

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710180051.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月2日

[11] 公开号 CN 101210921A

[22] 申请日 2007.12.24

[21] 申请号 200710180051.7

[71] 申请人 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心

地址 830002 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市  
碱泉一街380号

[72] 发明人 戴翔 王信惠 张渝疆 阿扎提  
阿布利米提

[74] 专利代理机构 乌鲁木齐新科联专利代理事务所  
(有限公司)

代理人 李振中

权利要求书1页 说明书5页

[54] 发明名称

兔抗大沙鼠免疫血清

[57] 摘要

一种兔抗大沙鼠免疫血清，包括：a. 大沙鼠血清 IgG 抗原的制备：采集大沙鼠血液，离心分离大沙鼠血清；将血清中加入饱和硫酸铵溶液，冷藏，再高速离心操作去除血清中的杂物及纤维蛋白；取上清液再补加饱和硫酸铵，冷藏，再进行高速离心弃上清液留取沉淀物，即为大沙鼠血清中的粗提 IgG；经纯化后的大沙鼠 IgG 装入透析袋透析过夜；b. 兔抗大沙鼠 IgG 抗体的制备：选取实验兔；吸取上述大沙鼠 IgG 抗原，沿兔背脊柱两侧行皮下多点注射免疫四次；采集实验兔血液，分离血清进行抗体检测；当抗体滴度达到 1:32 时，对实验兔进行颈动脉采血；静置待血清析出后进行离心操作即可获得兔抗大沙鼠免疫血清。本发明工艺步骤简单，使用方便。

1、一种兔抗大沙鼠免疫血清，其特征在于它是由下列两个工艺步骤制得的：

a、大沙鼠血清 IgG 抗原的制备：（1）采集大沙鼠血液，静置待血清析出后以至少 2000 转/分钟的离心速度用离心机分离获取大沙鼠血清；（2）再以至少 5000 转/分钟的离心速度用离心机去除步骤（1）大沙鼠血清中的颗粒状物；（3）将上述离心后的血清与等量生理盐水混合，逐滴加入饱和硫酸铵溶液至 20% 浓度，滴加时边加边摇，然后将其放置于 4℃ 的冰箱内保持至少 20 分钟，再以至少 8000 转/分钟的离心速度进行离心操作 5-15 分钟，去除血清中的杂物及纤维蛋白；（4）取上清液再补加饱和硫酸铵至 35% 浓度，然后将其放置于 4℃ 的冰箱内保持至少 20 分钟，再以至少 8000 转/分钟的离心速度进行离心操作 5-15 分钟，弃上清液留取沉淀物，即为大沙鼠血清中的粗提 IgG；（5）将所述沉淀物重新用生理盐水溶解，重复（3）和（4）步骤进行进一步纯化；（6）将纯化后的大沙鼠 IgG 用生理盐水溶解后，装入透析袋用 0.01M pH7.2 PBS 进行透析过夜，透析后获得的大沙鼠 IgG 抗原置于 -20℃ 的冰箱内备用；

b、兔抗大沙鼠 IgG 抗体的制备：（1）选取两只各 2.5 公斤左右的健康新西兰实验兔备用；（2）用 1ml 注射器吸取由 a 步骤制得的大沙鼠 IgG 抗原 1ml，沿兔背脊柱两侧行皮下多点注射进行初次免疫；（3）间隔半个月后进行第二次免疫，免疫量及方法同上；（4）然后再每隔 15 天免疫一次，剂量及方法同上，共免疫四次；（5）末次免疫 15 天后，由股静脉采集实验兔血液 1mL，分离血清进行抗体检测，检测方法为免疫环状沉淀试验和红细胞凝集试验；（6）当抗体滴度已达到环状沉淀试验要求的 1: 32 时，则对实验兔进行腹腔加强免疫三天后进行颈动脉采血；（7）采集的血液，静置待血清析出后至少 2000 转/分钟的离心速度进行离心操作即可获得兔抗大沙鼠免疫血清。

2、根据权利要求 1 所述的兔抗大沙鼠免疫血清，其特征在于：将纯化后的大沙鼠 IgG 用生理盐水溶解后，装入透析袋用 0.01M pH7.2 PBS 进行透析过夜，其间至少换液三次以除去 IgG 中的  $\text{NH}_4^+$  及  $\text{SO}_4^-$  离子。

## 兔抗大沙鼠免疫血清

### 技术领域

本发明涉及一种生物制品，特别是兔抗大沙鼠免疫血清。

### 背景技术

自 1877 年 R. 克劳斯发现血清学反应，1899 年 J. 博尔代发现免疫学交叉反应以来，利用这种抗原与抗体的特异性免疫学反应进行疾病的诊断、生物鉴定的技术方法得到广泛的应用和飞速发展，但这一技术方法需要开发研制特异性的抗血清或特异性的抗体，以此作为特异性诊断试剂。同时，这种制剂可作为进行进一步免疫学检测，如酶标记、荧光标记、分子标记等的基础制剂。目前国内和国际多家生物制剂公司开发出了较多的常规科学试验和医学检测用特异性免疫血清，如羊抗人免疫血清、羊抗鼠免疫血清、兔抗人免疫血清、兔抗鼠免疫血清等等。由于免疫学反应是一种种属特异性非常高的特异性反应，因此，上述这些市售的免疫血清制剂均有非常强的针对性，羊抗人或兔抗人的免疫血清主要针对人类感染疾病的研究、诊断等，而羊抗鼠或兔抗鼠的免疫血清则主要用于实验鼠类的疾病感染、模型和生物鉴定等的科学研究和实验室诊断。如果用上述制剂检测和研究其它物种，则会由于种属差异性的原因造成免疫交叉反应和非特异性等问题，引起研究结果和检测结果的偏差，如假阳性或假阴性等。鉴于此，对于大沙鼠感染性疾病的研究就需要专门研制相应的抗血清。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种兔抗大沙鼠免疫血清，用于大沙鼠感染性疾病、病原体和非致病性微生物感染的研究和实验室的特异性检测诊断，使用方便。

本发明的目的是这样实现的：一种兔抗大沙鼠免疫血清，它是由下列两个工艺步骤制得的：a、大沙鼠血清 IgG 抗原的制备：（1）采集大沙鼠血液，静置待血清析出后以至少 2000 转/分钟的离心速度用离心机分离获取大沙鼠血清；（2）再以至少 5000 转/分钟的离心速度用离心机去除步骤（1）大沙鼠血清中的颗粒状物；（3）将上述离心后的血清与等量生理盐水混合，逐滴加入饱和硫酸铵溶液至 20% 浓度，滴加时边加边摇，然后将其放置于 4℃ 的冰箱内保持至少 20 分钟，再以至少 8000 转/分钟的离心速度进行离心操作 5-15 分钟，去除血清中的杂物及纤维蛋白；（4）取上清液再补加饱和硫酸铵至 35% 浓度，然后将其放置于 4℃ 的冰箱内保持至少 20 分钟，再以至少 8000 转/分钟的离心速度进行离心操作 5-15 分钟，弃上清液留取沉淀物，即为大沙鼠血清中的粗提 IgG；（5）将所述沉淀物重新用生理盐水溶解，重复（3）和（4）步骤进行进一步纯化；（6）将纯化后的大沙鼠 IgG 用生理盐水溶解后，装入透析袋用 0.01M pH7.2 PBS 进

行透析过夜，透析后获得的大沙鼠 IgG 抗原置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内备用；b、兔抗大沙鼠 IgG 抗体的制备：（1）选取两只各 2.5 公斤左右的健康新西兰实验兔备用；（2）用 1ml 注射器吸取由 a 步骤制得的大沙鼠 IgG 抗原 1ml，沿兔背脊柱两侧行皮下多点注射进行初次免疫；（3）间隔半个月后进行第二次免疫，免疫量及方法同上；（4）然后再每隔 15 天免疫一次，剂量及方法同上，共免疫四次；（5）末次免疫 15 天后，由股静脉采集实验兔血液 1mL，分离血清进行抗体检测，检测方法为免疫环状沉淀试验和红细胞凝集试验；（6）当抗体滴度已达到环状沉淀试验要求的 1: 32 时，则对实验兔进行腹腔加强免疫三天后进行颈动脉采血；（7）采集的血液，静置待血清析出后至少 2000 转/分钟的离心速度进行离心操作即可获得兔抗大沙鼠免疫血清。

大沙鼠是新疆平原荒漠地区分布最广、数量最多的鼠类之一。不仅对野生植被和农作物具有巨大的破坏性，而且其自身携带和传播的一些动物性疾病的对广大人民群众的生命健康构成巨大威胁，如鼠疫、寄生虫等。本发明兔抗大沙鼠免疫血清将对研究大沙鼠感染性疾病、病原体和致病性微生物起到重要的作用。为制定有效的疾病预防措施提供科学依据。采用本发明工艺步骤制得的兔抗大沙鼠免疫血清可以用于大沙鼠感染性疾病、病原体和致病性微生物感染的研究和实验室的特异性检测诊断，也可用于以大沙鼠为模型的疾病研究，并可作为与其它鼠种的进行特异性生物鉴定和鉴别诊断的免疫血清制剂。同时，本制剂可作为进一步制备酶标记免疫血清、荧光标记免疫血清制剂的基础制剂，广泛用于大沙鼠、相关疾病和生物鉴别的研究和生产活动中。本发明工艺步骤简单，易于制造，使用方便。

#### 具体实施方式

一种兔抗大沙鼠免疫血清，它是由下列两个工艺步骤制得的：

##### a、大沙鼠血清 IgG 抗原的制备：

（1）采集大沙鼠血液，静置待血清析出后以 4000 转/分钟的离心速度用离心机分离获取大沙鼠血清；

（2）再以 6000 转/分钟的离心速度用离心机去除步骤（1）大沙鼠血清中的颗粒状物；

（3）将上述离心后的血清与等量生理盐水混合，逐滴加入饱和硫酸铵溶液至 20%浓度，滴加时边加边摇，然后将其放置于  $4^{\circ}\text{C}$  的冰箱内保持 30 分钟，再以 10000 转/分钟的离心速度进行离心操作 10 分钟，去除血清中的杂物及纤维蛋白；

（4）取上清液再补加饱和硫酸铵至 35%浓度，然后将其放置于  $4^{\circ}\text{C}$  的冰箱内保持 30 分钟，再以 10000 转/分钟的离心速度进行离心操作 10 分钟，弃上清

液留取沉淀物，即为大沙鼠血清中的粗提 IgG；

(5) 将所述沉淀物重新用生理盐水溶解，重复(3)和(4)步骤进行进一步纯化；

(6) 将纯化后的大沙鼠 IgG 用生理盐水溶解后，装入透析袋用 0.01M pH7.2 PBS 进行透析过夜，其间至少换液三次以除去 IgG 中的  $\text{NH}_4^+$  及  $\text{SO}_4^-$  离子；透析后获得的大沙鼠 IgG 抗原置于  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱内备用。

#### b、兔抗大沙鼠 IgG 抗体的制备：

(1) 选取两只各 2.5 公斤的健康新西兰实验兔备用；

(2) 用 1ml 注射器吸取由 a 步骤制得的大沙鼠 IgG 抗原 1ml，沿兔背脊柱两侧行皮下多点注射进行初次免疫；

(3) 间隔半个月后进行第二次免疫，免疫量及方法同上；

(4) 然后再每隔 15 天免疫一次，剂量及方法同上，共免疫四次；

(5) 末次免疫 15 天后，由股静脉采集实验兔血液 1ml 分离血清进行抗体检测，检测方法为免疫环状沉淀试验和红细胞凝集试验；

(6) 若抗体滴度已达到环状沉淀试验要求的 1: 32，则对实验兔进行腹腔加强免疫三天后进行颈动脉采血，若抗体滴度未达到环状沉淀试验要求的 1: 32，则继续按步骤(4)进行免疫直至抗体达到上述标准后再进行颈动脉采血；

(7) 采集的血液，静置待血清析出后以 4000 转/分钟的离心速度进行离心操作获取血清，本血清即为兔抗大沙鼠免疫血清；

(8) 用免疫环状沉淀试验和红细胞凝集试验检测抗体效价，按 20ml/每袋分装，置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱内保存。

#### 抗大沙鼠 IgG 免疫血清检测。

##### 1、环状沉淀试验：

1) 将环状试验管排列到小试管架上并编号；

2) 用移液器将大沙鼠 IgG 抗原置于环状试验管中，每管 0.1ml；

3) 将抗大沙鼠 IgG 免疫血清行 1: 4、1: 8、1: 16、1: 32、1: 64 稀释后，分别吸取各稀释度的抗大沙鼠二抗血清用移液器沿环状试验管壁缓慢加入到相应小试管大沙鼠 IgG 抗原液上，每管 0.1ml；

4) 静放 1 小时后观察结果；

5) 阳性则在两液界面上出现环状沉淀带，阴性则不出现环状沉淀带；

6) 一般情况下，环状沉淀试验免疫效价在 1: 32 或 1: 64 为可使用效价。

##### 2、红细胞凝集试验：

###### 双醛化血球制备：

1) 用大三角烧瓶配制 3.8% 的柠檬酸三钠抗凝液 100ml，至冰箱冷却到  $4^\circ\text{C}$

左右;

2) 用大号采血针颈静脉采集新鲜绵羊血液 150ml 加入到已加好抗凝剂的三角烧瓶中, 其间轻微摇动三角烧瓶以防血液凝固;

3) 用 100ml 大号离心管将上述含绵羊红细胞溶液以 3000 转/分钟的离心速度进行离心操作, 20 分钟后轻轻倒去上清液;

4) 用 0.01M pH7.2 PBS 缓冲液清洗绵羊红细胞 5 遍以去除血液中的蛋白;

5) 用 1%戊二醛和洗净的绵羊血球混匀, 边加戊二醛边摇动血球, 血球戊二醛溶液比例大约为 1: 5 左右, 作用 30 分钟进行初步醛化;

6) 将初步醛化后的绵羊红细胞再用 0.01M pH7.2 PBS 缓冲液洗绵羊红细胞 3 遍;

7) 将洗净的绵羊红细胞用 0.01M pH7.2 PBS 缓冲液配成 10%绵羊红细胞溶液与甲醛溶液混匀, 甲醛溶液与绵羊红细胞溶液混合比例约为 1: 5 左右, 混合液在摇床上摇动过液;

8) 将甲醛处理过的绵羊红细胞再用 0.01M pH7.2 PBS 缓冲液洗血球 5 遍;  
单宁酸处理双醛化血球:

1) 将双醛化处理的血球用 0.01M pH6.4 PBS 配成 10%浓度与 1/2 万单宁酸溶液等量混合, 室温作用 30 分钟后用 0.01M pH5.0 PBS 洗血球 3 遍;

大沙鼠 IgG 抗原致敏血球的制备:

1. 1 大沙鼠 IgG 抗原致敏浓度的选择:

1. 1. 1 将中号试管排在试管架上并编号, 用 0.01M pH5.0 PBS 将大沙鼠 IgG 抗原稀释成 1: 10、1: 20、1: 40、1: 80、1: 160、1: 320 等不同稀释度, 将经单宁酸处理的双醛化血球加入上述各管中, 绵羊红细胞终浓度为 5%, 摇床上摇动过液使大沙鼠 IgG 抗原致敏到绵羊红细胞上;

1. 1. 2 次日将上述不同稀释度大沙鼠 IgG 抗原致敏的绵羊血球, 以 4000 转/分钟的离心速度进行离心操作后弃上清液;

1. 1. 3 各浓度致敏的绵羊红细胞血球用 10%兔血清盐水饱和 30 分钟以减少血球非特异性凝集;

1. 1. 4 用 1%兔血清盐水将上述各浓度致敏的绵羊红细胞血球洗 5 遍以去除绵羊血球上多余的兔蛋白;

1. 2 将不同浓度致敏的血球配成 1%血球用于兔抗大沙鼠免疫血清的检测, 选择凝集相好、敏感性高的为兔抗大沙鼠免疫血清检测的使用浓度。

结果:

兔抗大沙鼠免疫血清环状沉淀试验效价 1: 32, 血凝效价 1: 8192。

兔抗大沙鼠免疫血清的用途:

1. 建立 ELISA 检测大沙鼠鼠疫 F1 抗体的方法:

1. 1 用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释兔抗大沙鼠免疫血清包被酶标板;
1. 2 加入大沙鼠被检血清;
1. 3 37℃温箱反应 1 小时;
1. 4 冲洗反应板后, 加 HRP-F1(鼠疫 F1 抗原酶标记物), 37℃温箱反应 1 小时;
1. 5 冲洗反应板后, 加显色液;
1. 6 出现颜色者为阳性, 反之则为阴性。

本发明兔抗大沙鼠免疫血清为国内外免疫学生物制剂的新品种。其发明工艺中采用的大沙鼠血清 IgG 抗原为本发明的特有产品, 并在生产工艺中采用了双醛化方法处理血球技术, 增加了试剂的稳定性, 检测结果凝集相好且敏感性高, 便于结果观察, 也弥补了一般检测试剂特异性高, 敏感性差的不足。

专利名称(译)	兔抗大沙鼠免疫血清		
公开(公告)号	<a href="#">CN101210921A</a>	公开(公告)日	2008-07-02
申请号	CN200710180051.7	申请日	2007-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
[标]发明人	戴翔 王信惠 张渝疆 阿扎提 阿布林米提		
发明人	戴翔 王信惠 张渝疆 阿扎提 阿布林米提		
IPC分类号	G01N33/531 A61K39/395 A61P31/00		
代理人(译)	李振中		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种兔抗大沙鼠免疫血清，包括：a.大沙鼠血清IgG抗原的制备：采集大沙鼠血液，离心分离大沙鼠血清；将血清中加入饱和硫酸铵溶液，冷藏，再高速离心操作去除血清中的杂物及纤维蛋白；取上清液再补加饱和硫酸铵，冷藏，再进行高速离心弃上清液留取沉淀物，即为大沙鼠血清中的粗提IgG；经纯化后的大沙鼠IgG装入透析袋透析过夜；b.兔抗大沙鼠IgG抗体的制备：选取实验兔；吸取上述大沙鼠IgG抗原，沿兔背脊柱两侧行皮下多点注射免疫四次；采集实验兔血液，分离血清进行抗体检测；当抗体滴度达到1:32时，对实验兔进行颈动脉采血；静置待血清析出后进行离心操作即可获得兔抗大沙鼠免疫血清。本发明工艺步骤简单，使用方便。