

医学免疫学 实验技术

主编 居颂光 朱一蓓



苏州大学出版社
SOOCHOW UNIVERSITY PRESS

医学免疫学实验技术

主 编 居颂光 朱一蓓

苏州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验技术 / 居颂光, 朱一蓓主编. — 苏州: 苏州大学出版社, 2011. 2
ISBN 978-7-81137-663-0

I. ①医… II. ①居…②朱… III. ①医药学: 免疫学-实验-高等学校-教材 IV. ①R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 023318 号

医学免疫学实验技术

居颂光 朱一蓓 主编

责任编辑 陈 鑫

苏州大学出版社出版发行

(地址: 苏州市十梓街 1 号 邮编: 215006)

扬中市印刷有限公司印装

(地址: 江苏省扬中市科技园区东进大道 6 号 邮编: 212212)

开本 787 mm×1 092 mm 1/16 印张 6.5 字数 138 千

2011 年 2 月第 1 版 2011 年 2 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-81137-663-0 定价: 15.00 元

苏州大学版图书若有印装错误, 本社负责调换

苏州大学出版社营销部 电话: 0512-65225020

苏州大学出版社网址 <http://www.sudapress.com>

医学免疫学实验技术

编 委 会

主 审 邱玉华

主 编 居颂光 朱一蓓

副主编 葛 彦 陈永井

编 者(以姓氏音序为序)

陈永井 (苏州大学)

葛 彦 (苏州大学)

何 艳 (苏州大学)

居颂光 (苏州大学)

邱玉华 (苏州大学)

施 勤 (苏州大学)

孙 静 (苏州大学)

孙中文 (苏州卫生职业技术学院)

王凤鸣 (苏州大学)

王艳萍 (苏州大学)

吴 艳 (苏州大学)

谢 炜 (苏州大学)

徐 颖 (苏州大学)

於葛华 (苏州大学)

郁 晓 (苏州大学)

朱华亭 (苏州大学)

朱一蓓 (苏州大学)

前言

《医学免疫学实验技术》是一本供高等医学院校本科生、研究生以及其他相关人员使用和参考的实验技术指导教材。考虑到免疫学的迅速发展及与其他学科的交叉、渗透与融合,本书在总结多年免疫学实验教学的基础上,又添加了许多新的内容,以便向读者提供更丰富、更可靠的实验研究方法。

本书共收录了免疫学相关实验 34 个。在内容上,既考虑到了教学大纲的要求,又考虑到了免疫学迅速发展的需要以及新的分析手段的不断涌现。因此,书中将与免疫相关的疾病模型如肿瘤模型、GVHD 模型及自身免疫性疾病模型等引入其中,并把共聚焦显微镜技术及同位素示踪技术等运用到实验中来。与此同时,本书还借鉴了众多编者多年来在国内外所从事的科研工作的经验。在形式上,本书力求表述得条理清晰,简明扼要。每一实验包括目的要求、原理、材料、方法、注意事项及思考题六个部分,并尽可能给出直观、形象的结果与分析,使读者能够全面掌握实验内容,了解实验过程中的关键操作及需要注意的事项,从而收到知其然并知其所以然的学习效果。书后附有实验常用试剂的配方以供查阅参考。

限于编者的水平与经验有限,书中难免存在不妥甚至错误之处,恳请读者批评指正。

邱玉华

2011 年 1 月 11 日

目
录

实验一	外周血单个核细胞的分离	1
实验二	T 淋巴细胞亚群的测定	4
实验三	MTT 法检测淋巴细胞增殖	7
实验四	WST-8/CCK-8 法检测细胞增殖	9
实验五	CFSE 标记检测 T 细胞增殖	12
实验六	混合淋巴细胞反应	14
实验七	软琼脂集落形成实验	17
实验八	^{51}Cr 释放法测定 CTL 活性	19
实验九	细胞周期测定	22
实验十	细胞迁移能力分析	24
实验十一	流式细胞术检测细胞膜抗原	26
实验十二	激光共聚焦扫描显微镜技术分析细胞膜分子共定位	30
实验十三	流式细胞术检测胞内抗原	32
实验十四	免疫组织化学染色法	35
实验十五	ELISA 法检测细胞因子含量	38
实验十六	酶联免疫斑点分析	42
实验十七	细胞传代培养	45
实验十八	细胞冻存与复苏	47
实验十九	支原体污染的检测与预防	49
实验二十	人外周血单核细胞来源树突状细胞的制备	51
实验二十一	小鼠腹腔细胞及巨噬细胞的制备	53
实验二十二	小鼠脾细胞来源 NK 细胞的制备	55
实验二十三	小鼠胸腺来源 NKT 细胞的培养和检测	58
实验二十四	小鼠肝脏淋巴细胞的分离	61
实验二十五	肿瘤浸润 T 细胞的分离	63

实验二十六	小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的制备	65
实验二十七	兔抗人 IgG 多克隆抗体的制备	67
实验二十八	B 淋巴细胞杂交瘤的建株	69
实验二十九	单克隆抗体的分离纯化	73
实验三十	免疫印迹实验	75
实验三十一	免疫沉淀技术	79
实验三十二	荷瘤动物模型的建立	81
实验三十三	小鼠 GVHD 模型的建立	83
实验三十四	胶原性关节炎模型的建立	87
附录:	免疫学实验常用试剂及其配制方法	89

实验一

外周血单个核细胞的分离

(Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells)

一、目的要求

1. 掌握外周血单个核细胞分离的原理和实际操作方法。
2. 掌握离心机及显微镜等仪器的使用。

二、原理

外周血单个核细胞(PBMC)包括淋巴细胞和单核细胞,其体积、形状和比重与其他血细胞不同.红细胞和粒细胞比重较大,为1.092左右,淋巴细胞和单核细胞的比重为1.075~1.090,血小板比重为1.030~1.035.利用一种比重为1.077左右、接近等渗的分离液(Ficoll)作密度梯度离心,可使一定比重的细胞群按相应密度梯度分布,从而将各种血细胞加以分离.

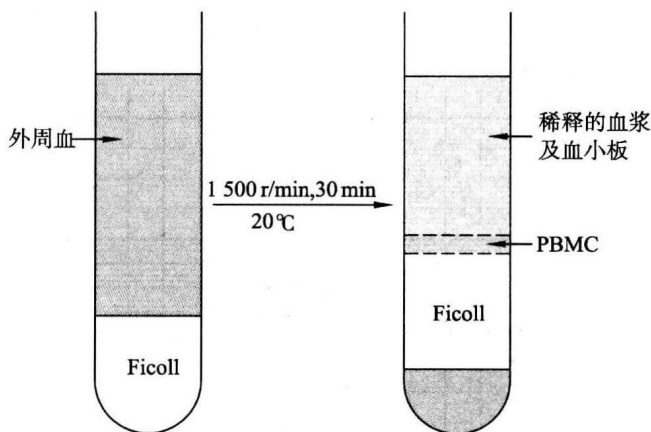


图 1-1 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞原理图

三、材料

1. 肝素抗凝的人外周血。
2. 淋巴细胞分离液(Ficoll)。
3. Hanks 液。
4. 倒置显微镜、离心机。

5. 华氏管、吸管、吸球、微量移液器、血球计数板及盖玻片等。

四、方法

1. 无菌抽取肝素抗凝外周血 10 mL, 放入离心管中, 用 Hanks 液稀释血液 1~2 倍, 并用吸管反复抽吸将其混匀, 避免产生气泡。

2. 吸取 3 mL Ficoll 加入华氏管中。

3. 用吸管吸取 6 mL 左右稀释血液, 在分离液 (Ficoll) 液面上 1 cm 处, 沿倾斜的试管壁缓缓加入, 使稀释血液重叠于分离液上, 二者之和不应超过离心管高度的 4/5。

4. 18~22 °C, 1 500 r/min 离心 30 min, 离心完毕后, 可见试管中分为 4 层: 最上层为血浆层, 富含血小板; 第二层为白膜层即单个核细胞层, 主要含 PBMC; 第三层为分离液; 第四层为粒细胞和红细胞, 沉于管底。

5. 将最上层血浆层吸弃, 用吸管沿试管壁周缘轻轻吸取单个核细胞层, 移入另一试管中。

6. 加入 5 倍以上体积的 Hanks 液, 充分混匀, 1 800 r/min 离心 10 min, 吸弃上清。

7. 重复洗涤一次, 1 400 r/min 离心 10 min, 吸弃上清。

8. 加入适量的 Hanks 液重悬细胞, 用微量移液器取细胞悬液约 20 μ L 置于血球计数板内。

9. 在显微镜下, 用 10 $\times$ 物镜观察计数板四角大方格中的细胞数 (细胞压线时, 计上不计下, 计左不计右, 如图 1-2 所示)。将计数结果代入下式, 得出细胞密度:

$$\text{细胞数/毫升原液} = (4 \text{ 大格细胞数之和} / 4) \times 10^4$$

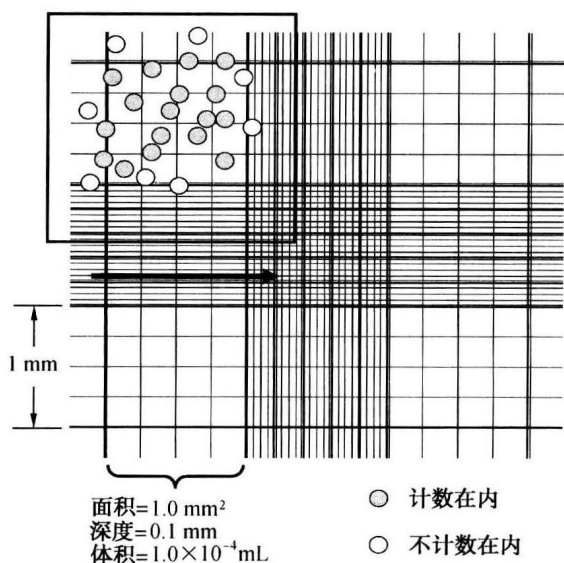


图 1-2 细胞计数板示意图

五、注意事项

1. 温度直接影响到 Ficoll 的比重和分离效果, Ficoll 的比重在 $18\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时为 1.077 ± 0.001 , 所以在实验之前, 需将所用 Ficoll 置于室温 $15\sim 20\text{ min}$, 使其温度达到 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右.
2. 在 Ficoll 液面上加入外周血时, 应缓慢加, 动作要轻, 以免冲散分离液面或与分离液混合而影响分离效果.
3. 吸取单个核细胞层时, 应避免吸出过多的上清液或分离液而导致血小板污染.
4. 取样计数前, 应充分混匀细胞悬液, 加样量不要溢出盖玻片或带有气泡以免影响计数的准确性.
5. 本法要求细胞密度不低于 10^4 个/mL.

六、思考题

1. Ficoll 分离离心时, 为什么要保持适当的温度、速度和时间?
2. 从 PBMC 中进一步分离 T、B 淋巴细胞, 可采用哪些方法?

(朱一蓓)

实验二

T 淋巴细胞亚群的测定

(Assay for T Cell Subpopulation)

一、目的要求

1. 掌握淋巴细胞不同亚群的常用表面标志.
2. 掌握 T 细胞亚群测定免疫荧光法的原理和操作方法.
3. 了解 T 细胞亚群测定的临床意义.

二、原理

淋巴细胞是参与机体免疫调节和免疫应答的主要细胞,可分为 T 淋巴细胞($CD3^+$)、B 淋巴细胞($CD19^+$)和 NK 细胞($CD16^+56^+$). 根据其是否表达 CD4 或 CD8 分子又可将 T 细胞分为 $CD3^+CD4^+$ T 细胞亚群和 $CD3^+CD8^+$ T 细胞亚群. 在正常情况下,人外周血中各群淋巴细胞的数目和相对比例都在一定的范围内. 因此,T 细胞亚群的测定有助于了解机体免疫状况及一些疾病的监测,对患者的免疫功能和预后作出判断以及指导治疗.

利用不同淋巴细胞亚群特异性的表面标志,采用不同荧光标记的单克隆抗体与淋巴细胞表面的抗原结合,通过流式细胞仪检测分析即可以把各种不同功能的淋巴亚群区分开来,进而得到各亚群的相对比例. 最常检测的亚群包括 T 细胞 [$CD4^+$ T 细胞($CD3^+CD4^+$)和 $CD8^+$ T 细胞($CD3^+CD8^+$)], B 细胞($CD19^+$)、NK 细胞($CD16^+56^+$)等.

1. 应用 CD3/CD19 区分 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞.

CD3 是 T 细胞表面标志抗原,CD19 是 B 细胞表面标志抗原. 因此,应用 CD3/CD19 双标试剂即可区分和鉴定 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞亚群.

2. 应用 CD3/CD4/CD8 鉴定 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞.

首先用 CD3 来圈定外周血 T 细胞群体,而后利用 $CD3^+$ T 细胞是否表达 CD4 和 CD8 将 T 细胞分为两个亚群: $CD4^+$ T 细胞($CD3^+CD4^+$)和 $CD8^+$ T 细胞($CD3^+CD8^+$).

3. 临床意义:

淋巴细胞各亚群之间的互相制约和互相辅助作用是维持机体正常免疫应答反应的保障. 因此,T 淋巴细胞亚群的测定是检测机体细胞免疫功能的重要指标,且

对某些疾病(如自身免疫性疾病、免疫缺陷性疾病、恶性肿瘤、血液病、变态反应性疾病等)的辅助诊断,分析发病机制,观察疗效及监测预后有重要意义. 中国人 T 淋巴细胞表型见表 2-1.

表 2-1 中国人 T 淋巴细胞占外周血单个核细胞的比值(参考值)

项 目	阳性率	绝对值(个/ μL)
T 细胞(CD3^+)	61%~85%	955~2 860
辅助性 T 细胞($\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$)	28%~58%	550~1 440
细胞毒性 T 细胞($\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$)	19%~48%	320~1 250
$\text{CD4}^+ \text{T}/\text{CD8}^+ \text{T}$	0.9~2.0	

注:同一 CD 抗原可被多个克隆的单克隆抗体识别,所测出的数值可略有不同,每个实验室应以自己实验室的正常数值为参考.

(1) $\text{CD4}^+ \text{T}$ 淋巴细胞减少:见于恶性肿瘤、遗传性免疫缺陷病、艾滋病、应用免疫抑制剂的患者.

(2) $\text{CD8}^+ \text{T}$ 淋巴细胞增多:见于自身免疫病、变态反应性疾病,如系统性红斑狼疮(SLE)、慢性活动性肝炎、肿瘤及病毒感染等.

(3) $\text{CD4}^+ \text{T}/\text{CD8}^+ \text{T}$ 值异常:艾滋病患者比值显著降低,多在 0.5 以下. 比值增高见于恶性肿瘤、自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、I 型糖尿病等. 此外还可用于监测器官移植的排斥反应,若移植后 $\text{CD4}^+ \text{T}/\text{CD8}^+ \text{T}$ 值较移植前明显增加,则可能发生排异反应.

三、材料

1. 抗凝人外周血.
2. FITC-鼠抗人 CD3 单克隆抗体、PE-鼠抗人 CD4 单克隆抗体、APC-鼠抗人 CD8 单克隆抗体和相应荧光标记的鼠抗人同型对照抗体.
3. pH 7.2, 0.01 mol/L PBS.
4. 溶血剂.
5. 流式细胞仪.
6. 温控离心机.
7. 细胞计数板、流式管、移液尖和移液枪等.

四、方法

1. 取新鲜抗凝人外周血 3 mL,加入溶血剂 0.5 mL 室温下孵育 10 min,离心弃上清.
2. 加入 PBS 10 mL,洗涤两遍.
3. 细胞计数后,将细胞密度调整至 10^6 个/mL,按 100 μL /Test 加入流式管.
4. 分别加入 FITC-鼠抗人 CD3 单克隆抗体、PE-鼠抗人 CD4 单克隆抗体、APC-鼠抗人 CD8 单克隆抗体,冰上孵育 15 min;设立 FITC-鼠抗人 CD3 单克隆抗

体、PE-鼠抗人 CD4 单克隆抗体、APC-鼠抗人 CD8 单克隆抗体-分别标记组和空白组以及同型对照标记组；抗体用量为 1 $\mu\text{g}/\text{Test}$ 。

5. PBS 洗涤两次，采用流式细胞仪分析。

结果如图 2-1 所示：

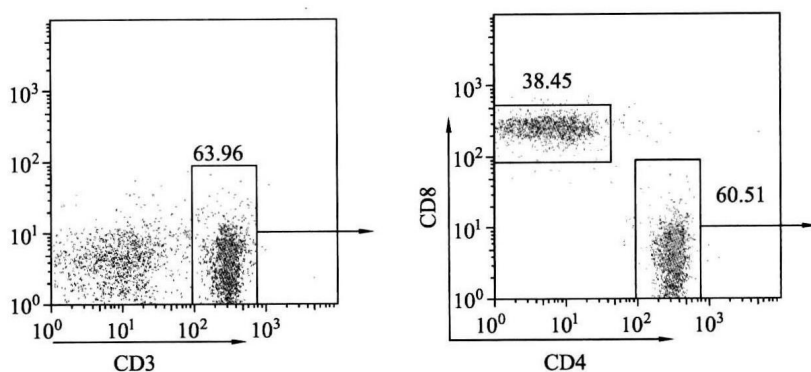


图 2-1 流式细胞术鉴定 CD4^+ T 细胞和 CD8^+ T 细胞

五、注意事项

1. 利用溶血剂充分裂解红细胞，以免影响抗体染色效果。
2. 多色荧光标记细胞后，利用流式细胞仪检测时需调节补偿以减少误差。

六、思考题

1. T 细胞还有哪些分类和亚群鉴定方法？
2. T 细胞亚群鉴定有什么临床意义？

(葛彦)

实验三

MTT 法检测淋巴细胞增殖

(Lymphocyte Proliferation Assay by MTT)

一、目的要求

1. 掌握淋巴细胞增殖实验的原理及用途.
2. 掌握淋巴细胞增殖实验常用的 MTT 法.

二、原理

MTT 化学名为 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide], 商品名为噻唑蓝, 是一种淡黄色可溶性物质, 可作为琥珀酸脱氢酶的底物. 在细胞培养终止前 4 h 加入 MTT, 参与线粒体能量代谢过程, 在琥珀酸脱氢酶和细胞色素 C 的作用下四唑环裂开, 使外源性淡黄色的 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色结晶——甲臆(formazan), 并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能.

二甲亚砜(DMSO)或异丙醇等有机溶剂能溶解细胞中的甲臆, 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定其光吸收值(OD), 因在一定细胞数范围内, MTT 结晶甲臆形成的量与细胞活化增殖程度呈正比, 可间接反映活细胞数量.

该方法已广泛用于一些生物活性因子的检测、大规模的抗肿瘤药物筛选以及肿瘤放射敏感性测定. 其优点为灵敏度较高、经济、操作简便、无放射性污染. 而缺点为敏感性不如 ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)渗入法, 溶解甲臆的有机溶剂对实验者有害.

三、材料

1. 待测细胞.
2. 细胞培养基 RPMI 1640.
3. 多克隆激活剂 PHA($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$).
4. 96 孔细胞培养板.
5. CO_2 培养箱.
6. MTT 工作液($5\ \text{mg}/\text{mL}$, 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液配制, 过滤除菌, $4\ ^\circ\text{C}$ 避光保存).
7. 50% DMSO.

8. 振荡器.
9. 酶标检测仪.

四、方法

1. 细胞准备:常规分离外周血单个核细胞(PBMC),具体方法参见实验一,用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全悬浮细胞,调整密度至 2×10^6 个/mL.

2. 细胞接种:取上述细胞悬液加入 96 孔细胞培养板中(100 μ L/孔),每个样品设三个复孔,加入 100 μ L 多克隆激活剂 PHA, 阴性对照孔中加入不含 PHA 的 RPMI 1640 培养基 100 μ L. 同时设空白对照孔:与实验平行不加细胞只加培养液. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱培养 3~5 d(可根据实验目的和要求决定培养时间).

3. 显色:实验终止前 4 h,每孔吸弃上清,加 MTT 溶液(20 μ L/孔)继续孵育 4 h后终止培养,小心吸取孔内培养上清液,每孔加 150 μ L DMSO,振荡器上温和振荡 10 min,使结晶物充分溶解.

4. 比色:选择 570 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔 OD 值,记录结果,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线.

5. 结果判断:将丝裂原刺激组和对照组的 OD 值代入如下公式,计算刺激指数(SI).

$$SI = \frac{\text{刺激孔的 OD}_{570} \text{ 值}}{\text{对照孔的 OD}_{570} \text{ 值}}$$

五、注意事项

1. 选择适当的细胞接种密度.
2. 避免血清干扰:一般选小于 10%的胎牛血清的培养液进行实验. 在显色后尽量吸尽孔内残余培养液.
3. 设空白对照,其他实验步骤保持一致,最后比色以空白调零.

六、思考题

1. 何谓 MTT 法? MTT 法有哪些用途?
2. 淋巴细胞增殖的检测常用方法还有哪些? 各自的优缺点如何?
3. 为什么要设复孔和空白对照?
4. 为保证结果准确还有哪些注意事项?

(葛 彦)

实验四

WST-8/CCK-8 法检测细胞增殖

(Cell Proliferation Assay by WST-8/CCK-8)

一、目的要求

1. 掌握细胞增殖实验的原理及用途.
2. 掌握细胞增殖实验常用的 WST-8 法.

二、原理

WST-8 化学名为 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐,是一种类似于 MTT 的化合物,在电子耦合试剂存在的情况下,可以被细胞线粒体内的脱氢酶(dehydrogenase)还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臌(formazan)(图 4-1). WST-8 法与 MTT 法的比较如表 4-1 所示.生成甲臌的数量与活细胞的数量呈正比.细胞增殖越多、越快,则颜色越深.用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定其光吸收值(OD),在一定的范围内,颜色的深浅和细胞数目呈线性关系,可间接反映活细胞数量.该方法已广泛用于一些生物活性因子的检测、大规模的抗肿瘤药物筛选以及肿瘤放射敏感性测定.

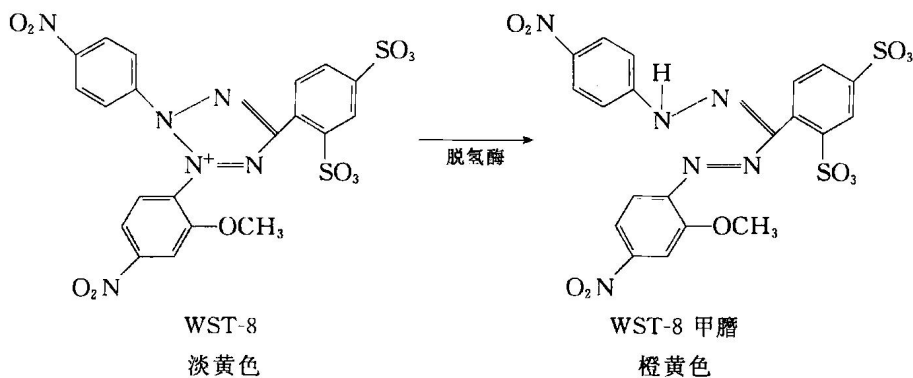


图 4-1 WST-8 检测原理

表 4-1 WST-8 与 MTT 法比较

	WST-8	MTT
还原产物可溶性	WST-8 被线粒体内脱氢酶还原生成的甲臆是水溶性的,可以省去后续的溶解步骤	MTT 被线粒体内脱氢酶还原生成的甲臆不是水溶性的,需要有特定的溶解液来溶解
重复性	不需要再吸出培养液加入有机溶剂溶解这个步骤,重复性好	去上清操作可能会带走小部分甲臆,重复性略差
操作	所有的检测步骤仅在同一块 96 孔板内完成,不必洗涤细胞,不必收集细胞,操作简便	略繁琐
测定波长	450~490 nm	550~600 nm
细胞毒性	无明显毒性. 加入 WST-8 显色后,可以在不同时间反复用酶标仪读板,使检测时间更加灵活,便于找到最佳测定时间	毒性较大
安全性	不需要有机溶剂溶解,相对安全	溶解甲臆的有机溶剂对实验者有危害
价格	昂贵	便宜

三、材料

- 1. 待测细胞.
- 2. 细胞培养基 RPMI 1640.
- 3. 多克隆激活剂 PHA(10 μg/mL) .
- 4. 96 孔细胞培养板.
- 5. CO₂ 培养箱.
- 6. CCK-8 试剂盒(主要试剂为 WST-8).
- 7. 50% DMSO.
- 8. 微量移液器.
- 9. 酶标检测仪.

四、方法

- 1. 细胞准备:常规分离外周血单个核细胞(PBMC),具体方法参见实验一,用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全悬浮细胞,调整密度至 2×10⁶ 个/mL.
- 2. 细胞接种:取上述细胞悬液加入 96 孔细胞培养板中(100 μL/孔),每个样品设 3 个复孔,加入 100 μL PHA, 阴性对照孔中加入不含 PHA 的 RPMI 1640 培养基 100 μL. 同时设空白对照孔:与实验平行不加细胞只加培养液. 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱培养 3~5 d(可根据实验目的和要求决定培养时间).
- 3. 显色:加入 WST-8(10 μL/孔). 由于每孔加入 WST-8 量比较少,有可能会因试剂粘在孔壁上而带来误差,建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀.
- 4. 培养:37 ℃, 5% CO₂ 培养箱培养 1~4 h,细胞种类不一样,形成的甲臆也不