

第三章

免疫原和抗血清的制备

第一节 免疫原的制备

免疫原(Immunogen): 是能诱导机体产生抗体并能与抗体发生反应的物质。

- 颗粒(细胞)性抗原制备
- 可溶性免疫原制备
- 人工抗原的制备
- 佐剂

颗粒(细胞)性抗原制备

绵羊红细胞抗原

- 玻璃珠脱纤维蛋白法抗凝
- 肝素抗凝(10-30 IU/L)
- **NS洗涤3次 2000r/min 10min NS稀释至 2~5%**
- **4°C 可保存3周**

细菌细胞抗原的制备

- 培养 **37°C 24h**
- 菌体抗原 **100°C 水浴 2~2.5h 杀菌**
- 鞭毛抗原 **0.4% 甲醛(37 °C 24h或4 °C 3-5天)**
- **NS稀释成8~10亿/ml**

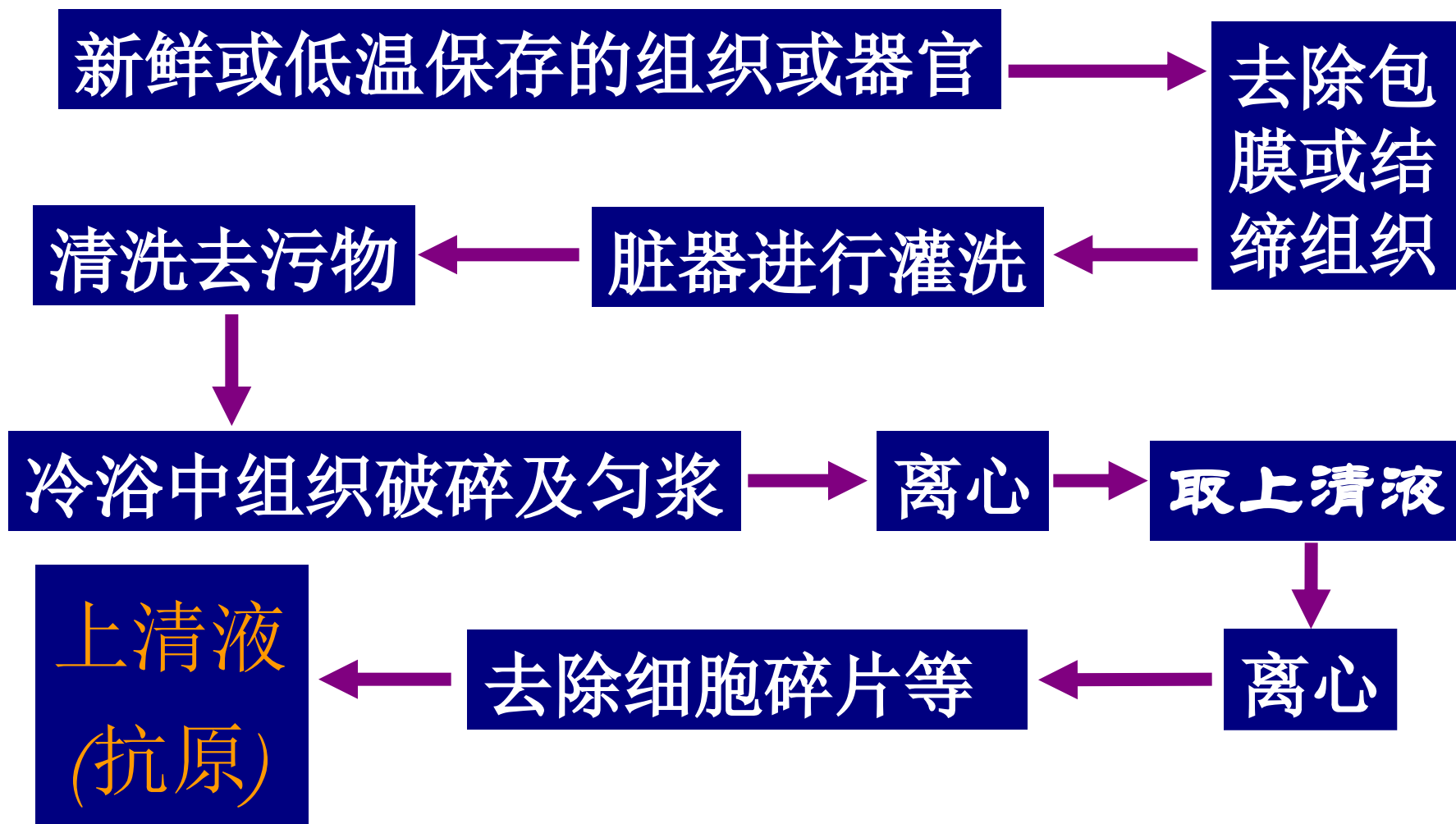
可溶性抗原制备

可溶性抗原： 蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、酶类、
补体、脂多糖、细菌外毒素和核酸

步骤：

- 组织和细胞可溶性抗原的制备
- 蛋白质的提纯
- 免疫球蛋白片段的制备
- 纯化抗原的鉴定

组织和细胞成分混合抗原制备流程



细胞破碎方法

- 物理法

 - 机械破碎

 - 冻融法

 - 超声破碎法

- 化学法

 - 酶处理法

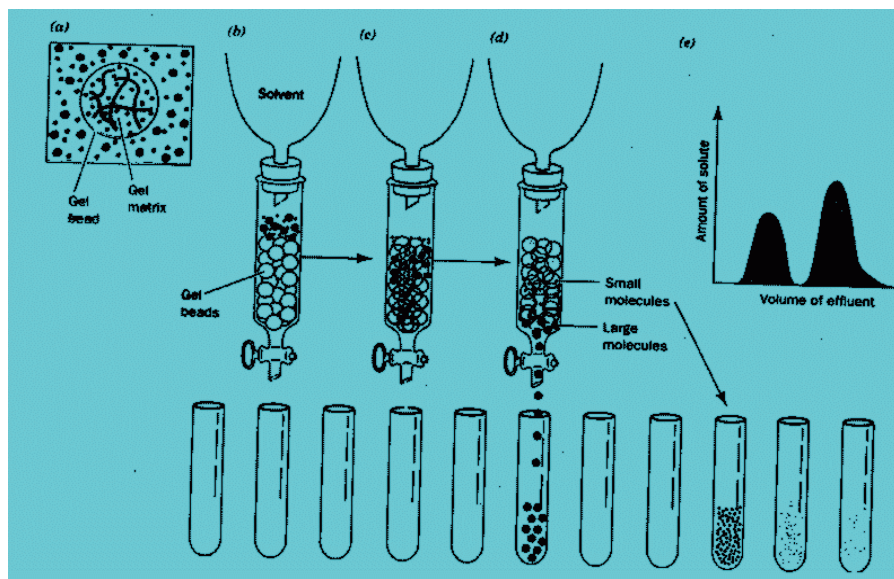
 - 表面活性剂处理

可溶性抗原的纯化

蛋白质类抗原

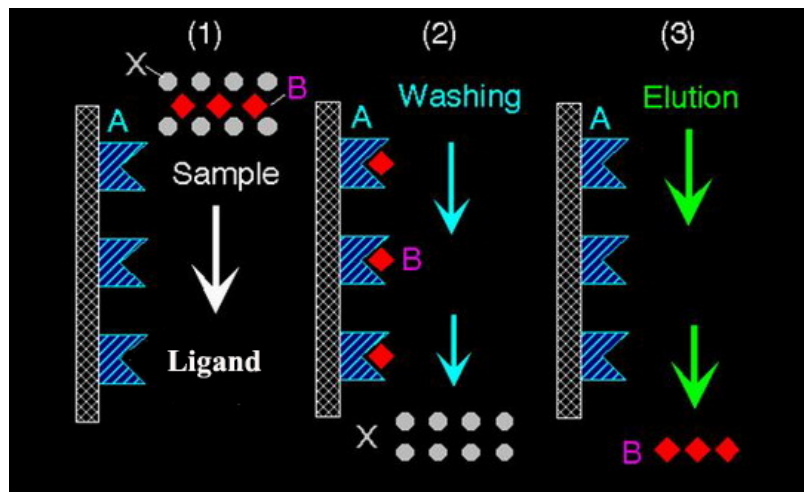
- 超速离心法
- 选择性沉淀法
- 凝胶层析法
- 离子交换层析法
- 亲和层析法
- 电泳法

凝胶层析与亲和层析



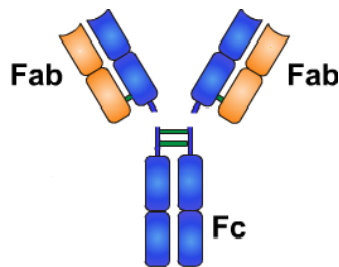
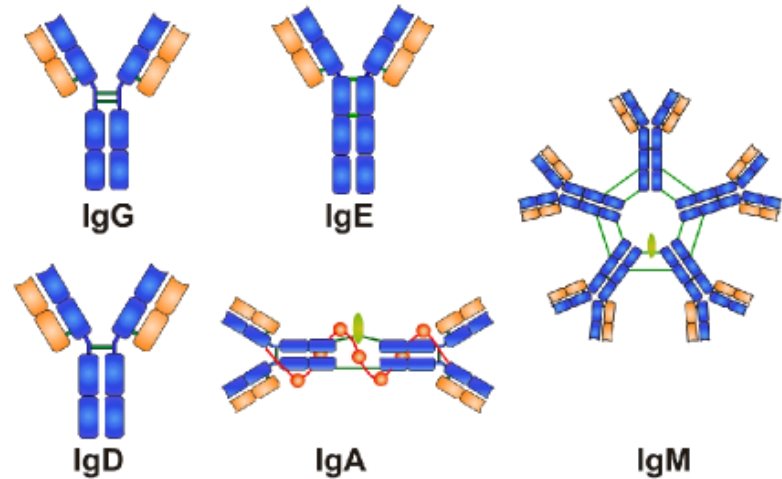
凝胶层析

亲和层析

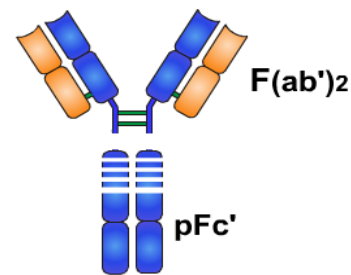


免疫球蛋白抗原的制备

- 酶裂解法
- 氧化法和还原法
- 强变性剂或改变pH



木瓜蛋白酶
(papain)



胃蛋白酶
(pepsin)

人工抗原的制备

- 人工抗原

是指经过人工合成或修饰后具有免疫原性的半抗原。大多为小或低分子量的化学物质。

多糖、多肽、甾族激素、脂肪胺、类脂质、核苷、某些药物(包括抗生素)及其他化学物品等。

- 载体

蛋白质: 人血清白蛋白、牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白等。

多肽聚合物: 人工合成 多聚赖氨酸

大聚合物: 羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮

**** (至少20个以上的半抗原分子连接到一个载体分子上)**

半抗原与载体的连接

- **碳化二亚胺法(R-NH=CH-R') :**

半抗原与载体蛋白质 混合 搅拌1~2h 室温24h
透析除去未反应的半抗原

- **戊二醛法(OHC-(CH₂)₃-CHO):**

半抗原的NH₂ 与 载体蛋白-NH₂ 混合
形成半抗原-N=CH-(CH₂)₃-CH=NH-载体蛋白

半抗原与载体的连接

氯甲酸异丁脂法:

- 半抗原-**COOH**载体与蛋白-**NH₂**在氯甲酸异丁脂存在情况下, 形成半抗原-**CO-NH**-载体蛋白
- 主要用于类固醇抗原制备

琥珀酸酐法:

- 半抗原与琥珀酸酐反应后, 形成带羧基的半抗原琥珀酸衍生物, 再经氯甲酸异丁脂法或碳化二亚胺法制备载体半抗原
- 用于不含羧基衍生物半抗原制备

佐 剂

概念： 与抗原同时或预先注射于机体，能增加机体免疫应答或改变免疫应答类型的物质。

目的：获得高效价抗体

要求：

- 改变抗原的活性基团构型
- 佐剂与抗原混合能延长抗原在局部组织的存留时间
- 直接或间接激活免疫活性细胞
- 无或低毒副作用

佐 剂

机理

- 增强抗原对机体的免疫原性
- 延长抗原在免疫动物的时间
- 增强抗体的产生能力及效价
- 改变抗原免疫应答类型
- 改变抗原的分布
- 增强局部对变应原的超敏反应

缺点

- 注射佐剂可引起局部形成肉芽肿和无菌性脓肿
- 影响抗血清的特异性
- 反复注射易发生超敏反应

常用佐剂的种类

- 氢氧化铝佐剂

由5%硫酸铝与5%氢氧化钠反应，形成氢氧化铝沉淀

- 明矾佐剂

- 弗氏佐剂(Freund adjuvant)

弗氏不完全佐剂 弗氏完全佐剂（卡介苗）

- 细胞因子

第三节 抗血清的制备

- 抗血清 (**Antiserum**):

将制备好的免疫原按一定的免疫程序接种给动物，诱使该动物体内的B细胞克隆被激活，并产生针对该抗原多个不同表位的混合性多克隆抗体。采集该动物的血液，分离含有抗体的血清，即为抗血清。

免疫动物选择

免疫接种用的动物： 主要是哺乳类和禽类

兔、绵羊、豚鼠、鸡、山羊、鼠、马



要求：

- 抗原与动物种属关系差异越远越好
- 适龄、健壮、正常、 体重
- 按免疫血清用量和要求选择不同动物



免疫方法

- 注射的免疫原剂量
- 免疫间隔时间：
 - 可溶性抗原首次常加佐剂
 - 重复**5至8次**
 - 间隔一至二周



- 免疫途径：
 - 静脉、腹腔、肌肉、皮下、皮内、淋巴结、足掌

免疫动物采血法

- 颈动脉放血法： 羊、兔最常用的方法
- 静脉采血法： 羊、兔，小鼠断尾或眼球
- 心脏采血法： 兔、豚鼠、鸡



免疫血清的纯化

IgG类抗体的纯化

- **盐析沉淀法：**经硫酸铵盐析提取 γ 球蛋白 3次，基本为IgG类抗体，
- **离子交换层析法：**DEAE纤维素或QAE纤维素。
- **亲和层析法：**将抗原交联Sepharose 4B制成亲和层析柱（抗血清、过柱、洗脱、改变洗脱液酸硷度，IgG从层析柱解离、收集）。

免疫血清的纯化

单价特异性抗血清的纯化

- 定义： 单价特异性抗血清是指只与其特异性抗原发生反应的抗血清。
- 免疫原不纯 杂抗体
- 纯化方法：
 - a、亲和层析法：将杂抗原交联Sepharose 4B制成亲和层析柱。
 - b、吸附剂法：用戊二醛等双功能试剂将不含特异性抗原的抗原液固相化，做成固相吸附剂。

抗血清的鉴定与保存

- **效价的鉴定：**即为抗体活性滴定
 - 颗粒性抗原的抗体用凝集试验
 - 可溶性抗原的抗体用双向琼脂扩散试验
- **特异性鉴定：** 交叉反应率 双扩 免疫电泳
- **纯度鉴定：** 免疫电泳分析法 SDS-PAGE 双扩
- **亲和力鉴定：** 亲和常数 平衡透析法 ELISA
- **抗血清的保存**
 - 4°C保存：可保存3~6个月
 - 低温保存：-20~-40°C可保存2~3年
 - 冰冻干燥保存：可保存5~10年