



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102532322 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201110449773. 4

(22) 申请日 2011. 12. 29

(71) 申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号

(72) 发明人 王颖 彭静 李艳玲 徐宁迎

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 杜军

(51) Int. Cl.

C07K 16/40 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

C07K 1/22 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 2 页

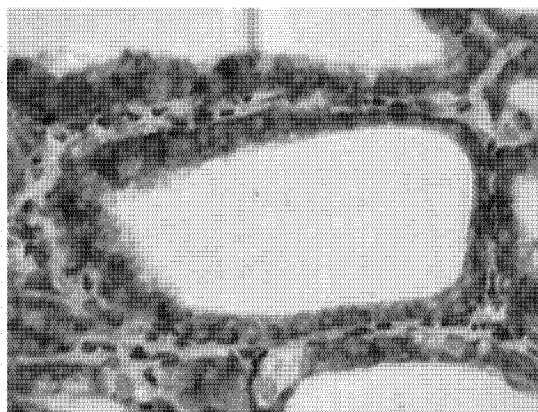
序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备与应用

(57) 摘要

本发明公开了兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备与应用。目前没有兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备, 本发明方法包括以下步骤: 1) TPO 分子 N 端多肽抗原的合成; 2) 兔抗人 TPO 分子多克隆抗体的制备; 3) ELISA 检测抗血清效价; 4) 抗血清的纯化; 5) 多克隆抗体的免疫组化染色。本发明具有特异性好、纯度高的特点, 可与甲状腺细胞的 TPO 蛋白发生特异性结合反应, 可用于免疫组化等试验的要求。



1. 兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备,其特征在于如下步骤:

步骤(1). 经 DNASTar 软件分析后,将猪的 TPO 蛋白 N 端第 95 ~ 113 位 20 个氨基酸作为兔抗猪 TPO 多克隆抗体抗原表位,氨基酸序列如下:

GluThrAlaValGlnGluValLysArgArgValCysArgArgArgAspThrAspGluLeu;

步骤(2). 用多肽自动合成仪化学合成猪的 TPO 多肽并纯化,纯化后与载体蛋白 KLH 偶联,形成猪的 TPO 多肽-KLH 复合蛋白;

步骤(3). 将猪的 TPO 多肽-KLH 复合蛋白乳化,乳化后在兔腹部皮下多点注射,先后注射三次,每次间隔 7 ~ 10 天;

步骤(4). 第三次注射 10 ~ 12 天后,收集、分离得到含有兔抗猪 TPO 多克隆抗体的血清;ELISA 检测血清中兔抗猪 TPO 多克隆抗体的效价;

所述的兔抗猪 TPO 多克隆抗体,其效价在 1:50000 以上;

步骤(5). 将步骤(2)合成并纯化的猪的 TPO 多肽与溴化氰活化的 Sepharose 4B 偶联,制备多肽亲和层析柱;

步骤(6). 将含有兔抗猪 TPO 多肽抗体的血清加入到步骤(5)制备的多肽亲和层析柱中,并在 4℃ 孵育过夜后,洗脱抗体,得到兔抗猪 TPO 多克隆抗体;

所述的步骤(2)猪的 TPO 多肽的纯化,采用 HPLC 对其进行纯化,使猪的 TPO 多肽的纯度达到 95% 以上;

所述的步骤(6)兔抗猪 TPO 多克隆抗体的纯化,采用免疫亲和纯化的方式。

2. 根据权利要求 1 所述的兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备后的应用,其特征在于:该抗体可与猪甲状腺细胞 TPO 蛋白发生特异性结合反应,可用于免疫组化实验的要求。

兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生命科学技术领域,具体涉及一种兔抗猪 TPO (甲状腺过氧化物酶, thyroid peroxidase) 多克隆抗体的制备及应用。

背景技术

[0002] TPO 是一种糖基化血红素蛋白,是催化甲状腺激素合成的关键酶。它参与了两个重要的反应:甲状腺球蛋白酪氨酸残基的碘化和碘化酪氨酸的偶联作用,从而产生 T3 和 T4。TPO 是甲状腺微粒体抗原的重要组成部分之一,与自身免疫性甲状腺疾病的发生、发展密切相关。TPO 不仅在甲状腺细胞表面表达,还在胞浆中表达,是参与补体介导的细胞毒性的细胞表面抗原,具有特殊的免疫学特性。正常时, TPO 不会溢出甲状腺入血,但当甲状腺发生病变时,滤泡细胞结构会受到破坏, TPO 就会由被隔绝于甲状腺滤泡细胞腔边缘向外周血溢漏,并作为 AITD 一种重要自身抗原刺激机体免疫系统产生甲状腺组织成分抗体即 TPO-Ab, 通过激活补体和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用对甲状腺造成免疫性损伤。目前关于猪 TPO 蛋白的抗体尚无商业化产品,限制了对猪 TPO 蛋白生物学功能的深入分析。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种特异性好、纯度高、可与甲状腺细胞的 TPO 蛋白发生特异性结合反应的兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备及应用。

[0004] 本发明的具体实施步骤如下:

步骤 (1). 经 DNASTar 软件分析后, 将猪的 TPO 蛋白 N 端第 95 ~ 113 位 20 个氨基酸作为兔抗猪 TPO 多克隆抗体抗原表位, 氨基酸序列如下:

GluThrAlaValGlnGluValLysArgArgValCysArgArgArgAspThrAspGluLeu。

[0005] 步骤 (2). 用多肽自动合成仪化学合成猪的 TPO 多肽并纯化, 纯化后与载体蛋白 KLH 偶联, 形成猪的 TPO 多肽-KLH 复合蛋白;

步骤 (3). 将猪的 TPO 多肽-KLH 复合蛋白乳化, 乳化后在兔腹部皮下多点注射, 先后注射三次, 每次间隔 7 ~ 10 天;

步骤 (4). 第三次注射 10 ~ 12 天后, 收集、分离得到含有兔抗猪 TPO 多克隆抗体的血清; ELISA 检测血清中兔抗猪 TPO 多克隆抗体的效价;

所述的兔抗猪 TPO 多克隆抗体, 其效价在 1:50000 以上;

步骤 (5). 将步骤 (2) 合成并纯化的猪的 TPO 多肽与溴化氰活化的 Sepharose 4B 偶联, 制备多肽亲和层析柱;

步骤 (6). 将含有兔抗猪 TPO 多肽抗体的血清加入到步骤 (5) 制备的多肽亲和层析柱中, 并在 4℃ 孵育过夜后, 洗脱抗体, 得到兔抗猪 TPO 多克隆抗体;

所述的步骤 (2) 猪的 TPO 多肽的纯化, 采用 HPLC 对其进行纯化, 使猪的 TPO 多肽的纯度达到 95% 以上;

所述的步骤 (6) 兔抗猪 TPO 多克隆抗体的纯化, 采用免疫亲和纯化的方式。

[0006] 兔抗猪 TPO 多克隆抗体应用广泛,可与猪甲状腺细胞 TPO 蛋白发生特异性结合反应,可用于免疫组化等实验的要求。

[0007] 本发明有益效果如下:

本发明制备的抗 TPO 多克隆抗体具有特异性好、纯度高的特点。本发明兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备,为深入研究猪 TPO 蛋白的生物学功能和在甲状腺细胞水平调控猪的生长发育提供了一个重要工具,具有重要的理论意义和生产价值。

附图说明

[0008] 图 1 为本发明在猪甲状腺细胞中的免疫组化染色。

具体实施方式

[0009] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0010] 实施例 1:

兔抗猪 TPO 多克隆抗体的制备步骤如下:

步骤 (1). 经 DNASTar 软件分析后,将猪的 TPO 蛋白 N 端第 95 ~ 113 位 20 个氨基酸作为兔抗猪 TPO 多克隆抗体抗原表位,氨基酸序列如下:

GluThrAlaValGlnGluValLysArgArgValCysArgArgArgAspThrAspGluLeu.

[0011] 步骤 (2). 用多肽自动合成仪化学合成猪的 TPO 多肽并纯化,纯化后与载体蛋白 KLH 偶联,形成猪的 TPO 多肽-KLH 复合蛋白;

步骤 (3). 将猪的 TPO 多肽-KLH 复合蛋白乳化,乳化后在兔腹部皮下多点注射,先后注射三次,每次间隔 7 ~ 10 天;

步骤 (4). 第三次注射 10 ~ 12 天后,收集、分离得到含有兔抗猪 TPO 多克隆抗体的血清;ELISA 检测血清中兔抗猪 TPO 多克隆抗体的效价;

所述的兔抗猪 TPO 多克隆抗体,其效价在 1:50000 以上;

步骤 (5). 将步骤 (2) 合成并纯化的猪的 TPO 多肽与溴化氰活化的 Sepharose 4B 偶联,制备多肽亲和层析柱;

步骤 (6). 将含有兔抗猪 TPO 多肽抗体的血清加入到步骤 (5) 制备的多肽亲和层析柱中,并在 4℃ 孵育过夜后,洗脱抗体,得到兔抗猪 TPO 多克隆抗体;

所述的步骤 (2) 猪的 TPO 多肽的纯化,采用 HPLC 对其进行纯化,使猪的 TPO 多肽的纯度达到 95% 以上;

所述的步骤 (6) 兔抗猪 TPO 多克隆抗体的纯化,采用免疫亲和纯化的方式。

[0012] 兔抗猪 TPO 多克隆抗体的应用步骤如下:

步骤 (1). 取猪甲状腺组织石蜡切片,常规脱蜡入水,0.3% H_2O_2 -甲醇浸泡 30 ~ 40 分钟,PBS 浸洗 3 次后,0.1% 的凝胶封闭,30-60 分钟后除去多余封闭液;

步骤 (2). 加入兔抗猪 TPO 多克隆抗体,37℃ 1 小时或 4℃ 孵育过夜;

步骤 (3). PBS 洗片 3 次,每次 5 分钟,加入羊抗兔 IgG-HRP,37℃ 孵育 1 小时;

步骤 (4). 如图 1 所示,PBS 洗片后进行 DAB 显色,苏木素复染,返蓝后封片镜检,放大 400 倍拍照记录结果。

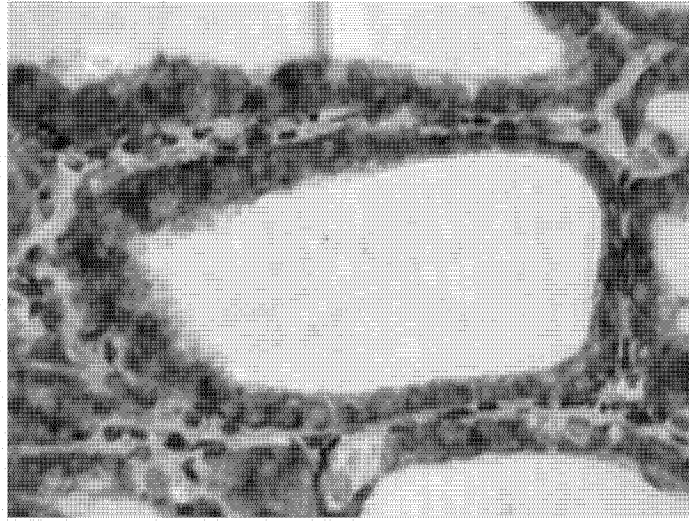


图 1

专利名称(译)	兔抗猪TPO多克隆抗体的制备与应用		
公开(公告)号	CN102532322A	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201110449773.4	申请日	2011-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	王颖 彭静 李艳玲 徐宁迎		
发明人	王颖 彭静 李艳玲 徐宁迎		
IPC分类号	C07K16/40 C07K16/06 C07K11/22 G01N33/53		
代理人(译)	杜军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了兔抗猪TPO多克隆抗体的制备与应用。目前没有兔抗猪TPO多克隆抗体的制备，本发明方法包括以下步骤：1)TPO分子N端多肽抗原的合成；2)兔抗人TPO分子多克隆抗体的制备；3)ELISA检测抗血清效价；4)抗血清的纯化；5)多克隆抗体的免疫组化染色。本发明具有特异性好、纯度高的特点，可与甲状腺细胞的TPO蛋白发生特异性结合反应，可用于免疫组化等试验的要求。

