



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104977401 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 14

(21) 申请号 201410553626. 5

(22) 申请日 2014. 10. 17

(66) 本国优先权数据

201410128592. 5 2014. 04. 01 CN

(71) 申请人 苏州浩欧博生物医药有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号

(72) 发明人 王洪 李庆春 孙婵 夏波 秦枫
钱林 王秀伟

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 孙仿卫 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/537(2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

一种过敏原阳性血清的纯化制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种过敏原阳性血清的纯化制备方法,包括用过敏原对健康动物进行免疫、采血后获得的抗血清的步骤和对所述的抗血清进行纯化获得阳性血清的步骤,所述的纯化的具体方法为:对所述的抗血清进行亲和纯化得到 IgG 抗体;将所述的 IgG 抗体和人 IgEFc 按质量比为 1:1~2 偶联后,经分离纯化获得 IgG-IgEFc 连接物浓溶液,将所述的 IgG-IgEFc 连接物浓溶液稀释至浓度为 0.5~1 μg/ml,即得所述的阳性血清。本发明方法可批量制备各种过敏原的阳性血清及其他各种阳性血清的纯化制备,解决了检测试剂盒制备过程中的阳性质控问题,也可以作为校准品的生产原料,并且本制备方法简单易行。

1. 一种过敏原阳性血清的纯化制备方法,包括用过敏原对健康动物进行免疫、采血后获得抗血清的步骤和对所述的抗血清进行纯化获得阳性血清的步骤,其特征在于:所述的纯化的具体方法为:

对所述的抗血清进行亲和纯化得到 IgG 抗体;将所述的 IgG 抗体和人 IgE Fc 按质量比为 1:1 ~ 2 偶联后,经分离纯化获得 IgG-IgE Fc 连接物浓溶液,将所述的 IgG-IgE Fc 连接物浓溶液稀释至浓度为 0.5 ~ 1 μ g/ml,即得所述的阳性血清。

2. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:采用琼脂糖亲和介质或者采用免疫亲和层析柱进行所述的亲和纯化。

3. 根据权利要求 2 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:所述的琼脂糖亲和介质为 Protein-A sepharose CL-4B。

4. 根据权利要求 2 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:所述的免疫亲和层析柱为所述的过敏原与琼脂糖凝胶连接成的亲和层析柱。

5. 根据权利要求 2 或 4 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:所述的抗血清先经过硫酸铵处理后,再采用所述的免疫亲和层析柱进行所述的亲和纯化。

6. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:所述的人 IgE Fc 是将人源 IgE 溶解木瓜蛋白酶消化液中,再用木瓜蛋白酶消化,再用碘乙酰胺终止消化反应后,用琼脂糖亲和介质提取获得的。

7. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:所述的 IgG 抗体和所述的人 IgE Fc 通过 2-亚胺四氢噻吩偶联剂或 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯偶联剂活化后,在 pH 7.2 ~ 7.4 的条件下进行所述的偶联。

8. 根据权利要求 7 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:所述的 2-亚胺四氢噻吩偶联剂的浓度为 9 ~ 11 mg/ml,所述的 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯偶联剂的浓度为 4 ~ 6 mg/ml。

9. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:采用 Sephadex 200 凝胶纯化柱进行所述的分离纯化。

10. 根据权利要求 1 所述的过敏原阳性血清的纯化制备方法,其特征在于:采用含质量比为 0.4 ~ 0.6% 的牛血清白蛋白、pH 7.5 ~ 8.5、0.09 ~ 0.11mol/L 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液将所述的 IgG-IgE Fc 连接物浓溶液进行所述的稀释。

一种过敏原阳性血清的纯化制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断技术领域,具体涉及一种过敏原阳性血清的纯化制备方法。

背景技术

[0002] 过敏是一种机体的变态反应,是人对正常物质(过敏原)的一种不正常的反应,当过敏原接触到过敏体质的人群才会发生过敏,过敏原有花粉、粉尘、异体蛋白、化学物质、紫外线等几百种。在过敏反应的发生过程中,过敏介质起着直接的作用,过敏原是过敏病症发生的外因,而机体免疫能力低下,大量自由基对肥大细胞和嗜碱粒细胞的氧化破坏是过敏发生的内因。一般来讲,当过敏原第一次进入机体时,与肥大细胞或者是嗜碱性粒细胞结合,产生白三烯,前列腺素等等的过敏因子,但并不会立即产生过敏,此特性有些将维持2~3天,有的数月。当机体第二次接受这种过敏原时,肥大细胞才会变形,产生过敏因子,也就产生了一系列的过敏现象。

[0003] 过敏可以是体液(抗体)或者是细胞免疫机制介导的。在大多数情况下,可产生过敏反应的抗体属于IgE类,这些个体可以归类于患有IgE介导的过敏反应。然而,并非所有的特异反应性个体都会发生与IgE相关的过敏反应;在非IgE介导的过敏反应中,抗体也可以属于IgG类,例如:包含右旋糖苷的免疫复合物导致的过敏性休克和现在罕见的血清病,它们以前被归于III型过敏反应。在患有过敏性支气管肺曲霉菌病(ABPA)病人中,IgE和IgG抗体都可以被检出。接触性过敏性皮炎是以淋巴细胞为介导的过敏性疾病的代表。IgE检测仍是公认的过敏检测的主流产品,由于点刺注册问题和体外检测技术的提高,体外检测今后将是过敏检测主流趋势;但是目前IgE检测学术进展迟缓,基本没有新的发展,因此提高检测质量和降低检测成本是主要开发方向。

[0004] 但是,由于过敏诊断试剂的发展缓慢以及前期人们的重视度有限,除了部分过敏原可以购买到商业血清,大部分过敏原的阳性血清还是很难查询到的,临床收集少量可行,大量或者高浓度的血清基本不能收集到,甚至于很多项目很少有合适的阳性血清(如:牛肉、羊肉)。

[0005] 如公布号为CN103018436A,公布日为2013-4-3的一种用家兔制备鸡传染性支气管炎阳性血清的方法,其在经过免疫取血后,仅将血液分离出血清,对血清进行离心过滤就得到阳性血清。但是,该阳性血清存在使用效果不好的问题。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种使用效果优良的过敏原阳性血清的纯化制备方法。

[0007] 为解决以上技术问题,本发明采取如下技术方案:

[0008] 一种过敏原阳性血清的纯化制备方法,包括用过敏原对健康动物进行免疫、采血后获得抗血清的步骤和对所述的抗血清进行纯化获得阳性血清的步骤,所述的纯化的具体方法为:

[0009] 对所述的抗血清进行亲和纯化得到 IgG 抗体；将所述的 IgG 抗体和人 IgE Fc 按质量比为 1:1 ~ 2 偶联后，经分离纯化获得 IgG-IgE Fc 连接物浓溶液，将所述的 IgG-IgE Fc 连接物浓溶液稀释至浓度为 0.5 ~ 1 μ g/ml，即得所述的阳性血清。

[0010] 优选地，采用琼脂糖亲和介质或者采用免疫亲和层析柱进行所述的亲和纯化。

[0011] 进一步优选地，所述的琼脂糖亲和介质为 Protein-A sepharose CL-4B。

[0012] 进一步优选地，所述的免疫亲和层析柱为所述的过敏原与琼脂糖凝胶连接成的亲和层析柱。

[0013] 进一步优选地，所述的抗血清先经过硫酸铵处理后，再采用所述的免疫亲和层析柱进行所述的亲和纯化。

[0014] 优选地，所述的人 IgE Fc 是将人源 IgE 溶解木瓜蛋白酶消化液中，再用木瓜蛋白酶消化，再用碘乙酰胺终止消化反应后，用琼脂糖亲和介质提取获得的。

[0015] 优选地，所述的 IgG 抗体和所述的人 IgE Fc 通过 2-亚胺四氢噻吩偶联剂或 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯偶联剂活化后，在 pH 7.2 ~ 7.4 的条件下进行所述的偶联。

[0016] 进一步优选地，所述的 2-亚胺四氢噻吩偶联剂的浓度为 9 ~ 11mg/ml，所述的 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯偶联剂的浓度为 4 ~ 6mg/ml。

[0017] 优选地，采用 Sephadex 200 凝胶纯化柱进行所述的分离纯化。

[0018] 优选地，采用含质量比为 0.4 ~ 0.6% 的牛血清白蛋白、pH 7.5 ~ 8.5、0.09 ~ 0.11mol/L 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液将所述的 IgG-IgE Fc 连接物浓溶液进行所述的稀释。

[0019] 由于以上技术方案的实施，本发明与现有技术相比具有如下优点：

[0020] 我们可以根据市场需要来有计划的生产（从几毫升到几千毫升），并且可以有效地控制批间差异。这是目前流行的阳性血清的制备方法无法做到的。另外，我们用 IgE Fc 与抗血清中的 IgG 连接，相比于用 IgE 与 IgG 连接的阳性血清的分子量小，这样就可以尽量避免交叉反应的发生，提高特异性的同时，在阳性血清上有效的保留了二抗的结合位点。

[0021] 本发明方法可批量制备各种过敏原的阳性血清，解决了检测试剂盒制备过程中的阳性质控问题，也可以作为校准品的生产原料，并且本制备方法简单易行。

附图说明

[0022] 附图 1 为兔抗柳树 IgG-IgE 分离纯化图。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明，但本发明并不限于以下实施例。实施例中采用的实施条件可以根据具体使用的不同要求做进一步调整，未注明的实施条件为本行业中的常规条件。

[0024] 实施例 1

[0025] （一）过敏原的免疫和兔抗血清效价测定

[0026] 材料与仪器

[0027] 1、过敏原：过敏原冻干粉，过敏原为牛肉；

[0028] 2、佐剂：弗氏完全佐剂，购自 sigma 公司，货号 (F5881)；弗氏不完全佐剂，购自 sigma 公司，货号 (F5506)；

[0029] 3、动物：选 3 只（每种过敏原免疫 3 只兔子）2 月龄、体重 1.5 ~ 2.0kg 的健康新西兰大白兔；

[0030] 4、二抗：HRP 标记的羊抗兔 IgG；

[0031] 5、耗材：三通器、一次性注射器、移液器等。

[0032] 免疫步骤

[0033] 1、免疫过敏原准备：用 BCA 蛋白质测定法来确定冻干粉溶解后过敏原的浓度，取 4mg 过敏原，并用 PBS 将其稀释至 600 μ L，用三通器将过敏原与完全佐剂或不完全佐剂（过敏原 V：佐剂 V = 6:5）乳化，直至将一滴乳液滴入水中呈现球形而不分散则过敏原准备好。首次免疫用弗氏完全佐剂，后续免疫均用弗氏不完全佐剂。

[0034] 2、动物免疫：将购买的 3 只新西兰大白兔在动物房养殖 1 周，使动物适应环境；将制备好的乳液，用 1ml 注射器进行颈部或背部皮下免疫注射，每只新西兰大白兔注射 3 点，每点注射 300 μ L；免疫周期为 14 天。

[0035] 3、抗血清的制备：每只动物免疫前先于一侧耳缘静脉抽取 2mL 血（作为空白对照），之后每次免疫 14 天，下次免疫前进行耳缘静脉取血用于抗血清评价；取血后取下针头，将注射器中的血缓缓转移至离心管中，于 4℃ 冰箱中过夜，取上清即为血清，析出淡黄色抗血清；将抗血清转移至另一管中，血凝块以 1500xg 离心 10min。吸出上清液合并收集到的抗血清管中；抗血清分装保存于 -70℃。

[0036] 4、抗血清效价的测定：采用酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay ;ELISA)，用包被缓冲液将过敏原（牛肉）稀释至 10 μ g/ml，除阴性孔外每孔加 100 μ L 即 1 μ g，4℃ 包被过夜；阴性对照 1 包被 1 μ g 羊肉过敏原，4℃ 包被过夜；阴性对照 2 包被 1 μ g 花生过敏原，4℃ 包被过夜；空白对照 1 为动物免疫开始前的血清；空白对照 2 为不含一抗抗体的一抗孵育封闭液；空白对照 3 为 HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育封闭液；其余孔为按 1:100、1:200 倍比稀释的抗血清，进行效价测定。每次效价测定时平行进行上次收集抗血清的效价测定，免疫前后抗血清效价相近时，则可以终止免疫杀兔取血，如果效价还有明显提高则继续免疫。

[0037] 以牛肉免疫兔后抗血清评价结果表 1：

[0038] 表 1

[0039]

	A	B
名称	OD 值	OD 值
阴性对照 1	0.066	0.076
阴性对照 2	0.071	0.069
空白对照 1	0.078	0.072
空白对照 2	0.067	0.077
空白对照 3	0.074	0.068
1:100	3.312	3.265
1:200	3.297	3.271
1:400	3.054	3.142
1:800	2.993	2.879
1:1600	2.853	2.775

[0040]

1:3200	1.631	1.645
1:6400	0.983	0.932
1:12800	0.552	0.571
1:25600	0.312	0.334
1:51200	0.184	0.169
1:102400	0.0107	0.073
1:200000	0.073	0.062
1:400000	0.069	0.071
1:800000	0.072	0.065
1:1600000	0.065	0.073

[0041] 注:A 列数据为免疫 6 次后测定的抗血清效价;B 列数据为免疫 7 次后测定的抗血清效价

[0042] 从上述表格中可以看出兔免疫 6 次和 7 次后,抗血清效价基本趋于稳定,按照实验设计评价的血清梯度为 1:100-1:1600000,其中当血清稀释至 1:51200 时,OD 值为空白孔的 2 倍左右,判断为阳性有效价,但当再进行稀释时 OD 值基本等于空白值或不到空白对照值的两倍,判断为无效价。A1-A2 和 B1-B2 为阴性对照,从数值可以看出获取的兔抗血清与其他过敏原没有反应性;A3-A5 和 B3-B5 为空白对照,可以看出过敏原与免疫前的兔血清、与二抗均不会产生非特异反应;其他孔的反应为牛肉过敏原和兔抗牛肉过敏原的特异性反应。

[0043] (二) 抗血清的亲纯化

[0044] 材料与仪器

[0045] 1、Protein-A sepharose CL-4B ;蠕动泵 ;离心管 ;离心机 ;过滤器 ;玻璃柱 ;分光光度计 ;

[0046] 2、TBS 缓冲溶液 :6.06g Tris(50mM),8.78g NaCl(150mM) 以及 0.5g 叠氮化钠(0.05%) 溶于 1L 蒸馏水中,并用 HCl 调节 pH 7.4 ;

[0047] 3、中和缓冲溶液 :121.2g Tris(1M),87.8g NaCl(1.5M),0.37g EDTA(1mM) 及 5g 叠氮化钠(0.05%) 溶于 1L 蒸馏水中,并用 HCl 调节 pH 8.0 ;

[0048] 4、洗脱缓冲溶液 (pH 2.7) :将 3.75g 甘氨酸 (50mM) 溶解于 1L 蒸馏水中,用 HCl 调节 pH 2.7 ;

[0049] 5、洗脱缓冲溶液 (pH 1.9) :将 3.75g 甘氨酸 (50mM) 溶解于 1L 蒸馏水中,用 HCl 调节 pH 1.9。

[0050] 操作步骤

[0051] 1、在真空瓶中将等体积的填料和 TBS 缓冲溶液混合,搅拌。抽真空约 15min 以除去填料中的气泡,否则在柱中形成的气泡影响柱子的容量和分离效果。将 Protein-A sepharose CL-4B 缓慢加入玻璃柱中,利用泵控制填充速度为 1ml/min ~ 2ml/min,避免柱干,利用 10 倍于床体积并经过预冷的 TBS 缓冲溶液平衡柱子。

[0052] 2、将制备得到的抗血清放入冰水或 4℃ 冰箱中缓慢解冻以避免蛋白质的聚集。在蛋白质解冻过程中出现的聚集可通过 37℃ 预热而溶解。加入固体叠氮化钠至浓度为 0.05%,4℃,15000xg 离心 5min,移出澄清的抗血清再经过滤器过滤除去多余的脂。

[0053] 3、将溶解后的抗血清用 TBS 缓冲溶液以 1:5 的比例进行稀释,再用过滤器进行过滤。以每分钟 0.5ml 的速度将抗血清上到柱上,为保证抗血清与填料的结合,需连续上柱 2 次并保留上样流出液。用 TBS 缓冲溶液清洗柱子至 A 280nm<0.008 后加 pH 2.7 洗脱缓冲溶液,以 0.5ml/min 的速度洗脱至所有蛋白均流下来。用已经加入 100 μ L 中和缓冲溶液的 1.5ml EP 管分管收集洗脱液,混匀后用 pH 试纸检查洗脱液的 pH,如果 pH 低于 7 可利用中和缓冲液调至约 pH 7.4 以防止抗体的变性 ;

[0054] 在柱中加入 10ml、pH 1.9 洗脱缓冲溶液,按上述方法收集洗脱液至 A_{280nm}<0.008 ;

[0055] 利用分光光度计测定各管中蛋白质的含量。若蛋白浓度低于 0.5mg/ml 可加入 10% 的甘油以便保存,将纯化的 IgG 抗体分装后在 2℃ ~ 8℃ 保存 ;

[0056] 用含 0.05% 叠氮化钠的 TBS 缓冲溶液清洗柱子后将柱子储存在 2℃ ~ 8℃ 环境。

[0057] (三) IgG 抗体与人 IgE Fc 偶联

[0058] 材料与仪器

[0059] 1、人 IgE Fc,由苏州浩欧博生物医药有限公司研制,以磷酸盐缓冲液保存 ;

[0060] 2、木瓜蛋白酶消化液 (Papain 溶解液) :0.1M Tris、2mM EDTA、pH 8.0。

[0061] 3、Papain、Iodoacetamide 购自 Sigma 公司。Protein-A 购自 GE 公司。

[0062] 4、偶联剂 4-(N- 马来酰亚胺基甲基) 环己烷 -1- 羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC),2- 亚胺四氢噻吩 (2-IT) 购自 THERMO 公司,三羟甲基氨基甲烷 (TRIS) 等化学试剂均达到化学纯 ;

[0063] 3、G-25 凝胶柱和 Sephadex 200 凝胶纯化柱为 GE 公司产品。

[0064] 操作步骤

[0065] 1、将人源 IgE 溶解在 Papain 消化液中,再用木瓜蛋白酶消化,再用 Iodoacetamide 终止消化反应。然后用 Protein-A 提取出来 Fc。

[0066] 2、取 1mg IgG 抗体,并加入 3 μ L 10mg/ml 的偶联剂 2-IT 溶液,室温静置 20min,加入 10 μ L 0.1mol/L 的甘氨酸溶液,在室温静置 5min。用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后抗体,5℃保存备用;

[0067] 3、取 1.5mg 的人 IgE Fc 溶液,加入 5mg/ml 的 SMCC 溶液 15 μ L,室温静置 30min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后抗体,5℃保存备用;

[0068] 4、将上述活化的 IgG 抗体与活化的人 IgE Fc 混合,在 pH 7.3 的条件下静置反应 20h,用 Sephadex 200 凝胶纯化柱纯化偶联物,获得连接物浓溶液,5℃保存备用;

[0069] 5、将 IgG-IgE Fc 连接物浓溶液用含 0.5%牛血清白蛋白、pH 8.0、0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5 μ g/ml,即得牛肉过敏原的阳性血清。

[0070] (四) 用 Phadia 公司生产的特异性过敏原 IgE 抗体检测盒对实施例 1 制备得到的阳性血清进行测定,结果如表 2:

[0071] 表 2

[0072]

名称	稀释倍比	Phadia 测值
IgG-IgE FC (F27) LOT131217	原液	73.2 KU/L
	3 倍	26.9 KU/L
	9 倍	10.3 KU/L
IgG-IgE FC (F27) LOT140319	原液	83.5 KU/L
	3 倍	33.9 KU/L
	9 倍	15.6 KU/L
IgG-IgE FC (F27) LOT140608	原液	69.7 KU/L
	3 倍	26.8 KU/L
	9 倍	11.9 KU/L

[0073] 注:Phadia 过敏原 IgE 检测定级:<0.35KU/L 为阴性;0.35-0.69 为 1 级阳性;0.7-3.49 为 2 级阳性;3.5-17.49 为 3 级阳性;17.5-49.99 为 4 级阳性;50-99.99 为 5 级阳性;>100KU/L 为 6 级阳性。

[0074] 从表 2 可见,3 批次 (LOT131217、LOT140319、LOT140608) 的阳性血清质控样本,用 Phadia 过敏原 IgE 检测试剂盒测定为阳性样本,并且为 5 级阳性样本即强阳性。从表格 2 中可以看到,质控样本分别进行 3 倍、9 倍的稀释时,其 Phadia 的测定值也呈现类似的 3 倍、9 倍的倍比降低比例。综合说明我们的样本制备成功,可以作为样本用于试剂盒的质控。

[0075] 实施例 2

[0076] (一) 过敏原的免疫和兔抗血清效价测定

[0077] 材料与仪器

[0078] 1、过敏原 :过敏原冻干粉,过敏原为柳树 ;

[0079] 2、佐剂 :弗氏完全佐剂,购自 sigma 公司,货号 (F5881) ;弗氏不完全佐剂,购自 sigma 公司,货号 (F5506) ;

[0080] 3、动物 :选 3 只 (每种过敏原免疫 3 只兔子)2 月龄、体重 1.5 ~ 2.0kg 的健康新西兰大白兔 ;

[0081] 4、二抗 :AP 标记的羊抗兔 IgG ;

[0082] 5、耗材 :三通器、一次性注射器、移液器等。

[0083] 免疫步骤

[0084] 1、免疫过敏原准备 :用 BCA 蛋白测定法来确定冻干粉溶解后过敏原的浓度,首次免疫分别取 0.05mg、0.15mg 和 0.2mg 过敏原用 PBS 稀释至 300 μ L,将过敏原与弗氏完全佐剂 0.8:1 (体积比) 混合,混匀方式是用移液器吹打混合物 10 次以上,混匀产物必须马上进行免疫 ;第二次以后的免疫都是取 0.05mg、0.15mg 和 0.2mg 过敏原用 PBS 稀释至 500 μ L,与弗氏不完全佐剂 0.8:1 (体积比) 混合,其余步骤同首次免疫。

[0085] 2、动物免疫 :将购买的 3 只新西兰大白兔在动物房养殖 1 周,使动物适应环境 ;将制备好的乳白色混合物,首次免疫用 1ml 注射器取混合 0.5ml 进行兔子的足底免疫,其他免疫均采用进行腿部和胸部肌肉注射,免疫周期为 7 天。

[0086] 3、抗血清的制备 :每只动物免疫前先于一侧耳缘静脉抽取 2mL 血 (作为空白对照),之后每进行下一次免疫前进行耳缘静脉取血,用于抗血清评价 ;另外效价达到要求后采用心脏采血法获取大量免疫血液 ;取血后通过 1000rpm 离心 15min,收集抗血清 ;抗血清分装保存于 - 70℃。

[0087] 4、抗血清效价的测定 :采用板式化学发光评价抗血清,用包被缓冲液将过敏原稀释至 5 μ g/ml,除阴性孔外每孔加 100 μ L 即 0.5 μ g 过敏原,37℃ 包被 2h ;一抗为梯度稀释的抗血清,二抗为 AP 标记的羊抗兔 IgG,其中阴性对照 :一抗为免疫过敏原前所取的同一只兔子的血清,与阳性抗血清一样进行梯度稀释 ;空白对照 :一抗孵育不含有任何血清的封闭液 ;其中血清按 1:200、1:400 等倍比稀释。抗血清效价达到 1 :100000 时,即达到我们要求。

[0088] 以柳树免疫兔后抗血清评价结果表 3 和表 4 :

[0089] 表 3

[0090]

动物编号	672	
血清编号	阳性	阴性对照
空白对照	32104	
1:200	8387823	97814
1:400	6626126	36807
1:800	5436566	32310
1:1600	4176213	28020
1:3200	2896923	28651
1:6400	1998789	26093
1:12800	1250476	28367
1:25600	715606	30144
1:51200	367424	
1:102400	200716	
1:204800	111176	
1:409600	67601	
1:800000	56854	
1:1600000	40704	
1:3200000	35891	

[0091] 表 4

[0092]

动物编号	671		670	
血清编号	阳性	阴性对照	阳性	阴性对照
空白对照	26837		27764	
1:200	7523439	137451	7504500	143790
1:400	6352811	69286	6204636	71080
1:800	5599561	62931	5429980	66423
1:1600	4545014	54381	4263473	50904
1:3200	3416377	44317	3248440	39157
1:6400	2549519	33341	2453204	32216
1:12800	1847314	29854	1730413	30516
1:25600	1326213	34961	1212607	29911
1:51200	633817		679976	
1:102400	334799		318177	
1:204800	201637		184946	
1:409600	114124		108490	

[0093]

1:800000	69803		67627	
1:1600000	51583		50146	
1:3200000	39241		40323	

[0094] 表 5

[0095]

动物编号	672	671	670
抗血清效价	1:100000	1:200000	1:100000

[0096] 注:上述数据为免疫4次后测定3只兔子的抗血清效价;

[0097] 从上述表格中可以看出兔免疫4次后,均满足和效价大于1:100000,按照实验设计评价的血清梯度为1:200~1:3200000,其中当血清稀释至1:100000时,672、671和670RLU值大于稀释梯度为1:200的阴性对照的RLU值的2倍左右,判断为阳性有效价,但当再进行大的梯度稀释时RLU值基本等于空白值或不到空白对照值的两倍,判断为无效价。

[0098] (二) 抗血清的亲纯化

[0099] 材料与仪器

[0100] 1、仪器:免疫亲和层析柱、蠕动泵、离心管、离心机、过滤器、层析柱、分光光度计;

[0101] 2、TBS平衡缓冲溶液:将6.06g Tris(50mM)、8.78g NaCl(150mM)以及0.5g叠氮化钠(0.05%)溶于1L蒸馏水中,并用HCl调节pH 7.4;

[0102] 3、高盐缓冲溶液:将121.2g Tris(1M)、87.8g NaCl(1.5M)、0.37g EDTA(1mM)及5g叠氮化钠(0.5%)溶于1L蒸馏水中,并用HCl调节pH 8.0;

[0103] 4、洗脱缓冲溶液:将3.75g甘氨酸(50mM)溶解于1L蒸馏水中,用HCl调节pH 2.6;

[0104] 5、其他材料:0.2M碳酸盐缓冲液(pH 9.5)、1.0mM HCl、1.0M甘氨酸溶液、CNBr-activated Sepharose 4B-Cl(GE)、柱料储存液(0.1MPBS,含1%氨基己酸,pH 7.4)。

[0105] 操作步骤

[0106] 1、准备免疫亲和层析柱:将免疫使用的抗原与琼脂糖凝胶连接,做成亲和层析柱。具体为:将特异性的过敏原用0.2M碳酸盐缓冲液(pH 9.5)溶解稀释成1.0mg/ml。再用1.0mM HCL处理活化好的Sepharose 4B-Cl(CNBr-activated Sepharose 4B-Cl),然后用0.2M碳酸盐缓冲液(pH 9.5)稀释成1.0g/ml。再将这两部分按1:1的比例进行混合,在室温下反应16~20小时。然后离心,收集上清液。测上清液的蛋白浓度,再与最初投放的过敏原的浓度和量进行比较,算出有多少抗原接在柱子上。剩下的Sepharose 4B-Cl放入1.0M甘氨酸溶液,溶液量为Sepharose 4B-Cl:1.0M甘氨酸溶液=1:1,反应4小时后。用0.1M的HCl,0.1M NaOH和2M尿素溶液分别以3倍柱体积依次进行清洗,最后用储存液保存。

[0107] 2、在容器中将等体积的亲和层析柱与过硫酸铵处理后的动物血清充分混合,轻摇2h。将混合物缓慢加入玻璃柱中,利用泵控制填充速度为1ml/min~2ml/min,避免柱干,利用3~10倍于柱床体积缓冲溶液平衡柱子。

[0108] 3、用TBS缓冲溶液清洗柱子至吸收值A在280nm<0.008后,再用高盐缓冲液洗去非特异结合蛋白。加pH 2.6洗脱缓冲溶液,以0.5ml/min的速度洗脱至吸收值A在280nm<0.008。用已经加入100μL中和缓冲溶液的1.5ml EP管分管收集洗脱液,混匀后用pH试纸检查洗脱液的pH,如果pH低于7可利用中和缓冲液调至约pH 7.4以防止抗体的变性;

[0109] 利用分光光度计测定各管中蛋白质的含量。若蛋白浓度低于0.5mg/ml可加入10%的甘油以便保存,将纯化的IgG抗体分装后在2℃~8℃保存;

[0110] 用含 0.05%叠氮化钠的 TBS 缓冲溶液清洗柱子后,将柱子储存在 2℃~8℃环境。

[0111] (三) IgG 抗体与人 IgE Fc 偶联

[0112] 材料与仪器

[0113] 1、人 IgE Fc,由苏州浩欧博生物医药有限公司研制,以磷酸盐缓冲液保存的;

[0114] 2、木瓜蛋白酶消化液(Papain 溶解液):0.1M Tris,2mM EDTA(pH 8.0)。

[0115] 3、Papain,购自 Sigma 公司;Iodoacetamide, 购自 Sigma 公司;Protein-A 购自 GE 公司;

[0116] 4、偶联剂 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC),2-亚胺四氢噻吩(2-IT) 购自 THERMO 公司,三羟甲基氨基甲烷(TRIS) 等化学试剂均达到化学纯;

[0117] 5、G-25 凝胶柱和 Sephadex 200 凝胶纯化柱为 GE 公司产品。

[0118] 操作步骤

[0119] 1、人 IgE,纯度为 95%,浓度为 1mg/ml,先用 Papain 消化液(也叫溶解液),pH = 8.0 透析,然后加入浓度为 Papain:IgE = 100:1(w/w) 进行消化 30min,再在消化液中加入 Iodoacetamide 终止反应,使用 Protein A 将 IgE Fc 部分纯化出来。

[0120] 2、取 1mg 的 IgG 抗体溶液,加入 5mg/ml 的 SMCC 溶液 15 μ L,室温静置 30min,用 G-25 凝胶柱除游离 SMCC,收集活化后抗体,4℃保存备用;

[0121] 3、取 1.5mg 人 IgE Fc 部分,加入 10mg/ml 的偶联剂 2-IT 溶液 3 μ L,室温静置 20min,加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μ L,室温静置 5min。用 G-25 凝胶柱除游离的 2-IT,收集活化后抗体,4℃保存备用;

[0122] 4、将上述活化的 IgG 抗体与活化的人 IgE Fc 部分混合,在 pH 7.3 的条件下静置 20h,用 Sephadex 200 凝胶纯化柱纯化偶联物,获得连接物浓溶液,4℃保存备用;

[0123] 5、将 IgG-IgE Fc 连接物浓溶液用含 0.5%牛血清白蛋白、pH 8.0、0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5 μ g/ml,即得柳树过敏原的阳性血清。

[0124] (四) 用 Phadia 公司生产的特异性过敏原 IgE 抗体检测盒对实施例 1 制备得到的阳性血清进行测定,结果如表 6:

[0125] 表 6

[0126]

名称	稀释倍比	Phadia 测值
IgG-IgE FC (T12) LOT140105	原液	>100KU/L
	3 倍	57.2 KU/L
	9 倍	20.03 KU/L
IgG-IgE FC (T12) LOT140327	原液	97KU/L
	3 倍	35 KU/L
	9 倍	12.5 KU/L
IgG-IgE FC (T12) LOT140507	原液	>100KU/L
	3 倍	77.9 KU/L
	9 倍	25.53 KU/L

[0127] 注:Phadia 过敏原 IgE 检测定级:<0.35KU/L 为阴性;0.35-0.69 为 1 级阳性;0.7-3.49 为 2 级阳性;3.5-17.49 为 3 级阳性;17.5-49.99 为 4 级阳性;50-99.99 为 5 级阳性;>100KU/L 为 6 级阳性。

[0128] 从表 6 可见,3 批次 (LOT140105、LOT140327、LOT140507) 的阳性血清质控样本,用 Phadia 过敏原 IgE 检测试剂盒测定为阳性样本,并且为 5-6 级阳性样本即强阳性。另外从表格中可以看到,质控样本倍比稀释后,测定值也为倍比稀释的。综合说明我们的样本制备成功,可以作为样本用于试剂盒的质控。

[0129] 以上对本发明做了详尽的描述,其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本发明的内容并加以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明的精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围内。

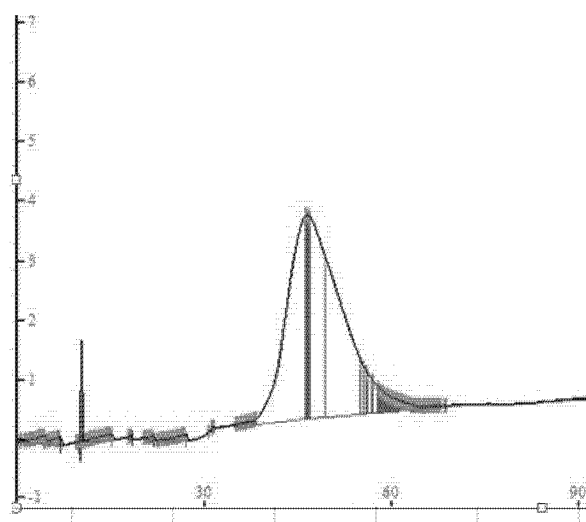


图 1

专利名称(译)	一种过敏原阳性血清的纯化制备方法		
公开(公告)号	CN104977401A	公开(公告)日	2015-10-14
申请号	CN201410553626.5	申请日	2014-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	王洪 李庆春 孙婵 夏波 秦枫 钱林 王秀伟		
发明人	王洪 李庆春 孙婵 夏波 秦枫 钱林 王秀伟		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/96		
代理人(译)	汪青		
优先权	201410128592.5 2014-04-01 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种过敏原阳性血清的纯化制备方法，包括用过敏原对健康动物进行免疫、采血后获得的抗血清的步骤和对所述的抗血清进行纯化获得阳性血清的步骤，所述的纯化的具体方法为：对所述的抗血清进行亲和纯化得到IgG抗体；将所述的IgG抗体和人IgEFc按质量比为1:1~2偶联后，经分离纯化获得IgG-IgEFc连接物浓溶液，将所述的IgG-IgEFc连接物浓溶液稀释至浓度为0.5~1μg/ml，即得所述的阳性血清。本发明方法可批量制备各种过敏原的阳性血清及其他各种阳性血清的纯化制备，解决了检测试剂盒制备过程中的阳性质控问题，也可以作为校准品的生产原料，并且本制备方法简单易行。

	A	B
名称	OD 值	OD 值
阴性对照 1	0.066	0.076
阴性对照 2	0.071	0.069
空白对照 1	0.078	0.072
空白对照 2	0.067	0.077
空白对照 3	0.074	0.068
1:100	3.312	3.265
1:200	3.297	3.271
1:400	3.054	3.142
1:800	2.993	2.879
1:1600	2.853	2.775