



(10) 授权公告号 CN 109824785 B

(45) 授权公告日 2021.03.23

(21) 申请号 201910152481.0

(22) 申请日 2019.02.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109824785 A

(43) 申请公布日 2019.05.31

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 沈建忠 王战辉 江海洋 温凯

史为民 张素霞

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104628825 A, 2015.05.20

AU 3539189 A, 1989.11.24

曹镭沛等.天然产物中毒性多肽的研究进展.《药学与临床研究》.2012,第20卷(第3期),
唐珊珊.剧毒鹅膏环肽毒素的组成、分布及其系统发育意义.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 基础科学辑》.2017,(第2期),

审查员 程静之

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

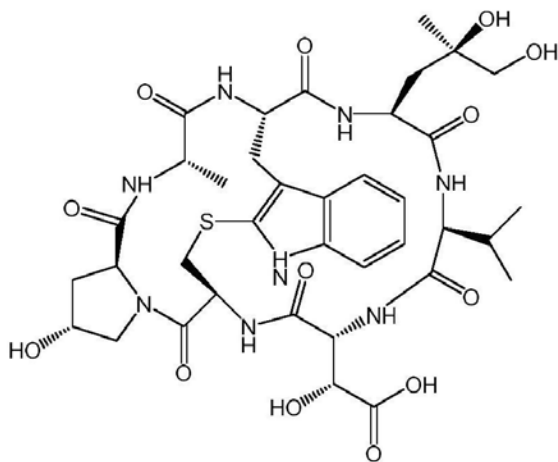
(54) 发明名称

一种二羟鬼笔毒肽人工抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及人工抗原的制备与免疫检测技术领域,具体提供一种二羟鬼笔毒肽人工抗原及其制备方法与应用。所述的二羟鬼笔毒肽人工抗原是由式(I)所示半抗原与载体蛋白偶联得到。

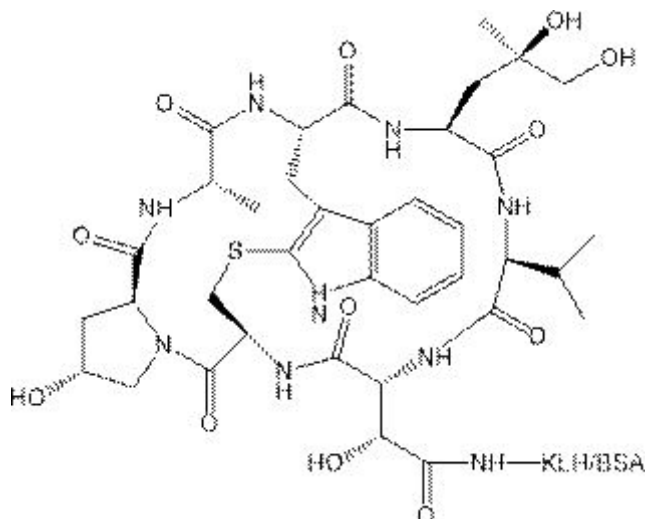
偶联物制备二羟鬼笔毒肽抗体,填补了国内空白,所述抗体制备过程简单、经济、灵敏度高、实用价值高。可用于建立二羟鬼笔毒肽的酶联免疫吸附分析技术,从而快速检测二羟鬼笔毒肽,具有广阔的应用前景。



式(I)

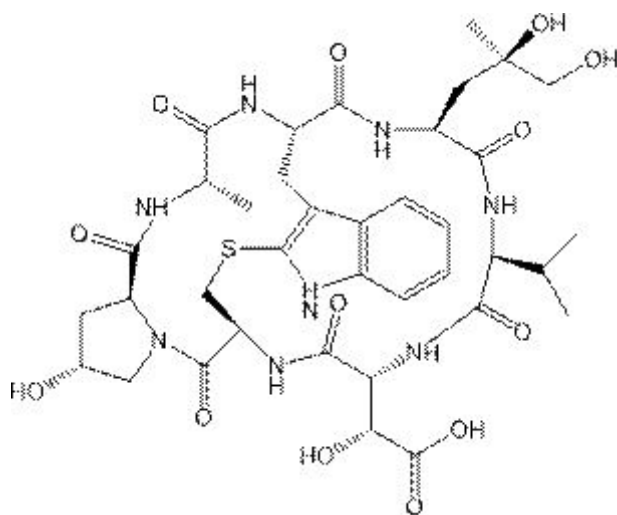
利用本发明提供的二羟鬼笔毒肽与载体蛋白的

1. 一种羧基二羟鬼笔毒肽人工抗原, 其特征在于, 其结构如式(II)所示:



式(II)。

2. 权利要求1所述羧基二羟鬼笔毒肽人工抗原的制备方法, 其特征在于, 将式(I)所述化合物与载体蛋白偶联得到的偶联物即为羧基二羟鬼笔毒肽人工抗原, 所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白,



式(I);

式(I)所述化合物与载体蛋白偶联的摩尔比为3.5:1;

采用活泼酯法使式(I)所述化合物与载体蛋白偶联制得人工抗原。

3. 权利要求1所述的羧基二羟鬼笔毒肽人工抗原的以下任一应用:

①在制备抗羧基二羟鬼笔毒肽特异性抗体中的应用;

②在检测抗羧基二羟鬼笔毒肽特异性抗体中的应用。

一种二羟鬼笔毒肽人工抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于人工抗原的制备与免疫检测技术领域,具体涉及一种二羟鬼笔毒肽人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

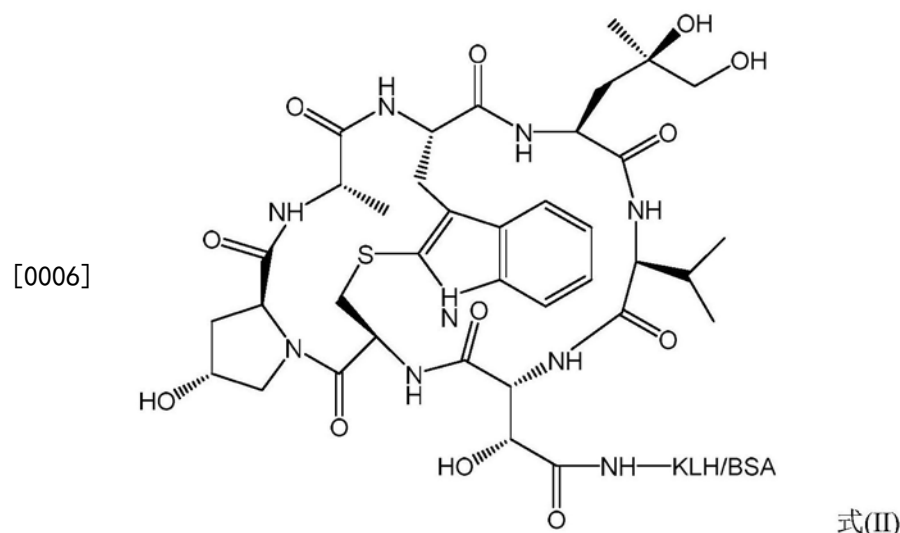
[0002] 毒蘑菇中毒是我国食物中毒事件中导致死亡的主要原因之一。90%以上的蘑菇中毒死亡是由含鹅膏肽类毒素的蘑菇引起,鬼笔毒肽类是鹅膏肽类毒素的一种,为双环七肽,已发现的有7种,结构相似。二羟鬼笔毒肽(Phalloidin,PCD)为其中一种,并占主要成分,与鹅膏毒肽一起存在,对小鼠的致死剂量是50 μ g,对人体也有很强的毒性,中毒后使动物或人的肝脏受损,可引起流涎、呕吐、便血、发绀、痉挛、肌肉挛缩,以致死亡。它同细胞松弛素的作用相反,只与聚合的微丝结合,而不与肌动蛋白单体分子结合。它同聚合的微丝结合后,抑制了微丝的解体,因而破坏了微丝的聚合和解聚的动态平衡。

[0003] 近年来,我国蘑菇中毒事件在云南,湖南,福建,四川等地频频发生,并导致人员死亡,因此制备鬼笔毒肽单克隆抗体,并建立免疫分析方法快速而有效地检测样品中的毒素对于食物中毒的毒源鉴定、蘑菇中毒预防和中毒后的针对性治疗具有重大作用。对保证人类食品安全健康具有重要意义。开发一种简单、快捷、用于检测鬼笔毒肽的抗体显得尤为重要。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种二羟鬼笔毒肽人工抗原及其制备方法与应用。

[0005] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供二羟鬼笔毒肽人工抗原,其结构如式(II)所示:

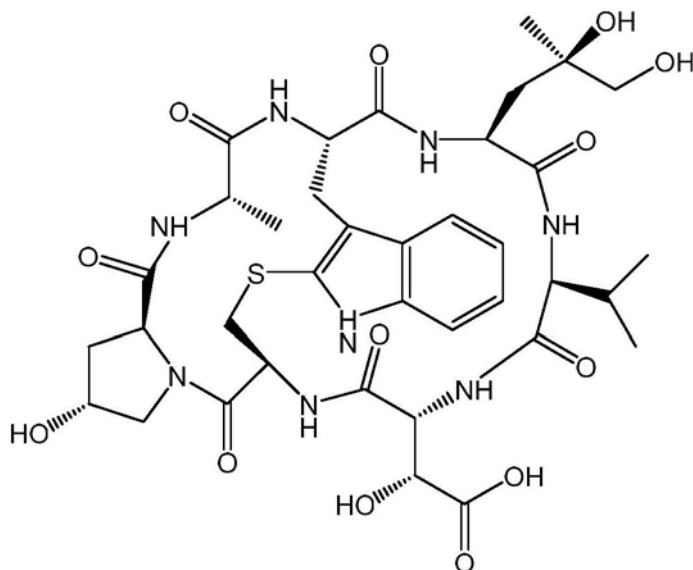


[0007] 第二方面,本发明提供所述人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0008] 将式(I)所述化合物与载体蛋白偶联得到的偶联物即为二羟鬼笔毒肽人工抗原,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优

选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白

[0009]



式 (I)。

[0010] 式 (I) 所述化合物与载体蛋白偶联的摩尔比为3.5:1。

[0011] 本发明是采用活泼酯法 (Active ester method, NHS) 使式 (I) 所述化合物与载体蛋白偶联制得人工抗原。

[0012] 上述方法制得的二羟鬼笔毒肽人工抗原属于本发明的保护范围。

[0013] 本发明所述人工抗原分为免疫原和包被原,免疫原可以是PCD-KLH,包被原可以是PCD-BSA。

[0014] 第三方面,本发明提供由所述二羟鬼笔毒肽人工抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体,优选多克隆抗体。所述多克隆抗体可通过二羟鬼笔毒肽人工抗原免疫实验动物(如小鼠,新西兰大白兔等),收集血清纯化获得。优选地,制备抗体的二羟鬼笔毒肽人工抗原由 (I) 所述化合物与钥孔血蓝蛋白偶联得到。

[0015] 第四方面,本发明提供所述二羟鬼笔毒肽人工抗原的以下任一应用:

[0016] ①在制备抗二羟鬼笔毒肽特异性抗体中的应用;

[0017] ②在检测抗二羟鬼笔毒肽特异性抗体中的应用。

[0018] 第五方面,本发明提供由所述特异性抗体制备的二羟鬼笔毒肽检测试剂或试剂盒。

[0019] 第六方面,本发明提供所述特异性抗体的以下任一应用:

[0020] (1) 在检测二羟鬼笔毒肽中的应用;

[0021] (2) 在制备二羟鬼笔毒肽的免疫层析试纸条中的应用;

[0022] (3) 在制备二羟鬼笔毒肽的胶体金检测试纸条中的应用;

[0023] (4) 在制备二羟鬼笔毒肽ELISA检测试剂盒中的应用。

[0024] 基于上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0025] (一) 本发明首次公开了一种新的二羟鬼笔毒肽人工抗原及其制备方法,用所述二羟鬼笔毒肽人工抗原免疫动物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的二羟鬼笔毒肽人工抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的二羟鬼笔毒肽检

测方法提供了新手段。

[0026] (二) 本发明提供的二羟鬼笔毒肽人工抗原可将二羟鬼笔毒肽的化学结构暴露出来作为抗原决定簇,为高灵敏度抗二羟鬼笔毒肽抗体制备奠定基础。

[0027] (三) 利用本发明提供的二羟鬼笔毒肽人工抗原制备二羟鬼笔毒肽抗体(多克隆抗体),制备过程简单、经济,抗体效价最高可达 4×10^4 ,检测灵敏度为 0.17 ng/mL 、实用价值高,在公共卫生安全检测中具有良好的应用前景。

附图说明

[0028] 图1为PCD-BSA的MALDI-TOF-MS图。

[0029] 图2为采用二羟鬼笔毒肽制作的标准曲线图。

具体实施方式

[0030] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。实施例中所用的PBS缓冲液均为 $\text{pH} 7.4$ 、 0.01 M 的PBS缓冲液。实施例中所用的碳酸盐缓冲液均为 $\text{pH} 9.6$ 、 0.05 mol/L 的碳酸钠缓冲液。

[0031] NHS为N-羟基琥珀酰亚胺的缩写。EDC为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的缩写。DMF为N,N-二甲基甲酰胺的缩写。N-羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐均购自sigma公司。牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum,BSA)购自sigma公司。钥孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin,KLH)购自sigma公司。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自sigma公司。

[0032] 实施例1、二羟鬼笔毒肽人工抗原的制备和表征

[0033] 本实施例所述免疫原与包被原的制备方法中,其区别在于载体蛋白的使用类型,所述免疫原载体蛋白主要采用KLH,所述包被原载体蛋白主要采用BSA,所用偶联方法为活泼酯法。

[0034] 一、二羟鬼笔毒肽包被原的合成和鉴定

[0035] 1、二羟鬼笔毒肽包被原的制备

[0036] (1) 将 3 mg 二羟鬼笔毒肽溶于 1 mL DMF中,加入 5 mg NHS和 5 mg EDC,室温下搅拌过夜,得到溶液I。

[0037] (2) 将 4 mg BSA加入 4 mL PBS缓冲液中,充分溶解,即为溶液II。

[0038] (3) 将溶液I缓慢滴加至溶液II中,缓慢 4°C 搅拌 24 h 后装入透析袋,在生理盐水中 4°C 透析 72 h (中间换水6次),得到二羟鬼笔毒肽包被原溶液, -20°C 保存。二羟鬼笔毒肽包被原简称PCD-BSA。

[0039] 2、二羟鬼笔毒肽包被原的鉴定

[0040] 用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry,MALDI-TOF-MS)法测定PCD-BSA溶液中BSA与半抗原的结合比。结果见图1。

[0041] 结合比 = $\{M(\text{偶联物}) - M(\text{蛋白质})\} / M(\text{半抗原})$

[0042] BSA的分子量为64812.9,半抗原的分子量为846.9。由质谱最高峰值分析偶联物的分子量为67847.5,经计算得出BSA与半抗原的结合比为3.5,即一个BSA分子上平均偶联3.5个半抗原。

[0043] 二、二羟鬼笔毒肽免疫原的合成

[0044] 用KLH代替BSA,其它同步骤一的1。二羟鬼笔毒肽免疫原简称PCD-KLH。

[0045] 实施例2二羟鬼笔毒肽抗血清的制备

[0046] 将实施例1制备的PCD-KLH溶液分别免疫2组3-4月龄,体重1.5-2.0kg的雌性新西兰大白兔,每组2只。将各免疫原用生理盐水稀释至1mg/mL,与等量弗氏佐剂乳化。首免采用弗氏完全佐剂,颈背部皮内多点注射,免疫剂量为1mg/只。4周后进行加强免疫,每隔4周加免1次,共加免3次,佐剂改为弗氏不完全佐剂,免疫剂量不变,改为颈背部皮下多点注射。第4次免疫1周后,用心脏采血的方法大量采血。取血后,将血液37℃静置2h,然后4℃静置过夜,然后3000rpm离心20min,收集上清液,即为抗血清,-20℃分装保存。

[0047] 实施例3二羟鬼笔毒肽抗血清的测定

[0048] 一、采用间接ELISA方法检测抗血清效价,具体操作步骤如下:

[0049] 1) 包被:将实施例1中的抗原PCD-BSA用0.05M、pH9.6碳酸盐缓冲液从10μg/mL开始进行倍比稀释,100μL/孔,37℃反应2h。

[0050] 2) 洗涤:将板内溶液倾去,甩干,并用洗涤液洗涤3次,每次3min。

[0051] 3) 封闭:拍干后,加入200μL/孔封闭液,37℃反应2h。洗涤后烘干备用。

[0052] 4) 加样:将实施例2制得的抗血清从1:1000开始进行倍比稀释,并加入到各种稀释度的包被孔中,100μL/孔,37℃反应1h;充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗兔IgG,100μL/孔,37℃反应1h。

[0053] 5) 显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100μL的TMB显色液,37℃避光反应15min。

[0054] 6) 终止和测定:每孔加入100μL终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的OD₄₅₀值。

[0055] 7) 结果判读:以OD₄₅₀值≥阴性对照孔的2.1倍(即P/N≥2.1)所对应的血清最高稀释倍数即为血清的ELISA效价。

[0056] 二、最低检测限、半数抑制的检测

[0057] 具体操作步骤如下:

[0058] 1) 用上述的间接ELISA方法确定以PCD-BSA作为包被原,以PCD-KLH免疫兔子获得的血清作为抗体,以OD₄₅₀值在1.5左右时所对应的抗原和抗体浓度为最适工作浓度。

[0059] 2) 包被:将包被原用包被缓冲液稀释20000倍,100μL/孔,37℃反应2h。

[0060] 3) 洗涤和封闭:方法操作同上述间接ELISA法。

[0061] 4) 配二羟鬼笔毒肽标准溶液:将二羟鬼笔毒肽标准品用0.01mol/L, pH7.4的PBS溶液配制成5mg/mL的母液,然后,在加样前,再用0.01mol/L, pH7.4的PBS溶液倍比稀释成需要浓度(二羟鬼笔毒肽的浓度分别为0.01ng/mL、0.1ng/mL、1.0ng/mL、5.0ng/mL、10.0ng/mL、100.0ng/mL、1000.0ng/mL)。

[0062] 5) 加样:每孔加入50μL倍比稀释的二羟鬼笔毒肽各浓度标准品,然后再加入50μL/孔最适稀释倍数的抗血清,37℃反应1h。充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗兔IgG,

100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 反应1h。

[0063] 6) 显色反应: 将酶标板取出, 充分洗涤后, 每孔加入100 μ L的TMB显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光反应15min。

[0064] 7) 终止和测定: 每孔加入100 μ L终止液以终止反应, 然后用酶标仪测定各孔的OD₄₅₀值。

[0065] 8) 数据处理: 以二羟鬼笔毒肽各浓度的对数为横坐标, 以二羟鬼笔毒肽各浓度对应的OD值为纵坐标, 使用Origin 8.5软件, 按照四参数对数拟合绘制标准曲线, 如图2所示, 结果显示, 四免后, 兔子抗血清效价可达40000, 检测限为0.17ng/mL, 二羟鬼笔毒肽IC₅₀值(半数抑制浓度)为2.73ng/mL。

[0066] 虽然, 上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述, 但在本发明基础上, 可以对之做一些修改或改进, 这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进, 均属于本发明要求保护的范围。

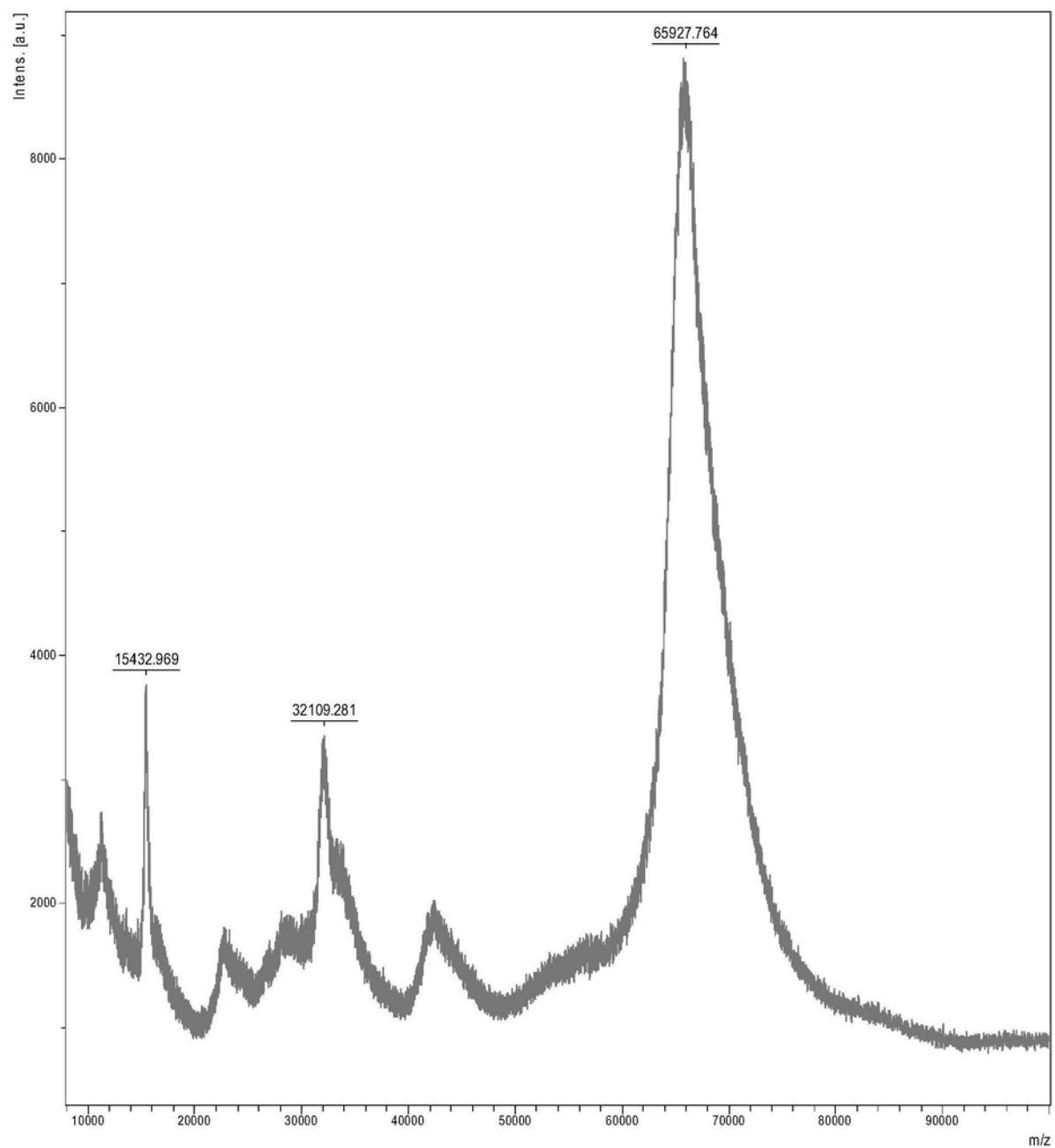


图1

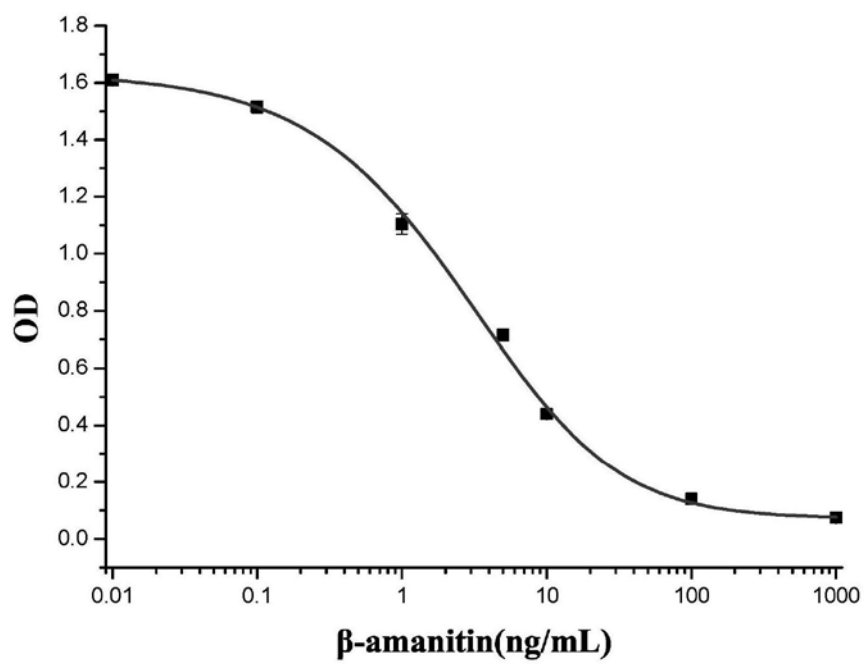


图2