



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109470852 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201811496282.3

(22)申请日 2018.12.07

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 柳春红 周雄 肖治理 韦晓群
靳登鹏 赖依琳 刘焕

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 任重

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

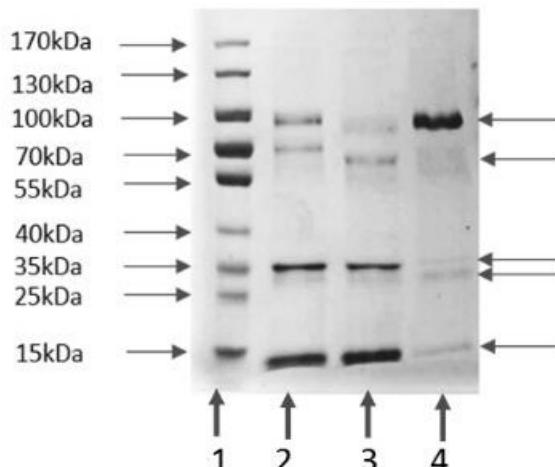
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱及其制备方法，所述母乳多克隆抗体是以去除脂肪的母乳作为免疫原制备得到，以此母乳多克隆抗体与固相配体支持物制备亲和吸附剂，加入到层析柱中，经洗涤、封闭、平衡后制得母乳多克隆抗体免疫亲和柱。本发明制备方法简单，能够对母乳中丰度相对较低、在质谱中的信号较低的蛋白进行富集，有利于人类更加正确的认识母乳的蛋白轮廓，能应用于母乳蛋白质组学下游的相关技术方面，值得大面积推广和应用。



1. 一种母乳多克隆抗体，其特征在于，所述多克隆抗体是以去除脂肪的母乳作为免疫原制备得到。
2. 根据权利要求1所述多克隆抗体，其特征在于，抗体溶液在被偏酸性的溶液洗脱后，立即用偏碱性的缓冲液中和。
3. 根据权利要求1所述多克隆抗体，其特征在于，纯化后的抗体0-10℃、3000-5000rpm超滤浓缩20-35min。
4. 根据权利要求1所述多克隆抗体，其特征在于，所得抗体经过Protein A/G agarose纯化。
5. 一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱，其特征在于，所述免疫亲和柱的柱中固定的是权利要求1-4任一所述多克隆抗体。
6. 根据权利要求5所述母乳多克隆抗体免疫亲和柱，其特征在于，是将权利要求1-4任一所述母乳多克隆抗体与固相配体支持物偶联得到亲和吸附剂，将亲和吸附剂填入柱中制得母乳多克隆抗体免疫亲和柱。
7. 根据权利要求6所述母乳多克隆抗体免疫亲和柱，其特征在于，所述固相配体支持物为琼脂多糖4B。
8. 根据权利要求5-7任一所述母乳多克隆抗体免疫亲和柱，其特征在于，所得亲和柱还需经防腐处理。
9. 根据权利要求5-7任一所述母乳多克隆抗体免疫亲和柱，其特征在于，所得亲和柱的保存温度为1-10℃。
10. 根据权利要求5-7任一所述母乳多克隆抗体免疫亲和柱，其特征在于，亲和柱经过使用后，可经再生处理后进行重复利用。

一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫亲和层析技术领域。更具体地，涉及一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱及其制备方法。

背景技术

[0002] 母乳作为婴儿理想的天然食物，除了蛋白质、脂肪、碳水化合物、矿物质、微量元素等，为婴儿生长发育提供能量与营养物质外，还含有丰富的生物活性物质，在增强婴儿抗感染能力、促进组织器官发育、建立自身免疫系统乃至调节婴儿社会行为等多方面发挥着重要的生物学功能。

[0003] 通过母乳蛋白质组学的研究，揭示母乳中具有生物活性的蛋白质，对认识母乳中蛋白质的轮廓和完善婴儿奶粉的配方具有关键性意义。但是这些具有生物活性的蛋白质，其丰度相对较低，况且低丰度蛋白在质谱中的信号较低，不利于人类更加正确认识母乳的蛋白质轮廓。因此目前除去高丰度蛋白、富集低丰度蛋白是解决研究瓶颈的主要策略。

[0004] 传统的蛋白质分离富集方法已经无法满足日益增长的技术需求，尤其体现在低丰度蛋白、糖基化后修饰蛋白和高分子量蛋白的分离分析方面。王静等的研究《利用免疫亲和层析技术去除母乳中高丰度蛋白的研究》中建立了一种去除母乳中高丰度蛋白的方法，使低丰度蛋白得到富集，但是该研究制备的免疫亲和层析柱一定程度上能够去除母乳中的4种高丰度蛋白，洗脱效果分离效果较差。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有母乳中高丰度蛋白去除及低丰度蛋白富集技术的缺陷和不足，提供一种母乳多克隆抗体，并基于该抗体构建了免疫亲和柱，能够更有效地去除母乳中的高丰度蛋白，对母乳中丰度相对较低、在质谱中的信号较低的蛋白进行富集，有利于人类更加正确的认识母乳的蛋白轮廓，能应用于母乳蛋白质组学下游的相关技术方面。

[0006] 本发明的目的是提供一种母乳多克隆抗体。

[0007] 本发明另一目的是提供一种利用上述母乳多克隆抗体制备的免疫亲和柱。

[0008] 本发明上述目的通过以下技术方案实现：

本发明首先制备了一种母乳多克隆抗体，是以去除脂肪的母乳作为免疫原制备得到。优选免疫剂量1.25mg/只。

[0009] 优选地，抗体溶液在被偏酸性的溶液洗脱后，立即用偏碱性的缓冲液中和，避免抗体在偏酸性的条件下失去活性。

[0010] 优选地，所述偏酸性的溶液为pH 2.5-3.5的Glycine洗脱液。

[0011] 更优选地，所述偏酸性的溶液为pH 3.0的Glycine洗脱液。

[0012] 优选地，所述偏碱性的缓冲液为pH8-9的Tris-HCl。

[0013] 更优选地，所述偏碱性的缓冲液为pH8.5的Tris-HCl。

[0014] 优选地,纯化后的抗体0-8℃、3000-5000rpm超滤浓缩20-35min,使抗体的浓度提高。

[0015] 更优选地,纯化后的抗体4℃、4000rpm超滤浓缩30min。

[0016] 优选地,所得抗体经过Protein A/G agarose纯化。

[0017] 具体地,所述多克隆抗体的制备方法如下:

S1. 母乳解冻后离心,避开上层乳清部分,吸取下层乳清部分;

S2. 初次免疫:母乳与弗氏佐剂乳化,乳化的标准是滴一滴液体在液面上,不散开证明乳化完成;

S3. 后续免疫:等量的抗原与非弗氏完全佐剂混合;

S4. 第四次免疫后,动脉取血,血清经过Protein A/G agarose纯化。

[0018] 优选地,步骤S1所述解冻的温度为0-8℃。

[0019] 更优选地,步骤S1所述解冻的温度为4℃。

[0020] 优选地,步骤S1所述离心的条件为0-8℃下1500-2500g离心10-30min。

[0021] 更优选地,步骤S1所述离心的条件为4℃下2000g离心20min。

[0022] 步骤S2和S3的免疫方法:多点皮下注射,免疫剂量1.25mg/只。

[0023] 步骤S4中纯化的方法如下:全部纯化过程在蛋白纯化仪上操作,将Protein A/G agarose装柱,将血清反复过柱后,先用0.15M NaCl,20mM Na₂HP0₄,pH 7.0的缓冲液洗涤,待基线平稳后,抗体溶液再用0.1M的Glycine pH 3.0的洗脱液,收集此阶段的出峰液体,然后立即用1M Tris-HCl pH8.5溶液将抗体调成中性,避免抗体在酸性条件下失活。

[0024] 其中,洗脱抗体的溶液通过超滤管(4℃,4000rpm,30min)经行了一定的浓缩,使IgG的浓度得到一定的提高。

[0025] 另外,基于上述母乳多克隆抗体,构建了一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱,其柱中固定的是上述母乳多克隆抗体。通过抗体与抗原的特异性结合,来去除母乳中的高丰度蛋白。

[0026] 优选地,是将所述母乳多克隆抗体与固相配体支持物偶联得到亲和吸附剂,将亲和吸附剂填入柱中制得母乳多克隆抗体免疫亲和柱。填入亲和吸附剂后需经洗涤、封闭、平衡,制得母乳多克隆抗体免疫亲和柱。

[0027] 优选地,所述固相配体支持物为琼脂多糖4B。

[0028] 优选地,所述偶联的步骤如下:

S11.把多克隆抗体在偶联缓冲液中进行透析;

S12.偶联:将琼脂多糖4B装入层析柱中,先用偶联缓冲液洗去过多的丙酮,然后将抗体加入到层析柱中,过夜;

S13.洗涤:用至少5倍琼脂多糖4B体积的偶联缓冲液清洗多余的抗体;

S14.封闭:转移到封闭缓冲液中,封闭任何活化的基团;

S15.平衡:先用5倍介质体积的0.2mol/L NaHC0₃、0.5mol/L的NaCl、pH8.3的缓冲液清洗,再用5倍介质体积的0.1M的乙酸/乙酸钠(pH4.0,包含0.5M的NaCl)洗涤,最后用5倍介质体积的0.1MTris-HCl(pH8.0,包含0.5MNaCl)洗涤;以上循环重复3次;

S16.后面紧接着是用0.1MTris-HCl(pH8.0,包含0.5MNaCl);得到琼脂多糖-抗体偶联复合物的IAC柱。

- [0029] 其中优选地，所述偶联缓冲液的成分为：0.1—0.3mol/L NaHCO₃、0.4—0.6mol/L的NaCl。
- [0030] 更优选地，所述偶联缓冲液的成分为：0.2mol/L NaHCO₃、0.5mol/L的NaCl。
- [0031] 步骤S12中过夜的条件为4℃、180—220rpm、8—12h。
- [0032] 步骤S13洗涤的方法是：静置，待凝胶沉降后，去掉上层的水，再重新倒入偶联缓冲液，如此反复。
- [0033] 步骤S14封闭的条件是：转移到封闭缓冲液中后，在4℃过夜或室温放置2h，或者是放置于pH8.0、0.1M的Tris-HCl缓冲液中放置2h。
- [0034] 进一步优选地，上述所制得的亲和柱还需经防腐处理。
- [0035] 优选地，防腐处理方法是使用1/10000叠氮钠的PBS缓冲液浸泡。
- [0036] 另外，优选地，所得亲和柱的保存温度为1—10℃。优选4℃。
- [0037] 最后，本发明的亲和柱经过使用后，可经再生处理后进行重复利用。
- [0038] 优选地，所述再生处理的方法是：使用后立即用5—10个柱体积的PBS洗涤，最后在用含1/10000叠氮钠的PBS保存，在4℃保存。
- [0039] 本发明具有以下有益效果：

本发明公开了一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱及其制备方法。本发明制备方法简单，能够更有效地去除母乳中的高丰度蛋白，能够对母乳中丰度相对较低、在质谱中的信号较低的蛋白进行富集，有利于人类更加正确的认识母乳的蛋白轮廓，能应用于母乳蛋白质组学下游的相关技术方面，值得大面积推广和应用。

附图说明

- [0040] 图1为纯化后抗体的电泳图；1号泳道代表Marker，2号泳道代表未纯化的血清，3号泳道代表纯化后的血清。
- [0041] 图2为本发明母乳多克隆抗体免疫亲和柱的洗脱高丰度蛋白的结果；1号泳道代表marker，2号泳道母乳样本，3号样本经过免疫亲和柱洗涤下来的样品（去除高丰度蛋白的样本），4号泳道代表免疫亲和柱洗脱下来的样品（高丰度蛋白）；2,3泳道上样量都为5.45μg蛋白。

具体实施方式

[0042] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明，但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明，本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0043] 除非特别说明，以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0044] 实施例1 母乳多克隆抗体的制备

1、制备方法

将母乳去除脂肪后，作为免疫原（免疫剂量1.25mg/只），通过免疫方法获得多克隆抗体。具体方法如下：

母乳4度解冻，在4℃度下2000g离心20min，避开上层乳清部分，吸取下层乳清部分。通过BCA测蛋白浓度。初次免疫时，母乳与弗氏佐剂乳化，乳化的标准是滴一滴液体在液面上，

不散开证明乳化完成,后续免疫,等量的抗原与非弗氏完全佐剂混合。免疫方法:多点皮下注射,免疫剂量1.25mg/只。第四次免疫后取血,效价大于 10^5 ,就可以动脉取血。所得到的血清经过Protein A/G agarose纯化。

[0045] 纯化过程如下:全部纯化过程在蛋白纯化仪上操作,将Protein A/G agarose装柱,将血清反复过柱后,先用0.15M NaCl,20mM Na₂HPO₄,pH 7.0的缓冲液洗涤,待基线平稳后,抗体溶液再用0.1M的Glycine pH 3.0的洗脱液,收集此阶段的出峰液体,然后立即用1M Tris-HCl pH8.5溶液将抗体调成中性,避免抗体在酸性条件下失活。洗脱抗体溶液通过超滤管(4℃,4000rpm,30min)进行超滤浓缩,使IgG的浓度得到一定的提高。

[0046] 经SDS-PAGE电泳验证抗体纯化效果,将含有抗体溶液超滤浓缩。

[0047] 2、结果

间接ELISA测效价,如表1所示。四免的效价在512000与1024000之间,证明免疫效果较好。

[0048] 表1

血清稀释度	空白	1: 256000	1: 512000	1: 1024000
OD ₄₅₀	0.105	2.399	1.213	0.747

通过Protein A/G agarose纯化血清后,得到纯化后抗体进行电泳,如图1所示,纯化后出现明显的IgG55KDa的重链带和25KDa的轻链带。

[0049] 实施例2 母乳多克隆抗体免疫亲和柱的制备

1、一种母乳多克隆抗体IAC的制备方法,是将实施例1制备的母乳多克隆抗体与琼脂多糖凝胶4B偶联得到亲和吸附剂,填入柱中制得母乳多克隆抗体免疫亲和柱。

[0050] 其中抗体与凝胶偶联步骤如下:

S11.更换抗体缓冲液:把纯化的多克隆抗体在偶联缓冲液(0.2mol/L NaHCO₃,0.5mol/L的NaCl)中进行透析;

S12.偶联:将琼脂多糖4B装入层析柱中,先用偶联缓冲液洗去过多的丙酮,然后将抗体加入到层析柱中,移入4℃摇床过夜;

S13.洗涤:用至少5倍凝胶介质体积的偶联缓冲液清洗多余的抗体,方法是:静置,待凝胶沉降后,去掉凝胶上层的水,然后再重新倒入偶联缓冲液,如此反复;

S14.封闭:将偶联抗体的凝胶转移到封闭缓冲液中,在4℃条件下过夜或者在室温条件下放置2h,或者是放置于pH8.0,0.1M的Tris-HCl缓冲液中放置2h,封闭任何活化的基团;

S15.平衡:用至少三种不同pH的缓冲液循环洗涤介质,每一种缓冲液至少是5倍的介质体积;具体是先用5倍介质体积的0.2mol/L NaHCO₃,0.5mol/L的NaCl,pH8.3的缓冲液清洗,再用5倍介质体积的0.1M的乙酸/乙酸钠(pH4.0,包含0.5M的NaCl)洗涤,最后用5倍介质体积的0.1MTris-HCl(pH8.0,包含0.5MNaCl)洗涤;以上循环重复3次,每一次循环清洗都应包含有0.1M的乙酸/乙酸钠(pH4.0,包含0.5M的NaCl);

S16.后面紧接着是用0.1MTris-HCl(pH8.0,包含0.5MNaCl);得到琼脂多糖-抗体偶联复合物的IAC柱。

[0051] 2、后续处理

上述步骤S15制备好的IAC柱如需放置一段时间,应使用1/10000叠氮钠的PBS缓冲液浸泡,进行防腐处理。

[0052] 另外, IAC柱切勿冻存, 应放在4℃冰箱里保存。

[0053] 再者, IAC的再生: IAC柱使用后, 立即用5~10个柱体积的PBS洗涤, 最后在用含1/10000叠氮钠的PBS保存, 在4度冰箱里保存。

[0054] 实施例3 母乳多克隆抗体免疫亲和柱的使用

1、母乳多克隆抗体的免疫亲和柱的使用方法。即利用该亲和柱洗脱高丰度蛋白、富集低丰度蛋白的方法, 包括以下步骤:

S21. 用5倍柱体积的PBS溶液洗去残存的叠氮化钠;

S22. 取适量的母乳, 用PBS溶液稀释, 进行上样, 在4℃下孵育30 min;

S23. 孵育结束后, 用PBS清洗未与抗体结合的蛋白及其它杂质, 通过蛋白纯化仪辅助纯化;

S24. 待基线稳定后, 用洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液, 立刻用偏碱性的Tris (pH=8.0) 的溶液进行中和, 洗脱液的pH调至7。处理后的洗脱液即为经过洗脱高丰度蛋白、富集低丰度蛋白的样品, 可进行电泳检测。

[0055] 同时, 将使用后的IAC柱子, 用5~10倍柱体积的PBS溶液清洗, 减少酸性对琼脂多糖的降解作用, 最后使用1/10000叠氮钠的PBS缓冲液保存, 存放温度为4℃。经过该步骤处理后的IAC柱子可以再生循环利用。

[0056] 2、电泳检测结果如图2所示

由图可以看出, 2号泳道和3号泳道相比, 高丰度蛋白有相应的减少, 同时4号泳道有相对应的高丰度蛋白洗脱下来, 低丰度的蛋白得到富集。证明亲和免疫柱很好的洗脱高丰度蛋白、富集低丰度蛋白的效果。

[0057] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

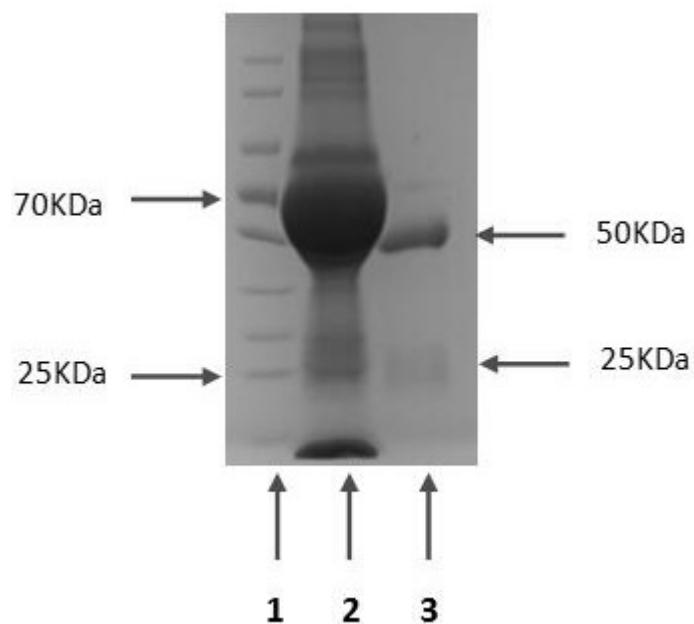


图1

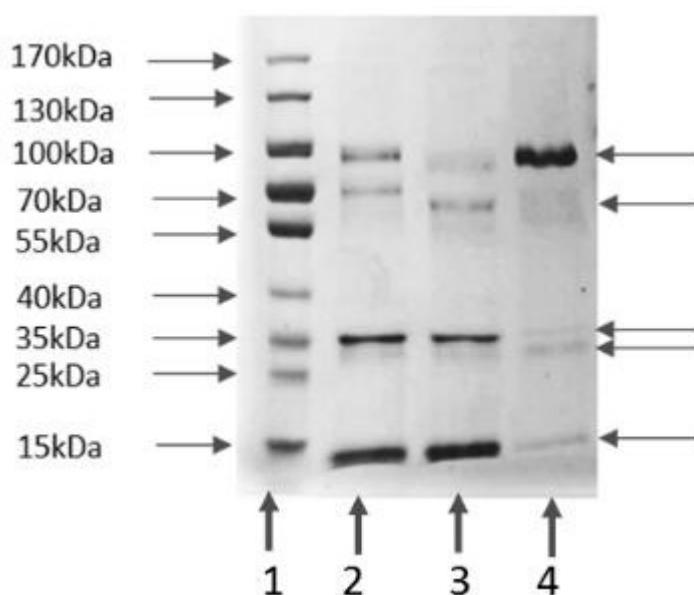


图2

专利名称(译)	一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱及其制备方法		
公开(公告)号	CN109470852A	公开(公告)日	2019-03-15
申请号	CN201811496282.3	申请日	2018-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	柳春红 周雄 肖治理 韦晓群 刘焕		
发明人	柳春红 周雄 肖治理 韦晓群 靳登鹏 赖依琳 刘焕		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	任重		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种母乳多克隆抗体免疫亲和柱及其制备方法，所述母乳多克隆抗体是以去除脂肪的母乳作为免疫原制备得到，以此母乳多克隆抗体与固相配体支持物制备亲和吸附剂，加入到层析柱中，经洗涤、封闭、平衡后制得母乳多克隆抗体免疫亲和柱。本发明制备方法简单，能够对母乳中丰度相对较低、在质谱中的信号较低的蛋白进行富集，有利于人类更加正确的认识母乳的蛋白轮廓，能应用于母乳蛋白质组学下游的相关技术方面，值得大面积推广和应用。

