

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

T/CVDA

团体标准

T/CVDA XX—XXXX

清敏用抗猫过敏原 Fel d1 和 Fel d4

卵黄抗体标准

Anti-cat allergen Fel d1 and Fel d4 IgY standard for allergy

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽药协会 发布

目 录

前 言	错误!未定义书签。
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 符号和缩略语	4
5 技术要求	4
5.1 原材料和辅料	4
5.2 关键质量属性	4
5.3 过程控制	5
6 检验方法	5
6.1 抗原生产及检测	6
6.2 抗体效价检测	6
6.3 放行检测	6
7 检验规则	6
7.1 抽样	6
7.2 判定	6
8 使用说明	6
9 标签、包装、储存、运输、保质期	6
9.1 标签	6
9.2 包装	6
9.3 储存	6
9.4 运输	7
9.5 保质期	7
10 附录	8

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国兽药协会提出并归口管理。

本文件起草单位：宁波贝安生物科技有限公司、宁波三生生物科技股份有限公司、浙江倍迪家宠物食品科技有限公司、广东省分析测试协会宠物健康产业分析技术专业委员会。

本文件主要起草人：韩爽、邓明亮、李艳、张伟、徐国华、戴志红、赵小波、曹春燕、许康、马若天。

清敏用抗猫过敏原 Fel d1 和 Fel d4 卵黄抗体标准

1 范围

本文件规定了，以抗猫源性过敏原 Fel d1、Fel d4 卵黄抗体为核心成分产品的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存、运输和保质期。

本文件适用于抗猫源性过敏原 Fel d1、Fel d4 卵黄抗体冻干粉和提纯液，及其为核心成分的猫粮、猫粮伴侣、喷雾、手套湿巾等产品的生产、检测。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 Fel d1 *Felis domesticus* 1

Fel d1是一种分泌球蛋白，主要由猫的唾液腺、皮脂腺和泪腺产生，是最为广泛存在且被认为是导致人过敏的最强效的猫源性过敏源，可在超过90%的猫过敏人群中引起IgE介导的过敏反应。

3.2 Fel d4 *Felis domesticus* 4

Fel d4是一种脂质运载蛋白，由唾液腺分泌，主要存在于唾液中，皮毛中也能发现，并且也可以大量散落在环境中，可在超过63%的猫过敏人群中引起IgE介导的过敏反应。

3.3 卵黄抗体 Immunoglobulin of yolk, IgY

又称卵黄免疫球蛋白，通过特定抗原免疫接种产蛋母鸡，在其卵黄中存在的多克隆抗体，可用于相应疾病的预防和治疗。

3.4 抗体效价 antibody titer

抗体和相应抗原在最适条件下可以产生明显反应的最高稀释度。

3.5 卵黄抗体冻干粉 lyophilized powder of IgY

采用冻干机的真空冷冻干燥法，预先将卵黄里面的水分冻结，然后在真空环境下将卵黄里面被冻结的水分升华，从而得到冷冻干燥卵黄，将冻干卵黄打碎制成的粉末。

3.6 卵黄抗体提纯液 Purified liquid of IgY

是通过水稀释法，把卵黄中的脂质等杂质除去，获得的较高纯度卵黄抗体液体。

4 缩略语

IgY——卵黄抗体 (Immunoglobulin of yolk)

5 技术要求

5.1 原材料和辅料

5.1.1 应建立抗原、佐剂、蛋鸡的标准，保证原材料鸡蛋符合生产要求。

5.2 关键质量属性

5.2.1 参考天然 Fel d1、Fel d4 序列，改造后构建重组质粒，转染至 CHO 细胞筛选获得重组稳定细胞株，将重组稳定细胞株采用悬浮培养工艺表达，经纯化浓缩后获得重组 Fel d1、Fel d4 抗原，纯度应 $\geq 90\%$ ，浓度应 $\geq 1.0\text{mg/ml}$ ，与天然抗原具有相似的构型、构象，与对应抗体具有较高结合活性。

5.2.2 佐剂需具有较高的安全性，与抗原有良好的相容性，且能提高机体免疫应答水平及延长免疫持续期。

5.2.3 蛋鸡需经过规范的疫苗免疫，具有良好的食欲、精神状态，产蛋量正常，无明显临床病症。

5.2.4 免后蛋鸡所产鸡蛋，蛋壳需清洁完整，呈规则卵圆形，具有蛋壳固有的色泽，表面无肉眼可见污物。打碎鸡蛋收获卵黄进行效价检测，重组 Fel d1 抗原免疫鸡所产鸡蛋，抗 Fel d1 卵黄抗体效价应 $\geq 1:1280000$ ；重组 Fel d4 抗原免疫鸡所产鸡蛋，抗 Fel d4 卵黄抗体效价应 $\geq 1:640000$ 。

5.2.5 卵黄抗体冻干粉，抗 Fel d1 卵黄抗体效价应 $\geq 1:800000$ ，抗 Fel d4 卵黄抗体效价应 $\geq 1:400000$ 。

5.2.6 卵黄抗体提纯液，抗 Fel d1 卵黄抗体效价应 $\geq 1:320000$ ，抗 Fel d4 卵黄抗体效价应 $\geq 1:80000$ 。

5.2.7 清敏猫粮，抗 Fel d1 卵黄抗体效价应 \geq 1:16000，抗 Fel d4 卵黄抗体效价应 \geq 1:8000。

5.2.8 清敏猫粮伴侣，抗 Fel d1 卵黄抗体效价应 \geq 1:640000，抗 Fel d4 卵黄抗体效价应 \geq 1:320000。

5.2.9 清敏喷雾，抗 Fel d1 卵黄抗体效价应 \geq 1:25600，抗 Fel d4 卵黄抗体效价应 \geq 1:6400。

5.2.10 清敏手套湿巾，抗 Fel d1 卵黄抗体效价应 \geq 1:12800，抗 Fel d4 卵黄抗体效价应 \geq 1:3200。

5.3 过程控制

5.3.1 抗原生产，需在无菌环境下进行，约培养 12~14 天，期间需不断补充糖、氨基酸、无机盐等细胞生长所需营养物质，并进行 pH 调节，保证细胞最佳生长环境；细胞密度需达到 2.0×10^7 /ml 左右，活率需达到 98% 及以上；抗原表达量需达到 1.0mg/ml 及以上。

5.3.2 疫苗制备，需严格按照佐剂推荐的制备方法进行，过程无菌，制备的疫苗（1）外观：均匀乳剂；
（2）剂型：为油包水剂型，取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴入冷水表面，除第 1 滴外，均应不扩散；
（3）稳定性：取疫苗 10ml 装于离心管中，以 3000r/min 离心 15min，管底析出的水相应不大于 0.5ml；
（4）黏度：黏度不超过 200cP。

5.3.3 蛋鸡免疫，根据抗原特性和蛋鸡免疫应答特点，按照合理的免疫程序和剂量进行免疫。推荐免疫程序为三次免疫，免疫时间间隔 2 周；每只鸡只免疫一种抗原，免疫剂量为 1mg/只/次。

5.3.4 卵黄冻干，符合效价要求的鸡蛋按不同抗原免疫分组进行卵黄分离，并分别混合均匀，避免室温长时间放置，添加适量食品级防腐剂，使用冻干机直接冻干，冻干后的卵黄应呈黄色、干燥、块状。冻干卵黄进行打粉，打粉后将重组 Fel d1 抗原免疫卵黄粉和重组 Fel d4 抗原免疫卵黄粉按照 6:4 的比例混合均匀，即获得卵黄抗体冻干粉。

5.3.5 卵黄提纯，符合效价要求的鸡蛋按不同抗原免疫分组进行卵黄分离，使用水稀释法进行提纯，收获的提纯液应为淡黄色澄清透明液体。将重组 Fel d1 抗原免疫卵黄提纯液和重组 Fel d4 抗原免疫卵黄提纯液按照 6:4 的比例混合均匀，即获得卵黄抗体提纯液。

5.3.6 卵黄抗体冻干粉按照 1~2% 的比例添加至清敏猫粮，按照 60~80% 的比例添加至猫粮伴侣，各加工环节温度不能超过 65℃。

5.3.7 卵黄抗体提纯液按照 10% 的比例添加至清敏喷雾，按照 5% 的比例添加至手套湿巾，各加工环节 pH 值应控制在 5.0~5.4 之间。

6 检验方法

6.1 抗原检测

6.1.1 抗原纯度、浓度，按照附录 A 的方法检验。

6.1.2 抗原结合活性，按照附录 B 的方法检验。

6.2 抗体效价检测

6.2.1 卵黄、卵黄抗体冻干粉、卵黄抗体提纯液效价检测，按照附录 C 的方法检验。

6.3 产品放行检测

6.3.1 猫粮、猫粮伴侣、喷雾、手套湿巾抗体效价检测，按照附录 D 的方法检验。

7 检验规则

7.1 抽样

按随机抽样原则进行抽样，从每批产品中抽取样品进行检测，样品的规格和数量应满足检验需要。

7.2 判定

每批产品出厂前，均由检验员按标准 6.3 项对其性状及理化指标进行检验，合格后发给合格证方可出厂。检验结果中如有一项指标不符合本标准规定时，可在原批中重新抽样对不符合项进行复验，若复验结果仍不符合本标准规定，则判定该批产品为不合格。

8 使用说明

使用说明随产品一起提供，也可标注到产品或包装上，描述对应产品的具体使用方法。

9 标签、包装、运输、储存、保质期

9.1 标签

标签内容包括：产品名称，规格，原料组成，生产批号，生产日期，生产区可证，保质期，储存方法，使用方法，生产地址，联系方式，注意事项等。

9.2 包装

包装材料符合国家药品包装材料卫生标准的要求。封口严密，包装牢固。

9.3 储存

产品应在常温、避光、干燥仓库内储存，不得与有毒、有害、有异味、易挥发、易腐蚀等物品同库

储存。

9.4 运输

产品运输过程中应防雨、防暴晒、防污染。

9.5 保质期

在符合本标准规定的包装、储存、运输条件下，保质期为 2 年。

附录 A

(规范性)

抗原纯度、浓度 (SEC-HPLC) 检测

A.1 参考方法

参考现行《中华人民共和国兽药典》附录高效液相色谱法 (HPLC) 进行检验。

A.2 材料

A.2.1 仪器设备

高效液相色谱仪、酸度计、分析天平等。

A.2.2 试剂

蛋白标准品混标15-600kDa、Fe1 d1/Fe1 d4抗原工作对照品、0.2M磷酸盐溶液 (pH7.0)。

A.3 检测步骤

A.3.1 准备工作

A.3.1.1 流动相配置

0.2M磷酸盐溶液 (pH7.0): 取磷酸氢二钠43.7g与磷酸二氢钠10.8g, 加入800ml水, 溶解后用2mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至 7.0 ± 0.1 , 定容到1L纯水中, 过滤脱气。

A.3.1.2 色谱柱准备

Sepax Omnix SEC-250, 4.6mm×250mm, 2.5 μ m, 或等效色谱柱。

A.3.1.3 色谱条件

流速为每分钟0.35ml; 洗脱时间35min; 柱温为25°C; 检测波长为280nm; 进样量5 μ l。

A.3.2 实验准备

开启仪器, 用过滤排气后的纯水灌注仪器, 然后换上所用流动相, 排气泡后平衡仪器, 安装色谱柱后调用检测方法平稳基线。

A.3.3 进样

将空白、蛋白标准品、工作对照品及样品按顺序进样。

A.4 结果处理

纯度计算：以面积归一化法计算各样品纯度。

浓度计算：按外标法以峰面积计算样品浓度。

$$\text{纯度}\% = \frac{\text{供试品溶液主峰面积}}{\text{供试品溶液总峰面积}} \times 100\%$$

$$\text{浓度} = \frac{\text{对照品浓度} \times \text{供试品溶液总峰面积}}{\text{工作对照品溶液总峰面积}}$$

附录 B

(规范性)

抗原鉴别 (SDS-PAGE、Western Blot) 检验

B.1 材料

B.1.1 仪器设备

垂直蛋白电泳仪、半干转印仪、化学发光成像系统等。

B.1.2 试剂

4-20%聚丙烯酰胺预制凝胶、BeyoECL Moon (极超敏ECL化学发光试剂盒)、6F9 anti Fel d1鼠单抗/1A8 anti Fel d4鼠单抗、HRP标记羊抗鼠IgG(H+L)二抗。

B.2 检测步骤

B.2.1 蛋白电泳

B.2.1.1 样品处理

样品经非还原处理后, 10 μ g/孔上样。

B.2.1.2 电泳

调节电压为80V, 上样后电泳至整块胶的中下部, 调节电压至110V, 至蛋白样品条带跑至蛋白胶中下部为止。

B.2.1.3 染色脱色处理及分子量分析

取下胶体放入染色液中进行染色, 染色完成后加入脱色液进行脱色, 脱色完成后置于凝胶成像仪中, 利用Image lab软件进行分子量分析。

B.2.2 Western Blot

B.2.2.1 蛋白电泳与转膜

WB条件与SDS-PAGE法一致, 电泳结束后半干转25V转膜10min。

B.2.2.2 封闭

用5%BSA室温封闭1h。

B.2.2.3 洗膜

用1×TBST清洗4次，每次5min。

B.2.2.4 一抗孵育

用5000倍稀释后的6F9 anti Fel d1鼠单抗/1A8 anti Fel d4鼠单抗室温孵育1h。

B.2.2.5 洗膜

用1×TBST清洗4次，每次5min。

B.2.2.6 二抗孵育

用5000倍稀释后的HRP标记羊抗鼠IgG(H+L)二抗室温孵育1h。

B.2.2.7 洗膜

用1×TBST清洗4次，每次5min。

B.2.2.8 显色

采用适宜的显色方法进行显色，进行目的蛋白Fel d1/Fel d4特异性抗体结合活性分析。

B.3 结果分析

经SDS-PAGE与WB鉴定，Fel d1单体和二聚体非还原分子量分别应在20kDa和40kDa左右/Fel d4非还原分子量应在22kDa左右。

附录 C

(规范性)

卵黄、卵黄抗体冻干粉、卵黄抗体提纯液抗体效价 (ELISA) 检测

C.1 材料

C.1.1 仪器设备

酶标仪、掌上离心机、旋涡振荡器、微孔板恒温振荡器等。

C.1.2 试剂耗材

Fe1 d1/Fe1 d4表达抗原、山羊抗鸡IgY (H+L) 二抗、PBST、封闭液、样品稀释液、终止液、TMB显色液、酶标板等。

C.2 检测步骤

C.2.1 包板

Fe1 d1/Fe1 d4表达抗原稀释至合适浓度后，加入酶标板4℃包被过夜。

C.2.2 洗板

0.1%PBST，洗板3~5次。

C.2.3 封闭

将封闭液加入到96孔板中，37℃孵育1h。

C.2.4 洗板

0.1%PBST，洗板3~5次。

C.2.5 加样

C.2.5.1 卵黄样品处理

卵黄搅拌混合均匀后，利用样品稀释液稀释至最高点稀释度（40000倍稀释），接着2倍系列稀释10个点。

C.2.5.2 卵黄抗体冻干粉样品处理

取一个50ml离心管，往里加入1g卵黄粉后加入10ml样品稀释液（相当于对样品做10倍稀释），泡发30min后，混合均匀，利用样品稀释液稀释至最高点稀释度（100000倍稀释），接着2倍系列稀释10个点。

C.2.5.3 卵黄抗体提纯液样品处理

卵黄提纯液利用样品稀释液稀释至最高点稀释度（10000倍稀释），接着2倍系列稀释10个点。

C.2.5.4 阳性对照处理

阳性对照混匀后利用样品稀释液稀释至最高点稀释度（10000倍稀释），接着2倍系列稀释10个点。

C.2.6 洗板

0.1%PBST，洗板3~5次。

C.2.7 加二抗

将山羊抗鸡IgY(H+L)二抗利用样品稀释液进行适当倍数稀释后，加入酶标板37℃孵育1h。

C.2.8 洗板

0.1%PBST，洗板3~5次。

C.2.9 显色

100 μ l/孔加入TMB显色液，室温孵育显色15min。

C.2.10 终止反应并读数

100 μ l/孔加入终止液终止反应，用酶标仪在450nm处读取吸光值。

C.3 结果处理

C.3.1 试验成立条件

- ①抗Fel d1卵黄抗体阳性对照效价测值结果位于1:640000~1:1280000区间；
- ②抗Fel d4卵黄抗体阳性对照效价测值结果位于1:160000~1:320000区间；
- ③阴性对照（稀释液）OD450值 \leq 0.15。

T/CVDA XXXXX—XXXX

C.3.2 效价计算方法

样本孔OD450值大于稀释液孔OD450均值2倍的最大稀释倍数=受检样品效价。

附录 D

(规范性)

猫粮、猫粮伴侣、喷雾、手套湿巾抗体效价 (ELISA) 检测

D.1 材料

D.1.1 仪器设备

酶标仪、掌上离心机、旋涡振荡器、微孔板恒温振荡器等。

D.1.2 试剂耗材

Fe1 d1/Fe1 d4表达抗原、山羊抗鸡IgY (H+L) 二抗、PBST、封闭液、样品稀释液、终止液、TMB显色液、酶标板等。

D.2 检测步骤

D.2.1 包板

Fe1 d1/Fe1 d4表达抗原稀释至合适浓度后，加入酶标板4℃包被过夜。

D.2.2 洗板

0.1%PBST，洗板3~5次。

D.2.3 封闭

将封闭液加入到96孔板中，37℃孵育1h。

D.2.4 洗板

0.1%PBST，洗板3~5次。

D.2.5 加样

D.2.5.1 猫粮样品处理

取一个250ml容器，加入10g猫粮和90ml样品稀释液（相当于对样品进行10倍稀释），泡发30min后，利用玻璃棒捣碎，混合均匀，取1.5ml上清1000rpm离心5min，再次取上清，利用样品稀释液稀释至最高点稀释度（1000倍稀释），接着2倍系列稀释10个点。

T/CVDA XXXXX—XXXX

D.2.5.2 猫粮伴侣样品处理

取一个50ml离心管，加入1g伴侣和9ml样品稀释液（相当于对样品进行10倍稀释），泡发30min后，混合均匀，取1.5ml上清1000rpm离心5min，再次取上清，利用样品稀释液稀释至最高点稀释度（40000倍稀释），接着2倍系列稀释10个点。

D.2.5.3 喷雾样品处理

将样品颠倒混匀后取出1ml待检，利用样品稀释液稀释至最高点稀释度（400倍稀释），接着2倍系列稀释10个点。

D.2.5.4 手套湿巾样品处理

带上干净的实验手套把手套湿巾中的液体挤出，取1ml作为待检样品，利用样品稀释液稀释至最高点稀释度S₂（200倍稀释），接着分别2倍系列稀释10个点。

D.2.5.5 阳性对照处理

阳性对照混匀后利用样品稀释液稀释至最高点稀释度（10000倍稀释），接着2倍系列稀释10个点。

D.2.6 洗板

0.1%PBST，洗板3~5次。

D.2.7 加二抗

将山羊抗鸡IgY(H+L)二抗利用样品稀释液进行适当倍数稀释后，加入酶标板37℃孵育1h。

D.2.8 洗板

0.1%PBST，洗板3~5次。

D.2.9 显色

100μl/孔加入TMB显色液，室温孵育显色15min。

D.2.10 终止反应并读数

100μl/孔加入终止液终止反应，用酶标仪在450nm处读取吸光值。

D.3 结果处理

D.3.1 试验成立条件

- ①抗Fel d1卵黄抗体阳性对照效价测值结果位于1:640000~1:1280000区间；
- ②抗Fel d4卵黄抗体阳性对照效价测值结果位于1:160000~1:320000区间；
- ③阴性对照（稀释液）OD450值 \leq 0.15。

C.3.2 效价计算方法

样本孔OD450值大于稀释液孔OD450均值2倍的最大稀释倍数=受检样品效价。
