

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610009803.9

[51] Int. Cl.  
C07K 16/18 (2006.01)  
C07K 16/02 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月22日

[11] 授权公告号 CN 100480268C

[22] 申请日 2006.3.13

[21] 申请号 200610009803.9

[73] 专利权人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号

[72] 发明人 王君伟 孙凌霜

[56] 参考文献

CN1490334A 2004.4.21

CN1417232A 2003.5.14

鹅卵黄 IgG 的纯化及兔抗鹅 IgG 酶标抗体的制备. 贺云霞. 中国预防兽医学报, 第 27 卷第 5 期. 2005

审查员 王亦然

[74] 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务所有限责任公司  
代理人 祖玉清

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

兔抗鸭 IgY + IgY (ΔFc) (H + L) 辣根过氧化物酶标记抗体及其制备方法

[57] 摘要

本发明提供的是兔抗鸭 IgY + IgY (ΔFc) (H + L) 辣根过氧化物酶标记抗体及其制备方法。本发明辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY + IgY (ΔFc) (H + L) 抗体是利用盐析、层析等蛋白纯化技术和酶标记技术, 在提纯鸭卵黄免疫球蛋白的基础上, 免疫家兔制备并纯化兔抗鸭 IgY + IgY (ΔFc) (H + L) 抗体, 再通过改良过碘酸钠法将其与辣根过氧化物酶结合, 并采用盐析及 Sephadex G200 纯化, 从而制备辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY + IgY (ΔFc) (H + L) 抗体。应用此酶标记抗体可以建立多种鸭类疫病检测技术, 预防鸭类多种传染病。

1、兔抗鸭辣根过氧化物酶标记抗体的制备方法，其特征是：

1) 纯化鸭卵黄免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc)

按 v/v 为卵黄:pH7.4、0.01mol/L 的 PBS:氯仿=1:2:3 的比例混匀，3000r/min 离心 30min，取上清，用终 w/v 浓度分别为 18%、14%、9%、14%的无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 依次盐析，3000r/min 离心 30min，其中，第三次取上清，其余三次取沉淀，末次沉淀用适量 PBS 悬浮，4℃PBS 透析 72h，将透析物 2000r/min 离心 10~15min，以 PH7.4、0.01mol/L 的 PB 为洗脱液，过 DE<sub>52</sub> 纤维素柱，1ml/min，1 管/5min，收集第一峰，提纯鸭卵黄免疫球蛋白的浓度在 1.0~5mg/ml 之间，纯度>90%；

2) 兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体的制备和纯化

首免，弗氏完全佐剂与 0.4mg/ml 的鸭卵黄免疫球蛋白按 v/v 为 1:1 的比例混合，2ml/只兔背部皮下多点注射；以后每隔 14~28d 加强免疫，二免改用弗氏不完全佐剂，剂量方式同上；三免 0.4mg/ml 的耳缘 1ml 静脉注射，心脏采血，37℃，1h，4℃过夜析出并收集血清；10ml 血清经 50%和 33%饱和硫酸铵依次盐析 3 次，末次沉淀用 2~4ml 的 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 溶解并对其透析除盐，以 0.01mol/L、pH7.4 的 PB 为洗脱液过 DE<sub>52</sub> 离子交换层析柱纯化，1ml/min，1 管/5min，收集第一峰，兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L) 血清效价 >1:32，纯化兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L) 抗体效价 >1:16，且其浓度为 1mg/ml~4mg/ml、纯度 >90%；

3) 改良过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体

将 N×4 mg 辣根过氧化物酶溶于 N×1ml 去离子水，加入 200-400 $\mu$ l、0.1mol/L 的 NaIO<sub>4</sub>，20~25℃搅拌 20min，于 pH4.4、0.001mol/L 的醋酸钠缓冲液 4℃透析过夜，加入 N×mg 纯化的兔抗鸭抗体，立即加入 0.2mol/L、pH9.5 的碳酸钠缓冲液调节 pH 值至 9-9.5，20~25℃搅拌 2h，其中 N 为常数；

4) 标记物的纯化

将上述标记物平均分为 2 份，一份用 50%饱和硫酸铵盐析 30min，离心取沉淀部分溶于少量 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS，并于 PBS 透析除盐；另一部分以 0.02mol/L、pH7.2 的 PBS 透析过夜，并以其为洗脱液过 Sephadex G200 层析柱，1ml/15min，2ml/管，将两部分合并；

5) 酶标记抗体的质量鉴定

280nm 和 403nm 测定其 OD 值，计算其 IgG 含量(A<sub>280</sub>-A<sub>403</sub>×0.3)×

0.62mg/ml、 $A_{403} \times 0.4 \text{mg/ml}$  的酶含量、(酶含量/IgG 含量) $\times 4$  的克分子比、 $A_{403}/A_{280} \times 100\%$  的结合物标记率、酶含量 $\times$ 结合物总体积/最初加入酶量的酶结合物产率，联茴香胺法测定标记物及其酶学活性，直接 ELISA 测定其最佳使用浓度，当酶标记抗体的酶结合物产率在 30%-60% 之间、克分子比在 1.0-2.0 之间、酶结合物标记率 $>60\%$ ，酶活性 $>1000 \text{U/mg}$ 、使用浓度 $>1:1000$  时符合制备标准。

2、根据权利要求 1 所述的兔抗鸭辣根过氧化物酶标记抗体的制备方法制备的兔抗鸭辣根过氧化物酶标记抗体，其特征是：它是采用如下方法制备得到的（1）由辣根过氧化物酶与兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L) 抗体组成的酶抗体结合物，其可与鸭免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc) 特异性结合，并可使辣根过氧化物酶的底物显色；（2）分子比在 1.0-2.0 之间，酶活性 $>1000 \text{U/mg}$ ，ELISA 使用浓度 $>1:1000$ ，Weston-Blotting 使用浓度 $>1:500$  的产品。

## 兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)辣根过氧化物酶标记抗体及其制备方法

### (一) 技术领域

本发明涉及的是一种酶抗体结合物及其制备方法，具体地说是辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体。

### (二) 背景技术

酶免疫检测技术是以酶的反应放大作用和抗原-抗体特异性结合特性为原理、以酶抗体和/或抗原结合物为基础的一种新型检测技术。其包括酶免疫组织化学染色和酶免疫检测技术(包括固和非固相酶免疫检测技术)，前者主要用于组织、细胞的免疫检测，后者主要用于抗原/抗体的检测。

酶联免疫吸附试验(ELISA)是酶免疫检测技术中发展最快、应用最广泛的一种，其以快速、准确、灵敏的特点逐渐成为一种公认的检测技术。目前，该检测技术已在部分动物疫病检测中使用，但仅有极少数鸭类疾病的检测使用该技术。原因很多，其中缺乏一种高质量、可商品化生产的酶标记抗体是阻碍其发展的主要原因之一。

我国是世界养禽大国,更是世界主要鸭类养殖地和消费国，鸭类养殖业的持续、稳定、健康发展不仅直接关系到我国农村发展、农民增收，而且关系到我国畜牧业的持续稳定发展。而酶标记抗鸭抗体不仅为鸭类疫病的检测搭建物质平台，更为鸭类整体免疫机理的研究提供物质支持，并最终为鸭类养殖业的发展提供技术平台。

### (三) 发明内容

本发明的目的在于提供辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体及其制备方法。

本发明的目的是这样实现的：本发明中所使用的缩写分别代表：PBS：磷酸盐缓冲液；PB：磷酸缓冲液；DE52：阴离子交换纤维素；Sephodex G200：葡聚糖 G200；IgY：免疫球蛋白 Y；IgY( $\Delta$ Fc)：免疫球蛋白 Y( $\Delta$ Fc)。

本发明的兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)辣根过氧化物酶标记抗体是：

(1)它是由辣根过氧化物酶与兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体组成的酶抗体结合物，其可与鸭免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc)特异性结合，并可使

辣根过氧化物酶的底物显色；(2)它是克分子比在 1.0-2.0 之间，酶活性 $>1000\text{U}/\text{mg}$ (临联茴香氨法)，ELISA 使用浓度 $>1:1000$ ，Weston-Blotting 使用浓度 $>1:500$  的产品。

本发明的兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L)辣根过氧化物酶标记抗体是采用这样的方法来制备的：

#### 1) 纯化鸭卵黄免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc)

按 v/v 为卵黄:PBS (pH7.4 0.01mol/L) : 氯仿=1:2:3 的比例混匀，3000r/min 离心 30min，取上清，用终浓度 (w/v) 分别为 18%、14%、9%、14% 的无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  依次盐析，3000r/min 离心 30min，其中，第三次取上清，其余三次取沉淀，末次沉淀用适量 PBS 悬浮，4℃PBS 透析 72h，将透析物 2000r/min 离心 10~15min，以 PB (pH7.4, 0.01mol/L) 为洗脱液，过  $\text{DE}_{52}$  纤维素柱，1ml/min，1管/5min，收集第一峰；

#### 2) 兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体的制备和纯化

首免，弗氏完全佐剂与鸭卵黄免疫球蛋白 (0.4mg/ml) 按 v/v 为 1:1 的比例混合，2ml/只兔背部皮下多点注射；以后每隔 14~28d 加强免疫，二免改用弗氏不完全佐剂，剂量方式同上；三免 1ml (0.4mg/ml) 耳缘静脉注射，心脏采血，37℃，1h，4℃过夜析出并收集血清；10ml 血清经 50% 和 33% 饱和硫酸铵依次盐析 3 次，末次沉淀用 2~4ml 的 PBS (0.01mol/L, pH7.4) 溶解并对其透析除盐，以 PB (0.01mol/L, pH7.4) 为洗脱液过  $\text{DE}_{52}$  离子交换层析柱纯化，1ml/min，1管/5min，收集第一峰；

#### 3) 改良过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体

将  $N \times 4\text{mg}$  辣根过氧化物酶溶于  $N \times 1\text{ml}$  去离子水，加入 200-400 $\mu\text{l}$   $\text{NaIO}_4$  (0.1mol/L)，20~25℃ 搅拌 20min，于醋酸钠缓冲液 (pH4.4, 0.001mol/L) 4℃透析过夜，加入  $N \times \text{mg}$  纯化的兔抗鸭抗体，立即加入 0.2mol/L 的碳酸钠缓冲液 (pH9.5) 调节 pH 值致 9-9.5，20~25℃ 搅拌 2h (注：N 为常数)；

#### 4) 标记物的纯化

将上述标记物平均分为 2 份，一份用 50% 饱和硫酸铵盐析 30min，离心取沉淀部分溶于少量 PBS (0.01mol/L, pH7.4)，并于 PBS 透析除盐；另一部分以 PB (0.02mol/L, pH7.2) 透析过夜，并以其为洗脱液过 Sephadex G200 层析柱，1ml/15min，2ml/管，将两部分合并；

#### 5) 酶标记抗体的质量鉴定

280nm 和 403nm 测定其 OD 值，计算其 IgG 含量  $((A_{280}-A_{403} \times 0.3) \times 0.62\text{mg}/\text{ml})$ 、酶含量  $(A_{403} \times 0.4\text{mg}/\text{ml})$ 、克分子比  $((\text{酶含量}/\text{IgG 含量}) \times 4)$ 、结合物标记率  $(A_{403}/A_{280} \times 100\%)$  酶结合物产率  $(\text{酶含量} \times \text{结合$

物总体积/最初加入酶量), 联茴香胺法测定标记物及的酶学活性, 直接 ELISA 测定其最佳使用浓度。当酶标记抗体的酶结合物产率在 30%-60% 之间、克分子比在 1.0-2.0 之间、酶结合物标记率 >60%, 酶活性 >1000U/mg、使用浓度 >1:1000 时符合制备标准。

采用本发明的方法可用于:

- ① 本方法可用于提纯鸭类卵黄免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc);
- ② 本方法可用于兔抗鸭辣根过氧化物酶标记抗体的质量鉴定;

采用本发明生产的产品可用于:

- ① 本产品可用于鸭类相关酶免疫组织化学染色。
- ② 本产品可用于鸭类相关的各种匀相和非匀相免疫酶检测技术, 主要包括各种 ELISA 试验、Weston-Blotting、酶免疫沉淀试验等。

本发明的产品优点表现在: 应用此酶标记抗体可以建立多种鸭类疫病检测技术, 预防鸭类多种传染病。

#### (四) 具体实施方式

##### 1) 纯化鸭卵黄免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc)

按 v/v 为卵黄:PBS (pH7.4 0.01mol/L):氯仿=1:2:3 的比例混匀, 3000r/min 离心 30min, 取上清, 用终浓度 (w/v) 分别为 18%、14%、9%、14% 的无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 依次盐析, 3000r/min 离心 30min, 其中, 第三次取上清, 其余三次取沉淀, 末次沉淀用适量 PBS 悬浮, 4℃PBS 透析 72h, 将透析物 2000r/min 离心 10~15min, 以 PB (PH7.4, 0.01mol/L) 为洗脱液, 过 DE<sub>52</sub> 纤维素柱, 1ml/min, 1管/5min, 收集第一峰;

##### 2) 兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体的制备和纯化

首免, 弗氏完全佐剂与鸭卵黄免疫球蛋白 (0.4mg/ml) 按 v/v 为 1:1 的比例混合, 2ml/只兔背部皮下多点注射; 以后每隔 14~28d 加强免疫, 二免改用弗氏不完全佐剂, 剂量方式同上; 三免 1ml (0.4mg/ml) 耳缘静脉注射, 心脏采血, 37℃, 1h, 4℃过夜析出并收集血清。10ml 血清经 50% 和 33% 饱和硫酸铵依次盐析 3 次, 末次沉淀用 2~4ml 的 PBS (0.01mol/L, pH7.4) 溶解并对其透析除盐, 以 PB (0.01mol/L, pH7.4) 为洗脱液过 DE<sub>52</sub> 离子交换层析柱纯化, 1ml/min, 1管/5min, 收集第一峰;

##### 3) 改良过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体

将 N × 4 mg 辣根过氧化物酶溶于 N × 1ml 去离子水, 加入 200-400 $\mu$ l NaIO<sub>4</sub> (0.1mol/L), 20~25℃ 搅拌 20min, 于醋酸钠缓冲液 (pH4.4, 0.001mol/L) 4℃透析过夜, 加入 N × mg 纯化的兔抗鸭抗体, 立即加入 0.2mol/L 的碳酸钠缓冲液 (pH9.5) 调节 pH 值致 9-9.5, 20~25℃ 搅拌

2h(注: N 为常数);

#### 4) 标记物的纯化

将上述标记物平均分为 2 份, 一份用 50%饱和硫酸铵盐析 30min, 离心取沉淀部分溶于少量 PBS (0.01mol/L, pH7.4), 并于 PBS 透析除盐; 另一部分以 PB (0.02mol/L, pH7.2) 透析过夜, 并以其为洗脱液过 Sephadex G200 层析柱, 1ml/15min, 2ml/管, 将两部分合并;

#### 5) 酶标记抗体的质量鉴定

280nm 和 403nm 测定其 OD 值, 计算其 IgG 含量  $(A_{280}-A_{403}\times 0.3)\times 0.62\text{mg/ml}$ 、酶含量  $A_{403}\times 0.4\text{mg/ml}$ 、克分子比  $(\text{酶含量}/\text{IgG 含量})\times 4$ 、结合物标记率  $(A_{403}/A_{280}\times 100\%)$  酶结合物产率  $(\text{酶含量}\times\text{结合物总体积}/\text{最初加入酶量})$ , 联茴香胺法测定标记物及的酶学活性, 直接 ELISA 测法定其最佳使用浓度。当酶标记抗体的酶结合物产率在 30%-60% 之间、克分子比在 1.0-2.0 之间、酶结合物标记率 >60%, 酶活性 >1000U/mg、使用浓度 >1:1000 时符合制备标准。

专利名称(译)	兔抗鸭IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)辣根过氧化物酶标记抗体及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN100480268C</a>	公开(公告)日	2009-04-22
申请号	CN200610009803.9	申请日	2006-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	王君伟 孙凌霜		
发明人	王君伟 孙凌霜		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/02 G01N33/53		
审查员(译)	王亦然		
其他公开文献	CN1817905A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供的是兔抗鸭IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)辣根过氧化物酶标记抗体及其制备方法。本发明辣根过氧化物酶标记兔抗鸭IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体是利用盐析、层析等蛋白纯化技术和酶标记技术，在提纯鸭卵黄免疫球蛋白的基础上，免疫家兔制备并纯化兔抗鸭IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体，再通过改良过碘酸钠法将其与辣根过氧化物酶结合，并采用盐析及Sephodex G200纯化，从而制备辣根过氧化物酶标记兔抗鸭IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体。应用此酶标记抗体可以建立多种鸭类疫病检测技术，预防鸭类多种传染病。