隆化,然后大量培养增殖,制备所需的 McAb。该技术是一项周期长、高度连续性的实验技术,具体包括两种亲本细胞的选择和制备、细胞融合、杂交瘤细胞的选择性培养和克隆化、单克隆抗体的制备、特异性鉴定及纯化等。

【实验目的】

熟悉单克隆抗体制备的原理,了解单克隆抗体制备的过程和鉴定方法。

【实验原理】

抗原免疫的 B 淋巴细胞能够产生特异性抗体,但在体外不能进行无限增殖;而骨髓瘤细胞虽然可以在体外进行无限增殖,但不能产生特异性抗体。将免疫脾细胞与骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤细胞,这种细胞具有两种亲本细胞的特性,既具有 B 淋巴细胞合成和分泌特异性抗体的能力,也具有骨髓瘤细胞无限增殖的特性。即杂交瘤细胞可在体内长期培养,又能不断地分泌特异性

抗体。

单克隆抗体制备成功的关键是采用了一种特殊的选择培养基即 HAT 培养基, 此培养基含有次黄嘌呤 (H)、氨基蝶呤 (A)、胸腺嘧啶核苷 (T), 可将所需要的杂交瘤细胞分离出来。其原理是: 经在 HAT 培养基中进行选择性培养, 未融合的脾细胞因不能在体外长期存活而死亡, 而未融合的骨髓瘤细胞合成 DNA 的主要途径被培养基中的氨基蝶呤阻断, 又因缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶 (HGPRT), 不能利用培养基中的次黄嘌呤完成 DNA 的合成过程而死亡。只有融合的杂交瘤细胞由于从脾细胞获得了次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶, 因此能在 HAT 培养基中存活和增殖。经过克隆选择, 可筛选出能产生特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞, 在体内或体外培养, 即可无限制地大量制备单克隆抗体。

【实验材料】

1. 实验动物 8~10 周龄, 重约 20g, 健康的 Balb/c 纯系小鼠, 雌雄均可。
2. 细胞 小鼠骨髓瘤细胞 (Sp2/0 细胞)。
3. 试剂 50% 聚乙二醇 (PEG)、无菌生理盐水、2.5% 碘伏、75% 乙醇溶液、台盼蓝溶液、蒸馏水; R/MINI-1640 培养液、HT 培养基、HAT 选择培养基、小牛 (或胎牛) 血清、10% 二甲基亚砷 (DMSO)。
4. 器材 解剖刀剪、细胞计数板、试管、带刻度吸管、注射器、6cm 平皿、加样器、CO₂ 培养箱、细胞培养瓶、96 孔培养板、超净工作台、水平式离心机、倒置显微镜、冰箱等。

【实验步骤】

1. 免疫动物 免疫动物是用目的抗原免疫小鼠, 使小鼠产生致敏 B 淋巴细胞的过程。先选用 Balb/c 小鼠, 按照预先制定的免疫方案进行免疫注射。抗原通过血液循环或淋巴循环进入外周免疫器官, 刺激相应 B 淋巴细胞克隆, 使其活化、增殖, 并分化成为致敏 B 淋巴细胞。

2. 骨髓瘤细胞的制备 在融合前 48h, 用含 20% 小牛血清的 R/MINI-1640 培养液, 将骨髓瘤细胞增殖培养。融合前 24h, 再以同样培养液换液一次, 使细胞融合当天处于对数生长期。取数瓶骨髓瘤细胞, 轻轻去除瓶内原有培养液, 加入冷的无血清培养液少许, 用吸管将细胞吹打均匀在培养液中, 离心洗涤后悬于无血清培养液中。台盼蓝染色检查活细胞数应大于 95%, 置于 37℃ 下备用。

3. 免疫小鼠脾细胞的制备 取末次免疫后第三天的鼠, 眼眶放血, 分离血清冻存备用。颈椎脱臼处死小鼠, 浸泡于 75% 乙醇溶液中 3~5min。无菌操作取出脾, 置平皿内的 200 目钢网上, 加入 10mL 的 R/MINI-1640 培养液, 用注射器芯将脾细胞轻轻挤压过网, 制备脾细胞悬液, 用此 R/MINI-1640 培养液将脾细胞洗涤 2 次 (以 1000r/min 转速离心 10min), 弃上清液, 用 R/MINI-1640 培养液悬浮沉淀, 计数活细胞数, 一般每只小鼠可得 0.5×10^8 个脾细胞。

4. 饲养细胞准备 在体外的细胞培养中, 单个的或数量很少的细胞不易存活, 必须加入其他活的细胞才能使其生长繁殖, 加入的细胞称为饲养细胞 (feeder cell)。在细胞融合和单克隆的选择过程中, 就是在少量的或单个细胞的基础上使其生长繁殖成群体, 因此在这一过程中必须使用饲养细胞。许多动物的细胞都可做饲养细胞, 常选用腹腔渗出细胞, 其中主要是巨噬细胞和淋巴细胞。

将小鼠致死、体表消毒和固定后, 用消毒器械从下腹掀起腹部皮肤, 暴露腹膜。用酒精棉球擦拭腹膜消毒。将 10mL 培养液注射至腹腔, 注意避免穿入肠管。右手固定注射器, 使针头留置在腹腔内, 左手持酒精棉球轻轻按摩腹部 1min, 随后吸出注入的培养液。离心 10min (转速 1000r/min), 弃上清液。先用 5mL HAT 培养基将沉淀细胞悬浮, 根据细胞计数结果, 补加 HAT 培养基, 使细胞浓度为 2×10^8 /mL, 将细胞加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 0.1mL, 置 CO₂ 培养箱备用。

5. 细胞融合

(1) 将准备好的骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞按 1:5~1:10 比例混合, 加入 20~50mL R/MINI-1640 液, 以 1000r/min 转速离心, 弃上清液, 将上清液尽量吸净, 以免影响 PEG 的浓度。

(2) 用手指轻弹离心管底部, 使沉淀细胞分散, 将离心管置 37℃ 水浴中。吸 1mL 37℃ 预温的 50%PEG 缓慢滴入离心管内, 边加边轻轻摇晃, 1min 内加完, 37℃ 静置 1min。加 R/MINI-1640 液 (37℃ 预温) 1mL, 1min 内加完, 再加 R/MINI-1640 液 10mL, 边加边轻轻摇晃 1min, 然后加 R/MINI-1640 液至 50mL, 使 PEG 作用终止。

(3) 以 800r/min 转速离心 10min, 弃全部上清液。加入少许 HAT-R/MINI-1640 选择培养液, 用 1mL 吸管轻轻混匀, 切记不可用力吹打, 以免使融合在一起的细胞散开。随后将沉淀细胞轻轻悬浮于所需容积的 HAT 培养液中, 接种于 96 孔培养板 (0.1mL/孔)。接种完毕后, 将培养板放入 37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养。每天观察细胞培养板有无细菌污染及克隆生长情况。

6. 选择性培养 两种亲本细胞经 PEG 处理后, 可形成多种细胞成分的混合体, 包括未融合的游离亲本细胞、骨髓瘤细胞间的融合、免疫 B 细胞间的融合以及骨髓瘤细胞与免疫 B 细胞间融合的异核细胞, 仅后者可形成杂交瘤, 应予以筛选出来克隆培养。通常应用 HAT 培养基, 其中含有次黄嘌呤 (H)、氨基嘌呤 (A)、胸腺嘧啶核苷 (T)。在 HAT 培养基中, 未融合的骨髓瘤细胞因缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶, 不能利用补救途径合成 DNA 而死亡。未融合的 B 淋巴细胞虽具有次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶, 但其本身不能在体外长期存活也逐渐死亡。只有融合的杂交瘤细胞由于从脾细胞获得了次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶, 并具有骨髓瘤细胞能无限增殖的特性, 因此能在 HAT 培养基中存活和增殖。

接种 96 孔板 1 周后换 HAT 培养液, 每次吸出培养孔旧液 1/2, 换入新液, 连续 2 周。3~5d 后未融合及自身融合的细胞逐渐死亡, 1 周左右可出现克隆, 并不断增殖, 当集落大于 3mm 或布满孔底 1/2 时即可取上清做抗体活性检测, 同时补加新鲜 HAT 培养液。在一次较好的融合试验中, 70%~80% 的孔有。所有生长克隆的孔都需要取培养上清液进行抗体活性检测。培养 3 周后即可改用普通完全培养液。

7. 杂交瘤阳性克隆的筛选与克隆化

(1) 杂交瘤阳性克隆的筛选: 杂交瘤细胞在 HAT 培养液中生长形成克隆后, 其中仅少数是分泌预定特异性 McAb 的细胞, 而且多数培养孔中有多个克隆生长, 分泌的抗体也可能不同, 因此, 必须进行筛选与克隆化。要求所测抗体的方法高度灵敏、快速、特异, 且便于大量检测。通常根据抗原性质和抗体的类型而定。常用方法有酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫荧光、放射免疫测定、间接血凝试验、溶血空斑试验等。

首先初筛出能分泌与预定抗原起反应的 McAb 杂交瘤细胞, 再进一步从中筛选出有预定特异性的杂交瘤细胞, 然后选出可供实际应用具有能稳定生长和有功能特性的细胞克隆。而且应尽量选择数株细胞, 以保证有足够的候选株供实际应用。

(2) 克隆化技术: 为了防止无关克隆的过度生长, 需对检测抗体阳性的杂交克隆尽早进行克隆化培养, 否则抗体分泌的细胞会被抗体非分泌的细胞所抑制, 因为抗体非分泌细胞的生长速度比抗体分泌地细胞生长速度快, 二者竞争的结果会使抗体分泌的细胞丢失。即使克隆化过的杂交瘤细胞也需要定期地再克隆, 以防止杂交瘤细胞的突变或染色体丢失, 从而丧失产生抗体的能力。克隆化的方法包括有限稀释法、软琼脂平板法、显微操作法和荧光激活细胞分选法, 最常用的方法是有限稀释法。有限稀释法是将需要再克隆的细胞株自培养孔内吸出并作细胞计数, 计出 1mL 的细胞数。用 HT 培养液稀释, 使细胞浓度为 50~60 个/mL, 于 96 孔培养板中每孔加 0.1mL (5~6 个细胞/孔)。接种两排, 剩余细胞悬液用 HT 培养液作倍比稀释, 再接种两排, 如此类推, 直至使每孔含 0.5~1 个细胞。培养 4~5d 后, 在倒置显微镜上可见到小的细胞克隆, 补加完全培

养液 200 μ L/孔。第8~9天时肉眼可见细胞克隆,及时进行抗体检测。选择单个克隆生长的阳性孔再一次进行克隆。一般需要如此重复3~5次,直至达100%阳性孔率时即可,以确保抗体由单个克隆所产生。初次克隆化的杂交瘤细胞需要在完全培养液中加 HT。

8. 杂交瘤细胞的保存与复苏 将已克隆化和经鉴定合格的杂交瘤细胞株,或是一时来不及克隆化鉴定的杂交瘤细胞及时冻存是十分重要的。因为在细胞培养过程中随时可能发生细胞被污染或分泌抗体的功能丧失等现象。如果没有原始细胞的冻存,有时会造成不可弥补的损失。

(1) 杂交瘤细胞的冻存:收集培养的杂交瘤细胞或从小鼠体内取出的杂交瘤细胞,加入一定量的细胞冻存液(30%~40%小牛血清、50%~60%不完全 R/MINI-1640 选择培养液,10%DMSO),使细胞浓度为 $(1\sim5)\times 10^8/\text{mL}$ 。将细胞悬液分装到冻存管中,采用分步冷冻法即先置于 -30°C 冰箱1h再移置 -70°C 冰箱2h以上或过夜,最后于 -196°C 液氮或液氮蒸气中长期保存。每种细胞株至少冻存5~10管。

(2) 杂交瘤细胞的复苏:将杂交瘤细胞的冻存管从液氮罐里取出,立即投入 37°C 水浴中,待细胞悬液快速解冻后,立即将细胞用 R/MINI 1640 培养液清洗2次,然后用 R/MINI-1640 完全培养液配成细胞悬液滴入24孔培养板或25mL培养瓶中,置于 37°C 下、5% CO_2 培养箱内培养。待复苏细胞生长良好时,2~3d传代培养。若冷冻后细胞死亡较多,可加入饲养细胞共同培养,在复苏冷冻细胞前一天,于24孔培养板上每孔加小鼠腹腔巨噬细胞0.5mL($10^4/\text{mL}$)。

9. 单克隆抗体的大量制备 获得稳定的杂交瘤细胞系后,即可根据需要大量生产 McAb。目前制备 McAb 主要采用动物体内诱生腹水法和体外培养法。

(1) 动物体内诱生腹水法:先在小鼠腹腔注射液体石蜡或福氏不完全佐剂,一周后将杂交瘤细胞悬液注射入小鼠腹腔。接种10~14d后,可分次采集腹水,将收集的腹水离心去除细胞,灭活(56°C ,30min),再离心,取上清液即可。该法操作简便、经济、抗体浓度高。但腹水中常混有小鼠的其他蛋白,因此要提纯后方可使用。目前治疗用或体外诊断用的 McAb 多采用这一方法制备。

(2) 体外培养法:将杂交瘤细胞置培养瓶中培养,待培养液颜色改变或细胞过多开始死亡时,收集上清液,离心去掉碎片及细胞即可。该法所得抗体含量不高,且需要特殊仪器设备,故常用于实验室中。

10. 单克隆抗体性质的鉴定 为了更好地利用所获得的单克隆抗体,需对单克隆抗体的性质进行鉴定,鉴定的内容包括特异性、免疫球蛋白的类及亚类、亲和力、识别结合抗原的表位及其分子量等。

(1) 单克隆抗体特异性的鉴定:特异性鉴定是检测抗体是否会与目的抗原之外的其他抗原反应,即交叉反应性的程度。其检测方法很多,包括酶免疫测定法、免疫荧光技术、放射免疫测定法、蛋白印迹杂交技术、间接血凝试验、化学发光免疫斑点法等。例如:①蛋白印迹杂交技术,将抗原(含有其他相关抗原)行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转至硝酸纤维素膜上。转膜完毕后,将膜置于封闭液中,置室温1~2h下。取出晾干后,将膜切成小条,与待测抗体孵育,洗涤显色后观察结果。如果一种单抗只与某一特定的蛋白带起反应,说明其特异性强,若还与其他蛋白起反应,说明有交叉反应。至于反应的程度只能粗略的估计。②免疫荧光技术,适合于细胞抗原及组织切片抗原,根据是否有荧光及荧光强弱来判断是否有交叉反应及交叉反应的强弱。具体操作步骤见相关章节。

(2) 单克隆抗体的类及亚类的鉴定:通常以兔抗小鼠 Ig 的类和亚类的标准血清,采用免疫双扩散试验或 ELISA 夹心法测定 McAb 与抗小鼠 Ig 类型和亚类的反应性,以确定 McAb 属哪一类型和亚类。例如免疫双扩散试验的具体步骤有:①以磷酸盐溶液配制1%的琼脂糖溶液,趁热倒入直径35mm的小平皿中,凝固后打孔(梅花孔型),即中间1个孔,周围6个孔。②取杂交瘤培养上清液1mL(含待测抗体),加硫酸铵0.38g沉淀抗体。离心5min(转速10 000r/min),吸弃