

制备兔抗人 IgG 抗体的一种简便方法

柯 岩 陈哲生

(首都医科大学微生物学免疫学教研室 北京 100054)

摘要 我们采用中等剂量抗原免疫法,用加佐剂的纯化人 IgG 抗原对家兔足掌、皮下和肌肉多点注射进行基础免疫,用不加佐剂的单独人 IgG 抗原肌肉和皮下多点注射后,再经耳缘静脉注射进行加强免疫相配合,制备成高效价(1:32)兔抗人 IgG 抗血清。

关键词 纯化的人 IgG, 家兔, 兔抗人 IgG 抗体

制备高效价和高特异性的免疫血清有助于临床疾病的诊断和治疗,以及抗原的分析和病原体的鉴定等,同时,也是免疫学实验室和临床

检验室所必不可少的生物制剂。其中兔抗人

1996-12-30收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

IgG 抗体用途极为广泛,它既可用于直接检测相应抗原,又可制备成羊抗兔 IgG 酶标抗体或羊抗兔 IgG 荧光抗体,作为第二抗体进行间接免疫反应。目前,制备兔抗人 IgG 抗体的方法很多,没有一个统一的具体免疫方案,只简单地按照现成的方法制备,难于制备出理想的高效价抗体。因此,我们实验室根据制备免疫抗体的基本原理^[1],并参考有关免疫方案,摸索了一种简捷的制备兔抗人 IgG 抗体的方法。现介绍如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:健康雄性家兔,体重 2~3Kg。

1.1.2 抗原:制备纯化的人 IgG^[2]:选取健康人血清,用一次 50% 饱和硫酸铵和两次 33% 饱和硫酸铵沉淀盐析,从而得到粗提物人 γ -球蛋白;再经 γ -球蛋白经葡聚糖凝胶 G-200 过柱,得到纯化的人 IgG。

1.1.3 卡介苗(B. C. G):75mg / ml(上海生物制品研究所生产)。

1.1.4 福氏完全佐剂^[3]:取羊毛脂和石蜡油按 1:2 混合后,经 0.55×10^5 Pa 高压灭菌,然后等体积地同纯化的人 IgG 混合,并按 10mg / ml 加入卡介苗,于 2 支 5ml 无菌注射器内进行对抽,使之成为油包水的粘稠乳剂。制成含 10mg / ml 人 IgG 抗原的佐剂-抗原混合物。

1.2 方法

为消除免疫动物的个体差异,同时免疫 3 只家兔。

用 3 只家兔,每只于两后足掌各注射佐剂-抗原 0.2ml,背部皮下分 3 点各注射 0.2ml 佐剂-抗原,每只共注射佐剂-抗原 1ml(含 10mg / ml 纯化的人 IgG),进行第一次基础免疫。

第一次注射 2 周后,每只于两后腿内侧肌肉各注射 0.5ml 不加佐剂的人 IgG 抗原,且背部皮下分 3 点各注射 0.2ml 不加佐剂的抗原,每只共注射 1.6ml(含 6mg / ml 人 IgG 抗原),进行第二次免疫。

第二次注射 1 周后,每只于两后腿内侧肌肉各注射 1ml 不加佐剂的人 IgG 抗原,且背部皮下分 3 点各注射 0.2ml 不加佐剂的抗原,每只共注射 2.6ml(含 6mg / ml 人 IgG 抗原),进行第三次免疫。

第三次注射 1 周后,每只于两后腿内侧肌肉各注射 1ml 不加佐剂的人 IgG 抗原,且背部皮下分 3 点各注射 0.2ml 不加佐剂的抗原,每只共注射 2.6ml(含 10mg / ml 人 IgG 抗原),进行第四次免疫。

第四次注射 1 周后,每只于耳缘静脉加强免疫注射经加热凝聚的不加佐剂的人 IgG 抗原 1ml(含 10mg / ml 人 IgG),进行第五次免疫。

第五次注射 1 周后,试血,做琼脂糖双扩散试验,测抗体效价,并从颈总动脉放血,收集血清抗体。

2 结果与讨论

经琼脂糖双扩散试验^[4],测得制备出的兔抗人 IgG 抗体效价均为 1:32。详见表 1。

表1 琼脂糖双扩散试验测得制备出的兔抗人 IgG 抗体效价

实验动物	抗体效价			
	1:4	1:8	1:16	1:32
1号	++++	++++	++++	++
2号	++++	++++	++++	++++
3号	++++	++++	++++	++++

注:“++++”表示双扩散的抗原-抗体反应沉淀线粗、清楚

“++”表示双扩散的抗原-抗体反应沉淀线细、模糊但可见

合适的抗原是制备特异性强、亲和力高和效价高的免疫血清的先决条件。对于免疫用的抗原,其成分必须均一,不能含有激发机体产生其它抗体的物质。要获得高效价抗血清,就需要采用较纯的抗原去免疫动物。本试验中,我们分别采用多次分级饱和硫酸铵沉淀盐析法和葡聚糖凝胶 G-200 过柱法,先后对人血清抗原进行粗提和精提,制得纯化的人 IgG 抗原。抗原的免疫原性与其分子量大小有密切关系。经分离纯化的人 IgG,分子量较小,只有 170ku,单独使用,不易刺激机体产生效价满意的抗血清,

必须将它和其它物质结合成大分子物质,才具有较强的免疫原性。福氏佐剂^[5],又称免疫增强剂,它和抗原同时或前后注射,可以增强抗原的免疫原性和改变机体的免疫反应性,提高抗体产量。注射佐剂-抗原混合物可以产生比单独应用抗原所产生的抗体量高出 5 倍,且可使抗体产生延续更长的时间。佐剂的作用原理是:

(1). 佐剂粘附抗原后,可以增加抗原的表面积和改变抗原活性基团的构型,从而增加抗原的免疫原性;(2). 佐剂可引起局部肉芽肿,延长抗原在局部组织的贮存时间(如仓库作用),及减低抗原的分解速度,使抗原缓慢释放,从而使产生抗体的初次反应和再次反应结合在一起;(3). 佐剂造成局部肉芽肿的结果,使巨噬细胞、淋巴细胞及浆细胞在局部聚集,促进这些细胞增殖,有利抗体产生。因此,我们在初次免疫时,使用福氏完全佐剂作为基础免疫,来提高人 IgG 抗原的免疫原性,刺激机体产生免疫应答。在最后的加强免疫中,单独使用人 IgG 抗原,为了增加它的分子量,我们先将人 IgG 抗原加热,凝聚成较大的分子后,再进行直接耳缘静脉注射。

免疫动物的合理选择也很重要。人与家兔亲缘关系较远,兔对人源抗原的免疫原性较强,可产生高效价抗体,且家兔出血量适中,可满足一般应用量。

此外,还须考虑注射途径,抗原剂量,注射次数,时间间隔,据此而制定的合理的免疫方法。通常可采用静脉、腹腔、皮下、皮内或肌肉及足掌等途径注射抗原。经静脉或腹腔注射后,抗原能直接或很快进入血流,在短时间内即被清除,没有足够的时间刺激抗体形成细胞,因而也不能获得效价满意的抗血清。只有在抗原经皮下、皮内或肌肉注射时,抗原扩散速度很慢,抗原在皮下组织内较长期的贮留,特别是和佐剂混合的抗原,从皮下组织缓慢释放,才能有利于抗体的产生和持续较长的时间。因此,我们先经足掌、皮下和肌肉注射佐剂-抗原作基础

免疫,再经耳缘静脉注射进行加强免疫,相互配合,提高抗体效价和产量。

免疫剂量可分为微量、中等剂量及大量免疫法。微量免疫抗原在微克量内,中等剂量法免疫抗原量在 1~10mg 左右,而大量免疫法抗原量则在 50~100mg^[6]。我们采用从小剂量开始,逐渐递增法免疫家兔。

选择恰当的免疫次数和间隔时间,对于产生出高效价抗体极为重要。一次抗原注射,抗体产生较慢,效价低,持续时间短,但特异性高;再次注射抗原,出现再次反应,效价上升较快,达到顶峰较高,持续时间也长;多次注射,可得到高效价的免疫血清,但抗体特异性较低。根据注射的抗原形式不同,间隔时间也不同,一般注射无佐剂的抗原,间隔 1 周左右,而注射佐剂抗原,间隔要 10~15d 左右。

由此,根据上述这些免疫原理,我们将上述诸多因素结合起来考虑,采用中等剂量(10mg/ml)免疫法,先用佐剂抗原从足掌和皮下多点注射,进行基础免疫,间隔 2 周,然后用不加佐剂的抗原从小剂量开始(6mg/ml),多次小剂量,逐渐递增法(10mg/ml),进行皮下和肌肉多点注射,直至最后一次直接从耳缘静脉注射(10mg/ml),进行加强免疫,间隔 1 周。这样经过小剂量多次注射,得到较好的免疫效果。

参 考 文 献

- [1] 龙振州主编. 医学免疫学(第二版). 北京:人民卫生出版社,1996,121.
- [2] 首都医学院微生物教研室编写. 免疫学实验指导, 1983, 6.
- [3] 宋大新, 范长胜, 徐德强, 陆妙康主编. 微生物学实验技术教程. 上海:复旦大学出版社,1993,307.
- [4] 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海:上海科学技术出版社,1986,527.
- [5] 龙振州, 丁桂凤主编. 免疫学实验技术. 北京:北京医科大学免疫学教研组,1988,191.
- [6] 李成文编著. 现代免疫化学技术. 北京:军事医学科学院微生物流行病学研究所,1990,149.