

研究生创新教育系列丛书

抗体技术 (第二版)

汪世华等 编著



科学出版社

非外借

研究生创新教育系列丛书

抗 体 技 术

(第二版)

汪世华 等 编著

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

全书共分9章, 主要内容包括抗体概述、抗原制备、动物免疫与多克隆抗体制备、单克隆抗体的筛选与鉴定、抗体的大量制备与性质研究, 同时介绍了基因工程抗体的制备、抗体的改造、抗体表达与纯化, 最后还详细介绍了常用的免疫检测技术。

本书适合生命科学、生物医学等相关专业的研究、教学人员参考阅读, 也适合生物科学、生物技术、生物工程、生物医学等相关专业的本科生和研究生作为教材或者参考书。

图书在版编目(CIP)数据

抗体技术/汪世华等编著. —2版. —北京: 科学出版社, 2018.11
(研究生创新教育系列丛书)

ISBN 978-7-03-058349-9

I. ①抗… II. ①汪… III. ①抗体—研究生—教材
IV. ①Q939.91

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第165175号

责任编辑: 罗 静 / 责任校对: 郑金红
责任印制: 张 伟 / 封面设计: 刘新新

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>

北京教图印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

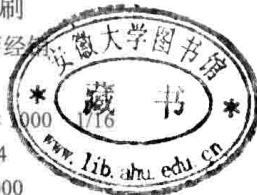
2009年3月第 一 版 开本: 720×1000

2018年11月第 二 版 印张: 12 3/4

2018年11月第一次印刷 字数: 257 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)



《抗体技术》(第二版)参编人员

(按姓氏汉语拼音排序)

贾坤志	凌素美	汪世华
王俊程	王荣智	肖诗伟
谢成杰	杨 航	曾令茂
张丹萍	钟燕芳	

第二版前言

抗体是机体在抗原物质刺激下，由 B 细胞产生的可与相应抗原发生特异性结合反应的免疫球蛋白。1964 年世界卫生组织将具有抗体活性及与抗体结构相似的球蛋白统称为免疫球蛋白。抗体通过结合抗原、介导细胞毒效应等方式，参与免疫防御、免疫监视和免疫稳定等生物学过程，在免疫反应中起着十分重要的作用。

19 世纪末期诞生了第一代抗体，即多克隆抗体的出现和应用。1975 年杂交瘤单克隆抗体的出现，标志着第二代抗体的诞生。20 世纪 80 年代之后，抗体技术与基因工程、分子生物学相结合，在小分子抗体和人源化抗体等一系列领域取得突破性的成果，使抗体技术成为生物技术特别是生物医药领域研究的热点，从此进入了第三代抗体工程，即基因工程抗体时代。

近年来，单克隆抗体及基因工程抗体得到了快速的发展，并已迅速应用于包括医学在内的诸多领域，包括免疫检测试剂盒、免疫胶体金、免疫成像技术、医学诊断、肿瘤治疗等。由于抗体自身多方面的优势，抗体技术将会在疾病诊断治疗、微量物质检验、生命科学研究等诸多方面发挥越来越重要的作用，抗体药物的人源化、微型化，抗体检测的可视化、自动化都是抗体技术发展的现实要求和重要趋势。而这些相关技术的发展和创新的又将进一步推动抗体技术的广泛应用。

本书的第一版于 2009 年在军事医学科学出版社出版,转眼间过了 10 年,这期间抗体技术有了很大的进展,特别是人源化抗体和治疗性抗体技术突飞猛进。应广大读者的要求,我们编写了第二版。本书的第一版偏重基本概念和实验方法的介绍;由于军事医学科学出版社改制的原因,第二版我们更换了出版社,并且在第一版的基础上更新了本领域的一些研究成果,其中绝大部分的实验结果都是本实验室(福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室)的研究成果。

本实验室获得了国家科学技术部、福建省科学技术厅等多个国家部委和省级项目的资助和支持。正是在这些项目的持续支持下,本实验室获得了系列研究成果。再结合前人研究成果和文献报道,形成了本书的主要内容。本书在介绍抗体基本概念和发展简史的同时,结合本实验室的研究成果,详细介绍了常见抗体的制备过程、性质研究和应用等,旨在让读者了解抗体的主要技术和研究进展,并为相关学科提供基础知识和技术。

全书共 9 章,由汪世华等编著。同时本实验室的老师、博士研究生和硕士研究生在图表绘制、文字写作、校对、排版等方面做了大量工作,他们分别是贾坤志、凌素美、王俊程、王荣智、肖诗伟、谢成杰、杨航、曾令茂、张丹萍、钟燕芳。

本书的顺利出版,首先要感谢本书的第一版出版社即军事医学科学出版社,同时感谢国家科学技术部、福建省科学技术厅、福建省发展和改革委员会等国家和省部级的项目支持,同时本实验室的研究生、留学生、教师等对抗体研究做了大量的工作,在

此一并表示感谢。

由于抗体技术发展势头异常迅猛、日新月异，一些内容还尚无统一的结论，以及编制水平有限，难免有遗漏和疏忽之处，敬请广大读者批评指正。

汪世华

2018年5月于福州

第一版前言

抗体技术始于 19 世纪末期,以多克隆抗体的出现和应用为标志。1975 年,单克隆抗体技术的出现,标志着第二代抗体工程的诞生。伴随着生命科学的不断进步,抗体技术在肿瘤治疗、疾病检测以及推动与生产、生活密切相关科学的发展方面有着不可估量的前景。但是由于这些抗体是异源的,在临床应用中会产生人抗鼠抗体反应(HAMA),所以在实际应用中存在很大的局限性。

20 世纪 70 年代基因工程的诞生,以及 80 年代分子生物学和分子遗传学的发展为基因的修饰和改造提供了重要的工具。与此同时,对抗体基因结构功能的认识也达到了一个较高的水平,这一切都为基因工程抗体技术的产生铺平了道路。人们利用基因工程手段可以对抗体基因进行适当的改造并转入合适的表达载体,以获得适合实际应用的理想抗体分子。从此,抗体技术的发展翻开了崭新的一页,即进入了第三代抗体工程——基因工程抗体时代。

抗体生产的最终目的是为了应用,而在应用中积累的经验反过来又促进抗体生产技术的不断革新进步。抗体技术在自身不断发展的同时,作为一种强有力的研究工具在生命科学的各个研究领域也起到了极大的促进作用,推动生命科学与技术取得了一个又一个突破,将一个全新的生物科学世纪展现在我们面前。特别是在临床医学、环境保护学、基因组学、生物信息学等学科领域发挥了巨大的作用。时至今日,抗体技术已成为生命科学研究中

不可缺少的一环，它将在维护人类健康、保障环境安全、增进对基本生物学问题的认识等方面，发挥越来越重要的作用。

本书在介绍抗体技术基本内容的同时，兼顾学科发展动向，涉及当今抗体技术的应用。内容不仅包括细胞工程抗体、基因工程抗体、抗体库的构建和筛选、抗体改造、抗体表达与分离纯化、抗体标记技术，还对免疫检测技术、抗体性质测定及抗原表位分析做了介绍。旨在使读者了解现代抗体技术的进展，并为相关学科提供知识和技术。全书共 10 章，由汪世华编写，王磊、张薇、张晓鹏、刘晓雷、杨新、刘丽华、张峰、刁苗、连惠芾、张成、焦航宇、郑嘉熙在图表的绘制、文字的校对和排版方面作了大量的工作。

本书的出版得到了“高校教材出版基金”和福建农林大学教务处的资助，在此表示感谢。感谢“全国高校素质教育教材研究编审委员会”对本书的审定。

由于抗体技术发展势头异常迅猛、日新月异，一些内容尚无统一的结论，以及编者水平有限，难免挂一漏万，敬请广大读者批评指正。

编 者

2008 年 8 月于福州

目 录

第二版前言

第一版前言

第 1 章 抗体概述	1
1.1 抗体的发展历程	1
1.1.1 抗体的发现	1
1.1.2 抗体技术的发展	2
1.2 抗体的分子结构	4
1.2.1 抗体的概念	4
1.2.2 抗体分子的组成	5
1.2.3 抗体分子超家族	6
1.3 抗体的类型	8
1.3.1 IgG	8
1.3.2 IgM	9
1.3.3 IgA	9
1.3.4 IgE	10
1.3.5 IgD	10
1.4 抗体的功能	10
1.4.1 抗体分子的水解片段	11
1.4.2 抗体分子的功能区结构	12
1.4.3 抗体抗原结合	13
1.4.4 补体激活	14
1.4.5 Fc 受体介导的效应功能	15
1.5 抗体技术的应用	15
1.5.1 免疫检测试剂盒	16
1.5.2 免疫胶体金	16
1.5.3 免疫成像技术	17

1.5.4	医学诊断	17
1.5.5	肿瘤治疗	17
1.6	抗体技术的发展趋势	18
1.6.1	抗体药物的人源化	18
1.6.2	抗体药物的微型化	19
1.6.3	免疫检测的可视化	20
1.6.4	免疫检测的自动化	21
第 2 章	抗原制备	22
2.1	完全抗原的制备	23
2.1.1	颗粒性抗原的制备	23
2.1.2	可溶性抗原的制备	24
2.2	小分子抗原的制备	26
2.2.1	载体选择	26
2.2.2	有羧基和氨基的半抗原的偶联	27
2.2.3	无羧基和氨基的半抗原的偶联	29
2.3	超抗原	30
2.3.1	超抗原的种类	31
2.3.2	超抗原的生物学意义	31
2.4	抗原的鉴定	32
2.4.1	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	32
2.4.2	双向免疫扩散试验	32
2.4.3	免疫电泳	33
2.5	小分子半抗原偶联物的鉴定	33
2.5.1	琼脂糖凝胶电泳法	34
2.5.2	紫外扫描鉴定	34
2.5.3	红外扫描鉴定	35
2.5.4	酶联免疫吸附法	36
第 3 章	动物免疫与多克隆抗体制备	38
3.1	动物免疫	38
3.1.1	免疫动物的选择	38

3.1.2	佐剂的选择	40
3.1.3	免疫剂量和途径	41
3.1.4	可溶性抗原的免疫方案	42
3.1.5	颗粒性抗原的免疫方案	43
3.2	血清采集	43
3.2.1	少量取血	43
3.2.2	中等量取血	44
3.2.3	大量采血	44
3.3	免疫效价检测	45
3.4	多抗血清的纯化与保存	46
3.4.1	多抗血清的纯化	47
3.4.2	抗体的保存	47
3.5	多抗的性质鉴定	47
3.5.1	多抗血清的特异性	47
3.5.2	血清效价测定	48
3.5.3	基于多抗的毒素检测	49
3.5.4	利用多抗血清检测实际样品	49
第 4 章	单克隆抗体的筛选与鉴定	51
4.1	单克隆抗体产生的原理	51
4.2	细胞融合	52
4.2.1	饲养细胞	53
4.2.2	骨髓瘤细胞	53
4.2.3	融合剂	55
4.2.4	细胞融合	55
4.3	杂交瘤细胞的筛选	56
4.3.1	HAT 培养基筛选	56
4.3.2	iELISA 筛选	58
4.4	杂交瘤细胞的克隆化与鉴定	59
4.4.1	杂交瘤细胞的克隆化	60
4.4.2	抗体亚类分析	60

4.4.3	细胞染色体分析	61
4.4.4	细胞培养上清效价检测	62
4.4.5	抗体特异性	63
4.5	杂交瘤细胞的保存与复苏	65
4.5.1	杂交瘤细胞的保存	65
4.5.2	杂交瘤细胞的复苏	66
第5章	抗体的大量制备与性质研究	67
5.1	单克隆抗体大量制备的方法	67
5.1.1	动物体内诱生法	67
5.1.2	体外培养法	69
5.1.3	杂交瘤细胞的无血清培养	70
5.2	单克隆抗体的纯化	71
5.2.1	亲和层析法	72
5.2.2	沉淀法	74
5.3	抗体的性质研究	77
5.3.1	抗体特异性测定	77
5.3.2	抗体亲和力测定	81
5.3.3	抗体稳定性测定	83
5.4	抗体的检测	84
5.4.1	检测标准竞争曲线的绘制	84
5.4.2	加标准样品检测	85
第6章	基因工程抗体的制备	86
6.1	基因工程抗体的种类	86
6.1.1	人源化抗体	87
6.1.2	小分子抗体	91
6.1.3	特殊基因工程抗体	95
6.2	抗体基因库的构建	96
6.2.1	噬菌体抗体库的构建	97
6.2.2	半合成抗体库的构建	99
6.2.3	全合成抗体库的构建	100

6.2.4	天然抗体库的构建	100
6.3	抗体的筛选与鉴定	101
6.3.1	抗体库的筛选方法	101
6.3.2	抗体特性的鉴定	105
6.3.3	筛选效率的检测	108
第 7 章	抗体的改造	110
7.1	抗体亲和力成熟	110
7.1.1	抗体亲和力成熟过程	111
7.1.2	体内抗体亲和力成熟的策略	111
7.1.3	体外抗体亲和力成熟的策略	112
7.1.4	体外亲和力成熟实例	119
7.2	抗体稳定性改造	121
7.2.1	单链抗体	121
7.2.2	二硫键稳定的 Fv (dsFv)	122
7.2.3	双价 dsFv	123
7.2.4	变型 Fv	123
7.3	抗体人源化改造	124
7.3.1	嵌合抗体	125
7.3.2	CDR 移植抗体	125
7.3.3	SDR 移植抗体	126
7.3.4	噬菌体抗体库构建人源化抗体	127
7.3.5	完全人源化抗体	127
第 8 章	抗体表达与纯化	129
8.1	抗体的融合表达	129
8.1.1	融合表达载体	130
8.1.2	融合表达标签	131
8.1.3	融合表达的宿主	134
8.2	抗体的分子伴侣表达	138
8.2.1	分子伴侣的分类	138
8.2.2	分子伴侣表达实例	139

8.3 表达抗体的纯化	145
8.3.1 沉淀法	145
8.3.2 层析技术	146
第 9 章 免疫检测技术	150
9.1 酶联免疫吸附测定	150
9.1.1 ELISA 的基本原理	150
9.1.2 ELISA 的种类	151
9.1.3 ELISA 检测方法的建立	155
9.2 免疫印迹技术	158
9.2.1 免疫印迹的基本步骤	158
9.2.2 免疫印迹结果的分析	160
9.3 胶体金检测技术	160
9.3.1 胶体金制备	161
9.3.2 抗体的胶体金标记	163
9.3.3 金标试纸条的组装	167
9.3.4 胶体金检测	168
9.4 免疫检测的其他技术	172
9.4.1 免疫沉淀法	172
9.4.2 免疫组织化学	173
9.4.3 免疫荧光技术	173
9.4.4 补体结合反应技术	173
9.4.5 多元免疫分析技术	174
主要参考文献	177

第1章 抗体概述

抗体是动物在抗原的刺激下，由机体免疫系统产生的具有高度特异性的效应分子。抗体通过结合抗原、介导细胞毒效应等方式参与机体的免疫防御、免疫监视和免疫稳定等生物学过程，在体液免疫中起着十分重要的作用。

抗体及其相关应用技术的研究开始于 19 世纪，经过长期的积累，20 世纪后半叶进入了快速发展时期，80 年代之后在抗体生产技术和应用技术领域取得了许多突破性的进展。多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体等一系列突破性的成果，使抗体技术成为生物技术特别是生物技术医药领域研究的热点。

1.1 抗体的发展历程

抗体技术研究是伴随着抗体的发现开始的，同时伴随着对抗体认识的不断加深而拓展。广义的抗体技术包括抗体的生产及应用相关的所有技术，狭义的抗体技术则是指与抗体生产相关的技术。在抗体技术的研究过程中，人类对抗体技术各方面应用的需求推动着抗体技术研究不断向前发展，取得了许多标志性的研究成果。

1.1.1 抗体的发现

1796 年，英国医生 Jenner 研究出用牛痘预防天花的方法，推动了免疫学前期的快速发展。19 世纪末，法国的巴斯德发明了用

减毒狂犬病毒株制成狂犬病疫苗，预防人类的狂犬病。1890 年，德国的 Behring 发现用白喉毒素免疫动物后获得的免疫血清中有一种能够中和抗白喉毒素的物质存在，日本细菌学家 Kitasato 也发现用破伤风毒素免疫动物之后获得的免疫血清中存在类似的物质。两人将获得的免疫血清用于治疗白喉和破伤风疾病，取得了良好的治疗效果。这类能够中和毒素的物质被称为抗毒素 (antitoxin)。之后，抗体 (antibody, Ab) 的概念就开始被引用来指代与抗毒素类似的物质。与此相应地，将能够刺激机体产生抗体并能与相应抗体发生特异性反应的物质称为抗原 (antigen, Ag)。

20 世纪 30 年代末，Tiselius 和 Kabat 发现，免疫后的动物血清中 γ -球蛋白的含量明显增加，而当血清与相应的抗原反应之后，血清中 γ -球蛋白的含量恢复到免疫前的水平，从而确定了抗体分子的本质是 γ -球蛋白。

1.1.2 抗体技术的发展

抗体生产技术根据发展历史可以分成 3 个阶段，分别是多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体。

1. 多克隆抗体

多克隆抗体 (polyclonal antibody, PcAb) 出现于 19 世纪末。最初发现的白喉毒素的抗血清即是一种多克隆抗体。当抗原注射到动物体内之后就会产生针对该抗原的抗体。大多数抗原表面的成分复杂，具有多种不同的抗原表位，因而免疫血清中产生的抗体不是针对某个单一抗原表位的，而是针对多种抗原成分或抗原表位的，是综合的、不均一的，即为多克隆抗体。