



多克隆抗体技术

(Polyclone antibodies preparation technique)

一、概述

(一) 多克隆抗体的概念

抗原刺激机体，产生免疫学反应，由机体的浆细胞合成并分泌的与抗原具有特异性结合能力的一组球蛋白，这就是免疫球蛋白，这种与抗原具有特异性结合能力的免疫球蛋白就是抗体。

抗原通常是由多个抗原决定簇组成的，由一种抗原决定簇刺激机体，由一个 B 淋巴细胞接受该抗原所产生的抗体称之为单克隆抗体 (Monoclonal antibody)。由多种抗原决定簇刺激机体，相应地就产生各种各样的单克隆抗体，这些单克隆抗体混杂在一起就是多克隆抗体，机体内所产生的抗体就是多克隆抗体；除了抗原决定簇的多样性以外，同样一类抗原决定簇，也可刺激机体产生 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD 等五类抗体。

(二) 免疫动物

供免疫用的动物主要是哺乳动物和禽类，常选择家兔、绵羊、山羊、马、骡和豚鼠及小鼠等。动物的选择常根据抗体的用途和量来决定，也与抗原的性质有关。如要获得大量的抗体，多采用大动物；如要是获得直接标记诊断的抗体，则直接采用本动物；如要获得间接的标记诊断用抗体，则必须用异源动物制备抗体；如果难以获得的抗原，且抗体的需要量少，则可以采用纯系小鼠制备；一般实验室采用的抗体，多用兔和羊制备。

免疫用的动物最好选择适龄的健康雄性动物，雌性动物特别是妊娠动物用于制备免疫抗体则非常不合适，有时甚至不产生抗体。由于对免疫应答的个别差异，免疫时应同时选用数只动物进行免疫。

抗原是多种多样的，而且千差万别。就其化学成分而言，有蛋白质抗原、类脂抗原、多糖类抗原和核酸抗原等。就抗原性而言，有完全抗原和不完全抗原。为了获得较好的抗血清，最好是选用蛋白质抗原，如要制备用于筛选细菌表达的 cDNA 文库或免疫印迹的抗血清，最好选用可降解的蛋白质抗原。不同的抗原，其免疫原性的强弱均不相同，这种免疫原性的强弱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。

抗原的免疫剂量是依照给予动物的种类、免疫周期以及所要求的抗体特性等不同而不同。剂量过低，不能引起足够强的免疫刺激，免疫剂量过多，有可能引起免疫耐受。在一定的范围内，抗体的效价是随注射剂量的增加而增高。蛋白质抗原的免疫剂量比多糖类抗原宽。一般而言，小鼠的首次免疫剂量为 $50 \mu\text{g} \sim 400 \mu\text{g}$ /次，大鼠为 $100 \mu\text{g} \sim 1000 \mu\text{g}$ /次，兔为 $200 \mu\text{g} \sim 1000 \mu\text{g}$ /



次。加强计量为首次剂量的 $1/5 \sim 2/5$ 。

免疫剂量与注射途径有关，一般而言，静脉注射剂量大于皮下注射，而皮下注射又比掌内和跖内皮下注射剂量大，也可采用淋巴结内注射法。加佐剂比不加佐剂的注射剂量要小，对家兔而言，采用弗氏完全佐剂，则需注射 $0.5\text{mg} \sim 1\text{mg}/\text{kg}$ /次，如采用弗氏不完全佐剂则注射剂量应大 10 倍以上。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。如需要获得高效价的抗血清，宜采用大剂量长程免疫法。免疫周期长者，可少量多次。免疫周期短者，应大量少次。

两次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。一般间隔时间应为 $5 \sim 7$ 天，加佐剂者应为 2 周左右。

注射的 Ig 纯度高，则一般不易引起过敏反应，如注射血清，即使是少量，在再次免疫时，极易引起过敏反应，所以一定要采取措施。

（三）佐剂的应用

对可溶性抗原而言，为了增强其免疫原性或改变免疫反应的类型、节约抗原等目的，常采用加佐剂的方法以刺激机体产生较强的免疫应答。

1. 佐剂的类型 目前实践中常应用的佐剂有氢氧化铝胶、明矾、弗氏佐剂、脂质体和石蜡油等。也有采用结合杆菌等分枝杆菌、白喉杆菌以及细小棒状杆菌等。

(1) 弗氏不完全佐剂 (incomplete Freund's adjuvant, IFA)

羊毛脂	1 份
石蜡油	5 份

混合，高压灭菌后保存。用时加热融化，冷却至 50°C 左右，加抗原进行乳化处理。

(2) 弗氏完全佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA)

弗氏不完全佐剂	10ml
卡介苗	$10\text{mg} \sim 200\text{mg}$

卡介苗可 100°C 10min 灭活处理。

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，一般不用完全佐剂，而采用弗氏不完全佐剂。但在研究分枝杆菌及相关抗原时，一般不用弗氏完全佐剂，以免卡介苗的干扰。

(3) 脂质体：是人工制备的类脂质的小球体，由一个或多个酷似细胞膜的类脂双分子层组成，这种结构使其能够携带各种亲水的、疏水的和两性物质，他们被包裹在脂质体内部的水相中，或插入类脂双分子层或吸附、联接在脂质体的表面，起到明显的免疫增强作用。

(4) 油佐剂：采用植物油和矿物油均可，包括豆油、花生油、油菜油等。目前应用最广的矿物油。

10 号白油(石蜡油)	100ml
-------------	-------

硬脂酸铝	2g
司本 80	6ml

混合加热融化，分装。用时按下列配方进行乳化。

油相	3 份
水相（加 4%吐温-80）	1 份

先把油相搅拌起来，然后缓慢加入水相乳化。司本是油分散剂，吐温是水分散剂，均有利于乳化。

2. 乳化 将抗原与佐剂混合的过程称为乳化。乳化的方法很多，可采用研钵乳化；可直接在旋涡振荡器上乳化；可用组织捣碎器乳化。少量时，特别是弗氏佐剂与抗原乳化时，常采用注射器乳化，用两个注射器，一个吸入抗原液，一个吸入佐剂，两注射器头以胶管连接，注意一定扎紧，然后来回抽吸。当大量乳化时，可采用胶体磨进行。

乳化好的标志是取一滴乳化剂滴入水中呈现球形而不分散。如出现平展扩散即为未乳化好。乳化过的物质放置一段时间（在保存期内）出现油水分层也是未乳化好的表现。

根据抗原的性质、免疫原性和动物的免疫反应性来决定免疫途径、免疫次数和间隔时间等。

免疫途径包括皮下注射、皮内注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射以及淋巴结内注射等。抗原量少，则一般多采用加佐剂，淋巴结内或淋巴结周围、或足掌、或皮内、皮下多点注射，如抗原量多，则可采用皮下、肌肉、以至静脉注射。

注射间隔时间 带佐剂的皮内、皮下注射，一般为间隔 2~4 周免疫一次。不带佐剂的皮下或肌肉注射，一般为 1~2 周间隔时间；肌肉或静脉免疫的，可 5 天左右的间隔时间。

可以把各种注射途径联合起来应用，最终以达到效价要求为目的。

（四）抗体的鉴定

1. 抗体的效价鉴定 不管是用于诊断还是用于治疗，制备抗体的目的都是要求较高效价。不同的抗原制备的抗体，要求的效价不一。鉴定效价的方法很多，包括有试管凝集反应、琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验等。常用的抗原所制备的抗体一般都有约定的鉴定效价的方法，以资比较。如制备抗抗体的效价，一般就采用琼脂扩散试验来鉴定。

2. 抗体的特异性鉴定 抗体的特异性是指与相应抗原或近似抗原物质的识别能力。抗体的特异性高，它的识别能力就强。衡量特异性通常以交叉反应率来表示。交叉反应率可用竞争抑制试验测定。以不同浓度抗原和近似抗原分别做竞争抑制曲线，计算各自的结合率，求出各自在 IC₅₀ 时的浓度，并按下列公式计算交叉反应率。

$$\text{交叉反应率} = \frac{\text{IC}_{50} \text{时抗原浓度 (Y)}}{\text{IC}_{50} \text{近似抗原物质的浓度 (Z)}} \times 100\%$$

如果所用抗原浓度 IC₅₀ 浓度为 pg/管，而一些近似抗原物质的 IC₅₀ 浓度几乎是无穷大时，表示

这一抗血清与其他抗原物质的交叉反应率近似为 0，即该血清的特异性较好。

3. 抗体的亲和力 是指抗体和抗原结合的牢固程度。亲和力的高低是由抗原分子的大小、抗体分子的结合位点与抗原决定簇之间立体构型的合适度决定的。有助于维持抗原抗体复合物稳定的分子间力有氢键、疏水键、侧链相反电荷基因的库仑力、范德华力和空间斥力。亲和力常以亲和常数 K 表示， K 的单位是 L/mol ，通常 K 的范围在 $10^8\sim 10^{10}/mol$ ，也有多达 $10^{14}/mol$ 。抗体亲和力的测定对抗体的筛选，确定抗体的用途，验证抗体的均一性等均有重要意义。

（五）抗血清的冻存

抗血清收获后，加 1/万硫柳汞或 1/万的叠氮钠防腐，或加入等量的中性甘油，分装小瓶，置 $-20^{\circ}C$ 以下的低温保存，数月至数年内抗体效价无明显变化。注意避免反复冻融。也可将抗血清冷冻干燥后保存。

二、抗 Ig 抗体的制备

（一）抗原制备

Ig 是免疫球蛋白，对异种动物而言，是良好的抗原物质。可以刺激异种动物产生抗 Ig 血清，经适当提取后，产生抗 Ig 抗体，又叫第二抗体或抗抗体。在多数的间接标记反应中，均需制备抗 Ig 抗体。

（二）材料与试剂

1. 提取的动物 Ig
2. 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂
3. 青霉素和链霉素
4. 实验动物 兔
5. 其它材料及试剂

（三）操作方法

1. 免疫方法 可以采用以下各种方法之一进行免疫。

（1）淋巴结注射法：①在兔的两后足跖部皮下（或皮内）注射活卡介苗 50mg（每侧约 0.30ml）。7~10 天后，兔跖及膈肌淋巴结肿大；②于肿大的两侧淋巴结内各注射加有完全佐剂的 IgG 乳化抗原 0.50ml（含 IgG 5mg/ml、青霉素 1 000U/ml、链霉素 1 000 μ g/ml）；③必要时，14 天后，重复步骤②一次；④再过 7 天后，于两侧淋巴结内各注射加有完全佐剂的 IgG 乳化抗原 0.50ml（含 IgG 5mg/ml、青霉素 1 000U/ml、链霉素 1 000 μ g/ml）；⑤5~7 天后，耳静脉采血。测定血清效价。

（2）皮下多点注射法：①家兔两侧掌（跖内各注射含有完全佐剂抗原 0.10ml（IgG 含量 5mg/ml）；②7~10 天后，脊柱两侧多点（颈、胸、腰椎各两点、共 6 点）皮下注射含不完全佐剂

的抗原，每点 0.50ml；③7~10 天后，脊柱两侧重复注射一次；④7~10 天后试血。不合格者重复步骤③。

(3) 多途径联合注射法：①两侧掌（跖）内侧皮下注射含完全佐剂抗原 0.50ml（IgG 量为 5mg/ml）；②14 天后，多点皮下注射含有不完全佐剂抗原；③7 天后，耳静脉注射不含佐剂的抗原 2ml；④测定血清抗体效价，不合格者重复步骤③，并适当递增 IgG 量。

2. 效价测定 采用琼脂扩散法。

(1) 将血清倍比稀释，加入外周孔。

(2) 中间孔加动物 Ig。

(3) 37℃湿盒琼扩 24 小时，观察结果。

(四) 结果判定

1. 抗 Ig 的效价测定 琼脂扩散效价达 1 : 16 或 1 : 32 者为合格。

2. 纯度鉴定 采用琼扩法。中间孔加抗 Ig 血清，外周孔加 Ig 和标准品 Ig。在抗 Ig 与 Ig 以及标准品 Ig 均出现一条沉淀线，且这两条沉淀线相互融合者，说明提取的 Ig 是纯的。

三、猪瘟、猪丹毒、猪肺疫三联血清的制备

(一) 材料及试剂

1. 猪瘟疫苗
2. 猪丹毒菌苗
3. 猪肺疫疫苗
4. 肥猪

(二) 操作方法

1. 基础免疫 选健康的育肥猪数头，进行猪瘟、猪丹毒和猪肺疫三种疫苗的基础免疫。猪瘟疫苗采取肌肉注射法，猪丹毒和猪肺疫采用口服法进行。

2. 加强免疫 基础免疫后 7~10 天，进行加强免疫。猪瘟疫苗、猪丹毒和猪肺疫菌苗分别为 200 头份、100 头份和 100 头份，肌肉或皮下注射。

3. 7 天后，进行第二次强化注射，剂量同前。

4. 10~12 天后，无菌放血和收集血液。放血前一天晚上停食，可饮水。

5. 血液自然凝固、分离血清。按 0.3%加石炭酸，无菌分装，冰箱内保存。

(三) 结果判定

1. 物理性状检查 血清清亮、透明，呈草黄色或金黄色。

2. 无菌检查 采血清样进行普通肉汤、琼脂斜面、肝片肉汤，观察 3~7 天，应无菌生长。

3. 安全检查 取血清样 0.50ml，皮下注射小白鼠，一次注射 3~5 只，观察 7 天，小白鼠应

健康存活。

4. 效力检查 猪丹毒和猪肺疫的小白鼠攻毒试验，保护率应为 100%。

四、鸡新城疫和鸡传染性法氏囊炎二联高免卵黄抗体的制备

（一）材料与试剂

1. 新城疫灭活油佐剂苗
2. 患传染性法氏囊炎的法氏囊组织
3. 传染性法氏囊炎弱毒苗
4. 健康产卵鸡群
5. 新城疫血凝抗原
6. 传染性法氏囊炎琼扩抗原
7. 其它

（二）操作方法

1. 传染性法氏囊炎组织灭活苗的制备 将有病变的法氏囊组织称重，以组织捣碎器捣成匀浆，按 1：5（重量：体积）加灭菌生理盐水，继续捣匀，然后用 5 层灭菌纱布过滤，加入 0.30% 的甲醛，混匀，37℃ 感作 24h，中间振荡数次。灭活后，以常规培养基进行杂菌检查，以小白鼠进行安全检查，合格后，置阴凉处备用。

2. 传染性法氏囊炎灭活油佐剂组织苗的制备 将 10 号白油按 2% 加硬脂酸铝粉和 6% 的司本—80 混合加热融化后，分装保存。灭活组织液以 4% 比例加入吐温 80，以油相：水相=3：1 的剂量制成灭活油佐剂组织苗。先将油相搅拌起来，逐渐加入水相，充分搅拌即可。

3. 选取健康无主要传染病，特别是无鸡白痢、沙门氏菌病的高产鸡群。

4. 将鸡新城疫灭活油佐剂苗与传染性法氏囊炎灭活油佐剂组织苗等量混合，给每只鸡皮下注射 2ml。

5. 14 天后，从鸡翅静脉采血，采集血清做鸡新城疫血凝抑制试验和传染性法氏囊琼脂扩散试验。血凝抑制价平均达到 1：2084，琼扩效价达到 1：16 以上，即为合格。如不合格，可继续重复步骤 4。

6. 效价合格，收获鸡蛋。

7. 将鸡蛋水洗后，浸入 0.50% 石炭酸水中消毒半小时，捞出后，置无菌室紫外线照射 20min。无菌操作去蛋皮，收取卵黄，按 1：1 加入灭菌的含 1% 石炭酸生理盐水，搅拌，以两层纱布过滤，滤液即为鸡新城疫和传染性法氏囊炎二联高免卵黄抗体。

8. 4℃~8℃ 保存备用。

（三）结果判定

1. 物理性状 呈均一的橙黄色带胶状的液体，放置一定时间，下沉多量的黄白色絮状沉淀，摇匀后，仍呈均一黄色或淡白色液体。
2. 效价 新城疫血凝抑制价应大于 1024^{\times} ，传染性法氏囊炎琼扩效价应大于 8^{\times} 。
3. 安全检查 取 3ml~5ml 卵黄液一次皮下注射小白鼠或雏鸡，无任何影响。
4. 杂菌检查 应无菌生长。
5. 效力检查 对典型的新城疫病鸡和传染性法氏囊炎病鸡，肌肉或皮下注射 1ml，3 天内应有 80% 以上明显好转或痊愈。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：5446 0832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

