



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105435758 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201510865924. 2

G01N 33/531(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 02

B01D 15/38(2006. 01)

(71) 申请人 江苏农牧科技职业学院

地址 225300 江苏省泰州市海陵区凤凰东路  
8号

(72) 发明人 于生兰 徐加兵 欧阳臻 王帅兵  
秦枫 赵丽 洪伟鸣 陈毓  
黄文强

(74) 专利代理机构 泰州地益专利事务所 32108  
代理人 王楚云

(51) Int. Cl.

B01J 20/281(2006. 01)

B01J 20/30(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

C07K 1/22(2006. 01)

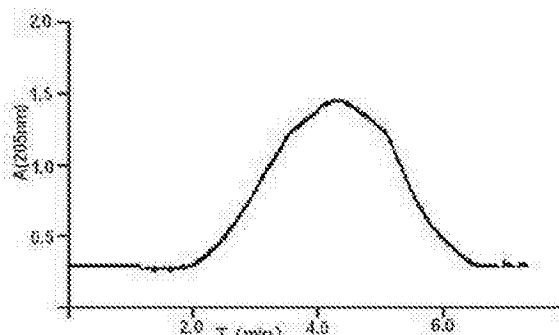
权利要求书2页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱及其应用的技术方案,本发明以黄芪甲苷为配基,具体步骤为:制备黄芪甲苷半抗原,由黄芪甲苷半抗原与固相载体交联制备免疫亲和吸附剂,以免疫亲和吸附剂为填料装入层析柱,用醋酸缓冲液和 Tris-HCl 缓冲液交替洗涤填料三次得免疫亲和层析柱;应用本发明制备的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷抗体的方法包括将待纯化样品加入到所述免疫亲和层析柱、洗脱液洗脱及中和液中和等步骤。本发明有效提高黄芪甲苷单克隆抗体的纯化效率,纯度可达 99% 以上,且操作简单、成本低、污染少。



1. 一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,以黄芪甲苷为配基,具体步骤为:制备黄芪甲苷半抗原,由黄芪甲苷半抗原与固相载体交联制备免疫亲和吸附剂,以免疫亲和吸附剂为填料装入层析柱,用醋酸缓冲液和Tris-HCl缓冲液交替洗涤填料三次得免疫亲和层析柱。

2. 根据权利要求1所述的一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,所述黄芪甲苷半抗原的制备方法,具体步骤为:

(1)将黄芪甲苷溶于80%甲醇中配成浓度为1mg/mL的黄芪甲苷溶液,即第一溶液;

(2)将NaIO<sub>4</sub>溶于蒸馏水中,即第二溶液;

(3)用注射器将第一溶液缓缓滴加至第二溶液中,室温搅拌反应4小时,即第一反应液;

(4)慢慢往第一反应液中滴加乙二醇并室温反应2小时;

(5)终止反应,采用透析袋除去过量NaIO<sub>4</sub>,得到黄芪甲苷半抗原。

3. 根据权利要求1所述的一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,所述免疫亲和吸附剂的制备方法,具体步骤为:

(1)将黄芪甲苷半抗原与固相载体置于0.1M pH8.0 的碳酸氢钠溶液中,

在20-25°C条件下反应4小时,即第二反应液;

其中:黄芪甲苷半抗原/固相载体/ 0.1M pH8.0 的碳酸氢钠溶液其配比为:10mg:2g:20mL;

将第二反应液用1M pH 8.0 的乙醇胺水溶液在20-25°C条件下封闭2小时,得封闭液;

(2)封闭交联反应结束,用0.1M pH 8.0 的碳酸氢钠溶液洗涤(1)所得封闭液去除未结合的黄芪甲苷半抗原,得免疫亲和吸附剂。

4. 根据权利要求3所述的一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,所述固相载体为琼脂糖凝胶、纤维素、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、多孔玻璃或聚丙烯酰胺—琼脂糖凝胶中的一种。

5. 根据权利要求4所述的一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,所述固相载体为经环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B。

6. 根据权利要求1所述的一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,所述免疫亲和层析柱的制备方法,具体步骤为:

将免疫亲和吸附剂装入层析柱,用0.1M pH4.0醋酸缓冲液和0.1M pH8.0Tris-HCl缓冲液交替洗涤三次,得到免疫亲和层析柱。

7. 一种应用权利要求1-6任一项权利要求所述的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷抗体的方法,其特征在于,具体步骤为:

(1)将待纯化样品加入到所述免疫亲和层析柱;

(2)用洗涤液洗涤至紫外分光光度计测定OD<sub>280</sub> 值至0.01 以下;

(3)洗脱液洗脱;

(4)中和液中和;

所述洗脱液与中和液的体积比为300:36。

8. 根据权利要求7所述的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷抗体的方法,其特征在于,所述洗涤液为0.1M pH4.0的含0.5M NaCl的醋酸缓冲液,该醋酸缓冲液制备方法为:取醋酸钠8.2g,醋酸1.04mL,NaCl 29.22g,加水配成1000mL溶液。

9. 根据权利要求7所述的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷抗体的方法, 其特征在于, 所述洗脱液为0.1M pH8.0的含0.5M NaCl的Tris-HCl 缓冲液, 该Tris-HCl缓冲液制备方法为: 取Tris12.114g, NaCl 29.22g, 加水配成1000mL溶液。

10. 根据权利要求7所述的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷抗体的方法, 其特征在于, 所述中和液为1M pH8.8Tris-HCl缓冲液, 该缓冲液由如下制备步骤得到: 称取Tris121.14g, 加蒸馏水800mL, 用0.1M HCl 调pH 至8.8, 加蒸馏水至1000mL。

## 一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱及其应用。

### 背景技术

[0002] 黄芪为常用中药,具有补气固表、敛疮生肌、利尿托毒等功能。现代药理研究表明,黄芪具有增强机体免疫、降血糖、强心、利尿、降压、抗衰老及抗疲劳等多种药理学活性。黄芪中的主要有效成分为黄芪多糖(astragalus polysaccharides)、黄芪皂苷(astragalus saponins)和黄芪异黄酮(isoflavones),目前主要采用黄芪皂苷中的黄芪甲苷(Astragaloside IV)作为评价黄芪药材质量优劣的标准。当前黄芪甲苷定量分析的方法主要有:高效液相色谱法(HPLC)、薄层扫描法(TLCS)及荧光法等,虽然这些方法特异性强、灵敏度高,但是样品前处理操作步骤繁琐,成本较高,也不适用于大批量样品的筛选检测。建立一种快速、灵敏、准确、经济的检测黄芪甲苷的免疫学分析方法可以克服上述方法的不足,与其形成优势互补,而建立一种重复性好,灵敏度高,分析结果准确的免疫分析方法最重要的是获得特异性好效价高的抗体。免疫化学分析鉴于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点弥补了理化分析的不足,在黄芪甲苷的检测中起着越来越重要的作用,而抗血清或腹水的成分非常复杂,一些杂蛋白可能会影响抗体与抗原的反应,因此黄芪甲苷抗体的纯化就显得尤为重要。利用亲和层析柱进行靶蛋白的筛选具有效率高,成本低、靶向性好的优点。目前抗体纯化方法主要是盐析法、有机溶剂沉淀法、各种原理的层析法以及亲和纯化法(通常是Protein A 或 Protein G)等,这些都不能得到很纯的特异性抗体,即使是亲和纯化法,也只能得到特异性抗体和非特异性抗体的混合物,而不能将两者分离而得到特异性的抗体,从而影响评价黄芪药材质量优劣的准确性和效率,因此研究一种能够有效分离纯化特异性抗体的纯化方法,具有较高的学术价值和应用前景。是以此为基础建立一种能够快速评价黄芪药材质量优劣的方法,而建立此种方法的前提就是获得效价较高、特异性好的黄芪甲苷单克隆抗体,我们的方法就是通过纯化得到效价高特异性好的黄芪甲苷单克隆抗体。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提高黄芪甲苷单克隆抗体的纯化效率,提供“一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱及其应用”的发明。本发明的主要优点是,1、采用高碘酸钠将黄芪甲苷邻羟基氧化成醛基,可以使黄芪甲苷半抗原与固相载体充分交联;2、利用抗原与抗体的特异性亲和,有效的去除了非特异性抗体及其他杂蛋白,提高黄芪甲苷单克隆抗体的纯化效率,纯度可达99%以上,且操作简单、成本低、污染少。

[0004] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案来实现的,主要的技术方案是,一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱的制备方法,以黄芪甲苷为配基,具体步骤为:制备黄芪甲苷半抗原,由黄芪甲苷半抗原与固相载体交联制备免疫亲和吸附剂,将免疫亲和吸附剂为填料装入层析柱,用醋酸缓冲液和Tris-HCl缓冲液交替洗涤填料三次得免疫亲和层

析柱。

[0005] 进一步的技术方案是,所述黄芪甲苷半抗原的制备方法,具体步骤为:

- (1)将黄芪甲苷溶于80%甲醇中配成浓度为1mg/mL的黄芪甲苷溶液,即第一溶液;
- (2)将NaIO<sub>4</sub>溶于蒸馏水中,即第二溶液;
- (3)用注射器将第一溶液缓缓滴加至第二溶液中,室温搅拌反应4小时,即第一反应液;
- (4)慢慢往第一反应液中滴加乙二醇并室温反应2小时;
- (5)终止反应,采用透析袋除去过量NaIO<sub>4</sub>,得到黄芪甲苷半抗原。

[0006] 进一步的技术方案是,所述免疫亲和吸附剂的制备方法,具体步骤为:

(1)将黄芪甲苷半抗原与固相载体置于0.1M pH8.0 的碳酸氢钠溶液中,在20-25℃条件下反应4小时,即第二反应液;

其中:黄芪甲苷半抗原/固相载体/ 0.1M pH8.0 的碳酸氢钠溶液配比为:10mg:2g:20mL;

(2)将第二反应液用1M pH 8.0 的乙醇胺水溶液在20-25℃条件下封闭2小时;

(3)封闭交联反应结束,用10mL 0.1M pH 8.0 的碳酸氢钠溶液洗涤交联物去除未结合的黄芪甲苷半抗原,得免疫亲和吸附剂(即填料)。

[0007] 进一步的技术方案是,所述固相载体为琼脂糖凝胶、纤维素、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、多孔玻璃或聚丙烯酰胺-琼脂糖凝胶中的一种,具体为经环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B。

[0008] 进一步的技术方案是,所述免疫亲和层析柱的制备方法,具体步骤为:

(1)将填料装入层析柱,用0.1M pH4.0醋酸缓冲液和0.1M pH8.0Tris-HCl缓冲液交替洗涤填料三次,得到免疫亲和层析柱;

本发明还提供了一种应用免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷单克隆抗体的方法,具体步骤为:

- (1)将待纯化样品加入到所述免疫亲和层析柱;
- (2)用洗涤液洗涤至紫外分光光度计测定OD<sub>280</sub> 值至0.01 以下;
- (3)洗脱液洗脱;
- (4)中和液中和;

所述洗脱液与中和液的体积比为300:36。

[0009] 其中,所述洗涤液为0.1M pH4.0的含0.5M NaCl的醋酸缓冲液,该醋酸缓冲液制备方法为:取醋酸钠8.2g,醋酸1.04mL,NaCl 29.22g,加水配成1000mL溶液。

[0010] 所述洗脱液为0.1M pH8.0的含0.5M NaCl的Tris-HCl 缓冲液,该Tris-HCl 缓冲液制备方法为:取Tris12.114g,NaCl 29.22g,加水配成1000mL溶液。

[0011] 所述中和液为1MpH8.8Tris-HCl缓冲液,该缓冲液由如下制备步骤得到:称取121.14g Tris,加蒸馏水800mL,用0.1M HCl 调pH 至8.8,加蒸馏水至1000mL。

[0012] 采用本发明所设计制备的以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷单克隆抗体的方法,与现有盐析、传统层析等抗体的纯化技术相比较,具有如下优点:

1、因免疫亲和吸附剂是由黄芪甲苷半抗原与固相载体交联制备而成,又因黄芪甲苷半抗原的制备步骤中,将黄芪甲苷溶于80%甲醇中配成浓度为1mg/mL的黄芪甲苷溶液,即第一溶液;将NaIO<sub>4</sub>溶于蒸馏水中,即第二溶液;用注射器将第一溶液缓缓滴加至第二溶液中,室

温搅拌反应4小时,采用 $\text{NaIO}_4$ 将黄芪甲苷邻羟基氧化成醛基,可以使黄芪甲苷半抗原与固相载体充分交联。

[0013] 2、应用免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷单克隆抗体的方法中,利用抗原与抗体的特异性亲和,有效的去除了非特异性抗体及其他杂蛋白,提高黄芪甲苷单克隆抗体的纯化效率,纯度可达99%以上,且操作简单、成本低、污染少。

[0014] 3、本发明免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷单克隆抗体,纯化效率高,纯度可达99%以上。

#### 附图说明

[0015] 图1 为黄芪甲苷单克隆抗体洗脱曲线。

[0016] 通过本发明所制备的免疫亲和吸附剂对黄芪甲苷单克隆抗体进行了纯化,由图1所示:洗脱曲线对称性良好,洗脱时间分布合理,证明所建立的洗脱条件较为合适。

[0017] 图2 为黄芪甲苷单克隆抗体纯化前后抗体效价测定结果。

[0018]

由图2所示:纯化后抗体的效价明显高于纯化前抗体的效价。

[0019] 图3 为黄芪甲苷单克隆抗体纯化前后抗体特异性测定结果。

[0020] 采用间接竞争ELISA法测定了纯化前和纯化后所得黄芪甲苷单克隆抗体的特异性。由图3所示:纯化后的黄芪甲苷单克隆抗体的特异性明显高于纯化前的黄芪甲苷单克隆抗体的特异性。

[0021] 图4 为黄芪甲苷单克隆抗体纯化前后SDS-PAGE 检测结果。

[0022] Lane1是未纯化的单克隆抗体进行的凝胶电泳分析, lane2是纯化后的单克隆抗体的凝胶电泳分析。由图4所示:纯化后的单克隆抗体纯度较高,达99%以上。

[0023] 图5为偶联前环氧氯丙烷活化Sepharose6B的红外扫描图

图6为偶联后环氧氯丙烷活化Sepharose6B的红外扫描图。

[0024] 由图5、图6通过红外扫描图谱可知在偶联前位于 $1295\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰在偶联之后消失了,而峰对应的官能团为醚基团,说明在偶联之后醚键断裂与黄芪甲苷分子进行了偶联。

#### 具体实施方式

[0025]

下面通过非限制性实施例,进一步阐述本发明,理解本发明。

[0026] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0027] 黄芪甲苷:成都曼思特生物科技有限公司,货号84687-43-4。

[0028] 氯化钠:国药集团化学试剂有限公司,货号10019318。

[0029] 甲醇:国药集团化学试剂有限公司,货号32060。

[0030] 碳酸氢钠:国药集团化学试剂有限公司,货号10019261。

[0031] 无水乙酸钠:国药集团化学试剂有限公司,货号10019121。

[0032] 冰醋酸:上海苏懿化学试剂有限公司,货号64-19-7。

[0033] Tris :Amresco 公司,货号77-86-1。

- [0034] 浓盐酸:国药集团化学试剂有限公司,货号81006。  
 [0035] 环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B :GE 公司,货号00021307。  
 [0036] 乙醇胺:国药集团化学试剂有限公司,货号51126。  
 [0037] 乙二醇:国药集团化学试剂有限公司,货号62135。  
 [0038] 甘氨酸:国药集团化学试剂有限公司,货号62011516。  
 [0039] 氯化钾:国药集团化学试剂有限公司,货号10016318。  
 [0040]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  :国药集团化学试剂有限公司,货号10020318。  
 [0041]  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  :国药集团化学试剂有限公司,货号10020716。  
 [0042] HRP 标羊抗鼠二抗:Jackson ImmunoResearch 公司,货号111-035-003。  
 [0043] 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB):Sigma 公司,货号ST056501。  
 [0044] TEMED(N-N-N'-N'-四甲基乙二胺) :Amresco 公司,货号0761。  
 [0045] 浓硫酸:国药集团化学试剂有限公司,货号73108460。  
 [0046] 小牛血清:郑州益康生物工程有限公司,货号016。

### 实施例

[0047] 一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱的制备方法,以黄芪甲苷为配基,具体步骤为:制备黄芪甲苷半抗原,由黄芪甲苷半抗原与经环氧活化的琼脂糖凝胶6B交联制备免疫亲和吸附剂,以免疫亲和吸附剂为填料装入层析柱,用醋酸缓冲液和Tris-HCl缓冲液交替洗涤填料三次得免疫亲和层析柱。

[0048] 一、黄芪甲苷半抗原的制备方法,具体步骤为:

(1)将10mg黄芪甲苷溶于不同梯度pH值的80%甲醇中配成浓度为1mg/mL的黄芪甲苷溶液,即第一溶液;

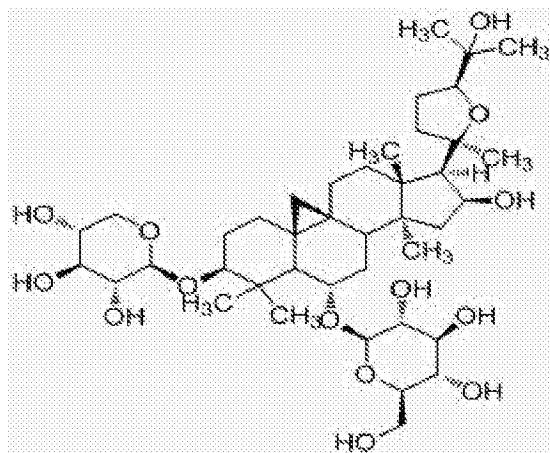
(2)将3 mg  $\text{NaIO}_4$ 溶于蒸馏水中,即第二溶液;

(3)用1 mL注射器将2 mL第一溶液缓缓滴加至第二溶液中,采用磁力搅拌器室温连续搅拌反应4小时,即第一反应液;

(4)慢慢往第一反应液中滴加乙二醇4mL并室温反应2小时;

(5)终止反应,采用透析袋除去过量 $\text{NaIO}_4$ ,得到黄芪甲苷半抗原。

[0049] 黄芪甲苷的结构如下:



二、免疫亲和吸附剂的制备方法,具体步骤为:

(1)将黄芪甲苷半抗原与经环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B在0.1M pH8.0 的碳酸氢钠溶液中充分混合,室温反应4小时,即第二反应液即交联物溶液;

其中:黄芪甲苷半抗原10mg,经环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B 2g, 0.1M pH8.0 的碳酸氢钠溶液20mL。

[0050] (2)用10mL 0.1M pH 8.0 的碳酸氢钠溶液洗涤第二反应液去除未结合的黄芪甲苷半抗原;

(3)用2mL 1M pH 8.0 的乙醇胺水溶液在20-25℃条件下封闭2小时;

(4)封闭交联反应结束,再用10mL 0.1M pH 8.0 的碳酸氢钠溶液洗涤除去多余的乙醇胺,得免疫亲和吸附剂。

[0051]

取4mg 步骤一制备的黄芪甲苷半抗原,与1mL 经环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B(购自GE 公司,货号00021307)填料,在2mL0.1M pH8.0 的碳酸氢钠溶液中充分混合,室温反应4h ;以10mL 碳酸氢钠缓冲液洗涤第二反应物去除未结合的黄芪甲苷半抗原后,用2mL1M pH8.0 的乙醇胺(国药集团化学试剂有限公司,货号398136)水溶液于室温下封闭交联物2h ;先洗涤再封闭然后再洗去多余的乙醇胺。

[0052] 将经环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B 0.02 g, 于双蒸水中溶胀30min, 并用双蒸水抽洗30 min, 分3组待用;

各组分别称取10mg黄芪甲苷以NaOH配置的不同梯度pH的80%甲醇溶液中溶解, 向溶液中加入溶胀、抽洗过的经环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B.3组分别在25℃、33℃、40℃下, 水浴振荡20 h, 转速110 r /min, 即得以黄芪甲苷为配基的免疫亲和吸附剂。

[0053] 交联反应的原理:经环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶6B上的环氧键在碱性条件下开环形成邻羟基,伯碳上的羟基与黄芪甲苷上的羟基脱去一个水分子进行缩合。

[0054] 交联物检测:将反应后的交联物取出,滤去上清液,先用50mL80%甲醇冲洗,再用50mL蒸馏水冲洗,烘干备用。取烘干后的交联物3mg与KBr混合经压片处理进行红外扫描,因反应发生在环氧基上,故通过对比交联前后环氧基对应的吸收峰(1295cm<sup>-1</sup>)可初步判定交联反应是否发生,即经反应后峰消失。

[0055] 三、免疫亲和层析柱的制备方法,具体步骤为:

(1)0.1M pH8.0 的碳酸氢钠溶液制备:称取0.84g 碳酸氢钠, 加蒸馏水至100mL。

[0056] (2)醋酸钠缓冲液(0.1M pH4.0,含有0.5M NaCl)制备:称取醋酸钠8.2g,1.04mL醋酸,29.22g NaCl,加蒸馏水定容至1000mL。

[0057] (3)Tris-HCl 缓冲液(0.1M pH8.0,含有0.5M NaCl)制备:称取12.114g Tris, 29.22gNaCl,加蒸馏水800mL,用0.1M HCl 调pH 至8.0,加蒸馏水定容至1000mL。

[0058] (4)将填料装入10mL层析柱中,分别用5mL 醋酸缓冲液(0.1M pH4.0,含有0.5M NaCl)和Tris-HCl 缓冲液(0.1M pH8.0,含有0.5M NaCl)交替洗涤填料三次(完成一次交替洗涤为一次),得到待用的以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱。

[0059] 四、本发明进一步提供了一种应用本发明所制备的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷单克隆抗体的方法,具体步骤为:

1、待纯化样品制备

向Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.4mL/ 只,7 天后再向腹腔注射杂交瘤细胞株

KWF9-11  $5 \times 10^5$  个/只,14 天后采集腹水作为待纯化样品;

2、取2mL经洗涤液稀释后的待纯化样品加入以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱中,流出液装入该柱中,再封住流出口,在室温下反应30min;

3、用洗脱液洗脱层析柱,使结合到层析柱上的黄芪甲苷单克隆抗体解离,至紫外分光光度计测定OD<sub>280</sub> 值低于0.01 以下;

4、中和液中和,收集时,在收集管中预先加入360 $\mu$ L中和液(收集到的洗脱液体积为3000 $\mu$ L,即洗脱液与中和液的体积比为300:36),以调节组分的pH,获得纯化后抗体。

[0060] 其中,所述洗涤液为0.1M pH4.0的含0.5M NaCl的醋酸缓冲液,该醋酸缓冲液制备方法为:取醋酸钠8.2g,醋酸1.04mL,NaCl 29.22g,加水配成1000mL溶液。

[0061] 所述洗脱液为0.1M pH8.0的含0.5M NaCl的Tris-HCl 缓冲液,该Tris-HCl 缓冲液制备方法为:称取Tris12.114g,NaCl 29.22g,加水配成1000mL溶液。

[0062] 所述中和液为1MpH8.8Tris-HCl缓冲液,该缓冲液由如下制备步骤得到:取121.14g Tris,加蒸馏水800mL,用0.1M HCl 调pH 至8.8,加蒸馏水至1000mL。

[0063] 在利用以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱进行样品纯化过程中,层析柱以及各溶液的温度都需要回复到室温,否则抗原抗体结合的速度会变慢;另外,注意待纯化的腹水中不能含有固体杂质,4 $^{\circ}$ C过夜后直接用0.45 $\mu$ m 的滤膜过滤,否则会堵住柱子,影响柱子使用寿命。

[0064] 黄芪甲苷单克隆抗体纯化图谱如图3 所示,从图中可以看出,在步骤一中洗涤液的清洗下,杂蛋白、非特异性抗体与未结合的特异性抗体会随洗涤液流出,而换为步骤一中洗脱液洗脱时,结合到层析柱上的特异性抗体会被解离下来。

[0065] 应用本发明所制备的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷单克隆抗体纯化效果分析。

[0066] (1)间接ELISA 法测定纯化前后抗体效价

包被缓冲液:0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液,配方为Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>1.59g,NaHCO<sub>3</sub>2.93g,加蒸馏水至1000mL。

[0067] 0.01M 磷酸盐缓冲液的配方为:NaCl18.5g,KCl10.02g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.9g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.593g,加蒸馏水至1000mL。

[0068] 封闭液:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 5.80g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.593g,NaCl 8.0g,酪蛋白2.50g,蔗糖50.00g,小牛血清50mL,ProClin-300 $\mu$ L,加蒸馏水至1000mL,pH7.4。

[0069] 抗体稀释液:NaCl16g,KCl10.04g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.9g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.593g,proclin-300 300 $\mu$ L,triton x-100 500 $\mu$ L,加蒸馏水至1000mL。

[0070] 采用间接ELISA 法测定纯化前后抗体效价,操作步骤具体如下:

1)包被:在96 孔酶标板中加入100 $\mu$ L 的2 $\mu$ g/mL 实施例1 步骤一中制备的黄芪甲苷人工抗原溶液(用包被缓冲液稀释),同时设置不包被抗原的对照,4 $^{\circ}$ C包被过夜,用0.01M 磷酸盐缓冲液洗涤3 次。

[0071] 2)封闭:加入150 $\mu$ L/ 孔的封闭液,在37 $^{\circ}$ C孵育1h,弃封闭液,洗涤3 次,拍干。置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0072] 3)加待测样品:吸取待测样品(纯化前或纯化后的抗体,调节浓度至0.1mg/mL 后用抗体稀释液进行梯度稀释(1 $\times$ ,10 $\times$ ,20 $\times$ ,40 $\times$ ,80 $\times$ ,100 $\times$ ,200 $\times$ ,400 $\times$ ,800 $\times$ )100 $\mu$ L,加入对应的酶标板中,37 $^{\circ}$ C孵育30min,洗板4 次,拍干。每个浓度梯度做3 个平行实验。

[0073] 同时设置以0.01M 磷酸盐缓冲液代替待检测样品的对照(阴性对照孔)。

[0074] 4)加酶标二抗:取HRP 标羊抗鼠二抗,按体积比1: 5000 倍稀释(用抗体稀释液稀释)后,100 $\mu$ L/ 孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min,洗涤4 次,拍干。

[0075] 5)显色:将20 $\times$ TMB 稀释至1 $\times$ TMB,按100 $\mu$ L/ 孔加入,37 $^{\circ}$ C显色15-30min。

[0076] 6)终止:加入终止液(2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)50 $\mu$ L/ 孔。

[0077] 7)读数:以450nm波长处测定各孔吸光值,以与阴性对照孔(以0.01M 磷酸盐缓冲液代替待测样品的对照)OD 值的比值(P/N)大于2.1 为限,作为判断为抗体效价的临界点。

[0078] ELISA 结果判定方法:以P/N>2.1 的抗体最大稀释倍数表示。

[0079] 纯化前后抗体的效价检测结果如图2所示,根据吸光值计算得到,纯化前抗体(即待纯化样品)的效价为1:6000,纯化后抗体的效价为1:7500。纯化后抗体的效价明显高于纯化前抗体的效价。

[0080] (2)间接竞争ELISA 法测定纯化前后抗体特异性

采用间接竞争ELISA 法测定纯化前后抗体特异性步骤如下:配制一系列浓度的AST标准品溶液作为竞争抑制剂,浓度分别为10  $\mu$ g/mL、5  $\mu$ g/mL、2.5  $\mu$ g/mL、1.25  $\mu$ g/mL、0.625 $\mu$ g/mL、0.3125  $\mu$ g/mL、0.15625 $\mu$ g/mL、0.078 $\mu$ g/mL、0.036 $\mu$ g/mL、0.018 $\mu$ g/mL。血清抗体浓度和抗原包被浓度按上面步骤确定的抗体最佳工作浓度。以包被缓冲液将包被抗原AST-OVA 稀释至工作浓度,每孔加100  $\mu$ L,放入37  $^{\circ}$ C烘箱中孵育1 h,于4  $^{\circ}$ C冰箱过夜,弃去孔内液体,用含体积分数0.5%吐温20的PBS(PBST)洗涤缓冲液洗5次,每次5 min;每孔加封闭液300  $\mu$ L,于37 $^{\circ}$ C温箱封闭2 h后,洗板;先向酶标板各列孔中加入配置好的不同浓度50 $\mu$ L AST溶液,再加入50 $\mu$ L稀释至工作浓度的小鼠抗血清,其余步骤按上述间接竞争ELISA法步骤进行。

[0081] 纯化前后抗体的特异性检测结果如图3 所示,纯化后抗体对黄芪甲苷的特异性要明显强于纯化前的样品。

[0082] (3)SDS-PAGE 分析纯化前后抗体纯度

以纯化前抗体(待纯化样品- 腹水)、纯化后抗体(洗脱液),进行SDS-PAGE 分析,每种样品在各自泳道的上样量均为10 $\mu$ g 蛋白总量,从而检测纯化前后抗体纯度。

[0083] SDS-PAGE 检测结果如图4 所示,从图中可以看出,大部分黄芪甲苷单克隆抗体都在洗脱液中,纯化后抗体的纯度达99%以上。

[0084] 综上所述,采用本发明技术方案所制备的以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱以及采用本层析柱纯化黄芪甲苷单克隆抗体的方法,通过对纯化前后黄芪甲苷单克隆抗体效价、特异性、SDS-PAGE、纯度分析检测,应用本发明免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷抗体,纯化效率高,纯度可达99%以上,可有效提高黄芪甲苷单克隆抗体的纯化效率,为进一步研制开发黄芪甲苷ELISA免疫检测试剂盒奠定了基础。

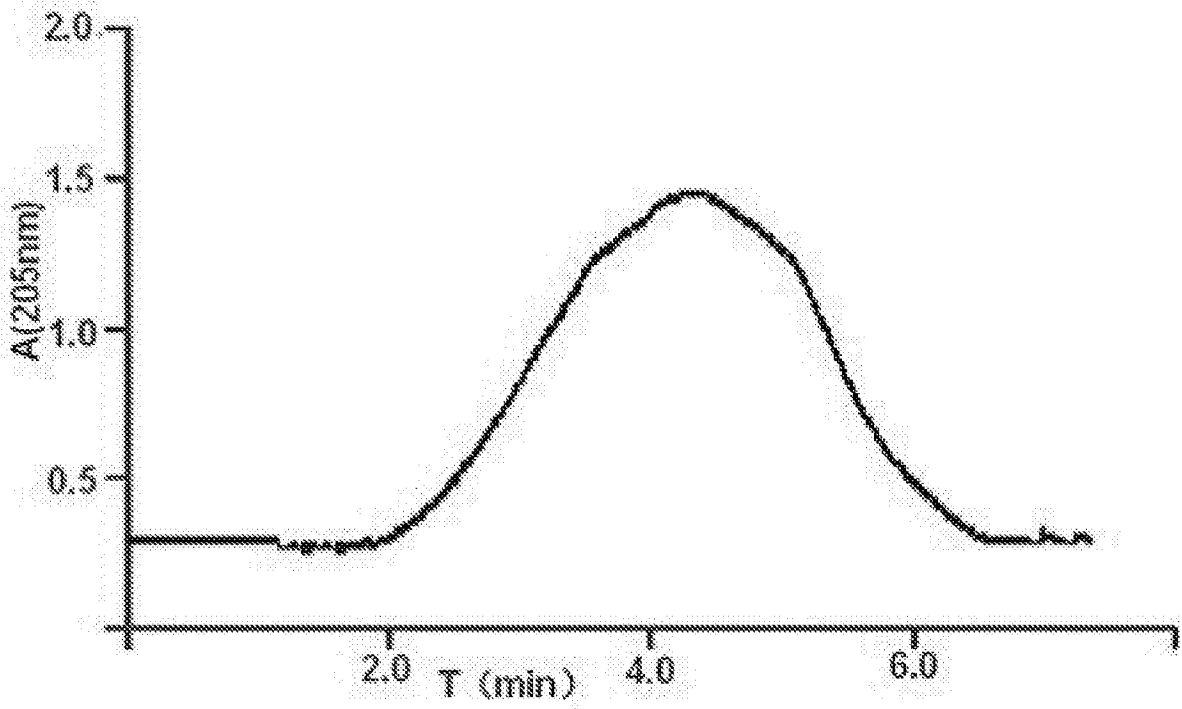


图1

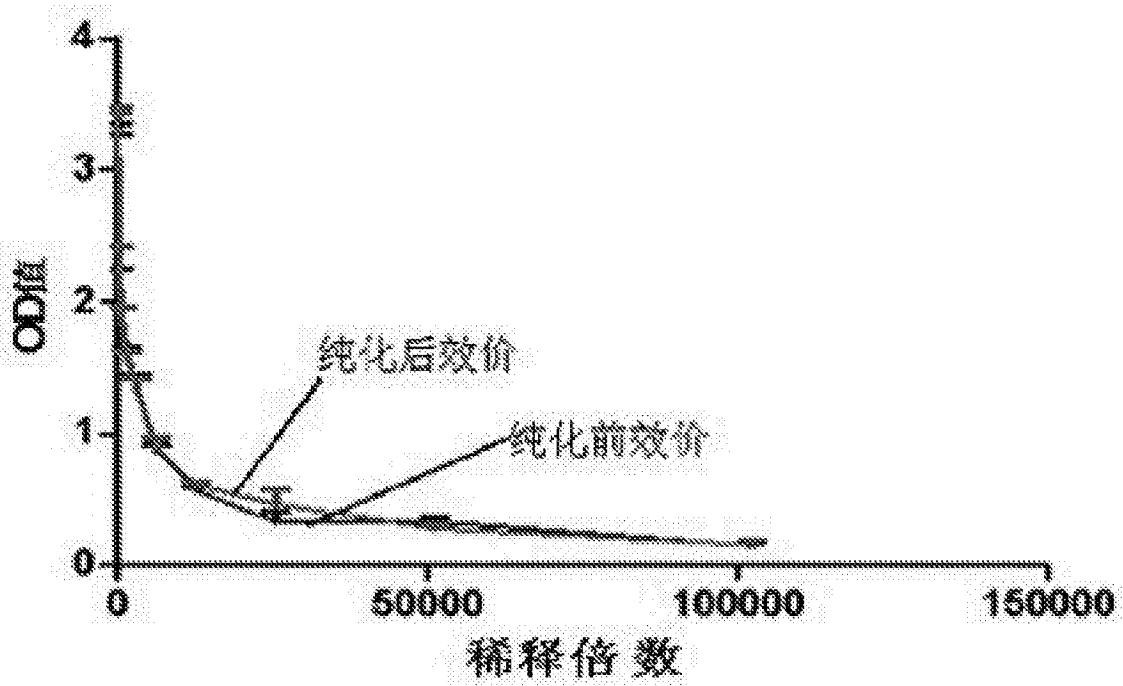


图2

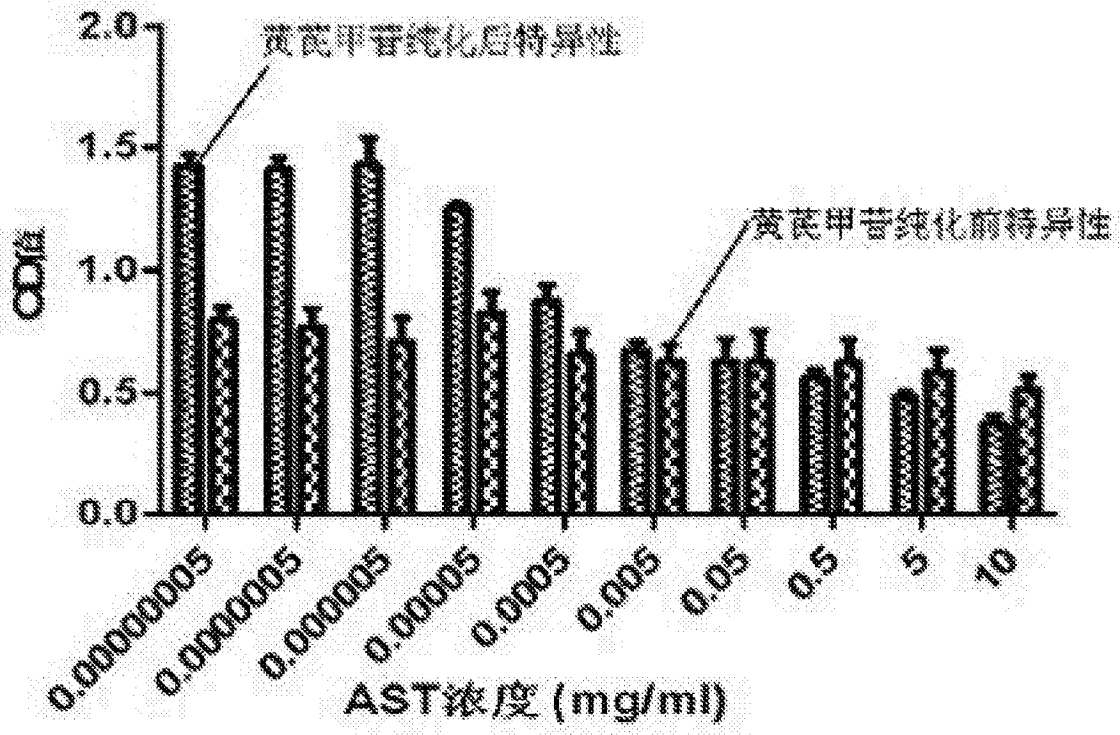


图3

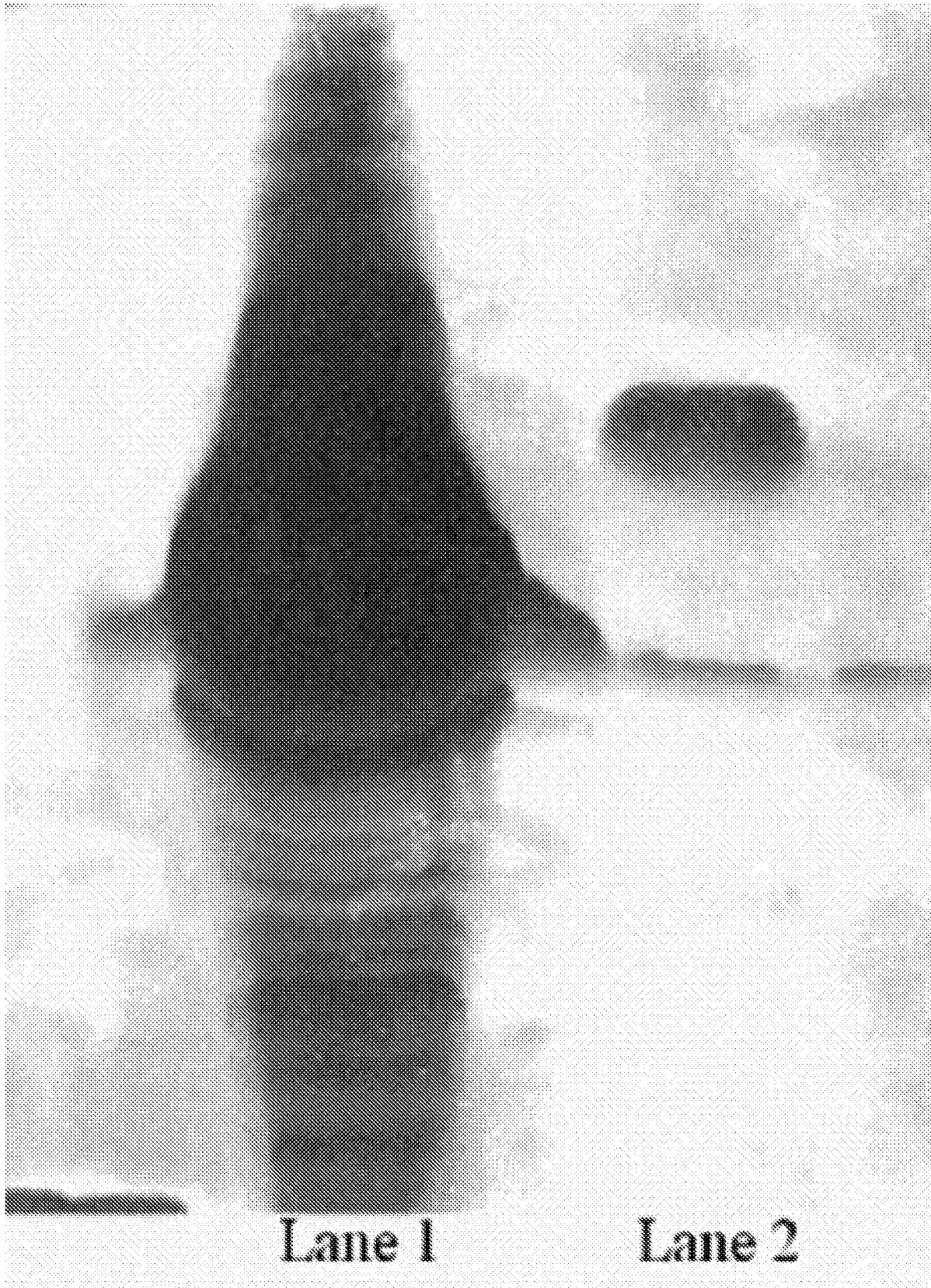


图4

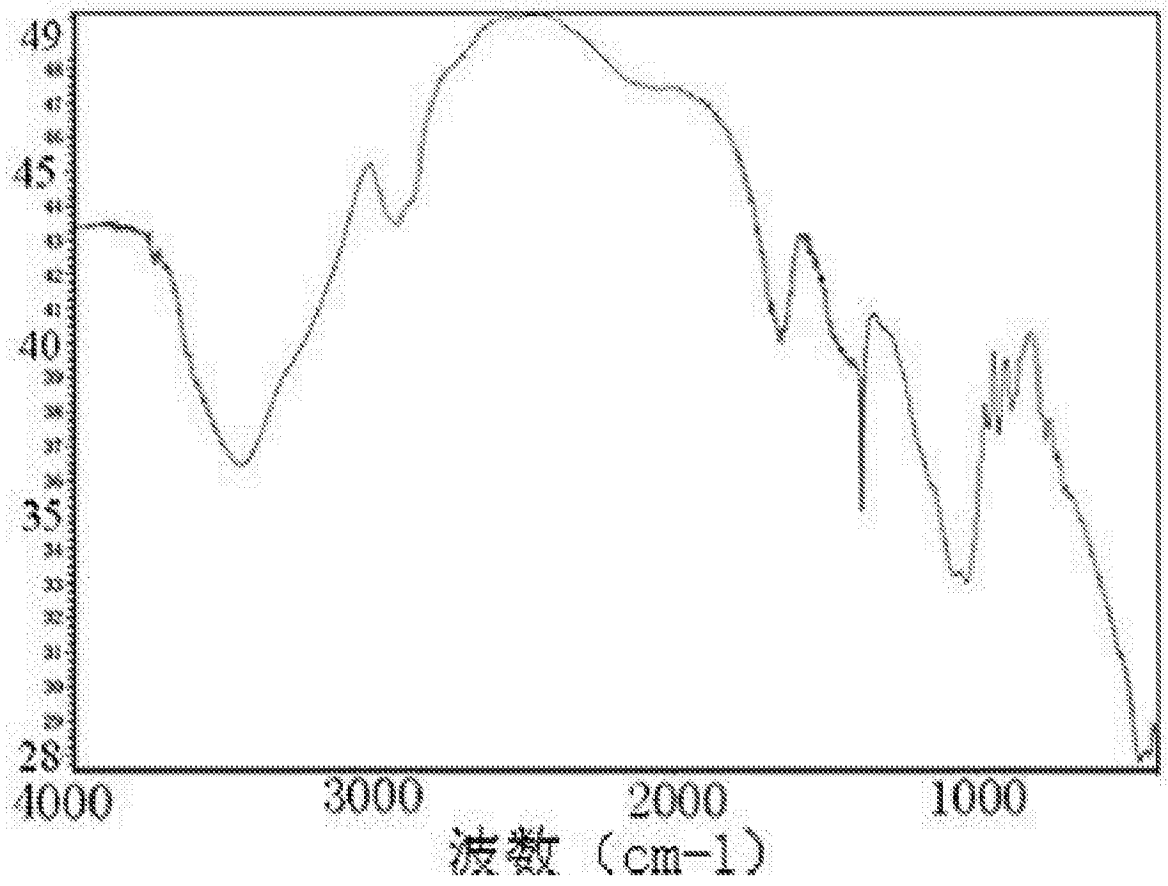


图5

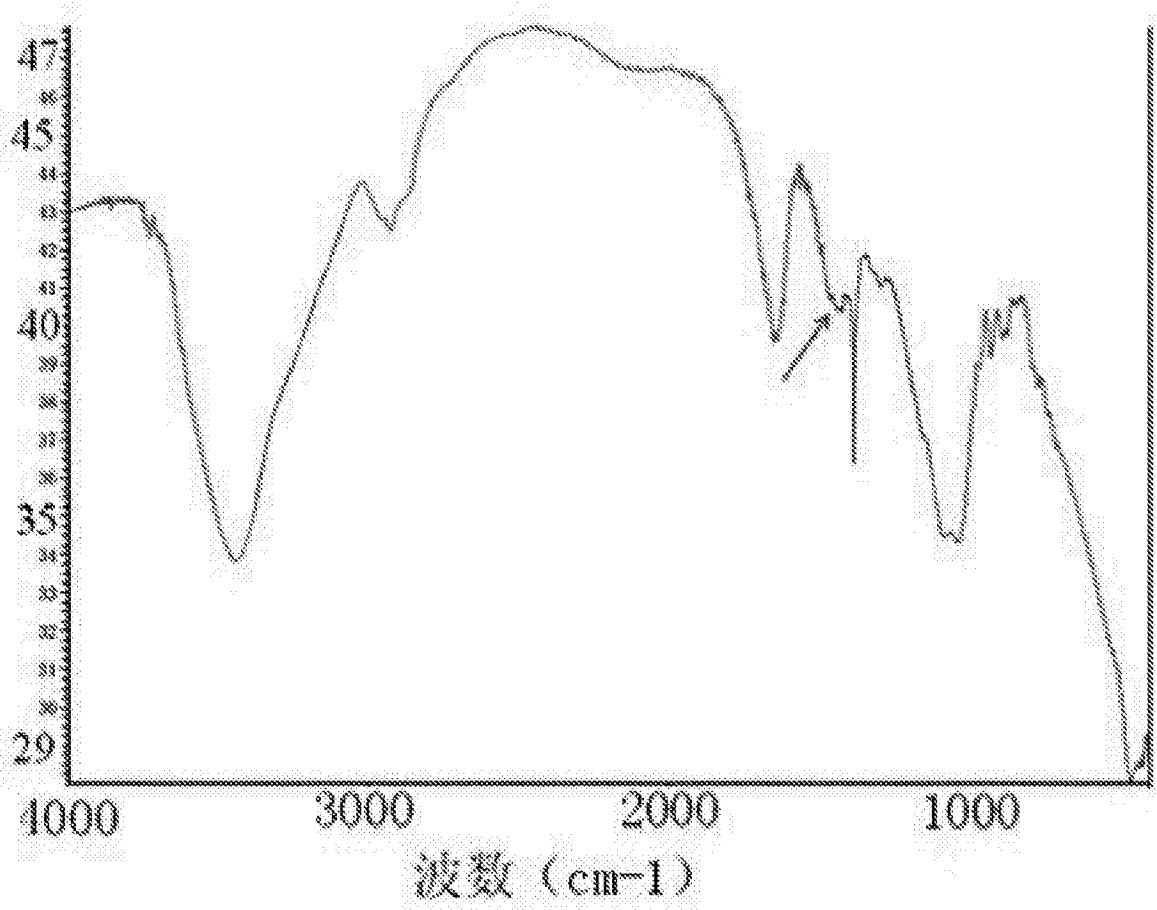


图6

专利名称(译)	一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105435758A</a>	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201510865924.2	申请日	2015-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	江苏农牧科技职业学院		
申请(专利权)人(译)	江苏农牧科技职业学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏农牧科技职业学院		
[标]发明人	于生兰 徐加兵 欧阳臻 王帅兵 秦枫 赵丽 洪伟鸣 陈毓 黄文强		
发明人	于生兰 徐加兵 欧阳臻 王帅兵 秦枫 赵丽 洪伟鸣 陈毓 黄文强		
IPC分类号	B01J20/281 B01J20/30 C07K16/44 C07K1/22 G01N33/531 B01D15/38		
代理人(译)	王楚云		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种以黄芪甲苷为配基的免疫亲和层析柱及其应用的技术方案，本发明以黄芪甲苷为配基，具体步骤为：制备黄芪甲苷半抗原，由黄芪甲苷半抗原与固相载体交联制备免疫亲和吸附剂，以免疫亲和吸附剂为填料装入层析柱，用醋酸缓冲液和Tris-HCl缓冲液交替洗涤填料三次得免疫亲和层析柱；应用本发明制备的免疫亲和层析柱纯化黄芪甲苷抗体的方法包括将待纯化样品加入到所述免疫亲和层析柱、洗脱液洗脱及中和液中和等步骤。本发明有效提高黄芪甲苷单克隆抗体的纯化效率，纯度可达99%以上，且操作简单、成本低、污染少。

