



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109001448 A

(43)申请公布日 2018.12.14

(21)申请号 201810610896.3

(22)申请日 2018.06.14

(71)申请人 广东腾湃医疗股份有限公司

地址 511500 广东省清远市狮子湖大道1号
渔人码头商业街B区101号

(72)发明人 张积仁 李波 王进京 杨万泉
钟锦永

(74)专利代理机构 北京华仲龙腾专利代理事务
所(普通合伙) 11548

代理人 李静

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法

(57)摘要

本发明公开了一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法,包括以下步骤:步骤一:先将螯合剂溶液配制完成,再将螯合剂溶于溶剂中,即可得到螯合剂溶液,步骤二:取适量载体蛋白,将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,即可制得载体蛋白溶液,步骤三:将已制得的螯合剂溶液加入到载体蛋白溶液中,置于恒温水浴中并搅拌均匀,恒温水浴,即可得到混合液,步骤四:自制半透膜,步骤五:预提纯除去未螯合的砷离子和其它杂离子,步骤六:除去未结合的载体蛋白。本发明的提纯过程中部分用品自制,因此能够显著降低提纯成本,工作环境的要求更低,适用的范围更加广泛,使用复式层析柱有效减少提纯和纯化时间,一定程度上降低了成本。

1. 一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一:先将螯合剂溶液配制完成,再将螯合剂溶于溶剂中,即可得到螯合剂溶液;

步骤二:取适量载体蛋白,将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,即可制得载体蛋白溶液;

步骤三:将已制得的螯合剂溶液加入到载体蛋白溶液中,置于恒温水浴中并搅拌均匀,恒温水浴,即可得到混合液;

步骤四:自制半透膜,向光滑、洁净、干燥的250ml锥形瓶中倒入火棉胶溶液,小心转动容器,使火棉胶溶液均匀附在壁上成一薄层,倾出多余的溶液,然后将容器倒置,进一步将多余溶液流尽和使溶剂乙醚挥发掉,直至用手指轻触所形成的膜而不粘着方可,然后往容器中加水至满为止,遇水后在乙醚未蒸发干的地方会发白,制成半透膜,将瓶口上的膜脱开,并在膜与容器壁间注入水,使膜自动脱离瓶壁,轻轻取出制成的袋形半透膜,检查是否有孔洞,如果有则不能使用,应重新制作,若以膜袋浸入不同浓度的乙醇水溶液中,则可得到不同渗透度的膜,按此法制作的半透膜不使用时,则应存放于水中,以免损坏;

步骤五:预提纯除去未螯合的砷离子和其它杂离子,在将3-5组半透膜按内外次序排列后加入EDTA溶液煮沸10min,弃废液后用ddH₂O冲洗,重复该步骤2-4次,步骤三中的混合液装入处理后的多层半透膜中,用ddH₂O透析换水,4℃透析过夜之后,收集液体;

步骤六:除去未结合的载体蛋白,取未使用的复式层析柱,用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在上层层析柱中装入能与砷离子特异性结合的填料,在下层层析柱中装入能与载体蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液K₂HPO₄平衡层析柱,待层析柱平衡后,用稀释缓冲液K₂HPO₄稀释步骤四中的样品,然后上柱,载体蛋白与填料特异性结合,使用稀释缓冲液K₂HPO₄冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.1mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱,收集得到的洗脱液,装入半透膜,用ddH₂O透析,换水2-4次后,4℃透析过夜,收集样本,即可得到高纯度的砷螯合型免疫复合物。

2. 根据权利要求1所述的砷螯合型免疫复合物,其特征在于:所述免疫复合物或载体蛋白的结构中至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的一种,砷离子与免疫复合物或载体蛋白与锌指结构或巯基或半胱氨酸残基相结合。

3. 根据权利要求1所述的砷螯合型免疫复合物,其特征在于:所述载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫或免疫球蛋白中的一种。

4. 根据权利要求1所述的砷螯合型免疫复合物,其特征在于,所述砷离子通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合,所述螯合剂为ITCBE、EDTA、多磷酸盐、氨基酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

5. 一种定性检测砷螯合型循环免疫复合物的方法,其特征在于,以已知含量的权利要求1所述的砷螯合型免疫复合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫复合物领域,具体为一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法。

背景技术

[0002] 免疫复合物是抗体与抗原结合所得到的一种复合物,是由各种免疫细胞、吞噬细菌,病毒,致敏物质共同死亡后结合而形成的,所以又称抗原-抗体复合物,在某些情况下,抗原与抗体在体内形成的免疫复合物,沉积于血管壁基底部,从而激活补体,被激活的补体,发挥溶解细菌、病毒、肿瘤细胞等作用,但是现有提纯砷螯合型免疫复合物方法,提纯的成本较高,提纯过程中对实验研究的环境要求高,影响使用范围限制了使用,而提纯时间较长,增加了提纯和纯化的时间。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法及其制备方法,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法,包括以下步骤:

[0005] 步骤一:先将螯合剂溶液配制完成,再将螯合剂溶于溶剂中,即可得到螯合剂溶液;

[0006] 步骤二:取适量载体蛋白,将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,即可制得载体蛋白溶液;

[0007] 步骤三:将已制得的螯合剂溶液加入到载体蛋白溶液中,置于恒温水浴中并搅拌均匀,恒温水浴,即可得到混合液;

[0008] 步骤四:自制半透膜,向光滑、洁净、干燥的250ml锥形瓶中倒入火棉胶溶液,小心转动容器,使火棉胶溶液均匀附在壁上成一薄层,倾出多余的溶液,然后将容器倒置,进一步将多余溶液流尽和使溶剂乙醚挥发掉,直至用手指轻触所形成的膜而不粘着方可,然后往容器中加水至满为止,遇水后在乙醚未蒸发干的地方会发白,制成半透膜,将瓶口上的膜脱开,并在膜与容器壁间注入水,使膜自动脱离瓶壁,轻轻取出制成的袋形半透膜,检查是否有孔洞,如果有则不能使用,应重新制作,若以膜袋浸入不同浓度的乙醇水溶液中,则可以得到不同渗透度的膜,按此法制作的半透膜不使用时,则应存放于水中,以免损坏;

[0009] 步骤五:预提纯除去未螯合的砷离子和其它杂离子,在将3-5组半透膜按内外次序排列后加入EDTA溶液煮沸10min,弃废液后用ddH₂O冲洗,重复该步骤2-4次,步骤三中的混合液装入处理后的多层半透膜中,用ddH₂O透析换水,4℃透析过夜之后,收集液体;

[0010] 步骤六:除去未结合的载体蛋白,取未使用的复式层析柱,用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在上层层析柱中装入能与砷离子特异性结合的填料,在下层层析柱中装入能与载体蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液K₂HPO₄平衡层析柱,待层析柱平

衡后,用稀释缓冲液 K_2HPO_4 稀释步骤四中的样品,然后上柱,载体蛋白与填料特异性结合,使用稀释缓冲液 K_2HPO_4 冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.1mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱,收集得到的洗脱液,装入半透膜,用ddH₂O透析,换水2-4次后,4℃透析过夜,收集样本,即可得到高纯度的砷整合型免疫复合物。

[0011] 优选的,所述免疫复合物或载体蛋白的结构中至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的一种,砷离子与免疫复合物或载体蛋白与锌指结构或巯基或半胱氨酸残基相结合。

[0012] 优选的,所述载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫或免疫球蛋白中的一种。

[0013] 优选的,所述砷离子通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合,所述螯合剂为ITCBE、EDTA、多磷酸盐、氨基酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

[0014] 一种定量检测砷整合型循环免疫复合物的方法,以已知含量上述的砷整合型免疫复合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明的提纯过程中部分用品自制,因此能够显著降低提纯成本,对工作环境的要求更低,适用的范围更加广泛,使用复式层析柱有效减少提纯和纯化的时间,一定程度上降低了成本。

具体实施方式

[0016] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0017] 本发明提供一种技术方案:一种新型提纯砷整合型免疫复合物方法,包括以下步骤:

[0018] 步骤一:先将螯合剂溶液配制完成,再将螯合剂溶于溶剂中,即可得到螯合剂溶液;

[0019] 步骤二:取适量载体蛋白,将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,即可制得载体蛋白溶液;

[0020] 步骤三:将已制得的螯合剂溶液加入到载体蛋白溶液中,置于恒温水浴中并搅拌均匀,恒温水浴,即可得到混合液;

[0021] 步骤四:自制半透膜,向光滑、洁净、干燥的250ml锥形瓶中倒入火棉胶溶液,小心转动容器,使火棉胶溶液均匀附在壁上成一薄层,倾出多余的溶液,然后将容器倒置,进一步将多余溶液流尽和使溶剂乙醚挥发掉,直至用手指轻触所形成的膜而不粘着方可,然后往容器中加水至满为止,遇水后在乙醚未蒸发干的地方会发白,制成半透膜,将瓶口上的膜脱开,并在膜与容器壁间注入水,使膜自动脱离瓶壁,轻轻取出制成的袋形半透膜,检查是

否有孔洞,如果有则不能使用,应重新制作,若以膜袋浸入不同浓度的乙醇水溶液中,则可得到不同渗透度的膜,按此法制作的半透膜不使用时,则应存放于水中,以免损坏;

[0022] 步骤五:预提纯除去未螯合的砷离子和其它杂离子,在将3-5组半透膜按内外次序排列后加入EDTA溶液煮沸10min,弃废液后用ddH₂O冲洗,重复该步骤3次,步骤三中的混合液装入处理后的多层半透膜中,用ddH₂O透析换水,4℃透析过夜之后,收集液体;

[0023] 步骤六:除去未结合的载体蛋白,取未使用的复式层析柱,用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在上层层析柱中装入能与砷离子特异性结合的填料,在下层层析柱中装入能与载体蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液K₂HPO₄平衡层析柱,待层析柱平衡后,用稀释缓冲液K₂HPO₄稀释步骤四中的样品,然后上柱,载体蛋白与填料特异性结合,使用稀释缓冲液K₂HPO₄冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.1mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱,收集得到的洗脱液,装入半透膜,用ddH₂O透析,换水3次后,4℃透析过夜,收集样本,即可得到高纯度的砷螯合型免疫复合物。

[0024] 进一步的,免疫复合物或载体蛋白的结构中至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的一种,砷离子与免疫复合物或载体蛋白与锌指结构或巯基或半胱氨酸残基相结合。

[0025] 进一步的,载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫或免疫球蛋白中的一种。

[0026] 进一步的,砷离子通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合,螯合剂为ITCBE、EDTA、多磷酸盐、氨基酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

[0027] 本发明还提供一种定量检测砷螯合型循环免疫复合物的方法,以已知含量上述的砷螯合型免疫复合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

[0028] 本发明除特别说明外,涉及的实验操作步骤均为本领域常规的步骤,试剂、材料如下述所列举,在本发明中没有列举出来的均为本领域常用的或者可以通过市购方式获得:

[0029] 稀释缓冲液为pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液,配制方法示例:取1.5g的K₂CO₃和1.93g的KHCO₃溶解加ddH₂O定容至1000mL;

[0030] 洗涤缓冲液为pH7.4的0.15MPBS缓冲液,配制方法示例:取0.2g的KH₂PO₄、2.90g的Na₂HPO₄·12H₂O、8.0g的NaCl、0.2g的KCl、0.5mLTween-20,溶解加ddH₂O定容至1000mL;

[0031] 封闭液为牛血清白蛋白溶液,配制方法示例:取0.1g牛血清白蛋白,加入洗涤缓冲液稀释定容至100mL;

[0032] 终止液为2MH₂SO₄,配制方法示例:取178.3mL的ddH₂O,向ddH₂O中逐滴沿壁加入浓H₂SO₄,边加边搅拌,定容至200mL;

[0033] 底物缓冲液的pH为5.0、Na₂HPO₄的摩尔浓度为0.2M、柠檬酸的摩尔浓度为0.1M,每50mL的底物缓冲液的制备方法如下:取1.42gNa₂HPO₄、0.96g柠檬酸,然后加入ddH₂O至50mL,即得;

[0034] 底物为甲基联苯胺(TMB)溶液,该甲基联苯胺(TMB)溶液由按照如下比例的组分配制而成:TMB:底物缓冲液:0.75%H₂O₂=0.5mL:10mL:32μL,其中TMB为2g/L的甲基联苯胺乙醇溶液;

[0035] 可以捕获免疫复合物的蛋白为可与免疫复合物特异性结合的蛋白,包括但不限于如补体C1q、C1F蛋白、抗C3抗体;以下实施例中,可以捕获免疫复合物的蛋白具体使用的是C1qRecombinantProtein,货号为“NOVUSH00000712-p01”;

[0036] 捕获砷的物质为货号为“广州然科公司RK15728”的鼠抗AsmAb,以下实施方式中的与砷特异性结合的物质、与砷有亲和力的物质、二抗、抗砷抗体均为捕获得砷的物质;

[0037] 能与载体蛋白特异性结合的抗体为兔抗人载体蛋白抗体,为市售。

[0038] 以下稀释倍比为重量体积比。

[0039] 方法一:提纯CIC法+ELISA法检测砷螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0040] 1) 提取非特异性免疫复合物:利用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶;

[0041] 2) 用可以捕获砷的物质包被于固相载体上:用样品缓冲液稀释包被抗体至15500-100000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0042] 3) 封闭:移去样品缓冲液稀释,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于36.7-37.5℃放置1小时;

[0043] 4) 加待检样品,并且温育:从提取的非特异性免疫复合物的复溶液中取样,作待检样品;以已知含量的砷螯合型免疫复合物作标准样品;用样品缓冲液稀释10-40倍,加入微孔中,37℃作用1-2.5小时;

[0044] 5) 酶结合物温育:移去非特异性免疫复合物的复溶液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的HRP酶标抗体,37℃作用1.5-2小时,使其与抗砷抗体反应;

[0045] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0046] 7) 终止反应:以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔。

[0047] 8) 取波长为405nm,加完终止液后,在上述ELISA试剂板中洗脱的溶液中取0.5ml液体,于酶标仪上分别读取待测样品组和标准样品的OD值,通过与标准样品组比较,求得待测样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0048] 方法二:提纯CIC法+AAS法检测砷螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0049] 1) 提取非特异性免疫复合物:利用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶;

[0050] 2) 检测:从非特异性免疫复合物的复溶液中取0.5ml液体,于原子吸收光谱仪检测螯合于免疫复合物上的砷,读出相应数值。

[0051] 本发明的提纯过程中部分用品自制,因此能够显著降低提纯成本,对工作环境的要求更低,适用的范围更加广泛,使用复式层析柱有效减少提纯和纯化的时间,一定程度上降低了成本。

[0052] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

专利名称(译)	一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法		
公开(公告)号	CN109001448A	公开(公告)日	2018-12-14
申请号	CN201810610896.3	申请日	2018-06-14
[标]发明人	张积仁 李波 王进京 杨万泉		
发明人	张积仁 李波 王进京 杨万泉 钟锦永		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	李静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新型提纯砷螯合型免疫复合物方法，包括以下步骤：
 步骤一：先将螯合剂溶液配制完成，再将螯合剂溶于溶剂中，即可得到螯合剂溶液，步骤二：取适量载体蛋白，将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中，即可制得载体蛋白溶液，步骤三：将已制得的螯合剂溶液加入到载体蛋白溶液中，置于恒温水浴中并搅拌均匀，恒温水浴，即可得到混合液，步骤四：自制半透膜，步骤五：预提纯除去未螯合的砷离子和其它杂离子，步骤六：除去未结合的载体蛋白。本发明的提纯过程中部分用品自制，因此能够显著降低提纯成本，工作环境的要求更低，适用的范围更加广泛，使用复式层析柱有效减少提纯和纯化时间，一定程度上降低了成本。