

B 淋巴细胞分离技术

一、实验原理

膜表面免疫球蛋白(SmIg)，是 B 细胞特有的表面标志，它既是 B 细胞识别抗原的受体，与相应抗原特异性结合；又是表面抗原，能与相应的抗 Ig 的抗体结合，故可用荧光标记的抗 Ig 抗体作免疫荧光镜检，以查出 B 淋巴细胞。由于 B 淋巴细胞在分化过程中最先出现 SmIg，所以该法可以检出全部 B 淋巴细胞。B 淋巴细胞表面最先出现 IgM，以后相继出现 IgG、IgD、IgA 等表面免疫球蛋白。而金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)能与许多哺乳动物 IgG 的 Fc 段发生结合，并且这种反应也发生于膜表面的 IgG，所以亦可以用荧光标记的 SPA 菌体(FITCSPA)替代 FITC 抗 IgG 检测 SmIg 阳性 B 淋巴细胞，凡于 FITCSPA 结合的细胞，在荧光显微镜下，可见到 B 淋巴细胞表面或周围布满许多呈黄绿色荧光的菌体，即为 SmIg 阳性细胞即为 B 淋巴细胞。现将荧光标记 SPA 法介绍如下：

二、实验材料

- 1 冻干荧光金黄色葡萄球菌 A 蛋白(FITCSPA)菌体试剂，用时按要求稀释。
- 2 pH 值 7.2 Hank's 液，含 5%小牛血清。
- 3 淋巴细胞分层液，20℃时比重为 1.077 ± 0.002
- 4 吸管、移液管、台式离心机、载玻片、盖玻片

三、实验步骤

- 1、取肝素抗凝血 2ml，用 Hank's 液稀释 1~2 倍，轻轻加入到装有 3ml 淋巴细胞分层液的试管中，2000~2500 r/min 水平离心 20~25min，获取淋巴细胞。
- 2、用 pH 值 7.2 Hanks 液洗 2 次，最终配成细胞数为 $2 \sim 25 \times 10^6/\text{ml}$ 的淋巴细胞悬液。用 pH 值 7.2 Hanks 液稀释 FITCSPA 菌体试剂，然后将淋巴细胞液与等量的 FITCSPA 菌体悬液混合，充分混匀后，放 4℃冰箱 30min。

3、再用经 37℃预热的 Hanks 液(含 5%小牛血清)洗涤离心

4、取沉淀细胞滴加在载玻片上，覆以盖玻片，在荧光显微镜下观察。

四、 结果观察

凡淋巴细胞表面粘附 5 个以上菌体细胞为 Smlg 阳性。一般先用暗视野计算荧光阳性细胞数，继用明视野计算同一视野中淋巴细胞总数。每份标本至少计算 200 个淋巴细胞，并求出荧光阳性细胞百分率，同时按原血标本中淋巴细胞的总数计算 B 淋巴细胞的绝对值。同时，每个 B 淋巴细胞表面可带有不同类别的 Ig，即 IgM、IgG、IgA 等，如果分别用单价荧光抗 Ig 血清染色，则可鉴定不同 Ig 的 B 淋巴细胞。但淋巴细胞数量的多少会影响检出率。过多或过少时，除难以计数外，染色背景明暗不匀，着色与不着色的细胞难以区别，一般以 $2 \sim 25 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞浓度为宜，活细胞数应不少于 95%。

五、 实验分析

此法特异性强，荧光亮度好，操作迅速简便。加上试剂有商品供应，可以使本法标准化。

一般 Smlg 阳性的 B 淋巴细胞表面或周围均可布满许多黄绿色荧光菌体，很少见到表面只粘附 2~3 个菌体细胞同时，每个 B 淋巴细胞表面可带有不同类别的 Ig，即 IgM、IgG、IgA 等，如果分别用单价荧光抗 Ig 血清染色，则可鉴定不同 Ig 的 B 淋巴细胞。

淋巴细胞数量的多少会影响检出率。过多或过少时，除难以计数外，染色背景明暗不匀，着色与不着色的细胞难以区别，一般以 $2 \sim 25 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞浓度为宜，活细胞数应不少于 95%。

实验注意事项

当 Smlg 抗体发生结合时，由于抗血清为双价，使 Smlg 出现交联现象，这种抗原与抗体结合物可连成斑点和帽状，时间过长，帽状结合物可脱落或被吞饮而消失，因此染色后，观察时间不能超过 30min，或在染色时加叠氮钠防止帽状物形成或被吞饮。

在滴片前要彻底去除游离的抗体，以避免假阳性结果

备注

异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) FITC 纯品为黄色或橙黄色结晶粉末，易溶于水和酒精溶剂。有两种异构体，其中异构体 I 型在效率、稳定性与蛋白质结合力等方面都更优良。FITC 分子量为 389.4，最大吸收光波长为 490 ~ 495nm，最大发射光波长为 520 ~ 530nm，呈现明亮的黄绿色荧光。FITC 在冷暗干燥处可保存多年，是目前应用最广泛的荧光素。其主要优点是人眼对黄绿色较为敏感，通常切片标本中的绿色荧光少于红色。