

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610009804.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月16日

[11] 公开号 CN 1818651A

[22] 申请日 2006.3.13

[21] 申请号 200610009804.3

[71] 申请人 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

[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

兔抗鹅 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鹅 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鹅 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，在提纯鹅卵黄免疫球蛋白的基础上，免疫家兔制备并纯化兔抗鹅 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鹅 IgY + IgY (ΔFc) (H + L) 抗体。应用此酶标记抗体可以建立多种鹅类疫病检测技术，预防鹅类多种传染病。

1、兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 辣根过氧化物酶标记抗体, 其特征是: (1) 它是由辣根过氧化物酶与兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L) 抗体组成的酶抗体结合物, 其可与鹅免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\square$ 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 $>1000\text{U}/\text{mg}$ , ELISA 使用浓度 $>1:1000$ , Weston-Blotting 使用浓度 $>1:500$  的产品。

2、兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 辣根过氧化物酶标记抗体的制备方法, 其特征是:

1) 纯化鹅卵黄免疫球蛋白 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,  $4^\circ\text{C}$  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, 提纯鹅卵黄免疫球蛋白的浓度在 1.0~5mg/ml 之间, 纯度 $>90\%$ ;

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

首免, 弗氏完全佐剂与鹅卵黄免疫球蛋白 (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,  $37^\circ\text{C}$ , 1h,  $4^\circ\text{C}$  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, 兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 血清效价 $>1:32$ , 纯化兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体效价 $>1:16$ , 且其浓度 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鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体

将  $N \times 4$  mg 辣根过氧化物酶溶于  $N \times 1$  ml 去离子水, 加入  $200\text{--}400\mu\text{l}$   $\text{NaIO}_4$  (0.1mol/L),  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  搅拌 20min, 于醋酸钠缓冲液 (pH4.4, 0.001mol/L)  $4^\circ\text{C}$  透析过夜, 加入  $N \times \text{mg}$  纯化的兔抗鹅抗体, 立即加入 0.2mol/L 的碳酸钠缓冲液 (pH9.5) 调节 pH 值致 9~9.5,  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  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Sephodex 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( $(A_{280}-A_{403}) \times 0.62 \text{mg/ml}$ )、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 $>1000\text{U/mg}$ 、使用浓度 $>1:1000$ 时符合制备标准。

## 兔抗鹅 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鹅 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，但仅有极少数鹅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,更是世界主要鹅类养殖地和消费国，鹅类养殖业的持续、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。而酶标记抗鹅抗体不仅为鹅类疫病的检测搭建物质平台，更为鹅类整体免疫机理的研究提供物质支持，并最终为鹅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鹅 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)。

本发明的兔抗鹅 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鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体组成的酶抗体结合物，其可与鹅免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\square$ 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。

本发明的兔抗鹅 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) 纯化鹅卵黄免疫球蛋白 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) 兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体的制备和纯化

首免，弗氏完全佐剂与鹅卵黄免疫球蛋白 (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鹅 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  $N \times \text{mg}$  纯化的兔抗鹅抗体，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。

采用本发明的方法可用于:

- ① 本方法可用于提纯鹅类卵黄免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc);
- ② 本方法可用于兔抗鹅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 本产品可用于鹅类相关酶免疫组织化学染色。
- ② 本产品可用于鹅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鹅类疫病检测技术, 预防鹅类多种传染病。

#### (四) 具体实施方式

##### 1) 纯化鹅卵黄免疫球蛋白 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) 兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体的制备和纯化

首免, 弗氏完全佐剂与鹅卵黄免疫球蛋白 (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鹅 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 纯化的兔抗鹅抗体, 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Sephodex 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 $>1000\text{U/mg}$ 、使用浓度 $>1:1000$ 时符合制备标准。

专利名称(译)	兔抗鹅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="#">CN1818651A</a>	公开(公告)日	2006-08-16
申请号	CN200610009804.3	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	G01N33/53 G01N33/535 G01N21/78		
其他公开文献	CN1818651B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供的是兔抗鹅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鹅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，在提纯鹅卵黄免疫球蛋白的基础上，免疫家兔制备并纯化兔抗鹅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鹅IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)抗体。应用此酶标记抗体可以建立多种鹅类疫病检测技术，预防鹅类多种传染病。