

# 免疫细胞及其功能检验技术

## 第一节 免疫细胞的分离与纯化

一、 白细胞的分离

二、 外周血单个核细胞分离

三、 淋巴细胞的纯化及亚群的分离

四、 吞噬细胞的分离

## 第二节 淋巴细胞标志及亚群分类

一、 T细胞表面标志及亚群

二、 B细胞表面标志

三、 NK细胞表面标志

## 第三节 其他的免疫细胞

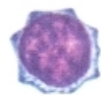
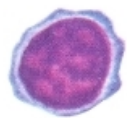
## 第四节 免疫细胞表面标志的检测及应用

一、 免疫细胞表面标志的检测方法

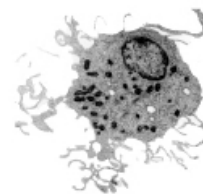
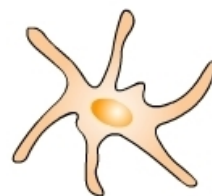
二、 淋巴细胞表面标志检测的临床意义

思考题

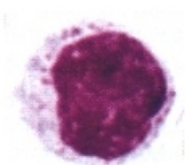
小结



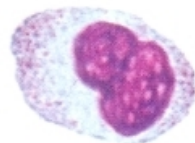
淋巴细胞 (T、B细胞)



树突状细胞



NK细胞



单核细胞/巨噬细胞



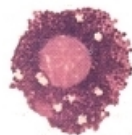
中性粒细胞



嗜酸性粒细胞



嗜碱性粒细胞



肥大细胞



红细胞



血小板

## 免疫细胞种类

# 第一节 免疫细胞的分离与纯化

- 白细胞的分离
- 外周血单个核细胞分离
- 淋巴细胞的纯化及亚群的分离
- 吞噬细胞的分离

# 第一节 白细胞的分离

细胞类型	数量（外周血）	密度
红细胞	400~500万个/L	1.093
白细胞	0.8~1万个/L	1.092

- **自然沉降法**

血浆——白细胞、血小板——红细胞

- **高分子聚合物沉降法**

明胶、右旋糖酐、聚乙烯吡咯烷酮等高分子聚合物可使红细胞发生凝集，加快沉降率

## 二、外周血单个核细胞分离

- 外周血单个核细胞（**peripheral mononuclear cells, PMNC**）包括淋巴细胞和单核细胞（**monocyte**）。
- **Ficoll**分离液法主要用于分离外周血中的单个核细胞，是一种单次差速密度梯度离心的分离法。

# 细胞分离基本原理

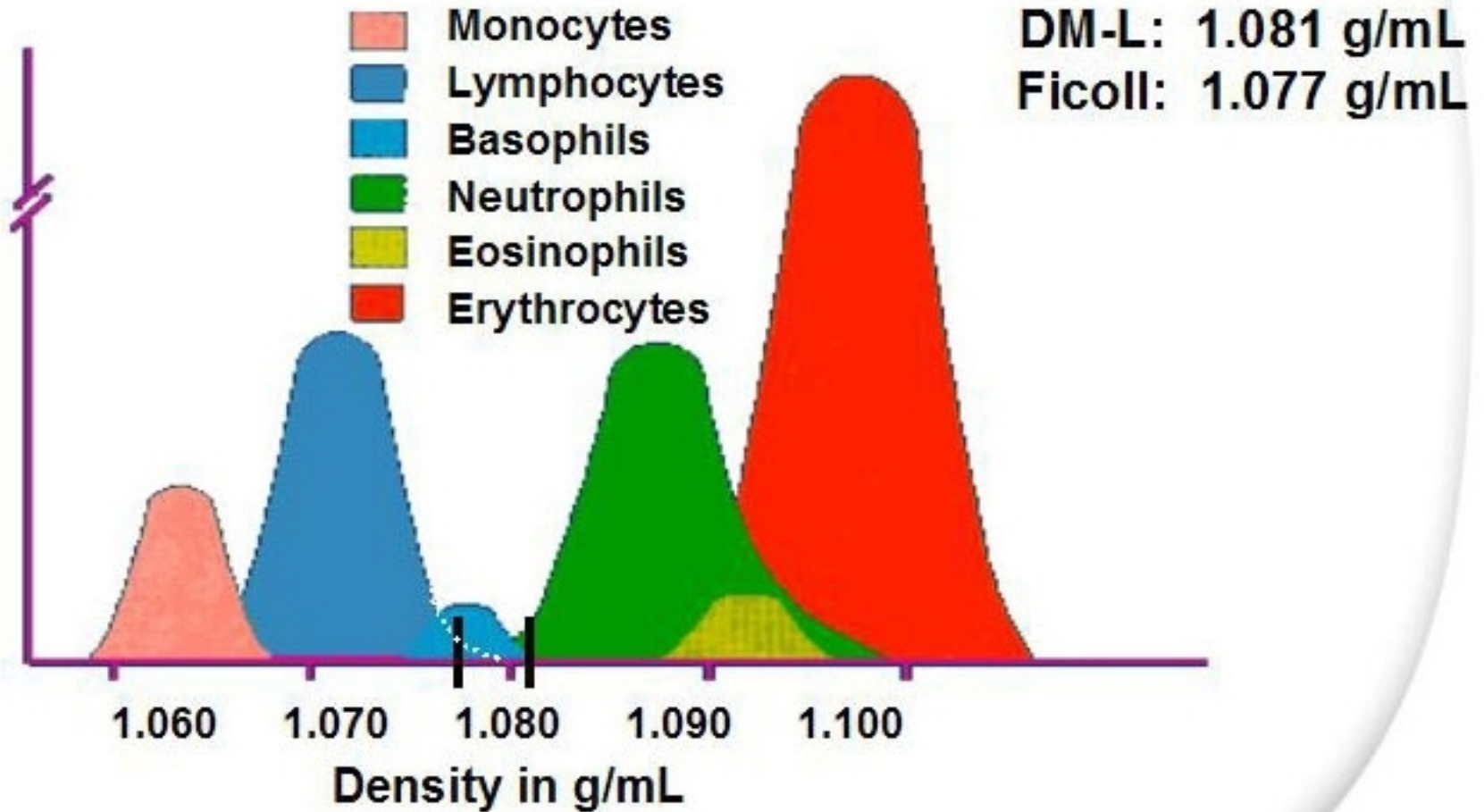
- 不同细胞密度不同
- 不同细胞表面生物学特性不同
- 不同细胞表面分化抗原不同



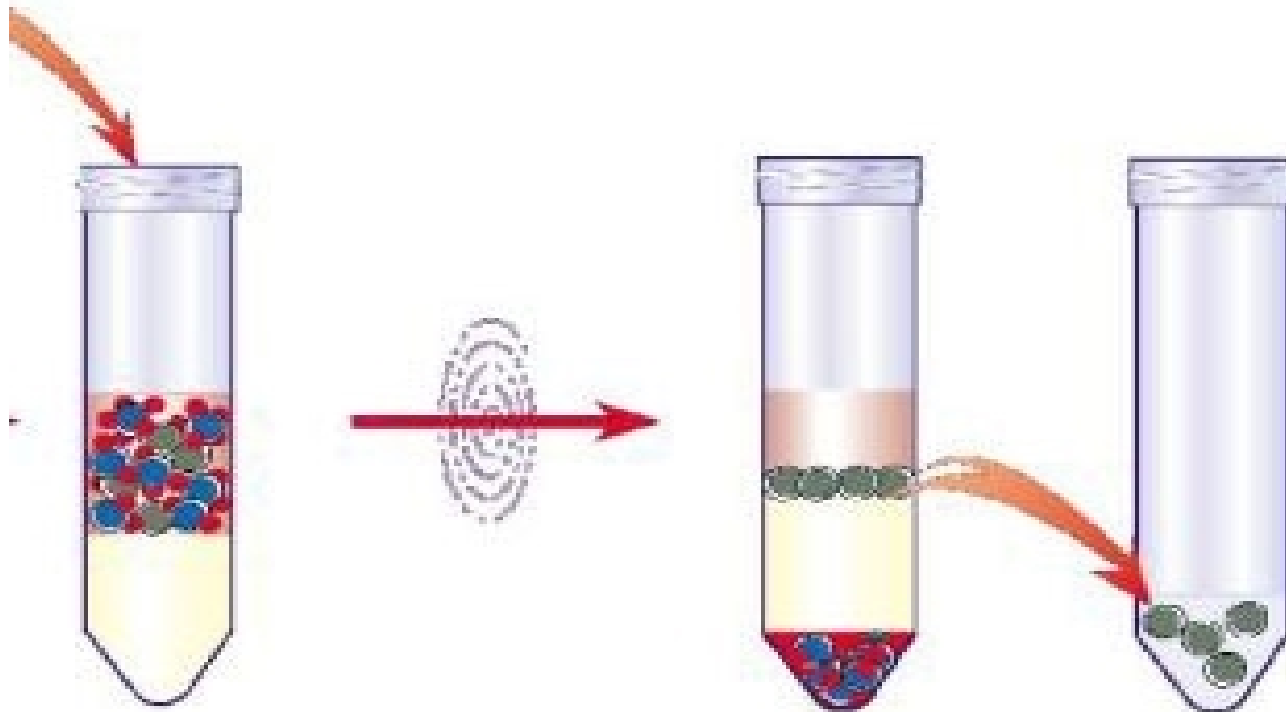
## 不同细胞密度不同

- 人的红细胞密度为**1.093**
- 粒细胞密度为**1.092**
- 单个核细胞（淋巴细胞和单核细胞）的密度为**1.075-1.090**

## 不同细胞密度不同



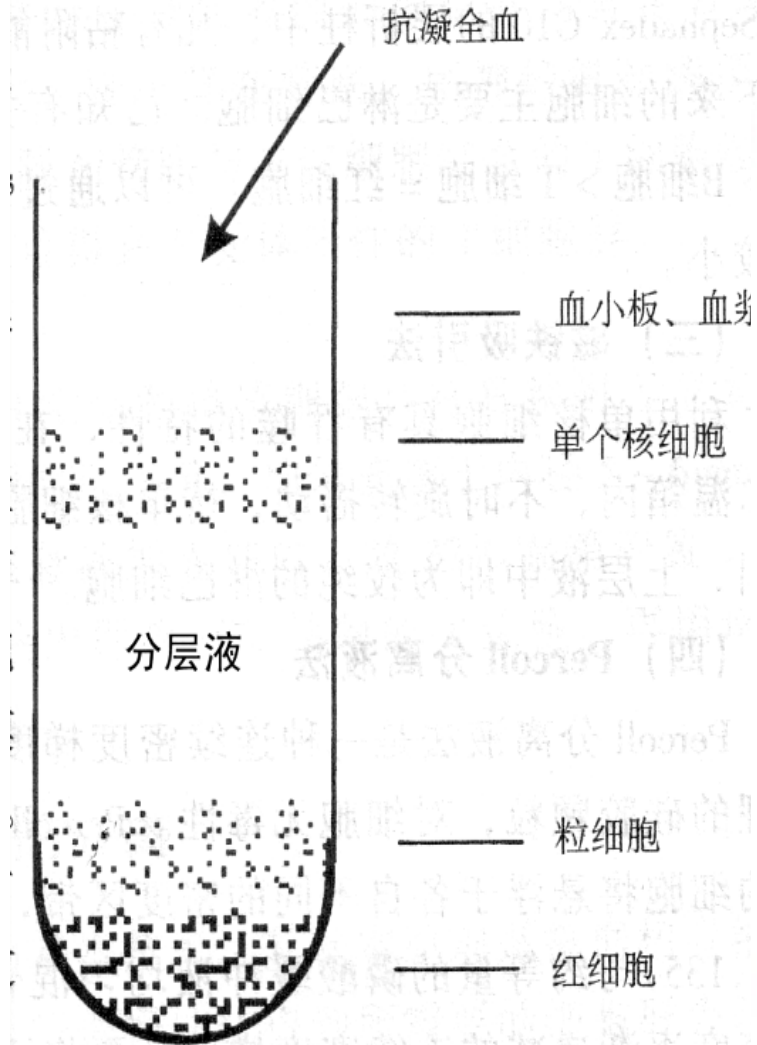
用 $1.077 \pm 0.001$ 的分层液可将细胞分离



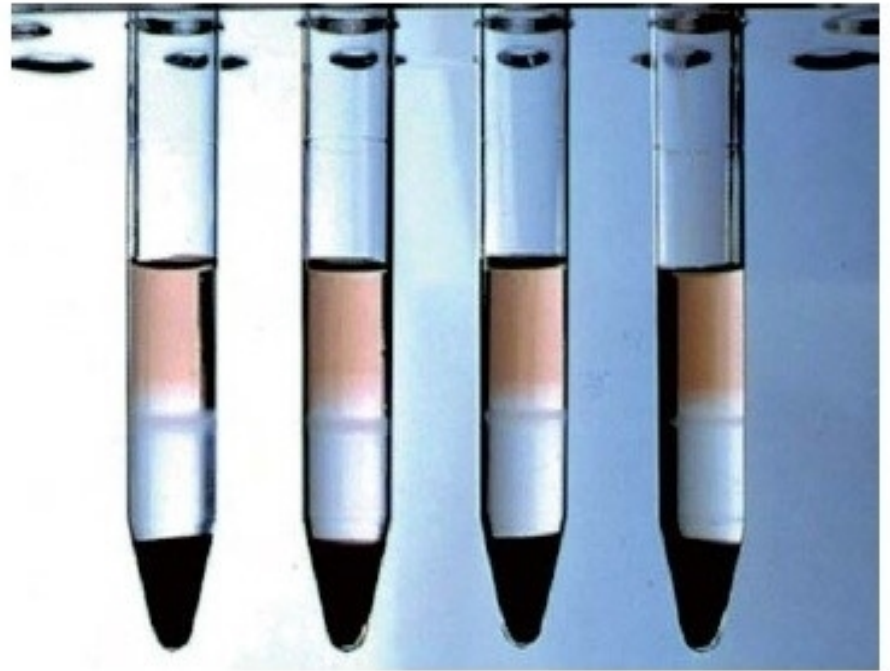
离心

收集

# 密度梯度离心 (Ficoll) 离心



Ficoll-Paque PLUS



用Ficoll-Paque PLUS从外周血分离人的淋巴细胞(交界处)

➤ Percoll 分离液法（连续密度梯度离心）



## 三、淋巴细胞的纯化 及亚群的分离

### 1. 去单核细胞

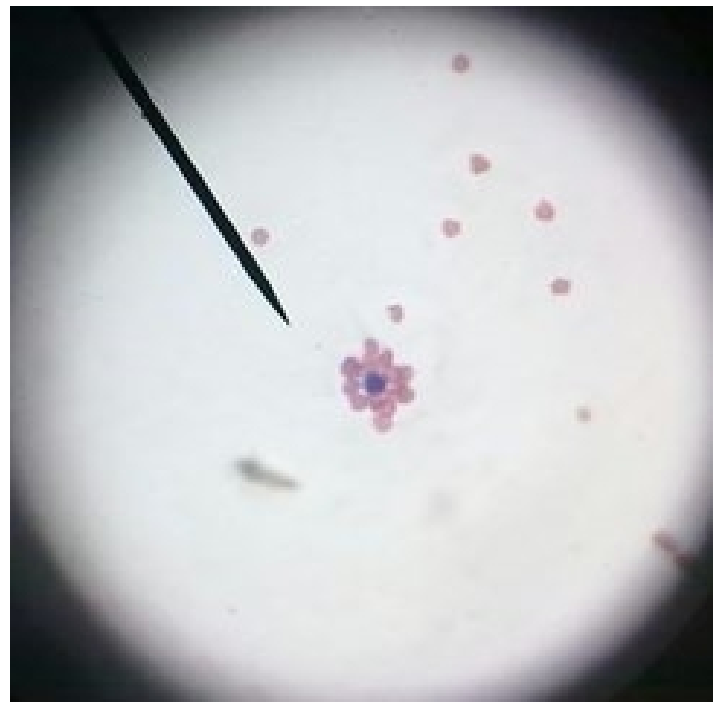
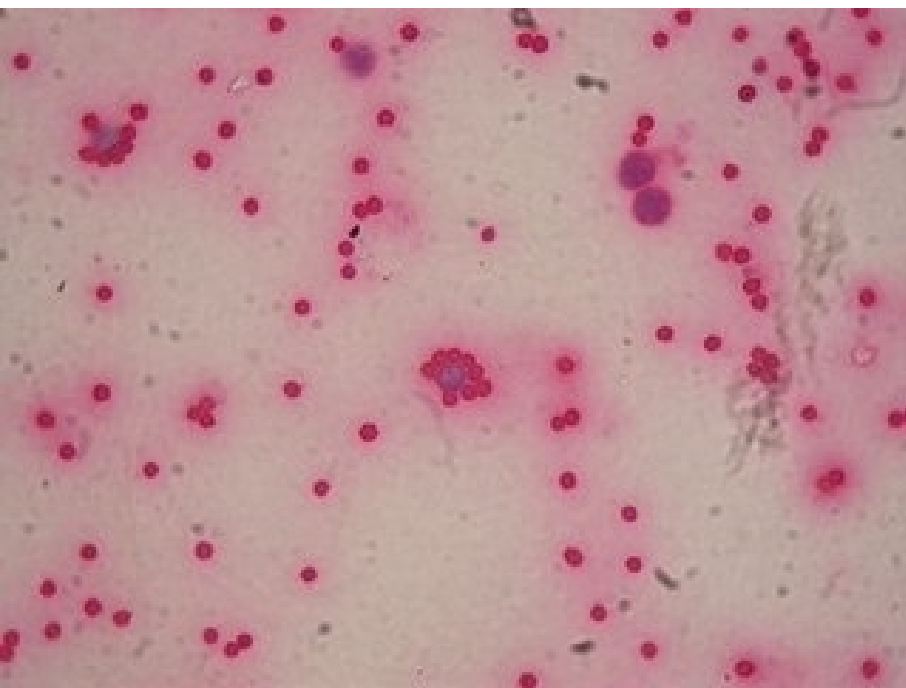
- 贴壁粘附法
- 吸附柱过滤法
- 磁铁吸引法

### 2. 去红细胞

### 3. 去血小板

## 四、T细胞和B细胞的分离

- E花环沉降法
- 尼龙毛柱分离法



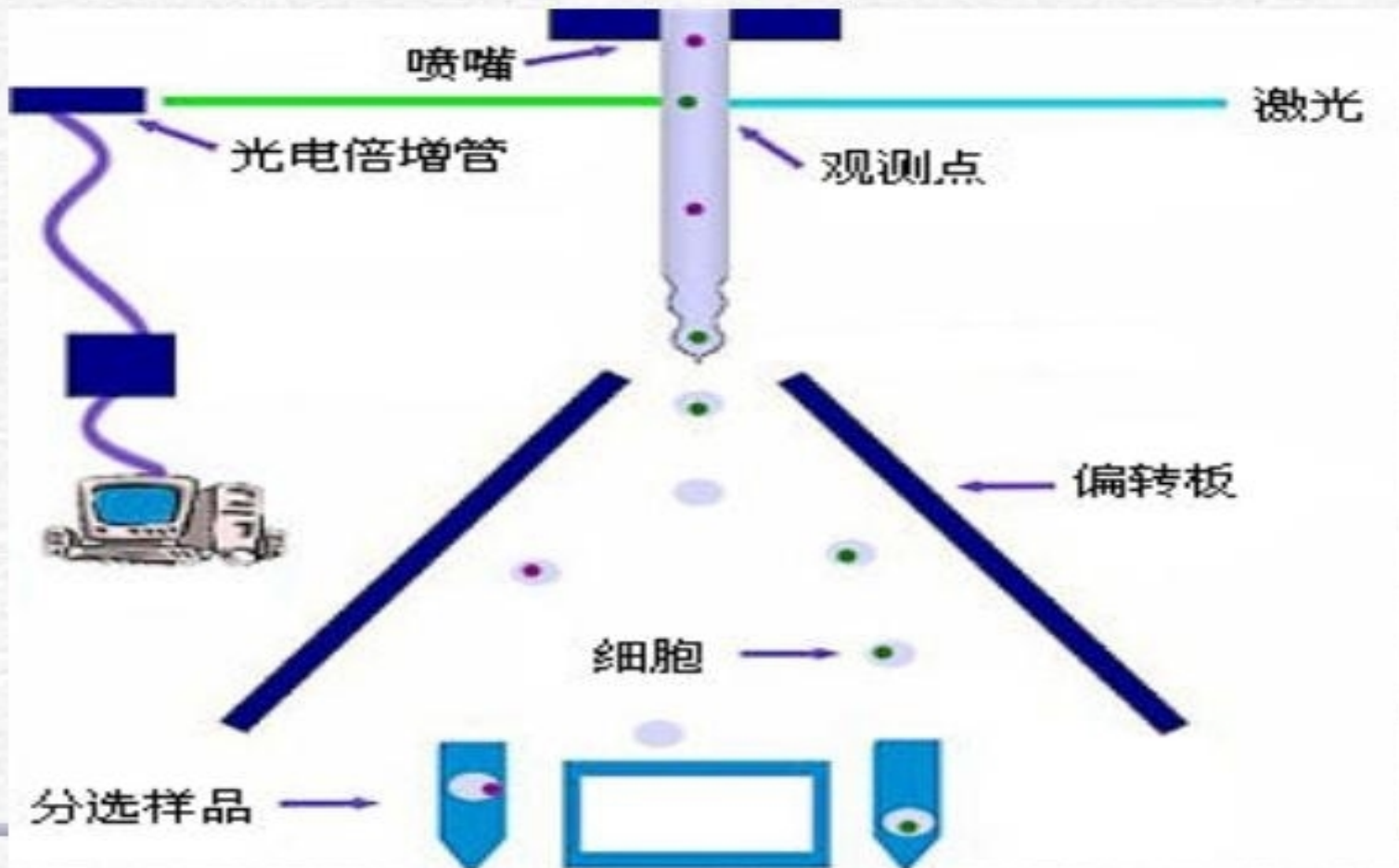
## 四、T细胞亚群的分离

- 亲和板结合分离法
- 磁性微球分离法
- 荧光激活细胞分离仪分离法



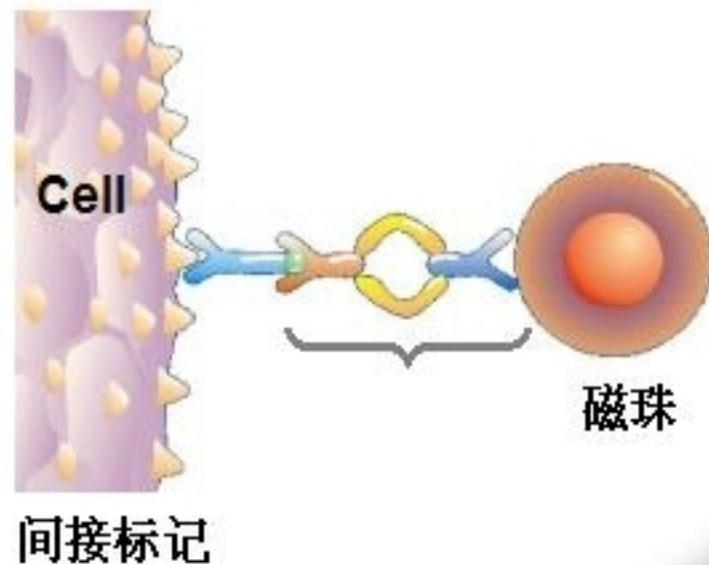
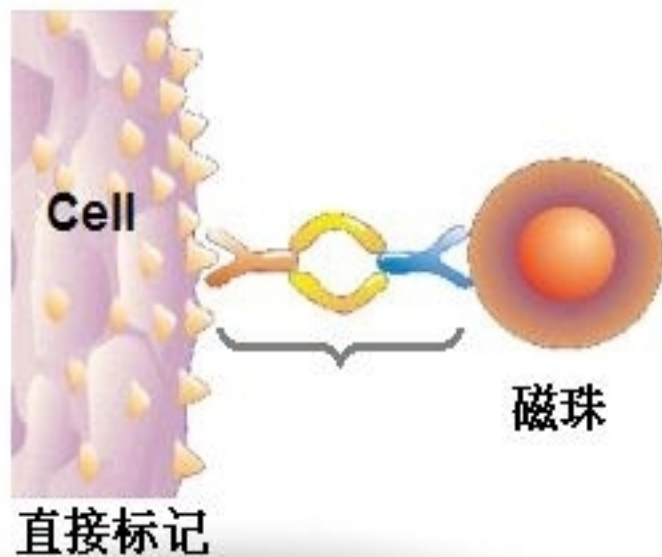
# 荧光激活细胞分离仪分离法

流式细胞仪工作原理示意图

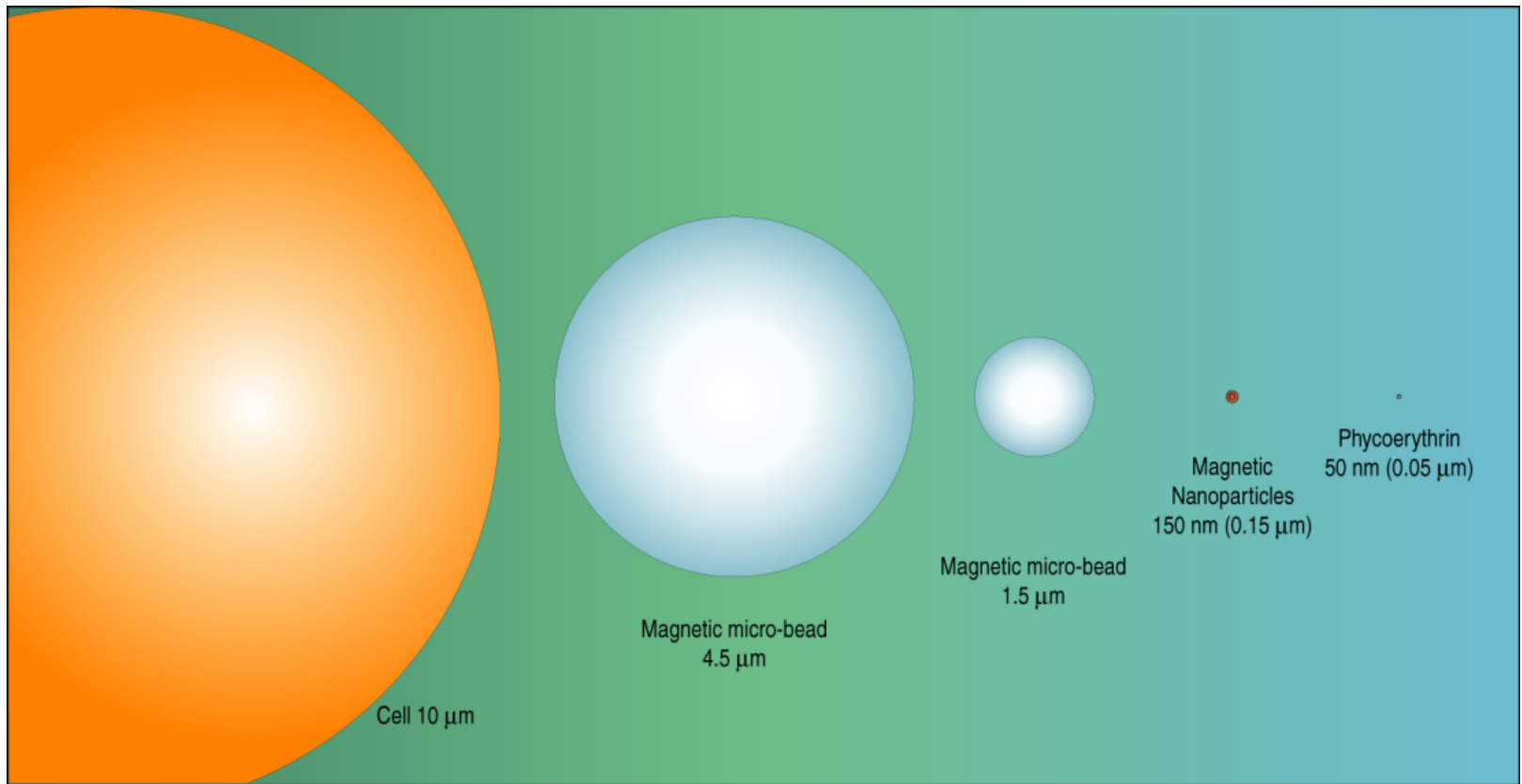


# 免疫磁珠细胞分选原理

## 直接标记和间接标记



# 磁珠大小可以选择

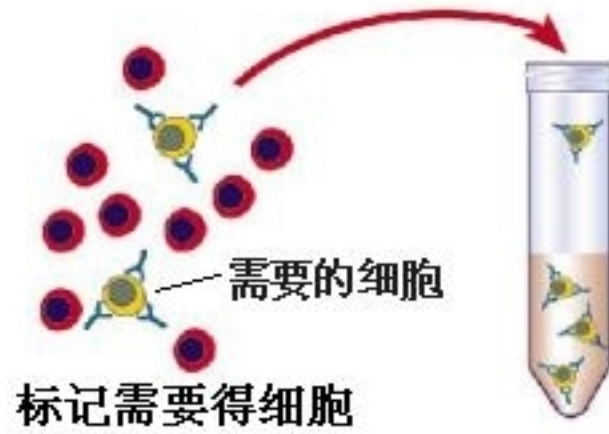


# 大小免疫磁珠分离细胞的特点比较

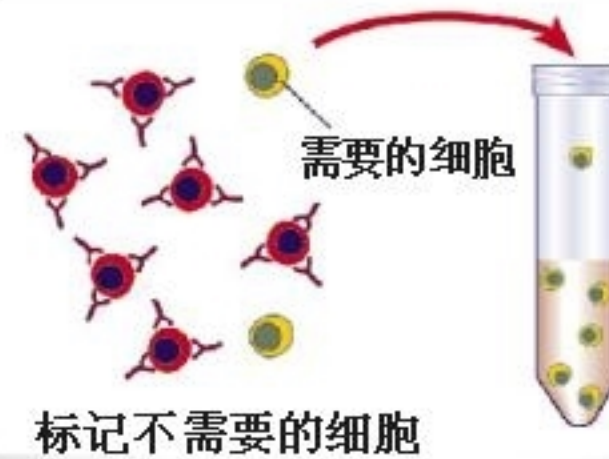
比较项目	大磁珠	小磁珠
对细胞的影响	对细胞造成机械压力，影响其生物学活性，不利于分离后培养。	对细胞温和，不影响分离细胞的后续培养。
对流式细胞仪的影响	阻塞流式细胞仪的喷嘴，影响散射光。	可直接上流式细胞仪检测，不影响散射光。
分离条件要求	技术简单，分离可在试管中完成。	需要很强的磁场来分离细胞。
收率	得率高。	得率不高。
纯度	纯度低。	纯度高。
分离时间	分离速度快。	分离速度慢。
分离成本	成本低。	需要很强的磁场来分离细胞，需要一次性的分离柱，不能在普通试管进行。

# 正选 和 负选

正选



负选



# 正选和负选比较

## 正选

## 负选

### 优点

- 只需要一种抗体
- 分离出的细胞纯度高
- 对于比例小的细胞群，正选容易得到高纯度

- 需要的细胞没有被抗体等标记
- 对需要的细胞，不需要特异性的细胞标记

---

### 缺点

- 需要特异性的靶细胞标记
- 可能引起细胞活化

- 需要多种抗体标记不需要的细胞



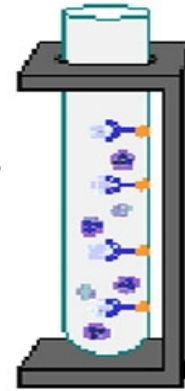
# 免疫磁珠法细胞分选过程



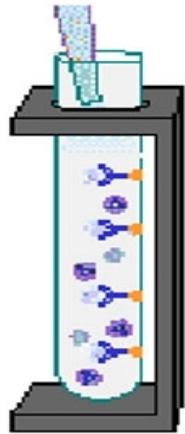
1 向细胞悬液中加入抗体标记的磁珠



2 磁珠通过特异性抗体与带有相应抗原的细胞结合



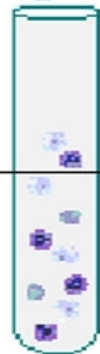
3 将试管置于磁场中，与磁珠连接的细胞被磁场吸附



4 吸去上清，带有抗原的细胞留在试管里，其他细胞在吸出的上清液中



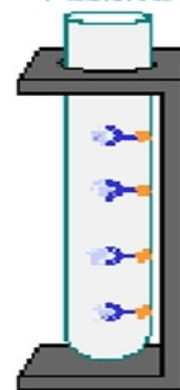
Negative



负选法:  
分析上清，  
目的细胞在  
上清液中

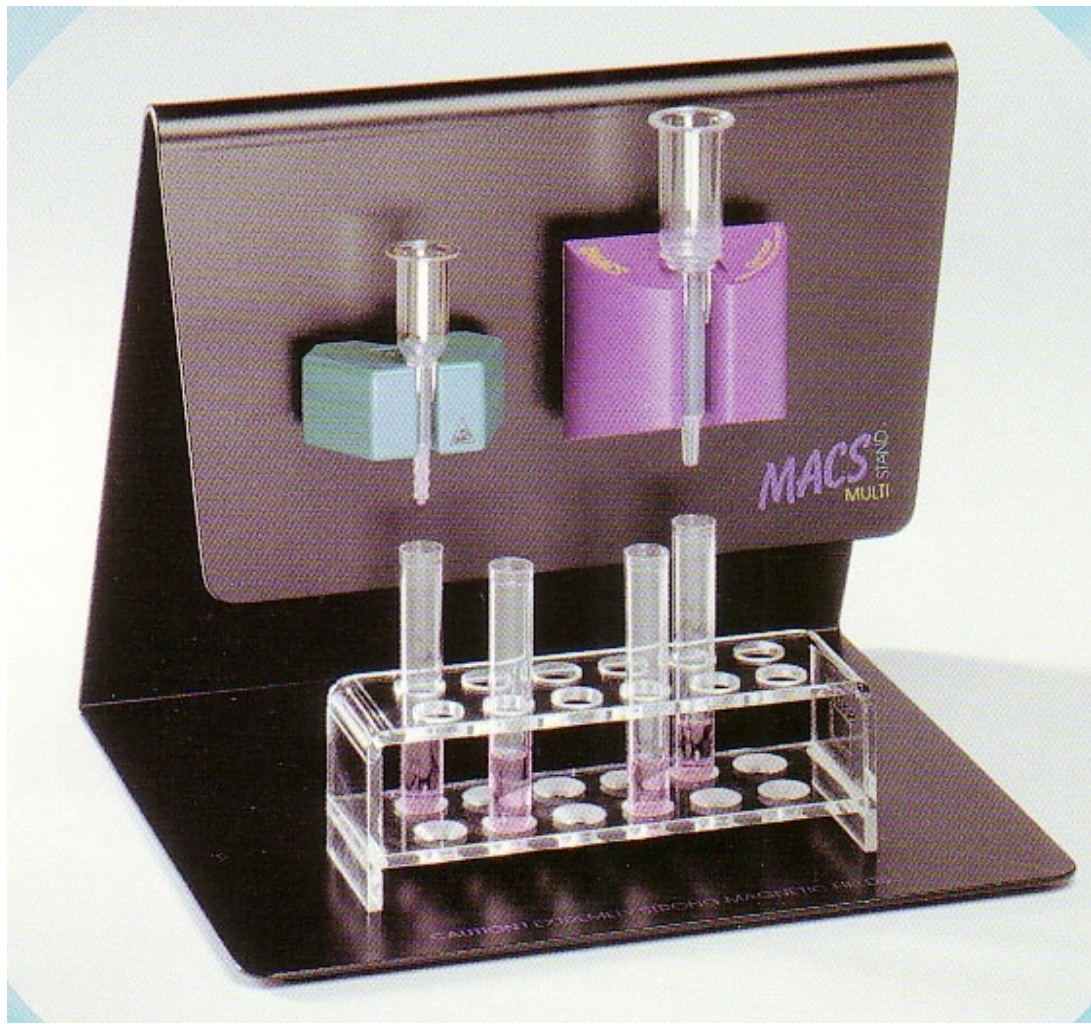


Positive



正选法:  
去除上清，将试管移出磁场，分析被磁珠捕获的细胞，即为目的细胞

# 免疫磁珠细胞分选装置





# 全自动细胞分选系统



# 流式细胞分析仪



## 第二节 淋巴细胞数量及功能检测

常用于鉴定和检测淋巴细胞表面标志是簇分化抗原（Cluster of differentiation, CD）。

## 细胞表面分化抗原（CD抗原）

- 适用于T、B细胞的分离
- 已知CD抗原细胞亚群的分离
- 未知CD抗原细胞亚群的分离
- （阴性分选）

# 一、T细胞表面标志及其亚群

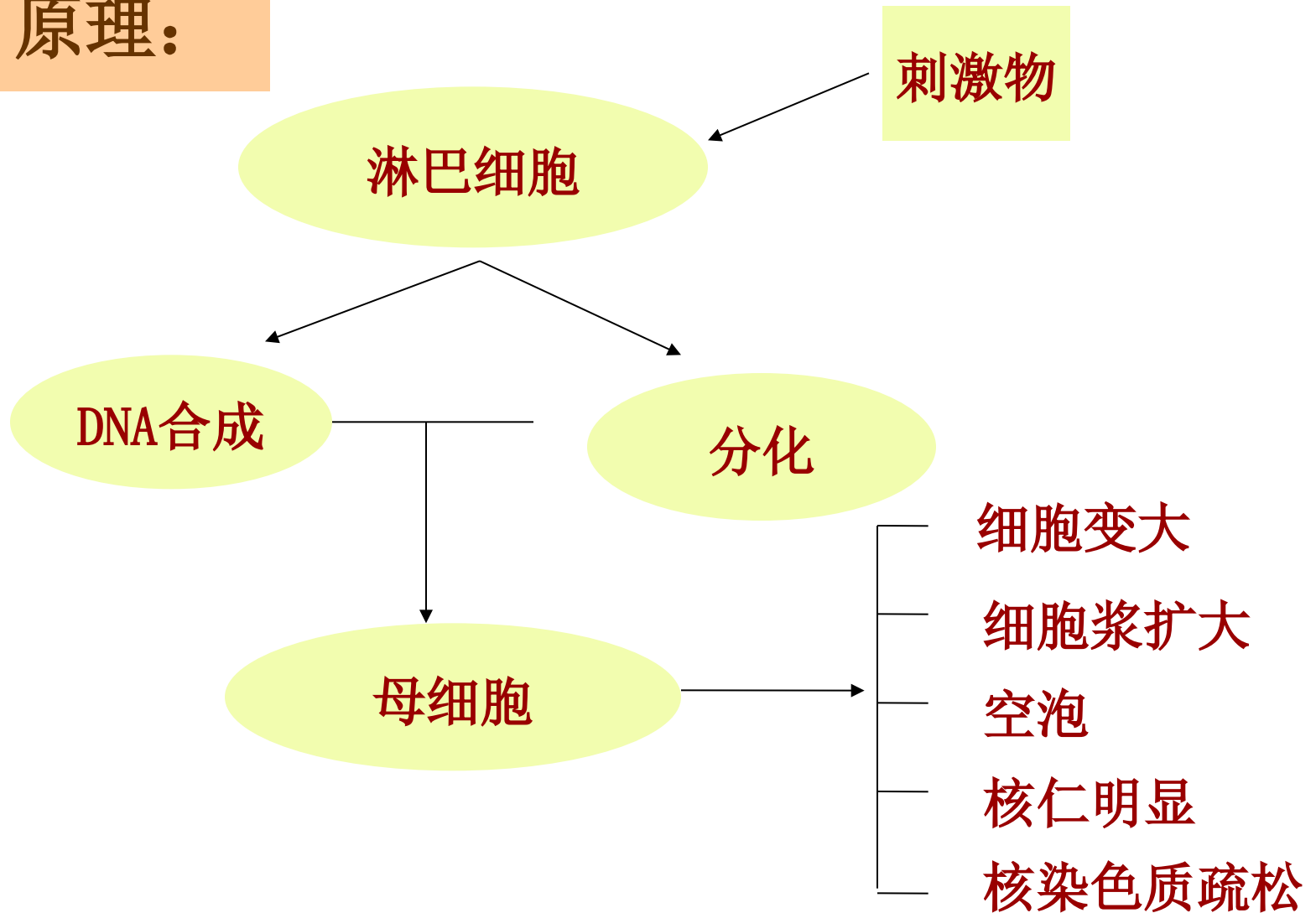
- **CD3+CD4+CD8-**辅助性T细胞  
(help T cell,Th)
- **CD3+CD4-CD8+**细胞毒性T细胞  
(cytotoxic T cell,Tc or CTL)
- **CD4+CD25+**调节性T细胞  
(regulatory T cell,Tr or Treg)

## 二、T细胞功能的检测

- T细胞增殖试验
- T细胞分泌功能测定
- T细胞介导的细胞毒试验
- 体内试验

# (一) T淋巴细胞增殖试验

## 1. 原理:



# 未转化和转化淋巴细胞的形态特征

## 转化的淋巴细胞

## 未转化的淋巴细胞

### 淋巴母细胞

### 过渡型

细胞大小(直径  
 $\mu\text{m}$ )

12~20

12~16

6~8

核大小、染色质

增大、疏松

增大、疏松

不增大、密集

核仁

清晰、1~4个

有或无

无

有丝分裂

有或无

无

无

胞质、着色

增多、嗜碱

增多、嗜碱

极少、天青色

浆内空泡

有或无

有或无

无

伪足

有或无

有或无

无



## 2. 淋巴细胞转化的刺激物

非特异性刺激物:

PHA -----T细胞

ConA -----T细胞

PWM -----T、 B细

胞

LPS -----B细胞

特异性刺激物:

异种抗原

同种组织抗原

### 3. 检测方法

形态法：刺激物 → 淋巴细胞（4-6天） → 母细胞化

同位素法：PHA → 淋巴细胞（54h）

DNA合成期 ↓ +  $^3\text{HTdR}$  掺入

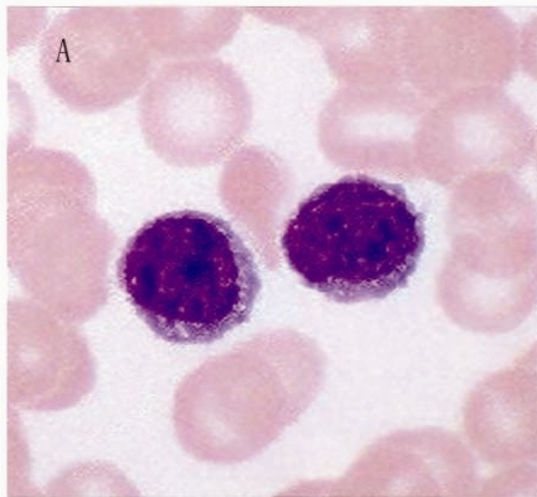
收集细胞

检测  $\beta$  射线

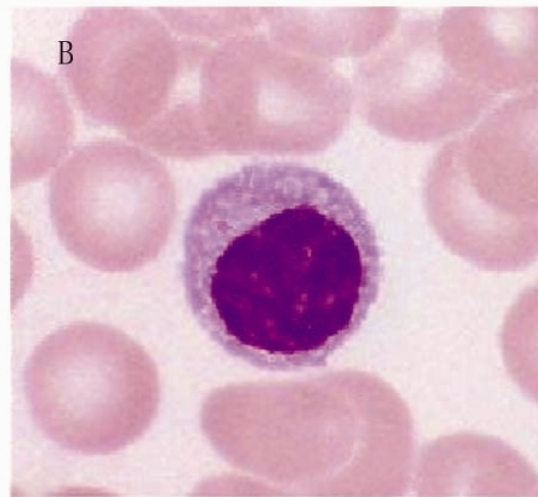
测定细胞内的 $^3\text{H}-\text{TdR}$

## (1) 形态学检查法

$$\text{转化率} = \frac{\text{转化的淋巴细胞数}}{\text{转化和未转化的淋巴细胞数}} \times 100\%$$



A: 未转化细胞



B: 转化细胞

图 15-1 淋巴细胞转化的形态特征示意图

## 方法学评价：

- 优点：形态学方法简便易行，普通光学显微镜便能观察结果，适于基层实验室应用。
- 缺点：是依靠肉眼观察形态学变化，判断结果易受主观因素影响，重复性和准确性较差。

## (2) <sup>3</sup>H-TdR掺入法

$$SI = \frac{\text{试验孔A}_{570\text{nm}} \text{均值}}{\text{对照孔A}_{570\text{nm}} \text{均值}}$$

- 优点：<sup>3</sup>H-TdR掺入法敏感性高，客观性强，重复性好。
- 缺点：但需一定设备条件，同时还存在放射性核素污染问题。

## (二) T细胞分泌功能测定

体外培养的T细胞经各种丝裂原或抗原刺激后,分泌各种细胞因子,可借助免疫学、细胞生物学及分子生物学技术分别检测细胞因子含量、生物学活性或基因表达水平,以反映T细胞功能。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/598040114143006051>