

第 1 章 抗体制备技术

抗体 (antibody, Ab) 是机体 B 淋巴细胞受到抗原刺激后所产生的特异性球蛋白, 故亦称为免疫球蛋白。机体初次接触抗原后, 激发机体产生的特异性抗体亲和力低、持续时间短; 而当同一抗原再次刺激机体后, 则能产生高亲和力、高效价、持续时间长的抗体。由于抗体能与相应的抗原发生特异性结合反应, 因此特异性抗体是免疫学实验中常用的试剂, 不仅对于抗原的分析鉴定和定量检测极为重要, 而且广泛应用于临床疾病的诊断、治疗和预防中。在免疫学检测中应用的主要抗体是多克隆抗体和单克隆抗体, 多克隆抗体常用免疫动物的方法获得, 而单克隆抗体则采用杂交瘤技术制备。本章主要介绍这两种抗体的制备方法。

实验一 多克隆抗体的制备

多克隆抗体 (polyclonal antibody) 是机体针对抗原的不同表位所产生的抗体混合物。是用制备的纯化免疫原按照一定的免疫程序接种给所选择的动物, 在含有多种抗原表位的抗原刺激下, 该动物体内多个 B 细胞克隆被激活并产生针对这种抗原多种不同表位的抗体混合物。含有这些特异性抗体的动物血清称为免疫血清或抗血清, 而从免疫血清中纯化的免疫球蛋白则称为抗体。

一、抗体制备的流程

优质免疫血清的产生, 主要取决于抗原的纯度和免疫原性, 动物的应答能力以及免疫程序 (如免疫途径、抗原剂量、注射次数、时间间隔、有无佐剂等因素)。

因此制备高质量的抗体必须具备理想的免疫原、适宜的动物和切实可行的免疫方案。

(一) 免疫动物的选择

免疫用的动物主要为哺乳动物和禽类, 常选择家兔、绵羊、豚鼠及小鼠等。选择动物要依据抗体制备的条件而定。

1. 抗原与动物的种系 抗原的来源与免疫动物之间种系关系越远, 其抗原免疫原性越强, 越易产生免疫应答; 反之, 种系关系越近, 则抗原免疫原性越弱。如用鸡球蛋白免疫亲缘关系较近的鸭或鹅, 则免疫原性较差。

2. 动物的个体状况 动物的年龄与健康状况可影响产生抗体的效价, 年龄太小者易产生免疫耐受, 而年老体衰者免疫应答能力低下, 不易产生高效价的抗体。所以用于制备抗血清的动物必须是适龄、健壮、体重合乎一定要求的健康动物。免疫过程中应特别注意营养和卫生管理。

3. 抗体的用量和要求 动物的选择常根据抗体的用途和量来决定。制备量大的抗体常选择羊、马等大动物; 如所需抗体的量少, 宜用小动物, 如家兔、豚鼠等。对蛋白质抗原大部分动物均适合, 常用家兔和山羊。制备供补体试验用的抗体可选择豚鼠。

(二) 免疫方案

不同的抗原, 其免疫原性的强弱不一, 这取决于抗原的分子量、化学活性基团、立体结构、

物理形状和弥散速度等。在免疫动物时应考虑免疫原的剂量、免疫途径、次数和免疫间隔时间等因素对免疫效果的影响。

1. 免疫原的剂量 抗原的免疫剂量依照给予抗原的种类、注射途径、免疫次数以及受体动物的种类、免疫周期及所要求的抗体特性等而不同。免疫原剂量过大或过小都易引起免疫耐受。在中间剂量范围内,免疫原剂量适当加大,时间间隔延长,可产生较高效价的抗体。一般而言,小鼠首次免疫剂量为每次 50~400 μg ,大鼠为每次 100 μg ~1mg,兔为每次 200 μg ~1mg。加强免疫剂量为首次剂量的 1/5~2/5。如要制备高度特异性的抗血清,可选用低剂量抗原短程免疫法;如欲获得高效价的抗血清,则宜采用大剂量抗原长程免疫法。

2. 免疫途径、次数和间隔时间 常根据抗原性质、免疫原性及动物的免疫反应性决定免疫途径、免疫次数和间隔时间等。抗原注射途径可根据不同抗原及实验要求,选用皮内、皮下、肌肉、腹腔、静脉或淋巴结等不同途径进行免疫。一般多采用动物的背部、足掌、淋巴结周围、耳后等处皮内或皮下多点注射。两次免疫注射的间隔时间应长短适宜,太短起不到再次反应的效果,太长则失去了前一次激发的敏感作用。一般第一次和第二次间隔 10~20d,3次及以后间隔 7~10d,加佐剂者应为 2 周左右。免疫的总次数一般为 5~8 次。

3. 佐剂的应用 佐剂可增强抗原的免疫原性,使无或弱免疫原性的物质变成有效免疫原。如用可溶性蛋白质抗原免疫家兔,在加用佐剂时一次注入剂量一般为 0.5mg/kg,如不加佐剂,则抗原剂量应加大 10~20 倍。动物实验中最常使用的佐剂为弗氏不完全佐剂(Freund incomplete adjuvant, FIA)和弗氏完全佐剂(Freund complete adjuvant, FCA),前者是将抗原和油剂(液状石蜡或花生油)混合,再加入乳化剂(羊毛脂或吐温-80^①),使之成为油包水乳剂。在弗氏不完全佐剂中加入死的分枝杆菌即为弗氏完全佐剂。初次免疫时,最好用弗氏完全佐剂,以刺激机体产生较强的免疫反应。再次免疫时,则采用弗氏不完全佐剂。对可溶性抗原常需加用佐剂,以增强抗原的免疫原性,刺激机体产生较强的免疫应答。

(三) 免疫血清效价的鉴定

测定免疫血清效价是及时掌握对免疫动物采血时机的重要步骤,又称试血。

1. 颗粒性抗原相应抗体效价的测定 如细菌性抗原多用凝集反应测定,细胞性抗原可用补体依赖的细胞毒实验等方法测定相应的抗体。

2. 可溶性抗原相应抗体效价的测定 多采用沉淀反应及简便快速的方法如酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),更为灵敏的放射免疫测定法进行测定。

(四) 采血及分离血清

无论是免疫的大动物还是小动物,采血方法均可分为一次放血法和多次放血法两种。一次放血法,家兔等大动物可用颈动脉放血,豚鼠等小动物可通过心脏直接采血。多次少量放血法,大动物如家兔可通过耳静脉采血,小动物如豚鼠可经耳静脉采血,小鼠可经眶静脉或尾静脉采血。

采血后分离血清,可将血液放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 30~60min 使之凝固,血凝块与采集器表面分开,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜,使血凝块收缩,离心,移出血清,置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 30min 灭活补体。

(五) 免疫血清的纯化

更加精细的免疫试验需要从抗血清中提取免疫球蛋白,此过程称为抗血清的纯化。纯化

^① 吐温-80: 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。

的步骤为：50%饱和硫酸铵盐析出沉淀血清球蛋白，应用透析或分子筛法除盐。除盐后的球蛋白过阴离子交换柱（DEAE-纤维素），根据不同类别免疫球蛋白的等电点，选用不同pH和离子强度的缓冲液分别洗脱之；高渗或风干法浓缩免疫球蛋白，若使用冷冻干燥器则可获得干燥制品。

（六）免疫血清性质的鉴定

获得的免疫血清需要进行特异性检测、亲和力测定和效价滴定。针对颗粒性抗原的免疫血清效价，可通过凝集或溶细胞试验（如溶血素效价滴定）检测。可溶性抗原相应抗体的效价和纯度多选用环状沉淀、琼脂扩散和免疫电泳的方法检测。酶免疫测定、放射免疫分析及平衡透析等方法，可用于抗体的特异性和亲和力测定。抗血清鉴定的方法详见后述相应实验。

（七）免疫血清的保存

1. 冰冻保存 冰冻之前先用干冰急速冷冻，然后放 $-70\sim-20^{\circ}\text{C}$ 冰冻。该法保存期较长，可达2~3年，在保存期间尽量避免反复冻融，否则可使抗体变性，效价降低甚至完全失效，宜分小包装，是较常用的保存免疫血清的方法。

2. 冷冻干燥保存 此为较好的保存方法。将免疫血清干燥成粉分装于安瓿瓶中，急速低温冷冻干燥，火焰封口，置 -20°C 可保存4~5年。

3. 加入防腐剂保存 免疫血清中加入防腐剂后可放 4°C 保存，在1~2年内使用。常用的防腐剂有叠氮钠、硫柳汞和石炭酸，其应用终浓度分别是0.01%、0.01%和0.5%。但标记荧光的抗体不能用叠氮钠防腐，因其对荧光素有淬灭作用。

二、兔抗人全血清的多克隆抗体制备

【实验目的】

掌握人全血清免疫原和佐剂的制备方法；熟悉多克隆抗体制备的基本过程；了解动物实验的基本知识。

【实验原理】

根据抗原的生物学和理化特性，用不同的方法制得高纯度的免疫原，再进行不同形式的处理（例如加入佐剂），可使其具有更强的免疫原性。将抗原物质经适当的途径，按照预先制定的免疫方案免疫动物，经过一定时间，可刺激机体产生特异性抗体并释放入血，当血中抗体达到一定效价时采血，分离血清，即可获得多克隆抗体。

【实验材料】

1. 实验动物 健康雄性家兔，体重2~3kg，4~5月龄。
2. 试剂 生理盐水、混合人血清、羊毛脂，液体石蜡、卡介苗（BCG）、2.5%碘伏、75%乙醇溶液、PBS。
3. 器材 烧杯、乳钵、1mL吸管、5mL吸管、量筒、5mL注射器、试管、台式离心机、冰箱、台式天平。

【实验步骤】

1. 人全血清免疫原的制备 选取健康志愿者（学生）或献血员，静脉采血5mL；置试管中于室温下使之自然凝集，凝集后离心取上清液（血清）约2.5mL。将多人（至少2~3人）的血清混合，即为人全血清。

2. 佐剂的制备

（1）福氏不完全佐剂（FIA）的制备：先称取羊毛脂2g，放入无菌乳钵内，再用吸管吸取液

体石蜡 4mL, 加入放有羊毛脂的乳钵中, 沿一个方向边滴加边研磨混匀。

(2) 福氏完全佐剂 (FCA) 的制备: 在上述的福氏不完全佐剂中再逐滴加入卡介苗 1mL, 沿一个方向边滴边研磨, 使菌体完全分散乳化。

3. 人全血清与佐剂的混合物 将人全血清 2mL 用生理盐水作 1:2 稀释。取稀释好的人全血清与福氏完全佐剂按 1:1 的比例混合, 制成油包水状态。具体方法有: ①研磨法, 取福氏完全佐剂置于无菌研钵中, 然后逐滴加入稀释好的人全血清, 边加边沿一个方向研磨直到形成均一性的乳化物, 用无菌滴管取一滴于冷水上, 不散开为达到“油包水”状态, 为合格的佐剂抗原的混合物。如果很快分散成云雾状或小颗粒, 则为不合格, 需继续研磨。②注射器法, 即用两个注射器对接, 使佐剂与抗原往返推拉, 直至乳化。另外, 也可将佐剂置磁力搅拌器上, 边搅拌, 边滴加抗原并继续搅拌, 使其完全乳化。

4. 免疫方法 家兔分 4 次进行免疫, 每次间隔 2~3 周。于家兔背部及腹股沟, 皮下多点注射, 一般注射 5~7 个皮下点。

第一次免疫, 取上述纯化后的抗原 (1mL/家兔) 用 PBS 作 1:2 稀释后, 加等体积 FCA 充分乳化, 于家兔背部及腹股沟, 皮下多点注射。

第二次免疫, 2 周后再以相同抗原加等体积 FIA 乳化后, 注入家兔背部或腹股沟皮下多点加强免疫。

第三次免疫和第四次免疫同第二次。

每次免疫后 7~14d 抽取少许静脉血, 分离血清, 以备检测免疫效果。于第 4 次免疫后 5~7d 试血。

5. 免疫效价的检测 于家兔耳静脉取血 1~2mL, 分离血清。用环状沉淀试验测定抗体效价达 1:5000 以上 (稀释抗原), 或用双向免疫扩散试验测定抗体效价达 1:16 以上 (稀释抗体), 即可从心脏或颈动脉放血, 或静脉采血, 分离血清, 进行抗体的纯化及检测。

6. 抗体的保存 免疫血清经 56℃、30min 加热灭活后, 加入适当的防腐剂, 适量分装, 做好标记, 置 -20℃ 以下低温保存。

【注意事项】

1. 抗原制备、免疫动物及采集血清等过程应注意无菌操作。

2. 人全血清抗原应该选择 3 人以上混合血清, 以避免个体差异性; 血清应新鲜, 以保持血清中各成分的活性。

3. 蛋白质等可溶性抗原在免疫时需要加入佐剂, 混合研磨时应充分乳化, 否则难以达到预期的免疫效果。在使用佐剂-抗原时, 若难以吸入注射器, 则可将连同装有佐剂的容器置热水上加热, 并选用较粗的注射针头。

4. 再次注射免疫原时, 要防止过敏反应发生。

5. 免疫时应采用多点注射以提高免疫的效果。

【临床意义】

随着医学科学技术的不断发展, 免疫血清的应用日益广泛, 虽然多有商品供应, 但部分诊断血清及科研用血清常需要自行制备, 因此制备高纯度、高效价的免疫血清是实验室工作的基本技术之一。

【思考题】

1. 制备兔抗人全血清的多克隆抗体为何要加入佐剂?

2. 佐剂有何用途? 其作用机制如何?

3. 抗血清的制备需要什么条件?

三、兔抗羊红细胞的多克隆抗体制备

【实验目的】

掌握颗粒性免疫原制备多克隆抗体的原理和方法。

【实验原理】

将绵羊红细胞 (sheep red blood cell, SRBC) 等颗粒性抗原纯化后经适当的途径免疫动物, 可刺激动物体发生体液免疫应答, 经过一定时间可产生相应的特异性抗体并释放入血, 即为特异性的免疫血清。

【实验材料】

1. 实验动物 健康的绵羊, 健康的雄性家兔。
2. 试剂 无菌生理盐水、2.5% 碘伏、75% 乙醇溶液、阿氏液。
3. 器材 100mL 注射器、16号针头、胶管、三角烧瓶、玻璃珠、烧杯、试管、量筒、1mL 吸管、5mL 吸管、1mL 注射器、止血钳、手术剪、水平离心机、冰箱、台式天平。

【实验步骤】

1. 绵羊红细胞 (SRBC) 悬液的制备

(1) 采羊血: 取绵羊侧卧位, 先用带子固定其头部和四肢, 剪去羊颈侧的毛, 再用 2.5% 碘伏和 75% 乙醇溶液消毒绵羊皮肤, 而后用手压迫颈静脉, 待其明显隆起后用 100mL 注射器自颈静脉无菌采血。

(2) 去除血中纤维蛋白: 采足所需血量 (50~80mL) 后, 注入装有玻璃珠的三角烧瓶内, 加塞后沿着一个方向摇动烧瓶, 用玻璃珠脱去羊血中的纤维蛋白。或事先在烧瓶内加入适量肝素抗凝。

(3) 取适量羊血立即做细胞悬液, 其余放入阿氏液中保存 (羊血与阿氏液之比为 1:2), 置 4℃ 冰箱可有效保存 2 周。

(4) 取玻璃试管 1 支, 加入预先准备的羊血 2mL, 再加入 4mL 生理盐水稀释, 进行洗涤, 离心 10min (转速 2000r/min), 吸弃上清液; 重复用生理盐水洗涤离心 3 次。最后一次离心后弃去上清液, 管底沉淀的血细胞即为压积红细胞。

(5) 将压积红细胞稀释为 $5 \times 10^8/\text{mL}$ (5%) 的细胞悬液, 通常亦称为 SRBC 悬液, 白细胞可忽略不计。(取压积红细胞 0.5mL + 生理盐水 9.5mL = 5% 的红细胞悬液)

2. 动物准备 取体重 2~3kg 的健康雄性家兔若干只 (根据需要确定), 先饲养观察数日, 无疾病等特殊情况即可使用。将家兔分笼饲养, 笼上挂牌, 注明免疫原、免疫程序及免疫途径等。

3. 免疫方法 根据不同的免疫原, 采用不同的免疫程序。绵羊红细胞 (SRBC) 悬液的免疫程序见表 1-1。

表 1-1 绵羊红细胞的免疫程序

免疫次序	免疫日程 (d)	注射剂量 (mL)	注射途径
1	1	0.5	皮下
2	3	1.0	皮下
3	5	1.5	皮下
4	7	2.0	皮下
5	9	2.5	皮下
6	12	1.0	耳静脉
7	15	1.0	耳静脉

第 20 天试血，凝集效价大于 1:2000 以上可放血。如效价不够，可追加免疫。

4. 采血获得抗血清 家兔采血有 3 种基本方法。①耳静脉采血法：少量采血时（如测试抗体效价等）应用此法；②心脏采血法：大量采血时应用，此法简便易行，可以使动物继续存活，如果进行加强免疫，饲养一段时间后可再行采血；③动脉放血法：可以最大限度地得到血清，但动物不能再存活。

采血获得的兔血，可置 37℃ 下促进血块收缩，并用毛细吸管吸取血清，经离心（转速 3000r/min）去除残留的红细胞，得到抗血清。

5. 抗血清的保存 抗体的保存以浓度 20~30mg/mL 为宜，加入万分之一的硫柳汞或千分之一的叠氮钠防腐，并加入等量的中性甘油，分装小瓶，-20℃ 以下保存，数月甚至数年内抗体效价无明显改变。

【注意事项】

1. 制备压积红细胞时，应无菌操作，避免剧烈震荡；试管应洗涤洁净，充分干燥，以免发生溶血。

2. 免疫程序并非固定不变，一般而言，不与佐剂一同免疫的抗原，免疫间隔时间较短，可每隔 2~3d 免疫一次。由于佐剂具有缓释作用，于佐剂一起免疫的抗原可隔 1~2 周。无论有无佐剂，最后一次免疫一周后采取血清。

3. 由于免疫期限及间隔时间较长，要注意脱敏，尤其在静脉免疫时。脱敏的原则是少量多次注射抗原，例如，在静脉注入抗原前，先将抗原少量注入腹腔，1h 后再作缓慢静脉注射。

【临床意义】

兔抗羊红细胞的多克隆抗体的制备，可用于溶血反应作为补体结合反应中的主要试剂，多为科研和实验教学的基本技术。

【思考题】

1. 制备兔抗 SRBC 免疫血清的过程与制备兔抗人全血清的有何不同？为什么？
2. 抗血清的保存方法有哪些？

实验二 单克隆抗体的制备

1975 年 Koehler 和 Milstein 创建了淋巴细胞杂交瘤技术，又称为抗体的细胞工程技术。它是将可产生特异性抗体但短寿的 B 细胞与无抗原特异性但长寿的骨髓瘤细胞融合，建立的可产生单克隆抗体（monoclonal antibody, McAb）的 B 淋巴细胞杂交瘤细胞和单克隆抗体技术。

利用杂交瘤技术制备单克隆抗体可根据以下原则：①淋巴细胞产生抗体的克隆选择学说，即一种克隆只产生一种抗体；②细胞融合技术产生的杂交瘤细胞可以保持双方亲代细胞的特性；③利用代谢缺陷补救机制筛选出杂交瘤细胞，并进行克隆化，然后大量培养增殖，制备所需的 McAb。该技术是一项周期长、高度连续性的实验技术，具体包括两种亲本细胞的选择和制备、细胞融合、杂交瘤细胞的选择性培养和克隆化、单克隆抗体的制备、特异性鉴定及纯化等。

【实验目的】

熟悉单克隆抗体制备的原理，了解单克隆抗体制备的过程和鉴定方法。

【实验原理】

抗原免疫的 B 淋巴细胞能够产生特异性抗体，但在体外不能进行无限增殖；而骨髓瘤细胞虽然可以在体外进行无限增殖，但不能产生特异性抗体。将免疫脾细胞与骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤细胞，这种细胞具有两种亲本细胞的特性，既具有 B 淋巴细胞合成和分泌特异性抗体的能力，也具有骨髓瘤细胞无限增殖的特性。即杂交瘤细胞可在体内外长期培养，又能不断地分泌特异性

抗体。

单克隆抗体制备成功的关键是采用了一种特殊的选择培养基即 HAT 培养基，此培养基含有次黄嘌呤（H）、氨基蝶呤（A）、胸腺嘧啶核苷（T），可将所需要的杂交瘤细胞分离出来。其原理是：经在 HAT 培养基中进行选择性培养，未融合的脾细胞因不能在体外长期存活而死亡，而未融合的骨髓瘤细胞合成 DNA 的主要途径被培养基中的氨基蝶呤阻断，又因缺乏次黄嘌呤 - 鸟嘌呤 - 磷酸核糖转移酶（HGPRT），不能利用培养基中的次黄嘌呤完成 DNA 的合成过程而死亡。只有融合的杂交瘤细胞由于从脾细胞获得了次黄嘌呤 - 鸟嘌呤 - 磷酸核糖转移酶，因此能在 HAT 培养基中存活和增殖。经过克隆选择，可筛选出能产生特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞，在体内或体外培养，即可无限制地大量制备单克隆抗体。

【实验材料】

1. 实验动物 8~10 周龄，重约 20g，健康的 Balb/c 纯系小鼠，雌雄均可。
2. 细胞 小鼠骨髓瘤细胞（Sp2/0 细胞）。
3. 试剂 50% 聚乙二醇（PEG）、无菌生理盐水、2.5% 碘伏、75% 乙醇溶液、台盼蓝溶液、蒸馏水；R/MINI-1640 培养液、HT 培养基、HAT 选择培养基、小牛（或胎牛）血清、10% 二甲基亚砷（DMSO）。
4. 器材 解剖刀剪、细胞计数板、试管、带刻度吸管、注射器、6cm 平皿、加样器、CO₂ 培养箱、细胞培养瓶、96 孔培养板、超净工作台、水平式离心机、倒置显微镜、冰箱等。

【实验步骤】

1. 免疫动物 免疫动物是用目的抗原免疫小鼠，使小鼠产生致敏 B 淋巴细胞的过程。先选用 Balb/c 小鼠，按照预先制定的免疫方案进行免疫注射。抗原通过血液循环或淋巴循环进入外周免疫器官，刺激相应 B 淋巴细胞克隆，使其活化、增殖，并分化成为致敏 B 淋巴细胞。

2. 骨髓瘤细胞的制备 在融合前 48h，用含 20% 小牛血清的 R/MINI-1640 培养液，将骨髓瘤细胞增殖培养。融合前 24h，再以同样培养液换液一次，使细胞融合当天处于对数生长期。取数瓶骨髓瘤细胞，轻轻去除瓶内原有培养液，加入冷的无血清培养液少许，用吸管将细胞吹打均匀在培养液中，离心洗涤后悬于无血清培养液中。台盼蓝染色检查活细胞数应大于 95%，置于 37℃ 下备用。

3. 免疫小鼠脾细胞的制备 取末次免疫后第三天的小鼠，眼眶放血，分离血清冻存备用。颈椎脱臼处死小鼠，浸泡于 75% 乙醇溶液中 3~5min。无菌操作取出脾，置平皿内的 200 目钢网上，加入 10mL 的 R/MINI-1640 培养液，用注射器芯将脾细胞轻轻挤压过网，制备脾细胞悬液，用此 R/MINI-1640 培养液将脾细胞洗涤 2 次（以 1000r/min 转速离心 10min），弃上清液，用 R/MINI-1640 培养液悬浮沉淀，计数活细胞数，一般每只小鼠可得 0.5×10^8 个脾细胞。

4. 饲养细胞准备 在体外的细胞培养中，单个的或数量很少的细胞不易存活，必须加入其他活的细胞才能使其生长繁殖，加入的细胞称为饲养细胞（feeder cell）。在细胞融合和单克隆的选择过程中，就是在少量的或单个细胞的基础上使其生长繁殖成群体，因此在这一过程中必须使用饲养细胞。许多动物的细胞都可做饲养细胞，常选用腹腔渗出细胞，其中主要是巨噬细胞和淋巴细胞。

将小鼠致死、体表消毒和固定后，用消毒器械从下腹掀起腹部皮肤，暴露腹膜。用酒精棉球擦拭腹膜消毒。将 10mL 培养液注射至腹腔，注意避免穿入肠管。右手固定注射器，使针头留置在腹腔内，左手持酒精棉球轻轻按摩腹部 1min，随后吸出注入的培养液。离心 10min（转速 1000r/min），弃上清液。先用 5mL HAT 培养基将沉淀细胞悬浮，根据细胞计数结果，补加 HAT 培养基，使细胞浓度为 2×10^8 /mL，将细胞加入 96 孔细胞培养板中，每孔 0.1mL，置 CO₂ 培养箱备用。

5. 细胞融合

(1) 将准备好的骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞按 1:5~1:10 比例混合, 加入 20~50mL R/MINI-1640 液, 以 1000r/min 转速离心, 弃上清液, 将上清液尽量吸净, 以免影响 PEG 的浓度。

(2) 用手指轻弹离心管底部, 使沉淀细胞分散, 将离心管置 37℃ 水浴中。吸 1mL 37℃ 预温的 50%PEG 缓慢滴入离心管内, 边加边轻轻摇晃, 1min 内加完, 37℃ 静置 1min。加 R/MINI-1640 液 (37℃ 预温) 1mL, 1min 内加完, 再加 R/MINI-1640 液 10mL, 边加边轻轻摇晃 1min, 然后加 R/MINI-1640 液至 50mL, 使 PEG 作用终止。

(3) 以 800r/min 转速离心 10min, 弃全部上清液。加入少许 HAT-R/MINI-1640 选择培养液, 用 1mL 吸管轻轻混匀, 切记不可用力吹打, 以免使融合在一起的细胞散开。随后将沉淀细胞轻轻悬浮于所需容积的 HAT 培养液中, 接种于 96 孔培养板 (0.1mL/孔)。接种完毕后, 将培养板放入 37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养。每天观察细胞培养板有无细菌污染及克隆生长情况。

6. 选择性培养 两种亲本细胞经 PEG 处理后, 可形成多种细胞成分的混合体, 包括未融合的游离亲本细胞、骨髓瘤细胞间的融合、免疫 B 细胞间的融合以及骨髓瘤细胞与免疫 B 细胞间融合的异核细胞, 仅后者可形成杂交瘤, 应予以筛选出来克隆培养。通常应用 HAT 培养基, 其中含有次黄嘌呤 (H)、氨基嘌呤 (A)、胸腺嘧啶核苷 (T)。在 HAT 培养基中, 未融合的骨髓瘤细胞因缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶, 不能利用补救途径合成 DNA 而死亡。未融合的 B 淋巴细胞虽具有次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶, 但其本身不能在体外长期存活也逐渐死亡。只有融合的杂交瘤细胞由于从脾细胞获得了次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶, 并具有骨髓瘤细胞能无限增殖的特性, 因此能在 HAT 培养基中存活和增殖。

接种 96 孔板 1 周后换 HAT 培养液, 每次吸出培养孔旧液 1/2, 换入新液, 连续 2 周。3~5d 后未融合及自身融合的细胞逐渐死亡, 1 周左右可出现克隆, 并不断增殖, 当集落大于 3mm 或布满孔底 1/2 时即可取上清做抗体活性检测, 同时补加新鲜 HAT 培养液。在一次较好的融合试验中, 70%~80% 的孔有。所有生长克隆的孔都需要取培养上清液进行抗体活性检测。培养 3 周后即可改用普通完全培养液。

7. 杂交瘤阳性克隆的筛选与克隆化

(1) 杂交瘤阳性克隆的筛选: 杂交瘤细胞在 HAT 培养液中生长形成克隆后, 其中仅少数是分泌预定特异性 McAb 的细胞, 而且多数培养孔中有多个克隆生长, 分泌的抗体也可能不同, 因此, 必须进行筛选与克隆化。要求所测抗体的方法高度灵敏、快速、特异, 且便于大量检测。通常根据抗原性质和抗体的类型而定。常用方法有酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫荧光、放射免疫测定、间接血凝试验、溶血空斑试验等。

首先初筛出能分泌与预定抗原起反应的 McAb 杂交瘤细胞, 再进一步从中筛选出有预定特异性的杂交瘤细胞, 然后选出可供实际应用具有能稳定生长和有功能特性的细胞克隆。而且应尽量多选数株细胞, 以保证有足够的候选株供实际应用。

(2) 克隆化技术: 为了防止无关克隆的过度生长, 需对检测抗体阳性的杂交克隆尽早进行克隆化培养, 否则抗体分泌的细胞会被抗体非分泌的细胞所抑制, 因为抗体非分泌细胞的生长速度比抗体分泌地细胞生长速度快, 二者竞争的结果会使抗体分泌的细胞丢失。即使克隆化过的杂交瘤细胞也需要定期地再克隆, 以防止杂交瘤细胞的突变或染色体丢失, 从而丧失产生抗体的能力。克隆化的方法包括有限稀释法、软琼脂平板法、显微操作法和荧光激活细胞分选法, 最常用的方法是有限稀释法。有限稀释法是将需要再克隆的细胞株自培养孔内吸出并作细胞计数, 计出 1mL 的细胞数。用 HT 培养液稀释, 使细胞浓度为 50~60 个/mL, 于 96 孔培养板中每孔加 0.1mL (5~6 个细胞/孔)。接种两排, 剩余细胞悬液用 HT 培养液作倍比稀释, 再接种两排, 如此类推, 直至使每孔含 0.5~1 个细胞。培养 4~5d 后, 在倒置显微镜上可见到小的细胞克隆, 补加完全培

养液 200 μ L/孔。第 8~9 天时肉眼可见细胞克隆, 及时进行抗体检测。选择单个克隆生长的阳性孔再一次进行克隆。一般需要如此重复 3~5 次, 直至达 100% 阳性孔率时即可, 以确保抗体由单个克隆所产生。初次克隆化的杂交瘤细胞需要在完全培养液中加 HT。

8. 杂交瘤细胞的保存与复苏 将已克隆化和经鉴定合格的杂交瘤细胞株, 或是一时来不及克隆化鉴定的杂交瘤细胞及时冻存是十分重要的。因为在细胞培养过程中随时可能发生细胞被污染或分泌抗体的功能丧失等现象。如果没有原始细胞的冻存, 有时会造成不可弥补的损失。

(1) 杂交瘤细胞的冻存: 收集培养的杂交瘤细胞或从小鼠体内取出的杂交瘤细胞, 加入一定量的细胞冻存液 (30%~40% 小牛血清、50%~60% 不完全 R/MINI-1640 选择培养液, 10% DMSO), 使细胞浓度为 $(1\sim5)\times 10^8$ /mL。将细胞悬液分装到冻存管中, 采用分步冷冻法即先置于 -30°C 冰箱 1h 再移置 -70°C 冰箱 2h 以上或过夜, 最后于 -196°C 液氮或液氮蒸气中长期保存。每种细胞株至少冻存 5~10 管。

(2) 杂交瘤细胞的复苏: 将杂交瘤细胞的冻存管从液氮罐里取出, 立即投入 37°C 水浴中, 待细胞悬液快速解冻后, 立即将细胞用 R/MINI 1640 培养液清洗 2 次, 然后用 R/MINI-1640 完全培养液配成细胞悬液滴入 24 孔培养板或 25mL 培养瓶中, 置于 37°C 下、5% CO_2 培养箱内培养。待复苏细胞生长良好时, 2~3d 传代培养。若冷冻后细胞死亡较多, 可加入饲养细胞共同培养, 在复苏冷冻细胞前一天, 于 24 孔培养板上每孔加小鼠腹腔巨噬细胞 0.5mL (10^4 /mL)。

9. 单克隆抗体的大量制备 获得稳定的杂交瘤细胞系后, 即可根据需要大量生产 McAb。目前制备 McAb 主要采用动物体内诱生腹水法和体外培养法。

(1) 动物体内诱生腹水法: 先在小鼠腹腔注射液体石蜡或福氏不完全佐剂, 一周后将杂交瘤细胞悬液注射入小鼠腹腔。接种 10~14d 后, 可分次采集腹水, 将收集的腹水离心去除细胞, 灭活 (56°C , 30min), 再离心, 取上清液即可。该法操作简便、经济、抗体浓度高。但腹水中常混有小鼠的其他蛋白, 因此要提纯后方可使用。目前治疗用或体外诊断用的 McAb 多采用这一方法制备。

(2) 体外培养法: 将杂交瘤细胞置培养瓶中培养, 待培养液颜色改变或细胞过多开始死亡时, 收集上清液, 离心去掉碎片及细胞即可。该法所得抗体含量不高, 且需要特殊仪器设备, 故常用于实验室中。

10. 单克隆抗体性质的鉴定 为了更好地利用所获得的单克隆抗体, 需对单克隆抗体的性质进行鉴定, 鉴定的内容包括特异性、免疫球蛋白的类及亚类、亲和力、识别结合抗原的表位及其分子量等。

(1) 单克隆抗体特异性的鉴定: 特异性鉴定是检测抗体是否会与目的抗原之外的其他抗原反应, 即交叉反应性的程度。其检测方法很多, 包括酶免疫测定法、免疫荧光技术、放射免疫测定法、蛋白印迹杂交技术、间接血凝试验、化学发光免疫斑点法等。例如: ①蛋白印迹杂交技术, 将抗原 (含有其他相关抗原) 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后转至硝酸纤维膜上。转膜完毕后, 将膜置于封闭液中, 置室温 1~2h 下。取出晾干后, 将膜切成小条, 与待测抗体孵育, 洗涤显色后观察结果。如果一种单抗只与某一特定的蛋白带起反应, 说明其特异性强, 若还与其他蛋白起反应, 说明有交叉反应。至于反应的程度只能粗略的估计。②免疫荧光技术, 适合于细胞抗原及组织切片抗原, 根据是否有荧光及荧光强弱来判断是否有交叉反应及交叉反应的强弱。具体操作步骤见相关章节。

(2) 单克隆抗体的类及亚类的鉴定: 通常以免疫小鼠 Ig 的类和亚类的标准血清, 采用免疫双扩散试验或 ELISA 夹心法测定 McAb 与抗小鼠 Ig 类型和亚类的反应性, 以确定 McAb 属哪一类型和亚类。例如免疫双扩散试验的具体步骤有: ①以磷酸盐溶液配制 1% 的琼脂糖溶液, 趁热倒入直径 35mm 的小平皿中, 凝固后打孔 (梅花孔型), 即中间 1 个孔, 周围 6 个孔。②取杂交瘤培养上清液 1mL (含待测抗体), 加硫酸铵 0.38g 沉淀抗体。离心 5min (转速 10 000r/min), 吸弃

上清液，加入 50 μ L 磷酸盐溶液溶解沉淀物。③取 10~15 μ L 加入中央孔，周边孔分别加入抗不同免疫球蛋白的类及亚类。在 37 $^{\circ}$ C 下保湿 24h 以上，出现沉淀线者为阳性反应，表明这种抗体属于对应的免疫球蛋白的类及亚类。

(3) 单克隆抗体亲和力的鉴定：抗体亲和力的鉴定对可溶性抗原可采用免疫沉淀、ELISA、免疫荧光、放射免疫分析技术 (radioimmunoassay, RIA)、竞争抑制试验以及生物传感器分析法等；对细胞等颗粒性抗原可采用荧光激活细胞分类仪 (fluorescence activated cell sorter, FACS) 测定。

(4) 单克隆抗体识别抗原表位的鉴定：一种抗原分子表面常有多个抗原表位，用该抗原制备的 McAb，有的是抗同一表位，有的则是抗不同表位。可采用竞争抑制试验和分子生物学方法等鉴定 McAb 所识别的抗原位点。

(5) 单克隆抗体作用抗原的分子量：常采用免疫印迹试验测定单克隆抗体结合的抗原分子量。

(6) 单克隆抗体效价测定：McAb 的效价以培养上清或腹水的稀释度表示。在凝集反应中，腹水效价可达 5×10^4 ；在 ELISA 或 RIA 中，腹水效价可达 10^6 ，如低于 10^5 ，该抗体用于诊断的敏感性将不高。

【实验结果】

制备针对某种抗原的某一抗原表位的特异性 McAb。

【注意事项】

1. 免疫的动物应选择与亲本骨髓瘤细胞同一品系的动物，因为免疫动物品系和骨髓瘤细胞种系越远，融合的杂交瘤细胞越易发生免疫排斥反应，越不稳定。

2. 免疫用的抗原尽量设法提高其纯度，并保存其活性。

3. 饲养细胞制备时，注入和抽取腹腔液时应避开网膜，动作要轻，以免损伤肝、脾。

4. 为防止无关克隆的过度生长，染色体丢失或变异，获得能稳定增殖并大量分泌特异性抗体的杂交瘤细胞，在筛选得到阳性杂交瘤细胞时应及时克隆化，并及时冻存细胞。

5. 为防止细胞污染，通常用的抗生素有青霉素 (100U/mL)、链霉素 (100 μ g/mL)、四环素 (50 μ g/mL)、庆大霉素 (50 μ g/mL)，其中青霉素和链霉素联合使用较为常用，俗称“双抗”。

6. PEG 有毒性，在细胞融合过程中作用时间不宜过长。

7. 细胞复苏过程中，离心速度控制在 1000r/min 左右，否则过高的离心速度对细胞生长有影响。

8. 克隆化培养后的阳性杂交瘤细胞应及时冻存留种，以防细胞染色体丢失、变性或死亡。

9. 整个制备过程应严格无菌操作。对于细胞传代培养应适时注意更换培养液，防止细胞死亡，避免因此而造成的损失。

【临床意义】

单克隆抗体以其特异性强、纯度高、均一性好等优点，在临床医学的应用主要表现为：①作为医学诊断试剂，广泛应用于酶联免疫吸附试验、放射免疫分析、免疫组化和流式细胞仪等技术。目前应用单克隆抗体制作的试剂盒广泛应用在：病原微生物抗原、抗体的检测；肿瘤抗原的检测；免疫细胞及其亚群的检测；激素测定；细胞因子的测定等。②蛋白质的提纯。③肿瘤的靶向治疗，即将针对某一肿瘤抗原的单克隆抗体与化疗药物或放疗物质连接，利用单克隆抗体的导向作用，将药物或放疗物质携带至肿瘤细胞，直接杀伤肿瘤细胞。

【思考题】

1. 简述单克隆抗体制备的原理。
2. 单克隆抗体和多克隆抗体各有何特点？
3. 如何筛选杂交瘤细胞？
4. 杂交瘤细胞培养过程中应注意什么？

实验三 抗体的纯化与保存

免疫原免疫动物制备的抗血清是成分复杂的混合物，除含有特异性抗体外，还存在非特异性抗体和其他血清成分。在许多情况下我们需要用纯化抗体进行研究和检测。因此，抗血清需经纯化后方可应用。基于抗体的来源、用途和纯度要求的不同，选择合适可行的纯化方法非常必要。一般应综合考虑抗体的产量和纯度，尽可能用较少的纯化步骤获得较高纯度的目的蛋白。但通常情况下，没有一种方法能满足所有纯化的目的，所以必须结合抗体本身的特点，选择合适的一种或几种方法纯化特定的抗体。纯化抗体的方法主要有盐析法、辛酸提取法、离子交换层析法、亲和层析法等。

一、特异性抗体的纯化

特异性是指抗血清只与其特异性抗原发生反应。有时由于免疫原不纯，含有微量的杂抗原导致制得的抗血清中出现相应的杂抗体。即使用纯抗原，例如用高度纯化的 IgG 免疫动物，获得的抗体不仅有抗 γ 重链的抗体，也有抗 κ 轻链和抗 λ 轻链的抗体。有些蛋白质和其他蛋白质处于一种结合状态，如甲胎蛋白常和白蛋白相结合，因此免疫得到的抗血清含有抗白蛋白的杂抗体存在。去除杂抗体的方法有：

1. 亲和层析法 将杂抗原交联到琼脂糖凝胶 4B (Sephrose-4B) 上，如去除抗白蛋白抗体，则交联上白蛋白或不含甲胎蛋白的血清，装柱后将待纯化的抗血清通过亲和层析柱，杂抗体吸附在柱上，流出液则是特异性抗体。

2. 吸附法 用双功能试剂（如戊二醛或丙酮醛）将不含特异性抗原的杂抗原（如血清、组织液或已知的某种杂抗原）混合液交联，制成固相吸附剂。将此吸附剂加到抗血清中，杂抗体与相应抗原结合而去除。如用不含甲胎蛋白的血清，稀释 1 倍后，加入 0.25% 的戊二醛，置冰箱过夜使之呈胶冻状，用组织粉碎器打碎，经缓冲液多次洗涤后，则成为颗粒状的凝胶吸附剂。用此吸附剂直接加到抗血清中（约 1 : 10），抗原则与杂抗体结合，上清液则为特异性抗体。有时因杂抗体太多，须重复吸附才能完全去除。吸附过的凝胶可用 3mol/L 硫氰酸钾洗涤，洗脱杂抗体后方可继续使用。有时杂抗体较少，其他蛋白也少，加入戊二醛后不形成胶冻状，此时可加入无关蛋白进行交联，如牛血清白蛋白、兔血清、卵白蛋白等。加入量为总蛋白的 2%~3% 为宜。

二、IgG 的纯化

IgG 是人体血浆免疫球蛋白的主要成分，占人体血清抗体的 70%~80%，是人体重要的抗感染抗体，因此在免疫学检测技术中纯化特异性 IgG 极为重要。血浆蛋白质成分多样，血清中 IgG 的电泳迁移度很宽，从慢 γ 区延伸至快 β 区，直至 α 区。因此要提纯 IgG，首先要进行粗分离程序，尽可能除去其他蛋白质成分。即必须利用化学方法除去血清中的白蛋白，沉淀出 β 球蛋白，进而用透析和过滤的方法去掉血清 γ 球蛋白中的盐类物质，使 IgG 在样品中比例大为增高。经脱盐的纯净 γ 球蛋白中含有各种免疫球蛋白，可根据这些蛋白质的分子量和其物理、化学性质上的差异采用盐析法、离子交换层析法等获得较纯的 IgG。

（一）兔抗人 IgG 硫酸铵盐析法

盐析法是粗分离蛋白质的重要方法之一，可用于从大量粗制剂中浓缩和部分纯化蛋白质。高浓度的盐离子在蛋白质溶液中可与蛋白质竞争水分子，从而破坏蛋白质表面的水化膜，降低其溶解度，使之从溶液中沉淀出来。各种蛋白质的溶解度不同，因而可利用不同浓度的盐溶液来沉淀

不同的蛋白质。盐析所需的最小盐量称为盐析浓度。但盐析后的蛋白质中仍含有一些杂蛋白，所以盐析产生的制品为粗分离产品需要进一步纯化。硫酸铵因其溶解度大，温度系数小和不易使蛋白质变性，其盐析法可使蛋白质的纯度提高约 5 倍，且可除去 DNA 和 RNA 等。

【实验目的】

掌握兔抗人 IgG 硫酸铵盐析法的原理；熟悉硫酸铵盐析法的操作过程。

【实验原理】

由于抗体分子为亲水胶体，带有羧基解离的负电荷或氨基解离的正电荷，其极性基团分子间相互排斥，与水分子可形成水膜，使之呈溶于水的溶胶状态。许多蛋白质在纯水或低盐溶液中溶解度较低，若稍加一些无机盐则溶解度增加，这种现象称为“盐溶”。而当盐浓度继续增加到某一浓度时，蛋白质又变得不溶而自动析出，这种现象称为“盐析”。因此，当加入少量盐时，增加了蛋白质分子上的极性基团，因而增大了蛋白质在水中的溶解度出现“盐溶”现象。但当盐浓度增加到一定浓度时，一方面大量的水与盐分子结合，使得蛋白质没有足够的水维持溶解状态，破坏了维持蛋白质亲水胶体的水膜，使之容易沉淀出来；另一方面加入的盐离子可中和蛋白质分子的相互碰撞，使之发生相互聚集而沉淀出现“盐析”现象。由于各种蛋白质“盐析”出来所需的盐浓度各异，所以盐析法是通过控制盐的浓度，使蛋白质混合溶液中的各个成分分步“盐析”出来，以达到分离目的蛋白质。各种不同的免疫球蛋白盐析所需硫酸铵的饱和度不完全相同，通常用来分离抗体的硫酸铵饱和度为 33%~50%。

【实验材料】

1. 标本 免疫兔血清。
2. 试剂 硫酸铵、pH 值为 7.2 的 PBS、生理盐水、5mol/L 的 BaCl₂、奈氏试剂、28% 氨水、H₂SO₄ (1:2) 稀释液、蒸馏水。
3. 器材 透析袋、烧杯、玻璃棒、离心机、pH 计、冰箱。

【实验步骤】

1. 饱和硫酸铵溶液 (SAS) 配制 将 760g 硫酸铵加到 1000mL 蒸馏水中，加热溶解，此时液面可成薄膜，用 28% 氨水调整 pH 为 8~9，出现褐色沉淀，趁热经滤纸过滤得到透明液体。室温冷却，用 1:2 的 H₂SO₄ 调整 pH 至 7.0~7.2，多余的硫酸铵析出，再次核对 pH 值。因酸性易使蛋白变性，影响蛋白质的收集。

2. 50% 硫酸铵提取 取 2X mL 免疫血清 (血清 X mL + 盐水 X mL)，加等量饱和硫酸铵。逐滴加入，并不断搅拌血清，最终总量为 4X mL。室温放置至少 20min，冰箱 40min 或 1d。然后以 4000r/min 转速离心 30~40min，上清液为白蛋白，沉淀物为球蛋白，弃上清液，加冷盐水 2X mL，充分溶解。

3. 33% 硫酸铵提取 向 2XmL 沉淀物中加入 XmL 饱和硫酸铵溶液，边加边搅拌，最终总量达 3X mL。放置室温 30min，冰箱过夜，而后以 4000r/min 转速离心 30~40min，弃上清液 (主要为 β、γ 球蛋白)，沉淀物基本属于 γ 球蛋白。为进一步提纯 γ 球蛋白，此步可重复两次。

4. 透析脱盐 以少量冷盐水溶解沉淀物，再将沉淀管中残留的 γ 球蛋白都洗下来，装到透析袋内。把透析袋上口扎好，悬于流水中，透析 5~10min 后放在冰箱中用 pH 值为 7.2 的 PBS 透析。透析 3~4h 后取少量外液加一滴 0.5% 的 BaCl₂，如呈白色浑浊说明有 SO₄²⁻ 存在，若加奈氏试剂呈褐色说明有 NH₄⁺ 存在。此时应更换新鲜外液继续透析，直到外液检不出上述离子为止。

【注意事项】

1. 加盐的速度不宜过快，否则局部共沉淀作用加强。
2. 沉淀时间要把握好，注意溶液的 pH 值。
3. 若蛋白浓度过高，纯化时会出现其他蛋白与抗体蛋白共沉淀现象，因此蛋白含量应在

2.5%~3% 为宜, 过高时需用生理盐水稀释。

4. 抗体对温度比较敏感, 长时间暴露在室温可使其活性降低甚至失活。因此纯化过程需在 4℃ 条件下进行。

【思考题】

1. 简述兔抗人 IgG 硫酸铵盐析法的原理。
2. 硫酸铵盐析法在 IgG 纯化中常使用的盐浓度是多少?

(二) 离子交换层析法提取 IgG

用硫酸铵沉淀法提取的 IgG 中, 尚有转铁蛋白。为得到纯的 IgG, 必须通过离子交换层析法去除其他的蛋白成分。常用的离子交换剂有二乙氨乙基纤维素 (DEAE-cellulose) 或 QAE-sephadex。离子交换剂是借酯化, 醚化或氧化等化学反应, 在纤维素等的分子中引入碱性或酸性离子集团而制成的。离子交换剂与蛋白质等大分子间的交换作用, 主要依靠在不同 pH 值条件与离子强度的溶液中可逆性的吸附与解脱作用。各种蛋白质的等电点不同, 电荷不同, 分子大小不同, 与交换剂结合强度不同, 因此可利用不同的置换条件, 将它们分离。该方法是采用离子交换剂进行层析的一种方法。在此简介 DEAE-cellulose 层析法。

【实验目的】

熟悉 DEAE-cellulose 层析法提取 IgG 的原理和操作过程。

【实验原理】

二乙氨乙基纤维素 (DEAE-cellulose) 是阴离子交换剂。在离子交换层析中, 基质是由带有电荷的纤维素或树脂组成。由于蛋白质也有等电点, 当蛋白质处于不同的 pH 条件下, 其带电状况也不同。阴离子交换基质结合带有负电荷的蛋白质, 所以这类蛋白质被留在柱子上, 然后通过提高洗脱液中的盐浓度等措施, 将吸附在柱子上的蛋白质洗脱下来。结合较弱的蛋白质首先被洗脱下来。反之阳离子交换基质结合带有正电荷的蛋白质, 结合的蛋白可以通过逐步增加洗脱液中的盐浓度或是提高洗脱液的 pH 值洗脱下来。

【实验材料】

1. 标本 硫酸铵提取的 IgG 蛋白液。
2. 试剂 15~20g 的 DEAE-cellulose、0.5mol/L NaOH、0.5mol/L HCl、pH6.3 的 0.0175mol/L 的 PBS 缓冲液、20% 氨基水杨酸。
3. 器材 紫外分光光度计、小试管、吸管、烧瓶等。

【实验步骤】

1. DEAE-cellulose 的活化

(1) 取一定量的 DEAE-cellulose 加入到 50 倍的蒸馏水充分浸泡, 室温静止 30min, 轻轻将上 1/3 倒掉以去除浮于上清液中的细小微粒。

(2) 加入到 20 倍的 0.5mol/L NaOH 中, 充分搅拌 20min, 静止于冰箱中浸泡 1h, 弃上清液, 用蒸馏水冲洗至中性。

(3) 以 0.5mol/L HCl 充分浸泡 1h, 仍用蒸馏水冲洗至中性。

(4) 用 pH6.3 的 0.0175mol/L 的 PBS 缓冲液在冰箱中充分平衡至少 24h 以上。

2. 装柱 一般用柱口径为 2cm, 高 50cm, 将上述平衡好的纤维素用吸管一次性加入柱内, 使柱内上下均匀一致, 打开下口调节流速以每分钟 20 滴为宜。

3. 上样 装好柱后, 以 0.0175mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 为 6.3) 充分洗脱, 打开下口调节流速, 当柱内液体存留大约 0.5cm 高度时, 关闭下口, 将样品用吸管沿柱壁周围缓缓加入, 加完后打开下口, 样品进入柱内后用 pH6.3 的 0.0175mol/L 的 PBS 缓冲液洗脱。

4. 样品收集 样品进入柱内开始洗脱并收集。收集时根据需要准备若干试管，每支收集2mL。收集时，不断用20%氨基水杨酸检查。凡含有蛋白的各管立即放入冰箱中，全部收集完毕后，将蛋白部分放入透析袋浓缩，此即纯化的IgG。

5. IgG的鉴定。

【注意事项】

1. 洗涤好的纤维素使用前必须平衡至所需的pH和离子强度。
2. 已平衡的交换剂在装柱前还要减压除气泡。
3. 柱子装好后再用起始缓冲液淋洗，直至达到充分平衡方可使用。

【思考题】

简述离子交换层析法的主要作用和用途。

(三) 亲和层析法纯化抗体

亲和层析法是利用抗体与固定在胶基质上的特定配体的特异、可逆结合将抗体与溶液中其他物质分开，是获得纯净抗体较理想的方法。亲和配体若是与某种抗体同种型结合的蛋白A和蛋白G，得到的抗体即为某种同种型抗体，如IgG、IgM和IgA；若亲和配体为特定抗原，得到的抗体即为抗原特异性抗体。因此亲和层析是蛋白质分离纯化最有效的方法之一。另外，如果配体与蛋白质的亲和能力很强，也可同时进行样品的浓缩。

【实验目的】

熟悉亲和层析法纯化抗体的原理和操作步骤。

【实验原理】

蛋白A亲和层析是一种非常有效的分离纯化抗体的方法。蛋白A是从金黄色葡萄球菌中获得，可与抗体重链的Fc片段相结合。现在已知蛋白A可与多种哺乳动物的IgG相结合，也可与某些IgM和IgA相结合。将蛋白A预先固定于层析柱（如sepharose CL-4B）上，然后将含有目标抗体的溶液过柱，其中易与蛋白A结合的抗体被截留在柱上（非共价可逆结合），其他物质则流出，再经洗脱液洗脱即可获得目标抗体。

【实验材料】

1. 标本 未经纯化的自制兔抗血清及经硫酸铵法粗提的IgG。
2. 试剂

(1) TBS缓冲溶液：6.06g Tris(50mmol/L)、8.78g NaCl(150mmol/L)、0.5g叠氮化钠(0.05%)溶于1L蒸馏水中，并用HCl调节pH值至7.4。

(2) 中和缓冲溶液：121.2g Tris(1mol/L)、87.8g NaCl(1.5mol/L)、0.37g EDTA(1mmol/L)、5g叠氮化钠(0.5%)溶于1L蒸馏水中，并用HCl调节pH值至8.0。

(3) 洗脱缓冲溶液(pH2.7)：将3.75g甘氨酸(50mmol/L)溶解于1L蒸馏水中，用HCl调节pH值至2.7。

3. 器材 蛋白A柱、泵、离心管、离心机、pH试纸、过滤器、分光光度计。

【实验步骤】

1. 亲和层析柱的准备 通常准备5mL或10mL蛋白A sepharose CL-4B填料，在真空瓶中将与等体积的填料和TBS缓冲溶液混合，搅拌。抽真空约15min以除去填料中的气泡。将蛋白A sepharose CL-4B填料缓慢加入玻璃柱中，利用泵控制填充速度为1~2mL/min，避免柱干，利用10倍于柱体积预冷的TBS缓冲溶液平衡层析柱。

2. 抗血清的准备 将抗血清放入冰水或4℃冰箱中缓慢解冻以避免蛋白质的聚集。若出现聚集可于37℃预热溶解。加入固体叠氮化钠至浓度为0.05%，在4℃下以15 000r/min转速离心5min，

移出澄清的抗血清再经过滤器过滤除去多余的脂。

3. 亲和层析 将抗血清用 TBS 缓冲液以 1 : 5 的比例稀释, 再行过滤。以 0.5mL/min 的速度将抗血清上柱, 为保证抗血清与填料的结合, 需连续上柱 2 次并保留上样的流出液。用 TBS 缓冲液清洗柱子至 $A_{\lambda 280\text{nm}} < 0.008$ 后加 pH2.7 洗脱缓冲液, 以 0.5mL/min 的速度洗脱至所有蛋白均流下来。用加有 100 μ L 中和缓冲溶液的 1.5mL EP 管分管收集洗脱液, 混匀后用 pH 试纸检查洗脱液的 pH, 如果 pH < 7 可利用中和缓冲液调至约 pH7.4, 以防止抗体的变性。

在柱中加入 10mL, pH1.9 洗脱缓冲液, 按上述方法收集洗脱液至 $A_{\lambda 280\text{nm}} < 0.008$ 。

4. 蛋白质的含量测定 利用分光光度计测定各管中蛋白质的含量。若蛋白浓度低于 0.5mg/mL 可加入 10% 的甘油以便保存, 将纯化的抗体分装后在 2~8 $^{\circ}$ C 保存。

【实验结果】

利用 SDS-PAGE 检查洗脱获得的蛋白纯度, 并利用免疫电泳技术检查纯化后抗体的滴度。

【注意事项】

1. 在纯化过程中, 预冷的 TBS 缓冲溶液可减少蛋白质的非特异性结合和微生物的代谢。
2. 叠氮钠有毒, 应戴手套并小心操作。
3. 用亲和层析法纯化抗体时需要结合和洗脱条件进行优化, 以便尽可能多地获得高纯度的抗体。

【思考题】

1. 简述亲和层析法纯化抗体的原理。
2. 简述 TBS 缓冲液的配制方法。

三、IgM 的纯化

【实验目的】

熟悉 IgM 抗体纯化的方法和操作步骤。

【实验原理】

IgM 大多数为巨球蛋白不溶于水, 故可用双蒸水透析纯化。对那些溶于水的 IgM 类抗体可先用饱和硫酸铵沉淀, 而后采用凝胶过滤进一步纯化。凝胶过滤是利用微孔凝胶分离不同大小分子的抗体, 可用于样品中 IgM 和 IgG 的分离, 常用于对硫酸铵粗提物的进一步纯化。通过该法纯化所得抗体可用于 Ig 分子片段的制备、FITC 等标记物的标记。

【实验材料】

1. 样品 抗血清 (杂交瘤腹水或其上清液), 硫酸铵粗提物。
2. 试剂 含 0.02%NaN₃ 的硼酸缓冲液、PBS 缓冲液、双蒸水、SE 凝胶。
3. 器材 透析袋、层析柱、紫外分光光度计等。

【实验步骤】

1. 将待测抗血清在 4 $^{\circ}$ C 下以 12 000r/min 转速离心 30min, 弃沉淀。
2. 上清液用双蒸水透析 (4 $^{\circ}$ C, 24h)。
3. 在 4 $^{\circ}$ C 下以 12 000r/min 转速离心 1h, 留沉淀。
4. 制备 SE 凝胶层析柱, 用 0.02%NaN₃ 的硼酸缓冲液平衡。
5. 将步骤 3 的沉淀或硫酸铵粗提物以 5mL 硼酸缓冲液溶解, 缓慢加样。
6. 以硼酸缓冲液洗脱蛋白质, 并收集 100 管 (每管为柱床体积的 1%), IgM 在洗脱液的一个蛋白峰。
7. 收集蛋白峰, 分别合并, 透析浓缩, 于紫外分光光度计 OD_{280nm} 测定 Ig 含量, SDS-PAGE 鉴定 IgM 纯度。

【注意事项】

1. IgM 类抗体最好用硼酸缓冲液进行透析并保存, 有些 IgM 类抗体易从溶液中析出, 实验中应密切观察。

2. IgM 为五聚体, 反复冻溶可能会使五聚体打开成单体, 影响抗体的功能, 因此 -70°C 保存时, 加适量甘油, 有助于保持抗体稳定。

【思考题】

1. 简述 IgM 的生物学特点。
2. 简述 IgM 抗体纯化的方法。

四、SDS-PAGE法检测免疫球蛋白纯度

十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 是一种通过电泳技术将不同的分子量的蛋白质在凝胶中分离的技术。

【实验目的】

熟悉 SDS-PAGE 法检测免疫球蛋白纯度的原理和方法。

【实验原理】

SDS-PAGE 分离蛋白的主要原理, 是各种物质分子量的差异性。SDS 为阴离子表面活性剂, 能以一定的比例和蛋白质结合形成 SDS-蛋白质复合物, 使蛋白质分子带有大量的负电荷, 并远远超过其原有的电荷使蛋白质分子间的电荷差别降低乃至消除。同时蛋白质在 SDS 作用下结构变得松散, 形状趋向一致, 因此各种 SDS-蛋白质复合物在电泳时产生的泳动率差异, 就反映了分子量的差异。

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体和少量交联剂甲叉双丙烯酰胺通过化学催化剂 (过硫酸铵), 四甲基乙二胺 (TEMED) 作为加速剂或光催化聚合作用形成的三维空间的高聚物。聚合后的聚丙烯酰胺凝胶形成网状结构。具有浓缩效应、电荷效应、分子筛效应, 适用于不同相对分子质量物质的分离, 且分离效果好。

【实验材料】

1. 样品 未纯化的兔免疫血清、纯化的兔 IgG。
2. 试剂 30% 丙烯酰胺溶液、1.5mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.8)、1.0mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH6.8)、Tris-甘氨酸电泳缓冲液、10% 过硫酸铵 (AP)、四甲基乙二胺 (TEMED)、10% SDS (十二烷基磺酸钠)、SDS-PAGE 上样缓冲液、考马斯亮蓝染色液、脱色液、蛋白质分子量标志物。
3. 器材 垂直电泳槽、电泳仪、脱色摇床、烧杯、玻璃棒、微量加样器等。

【实验步骤】

1. 配制分离胶、灌胶 配制 10% 分离胶。边配边平摇烧杯混匀, 配好胶后迅速用滴管灌胶。先将胶管封好底, 将配制好的分离胶液灌注入胶管内, 约 70mm 高度, 在凝胶表面轻轻加一层双蒸水 (3~4mm)。用于隔绝空气, 使胶面平整。室温下静置约 60min。

2. 配制浓缩胶、灌胶 配制 5% 浓缩胶。分离胶凝固后, 倒掉覆盖在分离胶表面的蒸馏水, 用去离子水冲洗一次, 倒置吸净残留的水。将配制好的浓缩胶液灌注, 插入胶梳; 在室温下静置 60min, 使胶凝固。

3. 样品预处理 取样品 0.1mL、上样缓冲液 0.9mL, 混匀, 在 100°C 水浴中加热 5min 使蛋白变性。

4. 加样电泳 将胶管封底去掉, 放入电泳槽中。将 Tris-甘氨酸电泳缓冲液加入电泳槽中, 电泳缓冲液要盖过胶管口, 然后用微量加样器将样品 $10\mu\text{L}$ 加到胶管胶面内。

5. 电泳 接好电极, 先调电压为 100V/浓缩胶, 开始电泳, 当指示染料进入分离胶后, 将电压增加到 120V/分离胶, 继续电泳直至染料抵达距分离胶下端约 1cm 处, 停止电泳, 断开电

源。电泳时间在 1.0~1.5h。

6. 凝胶染色 电泳结束后,取出电泳胶管,用长注射器针剥胶,一边注水一边推胶,直至胶出。将胶移至培养皿中,精确量取并记录凝胶长度和指示染料的迁移距离(分离胶上缘到染料条带中心距离),然后将凝胶板浸入考马斯亮蓝染色液中室温染色 30~45min。

7. 脱色 用脱色液脱色至蛋白条带清晰,凝胶无色为止。

8. 拍照分析 凝胶成像系统拍摄并分析分子量与含量。

【注意事项】

1. 制胶过程中用水封住胶面是为了阻止空气中的氧气对凝胶聚合的抑制作用。

2. 上样量不宜过大,否则会出现过载现象。

3. 考马斯亮蓝染色程度和脱色程度应把握好,尽量使更多的条带出现在凝胶上。

4. 丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺有神经毒性,可经皮肤、呼吸道等吸收,故操作时要注意安全防护。

【思考题】

1. 简述 SDS-PAGE 法检测免疫球蛋白纯度的主要步骤。

2. 为达到实验要求,制胶和上样应注意什么?

五、抗体的保存

抗体分子完整而稳定的蛋白区使其具有抗低温和变性条件的优势,这使得长期保存抗体变得相对容易,在保存缓冲液中很少需要添加甘油或其他稳定复合物。唯一经常遇到的问题是抗体溶液的细菌或真菌污染。尽管这一点可用 0.02% 叠氮钠防止,但叠氮钠可限制抗体在许多生物学方面的应用,且干扰一些偶联方法。在抗体偶联反应中,叠氮钠可用透析或凝胶过滤的方法去除。如果抗体是用作体内试验,千万不可使用叠氮钠。此时抗体溶液应滤过除菌,而且无菌抗体必须严格无菌操作。

收集到的血清、培养上清液或腹水中的抗体常规应置于 -20°C 保存。抗体溶液不应反复冻融,否则容易导致凝集。抗体的凝集常会影响抗体的抗原结合位点的空间结构,或产生不溶物而使抗体活性丧失。

1. 血清、组织培养上清液或腹水中抗体的保存

(1) 杂交瘤上清液应加入 1/20 体积的 1mol/L Tris-HCl 作缓冲液,腹水或血清不必加缓冲液。

(2) 如果可以使用叠氮钠,应加入 0.02% 叠氮钠。

(3) 通常需分装成一次性使用所需的剂量,于 -70°C ~ -20°C 下可保存 2~3 年。

(4) 抗体工作液直接置于 4°C 下可保存 3~6 个月。

2. 纯化抗体的保存

(1) 需要调整抗体溶液的 pH 值至中性。PBS 或相似的等渗溶液都是常用的纯化抗体的保存缓冲液。

(2) 纯化抗体溶液应以相对高的浓度 ($\geq 1.0\text{mg/mL}$) 在 pH 值中性条件下保存,通常使用高达 10mg/mL 浓度的缓冲液。如抗体浓度过低,在保存前应采用超滤或硫酸铵沉淀法浓缩。如果纯化抗体不是用于标记的,可在低浓度的纯化抗体中加入 1% 的 BSA 以提高蛋白浓度再行冻存。

(3) 如不做特殊要求,可加入 0.02% 叠氮钠防止污染。

(4) 为方便使用,可将抗体分为小包装,多数抗体于 -20°C 可保存数年。抗体工作液在 4°C 下保存至少 6 个月内稳定。