

T 淋巴细胞分离技术

(免疫细胞的分离、纯化和鉴定)

免疫细胞的分离、纯化技术

各种免疫细胞的分工与协作，共同完成免疫应答及其调控，因此，各种免疫细胞的分离及其功能测定对于了解其在免疫应答中的作用及相互关系有着重要意义。免疫细胞分离的方法有很多，主要是根据细胞的理化性状、功能，以及细胞表面标志等的差异而设计的。粘附分离法、尼龙毛柱分离法、羧基铁分离法等主要根据细胞的属性（如粘附）和功能不同，旨在将粘附和非粘附或粘附力较小的细胞分离开。有人证实免疫细胞在玻璃或塑料平面上的粘附能力分别为：巨噬细胞或单核细胞 > 树突状细胞 = 抗体产生细胞 > B 淋巴细胞 > T 淋巴细胞 = 红细胞。粘附的细胞可通过 trypsin 洗脱而收集。葡聚糖-泛影葡胺密度梯度离心法和 Percoll 不连续密度梯度离心法等是根据细胞的大小及比重的差异进行细胞分离。E 花环沉淀分离技术主要是利用细胞表面标志进行细胞分离。尚可利用特异性单克隆抗体结合其它技术分选细胞，如补体细胞毒分离法，洗淘分离法 (panning)、流式细胞术分离法，以及免疫磁珠法分离细胞技术等。一般应根据实验的目的及所需细胞的种类、纯度及数量等要求来确定采用何种方法。

Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞 (PBMC)

外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的分离是免疫学研究中的一项基本技术。目前国内外分离 PBMC 的常用方法是葡聚糖-泛影葡胺密度梯度离心法 (ficoll-hypaque density gradient centrifugation)，用此方法分离 PBMC 纯度可达 95%，淋巴细胞约占 90%，其中 T 淋巴细胞占 80%，B 淋巴细胞占 4~10%。ficoll-hypaque 混合溶液，又称淋巴细胞分层液，在分离人 PBMC 时，要求其比重为 1.077；分离小鼠单个核细胞时比重为 1.080；分离大鼠单个核细胞时比重为 1.084~1.087；分离马单个核细胞时比重为 1.090。

【原理】

血液中各有形成分的比重存在差异，利用比重为 1.077、近于等渗的 ficoll-hypaque 混合溶液（又称淋巴细胞分层液）作密度梯度离心时，各种血液成分将按密度梯度重新聚集。血浆和血小板由于密度较低，故悬浮于分层液的上部；红细胞与粒细胞由于密度较大，故沉于分层液的底部；PBMC 密度稍低于分层液，故位于分层液界面上，这样就可获得 PBMC。

【器材与试剂】

1. 刻度离心管、吸管、试管、毛细吸管、橡皮乳头、载玻片、盖玻片、离心机等。
2. pH7.2 Hanks 液、肝素、生理盐水溶液，淋巴细胞分层液。（8.2%的聚蔗糖溶液 28 份，35.7%泛影葡胺 10 份）

【方法】

1. 静脉取血 2ml，加入含肝素溶液(10~50u / ml 血样本)的试管中，混匀，使血液抗凝。用 pH7.2 Hanks 液或生理盐水将抗凝血稀释 1 倍。

2.吸取 2ml 淋巴细胞分层液置于刻度离心管中，然后将离心管倾斜 45°角，用毛细滴管将稀释的全血沿管壁缓慢加至分离液上面，应注意保持两者界面清晰。

3.在 18℃ ~ 20℃下，用水平离心机以 2000r/min 离心 20min。离心后细胞分布如图。

4.用毛细吸管轻轻插到混浊带，沿管壁轻轻吸出此层细胞，移入另一支离心管中。即要吸取所有单个核细胞，又要避免吸取过多的分层液或血浆，以免混入其他细胞成分。

5.用 Hanks 液洗涤细胞 3 次。第一次 2000r/min，10 min；第 2 ~ 3 次 1500r/min，10 min，可去掉大部分混杂的血小板。

6.将沉淀细胞悬于培养基中备用。

【注意事项】

1、实验所用玻璃器皿应该洁净。如果制备的单个核细胞悬液用于细胞培养时，上述操作过程都要在无菌条件下进行，所用器材、试剂都应无菌。

2、实验中的细胞得率与室温及分层液比重等有关。分层液应避光 4℃保存。

3、往淋巴细胞分层液中加入稀释全血时，不得将血液冲入分离液中，须保持两层液体的清晰界面。

免疫磁珠法分离淋巴细胞

【原理】

免疫磁珠法分离细胞是基于细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合，在外加磁场中，通过抗体与磁珠相连的细胞被吸附而滞留在磁场中，无该种表面抗原的细胞由于不能与连接着磁珠的特异性单抗结合而没有磁性，不在磁场中停留，从而使细胞得以分离。

根据免疫磁珠 (immune magnetic bead, IMB) 的种类，免疫磁珠法分离细胞可分为直接法和间接法。**直接法**即将特异性抗体与磁珠相连，IMB 可与表达相应膜抗原的细胞结合，在磁性分离器 (磁架) 作用下，连有磁珠的细胞被吸附在磁架上，从而与其他细胞分离。间接法即将二抗与磁珠相连，磁珠通过二抗与一抗相结合，一抗与细胞表面抗原结合，因此使磁珠与细胞相连，从而在磁场作用下，对细胞进行分离。直接法分离得到的连有磁珠的细胞可直接用于功能实验或流式细胞仪检测。间接法分离得到的连有磁珠的细胞须再培养 2 天，待磁珠从细胞上脱落下来，才能进行功能实验或流式细胞仪检测。近年来，开发了生物素标记的单抗--亲和素/链霉亲和素—生物素结合的磁珠实验体系 (BAB 法)。利用生物素和亲和素之间的高亲和力及生物放大效应来增强 IMB 与细胞的特异性结合，从而提高细胞分离效率。为了分离后迅速进行分离效果分析，目前有研究者将荧光素 (如 FITC) 标记在亲和素/链霉亲和素表面，使所分离的细胞在流式细胞仪上马上得到检测，从而省去了免疫荧光染色的时间。

根据磁珠结合的细胞与所要获得的细胞的关系，免疫磁珠法分离细胞可分为正选法和负

选法。正选法即磁珠结合的细胞就是所要分离获得的细胞,负选法即磁珠结合不需要的细胞,游离于上清液的细胞为所需细胞。还有一种基于负选法的高效分离方法,即在实验体系中加入连接有磁珠的多种单抗,通过磁性分离器后,则所有不需要的细胞被吸附在磁架上,未被吸附的细胞为目的细胞。这种方法可一次去除多种细胞,又称鸡尾酒法 (cocktail)。

免疫磁珠法分离细胞是一种 90 年代初兴起的新型细胞分离技术,所获细胞纯度高 (93%-99%),获率可达 90%,活细胞率大于 95%,且操作简单,不需使用离心沉淀分离技术,省时且费用低。

以下介绍免疫磁珠间接法分离淋巴细胞 (正选法) (以 Immunotech 公司产品为例)。

【器材与试剂】

连接有磁珠的二抗,抗体 (一抗)、PBS+0.2%BSA、PBS+1.2%BSA、PBS+30%FCS、磁架、玻璃管等。

【方法】

1. 取适量磁珠悬液,用 20 倍体积的 PBS+0.2%BSA 溶液重悬后,置磁架上 5min。(磁珠与单个核细胞或全血的比例为: 0.5mg 磁珠/ 1×10^7 个单个核细胞或 1ml 全血)

2. 吸去上清,以去除在储存过程中从磁珠上脱落的二抗。用 100ul PBS+0.2%BSA 溶液重悬磁珠。加入一抗 (一抗与磁珠的比例为: 5ug 一抗/1mg 磁珠),置室温 15 min,中间轻微晃动二次。再置磁架上 5min。

3. 加入 2ml PBS+1.2%BSA 溶液,再置磁架上 5min。吸去上清,以去除未与二抗结合的一抗。重复操作一次。用 100ul PBS+0.2%BSA 溶液重悬磁珠。

4. 用 PBS+30%FCS 调整待分离细胞的浓度为 1×10^7 细胞/ml,将细胞加入磁珠悬液中,置室温 10min,中间轻微晃动一次。然后置磁架上 10min。吸去上清。

5. 用完全培养基重悬磁珠结合的细胞后直接进行培养。

【注意事项】

1. 若采用负选法分离细胞,磁珠与细胞比例为: 1mg 磁珠/ 1×10^7 单个核细胞或 1ml 全血。

2. 待分离的细胞悬液应尽量是单细胞悬液,避免细胞粘附成团,以免影响分离效果。

血清灭活处理步骤

① 选用与血清瓶同规格的对照瓶一个。

② 对照瓶内放入与血清等体积的水。

③ 温度预试：

对照瓶内插入 2—3 支经挑选的温度计(保证测试温度的准确性)，放入水浴箱中，接通电源，调节温度控制钮，使水浴箱温度所示温度保持在 56℃。

④ 血清灭活：

血清瓶与带温度计的对照瓶一齐放入水浴箱中，待温度计所示温度上升至 56℃ 时， 定时 30 分钟。

⑤ 大瓶血清灭活后， 进行分装

⑥保存

分装后，抽样做无菌试验， - 20 ~ - 70℃保存。

血清的热灭活是很多培养者感兴趣的话题，价格不菲的血清中含有诸如生长因子，维生素，氨基酸等珍贵物质，而将它们置于 50℃以上的温度长达 30 分钟是完全没有必要的。尽管如此，在大多数实验室之中血清的热灭活还是作为常规来执行，多数实验者并没有考虑热处理对血清中的生长因子，氨基酸等成分带来的负面影响，在我们的技术热线中最常被提到的就是否该对血清进行热灭活。