



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1818651 B

(45) 授权公告日 2010.07.21

(21) 申请号 200610009804.3

CN 1438245 A, 2003.08.27, 全文.

(22) 申请日 2006.03.13

贺云霞,等. 鹅卵黄 IgG 的纯化及兔抗鹅 IgG 酶标抗体的制备. 中国预防兽医学报 27 5. 2005, 27(5), 412-414.

(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

审查员 边昕

(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有限责任公司 23101

代理人 祖玉清

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

(56) 对比文件

WO 0188162 A2, 2001.11.22, 全文.

CN 1509188 A, 2004.06.30, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L) 辣根过氧化物酶标记抗体

(57) 摘要

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 Sephadex 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。

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( $\Delta$ 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 $> 1000\text{U}/\text{mg}$ , ELISA 使用浓度 $> 1 : 1000$ , Weston-Blotting 使用浓度 $> 1 : 500$  的产品。

## 兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L) 辣根过氧化物酶标记抗体

### (一) 技术领域

[0001] 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

[0002] 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。

[0003] 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。

[0004] 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

[0005] 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。

[0006] 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)。

[0007] 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:

[0008] (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( $\Delta$ 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。

[0009] 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:

[0010] 1) 纯化鹅卵黄免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc)

[0011] 按 v/v 为卵黄:PBS(pH7.40,0.01mol/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°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 DE<sub>52</sub> 纤维素柱,1ml/min,1 管/5min,收集第一峰;

[0012] 2) 兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc) (H+L) 抗体的制备和纯化

[0013] 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 $^{\circ}$ C, 1h, 4 $^{\circ}$ 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 DE<sub>52</sub> 离子交换层析柱纯化, 1ml/min, 1 管 /5min, 收集第一峰;

[0014] 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

[0015] 将 N $\times$ 4mg 辣根过氧化物酶溶于 N $\times$ 1ml 去离子水, 加入 200-400  $\mu$  INaIO<sub>4</sub> (0.1mol/L), 20 ~ 25 $^{\circ}$ C 搅拌 20min, 于醋酸钠缓冲液 (pH4.4, 0.001mol/L) 4 $^{\circ}$ C 透析过夜, 加入 N $\times$ 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 $^{\circ}$ C 搅拌 2h (注: N 为常数);

[0016] 4) 标记物的纯化

[0017] 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 SephadexG200 层析柱, 1ml/15min, 2ml/ 管, 将两部分合并;

[0018] 5) 酶标记抗体的质量鉴定

[0019] 280nm 和 403nm 测定其 OD 值, 计算其 IgG 含量 ((A<sub>280</sub>-A<sub>403</sub> $\times$ 0.3) $\times$ 0.62mg/ml)、酶含量 (A<sub>403</sub> $\times$ 0.4mg/ml)、克分子比 ((酶含量 / IgG 含量) $\times$ 4)、结合物标记率 (A<sub>403</sub>/A<sub>280</sub> $\times$ 100%) 酶结合物产率 (酶含量 $\times$ 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。

[0020] 采用本发明的方法可用于:

[0021] ① 本方法可用于提纯鹅类卵黄免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc);

[0022] 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;

[0023] 采用本发明生产的产品可用于:

[0024] ① 本产品可用于鹅类相关酶免疫组织化学染色。

[0025] 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。

[0026] 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

[0027] 1) 纯化鹅卵黄免疫球蛋白 IgY 和 IgY( $\Delta$ Fc)

[0028] 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 $^{\circ}$ 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 DE 52 纤维素柱,1ml/min,1 管 /5min,收集第一峰;

[0029] 2) 兔抗鹅 IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L) 抗体的制备和纯化

[0030] 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;

[0031] 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

[0032] 将 N×4mg 辣根过氧化物酶溶于 N×1ml 去离子水,加入 200-400  $\mu$  INaIO<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);

[0033] 4) 标记物的纯化

[0034] 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 SephadexG200 层析柱,1ml/15min,2ml/ 管,将两部分合并;

[0035] 5) 酶标记抗体的质量鉴定

[0036] 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)	兔抗鹅IgY+IgY( $\Delta$ Fc)(H+L)辣根过氧化物酶标记抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN1818651B</a>	公开(公告)日	2010-07-21
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	CN1818651A		
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。