



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105467120 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201410413740. 8

(22) 申请日 2014. 08. 21

(71) 申请人 江苏美正生物科技有限公司

地址 214135 江苏省无锡市新区菱湖大道
97-1 太湖国际科技园传感网大学科技
园兴业楼 C 区 301 号

(72) 发明人 柳家鹏

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种河豚毒素免疫亲和柱及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种河豚毒素免疫亲和柱及其制备方法,属于水产中毒素检测领域。该免疫亲和纯化柱利用蛋白 G 偶联到琼脂糖凝胶载体上,然后用抗河豚毒素的抗体与琼脂糖上的蛋白 G 偶联。然后再利用交联剂对河豚毒素抗体-蛋白 G-琼脂糖凝胶载体进行交联后装填亲和柱。该免疫亲和柱主要用于对于水产中的河豚毒素的纯化。

1. 一种河豚毒素的免疫亲和柱,其特征在于包含有载体、蛋白 G 和河豚毒素抗体。
2. 根据权利要求 1 中所述的免疫亲和柱,其特征在于蛋白 G 通过化学键偶联在载体上,河豚毒素抗体与蛋白 G 结合后用交联剂交联。
3. 根据权利要求 1 中所述的免疫亲和柱,其特征在于蛋白 G 是基因重组表达的蛋白 G。
4. 根据权利要求 2 中所述的免疫亲和柱,其特征在于所述的蛋白 G 包括按照 GenBank CAA27638.1 序列表达的蛋白 G,以及经过序列优化后表达的蛋白 G。
5. 根据权利要求 3 中所述的免疫亲和柱,其特征在于所述的序列优化的蛋白 G,包括针对大肠杆菌表达进行的蛋白 G 密码子进行优化、对蛋白 G 进行抗体结合区域进行序列改变以增加亲和力以及增加蛋白 G 基因序列中抗体结合区域数量以提高抗体亲和能力。
6. 根据权利要求 1 中所述的免疫亲和柱,其特征在于所述的载体是琼脂糖凝胶。
7. 根据权利要求 6 中所述的免疫亲和柱,其特征在于所述的琼脂糖凝胶包含但不限于溴化氰活化的琼脂糖凝胶、交联的琼脂糖凝胶、聚丙烯酸琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶以及纤维素。
8. 根据权利要求 6 中所述的免疫亲和柱,其特征在于所述的抗河豚毒素抗体包括单克隆 IgG 抗体和多克隆抗体。
9. 一种纯化河豚毒素的免疫亲和柱制备方法,其特征在于
 - 1) 琼脂糖 sepharose4B,加入 0.8M 的 NaOH,30% 的环氧氯丙烷,2mg/ml 的硼氢化钠 NaBH₄,在 25℃ 下摇床反应 8 小时进行活化,或者购买溴化氰活化的 sepharose4B;
 - 2) 每克活化的 sepharose4B 加入 30-200nmol 的蛋白 G,在 0.1M NaHCO₃,0.5M NaCl PH8.8 的缓冲液中,室温偶联 2 小时;或者 4℃ 偶联过夜;
 - 3) 偶联产物用 1M Tris.HCl PH 8.0 室温反应 2 小时;
 - 4) 偶连好的 sepharose-蛋白 G,用 20mM PH7.4 的 PBS 洗涤;
 - 5) 将河豚毒素抗体溶解在同样的 20mM PH7.4 的 PBS 中,每克蛋白 G-sepharose 加入 200nmol-1.2umol 抗体;室温反应 30 分钟;
 - 6) 将河豚毒素抗体-蛋白 G-sepharose 载体用 20mM PBS PH7.4 洗涤,然后加入终浓度 0.2M 的三乙醇胺和 20mM 的二甲基庚二酸酯(DMP),PH8.3. 室温反应 1 小时;
 - 7) 用 20mM PH7.4 的乙醇胺终止反应,用含有 0.01% 硫柳汞的 10mMPBS PH7.4 洗涤河豚毒素抗体-蛋白 G-sepharose 载体,装柱,放于 4℃ 保存。

一种河豚毒素免疫亲和柱及其制备方法

[0001] 技术领域：

本发明涉及一种河豚毒素的免疫亲和柱及其制备方法，属于水产毒素检测领域。

[0002] 背景技术：

河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)是豚鱼类(俗称河豚鱼)、其它多种海洋生物以及蝾螈、火蜥蜴、青蛙、蟾蜍、扁形虫等动物体内含有的一种生物碱(氨基全氢喹唑啉型化合物)，是自然界中所发现的毒性最大的神经毒素之一，其分子式为 $C_{11}H_{17}O_8N_3$ ，分子量为 319，是小分子量、非蛋白质的神经性毒素，其毒性比剧毒的氰化钠还要高 1250 多倍，0.5mg 即可致人于死命。河豚毒素对肠道有局部刺激作用，吸收后迅速作用于神经末梢和神经中枢，阻碍神经传导，从而引起神经麻痹而致死亡。其具体作用机制是通过与钠离子通道受体结合，阻断电压依赖性钠通道，从而阻滞动作电位，导致与之相关的生理活动的阻碍，主要是神经肌肉的麻痹，河豚毒素对呼吸和心血管的抑制是对中枢和外周神经共同作用的结果。河豚毒素的化学性质稳定，一般烹调手段难以破坏，中毒后也缺乏有效的解救措施。因此 TTX 的检测具有非常重要的现实意义。

[0003] TTX 检测技术主要包括以小鼠检测法为代表的生物检测技术；以荧光分光光度法、液相色谱检测法为代表的仪器检测技术。小鼠检测法是利用河豚毒素的毒性特点进行的小鼠毒性检测的方法，方法简便，但定量不准确且重复性差、目标性差，已少用。荧光分光光度法是最早建立的测定 TTX 的仪器方法，操作简便，但灵敏度低、专一性差。高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对样品的适用性广，不受分析对象挥发性和热稳定性的限制，因而弥补了气相色谱法的不足。是定量分析真菌毒素最常用的方法。

[0004] 在使用高效液相色谱检测河豚毒素时，需要先将河豚毒素样品进行净化处理。目前常用的净化处理方法就是固相萃取法，也叫柱层析法。是目前真菌毒素净化使用最广泛的方法。其中，免疫亲和柱方法的分析速度快，灵敏度高，分离效率和回收率高，不需要剧毒的真菌毒素标准物来标定，安全可靠。因而成为最常用的方法。

[0005] 用于目前制备免疫亲和纯化柱的方法大概有：溴化氰活化直接偶联法、环氧氯丙烷法、过碘酸钠法等。这些方法的基本原理都是将载体基质进行化学活化后，将抗体偶联到载体上。但是由于偶联是非特异性的，抗体的任何部位都有可能和载体偶联，方向性是不可控制的。势必影响亲和纯化柱纯化河豚毒素的效率。

[0006] 发明内容：

本发明的目的在于提供一种河豚毒素免疫亲和柱及其制备方法和用途。

[0007] 为了达到上述目的，在本发明中，利用了蛋白 G 的功能，蛋白 G 是一种 G 型链球菌细胞壁上的蛋白，能特异性的与多种动物抗体的 Fc 部位相结合。并且具有很高的亲和力。我们克隆了蛋白 G 的基因序列，并且对其密码子进行了优化、重组后，在大肠杆菌中表达出了与抗体有高亲和力的基因重组蛋白 G。将基因重组的蛋白 G 偶联到载体上后，再将河豚毒素抗体偶联到蛋白 G 上，制备出了河豚毒素—蛋白 G—载体，再用交联剂将载体进行交联。交联后的载体装柱后就形成了高亲和力的河豚毒素免疫亲和柱。该亲和柱操作简便，

纯化河豚毒素效率高。样本经过简单的处理后就可以进行纯化,得到纯度很高的河豚毒素。用于高效液相色谱检测。

[0008] 具体操作如下:

本发明最大的优势就是利用了蛋白 G 与 Ig 抗体特异性结合的特点,IgG 抗体由两条重链和两条轻链构成,抗体分为 Fab 区和 Fc 区,其中,Fab 区是抗原结合的区域。

[0009] 蛋白 G 是链球菌细胞壁上的一种特殊的蛋白,与抗体的 Fc 区域有特异性的结合能力。蛋白 G 与抗体结合后,抗体的 Fab 区域游离在外,不影响抗体的抗原结合能力。经过我们基因优化重组后的蛋白 G,1 个分子的蛋白 G 可以结合 3 个分子的 IgG 抗体,具有很高的抗体亲和力。并且只有抗体能与蛋白 G 结合,其余蛋白均不能与蛋白 G 结合,特异性很高。以此蛋白 G 为基础制备的免疫亲和柱具有特异性好,河豚毒素结合量大,纯化效率高的特点。

[0010] 河豚毒素免疫亲和柱及其制备方法说明如下:

1. 载体活化

选择琼脂糖载体,sepharose4B,以环氧氯丙烷活化法进行活化。

[0011] 取 2% 的预溶胀的琼脂糖凝胶 sepharose4B,用 20 倍体积的蒸馏水充分冲洗,洗去残存的乙醇,用漏斗过滤掉水分。

[0012] 称取滤去水份后的湿凝胶 5 克,加入 7.5 毫升 0.8M 的 NaOH,30% 的环氧氯丙烷 2 毫升,2mg/ml 的硼氢化钠 NaBH₄,5 毫升,在 25℃ 下摇床反应 8 小时。

[0013] 反应后,用大量的蒸馏水洗涤,去除凝胶中混杂的环氧氯丙烷。

[0014] 2. 将蛋白 G 与活化载体 sepharose4B 的偶联

将活化好的琼脂糖凝胶 sepharose4B 用偶联缓冲液(0.1M 的 NaHCO₃,0.8M NaCl,PH8.9)洗涤 3 次。加入 2mg/ml 的蛋白 G,室温偶联 4 小时。

[0015] 将偶联好的琼脂糖载体用 20mM, PH7.4 的磷酸缓冲液 PBS 洗涤 3 次。偶联有蛋白 G 的琼脂糖载体 sepharose 命名为蛋白 G-sepharose。

[0016] 3. 抗河豚毒素抗体与蛋白 G-sepharose 载体上的蛋白 G 连接

蛋白 G 与抗体具有特异性的亲和力,在一定的反应条件下,将偶联有蛋白 G 的琼脂糖凝胶与抗体进行连接。将抗体连接于琼脂糖上。由于蛋白 G 与抗体的结合部位是抗体的 Fc 区域,抗体的抗原结合区不受影响,充分保证了抗体的抗原结合能力。

[0017] 将抗河豚毒素抗体溶于 20mM、PH7.4 的 PBS 中,终浓度 2mg/ml。将抗体加入用 20mM PH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤过的蛋白 G-sepharose 中。室温结合 30 分钟。

[0018] 结合后的载体用 PBS 洗涤。连接有抗体的载体命名为抗体—蛋白 G—sepharose。

[0019] 4. 载体交联

将抗体—蛋白 G—sepharose 用 0.1M PH9.0 的硼酸缓冲液洗涤 3 次。然后加入 0.1M PH9.0 的硼酸缓冲液,在缓冲液中加入交联剂如庚二亚氨酸二甲酯(DMP)至终浓度 20mM。室温交联 1 小时。

[0020] 加入 50mM, PH9.0 的乙醇胺终止反应。并用 50mM 的乙醇胺封闭 10 分钟。

[0021] 交联后的抗体—蛋白 G—sepharose 载体用 20mM, PH7.4 的 PBS 洗涤 3 次。

[0022] 5. 装柱

将交联后的抗体—琼脂糖载体根据需要装入层析柱中,可根据需要制备不同容量的河豚毒素亲和纯化柱。

与现有技术相比,本发明具有如下优点:

1) 充分的利用了蛋白 G 与 IgG 抗体特异性结合的特性,使抗体通过蛋白 G 偶联到载体上。并且 IgG 抗体的 Fab 片段充分的暴露在外,大幅度提高了河豚毒素的捕捉能力,河豚毒素的纯化效率也得到有效提高。

[0023] 2) 本发明使用了基因改造后的蛋白 G,通过对密码子的优化和 IgG 结合域基因的优化。使蛋白 G 的抗体结合能力大幅度提高,进而提高了河豚毒素的纯化效率。

[0024] 3) 使用本发明纯化河豚毒素操作简便,几步就可以得到纯度较高的河豚毒素,更方便操作者使用。

[0025] 4) 使用本发明得到的河豚毒素纯度很高,后续不用再做别的纯化处理就可以直接用于高效液相色谱检测或者荧光检测,节省了操作者的时间和费用。

具体实施方式

[0026] 实施例:河豚毒素免疫亲和纯化柱的制备

本发明制备河豚毒素免疫亲和纯化柱的一个优选的实施方案如下:

1. 琼脂糖凝胶活化

取 2% 的琼脂糖凝胶 sepharose2B,用 20 倍体积的蒸馏水充分冲洗,洗去残存的乙醇。用漏斗过滤掉水分。称取滤去水份后的湿凝胶 5 克,加入 7.5 毫升 0.8M 的 NaOH,30% 的环氧氯丙烷 2 毫升,2mg/ml 的硼氢化钠 NaBH₄,5 毫升,在 25℃ 下摇床反应 8 小时。

[0027] 反应后,用 50 毫升蒸馏水洗涤,去除凝胶中混杂的环氧氯丙烷。

[0028] 2. 蛋白 G 与活化的琼脂糖凝胶的偶联

取 1 克活化后的琼脂糖凝胶,用偶联缓冲液(0.1M 的 NaHCO₃,0.8M NaCl,PH8.9)洗涤 3 次。加入 2mg/ml 的蛋白 G20ml,室温偶联 4 小时。

[0029] 将偶联好的琼脂糖载体用 20mM, PH7.4 的磷酸缓冲液 PBS 洗涤 3 次。偶联有蛋白 G 的琼脂糖载体 sepharose 命名为蛋白 G-sepharose。

[0030] 3. 抗河豚毒素 IgG 单抗与蛋白 G-sepharose 结合

将抗河豚毒素抗体溶于 20mM、PH7.4 的 PBS 中,终浓度 2mg/ml,总体积 10ml。

[0031] 将蛋白 G-sepharose 用 20mM PH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤三次,每次 30ml。将溶解于 PBS 中的河豚毒素抗体加入洗涤过的蛋白 G-sepharose 中。室温结合 30 分钟。

[0032] 结合后的载体用 20mM PH7.4 的 PBS 洗涤三次,每次 30ml。连接有抗体的载体命名为抗体—蛋白 G—sepharose。

[0033] 4. 结合 IgG 的琼脂糖 sepharose 交联

将抗体—蛋白 G—sepharose 用 0.1M PH9.0 的硼酸缓冲液洗涤 3 次,每次 30ml。

[0034] 将湿凝胶固体,加入 0.1M PH9.0 的硼酸缓冲液 20ml,在缓冲液中加入交联剂庚二亚氨酸二甲酯(DMP)至终浓度 20mM。室温交联 1 小时。

[0035] 加入 100mM, PH9.0 的乙醇胺 20ml 终止反应。并用 50mM 的乙醇胺 20ml 封闭 10 分钟。

[0036] 交联后的抗体—蛋白 G—sepharose 载体用 20mM, PH7.4 的 PBS 洗涤 3 次,每次 30ml。

[0037] 5. 装柱

将交联后的 sepharose 用 10 毫升 20mM PBS PH7.4 重悬,然后装入空的亲和纯化柱柱体中。

专利名称(译)	一种河豚毒素免疫亲和柱及其制备方法		
公开(公告)号	CN105467120A	公开(公告)日	2016-04-06
申请号	CN201410413740.8	申请日	2014-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	江苏美正生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏美正生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏美正生物科技有限公司		
[标]发明人	柳家鹏		
发明人	柳家鹏		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种河豚毒素免疫亲和柱及其制备方法，属于水产中毒素检测领域。该免疫亲和纯化柱利用蛋白G偶联到琼脂糖凝胶载体上，然后用抗河豚毒素的抗体与琼脂糖上的蛋白G偶联。然后再利用交联剂对河豚毒素抗体—蛋白G-琼脂糖凝胶载体进行交联后装填亲和柱。该免疫亲和柱主要用于对于水产中的河豚毒素的纯化。