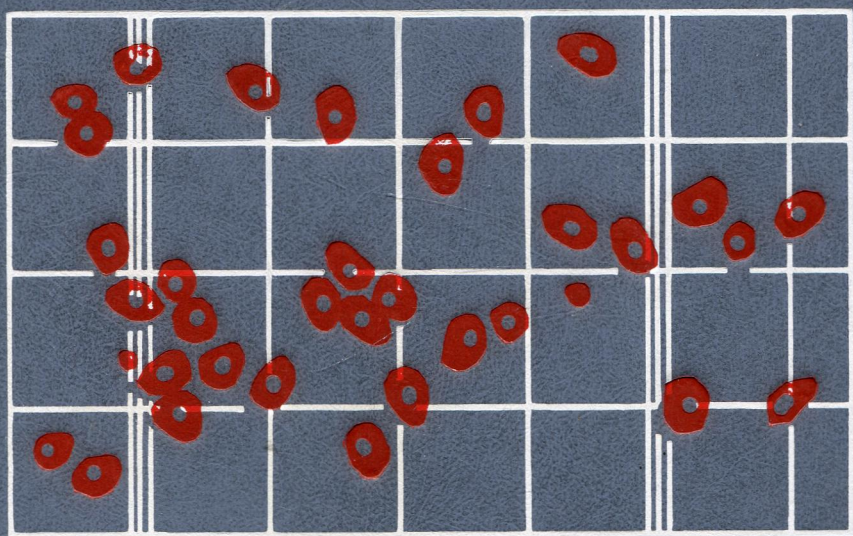


# Иммунологические методы исследований



Издательство «Мир»

# **Иммунологические методы исследований**

Под редакцией  
**И. Лефковитса,  
Б. Перниса**

Перевод с английского  
д-ра биол. наук **Г. А. Банникова,**  
канд. биол. наук **Ю. Ю. Венгерова**  
и д-ра биол. наук **Г. Г. Гаузе**

под редакцией  
д-ра биол. наук **А. Т. Михайлова**



**Москва «Мир» 1988**

ББК 28.073  
И53  
УДК 57.083.3

**Иммунологические методы исследований: Пер. с англ./**  
И53 Под ред. И. Лефковитса, Б. Пернуса. — М.: Мир, 1988.  
530 с., ил.  
ISBN 5-03-001170-6

Настоящая книга авторов из Нидерландов, США, Швейцарии, Италии представляет собой перевод третьего тома серии *Immunological Methods*; переводы двух первых томов выпущены издательством «Мир» в 1981 и 1983 гг. В данную книгу вошли последние, наиболее актуальные методические разработки в области молекулярной и клеточной иммунологии.

Предназначена для иммунологов, специалистов по молекулярной биологии, цитологов, врачей, лаборантов научно-исследовательских институтов, аспирантов и студентов биологических специальностей.

И 2001040000—157  
041(01)—88 134—88, ч. 1

ББК 28.073

*Редакция литературы по биологии*

**Монография**

Микаэл Стейнметц, Даниэл Стефан,  
Голам Реза Дастурнику и др.

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Под ред. Ивана Лефковитса и Бенвенуто Пернуса

Зав. редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев  
Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова  
Научн. редактор Т. И. Пономарева  
Мл. редактор Н. Ю. Плавинская  
Художник В. А. Медников  
Художественный редактор К. И. Радченко  
Технический редактор И. М. Кренделева  
Корректор М. А. Смирнов

ИБ № 5897

Сдано в набор 11.IX.87. Подписано к печати 5.II.88. Формат 60×90<sup>1/16</sup>. Бумага книжно-журн. Гарнитура латинская. Объем 16,50 бум. л. Усл. печ. л. 33,0. Усл. кр.-отт. 33,0. Уч.-изд. л. 32,62. Изд. № 4/5217. Тираж 8500 экз. Зак. 1278. Цена 3 р. 60 коп.

Издательство «Мир». 129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.

ISBN 5-03-001170-6 (русск.)  
ISBN 0-12-442703-0 (англ.)

© 1985, by Academic Press, Inc.  
© перевод на русский язык, «Мир», 1988

## Оглавление

Предисловие редактора перевода . . . . .	5
Предисловие . . . . .	7
Список авторов . . . . .	9
Список сокращений . . . . .	12
<b>Глава 1. МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИММУНОЛОГИИ: «ПРОГУЛКА ВДОЛЬ ХРОМОСОМЫ» В ОБЛАСТИ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ (М. Стейнметц, Д. Стефен, Г. Р. Дастурнику, Э. Джибб и Р. Романюк)</b> . . . . .	<b>16</b>
I. Введение . . . . .	16
II. Материалы . . . . .	17
III. Конструирование космидных библиотек . . . . .	18
А. Частичный гидролиз эукариотической ДНК . . . . .	19
Б. Фракционирование в сахарозном градиенте . . . . .	19
В. Идентификация фракций, содержащих фрагменты ДНК размером 30—50 kb . . . . .	21
Г. Приготовление «плеч» вектора . . . . .	22
Д. Лигирование фрагментов вектора и эукариотической ДНК . . . . .	23
Е. Упаковка <i>in vitro</i> . . . . .	24
Ж. Титрование . . . . .	24
З. Рассев библиотеки . . . . .	25
И. Получение реплик . . . . .	25
К. Лизис и связывание с ДНК . . . . .	27
IV. Скрининг космидных библиотек . . . . .	27
А. Преинкубация . . . . .	27
Б. Гибридизация . . . . .	28
В. Промывка . . . . .	29
Г. Радиоавтография, проявление, хранение . . . . .	29
Д. Идентификация и отсев положительных колоний . . . . .	30
Е. Повторный скрининг положительных колоний . . . . .	31
Ж. Хранение космидных клонов . . . . .	31
V. Характеристика космидных клонов . . . . .	32
А. Выделение ДНК . . . . .	32
Б. Анализ методом дот-блот . . . . .	33
В. Рестрикционное картирование . . . . .	33
Г. Выделение зондов для «прогулки вдоль хромосомы» . . . . .	34
VI. Критическая оценка . . . . .	35
Литература . . . . .	37
<b>Глава 2. ТРАНСФОРМАЦИЯ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ДНК (Дж. Мак-Кабри)</b> . . . . .	<b>38</b>
I. Введение . . . . .	38
II. Доминантные селективируемые маркеры . . . . .	39
III. Методы стабильного переноса генов . . . . .	40

А. Копреципитация ДНК с фосфатом кальция . . . . .	40
Б. Слияние бактериальных протопластов . . . . .	42
IV. Другие методы стабильного переноса генов . . . . .	46
Литература . . . . .	46
<b>Глава 3. КЛОНИРОВАНИЕ КДНК С ПОМОЩЬЮ ВЕКТОРОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭКСПРЕССИЮ В КЛЕТКАХ-ХОЗЯЕВАХ (М. Хи-рама)</b> . . . . .	<b>48</b>
I. Введение . . . . .	48
II. Общие подходы и связанные с ними трудности . . . . .	49
III. Экспериментальные процедуры . . . . .	54
А. Материалы общего назначения и исходные растворы . . . . .	54
Б. Получение полисомной мРНК . . . . .	54
В. Подготовка вектора-затравки . . . . .	58
Г. Получение линкеров . . . . .	61
Д. Синтез кДНК . . . . .	62
Е. Циклизация плазмиды с помощью линкера, содержащего oligo(dG)-концевую последовательность . . . . .	67
Ж. Синтез второй цепи кДНК путем замещения мРНК . . . . .	68
З. Трансформация бактерий плазмидой, полученной на этапе III, Ж . . . . .	68
И. Селекция с помощью гибридизации . . . . .	69
К. Индукция триптофанового оперона и получение бактериального экстракта . . . . .	69
Л. Скрининг с помощью антител . . . . .	70
IV. Общие замечания . . . . .	70
А. Метод Хейдекера — Мессинга . . . . .	70
Б. Состыкованные полипептиды . . . . .	72
В. Эукариотическая система . . . . .	72
Литература . . . . .	73
<b>Глава 4. КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ «ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ» ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (А. Траунекер)</b> . . . . .	<b>74</b>
I. Введение . . . . .	74
II. Общая стратегия . . . . .	75
А. Векторы для клеточной трансформации . . . . .	75
Б. Обычно используемые векторы . . . . .	75
III. Материалы и исходные растворы . . . . .	75
IV. Экспериментальные процедуры . . . . .	76
А. Экстракция мини-плазмид . . . . .	76
Б. Быстрое препаративное получение плазмид . . . . .	77
В. Очистка фрагментов ДНК в геле легкоплавкой агарозы . . . . .	80
Г. Лигирование выделенных фрагментов с соответствующим вектором . . . . .	82
Д. Получение компетентных бактерий с помощью CaCl <sub>2</sub> . . . . .	82
Е. Трансформация компетентных бактерий . . . . .	82
Ж. Стратегия для отбора генетических конструкций . . . . .	83
V. Примеры конструкций . . . . .	86
А. Конструкции, полученные на основе генов IgM (генов анти-TNP легкой и тяжелой цепи) . . . . .	86
Б. Работа с клонированными генами <i>in vitro</i> . . . . .	86
Литература . . . . .	86

<b>Глава 5. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ ОЛИГОНУК-ЛЕОТИДОВ</b> (Х. Кифер, В. Банварт)	<b>88</b>
I. Введение	88
II. Основные принципы синтеза	89
А. Твердая фаза	89
Б. Триэфирный метод	90
В. Фосфитный метод	91
Г. Защищенные блоки элонгации	92
Д. Удаление защитных групп	93
Е. Синтез вручную на полимерном носителе	94
Ж. Синтезаторы	95
III. Экспериментальная часть	97
А. Функционализация стеклянного носителя	97
Б. Отщепление цианэтильной группы от триэфиров мономеров и димеров и подготовка к этапу конденсации на носителе	98
В. Активация амидитов для реакции на носителе	99
Г. Активация и связывание диэфиров	99
Д. Проведение реакций в условиях полного отсутствия влаги	99
Е. Тритильный анализ	100
Ж. Удаление защитных групп и очистка дезоксирибонуклеотидов после синтеза на полимерном носителе	100
IV. Реагенты и растворители, которые необходимо очищать или готовить	102
Литература	103
 <b>Глава 6. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ВЖХ) БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БЕЛКОВ В НАНОГРАММОВЫХ (ПИКОМОЛЬНЫХ) КОЛИЧЕСТВАХ</b> (К. Ройтч, М. Барнес)	 <b>104</b>
I. Введение	104
II. Материалы и методы	105
А. Оборудование	105
Б. Матрицы для колонок	106
В. Определения биологической активности	106
Г. Аминокислотный анализ	106
III. Разделение по размеру: гель-проникающая хроматография	107
А. Введение	107
Б. Реагенты и условия элюции	107
В. Использование для очистки и характеристики МГФР	108
Г. Аналитический вариант	108
Д. Переход к препаративному разделению	109
IV. Разделение по заряду: хроматография на ионообменных носителях и гидроксипатите	109
А. Ионообменная хроматография (ИОХ)	109
Б. Хроматография на гидроксипатите	113
V. Разделение по гидрофобным свойствам: обратнофазовая хроматография	115
А. Введение	115
Б. Реагенты и условия элюции	115
В. Использование обратнофазовой хроматографии	118
Г. Общие замечания для аналитического варианта разделения	121
Д. Препаративное выделение	123
VI. Количественное определение белка и пределы чувствительности	123
А. Введение	123

Б. Реагенты и условия элюции . . . . .	124
В. Определение по УФ-поглощению при 280 и 205 нм . . . . .	125
Г. Сравнение ошибок при количественном определении белка по поглощению УФ-света и колориметрическими методами . . . . .	125
VII. Очистка белков . . . . .	128
А. Предварительные замечания . . . . .	128
Б. Некоторые необоснованные представления . . . . .	129
В. Работа с образцом . . . . .	129
Г. Применение . . . . .	130
Д. Препаративное разделение . . . . .	131
Литература . . . . .	131
<b>Глава 7. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (Джеффри У. Хенсон)</b> . . . . .	<b>133</b>
I. Введение . . . . .	133
II. ВЖХ: теория, практика и оборудование . . . . .	134
А. Теория . . . . .	134
Б. Практика . . . . .	136
В. Оборудование . . . . .	137
III. Использование ВЖХ для очистки и исследования иммуноглобулинов . . . . .	139
А. Общие замечания . . . . .	139
Б. Гель-проникающая ВЖХ (ГП-ВЖХ) . . . . .	139
В. Обратнофазовая ВЖХ (ОФ-ВЖХ) . . . . .	143
Г. ВЖХ на гидроксипатите (ГА-ВЖХ) . . . . .	145
IV. Обсуждение . . . . .	148
Литература . . . . .	148
<b>Глава 8. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ ЛИМФОЦИТОВ (Питер Робинсон)</b> . . . . .	<b>150</b>
I. Введение . . . . .	150
II. Выделение мембранных белков . . . . .	150
А. Принцип метода . . . . .	151
Б. Приготовление препаратов клеточных мембран . . . . .	151
В. Выделение мембранных гликопротеинов . . . . .	152
Г. Очистка индивидуальных белков с помощью аффинной хроматографии . . . . .	153
III. Получение липосом . . . . .	154
А. Принцип метода . . . . .	154
Б. Получение клеточных липидов . . . . .	154
В. Синтетические липидные смеси . . . . .	155
Г. Получение липосом с использованием полистирольных гранул SM2 . . . . .	155
Д. Получение липосом после удаления детергента диализом . . . . .	156
Е. Очистка липосом . . . . .	156
IV. Применение . . . . .	157
А. Активация цитотоксических Т-клеток . . . . .	157
Б. Перенос макромолекул за счет слияния липосом с клетками . . . . .	158
Литература . . . . .	158
<b>Глава 9. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИКОЛИПИДНЫХ АНТИГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (М. Брокхаус)</b> . . . . .	<b>159</b>
I. Введение . . . . .	159
II. Предварительные тесты . . . . .	160
III. Экстракция липидов . . . . .	160

А. Принцип метода	160
Б. Материалы	161
В. Процедура экстракции	162
IV. Твердофазный РИА	162
А. Принцип метода	162
Б. Материалы	164
В. Процедура определения	165
V. Ингибирование гаптенами и связывание гаптенгов	165
VI. Тонкослойная хроматография	167
А. Принцип метода	167
Б. Оборудование	169
В. Реактивы	169
Г. Обработка антителами	170
Д. Химическое окрашивание	171
VII. Критическая оценка	171
Литература	172

#### Глава 10. КАРТИРОВАНИЕ НОВЫХ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫХ АНТИГЕНОВ В-ЛИМФОЦИТОВ (Дж. Мак-Керн, Дж. Хансон) . . . 173

I. Введение	173
II. Определение антигенных маркеров дифференцировки В-клеток с помощью метода негативного отбора	176
А. Общие требования к методу определения	176
Б. Иммунизация и слияние	180
В. Отбор позитивных гибридных клонов	182
Г. Клонирование гибридов, секретирующих МА	184
III. Анализ антигенных маркеров дифференцировки В-клеток с помощью двумерного электрофореза	185
А. Цель и схема эксперимента	185
Б. Техника двумерного электрофореза	187
IV. Приложение	189
Литература	191

#### Глава 11. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ ISODALT ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА ДЛЯ АНАЛИЗА БОЛЬШОГО ЧИСЛА ОБРАЗЦОВ (И. Лефковитс, П. Янг, Л. Кюн, Дж. Кеттман, А. Джеммелл, С. Толлаксен, Л. Андерсон, Н. Андерсон) . . . 192

I. Назначение метода	192
II. Материалы	192
А. Оборудование	192
Б. Растворы и буферы	200
III. Методы	203
А. Биосинтетическое введение метки	203
Б. Приготовление образцов	205
В. Разделение по заряду: ISO-разделение	205
Г. Разделение по размеру: DALT-разделение	208
Д. Радиоавтография и радиофлюорография	212
IV. Критическая оценка	213
А. Чувствительность	213
Б. Окрашивание серебром или биосинтетическое мечение	214
В. Проблема амфиолинов	214
Г. Электроэндосмос	214
Д. Горизонтальное искажение полос	215
Е. Сопоставление радиоавтографии и радиофлюорографии	216
Литература	216



<b>Глава 12. ТИПИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСИНТЕТИЧЕСКИ МЕЧЕННЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (К. Ф. Линдал)</b>	<b>217</b>
I. Введение	217
А. Принцип метода	217
Б. Альтернативные методы	217
II. Биосинтетическое мечение	218
А. Выбор аминокислот и радиоактивного изотопа	218
Б. Среда	219
В. Биосинтетическое мечение	220
Г. Эффективность мечения	220
III. Очистка антител	221
А. Очистка на колонке с белком А	221
Б. Очистка с помощью преципитации	224
IV. Активность и стабильность препаратов антител	225
V. Тест связывания	226
VI. Применение и ограничения метода	227
Литература	231
<b>Глава 13. ТЕСТЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИМФОКИНОВ, ПОДДЕРЖИВАЮЩИХ РОСТ В-КЛЕТОК (Томас Леандерсон)</b>	<b>232</b>
I. Введение	232
II. Материалы	233
III. Условия предварительной активации	236
IV. Условия рекультивирования	238
V. Измерение активности пролиферации	239
Литература	240
<b>Глава 14. СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В-КЛЕТОК <i>in vitro</i> (Роланд Х. Гислер, Анита Сёдерберг, Фриц Ледерманн)</b>	<b>241</b>
I. Введение	241
II. Принцип метода	242
III. Материалы	243
А. Мыши	243
Б. Солевые растворы и среды	243
В. Микроносители для прикрепляющихся клеток	244
Г. Сефадекс G-10	244
Д. Пластиковая культуральная посуда	245
IV. Проведение опытов	245
А. Сбор клеток костного мозга мыши	245
Б. Создание микроокружения костномозговых клеток	245
В. Приготовление костномозговых предшественников В-клеток	246
Г. Созревание культур	247
Д. Определение функционально активных В-клеток	247
V. Дополнительные замечания	251
Литература	252
<b>Глава 15. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В-КЛЕТОК В ПОЛУЖИДКИХ АГАРОВЫХ КУЛЬТУРАХ (К. Дж. Пэйдж, Е. Скарвалл, Х. Саутер, С. Мэгазайни)</b>	<b>254</b>
I. Введение	254
II. Экспериментальные методы	255

А. Приготовление агара . . . . .	256
Б. Приготовление среды . . . . .	257
В. Приготовлении двухслойных культур . . . . .	258
Г. Обнаружение секретируемых антител . . . . .	260
Д. Стимуляторы и условия роста . . . . .	263
III. Краткий перечень полученных результатов . . . . .	266
А. Частота встречаемости и абсолютное число клоногенных пре- В-клеток в процессе онтогенеза . . . . .	266
Б. Временные характеристики процесса образования зон гемо- лиза . . . . .	267
В. Фенотип клеточной поверхности . . . . .	267
Литература . . . . .	267

**Глава 16. ВЫДЕЛЕНИЕ КЛОНОВ АЛЛОРЕАКТИВНЫХ Т-ХЕЛПЕ-  
РОВ ЧЕЛОВЕКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИХ В КАЧЕСТВЕ ПОЛИ-  
КЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ В-КЛЕТОК (А. Ланцавечия)** . . . . . 269

I. Цель и принцип метода . . . . .	269
II. Материалы . . . . .	270
А. Среда и добавки . . . . .	270
Б. Интерлейкин-2 (ИЛ-2) . . . . .	270
В. Среда для роста Т-клеток (GM) . . . . .	271
Г. Клеточные суспензии . . . . .	271
Д. Источник клеток-стимуляторов . . . . .	272
Е. Иммуноферментный анализ . . . . .	272
III. Методика . . . . .	273
А. Отбор аллореактивных Т-клеток . . . . .	273
Б. Клонирование аллореактивных Т-клеток . . . . .	274
В. Культивирование клонов аллореактивных Т-клеток . . . . .	274
Г. Пролиферативный тест . . . . .	275
Д. Хелперный тест активации В-клеток . . . . .	275
IV. Критическая оценка . . . . .	276
Литература . . . . .	280

**Глава 17. ЦИТОЛИТИЧЕСКИЕ Т-КЛЕТОЧНЫЕ КЛОНЫ И ГИБРИ-  
ДОМЫ (Х. фон Бёмер, В. Хаас)** . . . . . 281

I. Введение . . . . .	281
II. Материалы . . . . .	281
А. Сбалансированный солевой раствор . . . . .	281
Б. Среда без $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ . . . . .	282
В. Солевой раствор для ГКН-буфера . . . . .	282
Г. Раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) . . . . .	282
Д. Нормальная среда для культивирования . . . . .	282
Е. Среда, содержащая фактор роста Т-клеток (ФРТК) . . . . .	283
Ж. Селективная среда . . . . .	283
III. Методы . . . . .	284
А. Иммунизация in vivo . . . . .	284
Б. Получение цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в массо- вых культурах . . . . .	284
В. Выделение клонов ЦТЛ . . . . .	285
Г. Отделение прикрепившихся клеток от подложки . . . . .	286
Д. Получение цитолитических Т-клеточных гибридом . . . . .	286
Е. Функциональные тесты . . . . .	290
Ж. Выявление заражения микоплазмой и ее ликвидация . . . . .	291
З. Замораживание клонов ЦТЛ . . . . .	292

IV. Применение	293
А. Отбор антиген-специфических цитолитических Т-клеток <i>in vitro</i>	293
Б. Клоны ЦТЛ	294
В. Цитолитические Т-клеточные гибридомы	296
Литература	299

### Глава 18. УСЛОВИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ *in vitro* МЫШИНЫХ ЛИНИЙ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В-КЛЕТОК, ЗАВИСИМЫХ ОТ ИНТЕРЛЕЙКИНА-3 (Р. Паласиоз)

I. Введение	301
II. Материалы	302
III. Надосадочная жидкость из культур клеток WENI-3	304
IV. Определение активности ИЛ-3	304
V. Приготовление клеток	306
А. Клетки костного мозга	306
Б. Клетки селезенки	306
VI. Получение ИЛ-3-зависимых линий предшественников В-клеток	307
А. Удаление прикрепляющихся клеток	307
Б. Размножение клеток	310
В. Подавление миелоидного и эритроидного ростков	310
Г. Замораживание клеточных линий	311
VII. Клонирование ИЛ-3-зависимых предшественников В-клеток	311
VIII. Характеристика клеточных линий	312
IX. Заключительные замечания	313
Литература	314

### Глава 19. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК, СИНТЕЗИРУЮЩИХ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР (Дэвид А. Нимэйзи)

I. Введение	315
II. Метод определения зон гемолиза	315
А. Антитела-мишени	316
Б. Восстановление и алкилирование антител-мишеней	316
В. Выбор гаптенной системы	316
Г. Конъюгирование арсоната с эритроцитами	317
Д. Приготовление комплемента	317
Е. Гемолитический тест для скрининга гибридом	317
Ж. Количественный гемолитический тест	318
III. Метод определения зон гемолиза	319
А. Метод Эрне	320
Б. Метод Каннингема	320
IV. Радиоиммунологический анализ	321
А. Очистка мышиного IgM из асцитной жидкости	322
Б. Приготовление антител к $\mu$ -цепям	322
В. Иодирование антител к $\mu$ -цепям с помощью хлораминового метода	323
Г. Очистка мышиного IgG на ДЭАЭ-целлюлозе	323
Д. Адсорбция на пластике	324
Е. Инкубация проб	324
Ж. Инкубация с мечеными антителами к $\mu$ -цепям	324
Литература	325

**Глава 20. МЕТОДЫ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ И СОРТИРОВКИ КЛЕТОК В ИММУНОЛОГИИ (Уильям Лейзерсон)** . . . 326

I. Введение	326
II. Описание клеточного сортера	327
А. Оптическая скамья	327
Б. Обработка сигналов	329
В. Разделение клеток	330
Г. Хранение данных	331
III. Приготовление реагентов	332
А. Специфичность реагентов	332
Б. Выбор флуорохрома	332
IV. Приготовление образцов	334
А. Приготовление клеточных суспензий	334
Б. Окрашивание	336
V. Разделение клеток	337
А. Общие положения	337
Б. Стерильные условия	339
VI. Получение и накопление данных	340
А. Установка окон дискриминации	340
Б. Усиление сигнала и его перевод в цифровую форму	342
VII. Анализ данных по одному параметру и интерпретация результатов	347
А. Представление результатов	347
Б. Получение количественных данных	349
В. Контроли	352
VIII. Примеры	353
А. Титрование реагента	353
Б. «Слабопозитивные» образцы	353
В. Высокий уровень фона	354
Г. Артефакты, обусловленные агглютинацией клеток	357
Благодарности	357
Литература	357

**Глава 21. ТАБЛИЦЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ЛИМИТИРУЮЩИХ РАЗВЕДЕНИЙ (Ч. Стейнберг, И. Лефковитс)** . . . 358

I. Введение	358
II. Процентное содержание клонов, происходящих из одной клетки	359
III. Доверительные интервалы	361
IV. Тест на независимость в корреляционных матрицах $2 \times 2$	371
Литература	410

**Глава 22. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИМФОИДНЫХ ХИМЕР ПТИЦ (В. Т. Вебер)** 411

I. Введение	411
II. Принцип метода	411
III. Детали методики	412
А. Генетические линии	412
Б. Обработка реципиентов клеток	412
В. Приготовление клеток фабрициевой сумки	413
Г. Содержание химер	414
IV. Анализ химер	414
А. Препараты лимфоцитов крови, селезенки и тимуса	414

Б. Усовершенствованные условия культивирования в отсутствие сыворотки	415
В. Цитогенетические методики	417
Г. Использование моноклональных антител	419
V. Дополнительные замечания	420
Литература	421
<b>Глава 23. ЗАРОДЫШИ ПТИЦ В ИММУНОЛОГИИ (Дж. Р. Л. Пинк, Ф. Иотеро, Э. Уссэн, В. Т. Вебер)</b>	<b>422</b>
I. Введение	422
II. Материалы	422
А. Источник яиц	422
Б. Генетические маркеры и моноклональные антитела	424
III. Методы	424
А. Получение, инкубация и просвечивание яиц	424
Б. Высверливание скорлупы, инъекции и забор крови	426
В. Подавление выработки аллотипов и классов иммуноглобулинов	428
Г. Обработка циклофосфамидом	429
Д. Обработка тестостероном	429
Е. Ранняя хирургическая бурсэктомия	430
Ж. Поздняя хирургическая бурсэктомия	430
З. Реакции «трансплантат против хозяина»	431
И. Парабиоз	433
К. Пересадки тимуса и фабрицевой сумки зародышей	434
Л. Химеры зародыш—желточный мешок и рекомбинанты blastoderms	438
М. Облучение и восстановление костного мозга	439
Литература	441
<b>Глава 24. ОВЦА КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ В ИММУНОЛОГИИ: ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ in vitro И in vivo (Масамюки Миясака, Зденек Трнка)</b>	<b>443</b>
I. Введение	443
II. Содержание экспериментальных овец	445
III. Процедуры	445
А. Забор крови	445
Б. Хирургические процедуры	448
IV. Процедуры in vitro	456
А. Фракционирование клеток	456
Б. Криоконсервация лимфоцитов	461
В. Функциональные тесты	462
Г. Иммуноцитохимия	464
Благодарности	465
Литература	465
<b>Глава 25. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ <i>Xenopus</i> (Amphibia, Anura) (Л. Дю Паске, М. Флайник, Ш. Гюье, Э. Хсю)</b>	<b>467</b>
I. Введение: иммунная система <i>Xenopus</i>	467
А. Лимфоциты и лимфоидные органы <i>Xenopus</i>	467
Б. Иммуноглобулины	470
В. Главный комплекс гистосовместимости (МНС) <i>Xenopus</i>	470
Г. Иммунный ответ	472
Д. Своеобразие <i>Xenopus</i> как модели для исследований	472

II. Имеющиеся линии и виды животных . . . . .	473
III. Хирургические процедуры на <i>Xenopus</i> . . . . .	476
А. Маркировка животных . . . . .	476
Б. Забор крови у взрослых лягушек . . . . .	476
В. Забор крови и перитонеальной жидкости у головастиков . . . . .	478
Г. Тимэктомия . . . . .	481
Д. Получение химерных зародышей . . . . .	481
Е. Пересадка кожи . . . . .	481
IV. Подготовка лимфоцитов для клеточных культур . . . . .	482
А. Клетки крови . . . . .	482
Б. Суспензии клеток тимуса или селезенки . . . . .	483
В. Получение макрофагов от взрослой лягушки . . . . .	485
Г. Разделение клеточных популяций . . . . .	485
V. Получение иммунологических реагентов . . . . .	486
А. Получение антисывороток . . . . .	487
Б. Моноклональные антитела . . . . .	488
VI. Изучение иммунной системы . . . . .	489
А. Иммунопреципитация иммуноглобулинов и электрофорез . . . . .	489
Б. Иммунопреципитация мембранных полипептидов . . . . .	493
В. Иммуофлуоресценция . . . . .	495
Г. Гемагглютинация . . . . .	496
Д. Цитотоксический микротест с клетками <i>Xenopus</i> . . . . .	497
VII. Функциональные методы анализа иммунного ответа . . . . .	498
А. Антителообразование и синтез иммуноглобулинов . . . . .	498
Б. Выявление антител после изоэлектрофокусирования . . . . .	500
В. Оценка иммунного ответа на клеточном уровне . . . . .	502
Г. Методы исследования клеточного иммунитета . . . . .	503
VIII. Получение соматических гибридов слиянием лимфоцитов <i>Xenopus</i> с клетками миеломы мышей . . . . .	506
IX. Маркеры клеток; плоидность как маркерный признак . . . . .	507
А. Получение полиплоидных <i>Xenopus</i> . . . . .	507
Б. Способы определения плоидности клеток у химер . . . . .	508
X. Приложение . . . . .	509
Литература . . . . .	511
Предметный указатель . . . . .	514