



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104804086 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201510018553. 4

(22) 申请日 2015. 01. 14

(71) 申请人 遵义医学院

地址 519041 广东省珠海市金湾区遵义医学  
院珠海校区

(72) 发明人 孙万邦 郭锦锦 宋明英 李婷  
张莹 旷龙昊

(74) 专利代理机构 广东秉德律师事务所 44291  
代理人 杨焕军

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18*(2006. 01)

*C07K 1/36*(2006. 01)

*C07K 1/34*(2006. 01)

*C07K 1/30*(2006. 01)

*G01N 33/535*(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

### (54) 发明名称

兔抗 IgY 抗体的制备方法、酶标记抗体的制备方法及应用

### (57) 摘要

本发明提供了一种兔抗 IgY 抗体的制备方法、酶标记抗体的制备方法及应用,兔抗 IgY 抗体的制备方法包括如下步骤:(1) 硫酸铵盐析法粗提取 IgG;(2) 葡聚糖凝胶纯化 IgG。该兔抗 IgY 抗体的制备方法为酶标记抗体 IgG-HRP 的制备提供了基础,简单实用,容易推广,酶标记抗体 IgG-HRP 能针对一个抗原的多个表位进行识别,可以提高检测的灵敏度,因此,酶标记抗体 IgG-HRP 可以适用各种卵黄抗体鉴定、效价检测的通用试剂。

1. 一种兔抗 IgY 抗体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 硫酸铵盐析法粗提取 IgG:

(101) 取等体积量的兔抗 IgY 免疫血清和生理盐水进行混合,边搅拌边滴加饱和硫酸铵,使溶液中硫酸铵饱和度为 50%,记录此时饱和硫酸铵的加入量 X 毫升,  $X > 0$ , 4℃ 静置 3h 以上,3000rpm 离心 20min,弃上清液,得沉淀物;

(102) 沉淀物用生理盐水稀释至 0.5X 毫升,边搅拌边滴加饱和硫酸铵,使溶液中硫酸铵饱和度为 33%,4℃ 静置 3h 以上,3000rpm 离心 20min,弃上清液,取沉淀物;重复此步骤 2 次;

(103) 按每毫克沉淀物加 500ul 的生理盐水的比例用生理盐水溶解 (102) 所制得的沉淀物,装入透析袋,置 4℃ 用 0.1mol/L、PH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为透析处理液进行透析除盐,更换透析处理液数次直至:奈氏试剂测定无  $\text{NH}_4^+$ , 1%  $\text{BaCl}_2$  测定无  $\text{SO}_4^{2-}$ ;得所需的 IgG 样品,置 4℃ 保存;

(2) 葡聚糖凝胶纯化 IgG:

(201) 凝胶的预处理;

(202) 装柱:凝胶床总体积与 IgG 样品的加入体积量应满足:IgG 样品的加入体积量为凝胶床总体积的 5%~10%;

(203) 加样:凝胶床经平衡后,吸去上层液体,待平衡液下降至床表面时,关闭流出口,用滴管加入样品,打开流出口,使样品缓慢渗入凝胶床内,当样品液面恰与凝胶床表面持平时,用洗脱液冲洗管壁;

(204) 洗脱与收集:洗脱与收集:连接好凝胶柱层析系统,调节洗脱液流速为每分钟 1 毫升,进行洗脱,收集洗脱液中与目的峰相应的部分洗脱液作为所需的兔抗 IgY 抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的一种兔抗 IgY 抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤 (101) 中兔抗 IgY 免疫血清的制备方法,包括以下步骤:

(111) IgY 制备:取鸡蛋卵黄并加入 8 倍体积的灭菌的双蒸水,用浓度为 0.1M 的 HCl 溶液调 PH 为 5.0-5.1,置 4℃ 搅拌 8h,得卵黄稀释液;取卵黄稀释液,以 10000-12000rpm、4℃ 进行离心 15min,收取上清液;于上清液中加入使用 0.01mol/L、PH7.4 的 PBS 液配制的浓度为 8% 的 PEG6000 量,鸡蛋卵黄量 / 浓度为 8% 的 PEG6000 量 = 5g/ml,搅拌 30min,以 10000-12000rpm、4℃ 进行离心 10min,收集沉淀,去上清液;将沉淀物溶于 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液并装入透析袋中,在 0.01mol/L、PH 值为 7.4 的 PBS 透析液中透析,每毫克沉淀物对应 500  $\mu$ l 的 PBS 液、500ml 的透析液;透析完成后用 0.22  $\mu$ m 膜过滤除菌,取蛋白质浓度大于 30mg 蛋白 /ml 的产物作为所需的 IgY,置 -20℃ 保存;

(112) IgY 免疫原制备:将所制备的 IgY 用 PBS 液进行稀释至蛋白质浓度 30mg 蛋白 /ml,将 10ml 弗氏完全佐剂置于研钵内,边研磨边滴加等量稀释后的 IgY,直至形成白色油包水乳剂,置 4℃ 保存备用;

(113) 免疫家兔:选用 2~2.5kg 健康家兔,于颈后,两后肢大腿外侧共四个部位皮下各注射步骤 (112) 所得物 0.5ml,7 天后再次同样免疫,21 天后同样部位注射步骤 (111) 所得物 0.5ml,末次注射后第 7 天试血,双向琼脂扩散试验效价达 1:16~1:32 放血收集血清,得兔抗 IgY 免疫血清。

3. 一种酶标记抗体的制备方法,使用权利要求 1 或 2 所述的一种兔抗 IgY 抗体制备,其

特征在于,包括如下步骤:

(31) 于称量瓶中,将辣根过氧化物酶 5p 毫克溶于 0.3mol/L、PH8.1 的碳酸氢钠溶液 1p 毫升中,加入 1%二硝基氟苯无水乙醇溶液 0.1p 毫升,25℃搅拌 1h;p 为大于零的比例系数;

(32) 加入 0.08mol/L 过碘酸钠溶液 1p 毫升,25℃搅拌 30min;

(33) 加 0.08mol/L 乙二醇溶液 1p 毫升,25℃搅拌 1 小时,然后将称量瓶中液体装入透析袋中;

(34) 用 0.01mol/L、pH9.5 碳酸缓冲液 1000p 毫升,进行 4℃透析 12h,换液 3 次,取出透析袋中液体加入称量瓶中;

(35) 将 5p 毫克所述兔抗 IgY 抗体溶于 0.01mol/L pH 9.5 碳酸钠缓冲液 1p 毫升中,然后加入称量瓶中,室温轻搅 2 ~ 3h,25℃搅拌 2 ~ 3 小时;

(36) 于称量瓶中,加入硼氢化钠 ( $\text{NaBH}_4$ ) 5p 毫克,置 4℃放置 3h 以上;

(37) 称量瓶中,逐滴加入等量饱和硫酸铵溶液 4℃放置 1h,以 4000rpm 离心 15min,弃上清液,沉淀再用 50%饱和硫酸铵洗 2 次;

(38) 沉淀溶于 200p 微升的 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液中,装入透析袋并以 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液作为透析液充分透析至无  $\text{NH}_4^+$ ,然后,4℃、1000rpm 离心 10min 去沉淀,取上清液,得酶标记抗体。

4. 权利要求 3 所述的酶标记抗体应用于酶联免疫吸附试验。

## 兔抗 IgY 抗体的制备方法、酶标记抗体的制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药生物技术领域,特别是涉及兔抗 IgY 抗体 (IgG) 的制备方法、酶标记抗体 IgG-HRP 的制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] IgY 理化性质:禽类的免疫系统包括细胞免疫和体液免疫系统,分别受胸腺和法氏囊的控制。当机体受到外来抗原刺激后,法氏囊内的 B 细胞分化成为浆细胞,分泌特异性抗体进入血液循环,当血液流经卵巢时,特异性抗体(主要是 IgG, IgG 的英文全称为 immunoglobulin G,是血清中免疫球蛋白主成分,约占血清中免疫球蛋白总含量的 75%) 在卵细胞中逐渐蓄积,形成卵黄抗体(英文全称 yolk antibody,英文简称 IgY), IgY 的理化性质与哺乳动物的 IgG 相似。IgY 与一般哺乳动物 IgG 相比, IgY 具有较强的耐热、耐酸、抗离子强度和一定的抗酶降解能力。在低于 75℃ 条件下, IgY 具有良好的热稳定性。IgY 制剂在 4℃ 贮存 5 年或在室温贮存 6 个月其活性仍无明显变化或下降。IgY 对胃蛋白酶有较高的抵抗力,但对胰蛋白酶十分敏感。将胃蛋白酶和 IgY 在 pH2.0 温育 1h 后,几乎所有活性丧失,但在 pH4.0 时 1h 后可保持 91% 的活性,甚至温育 10h 后仍有 63% 活性。IgY 分别与胰蛋白酶和胰凝乳酶温育 8h, 活性分别保持 39% 和 41%。

[0003] IgY 在动物疾病防治方面的应用:研究表明, IgY 能抵抗幼龄动物肠道中胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的消化。故常在幼畜饲料或添加剂中加入一定量的针对某些特定疾病的 IgY, 以使其获得有效的被动免疫。何月英等利用小鹅瘟强毒制备的卵黄抗体,对 2-3 日龄雏鹅进行预防,其保护率高达 100%。杨晓梅等用鸭病毒性肝炎 I 型鸡胚毒免疫鸡,制备的鸡抗鸭病毒性肝炎高免卵黄抗体,经实际应用于预防时,雏鸭的平均成活率为 96.9%。卵黄抗体已被广泛应用于许多疾病的防治。汪铭书应用抗鸭病毒性肝炎 (DHV) 的卵黄抗体治疗人工感染的鸭时,当用 1 万倍 LD<sub>50</sub> 强毒时保护率可达到 100%。张英等用抗小鹅瘟的卵黄抗体治疗发病鹅群,治愈率为 95.2%。此外,应用多种病原菌免疫制备的卵黄抗体还可以防治多种病原菌的感染。詹丽娥等用 IBD、ND 和 EDS-76 三联高免卵黄抗体治疗上述三种疾病,总有效率可达 50% 以上。日本成功地从鸡蛋中提取出能够杀死幽门螺旋杆菌的抗体,并以这种抗体为原料制成了能杀死人体内幽门螺旋杆菌的酸奶。卵黄抗体治疗疾病,安全、高效且无公害,我国已有部分商品化的卵黄抗体供应。

[0004] IgY 在动物疾病诊断方面的应用:卵黄抗体和哺乳动物免疫球蛋白有许多不同之处,如它不与金色葡萄球菌 A 蛋白结合,不与哺乳动物 Fc 受体结合,对哺乳动物补体无固定作用等,这使得卵黄抗体在检测诊断上具有更强的特异性和灵敏度,所以卵黄抗体可以应用于免疫荧光试验、ELISA 试验、免疫扩散、免疫电泳等。郑厚旌等用卵黄琼扩实验检验卵黄中的 IBD 抗体水平,结果表明用卵黄琼扩试验替代血清琼扩试验检测 IBD 抗体水平是可行的,并且具有经济、省力、省时的特点。此外卵黄抗体有望取代传统的多克隆抗体的生产,获取大量更有效的抗体,同时也可减少对动物的副反应,提高动物的福利。

[0005] IgY 开发前景: IgY 作为替代抗生素的新型饲料添加剂正在引起人们的关注, IgY

取代抗生素用作生长促进剂,不会产生药物残留,是一种安全的绿色添加剂。用鸡卵黄大量生产、制备多克隆抗体是近年来抗体制备技术中新兴的研究领域。IgY 产量高,价格低廉。使用 IgY 技术生产免疫球蛋白,可以减少对动物的应激,提高动物的福利。

[0006] 综上所述,鸡卵黄 IgY 是一种高产、优质的多克隆抗体,而且鸡大规模工业化饲养成本低,经济方便,同时制备 IgY 的工艺相对简单。因此, IgY 在生物制品的开发和疾病的防治方面具有广阔的前景。

[0007] 但应用卵黄抗体防治疾病也有不可避免的缺点,如可能带有蛋传染性疾病的病原,对养禽业存在潜在的威胁。因此,对各种 IgY 抗体 (IgG) 制品的鉴定、效价检测就成了制品应用的基础。目前,公认的敏感方法是免疫标记技术,但目前没有“免疫标记的兔抗鸡卵黄抗体”的供应,给鉴定带来困难。

[0008] 免疫酶技术已广泛应用于临床检测和实验研究,其中以酶联免疫吸附试验 (英文全称为enzyme linked immunosorbent assay,英文简称为ELISA) 最为常用,它既可用于测定抗体,又可测定可溶性抗原及细胞抗原。

[0009] 酶联免疫吸附试验的基本原理:先将已知的抗体或抗原结合在某种固相载体上,并保持其免疫活性;测定时,将待检标本和酶标抗原或抗体按不同步骤与固相载体表面吸附的抗体或抗原发生反应,再用洗涤的方法分离抗原抗体复合物和游离成分,然后加入酶的作用底物催化显色,进行定性或定量。

#### 发明内容:

[0010] 本发明所要解决的第一个技术问题是提供一种兔抗 IgY 抗体的制备方法。

[0011] 本发明所要解决的第二个技术问题是提供一种酶标记抗体的制备方法。

[0012] 上述第一个技术问题通过以下技术方案进行解决:

[0013] 一种兔抗 IgY 抗体的制备方法,包括如下步骤:

[0014] (1) 硫酸铵盐析法粗提取 IgG:

[0015] (101) 取等体积量的兔抗 IgY 免疫血清和生理盐水进行混合,边搅拌边滴加饱和硫酸铵,使溶液中硫酸铵饱和度为 50%,记录此时饱和硫酸铵的加入量 X 毫升,  $X > 0$ , 4℃ 静置 3h 以上, 3000rpm 离心 20min, 弃上清液, 得沉淀物;

[0016] (102) 沉淀物用生理盐水稀释至 0.5X 毫升,边搅拌边滴加饱和硫酸铵,使溶液中硫酸铵饱和度为 33%, 4℃ 静置 3h 以上, 3000rpm 离心 20min, 弃上清液, 取沉淀物;重复此步骤 2 次;

[0017] (103) 按每毫克沉淀物加 500ul 的生理盐水的比例用生理盐水溶解 (102) 所制得的沉淀物,装入透析袋,置 4℃ 用 0.1mol/L、PH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为透析处理液进行透析除盐,更换透析处理液数次直至:奈氏试剂测定无  $\text{NH}_4^+$ , 1%  $\text{BaCl}_2$  测定无  $\text{SO}_4^{2-}$ ;得所需的 IgG 样品,置 4℃ 保存;

[0018] (2) 葡聚糖凝胶纯化 IgG:

[0019] (201) 凝胶的预处理;

[0020] (202) 装柱:凝胶床总体积与 IgG 样品的加入体积量应满足: IgG 样品的加入体积量为凝胶床总体积的 5%~10%;

[0021] (203) 加样:凝胶床经平衡后,吸去上层液体,待平衡液下降至床表面时,关闭流

出口,用滴管加入样品,打开流出口,使样品缓慢渗入凝胶床内,当样品液面恰与凝胶床表面持平时,用洗脱液冲洗管壁;

[0022] (204) 洗脱与收集:洗脱与收集:连接好凝胶柱层析系统,调节洗脱液流速为每分钟 1 毫升,进行洗脱,收集洗脱液中与目的峰相应的部分洗脱液作为所需的兔抗 IgY 抗体。

[0023] 本发明的兔抗 IgY 抗体的制备方法,操作简单,可以制备出兔抗 IgY 抗体,为酶标记抗体 IgG-HRP 的制备提供了基础。

[0024] 进一步的方案是,所述步骤(101)中兔抗 IgY 免疫血清的制备方法,包括以下步骤:

[0025] (111) IgY 制备:取鸡蛋卵黄并加入 8 倍体积的灭菌的双蒸水,用浓度为 0.1M 的 HCl 溶液调 PH 为 5.0-5.1,置 4℃ 搅拌 8h,得卵黄稀释液;取卵黄稀释液,以 10000-12000rpm、4℃ 进行离心 15min,收取上清液;于上清液中加入使用 0.01mol/L、PH7.4 的 PBS 液配制的浓度为 8% 的 PEG6000 量,鸡蛋卵黄量 / 浓度为 8% 的 PEG6000 量 = 5g/ml,搅拌 30min,以 10000-12000rpm、4℃ 进行离心 10min,收集沉淀,去上清液;将沉淀物溶于 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液并装入透析袋中,在 0.01mol/L、PH 值为 7.4 的 PBS 透析液中透析,每毫克沉淀物对应 500  $\mu$ l 的 PBS 液、500ml 的透析液,透析完成后用 0.22  $\mu$ m 膜过滤除菌,取蛋白质浓度大于 30mg 蛋白 /ml 的产物作为所需的 IgY,置 -20℃ 保存;

[0026] (112) IgY 免疫原制备:将所制备的 IgY 进行调整以至蛋白质浓度 30mg 蛋白 /ml,将 10ml 弗氏完全佐剂置于研钵内,边研磨边滴加等量所调整后的 IgY,直至形成白色油包水乳剂,置 4℃ 保存备用;

[0027] (113) 免疫家兔:选用 2 ~ 2.5kg 健康家兔,于颈后,两后肢大腿外侧共四个部位皮下各注射步骤(112)所得物 0.5ml,7 天后再次同样免疫,21 天后同样部位注射步骤(111)所得物 0.5ml,末次注射后第 7 天试血,双向琼脂扩散试验效价达 1 : 16 ~ 1 : 32 放血收集血清,得兔抗 IgY 免疫血清。

[0028] 上述方案具体了兔抗 IgY 免疫血清的制备方法,方法简单实用,容易推广。

[0029] 上述第二个技术问题通过以下技术方案进行解决:

[0030] 一种酶标记抗体 IgG-HRP 的制备方法,使用上述一种兔抗 IgY 抗体制备,包括如下步骤:

[0031] (31) 于称量瓶中,将辣根过氧化物酶 5p 毫克溶于 0.3mol/L、PH8.1 的碳酸氢钠溶液 1p 毫升中,加入 1% 二硝基氟苯无水乙醇溶液 0.1p 毫升,25℃ 搅拌 1h ;p 为大于零的比例系数;

[0032] (32) 加入 0.08mol/L 过碘酸钠溶液 1p 毫升,25℃ 搅拌 30min,溶液呈黄绿色;

[0033] (33) 加 0.08mol/L 乙二醇溶液 1p 毫升,25℃ 搅拌 1 小时,然后将称量瓶中液体装入透析袋中;

[0034] (34) 用 0.01mol/L、pH 9.5 碳酸缓冲液 1000p 毫升,进行 4℃ 透析 12h,换液 3 次,取出透析袋中液体加入称量瓶中;

[0035] (35) 将 5p 毫克所述兔抗 IgY 抗体溶于 0.01mol/L pH 9.5 碳酸钠缓冲液 1p 毫升中,然后加入称量瓶中,室温轻搅 2 ~ 3h,25℃ 搅拌 2 ~ 3 小时;

[0036] (36) 于称量瓶中,加入硼氢化钠 (NaBH<sub>4</sub>) 5p 毫克,置 4℃ 放置 3h 以上;

[0037] (37) 称量瓶中,逐滴加入等量饱和硫酸铵溶液 4℃ 放置 1h,以 4000rpm 离心

15min,弃上清液,沉淀再用 50%饱和硫酸铵洗 2 次;

[0038] (38) 沉淀溶于 200 $\mu$ l 微升的 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液中,装入透析袋并以 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液作为透析液充分透析至无  $\text{NH}_4^+$ ,再 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1000rpm 离心 10min 去沉淀,取上清液,得酶标记抗体。

[0039] 经测试,本发明制备出的酶标记抗体 IgG-HRP 可以适用各种卵黄抗体鉴定,效价检测的通用试剂。因此,本发明能为卵黄抗体检测提供选择,为各种卵黄抗体的应用价值提供依据。

[0040] 本发明还将上述酶标记抗体应用于酶联免疫吸附试验。

## 具体实施方式

[0041] 实施例一

[0042] 本实施例提供一种兔抗 IgY 抗体的制备方法,包括如下步骤:

[0043] (1) 硫酸铵盐析法粗提取 IgG:

[0044] (101) 取等体积量的兔抗 IgY 免疫血清和生理盐水进行混合,边搅拌边滴加饱和硫酸铵,使溶液中硫酸铵饱和度为 50%,记录此时饱和硫酸铵的加入量 X 毫升,  $X > 0$ , 4 $^{\circ}\text{C}$  静置 3h 以上,3000rpm 离心 20min,弃上清液,得沉淀物;

[0045] 在通常的一次操作中,等体积量为 10 毫升。可以根据实际情况进行取值,不限于取 10 毫升。

[0046] (102) 将沉淀物用生理盐水稀释至 0.5X 毫升,边搅拌边滴加饱和硫酸铵,使溶液中硫酸铵饱和度为 33%,4 $^{\circ}\text{C}$  静置 3h 以上,3000rpm 离心 20min,弃上清液,取沉淀物;然后重复此步骤 2 次,即用沉淀物按照步骤 (102) 得第一次的沉淀物,然后又用第一次的沉淀物按照步骤 (102) 得第二次的沉淀物。所述第二次的沉淀物为步骤 (102) 所需制备的产物。

[0047] (103) 按每毫克沉淀物加 500 $\mu$ l 的生理盐水的比例用生理盐水溶解 (102) 所制得的沉淀物,装入透析袋,置 4 $^{\circ}\text{C}$  用 0.1mol/L、PH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为透析处理液进行透析除盐,更换透析处理液数次直至:奈氏试剂测定无  $\text{NH}_4^+$  (有  $\text{NH}_4^+$  会出现砖红色或黄色),1%  $\text{BaCl}_2$  测定无  $\text{SO}_4^{2-}$  (有  $\text{SO}_4^{2-}$  会出现白色沉淀);得所需的 IgG 样品,置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存;

[0048] 为了更好地掌握实验,通常会对 IgG 样品进行测定蛋白含量。

[0049] 测定蛋白含量计算方法是:

[0050]  $\text{IgG 样品蛋白含量 (mg/ml)} = (1.45 \times \text{OD}_{280} - 0.74 \times \text{OD}_{260}) \times \text{稀释倍数}$ 。

[0051] 其中,为了使得酶标记抗体的良好制备,IgG 样品的性能最好满足:IgG 抗体效价测定双向琼脂扩散试验效价  $\geq 1:16$ ,ELISA 试验  $\geq 1:8000$ 。

[0052] (2) 葡聚糖凝胶纯化 IgG:

[0053] (201) 凝胶的预处理:交联葡聚糖凝胶 (sephadex) 商品多为干燥颗粒,使用前必须充分溶胀。方法是,取 sephadex G-100 凝胶缓慢地倾倒入 5 ~ 10 倍体积的去离子水中,加热煮沸进行凝胶溶胀;此法不仅能加快溶胀速率,而且能除去凝胶中污染的细菌,同时排除气泡;

[0054] (202) 装柱:凝胶床总体积与样品的加入量应满足:样品的加入量(体积)应掌握在凝胶床总体积的 5% ~ 10%;

[0055] 层析柱的选择一般根据分离样品的种类和样品的数量而定；纯化蛋白质时，样品的加入量（体积）应掌握在凝胶床总体积的 5%~10%。凝胶层析柱的装填要求：凝胶层析柱要求柱中的填料（凝胶）密度均匀一致，不能有空隙和气泡；通常新装的凝胶柱用适当的缓冲溶液平衡后，将带色的兰葡聚糖-2000、细胞色素带血红蛋白等物质配制成质量浓度为 2g/L 的溶液过柱，观察色带是否均匀下移，以鉴定新装柱的技术质量是否合格，否则，必须重新装填；

[0056] (203) 加样：凝胶床经平衡后，吸去上层液体，待平衡液下降至床表面时，关闭流出口，用滴管加入样品，打开流出口，使样品缓慢渗入凝胶床内，当样品液面恰与凝胶床表面持平时，用洗脱液冲洗管壁；

[0057] 其中，加样量与测定方法和层析柱大小有关。采用 280nm 波长测定吸光度，一根 2cm×60cm 的柱，加样量需 5mg 左右。加样量越少或加样体积越小（样品浓度高），分辨率越高。通常样品的加入量（体积）应掌握在凝胶床总体积的 5%~10%。样品体积过大，分离效果不好。

[0058] (204) 洗脱与收集：连接好凝胶柱层析系统（通常包括层析床、洗脱液储瓶、检测仪、分部收集器及记录仪），调节洗脱液流速为每分钟 1 毫升，进行洗脱，收集洗脱液中与目的峰相应的部分洗脱液作为所需的兔抗 IgY 抗体。

[0059] 对于目的峰的确认，可以先收取各个阶段的峰，然后分别做电泳进行鉴定来选择目的峰。这可由本技术领域人员按常规技术完成。确定目的峰后，可以结合层析谱图得出与目的峰对应的时间段，从而进行收集与目的峰相应的部分洗脱液。

[0060] 在葡聚糖凝胶纯化 IgG 的过程中，一般都以单一缓冲溶液或盐溶液作为洗脱液，有时甚至可用蒸馏水。洗脱时用于流速控制的装置最好的是恒流泵。若无此装置，可用控制操作压的办法进行。洗脱液应与膨胀一致，否则更换溶剂，凝胶体积会发生变化，影响分离效果。洗脱液要有一定的离子强度和 pH 值。分离血清蛋白常用 0.02~0.1Mol/L、pH 6.9~8.0 的 PBS 液 (0.14Mol/L NaCl) 或 0.1Mol/L、pH8.0 Tris-HCl 缓冲盐溶液 (0.14Mol/L NaCl)。

[0061] 其中一个实施例中，上述步骤 (101) 中兔抗 IgY 免疫血清的制备方法，包括以下步骤：

[0062] (111) IgY 制备：取一个鸡蛋并用清水冲洗，用剪刀打开蛋壳一个小孔，让蛋清缓慢流出，然后打开蛋壳，小心将整个卵黄移出；鸡蛋卵黄加入 8 倍体积的灭菌的双蒸水，用浓度为 0.1M 的 HCl 溶液调 PH 为 5.0-5.1，置 4℃ 冰箱搅拌 8h，得卵黄稀释液；冰箱取出卵黄稀释液，以 10000-12000rpm、4℃ 进行离心 15min，收取上清液；于上清液（上清液为水溶性组分液 WSF）中加入使用 0.01mol/L、PH7.4 的 PBS 液配制的浓度为 8% 的 PEG6000 量 (PEG, 英文名全称 polyethylene glycol, 中文名为聚乙二醇)，鸡蛋卵黄 (g)/浓度为 8% 的 PEG6000 量 (ml) = 5，搅拌 30min，以 10000-12000rpm、4℃ 进行离心 10min，收集沉淀，去上清液；将沉淀物溶于浓度为 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液并装入透析袋中，在透析液（浓度为 0.01mol/L、PH 值为 7.4 的 PBS 液）中透析，每毫克沉淀物对应 500 μl 的 PBS 液、500ml 的透析液；透析完成后用 0.22 μm 膜过滤除菌，取蛋白质浓度大于 30mg 蛋白/ml 的产物作为所需的 IgY，置 -20℃ 保存；

[0063] 所得到的产物的蛋白质浓度在紫外分光光度计下测量。

[0064] (112) IgY 免疫原制备：将所制备的 IgY 用 PBS 液进行稀释至蛋白质浓度 30mg 蛋白 /ml, 将 10ml 弗氏完全佐剂置于研钵内, 边研磨边滴加等量所稀释后的 IgY, 直至形成白色油包水乳剂, (滴加于水中完全不散开即为合格), 置 4℃ 保存备用;

[0065] (113) 免疫家兔：选用 2 ~ 2.5kg 健康家兔, 于颈后, 两后肢大腿外侧共四个部位皮下各注射步骤 (112) 所得物 0.5ml, 7 天后再次同样免疫, 21 天后同样部位注射步骤 (111) 所得物 0.5ml, 末次注射后第 7 天试血, 双向琼脂扩散试验效价达 1 : 16 ~ 1 : 32 放血收集血清, 得兔抗 IgY 免疫血清。

[0066] 其中一个实施例中, 弗氏完全佐剂的制备方法如下: 称取羊脂 8F 克, 量取石蜡油 32F 毫升,  $F > 0$ , 置高压灭菌器灭菌后用无菌研钵研磨均匀, 置 4℃ 冰箱过夜, 12h 后仍均匀粘稠无分层, 即为弗氏不完全佐剂; 将其再放入无菌研钵、按一个方向边研磨边加入卡介苗 (以 10ml 弗氏不完全佐剂计, 应加卡介苗 30 ~ 100mg), 磨毕在 4℃ 下置 12h, 如不分层, 即为弗氏完全佐剂。在上述方法中, F 为大于零的比例系数, 表示相应物质的量是可以变化的。在通常的操作中,  $F = 1$ 。

[0067] 实施例二

[0068] 本实施例提供的一种酶标记抗体 (HRP-IgG) 的制备方法, 使用实施例一所制得的兔抗 IgY 抗体制备, 包括如下步骤:

[0069] (31) 于称量瓶中, 将辣根过氧化物酶 5p 毫克溶于 0.3mol/L、pH8.1 的碳酸氢钠溶液 1p 毫升中, 加入 1% 二硝基氟苯无水乙醇溶液 0.1p 毫升, 25℃ 搅拌 1h; 在本方法中, p 为大于零的比例系数, 表示相应物质的量是可以变化的。在通常的操作中,  $p = 1$ 。

[0070] (32) 加入 0.08mol/L 过碘酸钠溶液 1p 毫升, 25℃ 搅拌 30min, 溶液呈黄绿色;

[0071] (33) 加 0.08mol/L 乙二醇溶液 1p 毫升, 25℃ 搅拌 1 小时, 然后将称量瓶中液体装入透析袋中;

[0072] (34) 用 0.01mol/L、pH 9.5 碳酸缓冲液 1000p 毫升, 进行 4℃ 透析 12h, 换液 3 次, 取出透析袋中液体加入称量瓶中;

[0073] (35) 将 5p 毫克的实施例一所得的兔抗 IgY 抗体溶于 0.01mol/L pH 9.5 碳酸缓冲液 1p 毫升中, 然后加入称量瓶中, 室温轻搅 2 ~ 3h, 25℃ 搅拌 2 ~ 3 小时;

[0074] (36) 于称量瓶中, 加入硼氢化钠 ( $\text{NaBH}_4$ ) 5p 毫克, 置 4℃ 放置 3h 以上;

[0075] (37) 称量瓶中, 逐滴加入等量饱和硫酸铵溶液 4℃ 放置 1h, 以 4000rpm 离心 15min, 弃上清液, 沉淀再用 50% 饱和硫酸铵洗 2 次;

[0076] (38) 沉淀溶于 200p 微升的 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液中, 装入透析袋并以 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 液作为透析液充分透析至无  $\text{NH}_4^+$ , 然后取出透析袋中液体, 于 4℃、1000rpm 离心 10min 去沉淀, 取上清液, 得酶标记抗体 (HRP-IgG)。

[0077] 测酶标记抗体的  $\text{OD}_{403}$  及  $\text{OD}_{280}$ , 计算酶标记抗体的酶含量, IgG 含量及克分子比值, 具体如下:

[0078] 1) 酶含量 (mg/ml) =  $\text{OD}_{403} \times 0.4 = 7.403 \times 0.4 = 2.961$

[0079] 2) IgG 含量 (mg/ml) =  $(\text{OD}_{280} - \text{OD}_{403} \times 0.3) \times 0.62 = (20.53 - 28.63 \times 0.3) \times 0.62 = 7.403$

[0080] 3) 克分子比值 = 酶含量  $\times 4 / \text{IgG 含量} = 1.6$

[0081] 本方法所制备的酶标记抗体 HRP-IgG 为多克隆抗体酶标记抗体, 能针对一个抗原

的多个表位进行识别,可以提高检测的灵敏度。

[0082] 实验测试:将制备好的酶标抗体与选取的五种不同品种鸡的卵黄抗体分别进行抗原抗体反应并加入底物显色,有颜色出现说明抗原抗体发生了反应,结果如表一。

[0083] 表一

[0084]

品种	抗原抗体反应
粤禽鸡	+
三黄鸡	+
芦花鸡	+
茶花鸡	+
黑土鸡	+

[0085] 由表一可知,制备好的酶标抗体与选取的五种不同品种鸡的卵黄抗体均发生抗原抗体反应,因此,本发明的酶标记抗体 IgG-HRP 可以适用各种卵黄抗体鉴定,效价检测的通用试剂。本发明能为卵黄抗体检测提供选择,为各种卵黄抗体的应用价值提供依据。

[0086] 因此,本发明还提供一种应用:本发明所制备的酶标记抗体 IgG-HRP 应用于酶联免疫吸附试验 (ELISA)。

专利名称(译)	兔抗IgY抗体的制备方法、酶标记抗体的制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104804086A</a>	公开(公告)日	2015-07-29
申请号	CN201510018553.4	申请日	2015-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	遵义医学院		
申请(专利权)人(译)	遵义医学院		
当前申请(专利权)人(译)	遵义医学院		
[标]发明人	孙万邦 郭锦锦 宋明英 李婷 张莹 旷龙昊		
发明人	孙万邦 郭锦锦 宋明英 李婷 张莹 旷龙昊		
IPC分类号	C07K16/18 C07K1/36 C07K1/34 C07K1/30 G01N33/535		
代理人(译)	杨焕军		
其他公开文献	CN104804086B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种兔抗IgY抗体的制备方法、酶标记抗体的制备方法及应用，兔抗IgY抗体的制备方法包括如下步骤：(1)硫酸铵盐析法粗提取IgG；(2)葡聚糖凝胶纯化IgG。该兔抗IgY抗体的制备方法为酶标记抗体IgG-HRP的制备提供了基础，简单实用，容易推广，酶标记抗体IgG-HRP能针对一个抗原的多个表位进行识别，可以提高检测的灵敏度，因此，酶标记抗体IgG-HRP可以适用各种卵黄抗体鉴定、效价检测的通用试剂。