

分子克隆
实验指南系列

抗体技术实验指南

[美] E. 哈洛 D. 莱恩 编著

沈关心 龚非力 等译

科学出版社

北 京

内 容 简 介

抗体的研究成果已广泛地应用于免疫学、生物化学与分子生物学、药理学和预防医学以及临床医学各领域,推动了这些学科的发展,并为新药的开发、疾病的诊断及防治开拓了新的前景。本书是冷泉港实验室出版社继《分子克隆实验指南》后推出的又一本经典名著,简要阐述了抗体的理论,详细地介绍了抗体应用研究的新技术、新方法和新进展。全书分为11章,包括抗体的分子结构与功能,抗原-抗体相互作用的物质基础和特点,应用抗体的选择和处理,组织和细胞免疫染色技术,免疫沉淀和免疫印迹技术,免疫亲和纯化技术,基因工程重组标记蛋白的设计和应用以及抗原表位的分析等。本书内容翔实、实用性强。

本书可供从事生物学、免疫学、生物化学与分子生物学、医药卫生等学科以及相关领域的科研技术人员、教学人员及研究生参考。

Ed Harlow, David Lane

Using Antibodies: A Laboratory Manual

© 1999 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

图书在版编目(CIP)数据

抗体技术实验指南/(美)哈洛(Harlow, E.), (美)莱恩(Lane, D.)
编著;沈关心等译. —北京:科学出版社, 2002. 9

(分子克隆实验指南系列)

书名原文: Using Antibodies: A Laboratory Manual

ISBN 7-03-007325-8

I. 抗… II. ①哈…②莱…③沈… III. 抗体 IV. R392. 2

中国版本图书馆CIP数据核字(2002)第063240号

责任编辑: 马学海 乐俊河/责任校对: 陈玉凤

责任印制: 刘士平/封面设计: 王 浩

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>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年9月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2003年8月第二次印刷 印张: 19 1/2

印数: 3 001—5 000 字数: 439 000

定价: 39.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

译者名单

主 译 沈关心 龚非力

译校人员(按姓氏笔画为序)

丁洪波	王 硕	王 烽	王国华
叶 飞	朱慧芬	朱丽娟	刘恭植
孙毅敏	邱文洪	辛利军	余俊平
李 莉	李凌波	李清芬	吴雄文
杨道锋	周华蓉	周汝麟	郑 芳
明建扩	房崇云	梁智辉	黄亚非
雷 萍	熊士秋	廖国宁	

献 词

追念我的父亲 (11/22/1917—8/16/1998)

EH

献给伯奇特、阿米莉亚、奥利弗

DL

前 言

《抗体技术实验指南》第一版发行距今已十年。第一版发行于1988年底，而最新版于1998年12月初与读者见面。我们为《抗体技术实验指南》受到读者的高度赞扬而感到高兴和宽慰，尤其是一些不熟悉的人对本书的评论更使我们受到激励。他们告诉我们，已尝试了这本书所介绍的一些新的实验，并顺利完成。

除这些善意的评论外，也存在许多批评和建议。这些年来，我们坚持收集有关的批评和建议。当开始筹备第二版时，我们将读者的意见进行了归类，并邀请了Gerard Evan、Deborah French、Kevin Johnson和Jennifer Rabinowitz进一步给这本手册提供批评及建议。他们耐心地阅读了这本书，提出了有益的建议，包括对本书的整理装订及作者的要求。在此方面本书与第一版相比有一些改进。

首先，对装订形式进行了改变，这种装订不仅能使书平放在工作台上，也能使其直立，使之最为适用于实验室工作。

第二个重要变化是这本书仅覆盖相当于第一版书的一半信息。当我们开始为第二版整理资料时，突然认识到出书的目的：实用性。因此有关抗体内容大致分成两部分：一部分即为本书，主要讲述抗体的应用，重点介绍了一些免疫化学方法。另一部分内容将集中在另一本书《抗体的制备》中，随后与读者见面。这一部分的工作并非毫无缺点，但它给予我们足够的空间处理需要注意的主题，防止了相关方法之间分类的混乱。

除此之外，在收集建议的基础上对第二版的编写内容进行了修改。第一版像一本百科辞典，收集了每种方法的许多不同形式。在第二版中，我们采取不同的策略。在有足够理由的前提下本书推荐一种方法，那就是所推荐的方法一定比其他方法更为可行、更便宜或是更为广泛应用。经验丰富的工作者也许在书中找不到其最喜爱的方法，我们建议继续使用现用方法。我们的目的是给初学者足够的信息，使其能够快速进行工作。这并不妨碍经验丰富的工作者应用其他的方法。除了列出的较少的方法之外，第二版中增添了较多的注释，指出较难的步骤、潜在的缺点及一些特殊的问题。我们对在实验室新开展的某一实验所遇到的问题及方法的缺点进行了评论，这些评论位于每一技术的开始或整篇文章的边区（中文版以小一号字的形式表示）。

第二版还有其他方面的变动，设计了各种新形式，来帮助读者很好地使用本书及每一技术。每一章都有一个图标，反映了这项技术本身或是这个领域的发展。图标用于每章的开头，作为一种指示使读者更快地找到所需的章节。我们在每项技术中加入定位器¹⁾，指导工作者寻找该方法的前后步骤。定位器的想法来自于公共交通图、铁路“技术”图中，新一步的开始代表另一步的结束，希望这些能帮助读者遨游于各种技术步骤。其他新形式还有本书主要方法的缩写本，没有过多解释，便于实验者工作（相当于每一章的小结）。这些方法被授予“便携式方法”的称号，位于每章的结尾，也能分为

1) “定位器”与“薄卡”在中译版中略去。——编辑注

独立的薄卡使用。

本书的读者与第一版相似，是经验丰富的分子生物学者，但对于免疫化学方法并不熟悉。我们希望那些经验丰富的免疫学家、病理学家等能够认为这本书会对他们的工作有所帮助，但我们并非尽量囊括常规应用的所有方法。我们尽力讨论有关抗原的所有型别，但是实际上这本手册主要是处理蛋白质抗原。这就意味着它作为一种标准的方法手册被那些需要从克隆转向蛋白质分析的人们使用。

前言最重要的功能是感谢所有为这本书的编写出版提供帮助的人。深深感谢我们的编辑 Judy Cuddihy (朱蒂·卡第黑)。在整个编写出版过程中 Judy Cuddihy 是一位领导者，解决问题者，富有创造力的好朋友。如果没有她，这本书不会出版。在编写出版过程中，经过他们的努力，平息了几次事端，使工作进行顺利。Judy Cuddihy 和我们一起完成了两个版本的工作，显示了与我们的友谊及脚踏实地的工作态度。

其他许多同志也做出了重要贡献。Tracy Kuhlman 是助理编辑，她忍受我们一次又一次令人发狂的质疑，提供给我们所需的信息，并阅读了步骤和注释及纠正了其错误的地方。Peter Hall、Andi McClatchey、Shiv Pillai 和 Sander Van den Heuvel 都阅读并评论了本书的部分章节，我们感谢这些专家的帮助。

在整个编写出版过程中，John Inglis 是我们的领导及朋友，他激起了我们对这一项目的兴趣，并带领 CSHL 杂志社的职员为这本书的出版做出重大贡献。尤其感谢 Denise Weiss、Pat Barker、Inez Sialiano、Mary Cozza 和 Jan Argentine。

最后，感谢所有提供新技术及指出第一版缺点的人们。出版这本书最好的事情就是能够和读者相互反馈。

我们希望本书能给读者带来乐趣。

EH 和 DPL

为《抗体技术实验指南》作序

这本手册是受 Tom Maniatis、Ed Fritsch 和 Joe Sambrook 所著的《分子克隆实验指南》的鼓舞而编写的。《分子克隆实验指南》一书为分子生物学方法在科学界的更广泛应用做出了巨大贡献。最令人高兴的是，这本手册给初学者以信心，让所有工作者尝试新的方法。目前，掌握许多现代免疫化学方法对非免疫学专业工作者来说比较困难，《抗体技术实验指南》的一个重要目的，就是让更多的学者掌握这些方法。我们希望以这本手册能否帮助人们克服这些障碍作为评价本书的标准。

《抗体技术实验指南》一书的编写出版具有一个长期而又复杂的产生过程。出版一本免疫学手册的最初想法是由 Ron McKay、Steve Blose 和 Jim Lin 提出的，一些最初的设想在这个版本中依然保存，因此我们非常感谢 Ron McKay、Steve Blose 的贡献。对于第二版的构思起于 1986 年。编写的开始阶段主要涉及总结实验方法，因此完成得较快。当我们在工作中与同伴们探讨问题时提出了两个问题。首先，为非免疫学家提供一个免疫化学方法实验指导是令人鼓励的事情；再则，现代免疫学与大部分分子生物学的背景之间的距离比我们想象的大得多。这就意味着如果这本书要帮助交叉学科的科学家的学习，必须介绍更多的背景知识。

《抗体技术实验指南》的最终版本前面四个章节概述了免疫应答的主要特征，抗体分子的结构，抗体的活性以及抗体反应的机制。这些概述采用最新的公认观点，也许过于简单和省略会引起一些免疫学家的不满，但我们希望那些非免疫学家通过对以后章节中的观点及技术的学习，会发现一些有用的部分。书中大部分内容包括提取、纯化和标记单克隆抗体及多克隆抗体的方法，也有些章节描述如何运用抗体来研究抗原。两个着重点很明确：着重于蛋白质抗原，但不包括几种经典免疫化学方法，如 ELISA 等。取而代之的是集中在细胞免疫染色、免疫沉淀、免疫印迹、免疫亲和纯化和免疫学测定，这些技术对于非免疫学家来说更为普遍需要。

一种方法的真实来源常难以判定，虽然我们给予了相应的参考文献，但是也存在一些错误的地方。本书所介绍的一些方法大部分源自我们实验室或关系密切的实验室。显而易见，很少方法是规定的，除依赖于一种特殊抗体的独有的质量外。我们在书中加入了一般注释和一些个人评论。对于一些不能达到统一意见的方法，我们尽量对技术的理论和实际基础进行详细的解释，以便当问题出现时能提供有效的指导。

为了进一步获得信息，Weir、Herzenberg、Blackwell 和 Herzenberg 于 1986 年编写出版的《实验免疫学手册》(*Handbook of Experimental Immunology*) 是技术指导最好的来源，Goding (1987) 编写的《单克隆抗体：原理和实践》(*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*) 和 Springer (1985) 出版的《生物科学和医学中的杂交瘤技术》(*Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine*) 是单克隆抗体方面信息的最好来源。此外，更多的参考文献列在书中相应的部分。对于新的技术方法，读者应该事先浏览一下《免疫学方法杂志》(*Journal of Immunological Methods*) 和《分析生物化学》

(*Analytical Biochemistry*) 期刊。

在本书编写过程中,有许多同仁帮助整理方法,我们的工作常是收集、校对和注解。感谢 Joan Brugge 和她的实验室成员 (Michael DeMarco, Adele Filson, Lawrence Fox, Andy Golden, Joan Levy, Sally Lynch, Susan Nemeth, John Schmidt, 和 Susan Schuh), 他们使用了《抗体技术实验指南》第一版并给予了很大的帮助, 不仅发现错误, 而且为再版修订提供了合理化的建议。我们实验室的一些工作人员, 如 Carmelita Bautista, Karen Guchkovich, Margaret Falkowski, Julian Gannom, Richard Iggo, Margaret Raybuck, 和 Carmella Stephens 等几乎每天都使用这本手册, 他们对第一版给予了确切而精辟的批评。

Lionel Craxford, Larry Banks, Mike Krangel, Margaret Raybuck, David Chiswell 和他 Amersham 的同事们认真地阅读了本书的全部内容。他们的许多评论帮助我们解决了内容取舍的困难。本书的一至四章是由 Winship Herr, Richard Iggo 和 Jihn Inglis 阅读和评论; Steve Dilworth, Ann Harris 和 Bob Knowles 帮助整理了六至九章及十五章; Jean Beggs 和 Birgitte Lane 帮助整理十至十四章; Carl Anderson 和 Mark Zoller 负责阅读和增添附录。除了这些主要的读者外, 其他同仁也在某些章节给予了帮助。John Kilmartin, Jean Beggs, Paul Nurse 和 David Beach 等对酵母染色, Susan Alpert 对细胞免疫染色以及 Rebecca Rowehl 和 Jacqueline Bortzner 对第六、七章分别提出了宝贵的建议。Ian Mohr 建议我们把免疫学实验一章改为易于理解的形式, Seth Grant 对十二章的编写给予了帮助, Ella Wetzel 阅读并评论了第十一章的早期版本。为使这本书编写得更好, 上述同仁做出了很大的贡献。对于没有采纳的意见, 希望能够谅解。

特别感谢 Birgitte Lane, Nicky Williamson, Gordon Peters, Brenda Marriot, Frank Fitzjohn 和 Marilyn Goodwin, 在本书的编写过程中, 他们提醒我们按时上飞机, 帮助我们安排睡觉及写作的地方, 避免我们分散注意力。优秀的艺术工作是由 Mike Ockler 完成的, 在 Carl Molnod 的建议下, 封面艺术有非常大的突破。Jim Pflugrath 提供电脑图形。Christy Kuret, Michele Ferguson, Inez Sialiano 和 Susan Schaefer 提供编辑帮助。本书由 Emily Harste 设计, Nancy Ford 和 Annette Kirk 在整个工作中进行监督及提供援助。

最后特别感谢我们的编辑 Judy Cuddihy, 她耐心的忠告、鼓励和准确的判断使我们顺利通过了最好和最糟的时光。

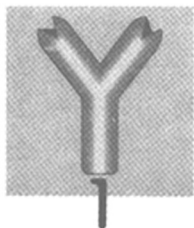
希望这本书能给读者带来乐趣。

EH 和 DL

目 录

理 论

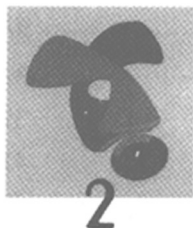
第一章 抗体的结构与功能



抗体是宿主对体内存在的外来分子、微生物或体内其他物质刺激机体产生的蛋白质。抗体主要由 B 淋巴细胞系的终末分化细胞——浆细胞产生的，并且循环在血液和淋巴液中，在此与抗原结合。抗体抗原一旦形成复合物后，主要通过巨噬细胞的吞噬作用将其由循环中清除。抗体应答是宿主抵御外来分子和微生物入侵的重要机制。

- 一、抗体是能与相应抗原以高亲合力结合的有用试剂 2
- 二、血清中含有能与抗原不同表位结合的混合抗体 2
- 三、抗体的结构由抗原结合区和细胞结合区组成 3
- 四、IgG 由 2 条相同的多肽重链和 2 条相同的多肽轻链组成 5
- 五、血清中除 IgG 分子外还有其他类型的抗体分子 5
- 六、含有一个可变区和一个恒定区的轻链一级氨基酸序列 6
- 七、含有一个可变区和一个恒定区的重链一级氨基酸序列 6
- 八、重链和轻链的可变区形成抗原结合部位 6
- 九、抗原结合部位多样性的多基因机制 7
- 十、进一步重组产生不同类和亚类的抗体 8
- 十一、可变区提供抗原结合位点和特异性，恒定区决定抗体如何发挥作用 8

第二章 抗体-抗原反应

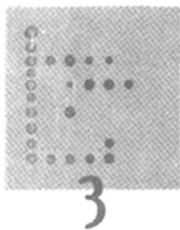


抗体与抗原的相互作用是所有免疫化学技术的基础。本章将从三个方面讨论抗体-抗原相互作用的特点：①抗体-抗原复合物的结构；②抗原-抗体相互作用的强度，即亲和力；③与免疫复合物稳定性有关的各种因素，即抗原抗体的亲合性。

- 第一节 抗体-抗原复合物的结构 18
 - 一、抗体的抗原结合位点由重链和轻链的可变区构成 18
 - 二、抗原与抗体的结合区称为表位 19
 - 三、蛋白质抗原上的表位是由相邻连续的或非连续的氨基酸序列形成的局部表面结构 19
 - 四、某些免疫复合物中抗体或抗原的结构未发生改变，而另一些则出现巨大的构

象改变	20
五、抗体-抗原复合物通过大量非共价键连接	20
六、抗体能与范围广泛的化学结构发生结合并能区分类似的化合物	21
第二节 亲和力	21
一、抗体和抗原的结合是可逆的, 相互作用的强度可以描述为平衡反应	21
二、抗体-抗原之间相互作用的亲和力有很大的差异	21
三、在特定的环境中抗体-抗原的亲和力虽然不能改变, 但可以控制免疫复合物的形成量	22
第三节 亲合性	22
一、当抗体和抗原形成多价复合物时相互作用的强度显著增加	22
二、同聚体的抗原存在相同的重复表位, 促进双价结合	24
三、和抗原上的多个位点结合的抗体能够形成大而稳定的多聚复合物	24
四、和抗原上多个位点结合的抗体为第二试剂提供大量极好的靶分子	25
五、固定在固相支持物上的抗原在高浓度时能促进高亲合性的双价结合	25

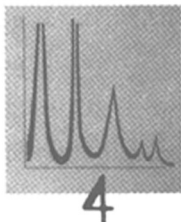
第三章 抗体的选择



各项免疫化学技术以不同的物理状态呈现抗原。免疫染色技术呈现的是天然状态的抗原; 溶液中免疫沉淀反应呈现的抗原含有大量的其他杂分子; 免疫印迹使抗原完全变性, 并且部分纯化, 但需要与固相支持物结合。由于抗原显示的多样性, 使得每一项免疫化学技术需要不同特性的抗体。

第一节 免疫化学技术成功的要素	31
一、抗体-抗原的亲合性	31
二、抗体的特异性	32
三、表位破坏	33
四、抗体的易接近性	34
五、二级试剂	36
第二节 合适抗体的选择	36
一、不同免疫化学方法的比较	37
二、最佳抗体选择方法的比较	39
三、多克隆抗体、单克隆抗体或混合单克隆抗体的应用	41
第三节 最佳二级试剂的选择	41
一、二级试剂产生的背景	41
二、商业来源试剂的灵敏度	41
三、商业来源试剂的滴度	42
四、特异性	42
第四节 索取抗体的环节	42

第四章 抗体的处理



本章将介绍抗体的储存、纯化及标记技术。一般而言，这些技术可以用于处理不同实验室自制的抗体。多数商品化标记或未标记的抗体都提供了如何存放、处理以及使用的方法。

第一节 抗体的储存	45
一、污染	45
二、储存温度	45
三、储存时间	46
第二节 抗体的纯化	48
一、推荐使用的纯化方法	49
二、纯化抗体的定性和定量	49
第三节 抗体的标记	55
一、直接法与间接法	55
二、标记物的选择	56
第四节 经蛋白 A 或蛋白 G 纯化抗体的方法（小结）	64

实 践

第五章 细胞染色

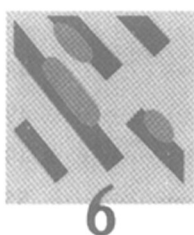


免疫染色法可用于对蛋白质抗原进行亚细胞水平的精细定位，跟踪此类抗原在细胞受刺激时分布位置的改变，或与细胞内其他蛋白质的分布进行比较。在设立严格对照组的前提下，可以用来确定细胞内某种蛋白质含量的多少。在本书中，根据被检细胞来源的不同，将免疫染色的方法分为两大类。本章讨论组织培养细胞的染色方法，下一章讨论组织与器官的染色方法。

第一节 免疫染色法的主要影响因素	67
第二节 合适抗体的选择	68
一、标本的固定	68
二、可能的交叉反应	69
三、应用单克隆抗体、多克隆抗体进行细胞染色	71
第三节 组织培养细胞免疫染色的方法	72
一、免疫染色方法的概述	72
二、细胞标本的制备	72
三、固定	76
四、抗体的结合及检测	79
第四节 免疫染色技术的特殊问题	87
一、双标记染色法	88

二、免疫染色技术与放射自显影技术的联合使用	88
三、细胞表面蛋白的染色	89
四、应用免疫染色进行细胞分选	89
五、应用免疫染色进行定量检测	89
六、生物素和链霉亲合素	90
第五节 对盖玻片上生长的细胞进行染色 (小结)	90
一、特点	90
二、操作步骤	91

第六章 组织免疫染色

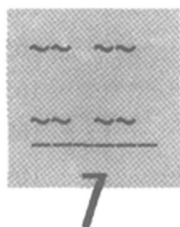


组织或整个器官的免疫染色可用于检测生理状态下抗原的定位。使用这些方法,在显像中可以了解抗原的分布,在体内状态下,对多细胞中标记的特殊细胞类型的定位,或者检测疾病组织中抗原的呈现。此方案一般要求数天时间完成多步操作,以及对所研究的组织结构需要有渊博的知识。在此过程中要求组织结构受损伤的程度较轻。因此,许多抗体在其他免疫方法检测中虽然很有效果,而在组织染色中的效果却不理想。

第一节 主要影响因素	94
第二节 合适抗体的选择	95
一、抗原特异性	95
二、固定	96
三、组织灌流	96
第三节 应用单克隆抗体或多克隆抗体进行组织免疫染色	96
一、应用多克隆抗体进行细胞免疫染色	97
二、应用单克隆抗体进行组织免疫染色	97
三、应用混合单克隆抗体进行组织免疫染色	97
第四节 组织切片的免疫染色方法	98
一、组织切片免疫染色过程	98
二、组织标本的制备	98
三、结合	102
四、检测	104
第五节 酵母菌免疫染色的特殊性	110
第六节 美丽线虫免疫染色的特殊性	113
一、Bouin 固定虫体法	114
二、多聚甲醛固定虫体法	115
三、虫体的抗体染色和检测	116
第七节 果蝇类免疫染色的特殊性	118
一、方法概述	118
二、发育早期胚胎的制备	118
三、发育晚期胚胎的制备	119
四、在果蝇类标本内加入抗体及酶标试剂染色检测	120

第八节 抗原修复方案	125
一、蛋白酶处理以暴露被掩盖的抗原表位	125
二、微波处理以暴露被掩盖的抗原表位	126
三、加压蒸煮处理以暴露被掩盖的抗原表位	126
第九节 冷冻组织切片(小结)	127

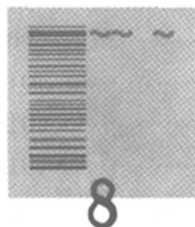
第七章 免疫沉淀



免疫沉淀可以从可溶分子的复杂混合物中纯化特定的抗原,通常为蛋白质。通过将抗原聚集在惰性微珠上,可以简单、快速地将抗原纯化10 000倍。该技术需要一天时间,而且可与其他使用固定蛋白质作为起始材料的方法相结合。

第一节 主要影响因素	131
第二节 合适抗体的选择	132
一、应用多克隆抗体进行免疫沉淀	132
二、应用单克隆抗体进行免疫沉淀	133
三、应用混合单克隆抗体进行免疫沉淀	134
第三节 免疫沉淀技术	134
一、免疫沉淀技术概述	134
二、裂解细胞	136
三、裂解物的预处理	142
四、免疫复合物的纯化	143
第四节 免疫沉淀技术的特殊问题	147
一、蛋白质相对分子质量的确定	148
二、蛋白质的稳态水平	149
三、蛋白质抗原半寿期的测定	150
四、蛋白质翻译后修饰的测定	152
五、蛋白质-蛋白质间的相互作用	154
六、蛋白质内在或相关酶活性的测定	156
七、抗原裂解物的清除	156
第五节 免疫沉淀(小结)	157

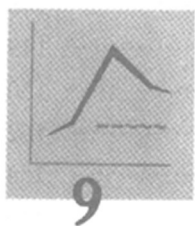
第八章 免疫印迹



免疫印迹为检测样品中是否存在蛋白抗原提供了一种可靠方法。该法鉴定蛋白质的原理是根据被测蛋白能与特异性抗体结合的特性和该蛋白的相对分子质量。免疫印迹亦可用于测定抗原的其他特征,如抗原的相对丰度或与其他已知抗原的关系。它也是评价新抗体特性的一种有用的方法。免疫印迹包括多个简单的步骤,可在一天内完成。该方法具有高效、简便、灵敏等特点。

第一节 主要影响因素	161
第二节 合适抗体的选择	161
一、变性蛋白的识别	161
二、非特异性条带	162
三、多克隆抗体或单克隆抗体的免疫印迹	163
四、检测范围	164
第三节 免疫印迹技术	165
一、免疫印迹技术概述	165
二、样品的制备	165
三、凝胶电泳	169
四、蛋白质从凝胶转印至膜	169
五、印迹膜上总蛋白的染色	175
六、抗原检测	177
第四节 检测中的特殊问题	182
一、特殊问题 1——精确定量	182
二、特殊问题 2——设置对照	182
三、特殊问题 3——用生物素/链霉亲和素检测多种属来源抗体	183
第五节 免疫印迹技术的特殊问题	183
一、免疫印迹检测酪氨酸残基的磷酸化	183
二、剥离与重复免疫印迹	183
三、免疫印迹纯化抗体	184
第六节 免疫印迹(小结)	184

第九章 免疫亲和纯化技术

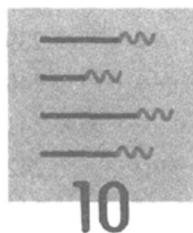


免疫亲和纯化具有以下特点：①抗体与其相应抗原结合具有高度亲和力和特异性，能大量分离天然状态或近似天然状态的抗原；②不是所有的抗体都适用于免疫亲和纯化，但一旦获得一种性能良好的抗体，纯化过程就很快而且可靠；③可按照不同规模进行，半天内即可完成；④经过简单的改进，免疫亲和法也可用于纯化针对不同抗原的特异性抗体。

第一节 主要影响因素	188
第二节 合适抗体的选择	189
第三节 应用多克隆抗体和单克隆抗体进行免疫亲和纯化	190
一、应用多克隆抗体进行免疫亲和纯化	190
二、应用单克隆抗体进行免疫亲和纯化	190
三、应用混合单克隆抗体进行免疫亲和纯化	191
第四节 免疫亲和纯化技术	191
一、免疫亲和纯化技术概述	191
二、抗体亲和层析柱的制备	192
三、抗原与抗体-微珠基质的结合	197

第五节 免疫亲和纯化的特殊问题	203
亲和纯化抗体的制备	203
第六节 免疫亲和纯化(小结)	203

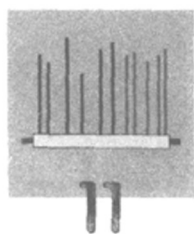
第十章 标记蛋白



采用 DNA 重组技术标记蛋白质,并可在不同宿主细胞系统中对其进行纯化和特异性检测。包括为进行检测(GFP)或纯化(如 His 标记物和谷胱甘肽-S-转移酶标记物)而设计的特异性标记物。目前已制备出与表位标记物结合力较强的特异性抗体,可用于本书中描述的所有免疫检测和纯化方法。本章主要讨论现有的各种标记物系统的优缺点,以及如何为所开展的实验选择正确的标记物。

第一节 主要影响因素	208
第二节 为何使用标记蛋白	208
第三节 蛋白检测的标记物	209
一、GFP 标记物	209
二、表位标记物	210
三、其他检测标记物	213
第四节 蛋白纯化的标记物	215
一、GST 标记物	215
二、His 标记物	215
三、表位标记物	216
四、其他纯化标记物	216
第五节 合适标记物的选择	218
一、标记蛋白的细胞和亚细胞定位检测	218
二、蛋白调控和相互作用的检测	219
三、蛋白的纯化	220
第六节 标记物插入的位置	221
第七节 制备标记蛋白	223
一、通过克隆到表达载体中进行标记	223
二、在限制性酶切位点插入合成的标记物	224
三、采用 PCR 技术插入表位标记物	225
四、多肽标记物的常见问题	227

第十一章 表位作图



对单克隆抗体和多克隆抗体识别蛋白质抗原表位的确定为免疫化学分析提供了十分有用的信息。表位作图方法是检测免疫反应特异性和鉴定不同抗体的重要方法。

第一节	确定表位的基本结构·····	232
第二节	表位作图方法的选择·····	233
第三节	竞争分析作图法·····	234
第四节	基因片段表达作图法·····	237
第五节	合成肽表位作图法·····	238
第六节	系列肽的合成或购买·····	239
第七节	生物素标记肽的检测方法·····	240
第八节	表位作图的替代方法·····	241
一、	噬菌体随机肽库结合位点作图法·····	242
二、	噬菌体特异性肽库抗体结合位点作图法·····	242

有用资料

附录 I	电泳·····	245
附录 II	蛋白质技术·····	260
附录 III	通用资料·····	278
附录 IV	注意事项·····	286
附录 V	注册商标·····	294
附录 VI	供应商·····	296

第一章 抗体的结构与功能

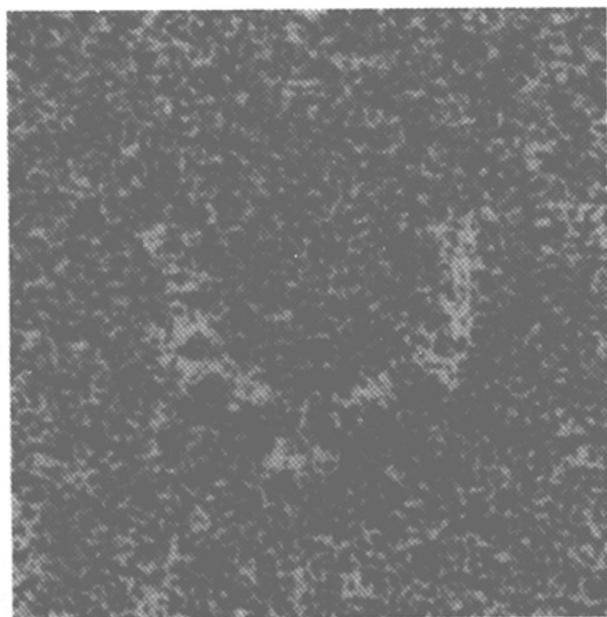


图1 1个IgG分子与2个流感病毒血凝素(HA)分子结合的三维结构，放大25万倍

IgG的Fab段轴向旋转及内部区域柔韧性的电镜照片(Wrigley NG, et al. J Mol Biol, 1983, 169: 771~774, 经原著作者同意)

多方面的大量研究使人们对抗体的结构与功能有了较精确的了解，如同其他哺乳类蛋白质一样，有关资料来源于很多不同的研究领域：早期的蛋白质生物化学研究显示，抗体是如何被酶裂解为若干个具有不同功能的片段；将罕见的免疫性疾病患者和动物体内获得的均质性抗体进行多肽序列比较，人们第一次观察到抗体的多样性；对这种多样性的来源及其产生原因的理解则来自现代分子生物学研究。通过分子生物学研究提供了探讨抗体功能区细微结构的工具，以及通过改变鼠基因可以详细研究有关抗体的调控和功能；细胞生物学研究证明抗体是如何合成和转运的；通过冷冻蚀刻电镜（图1）和精密的X射线晶体衍射分析揭示了抗体的结构。所有这些工作对认识抗体功能起到了极大的促进作用，并且使人们将抗体作为最重要的工具之一应用到现代生物学研究领域。

抗体是宿主对体内存在的外来分子、微生物或者其他因子的应答而产生的蛋白质。抗体主要由B淋巴细胞系的终末分化细胞——浆细胞产生的，并且循环在血液和淋巴液中，在那里抗体与抗原结合。抗原抗体一旦形成复合物后，主要是靠巨噬细胞的吞噬