

21世纪高等医学院校教材

(供本科生及研究生使用)

免疫学常用实验技术

主编 柳忠辉 吕昌龙

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书以免疫学的教学和科研实践为基础,在兼顾 20 多年来广泛应用的免疫学实验方法的同时,融入了近年来出现并证明行之有效的新方法、新技术,以实验技术手册的形式编写而成。全书共分为 16 章,主要涉及抗体制备和标记技术,抗原纯化和鉴定,免疫细胞分离、鉴定及功能检测等三大部分,各章节之间既相互独立又相互关联。本书在讲述实验基本操作过程的同时,着重阐述了实验关键知识点,集实验操作的实用性和科学性于一体,既适合免疫学研究生、本科生教学使用,也可作为参考书籍供从事免疫学研究的相关人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学常用实验技术/柳忠辉,吕昌龙主编. —北京:科学出版社, 2002. 8

21 世纪高等医学院校教材

ISBN 7-03-010506-0

I. 免… II. ①柳… ②吕… III. 免疫学-实验-医学院校-教材
IV. Q939.91-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 037911 号

出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002 年 8 月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2002 年 8 月第一次印刷 印张:9 3/4

印数:1-5 000 字数:185 000

定价:15.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

《免疫学常用实验技术》编写人员

主 编 柳忠辉 吕昌龙

副主编 李 一 曹雅明 朱 伟 汪广荫 张逢春

编 者 (按姓氏笔画排序)

于春雷 尹艳慧 艾金霞 台桂香

刘永茂 刘凤芝 朱 伟 吕昌龙

汪广荫 李 一 劳风学 张逢春

张学军 杨 煜 杨 蜜 柳忠辉

曹雅明 曾常茜 韩宏伟

前 言

免疫学作为现代生命科学的三大前沿学科之一,伴随着细胞生物学、分子生物学的进步而获得迅猛的发展。现代免疫学技术已广泛渗透到生命科学研究的每一个研究领域,不论是基础医学研究,还是临床医学研究,都离不开免疫学技术。

作为一种技术的创建,还没有哪一门生命科学能像免疫学一样造就了众多的医学诺贝尔奖的获得者。1901年,首届医学诺贝尔奖即授予了建立抗血清(抗体)治疗的 Behring EV 先生;1977年,又将这一殊荣颁发给放射免疫分析技术的创建者 Yallow R 女士;1984年,这一最高科学荣誉又被开创单克隆抗体技术的 Milstein C 和 Küller GF 双双获得。从这些科学巨匠的工作中,我们可以了解到免疫学技术的巨大进步。

现代免疫学技术发展的特点是,微量化与高特异性检测技术相结合的新技术的发现,使得免疫学技术在不断地推陈出新。20年前,人们只能应用 RIA 检测微量蛋白,而今天,人们几乎可以用 ELISA 法检测所有的细胞因子,应用 Western blot 和免疫沉淀技术分析组织中微量蛋白,采用单克隆抗体技术、荧光标记和计算机相结合的流式细胞仪,开辟了细胞学研究的新途径,已经广泛应用在细胞分类、分化及凋亡等方面的研究中。

免疫学技术虽然带动了多学科研究的发展,但人们对免疫学技术仍缺乏足够的认识。国内虽然已经有多部介绍免疫学实验的书籍,但一本好的参考书必须具有实用性、保证实验的可操作性,既不能只介绍单纯的理论知识,也不能仅仅介绍实验操作程序,而应该具有举一反三的作用,也就是能让学习者知道怎样应用一个实验,什么条件下采用什么样的具体实验方法,这在以往的教科书中介绍得较少。本书最大特点是每个实验都有应用时进行相关实验改进的指导——即实验操作的“关键点”。在关键点中作者详细地阐明每个实验的影响因素,在不同条件下改进实验的方法。举一个最简单的例子,在双位点 ELISA 应用单克隆抗体包被酶标板时,为什么有时采用 pH 9.6 包被液并不能获得满意的结果;在 Western blot 电转印时,不同的膜怎样处理,采用什么样的电流转印效果最佳。这些实际问题是实验者最想知道、一般书籍又很少涉及的,而这些正是本书着重阐述的内容。

由于编写时间仓促,编写者水平不一,本书虽经最后统一审核,错误之处在所难免。希望广大读者给予谅解,并对不足之处给予批评指正。

在此,对本书的合作者中国医科大学、齐齐哈尔医学院和北华大学的同仁表示衷心的感谢,同时也对参加本书审校过程中的各位工作者表示感谢。最后还要对将本书列为吉林大学立项教材的校教材科同仁及学者们的支持表示诚挚的谢意。

柳忠辉

2002年2月于长春

目 录

第一章 多克隆抗体制备	1
第一节 动物免疫与采血	1
一、免疫原	1
二、佐剂	2
三、动物选择	2
四、免疫方法	3
五、免疫动物采血	3
六、抗原免疫实例	4
第二节 抗体纯化	5
一、盐析法	5
二、凝胶柱层析	6
三、应用举例——重组蛋白抗体制备	7
第三节 抗体保存	10
第二章 单克隆抗体制备	11
一、试剂与器材	11
二、实验流程	13
三、关键点	15
四、应用举例	16
第三章 酶免疫测定技术	18
一、实验原理	18
二、试剂与材料	20
三、基本流程	20
四、关键点	22
第四章 放射标记技术	23
第一节 抗原放射性核素标记	23
一、氯胺 T 标记法	23
二、Iodogen 标记法	24
三、 ¹²⁵ I 标记复合物的分离	25
第二节 放射免疫分析技术	26

一、实验原理	26
二、主要技术条件	26
第三节 免疫放射分析	28
第四节 应用举例	29
一、人卵泡休止素放射免疫分析	29
二、人卵泡休止素免疫放射分析	30
三、关键点	31
第五节 免疫细胞受体放射分析	31
第五章 免疫细胞化学技术	35
一、试剂配制	36
二、器材准备	36
三、实验基本流程	37
四、关键点	41
五、常见问题及解决办法	43
六、应用举例	44
第六章 经典抗原抗体反应	46
第一节 凝集反应	46
一、直接凝集反应	46
二、间接凝集反应	48
第二节 沉淀反应	49
一、单向免疫扩散试验	49
二、双向免疫扩散试验	50
第三节 补体的测定	51
一、血清补体总活性测定	51
二、C4 溶血活性的测定	52
第四节 循环免疫复合物(CIC)的测定	53
第七章 抗原分离、纯化与鉴定	55
第一节 抗原粗分离	55
第二节 抗原精制	56
一、吸附层析	56
二、离子交换层析	57
三、凝胶过滤层析	59
四、亲和层析	61
五、高效液相色谱法	63
六、离心法	63

第三节 抗原性质鉴定	64
第四节 应用举例	65
一、离子交换层析分离血清蛋白抗原	65
二、亲和层析法纯化甲胎蛋白	66
第八章 免疫印迹	68
第一节 蛋白质抗原电泳分离	68
一、样本处理	68
二、凝胶的选择	69
三、蛋白标准品的选择	70
第二节 蛋白质的转膜	71
一、半干式电转印	71
二、湿式电转印	72
第三节 杂交	72
一、抗体的选择	72
二、封闭	73
三、抗体杂交	73
第四节 检测	74
一、放射性核素检测	74
二、辣根过氧化物酶——ECL 法	74
三、碱性磷酸酶法	75
四、关键点	75
第五节 应用举例	76
第九章 免疫沉淀	78
一、细胞裂解	79
二、免疫沉淀抗原-抗体复合物	80
三、抗原-抗体复合物法应用举例	81
四、三分子复合物法应用举例	83
第十章 免疫细胞分离	86
第一节 外周血白细胞分离	86
一、低渗分离	86
二、聚蔗糖-泛影葡胺分离法	88
三、聚乙烯吡咯烷酮硅胶分离法	89
第二节 单核巨噬细胞分离	90
一、腹腔巨噬细胞分离	90
二、脾巨噬细胞分离	91

三、单核细胞纯化	92
第三节 T、B 淋巴细胞选择性分离	93
一、E 花环分离 T 细胞	93
二、尼龙毛分离 T 细胞	94
三、B 细胞分离	95
第四节 NK 细胞分离	96
一、Percoll 不连续密度梯度分离法	96
二、磁化细胞分离器分离法	96
第五节 中性粒细胞分离	98
一、小量分离法	98
二、大量分离法	98
第六节 树突状细胞分离	99
第十一章 流式细胞仪检测技术	101
一、实验原理	101
二、实验应用	102
三、实验方法	103
四、应用举例	106
五、关键点	108
第十二章 淋巴细胞转化试验	109
一、试剂配制	110
二、材料准备	110
三、基本流程	111
四、关键点	112
五、B 淋巴细胞增殖实验	113
第十三章 细胞毒实验技术	114
第一节 NK 细胞活性测定	114
一、放射性核素释放法	114
二、乳酸脱氢酶释放法	115
第二节 细胞毒性 T 细胞功能测定	117
第三节 补体依赖性细胞毒试验	118
第十四章 吞噬功能及溶血空斑试验	119
一、中性粒细胞吞噬功能测定	119
二、小鼠巨噬细胞吞噬功能测定	120
三、人巨噬细胞吞噬功能测定	121
四、小鼠 B 细胞溶血空斑形成试验	121

第十五章 细胞因子活性检测	124
一、IL-1 生物学活性检测	124
二、IL-2 生物学活性检测	125
三、IL-4 生物学活性检测	127
四、IL-6 生物学活性检测	128
五、IL-8 生物学活性检测	128
六、IL-10 生物学活性检测	129
七、肿瘤坏死因子生物学活性检测	130
第十六章 免疫细胞凋亡	132
第一节 细胞形态学观察法	132
一、普通光学显微镜观察方法	132
二、荧光显微镜观察方法	134
第二节 寡核苷酸片段检测法	136
一、普通琼脂糖凝胶电泳法	136
二、定量琼脂糖凝胶电泳法	138
三、ELISA 检测法	140
第三节 流式细胞仪	141
一、PI 单染色法	141
二、Hoechst 33342/PI 双染色法	142

第一章

多克隆抗体制备

机体具有多种 B 细胞克隆,抗原刺激机体后可被不同的 B 细胞克隆同时识别,受刺激活化的 B 细胞克隆针对抗原表位的多少而产生相应的特异性抗体,因此,利用抗原物质免疫动物时,每一抗原表位都能诱发相应 B 细胞克隆产生单克隆抗体(mAb),所获得的免疫血清即为多种 mAb 的混合物,称之为多克隆抗体血清。

第一节 动物免疫与采血

一、免疫原

1. 抗原种类 常用的抗原主要包括:①微生物抗原:如细菌、病毒、立克次体、支原体、螺旋体、真菌等。②组织抗原:主要是来源于细胞的各种蛋白质或蛋白质复合物,如多种酶类、激素、血浆蛋白、肿瘤组织等成分。③免疫球蛋白抗原。

2. 抗原纯度 抗原纯度越高越好,但并非要达到绝对的氨基酸分析纯,一般的抗原只要达到亲和层析或 SDS-PAGE 电泳纯即可用于免疫。特殊情况下要求达到 90% 以上的纯度。应用病原微生物抗原时,要选择抗原性强、特异性好、遗传性稳定的标准菌株或病毒株。免疫球蛋白抗原在纯化过程中应避免因操作而造成的蛋白质变性和降解。

3. 抗原用量 抗原量在一定范围内与免疫应答强度呈正相关。抗原量过大、过小均易产生免疫耐受。抗原用量与抗原成分、剂型、注射途径以及所用佐剂种类、含量均有关。在应用完全弗氏佐剂时,蛋白质类抗原剂量以 0.5~ 1mg/kg 体重为宜。静脉注射时应适当减少用量,以免引起动物超敏反应而死亡。

4. 抗原的处理

(1) 颗粒性抗原,如动物的红细胞、细菌菌体等可制备成悬液,不需佐剂,直接免疫。菌体数以 1×10^{10} 个/ml 为适。

(2) 可溶性蛋白质抗原(如人的 IgG)、病毒抗原、细菌可溶性抗原组分等,可以直接与弗氏完全佐剂(1: 1 V/V)混合、乳化。抗原乳化方法有多种,如果采用注射器研磨法,可以取 2 支 5ml 注射器,以双接头注射针头连接,反复推拉,混合至油和水在放置时不再析出即可,约半小时左右达到乳化完全。乳化完全的抗原滴在水面上不扩散为合格。

(3) 半抗原(多糖、多肽、激素、化学药品等)需与载体偶联后,才能免疫动物,制备抗体。常用载体为牛血清白蛋白(BSA)、KLH(keyhole limpet haemocyanin)、鸡血清蛋白(OA);偶联剂有过碘酸钠、戊二醛以及碳化二亚胺(carbodiimide)等。载体蛋白以 KLH 最为常用,该蛋白与哺乳动物蛋白没有亲缘关系,不会引起免疫交叉反应。偶联剂以碳化二亚胺最常用,方法简单,偶联效果好。

*注:半抗原与载体蛋白偶联的碳化二亚胺法

取半抗原 5mg 与 BSA 5mg 溶解在 0.5ml 蒸馏水中,10mg 碳化二亚胺溶解在 0.5ml 蒸馏水中,将上述溶液混合,4℃ 避光搅拌过夜,再用生理盐水透析除去碳化二亚胺,即为偶联的抗原,免疫时按每只家兔半抗原量 250~ 500 μ g 计算免疫抗原总量。

二、佐 剂

佐剂属非特异性免疫增强剂,与抗原一起注射或预先注入机体时,可增强机体免疫应答或改变免疫应答的类型。佐剂种类繁多:如卡介苗(BCG)、短小棒状杆菌(CP)、脂多糖(LPS)、细胞因子;氢氧化铝、明矾;双链多聚肌苷酸:胞苷酸(poly I: C)和双链多聚腺苷酸:鸟苷酸(poly A: U);矿物油、脂质体、免疫刺激复合物(ISCOMs)、CPG 寡核苷酸等。在多克隆抗体制备中以弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂最为常用。弗氏完全佐剂配方较多,主要成分为羊毛脂、液状石蜡和灭活的卡介苗。羊毛脂与液状石蜡之比为 1: 2,也可用 1: 1 等。灭活的卡介苗,一般在临用前加入(2~ 4mg/kg 体重)。通常佐剂与抗原等量混合,充分乳化。弗氏不完全佐剂不含卡介苗,其他同弗氏完全佐剂。

三、动物选择

实验室用于免疫的动物主要有兔、山羊和鼠。如大量制备商品用抗血清或提取免疫球蛋白时也可选用马、驴等大型动物。对免疫动物的主要要求有:

1. 应选择与抗原物质亲缘关系远的动物,特别是在制备抗免疫球蛋白血清时更应注意。抗原物质的来源生物与被免疫动物亲缘关系越远,免疫应答能力越强,抗体产生水平越高,抗体亲和力也越强。

2. 动物生理状态正常,发育成熟,健壮,体重符合规定,家兔初始免疫的体重通常在 2~ 2.5kg。

3. 性别上以雄性成年动物较常用,也可采用雌性非妊娠动物。患病或刚刚病愈、有免疫缺陷或应用免疫抑制剂的动物不能应用。

四、免疫方法

1. 免疫途径 可采用静脉、腹腔、肌内、皮下、皮内和淋巴结等注射方法。但一般采用小剂量、多点、多途径的免疫方法。颗粒性抗原(细菌悬液、红细胞悬液)多采用小鼠腹腔注射法。而可溶性抗原(如 IgG 等)多采用含弗氏完全佐剂的乳剂(油包水型),家兔背部多点皮下注射法。

2. 可溶性抗原免疫 基础免疫后(即初次免疫)的 3 周左右,应进行加强免疫,以后每隔 2 周进行一次加强免疫。加强免疫的次数取决于试血的结果。末次免疫后,从家兔耳缘静脉、小鼠眶静脉采血少量,分离血清,采用免疫双扩散试验测定抗血清效价,血清效价 $> 1: 32$,或 ELISA 法检测抗体效价 $> 1: 10\,000$,表明抗体水平已经较高,此时可以从兔颈动脉或心脏采集全部血液,分离血清。如果抗体效价较低,可继续加强免疫,一般需 4~ 5 次免疫,抗体效价即可达到合适水平,如果此时仍不能达到采血的抗体效价要求,应该考虑重新免疫。

3. 颗粒性抗原免疫 第一周注射 2 次,随后每周加强免疫一次,加强免疫后 4~ 5 天试血,做凝集试验,抗血清效价 $> 1: 2\,000$,即可以从兔颈动脉或心脏采集全部血液,分离血清。

五、免疫动物采血

1. 一次放血法 家兔最后一次加强免疫的第 7 天采血。采血前禁食 12 小时,但不禁水。动物仰卧固定,切开皮肤将颈动脉与迷走神经剥离,选择血管中段,用两支止血钳夹住(约 5cm),切开放血(2500g 家兔可放血约 100ml)。为提高采血量,可适当减慢放血速度,并提高动物下肢位置。血液放于大试管、平皿或三角烧瓶中,待凝固后,用铂耳或无菌滴管沿边缘剥离,置 37°C 1 小时,再放 4°C 过夜,使血清充分析出。离心沉淀,分装,鉴定合格后, $- 40^{\circ}\text{C}$ 以下保存备用,效价可保持 2 年以上。此外,家兔与豚鼠也可通过心脏直接采血。

2. 少量多次放血法 家兔末次免疫后放血 40~ 50ml。并补充生理盐水或

10% 葡萄糖溶液,继续饲养。以后每隔 4 周放血 40~ 50ml,每次放血前 5~ 8 天可加强免疫一次。该法既可提高抗体效价,又能维持较长时间采血。采血时可采用心脏或家兔耳缘静脉切开放血法。耳缘静脉切开前,先消毒并采用加热扩张血管,然后横断切开静脉,保持血流通畅,一般可采集 30~ 40ml 血。取血后用灭菌干纱布压迫止血。

六、抗原免疫实例

1. 颗粒抗原多克隆抗体制备方法(溶血素制备为例)

(1)抗原制备:采取雄性绵羊血液,以玻璃珠脱纤维或 10% 枸橼酸钠溶液抗凝(10% 枸橼酸钠溶液 10ml 可抗凝新鲜血液 100ml),离心弃血浆,生理盐水洗血细胞 3~ 4 次,然后按表 1-1 配制稀释液。

表 1-1 血细胞浓度稀释与免疫次数

免疫次数	1	2	3	4	5	6	7
血细胞浓度	10%	20%	30%	40%	40%	40%	40%
剂量(ml)	4	4.5	5.5	6.5	7	7	7

(2) 免疫方法:选择体重 2kg 以上的健康家兔,按耳静脉注射法进行,前 5 次免疫间隔 48 小时,后两次每日免疫 1 次,末次免疫后 5~ 6 天试血,当免疫血清溶血效价达 1: 2 000 以上即可采血,若低于 1: 2 000,应继续免疫 1~ 2 次,采血后分离血清,分装冻存。

2. 可溶性蛋白质抗原多克隆抗体制备方法

(1) 抗原制备:人血清可采用饱和硫酸铵沉淀、DEAE 纤维素层析法或 protein A 亲和层析纯化 IgG,所得人 IgG 样品经免疫双扩散法鉴定,与标准的抗人全血清或抗人 IgG 免疫血清应呈单一沉淀线。将纯化 IgG(5mg/ml)与弗氏完全佐剂按 1: 1(V/V)混合,采用注射器法乳化。

(2) 免疫方法:取家兔 4 只,采用背部皮下多点注射(20 点以上),初次免疫剂量约 1mg/只,3 周后加强免疫,剂量 1mg/只,以后每隔 2 周加强免疫一次,共 3~ 4 次。

(3) 试血:末次注射后第 7 天,耳缘静脉采血少量,分离血清与 IgG 做免疫双扩散试验;抗体效价在 1: 32 以上,可采血分离血清,分装保存。

第二节 抗体纯化

由免疫动物制备的多克隆抗体血清,因其中含有非常复杂的多种蛋白质组分,并不适用于实验室实际分析、检测应用,必须将其有效的抗体成分分离、纯化。根据实验的目的不同,其分离、纯化的纯度要求也不同,如作为 ELISA 检测时的抗体,部分情况下饱和硫酸铵纯化即可,而免疫放射测定的标记用抗体必须达到双级纯才可应用(亲和层析纯+ SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯)。抗体纯化的方法常用的有盐析法、凝胶柱层析、离子交换剂层析、免疫亲和层析等技术。下面主要介绍盐析法、凝胶柱层析以及亲和层析分离法。

一、盐析法

1. 实验原理 蛋白质由于分子质量和携带的电荷等不同,可在不同浓度的高盐液体中分级析出,根据这一原理,在免疫血清中加入不同浓度的硫酸铵溶液,逐步使免疫球蛋白沉淀析出,达到分离纯化抗体的目的。这种通过向血清等高分子溶液中加入大量盐类分子,使原来溶解的免疫球蛋白析出沉淀的过程称为蛋白质盐析。

2. 试剂与材料

(1) 饱和硫酸铵溶液:取 500ml 蒸馏水,加入约 400g 硫酸铵,水浴加热至 70℃,用磁力搅拌器充分搅拌,直到加入的硫酸铵不再溶解,以氨水(也可用 NaOH)调 pH 至 7.2,室温保存。

(2) 0.9% 氯化钠溶液。

(3) 磁力搅拌器,500ml 烧杯,透析袋。

(4) 兔抗人 IgG 免疫血清。

3. 基本流程

(1) 盐析过程:取免疫血清 10ml,加等量生理盐水稀释,置磁力搅拌器上,边搅拌边逐滴加入饱和硫酸铵溶液 20ml,至 50% 饱和度 4℃ 放置 1 小时,4 000r/min,4℃ 离心 30 分钟,弃上清,沉淀物加生理盐水 20ml 溶解。再次加入饱和硫酸铵溶液 10ml,至饱和硫酸铵浓度大于 33%,4 000r/min,4℃ 离心 30 分钟,弃上清,重复此步骤 2 次。最后将离心沉淀物加生理盐水 4ml 溶解,装入透析袋。

(2) 除盐:将盛装盐析物溶液的透析袋置入大烧杯中,蒸馏水 4℃ 下透析 4 小时,换用生理盐水透析 48 小时,此过程应反复换液数次,目的是除去 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 成分。也可采用 Sephadex G25 层析除盐,该法除盐较彻底、快速,但抗体浓度将被稀释。

4. 关键点

(1) 全部实验操作应避免在超过 20℃ 温度环境中进行,最好在 4℃ 冷室中操作,以防 Ig 变性。

(2) 磁力搅拌器搅拌血清时,速度不宜过快,以防产生多量泡沫影响饱和硫酸铵液的加入。

(3) 如果盐析的免疫球蛋白来源于小鼠,饱和硫酸铵溶液的终浓度不宜低于 45%,尤其是单克隆抗体纯化时,饱和硫酸铵溶液终浓度以 50% 为宜,过低会导致大量单克隆抗体(IgG)丧失。

二、凝胶柱层析

1. 实验原理 凝胶本身是一种多孔网状结构的分子筛,其线性基质含多个羟基,具有亲水性,在交联剂作用下交联形成不溶于水的三维空间网络结构。蛋白质溶液流经凝胶柱时,大分子蛋白质不能穿过凝胶网孔进入凝胶粒内部,而留在胶粒间隙的溶液中,随洗脱液最先流出。而小分子蛋白质则进入胶粒内部,由于受到胶粒阻留,洗脱较慢。这样,不同的蛋白质组分根据分子质量大小不同,由大到小依次洗脱而得到分离。

2. 试剂及材料

(1) 抗体样品:经饱和硫酸铵溶液沉淀、初步分离的 IgG。

(2) 0.2mol/L Na_2HPO_4 溶液:称取固体 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 358.22) 71.64g,用蒸馏水溶解至 1 000ml。

(3) 0.2mol/L NaH_2PO_4 溶液:称取固体 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 156.03) 31.21g,用蒸馏水溶解至 1 000ml。

(4) 0.05mol/L pH8.0 磷酸缓冲液(PB):0.2mol/L Na_2HPO_4 溶液 94.7ml, 0.2mol/L NaH_2PO_4 溶液 5.3ml 混合后,用蒸馏水稀释至 400ml。

(5) Sephadex G-200 干胶 20g。

(6) 实验材料:层析仪(蠕动泵 1 台、紫外监测仪 1 台、记录仪 1 台、梯度发生器 1 台和分部收集器 1 台)1 套;2.5cm×100cm 层析柱 1 套;1 000ml 烧杯 2 个;玻璃棒 1 根;5ml 吸量管 1 支;8ml 试管 100 支。

3. 基本流程

(1) 凝胶处理:Sephadex G-200 为干燥颗粒,使用前应用缓冲液浸泡,使其充分膨胀。缓冲液的量通常为凝胶溶胀体积的 2 倍,浸泡 72 小时。为节约时间,也可煮沸 2~4 小时,加速膨胀。将膨胀好的凝胶混悬后自然沉降,用吸管吸除上层细小颗粒,并重复漂洗 2~3 次。

(2) 装柱:选择合适的层析柱(柱内径和高度应在 1:20~1:50 之间),将层

析柱与层析仪的蠕动泵、紫外监测仪相连。装柱前,先向柱内加入 1/3 高度的缓冲液,将溶胀的 G-200 凝胶用起始缓冲液(0.05mol/L pH8.0 磷酸缓冲液)调成糊状,沿柱内壁填充到柱内,待其部分自然沉降后,吸出部分上清,再加入凝胶,反复数次,直至凝胶距柱上口 6~8cm,在凝胶上放一直径略小于内径的圆形滤纸片,使其平铺在凝胶柱面上。目的是防止加样或加缓冲液时破坏凝胶柱界面的平整及防止样品杂质进入凝胶柱。安装好上接头,并与起始缓冲液相连,启动蠕动泵(0.2ml/min),连续冲洗,使柱充分平衡后上样,一般至少需要平衡 4 小时以上。

(3) 加样:吸去滤纸片上层缓冲液,加入 2ml 经饱和硫酸铵沉淀的抗体样品,待样品进入层析凝胶柱后,再加满缓冲液。

(4) 洗脱:用 0.05mol/L pH8.0 磷酸缓冲液,以 0.1ml/min 的速度洗脱,记录洗脱图谱,分步收集洗脱组分(2ml/管)。

(5) 检测:蛋白主峰为 IgG,收集的样品采用紫外分光光度计法检测蛋白含量,进一步分析蛋白的免疫学活性和纯度。

4. 关键点

(1) 装柱中,要轻轻搅动凝胶悬液并缓缓沿内壁加入,切忌有气泡和断层,若有断层,需倾倒入,重新装柱。

(2) 加样时,注意缓冲液界面恰好在滤纸片上,及时加样,不能出现因放液过快,凝胶柱干涸现象,一旦如此凝胶,不能继续使用。

(3) 整个层析过程时间较长,要求在 4℃ 环境中操作,以防影响免疫球蛋白活性。

三、应用举例——重组蛋白抗体制备

抗体是后基因组、蛋白组计划中对新功能蛋白质研究所必需的工具。而针对新的重组蛋白的抗体制备,多数是以重组融合蛋白免疫法制备其抗体。常用融合蛋白有 GST(谷胱甘肽 S 转移酶)、MBP(麦芽糖结合蛋白)。本节以重组 GST-follistatin(卵泡抑素,FS)C 末端 35 肽抗原(FSc35)为例,阐述抗融合蛋白抗体的制备过程。

1. 试剂及材料

重组 GST-FSc35 肽

弗式完全与不完全佐剂

protein A 亲和层析凝胶

Affi-gel 10 亲和层析凝胶

GST 蛋白

FS315 全长蛋白

2. 实验流程

GST-FSc35 肽与弗式完全佐剂等体积混合、充分乳化



家兔背部皮下多点免疫,每只家兔注射总抗原量约合 FSc35 肽 300~ 500 μ g



免疫 3 周后,取等量 GST-FSc35 与弗式不完全佐剂等体积乳化,加强免疫 1 次



此后每隔 2 周加强免疫 1 次,共两次



最后一次免疫的第 7 天,在兔耳缘静脉采血。间接酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定抗体效价 $> 1: 10\ 000$,即可从兔颈动脉采集全部血液,分离血清



取 10ml 抗血清,经 45%~ 50% 饱和硫酸铵溶液沉淀 2 次,0.9% 生理盐水溶解抗体,再经盐水充分透析 48~ 72 小时



取透析的抗体与 1ml protein A 凝胶在 4 $^{\circ}$ C 旋转混合 30 分钟



将凝胶移至微量柱上,20 倍柱床体积的 1 \times PBS 充分洗涤 protein A 柱 ①



4 倍柱床体积的 0.1mol/L pH2.4 甘氨酸-HCl 缓冲液洗脱抗体,每 10 滴(约 0.4ml)收集 1 管,管内预先加入等体积 0.2~ 0.5mol/L pH7.5 的 PB 缓冲液,收集含有蛋白的管(约 5 管),并将其混合



超滤除盐、浓缩,以 1 \times PBS 调体积至 2ml



取 1ml 柱床体积的 GST-Affi-gel 10 亲和层析凝胶与上述抗体在 4 $^{\circ}$ C 旋转混合 60 分钟 ②



收集流出液即为部分纯化的抗 FSc35 肽 IgG 抗体



取 1ml 柱床体积的 FS-Affi-gel 10 亲和层析凝胶与抗体在 4 $^{\circ}$ C 旋转混合 60 分钟 ③



20 倍柱床体积的 1 \times PBS 充分洗涤凝胶

↓

4 倍柱床体积的 0.1mol/L pH2.8 甘氨酸-HCl 缓冲液洗脱抗体

↓

每 10 滴 1 管,收集洗脱液,混合蛋白含量 > 0.2mg/ml 的样本管,
测抗体效价,分装,-70℃ 保存。此法获得的高纯度抗 FS C 末端肽 IgG 抗体,
可满足各种免疫学实验需要

3. 关键点

① 凝胶经充分洗净后,其流出液在 280nm 测定光吸收值应 < 0.02。

② 该步骤的目的是除去 GST-FSc35 融合蛋白免疫后产生的抗 GST 抗体部分。

*注:Affi-gel 10 和 Affi-gel 15 是两种最常用的活化型亲和层析介质,具有保存方便、活性稳定、操作简便等优点。Affi-gel 10 与蛋白结合时,要求结合缓冲液 pH 值低于蛋白的等电点(pI),而 Affi-gel 15 结合蛋白缓冲液 pH 值要求高于蛋白的 pI;Affi-gel 10 与 Ig 的结合率比 Affi-gel 15 高 30%~40%,在实验中 Affi-gel 10 更常用。Affi-gel 10 和 Affi-gel 15 与蛋白结合缓冲液以 0.1mol/L MOPS 最常用,也可采用 0.1mol/L HEPES、醋酸盐或碳酸盐缓冲液,但禁用 Tris 或甘氨酸类含氨基的缓冲液。1ml 体积的凝胶约结合 30mg 蛋白。表 1-2 显示了 Affi-gel 10 和 Affi-gel 15 与常见蛋白的结合能力。

表 1-2 Affi-gel10 和 Affi-gel15 结合蛋白的能力

蛋白种类	PI	结合能力(%)	
		GST-Affi-gel10	GST-Affi-gel15
卵白蛋白	4.7	< 9	> 70
BSA	4.9	< 15	> 80
人 Ig	6~7	> 90	< 40
细胞色素 C	9.3	> 90	≈ 0
溶菌酶	10	> 90	≈ 0

GST-Affi-gel 10 的制作:取约 60mg GST 蛋白,加入 1ml Affi-gel 10 凝胶,在 4℃ 旋转混合 4 小时以上,移去未结合的 GST 蛋白,加入 0.1ml 1mol/L Ethanolamine HCl (pH8.0),继续反应 1 小时,充分封闭 Affi-gel 10 凝胶。再经 20 倍凝胶柱床体积的 1× PBS 充分洗净,即为偶联的 GST-Affi-gel 10 凝胶。

③ 经除去抗 GST 抗体获得的部分纯化抗体,可以满足 ELISA 等常规的免疫学试验用。如果有条件,尽可能采用相应的特异性抗原,按本步骤操作,最终获取高纯度抗体。本实验采用 FS315 全长蛋白免疫亲和层析,目的即是获得针对 FS315 C

末端反应的高纯度抗体,其中 FS-Affi-gel 10 凝胶的制备同上述②。

第三节 抗体保存

1. 避免高温、低 pH 值 无论是纯化的抗体(免疫球蛋白)还是免疫后的抗血清,在实验室内的保存条件和方法对维持其效价十分重要。保存方法不当,可使抗体腐败变质、杂菌污染或混入其他杂质而失去应用价值。由于抗体本身是大分子蛋白,因此,在抗体的保存和运输过程中,一定要注意避免蛋白质的变性问题,即过度的高温,或极端 pH 值的出现。抗体使用时可暂时保存在 4℃,约一个月左右。抗体在酸性条件下极易失活,pH 7~ 8 较为合适。

2. 避免反复冻融 抗体作为大分子蛋白质,在低浓度时极易引起空间结构的变化,因此,应尽可能以高浓度分装成小量,- 80℃ 保存,至少也要在- 20℃ 以下冻存。尽可能避免保存过程的多次冻融,一般来说,冻融 1、2 次对效价影响不大,融化后的抗体可暂时保存在 4℃,尽快使用。另外,为避免多次冻融影响效价,可将纯化的抗体(抗血清效果不佳)加上 50% 甘油保存在- 30℃,取抗体时尽可能在冰上操作。

3. 加入防腐剂保存 常用于抗体保存的防腐剂有叠氮钠(0.02% 浓度)、硫柳汞(0.01% 浓度)和苯酚(0.5% 浓度)。免疫血清加入防腐剂后可放入 4℃ 普通冰箱保存。本法保存期约 1 年。但荧光抗体或辣根过氧化物酶标记抗体不能用叠氮钠防腐,叠氮钠对荧光素(异硫氰酸荧光素)有淬灭作用,对酶也有毒性作用。

4. 除菌保存 为常用的有效的方法,可用滤器(孔径 0.22~ 0.45 μm)过滤除菌,4℃ 保存。

5. 真空冷冻干燥保存 这是一种理想的免疫血清和纯化抗体的保存方法。免疫血清或纯化抗体分装于安瓿或青霉素小瓶内(通常 1~ 2ml),低温冻结,置入低温真空干燥器内,真空条件下使样品逐渐脱水干燥(需 12~ 24 小时不等),然后密封(加盖或火焰封口)。冻干后免疫血清或纯化抗体可在- 20℃ 保存数年,效价无明显下降。

(汪广荫 朱 伟 柳忠辉)

第二章

单克隆抗体制备

根据致敏的单一 B 细胞克隆具有分泌特异性抗体和骨髓瘤细胞在体外长期增殖的特性,采用细胞融合技术在体外可将上述两种细胞融合形成杂交瘤细胞。该杂交瘤细胞可以在体外长期稳定地生长,并分泌均一独特型抗体,此即单克隆抗体制备技术。杂交瘤细胞培养的关键是 HAT 选择性培养,骨髓瘤细胞因缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转化酶(HGPRT),而在 HAT 培养基,即含次黄嘌呤(H)、氨基蝶呤(A)、胸腺嘧啶核苷(T)的培养基中不能生长;B 细胞虽然具有次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转化酶,可以在 HAT 中存活,但因 B 细胞不能传代生长,经短暂培养后即逐步死亡。而杂交瘤细胞因具备了 B 细胞和骨髓瘤细胞的双重特点,既可分泌抗体,又能在 HAT 培养基中长期存活。因此,可通过 HAT 选择培养,筛选出克隆化目的杂交瘤细胞株,再利用杂交瘤细胞培养上清或杂交瘤细胞接种小鼠产生的腹水,获取大量的来源于杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)。

由于单克隆抗体具有高特异性、高亲和力等特点,单克隆抗体现已广泛应用于免疫学、微生物学、肿瘤学、遗传学以及分子生物学等各个研究领域。如:抗原的精制和构造分析;细胞发生、分化;细胞功能检测和抗原定位的组织化学染色以及疾病的诊断、治疗和预防等方面。

一、试剂与器材

1. 细胞融合剂聚乙二醇(PEG) 相对分子质量 4 000, 1g/安瓿分装后,经 10 磅 15 分钟高压灭菌, - 30℃ 保存备用。用前酒精灯直接融化,待温度降至 60℃ 时,

迅速加入 1ml 无血清 RPMI-1640 培养液,混匀,即为融合用 50% PEG, 40℃ 保温备用。①

2. 0.2mol/L L-谷氨酰胺(L-G)贮存液 L-谷氨酰胺(相对分子质量 146.15) 2.9g,溶于双蒸水至 100ml,过滤除菌,分装,-30℃ 保存。

3. 200× 双抗溶液 青霉素 G(钠盐)100 万 U 和链霉素(硫酸盐)1g,溶于双蒸水至 50ml,过滤除菌分装,-30℃ 保存。

4. RPMI-1640 培养液 RPMI-1640 粉剂 10.4g + NaHCO₃ 2g + 双抗溶液 5ml + 0.2mol/L L-G 溶液 1ml,加双蒸水至 1000ml,调整 pH 至 7.2。过滤除菌,4℃ 或 -30℃ 保存。

5. 15% FCS-RPMI-1640 培养液 无菌条件下取 56℃ 30 分钟灭活补体的胎牛血清(FCS)15ml + 85ml RPMI-1640 培养液。

6. 100× 氨基蝶呤(A)贮存液(4×10^{-5} mol/L) 氨基蝶呤(相对分子质量 440.4) 1.76mg 溶于 90ml 双蒸水,滴加 1mol/L NaOH 溶液 0.5ml,待完全溶解后,加入 1mol/L HCl 0.5ml,加双蒸水至 100ml,-30℃ 保存。

7. 100× 次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷(HT)贮存液(H: 1×10^{-2} mol/L; T: 1.6×10^{-3} mol/L) 次黄嘌呤 136.1mg 和胸腺嘧啶核苷 38.8mg,加双蒸水至 100ml,置 50℃ 水浴中使其完全溶解,过滤除菌,每 2ml 分装,-30℃ 保存。用前可置 40℃ 加温助溶。

8. 1× HAT 培养液 15% FCS-RPMI-1640 培养液 98ml + 1ml A 储存液 + 1ml HT 储存液。

9. 1× HT 培养液 15% FCS-RPMI-1640 培养液 99ml + 1ml HT 储存液。

10. 细胞冻存液 90ml 含 30% FCS 的 RPMI-1640 培养液 + 10ml DMSO, 4℃ 保存可用一周。

11. 100× 8-杂氮鸟嘌呤(8-AG)贮存液 8-杂氮鸟嘌呤 200mg(相对分子质量 152.1)加入 1ml 4mol/L NaOH 溶液,待其溶解后,加 1mol/L HCl 溶液中和,补加双蒸水至 100ml,过滤除菌,分装,-30℃ 保存。

12. 0.2mol/L NaH₂PO₄ 取 NaH₂PO₄ · 2H₂O 31.2g 溶于双蒸水至 1000ml。

13. 0.2mol/L Na₂HPO₄ 取 Na₂HPO₄ · 12H₂O 71.63g 溶于双蒸水至 1000ml。

14. 0.2mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液(PB) 取 0.2mol/L NaH₂PO₄ 溶液 19ml + 0.2mol/L Na₂HPO₄ 溶液 81ml。

15. 主要仪器设备 CO₂ 培养箱、超净工作台、倒置显微镜、精密天平、低温和普通冰箱、液氮罐、离心机、高压灭菌器、烤箱、水浴锅、除菌滤器、酶联免疫测定仪。

16. 小鼠实验器材 手术剪刀、镊子、眼科剪刀、眼科镊子、止血钳、小鼠解剖台板。

17. 常规实验器材 血细胞计数板, 1ml、2ml 和 10ml 吸管, 毛细吸管, 10ml 和 50ml 离心管, 细胞培养瓶, 培养皿, 平底细胞培养板(24 孔和 96 孔), 细胞冷冻管, 1ml 和 10ml 注射器, 4 号、7 号和 25 号针头, 微量移液器及移液器头。
18. 小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0 或 NS-1。
19. 56℃ 灭活胎牛血清。
20. 抗体纯化器材与试剂。

二、实验流程

1. 实验动物免疫 BALB/c 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体重约 $18\text{g} \pm 2\text{g}$ 。基础免疫时, 细胞性抗原一般每次以 $(1 \sim 2) \times 10^7$ 个细胞腹腔注射, 间隔 2~3 周重复一次; 可溶性抗原用量一般为 $10 \sim 20\mu\text{g}$ 。首次免疫需与等体积完全弗氏佐剂混合 (1: 1V/V), 充分乳化后, 经背部皮下(s. c.) 多点注射或腹腔(i. p.) 注射。每次间隔 2~3 周, 同量抗原加等体积不完全弗氏佐剂, 充分乳化后, 加强免疫。采用间接 ELISA 法检测血清抗体滴度, 当效价达到 1: 400~1: 1 600 以上时, 取同量抗原尾静脉或腹腔注射加强免疫, 最后一次加强免疫 3 天后, 取免疫小鼠脾细胞进行细胞融合。②

2. 免疫动物脾细胞悬液的制备 无菌取末次免疫后 3 天的小鼠脾脏, 置于 100~200 目不锈钢筛网上, 用注射器内芯研磨脾脏。用 RPMI-1640 培养液离心洗涤脾细胞 ($1\ 000\text{r}/\text{min}$, 5 分钟) 2 次。制成单个脾细胞悬液, 镜下计数为 1×10^8 脾细胞。

3. 饲养细胞的制备 取正常 BALB/c 小鼠经 75% 乙醇溶液消毒腹部, 切开外层皮肤, 保证腹膜完整。用注射器腹腔注射 4℃ 预冷的无血清培养液 4~5ml, 轻揉腹部数次, 于左下腹部剪开腹膜, 用吸管吸取细胞悬液, 反复 2~3 次。用无血清培养液离心洗涤 ($1\ 000\text{r}/\text{min}$, 5 分钟) 2 次。重新悬浮于 15% FCS-RPMI-1640 培养液中, 调细胞浓度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 将细胞加至 96 孔培养板, 每孔 $100\mu\text{l}$ 。③

4. 骨髓瘤细胞的培养 将复苏的骨髓瘤细胞于 10% FCS-RPMI-1640 培养液中培养 1 周, 每 2~3 天换液一次, 根据细胞生长情况每 3~4 天传代一次或进行扩大培养。适宜的细胞密度约为 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 。在融合前 3 天, 每天更换一半培养液, 使骨髓瘤细胞保持在对数生长期。融合当天用 RPMI-1640 培养液洗涤离心骨髓瘤细胞 ($1\ 000\text{r}/\text{min}$, 5 分钟) 2 次, 以 RPMI-1640 培养液重新悬浮细胞。用台盼蓝染色, 镜下计数活细胞数大于 95%, 取 $(1 \sim 2) \times 10^7$ 骨髓瘤细胞。④

5. 细胞融合 将制备的脾细胞悬液 (1×10^8) 和骨髓瘤细胞 [$(1 \sim 2) \times 10^7$] 按 5: 1~10: 1 的比例混合, 加入 15% RPMI-1640 培养液, 离心洗涤 2 次 ($1\ 000\text{r}/\text{min}$, 5 分钟)。第二次离心后, 尽可能吸净残留液体, 使细胞沉淀团块松

散。于 37℃ 水浴内,在 1 分钟内缓慢加入 40℃ 预温的 50% PEG 1ml,静置 1 分钟。于 1 分钟内,加 37℃ 预温 RPMI-1640 培养液 2ml。于 3 分钟内,加 37℃ 预温 RPMI-1640 培养液 25ml, 1 000r/min,离心 5 分钟。倾去上清,轻弹试管底部,使细胞略松散,加 HAT 培养液轻轻悬浮沉淀细胞,调细胞浓度至 1×10^6 /ml。⑤

6. 杂交瘤细胞的选择性培养和筛选 将细胞接种于 96 孔板中(实验前一天加好饲养细胞的培养板),每孔 0.1ml,37℃,5% CO₂ 培养。融合后每隔 3~5 天更换 HAT 培养液一次,共 3~4 次,采用换半液法换液,即每次吸出培养液中的一半液体后再加入等量新培养液。融合后 1 周左右可出现克隆,当 14~21 天集落大于 3mm 或大于视野 1/2 时,利用间接 ELISA 法筛选分泌单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞克隆。

7. 杂交瘤细胞的克隆化培养 将检出的分泌单克隆抗体的阳性孔杂交瘤细胞按有限稀释法稀释细胞,即用 HAT 培养液稀释细胞至 2~5 个/ml, 10~20 个/ml 和 50 个/ml,于 96 孔细胞培养板中每孔加入细胞 0.1ml,各浓度按 12 孔、8 孔、4 孔的数量接种。亚克隆化培养 10~14 天后,收集单一杂交瘤细胞克隆孔的上清,用间接 ELISA 法检测抗体分泌情况,挑选单个阳性克隆生长的阳性孔再进行 2~3 次亚克隆,直到亚克隆化时全部克隆孔细胞培养上清中抗体检出阳性率达 100% 为止。⑥⑦

8. 杂交瘤细胞的冻存 将阳性克隆在 12/24 孔培养板中扩大培养,再将其移入培养瓶中进一步扩大培养,至细胞数约 $> 1 \times 10^6$ 时,收获细胞,1 000r/min,离心 5 分钟,弃培养液,加入细胞冻存液(含 10% DMSO)将细胞悬浮,调整细胞 $> 1 \times 10^6$ /ml,移入细胞冻存管中,将冻存管放入 BIOCELL(细胞冻存器)内,置 -70℃ 低温冻存 4 小时以上,即可移入液氮中长期保存。⑧

9. 单克隆抗体的大量制备 选用 BALB/c 雌性小鼠,在接种杂交瘤细胞前 1~2 周,腹腔内注射 0.5ml 2,6,10,14-四甲基五癸烷(降植烷)预处理。收集生长良好的杂交瘤细胞,用无血清培养液离心洗涤 2~3 次(1 000r/min,5 分钟),弃去上清,重悬浮于无血清培养液中,调整细胞浓度至 $(1 \sim 2) \times 10^6$ /ml,每只小鼠腹腔注射 0.5~1ml 细胞悬液。待小鼠腹部明显膨大时,收集腹水,12 000r/min 离心 20 分钟,回收上清,分装,-30℃ 保存备用。

10. 单克隆抗体的纯化 羟基磷灰石柱层析法(HAT):羟基磷灰石经 0.01mol/L pH6.8 PB 漂洗 3 次后装柱,柱床为 1.6cm × 10cm。1 倍柱床体积的 1mol/L NaCl 溶液洗涤,4 倍柱床体积的 0.01mol/L pH6.8 PB 洗涤平衡。加入 1~5ml 收集的腹水上清(除去了上层的不溶物质及沉淀物)。0.01~0.3mol/L pH6.8 PB 300ml 线性梯度洗脱,用部分收集器分部收集,流速为 0.7~0.9ml/min,5 分钟收集 1 管,第 3 管为纯化的 IgG 单克隆抗体。经生理盐水充分透析后,冷冻干燥,分装,-20℃ 冻存。

单克隆抗体常用的纯化方法还有,收集的腹水上清经 50% 饱和硫酸铵溶液沉淀,再采用 A 蛋白亲和层析柱纯化,即得 IgG 型单克隆抗体。

11. 单克隆抗体的鉴定

(1) 单克隆抗体亚类的鉴定:可采用标准的抗 Ig 亚类的单克隆抗体,利用琼脂扩散试验鉴定抗体的亚类,如属于 IgG1 还是 IgG2 型单克隆抗体。

(2) 单克隆抗体特异性的鉴定:采用包被不同抗原或类似抗原的酶标板,利用间接 ELISA 法检测抗体的交叉反应性;或采用免疫印迹试验检测抗体的特异性等。

(3) 单克隆抗体效价和亲和力测定:可采用间接 ELISA 法测定。

三、关键点

① 相对分子质量为 400~ 6 000 的 PEG 都可使用,但以相对分子质量 4 000 融合效率最高。

② 动物免疫:一般细胞、细菌和病毒等颗粒性抗原具有较强的免疫原性,可不加佐剂直接经腹腔注射进行初次、二次和加强免疫;而应用可溶性的蛋白质抗原免疫时需加用佐剂,经充分乳化后于小鼠的背部皮下(多点)和腹腔内注射;对具有较弱免疫原性的抗原应适当增加免疫次数;如为半抗原,应制备成人工完全抗原后,再加佐剂免疫;基础免疫最好同时免疫 3 只以上的小鼠。

③ 饲养细胞制备:取小鼠腹腔巨噬细胞制备饲养细胞时,腹腔冲洗液以 4~ 5 ml 较合适,保证饲养细胞在 96 孔细胞培养板中每孔约 $(1\sim 2)\times 10^4$ 的浓度。因此,最好于融合或克隆前 1~ 2 天铺 96 孔细胞培养板;血清质量好时,细胞融合也可不用饲养细胞。但杂交瘤细胞亚克隆化时,应加饲养细胞。

④ 骨髓瘤细胞的准备:为防止骨髓瘤细胞发生 HGPRT 酶的逆转,应定期用 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 8-AG 处理骨髓瘤细胞,或于融合前用 HAT 培养液检测骨髓瘤细胞的敏感性,发现较多骨髓瘤细胞逆转时,再用 8-AG 处理;当融合率低而又找不到其他原因时,应该考虑骨髓瘤细胞的质量,可试换骨髓瘤细胞。

⑤ 细胞融合:应选择对数生长期的骨髓瘤细胞进行融合;培养液中胎牛血清质量是决定融合和杂交瘤数量的关键因素,可通过克隆化法筛选血清;一只免疫小鼠脾细胞尽可能接种 10 块以上的 96 孔板,80% 以上的杂交瘤生长孔为 1~ 3 个克隆,这样可以减少克隆化次数和工作量,而且阳性克隆也不易丢失。

⑥ 克隆化:加有限稀释的 HAT 悬浮刚刚融合的细胞时,切忌强力吹打,以防止细胞损伤、分离,减低融合。在克隆化的过程中,应逐渐用普通 RPMI-1640 培养液以 1/2 的速度替代 HT 培养液,并递减牛血清的浓度至 10% 左右,可以直接在显微镜下挑取单个克隆进行克隆化。并将生长良好的阳性杂交瘤细胞扩大培养和

冻存。

⑦ 亚克隆化:通过有限稀释,可使每孔含 0.5~ 1 个杂交瘤细胞,有利于亚克隆化选择单一细胞克隆,高浓度(50 个细胞/ml)细胞孔是为了防止操作误差引起的种源细胞丢失。

⑧ 细胞冻存:细胞冻存有条件时,可采用 100% 的牛血清加 DMSO 进行冻存,有利于细胞复苏。冻存细胞也可在- 70℃ 低温冰箱中保存 6~ 12 个月。

四、应用举例

抗卵泡抑素单克隆抗体制备

1. 主要试剂

(1) 融合用 50% PEG, 40℃ 保温。

(2) RPMI-1640 培养液, 15% FCS-RPMI-1640 培养液, 37℃ 预温备用。

(3) 2× HAT 培养液: 15% FCS-RPMI-1640 培养液 96ml + 100× A 储存液 2ml + 100× HT 储存液 2ml, 37℃ 预温备用。

(4) 重组人卵泡抑素(follistatin, rhFS)。

(5) ELISA 检测用试剂等。

2. 骨髓瘤细胞(SP2/0) 对数生长期骨髓瘤细胞,用前 24 小时换液。

3. 实验器材 细胞培养用器材、ELISA 用器材等。

4. 实验流程

(1) 取纯化的重组 FS 5~ 10 μ g 与弗式完全佐剂充分乳化,背部多点免疫法免疫 7~ 8 周龄雌性健康的 BALB/c 小鼠。

(2) 第一次免疫 3 周后,取重组 FS 5~ 10 μ g 与不完全弗式佐剂充分乳化,加强免疫。2 周后再加强免疫 1 次。

(3) 第 3 次免疫 3 天后,在小鼠眶静脉采血,分离血清,采用重组 FS(5 μ g/ml)包被的酶标板,间接 ELISA 测抗血清效价 1: 800。

(4) 无菌分离小鼠脾细胞,取制备的脾单细胞悬液($> 1 \times 10^8$),对数生长期骨髓瘤细胞(SP2) 1×10^7 加入 50ml 离心管中离心,弃培养液,采用 50% PEG 法融合细胞,用 25ml 无血清 RPMI-1640 液离心(800r/min, 5 分钟)洗涤细胞,轻弹 50ml 试管底部,使细胞松散(切忌用吸管使劲吹打)。用 15% FCS-RPMI-1640 培养液调整融合细胞浓度至 1×10^6 /ml,将细胞分加 96 孔培养板(0.1ml/孔), 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养。

(5) 融合细胞培养 4 小时后,每孔再加入 2× HAT 培养液 0.1ml, 37℃, 5% CO₂ 继续培养。

(6) 从细胞融合后的第 3 天开始,每隔 2~ 3 天,采用 1× HAT 培养液换半液

法换液,直至细胞集落约显微镜下 1/2 视野大小,即可更换为 HT 培养液换液。

(7) 融合细胞集落大小约为显微镜下 1/2 视野以上时,尽可能采集培养孔中含单个细胞集落的培养上清,用 $1 \times$ PBS 1: 2~ 1: 4 稀释培养上清,利用包被 rhFS (0.2 μ g/0.1ml)酶标板,用间接 ELISA 法检测分泌上清中抗体水平,无杂交瘤细胞培养上清作阴性对照。

(8) 用毛细管在显微镜下直接回收抗体阳性孔杂交瘤细胞,经有限稀释后,接种于前一天已经铺好饲养细胞的 96 孔培养板,每孔约 0.4~ 4 个细胞,每个细胞克隆培养 24 孔。

(9) 克隆化后每 3~ 4 天换液 1 次,第 2 次换液起改用 10% FCS-RPMI-1640 培养液。

(10) 杂交瘤细胞经二次亚克隆化后扩大培养,回收细胞,经无血清 RPMI-1640 培养液离心洗涤两次,采用 Hank's 液调细胞浓度至 $(1 \sim 2) \times 10^6/\text{ml}$,每只经高压灭菌液状石蜡腹腔预处理的小鼠腹腔内注射细胞 0.5~ 1ml,约 10 天后采集腹水,经 50% 饱和硫酸铵溶液沉淀,用 A 蛋白亲和层析柱纯化,即可获得抗 FS IgG 型单克隆抗体,用间接 ELISA 法测定单克隆抗体效价,浓度为 1mg/ml 的单克隆抗体效价 $> 1: 800$ 。

(曹雅明 柳忠辉)

第三章

酶免疫测定技术

酶免疫测定技术(EIA)是将抗原抗体反应的特异性与酶的催化放大作用相结合的一种微量分析技术。该方法利用酶与其底物作用,促进显色剂发色,并通过肉眼或仪器测定显色结果,进而达到定量或半定量分析目的。EIA中所用的酶类既不能影响抗原或抗体免疫反应的特异性,也不能改变酶自身的活性,通常应用辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AP)。

酶免疫测定技术根据测定过程中是否需要将结合的酶标记物与游离的酶标记物分离而分为非均相和均相两类。前者需分离游离型和结合型酶标记物,且常应用固相载体以利于抗原-抗体结合物与游离物的分离,主要形式为ELISA;后者在测定过程中不需将游离型和结合型酶标记物分离,直接应用酶作用底物的信号放大效应,也称酶放大免疫测定法(EMIT)。EMIT通过抗原抗体结合反应使标记抗体的示踪物活性发生改变,待抗原-抗体结合与酶-底物反应平衡后,即可直接测定反应结果,整个过程在均一的液相中进行。酶免疫测定技术可用于激素、药物等半抗原的检测,也能测定大分子蛋白质、病毒及细胞性抗原成分。由于ELISA检测法技术简便、特异性好,因此,在实验室中更为广泛使用,本章仅介绍酶联免疫吸附试验。

一、实验原理

酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是应用酶标记的抗体(或抗原)在固相支持物表面检测未知抗原(或抗体)的方法。酶与抗体(或抗原)交联后,再与结合在固相支持物表面的相应抗原或抗体反应,形成酶标记抗

体-抗原复合物,此时加入酶底物和显色剂,在酶催化底物液体后呈现显色反应,液体显色的强弱和酶标记抗体-抗原复合物的量呈正比,借此反映出待检测的抗原或抗体量。ELISA 检测通常分为直接法、间接法、双位点法和竞争法(图 3-1)。

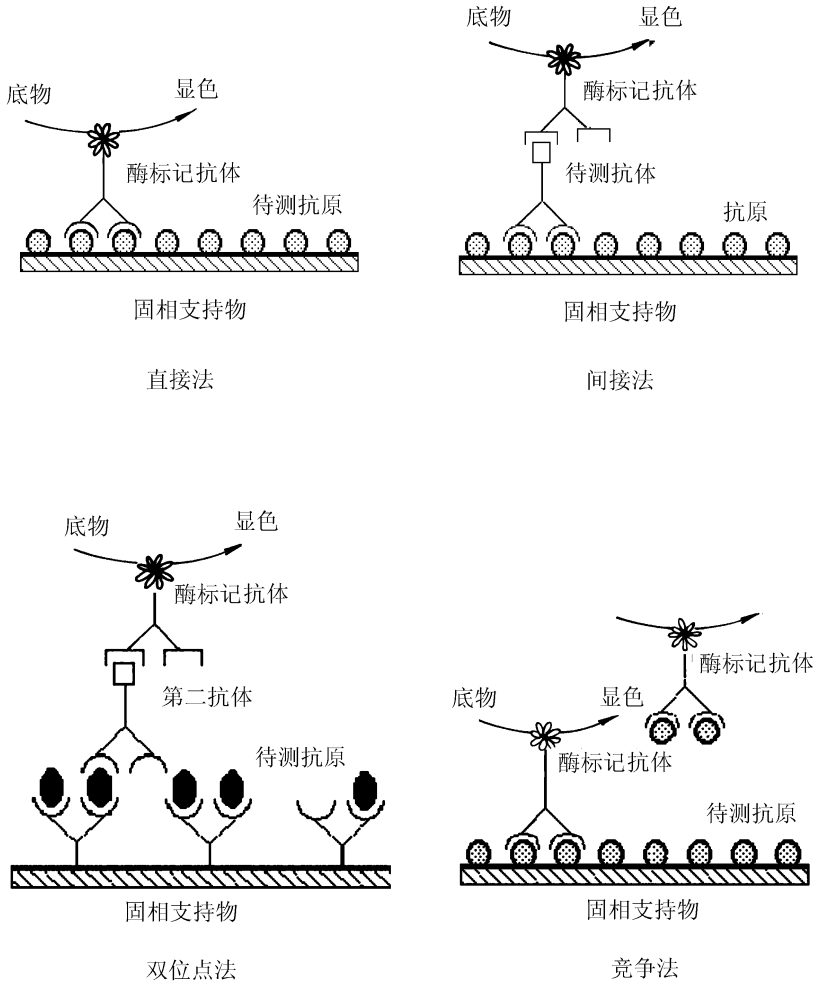


图 3-1 ELISA 检测示意图

直接 ELISA 的基本原理是利用待测抗原吸附在固相支持物表面,直接加入酶标记抗体,利用酶催化底物液体显色的强弱反映抗原的浓度。

间接 ELISA 的基本原理是将定量的可溶性抗原吸附在固相支持物表面,使待测抗体与之反应,再加入酶标抗体,显色的程度与待测抗体浓度呈正比。

双位点法的基本原理是将待测抗原夹在针对抗原不同决定簇的两种抗体之间,并加入酶标抗体,利用显色的程度反映待测抗原的量。其基本过程为:将已知的定量单克隆抗体包被固相支持物,加入待测抗原,并在其上加入另一已知抗体后,再加入酶标抗体,酶显色的程度与待测抗原的量呈正比。

竞争法通常是将已知定量的抗原吸附在固相支持物表面,同时加入可溶性抗原和定量的特异性抗体,可溶性抗原与吸附在固相上的抗原竞争结合抗体,因此,加入酶的显色程度与待测抗原浓度呈反比。

ELISA 法主要用于体液中可溶性抗原或抗体的测定。双位点法适用于测定大分子抗原;间接法适用于对各种抗体的检测;竞争法则适用于测定小分子抗原或半抗原及抗体。①

二、试剂与材料

1. 包被稀释液(0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6) Na_2CO_3 1.5g + NaHCO_3 2.9g 溶于双蒸水至 1 000ml。

2. 封闭液(5%脱脂乳-PBS 溶液, pH7.4) 50g 脱脂乳 + 0.02mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS) 至 1 000ml。②

3. 洗涤液(PBST, pH7.4) NaCl 16g + 0.2mol/L Na_2HPO_4 81ml + 0.2mol/L NaH_2PO_4 溶液 19ml + 吐温 20 1ml,加双蒸水至 2 000ml。

4. 样本稀释液(PBS, pH 7.4) NaCl 16g + 0.2mol/L Na_2HPO_4 溶液 81ml + 0.2mol/L NaH_2PO_4 溶液 19ml,加双蒸水至 2 000ml。③

5. 底物缓冲液 A 液(0.1mol/L 枸橼酸溶液),枸橼酸 19.2g 加双蒸水至 1 000ml; B 液(0.2mol/L Na_2HPO_4 溶液), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7g 加双蒸水 1 000ml;临用前取 A 液 24.3ml、B 液 25.7ml 混合。

6. 终止液(2mol/L H_2SO_4 溶液) 600ml 双蒸水中,缓慢滴加浓硫酸 100ml,并不断搅拌,双蒸水补足至 900ml。

7. 酶标反应板、微量加样器、温箱等。

8. 待测抗原或抗体样品。

9. HRP 标记羊抗兔 IgG 第二抗体(HRP-Ab₂)。

10. 酶联免疫测定仪。

三、基本流程

1. 间接法

(1) 抗原包被:将包被液稀释的抗原 BSA (2~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)加入 96 孔酶标板中,每孔 100 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。吸出上清液,加入封闭液 200 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1~ 1.5 小时或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。封闭结束后用洗涤液洗板 3 次,每次 3 分钟。④

(2) 加入待测样品:将稀释的待测兔抗 BSA 抗体(1: 400, 1: 800, …… , 1: 12 800)样品加入酶标反应孔中,100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 1.5 小时。弃去