



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101724069 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 06

(21) 申请号 200910254437. 7

CN 101564534 A, 2009. 10. 28,

(22) 申请日 2009. 12. 22

CN 1268643 C, 2006. 08. 09,

(73) 专利权人 陕西北美基因股份有限公司

林芳 等. 鸡卵黄抗体的制备以及金磁微粒为载体去除人血浆部分高丰度蛋白的研究. 《细胞与分子免疫学杂志》. 2008, 706-709.

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号

(72) 发明人 崔亚丽 胡佳 陈超

审查员 唐宁

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限公司 61211

代理人 徐平

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 16/02 (2006. 01)

C07K 1/22 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101343320 A, 2009. 01. 14,

CN 1724569 A, 2006. 01. 25,

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种抗人血清 / 浆中高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种抗人血清 / 浆高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 的制备方法及其应用, 本发明用经过高丰度蛋白免疫后母鸡的蛋作为提取抗体的来源。制备步骤是对经过免疫后的母鸡以间接 ELISA 法检测血清效价, 效价达标后, 获取含高效价抗体的鸡蛋。将鸡蛋卵黄液经酸性水解, 冻融, 过滤后, 硫酸铵沉淀。最后再经过 DEAE 离子交换层析进一步纯化得到卵黄抗体 IgY。人血清 / 浆高丰度蛋白是指白蛋白, IgG, 转铁蛋白, C3 补体, IgA, IgM, 胰蛋白, 珠蛋白, 脂蛋白, F 因子, C9 补体, C4 补体, 铜蓝蛋白, 载脂蛋白 B, 载脂蛋白 A-1,  $\alpha$ -1- 酸性糖蛋白, H 因子, 补体因子 B, 前白蛋白, C1q 补体等浓度高于 10  $\mu$ g/ml 的高丰度蛋白。



1 2

1. 一种抗人血清 / 浆中高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 的制备方法, 其特征在于: 所述制备过程包括以下步骤

(1) 收集经过高丰度蛋白免疫后母鸡所产的含高效价抗体的鸡蛋; 所述含高效价抗体的鸡蛋是这样确定的: 用间接 ELISA 法检测经过高丰度蛋白免疫后母鸡血清的效价, 效价达标后即高效价抗体鸡蛋;

(2) 从高价效抗体鸡蛋中分离提取抗高丰度蛋白卵黄抗体 IgY: 将所述高效价抗体鸡蛋的卵黄液经酸性水稀释, 经冻融, 过滤得到含卵黄抗体 IgY 的水溶液, 硫酸铵沉淀粗纯, DEAE 离子交换层析即可分离得到纯化的高丰度蛋白卵黄抗体 IgY;

步骤 (2) 具体按照以下步骤操作:

(2.1) 去除高效价鸡蛋的蛋白和卵黄膜得到卵黄液, 用超纯水稀释卵黄液, 按卵黄液与超纯水 1:2-1:15 的体积比, 并将稀释液调整 pH 在 4.5-6.0 范围, 4°C 搅拌 9h 至过夜; 将卵黄稀释液冻存后, 置于 4°C 缓慢溶解, 过滤; 滤液经 11000rpm 离心 20min, 收集上清即为含卵黄抗体 IgY 的水溶液;

(2.2) 含卵黄抗体 IgY 的水溶液上清用饱和硫酸铵沉淀 2 次, 终浓度分别为 50% 和 35%; 11000rpm 离心 25min, 弃上清, 沉淀用 PBS 溶解; 4°C 透析 24 h, 中间换液 4 次; 透析得到卵黄抗体粗品;

(2.3) 用 DEAE 阴离子交换柱在 pH 6.8 ~ 7.0 的近中性环境下对卵黄抗体进行纯化, 1 mol/L NaCl 梯度洗脱, 流速 1mL/min; 收集洗脱液, 得到卵黄抗体溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的抗人血清 / 浆中高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 的制备方法, 其特征在于: 步骤 (1) 对经过高丰度蛋白免疫后母鸡血清效价进行检测, 获取含高效价抗体的鸡蛋, 其步骤是:

(1.1) 用间接 ELISA 法检测免疫血清效价, 用酶标仪检测 450nm 的光吸收值, 以阳性血清 450nm 的光吸收值大于阴性对照平均值 2.1 倍时的血清最低稀释度为 ELISA 效价;

(1.2) 用间接 ELISA 法检测免疫血清效价, ELISA 效价达 1:10 000 后收取鸡蛋, 4°C 保存。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗人血清 / 浆中高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 的制备方法, 其特征在于: 所述高丰度蛋白为白蛋白, IgG, 转铁蛋白, C3 补体, IgA, IgM, 胰蛋白, 珠蛋白, 脂蛋白, F 因子, C9 补体, C4 补体, 铜蓝蛋白, 载脂蛋白 B, 载脂蛋白 A-1,  $\alpha$ -1-酸性糖蛋白, H 因子, 补体因子 B, 前白蛋白, C1q 补体, 所述高丰度蛋白的浓度高于 10  $\mu$ g/ml。

## 一种抗人血清 / 浆中高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 的制备方法 及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗人血清 / 浆中高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 的制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 人类血清 / 浆等生物样品中含有机体组织细胞分泌、脱落至血中的多种低丰度蛋白质,它们可能是一些信号传导和调控的关键蛋白。例如,坏死、凋亡或溶血过程中,都会有一些细胞内蛋白质释放到血中。开展疾病的血清蛋白质组学研究,寻找低丰度蛋白质,将有利于阐明发病机理,并有可能发现一些与疾病特定状态相关的标志性蛋白质,从而为疾病的诊断提供新方法。然而一些高丰度蛋白质的存在,尤其是白蛋白和抗体,严重影响了低丰度蛋白质的鉴定和检测。

[0003] 蛋白质组学研究中常利用抗体亲和层析法去除样品中的高丰度蛋白质,以提高对低丰度蛋白检测的灵敏度和分辨率。利用抗体亲和层析去除技术的关键是得到特异性高且廉价易得的抗体,而现在抗体亲和层析法多采用哺乳动物来源的重组单克隆或多克隆抗体。一般使用兔,鼠等哺乳动物作为产生抗血清 / 血浆中高丰度蛋白抗体的动物来源。哺乳动物的单克隆抗体制备较复杂,产量小,成本高;其来源于血浆的多克隆抗体同样存在上述问题,且会存在非特异性结合的缺点。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种抗人血清 / 浆中高丰度蛋白抗体的制备方法及其应用,其解决了现有技术中使用兔,鼠等哺乳动物作为产生抗血清 / 血浆中高丰度蛋白抗体的动物来源,使用哺乳动物血清作为提取抗体来源,致使抗体的制备步骤复杂,产量小,成本高,抗体有非特异性结合,效价低且不稳定等问题;并且解决了哺乳动物来源抗体在蛋白分离,提取中引起的非特异性分离问题。解决了哺乳动物来源抗体在免疫学检测中非特异性吸附而导致的杂信号影响问题。

[0005] 本发明解决上述问题的思路是:禽类在种系发生上具有和哺乳动物更远的亲缘关系,可针对哺乳动物进化中大量保守蛋白抗原产生具有更高特异性的抗体,且产生有效免疫反应所需抗原量小。使用经免疫后母鸡的蛋,取代动物血清,作为提取抗体的来源。近年来,卵黄免疫球蛋白(immunoglobulin of yolk,简称 IgY),因产量大、特异性强、获取方便、成本低等优点,越来越多的应用于疾病的诊断、预防和治疗,成为一种稳定可靠的抗体来源。抗人血浆高丰度蛋白的特异性 IgY 可共价结合于固体支持物,去除血浆中的高丰度蛋白,如白蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原、免疫球蛋白(IgA、IgM、IgG)等。

[0006] 本发明解决上述问题的技术方案是:所提供的一种抗人血清 / 浆中高丰度蛋白抗体 IgY 的制备方法包括以下步骤:

[0007] 1、收集经过高丰度蛋白免疫后母鸡所产的含高效价抗体的鸡蛋。所述含高效价抗体的鸡蛋是这样确定的:用间接 ELISA 法检测经过高丰度蛋白免疫后母鸡血清的效价,效

价达标后即高效价抗体鸡蛋；

[0008] 2、从高效价抗体鸡蛋中分离提取高丰度蛋白卵黄抗体 IgY：将所述的高效价抗体鸡蛋的卵黄液经酸性水溶解，冻融，过滤，硫酸铵沉淀和 DEAE 阴离子交换层析即可分离得到纯化的高丰度蛋白卵黄抗体 IgY。

[0009] 步骤 2 高丰度蛋白卵黄抗体的分离提取，其步骤是：

[0010] (1) 去除高效价鸡蛋的蛋白和卵黄膜得到卵黄液，用超纯水稀释卵黄液，按超纯水与卵黄液 1 : 2-1 : 15 的体积比，调整稀释液的 pH 在 4.5-6.0 范围，4℃ 搅拌 9h 至过夜。将卵黄稀释液冻存后，置于 4℃ 缓慢溶解，过滤。滤液经 11000rpm 离心 20min，收集上清。

[0011] (2) 上述上清液用饱和硫酸铵沉淀 2 次，最终浓度分别为 50% 和 35%。11000rpm 离心 25min，弃上清，沉淀用 PBS 溶解。4℃ 透析 24h，中间换液 4 次。透析得卵黄抗体粗品。

[0012] (3) 用 DEAE 阴离子交换柱在 6.8 ~ 7.0 的近中性环境下对卵黄抗体进行纯化，1mol/L NaCl 梯度洗脱，流速 1mL/min。收集洗脱液，即为卵黄抗体溶液。

[0013] 步骤 1 对经过免疫后母鸡的血清进行效价检测，获取含高效价抗体的鸡蛋，其步骤是：

[0014] (1.1) 用间接 ELISA 法检测免疫血清效价，用酶标仪检测 450nm 的光吸收值，以阳性血清 450nm 的光吸收值大于阴性对照平均值 2.1 倍时的血清最低稀释度为 ELISA 效价。

[0015] (1.2) 用间接 ELISA 法检测免疫血清效价，ELISA 效价达 1 : 10000 后收取鸡蛋，4℃ 保存。

[0016] 本发明中所述高丰度蛋白为白蛋白，IgG，转铁蛋白，C3 补体，IgA，IgM，胰蛋白，珠蛋白，脂蛋白，F 因子，C9 补体，C4 补体，铜蓝蛋白，载脂蛋白 B，载脂蛋白 A-1， $\alpha$ -1- 酸性糖蛋白，H 因子，补体因子 B，前白蛋白，C1q 补体等浓度高于 10  $\mu$ g/ml 的高丰度蛋白。

[0017] 本发明中抗人血清 / 浆中高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 应用包括：高丰度蛋白的免疫亲和提取、高丰度蛋白的免疫亲和分离，高丰度蛋白的免疫学检测。

[0018] 本发明的优点是：

[0019] 1、制备高丰度蛋白卵黄抗体 IgY 时，收集蛋方便，无需采血，无损伤，符合现代动物保护规则。

[0020] 2、抗体产量高，维持在高效价的时间长，成本低廉。产蛋禽类经免疫后，很快就可可在蛋中产生较高效价，且维持时间长。卵黄抗体产量大，每个蛋大约含 100mg 以上的 IgY，一个月可达 3g，相当于兔子的 10-12 倍。由于禽类的饲养费用低廉，并可长时间产生高效价抗体，其成本远远低于从哺乳动物血浆中提取到相应抗体。

[0021] 3、抗体分离提取方便且纯度高。卵黄中没有其他的 Ig，易于提纯。利用硫酸铵沉淀法分离到的 IgY 粗品纯度就达 90% 以上。

[0022] 4、IgY 更稳定，易于储存。由于受到卵黄的保护，蛋贮存在 4℃ 条件下 6 个月，IgY 活性只有很小损失。而且，IgY 较哺乳动物抗体更耐酸，耐碱，耐热。

[0023] 5、卵黄抗体对哺乳动物来源的蛋白抗原产生的效价高，特异性强，且产生有效免疫反应所需抗原量小。

[0024] 6、抗高丰度蛋白的卵黄抗体应用于高丰度蛋白的免疫亲和提取、高丰度蛋白的免疫亲和分离，高丰度蛋白的免疫学检测。解决了高丰度蛋白的免疫亲和提取、高丰度蛋白的免疫亲和分离，高丰度蛋白的免疫学检测中的非特异性问题。

## 附图说明

[0025] 图 1 为卵黄抗体 IgY 分离提取 SDS-PAGE 电泳图,泳道 1 为纯化得到的高丰度蛋白 IgY,泳道 2 为高丰度蛋白 IgY 标品。

## 具体实施方式

[0026] 实施例 1 为抗转铁蛋白鸡的 IgY 制备过程:

[0027] 1、对经过转铁蛋白免疫后母鸡的蛋进行检测,获取含高效价抗体的鸡蛋。具体步骤是:

[0028] (1) 用间接 ELISA 法检测免疫血清效价,用酶标仪检测 450nm 的光吸收值,以阳性血清 450nm 的光吸收值大于阴性对照平均值 2.1 倍时的血清最低稀释度为 ELISA 效价。

[0029] (2) 用间接 ELISA 法检测免疫血清效价,ELISA 效价达 1 : 10000 后收取鸡蛋,4℃ 保存。

[0030] 2、从高效价抗体鸡蛋中分离提取高丰度蛋白卵黄抗体 IgY:将所述的高效价抗体鸡蛋的卵黄液经酸性水溶解,冻融,过滤,硫酸铵沉淀和 DEAE-fast-flow 离子交换层析即可分离得到纯化的高丰度蛋白卵黄抗体 IgY。具体步骤是:

[0031] (1) 去除高效价鸡蛋的蛋白和卵黄膜得到卵黄液,用超纯水与卵黄液 1 : 9 的体积比稀释卵黄液,将稀释液调整到 PH = 5.5 左右,4℃ 搅拌 9h 至过夜。将卵黄稀释液冻存后,置于 4℃ 缓慢溶解,过滤。滤液经 11000rpm 离心 20min,收集上清。

[0032] (2) 上述上清液用饱和硫酸铵沉淀 2 次,最终浓度分别为 50% 和 35%。11000rpm 离心 25min,弃上清,沉淀用 PBS 溶解。4℃ 透析 24h,中间换液 4 次。透析得卵黄抗体粗品。

[0033] (3) 用 DEAE 阴离子交换柱在 6.8 ~ 7.0 的近中性环境下对卵黄抗体进行纯化,1mol/L NaCl 梯度洗脱,流速 1mL/min。收集洗脱液,即为卵黄抗体溶液。

[0034] (4) 从图 1 可以看出,泳道 1 和泳道 2 中,在相同位置出现相同条带,说明提取得到了卵黄抗体 IgY。

[0035] 实施例 2 为抗白蛋白鸡的 IgY 制备过程:

[0036] 1、对经过白蛋白免疫后母鸡的血清进行效价检测,获取含高效价抗体的鸡蛋。具体步骤是:

[0037] (1) 用间接 ELISA 法检测免疫血清效价,用酶标仪检测 450nm 的光吸收值,以阳性血清 450nm 的光吸收值大于阴性对照平均值 2.1 倍时的血清最低稀释度为 ELISA 效价。

[0038] (2) 用间接 ELISA 法检测免疫血清效价,ELISA 效价达 1 : 10000 后收取鸡蛋,4℃ 保存。

[0039] 2、从高效价抗体鸡蛋中分离提取高丰度蛋白卵黄抗体 IgY:将所述的高效价抗体鸡蛋的卵黄液经酸性水溶解,冻融,过滤,硫酸铵沉淀和 DEAE 离子交换层析即可分离得到纯化的高丰度蛋白卵黄抗体 IgY。

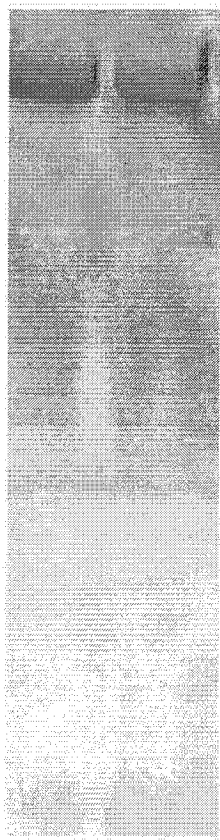
[0040] (1) 去除高效价鸡蛋的蛋白和卵黄膜得到卵黄液,用超纯水与卵黄液 1 : 9 的体积比稀释卵黄液,将稀释液调整到 PH = 5.5 左右,4℃ 搅拌 9h 至过夜。将卵黄稀释液冻存后,置于 4℃ 缓慢溶解,过滤。滤液经 11000rpm 离心 20min,收集上清。

[0041] (2) 上述上清液用饱和硫酸铵沉淀 2 次,最终浓度分别为 50% 和 35%。11000rpm

离心 25min, 弃上清, 沉淀用 PBS 溶解。4℃透析 24h, 中间换液 4 次。透析得卵黄抗体粗品。

[0042] (3) 用 DEAE 阴离子交换柱在 6.8 ~ 7.0 的近中性环境下对卵黄抗体进行纯化, 1mol/L NaCl 梯度洗脱, 流速 1mL/min。收集洗脱液, 即为卵黄抗体溶液。

[0043] (4) 从图 1 可以看出, 泳道 1 和泳道 2 中, 在相同位置出现相同条带, 说明提取得到了高纯度的卵黄抗体 IgY。



1 2

图 1

专利名称(译)	一种抗人血清/浆中高丰度蛋白卵黄抗体IgY的制备方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101724069B</a>	公开(公告)日	2013-03-06
申请号	CN200910254437.7	申请日	2009-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	陕西北美基因股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西北美基因股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	陕西北美基因股份有限公司		
[标]发明人	崔亚丽 胡佳 陈超		
发明人	崔亚丽 胡佳 陈超		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/02 C07K1/22 G01N33/53		
代理人(译)	徐平		
审查员(译)	唐宁		
其他公开文献	CN101724069A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种抗人血清/浆高丰度蛋白卵黄抗体IgY的制备方法及其应用，本发明用经过高丰度蛋白免疫后母鸡的蛋作为提取抗体的来源。制备步骤是对经过免疫后的母鸡以间接ELISA法检测血清效价，效价达标后，获取含高效价抗体的鸡蛋。将鸡蛋卵黄液经酸性水解，冻融，过滤后，硫酸铵沉淀。最后再经过DEAE离子交换层析进一步纯化得到卵黄抗体IgY。人血清/浆高丰度蛋白是指白蛋白，IgG，转铁蛋白，C3补体，IgA，IgM，胰蛋白，珠蛋白，脂蛋白，F因子，C9补体，C4补体，铜蓝蛋白，载脂蛋白B，载脂蛋白A-1， $\alpha$ -1-酸性糖蛋白，H因子，补体因子B，前白蛋白，C1q补体等浓度高于10 $\mu$ g/ml的高丰度蛋白。

