

免疫学实验-多克隆抗体的制备

吉林大学生命科学学院 生物实验教学示范中心

王飞 fei@jlu.edu.cn

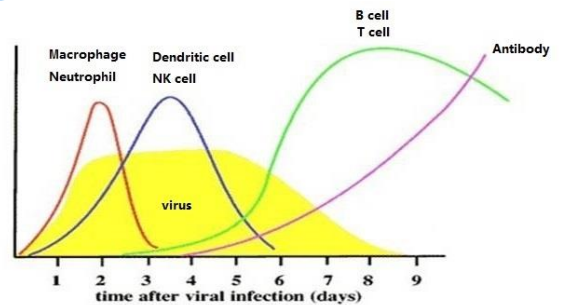
内容提要

- 1 抗体的产生及免疫功能
- 2 抗体的临床及科研应用
- 3 抗体制备原理
- 4 ELISA法测定抗体效价
- 5 实验项目简介

免疫系统概述

- ❖ Immune system: protect against disease
- ❖ Major target: detect and distinguish pathogens (virus, bacteria, fungi, parasite, others)
- ❖ **Innate/固有** immune system: nonspecific rapid (leukocyte, NK cell, complement)
scavenge recruit activate
- ❖ **Adaptive/适应性** immune system: specific slow (lymphocyte, antibody)
recognize tag memory

免疫反应时间线



概念

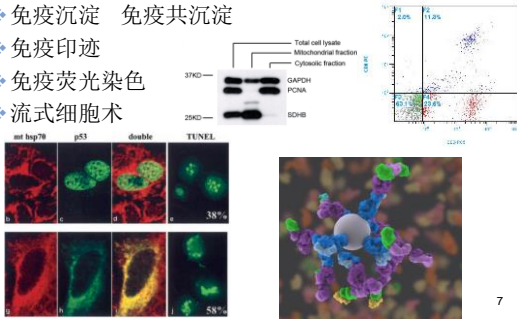
- ❖ **抗原(antigen)**: 能刺激机体免疫系统产生抗体和/或致敏淋巴细胞, 并能与相应抗体或致敏淋巴细胞在体内外发生特异性结合而出现反应的物质。
- ❖ **抗体(antibody)**: 机体的免疫系统在抗原刺激下, 由B淋巴细胞增殖分化形成的浆细胞所产生的, 可与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白。主要分布在血清中, 也分布于组织液及外分泌液中。

抗体的产生及功能

- ❖ 抗体的产生:
B细胞被激活后分化为浆细胞并分泌抗体。
- ❖ 抗体的免疫学功能:
识别病原菌表面抗原
阻止病原菌侵袭体细胞
介导特异性免疫攻击

抗体的科研应用

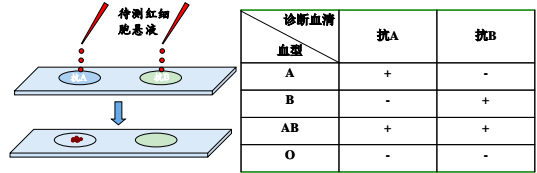
- ❖ 免疫沉淀 免疫共沉淀
- ❖ 免疫印迹
- ❖ 免疫荧光染色
- ❖ 流式细胞术



7

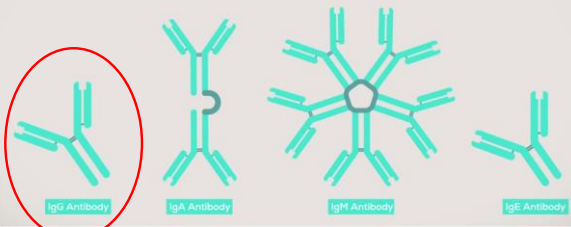
抗体的临床应用

- ❖ 检测待测抗原
妊娠检测 血型鉴定 病原菌鉴定 ELISA
- ❖ 癌症靶向治疗
直接激活NK细胞 挂载药物



抗体制备的目标

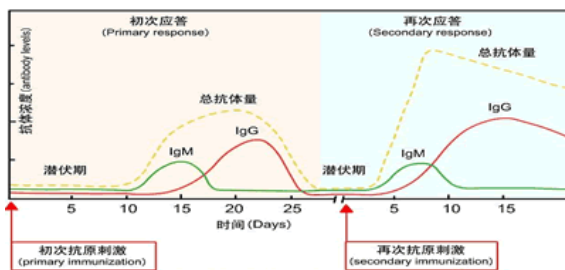
ANTIBODY CLASSES



抗体制备原理

- ❖ 首次免疫：B细胞活化为浆细胞和记忆B细胞，浆细胞分泌抗体，IgG含量不高。首免响应速度慢，延迟期6-10天。
- ❖ 再次免疫：2-4次，激活体液中驻留的记忆B细胞，分化为浆细胞并分泌抗体，IgG含量高。再免响应速度快，延迟期短。
- ❖ 免疫间隔：首免与二免间隔10天以上，确保记忆B细胞产生。再免间隔不固定，一般是7天。
- ❖ 抗体制备的收集对象：
再免激活的浆细胞（单抗制备）
再免产生的抗体（多抗制备）

抗体制备原理

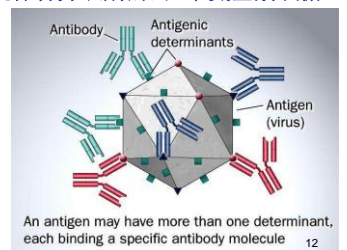


初次及再次免疫应答抗体产生的一般规律

11

抗体制备的产物类型

- ❖ 抗原决定簇 (epitope / antigenic determinant) : 抗原表面能够被抗体特异识别的约6个氨基酸或糖基组成的结构域。

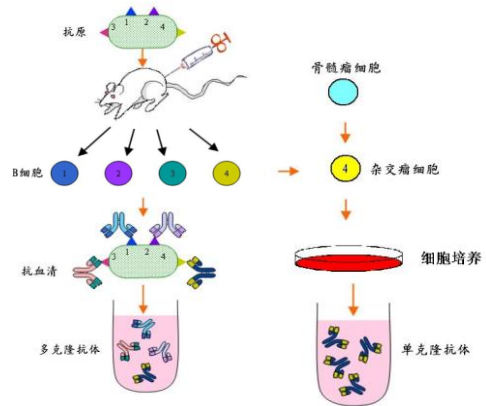


An antigen may have more than one determinant, each binding a specific antibody molecule

12

抗体制备的产物类型

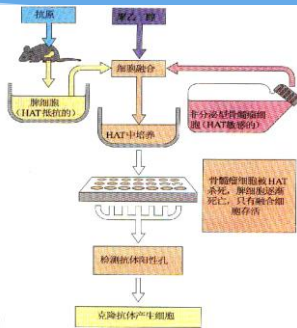
- ❖ **单克隆抗体 (monoclonal antibody)**：由一种浆细胞产生的，只识别一种抗原决定簇的抗体。
- ❖ **多克隆抗体 (polyclonal antibody)**：由多种浆细胞产生的，识别同一抗原的多个抗原决定簇的多种抗体的集合。



13

杂交瘤细胞融合技术

- ❖ B细胞：能分泌抗体，无法增殖。
- ❖ 骨髓瘤细胞：能永久传代
- ❖ 杂交瘤细胞：能分泌抗体能永久传代。
- ❖ 聚乙二醇 (PEG) 融合剂
- ❖ HAT筛选 (第一次筛选)
- ❖ 抗原筛选 (第二次筛选)



HAT选择

- ❖ DNA合成途径：主要途径，替代途径
- ❖ HAT培养基：抑制主要途径
- ❖ B细胞：具备替代途径，无法增殖，自然死亡。
- ❖ 骨髓瘤细胞：替代途径缺失，无法生长。
- ❖ 杂交瘤细胞：DNA替代途径正常，具备增殖能力，稳定传代。

免疫佐剂

- ❖ 佐剂 (adjuvant)：一类非特异性免疫增强剂，先于抗原或与抗原一起注入机体，可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。
- ❖ 作用原理：增加滞留时间、增强机体免疫敏感性
- ❖ 佐剂种类很多，见百度。

弗氏佐剂 (Freund's adjuvant)

- ❖ 抗体制备时常用的佐剂
- ❖ 弗氏不完全佐剂
羊毛脂+液体石蜡
- ❖ 弗氏完全佐剂
羊毛脂+液体石蜡+卡介苗
- ❖ 首次免疫用完全佐剂，再次免疫用不完全佐剂。
- ❖ 羊毛脂、液体石蜡：油包水乳液，增加滞留时间。
- ❖ 卡介苗：增强免疫系统敏感性。提升抗原递呈能力。

多克隆抗体的分离与纯化

- ❖ 抗血清的制备：
取血，离心
- ❖ 亲和层析纯化：
ProteinA/G（中性亲和，酸性解离），所有抗体。
抗原亲和纯化，特异抗体。

单克隆抗体分离与纯化

- ❖ 杂交瘤细胞体内培养：取腹水
- ❖ 杂交瘤细胞体外培养：收集培养基上清
- ❖ 亲和层析纯化：
ProteinA/G（中性亲和，酸性解离），所有抗体。
抗原亲和纯化，特异抗体。

JLU

酶联免疫吸附测定

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

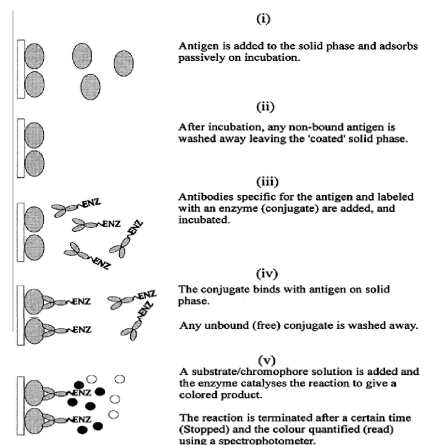
酶联免疫吸附实验

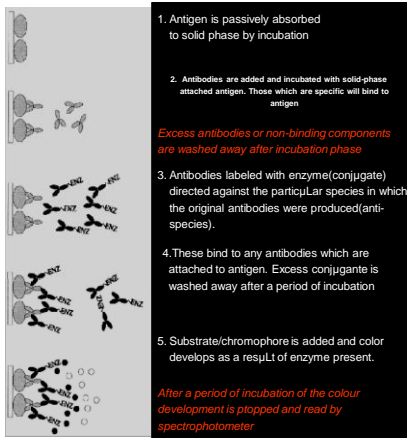
- ❖ 原理：在固相载体上包被抗原，用相应的抗体与之识别，形成锚定在固相载体上的抗原-抗体复合物。复合物内暴露在最外端的抗体为酶标抗体，在加入相应底物后可以催化底物的生色反应，进而通过分光光度计的度数来判断复合物的生成量。

ELISA分类

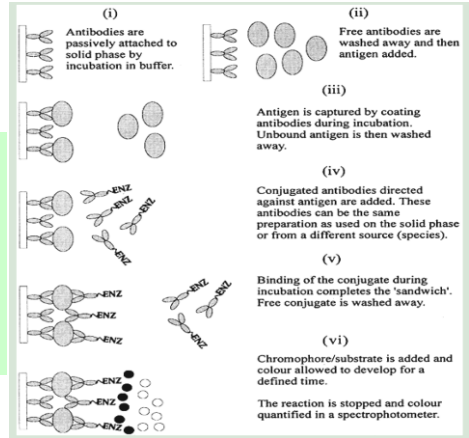
- ❖ 直接法
- ❖ 间接法
- ❖ 双抗夹心法

直接法





间接法

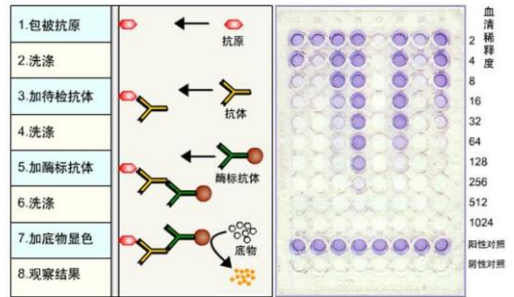


双抗夹心法

间接法ELISA测定抗体效价

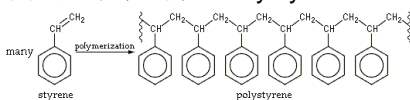
- ❖ 抗体效价：抗体样本与特定抗原间亲和能力的直接评价指标。
- ❖ 抗体效价由两方面因素决定：
有效抗体的数量
抗体与抗原表面决定簇间的亲和能力
- ❖ 间接法ELISA是目前测定抗体效价最常用的技术

间接法ELISA测抗体效价流程



固相载体-包被

- ❖ ELISA中可用的固相载体的材料有很多，最常用的是聚苯乙烯 (Polystyrene)



- ❖ 非特异物理吸附：疏水相互作用
- ❖ 包被缓冲液：PH9.6 >PI 负电表面抑制蛋白间相互作用

封闭 洗涤

- ❖ 封闭：非特异蛋白封闭未被抗原覆盖的固相载体表面。牛奶 BSA
- ❖ 洗涤：去除非特异识别的抗体，降低背景。温和表面活性剂：Tween-20

催化生色反应的酶

- ❖ 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)
 $DH_2 + H_2O_2 \rightarrow D + H_2O$
 DH_2 为供氢体, H_2O_2 为受氢体
- ❖ 常用供氢体:
 邻苯二胺(OPD) 490nm吸收峰
 四甲基联苯胺(TMB)
 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐
 (ABTS)
- ❖ 酸性条件反应终止

效价判定

- ❖ 抗体效价:

- 二倍于阴性对照OD值所对应的抗体稀释度

稀释度 (倍)	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	阴性 对照
OD值	0.4	0.3 5	0.3	0.25	0.2	0.15	0.11	0.08

抗体效价: 64000-128000
 受限于实验条件, 不做线性回归, 不计算准确效价。

实验项目简介-内容

- ❖ 制备鸡卵清白蛋白(OVA)的鼠源多克隆抗体
- ❖ 酶联免疫标记技术(ELISA)检测多克隆抗体的效价

实验项目简介-流程

- ❖ 首次免疫 Day 0
 - ❖ 二次免疫 Day 14
 - ❖ 三次免疫 Day 21
 - ❖ 取血制备血清
 - ❖ 梯度稀释血清
 - ❖ ELISA法测效价
- } Day 28
- ❖ 具体操作信息见《课前讲解》ppt

JLU

免疫小鼠

课前讲解

材料及分组情况

- ❖ 小鼠 每组3只
- ❖ 注射器 每组3只
- ❖ 乳胶手套 每人1付(用于三次注射)
- ❖ 线手套 每组1付
- ❖ 记号笔、手术剪刀 公用
- ❖ 有佐剂注射液 公用
- 200ug/ml OVA in 弗氏佐剂
- ❖ 无佐剂注射液 公用
- 200ug/ml OVA in 生理盐水
- ❖ 生理盐水(对照) 公用

免疫程序

时间	组别	有佐剂组	无佐剂对照组	阴性对照组
Day 0 皮下注射		40ugOVA 弗氏完全佐剂	40ugOVA	生理盐水
Day 14 皮下注射		40ugOVA 弗氏不完全佐剂	40ugOVA	生理盐水
Day 21 腹腔注射		40ugOVA 弗氏不完全佐剂	40ugOVA	生理盐水
Day 28		取血	取血	取血

分组情况



颈部皮下注射要点

- ❖ 拇指与食指捏起颈部皮肤
- ❖ 水平进针，针头脱空感，缓慢注射，迅速拔出



腹腔注射要点

- ❖ 抓住颈部皮肤和鼠尾，将小鼠翻转，头部偏下
- ❖ 45度进针，靠近腹部中线，进针1cm针头脱空感，缓慢注射，迅速拔出



注意事项

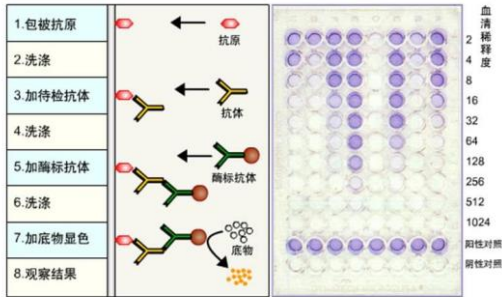
- ❖ 戴手套操作
- ❖ 注射器针头用后及时盖帽
- ❖ 文字记录标记方法
- ❖ 经常检查标记保存状况

JLU

ELISA法检测抗体效价

课前讲解

间接法ELISA测抗体效价流程



材料及试剂成分

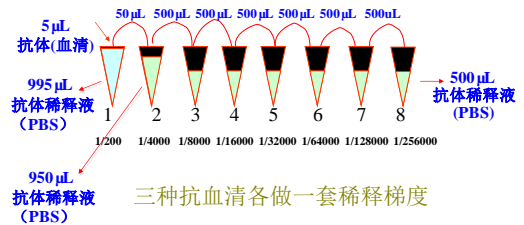
- ❖ 96孔ELISA板、移液器、镊子、离心管
- ❖ 抗原包被液：50ug/ml OVA in 0.05M碳酸盐缓冲液，pH9.6
- ❖ 封闭液：5%脱脂奶粉 in PBS pH7.4
- ❖ 抗体稀释液：PBS pH7.4
- ❖ 二抗：HRP标记羊抗鼠抗体，1:5000 稀释
- ❖ 洗涤液(PBST)：0.1%Tween-20 in PBS pH7.4
- ❖ 显色液：0.04%OPD、0.15%H₂O₂ in 柠檬酸-磷酸缓冲液 pH5.0
- ❖ 终止液：2M硫酸

取血

- ❖ 摘取小鼠眼球，用1.5ml EP管接血。
- ❖ 4000rpm，离心5分钟，吸取上清（血清）待用。
- ❖ 拉颈处死小鼠。



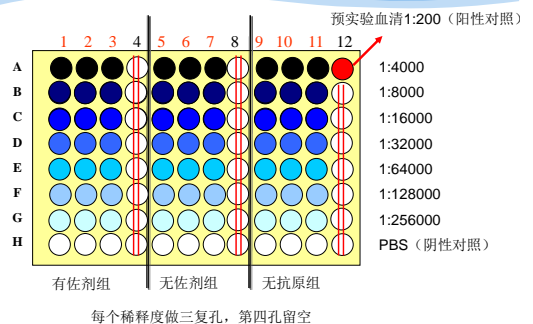
抗血清梯度稀释



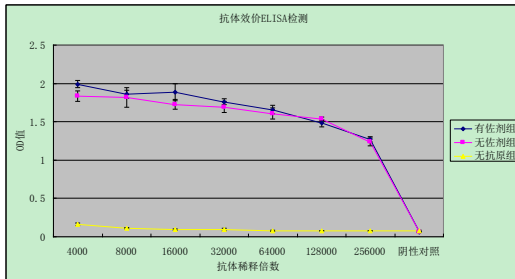
ELISA步骤

- ❖ 包被: OVA抗原(50ug/ml) 100μL/孔, 4 °C 过夜。(已完成)
- ❖ 封闭: 弃上清, 加入封闭液 150μL/孔, 37°C, 30min.
- ❖ 洗涤: 弃封闭液, 加洗液200ul/孔, 弃上清, 洗一次.
- ❖ 一抗: 弃上清, 加入不同稀释度的待测血清抗体100μL/孔 37°C, 30min. **黄**
- ❖ 洗涤: 弃一抗, 加洗液200ul/孔, 弃上清, 洗三次.
- ❖ 酶标抗体: 加入HRP标二抗100 μL/孔 37°C 30min. **黄**
- ❖ 洗涤: 弃二抗, 加洗液200ul/孔, 弃上清, 洗三次.
- ❖ 显色: 加入底物100 μL/孔, 避光约15min (观察颜色) **黄**
- ❖ 加终止液: 加2M硫酸 50 μL/孔. 加入顺序及速度与显色液一致. **黄**
- ❖ 测量: 酶标仪测定OD 490nm值.

加板方法



数据统计方法（课上演示）



注意事项

- ❖ EP管做好标记
- ❖ 离心配平
- ❖ 移液器操作：缓吸缓吐，用后恢复到最大量程
- ❖ 加板：枪尖对准孔壁
- ❖ 禁止磕板
- ❖ 弃上清：用力倒扣，甩掉残留液体，避免孔间污染

JLU

Thank You !