



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103012583 A

(43) 申请公布日 2013.04.03

(21) 申请号 201210572910.8

(22) 申请日 2012.12.25

(71) 申请人 上海生物芯片有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区李冰路 151 号

申请人 上海友科生物科技有限公司

(72) 发明人 邵钧 吴杨 蔡兴锋

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法

(57) 摘要

本发明涉及一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法。应用本发明的方法,可获得稳定偶联的麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白偶联产物,从而为麻痹性贝毒抗体的制备、麻痹性贝毒 C1&C2 的免疫学检测分析提供有效途径。

1. 一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法,其特征在于,所述方法包括:
 - (1) 将麻痹性贝毒 C1&C2 溶于 pH 值 5.0-6.0 偶联缓冲液中,使麻痹性贝毒 C1&C2 浓度在 1-4mg/ml ;之后加入载体蛋白,使之终浓度 1-40mg/ml ;混匀再加入甲醛,混合反应 60-90 小时;
 - (2) 将 (1) 的反应产物进行透析,获得麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白的偶联产物。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的载体蛋白选自:匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白或卵清蛋白。
3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的载体蛋白是血清白蛋白较佳地,所述的载体蛋白是牛血清白蛋白或人血清白蛋白。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的偶联缓冲液是 pH5 的醋酸钠缓冲液;较佳地,醋酸钠含量 16.4g/L。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的麻痹性贝毒 C1&C2 在偶联缓冲液中的浓度为 2-3mg/ml ;或
加入的载体蛋白的终浓度 2-30mg/ml 。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的甲醛是 37% 甲醛溶液,加入量为偶联缓冲液体积的 1-10% ;较佳地,所述的甲醛溶液加入量为偶联缓冲液体积的 2-6%。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 (1) 包括:将 1mg 麻痹性贝毒 C1&C2 溶解于 500ul pH 值 5.0-6.0 的偶联缓冲液中,加入 1-10mg 载体蛋白,混匀,再加入 37% 甲醛溶液 20ul,混合反应 72 小时 ;和
步骤 (2) 包括:将麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白偶联产物放入透析袋中,用 pH7.2 的 PBS 溶液在 4℃ 透析 72 小时,期间换透析液 3 次。
8. 如权利要求 1-7 任一所述的方法,其特征在于,步骤 (2) 之后,还包括步骤:将透析产物电泳鉴定。
9. 一种麻痹性贝毒与载体蛋白的偶联产物,其特征在于,其由权利要求 1-8 任一所述的方法制备获得。
10. 权利要求 9 所述的麻痹性贝毒与载体蛋白的偶联产物的用途,其特征在于,用于麻痹性贝毒 C1&C2 的抗体的制备 ;或用于水产品中麻痹性贝毒 C1&C2 残留的免疫学方法检测分析。

一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域;更具体地,本发明涉及一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法。

背景技术

[0002] 20 世纪 50 年代以后,海洋赤潮发生频繁,赤潮毒素对人类造成的危害事件也日益增多。目前赤潮中将近有 20 种腰鞭毛虫和少数的硅藻可以产生藻黄素。贝类通过滤食有毒微藻(主要是藻黄素),经过生物累积和放大转化为有机毒素,即贝毒。贝毒危害具有突发性和广泛性,由于其毒性大、反应快、无适宜解毒剂给防治带来了许多困难。因此,开展贝毒研究对确保水产品及人类生命财产安全具有重要意义。

[0003] 麻痹性贝毒是一种低分子量、高毒性的贝类毒素,主要由甲藻 *Alexandrium tamarense*, *A. catenella*, *A. acatenella*, *A. cohorticula*, *A. fundyense*, *A. fraterculus*, *A. nimutum*, *A. Gonyaulax tamarensis*, *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium babamense var compressum* 等以及一种淡水蓝绿藻 *Aphanizomenon flos-aquae* 产生,通过对钠离子通道的影响而抑制神经的传导,为神经毒素的一种。麻痹性贝毒是一类小分子的烷基氢化嘌呤化合物,这是一类非洁净、高极性、不挥发的化学物质,通常呈碱性,水溶性高,可溶于甲醇、乙醇,不溶于大部分非极性溶剂。

[0004] 麻痹性贝毒是一类四氢嘌呤的三环化合物,已发现的毒素根据基团的相似性,可分为四类:氨基甲酸酯类毒素 (Carbamate toxins),包括石房蛤毒素 (Saxitoxin, STX),新石房蛤毒素 (Neosaxitoxin, NEO),膝沟藻毒素 (Gonyautoxin),包括膝沟藻毒素 GTX1, GTX2, GTX3 和 GTX4 ;N-磺酰氨基甲酰基类毒素 (N-sulfocarbamoyl toxins),包括 C1、C2、C3、C4、GTX5 (B1) 和 GTX6 (B2);脱氨基甲酰基类毒素 (Decarbamoyl toxins),包括 Decarbamoyl saxitoxin (dcSTX), Decarbamoyl neosaxitoxin (dcneoSTX), Decarbamoyl gonyautoxins 1-4 (dcGTX1-4);脱氧脱氨基甲酰基类毒素 (Deoxydecarbamoyl toxins)。

[0005] 现有技术中,贝毒的检测主要有小白鼠生物试验法、化学仪器分析技术和免疫学方法三种,其中免疫学检测方法具有时间短,操作简便,特异性好等优点。但是需要得到针对贝毒的特异性抗体,而贝毒为小分子化合物,免疫原性不够,不能直接刺激机体产生特异性抗体,需要与载体蛋白连接后免疫动物,目前并没有贝毒 C1&C2 与载体蛋白连接成功的案例。

[0006] 因此,本领域亟需研究贝毒 C1&C2 与载体蛋白成功连接的问题,从而为麻痹性贝毒 C1&C2 抗体的制备、水产品中麻痹性贝毒 C1&C2 残留的免疫学方法检测分析提供有效途径。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法。

[0008] 在本发明的第一方面,提供一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法,所述方法包

括：

[0009] (1) 将麻痹性贝毒 C1&C2 溶于 pH 值 5.0-6.0 偶联缓冲液中,使麻痹性贝毒 C1&C2 浓度在 1-4mg/ml ;之后加入载体蛋白,使之终浓度 1-40mg/ml ;混匀再加入甲醛,混合反应 60-90 小时 ;

[0010] (2) 将 (1) 的反应产物进行透析,获得麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白的偶联产物。

[0011] 在本发明的一个优选方式中,所述的载体蛋白选自(但不限于):匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白或卵清蛋白。

[0012] 在本发明的另一优选方式中,所述的载体蛋白是血清白蛋白较佳地,所述的载体蛋白是牛血清白蛋白或人血清白蛋白。

[0013] 在本发明的另一优选方式中,所述的偶联缓冲液是 pH5 的醋酸钠缓冲液 ;较佳地,醋酸钠含量 16.4g/L。

[0014] 在本发明的另一优选方式中,所述的麻痹性贝毒 C1&C2 在偶联缓冲液中的浓度为 2-3mg/ml ;或

[0015] 加入的载体蛋白的终浓度 2-30mg/ml。

[0016] 在本发明的另一优选方式中,所述的甲醛是 37% 甲醛溶液,加入量为偶联缓冲液体积的 1-10% ;较佳地,所述的甲醛溶液加入量为偶联缓冲液体积的 2-6%。

[0017] 在本发明的另一优选方式中,步骤 (1) 包括:将 1mg 麻痹性贝毒 C1&C2 溶解于 500ul pH 值 5.0-6.0 的偶联缓冲液中,加入 1-10mg 载体蛋白,混匀,再加入 37% 甲醛溶液 20ul,混合反应 72 小时 ;和

[0018] 步骤 (2) 包括:将麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白偶联产物放入透析袋中,用 pH7.2 的 PBS 溶液在 4℃ 透析 72 小时,期间换透析液 3 次。

[0019] 在本发明的另一优选方式中,步骤 (2) 之后,还包括步骤:将透析产物电泳鉴定。

[0020] 在本发明的另一方面,提供一种麻痹性贝毒与载体蛋白的偶联产物,其由所述的方法制备获得。

[0021] 在本发明的另一方面,提供所述的麻痹性贝毒与载体蛋白的偶联产物的用途,用于麻痹性贝毒 C1&C2 的抗体的制备 ;或用于水产品中麻痹性贝毒 C1&C2 残留的免疫学方法检测分析。

[0022] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0023] 图 1、麻痹性贝毒 C1&C2- 载体蛋白偶联产物的电泳图。

[0024] Lane1/2/3 :牛血清白蛋白 ;Lane4/5/6 :透析后的麻痹性贝毒 C1&C2- 牛血清白蛋白偶联产物。

[0025] 图 2、实施例 2 偶联方法的产物的电泳图。Lane1 :牛血清白蛋白 ;Lane2/3 :偶联产物。

具体实施方式

[0026] 本发明人针对现有技术中难以获得麻痹性贝毒 C1&C2 的抗体的缺陷,经过深入的

研究,首次揭示一种麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白的偶联方法。应用本发明的方法,可获得稳定偶联的麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白偶联产物。

[0027] 如本文所用,“免疫活性”或“免疫原性”指诱导哺乳动物体内的特异性体液和 / 或细胞免疫应答的能力。

[0028] 如本文所用,“麻痹性贝毒 C1&C2”是指麻痹性贝毒 C1 和 C2 混合物,C1 和 C2 结构及其类似,常以混合物形式存在。

[0029] 本发明中,所述的载体蛋白可以选自匙孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白或卵清蛋白。这些载体蛋白均是本领域技术人员易于获得的,例如牛血清白蛋白可以购自美国 sigma 公司。上述载体蛋白的突变体、类似物或衍生物也可被应用于本发明,只要它们仍然保持了所述载体蛋白的功能,可与麻痹性贝毒 C1&C2 实现偶联并使之具有免疫原性。

[0030] 针对麻痹性贝毒 C1&C2 难以与载体蛋白偶联的问题,本发明人进行了反复而深入的研究,优化了各项实验条件。

[0031] 作为本发明的优选实施方式,所述方法包括:将 1mg 麻痹性贝毒 C1&C2 溶解于 500ul pH 值 5.0-6.0 的偶联缓冲液中,加入 1-10mg 载体蛋白,混匀,再加入 37% 甲醛溶液 20ul,混合反应 72 小时;和将麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白偶联产物放入透析袋中,用 pH7.2 的 PBS 溶液在 4℃ 透析 72 小时,期间换透析液 3 次。最后,还可包括将透析产物电泳鉴定的步骤。

[0032] 本发明人在实验中发现,适当的 pH 值对于麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白的成功偶联是较为关键的。当 pH 低于 5 的条件下,偶联的效率非常低,难以获得稳定的偶联产物。

[0033] 本发明中,还提供了采用本发明的方法制备获得的 C1&C2-载体蛋白偶联产物。所述的偶联产物可用于麻痹性贝毒 C1&C2 抗体的制备、水产品中麻痹性贝毒 C1&C2 残留的免疫学方法检测分析。

[0034] 本发明还提供一种组合物,所述的组合物含有:(i)有效量(如 0.00001-50uM)的本发明所述的 C1&C2-载体蛋白偶联产物;和(ii)药学上可接受的载体。

[0035] 如本文所用,“药学上或食品学上可接受的”的成分是适用于人和 / 或哺乳动物而无过度不良副反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益 / 风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。该术语指这样一些药剂载体:它们本身并不是必要的活性成分,且施用后没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991) 中可找到关于药学上可接受的载体的充分说明。在组合物中药学上可接受的载体可含有液体,如水、盐水、甘油和山梨醇。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如润滑剂、助流剂、润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质和稳定剂等。

[0036] 可将所述的组合物制成各种适合于哺乳动物给药的剂型,所述剂型包括但不限于:注射剂、粉末剂、乳剂。

[0037] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0038] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意

义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0039] 实施例 1、麻痹性贝毒素的提取、纯化

[0040] 1、试剂与材料

[0041] 洗脱液:2mM 的磷酸四丁基铵溶液,调整 PH 至 6.0。

[0042] 氧化剂:均为含有 7mM 高碘酸的 50mM 磷酸氢二钾缓冲液,PH 为 9.0;

[0043] 酸化剂:均为 0.5M 的乙酸溶液。

[0044] 其他常规化学试剂:冰醋酸、丙酮、无水乙醇。

[0045] 2、藻的培养

[0046] 塔玛氏亚历山大藻 *Alexandrium. Tamarense* 用于生产 C 毒素(麻痹性贝毒 C1&C2)。取 25 毫升藻液,4000g,20℃离心 10min,弃上清,下层藻细胞加入 500u150mM 醋酸于 -20℃保存或立即进行毒素提取,用 HPLC 分析测定毒素含量。至毒素最高含量时,以 10 微米筛绢收集藻细胞,-20℃保存备下一步提取毒素用。

[0047] 3、毒素的提取方法流程

[0048] (1) 毒素粗提

[0049] 离心收集的藻细胞 50mM 醋酸悬浮,超声波破碎仪冰浴破碎,镜检完全破碎后,10000×g,4℃离心 30 分钟,取上清,即毒素粗提液;1:1 体积丙酮除部分蛋白。

[0050] (2) P2 柱纯化

[0051] 样品浓缩:真空旋转蒸发仪浓缩上步收集的毒素粗提液至所需上样量,约 3ml;仪器工作条件:恒温锅 37℃;循环水温度:4℃。

[0052] 柱平衡:100mM 醋酸,5ml/min 充分平衡至少 1 小时,再以 2ml/min 平衡 1 小时(2 个柱体积)。

[0053] 上样:将上步所浓缩样品上柱后,以 2ml/min 速度洗脱收集,约 500ml(针对 60CM×3.5CM 的 P2 柱子)后,接分部收集器以每管 10ml(5 分钟)分部收集。

[0054] 洗柱:以 100mM 醋酸,4ml/min 流速洗脱 2h 以上。必要时用 20% 乙醇在线洗或浸泡洗。

[0055] HPLC 检测:将上步分部收集的洗脱液每隔数管 HPLC 检测,以毒素标样为定性依据,收集 C 毒素。

[0056] (3) C18 柱纯化

[0057] 将上步收集的 C 毒素分别用真空旋转蒸发仪浓缩,上样及柱子平衡,收集方法同前述 P2 柱纯化方法。

[0058] (4) 长 P2 柱纯化,同 P2 柱纯化方法。

[0059] 将所得毒素真空旋转蒸发浓缩至所需浓度后,定量,-20℃保存。保存液为 100mM 醋酸溶液。

[0060] 采用 HPLC 法进行毒素检测及定量分析。

[0061] 色谱条件

[0062] 洗脱液流速为 0.8mL/min,氧化剂和酸化剂的流速均为 0.4mL/min。分析 C 毒素(麻痹性贝毒 C1&C2)时柱温 30℃,衍生温度 45℃;毒素分析所用色谱柱为 Inertsil C18 反相色谱柱(150×4.6mm,5 μm),荧光检测器设定的激发波长 330nm,发射波长 390nm。

[0063] 标准定量

[0064] C 毒素（麻痹性贝毒 C1&C2）分析所用标样购于加拿大 NRC，保留时间定性。将母液用 19mM 醋酸溶液稀释到一系列不同浓度标准溶液（1/20, 1/40, 1/80, 1/200）以确定标准曲线，外标法定量。毒素测定每隔 5 个样品进一次标准样品，每组平行实验样品连续测定，毒素组分的峰面积取其平均值，然后与相邻的两个标准样对照进行定量计算以减小毒素组分峰面积变化所造成的误差。

[0065] 经 P2 柱、C18 柱反复抽提纯化，最终得到纯度 99% 以上的 C1&2 毒素。

[0066] 实施例 2、麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白的偶联方法

[0067] (1) 将 1mg 麻痹性贝毒 C1&C2 溶解于 500 μ l 偶联缓冲液（称取 16.4g 醋酸钠，溶于 1000ml 去离子水中，用冰醋酸调节 pH 值到 5.0）中，加入 5mg 载体蛋白 BSA，混匀，再加入 37% 甲醛溶液 20 μ l，混合反应 72 小时。

[0068] (2) 麻痹性贝毒 C1&C2-载体蛋白偶联产物放入透析袋中，用 pH7.2 的 PBS 溶液在 4 $^{\circ}$ C 透析 72 小时，期间换透析液 3 次。

[0069] (3) 透析后的麻痹性贝毒 C1&C2-载体蛋白偶联产物进行电泳鉴定，确定高效获得了成功偶联的蛋白，如图 1。从图 1 中可以看出，反应后的样品，BSA 上方有明显的弥散条带产生，为 BSA 与贝毒偶联的产物。

[0070] 将偶联产物免疫小鼠，在体内可获得较高效价的抗体。

[0071] 实施例 2、对比实验

[0072] 本实施例中，采用与实施例 1 中相同的方法，不同点在于步骤（1）中，采用的偶联缓冲液 pH 值 4.0-4.5。步骤（2）和（3）同实施例 1。

[0073] 结果如图 2，从图 2 中可以看出，反应后的样品，BSA 上方未能出现明显的弥散条带，没有 BSA 与贝毒的偶联产物。也即无法获得稳定的偶联产物。

[0074] 综上，本发明提供了一种麻痹性贝毒 C1&C2 与载体蛋白的偶联方法，为下一步进行贝毒 C1&C2 抗体的制备以及贝毒 C1&C2 免疫检测试剂盒的开发提供了有效途径。

[0075] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

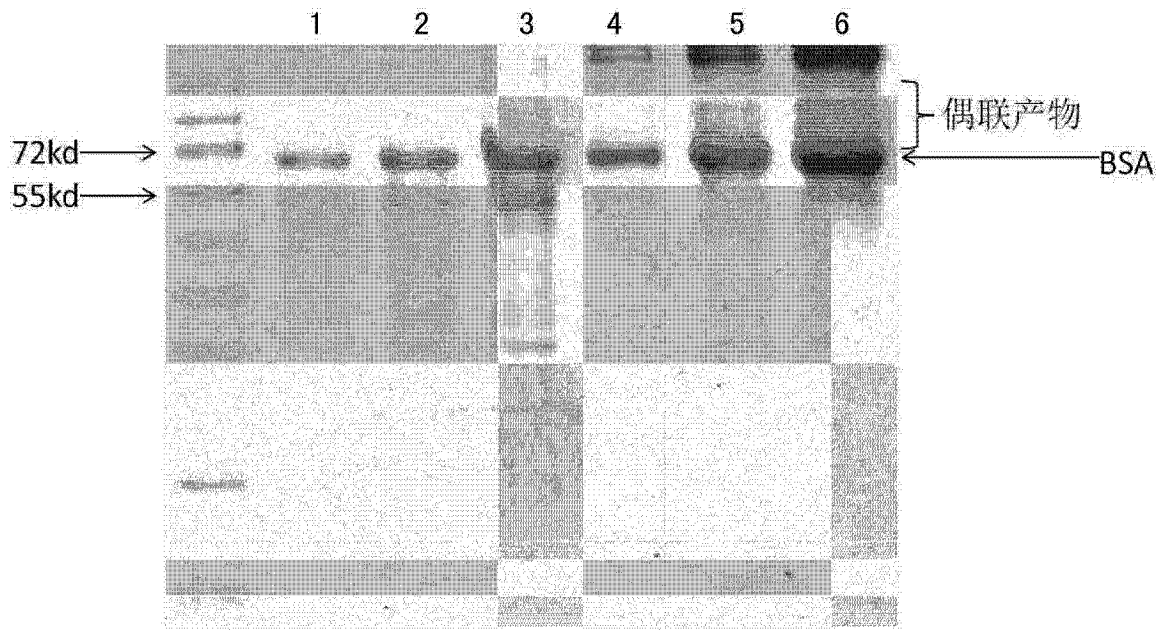


图 1

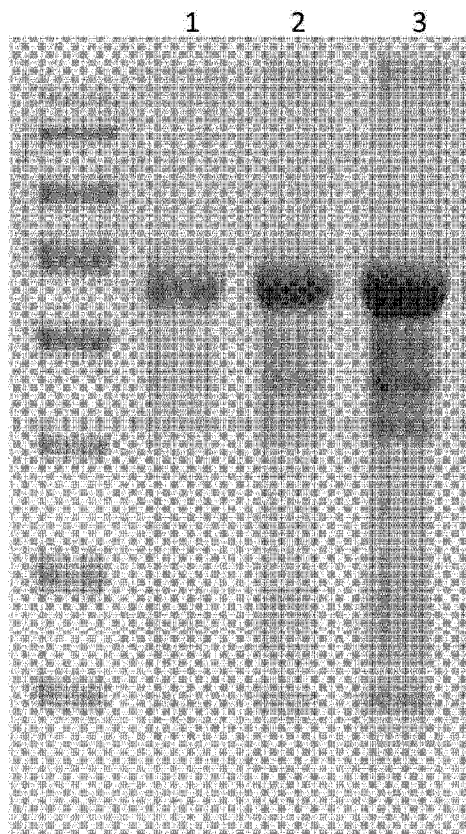


图 2

专利名称(译)	一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法		
公开(公告)号	CN103012583A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201210572910.8	申请日	2012-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	上海生物芯片有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海生物芯片有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海生物芯片有限公司		
[标]发明人	邵钧 吴杨 蔡兴锋		
发明人	邵钧 吴杨 蔡兴锋		
IPC分类号	C07K14/795 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/107 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	陈静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种麻痹性贝毒与载体蛋白的连接方法。应用本发明的方法，可获得稳定偶联的麻痹性贝毒C1&C2与载体蛋白偶联产物，从而为麻痹性贝毒抗体的制备、麻痹性贝毒C1&C2的免疫学检测分析提供有效途径。

