

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710012527.6

[43] 公开日 2008 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 101140282A

[22] 申请日 2007.8.22

[21] 申请号 200710012527.6

[71] 申请人 大连金港安迪生物制品有限公司

地址 116620 辽宁省大连市开发区双 D 港生命二路 36 号

[72] 发明人 公殿力 张玉颖 单宝龙

[74] 专利代理机构 大连万友专利事务所
代理人 王 发

权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

水痘抗血清的制备方法

[57] 摘要

一种水痘抗血清的制备方法，先将人二倍体细胞扩增传代，其扩增传代比例为 1：2～4，加入扩增的水痘一带状疱疹病毒液，于 35～37℃ 培养 2～5 天，当人二倍体细胞出现 80% 以上典型病变时倒掉原维持液，用磷酸盐缓冲液冲洗细胞表面，加入含 2%～20% 豚鼠血清的培养基，液量为原液体积的 1/1～1/100，破碎细胞、澄清过滤、取含水痘一带状疱疹病毒的上清液，用上述含水痘一带状疱疹病毒的上清液多次免疫豚鼠，采集上述豚鼠血，离心分离血清，除菌过滤，血清灭活，得到水痘抗血清。本发明方法比从人血制取法简单，成本低，制出的抗血清杂蛋白少、效价高，一般为 1：1024～2048。

1、一种水痘抗血清的制备方法，其特征在于：

- 1). 将人二倍体细胞扩增传代，其扩增传代比例为 1：2~4，生长液为 PH 值 7.2~7.6 的含 10~20%小牛血清的 MEM 培养基或 PH 值 7.2~7.6 的含 10~20%小牛血清的 199 培养基，于 37℃培养 3-5 天，
- 2) 扩增水痘一带状疱疹病毒，
- 3). 将扩增的水痘一带状疱疹病毒液加入到步骤 1) 的产物中，维持液为 PH 值 7.2-7.6 的含 1~20%199 培养基或含 1~20%小牛血清的 MEM 培养基，于 35~37℃培养 2-5 天，
- 4). 当人二倍体细胞出现 80%以上典型病变时倒掉原维持液，用 PH 值 7.4~7.6 磷酸盐缓冲液冲洗细胞表面，
- 5). 向上述细胞中加入含 2%-20%豚鼠血清的 PH 值为 7.2~7.6 的 MEM 培养基或 199 培养基，液量为原液体积的 1/1~1/100，破碎细胞、澄清过滤、取含水痘一带状疱疹病毒的上清液，
- 6). 用上述含水痘一带状疱疹病毒的上清液多次免疫豚鼠，
- 7). 采集上述豚鼠血，离心分离血清，除菌过滤，血清灭活，得到水痘抗血清，
- 8). 测定上述水痘抗血清效价。

2、根据权利要求 1 所述的水痘抗血清的制备方法，其特征在于：将人二倍体细胞 MRC-5 扩增传代，传代比例为 1：2，其生长液为 PH 值是 7.2 的含 10%小牛血清的 MEM 或 199 培养基，于 37℃温度放置

培养 3 天，取水痘一带状疱疹病毒，按 1/20（体积比）比例加入到维持液中，维持液为 PH 值是 7.2，含 2%小牛血清的 MEM 或 199 培养基，于 37℃温度放置培养 3 天，用显微镜观察有 80%以上细胞由条状变为葡萄状发生典型病变时，倒掉原维持液，然后加入 PH 值为 7.2 的含 10%小牛血清的 MEM 或 199 培养基，液量为原维持液量的 1/1~1/2（体积比），破碎细胞，澄清过滤，所得滤液即为扩增的水痘一带状疱疹病毒液。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的水痘抗血清的制备方法，其特征在于：用含水痘一带状疱疹病毒的上清液与弗氏完全佐剂的混合物多次免疫豚鼠，并且含水痘一带状疱疹病毒的上清液与弗氏完全佐剂的体积比为 1：0~1。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的水痘抗血清的制备方法，其特征在于：用含水痘一带状疱疹病毒的上清液与弗氏不完全佐剂的混合物多次免疫豚鼠，并且含水痘一带状疱疹病毒的上清液与弗氏不完全佐剂的体积比为 1：0~1。

水痘抗血清的制备方法

技术领域：本发明涉及一种抗血清的制备方法，特别是水痘抗血清的制备方法。

背景技术：水痘抗血清是检验水痘疫苗的试剂，用于鉴别水痘一带状疱疹病毒，确定水痘疫苗质量。目前，制备抗血清一般是用抗原免疫家兔来制备，但是家兔对水痘一带状疱疹病毒不敏感，不能产生高效价抗血清，因此，水痘抗血清大部分是从人血清中提取的，它的不足之处是 1、含水痘抗血清的人血较少，来源受到很大限制，满足不了对水痘抗血清的需求。2、价格昂贵、成本高。3、效价低。

发明内容：本发明的目的在于提供一种来源广泛，成本低，效价高的水痘抗血清的制备方法。

本发明主要是用水痘一带状疱疹病毒作为抗原免疫豚鼠，再从豚鼠血中提取水痘抗血清，其方法如下：

一、水痘一带疱疹病毒的制备。

1 人二倍体细胞扩增传代

将人二倍体细胞扩增传代，人二倍体细胞包括 2BS 株、MRC-5 株、WI-38 株、HLF-02 株，KMB-17 株。扩增传代的比例为：1：2~4。扩增传代生长液为 PH 值 7.2-7.6 含 10~20%小牛血清的 MEM 培养基（极限必须培养基）或 PH 值 7.2-7.6 的含 10~20%小牛血清的 199 培养基；于 37℃温度培养 3-5 天，使人二倍体细胞生长成致密单层。

2 水痘一带状疱疹病毒的扩增

将人二倍体细胞 MRC-5 扩增传代，传代比例为 1: 2,，其生长液为 PH 值是 7.2 的含 10%小牛血清的 MEM 或 199 培养基，于 37℃ 温度放置培养 3 天。取水痘一带状疱疹病毒，该水痘一带状疱疹病毒的来源（1）从美国典型培养物保藏中心（ATCC）购买的水痘疫苗毒种 OKa 株。（2）从水痘患者的疹内液体中分离的水痘一带状疱疹病毒。（3）从水痘患者的疹内液体中分离的水痘一带状疱疹病毒在减毒过程中得到的中间产物。将该病毒按 1/20（体积比）比例加入到维持液中，维持液为 PH 值是 7.2，含 2%小牛血清的 MEM 或 199 培养基，于 37℃ 温度放置培养 3 天。用显微镜观察有 80%以上细胞由条状变为葡萄状发生典型病变时，倒掉原维持液，然后加入 PH 值为 7.2 的含 10%小牛血清的 MEM 或 199 培养基，液量为原维持液量的 1/1~1/2（体积比）。破碎细胞，澄清过滤，所得滤液即为扩增的水痘一带状疱疹病毒液。

3 免疫豚鼠用水痘一带状疱疹病毒的制备

将扩增的水痘一带状疱疹病毒液加入到扩增传代的人二倍体细胞中感染细胞，其维持液为 PH 值 7.2-7.6 含 1~20%小牛血清的 199 培养基或含 1~20%小牛血清的 MEM 培养基，最好水痘-带状疱疹病毒液：维持液=1/1~1/100（体积比），于 35℃~37℃ 温度培养 2-5 天。当人二倍体细胞出现 80%以上典型病变时，倒掉原维持液。用 PH 值 7.4-7.6 磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗细胞面，最好冲洗量至少是一倍维持液量。向上述细胞中加入 PH 值 7.2-7.6 的含 2-20%豚鼠血清的新维

持液 MEM 培养基或 199 培养基,液量为原维持液量的 1/1~1/100 (体积比),收获细胞培养物,破碎细胞,澄清过滤、取含水痘一带状疱疹病毒的上清液,即为进一步扩增的水痘一带状疱疹病毒液。

二、用水痘一带状疱疹病毒作为抗原免疫豚鼠,制备水痘抗血清。

1 用上述含水痘一带状疱疹病毒的上清液(进一步扩增的水痘一带状疱疹病毒液)多次免疫豚鼠,或用上述含水痘一带状疱疹病毒的上清液与弗氏完全佐剂或不完全佐剂的混合物免疫豚鼠,

含水痘一带状疱疹病毒上清液: 弗氏完全佐剂=1: 0~1 (体积比)

含水痘一带状疱疹病毒上清液: 弗氏不完全佐剂=1: 0~1 (体积比)

免疫时间分别为 0, 1, 2 周; 免疫部位可以是腹腔、皮内、皮下及肌肉。

2 采集上述豚鼠血,最好第 5 周心脏采血。将豚鼠血分别在 37℃ 温度放置 1 小时, 4℃ 温度放置 2~24 小时,然后离心分离血清,除菌过滤, 56℃ 温度 30 分钟血清灭活,得到外观微黄、澄清、透明的水痘抗血清。

3 测定上述水痘抗血清效价,测定方法见实施例 1。

本发明与现有技术相比具有如下优点:

1 本发明方法比从人血制取法简单,易于操作。

2 制出的抗血清效价高,为 1: 1024-2048,而外国从人血提取的抗血清效价为 1: 20。

3 制出的抗血清杂蛋白少: 如果使用人血白蛋白或牛血清作病毒保护剂,不但产生抗水痘一带状疱疹抗体,而且还产生抗人血白蛋白或牛

血清的抗体，使得抗体纯度不高。采用豚鼠血清作病毒保护剂免疫豚鼠时，只产生抗水痘-带状疱疹病毒的抗体，由于保护剂中不含人血白蛋白或牛血清，因此制备出的抗血清中不含这两种保护剂的抗体。

4 采用本发明制得的水痘抗血清成本低，约是从人血提取的水痘抗血清成本的 1/10。

具体实施方式

例 1

将人二倍体细胞 MRC-5 扩增传代，传代比例为 1: 2，其生长液为 PH 值是 7.2 的含 10%小牛血清的 199 培养基，于 37℃温度放置培养 3 天。加入扩增的水痘一带状疱疹病毒液，（其扩增的方法为将人二倍体细胞 MRC-5 扩增传代，传代比例为 1: 2，，其生长液为 PH 值是 7.2 的含 10%小牛血清的 MEM 培养基，于 37℃温度放置培养 3 天。取水痘一带状疱疹病毒，该水痘一带状疱疹病毒是从美国典型培养物保藏中心购买的水痘疫苗毒种 OKa 株。将该病毒按 1/20 体积比加入到维持液中，维持液为 PH 值是 7.2，含 2%小牛血清的 MEM 培养基，于 37℃温度放置培养 3 天。用显微镜观察有 80%以上细胞由条状变为葡萄状发生典型病变时，倒掉原维持液，然后加入 PH 值为 7.2 的含 10%小牛血清的 MEM 培养基，液量与原维持液量的体积比为 1/1。破碎细胞，澄清过滤，所得滤液即为扩增的水痘一带状疱疹病毒液。）

水痘一带状疱疹病毒液按 1/20（体积比）比例加入到维持液中，维持液为 PH 值是 7.2 含 2%小牛血清的 199 培养基，于 37℃温度放置培养 3 天。用显微镜观察有 80%以上细胞由条状变为葡萄状发生典型

病变时，倒掉原维持液。用一倍维持液量（体积）PH 值 7.4~7.6 的磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗细胞面，然后加入 PH 值为 7.2 的含 5% 豚鼠血清的 199 培养基，液量为原维持液量的 1/100（体积比）。破碎细胞，澄清过滤，取含水痘一带状疱疹病毒的上清液，（即为进一步扩增的水痘一带状疱疹病毒液）。向豚鼠腹腔接种 1 毫升上述上清液，相隔一周、二周再分别向豚鼠腹腔接种 1 毫升上述上清液。于第 5 周心脏采全血。将豚鼠血分别在 37℃ 温度放置 1 小时，4℃ 温度放置 2 小时，然后在 1000 转/分条件下离心 20 分钟，取血清，血清再经滤膜过滤除菌后，置于 56℃ 温度 30 分钟进行血清灭活，得到的外观为微黄、澄清、透明的产品即为水痘抗血清。上述豚鼠水痘抗血清按以下方法进行效价测定：

将培养 3 天已长成单层的人二倍体细胞 MRC-5 株弃去生长液，接种病毒，2ml/瓶，轻摇使病毒均匀分散于人二倍体细胞表面，37℃ 吸附 60 分钟。吸附完毕后，每瓶补加维持液至 15ml，维持液为 PH7.2-7.6 的 199 培养基，置 37℃ 恒温箱培养 3 天，于显微镜下观察，确认病变达 80%，弃旧液，加入配制好的胰蛋白酶液 5ml/瓶，置室温消化 3 分钟，弃胰蛋白酶液，加入 PH 值 7.4-7.6 磷酸盐缓冲液（PBS），10ml/瓶，将病变细胞轻轻吹下，并将其收集到离心杯中，补加 PH 值 7.4-7.6 磷酸盐缓冲液（PBS）900 转/分，离心 10 分钟。离心结束，弃上清液，加入 PH 值 7.4-7.6 磷酸盐缓冲液（PBS）（按 25ml/100ml 小方瓶），用吸管吹打分散沉淀物使之成均匀的悬液，然后用 25 μ l 微量加样器将病变细胞接种到十二孔载物片上，每孔接种病变细胞悬

液 20 μ l, 于湿盒中放置 30 分钟。将载物片放入已于-70℃预冷 1 小时的丙酮中固定 10 分钟, 再用 PH 值 7.4-7.6 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗三次, 10 分钟/次, 然后干燥即制备成抗原载物片, 置-70℃保存备用。

用多头微量加样器吸取 PH 值 7.4-7.6 磷酸盐缓冲液 (PBS) 加到酶标板中 50 μ l/孔, 然后用单头微量加样器吸取 50 μ l 血清加到酶标板中第一孔, 换取样器头吸打 10 次, 为 2 倍稀释, 再从此孔吸取 50 μ l 2 倍稀释血清加入到酶标板第二孔中, 吹打 10 次, 为 4 倍稀释, 如此倍比稀释至 2048 倍。用单头微量加样器吸取 2048 倍稀释的血清 20 μ l 滴加到抗原载物片第 10 孔上, 再吸取 1024 倍稀释的血清 20 μ l 滴加到抗原载物片第 9 孔上, 如此从高稀释度到低稀释度分别滴加到载物片各孔上。即第一孔为 4 倍稀释, 第十孔为 2048 倍稀释。抗原载物片的第 11 孔滴加阴性对照血清 20 μ l, 第 12 孔滴加阳性对照血清 20 μ l, 然后将抗原载物片置湿盒中放 37℃恒温反应 30 分钟。抗原抗体反应结束后用 PH 值 7.4-7.6 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 每次 10 分钟, 干燥后每孔加入荧光标记抗人 IgG 20 μ l, 置湿盒中放 37℃恒温 30 分钟。反应结束后, 用 PH 值 7.4-7.6 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 每次 10 分钟, 干燥后每孔滴加甘油缓冲液 1 滴, 覆盖盖玻片。将载物片置荧光显微镜下观察, 呈现黄绿色膜性荧光为阳性, 呈现非膜性浅绿色为阴性, 根据荧光判定水痘抗血清的效价。经测定水痘抗血清的效价为 1: 2048。

其它实施例重复例 1 的操作, 具体数值列表如下:

序号	项目内容	例 1	例 2	例 3	例 4	例 5
1	细胞名称	MRC-5	2BS	WI-38	MRC-5	KMB-17
	传代倍数	2	3	2	2	4
2	扩增病毒的培养基	MEM	199	MEM	MEM	199
3	水痘一带状疱疹病毒来源	美国 ATCC 的 OKa 株	患者疹内液体	疹内液体减毒中间产物	美国 ATCC 的 OKa 株	美国 ATCC 的 OKa 株
4	病毒液是维持液的倍数 (V/V)	1	0.5	0.75	1	0.8
5	生长液 PH 值	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6
	生长液	含 10% 小牛血清 199 培养基	含 10% 小牛血清 MEM 培养基	含 20% 小牛血清 199 培养基	含 20% 小牛血清 MEM 培养基	含 15% 小牛血清 199 培养基
	时间 (天)	3	4	3	3	5
6	加病毒量(v/v)	1/20	1/10	1/40	1/1	1/100
	维持液 PH 值	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6
	含小牛血清	2%	20%	1%	2%	5%
	培养基名称	199	MEM	199	MEM	199
	温度℃	37	36	35	36	37

	时间	3	3	3	2	5
7	细胞病变百分率	95	85	80	95	80
	冲洗液倍数	1	1	2	1.5	1
8	培养基 PH 值	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6
	含豚鼠血清%	5	2	4	10	20
	培养基名称	199	MEM	199	MEM	199
	培养基用量	1ml	5ml	100ml	2ml	20ml
9	免疫豚鼠部位	腹	肌肉	皮下	腹	腹
10	弗氏完全佐剂 比例		0.5			1
11	弗氏不完全佐 剂比例			0.5	1	
12	血清效价	1: 2048	1: 512	1: 256	1: 1024	1: 256

专利名称(译)	水痘抗血清的制备方法		
公开(公告)号	CN101140282A	公开(公告)日	2008-03-12
申请号	CN200710012527.6	申请日	2007-08-22
[标]发明人	公殿力 张玉颖 单宝龙		
发明人	公殿力 张玉颖 单宝龙		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	王发		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种水痘抗血清的制备方法，先将人二倍体细胞扩增传代，其扩增传代比例为1:2~4，加入扩增的水痘—带状疱疹病毒液，于35~37℃培养2-5天，当人二倍体细胞出现80%以上典型病变时倒掉原维持液，用磷酸盐缓冲液冲洗细胞表面，加入含2%-20%豚鼠血清的培养基，液量为原液体积的1/1~1/100，破碎细胞、澄清过滤、取含水痘-带状疱疹病毒的上清液，用上述含水痘-带状疱疹病毒的上清液多次免疫豚鼠，采集上述豚鼠血，离心分离血清，除菌过滤，血清灭活，得到水痘抗血清。本发明方法比从人血制取法简单，成本低，制出的抗血清杂蛋白少、效价高，一般为1:1024-2048。

序号	项目内容	例 1	例 2	例 3	例 4	例 5
1	细胞名称 传代倍数	MRC-5 2	2BS 3	WI-38 2	MRC-5 2	KMB-17 4
2	扩增病毒的培 养基	MEM	199	MEM	MEM	199
3	水痘—带状疱疹病毒来源	美国 ATCC 的 OKa 株	患 者 疹 内 液 体	疹内液体 减毒中间 产物	美国 ATCC 的 OKa 株	美国 ATCC 的 OKa 株
4	病毒液是维持 液 的 倍 数 (V/V)	1	0.5	0.75	1	0.8
5	生长液 PH 值 生长液 时间 (天)	7.2 含 10% 小 牛血清 199 培 养基 3	7.3 含 10% 小 牛 血 清 MEM 培养基 4	7.4 含 20% 小 牛血清 199 培养基 3	7.5 含 20% 小 牛 血 清 MEM 培 养基 3	7.6 含 15% 小 牛血清 199 培养基 5
6	加病毒量(v/v) 维持液 PH 值 含小牛血清 培养基名称 温度℃	1/20 7.2 2% 199 37	1/10 7.3 20% MEM 36	1/40 7.4 1% 199 35	1/1 7.5 2% MEM 36	1/100 7.6 5% 199 37