

QuickAntibody 佐剂应用实例

小鼠抗 VP1 蛋白多抗制备

委托单位：中国 CDC 病毒病所

报告时间：2014 年 5 月 23 日

1. 免疫小鼠
 - 1.1. 抗原：VP1 蛋白
 - 1.2. 抗原用量：10 μ g/次，共 2 次
 - 1.3. 动物：小鼠 BALB/c，共 6 只，其中 5 只注射抗原，1 只不注射抗原作为阴性对照
 - 1.4. 佐剂：QuickAntibody-3W
 - 1.5. 免疫方法：
 - 1.5.1. 用生理盐水将 VP1 蛋白稀释到 10 μ g/50 μ l。
 - 1.5.2. 充分混匀 QuickAntibody-3W，无菌条件下取出所需用量（按每针次 50 μ l）与抗原按体积比 1:1 迅速混匀。
 - 1.5.3. 通过后腿小腿肌肉注射免疫小鼠，每只小鼠注射 100 μ l。
 - 1.5.4. 第 14 天按同样方式加强免疫一针。注：每次佐剂和抗原现配现用。
 - 1.5.5. 第 21 天采微量尾血进行 ELISA 测定，抗体滴度应达到 1:10000~1:100000 或更高，即可摘眼球采全血。
2. 血清滴度检测
 - 2.1. 试剂
 - 2.1.1. 包被液
 - 2.1.1.1. Na₂CO₃, 1.5 g
 - 2.1.1.2. NaHCO₃, 2.93 g
 - 2.1.1.3. Distilled water, 1 liter, pH to 9.6
 - 2.1.2. 封闭液
 - 2.1.2.1. Phosphate Buffered Saline (PBS) containing 1% w/v BSA
 - 2.1.3. 洗脱液
 - 2.1.3.1. Phosphate Buffered Saline containing 0.05% v/v Tween®-20
 - 2.2. 方法
 - 2.2.1. 用包被液将抗原 VP1 蛋白稀释到 5 μ g/ml，每个孔加 100 μ l。盖上 96 孔板，放于 25 $^{\circ}$ C 温箱中保温 1hr。
 - 2.2.2. 用洗脱液洗板 3 次。
 - 2.2.3. 各孔中加入 150 μ l 封闭液，25 $^{\circ}$ C 温箱中保温 1hr。
 - 2.2.4. 用洗脱液洗板 5 次。
 - 2.2.5. 各孔中加入 100 μ l 适当稀释的抗血清，25 $^{\circ}$ C 温箱中保温 1hr。
 - 2.2.6. 用洗脱液洗板 5 次。
 - 2.2.7. 各孔中加入 100 μ l 过氧化物酶（POD）标记的二抗（用洗脱液 1:8000 稀释），25 $^{\circ}$ C 温箱中保温 1hr。

2.2.8. 用洗脱液洗板 5 次。

2.2.9. 各孔中加入 50 μ lTMB 溶液，室温放置约 12min。（如有要求，需避光）。

2.2.10. 加 100 μ l 终止液，轻轻敲击以充分混匀。

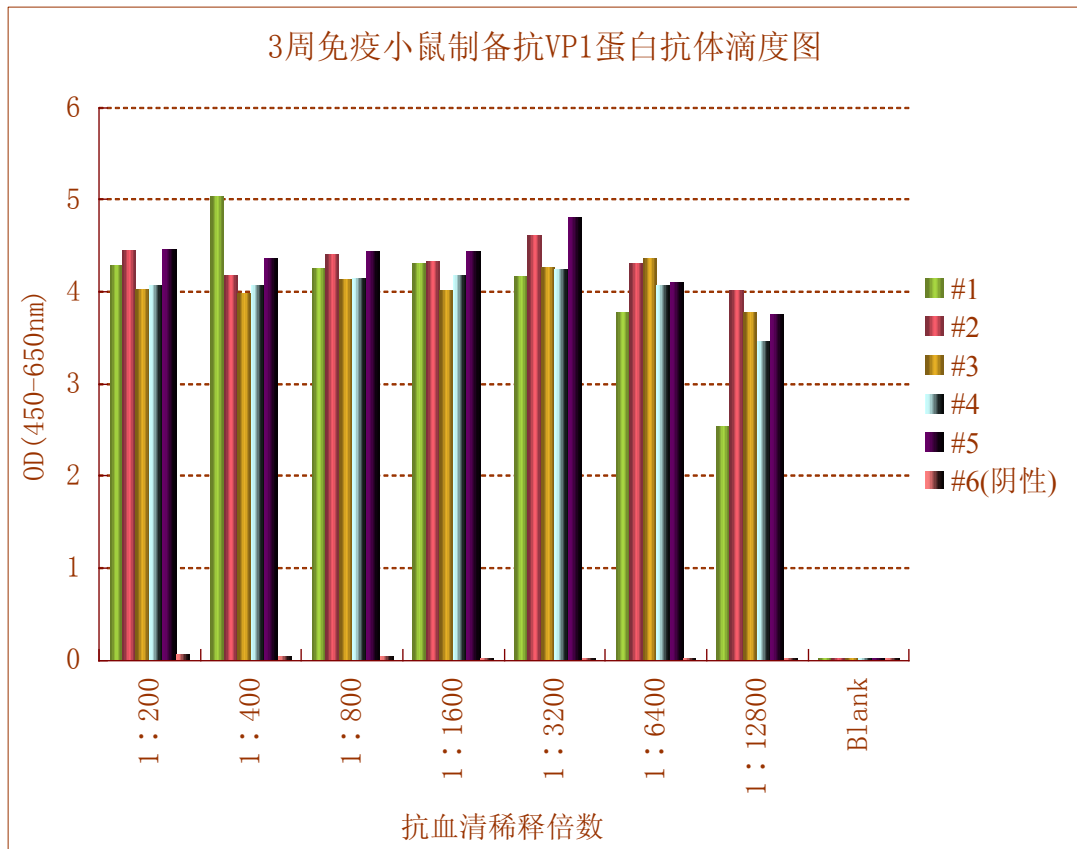
2.2.11. 在 15min 内完成 OD 值的测定（450-650nm），绘制血清抗体滴度图。

2.3. 原始数据

	#1	#2	#3	#4	#5	#6(阴性*)	抗体稀释度
A	4.284	4.447	4.037	4.076	4.473	0.068	1:200
B	5.036	4.177	3.986	4.071	4.365	0.045	1:400
C	4.260	4.399	4.136	4.153	4.430	0.031	1:800
D	4.311	4.336	4.018	4.187	4.430	0.027	1:1600
E	4.169	4.610	4.278	4.246	4.807	0.029	1:3200
F	3.775	4.310	4.368	4.070	4.099	0.025	1:6400
G	2.550	4.012	3.778	3.461	3.758	0.018	1:12800
H	0.023	0.019	0.021	0.020	0.021	0.016	Blank

阴性*：未注射抗原的小鼠。

2.4. 数据分析



2.5. 结论

全部 5 只注射了 VP1 蛋白的小鼠均产生了抗 VP1 的抗体，滴度均超过 1 : 12800
(注：该稀释度下 OD 值仍高达 2.550-4.012，以 Cutoff 值=0.1，实际滴度应该更高)。
5 只小鼠抗体滴度比较平均，个体差异不大。