



# 生物化学实验

## 免疫学实验技术

### 6.3 免疫血清的制备

北京大学 王青松 胡晓倩

# 概述

- 制备高特异性、高效价的抗体是免疫学检测的基础，高效价、高特异性的免疫血清广泛应用于生命科学实验研究、免疫学诊断及免疫治疗等方面，因此免疫血清的制备是免疫学基础实验技术。
- 免疫血清，也叫抗血清（antiserum），含有对应于特定抗原的多个抗原表位的高效价特异性多克隆抗体（ polyclonal antibody）。

# 实验原理

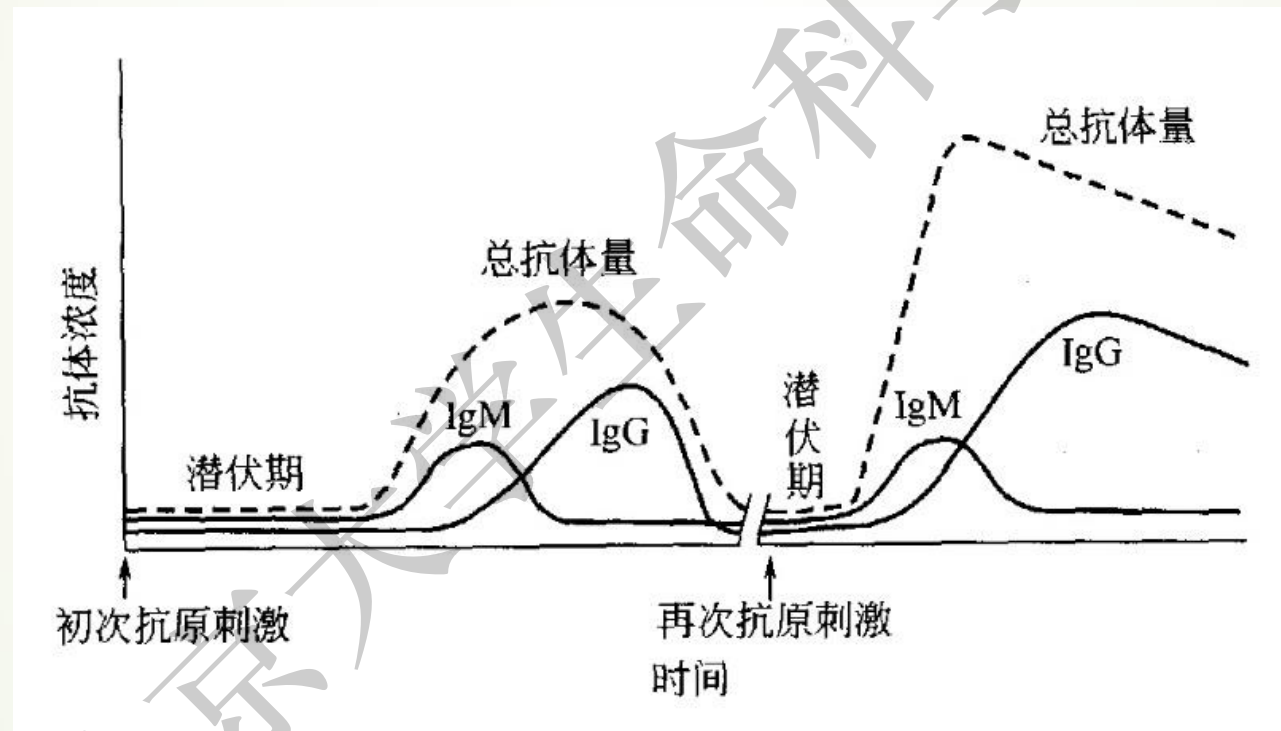
- 机体受抗原刺激后，相应的B淋巴细胞被激活，增殖分化形成浆细胞（抗体形成细胞），分泌特异性抗体。
- 由于抗原分子表面的不同抗原表位被不同特异性的B淋巴细胞所识别，因此由某一抗原刺激后产生的抗体实际上是针对抗原分子表面不同抗原表位的抗体混合物，即多克隆抗体。



# 实验原理

- **初次免疫应答：**当抗原初次进入具有免疫应答能力的动物体内后，经过一段较长的潜伏期才能在血液中出现抗体，初期是低亲和力的IgM，随后产生IgG，在这段时期内总抗体量较少，且维持时间短，这次机体对抗原产生的应答反应为“初次免疫应答”。
- **再次免疫应答：**当同一抗原再次进入机体时，经过短暂的潜伏期，血液中很快出现抗体，抗体总量明显高于初次应答反应，且维持时间较长，**抗体的主要成分是高亲和力的IgG类抗体**，这次机体对抗原产生的应答反应为“再次免疫应答”。

# 初次及再次免疫应答反应



动物机体的初次及再次免疫应答反应

# 抗体产生的阶段

## 1) 静止期 (2天)

- 血液中无抗体，仅有抗原。

## 2) 指数期 (4天)

- 动物体内抗体水平上升，抗体含量6~7天达高峰

## 3) 稳定期 (2~4周)

- 抗体水平相对稳定

## 4) 下降期

- 几个月至一到两年
- 抗体水平缓慢下降

# 免疫血清制备的基本流程

1. 制备  
免疫原

2. 免疫  
动物

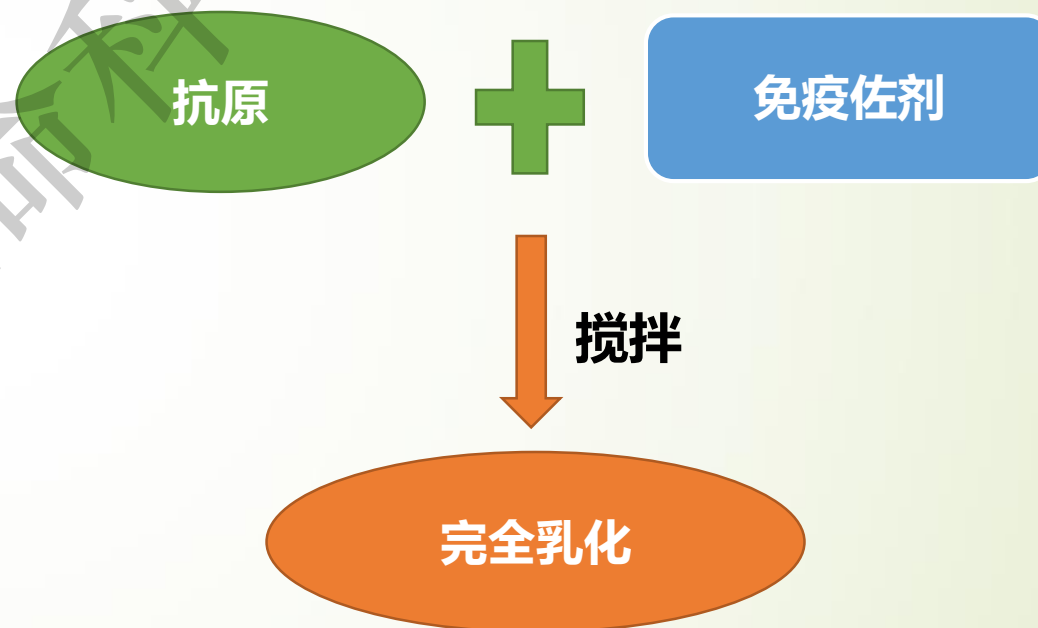
3. 分离  
抗血清

4. 保存  
抗血清

5. 鉴定  
抗体

# 1. 制备免疫原

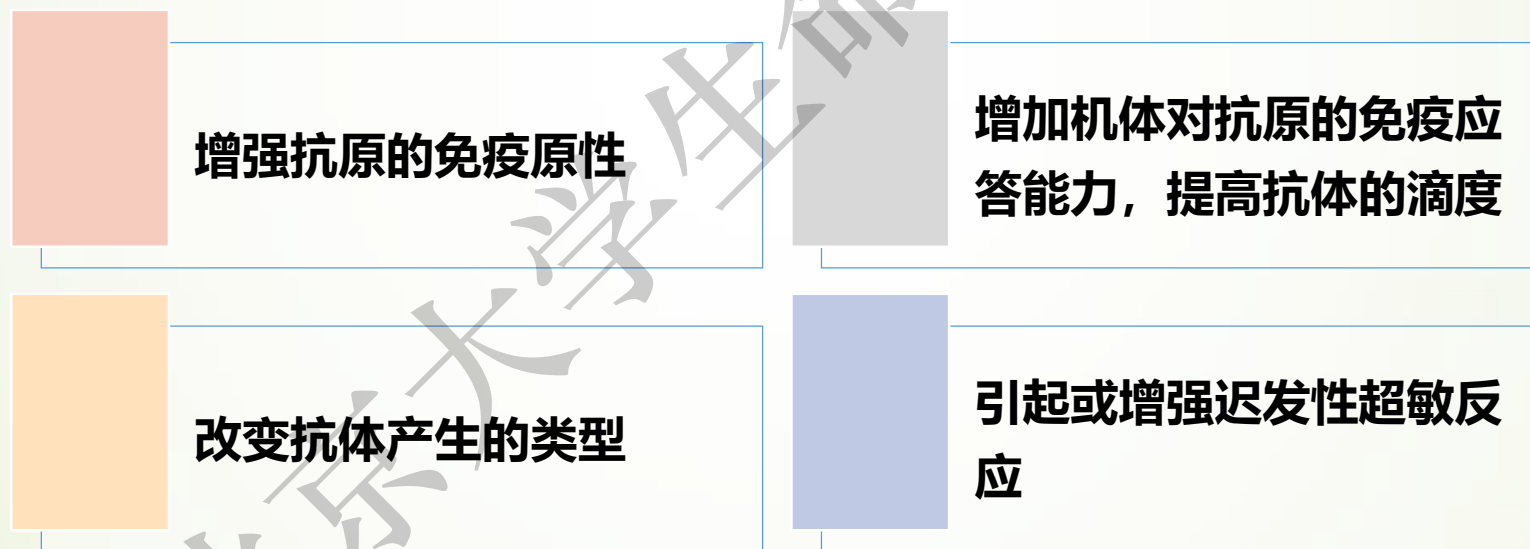
- 免疫原 (immunogen) : 包括天然抗原、人工或合成抗原。可制备为:
  - 颗粒性抗原: 细胞、细菌、寄生虫
  - 可溶性抗原: 蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、核酸等
  - 半抗原: 需与大分子蛋白质载体交联, 方可免疫动物。





# 免疫佐剂

- 免疫佐剂 (immunoadjuvant) 是先于抗原或与抗原混合在一起注射到动物机体，能够增强免疫应答或改变免疫应答类型的物质。



**免疫佐剂的作用**

# 常用免疫佐剂

- 弗式佐剂是免疫血清制备中最常用的佐剂，它分为：
  - **不完全弗式佐剂**：将抗原水溶液与等量的油剂（石蜡油或植物油）混合，再加入乳化剂羊毛脂混合制成油包水的抗原乳剂。
  - **完全弗式佐剂**：在不完全弗式佐剂中加入**灭活的结核杆菌或卡介苗**。

## 2. 免疫动物



- 由于动物的遗传性不同，同一抗原对不同种的动物、同种不同品系的动物甚至同一品系不同动物个体产生特异免疫反应的强弱都不相同，**必须选择对该种抗原敏感的动物。**

# 免疫动物选择需考虑

## 抗原与动物种属的关系

- 抗原来源与免疫动物的亲缘关系越远，免疫原性越强。
- 太近不易产生高效价的抗体。

## 动物个体的选择

- 年龄、体重、健康及性别。
- 免疫动物最好选择雄性个体，年龄不宜太大或太小。

## 抗血清的量

- 马或羊等大型哺乳动物：适用于制备大量抗血清。
- 家兔或鼠：适用于少量制备抗血清，常用于生物学实验室研究。

# 免疫剂量/免疫途径/间隔时间

## 免疫剂量

- 依据抗原的免疫原性强弱、相对分子质量大小、抗原来源及成本等来确定抗原剂量。中间剂量范围内，免疫原剂量适当增加可获得高效价抗体。

## 免疫途径

- 免疫应答水平：皮内 > 皮下 > 肌肉 > 腹腔 > 静脉 > 口服

## 间隔时间

- 第1次和第2次免疫之间间隔2 ~ 3周，以后每1 ~ 2周加强免疫1次。

### 3. 分离抗血清



- **动物采血方法：**

- **心脏采血法：**心脏穿刺采血，常用于家兔、大鼠等小动物，操作不当容易引起动物死亡。
- **静脉采血：**部分采血，动物可继续饲养，家兔可用耳静脉放血，羊、马可用颈静脉采血。
- **颈动脉放血法：**一次性放血较为常用的方法，家兔、羊等动物放血常用，其放血量较多。

# 抗血清分离步骤

收集血液样品，  
室温放置2~4  
h，血块形成



4°C过夜放置



血清转移至离  
心管，离心  
(3000 g,  
10 min, 4°C)



取上清，即得  
抗血清

## 4. 保存抗血清

### 1. 分装/低温保存

- 按需分装后，放-20℃或-80℃可长期保存，**避免抗体反复冻融。**

### 2. 冷冻干燥保存

- 抗血清分装，低温真空干燥后，4℃保存。

### 3.. 加防腐剂保存

- 抗血清中加入终浓度0.02%的叠氮化钠或0.02%的硫柳汞，-20℃一般可保存2~5年，4℃可保存半年。

### 4. 中性甘油保存

- 抗血清中可加入终浓度50%的甘油，-20℃长期保存。

- **高浓度保存：抗体浓度越高 (> 1 mg/mL) ，保存效果越好。**



## 5. 鉴定抗体

抗体效价的测定

• ELISA间接法、凝集试验、双向免疫扩散法

抗体特异性的鉴定

• 蛋白质免疫印迹、双向免疫扩散法

抗体纯度的鉴定

• SDS-PAGE电泳

抗体亲和力的鉴定

• 平衡透析、非竞争ELISA法、竞争结合法

- 抗体效价测定，详见：6.5 酶联免疫吸附测定-间接法测定抗血清效价