

“十一五”国家重点图书出版规划项目

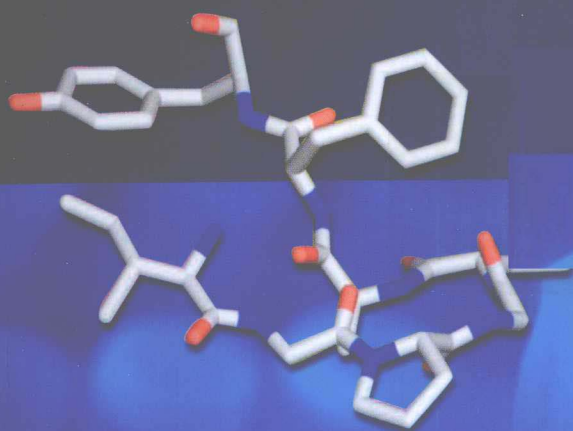


生命科学实验指南系列

Making and Using Antibodies

抗体制备与使用实验指南

[美] G.C.霍华德 M.R.凯瑟 著
张权庚 张玉祥 丁卫 王炜 主译



科学出版社
www.sciencep.com



扫一扫 95105715 或短
信发送至 106695887808

科学出版社官方微信

生命科学领域权威期刊

Making and Using Antibodies

抗体制备与使用实验指南

2015年12月第1版 16开 300页 32
ISBN 978-7-03-045111-9



“十一五”国家重点图书出版规划项目
生命科学实验指南系列

号 1530-2005-10; 2005

Making and Using Antibodies

抗体制备与使用实验指南

[美] G. C. 霍华德 M. R. 凯瑟 著

张权庚 张玉祥 丁卫 王炜 主译

ISBN 7-03-01530-10

定价：35.00元

科学出版社
北京

科学出版社

北京

北京

北京

北京

北京

北京

北京

北京

科学出版社

北京

图字:01-2009-0232 号

内 容 简 介

本书收集了抗体制备与使用中的基本实验方法及相关的最新科研进展,这些方法是开展抗体制备研究的必备知识,包括鼠源性单克隆抗体的制备、纯化、应用以及抗体的修饰等,同时也包括部分基因重组性单克隆抗体,涉及内容具体、全面,反映了国际上的最新发展方向。

本书对从事生物学、免疫学、生物化学与分子生物学、医药卫生科学领域的科研技术人员,以及高等院校师生具有参考价值。

Making and Using Antibodies

© 2007 by Taylor & Francis Group, LLC.

All Rights Reserved. Authorized translation from English language edition published by CRC Press, part of Taylor & Francis Group LLC.

本书贴有 Taylor & Francis 集团防伪标签,未贴防伪标签属未获授权的非法行为。

图书在版编目(CIP)数据

抗体制备与使用实验指南/(美)霍华德(Howard, G. C.), (美)凯瑟(Kaser, M. R.)著;张权庚等译. —北京:科学出版社,2010

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-028556-0

I. ①抗… II. ①霍…②凯…③张… III. ①抗体-制备-实验-指南②抗体-使用-实验-指南 IV. ①Q939.91-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 156911 号

责任编辑:李悦 席慧 刘晶 / 责任校对:刘小梅
责任印制:钱玉芬 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年8月第一版 开本:787×1092 1/16
2010年8月第一次印刷 印张:19 1/2 彩插:1
印数:1—3 000 字数:434 000

定价:78.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

译者名单

主 译 张权庚 张玉祥 丁 卫 王 炜

译 者(按姓氏音序排列)

曹 宁 陈 彦 丁 卫 郭 玲 何秀娟 胡智颖

李 波 李 蕴 刘 舒 龙 军 彭 智 王 炜

王一松 杨伊姝 张权庚 张玉祥 张 月 朱俊平

译 者 序

抗体的重要性不言而喻。目前几乎每一个生物医学研究室,每所医院的疾病诊断都在越来越多地使用到抗体,而对肿瘤的靶向治疗抗体目前已有十余种被批准用于肿瘤临床患者治疗,并且取得了非常好的疗效。有望在不久的将来,越来越多的治疗性抗体被运用于一些难治性疾病的治疗,如肿瘤、自身免疫性疾病等。一种好的治疗性抗体一年的销售市场将达 10 亿美元以上。

我国是一个正在崛起的经济和科技大国,拥有 13 亿人口,自力更生研制出各种治疗性和诊断性抗体以满足国内临床需求已是形势所迫。我们应该,并有能力参与国际抗体市场的竞争,但在这些方面我国目前与发达国家相比还有不小的差距,因此急需培养一大批理论扎实,技术过硬的生物医学科研队伍。

一本好的、实用性强的关于抗体制备与使用技术的专题手册会对我国目前广大的生物医学方面领域工作者、研究生、临床诊断实验室工作人员,以及抗体研制企业的日常科研工作提供指导。当我们有幸从科学出版社得到翻译美国 CRC 出版公司出版的《抗体制备与使用实验指南》这本书的机会后,我们当即根据自己十多年抗体使用方面的经验,对本书的翻译价值进行了评判。我们认为本书正是这样一本实用性很强的书籍,每章内容都反映出作者在本领域具有很强的实际操作经验,希望会对广大的生物医学工作者的实际操作和方向性思考方面有一定的借鉴作用。

我们衷心感谢首都医科大学免疫学系和微生物系广大师生对本书翻译工作的支持,正是她(他)们的辛勤工作使得本书能与大家见面。我们也希望在此表达对科学出版社李悦编辑的谢意,感谢她对我们的信任以及对翻译工作的诸多指导。

该书如有翻译不当之处,希望广大读者批评指正。

张权庚 张玉祥 丁卫 王炜

前 言

抗体可称为在地球上生命的发展历史中最重要的一群蛋白。这些"魔弹"已经成为生物学和医学研究中不可或缺的工具。在近 25 年生物学领域所收获的重要知识的浪潮中,抗体起着关键性的作用,而在医学实践方面,各种各样疫苗的研究成功和使用已经使多种传染性疾病得到了控制(至少在发达国家是这样),例如脊髓灰质炎、腮腺炎、麻疹、水痘等,并且已基本使天花绝迹。

我们希望本书对生物医学领域的研究人员和学生有所帮助。尽管未来在制备和使用抗体方面一定还会出现新的方法,但目前抗体的使用方法,如酶联免疫试验(ELISAs)、蛋白质印迹方法(Western Blot)、免疫组化、流式细胞术等,其功能是如此强大,以致于在未来相当长的时间内这些技术方法仍将对生物医学科学领域起着关键作用。

我们想在此对本书的所有作者表达深切谢意,在他们杰出的专业知识,优秀的写作和对本书的热心支持下,本书的出版才成为可能。我们也想在此深切感谢 CRC 出版公司负责本书出版工作的编辑 Judith Spiegel,感谢她对本书的诸多帮助和极大的耐心。

G. C. 霍华德

M. R. 凯瑟

目 录

译者序	
前言	
第 1 章 抗体	1
1.1 一种多功能分子——抗体	1
1.2 相关伦理思考	3
1.3 实验室安全	4
1.4 手册编排	4
参考文献	4
第 2 章 抗原	5
2.1 抗原的选择	5
2.2 多肽抗原	6
2.2.1 多肽抗原的免疫进度表	7
2.3 蛋白质抗原	7
2.3.1 原核蛋白	8
2.3.2 真核蛋白	11
2.4 全细胞免疫原	12
2.4.1 全细胞免疫原的免疫方案	13
2.5 基因免疫	14
2.5.1 质粒 DNA	14
2.5.2 腺病毒	16
参考文献	17
第 3 章 佐剂	20
3.1 引言	20
3.2 佐剂的使用	22
3.2.1 总体要求	22
3.2.2 弗氏佐剂的使用	23
3.2.3 TiterMax 佐剂的使用方案	25
3.2.4 Ribi 佐剂系统(RAS)的应用	26
3.2.5 Gerbu 佐剂的应用	27
3.2.6 Imject 铝盐佐剂的使用	27
参考文献	28
第 4 章 多克隆抗体制备	30
4.1 概要	30
4.2 抗原提呈细胞	30

4.2.1	B 细胞的抗原识别	32
4.2.2	T 细胞的抗原识别	32
4.2.3	B 细胞受体和抗体产生	34
4.2.4	免疫记忆	34
4.2.5	抗体	34
4.2.6	佐剂的作用	35
4.2.7	抗原特点	39
4.2.8	免疫途径	40
4.2.9	免疫步骤	44
4.2.10	物种选择	44
4.3	结论	48
	参考文献	48
第 5 章	单克隆抗体的制备	55
5.1	引言	55
5.2	材料	56
5.2.1	免疫原	56
5.2.2	免疫用的动物	57
5.2.3	免疫策略	58
5.3	免疫程序	60
5.3.1	培养基和骨髓瘤细胞	60
5.3.2	免疫 B 细胞的制备	63
5.3.3	融合和铺板	63
5.3.4	筛选	65
5.3.5	亚克隆和低温冻存	66
5.3.6	杂交瘤细胞的扩增	68
5.4	结论	69
	参考文献	70
第 6 章	单克隆抗体的定量生产	72
6.1	引言: 方法比较	72
6.2	抗体制备方法概况	72
6.2.1	产量	73
6.2.2	费用和设备	73
6.2.3	动物福利	73
6.2.4	免疫活性分子污染	74
6.2.5	微生物污染	74
6.2.6	抗体糖基化	75
6.3	腹水的制备	75
6.3.1	方法概述	75
6.3.2	免疫原同种异体反应性或异种抗原反应性的对策	76

6.3.3	体内制备方案: BALB/c 小鼠腹水	77
6.3.4	体内单克隆抗体的制备: 通过异种的杂交瘤细胞系制备腹水	80
6.4	细胞培养制备单克隆抗体	83
6.4.1	在研究实验室中体外制备单克隆抗体	83
6.4.2	实验方案: 在 CELLline CL-1000 培养瓶中制备单克隆抗体	85
6.4.3	用重组和转基因系统制备抗体	89
6.5	结论	89
	参考文献	89
第7章	抗体的纯化和鉴定	94
7.1	引言	94
7.2	抗体纯化	94
7.2.1	通过沉淀进行部分纯化	95
7.2.2	蛋白质 A 和蛋白质 G	97
7.2.3	IgM 和 F _{AB} 抗体片段的纯化	103
7.3	抗体的鉴定	107
7.3.1	区带(醋酸纤维)电泳	107
7.3.2	通过 280nm 吸光度测定抗体浓度	108
7.3.3	SDS-PAGE	109
7.3.4	免疫印迹	111
7.3.5	等电聚焦	113
7.3.6	酶免疫分析	114
7.4	结语	116
	参考文献	116
第8章	细菌中制备抗体	117
8.1	引言	117
8.2	所需材料	119
8.3	方法	121
8.3.1	噬粒设计	121
8.3.2	文库构建	122
8.3.3	抗原特异性抗体的筛选	128
	参考文献	132
第9章	抗体的化学和蛋白水解修饰	136
9.1	引言	136
9.2	一般步骤	137
9.2.1	抗体溶液的稳定性	137
9.2.2	抗体的定量	138
9.2.3	抗体的浓缩和缓冲液置换	140
9.3	胺类的修饰	142
9.3.1	总体考虑	142

9.3.2	胺反应试剂的分类	144
9.3.3	NHS-PEO ₄ -BIOTIN 的生物素化反应	146
9.3.4	用荧光染料进行标记	151
9.3.5	巯基的导入	152
9.3.6	聚乙二醇化	154
9.3.7	与螯合剂的偶合	154
9.4	巯基和二硫键的修饰	156
9.4.1	IgG 的二硫键和巯基	156
9.4.2	二硫化物的互换反应	157
9.4.3	其他涉及巯基和二硫键的氧化-还原试剂	161
9.4.4	用卤代烃和 <i>N</i> -烷基马来酰亚胺进行硫醇的烷基化	162
9.5	碳水化合物修饰	163
9.5.1	范例流程 10: 用 NaIO ₄ 氧化 IgG 的碳水化合物部分	164
9.5.2	范例流程 11: DAVLB 酰肼与氧化型 IgG 的偶合	165
9.6	抗体的固相化	165
9.6.1	聚苯乙烯培养皿和 ELISA 孔的固相化	165
9.6.2	与亲和介质的共价偶合	166
9.6.3	经生物素介导与亲和介质的固相化	168
9.7	蛋白的水解修饰	170
9.7.1	木瓜蛋白酶水解兔 IgG 制备 Fab 片段	172
9.8	抗体与其他蛋白质的交联	177
9.8.1	范例流程 18: 肼与 IgG 氨基的交联	178
9.8.2	范例流程 19: 醛与另一个蛋白质氨基的交联	180
9.8.3	范例流程 20: MEHN-IgG 与 FB 蛋白质的交联	181
	参考文献	182
第 10 章	抗体的应用	184
10.1	引言	184
10.2	蛋白质转印	185
10.2.1	转印设备	185
10.2.2	转印缓冲液	187
10.2.3	条件的优化	187
10.2.4	转印膜	187
10.3	检测	189
10.3.1	蛋白质印迹的直接染色	189
10.3.2	抗原的检测	189
10.3.3	蛋白质免疫印迹的检测抗体	190
10.3.4	免疫印迹实验中抗体的替代品	191
10.3.5	蛋白质免疫印迹的定量	192
10.3.6	相对分子质量标准品	193

10.4	蛋白质免疫印迹实验的操作程序	194
10.4.1	操作流程	195
10.4.2	免疫印迹实验需要的溶液	196
10.5	实验假象以及故障的诊断和排除	198
10.6	抗体芯片	198
10.7	临床应用	199
10.8	免疫沉淀反应及其相关应用	200
10.9	总结	201
	参考文献	202
第 11 章	免疫组织化学法	206
11.1	引言	206
11.1.1	方法学概述	206
11.1.2	对新的免疫组织化学方法进行标准化的一种实用方法	206
11.1.3	免疫组织化学中的抗体	207
11.2	组织准备	208
11.2.1	载玻片	209
11.2.2	细胞涂片/离心细胞涂片制备	209
11.2.3	冰冻切片	210
11.2.4	石蜡切片	210
11.2.5	细胞块	211
11.3	酶标记	211
11.3.1	辣根过氧化物酶	212
11.3.2	碱性磷酸酶	212
11.4	背景与非特异反应产生的原因	212
11.4.1	内源性酶活性	212
11.4.2	其他内源性物质活性	213
11.4.3	一抗产生的非特异结合反应或背景染色的原因	213
11.4.4	疏水作用和离子相互作用产生的背景	214
11.5	抗原修复技术(AR)	215
11.5.1	去污剂和离液序列高的物质	215
11.5.2	酶抗原修复法	216
11.5.3	热诱导抗原决定簇修复(HIER)	216
11.6	免疫酶技术	218
11.6.1	直接法	219
11.6.2	间接法	220
11.6.3	多步法	221
11.7	免疫荧光技术	227
11.7.1	荧光染料	227
11.7.2	间接免疫荧光技术	228

附录	228
A. 1 免疫组织化学染色试剂	228
A. 1.1 内源性过氧化物酶封闭液	228
A. 1.2 内源性碱性磷酸酶封闭液	229
A. 1.3 非特异结合性封闭液	230
A. 1.4 内源性亲和素/生物素封闭液	230
A. 1.5 抗原修复缓冲液	231
A. 1.6 胰蛋白酶抗原修复溶液	231
A. 1.7 抗原修复中的蛋白酶	232
A. 1.8 抗原修复中的胃蛋白酶	232
A. 1.9 漂洗缓冲液 TBS 500mmol/L, pH7.6	232
A. 1.10 磷酸盐缓冲液(PBS), 20mmol/L, pH7.0	233
A. 1.11 抗体稀释缓冲液	233
A. 1.12 底物及色原的制备	234
参考文献	238
第 12 章 免疫电子显微镜	239
12.1 引言	239
12.2 抗体	240
12.2.1 一抗	240
12.2.2 常见问题解析	240
12.2.3 二抗	241
12.2.4 试剂滴定	241
12.2.5 非特异性背景染色	242
12.2.6 对照	243
12.3 标记物	243
12.3.1 胶体金	243
12.3.2 其他电子密度标记物	245
12.3.3 重金属标记物显色的故障诊断与排除	245
12.3.4 多重标记应用	245
12.3.5 标记定量	246
12.4 组织标记	246
12.4.1 固定	246
12.4.2 包埋前标记	246
12.4.3 颗粒样本	247
12.4.4 复型标记	248
12.4.5 冷冻切片标记	248
12.4.6 非冷冻组织包埋后标记	250
12.4.7 冷冻置换	251
12.5 与其他免疫显微镜的相关性	251
参考文献	252

第 13 章 流式细胞术	256
13.1 引言	256
13.1.1 现有技术	256
13.1.2 抗体选择	257
13.1.3 实验初始应考虑的因素	257
13.1.4 对照	258
13.1.5 特异性	258
13.1.6 仪器显示和质量控制	259
13.2 免疫分型	260
13.2.1 抗体滴度测定	260
13.2.2 直接标记法	264
13.2.3 间接标记法	266
13.2.4 胞内标记法	268
参考文献	271
第 14 章 酶联免疫吸附试验	272
14.1 引言	272
14.2 准备	272
14.2.1 抗体	272
14.2.2 检测反应	274
14.3 安全性	275
14.3.1 “夹心”ELISA	275
14.3.2 “竞争”ELISA	276
参考文献	278
第 15 章 抗体的未来:挑战与机遇	280
15.1 引言	280
15.2 抗体的新来源	280
15.2.1 从转基因动物制备人类抗体	280
15.2.2 基因免疫制备抗体	280
15.2.3 avimer: 替代抗体	281
15.3 使用抗体的新方法	281
15.3.1 抗体片段和单功能区抗体	281
15.3.2 抗体和蛋白组学	282
15.3.3 杂合和嵌合抗体的表达载体	282
15.3.4 DNA 疫苗	282
15.3.5 抗体的其他应用	282
15.4 未来	283
参考文献	283
索引	285
彩图	

第1章 抗 体

Matthew R. Kaser and Gary C. Howard

1.1 一种多功能分子——抗体

抗体可说是地球生命进化史上最出色的蛋白质种类之一,如果生物医学界有“魔力子弹”的话,这极有可能就是抗体。在哺乳动物中,这类分子对机体固有免疫系统起到增强和补充作用,并可针对体外刺激(如细菌、病毒或外源有机物等)进行合成以使机体产生获得性免疫。

Edward Jenner 1796 年的研究工作^[1]一直以来被视为是对抗体的首次实际应用。他阐明了对减毒病毒抗原的免疫反应可保护机体免遭随后相关病毒的侵袭。尽管是 Jenner 首先报道了在控制条件下的疫苗接种,但早在几个世纪前甚至几千年前,中国已经首先采用病毒物质进行天花接种(种痘)使机体获得相应的免疫力以抵抗以后的病毒感染^[2,3]。

免疫学是当今医疗和科研必不可少的一部分。自 40 年前 Edelman 和 Porter 率先分离出免疫球蛋白分子之后,抗体已被应用于很多方面。1998~2003 年,抗体类药物在诊断和治疗方面的应用突破性增长 53% 左右。由 Kohler 和 Milstein^[4]开发的单克隆抗体,目前在全球拥有超过 70 亿美元的治疗市场,还有数百种潜在产品尚在临床前期研究阶段(综述,见 Ramachandra^[5])。

抗体正应用于蛋白质组学和诊断学方面以检测肿瘤和细菌抗原;还可在山羊奶和植物中合成以作为疫苗和抗肿瘤因子;还可用作药物载体工具以治疗病毒或细菌感染,当然还有肿瘤(图 1.1, 图 1.2)。

采用抗体的类型取决于研究项目的最终目标。一般来讲,单克隆抗体最适用于对天然蛋白质表面的抗原表位或变性蛋白质的隐蔽性抗原表位进行纯化和分析;多克隆抗体多应用于免疫印迹和各种不同的同源蛋白的纯化;嵌合抗体则用于研究其独特型在实验动物体内所得到的异种分子。

本书作者都会依据各自的抗体研究相关经验作出相应介绍。有些新方法必须要进行尝试,其中的一些会取得成功。例如,多克隆抗体和单克隆抗体联合检测生物芯片上的大分子被认为效率最高。如存有疑惑,可与有经验的同行商讨并做预试验验证。

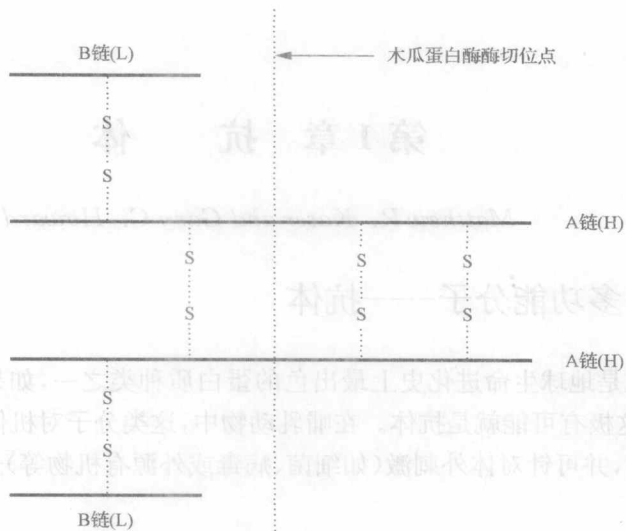


图 1.1 抗体结构。抗体是 Y 型四聚体结构分子,由两条轻链(L)和两条重链(H)组成^[6,7]。用木瓜蛋白酶消化抗体可得到 45kDa 的可结合抗原的 Fab 片段(抗体结合位点,Porter 术语)。55kDa 的 Fc 片段不结合抗原但可形成结晶。两个 Fab 片段可通过二硫键结合在一起。用从牛胃提取的胃蛋白酶消化抗体可得到不同的结果:得到比前述 Fab 片段稍大的片段。同时胃蛋白酶可消化 Fc 片段更多的肽键,产生更多小分子抗原片段,这些小分子抗原片段的重要性目前还不明确[经许可引自 Porter(1963) Br. Med. Bull. 19:197-201]。

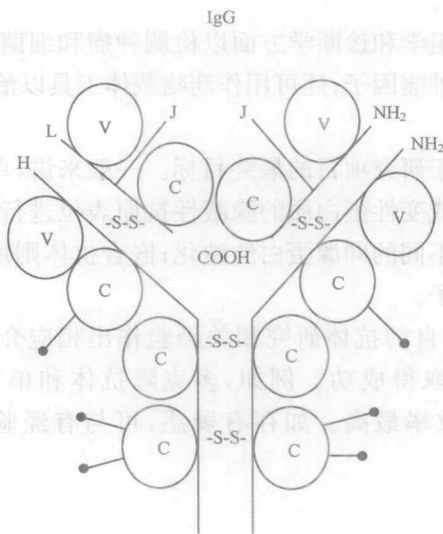


图 1.2 免疫球蛋白分子的各区域。免疫球蛋白含有 4 条肽链,每条肽链都包含一个可变区(V),可结合抗原;一个连接区(J)和一个恒定区(C)。这些肽链可根据它们在 8mol/L 尿素凝胶解离条件下的相对分子质量大小分为轻链(L)和重链(H)。

1.2 相关伦理思考

关于抗体的结构和作用机制的许多研究工作涉及动物实验(图 1.3)。所以这些实验中的动物使用就成了社会和科学家们的关注点。对许多动物实验,目前有一些复制或模拟组织或器官的替代方法在应用,如利用原代细胞或永生细胞系、整株植物和树叶、细菌和噬菌体繁殖、化学或生化合成等。

但是,有些结果必须用动物实验才能得到。这些情况下,严格遵守已有的有关实验动物的使用和健康的规章制度显得非常重要。大学、研究机构和其他组织有动物使用伦理监督委员会核准使用动物的研究。

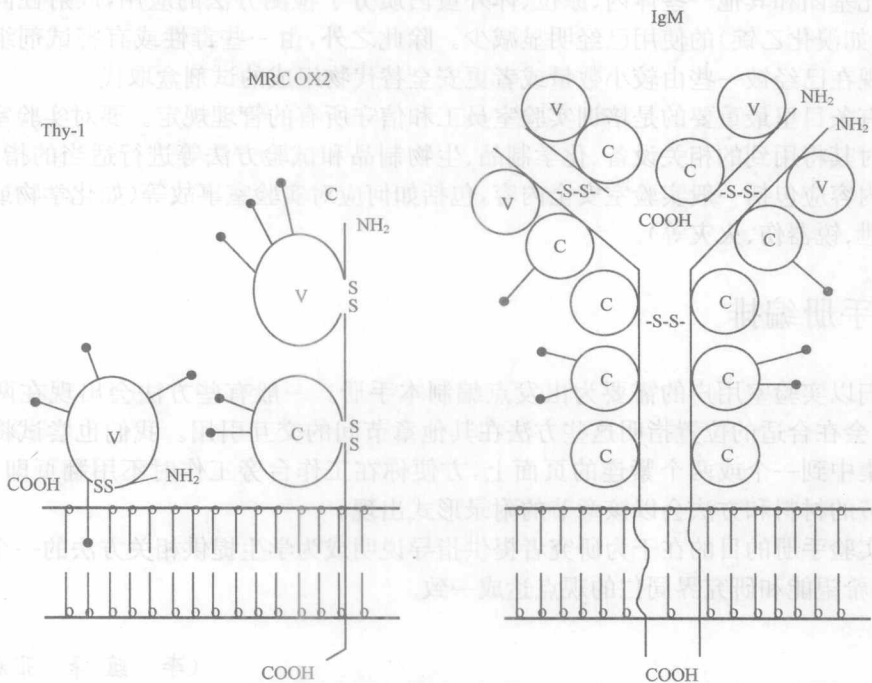


图 1.3 抗体是免疫球蛋白(Ig)超家族中的较大部分,由淋巴细胞合成,与一些入侵的或非己生物的某些表位结合。免疫球蛋白家族的大部分其他成员,如 IgF 和 IgA,合成并表达在淋巴细胞表面,可与附近的组织或细胞接近,和相关抗原结合并被其激活。抗体的跨膜区将结合信号传递到细胞膜下或细胞质蛋白,在胞质内产生第二信使通路反应,通常将此信号传递到基因组。另外,抗体,如 IgG 或 IgE 是可溶性蛋白,可自由通过循环系统迁移,在机体内对外源生物起免疫“侦察”的作用。研究发现,大约 4 亿 7000 万年前,即早奥陶纪时期,免疫球蛋白超家族成员(IgSF)已在所有脊椎动物体内存在^[8]。至于人类免疫系统,研究发现,在灵长类和啮齿类动物体内,抗体多样性的产生主要归因于 V-J-D 基因的重排;但是,在一些其他脊椎动物体内体细胞高度突变和体细胞基因转换对抗体多样性的产生同样重要^[9]。这一观察与目前对哺乳动物进化的了解一致,即在北 Laurentia 时代,灵长类动物和啮齿动物共享一个共同的祖先,到大约 85 亿年前的 Laurasiatheres 时代两者才分开^[10,11]。IgSF 可变区和恒定区的每个功能区长度分别为 100~110 个和 90 个氨基酸残基^[12]。IgSF 各成员间结构域的氨基酸组成有 20%~30%的一致性。免疫球蛋白的 V-J-C 区的形成是由于在简单生物内原始的 Thy-1 样序列重复、变异和缺失(若干次)而形成,这样的理论可解释那些存在于种系内或种系之间超家族分子氨基酸残基顺序的相似性和同源性。Thy-1 分子很可能参与了一种细胞型对另一种细胞增殖的调控,在原始真核细胞间相互作用也有着相似的作用。图中显示了免疫球蛋白超家族成员 MRC OX2 和 IgM 的结构。