



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1955736 B

(45) 授权公告日 2011.09.14

(21) 申请号 200510096257.2

JP 3-78655 A, 1991.04.03, 1-4.

(22) 申请日 2005.10.28

审查员 边昕

(73) 专利权人 陕西北美基因股份有限公司

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号
西北大学 386 信箱

(72) 发明人 但宁 王童文 王丽莉

(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.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1465977 A, 2004.01.07, 1-4.

CN 1428353 A, 2003.07.09, 1-4.

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种鉴别性抗血清 / 抗体制剂及其制备方法和用途

(57) 摘要

一种鉴别性抗血清 / 抗体制剂, 其用某种来源的血红蛋白, 免疫刺激人或不同种类动物后产生的抗血清, 经与多种动物血红蛋白的抗原抗体结合反应测试后, 筛选出; 利用特异性抗原抗体反应, 在已测试的多种动物血红蛋白范围内, 仅可鉴别刺激其产生的血红蛋白, 或 / 和可鉴别其它不同动物种类的血红蛋白。本发明解决了背景技术中敏感性差, 检测通量小, 费时, 不能判定、鉴别不同来源的血红蛋白的技术问题。本发明特异性强, 可直接确定被检血红蛋白的来源。检测的灵敏度高, 可达 $\mu\text{g/ml}$ 以下级别。所获抗体可直接用于各种灵活多样、高通量免疫检测方法或系统。

1. 一种制备鉴别性抗血清 / 抗体制剂的方法, 其特征在于, 该方法包括以下步骤:

1) 制备抗血清: 分别取多种不同来源的具有单一抗体的动物的血清, 制备抗血清, 分装后 -80°C 至 -20°C 储藏;

该抗血清可以通过用某一不同来源的血红蛋白在佐剂条件下, 对动物进行免疫注射, 待动物血液中血清的抗体滴度不再明显增高时, 取得待用的抗血清;

2) 鉴别性抗血清的筛选: 用聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印记法, 筛选出仅可与一种、二种或多种来源血红蛋白结合的抗血清, 得相应蛋白的鉴别性抗血清; 该鉴别性抗血清的筛选具体包括以下步骤

2. 1) 将不同来源的血红蛋白样品, 用 10-15% 的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 将电泳分离后的蛋白转印于醋酸纤维膜或其它转印膜上;

2. 2) 用 Western 免疫印记法测定抗血清与转印膜上转印的不同来源的血红蛋白的特异性抗原抗体结合反应; 根据测定抗血清对所测不同来源血红蛋白结合的专一性程度, 选择出仅可与一种来源血红蛋白结合的抗血清, 得到该蛋白的鉴别性抗血清。

2. 根据权利要求 1 所述的制备鉴别性抗血清 / 抗体制剂的方法, 其特征在于: 所述的制备抗血清所需材料包括

(1) 抗原: 人血红蛋白、动物血红蛋白、各种血红蛋白衍生物或基因工程表达重组血红蛋白;

(2) 初次免疫注射制剂的制备: 将血红蛋白作抗原与免疫佐剂等体积混合, 得初次免疫注射制剂;

(3) 强化免疫注射制剂的制备: 将血红蛋白作抗原与免疫佐剂等体积混合, 得强化免疫注射制剂;

3. 根据权利要求 2 所述的制备鉴别性抗血清 / 抗体制剂的方法, 其特征在于: 所述的免疫佐剂是弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂。

一种鉴别性抗血清 / 抗体制剂及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可鉴别样品中不同动物来源血红蛋白的抗血清 / 抗体制剂, 该类鉴别性抗血清 / 抗体制剂的制备方法, 及通过特异的抗原抗体结合反应的方法得到具有特异性鉴别性的抗血清抗体 / 抗体制剂。用该鉴别性抗血清 / 抗体制剂鉴别或定性定量测定生物样品中的特定动物种类血红蛋白, 用于高灵敏度、快速、大通量的各种免疫检测。具体涉及一种鉴别性抗血清 / 抗体制剂及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 血红蛋白, 是一种保守性很强的蛋白质。各种动物的血红蛋白的氨基酸序列的相同性非常高, 例如: 牛血红蛋白和猪血红蛋白的 α , β 亚基均与人的十分相似, 其氨基酸序列的相同性达 86% 以上, 相似性为 97% 以上。

[0003] 近年来, 血红蛋白类氧载体产品的开发和临床使用, 使该类制品有可能成为体育竞赛中增强组织供氧能力的运动性兴奋剂。在进行这类兴奋剂的检测时, 必须能够鉴别动物源性血红蛋白和人原血红蛋白。目前, 这类兴奋剂在人类中应用的检测方法主要有凝胶过滤法和聚丙烯酰胺凝胶电泳法两种。

[0004] 凝胶过滤法: 是根据常见血红蛋白类氧载体的分子量大小及分布的特点, 来测定血清中这类兴奋剂分子的存在与否。其主要缺点如下:

[0005] ①敏感性差: 体液中血红蛋白的血清含量必须在 2mg/ml 以上, 才能够检出。

[0006] ②检测耗费时间长: 兴奋剂制品的血浆半衰期一般在 20 小时之内, 注射 48 小时后, 用凝胶过滤法将检测不出。

[0007] ③检测通量小, 无法实际应用。

[0008] 聚丙烯酰胺凝胶电泳法的主要缺点是: 样品制备繁琐, 灵敏度低, 一般在 1mg/ml 以上级别才能检出, 测定方法费时, 通量测定能力也较小。

[0009] 上述两种方法的缺点还在于其不能判定、鉴别不同来源的血红蛋白。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供一种鉴别性抗血清 / 抗体制剂及其制备方法和用途, 其解决了背景技术中敏感性差, 检测通量小, 费时, 不能判定、鉴别不同来源的血红蛋白的技术问题。

[0011] 本发明的技术解决方案是:

[0012] 一种鉴别性抗血清 / 抗体制剂, 其特殊之处在于: 它是

[0013] 1) 用某种来源的血红蛋白, 免疫刺激人或不同种类动物后产生的抗血清, 经与多种动物血红蛋白的抗原抗体结合反应测试后, 筛选出;

[0014] 2) 利用特异性抗原抗体反应, 在已测试的多种动物血红蛋白范围内, 仅可鉴别刺激其产生的血红蛋白, 或 / 和可鉴别其它不同动物种类的血红蛋白; 的鉴别性抗血清 / 抗体制剂。

[0015] 一种制备上述鉴别性抗血清 / 抗体制剂的方法,其特殊之处在于:该方法包括以下步骤

[0016] 1) 制备抗血清:用某一不同来源的血红蛋白在佐剂条件下,对动物进行免疫注射,待动物血液中血清的抗体滴度不再明显增高时,制备血清,分装后 -80°C 至 -20°C 储藏;

[0017] 2) 鉴别性抗血清的筛选:用聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印记法,筛选出仅可与一种、二种或多种来源血红蛋白结合的抗血清,得相应蛋白的鉴别性抗血清。

[0018] 上述制备抗血清的方法具体包括以下步骤

[0019] (1) 抗原:人血红蛋白、动物血红蛋白、各种血红蛋白衍生物或基因工程表达重组血红蛋白;

[0020] (2) 免疫动物:人或动物;

[0021] (3) 初次免疫注射制剂的制备:将血红蛋白作抗原与免疫佐剂等体积混合,得初次免疫注射制剂;

[0022] (4) 强化免疫注射制剂的制备:将血红蛋白作抗原与免疫佐剂等体积混合,得强化免疫注射制剂;

[0023] (5) 免疫注射:

[0024] ①初次免疫注射:经非静脉途径向动物体内注入初次免疫注射制剂。抗原注射量因免疫对象不同而异;

[0025] ②强化免疫注射:初次免疫注射后,每隔一至四周,强化免疫注射一次,注射途径、注射量与初次免疫相同;

[0026] (6) 制备抗血清:每次强化免疫注射后的 10-14 天,待动物血液中血清的抗体滴度不再明显增高时,收集血液,制备血清,分装后 -80°C 至 -20°C 储藏。

[0027] 上述用聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印记法筛选的方法包括以下步骤

[0028] (1) 将不同来源的血红蛋白样品,用 10-15% 的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,将电泳分离后的蛋白转印于醋酸纤维膜或其它转印膜上;

[0029] (2) 用 Western 免疫印记法测定抗血清与转印膜上转印的不同来源的血红蛋白的特异性抗原抗体结合反应;测定抗血清对所测不同来源血红蛋白结合的专一性程度,选择出仅可与一种来源血红蛋白结合的抗血清,得此蛋白的鉴别性抗血清。

[0030] 上述免疫佐剂可采用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂等。

[0031] 一种如上所述的鉴别性抗血清 / 抗体制剂,用于鉴定在已测定的不同动物血红蛋白中特定来源血红蛋白;或用于检测在已经测定的不同动物血红蛋白中不同来源血红蛋白的交叉反应。

[0032] 本发明具有以下优点:

[0033] 1. 本发明利用不同动物对结构非常相似的保守性很强的异源性蛋白产生的抗体,包括多克隆和单克隆抗体,可区别不同动物来源血红蛋白结构上细微的差异的特点,鉴别不同动物来源的血红蛋白。

[0034] 2. 本发明的特异性鉴别性抗血清样品制备筛选方法简单。

[0035] 3. 特异性强,可直接确定被检血红蛋白的来源。

[0036] 4. 检测的灵敏度高,可达 $\mu\text{g/ml}$ 以下级别。

[0037] 5. 所获抗体可直接用于各种灵活多样、高通量免疫检测方法或系统。

具体实施方式

[0038] 本发明通过不同动物对结构非常相似的异源性保守性很强的蛋白产生的抗体,包括多克隆和单克隆抗体,来鉴别不同来源的相应蛋白。首先制备出可鉴别生物样品中不同种类异源性血红蛋白的抗血清抗体;然后通过特异的抗原抗体结合反应的方法,用这些抗血清抗体鉴别生物样品中的异源性血红蛋白,得到具有特异性鉴别性的抗血清,用于高灵敏度、快速、大通量的各种免疫检测。

[0039] 例如:血红蛋白是一种动物世界中少有的、保守性很强的蛋白,但是不同动物之间的血红蛋白也存在着非常细微的氨基酸序列或空间微结构的变化。用某种来源的血红蛋白刺激某种动物,产生的抗体可能对其它动物来源的血红蛋白不发生抗原抗体结合反应,而对另一种动物来源的血红蛋白就可能发生特异性结合反应。利用这种抗血清对不同来源的血红蛋白的选择性反应,可对不同来源的血红蛋白进行来源确定、鉴别或定性定量测定。

[0040] 本发明鉴别性抗血清/抗体制剂的制备:

[0041] 1. 制备抗血清:用某一不同来源的血红蛋白在佐剂条件下,刺激不同种类的动物,使动物产生抗体滴度尽可能高的抗血清。

[0042] 1) 抗原:人血红蛋白、动物血红蛋白、各种血红蛋白衍生物及基因工程表达重组血红蛋白。例如:表面化学修饰产物和血红蛋白聚合体等。表面化学修饰产物,如:聚乙二醇修饰血红蛋白等。

[0043] 2) 动物:人或任何动物种类。

[0044] 3) 免疫佐剂:可采用任何免疫佐剂,如:弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂等。

[0045] 4) 初次免疫注射制剂的制备:将血红蛋白作抗原与佐剂等体积混合,得初次免疫注射制剂。

[0046] 5) 强化免疫注射制剂的制备:将血红蛋白作抗原与佐剂等体积混合,得强化免疫注射制剂。

[0047] 6) 免疫注射:

[0048] (1) 初次免疫注射:经非静脉途径向动物体内注入初次免疫注射制剂。抗原注射量因免疫对象不同而异。

[0049] (2) 强化免疫注射:初次免疫注射后,每隔一至四周,强化免疫注射一次,注射途径、注射量与初次免疫相同。

[0050] 7) 制备抗血清:每次强化免疫注射后的 10-14 天,待动物血液中血清的抗体滴度不再明显增高时,收集血液,制备血清,分装后 -80°C 至 -20°C 储藏。

[0051] 2. 鉴别性抗血清的筛选:

[0052] 筛选具有鉴别性的抗血清的方法有多种,例如:可用 Western 免疫印记法。操作步骤如下:

[0053] 1) 将不同来源的血红蛋白样品,用 10-15% 的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,将电泳分离后的蛋白转印于醋酸纤维膜或其它转印膜上。

[0054] 2) 用 Western 免疫印记法测定抗血清与转印膜上转印的不同来源的血红蛋白的特异性抗原抗体结合反应。测定抗血清对所测不同来源血红蛋白结合的专一性程度,选择出仅可与一种来源血红蛋白结合的抗血清,得此蛋白的鉴别性抗血清。

[0055] 制备鉴别性抗血清 / 抗体制剂的实施例：

[0056] 1. 制备抗血清：

[0057] 1) 抗原：人血红蛋白、猪血红蛋白、牛血红蛋白。

[0058] 2) 动物：2kg 左右新西兰兔、200g 左右 SD 大鼠和 20g 左右 BABL/c 小鼠，雌雄均可。

[0059] 3) 免疫佐剂：弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂。

[0060] 4) 初次免疫注射制剂的制备：将人血红蛋白、猪血红蛋白或牛血红蛋白溶液与弗氏完全佐剂等体积混合，并立即使用。

[0061] 5) 强化免疫注射制剂的制备：将相应单一抗原与弗氏不完全佐剂等体积混合，并立即使用。

[0062] 6) 免疫注射：

[0063] (1) 初次免疫注射：经皮下或腹腔向动物体内注入相应剂量的初次免疫注射制剂。抗原量注射量：约 500 μ g 蛋白 / 兔，约 200 μ g 蛋白 / 大鼠，约 20 μ g 蛋白 / 小鼠。

[0064] (2) 强化免疫注射：初次免疫注射后，每隔三周，用强化免疫注射制剂对动物进行强化免疫注射，注射途径、注射量与初次免疫相同。

[0065] 7) 制备抗血清：在每次强化免疫注射后的 12 天左右，收集动物血液，制备血清。检测血清中的抗体滴度。当血清中抗体滴度不再明显增高时，在保持动物生存的条件下收集尽可能多的血液，制备血清，得到抗血清，并分装储存于 -20℃ 冰箱。

[0066] 2. 鉴别性抗血清的筛选：

[0067] 筛选具有鉴别性的抗血清的方法有多种，例如：可用 Western 免疫印记法。操作步骤如下：

[0068] 1) 将不同来源的血红蛋白样品，如人、牛、猪等的血红蛋白，用 12% 的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离，将电泳分离后的蛋白转印于醋酸纤维膜或其它转印膜上。

[0069] 2) 用 Western 免疫印记法测定抗血清与转印膜上转印的不同来源的血红蛋白的特异性抗原抗体结合反应。测定抗血清对所测不同来源血红蛋白结合的专一性程度，选择出仅可与一种来源血红蛋白结合的抗血清，得到此蛋白的鉴别性抗血清。实验结果如下：

[0070]

抗血清种类	猪血红蛋白	牛血红蛋白	人血红蛋白
兔抗猪血红蛋白	6+	1+	-
小鼠抗猪血红蛋白	6+	-	-
大鼠抗猪血红蛋白	6+	-	-
兔抗牛血红蛋白	-	6+	-
小鼠抗牛血红蛋白	-	6+	-
大鼠抗牛血红蛋白	1+	6+	5+
兔抗人血红蛋白	-	-	6+
小鼠抗人血红蛋白	-	1+	6+
大鼠抗人血红蛋白	-	1+	6+

[0071] 上述实验结果表明：某种来源的血红蛋白在特定的实验动物中所引发生成的抗血清可以用免疫学方法特异性鉴别不同来源的血红蛋白。例如：小鼠抗猪血红蛋白血清可特

异性的与猪血红蛋白产生结合反应,但不与牛血红蛋白、人血红蛋白和人血清蛋白产生反应。所以,此血清可以用来在人、牛、猪血红蛋白中猪血红蛋白的鉴别性抗血清/抗体制剂。相反,大鼠抗牛血红蛋白抗血清与牛、猪、人血红蛋白均可结合。所以,此血清不可以用于鉴别此三种来源血红蛋白。

[0072] 因此,本发明的鉴别性抗血清/抗体制剂可用于鉴定在已经测定的不同动物血红蛋白中特定来源血红蛋白。鉴别性抗血清/抗体制剂可用于检测在已经测定的不同动物血红蛋白中不同来源血红蛋白的交叉反应

[0073] 本发明制备的鉴别性抗血清/抗体制剂,可以用各种方法进行各种动物来源血红蛋白的鉴定和定量性测定。所可用的方法可以是,但不局限于,Western免疫转印法、直接或间接免疫荧光测定法、直接或间接蛋白质芯片免疫测定法。可以用于同时检测所用设备设计可达到的任何大量的生物样品。其灵敏度适检测方法而异,可达到,但不限于, ng/ml ~ mg/ml 血红蛋白的检测范围。此类鉴别性抗血清/抗体制剂还可用于检测不同生物样品中,如,组织器官匀浆样品、各种体液样品等异源血红蛋白的定性定量测定。可作为血红蛋白类制剂药代动物学研究的定量定性的测定工具。也可用于血红蛋白类氧载体运动兴奋剂的检测。

专利名称(译)	一种鉴别性抗血清/抗体制剂及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN1955736B	公开(公告)日	2011-09-14
申请号	CN200510096257.2	申请日	2005-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	陕西西大北美基因股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西西大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	但宁 王童文 王丽莉		
发明人	但宁 王童文 王丽莉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	徐平		
其他公开文献	CN1955736A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种鉴别性抗血清/抗体制剂，其用某种来源的血红蛋白，免疫刺激人或不同种类动物后产生的抗血清，经与多种动物血红蛋白的抗原抗体结合反应测试后，筛选出；利用特异性抗原抗体反应，在已测试的多种动物血红蛋白范围内，仅可鉴别刺激其产生的血红蛋白，或/和可鉴别其它不同动物种类的血红蛋白。本发明解决了背景技术中敏感性差，检测通量小，费时，不能判定、鉴别不同来源的血红蛋白的技术问题。本发明特异性强，可直接确定被检血红蛋白的来源。检测的灵敏度高，可达 $\mu\text{g/ml}$ 以下级别。所获抗体可直接用于各种灵活多样、高通量免疫检测方法或系统。

抗血清种类	猪血红蛋白	牛血红蛋白	人血红蛋白
兔抗猪血红蛋白	6+	1+	-
小鼠抗猪血红蛋白	6+	-	-
大鼠抗猪血红蛋白	6+	-	-
兔抗牛血红蛋白	-	6+	-
小鼠抗牛血红蛋白	-	6+	-
大鼠抗牛血红蛋白	1+	6+	5+
兔抗人血红蛋白	-	-	6+
小鼠抗人血红蛋白	-	1+	6+
大鼠抗人血红蛋白	-	1+	6+

上述实验结果表明：某种来源的血红蛋白在特定的实验动物中所引发生成的抗血