



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103454413 B

(45) 授权公告日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201310397690. 4

期), 68-72.

(22) 申请日 2013. 09. 04

审查员 胡晓佳

(73) 专利权人 吉日本图

地址 010018 内蒙古自治区呼和浩特市赛罕
区东苑小区 A7-1-108

专利权人 刘微 玉斯日古楞

(72) 发明人 吉日本图 刘微 玉斯日古楞

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务
所 11305

代理人 向华

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102766207 A, 2012. 11. 07, 全文.

WO 02085944 A2, 2002. 10. 31, 全文.

WO 2012007593 A1, 2012. 01. 19, 全文.

WO 2004041863 A2, 2004. 05. 21, 全文.

夏丽洁 等. 采用双峰驼重链抗体特异的抗
血清检测不同抗原免疫骆驼过程中血清重链抗体
的水平. 《中国畜牧兽医》. 2012, 第 39 卷 (第 4

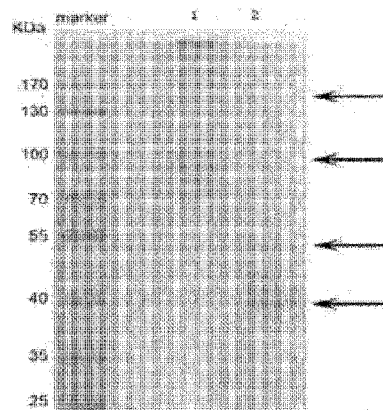
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

双峰驼特异性抗体制备及免疫检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫骆驼的最佳免疫程序及
方法, 所述免疫方法为双峰驼背部皮下多点注射,
免疫周期为 2 周, 注射抗原剂量为 1mg/mL, 免疫次
数为 3 次. 本发明还涉及兔抗骆驼 IgG 酶标二抗
的制备流程及方法以及应用兔抗骆驼酶标二抗通
过 ELISA 检测骆驼抗血清效价的方法及最佳检测
条件。



1. 一种通过免疫骆驼来制备抗体的方法,其特征在于所述方法包括如下步骤:

(1) 双峰驼背部皮下多点注射抗原,免疫周期为 2 周,注射抗原剂量为 1mg/mL,免疫次数为 3 次;

(2) 终免 15 天后从骆驼颈部静脉取血,分离血清;

所免疫的骆驼为内蒙古苏尼特双峰驼,所采用的抗原为牛血清白蛋白 BSA。

2. 一种检测权利要求 1 所述的经过免疫的骆驼体内抗血清效价的方法,其特征在于,所述方法为应用兔抗骆驼酶标二抗的 ELISA 检测方法,其中抗原包被浓度为 0.39ug/ml,一抗最佳工作浓度为 1:200,二抗最佳工作浓度为 1:2000,封闭液为 5% 脱脂奶粉,所述骆驼为内蒙古苏尼特双峰驼。

3. 权利要求 2 所述的一种检测经过免疫的骆驼体内抗血清效价的方法,其特征在于,所述二抗为酶标的兔抗骆驼 IgG,制备兔抗骆驼 IgG 酶标二抗步骤如下:①利用初免前骆驼血清,亲和层析 Pro A 法纯化骆驼 IgG;② Lowry 法蛋白定量;③ SDS-PAGE 纯度检测;④制备兔抗骆驼 IgG 抗血清,背部皮下多点注射,注射抗原剂量为 0.6mg/mL,免疫周期为 2 周,免疫次数为 3 次;⑤亲和层析 Pro A 法纯化兔抗骆驼 IgG,⑥ ELISA 法检测兔抗骆驼 IgG 抗血清效价;⑦简易过碘酸钠法标记抗体;⑧ Lowry 法蛋白定量标记抗体;⑨ ELISA 法测定标记抗体效价。

4. 一种检测权利要求 1 所述的经过免疫的骆驼体内抗血清效价的间接 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含:(1) 作为一抗的骆驼 IgG,一抗浓度为 1:200;(2) 抗原,其包被浓度为 0.39ug/ml;(3) 作为二抗的酶标兔抗骆驼 IgG,其浓度为 1:2000;(4) 作为封闭液的 5% 脱脂奶粉,所述骆驼为内蒙古苏尼特双峰驼。

双峰驼特异性抗体制备及免疫检测方法

(一) 技术领域

[0001] 本发明属于抗体工程技术领域,本发明以内蒙古苏尼特双峰驼为研究对象,利用牛血清白蛋白(BSA)制备抗BSA的骆驼多抗,优化免疫条件。并制备兔抗骆驼IgG酶标二抗,建立间接ELISA检测试剂盒。

(二) 背景技术

[0002] 免疫系统分为固有免疫和适应免疫,其中适应免疫又分为体液免疫和细胞免疫。

[0003] 抗血清之所以能和有关抗原起免疫结合反应,是因为在抗血清中,含有相关的抗体蛋白质。在20世纪60年代初将具有抗体活性的动物蛋白定义为免疫球蛋白(immunoglobulin)。主要存在于血浆中,也见于其他体液、组织和一些分泌液中。一般Ig分子上L链的抗原性总是相同的(κ 或 λ)。但H链抗原性不相同(μ 链、 γ 链、 α 链、 δ 链和 ϵ 链),据其将不同H链与L链组成完整Ig的分子可分为五类,即免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白D(IgD)和免疫球蛋白E(IgE),IgG, IgA和IgM还有亚类。Ig分子的基本结构是由四肽链组成的,即由二条相同的分子量较小的轻链(L链)和二条相同的分子量较大的重链(H链)组成的。

[0004] 人体血清免疫球蛋白的主要成分是IgG,它占总的免疫球蛋白的70-75%,分子量约15万,含糖2~3%。

[0005] 人体血清免疫球蛋白IgG是初级免疫应答中最持久、最重要的抗体,它仅以单体形式存在。大多是抗菌性、抗毒性和抗病毒抗体属于IgG,它在抗感染中起到主力军作用,能够促进单核巨噬细胞的吞噬作用(调理作用),中和细菌毒素的毒性(中和毒素)和病毒抗原结合使病毒失去感染宿主细胞的能力(中和病毒)。IgG在机体合成的年龄要晚于IgM,在出生后第3个月开始合成,3-5岁接近成年人水平。它是唯一能通过胎盘的Ig,在自然被动免疫中起重要作用。此外,IgG还具有调理吞噬和结合SPA等作用。

[0006] 1993年,Hamers-Casterman等报道了在骆驼科动物(单峰驼,双峰驼,美洲驼等)体内存在一种只含重链不含轻链的天然重链抗体(Heavy chain antibody,HCAb)。之后,在一些软骨鱼体内也发现了与骆驼重链抗体结构相似的新抗原受体(new antigen receptor,NAR)。

[0007] 由于骆驼重链抗体是纯天然的,不能直接作用于人,或者为人类所用。因此克隆骆驼体内重链抗体的可变区后,得到的仅由一个重链可变区组成的单域抗体,称之为重链可变区基因抗体(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody,VHH),其直径为2.5nm,长4nm,因此又被称为纳米抗体。作为一种小型的基因工程抗体,纳米抗体具备的高表达性、水溶性、稳定性、强组织穿透性及较弱的免疫原性等优点,使得该抗体在基础研究及药物开发等领域拥有广阔的前景[10]。目前,在欧美地区,基于骆驼重链抗体的VHH单域抗体的研究已成为一热点[11],但在国内仍鲜见报道。

[0008] 纳米抗体作为一个严格的单体,其特殊的结构及性质,使其具备一些其他普通抗体不具有的独特性质。如容易获得和表达、高水溶性和稳定性、靶向性、人源化简单等。

[0009] 目前国内报道中,仅对一峰骆驼的血清分析不同抗原在骆驼的免疫过程中产生重链抗体的情况,不免存在偏颇。而则国外的研究重点在于重组 VHH 抗体的理化性质、应用以及抗原靶向性方面。目前对于制备骆驼抗体免疫过程的最佳条件却未有报道。

[0010] 鉴于纳米抗体的强大优势及应用。本发明以内蒙古苏尼特双峰驼为研究对象,本着抗原应用最普遍、易得的原则,针对一定量的骆驼群体进行分析,制备骆驼抗 BSA 多克隆抗体,探索双峰驼特异性抗体制备过程中的机体反应变化,确定骆驼的最佳免疫次数。为今后分析双峰驼重链抗体的抗病保护作用,制备纳米抗体做铺垫,同时为今后研发新型的基因工程抗体提供新的方向。

[0011] 同时,由于国际市场上抗骆驼 IgG 酶标二抗还没有商品化,为今后纳米抗体的研究带来不便,本发明通过制备兔抗骆驼 IgG 酶标二抗,建立 ELISA 方法诊断试剂盒,检测免疫后的骆驼血清中抗体的效价。

(三) 发明内容

[0012] 1. 本发明要求保护免疫骆驼的最佳免疫程序及方法;

[0013] 本发明免疫方法为双峰驼背部皮下多点注射,免疫周期为 2 周,注射抗原剂量为 1mg/mL,免疫次数为 3 次;

[0014] 2. 本发明要求保护制备兔抗骆驼 IgG 酶标二抗所涉及的技术指标及结果;

[0015] 本发明制备兔抗骆驼 IgG 酶标二抗步骤如下:①亲和层析 Pro A 法纯化骆驼 IgG,② Lowry 法蛋白定量③ SDS-PAGE 纯度检测④制备兔抗骆驼 IgG 抗血清,背部皮下多点注射,注射抗原剂量为 0.6mg/mL,免疫周期为 2 周,免疫次数为 3 次。⑤亲和层析 Pro A 法纯化兔抗骆驼 IgG,⑥ ELISA 法检测兔抗骆驼 IgG 抗血清效价⑦简易过碘酸钠法标记抗体⑧ Lowry 法蛋白定量标记抗体⑨ ELISA 法测定标记抗体效价;

[0016] 3. 本发明要求保护应用兔抗骆驼酶标二抗 ELISA 检测骆驼抗血清效价方法及最佳检测条件。

[0017] 本发明检测骆驼抗血清最佳检测条件包括:①抗原抗体最佳工作浓度②最佳二抗稀释浓度③最佳封闭液。

[0018] 本发明以内蒙古苏尼特双峰驼为研究对象,利用牛血清白蛋白(BSA)制备抗 BSA 的骆驼多抗及兔抗骆驼 IgG 酶标二抗,并建立间接 ELISA 检测试剂盒。

[0019] 实验分为三部分:第一部分免疫骆驼,制备免疫骆驼血清;第二部分用纯化的骆驼 IgG 免疫兔子,制备兔抗骆驼 IgG 酶标二抗,为 ELISA 检测做准备;第三部分应用间接 ELISA 法检测免疫各个时期骆驼抗血清效价,最终确定最佳免疫次数,阐述双峰驼特异性抗体制备过程中的机体反应变化。

(四) 附图说明

[0020] 图 11 是非还原条件下 SDS-PAGE,条带于 170KD 为纯化内蒙双峰驼血清中的的混合的 IgG1、IgG3,条带于 90KD 处为纯化内蒙双峰驼血清中的的 IgG2;2 是还原条件下 SDS-PAGE,条带于 55 处为重链,40 处为轻链。

[0021] 图 2 纯化的骆驼 IgG Lowry 法蛋白定量标准曲线

[0022] 图 3 兔抗骆驼 IgG 酶标二纯化后和标记后 Lowry 法蛋白定量标准曲线

[0023] 图 4 兔抗骆驼 IgG 抗血清效价

[0024] 图 5 标记后兔抗骆驼 IgG 抗血清效价

[0025] 图 6 实验组每次免疫 P/N, 同一稀释度下五道柱状体从左至右分别是免疫前、初免、二免、三免和四免。由图可知, 0 免及初免 $P/N < 2.1$, 无抗体产生; 二免 $P/N > 2.1$ 的血清最大稀释度为 1:400; 在第三次和第四次免疫 $P/N > 2.1$ 的血清最大稀释度为 1:25600。

[0026] 图 7 对照组每次免疫 P/N, 同一稀释度下五道柱状体从左至右分别是免疫前、初免、二免、三免和四免。由图可知, 初免及之后的加强免疫的 P/N 值均未 > 2.1 , 及无抗体产生。

[0027] 图 8 实验组随免疫次数增加, 免疫血清中抗血清效价图中可知, 免疫三次即可。

(五) 具体实施方式

[0028] 1. 多克隆抗体的制备

[0029] 实验动物分成空白组 (3 峰) 和实验组 (3 峰) 两组。初免前分别颈部静脉抽取 20mL 阴性血液, 分离血清, 无菌分装后于 -40°C 冻存。空白组每次免疫生理盐水; 实验组免疫 0.1mg/ml BSA, 共免疫 4 次。每次免疫前及终免 15 天后从骆驼颈部静脉取血, 分离血清。

[0030] 2. ELISA 检测方法的初步建立

[0031] 2.1 兔抗驼 IgG 酶标二抗的制备

[0032] 1) 亲和层析法骆驼 IgG 的提纯;

[0033] ①洗涤将 Protein A 固定于铁架台。填料装柱后, 用超纯水 10 个柱床体积洗掉保护剂即乙醇;

[0034] ②平衡用 10 个柱体积的平衡缓冲液平衡柱子, 洗出液与起始缓冲液 pH 相等即可;

[0035] ③上样将血清上柱, 上样流速 $\leq 60\text{cm/h}$ 。

[0036] ④清洗用 20 个柱体积的平衡缓冲液清洗柱床体积, 直至 UV 线至基线。

[0037] ⑤洗脱用洗脱缓冲液 (甘氨酸 PH2.2) 洗脱, 在紫外 280nm 处高于 0.1 开始收集洗脱峰, 低于 0.1 时结束, 洗脱液立即用中和缓冲液中和到中性, 浓缩到所需体积。

[0038] 2) Lowry 法测定蛋白含量为 2.4mg/ml;

[0039] ①根据蛋白质浓度, 分别精确量取不同体积的标准蛋白质溶液, 各加 PBS 补至 0.2ml, 使标准蛋白的溶度分别为 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$;

[0040] ②精确量取样品加 PBS 补至 0.2ml;

[0041] ③将标准曲线和样品各加 1ml 碱性硫酸铜和 0.1ml Folin-酚试剂混匀, 在 750nm 处测 OD;

[0042] ④以标准蛋白的浓度为 Y 轴, 光吸收值为 X 轴, 得一标准曲线。由样品的光吸收值计算其浓度;

[0043] 3) SDS-PAGE 纯度检测;

[0044] ①准备一个干净的 200ml 的烧杯, 配制质量浓度为 10% 的分离胶

[0045] ②把配制好的分离胶加 4.7ml 至两块玻璃板中, 用少量异丙醇液封;

[0046] ③静置凝固, 倒掉异丙醇, 用滤纸吸干;

[0047] ④在干净的 50ml 烧杯内配制质量浓度为 5% 浓缩胶 (配制分离胶和浓缩胶时, 加质

量浓度为 10% 的过硫酸铵和 TEMED 的时候,要边摇烧杯边加,保证均匀),配方见表

[0048] ⑤用移液枪加 1mL 浓缩胶至分离胶上部,并轻轻插上梳齿,保证每个齿周围无气泡;

[0049] ⑥放置半小时,待浓缩胶凝固后,小心取出梳子,装进电泳槽。

[0050] ⑦蛋白跑胶:将还原 Loading Buffer、非还原 Loading Buffer、天然供试品 Buffer 见表 1

[0051] 表 1 Loading Buffer

	Tris	甘油	溴酚蓝	SDS	DTT
[0052] 还原变性 Loading Buffer	0.12M	20%	0.10%	4%	200mM
非还原变性 Loading Buffer	0.12M	20%	0.10%	4%	

[0053] 制得的样品分别跑胶,每孔上样 10 μ l ;

[0054] ⑧整个电泳过程冰浴,先用 80V 电压,待样品跑过浓缩胶后,加电压到 120V,当溴酚蓝跑到胶的底部时关闭电源;

[0055] ⑨电泳完后,卸下 PAGE 胶,在考马斯亮蓝染色液内染色过度,或者用微波炉略加热,加速染色;

[0056] ⑩旋转摇床,摇动脱色,1h 后看电泳结果并拍照。

[0057] 4) 兔抗骆驼 IgG 抗血清的制备

[0058] 实验动物平行 2 只。初免前分别颈部静脉抽取 20mL 阴性血液,分离血清,无菌分装后于 -40℃ 冻存。剂量为 0.6mg/mL 兔抗骆驼 IgG 于 0.5mL PBS/ 只,加 0.5mL 佐剂。共免疫 3 次。每次免疫前及终免 15 天后从颈部静脉取血,分离血清;

[0059] 5) 兔抗骆驼 IgG 纯化;

[0060] 同 1)

[0061] 6) ELISA 法测定兔抗骆驼 IgG 抗血清效价为 1:64000 ;

[0062] ①包被抗原

[0063] 抗原稀释的最终浓度是 1.25 μ g/mL。每孔加样 100 μ l,即每孔包被抗原的量为 0.125 μ g。每个血清样品做 12 个梯度稀释。

[0064] 抗原稀释好后,混匀。每孔加样 100 μ l, 盖上铝箔纸,4 度冰箱过夜。

[0065] ②洗涤:从冰箱取出板子,用排枪加 PBST 洗三次,每次于 37℃ 5min 后,拍干。

[0066] ③ BSA 封闭

[0067] 从冰箱取出板子,用排枪加 PBST 洗三次,每次于 37℃ 5min 后,拍干。每孔加入混匀好的 BSA200 μ l, 盖上铝箔纸,37℃ 烘箱放置 2 小时。

[0068] ④洗涤:从冰箱取出板子,用排枪加 PBST 洗三次,每次于 37℃ 5min 后,拍干。

[0069] ⑤加一抗

[0070] 将兔的阴阳血清用 BSA 分别作 1:1000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 倍稀释。稀释完毕之后,每孔加样 100 μ l。37℃ 烘箱放置 2 小时。

[0071] ⑥洗涤:从冰箱取出板子,用排枪加 PBST 洗三次,每次于 37℃ 5min 后,拍干。

[0072] ⑦加二抗

[0073] 用 BSA 把二抗作 1:2500 稀释。然后每孔加 100 μ l, 37℃ 烘箱放置 1.5 小时。

[0074] ⑧洗涤：从冰箱取出板子，用排枪加 PBST 洗三次，每次于 37℃ 5min 后，拍干。

[0075] ⑨显色

[0076] 加新鲜配制的 TMB 底物溶液 100mL/ 孔，37℃ 暗处放置 30min，显示蓝色。

[0077] ⑩终止

[0078] 每孔加入 2M 的浓硫酸 50 μ l。颜色变黄，用酶标仪测定 450nm 处各孔 OD 值，阳性反应的最大稀释度为待测样品的效价。

[0079] 7) 抗体标记；

[0080] ①取 5mgHRP 溶液于 1ml 蒸馏水

[0081] ②加入 0.2ml 新配的 0.1ml/L NaIO₄ 溶液于上液中，避光搅拌 20min。

[0082] ③将上述溶液用 1mmol/L 的醋酸钠缓冲液 (pH4.4) 透析，4℃ 过夜。

[0083] ④加 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 20 μ l，使以上醛化 HRP 的 pH 值升高到 9.0-9.5

[0084] ⑤立即加入 10mg IgG 到 1ml0.01mol/L 碳酸盐缓冲液中，室温避光搅拌 2h

[0085] ⑥加 0.1ml 新配的 4mg/mlNaBH₄ 液，混匀，4℃ 放置 2h

[0086] ⑦将上述液用 0.15mol/LPBS (pH7.4) 透析，4℃ 过夜

[0087] ⑧ 10000g4℃ 离心 30min

[0088] ⑨将上清移入另一管中，按体积 1:1 加入甘油，置 -20℃ 保存。

[0089] 8) 标记抗体 Lowry 法测定蛋白含量为 6.7mg/ml；

[0090] 同 2)

[0091] 9) ELISA 法测定标记抗体效价为 1:64000。

[0092] 同 6)

[0093] 2.2 抗原抗体最佳工作浓度的确定

[0094] 根据点阵滴定法测定，抗原最佳包被浓度为 0.39 μ g/ml，一抗最佳工作浓度为 1:200。

[0095] 2.3 最佳二抗稀释浓度的确定

[0096] OD₄₅₀ 阳性血清接近于 1.000，且 P/N 最大作为二抗的最佳稀释浓度。二抗最佳工作浓度为 1:2000。

[0097] 2.4 最佳封闭液的确定

[0098] 选取阴性 OD 平均值最小，P/N 比值最大的封闭组合，以确定封闭液。最佳封闭液为质量浓度 5% 脱脂奶粉。

[0099] 2.5 各待测血清效价的确定

[0100] 以上述确定的最佳抗原包被浓度、最佳一抗稀释度、最佳二抗稀释度、最佳封闭液做 ELISA，重复上述步骤。P/N > 2.1 最大稀释度为待测血清的效价。如表 2 所示，初免未生有效抗体，二免抗体效价为 1:400，三免抗体效价为 1:25600，四免抗体效价为 1:25600。

[0101] 表 2 实验组每次免疫抗血清的抗体滴度

[0102]

免疫次数	n	血清稀释度 (10 ²)											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1: 128	1:256	1:512	1:1024	1:4096	空白
0 免	6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
初免	6	1.52	1.40	1.31±	1.14	1.03±	0.95	0.85	0.91	0.88	0.83	0.81	0.81
		±	±	0.09a	±	0.07ab	±	±	±	±	±	±	±
		0.16ab	0.08a		0.06a		0.05a	0.04a	0.04a	0.03a	0.02a	0.03a	0.10a
二免	6	2.45	2.26	1.97±	1.73	1.48±	1.16	1.02	1.02	0.96	0.92	0.85	0.85
		±	±	0.08a	±	0.06b	±	±	±	±	±	±	±
		0.16b	0.08a		0.10a		0.06a	0.02a	0.05a	0.04a	0.02a	0.03a	0.08a
三免	6	4.61	6.55	7.47±	7.23	8.57±	4.70	2.74	2.36	1.45	1.08	0.94	0.79
		±	±	0.68b	±	0.18d	±	±	±	±	±	±	±
		0.56c	0.72b		0.37b		0.51b	0.33b	0.27b	0.19ab	0.11a	0.07a	0.09a
四免	6	5.01	6.34	7.07±	7.78	7.30±	5.60	3.62	2.37	1.76	1.46	1.22	1.12
		±	±	0.50b	±	0.28c	±	±	±	±	±	±	±
		0.67c	0.68b		0.39b		0.42c	0.36c	0.38b	0.35b	0.30ab	0.23ab	0.22a

[0103] 注：同列肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

[0104] 表 3 对照组每次免疫抗血清的抗体滴度

[0105]

免疫次数	n	血清稀释度 (10 ²)											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1: 128	1:256	1:512	1:1024	1:4096	空白
0 免	6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
初免	6	0.96	0.91	0.82	0.82	0.89	0.87	0.84	0.89	0.84	0.88	0.86	0.93
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.05a	0.04a	0.02ab	0.04ab	0.02b	0.02ab	0.02b	0.01b	0.02b	0.04a	0.07a	0.05a
二免	6	1.06	1.03	0.90	0.91	0.97	0.91	0.96	0.95	0.92	0.96	0.95	1.00
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.04a b	0.03a	0.02ab	0.02ab	0.02b	0.03ab	0.04ab	0.03ab	0.05ab	0.06a	0.07a	0.07a
三免	6	1.01	0.98	0.93	0.93	0.99	0.92	0.91	0.92	0.90	0.98	0.93	0.95
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.02b	0.05ab	0.07bc	0.04b	0.03b	0.05ab	0.03ab	0.03ab	0.04ab	0.10a	0.10a	0.09a
四免	6	1.32	1.18	1.04	0.99	1.00	0.96	0.97	0.99	1.04	1.10	1.03	1.07
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.15b	0.08b	0.03c	0.08b	0.02b	0.03b	0.02ab	0.03a	0.08a	0.10a	0.02	0.08a

[0106] 注：同列肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

[0107] 2.6 最佳免疫次数确定

[0108] 据表 2、表 3 可知，实验组第三次免疫血清最大稀释倍数下 P/N 与第四次免疫血清最大稀释倍数下 P/N 值无显著差异，而对照组各组之间无明显显著性差异，且并无 $P/N > 2.1$ ，因此，确定免疫骆驼最佳免疫次数为三次。

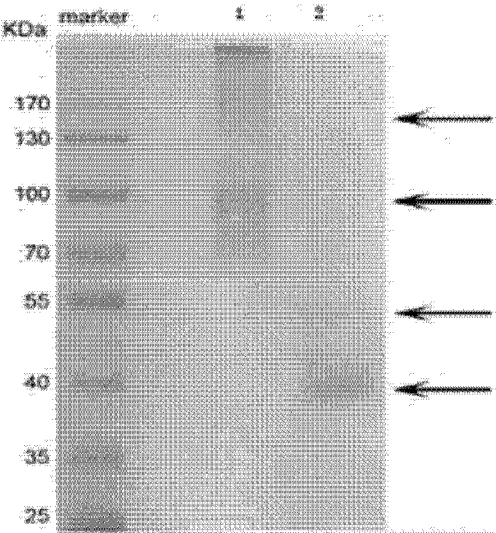


图 1

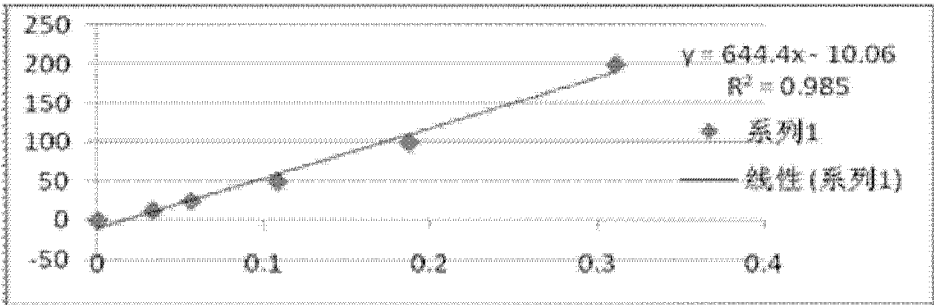


图 2

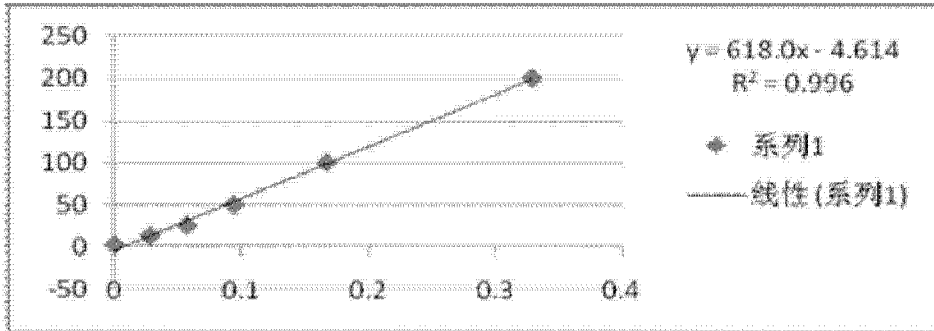


图 3

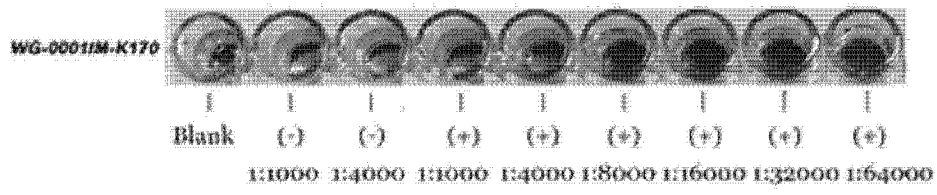


图 4

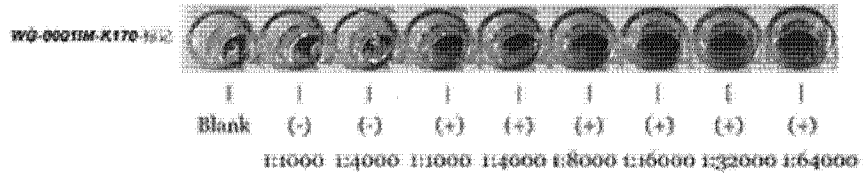


图 5

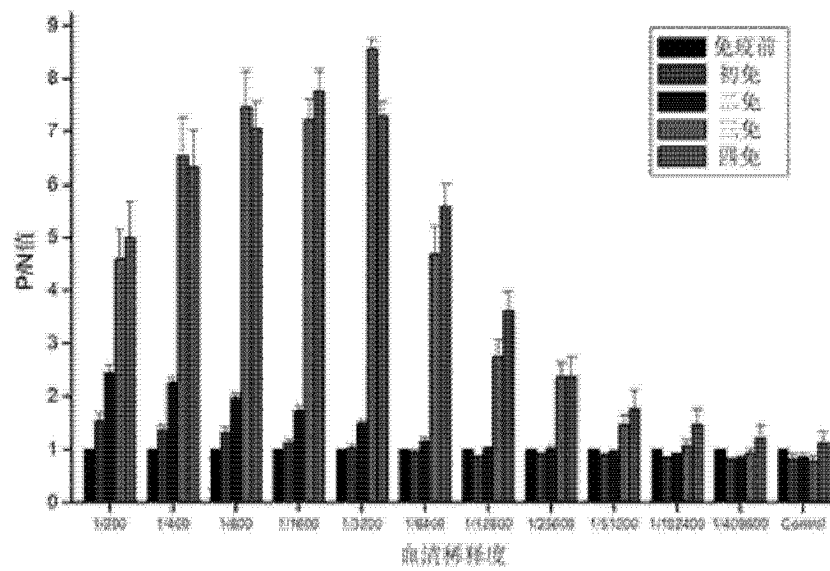


图 6

专利名称(译)	双峰驼特异性抗体制备及免疫检测方法		
公开(公告)号	CN103454413B	公开(公告)日	2015-03-11
申请号	CN201310397690.4	申请日	2013-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	吉日木图 刘微		
申请(专利权)人(译)	吉日木图 刘微		
当前申请(专利权)人(译)	吉日木图 刘微		
[标]发明人	吉日木图 刘微 玉斯日古楞		
发明人	吉日木图 刘微 玉斯日古楞		
IPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	向华		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN103454413A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫骆驼的最佳免疫程序及方法，所述免疫方法为双峰驼背部皮下多点注射，免疫周期为2周，注射抗原剂量为1mg/mL，免疫次数为3次。本发明还涉及兔抗骆驼IgG酶标二抗的制备流程及方法以及应用兔抗骆驼酶标二抗通过ELISA检测骆驼抗血清效价的方法及最佳检测条件。

