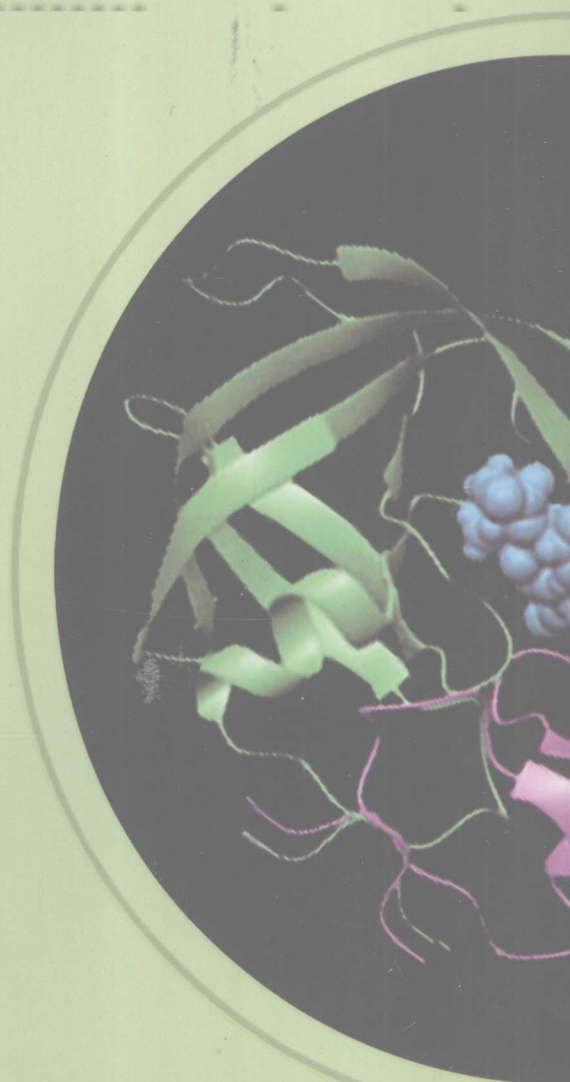


rotocols For Immunology

免疫学技术

葛海良 张冬青 主●编



科学出版社

www.sciencep.com

免疫学技术

2000-2001 年第 1 期

第 1 期
2000-2001 年第 1 期

免疫学技术

葛海良 张冬青 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书由上海交通大学医学院免疫学教研室、上海市免疫学研究所组织编写,涵盖了基础免疫学与临床免疫学的经典的实验技术。全书共分十六章,约 200 余实验技术,分别简要介绍各实验原理,同时就实验技术或方法中具体实施和要求作出详细说明,此外,在附录中还安排了与实验技术有关的常用试剂配制、仪器设备说明和免疫学相关网站等。

本书适用于从事免疫学专业的科研人员、教师和学生实验指导或课题研究,对相关专业的科研人员和学生也具有参考使用价值。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学技术 / 葛海良, 张冬青主编. —北京: 科学出版社, 2009

ISBN 978-7-03-024727-8

I. 免… II. ①葛…②张… III. 医药学: 免疫学 IV. R392

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 092403 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>

南京展望文化发展有限公司排版

上海敬民实业有限公司长阳印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 6 月第 一 版 开本: 889×1194 1/16

2009 年 6 月第一次印刷 印张: 24

印数: 1—3 300 字数: 730 000

定价: 48.00 元

序

免疫学技术是开展免疫学研究和实施免疫干预的重要手段。

就免疫学发展而言,免疫学技术与基础免疫学和临床免疫学共同构成了相互渗透的三个主要方面;就免疫学应用而言,免疫学技术是诊断免疫学的基础,并远远超越了免疫学本身,通过与细胞生物学、分子生物学、基因工程学、医学检验学、病理学等技术的结合,在整个生命科学的发展中已成为不可或缺的重要组成部分。特别在基础医学和临床医学中,免疫学技术发挥了举足轻重的作用,与疾病的诊断、治疗和揭示疾病的发病机制密切相关。再者,免疫学技术及其发展出的各种制剂和产物,又是实施诸多生物技术产业化的基础。

根据丰富的教学和科研实践,并参考国内外相关专著,上海市免疫学研究所和上海交通大学医学院免疫学教研室的各位教授,特别是一批活跃于教学和科研第一线的中青年学者和技术骨干,会同国内有关专家,编写了这本专著,希望为从事相关工作的同志们提供一本内容全面和深度恰当的免疫学技术参考书。由于内容直接来源于编著者自身的实践并融入了工作中的体会,这又是一本具有良好应用性和可操作性的工作手册。

《免疫学技术》一书既包括大量经典的(因而也是极为重要的)细胞免疫学、免疫化学和分子免疫学技术,也各有侧重地介绍了肿瘤免疫、移植免疫、感染免疫、血液免疫、免疫遗传、神经免疫、生殖免疫、自身免疫、过敏反应等领域所覆盖的技术。这本书多少成了该所主编的另一本理论性教程《免疫学原理》的姐妹篇。

祝贺《免疫学技术》一书的出版,也感谢主编葛海良教授、张冬青教授及全体作者为推动我国免疫学事业发展所做出的贡献。

周光炎

上海交通大学医学院

WHO 免疫遗传学和免疫病理学合作中心

2008 年 10 月

前 言

几经磨砺,寒至梅开,《免疫学技术》一书终于出版。

本书的宗旨为“实用和适用”相结合,经典和现代实验技术相匹配,既有常用的实验方法、又将现代免疫学发展的新技术与从事免疫学及相关学科的科研人员、教师和学生的基础和临床实验应用有机融合,使之体现出其“实用”和“适用”的特点,满足广大读者的需要。

全书共分为十六章,前八章(1~8章)重点介绍基础免疫学的实验技术,包括体液、细胞免疫和相关分子免疫学检测方法。后八章(9~16章)侧重于临床免疫学相关疾病的研究、诊断和应用的检测方法。在本书的附录中还选择性安排了实验技术中的常用试剂配方、实验仪器和部分动物模型以及免疫学相关网站等。

《免疫学技术》集成了上海市免疫学研究所和免疫学教研室同仁多年来在免疫学理论研究、教学实践以及与国内外同仁科研合作中拓展的基础和临床免疫学的实验技能和努力的结晶,在编写过程中注重可读性和实践指导性,适合于研究人员和学生课题研究的参考,也可选择部分内容作为教材使用。

尽管在编写和修改过程中各编者共同协作、竭尽所能、渴求完善,但毕竟学术水平和对实验技术了解的有限,书中存在的缺点和错误在所难免,恳请同行专家和读者提出宝贵意见。

值此之际,由衷感谢周光炎教授对本书编写的关注和指导,并作序言。惠于《免疫学技术》为其主编的研究生理论教材《免疫学原理》的姐妹篇。本书在编写过程中受到王福庆教授、王鸿利教授、童善庆教授以及上海交通大学免疫学教研室多位老师的支持和参与,在此一并致谢!

葛海良 张冬青

上海交通大学免疫学教研室

上海市免疫学研究所

2008年11月

目 录

序

前言

第一章	免疫细胞分离及检测技术	1
第二章	抗体与补体检测技术	29
第三章	免疫标记技术	54
第四章	细胞因子检测技术	75
第五章	CD 分子(黏附分子)检测技术	88
第六章	HLA 分型技术与移植免疫检测技术	97
第七章	抗原加工提呈与信号转导分子测定技术	130
第八章	分子免疫学相关技术	152
第九章	微生物感染免疫相关技术	169
第十章	血液免疫相关技术	193
第十一章	变态反应性疾病检测技术	241
第十二章	自身免疫性疾病检测技术	258
第十三章	免疫缺陷性疾病检测技术	284

第十四章 肿瘤免疫学检测技术	300
第十五章 生殖免疫学检测技术	318
第十六章 神经免疫学检测技术	327
附录一 实验室常规试剂配制	338
附录二 免疫学技术常用生化试剂配制	342
附录三 细胞免疫技术常用试剂配制	347
附录四 与分子生物学相关的常用试剂配制	352
附录五 常用单位换算公式、表格	354
附录六 免疫学实验中常用的小鼠品系	356
附录七 常用免疫学实验仪器	358
附录八 免疫学有关网站	367
参考文献	370
索 引	373

第一章 免疫细胞分离及检测技术

第一节 免疫细胞的分离

一、人外周血单个核细胞的分离和淋巴细胞的纯化

(一) 聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法

(二) 淋巴细胞的纯化

二、T细胞和B细胞的分离

(一) T细胞花环沉降法(AET-E花环)

(二) 尼龙毛分离法

三、T细胞亚群的分离

(一) 免疫吸附法

(二) 抗体和补体介导的特异性细胞毒作用分离法 (细胞毒分离法)

(三) 流式细胞术分离法

(四) 磁珠分离法——CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的分离

四、单核细胞的分离

(一) Colotta方法

(二) 密度梯度离心法

五、NK细胞的分离

(一) Percoll非连续密度梯度分离法

(二) MACS分选法

六、树突状细胞的分离和诱导培养

第二节 免疫细胞的数量检测

一、通过细胞表面标志检测各类免疫细胞的数量

(一) 免疫荧光染色技术

(二) 微量细胞毒试验

(三) 免疫酶染色技术(ABC法)

(四) 红细胞花环法

(五) 流式细胞术

(六) 抗原肽-MHC分子四聚体技术

第三节 免疫细胞功能的检测

一、淋巴细胞增殖能力的检测

(一) 丝裂原诱导的淋巴细胞增殖反应测定

(二) 混合淋巴细胞反应

(三) 可溶性蛋白质抗原诱导的细胞增殖反应

(四) 细胞因子诱导的淋巴细胞增殖反应

(五) CFSE细胞增殖试验

二、B细胞产生多克隆抗体的测定

(一) B细胞分泌抗体的检测(ELISA法)

(二) 反向溶血空斑形成试验

三、细胞毒性T细胞功能的测定

(一) 抗CD3单克隆抗体诱导的CTL功能检测

(二) 特异性抗原诱导的CTL功能测定

(三) 颗粒酶的胞泌作用分析

四、NK细胞的活性测定

(一) 乳酸脱氢酶(LDH)释放法

(二) ⁵¹Cr释放法

五、LAK/TIL细胞的活性测定

(一) 淋巴因子激活的细胞毒性细胞的诱导

(二) 肿瘤浸润淋巴细胞的分离

(三) LAK/TIL细胞的活性测定

六、巨噬细胞和树突状细胞的制备及功能测定

免疫细胞是一组极不均一的细胞群体,主要包括T淋巴细胞(下文简称T细胞)、B淋巴细胞(下文简称B细胞)、NK细胞、单核-巨噬细胞、树突状细胞(DC)及各种粒细胞等。在体内,各种免疫细胞既有分工,又相互协作和制约,共同完成对有害物质和异己物质的识别、应答和清除,从而维持机体内环境的稳定。因此,免疫细胞的数量和功能检测对于了解机体的免疫状态以及该细胞群体在免疫应答中的作用及其相互关系有着重要意义,在疾病的诊断、治疗和预后判断中也具有一定的应用价值。

免疫细胞的分离主要根据它们各自物理学性状(如细胞大小、密度、表面电荷、黏附能力)以及细胞表面标志等存在差异而得以实现,继单克隆抗体问世后又产生了细胞淘洗、磁珠分离和流式细胞仪分选等技术,从而使免疫细胞分离技术得到进一步地扩展。在实际应用中,分离方法的选用通常依研究目的的不同而异,获得高纯度、高活力的目的细胞是检测和研究各种免疫细胞表型特征及其功能的基础;而免疫细胞数量的检测及其亚群的功能测定可直接反映机体的免疫状态,因而是某些临床疾病诊断和治疗的主要依据。更为有意义的是,有些实验方法(如MLR等)已成为免疫调节研究中的实验模型被广泛应用,这对于探讨免疫细胞间相互作用、探索某些疾病的发病机制以及进行免疫调节研究等都是非常重要的。

第一节 免疫细胞的分离

一、人外周血单个核细胞的分离和淋巴细胞的纯化

人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)主要来源于外周血,其取材方

实验·思考

便,细胞含量丰富,利用聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)密度梯度离心法可简便而迅速有效地分离出 PBMC。在 PBMC 中含有 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞及各种粒细胞等,故 PBMC 的分离是各种免疫细胞纯化的基础。用 Percoll(聚乙烯吡咯烷酮包被的硅胶混悬液)不连续密度梯度分离液也可分离外周血中的不同细胞群体。

(一) 聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法

【实验原理】

PBMC 在体积、形状和比重等方面与外周血中的其他细胞有差异。红细胞和多核白细胞的比重分别为 1.093 和 1.092,而 PBMC 在 1.075~1.090 之间。因此,利用一种比重介于 1.075~1.092 之间的等渗分离液作密度梯度离心,可使血液中的各组分按不同密度重新分布。PBMC 因密度略低于分离液,主要位于分层液和血浆的交界面上,收集此层细胞,即可获得较高纯度的 PBMC。

【主要试剂与器材】

(1) 淋巴细胞分离液(密度 1.077 ± 0.001)、无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hank's 液(HBSS, pH 7.2~7.4)或磷酸盐缓冲液(PBS)。

(2) 肝素抗凝血。

(3) 10%胎牛血清(FCS)-RPMI-1640 培养液、2%台盼蓝染液。

(4) 15 ml 或 50 ml 锥底离心管。

(5) 血细胞计数板。

(6) 水平离心机、显微镜。

【操作步骤】

(1) 将肝素抗凝血用 HBSS(或 PBS)作 1:1~1:2 稀释。

(2) 吸取分离液 4 ml(或 15 ml)置 15 ml(或 50 ml)离心管中,用吸管将稀释血液沿管壁缓慢铺于分离液上,两者体积之比约为 2:1(见图 1-1)。

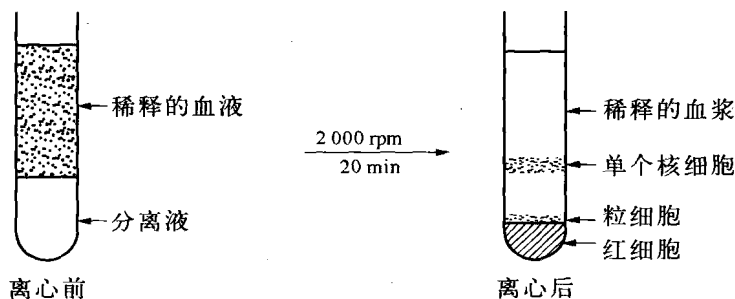


图 1-1 密度梯度离心前后的细胞分布

(3) 将离心管置水平离心机内,于室温条件下离心(2 000 rpm, 20 min),无制动停转。经离心后,细胞分布如图 1-1 所示。PBMC 即位于血浆与分层液的交界面,呈混浊的灰白色层。用吸管轻轻插至该细胞层,沿管壁四周吸出界面层细胞,移入另一试管内。

(4) 用足量 HBSS(或 PBS)洗涤 PBMC 2 次(1 500 rpm, 10 min)。末次离心后,吸尽上清。

(5) 将细胞重悬于 10% FCS-RPMI-1640 中,取样计数,并用 2%台盼蓝染液检测细胞活力,最后调整细胞至合适浓度。用本法分离的 PBMC 纯度可达 95%,其中淋巴细胞占 90%~95%,通常新鲜分离的 PBMC 活力应 >95%。

【注意事项】

(1) 分离液应避光保存于 4℃,取出后置室温,并待其温度上升至 18~20℃。临用前混匀。整个分离过程应在室温条件下完成(血液、HBSS 和离心机等也应尽量保持在 20℃左右),以免影响分离效果。

(2) 加稀释血液时,应叠加在细胞分层液上,不能搅混分离液面。

(3) 稀释血液可降低红细胞的凝聚,提高 PBMC 的收获率,但有些实验如要求保留血浆成分,则

不能稀释血液;如需保留自身血清则应采用脱纤维抗凝血,而不能用肝素抗凝血。

(4) 不同种属的 PBMC 的比重各不相同,如分离人的 PBMC 以 1.077 为最佳;小鼠为 1.088;大鼠为 1.087;马为 1.090,故不宜直接用比重为 1.077 的细胞分离液来分离动物的 PBMC。有时为提高 PBMC 的纯度和收获率,可适当调整分离液比重,调整方法可参考下列公式:

$$d_m = \frac{V_1 \times d_1 + V_2 \times d_2}{V_1 + V_2}$$

式中, d_m 为淋巴细胞分离液的比重; d_1 为以蒸馏水配制的 9% 的聚蔗糖溶液的比重,约为 1.020; V_1 为该溶液的体积; d_2 为以生理盐水配制的泛影葡胺溶液的比重,约为 1.20; V_2 为该溶液的体积。配制完成后,实测比重稍高于理论值时可加聚蔗糖溶液调整,反之可加泛影葡胺溶液调整,即可得到预期的分离介质。

(二) 淋巴细胞的纯化

单核细胞和分叶核白细胞具有黏附于塑料或玻璃表面及吞噬羟基铁等特性,而淋巴细胞则不能,由此可将其从 PBMC 中分离,藉以制备纯淋巴细胞悬液。常用的有以下几种方法。

1. 单核细胞的黏附去除法

(1) 用 10% FCS-RPMI-1640 将 PBMC 浓度调整至 2×10^6 /ml,并将细胞悬液(4~6 ml)移入 T25 细胞培养瓶(皿)内,置 5% CO_2 , 37℃ 温箱,孵育 120 min。

(2) 吸出非黏附的细胞悬液至一离心管内,并用预温的培养液荡洗培养瓶(皿),洗液一并移入同一离心管,即获得了去除单核细胞的淋巴细胞。

2. 去除单核细胞的磁铁吸引法

(1) 用 HBSS 将肝素抗凝血稀释 1 倍,加 10 ml 于试管内,再加 6% 右旋糖酐液 3 ml、羟基铁 1 g 和 3 mm 大小的玻璃珠 10 粒,混匀后置摇动台,37℃ 旋转摇动 10 min。

(2) 用磁铁在试管外将管内的铁屑吸引至管底,再将试管斜放 45°,于 37℃ 静置 20 min,取上清,即为去除单核细胞的淋巴细胞(巨噬细胞具有吞噬羟基铁功能)。

3. 羟基铁-乳胶分层液分离法

(1) 5% 右旋糖酐(用生理盐水配制)4 ml 与肝素抗凝血 20 ml 混匀,于室温静置 30 min,使红细胞沉降。

(2) 吸出富含白细胞的血浆层至一试管内,并加入等体积的 1% 羟基铁(用 HBSS 配制),两者混匀后加一滴乳胶颗粒(大小为 0.6 μm)悬液,将试管置摇动台,37℃ 下旋转摇动 60 min。

(3) 用细胞分离液分离上述混悬液(2 000 rpm, 20 min),由于吞噬了铁屑和乳胶颗粒的单核细胞比重较大,大多沉于管底,故可在分离液的界面上收获纯度为 95% 的淋巴细胞。

二、T 细胞和 B 细胞的分离

(一) T 细胞花环沉降法(AET-E 花环)

【实验原理】

人类成熟的 T 细胞表面具有独特的绵羊红细胞(SRBC)受体,即 E 受体(CD2),能与 SRBC 结合形成 E-花环,而 B 细胞则不能,经 Ficoll-Hypaque 分离液的密度梯度离心后,即可将二者分开。裂解 E-花环中的 SRBC,即可获得纯 T 细胞。而 B 细胞可直接取自分离液的界面。若用 2-氨基乙基硫酸溴化物(AET)处理 SRBC 后,可增加 E-花环的形成和稳定性,从而提高 T 细胞的分离效果。

【主要试剂与器材】

- (1) 纯化的淋巴细胞(或 PBMC)悬液($2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ /ml)。
- (2) 保存于阿氏(Alsever)液中的羊红细胞(SRBC,商品)。
- (3) 细胞分离液(比重 1.077 ± 0.001)、20% FCS-RPMI-1640、无菌双蒸水或 0.87% 氯化铵溶液。
- (4) AET 粉剂、生理盐水、3.5% NaCl 溶液。
- (5) 恒温水浴箱、pH 计。

实验·思考

(6) 其他材料同“外周血 PBMC 分离”。

【操作步骤】

(1) AET 溶液配制: 402 mg AET 溶于 10 ml 双蒸馏水中, 用 4 mol/L NaOH 调整溶液 pH 至 9.0, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 置 4℃ 保存。

(2) AET 处理 SRBC: 取 SRBC 悬液 5 ml, 加等体积生理盐水(或 PBS), 离心(2 000 rpm, 5 min), 重复 3~5 次。末次离心后, 将压积的 SRBC 轻轻摇匀, 使之完全分散。将 1 ml 压积 SRBC 和 4 ml AET 溶液混匀后, 置 37℃ 水浴 15 min, 间隔振摇。取出后用足量生理盐水(或 PBS)连续洗涤细胞 5 次(每次都须摇匀), 最后用 10% FCS-RPMI-1640 洗 1 次后, 将其配成 10% AET-SRBC 悬液, 置 4℃ 保存。使用前再稀释成 1% 的应用液。

(3) AET-E 花环制备: 将纯化的淋巴细胞(或 PBMC)悬液(2×10^6 /ml)与 1% AET-SRBC 等体积混合, 置 37℃ 水浴 15 min, 间隔振摇, 取出后分成数管(2~3 ml/管), 离心(800 rpm, 5 min), 4℃ 静置 45 min。

(4) T、B 细胞分离: 将 E-花环细胞悬液用分离液分离(方法同上), 吸取悬浮于分离液界面上呈云雾状的细胞层, 即为 B 细胞。将沉降在底部的 E-花环细胞, 用 HBSS 洗涤 1 次, 再加 3 ml 双蒸馏水低渗处理 3 s, 即加 3.5% 氯化钠溶液 1 ml, 使细胞悬液还原成等渗, 离心(1 000 rpm, 5 min), 该沉淀细胞即为 E 受体阳性的 T 细胞群。最后分别将 T、B 细胞用 20% FCS-RPMI-1640 重悬, 并调整细胞浓度。

对分离获得的 T、B 细胞纯度可分别用 CD3、CD19 单抗进行鉴定。一般而言, T 细胞纯度可达 90%, 而 B 细胞纯度则可能随原 PBMC 或淋巴细胞纯度不同而异。

【注意事项】

(1) AET 溶液须现用现配, 不宜久存。10% AET-SRBC 的保存时间不得超过 7 d, 并注意有否溶血, 若在新鲜处理时就发现溶血, 应检查原因, 并重新处理 SRBC 或换用其他批号的 SRBC。

(2) 尽量采用经 SRBC 吸收过的 FCS, 以免其所含的凝集素影响实验结果。

(3) 控制 AET-SRBC 与淋巴细胞(或 PBMC)之间的合适比例, 通常 1 ml 压积的 AET-SRBC 足够与 10^9 个淋巴细胞充分结合。本法的关键在于 AET-SRBC 的制备, SRBC 必须新鲜, 否则红细胞脆性将增大, 从而引起溶血。

(4) 控制花环形成、花环洗涤以及花环 SRBC 裂解等过程中的离心速度, 如转速过高可能会使细胞受损。

(5) 用细胞分离液分离 E-花环细胞时应在室温条件下进行。

类似的方法还有神经氨酸酶(NM)-E 花环分离法, 其原理和步骤基本与之相同。

(二) 尼龙毛分离法**【实验原理】**

B 细胞在 37℃ 时易黏附于尼龙毛纤维表面, 而 T 细胞则缺乏此能力, 借此可将 T、B 细胞分离。

【主要试剂与器材】

(1) 20% FCS-RPMI-1640、HBSS 和 0.2 mol/L 盐酸。

(2) PBMC 悬液或纯化的淋巴细胞悬液。

(3) 尼龙毛(聚酰胺纤维)和尼龙柱(半透明聚乙烯管, 直径 5~6 mm, 长 16 cm)。

(4) 37℃ 恒温箱、封口机、剪刀、小镊子。

【操作步骤】

(1) 尼龙毛柱的制备: 取聚乙烯软管, 一端用封口器作一斜角封口(成 30°角), 灌满 HBSS。取松散并经 HBSS 浸泡处理的尼龙毛, 均匀充填于该软管内(长 6~8 cm), 并在封口处剪一小口, 使液体流速为 30~40 滴/min。用 37℃ 预温的 10% FCS-HBSS 洗尼龙毛柱 3~4 次后, 置 37℃ 温箱备用。

(2) 细胞过柱: 将 0.5 ml PBMC(或淋巴细胞)悬液(2×10^6 /ml)加入柱内, 使其充满柱的中段, 横放尼龙毛柱, 并在柱的一端加少许 20% FBS-RPMI-1640, 置 37℃ 温箱, 孵育 45~60 min。

(3) T、B 细胞的收集: 取出尼龙毛柱, 置 10 ml 试管内, 并用 37℃ 预温的培养液冲洗尼龙毛柱,

收集 5 ml 洗柱液,其中富含非黏附的 T 细胞。再冲洗,丢弃 10 ml 液体。然后将柱置于另一试管内,用预冷的培养液边冲洗边挤压尼龙毛柱,收集洗柱液 5 ml,其中富含 B 细胞。

(4) 分别将 T、B 细胞以 1 500 rpm 离心 10 min,计数并调整细胞至所需浓度。

用本法分离 T 细胞,其纯度可达 80%~90%,活力大于 90%,分离效果较好;而 B 细胞纯度为 70%~80%,细胞收获较低,如操作不当,细胞活力难以保证,故 B 细胞的分离通常不建议用本方法。

【注意事项】

(1) 尼龙毛应预先用 0.2 mol/L 盐酸处理过夜,并用大量蒸馏水漂洗后晾干,撕匀后浸泡在 HBSS 中备用。装柱时,尼龙毛应均匀、松散、连续、不留气泡。装柱的长度应与分离的细胞量成正比。

(2) 在冲洗尼龙毛柱或进行过柱分离时,应保证无气泡存在。洗柱的速度要适当,因流速太快,冲击力太大,易将 B 细胞冲击,从而使收获的 T 细胞纯度降低,反之,则 T 细胞洗脱不净,影响 B 细胞的纯度。

(3) 注意控制挤压尼龙毛柱的力度,如用力过重将损伤 B 细胞,并有可能将黏附力较大的单核细胞随同 B 细胞一起挤出,而用力过轻,则细胞流出不全,影响 B 细胞收获率。

(4) 将细胞悬液加入柱内后,应立即补加 37℃ 预温的 20% FBS-RPMI-1640,以防尼龙毛干燥而影响细胞的活性。

对于 T、B 细胞的分离,除以上介绍的经典方法外,还可通过磁性激活细胞分离器(MACS)、流式细胞仪等分选技术和免疫吸附法进行,后两种方法比较适用于分离高纯度的 B 细胞,详细的操作步骤将在以下的“T 细胞亚群的分离”中作介绍。MACS 分离的基本原理和操作步骤可参见“NK 细胞的分离”。

三、T 细胞亚群的分离

(一) 免疫吸附法

【实验原理】

将 T 细胞与针对某一 T 细胞亚群特异性表面抗原的鼠抗人单克隆抗体共同孵育,再置于预先包被有羊抗鼠 Ig 的平皿中。此时结合有鼠抗人特异性抗体的 T 细胞亚群将吸附在平皿中,而其他 T 细胞则不被吸附,由此可将某一 T 细胞亚群从 T 细胞群体中分离出来。现以间接免疫吸附法为例,介绍用抗 CD4 单抗分离 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的方法。

【主要试剂与器材】

- (1) 抗鼠 IgG 抗体、特异性鼠抗人 CD4 单抗。
- (2) 塑料平皿。
- (3) Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.5)、PBS(0.15 mol/L, pH 7.2)。
- (4) 1% FCS-PBS、10% FCS-PBS、含利多卡因的 HBSS(4 mg/ml)。
- (5) 其他用于分离 PBMC 和 T 细胞的试剂和材料等。

【操作步骤】

(1) Tris-HCl 缓冲液稀释羊抗鼠 IgG 抗体至 10 μg/ml,并将该稀释抗体(10 ml)加至塑料平皿内,使液体完全覆盖皿底,室温下孵育 40 min 或 4℃ 放置 24 h(该包被平皿可在 4℃ 存放 1~2 周)。临用前,吸出未被吸附的抗体溶液,并用 5% FCS-PBS(约 5 ml)洗平皿 3 次,加 10% FCS-RPMI-1640(5 ml)于平皿内,置室温孵育 15 min。

(2) 用 PBS 将抗 CD4 单抗稀释至合适浓度,置 4℃ 备用。

(3) 分离外周血 PBMC,用 E-花环技术分离 T 细胞,将 T 细胞悬液以 1 200 rpm 离心 10 min,弃上清后加适量的抗 CD4 单抗,置冰浴 30 min。

(4) 取出后,加 5% FCS-PBS,洗涤 2 次,于 4℃ 下离心(1 200 rpm, 10 min),用 5% FCS-PBS(3 ml)重悬细胞。

(5) 将 T 细胞悬液倒入上述经洗涤后的平皿中,立即置 4℃ 孵育 30 min,取出后轻摇 30 s,再在同样条件下孵育 30 min。

实验·思考

(6) 吸出平皿内未被黏附的细胞悬液至一离心管内,用 1% FCS-PBS 小心清洗该平皿 3 次,洗液一并移入离心管内,洗脱液中即富含 CD8⁺ T 细胞。此为阴性选择法。

(7) 如需分离吸附于皿底的 CD4⁺ T 细胞则应继续用 1% FCS-PBS 洗平皿,直至平皿中不再留有未吸附的 CD8⁺ T 细胞为止。

(8) 在平皿内加入 5 ml 含利多卡因的 HBSS(4 mg/ml),室温静置 10~15 min,用吸管反复吹打直至黏附的细胞全部剥脱,用 HBSS 冲洗。将洗脱的细胞悬液移入另一离心管内即获得 CD4⁺ T 细胞。此为阳性选择法。

(9) 分别将 CD4⁺ 细胞、CD8⁺ 细胞悬液以 1 200 rpm 离心 10 min,用培养液重悬,取样计数并调整细胞至所需浓度,同时检测细胞活力(>95%),置 4℃ 备用。重复以上步骤可进一步提高分离细胞的纯度。

同样,如将 T 细胞悬液与 CD8 单抗反应,则阴性选择法获 CD4⁺ 细胞,阳性选择法获 CD8⁺ 细胞。

【注意事项】

- (1) 根据平皿底部的表面积适当调整细胞悬液的体积。
- (2) 采用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的培养液,以尽可能减少抗体与固相基质的非特异性结合。
- (3) 抗体的效价往往因批号而异,故每换一个批号的抗体都应预先测定其最适使用浓度。
- (4) 洗脱未吸附的 CD4⁺ 细胞时,动作应轻柔,加液时沿平皿边缘缓慢滴入,然后轻轻吸出,避免将吸管直接触底。
- (5) 从皿底洗脱分离的细胞由于已经特异性抗体刺激,可能成活化状态,在进行有关实验时应予以充分考虑。欲去除细胞悬液内某一细胞亚群时,用本法可能较为合适。

(二) 抗体和补体介导的特异性细胞毒作用分离法(细胞毒分离法)**【实验原理】**

人外周血 T 细胞按其表面标志而分为 CD4⁺ (Th/Ti) T 细胞和 CD8⁺ (Tc/Ts) T 细胞两个亚群,其细胞膜上分别表达 CD4 或 CD8 分子。当它们与相应的鼠抗人单克隆抗体结合后,在补体的参与下,可溶解相应的 T 细胞亚群,从而分离出另一群不能与特异性抗体结合的 T 细胞亚群(此为负选性分离法)。

【主要试剂与器材】

- (1) 无天然抗体和细胞毒性的幼兔补体。
- (2) 抗 CD8 单抗和抗 CD4 单抗。
- (3) 1% FCS-PBS、HBSS(无 Ca²⁺、Mg²⁺)和 RPMI-1640 培养液。
- (4) 人 PBMC 或纯化的 T 细胞悬液。
- (5) 细胞分离液(比重 1.077±0.001)。

【实验步骤】

- (1) 将细胞悬液(含 1×10⁶~1×10⁷ 个细胞)以 1 200 rpm 离心 10 min,弃上清,重悬于 0.5 ml 的 RPMI-1640 中,并与适量的抗 CD8 单抗反应,置冰浴 30 min。
- (2) 用 HBSS 洗涤细胞 2 次(1 000 rpm,10 min),以去除游离抗体。
- (3) 加入新鲜适量的兔补体使细胞重悬(加入的补体量使细胞浓度调整至 1×10⁷/ml),置 37℃ 水浴 1 h。
- (4) 离心(1 000 rpm,10 min)弃上清,即获得 CD4⁺ T 细胞。用 RPMI-1640 洗涤细胞 2 次(1 000 rpm,10 min),用完全培养液重悬细胞,取样计数并计算细胞毒作用的百分比:

$$\text{细胞毒作用(\%)} = \frac{\text{死细胞数}}{\text{活细胞数} + \text{死细胞数}} \times 100\%$$

同样可采用 CD4 单抗获取 CD8⁺ T 细胞。一般而言,若抗体选用适当,用本方法所分离的 T 细胞亚群的纯度与活率均大于 90%。

【注意事项】

- (1) 采集的补体要求由多只兔血清混合,并小量分装,-20℃ 保存,反复冻融将影响补体活

性。应通过预试验,剔除具天然毒性的兔血清,测定补体介导细胞毒作用的最佳工作浓度(通常为20%~50%)。

(2) 将抗体作二倍系列稀释,测定其在补体存在的条件下杀死靶细胞的最佳浓度。

(3) 注意设立对照组,即只加抗体而不加补体,只加补体而不加抗体,以排除实验系统中抗体或补体的非特异性细胞毒作用。

(三) 流式细胞术分离法

【实验原理】

流式细胞术(flow cytometry)分离法是借助于荧光激活细胞分离器(fluorescence activated cell sorter, FACS)对免疫细胞及其他细胞进行快速准确鉴定和分类的技术。其基本原理为:在一组混合的细胞群中,加入特异的针对特定靶细胞表面分子的荧光素标记的单克隆抗体,这种特异的单克隆抗体与其对应的抗原靶细胞分子结合,形成荧光抗体标记的靶细胞;标记细胞通过 FACS 高速流动系统,细胞排成单行一个个地流经检测区进行测定。当每一个细胞通过仪器的激光束照射时,细胞上的荧光就会被相应的激光束激活并发出对应的荧光和散射光,通过光电倍增管即可检测到从细胞表面发出的荧光。根据测得的散射光(scattered light)可得到细胞大小及颗粒状态的信息;而荧光发射光(fluorescence emissions)则反映了结合在细胞上的抗体信息,进而也就反映了该细胞表面相应分子的表达情况。

在流式细胞仪分离装置中,返回到计算机的信号,可用来产生一种电荷,这种电荷以特定准确的时间通过 FACS 的吸管孔,在与吸管孔的液体流相遇时,可将液体流打碎成只含一个细胞的微滴。含有电荷的微滴就会从主液体流中偏移,穿过一双极板。带正电荷的微滴被吸引至阴极,而带负电荷的微滴被吸引至阳极。以这种方式,特定的细胞亚群由于标记着不同的荧光抗体而带有不同的电荷,从而将目的细胞从混合的细胞群中分选出来。

【主要试剂与器材】

- (1) 人 T 细胞悬液。
- (2) 鼠抗人 CD4 单抗(或 CD8 单抗)。
- (3) FITC 标记的抗鼠 IgG 抗体(经 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌)。
- (4) 5% FCS - PBS(0.01 mol/L, pH 7.4), 高压灭菌。
- (5) FACS、微量加样器和无菌有盖小试管。

【操作步骤】

(1) 将 T 细胞悬液(约含 1×10^8 个细胞)用 PBS 洗涤 3 次(1 000 rpm, 10 min), 末次离心后, 吸尽上清液。

(2) 轻轻振荡试管, 使细胞完全分散。加入适当浓度的抗 CD4 单抗(或 CD8 单抗)200 μl , 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。

(3) 取出试管, 用 3~5 ml PBS 洗细胞 3 次(1 000 rpm, 10 min)。

(4) 轻摇试管, 使细胞分散, 并加入经稀释的 FITC 标记的抗鼠 IgG 200 μl , 混匀, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱反应 30 min。

(5) 取出试管, 用 3~5 ml PBS 洗细胞 3 次(1 000 rpm, 10 min)后, 加 3 ml PBS 重悬, 并将该细胞悬液移入专用的测试管内。

(6) 选择好有关测定参数, 调试好仪器, 细胞上机分离。经分离后的 T 细胞亚群用 RPMI - 1640 洗涤后, 重悬于合适的培养液中, 用于后续实验。

用流式细胞术分选目的细胞, 其活力和纯度通常都大于 95%。

【注意事项】

(1) 分离细胞前 1~2 d, 须用 75% 乙醇灌注 FACS 的细胞流动管道, 并用无菌生理盐水(或 PBS)反复冲洗。该步骤和细胞上机分离均应由专业技术人员操作。

(2) 正式实验前, 应分别测定一抗(抗 CD4 单抗)和二抗(FITC 标记的抗鼠 IgG)的最适使用浓度。

实验·思考

(3) 每次离心后,应尽量使沉淀的细胞混匀,严格控制离心速度和时间(1 000 rpm, 10 min),以免细胞压积过紧而形成团块,如有细胞团块,应预先用尼龙筛网过滤除去,以免上机分离时堵塞管道。

(4) 应尽可能在避光条件下制备细胞样品,且样品制备后最好立即上机分离,如不能及时分离,应用避光纸包裹后置 4℃ 冰箱,但放置时间不可过长,以免影响细胞活力。

(四) 磁珠分离法——CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的分离

CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞是一群表型和功能特异的 T 细胞,来源于胸腺,在人类和鼠类的胸腺、淋巴组织和外周血中占 CD4⁺T 细胞的 5%~15%。其在不同种属中呈进化保守性,人与小鼠及大鼠的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞不仅有类似的表型和分布,且均具有在体外抑制 T 细胞增殖/或维持自身免疫耐受的作用,能抑制过度的自身免疫应答,阻断感染引发的免疫病理过程,从而在肿瘤、移植、自身免疫病的免疫治疗领域有很大的应用前景。目前,用于分离 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的方法,主要由各试剂公司生产的试剂盒所提供的。Dyna1 公司推出的 CD4⁺CD25⁺ Treg 试剂盒用于自单个核细胞中分离人 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞。该试剂盒所分离的细胞产量高、纯度高,经清除 CD45RA⁺细胞后,其抑制效果更好。

【实验原理】

将人外周血 PBMC 先与试剂盒内的 CD4 阴选抗体混合物共同孵育,由于 CD4 阴选抗体混合物中包括抗 CD14、抗 CD8、抗 CD56、抗 CD19 和抗 Glycophorin A(erythrocytes/CD235a)的单抗,所以两者经孵育后,PBMC 中的 B 细胞、NK 细胞、单核细胞和 CD8⁺T 细胞、红细胞和 CD45RA⁺细胞分别被相应的抗体标记,并通过 Depletion Dynabeads 的加入,捕获这些抗体结合细胞,再利用磁力架将它们去除,即获得阴性筛选的 CD4⁺T 细胞。CD4⁺T 细胞通过与后续加入的 Dynabeads CD25 作用,则阳性选择获得 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞。最后去除分离 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的磁珠。

具体的操作步骤可参见有关试剂盒说明。

四、单核细胞的分离

在外周血中,要分离到足够数量的单核细胞,通常不用比重为 1.077 的细胞分层液,因为单核细胞的比重与淋巴细胞近似,且含量仅为 3%~8%,故很难将两者分开。而如用黏附法,则黏附细胞的剥离较难控制,剥离过度易造成细胞损伤,剥离不全使细胞回收率下降。以下介绍的两种方法可获得量多且纯度和活力都较好的单核细胞。

(一) Colotta 方法

【实验原理】

见 Percoll 非连续密度梯度分离法。

【主要试剂与器材】

- (1) 人外周血分离的 PBMC 悬液。
- (2) HBSS(无 Ca²⁺、Mg²⁺)、含 10% FCS 和 25 mmol/L HEPES 的 RPMI-1640(pH 7.2)。
- (3) 46% 浓度的 Percoll。

【操作步骤】

- (1) 将分离获得的 PBMC 用 HBSS 洗涤 2 次(1 000 rpm, 5 min),加 5 ml 完全培养液重悬。
- (2) 将细胞悬液缓慢叠加在 5 ml 的 46% Percoll 上,室温离心(2 200 rpm, 20 min);得到 3 个带:第一带为富集的单核细胞(83%);第二带含少量的单核细胞;第三带则为淋巴细胞。
- (3) 收集第一、第二带细胞,经洗涤后,重悬于培养液中。

【注意事项】

将细胞悬液叠加在 Percoll 分离液上时,应缓缓加入,保证二者间的比重界间不被破坏,否则会影响分离效果。

(二) 密度梯度离心法

【主要试剂与器材】

- (1) 肝素抗凝血。

(2) 不同比重的聚蔗糖-泛影葡胺细胞分层液:

A液: 90 g/L 聚蔗糖 15 ml, 加 500 g/L 泛影葡胺 10 ml(比重为 1.14)。

B液: 90 g/L 聚蔗糖 17.5 ml, 加 500 g/L 泛影葡胺 10 ml(比重为 1.13)。

C液: 90 g/L 聚蔗糖 20 ml, 加 500 g/L 泛影葡胺 10 ml(比重为 1.12)。

D液: 90 g/L 聚蔗糖 24 ml, 加 500 g/L 泛影葡胺 10 ml(比重为 1.08)。

【操作步骤】

(1) 在 15 ml 离心管内依次加入 A 液、B 液、C 液和 D 液各 2 ml, 制成梯度。

(2) 在 D 液上叠加肝素抗凝血(用 HBSS 稀释)约 2 ml, 室温下, 离心(1 000 rpm, 40 min); 血浆与 D 液的交界面即为单核细胞层(纯度可达 97%)。

(3) 用吸管小心吸取该细胞层, 经洗涤后, 重悬于培养液中备用。

【注意事项】

同“外周血 PBMC 的分离”。

五、NK 细胞的分离

NK 细胞即自然杀伤细胞(natural killer cells, NK 细胞), 是一群具有自然杀伤能力的大颗粒淋巴细胞, 无黏附作用。它不需要抗原激活, 也没有 MHC 限制性, 即能直接杀伤肿瘤细胞。NK 细胞可表达多种表面标志, 其中多数也可表达于其他免疫细胞的表面。目前, 通常将 TCR⁻、mIg⁻、CD56⁺、CD16⁺ 淋巴样细胞鉴定为 NK 细胞。NK 细胞主要分布于外周血和脾, 约占外周血的 3%。

(一) Percoll 非连续密度梯度分离法

【实验原理】

Percoll 是硅化聚乙酰胺吡咯酮的商品名, 为无毒、无刺激的新型密度梯度离心分离剂。由于 Percoll 在培养基中的颗粒大小不等, 其在离心过程中会自然形成密度梯度, 从而将不同密度的细胞分离出来。

【主要试剂与器材】

(1) 人外周血分离的 PBMC 悬液(浓度为 $0.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^8$ /ml)。

(2) Percoll 分离液、10% FCS-RPMI-1640, HBSS。

(3) 其他材料同“外周血 PBMC 的分离”。

【操作步骤】

(1) 调整 Percoll 分离液的渗透压到 285 mOsmol/kg H₂O。

(2) 配制下列不同密度的 Percoll 分离液, 范围为 40%~57.5%, 各梯度间相差 2.5%, 即 40%、42.5%、45%、47.5%、50%、52.5%、55%、57.5%。

(3) 将不同密度的 Percoll 从高到低轻轻叠加, 最后在 Percoll 分层液的顶部(40%)加 1 ml 细胞悬液。

(4) 离心(2 000 rpm, 30 min)。

(5) 小心吸取 40%与 42.5%、42.5%及 45% Percoll 之间的细胞层, 即富含 NK 细胞。

(6) 将细胞用 HBSS 洗 2 次(1 000 rpm, 10 min)后, 重悬于 10% FCS-RPMI-1640 中, 计数并调整细胞至所需浓度, 置 4℃保存(24 h 之内使用)。

【注意事项】

(1) 标本应新鲜, 宜在 4℃下分离细胞, 以保持细胞活力。

(2) 叠加分离液和细胞悬液时, 不能将各分层交界面搅混。

【结果观察】

通过形态学观察, 由 Percoll 密度梯度离心分离的 NK 细胞 80%为大颗粒淋巴细胞。细胞活力为 90%。

(二) MACS 分选法

【实验原理】

从外周血中分离出 PBMC, 以黏附法去除其中的单核细胞, 用尼龙毛柱法去除其中的 B 细胞, 余