



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105784987 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610112390.0

(22)申请日 2016.02.29

(71)申请人 丹娜(天津)生物科技有限公司
地址 300467 天津市滨海新区生态城中天
大道2018号生态科技园办公楼14号楼
(3B)1楼101室-2

(72)发明人 彭洁 史东东 李宁 栗艳
周泽奇

(74)专利代理机构 北京布瑞知识产权代理有限
公司 11505

代理人 张丹

(51)Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

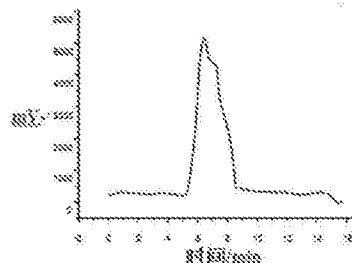
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法,利用免疫亲和层析技术制备新型隐球菌荚膜多糖GXM,首先用醋酸钙和冰醋酸处理含荚膜多糖的分泌上清液后,用乙醇沉淀得到粗制荚膜多糖;然后用交联了荚膜多糖GXM单克隆抗体的免疫亲和层析柱对荚膜多糖GXM粗提物进行处理,得到纯化的荚膜多糖GXM。本方法简便、高效、成本低,并能够有效的避免使用有毒有害的化学试剂。此外,本发明还涉及一种新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱,用于纯化粗制荚膜多糖GXM,该免疫亲和层析柱可重复利用,有利于降低制备成本,提高制备效率,其制备方法简单易行。



1. 一种新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)将新型隐球菌荚膜多糖GXM单克隆抗体溶于溶液中,并与亲和层析基质混合成匀浆;

(2)用交联缓冲液洗涤步骤(1)得到的匀浆,并离心,得到抗体与亲和层析基质的混合物;

(3)用交联缓冲液重悬步骤(2)得到的抗体与亲和层析基质的混合物,向得到的混悬液中加入双功能结合剂,室温孵育20-40分钟,并混匀,液固分离,得到亲和层析基质-抗体交联复合物;

(4)用封闭溶液洗涤步骤(3)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物;

(5)将步骤(4)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物重悬于封闭溶液中,室温孵育1.5-2.5小时,混匀;

(6)装柱:将步骤(5)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物填充入层析柱中,制得新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱。

2. 如权利要求1所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述的亲和层析基质选自蛋白A微珠、蛋白G微珠、活性微珠,优选蛋白A微珠;和/或,步骤(1)中所述的溶液选自碳酸盐缓冲液、醋酸-醋酸钠缓冲液;

步骤(1)中亲和层析基质和溶液的比例为:每10mL溶液中加入0.5-2.0mL亲和层析基质,亲和层析基质与抗体的比例为:每1mL亲和层析基质结合1-4mg单克隆抗体。

3. 如权利要求1所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述的交联缓冲液为0.1-0.3mol/L的pH8.0-9.5的硼酸钠溶液,用量为5-15倍亲和层析基质体积;

和/或,步骤(3)中所述交联缓冲液为0.1-0.3mol/L的pH8.3-9.5的硼酸钠溶液,用量为5-15倍亲和层析基质体积。

4. 如权利要求1所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述的双功能结合剂选自二甲基庚二酸酯、羰基二咪唑、溴化氰、羟基丁二酰亚胺、乙酰基碘,优选二甲基庚二酸酯,用量为使其在混悬液中的终浓度为15-25mmol/L。

5. 如权利要求1所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于,步骤(4)和(5)中所述的封闭溶液选自乙醇胺、氨基乙烷溶液,优选为乙醇胺溶液,进一步优选为浓度为0.1-0.25mol/L,pH值为7.5-8.5的乙醇胺溶液。

6. 一种新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱,其特征在于,所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱由权利要求1-5任一项所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法制备得到。

7. 一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)新型隐球菌荚膜多糖GXM的提取;

(2)利用权利要求6所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱进行新型隐球菌荚膜多糖GXM粗提物的纯化。

8. 如权利要求7所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法,其特征在于,所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM的提取,包括如下步骤:

- (1)培养新型隐球菌,至菌浓度达到对数期后期;
- (2)将菌液高压灭菌,离心除去菌体,保留上清液;
- (3)向上清液中边搅拌边加入醋酸钙粉末使醋酸钙在上清液中的终浓度达到2-8%,然后加冰醋酸调pH至4.6-5.2;
- (4)向步骤(3)得到的溶液中加入90-98%的乙醇,4℃静置过夜,离心,弃去上清,干燥沉淀,得到新型隐球菌荚膜多糖GXM的粗提物。

9.如权利要求7所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法,其特征在于,所述的利用权利要求6所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱进行新型隐球菌荚膜多糖GXM粗提物的纯化,包括如下步骤:

- (1)用与待纯化样品溶液相同的缓冲液冲洗权利要求6所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱;
- (2)使待纯化样品溶液流经步骤(1)处理后的层析柱;
- (3)用结合缓冲液洗柱;
- (4)用预洗脱缓冲液洗柱;
- (5)采用分段洗脱,连续以洗脱缓冲液流过层析柱,分管收集每一组分;
- (6)检测每管的GXM含量,将浓度高的各管合并。

10.如权利要求9所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述的待纯化样品的流速为0.5-1.5mL/h,用泵控制流速,优选使用蠕动泵。

11.如权利要求9所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法,其特征在于,步骤(3)中所述的结合缓冲液选自PBS缓冲液、Tris-HCl缓冲液、醋酸-醋酸钠缓冲液中的一种,优选PBS缓冲液,用量为10-25倍柱床体积;

和/或,步骤(4)中所述的预洗脱缓冲液为碳酸盐缓冲液,用量为10-25倍柱床体积;

和/或,步骤(5)中所述的洗脱缓冲液为pH3.0的缓冲液,优选pH3.0的0.1M甘氨酸缓冲液、pH3.0的柠檬酸-磷酸盐缓冲液、pH3.0的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、pH3.0的醋酸-醋酸钠缓冲液,用量为0.4-0.8柱床体积。

12.一种新型隐球菌荚膜多糖GXM,其特征在于,所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM由权利要求7-11任一项所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法制备得到。

13.一种如权利要求12所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM在新型隐球菌性脑膜炎的早期诊断试剂中的应用。

一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗原制备领域,具体涉及一种新型隐球菌的荚膜多糖GXM的制备方法。

背景技术

[0002] 新型隐球菌(*Cryptococcus Neofonmans*),又名溶组织酵母菌(*Torula Histolytica*),可在土壤、鸟粪、尤其是鸽粪中大量存在,也可存在于人体的体表、口腔及粪便中,可侵犯人和动物引起隐球菌病,对人类而言,它通常是条件致病菌,不仅能感染免疫抑制患者,也能感染免疫正常人群,大多由呼吸道吸入后引起感染,在肺部引起轻度炎症,肺部感染一般预后良好。当机体免疫功能下降时可向全身播散,播散病灶可发生再各个脏器,最易侵犯中枢神经系统,引起隐球菌性脑膜炎。隐球菌性脑膜炎是一种预后严重的深部真菌感染,早期误诊率达90%,死亡率和严重病残率分别高达25%~60%和20%以上(廖万清,姚志荣,顾菊林,等.隐球菌性脑膜炎的诊断与治疗.传染病信息,2000,13(2):86)。

[0003] 新型隐球菌的主要致病因素为荚膜、产黑素及其在宿主体温环境生长的能力等,其中荚膜为其毒性的主要决定因子之一,其主要成分是荚膜多糖,具有抑制吞噬和激活补体的作用,其中含量最多的是葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖(GXM)。在隐球菌性脑膜炎的早期诊断方法上,Wang等采用乳胶凝集试验检测隐球菌荚膜多糖抗原,用真菌培养和直接镜检法评估诊断的灵敏度和特异性,结果发现乳胶凝集试验、真菌培养和直接镜检的灵敏度分别为91.1%、69.6%和73.2%,特异性分别为96.0%、100%和100%,由此认为乳胶凝集试验检测隐球菌荚膜多糖抗原可作为对新型隐球菌性脑膜炎早期诊断方法。对隐球菌性脑膜炎进行隐球菌乳胶凝集试验对诊断隐球菌性脑膜炎特异性高,使早期诊断率得以提高(Wang H,Yuan X,Zhang L.Latex agglutination:Diagnose the early cryptococcus neoformans test of capsular polysaccharide antigen.Pakistan journal of pharmaceutical sciences,2015,28(1Suppl):307-311.)。因此,新型隐球菌荚膜多糖对隐球菌性脑膜炎的早期诊断非常重要。

[0004] Kozel等用培养罐培养新型隐球菌,培养液经过高压灭菌后,离心除去菌体,上清液先用0.45um滤膜过滤,然后超滤浓缩,并向浓缩液中加入醋酸钠和冰醋酸,接下来用乙醇沉淀出粗制荚膜多糖,然后用氯仿/正丁醇(v:v=5:1)进行反复抽提,除去蛋白,再用乙醇将荚膜多糖沉淀出来,离心收集沉淀,将沉淀溶于去离子水,透析,冻干得到精制荚膜多糖(Kozel T R,Cazin J.Nonencapsulated variant of *Cryptococcus neoformans* 1.Virulence studies and characterization of soluble polysaccharide.Infection and immunity,1971,3(2):287-294.)。上述方法中需使用大量的氯仿,氯仿是有毒有害的化学危险品,有致癌的危险性,对工作条件、操作人员的保护、污水处理等有较高要求。

[0005] Bryan等将新型隐球菌细胞用蒸馏水洗涤3次,离心收集细胞,用15mL二甲基亚砜(DMSO)重悬收集的湿细胞并孵育30分钟,然后通过离心将细胞沉淀分离,将DMSO上清液透析12小时,每2小时用水置换,得到的样品用蒸馏水或1mM EDTA充分透析3天,将透析得到的多糖溶液冷冻干燥得到荚膜多糖(Bryan R A,Zaragoza O,Zhang T,等.Radiological

studies reveal radial differences in the architecture of the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(2): 465-475.). 上述方法的制备周期较长, 产品的产率不高。

[0006] Maxson等将隐球菌细胞培养液离心, 分离细胞沉淀, 将所得上清液用聚醚砜超滤盘进行浓缩约20倍, 浓缩的过程中不断搅拌, 在滤盘上形成黏性薄膜后, 排出流体相, 用细胞刮刀回收胶凝材料, 最后进行冷冻干燥得到荚膜多糖(Maxson M E, Dadachova E, Casadevall A, 等. *Radial mass density, charge, and epitope distribution in the Cryptococcus neoformans capsule*. *Eukaryotic cell*, 2007, 6(1): 95-109.). 上述方法操作简单, 制备周期较短, 但产品的产率也不高。

[0007] 另外, Frases等通过实验发现隐球菌的胞外多糖和荚膜多糖在结构上是不同的, 并在试验中发现利用十六烷基三甲基溴化铵沉淀得到的多糖与通过浓缩和超滤得到的多糖(参照Maxson M E, Dadachova E, Casadevall A, 等. *Radial mass density, charge, and epitope distribution in the Cryptococcus neoformans capsule*. *Eukaryotic cell*, 2007, 6(1): 95-109. 中的提取方法)相比, 质量更大, 二者构象也不同, 由此判断常用的隐球菌荚膜多糖的提取方法会显著影响产物的结构和抗原性(Frases S, Nimrichter L, Viana N B, 等. *Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences*. *Eukaryotic cell*, 2008, 7(2): 319-327.).

[0008] 目前, 本领域迫切需要开发一种简便、高效、低成本、特异性高的新型隐球菌荚膜多糖的制备方法, 并能够有效地避免使用有毒有害的化学试剂。本发明克服现有技术的不足, 提供了一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法。

发明内容

[0009] 本发明的一个目的是提供一种新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法。

[0010] 所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

[0011] (1) 将新型隐球菌荚膜多糖GXM单克隆抗体溶于溶液中, 并与亲和层析基质混合成稀薄的匀浆;

[0012] (2) 用交联缓冲液洗涤步骤(1)得到的匀浆, 并离心, 得到抗体与亲和层析基质的混合物;

[0013] (3) 用交联缓冲液重悬步骤(2)得到的抗体与亲和层析基质的混合物, 向得到的混悬液中加入双功能结合剂, 室温孵育20-40分钟, 并轻轻混匀, 液固分离, 得到亲和层析基质-抗体交联复合物;

[0014] (4) 用封闭溶液洗涤步骤(3)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物来封闭层析基质中多余的活性基团以终止交联反应;

[0015] (5) 将步骤(4)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物重悬于封闭溶液中, 室温孵育1.5-2.5小时, 轻轻混匀;

[0016] (6) 装柱: 将步骤(5)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物经检测交联成功后, 填

充入层析柱中,制得新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱;

[0017] 优选的,(7)保存:步骤(6)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物或步骤(6)得到的填充好的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱在4℃条件下保存,1年内性能稳定;

[0018] 优选的,(8)再生:步骤(7)中在4℃条件下保存的层析柱或使用后的层析柱在使用前用10-25被柱床体积的待纯化样品的溶剂相同的缓冲液洗柱再生。

[0019] 优选的,将步骤(5)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物进行防腐处理后再填充入层析柱中,所述的防腐处理为将步骤(5)得到的亲和层析基质-抗体交联复合物用PBS缓冲液洗涤,并重悬于PBS缓冲液中,加入硫柳汞保存;所述的硫柳汞的浓度为0.005-0.015%。

[0020] 优选的,步骤(1)中所述的亲和层析基质选自蛋白A微珠、蛋白G微珠、活性微珠,优选蛋白A微珠。

[0021] 优选的,步骤(1)中所述的溶液选自pH8.0-9.0碳酸盐缓冲液。

[0022] 优选的,步骤(1)中亲和层析基质和溶液的比例为:每10mL溶液中加入0.5-2.0mL亲和层析基质,亲和层析基质与抗体的比例为:每1mL亲和层析基质结合1-4mg单克隆抗体;进一步优选的,步骤(1)中亲和层析基质和溶液的比例为:每10mL溶液中加入1mL亲和层析基质,亲和层析基质与抗体的比例为:每1mL亲和层析基质结合2mg单克隆抗体。

[0023] 优选的,步骤(2)中所述的交联缓冲液为0.1-0.3mol/L的pH8.0-9.5的硼酸钠溶液,用量为5-15倍亲和层析基质体积,进一步优选的,所述交联缓冲液为浓度为0.2mol/L的pH9.0的硼酸钠溶液,用量为10倍亲和层析基质体积;所述的洗涤次数为1-3次,离心条件为3000g离心2-5分钟或10000g离心30秒。

[0024] 优选的,步骤(3)中所述交联缓冲液为0.1-0.3mol/L的pH8.3-9.5的硼酸钠溶液,用量为5-15倍亲和层析基质体积;进一步优选的,所述交联缓冲液为浓度为0.2mol/L的pH9.0的硼酸钠溶液,用量为10倍亲和层析基质体积。

[0025] 优选的,步骤(3)所述的双功能结合剂选自二甲基庚二酸酯、羰基二咪唑、溴化氰、羟基丁二酰亚胺、乙酰基碘,优选二甲基庚二酸酯,用量为使其在亲和层析基质混悬液中的终浓度为15-25mmol/L,优选为20mmol/L。

[0026] 优选的,步骤(4)和(5)所述的封闭溶液选自乙醇胺、氨基乙烷等含可结合氨基的活性基团的小分子物质的溶液,优选为乙醇胺溶液,进一步优选为浓度为0.1-0.25mol/L,pH值为7.5-8.5的乙醇胺溶液,更优选为0.2mol/L的pH8.0的乙醇胺溶液。

[0027] 优选的,步骤(6)中所述的亲和层析基质-抗体交联复合物的交联效率的检测过程为:取亲和层析基质样品及亲和层析基质与抗体交联后的样品,分别加入Laemmli缓冲液中煮沸,分别取出相当于1mL和9mL的两种样品,在10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,用考马斯亮蓝染色,如交联前样品呈现重链区带(55kDa),而交联后样品则无,表明交联成功。

[0028] 优选的,步骤(6)中所述的装柱完成后,用PBS缓冲液冲洗容器,收集残留的亲和层析基质,如果可能,仅使用待纯化样品中全部GXM所需的亲和层析基质-抗体交联复合物。

[0029] 本发明的一个目的是提供一种新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱,其特征在于,所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱由上述新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备方法制备得到。

[0030] 本发明的一个目的是提供一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法,其特征在于,

包括如下步骤:

[0031] (1)新型隐球菌荚膜多糖GXM的提取;

[0032] (2)利用新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱进行新型隐球菌荚膜多糖GXM粗提物的纯化。

[0033] 所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM的提取,包括如下步骤:

[0034] (1)培养新型隐球菌,至菌浓度达到对数后期;

[0035] (2)将菌液高压灭菌,离心除去菌体,保留上清液;

[0036] (3)向上清液中边搅拌边缓慢加入醋酸钙粉末,然后加冰醋酸调pH至酸性;

[0037] (4)向步骤(3)得到的溶液中加入乙醇,4℃静置过夜,离心,弃去上清,干燥沉淀,得到新型隐球菌荚膜多糖GXM的粗提物。

[0038] 优选的,所述的新型隐球菌荚膜多糖的提取的步骤(1)中的新型隐球菌的培养条件为:培养基采用YM肉汤培养基,培养温度为30℃,震荡速度为200rpm,培养时间为32-40小时,所述的YM肉汤培养基配方为每升培养基含:3g酵母提取物,5g蛋白胨,3g麦芽糖提取物,10g D-葡萄糖。

[0039] 优选的,步骤(3)中所述的醋酸钙粉末的加入量为其在所述上清液中的终浓度达到2-8%,冰醋酸调节pH值至4.6-5.2。

[0040] 优选的,步骤(4)中所述的乙醇的浓度为90-98%,加入量为步骤(3)得到的溶液体积的2-4倍。

[0041] 所述的利用新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱进行新型隐球菌荚膜多糖GXM粗提物的纯化,包括如下步骤:

[0042] (1)用与待纯化样品溶液相同的缓冲液冲洗上述新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱;

[0043] (2)使待纯化样品溶液流经步骤(1)处理后的层析柱;

[0044] (3)用结合缓冲液洗柱;

[0045] (4)用预洗脱缓冲液洗柱;

[0046] (5)采用分段洗脱,连续以洗脱缓冲液流过层析柱,分管收集每一组分;

[0047] (6)检测每管的GXM含量,将浓度高的各管合并;

[0048] 优选的,(7)用10-25倍柱床体积的起始缓冲液流经层析柱使其再生,并加入硫柳汞使其终浓度为0.005-0.015%,在4℃条件下保存层析柱。

[0049] 优选的,步骤(2)中所述的待纯化样品的流速为0.5-1.5mL/h,用泵控制流速,优选使用蠕动泵。

[0050] 优选的,步骤(3)中所述的结合缓冲液选自pH6.0-8.0的PBS缓冲液、pH6.0-8.0的Tris-HCl缓冲液、pH6.0-8.0醋酸-醋酸钠缓冲液中的一种,优选pH6.0-8.0的PBS缓冲液;步骤(3)中所述的结合缓冲液的用量为10-25倍柱床体积,优选为20倍柱床体积。

[0051] 优选的,步骤(4)中所述的预洗脱缓冲液为pH8.5-9.5碳酸盐缓冲液,用量为10-25倍柱床体积,进一步优选为20倍柱床体积。

[0052] 优选的,步骤(5)中所述的洗脱缓冲液为pH3.0的缓冲液,优选pH3.0的0.1M甘氨酸缓冲液、pH3.0的柠檬酸-磷酸盐缓冲液、pH3.0的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、pH3.0的醋酸-醋酸钠缓冲液,用量为0.4-0.8柱床体积。

- [0053] 优选的,步骤(6)得到的GXM洗脱液进行透析去盐处理或用缓冲液调节其pH值。
- [0054] 本发明的一个目的是提供一种新型隐球菌荚膜多糖GXM,其特征在于,所述的新型隐球菌荚膜多糖GXM由上述新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法制备得到。
- [0055] 本发明所采用的新型隐球菌购自中国医学微生物菌种保藏管理中心。
- [0056] 本发明所采用的荚膜多糖单克隆抗体由丹娜(天津)生物科技有限公司提供。
- [0057] 本发明的一个目的是提供一种新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱在纯化新型隐球菌荚膜多糖GXM和新型隐球菌性脑膜炎的早期诊断中的应用。
- [0058] 本发明的一个目的是提供一种新型隐球菌荚膜多糖GXM在新型隐球菌性脑膜炎的早期诊断试剂中的应用。
- [0059] 本发明提供了一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法,使用免疫亲和层析对新型隐球菌荚膜多糖GXM粗提物进行纯化,有效地避免了有毒化学试剂的使用,保证了操作人员的安全,同时避免了环境污染,且特异性高,在简化制备工艺的同时能制备出高纯度的新型隐球菌荚膜多糖。本发明根据所要制备的目标产物,选择特异性针对目标产物的单克隆抗体,经过实验筛选多种条件,得到一种新型隐球菌荚膜多糖GXM层析柱及其制备方法。本发明提供的新型隐球菌荚膜多糖GXM层析柱特异性强、分离对应的目标产物效率高,使用简洁方便,并可重复利用,有利于降低制备成本,提高制备效率,其制备方法简单易行。

附图说明

- [0060] 图1所示为本发明一实施例提供的新型隐球菌荚膜多糖GXM定量检测的结果。
- [0061] 图2所示为本发明一实施例提供的新型隐球菌荚膜多糖GXM的HPLC纯度分析的结果。
- [0062] 图3所示为本发明一实施例提供的新型隐球菌荚膜多糖GXM的SDS-PAGE杂蛋白含量分析的结果。

具体实施方式

- [0063] 本发明中的“起始缓冲液”、“与待纯化样品溶液相同的缓冲液”等表述方式具有相同的含义,可互换使用。
- [0064] 本发明中所述的“新型隐球菌荚膜多糖”指新型隐球菌荚膜多糖中的主要成分葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖,与“新型隐球菌荚膜多糖中的葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖”、“新型隐球菌荚膜多糖GXM”、“GXM”等表述方式具有相同的含义,可互换使用。
- [0065] 实施例1:
- [0066] 新型隐球菌荚膜多糖GXM的提取,其具体步骤如下:
- [0067] (1)配制YM肉汤培养基0.6L,其成分为1.8g酵母提取物,3g蛋白胨,1.8g麦芽糖提取物,6g D-葡萄糖。培养新型隐球菌,培养温度为30℃,震荡速度为200rpm,培养时间为36h。
- [0068] (2)菌液在121℃下灭菌25min,16,000g离心30分钟去除菌体。
- [0069] (3)上清液中边搅拌边缓慢加入醋酸钙粉末至终浓度5%。再加冰醋酸调pH值至5.0左右。
- [0070] (4)向上述溶液中加入三倍体积95%的乙醇,马上会有沉淀产生,4℃静置过夜。倒

掉大部分上清,剩余物质转移至50mL圆底离心管中。12,000g离心5分钟。弃上清,沉淀干燥,得新型隐球菌荚膜多糖GXM粗提物。

[0071] 实施例2

[0072] 新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的制备,其具体步骤如下:

[0073] (1)将新型隐球菌荚膜多糖GXM单克隆抗体结合到蛋白A微珠上。按每毫升湿的微珠大约可以结合2mg单克隆抗体将抗体和蛋白A混合成为稀薄的匀浆,在总量为10mL的溶液中加入大约1mL微珠,室温孵育1h,轻轻摇动混匀。

[0074] (2)用10倍体积的0.2mol/L硼酸钠(pH9.0)洗涤微珠2次,每次以3000g离心2min,或10000g离心30s。

[0075] (3)用10倍体积的0.2mol/L硼酸钠(pH9.0)重悬微珠,留取相当于10mL湿微珠的样品。加入足量的二甲基庚二酸酯(固体)至微珠匀浆中,使终浓度为20mmol/L,室温孵育30min,使结合在蛋白A微珠上的抗体与微珠基质发生交联,并轻轻混匀,得到微珠-抗体交联复合物。留取相当于10mL交联复合物的样品。

[0076] (4)用0.2mol/L乙醇胺(pH8.0)洗涤微珠-抗体交联复合物1次以终止交联反应。

[0077] (5)将步骤(4)得到的微珠-抗体交联复合物重悬于0.2mol/L乙醇胺溶液中,室温孵育2h,轻轻混匀。

[0078] (6)将步骤(5)得到的微珠-抗体交联复合物用PBS洗涤后,重悬于PBS,加入硫柳汞至其终浓度为0.01%保存。

[0079] (7)将步骤(6)得到的微珠-抗体交联复合物填经检测交联成功后,填充入层析柱中,制得新型隐球菌荚膜多糖免疫亲和层析柱,用PBS冲洗容器,收集残留的微珠。如果可能,仅使用待纯化制品中全部GXM所需的抗体微珠基质。

[0080] 实施例3

[0081] 实施例1制备的新型隐球菌荚膜多糖粗提物GXM的纯化,其具体步骤如下:

[0082] (1)取实施例2制备的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱,用20倍柱床体积的起始缓冲液洗柱。

[0083] (2)将待纯化样品溶液加入层析柱,按每毫升柱体积大约1mL/h的流速,使样品溶液流过层析柱,用蠕动泵控制流速。

[0084] (3)用20倍柱床体积的结合缓冲液洗柱。

[0085] (4)用20倍柱床体积的预洗脱缓冲液洗柱。

[0086] (5)采用分段洗脱法,连续以0.5倍柱床体积的洗脱缓冲液通过层析柱,分管收集每一组分。

[0087] (6)检测每管的GXM含量,将浓度高的各管合并。根据抗原的用途,对收集的抗原洗脱液透析。

[0088] (7)用20倍柱床体积的起始缓冲液流经基质,使层析柱再生,向缓冲液中加入0.01%硫柳汞,然后将层析柱保存于4℃的环境中。

[0089] 其中,起始缓冲液、结合缓冲液、预洗脱缓冲液、洗脱缓冲液分别为高纯水、pH7的PBS缓冲液、pH9的碳酸盐缓冲液、pH3.0的0.1M的甘氨酸缓冲液。

[0090] 实施例4

[0091] 实施例3制备的新型隐球菌荚膜多糖GXM的检测:

- [0092] A. Dubois-硫酸苯酚法测定糖含量,其具体步骤如下:
- [0093] (1)称取1g葡萄糖溶于100mL dH₂O中,配成1%葡萄糖溶液;
- [0094] (2)取7支10mL洁净试管,每支试管分别加入1mL dH₂O和25μL苯酚溶液;
- [0095] (3)各支试管分别加入0、2.5、5、10、15μL葡萄糖溶液和10μL待测液;
- [0096] (4)每管缓慢加入2.5mL浓硫酸,都加入浓硫酸后再统一混匀;
- [0097] (5)试管水浴20分钟左右,冷却至室温;
- [0098] (6)将各管中液体小心倒入玻璃比色杯中;
- [0099] (7)用紫外分光光度计于485nm下测定吸光度值;
- [0100] (8)绘制标准曲线;
- [0101] (9)根据标准曲线计算出待测液多糖浓度。
- [0102] 标准曲线如图1所示,线性非常好,可用于计算待测样品浓度。
- [0103] B. HPLC纯度分析,其具体步骤如下:
- [0104] 取新型隐球菌荚膜多糖GXM样品1mL(3.65mg/mL)
- [0105] 色谱柱: Sugar—ParkT72011A09P/N85188Waters
- [0106] 流动相:超纯水
- [0107] 流速:0.5mL/min
- [0108] 柱温:85°C
- [0109] 检测器:示差折光检测器
- [0110] 灵敏度设定范围: 1.0×10^{-6} ~ 5.0×10^{-4} RIU
- [0111] 示差范围:1.00~1.75RIU
- [0112] 线性动态范围: 5×10^{-3} ~ 5×10^{-9} RIU
- [0113] 噪声: $<2 \times 10^{-8}$ RIUATTN
- [0114] HPLC进样,用示差折光检测器检测,结果见图2所示,出现单一吸收峰,表明样品的纯度较好。
- [0115] C. SDS-PAGE杂蛋白含量分析,其具体步骤如下:
- [0116] (1)配制浓度8%的SDS-PAGE凝胶,制胶;
- [0117] (2)每孔加10μL实施例3制得的新型隐球菌荚膜多糖GXM样品;
- [0118] (3)60V恒压电泳10分钟后120V恒压电泳大约1小时,至溴酚蓝条带距胶板下边缘1厘米时停止电泳;
- [0119] (4)考马斯亮蓝染色1小时;
- [0120] (5)4°C脱色过夜;
- [0121] (6)拍照并观察。
- [0122] 胶图如图3所示,由对比可知,实施例3制得的新型隐球菌荚膜多糖样品纯度较高,无杂蛋白。
- [0123] 实施例5:
- [0124] 新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的重复性、回收率、稳定性验证:
- [0125] A. 重复性验证,具体步骤如下:
- [0126] (1)按实施例2的步骤制备5个新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱,分别标号为001、002、003、004和005。

- [0127] (2)取实施例1制备的新型隐球菌荚膜多糖粗品为待纯化样品,均匀分成5份。
- [0128] (3)将5份2mL待纯化样品分别加入5个平行试验的层析柱中,按实施例3的操作进行纯化。
- [0129] (4)按实施例4的操作进行纯化后的多糖GXM的鉴定,结果如下:
- [0130] 硫酸苯酚法定量,纯化后得到的糖总量CV<10%;。
- [0131] HPLC纯度分析均出现单一吸收峰;
- [0132] SDS-PAGE杂蛋白含量分析均无杂蛋白条带。
- [0133] 表1新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的重复性验证结果
- [0134]

重复性					
层析柱编号	001	002	003	004	005
糖总量	19.65	18.05	21.89	19.12	18.56
平均值	19.56				
SD	1.48				
CV	7.65%				

- [0135] B.回收率验证,具体步骤如下:
- [0136] (1)按实施例2步骤制备5个新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱。
- [0137] (2)取实施例3中制备的新型隐球菌荚膜多糖GXM做为纯化标样,浓度为3.65mg/mL。
- [0138] (3)将2mL纯化标样溶液加入5个平行试验的层析柱中,按实施例3的操作进行纯化。
- [0139] (4)检测纯化后标样的糖总量,计算回收率在96.5%-100.5%之间。
- [0140] 表2新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的回收率验证结果
- [0141]

回收率						
层析柱编号	001	002	003	004	005	平均值
糖总量	7.18	7.34	7.09	7.05	7.13	7.16
回收率	98.36%	100.5%	97.12%	96.57%	97.67%	98.08%

- [0142] C.稳定性验证,具体步骤如下:
- [0143] (1)按实施例2的步骤制备1个新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱。
- [0144] (2)取实施例3中制备的新型隐球菌荚膜多糖GXM做为纯化标样,浓度为3.65mg/mL。
- [0145] (3)将1mL纯化标样溶液加入层析柱中,按实施例3的操作进行纯化,同一柱子重复进样10次,(每次洗脱后再生)。
- [0146] (4)检测10次纯化后标样的糖总量,计算回收率在78.08%-105.80%间。

[0147] 表3新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱的稳定性验证结果

纯化次数	糖总量	回收率
1	3.47	95.10%
2	3.64	99.70%
3	3.86	105.80%
4	3.32	91.00%
5	3.57	97.80%
6	3.12	85.50%
7	3.45	94.50%
8	3.01	82.50%
9	3.05	83.60%
10	2.85	78.08%
平均值	3.334	
SD	0.32	
CV	9.6%	

[0148] 由上述结果可知,按实施例2步骤制备的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱对目标化合物的特异性和回收率非常高,且重复性和稳定性较好,用于新型隐球菌荚膜多糖GXM的纯化制备可有效降低纯化制备成本、简化制备步骤和提高制备效率。

[0149] 由上述结果可知,按实施例2步骤制备的新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱对目标化合物的特异性和回收率非常高,且重复性和稳定性较好,用于新型隐球菌荚膜多糖GXM的纯化制备可有效降低纯化制备成本、简化制备步骤和提高制备效率。

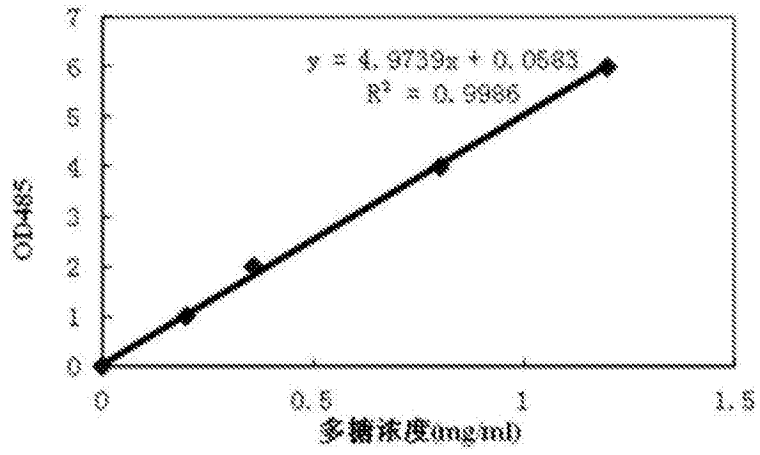


图1

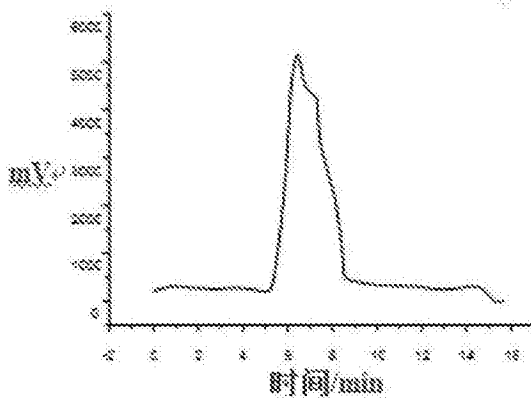


图2

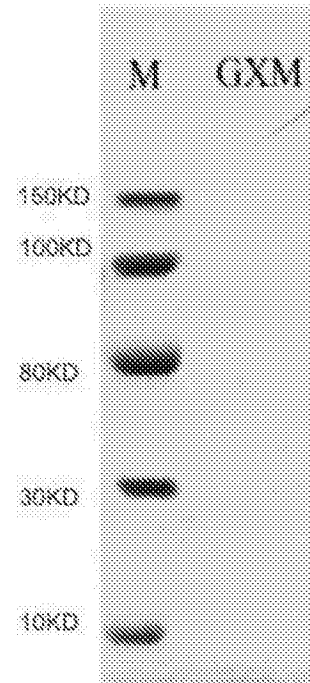


图3

专利名称(译)	一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法		
公开(公告)号	CN105784987A	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201610112390.0	申请日	2016-02-29
[标]申请(专利权)人(译)	丹娜(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	丹娜(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	丹娜(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	彭洁 史东东 李宁 粟艳 周泽奇		
发明人	彭洁 史东东 李宁 粟艳 周泽奇		
IPC分类号	G01N33/531 G01N30/02 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/31 G01N30/02 G01N2800/7095		
代理人(译)	张丹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种新型隐球菌荚膜多糖GXM的制备方法，利用免疫亲和层析技术制备新型隐球菌荚膜多糖GXM，首先用醋酸钙和冰醋酸处理含荚膜多糖的分泌上清液后，用乙醇沉淀得到粗制荚膜多糖；然后用交联了荚膜多糖GXM单克隆抗体的免疫亲和层析柱对荚膜多糖GXM粗提物进行处理，得到纯化的荚膜多糖GXM。本方法简便、高效、成本低，并能够有效避免使用有毒有害的化学试剂。此外，本发明还涉及一种新型隐球菌荚膜多糖GXM免疫亲和层析柱，用于纯化粗制荚膜多糖GXM，该免疫亲和层析柱可重复利用，有利于降低制备成本，提高制备效率，其制备方法简单易行。

