

免疫原的制备

免疫原：指能诱导机体产生抗体或致敏淋巴细胞，并能在体内外与抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应的物质。

一、颗粒性抗原的制备

颗粒性抗原如各种细胞、细菌、寄生虫等皆为颗粒性抗原。

细胞抗原（如绵羊红细胞）一般情况下经生理盐水或其他溶液洗净，配制一定浓度即可；

细菌抗原多用液体或固体培养物，经集菌后处理。有的需经特殊处理，如鞭毛抗原需用 0.3%~0.5% 甲醛处理；菌体抗原加温 100℃ 2~2.5h 去除鞭毛抗原；毒素抗原则在杀菌后再加 0.5%~1.0% 氯化钙溶液等。

颗粒性抗原大多用静脉内注射免疫法，较少加佐剂作皮内注射。

二、可溶性抗原制备

蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、酶、补体、细菌毒素、免疫球蛋白片段、核酸等皆为良好的可溶性抗原，免疫前常需纯化。

（一）组织和细胞抗原的制备

1.组织和细胞抗原的制备：通常需要先将来源于人和动物的组织和细胞破碎，再经一定的方法纯化，才能获得所需的抗原。细胞破碎方法有：

（1）高速组织捣碎机法；

（2）研磨法（可用组织匀浆器或乳钵） 组织匀浆液要离心沉淀，沉淀物为组织和细胞碎片，上清液为提取可溶性抗原的材料。

2.组织细胞或培养细胞可溶性抗原制备：除上述机械捣碎获取外，尚有酶处理法，常用胃蛋白酶或胰酶，可获得游离的单个细胞。

细胞抗原分膜蛋白抗原、细胞质抗原（主要为细胞器）、细胞核与核膜抗原，制备这些抗原前均需将细胞破碎，方法有：

（1）反复冻融法：一般-20℃反复冻融。

（2）超声破碎法：利用超声波机械振动原理使细胞破碎。

（3）自溶法：利用组织、细菌自身酶系统使之裂解。

（4）酶处理法：常用溶菌酶、蜗牛酶、纤维素酶等使细菌或组织裂解。

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。

(5) 表面活性剂处理法：常用十二烷基硫酸钠等表面活性剂处理。

(二) 超速离心分离法

用于分离亚细胞成分和蛋白质，是进一步纯化的第一次过筛。可分下列方法：

1. 差速离心法：低速离心高速离心交替进行，分离大小差异的抗原颗粒；

2. 梯度密度离心法：是一种区带分离法，通过梯度密度离心，使各类分子量的颗粒得以分离，也可以采用梯度柱的形式分离。

超速离心分离或梯度密度离心仅适用于少数大分子抗原及一些比重较轻的抗原，而不适用于大多数中、小分子抗原。

(三) 选择沉淀法

选择沉淀法是采用各种沉淀剂或某些条件使抗原成分沉淀的方法。

1. 核酸去除法：可采用氯化锰、硫酸鱼精蛋白等核酸提取沉淀剂，而核糖核酸降解法更简便（采用 DNA 或 RNA 酶）；

2. 盐析沉淀法：常采用硫酸铵使蛋白抗原进行粗筛、提取丙种球蛋白及抗原浓缩；

3. 有机溶剂沉淀法：常采用乙醇或丙酮；

4. 水溶性非离子型聚合物沉淀法：常用非离子型聚合物为分子量为 2000~6000 的聚乙二醇（PEG）。

(四) 凝胶过滤法

又称分子筛层析。通过凝胶分子筛作用，可将大、中、小三类分子分开，选择凝胶柱时应注意选用适于分离范围内的凝胶。

(五) 离子交换层析法

离子交换层析是利用一些带电离基团的凝胶或纤维素，吸附带有相反电荷的蛋白质抗原。常用的离子交换剂有：

1. 具有离子交换基团的纤维素。

2. 具有离子交换基团的交联葡萄糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺。

3. 被覆以离子化物质的细粉。

4. 凝胶合成的高度交联树脂。

(六) 亲和层析法

亲和层析是利用生物分子间所具有的专一性亲和力而设计的层析技术。如抗原和抗体、酶和酶抑制物、酶蛋白和辅酶、激素和受体、DNA 和 RNA 等之间有特殊亲和力，一定条件

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。

下，两者可紧密结合成复合物，如将复合物的一方固定于固相载体上，则可从溶液中分离和提纯另一方。

1.亲和层析支持物的选择：常用的有琼脂糖珠（sepharose2B、4B、6B）、琼脂糖、聚丙烯酰胺、多孔玻璃球等。

2.配体的选择：配体指具有亲和力的双方，或与受体特异性结合的结构物，作为免疫亲和层析则为抗原和抗体的同义语。良好配体必须具备抗原和抗体单一特异性；抗原和抗体间有较强亲和力；配体有一适宜的化学基团。

3.抗原或抗体与支持物的结合：结合的方法很多，可归纳为载体结合法、物理吸附法、交联法、网络法。

（七）免疫球蛋白片段的制备

五种免疫球蛋白都具抗原性、皆可提取及纯化，但如分解成片段（如 Fab 片段、Fc 片段、轻链片段等）作为免疫原可制备出分辨力更高的特异性抗血清。制备方法有：

1.温和条件下离析亚单位。如改变 pH；用盐酸胍或脲等强变性剂将亚单位分开；

2.用还原法或氧化法解离二硫键；

3.溴化氰裂解法。用溴化氰裂解蛋白质肽链；

4.酶裂解法。如木瓜酶可将 IgG 裂解成 2 个 Fab 片段及 1 个 Fc 片段；胃蛋白酶可将 IgG 裂解成 F(ab')₂ 片段及数个小片段；胰蛋白酶可将 IgG 切成不规则的肽链。

（八）纯化抗原的鉴定

主要对纯化抗原的含量、理化性质、纯度及免疫活性进行鉴定，常用方法有酚试剂法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法、免疫电泳法、免疫双扩散法等，实际工作中常几种方法联用作纯度鉴定。

三、半抗原的制备

半抗原：某物质在独立存在时只具有反应原性而无免疫原性，这些物质称为半抗原。如一些分子量小于 4000 的有机物质，如多肽、大多数的多糖、甾族激素、脂肪胺、类脂质、核苷、某些小分子量的药物等。

半抗原与蛋白质载体或高分子聚合物结合后才有免疫原性。

（一）载体的选择

1.蛋白质类：常用的有人血清白蛋白、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、牛甲状腺球蛋白等。以牛血清白蛋白最常用。蛋白质与半抗原结合基于游离氨基、羧基、酚基、巯基、吡啶基、咪唑基、胍基等活性基团的缩合。

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。

2.多肽类聚合物：常用多聚赖氨酸，分子量达十几万至几十万，与半抗原结合后可诱发动物产生高亲和力及高滴度的抗血清。

3.大分子聚合物和某些颗粒：聚乙烯吡咯烷酮、活性炭、羧甲基纤维素等皆常用。

（二）半抗原-载体联接方法

1.碳二亚胺法。

2.戊二醛法。

3.氯甲酸异丁酯法。

一般认为应连接 20 个以上半抗原才能使动物有效产生抗体。