



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109490457 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811395731.5

(22)申请日 2018.11.22

(71)申请人 浙江省海洋水产研究所

地址 316021 浙江省舟山市定海区临城体育路28号

(72)发明人 张小军 陈思 严忠雍

(74)专利代理机构 杭州仁杰专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33297

代理人 胡寅旭

(51)Int.Cl.

G01N 30/88(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种免疫亲和柱,尤其是涉及一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法,通过筛选出对DA毒素具特异性的抗体从而制得一种高性能、强识别的DA单克隆抗体免疫亲和柱,得到的DA单克隆抗体免疫亲和柱可应用于不同海洋生物中DA毒素的分析测定,有效解决前处理中样品净化不理想的问题,并减少样品基质干扰,缩短分析时间,提高方法回收率,填补免疫亲和技术在DA毒素检测领域的空白。本发明还提供了一种DA单克隆抗体免疫亲和柱的应用。

1. 一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 合成免疫原

在小烧瓶中依次加入10mg的牛血清白蛋白,2mL 0.05M、pH7.4的乙酸钠缓冲液,1mg的软骨藻酸,60μL质量浓度为37%的甲醛溶液,混匀,37℃搅拌48h,然后用0.1M、pH7.3的PBS缓冲液,于4℃透析3天,每天换液2次,得免疫原DA-BSA;

(2) 合成检测原

在小烧瓶中依次加入10mg的鸡卵清白蛋白,2mL 0.05M、pH7.4的乙酸钠缓冲液,1mg的软骨藻酸,60μL质量浓度为37%的甲醛溶液,混匀,37℃搅拌48h,然后用0.1M、pH7.3的PBS缓冲液,于4℃透析3天,每天换液2次,得检测原DA-OVA;

(3) 单克隆抗体制备及纯化

取5只6~8周龄的雌性Balb/c小鼠,背部皮下多点注射DA-BSA,20μg/只,免疫4周后开始加强免疫,每隔2周加强免疫1次;初次免疫时,用免疫原DA-BSA与等体积弗氏完全佐剂乳化,加强免疫时用免疫原DA-BSA与等体积弗氏不完全佐剂乳化,免疫剂量、免疫方式不变;

第2次加强免疫10天后,取小鼠尾静脉血检测,包被检测原DA-OVA,用间接竞争ELISA法检测血清的效价,选择效价最高的BALB/c小鼠用于制备杂交瘤细胞,融合前3天小鼠腹腔加强免疫一次,取效价最高的BALB/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0融合,筛选获得杂交瘤细胞;

BALB/c小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡致敏,8天后向小鼠腹腔内注射 1×10^7 个杂交瘤细胞,10天后开始用注射器从小鼠腹腔抽取腹水,之后每隔1天抽取腹水1次,离心,收集上清液,采用饱和硫酸铵法纯化上清液,再用ProteinG亲和层析法进一步纯化获得DA单克隆抗体;

(4) 亲和柱制备

称取0.5g CNBr活化的溴化氢活化琼脂糖凝胶4B干粉用100mL 1M的HCl溶液溶胀,并洗涤;再用100mL偶联缓冲液洗涤得凝胶;

取1.5mL溶胀后的凝胶,加入1.5mL 10mg/mL的DA单克隆抗体,室温振荡偶联反应2h,抽滤,并用30mL偶联缓冲液洗涤凝胶,抽滤,加入10mL封闭缓冲液,室温振荡反应2h,抽滤,再用100mL 0.01M、pH7.3的PBS缓冲液洗涤凝胶,并转移到5mL柱管中,加入含有质量浓度分别为0.05%硫柳汞、0.05%牛血清白蛋白的0.01M、pH7.3的PBS溶液,于2~8℃储存。

2. 根据权利要求1所述的一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法,其特征在于,步骤(4)中,所述偶联缓冲液的配方为: $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaHCO}_3$, $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaCl}$,pH8.3。

3. 根据权利要求1或2所述的一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法,其特征在于,步骤(4)中,所述封闭缓冲液的配方为: $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{Tris-HCl}$,pH 8.0。

4. 一种如其权利要求1所述的DA单克隆抗体免疫亲和柱在测定软骨藻酸类毒素时的应用。

一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫亲和柱,尤其是涉及一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 记忆缺失性贝毒(ASP)是有毒赤潮硅藻分泌产生的毒素,其主要活性成分软骨藻酸(domoic acid,DA)是一种神经性氨基酸类毒素。该毒素最早是在1987年加拿大爱德华王子岛东海岸因食用紫贻贝而造成的中毒死亡事件中被发现的。中毒者主要表现为腹痛、腹泻、呕吐,并伴有严重的头痛、记忆丧失、意识混乱、昏迷等症状。研究发现,DA主要由多列拟菱形藻产生。贝组织中软骨藻酸含量达到40mg/kg时可引起食用者中毒,150mg/kg时有致死危险,人类通过进食可耐受的最大限量为20mg/kg,加拿大首先制定了安全限量标准为20 μ g/g贝肉,欧洲、日本也相继将该种毒素列为贝类常规检测项目。中国对DA的研究还属于起步阶段,尚缺乏有效的检测手段和监控网络。虽然目前我国检出DA的报道还很罕见,但在中国沿海已经检测到多种产毒的拟菱形藻藻株。考虑到该毒素毒性大、反应快、无解毒剂,开展海洋生物中DA毒素的检测研究对确保水产品安全及人体健康极为重要。

[0003] 免疫亲和柱(IAC)是一种基于抗原抗体反应的新型层析柱,利用特异性抗体对目标毒素的亲合识别和可逆结合特性制作而成,具有高度的选择专一性和良好的吸附净化性能。而目前国内尚未有以免疫亲和柱作为前处理净化手段检测DA毒素的相关报道。

发明内容

[0004] 本发明的发明目的是为提供一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法,通过筛选出对DA毒素具特异性的抗体,制得的免疫亲和柱具有高性能、强识别的特点,可应用于不同海洋生物中DA毒素的分析测定,有效解决前处理中样品净化不理想的问题,并减少样品基质干扰,缩短分析时间,提高方法回收率,填补免疫亲和技术在DA毒素检测领域的空白。

[0005] 本发明还提供了一种DA单克隆抗体免疫亲和柱的应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 本发明的一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1)合成免疫原

[0009] 在小烧瓶中依次加入10mg的牛血清白蛋白,2mL 0.05M、pH7.4的乙酸钠缓冲液,1mg的软骨藻酸,60 μ L质量浓度为37%的甲醛溶液,混匀,37 $^{\circ}$ C搅拌48h,然后用0.1M、pH7.3的PBS缓冲液,于4 $^{\circ}$ C透析3天,每天换液2次,得免疫原DA-BSA。

[0010] (2)合成检测原

[0011] 在小烧瓶中依次加入10mg的鸡卵清白蛋白,2mL 0.05M、pH7.4的乙酸钠缓冲液,1mg的软骨藻酸,60 μ L质量浓度为37%的甲醛溶液,混匀,37 $^{\circ}$ C搅拌48h,然后用0.1M、pH7.3的PBS缓冲液,于4 $^{\circ}$ C透析3天,每天换液2次,得检测原DA-OVA。

[0012] (3)单克隆抗体制备及纯化

[0013] 取5只6~8周龄的雌性Balb/c小鼠,背部皮下多点注射DA-BSA,20 μ g/只,免疫4周后开始加强免疫,每隔2周加强免疫1次;初次免疫时,用免疫原DA-BSA与等体积弗氏完全佐剂乳化,加强免疫时用免疫原DA-BSA与等体积弗氏不完全佐剂乳化,免疫剂量、免疫方式不变;

[0014] 第2次加强免疫10天后,取小鼠尾静脉血检测,包被检测原DA-OVA,用间接竞争ELISA法检测血清的效价,选择效价最高的BALB/c小鼠用于制备杂交瘤细胞,融合前3天小鼠腹腔加强免疫一次,取效价最高的BALB/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0融合,筛选获得杂交瘤细胞;

[0015] BALB/c小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡致敏,8天后向小鼠腹腔内注射 1×10^7 个杂交瘤细胞,10天后开始用注射器从小鼠腹腔抽取腹水,之后每隔1天抽取腹水1次,离心,收集上清液,采用饱和硫酸铵法纯化上清液,再用ProteinG亲和层析法进一步纯化获得DA单克隆抗体。

[0016] (4) 亲和柱制备

[0017] 称取0.5g CNBr活化的溴化氢活化琼脂糖凝胶4B干粉用100mL 1M的HCl溶液溶胀,并洗涤;再用100mL偶联缓冲液洗涤得凝胶;

[0018] 取1.5mL溶胀后的凝胶,加入1.5mL 10mg/mL的DA单克隆抗体,室温振荡偶联反应2h,抽滤,并用30mL偶联缓冲液洗涤凝胶,抽滤,加入10mL封闭缓冲液,室温振荡反应2h,抽滤,再用100mL 0.01M、pH7.3的PBS缓冲液洗涤凝胶,并转移到5mL柱管中,加入含有质量浓度分别为0.05%硫柳汞、0.05%牛血清白蛋白的0.01M、pH7.3的PBS溶液,于2~8 $^{\circ}$ C储存。

[0019] 作为优选,步骤(4)中,所述偶联缓冲液的配方为:0.1mol $\cdot$ L⁻¹NaHCO₃,0.5mol $\cdot$ L⁻¹NaCl,pH8.3。

[0020] 作为优选,步骤(4)中,所述封闭缓冲液的配方为:0.1mol $\cdot$ L⁻¹Tris-HCl,pH 8.0。

[0021] 一种DA单克隆抗体免疫亲和柱在测定软骨藻酸类毒素时的应用。

[0022] 因此,本发明具有如下有益效果:通过筛选出对DA毒素具特异性的抗体,制备一种高性能、强识别的DA毒素免疫亲和柱,得到的DA毒素免疫亲和柱可应用于不同海洋生物中DA毒素的分析测定,从而有效解决前处理中样品净化不理想的问题,并减少样品基质干扰,缩短分析时间,提高方法回收率,填补免疫亲和技术在DA毒素检测领域的空白。

具体实施方式

[0023] 下面通过具体实施方式对本发明做进一步的描述。

[0024] 在本发明中,若非特指,所有百分比均为重量单位,所有设备和原料均可从市场购得或是本行业常用的,下述实施例中的方法,如无特别说明,均为本领域常规方法。

[0025] (一) 仪器和试剂

[0026] ACQUITY超高效液相色谱-串联质谱仪Xevo TQ-S(美国Waters公司);MS2漩涡混合器(德国IKA公司);氮气吹干仪(美国Organomatio公司);Centrifuge5810高速离心机(德国Eppendorf公司);12通道固相萃取装置(美国supelco公司)。

[0027] 软骨藻酸(DA)标准品(纯度 $\geq$ 98.0%,加拿大国家研究委员会);乙腈、甲醇(色谱纯,德国Merck公司);乙酸铵、甲酸(美国Sigma公司);十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、氯化钠、氨水(上海国药集团);实验用水均为超纯水。

[0028] (二) PBS缓冲液配制

[0029] 分别称取二水合磷酸二氢钠2.18g,十二水合磷酸氢二钠12.90g,氯化钠8.50g,用水溶解并定容至1000mL。

[0030] (三) 25 μ g/mL软骨藻酸(DA)标准溶液

[0031] 准确移取适量的软骨藻酸标准品溶液,用甲醇稀释定容至50mL,-20℃避光保存,保存期限为3个月。

[0032] 实施例

[0033] (a) 合成免疫原

[0034] 在小烧瓶中依次加入10mg的牛血清白蛋白,2mL 0.05M、pH7.4的乙酸钠缓冲液,1mg的软骨藻酸,60 μ L质量浓度为37%的甲醛溶液,混匀,37℃搅拌48h,然后用0.1M、pH7.3的PBS缓冲液,于4℃透析3天,每天换液2次,得免疫原DA-BSA;

[0035] (b) 合成检测原

[0036] 在小烧瓶中依次加入10mg的鸡卵清白蛋白,2mL 0.05M、pH7.4的乙酸钠缓冲液,1mg的软骨藻酸,60 μ L质量浓度为37%的甲醛溶液,混匀,37℃搅拌48h,然后用0.1M、pH7.3的PBS缓冲液,于4℃透析3天,每天换液2次,得检测原DA-OVA;

[0037] (c) 单克隆抗体制备及纯化

[0038] 取5只6~8周龄的雌性Balb/c小鼠,背部皮下多点注射DA-BSA,20 μ g/只,免疫4周后开始加强免疫,每隔2周加强免疫1次;初次免疫时,用免疫原DA-BSA与等体积弗氏完全佐剂乳化,加强免疫时用免疫原DA-BSA与等体积弗氏不完全佐剂乳化,免疫剂量、免疫方式不变;

[0039] 第2次加强免疫10天后,取小鼠尾静脉血检测,包被检测原DA-OVA,用间接竞争ELISA法检测血清的效价,选择效价最高的BALB/c小鼠用于制备杂交瘤细胞,融合前3天小鼠腹腔加强免疫一次,取效价最高的BALB/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0融合,筛选获得杂交瘤细胞;

[0040] BALB/c小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡致敏,8天后向小鼠腹腔内注射 1×10^7 个杂交瘤细胞,10天后开始用注射器从小鼠腹腔抽取腹水,之后每隔1天抽取腹水1次,离心,收集上清液,采用饱和硫酸铵法纯化上清液,再用ProteinG亲和层析法进一步纯化获得DA单克隆抗体;

[0041] (d) 亲和柱制备

[0042] 称取0.5g CNBr活化的溴化氢活化琼脂糖凝胶4B干粉用100mL 1M的HCl溶液溶胀,并洗涤;再用100mL偶联缓冲液洗涤得凝胶,偶联缓冲液的配方为:0.1mol $\cdot$ L⁻¹NaHCO₃, 0.5mol $\cdot$ L⁻¹NaCl, pH8.3;

[0043] 取1.5mL溶胀后的凝胶,加入1.5mL 10mg/mL的DA单克隆抗体,室温振荡偶联反应2h,抽滤,并用30mL偶联缓冲液洗涤凝胶,偶联缓冲液的配方为:0.1mol $\cdot$ L⁻¹NaHCO₃, 0.5mol $\cdot$ L⁻¹NaCl, pH8.3,抽滤,加入10mL封闭缓冲液,封闭缓冲液的配方为:0.1mol $\cdot$ L⁻¹Tris-HCl, pH8.0,室温振荡反应2h,抽滤,再用100mL0.01M、pH7.3的PBS缓冲液洗涤凝胶,并转移到5mL柱管中,加入含有质量浓度分别为0.05%硫柳汞、0.05%牛血清白蛋白的0.01M、pH7.3的PBS溶液,于2~8℃储存。

[0044] 通过本发明得到的DA单克隆抗体免疫亲和柱在测定软骨藻酸类毒素时的应用方

法为:

[0045] (1) 样品前处理:准确称取已充分均质样品2.00g于50mL具塞离心管中,加入8mL体积浓度为75%的甲醇水溶液,涡旋振荡2min,超声提取10min,7000r/min离心5min,将上清液移至另一50mL离心管中,得一次提取液;再往剩余残渣中加入8mL体积浓度为75%的甲醇水溶液,重复提取一次,得二次提取液;合并一次提取液和二次提取液后定容至20mL,得提取液;移取1mL提取液至另一50mL离心管中,加入5mL PBS缓冲液进行稀释,得待净化的样品液;

[0046] (2) 免疫亲和柱净化:取一DA单克隆抗体免疫亲和柱,待其恢复至室温后去掉亲和柱堵头,放出柱内保存液后,上样品液;上样结束后,用6mL体积浓度50%甲醇水溶液淋洗亲和柱,挤干柱内残留液,并弃去以上全部流出液,最后用3mL含有质量浓度2%氨水的甲醇溶液洗脱,收集的洗脱液于50℃氮气吹干,用1mL初始流动相定容溶解,经0.22μm滤膜过滤后供液相色谱-质谱进行分析;

[0047] 液相色谱条件为:色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(2.1mm×50mm,1.7μm);进样体积2μL;样品室温度10℃;柱温40℃;流速0.2mL/min;流动相A为乙腈,B为含0.1%甲酸的2mmol/L乙酸铵溶液,梯度洗脱:0~1.0min,90%A;1.0~3.0min,90%~10%A;3.0~4.0min,10%A;4.0~4.1min,10%~90%A;4.1~5.5min,90%A;

[0048] 质谱条件为:电喷雾离子源,正离子扫描(Electrospray ionization,ESI⁺);检测方式:多反应监测模式(Multiple Reaction Monitor,MRM);毛细管电压:3.0kV;离子源温度:150℃;脱溶剂气温度:600℃;锥孔气流量:150L/h;脱溶剂气流量:1000L/h;锥孔电压:12V;碰撞能量:16eV;分析物定性离子对:m/z 312.2>248.2;分析物定量离子对:m/z 312.2>266.2。

[0049] 采用上述方法对沿海城市贻贝、毛蚶、泥蚶、扇贝、牡蛎5个品种共计59份贝类进行分析检测,得到的检测结果如表1所示。DA检出率10%,包括5批次扇贝和1批次牡蛎,其中扇贝检出率最高,且DA污染水平在0.9-11.8μg/g不等;牡蛎检出率7%,DA含量为0.07μg/g。

[0050] 表1阳性样品中DA的污染水平

[0051]

品种	DA浓度(μg/g)
扇贝	11.8
扇贝	14.9
扇贝	0.7
扇贝	9.3
扇贝	0.9
牡蛎	0.07

[0052] 由此可知,通过本发明得到的DA单克隆抗体免疫亲和柱具有高性能、强识别的特性,能完全能满足海洋生物中DA毒素的分析测定需要。

[0053] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案,并非对本发明作任何形式上的限制,在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。

专利名称(译)	一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN109490457A	公开(公告)日	2019-03-19
申请号	CN201811395731.5	申请日	2018-11-22
申请(专利权)人(译)	浙江省海洋水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省海洋水产研究所		
[标]发明人	张小军 陈思 严忠雍		
发明人	张小军 陈思 严忠雍		
IPC分类号	G01N30/88 G01N30/06 G01N33/532 G01N33/577		
CPC分类号	G01N30/06 G01N30/88 G01N33/532 G01N33/577 G01N2030/8813		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫亲和柱，尤其是涉及一种DA单克隆抗体免疫亲和柱制备方法，通过筛选出对DA毒素具特异性的抗体从而制得一种高性能、强识别的DA单克隆抗体免疫亲和柱，得到的DA单克隆抗体免疫亲和柱可应用于不同海洋生物中DA毒素的分析测定，有效解决前处理中样品净化不理想的问题，并减少样品基质干扰，缩短分析时间，提高方法回收率，填补免疫亲和技术在DA毒素检测领域的空白。本发明还提供了一种DA单克隆抗体免疫亲和柱的应用。

[0051]

品种	DA浓度 (μg/g)
扇贝	11.8
扇贝	14.9
扇贝	0.7
扇贝	9.3
扇贝	0.9
牡蛎	0.07

[0052] 由此可知,通过本发明得到的DA单克隆抗体免疫亲和柱具有高性能、强识别的特