



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103926396 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201410128592. 5

(22) 申请日 2014. 04. 01

(71) 申请人 苏州浩欧博生物医药有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街  
218 号

(72) 发明人 孙婵 丁俊荣 宋孟杰 李永红

李庆春 左云国

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有

限公司 32103

代理人 孙仿卫 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种过敏原阳性血清的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种过敏原阳性血清的制备方法,包括依次进行的如下步骤:步骤1、用自身免疫抗原对健康动物进行多次免疫,每次免疫之前,对健康动物进行取血测定 OD 值,当 OD 值稳定后,免疫结束,进行取血,获得抗血清;步骤2、对步骤1所得的抗血清进行亲和纯化得到 IgG 抗体;步骤3、将步骤2所得的 IgG 抗体和人 IgE 抗体按质量比为 1:1~2 偶联后,经分离纯化获得 IgG-IgE 连接物浓溶液,将 IgG-IgE 连接物浓溶液稀释至浓度为 0.5~1 μg/ml,即得阳性血清。本发明方法可批量制备各种过敏原的阳性血清,解决了检测试剂盒制备过程中的阳性质控问题,也可以作为校准品的生产原料,并且本制备方法简单易行。

1. 一种过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:包括依次进行的如下步骤:

步骤 1、用自身免疫抗原对健康动物进行多次免疫,每次所述免疫之前,对所述健康动物进行取血测定 OD 值,当 OD 值稳定后,免疫结束,进行取血,获得抗血清;

步骤 2、对步骤 1 所得的抗血清进行亲和纯化得到 IgG 抗体;

步骤 3、将步骤 2 所得的 IgG 抗体和人 IgE 抗体按质量比为 1:1~2 偶联后,经分离纯化获得 IgG-IgE 连接物浓溶液,将所述的 IgG-IgE 连接物浓溶液稀释至浓度为 0.5~1 μg/ml,即得所述的阳性血清。

2. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:所述的健康动物为兔子。

3. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:步骤 1 中,每次免疫时所采用的所述的过敏原的质量为 2~60mg。

4. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:步骤 1 中,先将所述的过敏原配置成浓度为 4~8mg/ml 的过敏原溶液,按所述的过敏原溶液与弗氏完全佐剂的体积比为 1~1.5:1 配置成乳液进行首次免疫;按所述的过敏原溶液与弗式不完全佐剂的体积比为 1~1.5:1 配置成乳液进行后续免疫。

5. 根据权利要求 1 或 4 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:所述的免疫次数为 6~8 次,每两次免疫的间隔时间为 12~36 天。

6. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:步骤 1 中,取血时采用耳缘静脉取血。

7. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:采用蛋白 A sepharose CL-4B 亲和柱进行所述的亲和纯化。

8. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:步骤 3 中,所述的 IgG 抗体和所述的人 IgE 抗体分别通过所述的 2-亚胺四氢噻吩偶联剂和 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯偶联剂活化后,在 2~8℃ 下进行偶联。

9. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:步骤 3 中,采用 Supperdex200 凝胶纯化柱进行所述的分离纯化。

10. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的制备方法,其特征在于:步骤 3 中,采用含质量比为 0.4~6% 的牛血清白蛋白、pH7.5~8.5、0.09~0.11mol/L 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液将所述的 IgG-IgE 连接物浓溶液进行所述的稀释。

## 一种过敏原阳性血清的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断技术领域,具体涉及一种过敏原阳性血清的制备方法。

### 背景技术

[0002] 过敏是一种机体的变态反应,是人对正常物质(过敏原)的一种不正常的反应,当过敏原接触到过敏体质的人群才会发生过敏,过敏原有花粉、粉尘、异体蛋白、化学物质、紫外线等几百种。在过敏反应的发生过程中,过敏介质起着直接的作用,过敏原是过敏病症发生的外因,而机体免疫能力低下,大量自由基对肥大细胞和嗜碱粒细胞的氧化破坏是过敏发生的内因。一般来讲,当过敏原第一次进入机体时,与肥大细胞或者是嗜碱性粒细胞结合,产生白三烯,前列腺素等等的过敏因子,但并不会立即产生过敏,此特性有些将维持2~3天,有的数月。当机体第二次接受这种过敏原时,肥大细胞才会变形,产生过敏因子,也就产生了一系列的过敏现象。

[0003] 过敏可以是体液(抗体)或者是细胞免疫机制介导的。在大多数情况下,可产生过敏反应的抗体属于IgE类,这些个体可以归类于患有IgE-介导的过敏反应。然而,并非所有的特异反应性个体都会发生与IgE相关的过敏反应;在非-IgE-介导的过敏反应中,抗体也可以属于IgG一类,例如:包含右旋糖苷的免疫复合物导致的过敏性休克和和现在罕见的血清病,它们以前被归于三型过敏反应。在患有过敏性支气管肺曲霉菌病(ABPA)病人中,IgE和IgG抗体都可以被检出。接触性过敏性皮炎是以淋巴细胞为介导的过敏性疾病的代表。IgE检测仍是公认的过敏检测的主流产品,由于点刺注册问题和体外检测技术的提高,体外检测今后将是过敏检测主流趋势;但是目前IgE检测学术进展迟缓,基本没有新的发展,因此提高检测质量和降低检测成本是主要开发方向。

[0004] 但是,由于过敏诊断试剂的发展缓慢以及前期人们的重视度有限,除了部分过敏原可以购买到商业血清,大部分过敏原的阳性血清还是很难查询到的,临床收集少量可行,大量或者高浓度的血清基本不能收集到。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种可批量生产的过敏原阳性血清的制备方法。

[0006] 为解决以上技术问题,本发明采取如下技术方案:

[0007] 一种过敏原阳性血清的制备方法,包括依次进行的如下步骤:

[0008] 步骤1、用自身免疫抗原对健康动物进行多次免疫,每次所述免疫之前,对所述健康动物进行取血测定OD值,当OD值稳定后,免疫结束,进行取血,获得抗血清;

[0009] 步骤2、对步骤1所得的抗血清进行亲和纯化得到IgG抗体;

[0010] 步骤3、将步骤2所得的IgG抗体和人IgE抗体按质量比为1:1~2偶联后,经分离纯化获得IgG-IgE连接物浓溶液,将所述的IgG-IgE连接物浓溶液稀释至浓度为0.5~1 $\mu$ g/ml,即得所述的阳性血清。

- [0011] 优选地,所述的健康动物为兔子。
- [0012] 优选地,步骤 1 中,每次免疫时所采用的所述的过敏原的质量为 2 ~ 60mg。
- [0013] 优选地,步骤 1 中,先将所述的过敏原配置成浓度为 4 ~ 8mg/ml 的过敏原溶液,按所述的过敏原溶液与弗氏完全佐剂的体积比为 1 ~ 1.5:1 配置成乳液进行首次免疫;按所述的过敏原溶液与弗氏不完全佐剂的体积比为 1 ~ 1.5:1 配置成乳液进行后续免疫。
- [0014] 优选地,所述的免疫次数为 6 ~ 8 次,每两次免疫的间隔时间为 12 ~ 36 天。
- [0015] 优选地,步骤 1 中,取血时采用耳缘静脉取血。
- [0016] 优选地,采用蛋白 A sepharose CL-4B 亲和柱进行所述的亲和纯化。
- [0017] 优选地,步骤 3 中,所述的 IgG 抗体和所述的人 IgE 抗体分别通过所述的 2-亚胺四氢噻吩偶联剂和 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯偶联剂活化后,在 2 ~ 8°C 下进行偶联。
- [0018] 优选地,步骤 3 中,采用 Superdex200 凝胶纯化柱进行所述的分离纯化。
- [0019] 优选地,步骤 3 中,采用含质量比为 0.4 ~ 6% 的牛血清白蛋白、pH7.5 ~ 8.5、0.09 ~ 0.11mol/L 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液将所述的 IgG-IgE 连接物浓溶液进行所述的稀释。
- [0020] 由于以上技术方案的实施,本发明与现有技术相比具有如下优点:
- [0021] 本发明方法可批量制备各种过敏原的阳性血清,解决了检测试剂盒制备过程中的阳性质控问题,也可以作为校准品的生产原料,并且本制备方法简单易行。

#### 附图说明

- [0022] 附图 1 为经蛋白 A sepharose CL-4B 亲和柱纯化的兔抗牛肉 IgG 蛋白条带。

#### 具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的说明,但本发明并不限于以下实施例。实施例中采用的实施条件可以根据具体使用的不同要求做进一步调整,未注明的实施条件为本行业中的常规条件。

[0024] 实施例 1

[0025] (一) 过敏原的免疫和兔抗血清效价测定

[0026] 材料与仪器

[0027] 1、过敏原:过敏原冻干粉,过敏原为牛肉;

[0028] 2、佐剂:商品化的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂;

[0029] 3、动物:选 3 只(每种过敏原免疫 3 只兔子)2 月龄、体重 1.5 ~ 2.0kg 的健康新西兰大白兔;

[0030] 4、二抗:HRP 标记的羊抗兔 IgG;

[0031] 5、耗材:三通器、一次性注射器、移液器等。

[0032] 免疫步骤

[0033] 1、免疫过敏原准备:用 BCA 法确定冻干粉溶解后过敏原的浓度,取 4mg 过敏原用 PBS 稀释至 600 $\mu$ l,用三通器将过敏原与完全佐剂或不完全佐剂(过敏原 V:佐剂 V=6:5)乳化,直至将一滴乳液滴入水中呈现球形而不分散则过敏原准备好。首次免疫用弗氏完全佐

剂,后续免疫均用弗氏不完全佐剂。

[0034] 2、动物免疫:将购买的3只新西兰大白兔在动物房养殖1周,使动物适应环境;将制备好的乳液,用1ml注射器进行颈部或背部皮下免疫注射,每只新西兰大白兔注射3点,每点注射300 $\mu$ l;免疫周期为14天。

[0035] 3、抗血清的制备:每只动物免疫前先于一侧耳缘静脉抽取2mL血(作为空白对照),之后每次免疫14天后,下次免疫前进行耳缘静脉取血用于抗血清评价;取血后取下针头,将注射器中的血缓缓转移至离心管中,于4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜,取上清即为血清,析出淡黄色抗血清;将抗血清转移至另一管中,血凝块以1500 $\times$ g离心10min。吸出上清液合并收集到的抗血清管中;抗血清分装保存于-70 $^{\circ}$ C。

[0036] 4、抗血清效价的测定:采用酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),用包被缓冲液将过敏原稀释至10 $\mu$ g/ml,除阴性孔外每孔加100 $\mu$ l即1 $\mu$ g;阴性对照1和阴性对照2各包被1 $\mu$ g羊肉和花生过敏原,4 $^{\circ}$ C包被过夜;空白对照1:免疫过敏原前取血;空白对照2:一抗孵育封闭液,其中不含一抗抗体;空白对照3:HRP标记的羊抗兔IgG孵育封闭液;其余孔为按1:100、1:200倍比稀释的抗血清,进行效价测定。每次效价测定时平行进行上次收集抗血清的效价测定,前后两次免疫后抗血清效价差异不大,则可以终止免疫杀兔取血,如果效价还有明显提高则继续免疫。

[0037] 以牛肉免疫兔后抗血清评价结果表1:

[0038] 表1

[0039]

	A	B
名称	OD 值	OD 值
阴性对照 1	0.066	0.076
阴性对照 2	0.071	0.069
空白对照 1	0.078	0.072
空白对照 2	0.067	0.077
空白对照 3	0.074	0.068
1:100	3.312	3.265
1:200	3.297	3.271
1:400	3.054	3.142
1:800	2.993	2.879
1:1600	2.853	2.775

1:3200	1.631	1.645
1:6400	0.983	0.932
1:12800	0.552	0.571
1:25600	0.312	0.334
1:51200	0.184	0.169
1:102400	0.0107	0.073
1:200000	0.073	0.062
1:400000	0.069	0.071
1:800000	0.072	0.065
1:1600000	0.065	0.073

[0040] 注:A列数据为免疫6次后测定的抗血清效价;B列数据为免疫7次后测定的抗血清效价

[0041] 从上述表格中可以看出兔免疫6次和7次后,抗血清效价基本趋于稳定,按照实验设计评价的血清梯度为1:100-1:1600000,其中当血清稀释至1:51200时,OD值为空白孔的2倍左右,判断为阳性有效价,但当再进行稀释时OD值基本等于空白值或不到空白对照值的两倍,判断为无效价。A1-A2和B1-B2为阴性对照,从数值可以看出获取的兔抗血清与其他过敏原没有反应性;A3-A5和B3-B5为空白对照,可以看出过敏原与免疫前的兔血清、与二抗均不会产生非特异反应;其他孔的反应为牛肉过敏原和兔抗牛肉过敏原的特异性反应。

[0042] (二) 抗血清的亲纯化

[0043] 材料与仪器

[0044] 1、蛋白A sepharose CL-4B亲和柱;蠕动泵;离心管;离心机;过滤器;玻璃柱;

[0045] 2、TBS缓冲溶液:6.06g Tris(50mM),8.78g NaCl(150mM)以及0.5g叠氮化钠(0.05%)溶于1L蒸馏水中,并用HCl调节pH7.4;

[0046] 3、中和缓冲溶液:121.2g Tris(1M),87.8g NaCl(1.5M),0.37g EDTA(1mM)及5g叠氮化钠(0.5%)溶于1L蒸馏水中,并用HCl调节pH8.0;

[0047] 4、洗脱缓冲溶液(pH2.7):将3.75g甘氨酸(50mM)溶解于1L蒸馏水中,用HCl调节pH2.7;

[0048] 5、洗脱缓冲溶液(pH1.9):将3.75g甘氨酸(50mM)溶解于1L蒸馏水中,用HCl调节pH1.9。

[0049] 操作步骤

[0050] 1、准备蛋白A sepharose CL-4B亲和柱:准备10ml蛋白A sepharose CL-4B填料,在真空瓶中将等体积的填料和TBS缓冲溶液混合,搅拌。抽真空约15分钟以除去填料

中的气泡,否则在柱中形成的气泡影响柱子的容量和分离效果。将蛋白 A sepharose CL-4B 填料缓慢加入玻璃柱中,利用泵控制填充速度为 1ml/分~2ml/分,避免柱干,利用 10 倍于床体积并经过预冷的 TBS 缓冲溶液平衡柱子。

[0051] 2、将制备得到的抗血清放入冰水或 4℃ 冰箱中缓慢解冻以避免蛋白质的聚集。在蛋白质解冻过程中出现的聚集可通过 37℃ 预热而溶解。加入固体叠氮化钠至浓度为 0.05%,4℃,15000xg 离心 5 分钟,移出澄清的抗血清再经过滤器过滤除去多余的脂。

[0052] 3、将溶解后的抗血清用 TBS 缓冲溶液以 1:5 的比例进行稀释,再用过滤器进行过滤。以每分钟 0.5ml 的速度将抗血清上到柱上,为保证抗血清与填料的结合,需连续上柱 2 次并保留上样流出液。用 TBS 缓冲溶液清洗柱子至  $A \lambda 280\text{nm} < 0.008$  后加 pH2.7 洗脱缓冲溶液,以 0.5ml/min 的速度洗脱至所有蛋白均流下来。用已经加入 100u1 中和缓冲溶液的 1.5ml EP 管分管收集洗脱液,混匀后用 pH 试纸检查洗脱液的 pH,如果 pH 低于 7 可利用中和缓冲液调至约 pH7.4 以防止抗体的变性;

[0053] 在柱中加入 10ml、pH1.9 洗脱缓冲溶液,按上述方法收集洗脱液至  $A \lambda 280\text{nm} < 0.008$ ;

[0054] 利用分光光度计测定各管中蛋白质的含量。若蛋白浓度低于 0.5mg/ml 可加入 10% 的甘油以便保存,将纯化的 IgG 抗体分装后在 2℃~8℃ 保存;

[0055] 用含 0.05% 叠氮化钠的 TBS 缓冲溶液清洗柱子后将柱子储存在 2℃~8℃ 环境。

[0056] (三) IgG 抗体与人 IgE 抗体偶联

[0057] 材料与仪器

[0058] 1、人 IgE 抗体,由浩欧博生物医药有限公司合作单位天津医科大学免疫实验室自助制备,纯度为 95%,浓度为 1mg/ml,以磷酸盐缓冲液保存;

[0059] 2、偶联剂 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC),2-亚胺四氢噻吩(2-IT)购自 THERMO 公司,三羟甲基氨基甲烷(TRIS)等化学试剂均达到化学纯;

[0060] 3、G-25 凝胶柱和 Supperdex200 凝胶纯化柱为 GE 公司产品。

[0061] 操作步骤

[0062] 1、取 1mgIgG 抗体,加入 10mg/ml 的偶联剂 2-IT 溶液 3 $\mu$ l,室温静置 20min,加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 $\mu$ l,室温静置 5min。用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后抗体,5℃ 保存备用;

[0063] 2、取 1.5mg 的人 IgE 抗体溶液,加入 5mg/ml 的 SMCC 溶液 15 $\mu$ l,室温静置 30min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后抗体,5℃ 保存备用;

[0064] 3、将上述活化的 IgG 抗体与活化的人 IgE 抗体混合,2-8℃ 条件下静置 20h,用 Supperdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物,获得连接物浓溶液,5℃ 保存备用;

[0065] 4、将 IgG-IgE 连接物浓溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0、0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5 $\mu$ g/ml,即得牛肉过敏原的阳性血清。

[0066] 实施例 2

[0067] 用 Phadia 公司生产的特异性过敏原 IgE 抗体检测盒对实施例 1 制备得到的阳性血清进行测定,结果如表 2:

[0068] 表 2

[0069]

名称	稀释倍比	Phadia 测值
IgG-IgE( F27 )LOT130809	原液	45.63KU/L
	3 倍	16.31 KU/L
	9 倍	4.97 KU/L
IgG-IgE( F27 )LOT131201	原液	83.21KU/L
	3 倍	28.77 KU/L
	9 倍	10.03 KU/L
IgG-IgE( F27 )LOT140117	原液	55.7KU/L
	3 倍	19.31 KU/L
	9 倍	5.93 KU/L

[0070] 注 :Phadia 过敏原 IgE 检测定级 :<0.35KU/L 阴性 ;0.35-0.691 级阳性 ;0.7-3.492 级阳性 ;3.5-17.493 级阳性 ;17.5-49.994 级阳性 ;50-99.995 级阳性 ;>100KU/L6 级阳性。

[0071] 从表 2 可见,3 批次(Lot130809、Lot131201、Lot140117) 的阳性血清质控样本,用 Phadia 过敏原 IgE 检测试剂盒测定为阳性样本,并且为 4-5 级阳性样本即强阳性。另外从表格中可以看到,指控样本倍比稀释后,测定值也为倍比稀释的。综合说明我们的样本制备成功,可以作为样本用于试剂盒的指控。

[0072] 以上对本发明做了详尽的描述,其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本发明的内容并加以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明的精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围内。

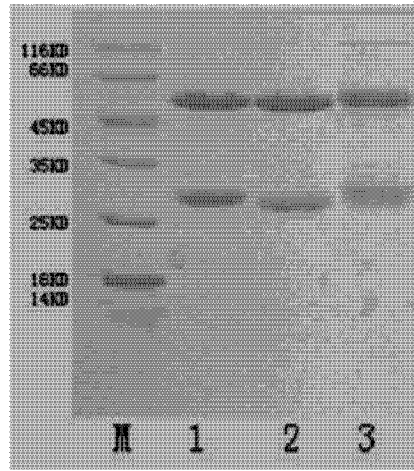


图 1

专利名称(译)	一种过敏原阳性血清的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103926396A</a>	公开(公告)日	2014-07-16
申请号	CN201410128592.5	申请日	2014-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	孙婵 丁俊荣 宋孟杰 李永红 李庆春 左云国		
发明人	孙婵 丁俊荣 宋孟杰 李永红 李庆春 左云国		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N2333/4716		
代理人(译)	汪青		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种过敏原阳性血清的制备方法，包括依次进行的如下步骤：步骤1、用自身免疫抗原对健康动物进行多次免疫，每次免疫之前，对健康动物进行取血测定OD值，当OD值稳定后，免疫结束，进行取血，获得抗血清；步骤2、对步骤1所得的抗血清进行亲和纯化得到IgG抗体；步骤3、将步骤2所得的IgG抗体和人IgE抗体按质量比为1:1~2偶联后，经分离纯化获得IgG-IgE连接物浓溶液，将IgG-IgE连接物浓溶液稀释至浓度为0.5~1μg/ml，即得阳性血清。本发明方法可批量制备各种过敏原的阳性血清，解决了检测试剂盒制备过程中的阳性质控问题，也可以作为校准品的生产原料，并且本制备方法简单易行。

名称	稀释倍比	Phadia 测值
IgG-IgE(F27)LOT130809	原液	45.63KU/L
	3倍	16.31 KU/L
	9倍	4.97 KU/L
IgG-IgE(F27)LOT131201	原液	83.21KU/L
	3倍	28.77 KU/L
	9倍	10.03 KU/L
IgG-IgE(F27)LOT140117	原液	55.7KU/L
	3倍	19.31 KU/L
	9倍	5.93 KU/L