

免疫学实习指导

高晓明 主编

免疫学系 集体编写

北京大学医学部基础医学院免疫学系

2004 年 12 月

序 言

本实习指导内容的安排与免疫学理论课的内容相衔接，主要包括免疫学的经典实验，即吞噬细胞吞噬功能检测、补体结合试验、T 淋巴细胞转化试验、免疫标记技术（膜表面免疫球蛋白的检测、ELISA）、溶血空斑试验、沉淀反应。细胞凋亡的检测为新增加的实验。

本指导旨在让学生在有限的时间内学到现代免疫学常用的实验方法和技术，并使学生通过实验课的学习进一步认识和巩固课堂所学的知识，同时培养学生的实际操作能力及分析问题、解决问题的科学思维能力。

本指导适用于我校 8 年制、6 年制、5 年制的基础、医疗、预防、口腔医学及护理、药学专业。不妥之处望指导教师和学生在使用过程中坦诚指出，以利进一步改进。

实验室规则

- 一、进入实验室实验要穿白大衣。
- 二、除实验中必用的学习用品外，其他物品不要放在实验台上。书包放桌屉内，衣帽挂衣架上。
- 三、实习室内不允许吃食物或饮料，严禁吸烟。
- 四、实验中一定要保持实习室安静，彼此讨论问题时不要大声喧哗、严禁打闹。
- 五、实验过程要按照教师要求进行操作，如有疑问要请教指导教师。
- 六、爱护实验器材，如有损坏应及时报告教师，需赔偿者按规定办理。
- 七、实验完毕，要清理台面。需冲洗的物品按要求冲洗，需收回的物品按要求摆放整齐送回教学准备室。
- 八、值日生要做好值日，离开实习室时，一定要有专人负责关好门窗、水源及照明设备。

免疫学实验课授课进度

本授课进度供承担免疫学实验教学（8 年制）任务的教师使用和参考，为保证实验课内容充实，有些实验课的内容安排可能超过规定的学时数，希望任课教师能合理安排时间，必要时，可将几个实验内容穿插进行，以保证教学进度。

- 1、单扩、双扩及免疫电泳（示教）共 2 学时
 - （1） 原理、试验方法及注意事项的讲解（15 分钟）
 - （2） 双扩铺板和打孔（30 分钟）
 - （3） 单扩打孔和单、双扩加样（30 分钟）
 - （4） 电泳示教及原理讲解（15 分钟）
 - （5） 小结 10 分钟
- 2、溶血空斑试验——小室液相法（PFC）和分析单扩和双扩结果 共 2 学时
 - （1） 原理、试验方法及注意事项的讲解（15 分钟）
 - （2） 取小鼠脾脏和制备单细胞悬液（30 分钟）
 - （3） 离心、灌注小室和封腊（30 分钟）
 - （4） 观察和分析单、双扩结果（20 分钟）
 - （5） 观察 PFC 结果和小结 10 分钟
- 3、吞噬细胞吞噬试验和免疫荧光染色实验 共 3 学时
 - （1） 原理、试验方法及注意事项的讲解（15 分钟）
 - （2） 吞噬细胞吞噬实验 （共 65 分钟）
 - A. 小鼠注射 SRBC （20 分钟）
 - B. 小鼠腹腔取巨噬细胞和涂片（30 分钟）
 - C. 观察结果（15 分钟）
 - （3） 免疫荧光染色实验（共 120 分钟）
 - A. 取小鼠脾脏和制备单细胞悬液及稀释计数 （30 分钟）
 - B. 荧光染色（40 分钟）
 - C. 离心备涂片（20 分钟）
 - D. 荧光显微镜观察（30 分钟）
 - （4） 小结 10 分钟
- 4、淋巴细胞转化试验和 ELISA 检测 IgE 试验（一）共 2 学时
 - （1） 原理、试验方法及注意事项的讲解（15 分钟）
 - （2） 取小鼠脾脏和制备单细胞悬液（30 分钟）
 - （3） 加样（30 分钟）
 - （4） ELISA 包板（20 分钟）
 - （5） 小结 10 分钟
- 5、ELISA 检测 IgE 试验（二）和观察分析淋巴细胞转化试验结果 共 3 学时

- (1) 原理、试验方法及注意事项的讲解 (15 分钟)
- (2) 洗板和加抗原 (20 分钟)
- (3) 37°C 孵育 (40 分钟)
- (4) 洗板、加酶标抗体 (20 分钟)
- (5) 37°C 孵育 (40 分钟)
- (6) 洗板、加底物 (20 分钟)
- (7) 显色 (20 分钟)
- (8) 加终止液和观察结果 (10 分钟)
- (9) 观察淋巴细胞转化结果 (15 分钟)
- (10) 取小鼠胸腺, 制备胸腺细胞悬液 (15 分钟)
- (11) 离心 (20 分钟)
- (12) Annexin V-FITC 抗体染色 (30 分钟)
- (13) 荧光显微镜观察结果 (30 分钟)
- (14) 小结 10 分钟

6、细胞毒试验及 E 花环形成 (示教) 和免疫器官 (示教) 2 学时

- (1) 原理、试验方法及注意事项的讲解 (15 分钟)
- (2) 细胞毒试验加样 (30 分钟)
- (3) 37°C 孵育 (30 分钟)
- (4) 示教 E 花环 (15 分钟)
- (5) 示教免疫器官——胸腺及脾脏 (15 分钟)
- (6) 小结 10 分钟

目 录

实验一、免疫器官（示教）	（1）
实验二、单向、双向免疫琼脂扩散和免疫电泳（示教）	（4）
实验三、吞噬细胞功能检测	（10）
实验四、B 淋巴细胞膜表面免疫球蛋白（SmIgG）的检测——直接免疫 荧光法	（12）
实验五、溶血空斑形成（液相小室法）试验（PFC）——体外抗体形 成细胞检测	（14）
实验六、T 淋巴细胞转化试验（MTT 法）	（16）
实验七、酶联免疫吸附试验（ELISA）	（18）
实验八、细胞凋亡检测	（21）
实验九、补体介导的细胞毒试验	（26）
实验十、E 玫瑰花环形成试验（示教）	（28）

实验一、免疫器官

(Organs of the Immune System)

(本实验属于示教内容)

免疫器官包括中枢免疫器官和外周免疫器官。在哺乳类动物，中枢免疫器官包括胸腺和骨髓；在禽类，中枢免疫器官包括胸腺和法氏囊。外周免疫器官有淋巴结、脾脏等。

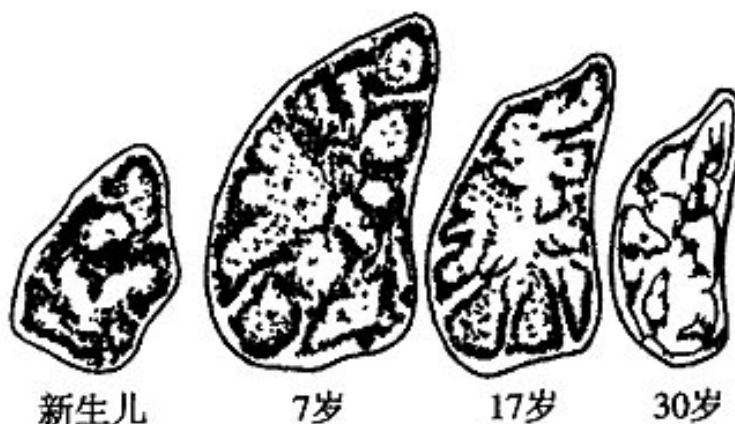
胸腺 (Thymus)

胸腺位于胸腔纵隔上部，胸骨后方。胸腺在胚胎期及出生后 2 岁内生长很快，体积较大；2 岁后到青春期发育仍很快；但青春期后开始萎缩，逐渐由脂肪组织所代替，它在机体免疫功能的建立上占有重要地位。骨髓内有部分淋巴细胞迁移到胸腺内，在胸腺素的影响下，增殖分化成为具有免疫功能的 T 细胞，再经血流输送到淋巴结和脾等周围免疫器官发挥免疫功能。若新生期切除胸腺或胸腺生长肿瘤，可导致细胞免疫功能显著下降，常因感染而死亡。

胸腺的组织结构：胸腺分左右两叶，表面覆盖有一层结缔组织被膜，被膜深入实质将实质分割成若干小叶。胸腺小叶的外层为皮质，内层为髓质。胸腺皮质区分为浅皮质区和深皮质区。皮质区内 85%-90% 的细胞为未成熟的 T 细胞。髓质区内有大量的胸腺上皮细胞和稀疏分散的较成熟的胸腺细胞、单核-巨噬细胞和 DC。

标本：胎儿胸腺、胸腺组织切片

图 1. 胸腺



不同年龄期的胸腺示意图

骨髓(Bone marrow)

骨髓位于骨髓腔中，分为红骨髓和黄骨髓。红骨髓有造血功能，由造血组织和血窦构成。造血组织主要由基质细胞和造血细胞组成。基质细胞包括网状细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞等。骨髓是各类血细胞和免疫细胞发生的场所。骨髓又是 B 细胞分化成熟的场所和体液免疫应答发生的场所。因此骨髓既是中枢免疫器官又是外周免疫器官。

标本：骨髓组织切片

法氏囊 (Bursa of Fabricius)

在禽类，法氏囊是位于泄殖腔上方的一个囊状物，内充满着淋巴组织，其中淋巴细胞不断受囊素的影响，发育成 B 淋巴细胞。若新生期切除法氏囊，抗体的形成将受影响，而细胞免疫功能不受影响。对于 B 淋巴细胞发育而言，禽类的法氏囊具有哺乳类动物骨髓相似的作用。

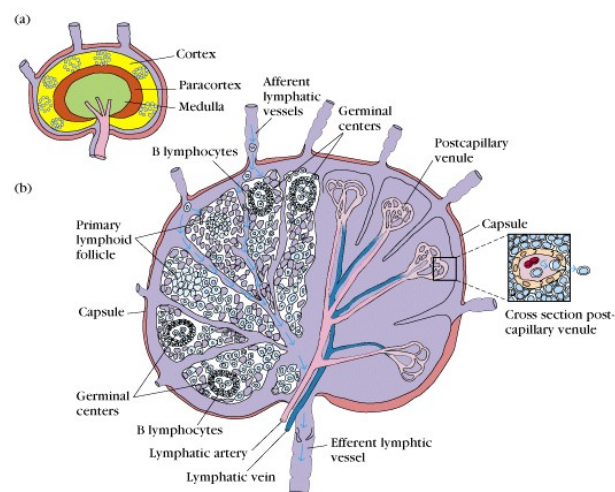
标本：鸡法氏囊

淋巴结 (Lymphoid node)

淋巴结的实质分为皮质区和髓质区两部分。皮质区分为浅皮质区和深皮质区两部分。浅皮质区靠近被膜下，是 B 细胞定居的场所，称为非胸腺依赖区 (thymus-independent area)。该区内大量 B 细胞聚集形成淋巴滤泡，或称淋巴小结。浅皮质区与髓质之间的深皮质区是副皮质区，是 T 细胞定居的场所，称为胸腺依赖区 (thymus-dependent area)。髓质区有髓索和髓窦组成，髓索由致密聚集的淋巴细胞组成，主要为 B 细胞和浆细胞。

标本：人淋巴结切片

图 2. 淋巴结

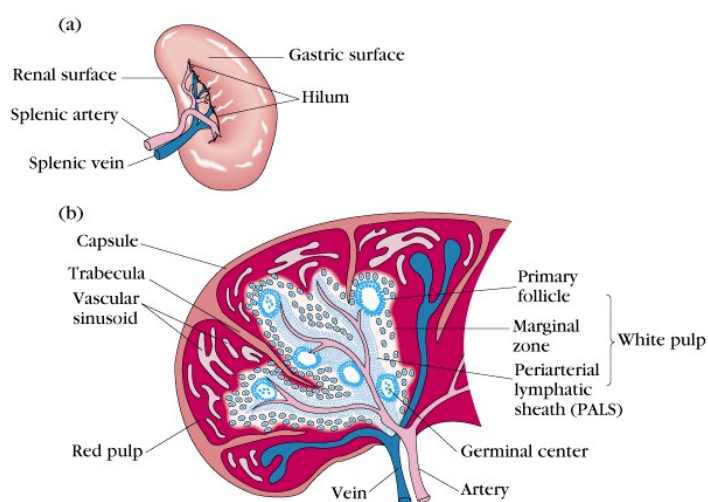


脾 (Spleen)

脾实质可分为白髓和红髓。白髓为密集的淋巴组织，为 T 细胞区。白髓与红髓交界的狭窄区域为边缘区，内含 T 细胞、B 细胞和较多 M ϕ 。红髓有髓索和髓窦组成。髓索为索条状组织，主要含 B 细胞、浆细胞、M ϕ 和 DC。

标本：人脾组织切片

图 3. 脾脏



实验二、单向、双向免疫琼脂扩散和免疫电泳（示教）

（Single Immunodiffusion and Double Immunodiffusion）

可溶性抗原与相应抗体以合适的比例发生特异反应时，在一定温度和电解质存在的条件下，形成肉眼可见的沉淀物，称为沉淀反应。沉淀反应的抗原可以是多糖、蛋白质、脂类等。

根据抗原与抗体的不同条件及其它因素，沉淀反应可以分为以下三种主要形式。即：环状沉淀反应(ring precipitation reaction)，凝胶中沉淀反应(precipitation reaction in gel)，如单向扩散、双向扩散、对流电泳、免疫电泳以及微生物学实验中的絮状沉淀反应(flocculation precipitation reaction)，如梅毒血清检验中的康氏（Kahn）及克莱氏（Kline）试验以及检测白喉杆菌毒力的体外试验-Elek 氏试验，检测毒素或类毒素的絮状沉淀单位测定等。本实验主要介绍凝胶中的沉淀反应。

（一）单向免疫扩散(Single immunodiffusion)——人群血清 IgG 正常值测定

一、基本原理

在含有特异抗体的琼脂板中打孔，并在孔中加入定量的抗原，当抗原向周围扩散后与琼脂中抗体相结合，即形成白色沉淀环，其直径或面积与抗原浓度呈正相关。同时用标准抗原或国际参考蛋白制成标准曲线，即可用以定量检测未知标本的抗原浓度(mg/ml 或 U/ml)。

应用这一实验方法可检测正常人群或患者血清中 IgG、IgA 及 IgM 的水平。

二、实验材料

2%离子琼脂或生理盐水琼脂（内含 2%NaN₃）。

标准马抗人 IgG 血清（抗体）（北京生物制品研究所生产）

工作标准参考蛋白（北京生物制品研究所生产）

pH7.2 PBS.

打孔器（孔径 3mm）及打孔模板

微量加样器

湿盒（容器内加湿纱布或泡沫塑料）

已制备好的含有 1%马抗人 IgG 抗体的琼脂板

1/50 稀释的单人份待检血清标本

三、实验方法

（一）标准曲线的制备：示教

1. 按照玻片的大小，准备制做琼脂板所需要的 1%离子琼脂。首先分装其 1/2 量的 2%盐水琼脂，例如，用普通载玻片制做时需 1%离子琼脂 4ml，在分装 2%盐水琼脂时即为 2ml。溶化后置 56°C~60°C 水浴中平衡温度备用。

2. 稀释抗体，用 pH7.2 的 PBS 稀释标准抗人 IgG 抗体，终浓度为抗体效价的一倍。例如，血清效价为 1/140，原浓血清即应按 1/70 稀释。并分装试管，其分装量应与 2%盐水琼脂量相等。

3. 制备琼脂板：将已稀释的抗人 IgG 抗体于 56°C 水浴中预热约半分钟，再倾注于已溶化并维持 56°C~60°C 的 2%盐水琼脂管中，用拇指将管口堵紧。翻转试管 1-2 次，将抗体与琼脂混合均匀（注意：抗体与琼脂混合时切勿产生气泡），即刻倾注于玻片上，待凝固后即可。

4. 打孔：将琼脂板置于模板上，在同一直线上用打孔器打孔 5 个，孔距 10mm。

5. 稀释不同浓度的标准参考蛋白（工作标准）：应根据制品说明进行稀释，例如：工作标准中免疫球蛋白含量，IgG 为 100 单位/ml，80.4 微克/单位，其稀释范围为 1/10、1/20、1/40、1/80 及 1/160。

6. 加样：将已稀释的不同浓度的工作标准蛋白依次用微量加样器每孔加入 10 μ l。（注意：每一稀释度均应更换塑料吸头）。

7. 将加样的琼脂板放湿盒中，置 37°C 温箱，24 小时后观察结果。

8. 用量角规测量并记录沉淀环直径，然后以沉淀环直径为纵座标，以标准参考蛋白量（单位/ml）为横座标，绘制成标准曲线。

（二）人血清中 IgG 正常值的测定：

1. 将已制备好的抗体琼脂板置打孔模板上，每一琼脂板可打孔 4 个（孔径 3mm，孔距 10mm）。

2. 将单位正常人血清用 pH7.2 PBS 分别作 1/50 稀释。

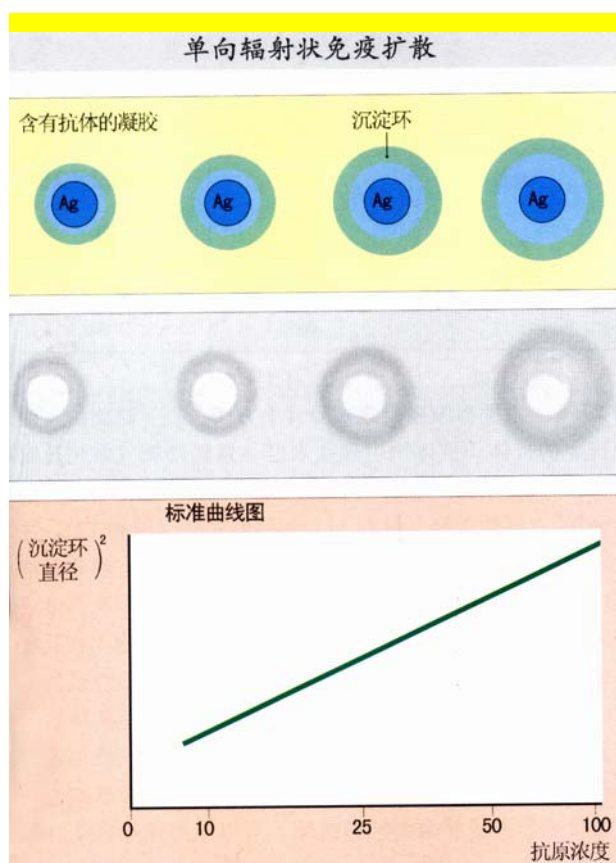
3. 用微量加样器分别取 1/50 稀释的单人份血清标本 10 μ l 加入孔中，每份标本应各加两孔。

2. 作好标记放湿盒中，置 37°C 温箱，24 小时后观察结果。

四、实验结果

测量各份标本的沉淀环直径并记录结果，然后用标准曲线测出每份标本所含 IgG 的量（U/ml），并换算为 mg/ml。

统计全实验室实验结果并计算出均值，写出较完整的实验报



单向免疫扩散示意图

五、注意事项

1. 在制做标准曲线时，为尽量减少误差，至少应做两份以上标准板。
2. 加样时，吸取每份标本均应更换塑料吸头。

(二) 双向免疫扩散 (Double immunodiffusion)—抗原分析

一、基本原理

双向免疫扩散是指可溶性抗原与相应抗体在琼脂介质中相互扩散,彼此相遇后形成一定类型的特异性沉淀线。沉淀线的特征与位置不仅取决于抗原抗体的特异性及相互间比例，而且与其分子大小及扩散速度相关。当抗原、抗体存在多个系统时，可呈现多条沉淀线乃至交叉反应。依据沉淀线的形态、清晰度及位置可了解抗原或抗体的若干性质，如浓度、特异性等。

二、实验材料

1%琼脂（生理盐水配制）管，每管约 4ml

载玻片

打孔器及打孔模板

微量加样器及塑料吸头

抗原：0.5 μ g/ml 牛血清白蛋白（BSA）、0.5 μ g/ml 人血清白蛋白（HSA）

抗体：兔抗人血清白蛋白加兔抗牛血清白蛋白

湿盒

三、实验方法

1. 将已溶化的 1% 盐水琼脂管放 58 $^{\circ}$ C -60 $^{\circ}$ C 水浴箱中平衡温度备用。

2. 将载玻片置于水平桌面上，倾注已溶化琼脂 3.5-4ml，使成厚度约 1.5mm 琼脂板（注意：倾注速度不要过快，以免琼脂溢出载玻片；倾注过程要连续以保证琼脂板均匀、平滑）。

3. 琼脂凝固后，将打孔模板置于琼脂板下，然后用打孔器打孔，根据不同需要可制成三角型、方阵型或梅花型。本次试验采用三角型（如图），即每三个孔组成一个三角型。（因本次实验所制备的琼脂板均以载玻片为底板，故根据其大小只能采用三角型且每一琼脂板也只能打孔两组。否则，如采用方阵型或梅花型则因琼脂板边缘琼脂厚度不够而使周边各孔所加抗原或抗体量不足或溢出，而制成三角型三组，因各孔相距过近，抗原、抗体相互渗透扩散将影响结果的判断）。

4. 如图 2 所示，用微量加样器加 10 μ l 抗体于各组一孔中，每组所余两孔各按抗原 1、2 为一组，3、4 为二组，5、6 为三组，分别各加入 10 μ l。注意每加一样品均需更换吸头，以防止交叉污染，影响实验结果。

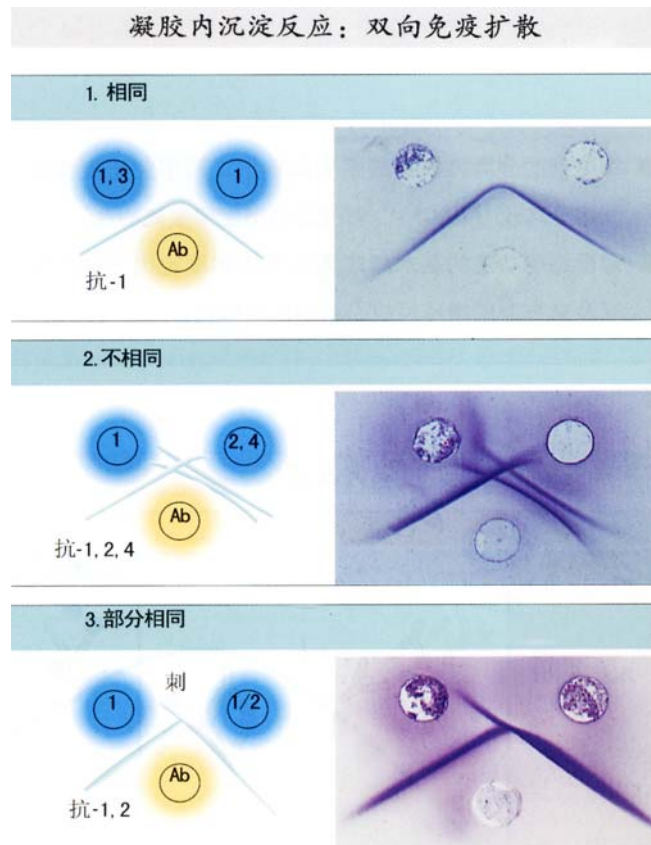
5. 作好标记，放湿盒中，置 37 $^{\circ}$ C 温箱，24 小时后观察结果。

四、实验结果

1. 融合性沉淀弧，说明两孔中抗原相同，为同一性反应（图 2-1）。

2. 两沉淀线独自形成并形成交叉，说明两孔中的抗原完全不同，为非同一性反应（图 2-2）。

3. 融合性沉淀弧出现支线，或同时有另一条或两条沉淀线，说明两孔中抗原有相同成分又有不同成分，此为部分同一性反应（图 2-3）。



双向免疫扩散沉淀线（图 2）

（三） 免疫电泳(Immunoelectrophoresis)-示教

一、基本原理

免疫电泳法是将凝胶电泳与双向免疫扩散两种技术相结合的一种实验方法。在电场作用下标本中各组分因电泳迁移率不同而分成区带，然后沿电泳平行方向将凝胶挖一沟槽，将抗体加入沟槽内，使抗原与抗体相互扩散而形成沉淀线。根据沉淀线的数量、位置及形状，分析标本中所含各组分的性质，本实验常用于抗原分析及免疫性疾病的诊断。

二、实验材料

1%离子琼脂（pH8.6 巴比妥缓冲液加入等量蒸馏水，再加入 1%琼脂。溶解后用脱脂棉过滤，分装，实验前加热溶解置 56℃-60℃水浴箱中平衡温度备用）。

免疫电泳用玻片

待检血清

人 IgG(1mg/ml)

抗人全血清抗体（购自北京中山公司）

微量加样器及塑料吸头

尖吸管及橡皮吸头

打孔器、解剖刀、尺、打孔模板、湿盒等。

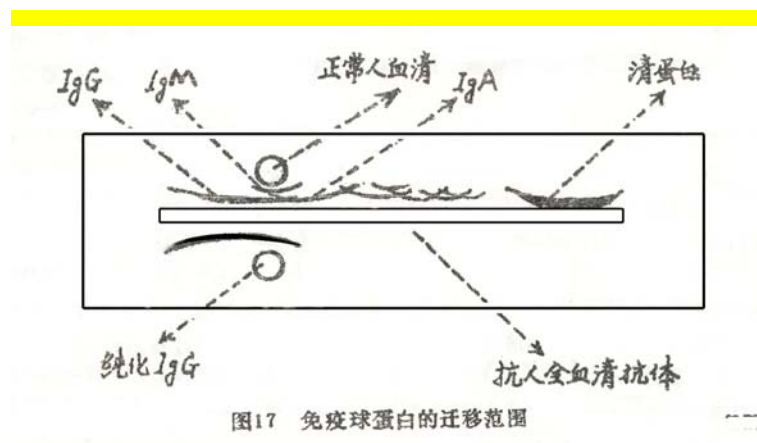
电泳仪：将 pH8.6 巴比妥缓冲液注入电泳槽内（注意正负极各槽内所加入的量应在同一水平）。并将滤纸裁至适当长度和宽度以备搭桥使用。

三、实验方法

1. 将溶化的 1% 离子琼脂倾注于玻片上制成琼脂板。
2. 琼脂板冷却凝固后，按照模板于挖槽线上下两侧各打一个孔，并分别用微量加样器加入待检血清及人 IgG 各 15ul。
3. 将琼脂板置于电泳槽内，注意电泳标本应放负极 “-” 一侧。并将已浸透缓冲液的滤纸一端覆盖于琼脂板两侧各约 0.5cm, 另一端浸于电泳液中。
4. 接通电源，电压、电流及电泳时间应视仪器性能而定。一般电势梯度 6 V/cm，电流每板 20mA，泳动时间 1-2 小时。
5. 电泳完毕，关闭电源，取出琼脂板，按模板位置用解剖刀挖横槽。用特制尖吸管加入抗人全血清抗体。
6. 将琼脂板置于湿盒中，于 37℃ 温箱中扩散 24 小时。

四、实验结果

根据沉淀弧的位置及形状，参照免疫球蛋白迁移范围示意图，识别主要 Ig。



实验三、吞噬细胞吞噬功能检测

(Assay of the Phagocytic Function of Phagocyte)

一、基本原理

吞噬细胞具有对异物(细菌、绵羊红细胞、鸡红细胞等)吞噬和消化的功能，在机体非特异性免疫中发挥重要作用。

小鼠腹腔内注射硫代乙醇酸钠，可刺激巨噬细胞的聚集。四日后小鼠腹腔内注入羊红细胞悬液，一小时后解剖收集腹腔吞噬细胞，染色、镜检可观察对羊红细胞的吞噬现象。通过计算吞噬百分比或吞噬指数可测定吞噬细胞的吞噬功能。

二、材料

1. ICR 小鼠（北京大学医学部实验动物中心提供）
2. PBS 缓冲液
3. 3%硫代乙醇酸钠
4. 1%羊红细胞悬液（北京大学医学部实验动物中心提供）
5. 解剖器材、注射器、尖吸管、橡皮吸头、小试管及载玻片、
6. 瑞氏染液、甲醇

三、实验方法

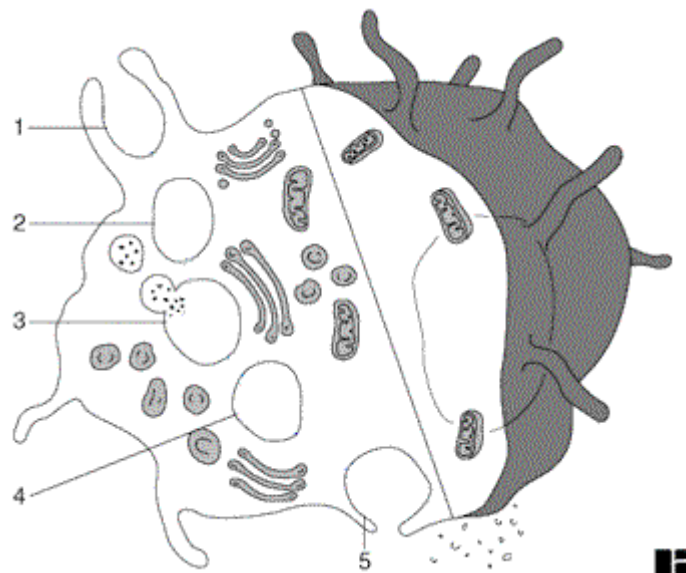
1. 实验准备：用无菌注射器吸取 3%硫代乙醇酸钠 3ml，注射于小鼠腹腔内。
2. 四日后，注射 1%羊红细胞悬液 1ml 于小鼠腹腔内。
3. 注射 1 小时后，将小鼠用颈椎脱臼法处死，解剖暴露腹腔，于腹腔靠上部位，用镊子轻轻夹起腹膜，将腹膜剪一小口，用尖吸管注入 5ml 预温的 PBS，同时用手反复揉搓腹腔约 1—2 分钟，以便尽可能多地冲洗出小鼠腹腔的吞噬细胞。
4. 用尖吸管吸取腹腔液，置一洁净试管内。
5. 用尖吸管将腹腔液吹打均匀(尽量避免产生气泡)，吸取一滴滴于载玻片上，加盖玻片镜检。
6. 观察结果，也可以将腹腔液涂片，平放于湿盘内，37℃，孵育 30 分钟。取出涂片，用预温的 PBS 冲洗 3 次，然后用甲醇固定 1 分钟，以瑞氏染液 1 份加 pH6.4 的 PBS 2 份混匀后，滴于涂片上染色 5-10 分钟，以蒸馏水冲洗（切勿先将染液倾去）后，待干，镜检。

四、实验结果

观察小鼠腹腔巨噬细胞和中性粒细胞对羊红细胞的吞噬现象，计算吞噬百分比，即每 100 个吞噬细胞中吞噬有羊红细胞的细胞数。也可用吞噬指数表示，即将 100 个吞噬细胞中所吞噬羊红细胞的总数除以 100，即为吞噬指数。吞噬百分比和吞噬指数一般是平行的。

五、注意事项

- (1) 充分揉搓腹腔，尽可能将吞噬细胞冲洗下来。
- (2) 用尖吸管吸取腹腔液时，尽量避开腹腔脏器，避免损伤血管引起出血，影响实验结果。
- (3) 用瑞氏染液染色时，切勿先将染液倾去后再冲洗，以免染液中细小颗粒附着于玻片上影响标本的清晰度。



实验四、 B 淋巴细胞膜表面免疫球蛋白 (SmIg) 的检查

直接免疫荧光法

(Direct Immunofluorescent Assay of B-lymphocyte Surface Membrane Immunoglobulin)

一、实验原理

SmIg 是 B 细胞的抗原识别受体,也是 B 细胞特异的表面标志,用直接免疫荧光法可检查出 SmIg。用荧光素标记的抗 Ig 抗体,在一定条件下与淋巴细胞混合,荧光素标记的抗 Ig 抗体可以与 B 细胞表面的 Ig 结合,在荧光显微镜下观察可见 B 细胞膜上出现荧光。此方法可用来鉴定 B 淋巴细胞。

二、实验材料

1. ICR 小鼠 (北京大学医学部实验动物中心提供)
2. 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的兔抗小鼠 Ig 抗体 (购自 BD 公司)
3. Hank's液: pH7.4(内含 0.1%NaN₃)
4. 台式离心机
5. 离心管、吸管、移液管等

三、实验方法

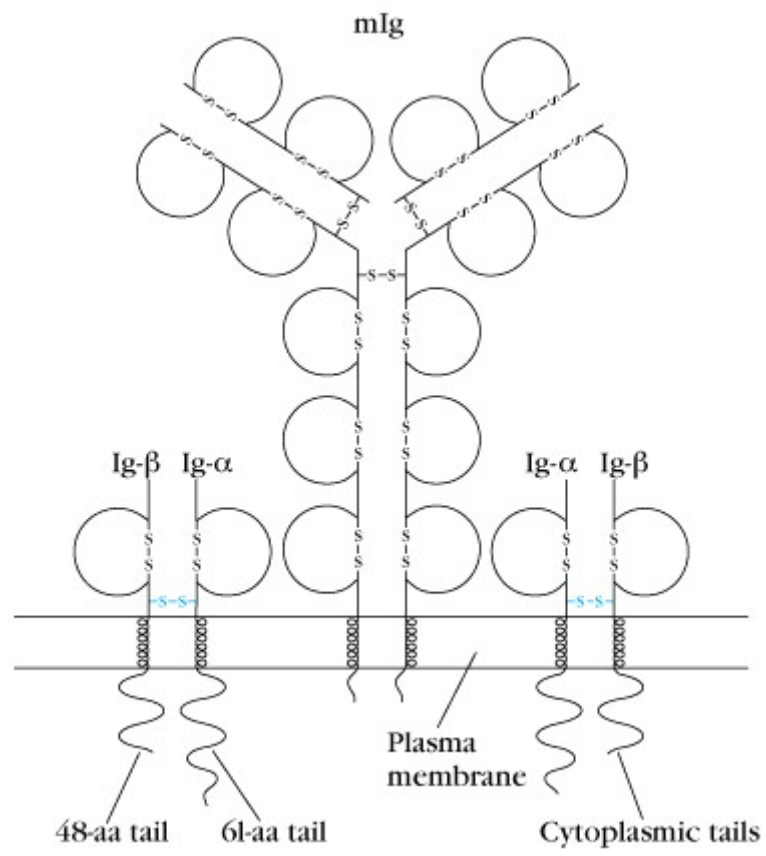
1. 采用颈椎脱臼法处死小鼠,解剖取出脾脏放入盛有 6ml Hank's液的平皿中,用 100 目钢网研磨,混匀。从中吸取 1ml细胞悬液放入一试管中,加满Hank's液,离心 1000rpm, 10 分钟,洗涤细胞一遍。倾去上清,沉积的细胞恢复 1ml 容积,即为约 1×10^7 /ml的细胞悬液。另取一支试管,吸取 1×10^7 /ml的细胞悬液 0.4ml加Hank's液 3.6ml,即为 1×10^6 /ml的细胞悬液。
2. 取 2ml离心管两只,各加入 1×10^6 /ml的细胞悬液 1ml,用台式离心机离心 2000rpm, 3 分钟,弃去上清液。一支加入荧光素标记的兔抗鼠Ig抗体 100 μ l,另一支不加抗体作对照,置 4℃冰箱 30 分钟。
3. 取出离心管,用 Hank's 液洗涤细胞两次,以去除游离的抗体,最后一次离心后弃去上清液,留少许回流液,混匀,滴片,用荧光显微镜观察。

四、实验结果

荧光显微镜观察,落射激发光下 SmIg 阳性细胞可见环状或斑点状荧光。用钨丝灯光源透射光照明计数同一视野内淋巴细胞总数,共计数 200~300 个淋巴细胞,算出其中 SmIg 阳性细胞的百分数。

五、注意事项

在滴片前要彻底去除游离的抗体,以避免假阳性结果。



实验五、 溶血空斑试验——小室液相法

(Test of Plaque Forming Cell)

一、基本原理

溶血空斑试验，又称空斑形成细胞（Plaque Forming Cell, PFC）试验，是一种体外检测抗体形成细胞的方法。将一定量洗涤过的绵羊红细胞注射入小鼠腹腔，四天后将小鼠杀死，取脾脏制成脾细胞悬液，内含抗体形成细胞。然后将脾细胞、绵羊红细胞，补体混合孵育。由于 PFC 所分泌的抗体和绵羊红血球结合形成抗原抗体复合物，在补体作用下可使红细胞溶解，于特制的小室内形成肉眼可见的溶血空斑。一个空斑即代表一个抗体形成细胞。

二、实验材料

1. 解剖器械、试管、1ml 吸量管
2. 载玻片、石蜡盘、酒精灯、微量加样器
3. ICR 小鼠（北京大学医学部实验动物中心提供）
4. 5%和 10%绵羊红血球（SRBC）
5. 补体(经 SRBC 吸收，临用时稀释成合适浓度)

三、实验方法

1. 小鼠免疫及脾细胞悬液的制备：

将 5%SRBC 0.4ml 注射于小鼠腹腔，4 天后拉脱颈椎处死，取出脾脏放在已加入 6ml Hank's 液的平皿中。在 100 目不锈钢网上研磨，过滤混匀，从中吸取 1ml 加入试管中，加满 Hank's 液混匀，离心 1000rpm，10 分钟。将沉淀的脾细胞恢复 1ml 容积，即为约 $1 \times 10^7 / \text{ml}$ 浓度的细胞悬液。

2. 制作小室：

取无脂载玻片（75mm×25mm），平置桌面上。用双面胶带在载玻片两端和中间各粘一条，然后再覆盖上同样的载玻片，即形成两个小室。将此双层玻片的一侧长边浸入融化的石蜡池中以封闭小室的一边（无需浸入过深，以能封闭小室边缘为准）。

2. 小室灌注细胞悬液：

取 $1 \times 10^7 / \text{ml}$ 脾细胞悬液 100 μl

10%SRBC 200 μl

新配补体 200 μl

Hank's 液 1ml

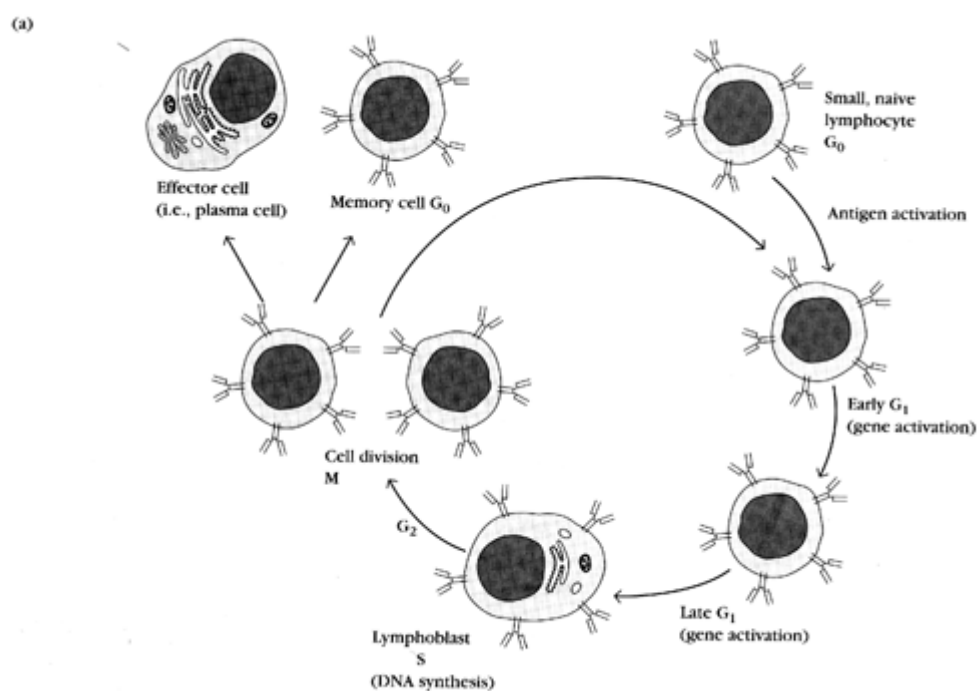
混匀后，用尖吸管灌注小室、蜡封、标记、平放于玻片盘内，置 37℃ 孵箱 30—45 分钟。

四、实验结果

观察小室内的透明空斑，一个空斑即代表一个空斑形成细胞（PFC），即 B 细胞。

五、注意事项

- (1) 小室注入液体时不要留有气泡。
- (2) 小室边缘需用石蜡封严。
- (3) 37℃ 孵箱孵育时，必须放平，不可倾斜。
- (4) 观察结果时，应注意辨别空斑与气泡的区别，避免将气泡误认为溶血空斑。



实验六、 T 淋巴细胞转化试验

(T Lymphocyte Transformation Test)

一、 基本原理

T 细胞在体外培养时，受到非特异性有丝分裂原（如 PHA、ConA）刺激后，可出现细胞体积增大，代谢旺盛，蛋白和核酸合成增加，即向淋巴母细胞转化。淋巴细胞转化率的高低可以反映机体的细胞免疫水平，因此可作为测定机体免疫功能的指标之一。

淋巴细胞转化试验有形态计数法、MTT 法和同位素法三种。

MTT 法即四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法。MTT 是一种噻唑盐，化学名 3-(4, 5-二甲基-2-噻唑)-2, 5-二苯基溴化四唑，水溶液为黄橙色。小鼠脾细胞受到 ConA 作用后发生增殖活化，其胞内线粒体琥珀酸脱氢酶活性相应升高，MTT 作为其底物参与反应，形成蓝色的甲臜（Formazan）颗粒沉积于细胞内或细胞周围，经盐酸—异丙醇溶解后为蓝色溶液，可用酶标测定仪测定细胞培养物的 OD 值，测定波长 570nm。根据 OD 值的大小计算反应体系中细胞增殖程度。

^3H -TdR 掺入法：细胞增殖的基本条件或前提为细胞质和细胞核的复制，这是正常细胞增殖过程缺一不可的前提。一般来说，一个细胞周期可大致分为四期，即G1 期、S期、G2 期和M期。其中S期为DNA合成期，主要功能活动为DNA合成。 ^3H -TdR即（甲基- ^3H ）胸腺嘧啶核苷（[^3H -methyl]thymidine），是DNA合成的前体。加入细胞培养液中后被细胞摄取作为DNA合成的原料。细胞合成的DNA越多，则所掺入的 ^3H -TdR就越多，因此，检测所掺入的 ^3H -TdR就可反映细胞增殖的程度。因该方法有同位素污染问题，故我们实习中仍用MTT法。

二、 实验材料

1. ICR 小鼠（北京大学医学部实验动物中心提供）
2. RPMI1640 培养液
3. Hank's 液
4. 刀豆蛋白 A（Concanvalin A, ConA），用 RPMI1640 液配成 1mg/ml，分装小瓶，冷冻保存
5. MTT 1mg/ml
6. 2.5%碘酒、75%酒精
7. 无菌尖吸管和刻度吸量管
8. 无菌解剖器械
9. 96 孔平底培养板

10. 5%CO₂培养箱（美国NAPCO公司产品）

11. 酶标测定仪（美国 BioRad 公司产品）

三、实验方法

1. 小鼠脾细胞悬液的制备：

取一个灭菌的平皿，加入 5ml Hank's液。颈椎脱臼法处死小鼠，取脾脏，放入平皿中，在钢网上研磨并过筛，制成细胞悬液。取出 100μl用于计数。将其余细胞悬液移入一离心管中，离心 1500rpm，7min，（或 1000rpm，10min）弃去上清，用RPMI1640 培养液稀释，制成 2.5×10^6 /ml的脾细胞悬液，然后加入ConA使每孔最终浓度为 2μg/ml，同时做不加ConA的阴性对照孔。

2. 将上述细胞悬液加入 96 孔平底培养板中，每孔 0.1ml。

3. 将培养板放入含有 5%CO₂的 37℃培养箱中培养 48-72 小时，在培养结束前 4-6 小时，于培养板各孔内加入 1mg/mlMTT液，10μl/孔。37℃培养 6 小时。

4. 各孔内加入 0.01M 盐酸—异丙醇 110μl，30 分钟内（或加 2%SDS 100ul/孔，过夜）用酶标测定仪测 OD 值，测定波长 570nm。

四、实验结果

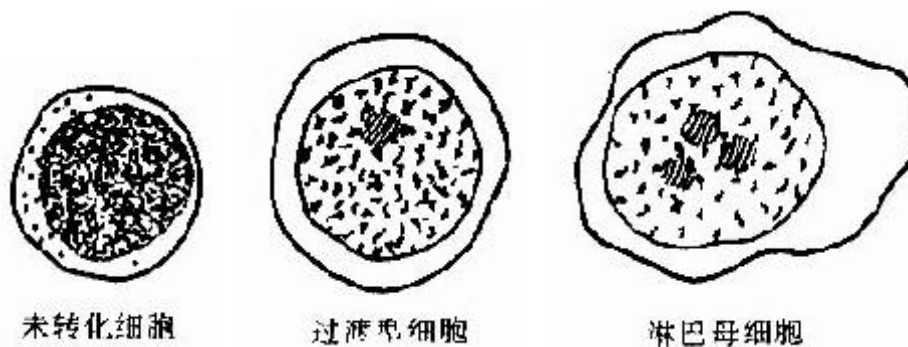
将实验组和对照组三个复孔的 OD 值平均。

转化值=实验组的平均 OD 值-对照组的平均 OD 值。

五、注意事项

（1）由于本实验需要培养 3 天，才能观察结果。因此，在操作时应注意无菌操作，避免细菌污染，导致实验的失败。

（2）细胞操作要轻柔、迅速，以免细胞损伤影响实验结果。



实验七、 酶联免疫吸附试验

(Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, ELISA)

一、实验原理:

利用标记技术将酶标记到抗体（抗原）上，使待检物中相应的抗原（抗体）与酶标记抗体（抗原）发生特异性反应。在遇到相应的酶底物时，酶能高效、专一催化、分解底物，生成有颜色的产物。根据颜色的深、浅、可以判断待检物中有无特异的抗原（抗体）以及量的大小。该方法可对待检样品进行定性和定量分析；同时具有微量、特异、高效、经济、简便等优点，因此是一种广泛应用于生物和医学领域的微量测定技术。

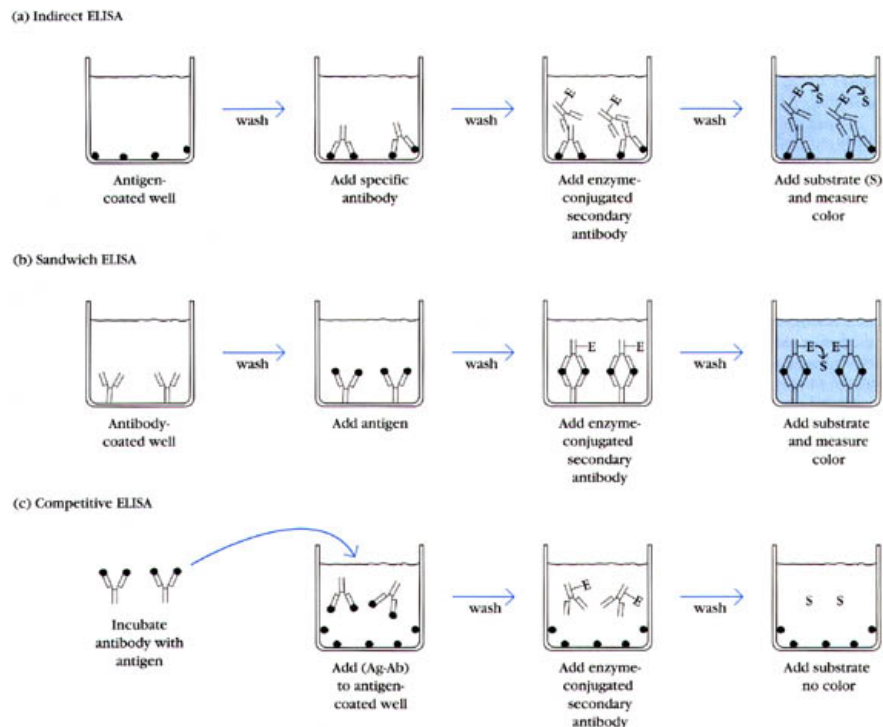
目前使用的酶联免疫检测方法很多，其种类按检测目的可分为：

间接法——用于测定抗体

双抗体夹心法——主要用于测定大分子抗原

竞争抑制法——主要用于测定小分子抗原

本实验以血清 IgE 的检测为例学习双抗体夹心法。



ELISA 的原理图

血清 IgE 的检测

二、实验材料

酶标板（聚苯乙烯微量板）

马抗人 IgE 抗体—IgG（购自北京中山公司）

辣根过氧化物酶（HRP）标记的马抗人 IgE 抗体—IgG

待检血清

包被缓冲液：pH9.6 0.05mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠洗涤液

封闭液：1%BSA 溶液

反应终止液：5N H₂SO₄

三、实验方法

包被酶标反应板：加 1:500 马抗人 IgE 抗体（IgG），0.2ml/孔

↓ 37℃ 孵育 2 小时后洗涤 3 次，10 分钟/次

封闭：加入 1%BSA ， 0.3ml/孔，4℃过夜

↓ 取出，洗涤同上

待检血清：加入不同稀释度的待检血清，0.1ml/孔

↓ 37℃孵育 40min 后，洗涤同上

酶标记抗体：加入适当稀释度的酶标抗体，0.1ml/孔

↓ 37℃孵育 40min 后， 洗涤同上

底物：加入 OPD（邻苯二胺）溶液，0.15ml/孔

↓ 室温 30 分钟

终止液：加入 5N HCl ， 0.1ml/孔

↓

于 20min 内，用酶标仪测定各孔 OD 值，测定波长 495nm

五、实验结果

用待测标本孔的吸收值与一组阴性标本测定孔平均吸收值的比值（P/N）

表示，当 P/N 大于某一数值时（如 2.1）判断为阳性，数值的大小依具体检测要求而定。

五、注意事项

1. 实验时应分别设阳性对照与阴性对照孔，每一待检样品应平行作两份，以保证实验结果的准确性。
2. 实验时，用羊血清、兔血清或 BSA 封闭以防止非特异性反应的发生。

实验八、 细胞凋亡检测(Annexin-V-FITC 单染法)

(Assay of Cell Apoptosis)

一、实验原理

细胞凋亡或称程序性细胞死亡(Programmed Cell Death,PCD)是细胞的生命现象之一,它在机体的胚胎发育、组织修复及自身反应性T淋巴细胞的清除等方面起着十分重要的作用。细胞凋亡调节的失控可导致临床各种疾病的发生。如老年性痴呆与神经细胞凋亡过度有关,自身免疫性疾病和肿瘤与细胞凋亡的抑制有关。细胞凋亡有别于细胞坏死,它有一系列的细胞形态学和生物化学的改变,包括出现染色质浓缩、DNA降解、凋亡小体形成等。在正常的活细胞,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)位于细胞膜的内侧,但在凋亡的细胞,PS从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面,暴露在细胞外环境中。Annexin-V(膜联蛋白-V)是一种分子量为35-36KD的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白,能与PS高亲和力结合。因此将Annexin-V进行荧光素(如FITC、PE)或生物素(Biotin)标记,以标记了的Annexin-V作为探针,利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。

二、实验仪器和材料

Annexin V-FITC (膜联蛋白-V-FITC) 500 μl/250 μl 20 μg/ml

标记缓冲液 (Binding Buffer) r 40/20 ml

PBS (1×) 60/30 ml

20 μl, 200 μl, and 1000 μl 移液器和吸头

微量离心管

可调速离心机

载玻片 (用于荧光显微镜观察)

盖玻片 (用于荧光显微镜观察)

去离子水

冰块

流式细胞仪或荧光显微镜

三、实验方法

1. 凋亡细胞的制备: 小鼠腹腔注射地塞米松 25mg/kg体重, 10h后解剖取胸腺, 分离胸腺细胞。用PBS洗两遍, 调整待测细胞的浓度为 2×10^6 /ml, 备用。
2. 200 μl细胞悬液加入1ml冷PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮, 1000rpm 4℃离心10分钟, 弃上清。

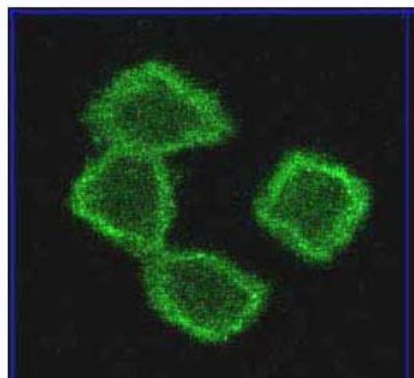
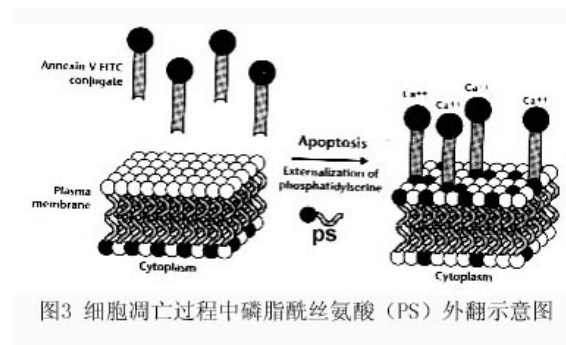
3. 重复步骤2两次。
4. 将细胞重悬于200 μ l 标记缓冲液。
5. 加入10 μ l Annexin V-FITC，轻轻混匀，避光室温反应15分钟或4℃反应30分钟。
6. 加入300 μ l标记缓冲液，立即上机（流式细胞仪）检测。

四、实验结果

用荧光显微镜观察，凋亡细胞细胞膜上可见黄绿色光环。PS转移到细胞膜外不是凋亡所特有的，也可发生在细胞坏死中。以FITC标记的Annexin V，可以同时结合使用PI(碘化丙啶)拒染法，用流式细胞仪分析可检测凋亡细胞的百分率。

五、注意事项

1. 整个操作过程动作要尽量轻柔，切勿用力吹打细胞，尽量在4℃下操作。
3. 反应完毕后要尽快检测，因为细胞凋亡是一个动态的过程，反应一小时后荧光强度就开始衰变。
4. Annexin V-FITC是光敏物质，在操作时要注意避光。



附：凋亡的其它检测方法

一、细胞凋亡的形态学检测

根据凋亡细胞固有的形态特征,人们已经设计了许多不同的细胞凋亡形态学检测方法。

1 光学显微镜和倒置显微镜

(1) 未染色细胞:凋亡细胞的体积变小、变形,细胞膜完整但出现发泡现象,细胞凋亡晚期可见凋亡小体。

贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落。

(2) 染色细胞:常用姬姆萨染色、瑞氏染色等。凋亡细胞的染色质浓缩、边缘化,核膜裂解、染色质分割

成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态。

2 荧光显微镜和共聚焦激光扫描显微镜

一般以细胞核染色质的形态学改变为指标来评判细胞凋亡的进展情况。

常用的 DNA 特异性染料有:HO 33342 (Hoechst 33342), HO 33258 (Hoechst 33258), DAPI。三种染料与 DNA 的结合是非嵌入式的,主要结合在 DNA 的 A-T 碱基区。紫外光激发时发射明亮的蓝色荧光。

Hoechst 是与 DNA 特异结合的活性染料,储存液用蒸馏水配成 1mg/ml 的浓度,使用时用 PBS 稀释成终浓度为 2~5mg/ml。

DAPI 为半通透性,用于常规固定细胞的染色。储存液用蒸馏水配成 1mg/ml 的浓度,使用终浓度一般为 0.5~1mg/ml。

结果评判:细胞凋亡过程中细胞核染色质的形态学改变分为三期:I 期的细胞核呈波纹状 (rippled) 或呈折缝样 (creased),部分染色质出现浓缩状态;IIa 期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化;IIb 期的细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。

3 透射电子显微镜观察

结果评判:凋亡细胞体积变小,细胞质浓缩。凋亡 I 期 (pro-apoptosis nuclei) 的细胞核内染色质高度盘绕,出现许多称为气穴现象 (cavitations) 的空泡结构 (图 2); IIa 期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化;细胞凋亡的晚期,细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。

二、线粒体膜势能的检测

线粒体在细胞凋亡的过程中起着枢纽作用,多种细胞凋亡刺激因子均可诱导不同的细胞发生凋亡,而线粒体跨膜电位的下降,被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,它发生在细胞核凋亡特征 (染色质浓缩、DNA 断裂) 出现之前,一旦线粒体 DYmt 崩溃,则细胞凋亡不可逆转。

线粒体跨膜电位的存在,使一些亲脂性阳离子荧光染料如 Rhodamine 123、3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC6 (3)]、Tetraphenyl-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide [JC-1]、Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) 等可结合到线粒体基质,其荧光的增强或减弱说明线粒体内膜电负性的增高或降低。

方法:将正常培养的细胞和诱导凋亡的细胞加入使用终浓度为 Rhodamine 123 (1mM) 或终浓度为 DiOC6 (25nM), JC-1 (1mM), TMRM (100nM), 37°C 平衡 30min, 流式细胞计检测细胞的荧光强度。

三、DNA 片断化检测

细胞凋亡时主要的生化特征是其染色质发生浓缩, 染色质DNA在核小体单位之间的连接处断裂, 形成50~300kbp长的DNA大片段, 或180~200bp整数倍的寡核苷酸片段, 在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱(DNA ladder)。细胞经处理后, 采用常规方法分离提纯DNA, 进行琼脂糖凝胶和溴化乙啶染色, 在凋亡细胞群中可观察到典型的DNA ladder。如果细胞量很少, 还可在分离提纯DNA后, 用³²P-ATP和脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)使DNA标记, 然后进行电泳和放射自显影, 观察凋亡细胞中DNA ladder的形成。

1. 大分子染色体DNA片段的测定

细胞凋亡的早期, 染色体断裂成为50~300kbp长的DNA大片段。所有超过一定分子量大小的双链DNA分子在琼脂糖凝胶中的迁移速度相同。线性DNA的双螺旋半径超过凝胶半径时, 即达到分辨力的极限。此时凝胶不再按分子量的大小来筛分DNA, DNA像通过弯管一样, 以其一端指向电场一极而通过凝胶, 这种迁移模式称之为“爬行”。因此, 细胞凋亡早期产生的50~300kbp长的DNA大片段不能用普通的琼脂糖凝胶电泳来分离。通常采用脉冲电泳技术可圆满地解决这一问题。这个方法是在凝胶上外加正交的交变脉冲电场。每当电场方向改变后, 大的DNA分子便滞留在爬行管中, 直至新的电场轴向重新定向后, 才能继续向前移动。DNA分子量越大, 这种重排所需要的时间就越长。当DNA分子变换方向的时间小于电脉冲周期时, DNA就可以按其分子量大小分开。

2. DNA Ladder 测定

方法: 收获细胞(1×10^7) 沉淀?细胞裂解液 13000rpm' 5min, 收集上清 1%SDS和RnaseA (5mg/ml) 56° C, 2h。蛋白酶K (2.5mg/ml) 37° C, 2h, 1/10 体积 3M醋酸钠和 2.5 倍体积的冷无水乙醇沉淀DNA, 4° C过夜。14000rpm' 15min最后将沉淀溶解在TE buffer中, 加DNA Loading Buffer 1.2%琼脂糖凝胶电泳, EB染色并照相。

3. 凋亡细胞DNA含量的流式细胞计分析

方法: 收集细胞, 70%冷乙醇(in PBS) 4° C固定过夜, PBS洗涤, 1000rpm' 10min RNase A (0.5mg/ml) 37° C消化 30min PI (50mg/ml) 染色, 室温避光 15min, FACScan 分析DNA亚二倍体的形成及细胞周期的变化。

4. ApoAlert™ LM-PCR Ladder Assay (CLONTECH)

优点: 敏感度高, 适合于检测少量样本, 小部分凋亡细胞。如临床活组织检测。

四、TUNEL 法

细胞凋亡中, 染色体DNA双链断裂或单链断裂而产生大量的粘性3'-OH末端, 可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下, 将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到DNA的3'-末端, 从而可进行凋亡细胞的检测, 这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有DNA的断裂, 因而没有3'-OH形成, 很少能够被染色。TUNEL实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法, 对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色, 能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征, 可用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养的细胞和从组织中分离的细胞的细胞形态测定, 并可检测出极少量的凋亡细胞, 因而在细胞凋亡的研究中被广泛采用。

五、Caspase-3 活性的检测

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用，其中 caspase-3 为关键的执行分子，它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能。Caspase-3 正常以酶原（32KD）的形式存在于胞浆中，在凋亡的早期阶段，它被激活，活化的 Caspase-3 由两个大亚基（17KD）和两个小亚基（12KD）组成，裂解相应的胞浆胞核底物，最终导致细胞凋亡。但在细胞凋亡的晚期和死亡细胞，caspase-3 的活性明显下降。

1 Western blot 分析 Procaspase-3 的活化，以及活化的 Caspase-3 及对底物多聚（ADP-核糖）聚合酶[poly（ADP-ribose）polymerase, PARP]等的裂解。

方法：收集细胞→PBS 洗涤→抽提细胞裂解液→蛋白定量→SDS-PAGE 电泳→硝酸纤维素膜或 PVDF 膜转移→5%脱脂奶粉封闭，室温 1.5~2h 或 4° C 过夜→Caspase-3 多抗或单抗室温反应 1~2h 或 4° C 过夜→TBS-T（含 0.05% Tween 20 的 TBS）洗 3 次，5~10min/次→HRP-标记的羊抗鼠 IgG 或 AP 标记的羊抗鼠 IgG 室温反应 1~2h→ TBS-T 洗 3 次，5~10min/次→ECL 显影或 NBT/BCIP 显色。

2 荧光分光光度计分析

原理：活化的 Caspase-3 能够特异切割 D1E2V3D4-X 底物，水解 D4-X 肽键。根据这一特点，设计出荧光物质偶联的短肽 Ac-DEVD-AMC。在共价偶联时，AMC 不能被激发荧光，短肽被水解后释放出 AMC，自由的 AMC 才能被激发发射荧光。根据释放的 AMC 荧光强度的大小，可以测定 caspase-3 的活性，从而反映 Caspase-3 被活化的程度。

方法：收获细胞正常或凋亡细胞，PBS 洗涤，制备细胞裂解液加 Ac-DEVD-AMC（caspase-3 四肽荧光底物），37° C 反应 1h，荧光分光光度计（Polarstar）分析荧光强度（激发光波长 380nm，发射光波长为 430-460nm）。

3 流式细胞术分析

方法：收获细胞正常或凋亡细胞，PBS 洗涤，加 Ac-DEVD-AMC 37° C 反应 1h UV 流式细胞计分析 caspase-3 阳性细胞数和平均荧光强度。

六、Annexin V 和 PI 双染法

在本实验中，已经介绍了将荧光素标记的 Annexin-V 作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶(propidine iodide, PI)是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI 能够透过细胞膜而使细胞核红染。因此将 Annexin-V 与 PI 匹配使用，就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。

由于凋亡是二十世纪细胞生物学的重要发现，其在医学生物学中具有重要的意义，因此检测细胞凋亡的方法也在不断地更新和发展中，除了我们以上介绍的方法，还有很多的新的凋亡检测手段，如凋亡相关蛋白 TFAR19 蛋白的表达和细胞定位分析等，同学们如果有兴趣可以参考有关的书籍和资料。

实验九、补体介导的细胞毒试验

(Complement Mediated Cytotoxicity Test)

一、实验原理

带有特异抗原的靶细胞（如正常细胞、肿瘤细胞、病毒感染细胞）与相应抗体结合后，在补体的参与下，引起靶细胞膜损伤，导致细胞膜的通透性增加、细胞死亡。染料（例如：伊红-Y、台盼蓝）可通过细胞膜进入细胞内使细胞着色，故可用于指示死细胞或濒死细胞，而活细胞不着色。此即补体依赖性细胞毒试验，利用细胞毒试验可以检查细胞膜抗原，亦可鉴定抗体的特异性。

本实验中，Thy-1 抗原是小鼠胸腺 T 细胞特异的表面抗原，在体外利用抗小鼠 Thy-1 的单克隆抗体通过补体的协同作用，可杀伤 95% 以上的胸腺细胞。

二、实验材料

1. 解剖器械(眼科剪、眼科镊)、平皿、80~100 目不锈钢网
2. 试管、1ml 吸量管、尖吸管
3. 载玻片、盖玻片
4. C57BL / 6J 小鼠
5. 含 5%NBS 的冷 Hank's 液
6. 抗小鼠 Thy-1 的单克隆抗体(最适稀释度)
7. 补体(豚鼠新鲜血清并经小鼠胸腺细胞吸收，预先测定效价并稀释为最佳稀释度)
8. 1%伊红-Y 染液

三、实验方法

1. 小鼠胸腺细胞悬液的制备：

将 4~6 周龄小鼠采用颈椎脱臼法处死，取出胸腺放入已加入约 4ml 冷 Hank's 液的平皿中，在 100 目的不锈钢网上研磨后，过筛，放入试管，离心 1000rpm，5 分钟，用 Hank's 液洗两次。将沉淀的细胞重悬于 Hank's 液中，配成 1×10^7 / ml 细胞悬液。

2. 取试管 3 支，标明顺序，依据下表依次加入 1×10^7 / ml 胸腺细胞悬液、抗小鼠 Thy-1 的单克隆抗体(最适稀释度)及 Hank's 液，放入 37℃ 水浴 30 分钟。

实验材料	试验管	补体对照管	细胞对照管
1X10 ⁷ / ml 胸腺细胞悬液	0.1ml	0.1ml	0.1ml
Thy-1 单克隆抗体	0.1ml	—	—
Hank's 液	—	0.1ml	0.2ml
1:3 补体	0.1ml	0.1ml	—

3. 取出后每管加入 1% 伊红-Y 染液 1 滴，混匀，室温放置 2 分钟。
4. 重新混匀后分别在一张载玻片上滴片，加盖玻片镜检。先在低倍镜下观察，再用高倍镜观察，比较 3 管中细胞死活情况。

四、实验结果

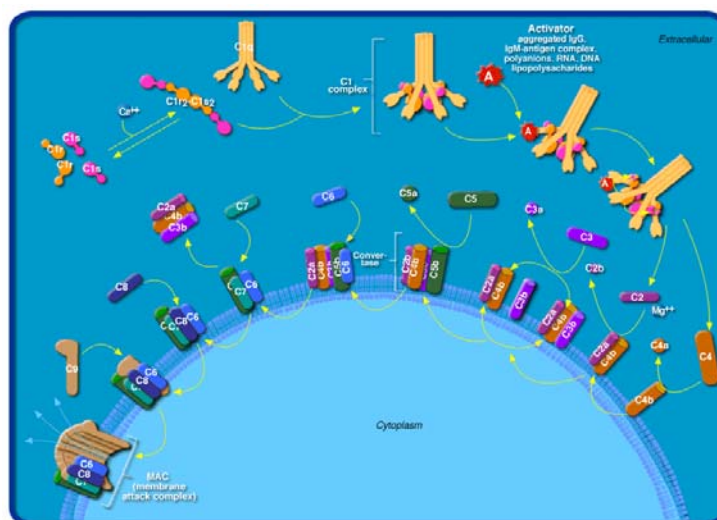
死细胞呈红色，无光泽且肿胀变大；活细胞不着色、有光泽且形态正常。

高倍镜下计数 200 个细胞并计算其中死细胞的百分数。计算公式如下：

$$\text{死细胞百分数} = \frac{\text{实验管死细胞数\%} - \text{对照管死细胞数\%}}{100\% - \text{对照管死细胞数\%}}$$

五、注意事项

- (1) 胸腺细胞制备速度要快，且需在冰浴中进行操作，以保持细胞活力。
- (2) 抗 Thy-1 的单克隆抗体和补体的效价要在预实验中确定。
- (3) 细胞对照管死细胞数若超过 5%，实验需重新做。
- (4) 细胞滴加到载玻片上后长时间放置不检测也可导致假阳性反应。



实验十、E 玫瑰花环形成试验

(E Rosette Test)

一、基本原理

正常人外周血中 T 细胞在体外能直接和绵羊红细胞(SRBC)结合形成玫瑰花样细胞团。这是因为人的 T 细胞膜上具有能和 SRBC 膜上的糖蛋白相结合的受体,称为 E 受体。已证实 E 受体是人 T 细胞所特有的表面标志,因此本试验可作为人外周血 T 细胞的鉴定和计数,同时作为人细胞免疫功能状态的一个检测指标,也是分离 T 细胞的常用方法之一。本实验为示教内容,学生只看结果。

二、实验材料

1. 肝素抗凝人外周血 1ml。
2. 淋巴细胞分层液(见附录)2ml。
3. 0.5%SRBC悬液:将脱纤维的绵羊静脉血用Hank's液洗 3 次,再用Hank's液配制为含压积SRBC为 0.5%的悬液(约含SRBC $8 \times 10^7 / \text{ml}$)。
4. 经 SRBC 吸收的灭活的新生小牛血清(NBS),取无菌 NBS 置 56℃水浴经 30 分钟灭活,取已灭活的 NBS 2 体积,加入经洗涤后的压积 SRBC 1 体积,混匀后置 37℃温箱 30 分钟,离心沉淀,吸取上层血清即成。
5. Hank's 液: pH7.4(见附录)。
6. 血球计数板、尖吸管、载玻片、瑞氏(Wright's)染液等。

三、实验方法

1. 取肝素抗凝血 1ml 加 1ml Hank's 液,混匀后用尖吸管将其加在 2ml 分层液上。
2. 离心 2000rpm, 30 分钟,用尖吸管吸取血浆与分层液界面处富含淋巴细胞的悬液置于另一洁净试管中。
3. 用 Hank's 液以 1000rpm,离心 10 分冲洗细胞两次,末次弃上清后再加入 Hank's 液 1ml,混匀,用微量加样器吸取 0.02ml 加于 0.38ml 白细胞计数液中,在血球计数板上于低倍镜下计数,并根据下式算出每毫升细胞数。

$$\text{细胞数} / \text{ml} = \frac{4 \text{个大方格细胞总数}}{4} \times 10^4 \times 20 (\text{稀释倍数})$$

然后用Hank's液配制成 $10^7 / \text{ml}$ 细胞悬液。

4. 取 $10^7 / \text{ml}$ 细胞悬液 0.1ml 加 0.1ml 经 SRBC 吸收的灭活 NBS, 再加 0.2ml 0.5%SRBC 悬液,混匀,放 37℃温箱 5 分钟,低速离心 500rpm, 5 分钟,然后放 4℃冰箱 2 小时或过夜。

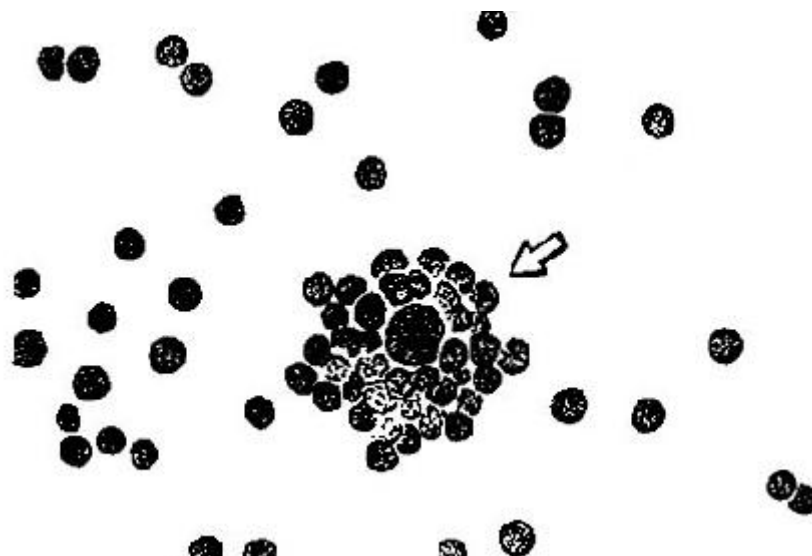
5. 取出试管，轻轻使沉淀的细胞悬浮，用尖吸管取出一滴置于载玻片上，盖上已滴加瑞氏染液的盖玻片，于高倍镜下观察计数。

四、实验结果

计数 200 个淋巴细胞，凡结合 3 个 SRBC 以上者为 E 玫瑰花阳性细胞，求出百分率即为 T 细胞百分比。正常值为 $68 \pm 9.9\%$ 。

五、注意事项

SRBC 自绵羊体内取出后限在 2 周内使用。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn