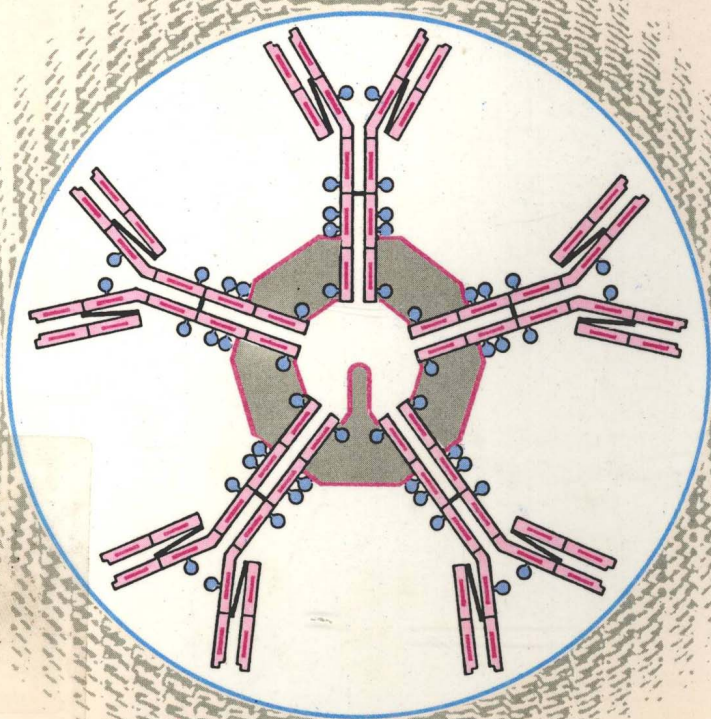


朱平 冯书章 主编

抗体实验技术



长春出版社

第三版

抗体实验技术



科学出版社

朱平
冯书章
主编

抗体实验技术

长春出版社

编 著 者

孟锐奇 刘晓明 许崇波
朱 平 冯书章 韩靖康
赵建增

审 校

邓 定 华

(吉)新登字 10 号

抗体实验技术

朱平 冯书章 主编

责任编辑:邓进 程与光

封面设计:庄宝仁

长春出版社出版
(长春市建设街 43 号)

长春出版社发行
长春市第四印刷厂印刷

开本:787×1092 1/32
印张:15.5
字数:109 000

1994 年 11 月第 1 版
1994 年 11 月第 1 次印刷
印数:1—2100 册

ISBN 7—80604—183—4/Q·8

定价:16.80 元

内 容 提 要

本书主要是以美国冷泉港实验室 Ed Harlow 和 David Lane 新出版的《抗体实验技术手册》为蓝本,参阅其它相关生物学著作编著而成,是一本国际通用的新型的抗体实验技术手册,也是生命科学领域的重要工具书。该书全面系统地介绍了抗体及其有关实验技术的基本原理和操作规程,并附有注意事项和大量附录,具有重要的实用和参考价值。全书共分十六章,第一章至第五章介绍了抗体的形成机制及其与抗原反应;第六章和第七章详述了单克隆抗体的特点、制备和检测方法,并对其应用前景进行了评价;第八章至第十章详述了抗体的贮存、纯化、标记和细胞染色技术;第十一章至第十四章详述了免疫沉淀、免疫印迹、免疫亲和纯化及免疫学测定原理和操作规程;第十五章扼要介绍了基因工程抗体的基本原理和技术;第十六章介绍了抗体实验中常用的试剂及其配制方法。本书提供了多种实验方法,并扼要阐述了其理论依据,以便读者选择适合于自己实验室的技术方法。本书可供从事细胞生物学、分子生物学、生物化学、生物技术、医药卫生以及畜牧兽医领域研究和教学人员使用,并可作为有关专业大中专学生和研究生参考书。

序

近二十年来免疫学的突飞猛进,已深入到很多相关学科之中。由于其涉及问题愈广泛,因而就越为人们所重视。关于免疫学的巨著虽然很多,但随本学科当今时代的迅速发展,实践者的需要已分向免疫学中各个问题的深入探讨,而且先进的技术方法,更是时代的宠儿。《抗体实验技术》正是应运而生者。

本书从免疫学实践的中心问题“抗体反应”出发,阐述其理论与技术,涉及到免疫体内与体外反应的各个细节;在技术操作方法,首先介绍了细胞工程中的核心技术单克隆抗体,另外还包含了免疫化学、免疫生化和分子生物学等方面内容,使本书中心问题更为精深。因此它具有极为重要的实用意义与参考价值。

朱、冯二位研究员与余从事本专业研究有年。近期朱平博士留学美国归来,介绍了哈罗等美国学者的最新著作,又有各位博士硕士协同编写,笔者审校之余甚感满意,特为读者介绍。是为序。

邓定华

1994年5月

目 录

第一章	免疫反应	(1)
第二章	抗体分子	(8)
第三章	抗原抗体相互作用	(31)
第四章	抗体反应	(46)
第五章	免疫接种	(67)
第一节	免疫原性	(67)
第二节	抗原来源	(71)
第三节	免疫动物	(97)
第四节	采集血清	(114)
第五节	强化弱抗原	(117)
第六章	单克隆抗体技术	(127)
第一节	免疫动物	(127)
第二节	筛选方法的建立	(131)
第三节	制备杂交瘤	(140)
第四节	单克隆抗体类型及其亚类鉴定	(150)
第五节	发展趋势	(152)
第七章	杂交瘤细胞的生长	(155)
第一节	瘤细胞及杂交瘤细胞的生长	(155)
第二节	单克隆抗体的制备与贮存	(166)
第三节	药物的选择	(168)
第八章	抗体的纯化与贮存	(172)

第一节	抗体的保存	(172)
第二节	抗体的纯化	(173)
第九章	抗体的标记	(185)
第一节	检测方法 & 标记方法的选择原则	(185)
第二节	碘标记抗体	(187)
第三节	生物素标记抗体	(196)
第四节	酶标记抗体	(198)
第五节	荧光染料标记抗体	(203)
第六节	生物合成法标记单克隆抗体	(206)
第十章	细胞染色	(207)
第一节	概述	(208)
第二节	抗体选择	(209)
第三节	细胞染色程序	(212)
第四节	封固标本	(243)
第五节	照相	(244)
第六节	细胞染色背景	(245)
第十一章	免疫沉淀	(247)
第一节	概述	(248)
第二节	抗体的选择	(248)
第三节	免疫沉淀程序	(253)
第四节	背景问题	(279)
第十二章	免疫印迹技术	(282)
第一节	抗体的选择	(284)
第二节	免疫印迹技术的操作程序	(286)
第三节	小结	(306)
第十三章	免疫亲和纯化技术	(308)

第一节	抗体的选择	(310)
第二节	免疫亲和纯化的操作程序	(312)
第十四章	免疫学测定	(334)
第一节	免疫学测定的类型和试验 条件的选择	(334)
第二节	免疫学测定的操作程序	(338)
第三节	免疫学测定的设计	(359)
第十五章	基因工程抗体	(364)
第一节	基因工程抗体的类型	(366)
第二节	抗体基因的结构特点	(367)
第三节	抗体可变区基因克隆的方法	(368)
第四节	抗体克隆所使用的引物和探针	(369)
第五节	抗体表达的策略	(372)
第六节	抗体基因克隆实例	(378)
第十六章	试剂	(382)
第一节	结合抗体的细菌细胞壁蛋白	(382)
第二节	抗免疫球蛋白抗体	(387)
第三节	抗体的蛋白酶水解片段	(390)
第四节	通过吸附法除去非异性结合	(393)
附录部分	(394)
附录一	电泳	(494)
附录二	蛋白质技术	(410)
附录三	试剂	(430)
附录四	细菌的表达	(438)

第一章 免疫反应

免疫系统的主要功能是保护动物使之免遭病原微生物及其毒性产物危害。这个系统涉及许多机制以将外源细菌、病毒及其分子定位,将这些入侵者中和并将它们排出体外。这个监视作用是由蛋白质及周身循环的细胞来行使的。许多不同的机制参予监视作用,它们可以粗略地分为二个范畴——非适应性免疫及适应性免疫 (nonadaptive and adaptive immunity)。

非适应性免疫是由对外来分子非特异性反应的细胞来介导的,包括诸如巨噬细胞的吞噬作用, 泌泪细胞分泌的溶菌酶以及中性杀伤细胞造成的细胞裂解机制,非适应性免疫即使反复暴露于外源分子亦不能改善。反之,适应性免疫是针对特定分子,而且可经反复暴露于外源分子使之加强。适应性免疫由淋巴细胞介导,这些淋巴细胞合成细胞表面受体或分泌特异性结合外源分子的蛋白质。这些分泌的蛋白质被称为抗体。可以与抗体结合的分子被称为抗原。当一个分子被用于诱导适应性反应时,这个分子就被叫作免疫原。抗原和免疫原这两个名词被用于描述一个分子的不同性质。免疫原性不是一个分子的内在性质而仅仅是为其诱导适应性反应能力而下的定义。抗原性也不是分子的内在性质,而是对其被抗体结合

能力下的定义。

免疫球蛋白这一名词常与抗体通用。正规地说,抗体是一个可结合已知抗原的分子,而免疫球蛋白是指这组蛋白质并不管其结合的靶子是否已知。在本书中,这种区别甚小,故二者通用。

一 免疫系统由大量的特化细胞组成

免疫系统含有 10^9 以上的淋巴细胞遍布全身,保证了它们在任何部位都能迅速反应。淋巴细胞由骨髓中的原始干细胞不断产生,经血液及淋巴系统循环,暂时停顿并积聚于称作淋巴器官的特异化的结构中,在哺乳动物中就是淋巴结和肝脏。在免疫反应过程中,免疫原集聚于一个淋巴器官中,这个淋巴器官就变成了免疫反应的焦点。

许多类型的具有不同功能的淋巴细胞已经被确认了,免疫系统大多数细胞功能可以通过将淋巴细胞分成三个基本类型来描述——B 细胞,细胞毒性 T 细胞和辅助 T 细胞,所有三型 T 细胞都携带有可以结合抗原的细胞表面受体。B 细胞分泌抗体,并在其表面携带一个同一抗体的修饰型,其功能相当抗原受体。细胞毒性 T 细胞裂解外源的或感染的细胞,通过叫做 T 细胞受体的表面抗原受体结合靶细胞,辅助 T 细胞在控制 B 细胞和细胞毒性 T 细胞的反应方面起关键的调节作用。

适应性免疫反应一般说可分为两类:体液介导类和细胞介导类,体液反应引发产生可结合外来抗原的循环抗体,它由 B 淋巴细胞产生,并由辅助 T 淋巴细胞介导。抗体反应成为本书中所有技术的基础。这一点在第四章中将详细阐述。细

胞介导的反应最典型的是毒性 T 淋巴细胞结合于外来或感染的细胞,随后将这些细胞裂解。细胞介导免疫主要是由细胞毒性 T 淋巴细胞在一些辅助 T 淋巴细胞参与下完成的。

二 免疫系统能特异性地对无数种分子反应

免疫系统持续地受无数抗原刺激。免疫系统的—个主要形式是它能合成大量的抗体及细胞表面受体。各个带有不同的抗原结合位点的抗体和 T 细胞受体与外来分子的结合提供了免疫反应特异性的基础。

三 个别淋巴细胞识别个别抗原

免疫反应的特异性是由一个简单机制来控制的———一个细胞识别一个抗原,因为单一淋巴细胞上的所有抗原受体是相同的。不管 T 淋巴细胞还是 B 淋巴细胞都是如此,尽管这些细胞引发的反应类型是不同的。

在成熟淋巴细胞表面的所有抗原受体都是糖蛋白。体细胞重组、突变及其它机制产生 10^7 个以上的结合位点,抗原特异性通过确保只有—个类型的受体在—个细胞内被合成的过程来维持。抗原受体在无抗原存在时产生,所以在发现抗原之前就有了各种各样的抗原受体储备。

虽然 B 细胞表面抗体和 T 细胞上的受体都具有类似的结构,但它们是由不同的基因家族编码的;其表达具有细胞型特异性。B 细胞上的表面抗体能结合可溶性抗原,而 T 细胞受体仅仅识别在其它细胞表面展示的抗原。

四 免疫系统能将外来微生物和分子与自身成分区别开来

由于抗体和细胞毒性 T 细胞能非常有效地清除抗原,所以极为重要的是免疫系统能将外源分子与自身的正常成分区别开来,不引起抗体对自身大分子的免疫反应。这种现象叫作免疫耐受。耐受是通过持续地清除产生可结合宿主分子的 T 细胞受体或抗体的淋巴细胞来建立和维持的。如果没有这种选择过程,宿主就要产生针对自身的免疫反应,造成许多紊乱。这些紊乱统称为自身免疫疾病。

五 免疫系统记忆每一次与外来抗原的遭遇

当一个动物首次遇到外来抗原时,其免疫反应是缓慢的。在免疫反应过程中,抗原被破坏。若抗原是一病原、缓慢的免疫反应可能就不足以防止疾病。当动物第二次暴露于同一抗原时,就引起一个更强更快的反应,病原通常在造成疾病之前就被消除了。这个引起强的二次反应的能力叫做免疫记忆。免疫记忆是特异性的;预先暴露于一个抗原的机体对其它免疫学上不相关抗原不起作用。免疫记忆可以延续动物终生。

六 免疫反应的许多性质是通过克隆选择确定的

由于任一淋巴细胞上的受体只能连接一种抗原,所以就很容易看到免疫系统如何特异地对特定抗原反应,也就是活化一种淋巴细胞而不是其它淋巴细胞。当 B 淋巴细胞表面受

体结合抗原时，B 淋巴细胞就被活化，分泌抗体并被刺激而增殖。T 细胞也以类似形式反应。这种细胞急剧分裂增加了抗原特异性淋巴细胞的数量，同时这种克隆扩增成为有效免疫反应进展的第一个步骤。细胞分裂的主要部位是在淋巴器官内。只要抗原持续存在，淋巴细胞活化就持续进行，从而增加免疫反应的强度。在抗原被清除之后，扩增了抗原特异性淋巴细胞的一部分仍保留在循环中。这些细胞是以后遇到相同抗原时反应的主体，为免疫记忆提供了细胞基础。

第二种克隆选择被认为与耐受有关。通过克隆缺失过程，细胞表面受体结合宿主成分的淋巴细胞被从免疫系统中排除掉。在分化过程中自我反应的克隆被特异性地除去，而在免疫系统发育中，这一过程被特异地激活。但由于新的淋巴细胞不断产生，这种选择过程必然持续终生。

七 一个有效免疫系统的成熟是由广泛的细胞间信息交换来调节的

免疫系统行使功能是通过广泛的细胞间信息交换来完成的，细胞间信息交换的调节是由不同淋巴细胞和巨噬细胞间的直接接触以及调节分子分泌来达到的。这些相互作用共同调控免疫反应。已经证实了免疫网络中有大量的受体和信号分子被涉及，这些受体和信号分子担负着多细胞有机体中细胞间信息交换作用。

参考文献

Burnet, F. M. 1959. The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, London.

Cantor, H. , and E. A. Boyse. 1975. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. *J. Exp. Med.* 141 : 1376-1389.

Dutton, R. W. and R. I. Mishell. 1967. Cellular events in the immune response of normal spleen cells to erythrocyte antigens. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32 : 407-414.

Gowans, J. L. and E. J. Knight. 1964. The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 159 : 257-282.

Jerne, N. K. 1971. The somatic generation of immune recognition. *Eur. J. Immunol.* 1 : 1-9.

Moore, M. A. S. and J. J. T. Owen. 1967. Experimental studies on the development of the thymus. *J. Exp. Med.* 126 : 715-725.

Triplett, E. L. 1962. On the mechanism of immunologic self recognition. *J. Immunol.* 89 : 505-510.

Hood, L. E., I. L. Weissman, W. B. Wood, and J. H. Wilson. 1984. *Immunology*, 2nd edition. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California.

Male, D. , B. Champion, and A. Cooke. 1987. *Advanced*

immunology. Gower, Lippencott Medical, Lippencott, Philadelphia.

Marchalonis, J. J. ,ed. 1977. Recirculating lymphocytes. The lymphocyte. Structure and function. M. Dekker, New Youk.

Nossal, G. J. V. 1983. Cellular mechanisms of immunologic tolerance. Annu. Rev. Immunol. 1 : 33-62.

Paul, W. E, ed. 1986. Fundamental immunology. Raven Press, New York.

Roitt, I. , Brostoff, and D. Male. 1985. Essential immunology. Mosby, St. Louis, Missouri.

Sato, V. L. and M. L. Gefter, ed. 1982. Cellular immunology : Selected readings. Benjamin-Cummings.

第二章 抗体分子

抗体是宿主对体内存在外源分子反应所产生的蛋白质，主要由浆细胞合成。后者是B淋巴细胞系的最终分化细胞。通过血液和淋巴循环，在血液和淋巴中结合外来抗原。这种抗原抗体复合物通过巨噬细胞的吞饮从循环中除去。

抗体是具有共同结构和功能形式的一大类糖蛋白。从功能上说，它们的特点是都具有结合抗原和免疫系统中异化细胞或蛋白质的能力。从结构上讲，抗体由一个或几个看起来成Y型的单位拷贝组成，每一个Y型单位含有四个多肽，二条相同的多肽被称之为重链，另二条相同的多肽被称之为轻链。根据Y型单位的数量和它们含有的重链多肽类型，抗体分成五类：IgG、IgM、IgA、IgE、和IgD(表2.1)。

IgG抗体仅含有一个Y型单位结构，而且在血浆中最丰富，所以最容易通过讨论IgG了解抗体的许多重要结构形式。为简化起见，下面以鼠抗体为例讨论，因为其主要性质与其它物种的IgG类似。

一 IgG类抗体有二个相同的抗原结合位点

IgG分子有三个蛋白区，二个相同的区组成了Y的臂，每个臂含有一个抗原结合点，这使IgG分子成为二价分子。