



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105136915 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201510396382. 9

(22) 申请日 2015. 07. 08

(71) 申请人 浙江省海洋水产研究所

地址 316021 浙江省舟山市定海区临城街道
体育路 28 号

(72) 发明人 张小军 严忠雍 喻亮 李佩佩
方益 祝银

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

代理人 王佳健

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006. 01)

G01N 30/60(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

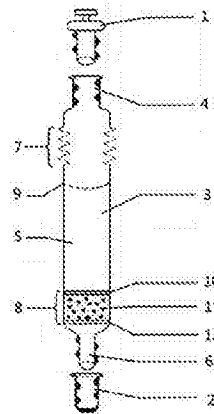
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种免疫亲和方法

(57) 摘要

本发明公开了一种免疫亲和方法。本发明首先根据分析对象的具体目标物,在免疫亲和柱中填充相对应的抗体基质。其次灌入抗体活性液保持抗体活性,活性液的最高液面低于免疫亲和柱的最高液面刻度线,拧紧上下堵头,置于合适的环境温度待使用。然后根据目标物的浓度范围,选择单根免疫亲和柱或者多根免疫亲和柱组合使用,确定免疫亲和柱的根数。最后加入目标物洗脱液,收集分析免疫亲和柱流出的洗脱液。所述的免疫亲和柱采用伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱。本发明提高了活性液体积,增强了免疫亲和的整体密封性,在保证有充足的抗体活性液同时,又达到了防溢出、漏液等情况的出现。



1. 一种免疫亲和方法,其特征在於该方法具体是:

首先根据分析对象的具体目标物,在免疫亲和柱中填充相对应的抗体基质,具体是:首先在空柱腔中放入下筛板,接着填入抗体基质,再放入上筛板,下压上筛板使抗体基质分布均匀,并起到固定抗体填充区的作用;

其次灌入抗体活性液保持抗体活性,活性液的最高液面低于免疫亲和柱的最高液面刻度线,拧紧上下堵头,置于合适的环境温度待使用;

然后根据目标物的浓度范围,选择单根免疫亲和柱或者多根免疫亲和柱组合使用,确定免疫亲和柱的根数;具体是:将要使用的免疫亲和柱取出,去掉上下堵头,固定免疫亲和柱于合适位置;待活性液全流出后,根据实验需要加入待分析样品液;确认分析样品液全流出后,加入适量淋洗液,并将其挤干弃去;

最后加入目标物洗脱液,收集分析免疫亲和柱流出的洗脱液;

所述的免疫亲和柱采用伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱,所述伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱包括上堵头、下堵头和上样管;

所述上堵头周向带有外螺纹,上堵头与上样管进口螺纹配合;

所述下堵头周向带有内螺纹,下堵头与上样管出口螺纹配合;

所述上样管包括进口、柱腔和出口,进口周向带有内螺纹,用于结合固定上堵头或者组合固定另一免疫亲和柱的出口;出口周向带有外螺纹,用于结合固定下堵头或者组合固定另一免疫亲和柱的进口;

所述柱腔包括伸缩区和免疫亲和区;伸缩区设置于进口下方,免疫亲和区位于出口上方,免疫亲和区内从上至下设置有上筛板、抗体填充区和下筛板;在柱腔外壁标识有最高液面刻度线,该最高液面刻度线位于伸缩区下方。

2. 根据权利要求 1 所述的一种免疫亲和方法,其特征在於:若分析样品较混浊,则拧紧上堵头,挤压伸缩区。

一种免疫亲和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫亲和方法。

背景技术

[0002] 作为一项样品前处理技术,固相萃取柱已得到实验室广泛地应用。随着固相萃取技术的不断发展,一种新型萃取柱——免疫亲和柱正悄然代替传统固相萃取柱。免疫亲和柱(IAC)基于抗原抗体反应,利用生物大分子具有对一类生物大分子特异识别和可逆结合的特性而制作的一种分离萃取柱,具有独特的选择专一性和良好的吸附净化性能。处理过的样品提取液在缓慢通过免疫亲和柱时,样品提取液中的分析物与柱内的抗体结合,而未被结合的其它杂质经洗涤后除去,再用洗脱液冲洗柱体,收集分析物。较传统固相萃取柱,免疫亲和柱对目标物的选择性更强,吸附净化效果更好,且所消耗的试剂更少。

[0003] 利用上述免疫亲和柱进行免疫亲和时存在以下几个问题:

1. 免疫亲和由于使用抗体基质代替传统固相填料,为保持柱内抗体活性,需将抗体置于活性液中。而目前免疫亲和柱通常体积较小,无法有足够的体积储存活性液,且活性液经常存在溢出、漏液等情况。

[0004] 2. 单根免疫亲和柱的抗体数量是固定的,这也决定了单根免疫亲和的可容纳目标物浓度是有限的。当目标物超过柱内抗体所能结合的抗原限度,将导致目标物流失,无法有效定量分析目标物浓度。

[0005] 3. 在使用免疫亲和柱的过程中,常出现分析样品液较混浊导致亲和柱堵塞的现象,影响亲和柱的抗体抗原结合能力,甚至无法正常开展淋洗、洗脱等后续步骤。

[0006] 上述因素限制了免疫亲和柱的推广使用和商品化,需要一种简单、有效的装置来解决这些问题。

发明内容

[0007] 本发明针对现有技术的不足,提供了一种免疫亲和方法。

[0008] 本发明解决技术问题所采取的技术方案为:

本发明方法具体是:

首先根据分析对象的具体目标物,在免疫亲和柱中填充相对应的抗体基质,具体是:首先在空柱腔中放入下筛板,接着填入抗体基质,再放入上筛板,下压上筛板使抗体基质分布均匀,并起到固定抗体填充区的作用。

[0009] 其次灌入抗体活性液保持抗体活性,活性液的最高液面低于免疫亲和柱的最高液面刻度线,拧紧上下堵头,置于合适的环境温度待使用。

[0010] 然后根据目标物的浓度范围,选择单根免疫亲和柱或者多根免疫亲和柱组合使用,确定免疫亲和柱的根数;具体是:将要使用的免疫亲和柱取出,去掉上下堵头,固定免疫亲和柱于合适位置;待活性液全流出后,根据实验需要加入待分析样品液;确认分析样品液全流出后,加入适量淋洗液,并将其挤干弃去。

[0011] 最后加入目标物洗脱液,收集分析免疫亲和柱流出的洗脱液。

[0012] 所述的免疫亲和柱采用伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱,所述伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱包括上堵头、下堵头和上样管。

[0013] 所述上堵头周向带有外螺纹,上堵头与上样管进口螺纹配合。

[0014] 所述下堵头周向带有内螺纹,下堵头与上样管出口螺纹配合。

[0015] 所述上样管包括进口、柱腔和出口,进口周向带有内螺纹,用于结合固定上堵头或者组合固定另一免疫亲和柱的出口;出口周向带有外螺纹,用于结合固定下堵头或者组合固定另一免疫亲和柱的进口。

[0016] 所述柱腔包括伸缩区和免疫亲和区;伸缩区设置于进口下方,免疫亲和区位于出口上方,免疫亲和区内从上至下设置有上筛板、抗体填充区和下筛板;在柱腔外壁标识有最高液面刻度线,该最高液面刻度线位于伸缩区下方。

[0017] 进一步说,若分析样品较混浊,则拧紧上堵头,挤压伸缩区。

[0018] 本发明的有益效果在于:

1. 伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱由于柱腔容量大,并配有上下两堵头拧于进出口,提高了活性液体积,增强了免疫亲和的整体密封性,在保证有充足的抗体活性液同时,又达到了防溢出、漏液等情况的出现。

[0019] 2. 采用多根伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱方式,使免疫亲和过程中的抗体数量成倍数增长,从根本上解决了免疫亲和方法中的可容纳目标物浓度有限的问题。

[0020] 3. 伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱带有伸缩区,在使用免疫亲和过程中可将上堵头拧紧进口,可通过侧面挤压或者向下压缩伸缩区,增大柱腔内压力,达到提高柱腔溶液流速和充分排除残留液的目的,同时还可防止柱腔堵塞。

附图说明

[0021] 图 1 为本发明中伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱结构示意图;

图 2 为本发明中使用单根免疫亲和柱示意图;

图 3 为本发明中使用多根免疫亲和柱示意图。

具体实施方式

[0022] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步描述。

[0023] 如图 1 所示,伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱主要包括以下部分:上堵头 1、下堵头 2、上样管 3。上堵头 1 高 1.5-1.8 cm,具外翻螺纹,外径 0.8-0.9 cm,螺旋式拧于上样管进口;下堵头 2 高 1.6-2.0 cm,具内陷螺纹,内径 0.4-0.5 cm,螺旋式拧于上样管出口。上样管 3 高 9.0-10.0 cm,外壁材料为聚乙烯,包括进口 4、柱腔 5 和出口 6。进口 4 高 0.9-1.0 cm,具内陷螺纹,内径为 0.9-1.0 cm,外径 1.0-1.1 cm,用于结合固定上堵头 1 或者组合固定另一免疫亲和柱的出口 6。出口 6 高 0.9-1.0 cm,具外翻螺纹,内径 0.1-0.2 cm,外径 0.3-0.4 cm,用于结合固定下堵头 2 或者组合固定另一免疫亲和柱的进口 4。柱腔 5 高 7.0-8.0 cm,内径 1.4-1.5 cm,外径 1.5-1.6 cm,可容纳分析体积为 6-7 mL,柱腔 5 包括伸缩区 7、免疫亲和区 8 及最高液面刻度线 9。伸缩区 7 设置于离进口 4 距为 0.7-0.8 cm,未伸缩高度为 1.1-1.2 cm,厚度偏薄,为 0.1-0.2 cm。免疫亲和区 8 位于出口 6 上方,高度 1.3-1.4 cm,

从上至下设置有上筛板 10、抗体填充区 11 和下筛板 12。最高液面刻度线 9 位于柱腔外壁具伸缩区 7 下方 0.9-1.0 cm。

[0024] 利用上述免疫亲和柱,进行免疫亲和的方法:

根据分析对象的具体目标物,填充相对应的抗体基质,具体是:首先在空柱腔中放入下筛板,接着填入抗体基质,再放入上筛板,下压上筛板使抗体基质分布均匀,并起到固定抗体填充区的作用。

[0025] 然后灌入抗体活性液保持抗体活性,活性液的最高液面要低于免疫亲和柱的最高液面刻度线,拧紧上下堵头,置于合适的环境温度待使用。根据目标物的浓度范围,选择单根免疫亲和柱或者多根组合使用,确定免疫亲和柱的根数。将要使用的免疫亲和柱取出,去掉上下堵头,固定免疫亲和柱于合适位置(若是多根组合使用,优先组合免疫亲和柱)。待活性液全流出后,根据实验需要加入合适体积的待分析样品液(若分析样品较混浊,可拧紧上堵头,挤压伸缩区)。确认分析样品液全流出后,加入适量淋洗液,并将其挤干弃去。最后加入合适的目标物洗脱液,收集分析免疫亲和柱流出的洗脱液。

[0026] 实施例:水产品中河豚毒素的免疫亲和净化应用。

[0027] 将河豚毒素抗体填入到柱腔内,高度为 1.2-1.3 cm,盖好筛板,并注入活性液,拧紧上下堵头,保存于 0-5℃ 环境,待使用。

[0028] 准确称取已充分均质马面鱼样品 2.00 g 于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 含有 1% 乙酸的甲醇溶液,涡旋振荡 2 min,60℃ 水浴超声提取 15 min,冷却至室温后,6000 r/min 离心 5 min。移取 5 mL 上清液至另一 50 mL 离心管中,加入 20 mL PBS 溶液进行稀释,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7~8,待净化。

[0029] 取出免疫亲和柱,去掉上下堵头,放出柱内保存活性液后,上样品液。上样结束后,用 8 mL 水淋洗亲和柱,挤干柱内残留液,并弃去以上全部流出液,最后用 4 mL 含有 1% 乙酸的甲醇溶液洗脱,收集的洗脱液于 60℃ 氮气吹干,用 1 mL 流动相定容溶解,经 0.22 μm 滤膜后供液相色谱-质谱分析。按照上述步骤平行测定 6 次,结果如表 1 所示。在 1.50 μg/kg 添加水平下,六次测定的平均回收率为 96.7%,相对标准偏差为 3.24%。整个免疫亲和净化过程耗时为 30 min。

[0030] 表 1 利用免疫亲和净化测定水产品中河豚毒素的残留量结果($n=6$)

样品	加标量 (μg/kg)	测定值 (μg/kg)	平均值 (μg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
马面鱼	150	1433	145	96.7	3.24
		1512			
		1387			
		1412			
		1450			
		1489			

实验结果表明使用本发明方法能有效吸附目标物,从而达到净化的效果。同时整个净化过程时间短,操作简单,具有较高的实际应用价值。

[0031] 以上所揭露的仅为本发明的较佳实施例而已,当然不能以此来限定本发明之权利范围,因此依本发明要求所作的等同变化,仍属于本发明所涵盖的范围。

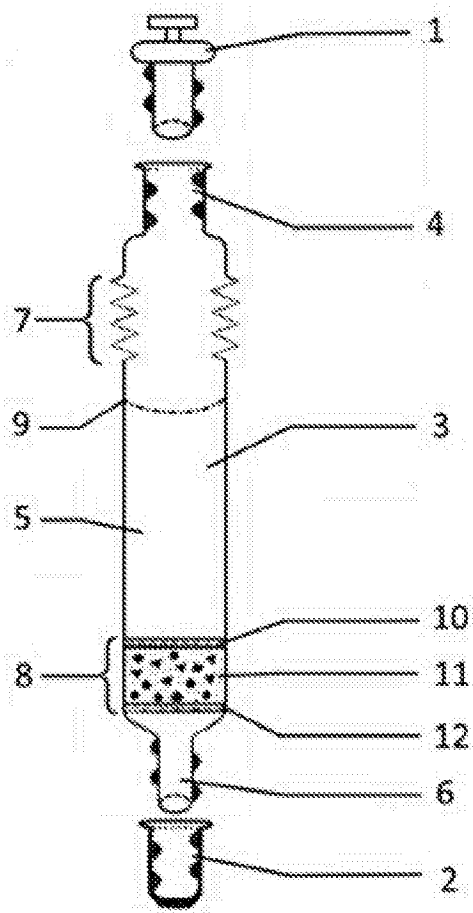


图 1

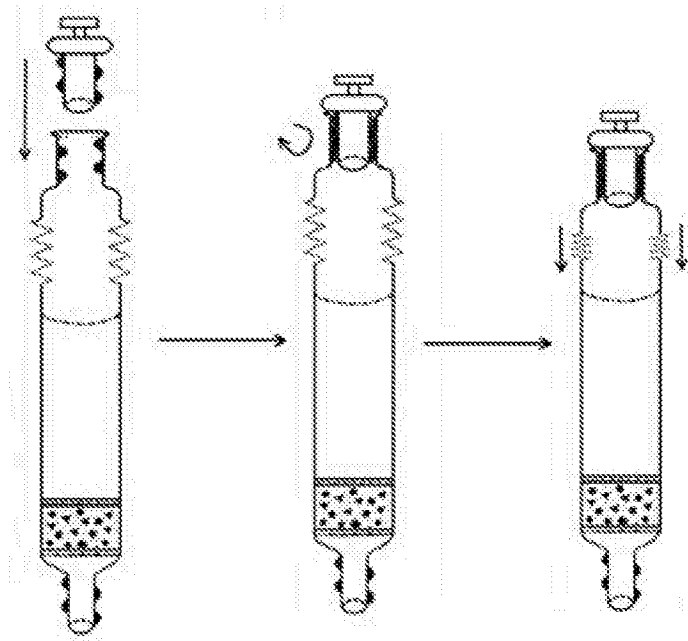


图 2

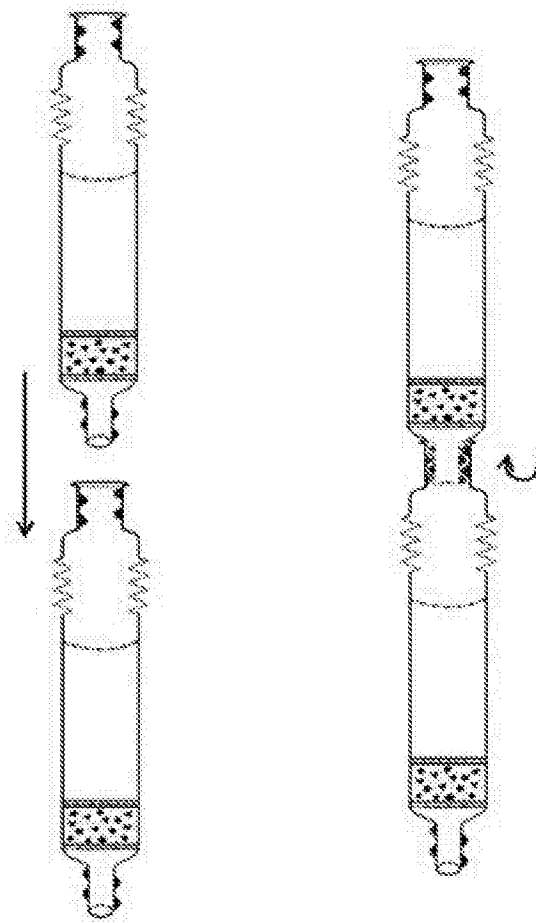


图 3

专利名称(译)	一种免疫亲和方法		
公开(公告)号	CN105136915A	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201510396382.9	申请日	2015-07-08
申请(专利权)人(译)	浙江省海洋水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省海洋水产研究所		
[标]发明人	张小军 严忠雍 喻亮 李佩佩 方益 祝银		
发明人	张小军 严忠雍 喻亮 李佩佩 方益 祝银		
IPC分类号	G01N30/02 G01N30/60 G01N33/53		
其他公开文献	CN105136915B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫亲和方法。本发明首先根据分析对象的具体目标物，在免疫亲和柱中填充相对应的抗体基质。其次灌入抗体活性液保持抗体活性，活性液的最高液面低于免疫亲和柱的最高液面刻度线，拧紧上下堵头，置于合适的环境温度待使用。然后根据目标物的浓度范围，选择单根免疫亲和柱或者多根免疫亲和柱组合使用，确定免疫亲和柱的根数。最后加入目标物洗脱液，收集分析免疫亲和柱流出的洗脱液。所述的免疫亲和柱采用伸缩型螺旋组合式免疫亲和柱。本发明提高了活性液体积，增强了免疫亲和的整体密封性，在保证有充足的抗体活性液同时，又达到了防溢出、漏液等情况的出现。

