

多克隆抗体制备

多抗制备通常用抗原免疫动物，激发动物机体免疫系统产生抗体，最后通过获取动物高免血清获得抗体；获得的高免血清大部分可以直接使用，用于普通免疫学实验，有些则需要进一步纯化修饰才可以使用。

动物免疫

动物的免疫是制备抗体最为重要的环节之一，最好选择与抗原物种远亲缘动物进行免疫。下表列出常规抗原在不同动物上的免疫剂量和免疫程序。

动物免疫程序和剂量：以蛋白类抗原为例

天数	佐剂类型	免疫程序	剂量（质量/体积）					
			兔子	小鼠	大鼠	豚鼠	山羊	鸡
0	完全佐剂	预取血(血清背景检测)首次免疫	100μg/500μl	40μg/50μl	100~500μg/200μl	100~500μg/200μl	1000μg/1000μl	300~500μg/300μl
20	不完全佐剂	第一次加强免疫	100μg/500μl	40μg/50μl	100~500μg/200μl	100~500μg/200μl	1000μg/1000μl	300~500μg/300μl
40	不完全佐剂	第二次加强免疫	100μg/500μl	40μg/50μl	100~500μg/200μl	100~500μg/200μl	1000μg/1000μl	300~500μg/300μl
60	不加佐剂	第三次加强免疫(静脉)	100μg/500μl	40μg/50μl	100~500μg/200μl	100~500μg/200μl	1000μg/1000μl	300~500μg/300μl
70			终放血					

*一般免疫间隔为3周，如果比较急，也可间隔2周免疫一次。

动物的准备及血清背景测试

选取健康符合实验动物标准的动物，免疫前需要静养一周，免疫前采血进行背景测试。

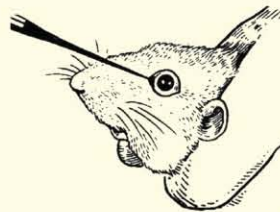
SOP13 兔耳静脉取血方法

耳静脉取2ml血，一般来说取1ml以上是足够做背景测试用的。

- 1.将兔子固定在固定盒内，轻轻抚摸背部使其安静下来。
- 2.用75%酒精棉擦拭兔耳朵，使其耳静脉可见，必要时可用刮刀刮净兔耳上的毛，如果血管依然不明显可用二甲苯擦拭，使其血管膨胀。
- 3.用5ml注射器针头平行插入耳静脉，轻轻回吸（吸的太快，静脉不能及时回血，血管会堵塞针头），血液缓冲进入注射器管腔。
- 4.迅速将注射器中的血液注入离心管，37℃放置1h，4℃过夜血清析出。
- 5.将血清析出的离心管于4℃，10,000rpm离心10min，收集上清，即为血清；短期不使用，需加入0.02%NaN₃，-20℃保存。

SOP14 大小鼠眼眶取血方法

- 1.将大/小鼠按压在鼠笼上，拇指、食指和中指联合固定其头部。
- 2.紧握颈部，压迫颈部两侧使眼突出，眶后静脉丛充血；右手持毛细管从眼内眦（zì）部与水平面成45°夹角旋转刺入。
- 3.固定身体，压住后肢，放松手指，调整毛细管，使血流顺畅，用离心管接收。接收完毕，离心管于37℃放置1h，4℃过夜血清析出。
- 4.取血完毕，放松颈部压力，拔出毛细管，干棉球按压止血。
- 5.将血清析出的离心管于4℃，10,000rpm离心10min，收集上清，即为血清，短期不使用，需加入0.02%NaN₃，-20℃保存。



动物血清背景测试

方法见下文ELISA效价测定方法。

抗原免疫前准备

SOP15 弗氏佐剂乳化免疫抗原

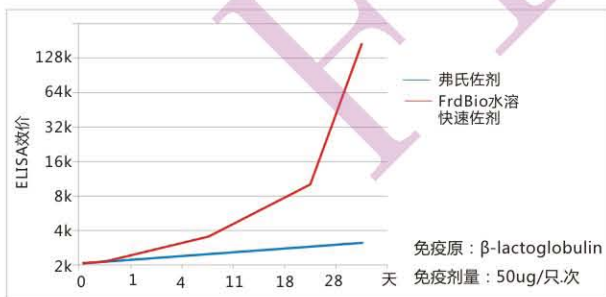
1. 抗原溶解在灭菌的0.85% NaCl溶液或PBS (pH7.2) 中, 抗原总量根据抗原性质不同而异, 可参考上表, 蛋白抗原以250µg/只兔子为宜, 多肽和小分子抗原需加大剂量, 最多不超过500µg为宜。

2. 抗原加入等体积佐剂乳化 (除首次使用弗氏完全佐剂外, 以后全部用弗氏不完全佐剂。完全佐剂使用时, 一定要将底部橘黄色沉淀搅起); 乳化可用双注射器反复推动, 也可用银汞调合器或超声波乳化。

判断乳化是否成功方法: 取一滴乳化液滴在水面上, 以不迅速扩散为宜, 乳化好的抗原总量应该为400~500µl/只兔子左右(其他参照上表)。否则注射动物体内难于释放抗原, 反而不利于抗体产生。

乳化的过程中, 由于乳化状态的抗原粘度粘壁, 会有部分的抗原损失, 剂量和体积越小相对损失越多, 所以对于微量珍贵抗原尽可能选用水溶性佐剂。

快速免疫佐剂: 为了快速获得高免血清或者抗体, 可以使用Frdbio快速水溶性佐剂 (针对不适合乳化或者微量抗原)。



Frdbio水溶性佐剂与弗氏佐剂效价监测比较

动物免疫

SOP16 兔注射免疫

1. 小心从笼中取出兔子, 固定在固定架上, 轻抚背部使其安静。

2. 用75%酒精棉球擦拭消毒, 将背部免疫部位皮肤提起, 针头与皮肤呈15°角插入皮下1~2 cm, 注射完后稍等停留10秒左右, 以防抗原外流。

注射宜采用多点注射 (免疫部位: 背部皮下、颈部皮下或腹股沟淋巴结等, 免疫点越多越好)。

3. 每次免疫前耳静脉取血测定效价 (测定方法见下文ELISA方法), 免疫后第10~14天抗体效价达到峰值。

SOP17 鸡的选择和免疫

1. 选成年产蛋母鸡或即将产蛋的母鸡 (鸡龄不宜太大, 偏大的免疫效果不是很好) 用于免疫。

2. 免疫途径: 翅部肌肉注射免疫, 免疫剂量与兔子相同或略低。

3. 免疫间隔: 0天, 21天, 35天, 49天, 63天。

4. 蛋的收集: 免疫结束后过10天收集蛋, 可以收1个月左右, 如果还需要收集, 可以加强免疫1次。



Frdbio水溶性佐剂

货号	产品名称	规格	产品描述
ABR0010	Frdbio®水溶性佐剂	1ml × 5	水溶性佐剂, 对抗原结构没有影响, 乳化方便, 抗原使用量少, 抗体滴度提升快速。
ABR0021	Frdbio®不完全佐剂	10ml × 10	性质同弗氏不完全佐剂, 性价比优于Sigma F5506。
ABR0022	Frdbio®完全佐剂	10ml × 10	性质同弗氏完全佐剂, 性价比优于Sigma F5881。

更多信息, 请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

抗体效价的监测/检测

SOP18 间接ELISA法检测抗血清效价

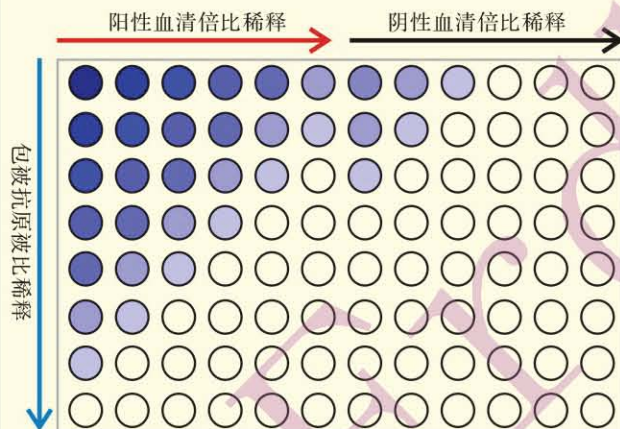
通过间接ELISA法确定抗原最佳包被浓度(方阵滴定,也叫棋盘滴定法)。

以免高免血清多抗效价检测为例

1.抗原用包被缓冲液CBS(0.05M碳酸盐缓冲液,pH9.6)按1μg/ml浓度,作连续1:2倍比稀释,每个稀释度包被一行(12孔/行),100μl/孔加入酶标板中,覆膜密封(防止水分挥发)4℃包被过夜(12h以上)。

2.次日甩掉板中液体,在吸水纸上拍干板子,每孔加入150μl封闭液(含2% BSA的包被缓冲液CBS),室温(25℃)2h以上。

3.用洗涤液PBST(含0.05% Tween-20的PBS,pH7.4)洗板3次,此时将待测高免阳性血清和空白阴性血清用抗体稀释液(含1% BSA的PBS缓冲液,pH7.4)分别从1:500开始做连续1:2倍比稀释,按下图分布模式100μl/孔,37℃ 孵育1h。



方阵滴定实验设计图

4.取出拍干,洗涤液洗板3次,每孔加入100μl二抗工作液(用抗体稀释液1:3000稀释HRP标记羊抗兔IgG,Frdbio, Cat No.:SAB90200H),37℃孵育1h。

5.取出拍干,洗涤液洗板3次,每孔加入100μl单组份TMB底物(Frdbio,Cat No.:ELS0010),室温孵育5~20min(根据颜色的改变速度确定合适的终止时间)。

6.每孔加入50μl终止液(0.5M H₂SO₄)。

7.在酶标仪上读取450nm/630nm的吸光度。

标准的结果分布模式应该如上图所示:ELISA酶标板显色由阴/阳性区域第一行第一列孔向外呈均匀放射状递减;如果在包被梯度方向上OD₄₅₀过高无梯度,应该继续降低包被浓度;反之,则增加。同理,如果在免疫血清稀释度方向上OD₄₅₀过高无梯度,则应继续加大稀释度,反之,则减小。

8.最佳包被浓度的确定

阳性血清区域内某个孔对应的OD值与其上/其左孔OD值恰好为2倍关系且OD值不低于1.2,且此孔对应的阴性血清区域OD值与空白对照孔OD值无差异,此孔包被的抗原浓度的2倍确定为抗原的最佳包被浓度。同理也可以参照此方法确定阳性血清的最佳稀释倍数。

如果方阵滴定的数值结果不能如图分布,则需要重新设计方阵实验。

9.以最佳包被浓度将抗原按照上述方法包被到酶标板后封闭,将阴性/阳性血清依次倍比稀释,100μl加到酶标板孔(最好做复孔),然后依次加入二抗、底物显色,读取OD值。

对应稀释度阴性血清OD值的2.1倍确定为阳性值,也称Cut-off值,这个是检验学上的常用方法,而往往制备抗体的高免血清的稀释度都比较高,其对应稀释度的阴性血清值接近于空白值,所以这个判断方法作为ELISA稀释终点没有意义,Frdbio定义ELISA终点方法为:OD值-空白值或阴性对照值≥0.100(前提条件是空白孔值和阴性对照孔OD值<0.050),可以根据自己的实验室具体情况自己确定合适的终点判定标准。

货号	产品名称	规格	产品描述
ELS0001	Frdbio®高吸附酶标板	10plates	蛋白吸附量大,背景低。
ELS0203	Frdbio®酶标板稳定剂	10plates	稳定抗原包被后的酶标板,稳定期长达2年,检测值下降不超过15%。
ELS0030	Frdbio® Efficient Coating Plate	10 plates	共价包被,不易脱落,包被环境中性,不损伤蛋白,蛋白用量少。
IMR0201	Frdbio®抗体稀释液	100ml	最大限度提高抗原抗体结合,同时降低非特异性结合背景问题。
IMR0202	Frdbio® HRP酶标抗体稀释液	100ml	最大限度提高抗原抗体结合,提高酶活性,降低非特异性酶底反应。
ELS0010	Frdbio®单组份TMB	100ml/500ml	即用型TMB底物,直接使用,灵敏度稳定性优于进口Sigma T0440。
IMR0101	Frdbio®免疫检测信号增强剂	100ml/500ml	增强抗原与抗体的结合,最高可以提高信号10倍,适用于ELISA和Western Blot。

更多信息,请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

动物免疫血清采集与保存

选取健康符合实验动物标准的动物，免疫前需要静养一周，并采血进行背景测试。

SOP19 兔颈动脉放血与血清分离

1. 将免疫兔仰面固定于固定架上，头部放低，暴露颈部。
2. 沿中部中线用2%普鲁卡因液局部麻醉，15min后剪开颈中部皮肤10cm长。沿气管钝性分离皮下组织，暴露气管前的胸锁乳突肌。
3. 分离胸锁乳突肌与气管间的颈三角疏松组织，肌束下面靠近气管两侧，找到颈部动脉（鲜红色搏动），分离颈动脉，两根棉线分别套入颈动脉，其中一根扎紧在颈动脉的远心端，另外一根暂时不扎。
4. 腹腔内注射1mg肾上腺素。
5. 止血钳夹紧颈动脉近心端血管，用眼科剪刀在棉线扎

系结与止血钳之间血管侧面剪开一个小口，将采血针塑料管向近心端方向插入，并扎紧棉线固定塑料管，将塑料管裸露的一头引入离心管并固定，松开近心端止血钳，血液就可以喷入离心管。

6. 抬高固定架尾部，同时挤压心脏，可以增加取血量，一般每只兔子可以取血80~100ml。
7. 将血清放在室温1h，然后放在4℃过夜，使血块收缩。
8. 将离心管放入离心机，4℃ 2,500rpm离心30min，收取上层血清。

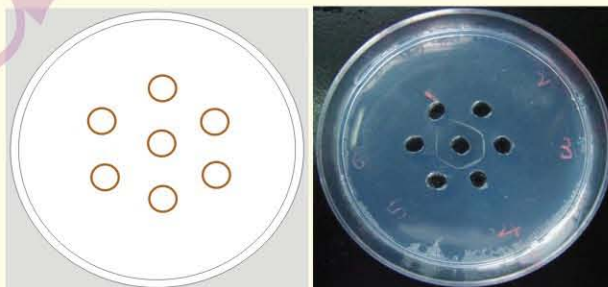
抗血清效价的测定

抗血清效价的测定除了以上的ELISA方法，还可以用琼脂扩散实验来进行。

SOP20 琼脂扩散实验检测抗血清效价

1. 称取1.0g琼脂糖融解在100ml PBS(pH7.4)或0.85%生理盐水中。
2. 将琼脂糖趁热倒在干净的玻片或平皿上，琼脂厚度约3mm。
3. 待其冷却，在其上按照梅花形排布打3~5mm小孔，并挑出孔中琼脂。
4. 在中间孔加入1mg/ml的抗原，加满不要溢出到其他孔。
5. 周边孔分别加入用生理盐水依次被比稀释的抗血清。
6. 加好后将玻片或平皿放入湿盒置于37℃孵育过夜。

7. 次日取出，在散射光下，稀释的抗体与中心抗原孔之间有白色沉淀线为阳性，否则为阴性。



琼脂扩散实验测抗体效价

服务编号	服务名称	服务描述
PAC0010	兔多克隆抗体制备服务	免疫2只新西兰大白兔，重组蛋白ELISA效价不低于1:10 ⁶ ，多肽ELISA效价不低于1:10 ⁵ 。
PAC0020	小鼠多克隆抗体制备服务	免疫5只Balb/c小鼠，重组蛋白ELISA效价不低于1:10 ⁶ ，多肽ELISA效价不低于1:10 ⁵ 。
PAC0021	小鼠快速多克隆抗体制备	45天免疫周期。免疫5只Balb/c小鼠，重组蛋白ELISA效价不低于1:10 ⁶ ，多肽ELISA效价不低于1:10 ⁵ 。

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

抗血清的保存

将以上获取的抗血清加入0.01%硫柳汞后者0.1%叠氮化钠，可于4℃保存3个月，或者加入30%甘油-20℃以下保存，建议分装成小管，避免反复冻融。抗血清也可以冻干保存。