



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101980019 A

(43) 申请公布日 2011.02.23

(21) 申请号 201010284337.1

(22) 申请日 2010.09.17

(71) 申请人 颜世敢

地址 250100 山东省济南市历城区桑园路
10号

(72) 发明人 朱丽萍 颜世敢 姚强 吕爱杰
赵守山

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

C07K 14/405(2006.01)

C07K 1/18(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种别藻蓝蛋白标记的荧光抗抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)标记的荧光抗抗体的制备方法。制备过程包括:阴离子交换层析法分离纯化螺旋藻 APC,用化学交联剂 SPDP 分别将 APC、抗抗体衍生,两种衍生物再以适宜摩尔比液相交联,经高压液相色谱纯化制备出 APC 标记的荧光抗抗体。本发明制备的荧光抗抗体交联效率高、纯度高、红色荧光明亮、稳定性好、灵敏度高,可作为通用荧光探针用于鸡、猪等动物传染病的间接免疫荧光检测。

1. 一种别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC) 标记的荧光抗抗体的制备方法, 包括: 阴离子交换层析法分离纯化螺旋藻 APC, 分别用摩尔比为 20-50 : 1、50-100 : 1 的化学交联剂 SPDP 将 APC、抗抗体衍生, 抗抗体的 SPDP 衍生物经摩尔比 50-100 : 1 的 DTT 还原获得带 -HS 的抗抗体, 带 -HS 的抗抗体与 APC 的 SPDP 衍生物以摩尔比 1 : 1-2 液相交联, 经 HPLC 纯化制备出荧光抗抗体, 制备的荧光抗抗体得率高、纯度高、稳定性好、荧光呈明亮的红色, 可作为通用荧光探针用于鸡、猪传染病的快速免疫荧光检测。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中 APC 由钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 中分离纯化, 制备过程为: 藻体细胞加入 5 倍体积 (v/w) 20mM 磷酸缓冲液 (pH6.8 ~ 7.0), 反复冻融 3 次, 4°C 10000rpm 离心, 上清液中加入硫酸铵至终浓度为 60% (w/v), 4°C 冰箱放置 24h, 离心, 沉淀溶于 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 中, 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 透析, 透析液经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱层析纯化, 离子交换柱经 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.0, 含 50mM NaCl) 预平衡, 洗脱液为 20mM 醋酸缓冲液 (pH3.6, 含 50mM NaCl), 洗脱速度为 60mL/h, 收集天蓝色液体即为纯化的螺旋藻别藻蓝蛋白, 纯化的螺旋藻 APC 纯度达电泳纯, 纯度指数 $A_{650}/A_{280} > 5$, 结构式为 $(\alpha \beta)_3$, 分子量约为 110kDa, 最大吸收峰位于 650nm, 在 620nm 处有一肩峰, 室温荧光发射峰位于 660nm, 纯化的 APC 硫酸铵沉淀 4°C 避光保存, 使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐, 调整浓度为 5-10mg/mL。

3. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗抗体为抗鸡 IgG 抗体、抗猪 IgG 抗体, 购自 Sigma 公司, 电泳检测纯度达电泳纯, 对流免疫电泳法检测抗抗体具有良好的生物学活性, 使用时用 PBS 透析, 调整蛋白浓度为 5-10mg/ml。

4. 根据权利要求 1 的方法, 其中荧光抗抗体采用化学交联法在液相体系中交联制备, 制备步骤为: 调整 APC、抗抗体的浓度为 5-10mg/ml, 以 DMSO 准确配制 SPDP 母液, 分别用双功能化学交联剂 SPDP 衍生 APC、抗抗体, SPDP 与 APC、抗抗体的摩尔比分别为 20-50 : 1、50-100 : 1, 混匀、铝箔封好后于室温旋转反应 2h, 超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 50-100 : 1 的摩尔比与抗抗体衍生物充分混匀, 室温静置反应 1h, 超滤离心除去多余的 DTT, 抗抗体 -HS 与 APC 衍生物以摩尔比 1 : 1-2 混匀, 铝箔封好后于 20-25°C 振荡反应 20h。加 NEM 封闭多余巯基, 室温旋转反应 60min。

5. 根据权利要求 1 的方法, 其中荧光抗抗体经 HPLC 纯化, 纯化在液相色谱工作站上进行, 液相柱型号 TSK G3000sw (规格 7.5mm×60cm), 流动相为 50mM pH 7.5PBS, 流速 0.5ml/min, 检测波长 190-800nm, 收集洗脱 19.57min 出现的产物峰, 经光谱、电泳、抗体活性检测合格置 4°C 避光保存。

一种别藻蓝蛋白标记的荧光抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC) 标记的荧光抗体的制备方法,属于免疫荧光检测领域。

技术背景

[0002] 免疫荧光检测法是一种历史悠久的标记分析法,兼具抗原、抗体反应的特异性及荧光检测的灵敏性,广泛应用于疾病检测和生物学研究中。免疫荧光检测法的特异性和敏感性依赖于荧光染料、抗体及荧光探针的属性和质量。实际应用时,由于血清和其他生物样品发射波长为 400-600nm 的本底荧光,与常用的 FITC 等传统荧光染料的荧光发射光谱重叠,严重降低荧光检测的灵敏度,造成一段时期内荧光检测法发展缓慢。

[0003] 藻胆蛋白是存在于红藻和蓝藻细胞中的一类水溶性的色素蛋白的总称,是藻类捕光天线复合物的的重要组成部分,能够高效捕获并传递光能。藻胆蛋白分为藻红蛋白 (PE)、藻蓝蛋白(PC)、别藻蓝蛋白 (APC) 和藻红蓝蛋白 (PEC) 四大类,具有水溶性大、无毒性、稳定性好、荧光量子产率高、斯托克位移大、荧光明亮、荧光不易淬灭等优点,是优秀的荧光染料。藻胆蛋白应用于荧光检测,极大地提高了荧光检测的灵敏度,促使多色荧光检测和能量共振转移 (FRET) 荧光探针检测成为现实。

[0004] 别藻蓝蛋白 (APC) 的稳定态为 $(\alpha \beta)_3$,分子量约为 110kDa, $\lambda_{\max} = 620-650\text{nm}$, $E_m = 660\text{nm}$,摩尔消光系数为 $7 \times 10^5 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,荧光量子产率为 68%。APC 是藻胆蛋白中发射荧光波长最大的一类,能够发射明亮的红色荧光,极易与生物物质本底的蓝色或绿色荧光区分,因此 APC 几乎不受生物物质本底荧光影响,荧光检测灵敏度明显提高,APC 的检测灵敏度是 cy5 的 7 倍。APC 是少有的长波长发射的荧光染料,红光激发红光发射,促进了 633nm 氩氦激光器的应用。

[0005] APC 是优秀的发射红色荧光的染料,但由于 APC 分离纯化困难、稳定性差,蛋白质交联时难以定量控制,造成 APC 标记得率低,生产成本低,甚至造成 APC 失活、荧光丧失,限制了这一优秀染料在临床检测中的应用。国内外尚没有 APC 标记荧光抗体应用于动物疫病检测的报道。本发明采用适宜摩尔比的化学交联剂 SPDP 分别将 APC、抗抗体衍生,然后定量交联高效制备了 APC 标记的荧光抗体,可作为通用荧光探针用于鸡或猪传染病的间接免疫荧光检测。

发明内容

[0006] 本发明涉及一种别藻蓝蛋白 (APC) 标记的荧光抗体的制备方法。

[0007] 本发明采用的螺旋藻别藻蓝蛋白 (APC) 是优秀的荧光染料,具有无毒性、水溶性大、荧光明亮且不易淬灭等特点,检测灵敏度显著高于传统的 FITC 等荧光染料。APC 在荧光染料中独树一帜,在波长 550-650nm 的光激发下,APC 能发射明亮的红色荧光,是少有的发射长波长荧光染料,而且 APC 等红色荧光染料的出现促进了 633nm 氩氦激光器在荧光检测中大量应用。

[0008] APC 的组成和晶体结构特点决定了其稳定性低于其它藻胆蛋白,因此交联时控制使用交联剂的浓度是关键,交联剂浓度不仅影响交联得率还影响荧光特性。本发明选择 SPDP 与 APC 和抗抗体的摩尔比分别为 20-50 : 1、50-100 : 1,衍生后的 APC 与抗体以摩尔比 1-2 : 1 交联,制备的 APC 标记的荧光抗抗体交联效率高、纯度高、荧光明亮、抗体活性好、稳定性好。

[0009] 本发明的解决方案如下:

[0010] 别藻蓝蛋白 (APC) 的制备:APC 为采用阴离子交换层析法由钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 中分离纯化。纯化步骤为:藻体细胞加入 5 倍体积 (v/w) 的 20mM 磷酸缓冲液 (pH6.8-7.0),反复冻融 3 次,4℃ 10000rpm 离心,上清液中加入硫酸铵至终浓度为 60% (w/v),4℃ 冰箱放置 24h,离心,沉淀溶于 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 中,用 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 透析,透析液经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱柱层析,离子交换柱经 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.0, 含 50mM NaCl) 预平衡,洗脱液为 20mM 醋酸缓冲液 (pH3.6, 含 50mM NaCl),洗脱速度为 60mL/h,收集天蓝色液体即为纯化的螺旋藻别藻蓝蛋白。纯化的 APC 硫酸铵沉淀 4℃ 避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 5-10mg/mL。

[0011] APC 标记荧光抗抗体的制备:抗抗体 (抗鸡 IgG 抗体、抗猪 IgG 抗体) 购自 Sigma 公司,电泳检测纯度达电泳纯,对流免疫电泳法检测抗抗体具有良好的生物学活性,使用时用 PBS 透析,调整蛋白浓度为 5-10mg/ml。APC 与抗抗体的交联采用蛋白质交联法技术,利用异型双功能交联剂 SPDP 分别在 APC、抗抗体上衍生吡啶二硫基团,然后用 DTT 还原抗抗体的衍生物为其引入游离 -SH,将携带吡啶二硫基的 APC 衍生物与携带巯基的抗抗体按一定摩尔比交联制备荧光抗抗体。SPDP 与 APC、抗抗体的摩尔比分别为 20-50 : 1、50-100 : 1,DTT 与衍生抗体的摩尔比为 50-100 : 1,SPDP 衍生的 APC 与带 -HS 的抗抗体再以摩尔比 1-2 : 1 液相交联制备 APC 标记的荧光抗抗体。

[0012] APC 标记的荧光抗抗体的高效纯化和交联效率分析:液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行荧光抗抗体的纯化和交联效率分析,流动相为 50mM pH7.5 的 PBS,流速 0.5mL/min,检测波长 190-800nm。采用分子筛高压液相色谱柱纯化,液相柱型号为 TSK G3000sw (规格 7.5mm×60cm),荧光标记抗抗体最先被洗脱下来 (附图 1)。收集洗脱峰,进行光谱学、抗体活性、电泳检测。目标产物的洗脱峰面积占所有洗脱峰面积的比例即为交联得率。

[0013] APC 标记荧光抗抗体的光谱检测:吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定,扫描波长区间 250-700nm。吸收光谱检测可判定交联是否成功及交联反应是否导致 APC 变性。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,激发波长 580nm,荧光扫描范围为 600-700nm。APC 标记荧光抗抗体在紫外区的吸光度明显高于对照 APC,吸收峰位置相同,这是因为 APC 表面交联了 280nm 有较强的光吸收的抗抗体分子,而在 450-700nm 区间,交联物的吸收光谱与 APC 的吸收峰及吸光度相似,这是因为抗抗体在此范围内无光吸收。APC 标记光抗抗体与对照 APC 在 580nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 660nm,没有发生斯托克位移改变,仍具有 APC 的特征荧光发射光谱,且荧光亮度无明显降低 (附图 2)。

[0014] APC 标记荧光抗抗体的效价检测:对流免疫电泳法检测 APC 标记荧光抗抗体的免疫学活性。APC 标记荧光抗抗体与鸡 IgG 形成天蓝色免疫沉淀线,不用染色就可清晰地观察到沉淀线的位置 (附图 3)。天蓝色免疫沉淀线的形成进一步说明抗抗体与 APC 交联成功,

同时也说明交联反应对抗抗体的免疫学活性影响不大,交联物仍保留较高的抗体活性。

[0015] APC 标记荧光抗抗体的电泳检测:SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%,218V 恒压电泳。用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后观察结果。SDS-PAGE 电泳发现 APC 标记荧光抗抗体既具有 APC 的 α 、 β 亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带(附图 4),电泳结果证实 APC 与抗抗体交联成功。

[0016] APC 标记荧光抗抗体的稳定性检测:纯化的 APC 标记荧光抗抗体中加入 0.02% 叠氮化钠,4℃ 避光保存,每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价,观察荧光亮度和抗体活性的变化。研制的 APC 标记荧光抗抗体在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃ 保存 60 天,荧光强度保持不变,随后随着保存时间推移荧光强度缓慢降低,但降幅较小。荧光抗抗体 4℃ 保存 90 天抗体效价维持在 5Log₂,随后抗体效价随保存时间推迟而缓慢降低(附图 5)。

[0017] 总之,APC 标记荧光抗抗体发射明亮红色荧光,4℃ 保存 60 天荧光亮度和抗体活性无衰减,可作为通用荧光探针用于鸡、猪等动物传染病的间接免疫荧光检测,省去了直接免疫荧光检测时需要针对每种病原制备荧光标记抗体的麻烦,采用间接免疫荧光抗体即可方便地进行鸡、猪等畜种的传染病的病原的免疫荧光检测,而且抗抗体可具有信号放大功能。

附图说明

[0018] 附图 1 为 APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体的 HPLC 纯化图。液相柱型号为 TSK G3000sw,流动相为 50mM pH7.5 的 PBS,流速 0.5mL/min,APC 标记荧光抗抗体的洗脱时间为 19.57min,抗抗体和 APC 的洗脱时间分别为 27.32、31.26min。

[0019] 附图 2 为 APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体(虚线)及对照 APC(实线)的吸收光谱(A)和荧光光谱(B)。APC 标记荧光抗抗体在紫外区的吸光度明显高于对照 APC,吸收峰位置相同,在 450-700nm 区间,交联物的吸收光谱与 APC 的吸收峰及吸光度相似。APC 标记荧光抗抗体与对照 APC 在 580nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 660nm,没有发生斯托克位移改变,仍具有 APC 的特征荧光发射光谱,且荧光亮度无明显降低。

[0020] 附图 3 为 APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体与鸡 IgG 的对流免疫电泳。APC 标记荧光抗抗体与鸡 IgG 形成天蓝色免疫沉淀线,不用染色就可清晰地观察到沉淀线的位置。

[0021] 附图 4 为 APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体的 SDS-PAGE 电泳。APC 标记荧光抗抗体既具有 APC 的 α 、 β 亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带。

[0022] 附图 5 为不同保存时间的 APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体的荧光亮度(A)和抗体活性(B)。APC 标记荧光抗抗体在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃ 保存 60 天,荧光强度保持不变,随后随着保存时间推移荧光强度缓慢降低。荧光抗抗体 4℃ 保存 90 天抗体效价维持在 5Log₂,随后抗体效价随保存时间推迟而缓慢降低。

具体实施方式

[0023] 实施方式 1:APC 标记的抗鸡 IgG 荧光抗抗体的制备方法

[0024] 别藻蓝蛋白(APC)的制备:APC 由钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中分离纯化。藻体细胞加入 5 倍体积(v/w)20mM 磷酸缓冲液(pH6.8-7.0),反复冻融 3 次,4℃ 10000rpm 离心,上清液中加入硫酸铵至终浓度为 60% (w/v),4℃ 冰箱放置 24h,离心,沉淀溶于 20mM 的磷酸缓冲液(pH7)中,20mM 的磷酸缓冲液(pH7)透析,透析液上 DEAE

Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱柱层析,离子交换柱经 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.0, 含 50mM NaCl) 预平衡,洗脱液为 20mM 醋酸缓冲液 (pH3.6, 含 50mM NaCl),洗脱速度为 60mL/h,收集天蓝色液体即为纯化的螺旋藻别藻蓝蛋白。纯化的螺旋藻 APC 纯度达电泳纯,纯度指数 $A_{650}/A_{280} > 5$,结构式为 $(\alpha \beta)_3$,分子量约为 110kDa,最大吸收峰位于 650nm,620nm 处有一肩峰,室温荧光发射峰位于 660nm,纯化的 APC 硫酸铵沉淀 4℃ 避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 5-10mg/mL。

[0025] APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体的制备:抗鸡 IgG 抗体购自 Sigma 公司,用 20mM 磷酸缓冲液 (pH6.8-7.0) 透析,调整抗体浓度为 8mg/mL。交联过程为:准确称取 SPDP,以 DMSO 溶解配制 SPDP 母液。将 SPDP 按摩尔比分别为 50 : 1、100 : 1 与 APC、抗鸡 IgG 抗体混匀,铝箔封好后于室温旋转反应 2h,超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 100 : 1 的摩尔比与抗抗体衍生物充分混匀,室温静置反应 1h,超滤离心除去多余的 DTT。抗抗体 -HS 与 APC 衍生物以摩尔比 1 : 2 混匀,铝箔封好后于 20-25℃ 振荡反应 20h。用 10mg/ml 的 NEM 溶液 20ul 封闭多余巯基,室温旋转反应 60min。反应中的 NEM 不用除去。

[0026] APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体的纯化和交联效率分析:液相色谱工作站上采用 HPLC 法分析交联效率和纯化,流动相为 50mM PBS pH 7.5,流速 0.5mL/min,检测波长 190-800nm。采用分子筛高压液相色谱柱纯化,液相柱型号 TSK G3000sw(规格 7.5mm×60cm)。洗脱顺序依次为荧光抗抗体、游离的抗抗体、游离的 APC,洗脱时间分别出现在 19.57、27.32、31.26min(附图 1)。收集 19.57min 出现的洗脱峰,即为 APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体。第一个洗脱峰的面积占有所有洗脱峰面积的比例即为交联效率,本法制备的荧光抗抗体的交联效率为 92%。

[0027] APC 标记荧光抗抗体的光谱检测:吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定,扫描波长区间 250-700nm。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,激发波长 580nm,荧光扫描范围为 600-700nm。在紫外区,APC 标记荧光抗抗体的吸光度明显高于对照 APC,吸收峰位置相同,这是因为 APC 表面交联了抗抗体分子,而抗抗体在 280nm 有较强的光吸收;450-600nm 范围内,交联物的吸收光谱与对照 APC 的吸收峰位置及吸光度无差别,因为抗抗体在此范围内无光吸收。通过吸收光谱检测可判定交联成功,同时交联反应没有导致 APC 变性。APC 标记荧光抗抗体与对照 APC 在 580nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 660 nm,具有 APC 的特征荧光发射光谱,没有发生斯托克位移的改变,且荧光亮度无明显降低(附图 2)。

[0028] APC 标记荧光抗抗体的效价检测:对流免疫电泳法检测 APC 标记荧光抗抗体的免疫学活性。取 10-15mL 熔化的 1% 的离子琼脂 (0.03M pH 8.6 的巴比妥缓冲液配制) 趁热倒在电泳板槽中,待冷却后打孔。孔直径约为 4mm,孔间距约为 5mm。打孔后在酒精灯上烘烤背面,使琼脂层与电泳板贴紧。用生理盐水稀释鸡 IgG 为 0.5mg/mL,吸取 20-40uL 注于正极端各孔;用生理盐水稀释 APC 标记荧光抗抗体成 1mg/mL,吸取 20-40uL,注于负极端孔中。在电泳板正、负电极端与电极槽缓冲液间用滤纸搭桥,150V 稳压电泳 4h。APC 标记荧光抗抗体与鸡 IgG 形成天蓝色免疫沉淀线,不用染色就可清晰地观察到沉淀线的位置(附图 3)。天蓝色免疫沉淀线的形成,进一步说明抗抗体成功地与 APC 进行了交联,同时也说明交联反应对抗抗体的免疫学活性影响不大,交联物仍然保留较高的抗体活性。

[0029] APC 标记荧光抗抗体的电泳检测:SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行,分

离胶浓度为 12.5%，浓缩胶浓度为 5%，218V 恒压电泳，用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色。APC 标记荧光抗抗体既具有 APC 的 α 、 β 亚基条带，又具有抗体的 H、L 链条带（附图 4），电泳结果证实 APC 与抗抗体交联成功，且纯度达电泳纯。

[0030] APC 标记荧光抗抗体的稳定性检测：纯化的 APC 标记荧光抗抗体中加入 0.02% 叠氮化钠，4℃ 避光保存，每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价，观察荧光亮度和抗体活性的变化。研制的 APC 标记荧光抗抗体在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃ 保存 60 天，荧光抗抗体的荧光强度保持不变，随后随着保存时间推移荧光强度缓慢降低，但降幅较小。4℃ 保存 90 天，荧光抗抗体的抗体效价维持在 5Log₂，然后抗体效价随着保存时间延长而缓慢降低（附图 5）。

[0031] 实施方式 2：APC 标记的抗猪 IgG 荧光抗抗体的制备方法

[0032] 别藻蓝蛋白 (APC) 的制备：APC 由钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 中分离纯化。藻体细胞加入 5 倍体积 (v/w) 20mM 磷酸缓冲液 (pH6.8-7.0)，反复冻融 3 次，4℃ 10000rpm 离心，上清液中加入硫酸铵至终浓度为 60% (w/v)，4℃ 冰箱放置 24h，离心，沉淀溶于 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 中，20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 透析，透析液上 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱柱层析，离子交换柱经 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.0，含 50mM NaCl) 预平衡，洗脱液为 20mM 醋酸缓冲液 (pH3.6，含 50mM NaCl)，洗脱速度为 60mL/h，收集天蓝色液体即为纯化的螺旋藻别藻蓝蛋白。纯化的螺旋藻 APC 纯度达电泳纯，纯度指数 $A_{650}/A_{280} > 5$ ，结构式为 $(\alpha\beta)_3$ ，分子量约为 110kDa，最大吸收峰位于 650nm，620nm 处有一肩峰，室温荧光发射峰位于 660nm，纯化的 APC 硫酸铵沉淀 4℃ 避光保存，使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐，调整浓度为 5-10mg/mL。

[0033] APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的制备：抗猪 IgG 抗体购自 Sigma 公司，用 20mM 磷酸缓冲液 (pH6.8-7.0) 透析，调整抗体浓度为 10mg/mL。以 DMSO 溶解 SPDP 配制 SPDP 母液，现配现用。将 SPDP 按摩尔比分别为 50 : 1、60 : 1 与 APC、抗猪 IgG 抗体混匀，铝箔封好后于室温旋转反应 2h，超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 60 : 1 的摩尔比与抗抗体衍生物充分混匀，室温静置反应 1h，超滤离心除去多余的 DTT。抗抗体 -HS 与 APC 衍生物以摩尔比 1 : 1 混匀、液相交联，铝箔封好后于 20-25℃ 振荡反应 20h。用 10mg/ml 的 NEM 溶液 20ul 封闭多余巯基，室温旋转反应 60min。反应中的 NEM 不用除去。

[0034] APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的纯化和交联效率分析：液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行交联效率分析和纯化，采用分子筛高压液相色谱柱纯化，液相柱型号 TSK G3000sw (规格 7.5mm×60cm)，流动相为 50mM PBS pH 7.5，流速 0.5mL/min，检测波长 190-800nm。洗脱顺序依次为荧光抗抗体、游离的抗抗体、游离的 APC，洗脱曲线与 APC 标记的抗鸡 IgG 荧光抗抗体（附图 1）基本一致，洗脱峰分别出现在 19.57、27.32、31.26min。这是由于抗鸡 IgG 抗体与抗猪 IgG 抗体分子量相同。收集 19.57min 出现的洗脱峰，即为 APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体。第一个洗脱峰的面积占有所有洗脱峰面积的比例即交联效率为 90%。

[0035] APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的光谱检测：吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定，扫描波长区间 250-700nm。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定，激发波长 580nm，荧光扫描范围为 600-700nm。光谱检测结果与附图 2 相同。APC 标记荧光抗抗体在紫外区的吸光度高于对照 APC，吸收峰位置相同；450-600nm 范围内，交联物的吸收光谱与 APC

的吸收峰及吸光度无差别。通过吸收光谱检测可判定交联成功,且交联反应没有导致 APC 变性。APC 标记荧光抗抗体与对照 APC 在 580nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 660nm,没有发生斯托克位移的改变,仍具有 APC 的特征荧光,且荧光亮度无明显降低。

[0036] APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的效价检测:取 10-15mL 熔化的 1% 的离子琼脂 (0.03M pH 8.6 的巴比妥缓冲液配制)趁热倒在电泳板槽中,待冷却后打孔。孔直径约为 4mm,孔间距约为 5mm。打孔后在酒精灯上烘烤背面,使琼脂层与电泳板贴紧。用生理盐水稀释鸡 IgG 为 0.5mg/mL,吸取 20-40uL 注于正极端各孔;用生理盐水稀释 APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体为 1mg/mL,吸取 20-40uL,注于负极端孔中。在电泳板正、负电极端与电极槽缓冲液间用滤纸搭桥,接通电源,150V 稳压电泳 4h。APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体与猪 IgG 抗体同样形成天蓝色免疫沉淀线,不用染色就可清晰地观察到沉淀线的位置。免疫沉淀线的形成说明抗抗体与 APC 交联成功,同时交联物仍然保留较高的抗体活性。

[0037] APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的电泳检测:SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%。218V 恒压电泳,用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后观察结果。SDS-PAGE 电泳发现 APC 标记荧光抗抗体既具有 APC 的 α 、 β 亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带,表明 APC 与抗猪 IgG 抗体交联成功。

[0038] APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的稳定性检测:纯化的 APC 标记荧光抗抗体中加入 0.02% 叠氮化钠,4℃ 避光保存,每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价。APC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体稳定性与 APC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体相近,4℃ 保存 60 天荧光强度保持不变,随后缓慢降低;4℃ 保存 90 天,荧光抗抗体的抗体效价维持在 5Log₂,然后随着保存时间延长而缓慢降低。

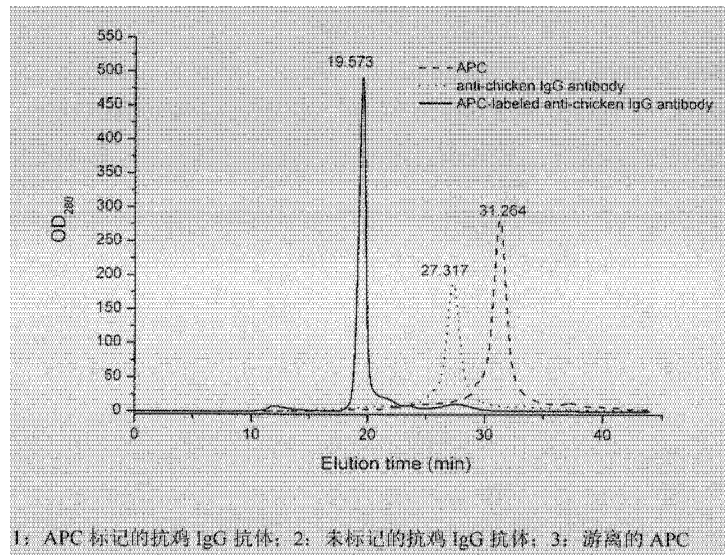


图 1

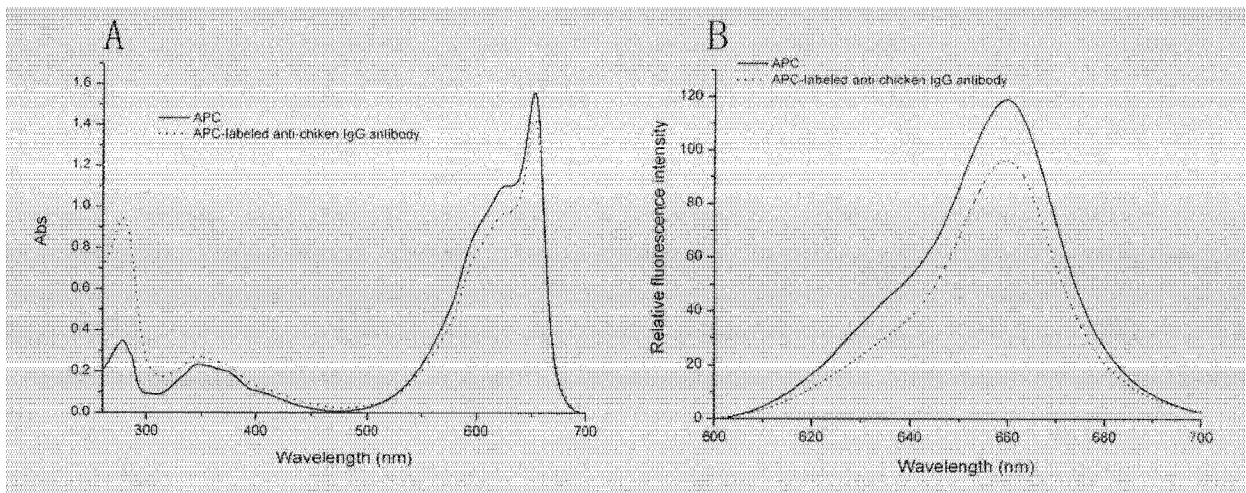


图 2

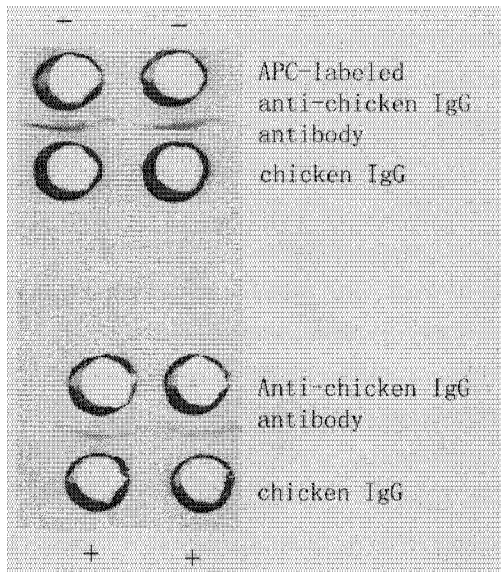


图 3

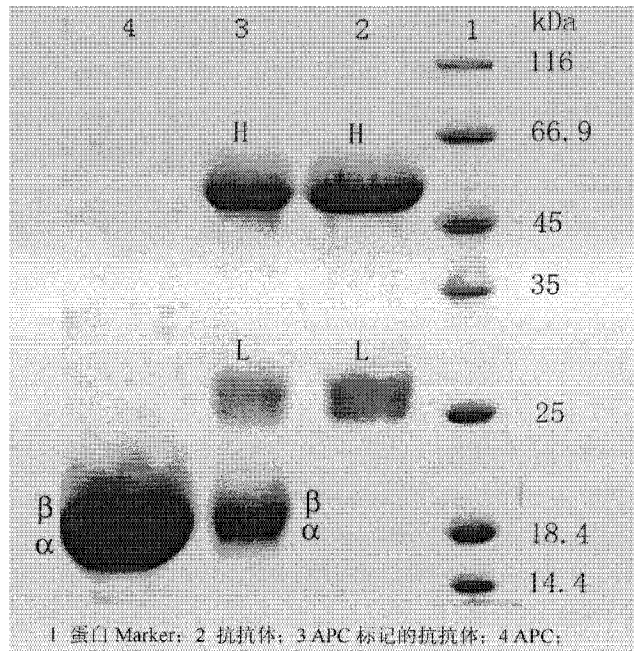


图 4

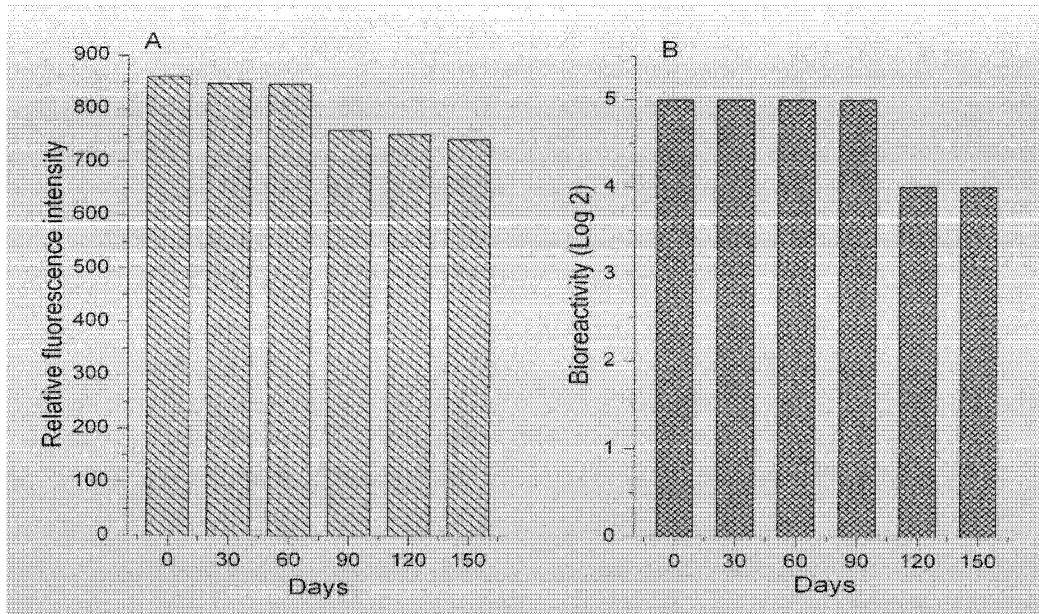


图 5

专利名称(译)	一种别藻蓝蛋白标记的荧光抗抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN101980019A	公开(公告)日	2011-02-23
申请号	CN201010284337.1	申请日	2010-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	颜世敢		
申请(专利权)人(译)	颜世敢		
当前申请(专利权)人(译)	山东轻工业学院		
[标]发明人	朱丽萍 颜世敢 姚强 吕爱杰 赵守山		
发明人	朱丽萍 颜世敢 姚强 吕爱杰 赵守山		
IPC分类号	G01N33/533 C07K14/405 C07K1/18		
其他公开文献	CN101980019B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)标记的荧光抗抗体的制备方法。制备过程包括：阴离子交换层析法分离纯化螺旋藻APC，用化学交联剂SPDP分别将APC、抗抗体衍生，两种衍生物再以适宜摩尔比液相交联，经高压液相色谱纯化制备出APC标记的荧光抗抗体。本发明制备的荧光抗抗体交联效率高、纯度高、红色荧光明亮、稳定性好、灵敏度高，可作为通用荧光探针用于鸡、猪等动物传染病的间接免疫荧光检测。

