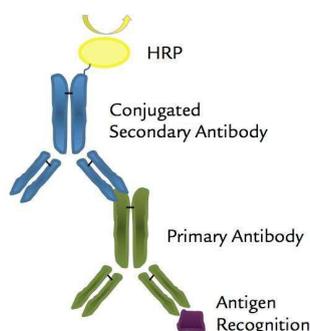


抗体标记实验技术

抗体标记简介



抗体标记是指将标记物（酶，荧光素，生物素等）共价连接到抗体上，与待检测物（如某些特定抗原）特异性反应形成多元复合物，并借助于荧光显微镜、射线测量仪、酶标检测仪、电子显微镜和发光免疫测定仪等精密仪器对试验结果直接镜检观察或进行自动化测定，可以在细胞、亚细胞、超微结构及分子水平上对抗原、抗体反应进行定性和定位研究或应用各种液相和固相免疫分析方法对体液中的半抗原、抗原进行定性和定量测定。目前抗体标记技术已被广泛用于医学病理

学、免疫组织化学、分子生物学、生物制药等领域的分析研究与技术测定，常见的抗体标记技术包括酶标记法，生物素化标记法，荧光素标记法和胶体金标记法等。

常用的抗体标记技术

1. 抗体的酶标记法

通过共价键经适当方法将酶联结在抗体上，制成酶标抗体，再借酶对底物的特异催化作用，生成有色的不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒，这些有色产物可用肉眼、光学显微镜和电子显微镜观察，也可以用分光光度计测定，呈色反应显示了酶的存在，从而证明发生了相应的免疫反应。

实验中使用偶联剂使酶与抗体结合，即通过应用单、双或多功能试剂，分别与大分子的抗体所存在的功能性基团发生反应，生成酶—抗体偶联复合物。不同的酶—抗体复合物制备方法中，最广泛应用的戊二醛法，本法与其它偶联方法相比，具有操作简单、反应条件温和，及实用面广等长处。

酶标记抗体的质量主要取决于纯度好、活性强及亲和力高的酶和抗体，其次要有良好的制备方法。高质量的抗体则可通过提取纯化而获得。在制备方法上，宜选用产率高、不影响结合物的活性和不混杂干扰性物质且操作简便易行的方法。

1) 辣根过氧化物酶(HRP)

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记单抗和多克隆抗体的常用方法是过碘酸钠法。其原理是 HRP 的糖基用过碘酸钠氧化成醛基, 加入抗体 IgG 后该醛基与 IgG 氨基结合, 形成 Schiff 氏碱。为了防止 HRP 中糖的醛基与其自身蛋白氨基发生偶合, 在用过碘酸钠氧化前先用二硝基氟苯阻断氨基。氧化反应未了, 用硼氢化钠稳定 Schiff 氏碱。

操作步骤:

将 5mg HRP 溶于 0.5ml 0.1mol/L NaHCO₃ 溶液中; 加 0.5ml 10mmol/L NaIO₄ 溶液, 混匀, 盖紧瓶塞, 室温避光作用 2 小时。

加 0.75ml 0.1mol/L Na₂CO₃ 混匀。

加入 0.75ml 小鼠已处理的腹水, 或纯化单抗等 (15mg/ml), 混匀。

称取 Sephadex G25 干粉 0.3g, 加入一支下口垫玻璃棉的 5ml 注射器外筒内; 随后将上述交联物移入注射器外套; 盖紧, 室温作用 (避光) 3 小时或 4°C 过夜。

(用少许 PBS 将交联物全部洗出, 收集洗出液, 加 1/20V 体积新鲜配制的 5mg/ml NaBH₄ 溶液, 混匀, 室温作用 30 分钟; 再加入 3/20V NaBH₄ 溶液, 混匀, 室温作用 1 小时 (或 4°C 过夜)。

将交联物过 Sephadex G200 或 Sepharose 6B (2.6×50cm) 层析纯化, 分管收集。

酶结合物质量鉴定:

克分子比值测定

酶量 (mg/ml) = OD₄₀₃ × 0.4

IgG 量 (mg/ml) = (OD₂₈₀ - OD₄₀₃ × 0.3) × 0.62

克分子比值 (E/P) = 酶量 × 4 / IgG 量, 一般在 1-2 之间。酶结合率 = 酶量 × 体积 / 抗体, 标记率一般为 0.3-0.6, 即 1-2 个 HRP 分子结合在一个抗体分子上, 标记率可大于 0.6, 0.8, 0.9; OD₄₀₃ / OD₂₈₀ 等于 0.4 时, E/P 约为 1。

标记率 = OD₄₀₃ / OD₂₈₀

酶活性和抗体活性的测定可应用 ELISA 法、免疫扩散、DAB-H₂O₂ 显色反应测定酶结合物的酶活性, 抗体活性及效价、特异性。

HRP 抗体结合物的保存: 加入等量甘油后, 小量分装 -20°C 存放, 防止反复冻融; 或加入等量 60% 甘油 4°C 保存; 不宜加 NaN₃ 或酚防腐, 否则会影响酶活性。必要时冻干保存, 以 BSA 或脱脂牛奶作保护剂。

2) 碱性磷酸酶 (AKP)

碱性磷酸酶 (AKP) 用于标记抗体, 常用戊二醛一步法, 将酶和单抗混合, 再加入适量戊二醛, 使酶和抗体蛋白的 NH₂ 分别与两个醛基结合, 制备成结合物。该法简便, 但所得产物不均一, 抗体活性损失大, 酶标记率低。

操作步骤:

- 将 5mg AKP 加入 1ml 抗体溶液 (2mg/ml) 中溶解, 装入透析袋, 于 4°C 对 0.01mol/L PH7.2 PBS 透析 18 小时, 换液三次。
- 加入 2.5% 戊二醛 20ul, 室温作用 1-2 小时, 4°C 对 PBS 透析过夜, 其间换液三次。
- 换用 0.05mol/L PH8.0 Tris-HCl 缓冲液透析, 4°C 过夜, 换液三次。
- 取出标记抗体, 用含 1%BSA 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至 4ml, 即为 AKP 标记物原液。
- 每毫升中加入 0.4ml 甘油, 小量分装, 保存备用。

2. 抗体的生物素化标记

亲和素与生物素都可与蛋白质(包括抗原、抗体、酶等)、荧光素等分子结合而不影响后者的生物活性, 是理想的标记剂。一个抗体分子可偶联数十个生物素或亲和素分子, 而亲和素或生物素分子又可与酶或荧光素结合, 从而组成一个生物放大系统, 显著提高检测的灵敏度。常用的有亲和素--生物素标记法(Labeled avidin biotin, LAB)、亲和素-生物素桥法(bridged avidin biotin, BAB)和亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(avidin biotin peroxidase complex, ABC)。本实验可使抗体或其它蛋白质的ε-氨基通过手臂与酰化的生物素共价结合。其后, 生物素化的分子可应用酶标-亲和素或荧光染料-链霉亲和素复合物来检测。

操作步骤:

- 将待生物素化的蛋白质用 0.1 mol/L 碳酸氢钠缓冲液 (pH 8.0) 或 0.5 mol/L 硼酸缓冲液 (pH 8.6) 稀释到 1mg/ml, 一般实验室应用的生物素化体积为 1-2.5ml;
- 交互用 0.1 mol/L 碳酸氢钠缓冲液 (pH 8.0) 或 0.5 mol/L 硼酸缓冲液 (pH 8.6), 对蛋白质充分透析;
- 用 1ml DMSO 溶解生物素琥珀酰亚胺酯 (NHSB) 1mg;
- 向 1ml 蛋白质溶液 (即含蛋白质 1mg) 加入 120μl NHSB 溶液 (即含 NHSB 120 μg);
- 在室温下持续搅拌, 保温 2-4 小时;
- 加入 9.6μl 1 mol/L NH₄Cl (每 25 μg NHSB 加 1 μl), 在室温下搅拌 10 分钟;

- 在 4°C，对 PBS 充分透析，以除去游离的生物素；
- 将样品上 1ml 的分子筛柱，以 PBS 缓慢洗脱，收集 1ml/管，蛋白质在 1-3ml 之间洗下；
- 最后，样品加入叠氮钠（终浓度 0.5g/L）及 1.0g/L

BSA。将结合产物置 4°C，避光保存，亦可加入 50%重蒸甘油，置 -20°C 保存。

实验要点及说明

- 如在反应混合液中有叠氮钠或游离氨基存在，会抑制标记反应。因此，蛋白质在反应前要对 0.1 mol/L 碳酸氢钠缓冲液或 0.5 mol/L 硼酸缓冲液充分透析；
- 所用的 NHSB 及待生物素化蛋白质之间的分子比按蛋白质表面的 ϵ -氨基的密度会有所不同，选择不当则影响标记的效率，应先用几个不同的分子比来筛选最适条件；
- 用 NHSB 量过量也是不利的，抗原的结合位点可能因此被封闭，导致抗体失活；
- 由于抗体的氨基不易接近可能造成生物素化不足，此时可加入去污剂如 Triton X-100, Tween 20 等。
- 当游离 ϵ -氨基（赖氨酸残基的氨基）存在于抗体的抗原结合位点时，或位于酶的催化位点时，生物素化会降低或损伤抗体蛋白的结合力或活性。此时，应试用其它交联方法；
- 生物素还可能与不同的功能基团，如羰基、氨基、巯基、异咪唑基及苯酚基，也可与糖基共价结合；
- 交联反应后，应充分透析，否则，残余的生物素会对生物素化抗体与亲和素的结合产生竞争作用；
- 在细胞的荧光标记实验中，中和亲和素的本底低，但由于链霉亲和素含有少量正电荷，故对某些细胞可导致高本底。

3. 抗体的荧光标记法

荧光抗体标记技术是将荧光素以化学方法与特异性抗体共价结合，形成荧光素-蛋白质结合物（即荧光标记抗体），此结合物仍保留着抗体活性，同时具有荧光素的示踪作用。当它与相应的抗原特异结合后，借助于荧光显微镜观察呈现明亮的特异荧光。实验中常用异硫氰基荧光黄（fluorescein isothiocyanate, FITC）作为标记物，在碱性溶液中，FITC 上的化学基团异硫氰基（ $-N=C=S$ ）与抗体蛋白自由氨基（主要是赖氨酸的 ϵ -氨基）结合，形成荧光抗体，以测定细胞相应抗原的存在。FITC 具有很高的量子产量（发射光与吸收光的比值, 0.85），而且形成的偶联物的稳定性很好。FITC 是应用最广的荧光染料，流式细胞仪就按 FITC 的特性，设计了激光波长为 488 nm, 很接近于 FITC 的最大激发波长 492nm）。

作为标记的荧光素应符合以下要求：

- 应具有能与蛋白质分子形成共价键的化学基团，与蛋白质结合后不易解离，而未结合的色素及其降解产物易于清除。
- 荧光效率高,与蛋白质结合后，仍能保持较高的荧光效率。
- 荧光色泽与背景组织的色泽对比鲜明。
- 与蛋白质结合后不影响蛋白质原有的生化与免疫性质，与蛋白质的结合物稳定，易于保存。
- 标记方法简单、安全无毒。

操作步骤：

- 用碳酸氢钠缓冲液 pH9.8 稀释抗体为 1-5mg/ml，或抗体对该缓冲液充分透析，以足以使赖氨酸不解离（去其正电荷），但注意保持大部分蛋白质仍未变性；
- 将透析袋放入 100ml 含 0.1 mg/ml 的 pH9.8 碳酸氢钠缓冲液（新配制）的烧杯中，用铝铂包烧杯以避光，4°C 搅拌过夜；
- 上述抗体液对 PBS 在 4°C 透析以终止反应。其间至少更换 PBS 液三次，直致 480nm 的吸收为零；
- 加入 0.5g/L 的叠氮钠。此后，结合物在 4°C 避光保存，或分装后在 -20°C 冻存。

荧光偶联质量的检测

- 用标准免疫荧光染色试验以测定偶联率。
- 或用 F/P 值测定对其 FITC 标记质量进行鉴定。
- 取结合物液 0.2ml，加 PBS 2.8ml（或两者均改用半量），测定其 A490/A280，查 FITC 标志曲线得其浓度 $\mu\text{g/ml}$ 值，按 IgG 的消光系数（mg/ml 约 A280 1.2），可计算其 F/P 值，即每 mg 抗体所标记的 FITC 的比值，以此鉴定及比较各批标记物的质量。

实验要点及说明

- 偶联反应要求在尽可能接近 pH9.8 的溶液中进行，而且注意在反应过程中要保持此 pH 水平；
- 要确定在偶联反应缓冲液中不含游离氨基（Tris, 氨及叠氮钠均可与 FITC 反应，因此会降低蛋白质与 FITC 的偶联率）；
- FITC 与蛋白质的比值（F/P），可通过测定 495nm 与 280nm 吸光度来鉴定。此比值的范围应为 0.3 - 1.0（方法见前）；

- FITC 唯一的缺陷是易被光淬灭，因此复合物必须始终避光保存；
- 如果 FITC - 复合物对 PBS 透析不充分，可能造成高本底，对免疫荧光染色产生干扰；
- 如果被标记的蛋白质是第二抗体或通用的第一抗体，则从商品购置可能更方便可取。

4. 免疫胶体金标记抗体及检测抗原

胶体金是一种常用的标记技术，是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术，有其独特的优点。近年已在各种生物学研究中广泛使用。在临床使用的免疫印迹技术几乎都使用其标记。同时在流式、电镜、免疫、分子生物学以至生物芯片中都可能利用到。

胶体金在光镜和电镜中均为有效的标记物，可以检测单一和多重抗原。胶体金在电解质中不稳定，但被蛋白质包被的胶体金是稳定的。一般常用免疫球蛋白或蛋白 A 包被胶体金，可作标记二抗进行免疫检测，本方法应用范围广，染色后的样品可以长期保存。

操作步骤

- 胶体金溶液制备
 - 称取 0.1g 氯金酸钠，溶解于 1L 去离子水中；
 - 加热煮沸，剧烈搅拌下，迅速加入 25ml 新配的 1% 柠檬酸钠溶液；
 - 继续煮沸 5 分钟，至溶液变成桔红色；
 - 用蒸馏水将溶液的 525 nm 波长下的光密度吸收值调到 0.8。
- 胶体金的包被
 - 将山羊抗鼠 Ig 抗体离心 30 分钟；
 - 上清液经 0.2 μm 滤膜过滤；
 - 确定蛋白质包被的最佳浓度：将蛋白质作连续 10 倍稀释各 1ml，加入 5ml 胶体金溶液，1 分钟后加入 1ml 10% 氯化钠溶液，静置 5 分钟；以胶体金溶液为空白对照测定光吸收度，选择最低吸收值的蛋白质浓度用于正式包被。
- 取 50ml 胶体金溶液，用 0.2M K₂CO₃ 调 pH 值为 7.6，按照确定的最佳比例将蛋白质加入并快速混合，让蛋白质吸附 2 分钟后，加 0.5ml 1% 聚乙二醇，防止非特异性凝集；

- 离心 1 小时，弃上清液，将胶体金悬浮于含 1% 聚乙二醇的 PBS 中；重复一次；
- 弃去上清液，将包被的胶体金溶液用 5 ml 含 1% BSA 的 PBS 稀释，经微孔滤膜过滤后，4°C 保存。
- 抗原检测
 - 取 20ul 人外周血白细胞与 5I T 淋巴细胞特异的单克隆抗体在 4°C 下孵育 30 分钟；
 - 1000 r/min 离心清洗细胞 5 分钟，2 次；
 - 将洗涤后的细胞与 20l (一般效价 1:20) 胶体金标记的山羊抗鼠 Ig 抗体在室温下孵育 30-60 分钟；
 - 1000 r/min 离心清洗细胞 5 分钟，2 次；
 - 将细胞涂片于载玻片，用 1% 戊二醛固定细胞 10 分钟，清洗多余固定液；
 - 将载玻片细胞面向上置于放有湿润滤纸的培养皿中，加 4 滴 50% 硝酸银溶液和 2 滴明胶显色液，覆以盖玻片，放入 60-65°C 的温箱中，显色 3-4 分钟，直至玻片标本呈现金褐色为止；
 - 移出盖玻片，用蒸馏水迅速漂洗数秒，晾干；
 - 光学显微镜下观察。

实验要点及说明

- 所使用的器皿均应非常洁净，需经过硅烷化处理；
- 使用高纯度多次蒸馏去离子水；
- 胶体金颗粒的形成、大小和速度，均决定胶体溶液的稳定性，水质和玻璃表面对启动还原和稳定胶体十分重要，本过程制备的胶体金颗粒直径约为 18-20 nm；
- 因为胶体金在电解质中不稳定，本实验全部操作过程要严格、迅速，注意液体颜色；
- 蛋白质包被胶体金时的相对最佳浓度要事先测定，测定最佳浓度时，胶体金溶液的 pH 值也要调节到 pH7.6；
- 一抗和胶体金标记二抗的稀释浓度应事先经预试验以最佳效价。

相关服务

[抗体标记服务](#)：提供生物素标记，FITC 荧光标记，HRP 标记等。

更多阅读

- [抗体亚型鉴定](#)
- [抗体配对](#)

