

抗体的制备方法与原理

一、抗血清的制备

有了质量好的抗原，还必须选择适当的免疫途径，才能产生质量好（特异性强和效价高）的抗体。

（一）用于免疫的动物

作免疫用的动物有哺乳类和禽类，主要为羊、马、家兔、猴、猪、豚鼠、鸡等，实验室常用者为家兔、山羊和豚鼠等。动物种类的选择主要根据抗原的生物学特性和所要获得抗血清数量，如一般制备抗 r-免疫球蛋白抗血清，多用家兔和山羊，因动物反应良好，而且能够提供足够数量的血清，用于免疫的动物应适龄，健壮，无感染性疾患，最好为♂雄性，此外还需十分注意动物的饲养，以消除动物的个体差异以及在免疫过程中死亡的影响。若用兔，最好用纯种新西兰兔，一组三只，兔的体重以 2~3kg 为宜。

（二）免疫途径

免疫途径有多种多样，如静脉内、腹腔内、肌肉内、皮内、皮下、淋巴结内注射等，一般常用皮下或背部多点皮内注射，每点注射 0.1ml 左右。途径的选择决定于抗原的生物学特性和理化特性，如激素、酶、毒素等生物学活性抗原，一般不宜采用静脉注射。

（三）佐剂

由于不同个体对同一抗原的反应性不同，而且不同抗原产生免疫反应的能力也有强有弱，因此常常在注射抗原的同时，加入能增强抗原的抗原性物质，以刺激机体产生较强的免疫反应，这种物质称为免疫佐剂。

佐剂除了延长抗原在体内的存留时间，增加抗原刺激作用外，更主要的是，它能刺激网状内皮系统，使参与免疫反应的免疫活性细胞增多，促进 T 细胞与 B 细胞的相互作用，从而增强机体对抗原的细胞免疫和抗体的产生。

常用的佐剂是福氏佐剂（Freund adjuvant），其成分通常是羊毛脂 1 份、石蜡油 5 份，羊毛脂与石蜡油的比例，视需要可调整为 1: 2~9（V/V），这是不完全福氏佐剂，在每毫升不完全佐剂加入 1~20mg 卡介苗就成为完全佐剂。

配制方法：按比例将羊毛脂与石蜡油置容器内，用超声波使之混匀，高压灭菌，置 4℃ 下保存备用。免疫前取等容积完全或不完全佐剂与免疫原溶液混合，用振荡器混匀成乳状，也可以在免疫前取需要量佐剂置乳钵中研磨，均匀后再边磨边滴加入等容积抗原液（其中加卡介苗 3~4mg/ml 或不加），加完后再继续研磨成乳剂，滴于冰水上 5~10min 内完全不扩散为止。为避免损失抗原，亦可用一注射器装抗原液，

另一注射器装佐剂，二者以聚乙烯塑料管连接，然后二者来回反复抽吸，约数十分钟后即能完全乳化。检查合格后即以其中一注射器作注射用。

（四）免疫方法

抗原剂量，首次剂量为 300~500μg，加强免疫的剂量约为首次剂量的 1/4 左右。每 2~3 周加强免疫一次。加强免疫时用不完全佐剂，首次免疫时皮下注射百日咳疫苗 0.5ml，加强免疫时不必注射百日咳疫苗。

在第 2 次加强免疫后 2 周，从耳缘静脉取 2~3ml 血，制备血清，检测抗体效价（见后）。如未达到预期效价，需再进行加强免疫，直到满意时为止（图 2-3）。当抗体效价达到预期水平时，即可放血制备抗血清。

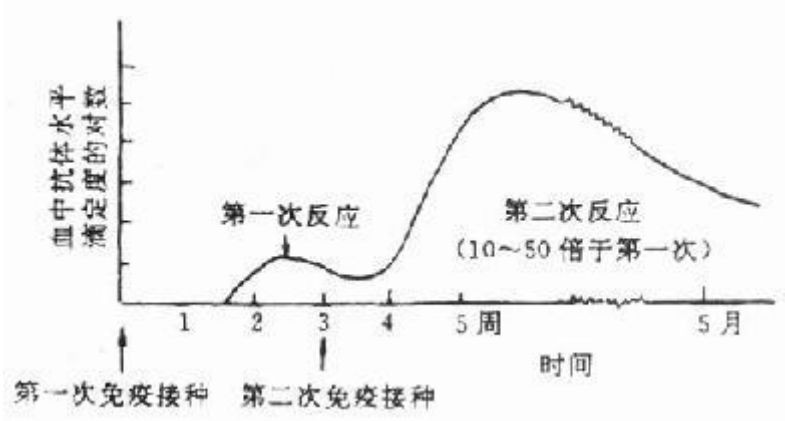


图 2-3 抗体反应

（五）抗血清的采集与保存

家兔是最常用以产生抗体的动物，因此这里主要讨论兔血的收集。羊等较大动物以颈静脉、动脉取血，鼠等小动物取血可参阅有关资料。取兔血有两种方法，一是耳缘静脉或耳动脉放血，一是颈动脉入血，也可心脏采血。取动脉或静脉放血时，将兔放入一个特造的木匣或笼内，耳露于箱（笼）外，也可由另一人捉住兔身。剪去耳缘的毛，用少许二甲苯涂抹耳廓，30s 后，耳血管扩张、充血。用手轻拉耳尖，以单面剃须刀或尖的手术刀片，快速切开动脉或静脉，血液即流出，每次可收集 30~40ml。然后用棉球压迫止血，凝血后洗去二甲苯。二星期后，可在另一耳放血。此法可反复多次放血。颈动脉放血时，将兔仰卧，固定于兔台，剪去颈部的毛，切开皮肤，暴露颈动脉，插管，放血。放血过程中要严格按无菌要求进行。

收集的血液置于室温下 1h 左右，凝固后，置 4℃ 下，过夜（切勿冰冻）析出血清，离心，4000rpm, 10min。在无菌条件，吸出血清，分装（0.05~0.2ml），贮于 -40℃ 以下冰箱，或冻干后贮存于 4℃ 冰箱保存。

（六）抗血清质量的评价

在免疫期间，不仅各个不同的动物，而且同一动物在不同的时间内抗血清效价、特异性、亲合力等都可能发生变化，因而必须经常地采血测试。只有在对抗血清的效价、特异性、亲合力等方面作彻底的评价后，才可使用所取得的抗血清。

1. 效价 抗血清的效价，就是指血清中所含抗体的浓度或含量。效价测定的方法常用的是放射免疫法，此法对所有的抗体均适用。某些由大分子（如蛋白类）抗原所产生的抗体，可用双扩散等方法测定。前者测定的效价极为精确。而后者则粗糙得多。

（1）放射免疫法：以不同稀释度的抗血清与优质标记抗原混合，孵育 24h 后，测定其结合率。通常以结合率为 50% 的血清稀度和为效价。如某抗血清的结合率为 50% 时的稀释度为 1: 15000，则该血清的效价就是 1: 15000。抗血清的效价，除由抗血清本身的性质决定外，还受标记抗原的质量、孵育时间，所用稀释液的成分及其 pH 等因素的影响，在工作中必须引起注意。（测定方法见第 8 章）

（2）双向扩散法：利用大分子抗原和抗体在琼脂平板上扩散，两者在相交处产生沉淀线，以观察和判断抗血清中是否有抗体及其浓度。

琼脂板的制备：100ml pH7.1 的磷酸盐缓冲液加到 15g 的琼脂内，于水浴中加温，搅拌，使琼脂完全溶解，趁热用纱布过滤，待溶液冷却到 65℃ 左右时，加入叠氮钠（ NaN_3 ），使其在溶液中的浓度为 0.1%。用移液管把琼脂放在干净平皿或玻片上，约 3mm 厚，待其冷却，完全凝固后，用打孔器打孔（图 2-4）。中央孔内加适量抗原（容量为 50 μl ），周围各孔内分别加入 50 μl 1: 2、1: 4、1: 8、1: 16、1: 32 及不稀释的抗血清，37℃ 下孵育 24h，观察有无沉淀线产生，以判断血清的稀释度（图 2-5）。

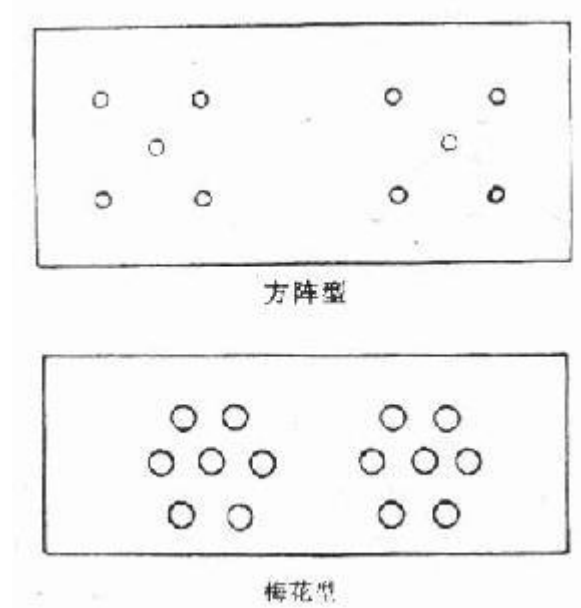


图 2-4 双向扩散模型

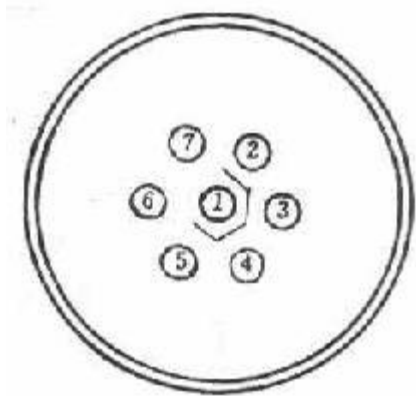


图 2-5 免疫扩散试验

2. 特异性测定 抗血清的特异性或称专一性是指抗血清对相应的抗原及近似的抗原物质的识别能力。特异性好就是抗血清的识别能力强。通常，特异性是以交叉反应率来表示的。交叉反应率低，表示抗血清的特异性好，反之则特异性差。交叉反应率一般是用竞争抑制曲线来判断的。以不同浓度的抗原和近似抗原物质分别做竞争抑制曲线，计算各自的结合率（B/T 或 B/B₀），求出各自在 IC₅₀ 时的浓度，按下列公式计算交叉反应率。

$$S=y/Z \times 100\%$$

S: 交叉反应率, y: IC₅₀ 时抗原浓度, Z: IC₅₀ 时近似抗原物质的浓度。

如某抗原的 IC₅₀ 浓度为 90Pg/管，而一些近似抗原物质 IC₅₀ 浓度几乎是无限大，可以说这一抗血清与其它抗原物质的交叉反应率近似零，即无交叉反应，该抗血清的特异性是好的。

3. 亲合力 在免疫学中，亲合力是指抗体与结合抗原体的活度或牢固度。抗体与抗原结合疏松，结合后会迅速解离，称为亲合力低，反之，亲合力高。亲合力的高低是由抗原分子的大小，抗体分子的结合位点与抗原的决定基之间的立体结构型的合适程度决定的。亲合力常以亲合常数 K 表示。K 的单位是升/摩尔（L/mol）。在 RIA 中，K 是该抗血清能达到的最小检出量（灵敏度）的倒数， $K=1/[H]$ ，[H]是最小检出量，通常，K 的范围在 10⁸~10¹²L/mol 之间，也有高达 10¹⁴L/mol 的。

计算亲合常数的方法 20 余种，计算出的 K 都不能真实反映实验情况，只能作为参考。

（七）免疫失败的可能原因及应采取的措施

有时不能获得满意的抗血清，可从下列几方面找原因，并改进之。

（1）免疫动物的种属及品系是否合适，可考虑改变动物的种属或品系，或扩大免疫动物的数量。

(2) 抗原质量是否良好，可改用其它厂家的产品或改用同一厂家的其它批号，也可考虑改变抗原分子的部分结构，或改进提取方法。

(3) 制备的免疫原是否符合要求，可从偶联剂，载体、抗原或载体的比例、反应时间等多方面去考虑，并加以改进。

(4) 所用的佐剂是否合适，乳化是否完全，可改用其它佐剂，或加强乳化。

(5) 免疫的方法、剂量，加强免疫的间隔时间和次数，免疫的途径是否合适。

(6) 动物的饲养是否得当，如营养（饲料、饮水）、环境卫生（通风、采光、温度）是否符合要求，动物的健康情况是否良好等。

二、单克隆抗体的制备

1975 年 Kohler 和 Milstein 发现将小鼠骨髓瘤细胞与和绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞进行融合，形成的杂交瘤细胞既可产生抗体，又可无性繁殖，从而创立了单克隆抗体杂交瘤技术。这一技术上的突破使血清学的研究进入了一个高度精确的新纪元。

免疫细胞化学的 技术关键之一是制备特异性强、亲合力大、滴度高的特异性抗体，由于每种抗原都有几个抗原决定簇，用它免疫动物将产生对各个决定簇的抗体，即多克隆抗体。单克隆抗体则是由一个产生抗体的细胞与一个骨髓瘤细胞融合而形成的杂交瘤细胞经无性繁殖而来的细胞群所产生的，所以它的免疫球蛋白属同一类型，质地纯一，而且它是针对某一抗原决定簇的，因此特异性强，亲合性也一致。单克隆抗体（McAb）的特性和常规血清抗体的特性比较见 2-3。

表 2—3 单克隆抗体（McAb）和常规免疫血清抗体的特性比较

项目	常规免疫血清抗体	McAb
抗体产生细胞	多克隆性	单克隆性
抗体的结合力	特异性识别多种抗原决定簇	特异性识别单一抗原决定簇
免疫球蛋白类别及亚类	不均一性，质地混杂	同一类属，质地纯一
特异性与亲合力	批与批之间不同	特异性高，抗体均一
有效抗体含量	0.01~0.1mg/ml（小鼠腹水）	0.5~5.0mg/ml(小鼠腹水)
		0.5~10.0μg/ml（培养物上清液）
用于常规免疫学实验	可用	单抗组合应用

抗原抗体形成格子结构(沉淀反应)	容易形成	一般难形成
抗原抗体反应	抗体混杂，形成 2 分子反应困难，不可逆	可形成 2 分子反应，可逆

单克隆抗体的制备方法如下。

(一) 动物的选择与免疫

1. 动物的选择 纯种 BALB/C 小鼠，较温顺，离窝的活动范围小，体弱，食量及排污较小，一般环境洁净的实验室均能饲养成活。目前开展杂交瘤技术的实验室多选用纯种 BALB/C 小鼠。

2. 免疫方案 选择合适的免疫方案对于细胞融合杂交的成功，获得高质量的 McAb 至关重要。一般在融合前两个月左右根据确立免疫方案开始初次免疫，免疫方案应根据抗原的特性不同而定。

(1) 可溶性抗原免疫原性较弱，一般要加佐剂，半抗原应先制备免疫原，再加佐剂。常用佐剂：福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂。

初次免疫 抗原 1~50 μ g 加福氏完全佐剂皮下多点注射或脾内注射（一般 0.8~1ml, 0.2ml/点）

↓ 3 周后

第二次免疫 剂量同上，加福氏不完全佐剂皮下或 ip（腹腔内注射）（ip 剂量不宜超过 0.5ml）

↓ 3 周后

第三次免疫 剂量同一，不加佐剂，ip（5~7 天后采血测其效价）

↓ 2~3 周

加强免疫，剂量 50~500 μ g 为宜，ip 或 iv（静脉内注射）

↓ 3 天后

取脾融合

目前，用于可溶性抗原（特别是一些弱抗原）的免疫方案也不断有所更新，如：①将可溶性抗原颗粒化或固相化，一方面增强了抗原的免疫原性，另一方面可降低抗原的使用量。②改变抗原注入的途径，基

础免疫可直接采用脾内注射。③使用细胞因子作为佐剂，提高机体的免疫应答水平，增强免疫细胞对抗原的反应性。

（2）颗粒抗原免疫性强，不加佐剂就可获得很好的免疫效果。以细胞性抗原为例，免疫时要求抗原量为 $1\sim 2\times 10^7$ 个细胞。

初次免疫 $1\times 10^7/0.5\text{ml}$ ip

↓ 2~3 周后

第二次免疫 $1\times 10^7/0.5\text{ml}$ ip

↓ 3 周后

加强免疫（融合前三天） $1\times 10^7/0.5\text{ml}$ ip 或 iv

↓

取脾融合

（二）细胞融合

1. 细胞融合前准备

（1）骨髓瘤细胞系的选择：骨髓瘤细胞应和免疫动物属于同一品系，这样杂交融合率高，也便于接种杂交瘤在同一品系小鼠腹腔内产生大量 McAb。常用的骨髓瘤细胞系见表 2-4。

表 2-4 用于融合试验的主要骨髓瘤细胞系

名 称	来 源	耐 受 药 物	Ig 链
			H L
P3/X63-Ag8(X63)	BALB/C 骨 髓 瘤 MOPC-21	8-氮鸟嘌呤	r1 K
P3/X63-Ag8.653(X63-Ag8.653)	P3/X63-Ag8	8-氮鸟嘌呤	— —
P3/NSI-1-Ag4-1(NS-1)	P3/X63-Ag8	8-氮鸟嘌呤	— K（不分泌型）
P3/X63-Ag8.UI(P3UI)	（ X63×BALB/C 脾 细 胞）杂交瘤	8-氮鸟嘌呤	— —

SP2/0-Ag14(SP2/0)	(X63×BALB/C 脾细胞) 杂交瘤	8-氮鸟嘌呤	— —
F0	BALB/C 骨髓瘤	8-氮鸟嘌呤	— —
S194/5.XXO.BU.1	P3/X63-Ag8	5-溴脱氧尿嘧啶核苷	— —
MPC11-45.6TG1.7	BALB/C 骨髓瘤 MPC-11	6-巯鸟嘌呤	r2b K
210.RCY3.Ag1.2.3	LOU 大鼠骨髓瘤 R210	8-氮鸟嘌呤	— K
GM15006TG-A12	人骨髓瘤 GM1500	6-巯鸟嘌呤	r1 K
U-266AR	人骨髓瘤 U-266	8-氮鸟嘌呤	ε λ

骨髓瘤细胞的培养可用一般的培养液，如 RPMI1640，DMEM 培养基。小牛血清的浓度一般在 10%～20%，细胞浓度以 $10^4 \sim 5 \times 10^5/\text{ml}$ 为宜，最大浓度不得超过 $10^6/\text{ml}$ 。当细胞处于对数生长的中期时，可按 1: 3～1: 10 的比例传代。每 3～5 天传代一次。细胞在传代过程中，部分细胞可能有返祖现象，应定期用 8-氮鸟嘌呤进行处理，使生存的细胞对 HAT 呈均一的敏感性。

(2) 饲养细胞：在组织培养中，单个或少数分散的细胞不易生长繁殖，若加入其它活细胞，则可促进这些细胞生长繁殖，所加入的这种细胞数被称为饲养细胞。在制备 McAb 的过程中，许多环节 需要加饲养细胞，如在杂交瘤细胞筛选、克隆化和扩大培养过程中，加入饲养细胞是十分必要的。常用的饲养细胞有：小鼠腹腔巨噬细胞（较为常用）、小鼠脾脏细胞或胸腺细胞。也有人用小鼠成纤维细胞系 3T3 经放射线照射后作为饲养细胞。饲养细胞的量为一般为 2×10^4 或 10^5 细胞/孔。

2. 细胞融合的步骤

(1) 制备饲养细胞层：一般选用小鼠腹腔巨噬细胞。

与免疫小鼠相同品系的小鼠，常用 BALB/C 小鼠，6～10 周

↓

拉颈 处死，浸泡在 75%酒精内，3～5min

↓

用无菌剪刀剪开皮肤，暴露腹膜

↓

用无菌注射器注入 5~6ml 预冷的培养液（严禁刺破肠管）

↓

反复冲洗，吸出冲洗液

↓

冲洗液放入 10ml 离心管，1200rpm/分离 5~6min

↓

用 20%小牛血清（NCS）或胎牛血清（FCS）的培养液混悬，调整细胞数至 $1 \times 10^5/\text{ml}$

↓

加入 96 孔板，100 μl /孔

↓

放入 37. °C CO₂ 孵箱培养

（2）制备免疫脾细胞

最后一次加强免疫 3 天后小鼠拉颈处死

↓

无菌取脾脏，培养液洗 一次

↓

脾脏研碎，过不锈钢筛网

↓

离心，细胞用培养液洗 2 次

↓

计数

↓

取 108 脾淋巴细胞悬液备用

(3) 制备骨髓瘤细胞

取对数生长骨髓瘤细胞离心

↓

用无血清培养液洗 2 次

↓

计数，取得 $\times 10^7$ 细胞备用

(4) 融合

①将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1: 10 或 1: 5 的比例混合在一起，在 50ml 离心管中用无血清不完全培养液洗 1 次，离心，1200rpm,8min;弃上清，用吸管吸净残留液体，以免影响聚乙二醇（PEG）浓度。轻轻弹击离心管底，使细胞沉淀略松动。

②90s 内加入 37℃ 预温的 1ml 45%PEG（分子量 4000）溶液，边加边轻微摇动。37℃ 水浴作用 90s。

③加 37.℃ 预温的不完全培养液以终止 PEG 作用，每隔 2min 分别加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 和 6ml。

④离心，800rpm, 6min。

⑤充上清，用含 20%小牛血清 HAT 选择培养液重悬。

⑥将上述细胞，加到已有饲养细胞层的 96 孔板内，每孔加 100 μ l。一般一个免疫脾脏可接种 4 块 96 孔板。

⑦将培养板置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。

(三) 选择杂交瘤细胞及抗体检测

1. HAT 选择杂交瘤细胞 脾细胞和骨髓瘤细胞经 PEG 处理后，形成多种细胞的混合体，只有脾细胞与骨髓瘤细胞形成的杂交瘤细胞才有意义。在 HAT 选择培养液中培养时，由于骨髓瘤细胞缺乏胸苷激酶或次黄嘌呤鸟嘌呤核糖转移酶，故不能生长繁殖，而杂交瘤细胞具有上述两种酶，在 HAT 选择培养液可以生长繁殖。

在用 HAT 选择培养 1~2 天内，将有大量瘤细胞死亡，3~4 天后瘤细胞消失，杂交细胞形成小集落，HAT 选择培养液维持 7~10 天后应换用 HT 培养液，再维持 2 周，改用一般培养液。在上述选择培养期间，杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时，即可开始检测特异性抗体，筛选出所需要的杂交瘤细胞系。在选择培养期间，一般每 2~3 天换一半培养液。

2. 抗体的检测 检测抗体的方法应根据抗原的性质、抗体的类型不同，选择不同的筛选方法，一般以快速、简便、特异、敏感的方法为原则。

常用的方法有：（1）放射免疫测定（RIA）可用于可溶性抗原、细胞 McAb 的检测。（2）酶联免疫吸附试验（ELISA）可用于可溶性抗原、细胞和病毒等 McAb 的检测。（3）免疫荧光试验适合于细胞表面抗原的 McAb 的检测。（4）其它如间接凝集试验、细胞毒性试验、旋转粘附双层吸附试验等。

（四）杂交瘤的克隆化

杂交瘤克隆化一般是指将抗体阳性孔进行克隆化。因为经过 HAT 筛选后的杂交瘤克隆不能保证一个孔内只有一个克隆。在实际工作中，可能会有数个甚至更多的克隆，可能包括抗体分泌细胞、抗体非分泌细胞、所需要的抗体（特异性抗体）分泌细胞和其它无关抗体的分泌细胞。要想将这些细胞彼此分开就需要克隆化。克隆化的原则是，对于检测抗体阳性的杂交克隆尽早进行克隆化，否则抗体分泌的细胞会被抗体非分泌的细胞所抑制，因为抗体非分泌细胞的生长速度比抗体分泌的细胞生长速度快，二者竞争的结果会使抗体分泌的细胞丢失。即使克隆化过的杂交瘤细胞也需要定期的再克隆，以防止杂交瘤细胞的突变或染色体丢失，从而丧失产生抗体的能力。

克隆化的方法很多，最常用的是有限稀释法和软琼脂平板法。

1. 有限稀释法克隆

（1）克隆前 1 天制备饲养细胞层（同细胞融合）。

2）将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹干，计数。

（3）调整细胞为 3~10 个细胞/ml。

（4）取头天准备的饲养细胞层的细胞培养板，每孔加入稀释细胞 100 μ l。孵育于 37℃、5%CO₂ 孵箱中。

(5) 在第 7 天换液，以后每 2~3 天换液 1 次。

(6) 8~9 天可见 细胞克隆形成，及时检测抗体活性。

(7) 将阳性孔的细胞移至 24 孔板中扩大培养。

(8) 每个克隆应尽快冻存。

2. 软琼脂培养法克隆

(1) 软琼脂的配制：含有 20%NCS（小牛血清）的 2 倍浓缩的 RPMI1640。

①1%琼脂水溶液：高压灭菌，42℃ 预热。

②0.5%琼脂：由 1 份 1%琼脂加 1 份含 20%小牛血清的 2 倍浓缩的 RPMI1640 配制而成。置 42℃ 保温。

(2) 用上述 0.5%琼脂液（含有饲养细胞）15ml 倾注于直径为 9cm 的平皿中，在室温中待凝固后作为基底层备用。

(3) 按 100/ml，500/ml 或 5000/ml 等浓度配制需克隆的细胞悬液。

(4) 1ml 0.5%琼脂液（42℃ 预热）在室温中分别与 1ml 不同浓度的细胞悬液相混合。

(5) 混匀后立倾注于琼脂基底层上，在室温中 10min，使其凝固，孵育于 37℃、5%CO₂ 孵箱中。

(6) 4~5 天 后即可见针尖大小白色克隆，7~10 天后，直接移种至含饲养细胞的 24 孔中进行培养。

(7) 检测抗体，扩大培养，必要是地再克隆化。

(五) 杂交瘤细胞的冻存与复苏

1. 杂交瘤细胞的冻存 及时冻存原始孔的杂交瘤细胞每次克隆化得到的亚克隆细胞是十分重要的。因为在没有建立一个稳定分泌抗体的细胞系的时候，细胞的培养过程中随时可能发生细胞的污染、分泌抗体能力的丧失等等。如果没有原始细胞的冻存，则可因上述意外而前功尽弃。

杂交瘤细胞的冻存方法同其他细胞系的冻存方法一样，原则上细胞应在每支安瓿含 1×10^6 以上，但对原始孔的杂交瘤细胞可以因培养环境不同而改变，在 24 孔培养板中培养，当长满孔底时，一孔就可以装一支安瓿冻存。

细胞冻存液：50%小牛血清；40%不完全培养液；10%DMSO（二甲基亚砷）。

冻存液最好预冷，操作动作轻柔、迅速。冻存时从室温可立即降至 0℃ 后放入 -70℃ 超低温冰箱，次日转入液氮中。也可用细胞冻存装置进行冻存。冻存细胞要定期复苏，检查细胞的活性和分泌抗体的稳定性，在液氮中细胞可保存数年或更长时间。

2. 细胞复苏方法 将玻璃安瓿自液氮中取出，放 37℃ 水浴中，在 1min 内使冻存的细胞解冻，将细胞用完全培养液洗涤两次，然后移入头天已制备好的饲养层细胞的培养瓶内，置 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养，当细胞形成集落时，检测抗体活性。

（六）单克隆抗体的大量生产

大量生产单克隆抗体的方法主要有两种：

（1）体外使用旋转培养管大量培养杂交瘤细胞，从一清液中获取单克隆抗体。但此方法产量低，一般培养液内抗体含量为 10~60μg/ml,如果大量生产，费用较高。

（2）体内接种杂交瘤细胞，制备腹水或血清。

①实体瘤法：对数生长期的杂交瘤细胞按 1~3×10⁷/ml 接种于小鼠背部皮下，每处注射 0.2ml,共 2~4 点。待肿瘤达到一定大小后（一般 10~20 天）则可采血，从血清中获得单克隆 抗体的含量可达到 1~10 mg/ml。但采血量有限。

②腹水的制备：常规是先腹腔注射 0.5ml Pristane (降植烷)或液体石蜡于 BALB/C 鼠，1~2 周后腹腔注射 1×10⁶ 个杂交瘤细胞，接种细胞 7~10 天后可产生腹水，密切观察动物的健康状况与腹水征象，待腹水尽可能多，而小鼠濒于死亡之前，处死小鼠，用滴管将腹水吸入试管中，一般一只小鼠可获 5~10ml 腹水。也可用注射器抽提腹水，可反复收集数次。腹水中单克隆抗体含量可达到 5~10mg/ml，这是目前最常用的方法，还可将腹水中细胞冻存起来，复苏后转种小鼠腹腔则产生腹水块、量多。

（七）单克隆抗体的鉴定

对制备的 McAb 进行系统的鉴定是十分必要的，应做下述几个方面的鉴定：

1. 抗体特异性的鉴定 除用免疫原（抗原）进行抗体的检测外，还应该用与其抗原成分相关的其它抗原进行交叉试验，方法可用 ELISA、IFA 法。例如：①制备抗黑色素瘤细胞的 McAb，除用黑色素瘤细胞反应外，还应该用其它脏器的肿瘤细胞和正常细胞进行交叉反应，以便挑选肿瘤特异性或肿瘤相关抗原的单克隆抗体。②制备抗重组的细胞因子的单克隆抗体，应首先考虑是否与表达菌株的蛋白有交叉反应，其次是与其它细胞因子间有无交叉。

2. McAb 的 Ig 类与亚类的鉴定 一般在用酶标或荧光素标记的第二抗体进行筛选时已经基本上确定了抗体的 Ig 类型。如果用的是酶标或荧光素标记的兔抗鼠 IgG 或 IgM，则检测出来的抗体一般是 IgG 类

或 IgM 类。至于亚类则需要用标准抗亚类血清系统作双扩或夹心 ELISA 来确定。在作双扩试验时，如加入适量的 PEG（3%），更有利于沉淀线的形成。

3. McAb 中和活性的鉴定 用动物或细胞的保护实验来确定 McAb 的生物学活性。例如，如果确定抗病毒 McAb 的中和活性，则可用抗体和病毒同时接种于易感的动物或敏感的细胞，来观察动物或细胞是否得到抗体的保护。

4. McAb 识别抗原表位的鉴定 用竞争结合试验，测相加指数的方法，测定 McAb 所识别抗原位点，来确定 McAb 的识别的表位是否相同。

5. McAb 亲合力的鉴定 用 ELISA 或 RIA 竞争结合试验来确定 McAb 与相应抗原结合的亲合力。