

# 抗体常见问题

## 免疫原性与抗原性有什么区别？

抗原性指抗原与其所诱导产生的抗体或致敏淋巴细胞特异性结合的能力。抗原性具有以下特点：

抗原性的强弱与抗原分子的大小、化学成分、抗原决定簇的结构、抗原与被免疫动物亲缘关系的远近等有密切关系。通常认为抗原的分子量愈大、化学组成愈复杂、立体结构愈完整以及与被免疫动物的亲缘关系愈远，则抗原性愈强。抗原的物理状态也对抗原性发生影响，例如蛋白质，聚合状态的比单体的抗原性强，一般球形分子的比纤维形分子的抗原性强。抗原加入佐剂改变物理状态后，抗原性也得到增强。例如，分子量高达 10 万的明胶由于缺乏苯环氨基酸，稳定性较差，在进入机体后容易被酶降解成低分子物质，如果加入少量酪氨酸（苯环氨基酸），就能增强其抗原性。

免疫原性是指能引起免疫应答的性能，即抗原能刺激特定的免疫细胞，使免疫细胞活化、增殖、分化，产生免疫效应物质抗体和致敏淋巴细胞的特性。免疫原性特点如下：

一种物质能否成为抗原，取决于该物质自身的性质，如具有免疫原性的物质的分子量都较大，通常在 10000 以上，低于 4000 者一般不具有免疫原性，抗原物质必须具有一定的化学组成和结构等。有些简单的有机分子本身不能引起免疫应答，但能与已产生的相应抗体或致敏淋巴细胞结合，这种物质称为半抗原（半抗原具有免疫反应性，免疫反应性也叫抗原性），半抗原与蛋白质结合后，可以获得免疫原性，成为完全抗原。

## 如何选择一抗与二抗？

请先确定要检测的种属和使用的实验方法，然后查找相关产品适用种属和实验方法来确定合适的抗体。一抗是能和非抗体性抗原（特异性抗原）特异性结合的蛋白。种类包括单克隆抗体和多克隆抗体。一抗可以特异性地结合底物，识别出要检测的东西。

### 1. 样本种属的确定

确定所用样本的种属，人、鼠、兔、猪、羊等。应选择物种相同或有交叉反应的抗体，因其氨基酸序列同源性较高，抗体可能与不同物种的同种靶蛋白有交叉反应。

### 2. 实验类型的确认

实验类型分类如，WB、IHC、ICC、ELISA、FCM 分析等。一般抗体说明书会列出该抗体经试验验证过适用于何种分析类型，根据说明书选择合适的应用抗体。

### 3. 结合蛋白结构性质

分析了解样本蛋白的结构性质有助于选择合适的抗体,抗体是由各种不同免疫原免疫宿主而制备得来,其中的免疫原包括:全长蛋白、蛋白片断、多肽等。如果打算检测的是蛋白片断或一种特殊的同型物或蛋白全长的某一区域,则必须选择用含此片段域的免疫原制备出的抗体。

二抗是在其它宿主体内制备的能与一抗或一抗片段结合的抗体,上面通常连有酶或荧光素等标签。一个一抗分子可以同时结合几个二抗分子,从而使信号增强,提高了实验灵敏度。二抗可以偶联有几种不同的标记,可以是酶,荧光素,或生物素。如何选择二抗?通常情况下,某一特定的实验中可能同时有几种二抗可供选择,如何能选择到适合该实验的二抗,需要综合以下几个方面进行考虑:

### 1. 一抗种属来源

根据一抗的物种来源选择相应的抗该物种的二抗。

### 2. 确定二抗形式

整个 IgG 分子:此种抗体适用于多数情况。

Fab 片段:它们只有一个结合位点,一般用来封闭内源性免疫球蛋白。

F(ab)2 片段:该种抗体是由两个靠二硫键连接的用于结合抗原的 Fab 片段组成,这些抗体用在特定的情况中,如需要避免抗体与具有 Fc 受体的细胞结合的情况。

### 3. 偶联标记选择

偶联到二抗上的探针主要有酶(辣根过氧化物酶 HRP),荧光基团(FITC, RRX, TR, PE)和生物素。选用哪种探针的二抗主要取决于具体的实验。对于 western blot 和 ELISA,常用的二抗是酶标二抗,而细胞或组织标记实验(组织免疫化学,细胞免疫化学,流式细胞术)中通常使用荧光基团标记的二抗,免疫组化中也可以使用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的二抗。

## 多克隆抗体与单克隆的区别?

多克隆抗体(polyclonal antibody, pAb):用一种包含多种抗原决定簇的抗原免疫动物,可刺激机体多个 B 细胞克隆产生针对多种抗原表位的不同抗体。所获得的免疫血清实际上是含有多种抗体的混合物。

单克隆抗体(monoclonal antibodies, mAb):由单一 B 细胞克隆产生的识别一种抗原表位的同源抗体。高度均一、特异性强、效价高、少或无交叉反应性。

### 1. 制备的区别

单抗制备方法为经过特定抗原处理过的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合的方法得到杂交细胞,经 HAT 培养基筛选、ELISA 检测效价后就得到阳性克隆株,然后进行细胞培养或

将细胞注入到动物（一般为 balb/c 小鼠）腹腔中用能水培养，收些腹水上清纯化后就能得到单克隆抗体。

而制备多克隆抗体就没有单克隆抗体繁琐，只要将抗原（纯度越高越好）直接注入到动物体内经过 3~4 次免疫，ELISA 测效价合格后，收集血液离心得到上清，纯化后即能得到多克隆抗体。多克隆抗体制备的主要流程包括：①制备抗原；②选择实验动物；③动物免疫；④试取血进行测试，看看是否成功免疫；⑤如果成功免疫，处死实验动物，采集全部血清；⑥纯化出抗体；⑦鉴定抗体，包括纯度以及特异性。因此制备多抗的周期就比单抗的短，制备价格也比单抗较低。

## 2. 应用的区别

单抗和多抗都有各自鲜明的特点与优势。单克隆抗体的特异性高，一旦制备成功就可以永续的生产完全一致的抗体，因此可以对其特异性进行全面、系统地验证。但如果所识别的抗原表位被破坏，实验的结果将会受到很大的影响，这也是单抗的缺点之一。

而多克隆抗体的特异性较差，即使是使用相同的抗照制备多抗，不同批次间也会存在差异，因而在特异性、一致性方面有很大的局限。所以在用多抗做免疫始测时，更容易造成在 WB 中有杂带，在 IHC 中背景较深等等。虽然还存在交叉反应的问题，但由于多抗识别多个抗原表位，即使是有少数几个抗原表位被破坏或者抗原构象改变，实验的结果也不会受到影响。在相同条件下，使用多抗可以提高检测的灵敏度，对于浓度偏低的蛋白也更容易检出。

如果对抗体的特异性要求高，用显较大或要长期使用一致的抗体，制备的抗体应用要求多，可以选择制备单克隆抗体。若对抗体的特异性要求不高，需要做沉淀和凝集反应的检测性实验或省只需做 ELISA 检测，可以选择多克隆抗体。

## 抗体纯化方法如何选择？

抗体纯化方法较多，包括冷酒精沉淀法、离子交换层析法、Protein A,G,A/G 纯化法、亲和纯化法等，一步亲和层析即可达到 90%以上的纯度，这为科研和实验室使用的抗体纯化提供很好的解决方案。然而要得到高质量高纯度的抗体，我们需要从样品处理，纯化介质的选择以及纯化方法上悉心考虑。

### 1. 为什么进行抗体的纯化

腹水或血清含有大量的杂蛋白和多种抗体，真正需要的抗体正常情况下只占总蛋白的 15%左右。未纯化的抗体不仅会干扰实验的正常进行，而且还可能产生与实验预期相反的结论。

抗体纯化的好处：纯化的抗体能降低非特异性，去除引起实验误差的污染蛋白，另一方面能精确控制实验中产生阳性信号的抗体量，可以浓缩抗体。

### 2. 血清、腹水、细胞悬液等样品纯化方法选择

对于血清、腹水、细胞悬液等一些含有小分子污染物的样品。可以使用分级沉淀法去除，如硫酸铵沉淀，羊脂酸沉淀的方法。利用脱盐柱来更换缓冲液并除盐，把样品换到合适的缓冲液中（PH 和盐浓度），并除去没有用处的小分子。

### 3. Protein A、Protein G 方法对比

针对大鼠单抗、小鼠 IgG、山羊多抗等样品，Protein A 结合性相对与较弱，可选择 Protein G 配基的介质；而猪、兔多克隆抗体纯化应用 Protein A 较多。

由于 Protein G 结合力较强，因此有时需要 pH 低于 2.0 才能有效洗脱，容易导致某些对酸敏感的抗体聚集沉淀。此时可以考虑结合力相对较弱的 proteinA 填料，结合缓冲液中需要加入 0.5~3M 的氯化钠以增加结合能力，目标抗体在 pH4.5 左右就可以被温和的洗脱。

### 4. 为什么纯化的抗体电泳结果很好，WB 结果却不佳？

聚丙烯酰胺凝胶电泳可用做蛋白质纯度的鉴定，聚丙烯酰胺凝胶电泳同时具有电荷效应和分子筛效应，可以将分子大小相同而带不同数量电荷的物质分离开，并且还可以将带相同数量电荷而分子大小不同的物质分离开。其分辨率远远高于一般层析方法和电泳方法，且重复性好，没有电渗作用。

Protein A/G 无法区分特异性 IgG 的 Fc 段还是非特异性 IgG 的 Fc 段，故此 Protein A/G 纯化出的是总的 IgG 蛋白，无法将杂 IgG 和目的抗体 IgG 分离出来。

聚丙烯酰胺凝胶电泳可用做蛋白质纯度的鉴定，但不可像 WB 用作蛋白质性质鉴定，所以有时用 Protein A/G 纯化的抗体，电泳很纯但做 WB 时却并不理想。

### 抗体能否与该蛋白其他亚型或其他种属蛋白发生交叉反应？

抗体对除免疫原以外的抗原的反应性称为交叉反应性。交叉反应是一个潜在的问题，针对密切相关蛋白质的抗体测试是证明其特异性的部分。然而，物种之间的交叉反应通常是有益的，因为它可能允许通过使用相同的抗体检测其他物种中的相应抗原。交叉反应有可能发生在系统发育密切相关的物种之间，并且许多针对人类蛋白质的抗体与非人类灵长类动物中的相应蛋白质显示出显著的交叉反应性。

对于一些抗体，说明书中明确指出了与其他蛋白质的交叉反应。如果说明书中没有相关信息的话，推荐比较该抗体的免疫原序列和其他亚型或种属蛋白序列。将说明书中的抗体免疫原序列和需要比较蛋白的序列输入后比较相同性。如果相同性超过 85%，则该抗体与比较蛋白交叉反应的可能性会比较高，但是即使序列同源性超过 85%，也不一定具有交叉反应，一个抗体能用于检测其他亚型、种属的影响因素是非常多的；如果要确定没有交叉反应，则比较出来的同源性要非常低才行。

### 抗体如何正确保存？

抗体能否正确保存，直接决定了抗体的活性和使用效果。抗体必须存放在适当的温度和pH值范围。为了维持蛋白质的活性，以及防止其聚集，经常保存在一定浓度的甘油，蔗糖，或类似的物质里面。分装可以很大程度的降低反复冻融对抗体活性的损害，同时也降低了由于多次从同一管中吸取抗体造成的污染可能性。如果抗体保存得当，大部分抗体活性都可以维持数月甚至数年。

对于大部分抗体，比较合适的保存方式是分装后保存在-20℃或-80℃，也可4℃短暂保存，并不影响抗体活性。但是，腹水形式的产品收到后需立即冻存，因为该产品含有大量的蛋白酶，长期在4℃保存会导致抗体的降解。

对于多克隆抗体，在血清中于-20℃保存十年其活性损失不大。但该抗体浓度应高于1mg/ml，因为稀的抗体容易失去活性而且容易造成物理吸附导致的损失。

对于单克隆抗体，可以加入50%的甘油存放于-20℃。也可4℃或-20℃保存于饱和硫酸铵中。

对于带标记的抗体，一般储存在黑色容器中或者用锡箔纸包裹。

对于碱性磷酸酶和其他酶结合物，冷冻敏感一般应在4℃短期存储。标记抗体长期保存在终浓度为50%的甘油或乙二醇中于-20℃保存。

对于荧光抗体，必须避光保存，其应该存放在4℃，避免让其凝固。

对于大部分抗体的运输条件：一般的运输过程需要1-2周的时间，所以是在4℃的条件下完成的。4℃运输主要的目的是为了减少反复冻融对抗体活性的损害，如果使用干冰运输，那么收到时抗体是冻起来的，为了分装就需要解冻，这就多了一次冻融的过程。所以运输过程中避免干冰运输。

### 抗体如何正确保存？

如果说明书中有推荐的稀释比例，请按照该稀释比例进行实验。但是由于标本类型、实验条件、操作环境等各种因素的影响，推荐浓度仅作为参考。实验者需要在推荐浓度周围进行多个浓度梯度的实验，从中发现稀释比例。

	组织培养上清	腹水	全抗血清	纯化抗体
WB/dot blot	1/100	1/1000	1/500	1ug/ml
IHC/ICC	neat-1/10	1/100	1/50-1/100	5 ug/ml
EIA/ELISA	1/1000	1/10000	1/5000	0.1ug/ml
FC	1/100	1/1000	1/500	1ug/ml
IP		1/100	1/50-1/100	1-10ug/ml
Concentration estimate	1-3 mg/ml	5-10mg/ml	1-10mg/ml	

如果说明书没有推荐稀释比例，就需要做大量的预实验来摸索比例。下表列出的纯化抗体用于不同实验方法时常用的工作浓度，可以作为预实验的参考，实际情况需要根据试验结果来进行适当的调整。以此起点作一系列的浓度，从中确定工作浓度和稀释比例。未纯化的抗体一般在说明书中不会标明抗体的浓度，因为大部分全抗血清、培养上清或腹水形式的产品浓度都是没有经过测定的。如果未纯化抗体产品的说明书中没有标明其中特异性抗体的浓度，实验过程中亦需要进行“方阵”梯度来进行实验条件的摸索与优化。

### 什么是人源化抗体？

用细胞工程制备人单抗在技术上和伦理上都存在一些难题，治疗性抗体的开发就集中在具有治疗前景的鼠源单抗上。但是鼠源单抗对人体具有异源性反应，可诱发人抗鼠抗体效应，使得单抗的治疗效果滞后。随着基因重组技术的发展和人们对抗体结构认识的深入，研究者们尝试对鼠源性抗体进行改造，致力于在保留与抗原结合的高亲和力的基础上，减少异源性抗体的免疫原性，推动抗体人源化研发的进程。

人源化抗体主要指以用基因克隆及 DNA 重组技术对鼠源单克隆抗体改造，重新表达产生的抗体。其大部分氨基酸序列被人源序列取代，基本保留亲本鼠单克隆抗体的亲和力和特异性，又降低了其异源性，有利应用于人体。

为了消除异源性抗体的不良影响，人们将噬菌体展示技术应用到抗体的表达和克隆上，产生了噬菌体抗体库技术。由此，抗体工程技术进入到了一个新的发展阶段，全人源化抗体

的生产和应用也逐渐走向成熟。全人源化抗体是指将人类抗体基因通过转基因或转染色体技术，将人类编码抗体的基因转移至基因工程改造的抗体基因缺失动物中，使动物表达人类抗体，达到抗体全人源化的目的。目前已建立多种方法生产完全人源性抗体，主要有噬菌体展示技术、转基因小鼠技术、核糖体展示技术和 RNA-多肽技术。

目前，人源化抗体在肿瘤，器官移植排斥反应，病毒感染，血液性疾病，自身免疫性疾病等方面的治疗和临床诊断中显示出越来越大的应用前景。

### WB, IHC, IP/ChIP 类型抗体有什么区别？

**WB:** 目前常做的类型，WB 识别的蛋白是经过加热变性之后都变成线性结构的蛋白。因此抗体是采用非常特异序列的人工合成多肽的方法来做实验，结果也非常特异。

**IHC:** 免疫组化中需要进行固定一步，固定是为了尽量让细胞的形态结构维持和原有的一致。这种化学物质的固定使蛋白质变性凝固，与天然状态下的蛋白质有了一定的区别，但是又不同 WB 中加热变性变成了线性的结构。因此在做 IF/IHC 实验中，合适的抗体可以是纯化的重组蛋白得到的抗体，也可以是人工合成多肽得到的抗体。

**IP/ChIP:** 这类实验是用抗体去结合生理状态下的蛋白质，因此 IP 和 ChIP 的抗体尽量使用纯化的天然蛋白制作的抗体。不要用人工合成多肽制作的抗体，因为这种抗体识别的位点可能被隐藏。如果抗体识别的表位和该蛋白质与 DNA 结合的部位一致，则会导致 CHIP 实验的失败。

**FC:** 流式细胞中分为两种，一种是活细胞的流式，这种采用天然蛋白或者重组蛋白的抗体来做，另外一种是经过固定之后的流式，和 IF/IHC 所用抗体一致。在做流式细胞中，我们有直接标记和间接标记，间接标记不如直接标记真实准确。因此我们选择流式抗体要采用带有荧光标记的抗体；如果研究的蛋白没有直接标记的抗体，那么就采用间接标记抗体，需要添加荧光二抗。

### 目的蛋白分子量为何与实际不符？

当条带所示的实际大小与理论有偏差时，可能有以下原因导致：蛋白发生如磷酸化、糖基化等翻译后修饰时条带会上移，蛋白发生剪切（如前体）时条带会下移，蛋白存在不同的可变剪切体或亚型，强相互作用大分子存在时变性不彻底。

### 多抗做 WB 检测为何有杂带？

从纯化方式来看：采用 ProteinA/G 纯化的多抗掺杂有动物本身产生的对其自身抗原产生的抗体，这些抗体在检测中会识别样本中的蛋白而出现杂带，可以采用抗原亲和纯化避免杂带的产生。

从蛋白修饰来看：天然蛋白存在复杂的翻译后修饰。

从蛋白翻译后加工来看：翻译后蛋白前体经切割可能会使部分蛋白分子量偏小，而天然组织中同时存在蛋白前体和切割加工后的蛋白，二者序列有相同部分，可能会产生杂带。这点需要通过查阅与目的蛋白相关文献进行了解。

从同源家族蛋白来看：当目的蛋白有同源家族蛋白时，蛋白异构体的存在可能会使分子量偏离预测分子量，因为天然样本中由同一个 mRNA 不同的剪接方式进行翻译形成的蛋白产物也会有相同的抗原表位，同时被抗体识别时会产生杂带。

从蛋白聚集形式来看：蛋白多聚体的形成，虽然还原条件可以抑制多聚体的形成，但是强烈的蛋白间相互作用在还原条件下也有可能不解聚导致条带偏大。

### 相关产品推荐

天然蛋白 重组蛋白 小分子抗原抗体

### Order and Inquiry

You can place an order or Inquiry through the following methods, and we will contact you

ASAP:

QQ 499854788; 82458988

Email [info@biotyscience.com](mailto:info@biotyscience.com)

Tel 010-5365 2239