



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112646028 A

(43)申请公布日 2021.04.13

(21)申请号 201910958648.2

(22)申请日 2019.10.10

(71)申请人 石家庄君乐宝乳业有限公司
地址 050000 河北省石家庄市石铜路68号

(72)发明人 王世杰 朱宏

(74)专利代理机构 天津合正知识产权代理有限公司 12229

代理人 郭乐

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/545(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

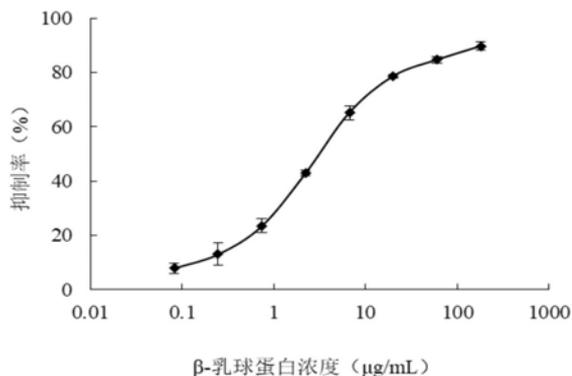
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法
及免疫分析方法

(57)摘要

本发明提供了一种 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法及免疫分析方法,所述制备方法主要过程为 β -乳球蛋白直接免疫新西兰大耳白兔,经过五次免疫后股动脉取全血,获得 β -乳球蛋白抗体血清;通过优化抗体包被量,抗体的稀释倍数,样品缓冲溶液的pH值建立 β -乳球蛋白间接竞争ELISA方法。本发明制备的抗体效价较高,建立的方法灵敏度和特异性较好。



1. 一种 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括免疫过程和抗体纯化过程两个步骤;

其中免疫过程具体方法为:免疫动物选择兔子,免疫原为 β -乳球蛋白,免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初次免疫后进行4次加强免疫,分别位于初次免疫后第2、4、6和8周,第5次免疫后采7-10天取全血,收集血清,冻存备用;

抗体纯化过程,具体包括如下步骤:

1) 将该实验中需要用到所有缓冲液和溶剂都超声10-30min以排除气泡;

2) 平衡纯化柱:首先用pH 7.4的磷酸缓冲液冲洗管路1-2min,流速设定为5.0-8.0mL/min。冲洗管路后让纯化柱内乙醇自行流出,然后将纯化柱与蛋白纯化仪连接好,用pH 7.4的磷酸缓冲液冲洗柱子,流速设定为0.5-1.5mL/min;观察程序屏幕中紫外和电导两条基线变为平行线时,停止冲柱;

3) 上样:取0.5-1.5mL待纯化的 β -乳球蛋白多克隆抗体血清与磷酸缓冲液等体积稀释后上柱,调整流速设置为0.3-0.8mL/min。纯化仪紫外电导图会显示出杂蛋白峰;

4) 洗脱:出现杂蛋白峰后,继续用磷酸缓冲液冲洗柱子,至基线达到平衡后停止。然后用pH 2.7的甘氨酸-盐酸缓冲液冲洗柱子,流速0.3-0.8mL/min,此时与Protein A-Sepharose 4B结合的免疫球蛋白被洗脱下来;

5) 收集:加入洗脱液后,注意仪器紫外电导图线的变化,当基线开始发生变化时开始收集洗脱液,每个收集管收集约1mL液体,直至曲线不发生变化,停止收集;收集液经分光光度计280nm处读数,弃去吸光度值 <0.4 的收集液,将吸光度值 >0.4 的液体混匀后立即用Tris-HCl迅速调节抗体,使其pH至7.0;

6) 处理纯化柱:待抗体纯化结束后,用0.05-0.20mol/L醋酸迅速冲洗柱子1-3min,流速3-8mL/min,然后再用磷酸盐缓冲液平衡柱子,同时用pH试纸测定流出缓冲液的pH值,直到其显示中性为止。最后用质量浓度为20%乙醇溶液冲洗纯化柱20min,并使柱子中充满20%乙醇溶液,封存于4℃;

7) 抗体保存方法:将纯化后的 β -乳球蛋白抗体倒入超滤装置中进行超滤,重复2-3次,最后一次在液体剩余大概4-5mL时停止超滤,取出液体用分光光度计测定吸光度,与等体积的丙三醇混匀,于-20℃冰箱中保存备用;

所述免疫过程具体包括如下步骤:

1) 初次免疫:免疫原与弗氏完全佐剂以1:1的体积混合,经密封性良好的玻璃注射器乳化,进行动物免疫,免疫剂量为1mg/只;

2) 加强免疫:免疫原和弗氏不完全佐剂等体积混合乳化,进行动物免疫,免疫剂量为0.5mg/只;

3) 免疫完成采集的全血先放至室温凝固,后放入4℃冰箱,待血清析出后,收集上清,分装存于-20℃备用。

2. 一种使用如权利要求1所述的制备方法制备的 β -乳球蛋白多克隆抗体的免疫分析方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 包被:用包被液稀释 β -乳球蛋白,将其包被于96孔聚苯乙烯酶标板,100 μ L/孔,4℃孵育12-16h后弃去孔中液体,用PBST洗液洗板3次,每次2min;

2) 封闭:在酶标板酶孔中加入200 μ L封闭液,37℃或室温封闭1h,弃去孔中液体,用PBST

洗液洗板3次,每次2min;

3) 加抗血清:每孔加入100 μ L用PBS稀释的兔抗血清,37 $^{\circ}$ C下孵育1h,用PBST洗液洗板4次,每次2min;

4) 加酶标二抗:辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗用PBS缓冲液稀释20000倍,100 μ L/孔加入酶标板中,室温反应30min后用PBST洗液洗板5次,每次2min;

5) 显色:提前15min吸取底物A恢复室温,加入底物B,混匀;每孔中加入100 μ L,于37 $^{\circ}$ C暗处显色约15-20min;

6) 终止:在每孔中加50 μ L终止液终止反应;

7) 读数:采用450-650nm双波长方式,用酶标仪读取吸光度值;

8) 绘制标准曲线。

使用的溶液配方如下:

包被液:0.05mol/L碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液,pH为9.6:分别准确称取Na₂CO₃ 1.60g,NaHCO₃ 2.91g,加双蒸水定容至1000mL,调节pH至9.6。

底物体系溶液,所述底物体系溶液为TMB-过氧化氢脲溶液,

底物液A:准确称取无水醋酸钠8.20g, β -糊精2.50g,溶解于1000mL的双蒸水中,然后准确称柠檬酸3.23g调节pH至5.0,待所有药品完全溶解后,准确称取过氧化氢脲428.6mg,加入已配制好的溶液中,于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存,使用时需提前15min取出,待恢复至室温方可使用;

底物液B:准确称取100mg TMB溶解于10mL DMSO中,常温棕色瓶暗处保存;

底物液A和底物液B在使用前需混合均匀:分别取10.95mL底物A溶液和0.3375mL底物B溶液;

终止液:1.25mol/L的H₂SO₄溶液。

3. 根据权利要求2所述的免疫分析方法,其特征在于:步骤1)中, β -乳球蛋白的包被量为0.03-0.08 μ g/孔。

一种 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法及免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于大分子蛋白免疫技术领域,尤其是涉及一种 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法及免疫分析方法。

背景技术

[0002] β -乳球蛋白目前是乳清蛋白中过敏原所占比例最高的,在牛奶中含量约为4.0mg/mL。它是一个多肽链,在鲜牛乳中,以相对分子量为36000的二聚体存在,其单体包含162个氨基酸残基,单体分子量约为18kDa,等电点为5.1-5.3。

[0003] 约有80%的人口会出现与 β -乳球蛋白相关的食物过敏。它不存在于母乳中,且胃蛋白酶不能将其消化水解,因此可通过胃肠道进入血液循环,具有强致敏性,作为牛乳中的首要过敏成分,刺激婴儿免疫系统的发生超敏反应。现有的 β -乳球蛋白多为单克隆抗体,对多克隆抗体的研究较少,有必要研发一种多克隆抗体,以提高抗体的灵敏度以及特异性。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明旨在提出一种 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法及免疫分析方法,以提高抗体的灵敏度以及特异性。

[0005] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0006] 一种 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法,包括免疫过程、抗体纯化过程两个步骤;

[0007] 其中所述免疫过程中,免疫动物选择兔子,免疫原为 β -乳球蛋白,免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初次免疫后进行若干次加强免疫,每次加强免疫7-10天后取血测定抗血清效价,最后一次免疫后7-10天后对动物取全血,收集血清,冻存备用。所述抗体纯化过程,是使用纯化柱与蛋白纯化仪实现的。

[0008] 优选的,所述免疫过程中,初次免疫后进行四次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后第2、4和6和8周,5次免疫7-10天后采用股动脉取全血,进行保存。

[0009] 优选的,所述免疫过程具体包括如下步骤:

[0010] 1) 初次免疫:免疫原与弗氏完全佐剂以1:1等体积混合,经密封性良好的玻璃注射器乳化充分,直到免疫原与佐剂完全混匀并呈乳白色状态为止,免疫剂量为1mg/只;

[0011] 2) 加强免疫:免疫原和弗氏不完全佐剂等体积混合乳化,进行动物免疫,免疫剂量为0.5mg/只;

[0012] 3) 免疫完成时将采集到的血液先在室温下凝固2h,然后保存于4℃冰箱中,使血块收缩,待血清析出后,收集分装存于-20℃备用。

[0013] 优选的,所述抗体纯化过程,具体包括如下步骤:

[0014] 1) 将实验中所需的所有缓冲液和溶剂超声20min以排除气泡;

[0015] 2) 平衡纯化柱:先用pH 7.4的磷酸缓冲液冲洗管路1-2min,流速设定为5-8mL/min。让纯化柱内乙醇自行流出后,将纯化柱与蛋白纯化仪连接好,用pH 7.4的磷酸缓冲液

冲洗柱子,流速设定为0.5-1.5mL/min。观察程序屏幕中紫外和电导两条基线变为平行线,即可停止冲柱;

[0016] 3) 上样:取0.5-1.5mL待纯化的抗血清,10000rpm离心10min,温度设定为4℃;上清液过0.45μm的水膜,过膜后的血清与磷酸缓冲液等体积稀释后上柱,在血清样即将进柱的时候,调整流速设置为0.2-0.8mL/min。抗血清中的免疫球蛋白特异性吸附在Protein A-Sepharose 4B的结合位点上,而其他蛋白脂肪等杂质不会被吸附,随缓冲液流出,纯化仪紫外电导图中会显示出杂蛋白峰;

[0017] 4) 洗脱:出现杂蛋白峰后,继续用磷酸缓冲液冲洗柱子,至基线达到平衡后停止;用pH 2.7的甘氨酸-盐酸缓冲液冲洗柱子,流速设定为0.3-0.8mL/min,此时与Protein A-Sepharose 4B结合的免疫球蛋白被洗脱下来;

[0018] 5) 收集:加入洗脱液后,注意仪器紫外电导图线的变化,当基线开始发生变化时就开始收集洗脱液,每收集管收集约1mL液体,直至曲线不发生变化,停止收集;收集液经分光光度计280nm处读数,弃去吸光度值<0.4的收集液,将吸光度值>0.4的液体混匀后立即用Tris-HCl迅速调节抗体,使其pH至7.0,以免抗体中蛋白质在酸性条件下变性;

[0019] 6) 处理纯化柱:待抗体纯化结束后,用0.05-0.20mol/L醋酸迅速冲洗柱子1-3min,流速3-8mL/min,然后再用磷酸盐缓冲液平衡柱子,同时用pH试纸测定流出缓冲液的pH值,直到其显示中性为止;最后用质量浓度为20%乙醇溶液冲洗纯化柱20min,并使柱子中充满20%乙醇溶液,封存于4℃;

[0020] 7) 抗体保存:将纯化后的抗体倒入超滤装置中进行超滤,当超滤容器内液体剩余5mL时倒入pH为7.4的PBS溶液,此过程重复2-3次,最后一次在液体剩余大概4-5mL时停止超滤,取出液体用分光光度计测定吸光度,从而计算浓度,最后与等体积的丙三醇混匀,于-20℃冰箱中保存备用。

[0021] 本发明还提供了一种使用如上所述的制备方法制备的β-乳球蛋白兔多克隆抗体的免疫分析方法,包括如下步骤:

[0022] 1) 包被:将β-乳球蛋白标准溶液用包被液稀释后包被在96孔聚苯乙烯酶标板中,100μL/孔,4℃孵育12-16h后弃去孔中液体,用PBST洗液洗板3次,每次2min;

[0023] 2) 封闭:每孔加入200μL封闭液,37℃或室温封闭1h后弃去孔中液体,用PBST洗液洗板3次,每次2min;

[0024] 3) 加样:每孔加入50μLβ-乳球蛋白标准溶液和50μLβ-乳球蛋白兔多克隆抗体,于37℃烘箱中竞争反应1h,取出用PBST洗液洗板4次,每次2min;

[0025] 4) 加酶标二抗:加入用PBS稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,固定稀释倍数为1:20000,100μL/孔,37℃反应30min后,用PBST洗液洗板5次,每次2min;

[0026] 5) 显色:提前15min将底物液配好置于室温,每孔加入100μL,37℃暗处显色15-20min;

[0027] 6) 终止:每孔中加50μL终止液;

[0028] 7) 读数:用450-650nm的双波长方式,用酶标仪读取吸光度值。

[0029] 8) 绘制标准曲线:抑制率曲线图的X轴为β-乳球蛋白浓度值,Y轴为相应的抑制率,标准曲线是典型的S型曲线,IC₅₀定义为抑制率为50%时对应的β-乳球蛋白浓度。

[0030] 进一步,以上使用的溶液配方如下:

[0031] 包被液:0.05mol/L碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液,pH为9.6:分别准确称取 Na_2CO_3 1.60g, NaHCO_3 2.91g,加双蒸水定容至1000mL,最后调pH至9.6。

[0032] 底物体系溶液(TMB-过氧化氢脲溶液)

[0033] 底物液A:准确称取无水醋酸钠8.20g, β -糊精2.50g,溶解在1000mL的双蒸水中,然后准确称柠檬酸3.23g调节pH至5.0,待所有药品完全溶解后,准确称取过氧化氢脲428.6mg加入已配制好的溶液中。使用时提前15min取出,待恢复至室温。

[0034] 底物液B:准确称取100mg TMB溶解于10mL DMSO中,常温棕色瓶暗处保存。

[0035] 底物液A和底物液B在使用前需混合均匀:分别取10.95mL底物A溶液和0.3375mL底物B溶液。

[0036] 终止液:1.25mol/L的 H_2SO_4 溶液。

[0037] 相对于现有技术,本发明所述的 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法及免疫分析方法,具有以下优势:

[0038] (1)通过本发明所述的 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法制备的抗体效价较高,抑制率较好;

[0039] (2)通过本发明所述的 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法制备的抗体具有较好的特异性和重现性。

[0040] (3)本发明提供的免疫分析方法即间接竞争ELISA方法操作简便、快速、专一,具有较高的灵敏度和特异性,其特异性决定于免疫学反应的特异性,其灵敏度取决于抗体的亲合性。

附图说明

[0041] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0042] 图1为本发明实施例一所述的免疫分析方法中绘制的标准曲线。

具体实施方式

[0043] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0044] 下面将结合实施例来详细说明本发明。

[0045] 实施例1

[0046] 一种 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的制备方法,其特征在于:包括免疫过程、抗体纯化过程两个步骤;

[0047] 其中所述免疫过程中,免疫动物选择兔子,免疫原为 β -乳球蛋白,免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初次免疫后进行4次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后2周、4周和6周和8周,五次免疫7-10天后采用股动脉取全血,进行保存。

[0048] 所述抗体纯化过程,具体包括如下步骤:

[0049] 1)将实验中所需的所有试剂超声20min以排除气泡;

[0050] 2)平衡纯化柱:先用pH 7.4的磷酸缓冲液冲洗管路1-2min,流速设定为6.5mL/min。让纯化柱内乙醇自行流出后,将纯化柱与蛋白纯化仪连接好,用pH 7.4的磷酸缓冲液

冲洗柱子,流速设定为1mL/min。观察程序屏幕中紫外和电导两条基线变为平行线,即可停止冲柱;

[0051] 3) 上样:取1mL待纯化的 β -乳球蛋白兔多克隆抗体血清,10000rpm离心10min,温度设为4℃,上清液过0.45 μ m的水膜,过膜后的血清与磷酸缓冲液等体积稀释后上柱,在血清样即将进柱的时候,调整流速设置为0.5mL/min。抗血清中的免疫球蛋白特异性吸附在Protein A-Sepharose 4B的结合位点上,而其他蛋白脂肪等杂质不会被吸附,随缓冲液流出,纯化仪紫外电导图会显示出杂蛋白峰;

[0052] 4) 洗脱:出现杂蛋白峰后,继续用磷酸缓冲液冲洗柱子,至基线达到平衡后停止;用pH 2.7的甘氨酸-盐酸缓冲液冲洗柱子,流速设为0.5mL/min,此时与Protein A-Sepharose 4B结合的免疫球蛋白被洗脱下来;

[0053] 5) 收集:加入洗脱液后,注意仪器紫外电导图线的变化,当基线开始发生变化时就开始收集洗脱液,每收集管收集约1mL液体,直至曲线不发生变化,停止收集。收集液经分光光度计280nm处读数,弃去吸光度值<0.4的收集液,将吸光度值>0.4的液体混匀后立即用Tris-HCl迅速调节抗体pH至7.0,以免抗体中蛋白质在酸性条件下变性;

[0054] 6) 处理纯化柱:待抗体纯化结束后,用0.1mol/L醋酸迅速冲洗柱子2min,流速5mL/min,然后用磷酸盐缓冲液平衡柱子,同时用pH试纸测定流出缓冲液的pH值,直到其显示中性为止。最后用质量浓度为20%乙醇溶液冲洗纯化柱20min,并使柱子中充满20%乙醇溶液,封存于4℃;

[0055] 7) 抗体保存:将纯化后的抗体倒入超滤装置中进行超滤,当超滤容器内液体剩余5mL时倒入pH为7.4的PBS溶液继续,此过程重复2-3次,最后一次在液体剩余大概4-5mL时停止超滤,取出液体用分光光度计测定吸光度,从而计算浓度,最后与等体积的丙三醇混匀,于-20℃冰箱中保存备用。

[0056] 一种使用如上所述的制备方法制备的 β -乳球蛋白兔多克隆抗体的免疫分析方法,包括如下步骤:

[0057] 1) 包被:将 β -乳球蛋白标准溶液用包被液稀释后包被在96孔聚苯乙烯酶标板,100 μ L/孔,4℃孵育12-16h后弃去孔中液体,用PBST洗液洗板3次,每次2min。

[0058] 2) 封闭:每孔加入200 μ L封闭液,于37℃或室温下封闭1h后弃去封闭液,PBST洗液洗板3次,每次2min;

[0059] 3) 加样:每孔加入50 μ L β -乳球蛋白标准溶液和50 μ L用PBS稀释的兔抗,37℃下竞争反应1h,用PBST洗液洗板4次,每次2min。

[0060] 4) 加酶标二抗:加入PBS稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,固定稀释倍数为1:20000,100 μ L/孔,37℃反应30min后,用PBST洗液洗板5次,每次2min。

[0061] 5) 显色:提前15min将底物液配好置于室温,每孔加入100 μ L,37℃

[0062] 暗处显色15-20min。

[0063] 6) 终止:在每孔中加50 μ L终止液终止反应;

[0064] 7) 读数:采用450-650nm的双波长方式,用酶标仪读取吸光度值。

[0065] 8) 绘制标准曲线:X轴为蛋白浓度值,Y轴为相应的抑制率,标准曲线是典型的S型曲线,IC₅₀定义为抑制率为50%时对应的乳过敏原蛋白的浓度,见图1。

[0066] 使用的溶液配方如下:

[0067] 包被液:0.05mol/L碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液,pH为9.6:分别准确称取 Na_2CO_3 1.60g, NaHCO_3 2.91g,然后加双蒸水定容至1000mL,最后调pH至9.6。

[0068] 底物体系溶液(TMB-过氧化氢脲溶液)

[0069] 底物液A:准确称取无水醋酸钠8.20g, β -糊精2.50g,溶解于1000mL的双蒸水中,然后准确称柠檬酸3.23g调节pH至5.0,待所有药品完全溶解后,准确称取过氧化氢脲428.6mg,并将其加入已配制好的溶液中。于4℃冰箱中保存,使用时需提前15min取出,待恢复至室温方可使用。

[0070] 底物液B:准确称取100mg TMB溶解于10mL DMSO中,常温棕色瓶暗处保存。

[0071] 底物液A和底物液B在使用前需混合均匀:分别取10.95mL底物A溶液和0.3375mL底物B溶液。

[0072] 终止液:1.25mol/L的 H_2SO_4 溶液。

[0073] 灵敏度:在确定的最优条件下,建立了如附图1所示的 β -乳球蛋白间接竞争ELISA方法的标准曲线,从图中可以得出该方法的灵敏度,其半抑制浓度 IC_{50} 值为 $3.08 \pm 0.24 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0074] 特异性:本实验使用卵类黏蛋白抗体对10种日常的易致敏食品的蛋白进行了交叉反应检测,目的是检查抗体的特异性,交叉反应率越小,表明抗体的特异性越好。如表1所示, β -乳球蛋白与其他几种常见的过敏原蛋白没有交叉反应。

[0075] 表1 β -乳球蛋白抗体与其他交叉反应

	过敏原	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	交叉反应率 (%)
[0076]	酪蛋白	193.40	1.59%
	α -乳白蛋白	>30000	<0.01
	花生蛋白	>30000	<0.01
	卵清蛋白	>30000	<0.01
	卵黏蛋白	>30000	<0.01
[0077]	卵转铁蛋白	>30000	<0.01
	溶菌酶	>30000	<0.01
	大豆蛋白	>30000	<0.01
	绿豆蛋白	>30000	<0.01
	芝麻蛋白	>30000	<0.01

[0078] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

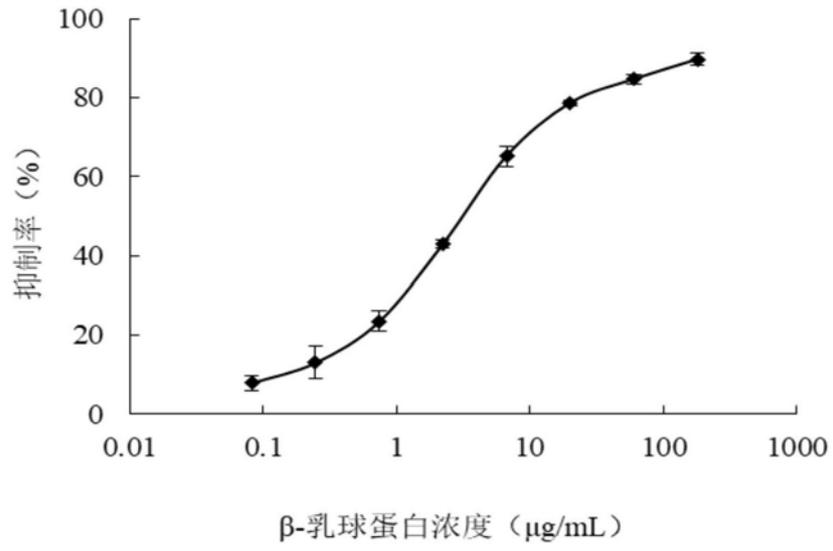


图1