

Высшее профессиональное образование

# ПРАКТИКУМ ПО ИММУНОЛОГИИ

2-е издание

Учебное пособие



Естественные  
науки

ВЫСШЕЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ

# ПРАКТИКУМ ПО ИММУНОЛОГИИ

Под редакцией  
И. А. Кондратьевой и А. А. Ярилина

*Допущено  
Министерством образования Российской Федерации  
в качестве учебного пособия для студентов  
высших учебных заведений, обучающихся по направлению  
510600 «Биология» и специальности 011600 «Биология»*

2-е издание, исправленное и дополненное

Москва  
  
ACADEMA  
2004

УДК 632.938(075.8)

ББК 28.074я73

П68

Авторы:

И. А. Кондратьева, А. А. Ярилин, С. Г. Егорова, **[К. В. Фрезе]**, Н. В. Воробьева,  
О. В. Буракова, Н. В. Малюченко, М. М. Мойсенович, К. Н. Новиков,  
А. В. Симонова, Б. В. Пинегин, А. А. Киташова, А. В. Киташов, Н. А. Заякин

Рецензенты:

акад. РАН, проф. *Г. И. Абеlev* (зав. лабораторией иммунохимии опухолей  
Института канцерогенеза РОНЦ РАМН);  
чл.-кор. РАМН, проф. *И. С. Гуцин* (зав. отделом Государственного научного  
центра — Института иммунологии Министерства здравоохранения РФ)

**Практикум по иммунологии:** Учеб. пособие для студ. высш.  
П68 учеб. заведений / И. А. Кондратьева, А. А. Ярилин, С. Г. Его-  
рова и др.; Под ред. И. А. Кондратьевой и А. А. Ярилина. —  
2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательский центр «Акаде-  
мия», 2004. — 272 с.

ISBN 5-7695-1497-3

В пособии представлены современные принципы и методы исследова-  
ния клеточного и гуморального иммунитета млекопитающих и человека,  
методы иммунохимического анализа и гибридной технологии, даны ре-  
комендации по применению этих методов при изучении иммунитета рыб  
и беспозвоночных животных. По сравнению с предыдущим изданием  
книгу дополняет материал о новых методах: определение внутриклеточ-  
ных и секретируемых цитокинов, оценка апоптоза, рекомбинатных анти-  
тел и т. д. Текст сопровождается оригинальными иллюстрациями авторов.

Для студентов биологических специальностей вузов. Может быть по-  
лезно специалистам, работающим в разных областях биологии, медици-  
ны, сельскохозяйственных наук и ветеринарии.

УДК 632.938(075.8)

ББК 28.074я73

*Учебное издание*

**Кондратьева Ирина Анатольевна, Ярилин Александр Александрович,  
Егорова Светлана Григорьевна и др.**

**Практикум по иммунологии**

**Учебное пособие**

Редактор *А. П. Сашина*. Технический редактор *Н. И. Горбачева*  
Компьютерная верстка: *Г. Ю. Никитина*. Корректоры *Н. В. Савельева, Г. Н. Петрова*  
Изд. № 1167-П. Подписано в печать 21.07.04. Формат 60×90/16. Гарнитура «Таймс».  
Бумага тип. № 2. Печать офсетная. Усл. печ. л. 17,0. Тираж 5100. Заказ №13748.

Лицензия ИД № 02025 от 13.06.2000. Издательский центр «Академия».  
Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.02.953.Д.004796.07.04 от 20.07.2004  
117342, Москва, ул. Буглерова, 17-Б. Тел./факс (095) 330-10-92

Отпечатано на Саратовском полиграфическом комбинате.  
410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 59.

© Коллектив авторов, 2004

© Образовательно-издательский центр «Академия», 2004

© Оформление. Издательский центр «Академия», 2004

ISBN 5-7695-1497-3

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие .....	3
Глава 1. Методы работы с животными (И. А. Кондратьева) .....	7
1.1. Методы введения антигена мышам и кроликам .....	11
1.1.1. Метод внутривенного введения антигена мышам .....	12
1.1.2. Метод внутривенного введения антигена кроликам .....	12
1.1.3. Метод внутрибрюшинного введения антигена мышам .....	13
1.1.4. Метод внутриселезеночного введения антигена мышам .....	13
1.1.5. Метод внутримышечного введения антигена мышам .....	14
1.1.6. Метод внутримышечного введения антигена кроликам .....	14
1.1.7. Метод подкожного введения антигена мышам .....	15
1.1.8. Метод подкожного введения антигена кроликам .....	15
1.1.9. Метод внутрикожного введения антигена мышам .....	15
1.1.10. Метод накожного применения антигена мышам и кроликам .....	16
1.1.11. Метод перорального введения антигена животным .....	16
1.2. Выделение органов и клеток иммунной системы у мышей и кроликов .....	16
1.2.1. Выделение В-лимфоцитов из костного мозга мышей .....	18
1.2.2. Выделение Т-клеток из тимуса мышей .....	18
1.2.3. Выделение клеток селезенки (спленоцитов) мышей .....	19
1.2.4. Выделение клеток из лимфатических узлов мышей .....	19
1.2.5. Взятие перитонеальных макрофагов у мышей .....	20
1.2.6. Взятие крови .....	21
1.3. Приготовление клеточных суспензий .....	24
1.4. Подсчет клеток в камере Горяева .....	25
1.4.1. Статистическая обработка результатов .....	26
1.5. Определение жизнеспособности клеток .....	27
1.6. Разделение клеток на фиколин-паке .....	27
1.7. Получение антисывороток .....	29
1.7.1. Получение кроличьей антисыворотки против тимоцитов мышей F <sub>1</sub> (СВА×С57BL/6) .....	31
1.7.2. Получение мышиной антилинейной сыворотки .....	32
1.8. Цитотоксическая реакция с антисыворотками и комплементом .....	32
1.9. Получение иммунных и толерантных мышей .....	34
1.9.1. Получение у мышей первичного иммунного ответа .....	34
1.9.2. Получение у мышей вторичного иммунного ответа .....	34
1.9.3. Получение мышей, толерантных к антигену .....	35
Глава 2. Иммунодиффузия в геле и иммуноэлектрофорез (Н. В. Воробьева) .....	37
2.1. Общие принципы постановки иммунодиффузии .....	37
2.2. Двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони .....	39
2.3. Простая радиальная иммунодиффузия по Манчини .....	43
2.4. Иммуноэлектрофорез .....	48
2.5. Ракетный иммуноэлектрофорез .....	52
2.6. Перекрестный иммуноэлектрофорез .....	55
Глава 3. Иммуноферментный анализ (О. В. Буракова, Н. В. Малоченко) .....	59
3.1. Общие принципы постановки ИФА .....	60
3.1.1. Гомогенный ИФА .....	61
3.1.2. Гетерогенный, или твердофазный, ИФА (ТИФА) .....	63
3.2. Общая схема проведения ТИФА .....	70
3.3. Практическая часть. Примеры проведения исследований с помощью ТИФА .....	70
3.3.1. Определение оптимального титра иммунной сыворотки с помощью прямого ТИФА .....	71
3.3.2. Варианты непрямого ТИФА .....	74

3.3.3. Примеры проведения «сэндвич»-варианта ТИФА .....	82
3.3.4. Конкурентный ТИФА с антигеном, сорбированным на планшет .....	88
3.3.5. Взаимодействие антител с антигеном в растворе с использованием биотинной метки .....	90
3.3.6. Сравнение степени связывания нативных и модифицированных антител в клеточном ТИФА .....	93
<b>Глава 4. Иммуноглобулины: выделение и анализ</b> [К. В. Фрезе] .....	97
4.1. Выделение глобулиновой фракции из сыворотки крови иммунизированного кролика. Солевое фракционирование белков сыворотки крови .....	98
4.2. Хроматографическое разделение иммуноглобулинов .....	101
4.2.1. Получение IgG-фракции из суммарной глобулиновой фракции сыворотки крови иммунизированного кролика с помощью ионообменной хроматографии .....	102
4.2.2. Выделение IgG мыши аффинной хроматографией на белок-А-сефарозе .....	107
4.2.3. Протеолитическое расщепление иммуноглобулинов. Разделение Fab- и Fc-фрагментов IgG кролика .....	109
4.2.4. Получение тяжелых и легких цепей IgG мыши. Фракционирование по размерам молекул .....	111
4.3. Электрофоретические методы в изучении иммуноглобулинов .....	114
4.3.1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия для анализа иммуноглобулинов .....	115
4.3.2. Иммуноблоттинг .....	120
<b>Глава 5. Гибридная технология</b> (С. Г. Егорова, М. М. Мойсенович, К. Н. Новиков) .....	126
5.1. Теоретические основы и предпосылки создания гибридной технологии .....	126
5.1.1. Получение миелом .....	127
5.1.2. Соматическая гибридизация. ....	128
5.1.3. Получение селективных культуральных сред (селекция гибридных клеток) .....	128
5.2. Создание гибридом .....	131
5.2.1. Иммунизация животных .....	131
5.2.2. Культивирование миеломных клеток .....	135
5.2.3. Слияние клеток миеломы с иммунными спленоцитами .....	137
5.2.4. Скрининг антител .....	139
5.2.5. Клонирование гибридных клеток .....	145
5.2.6. Размножение клонированных гибридом .....	147
5.2.7. Хранение гибридом и клонов .....	148
5.2.8. Очистка антител .....	150
5.3. Применение моноклональных антител .....	150
<b>Глава 6. Исследование гуморального иммунитета в клинике</b> (А. В. Симонова, Б. В. Линегин) .....	154
6.1. Определение иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови человека .....	154
6.2. Определение sIgA в слюне .....	159
6.3. Определение активности комплемента (по 50 %-му гемолизу) .....	161
6.4. Реакция связывания комплемента (РСК) .....	164
6.5. Определение общего IgE иммуноферментным методом .....	167
<b>Глава 7. Исследование клеточного иммунитета в клинике</b> (Б. В. Линегин, А. В. Симонова, Н. В. Воробьева) .....	170
7.1. Идентификация лимфоцитов и их субпопуляций с помощью моноклональных антител к их поверхностным дифференцировочным антигенам .....	170
7.1.1. Характеристика фенотипа лимфоцитов с помощью моноклональных антител .....	170
7.1.2. Проточная цитометрия .....	173

7.2. Метод непрямой иммунофлуоресценции для определения фенотипа лимфоцитов с помощью моноклональных антител .....	174
7.2.1. Вариант метода с использованием лазерного проточного цитометра ....	174
7.2.2. Вариант метода с использованием люминесцентного микроскопа ...	176
7.3. Определение количества лимфоцитов различных субпопуляций в лимфотоксическом тесте с помощью моноклональных антител .....	176
7.4. Метод оценки функциональной активности лимфоцитов — реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) .....	178
7.5. Смешанная культура лимфоцитов .....	181
7.6. Метод определения активности естественных киллерных клеток .....	187
7.7. Цитотоксическая активность нейтрофилов .....	188
7.8. Определение активности нейтрофилов .....	189
7.8.1. Хемотаксис нейтрофилов .....	189
7.8.2. Модификации метода .....	191
7.9. Спектрофотометрическое определение восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами (НСТ-тест) .....	192
7.10. Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках периферической крови человека .....	193
<b>Глава 8. Применение иммунологических методов в изучении эволюции иммунной системы (И. А. Кондратьева, А. А. Киташова, А. В. Киташов) ....</b>	<b>196</b>
8.1. Объекты изучения .....	197
8.2. Методы работы с животными .....	198
8.2.1. Отлов и содержание .....	198
8.2.2. Стимуляция иммунного ответа .....	199
8.2.3. Отбор проб .....	201
8.3. Методы исследования врожденного иммунитета .....	203
8.3.1. Подготовка препаратов для микроскопирования и видеосъемки .....	203
8.3.2. Наблюдение гемоцитов и амебоцитов .....	204
8.3.3. Динамика концентрации амебоцитов и гемоцитов в ответ на антигенную стимуляцию .....	205
8.3.4. Реакция гемагглютинации .....	209
8.3.5. Электрофорез .....	211
8.3.6. Определение общей концентрации белка .....	212
8.3.7. Определение концентрации лизоцима .....	213
8.4. Методы исследования приобретенного иммунитета .....	217
8.4.1. Выделение из сыворотки крови здоровых рыб иммуноглобулиновой фракции .....	218
8.4.2. Получение поликлональной кроличьей антисыворотки против иммуноглобулинов рыб. Выделение из нее иммуноглобулиновой фракции .....	218
8.4.3. Подбор условий для иммуноферментного анализа .....	219
8.4.4. Изучение специфического иммунитета рыб против <i>Alcaligenes sp.</i> и <i>Citrobacter freundii</i> .....	221
8.5. Методы статистической обработки данных .....	225
<b>Глава 9. Возможности применения компьютерной техники в практикуме по иммунологии (А. В. Киташов, Н. А. Заякин) .....</b>	<b>227</b>
9.1. Общие принципы применения компьютерной техники .....	227
9.2. Примеры преобразования данных .....	228
9.3. Пример обработки результатов .....	233
Приложение. Буферные растворы и среды .....	235
Программа. Основы иммунологии (А. А. Ярилин, И. А. Кондратьева, С. Г. Егорова) .....	241
Словарь иммунологических терминов (А. А. Ярилин) .....	246
Список литературы .....	260
Предметный указатель .....	262