



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110066762 A

(43)申请公布日 2019. 07. 30

(21)申请号 201810058613.9

(22)申请日 2018.01.22

(71)申请人 范清春

地址 210000 江苏省南京市雨花台区玉兰
路5号翠竹园21幢501室

(72)发明人 范清春

(51)Int.Cl.

C12N 5/071(2010.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书2页

(54)发明名称

工业化生产新生牛纯化血清的方法

(57)摘要

本发明涉及动物血清纯化方法,喂食过初乳含大量脂类、内毒素和血红蛋白等杂质成分的新生牛原料血清预滤去除纤维蛋白;经截留分子量100-300kd超滤柱将血清分离成截留部分(大分子复合物)和透析部分(游离分子);截留部分加入固相脱蛋白水化膜介质促使脂类(含乳糜颗粒和脂蛋白)、免疫球蛋白、内毒素、血红蛋白等杂质聚合成絮状沉淀,经连续流离心、澄清过滤得到澄清液体;澄清液体与所述超滤柱透析部分合并,除菌后制成新生牛纯化血清。使用该方法,喂食过初乳、内毒素和血红蛋白超标的新生牛血清可被加工成符合疫苗用细胞培养基、酶免试剂盒质量要求的血清。

1. 一种工业化生产新生牛纯化血清的方法,包括:喂食过初乳含大量脂类、内毒素和血红蛋白等杂质成分的新生牛原料血清预滤去除纤维蛋白;经截留分子量100-300kd超滤柱将血清分离成截留部分(大分子复合物)和透析部分(游离分子);截留部分加入固相脱蛋白水化膜介质促使脂类(含乳糜颗粒和脂蛋白)、免疫球蛋白、内毒素、血红蛋白等杂质聚合成絮状沉淀,经连续流离心、澄清过滤得到的澄清液体;澄清液体与所述透析部分合并,除菌后制成新生牛纯化血清。

2. 权利要求1所述的方法,其特征在于:所述原料为喂食过初乳含脂类、内毒素和血红蛋白超标的新生牛血清原料,该方法也适合于喂食过初乳仅需要去除脂类的新生牛原料血清,或者单独溶血需要去除血红蛋白的新生牛原料血清。

工业化生产新生牛纯化血清的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种工业化生产新生牛纯化血清的方法。

背景技术

[0002] 新生牛血清是人用疫苗和兽用疫苗生产最重要的细胞培养基,同时也是酶免试剂盒的重要辅料,市场需求巨大。新生牛血清在我国,是无菌采集刚出生未进食的小公牛动脉血制作成的血清,《药典》要求内毒素低于10EU/ml、血红蛋白低于200mg/mL、外观澄明。新西兰、澳大利亚等来源新生牛血清,新出生小公牛喂食过初乳4-14天,颈部放血制作的血清,含大量脂类成分、外观浑浊、粘稠,难以除菌过滤;通常溶血严重、还污染有内毒素、BVDV等,进一步限制了使用价值。

[0003] 本发明提供了一种低成本工业化加工方法,将喂食过初乳含大量脂类(包括乳糜颗粒和脂蛋白)、内毒素和血红蛋白等杂质成分的新生牛血清,加工成符合疫苗生产细胞培养基或者试剂盒酶免保护剂质量要求的血清。该项技术填补国际空白,并实现了产业化生产;去除脂类、内毒素和血红蛋白等杂质成分的血清纯化技术,国内外均无报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种工业化生产新生牛纯化血清的方法。

[0005] 本发明所提供的工业化生产新生牛纯化血清的方法,包括:原料血清的解冻、融化,预滤去除纤维蛋白;经截留分子量100-300kd超滤柱将预处理的血清分离成截留部分(大分子复合物)和透析部分(游离分子);截留部分加入固相脱蛋白水化膜介质促使脂类(含乳糜颗粒和脂蛋白)、免疫球蛋白、内毒素、血红蛋白等杂质聚合成絮状沉淀,经连续流离心、澄清过滤得到的澄清液体;澄清液体与所述透析部分合并,除菌后制成新生牛纯化血清。

[0006] 作为优选,原料血清为新西兰、澳大利亚新出生小公牛喂食过初乳4-14天含大量脂类、内毒素和血红蛋白超标的血清。该方法也适合于喂食过初乳仅需要去除脂类的新生牛原料血清,或者单独溶血需要去除血红蛋白的新生牛原料血清。

[0007] 作为优选,预过滤选用25m聚丙烯材质布袋滤器。

[0008] 作为优选,超滤使用美国Spectrum公司截留分子量100-300kd超滤柱或超滤膜中的一种。

[0009] 作为优选,澄清过滤介质为美国3M公司90sp膜堆。

[0010] 血清中脂类和免疫球蛋白、补体、血红蛋白、内毒素等聚合成大于100nm的颗粒,通常情况100-300kd超滤膜难以透析出来。超滤柱可有效将上述血清杂质富集在截留部分,固相脱蛋白水化膜介质能够优先将血清中大颗粒成分聚合、形成沉淀,采用离心方式除去。具体地,截留部分与固相脱蛋白水化膜介质按比例混合,混合比例为截留部分按原料血清1000L,加入25L南京澳范生物科技有限公司固相脱蛋白水化膜介质DHF01。

[0011] 超滤膜截留部分去除杂质后,与超滤膜透析部分合并,除菌后制成新生牛纯化血

清。

[0012] 本方法加工后的血清成品,免疫球蛋白降低40%以上、内毒素从30-100EU/ml降低到1.0EU/ml以内、血红蛋白从250-300mg/L降低到80mg/L以内,BVDV抗原ELISA检测从阳性变为阴性,外观为澄明液体。本发明方法生产的新生牛血清,培养BHK-21和VERO细胞效果接近国产新生血清质量,内毒素和血红蛋白指标优于国产血清。

[0013] 本发明的优点在于整个生产过程,没有使用化学溶剂,不会对血清产生污染;固相脱蛋白水化膜介质仅沉淀血清中大于100nm颗粒,不会对血清有效成分造成丢失,固相脱蛋白水化膜介质也容易去除。该方法生产新生牛纯化血清仅产生固体废弃物,没有液体废弃物,环保措施易于实现,适合工业化生产。

具体实施方式

[0014] 为了更好的理解本发明,以1000L原料血清为例对本方法进行详细介绍。下述实例中所述方法如无特殊说明均为常规方法,所述试剂和材料如无特殊说明均可从商业途径可获得。

[0015] 具体实施方法如下。

[0016] (1)血清融化:喂食过初乳含脂类、内毒素和血红蛋白超标的新生牛血清原料采集后-10℃以下冷冻保存,4-10℃解冻、融化后合并。

[0017] (2)预过滤:用25μm聚丙烯布袋滤器过滤除纤维蛋白(原)等颗粒,目的是保护超滤柱。通常情况一个2号布袋就能顺利过滤1000L血清。

[0018] (3)超滤:用美国Spectrum公司截留分子量100-300kd超滤柱充分透析,把血清分成截留部分(大分子复合物)和透析部分(游离分子),杂质成分富集在截留部分。血清粘度很大,超滤柱过滤面积应不小于50m²。

[0019] (4)杂质沉淀:截留部分按原血清体积1000L,搅拌下加入25升南京澳范生物科技公司的固相脱蛋白水化膜介质DHF01,血清中脂类、免疫球蛋白、内毒素、血红蛋白等杂质进一步聚合、形成沉淀。

[0020] (5)连续流离心:用连续流离心机将血清沉淀与固相脱蛋白水化膜介质一并去除,离心力应达到8000g才能有效分离上清和沉淀,离心过程温度控制在4-10℃范围内,离心进液速度需根据离心效果做相应调整,离心上清应透亮。

[0021] (6)澄清:离心上清用美国3M公司90sp膜堆过滤澄清,过滤液灯检应无乳光。1000L原料血清,通常情况该步过滤需要使用1.8 m²的膜堆。

[0022] (7)除菌:90sp膜堆过滤液与超滤膜透析部分合并,除菌后即為新生牛纯化血清成品。

专利名称(译)	工业化生产新生牛纯化血清的方法		
公开(公告)号	CN110066762A	公开(公告)日	2019-07-30
申请号	CN201810058613.9	申请日	2018-01-22
[标]发明人	范青春		
发明人	范青春		
IPC分类号	C12N5/071 G01N33/53		
CPC分类号	C12N5/0602 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及动物血清纯化方法，喂食过初乳含大量脂类、内毒素和血红蛋白等杂质成分的新生牛原料血清预滤去除纤维蛋白；经截留分子量100-300kd超滤柱将血清分离成截留部分（大分子复合物）和透析部分（游离分子）；截留部分加入固相脱蛋白水化膜介质促使脂类（含乳糜颗粒和脂蛋白）、免疫球蛋白、内毒素、血红蛋白等杂质聚合成絮状沉淀，经连续流离心、澄清过滤得到澄清液体；澄清液体与所述超滤柱透析部分合并，除菌后制成新生牛纯化血清。使用该方法，喂食过初乳、内毒素和血红蛋白超标的新生牛血清可被加工成符合疫苗用细胞培养基、酶免试剂盒质量要求的血清。