



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103645328 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201310691700. 5

(22) 申请日 2013. 12. 17

(73) 专利权人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市江干区下沙学源街 258 号

(72) 发明人 诸葛洁婧 潘家荣 潘文彬  
梁世正 张弛 冯涛

(74) 专利代理机构 杭州浙科专利事务所(普通合伙) 33213

代理人 吴秉中

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101993888 A, 2011. 03. 30,

CN 1733913 A, 2006. 02. 15, 全文.

CN 101819103 A, 2010. 09. 01,

魏啸南. 花生过敏原蛋白分离纯化方法研究进展. 《食品科学》. 2011, 第 32 卷(第 17 期), 第 371-375 页.

张英坤等. 离子交换层析法分离花生过敏原 Ara h2 的研究. 《食品科学》. 2006, 第 27 卷(第 12 期), 第 259-262 页.

审查员 周露露

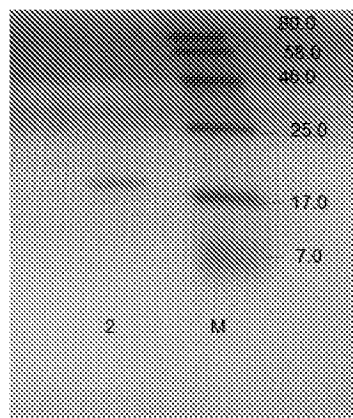
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

## (54) 发明名称

一种花生致敏蛋白 Ara h2 标准品的制备方法

## (57) 摘要

一种花生致敏蛋白 Ara h2 标准品的制备方法,属于蛋白的制备方法。其包括以下工艺步骤: 1)脱脂;2)粗提液的制备;3)硫酸铵分级沉淀;4)等电点沉淀;5)透析;6)离子交换层析;7)免疫亲和层析。本发明通过液氮超微粉碎,低温离心,有机脱脂萃取等多种方法相结合制得脱脂花生蛋白粉,最大程度的保留了其生物活性,并通过硫酸铵沉淀,等电点沉淀,离子交换层析和结合单抗的免疫亲和层析,最大程度的提高了花生过敏原的纯度和免疫活性,并可达到了规模化制备的要求。



1. 一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法,其特征包括以下工艺步骤:

1) 脱脂

取花生种子在 60℃ 的烘箱中烘烤 6 小时,去红皮,液氮冻融后用粉碎机粉碎,按照花生粉末质量:正己烷体积为 1:2 进行 -20℃ 过夜萃取,4℃ 下 10000r/m 离心 10min,倾去正己烷,脱脂粉风干后过 60 目筛,4℃ 保存备用;

2) 粗提液的制备

取花生粉以 10ml/g 加入至 pH8.0、浓度 0.5M 的 Tris-HCl 溶液中混合,超微粉碎、超速离心,超微粉碎条件:200W 的超声破碎仪中超声 100s,每次 5s,间隔 1s;超速离心条件:4℃ 下 10000-12000r/min 离心 10-15min,得到花生蛋白上清液;

3) 硫酸铵分级沉淀

取花生蛋白上清液,花生蛋白上清液中缓慢加入硫酸铵,边加边搅拌,直至溶液中硫酸铵饱和度达 30%,静置,离心;离心后的上清液中继续缓慢加入硫酸铵直至饱和度达 50%,静置,离心;离心后的上清液中继续缓慢加入硫酸铵直至饱和度达 70%,静置,离心;收集沉淀,用 pH 7.4、浓度 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液复溶,4℃ 保存,得到沉淀复溶物 I;

4) 等电点沉淀

取沉淀复溶物 I 加 1mol/L 的 HCl 至等电点为 5.2,静置、离心;沉淀用 pH 7.4、浓度 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液复溶,4℃ 保存,得到沉淀复溶物 II;

5) 透析

取沉淀复溶物 II 装入透析袋中,用 PEG20000 透析,得到花生蛋白粗提液;

6) 离子交换层析

采用 DEAE-Sephrose Fast Flow 离子柱层析,用 pH8.0、浓度 50mol/L Tris-HCl 缓冲溶液平衡,以 0.3mol/L NaCl 洗脱溶液进行洗脱,蠕动泵流速 1ml/min,5min 间隔自动收集,检测 280nm 吸收,收集洗脱液,透析,浓缩,得到花生致敏粗蛋白;

7) 免疫亲和层析

制备免疫亲和柱,将花生致敏粗蛋白经偶联了抗 Arah2 致敏蛋白的单克隆抗体的免疫亲和柱层析,以 pH2.4、浓度 0.1 mol/L 的 glycine-HCl 溶液洗脱,洗脱速度为 0.5 ~ 2ml/min,收集洗脱液,得到花生致敏蛋白 Arah2 标准品。

2. 如权利要求 1 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法,其特征包括所述的步骤 3) 和 4) 中涉及的静置条件均为:4℃ 静置 8h;所述的步骤 3) 和 4) 中涉及的离心条件均为:4℃ 下 10000-12000r/min 离心 10-15min。

3. 如权利要求 1 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法,其特征包括所述的步骤 5) 中透析条件为 4℃ 透析 6h。

4. 如权利要求 1 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法,其特征包括所述的步骤 7) 中制备免疫亲和柱具体包括:

a 处理凝胶

b 偶联抗体

更换抗体缓冲液:把纯化的抗 Arah2 致敏蛋白的单克隆抗体在偶联缓冲液中进行透析;

偶联:用一个带有塞子的玻璃容器,把准备好的介质悬浮液加到含抗体的偶联缓冲液

中,然后上下颠倒均匀,室温 1 h 或者是 4℃过夜,利用紫外分光光度计测定溶液中剩余抗体的方法评定免疫亲和柱的偶联率;

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;

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 2 h,封闭任何活化的基团,或者是放置于 pH8.0、浓度 0.1 M 的 Tris-HCl 缓冲液中,放置 2h;

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,每一次循环清洗包括以下步骤:先使用 0.1M 的乙酸 / 乙酸钠清洗,再用 0.1 M Tris-HCl 处理;

#### c 填装亲和柱

将偶联好抗体的免疫亲和介质填装到层析柱中,最后将混合膜按照柱子孔径大小进行裁剪,放入柱中,与凝胶界面紧贴。

## 一种花生致敏蛋白 Arah2标准品的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于蛋白的制备方法,具体涉及一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法。

### 背景技术

[0002] 食物过敏反应被世界卫生组织 (WHO) 列为当前世界性的重大卫生学问题。花生是最常见的八大食品过敏原之一,且为八大类容易引起过敏的食品之首,花生过敏属于即时性过敏,发生率较高,与其他食物过敏的不同之处在于,它是一种终身性的疾患,不会随着年龄的增长而产生免疫耐受,有时可引起过敏性休克,甚至危及生命,已成为全球范围内关心的问题。研究花生过敏原的检测与控制,必须首先获得高纯度的过敏原组分,它可以更为细致地了解花生过敏原的生化特性及各种加工过程对其致敏性的影响提供实验材料,从而有助于低过敏或无致敏的花生制品的研究以及花生过敏原的检测。南昌大学张英坤 (2007) 在其硕士毕业论文《抗花生过敏原 Arah2 多克隆抗体的制备及其应用》中介绍了一种制备 Arah2 花生过敏原的方法,他以四粒红花生为实验对象,经粉碎、脱脂、蛋白抽提、阴离子交换层析、SDS-PAGE 电泳回收,得到了电泳纯(纯度 >95%)的 Arah2。但是该方法只试用于实验室小试产品,未能达到规模化制备要求。

### 发明内容

[0003] 针对现有技术存在的问题,本发明的目的在于设计提供一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法的技术方案。

[0004] 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法,其特征在于包括以下工艺步骤:

[0005] 1) 脱脂

[0006] 取花生种子烘烤后依次进行去红皮、粉碎、正己烷脱脂、离心、风干和过筛,得到花生粉;

[0007] 2) 粗提液的制备

[0008] 取花生粉以 10ml/g 加入至 pH8.0、浓度 0.5M 的 Tris-HCL 溶液中混合,超微粉碎、超速离心,得到花生蛋白上清液;

[0009] 3) 硫酸铵分级沉淀

[0010] 取花生蛋白上清液缓慢加入硫酸铵,边加边搅拌,直至溶液中硫酸铵饱和度达 30%,静置,离心;离心后的上清液中继续缓慢加入硫酸铵直至饱和度达 50%,静置,离心;离心后的上清液中继续缓慢加入硫酸铵直至饱和度达 70%,静置,离心;收集沉淀,用 pH 7.4、浓度 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液复溶,4℃ 保存,得到沉淀复溶物 I;

[0011] 4) 等电点沉淀

[0012] 取沉淀复溶物 I 加 1mol/l 的 HCL 至等电点为 5.2,静置、离心;沉淀用 pH 7.4、浓度 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液复溶,4℃ 保存,得到沉淀复溶物 II;

[0013] 5) 透析

[0014] 取沉淀复溶物 II 装入透析袋中, 用 PEG20000 透析, 得到花生蛋白粗提液;

[0015] 6) 离子交换层析

[0016] 采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子柱层析, 用 pH8.0、浓度 50mol/L Tris-HCl 缓冲溶液平衡, 以 0.3mol/L NaCl 洗脱溶液进行洗脱, 蠕动泵流速 1ml/min, 5min 间隔自动收集, 检测 280nm 吸收, 收集洗脱液, 透析, 浓缩, 得到花生致敏粗蛋白;

[0017] 7) 免疫亲和层析

[0018] 制备免疫亲和柱, 将花生致敏粗蛋白经偶联了抗 Arah2 致敏蛋白的单克隆抗体的免疫亲和柱层析, 以 pH2.4、浓度 0.1 mol/L 的 glycine-HCl 溶液洗脱, 洗脱速度为 0.5 ~ 2ml/min, 收集洗脱液, 得到花生致敏蛋白 Arah2 标准品。

[0019] 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法, 其特征在于所述的步骤 1) 中取花生种子在 60℃ 的烘箱中烘烤 6 小时, 去红皮, 液氮冻融后用粉碎机粉碎, 按照花生粉末质量: 正己烷体积为 1:2 进行 -20℃ 过夜萃取, 4℃ 下 10000r/m 离心 10min, 倾去正己烷, 脱脂粉风干后过 60 目筛, 4℃ 保存备用。

[0020] 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法, 其特征在于所述的步骤 2) 中超微粉碎条件: 200W 的超声破碎仪中超声 100s, 每次 5s, 间隔 1s; 超速离心条件: 4℃ 下 10000-12000r/min 离心 10-15min。

[0021] 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法, 其特征在于所述的步骤 3) 和 4) 中静置条件为: 4℃ 静置 8h; 离心条件为: 4℃ 下 10000-12000r/min 离心 10-15min。

[0022] 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法, 其特征在于所述的步骤 5) 中透析条件为 4℃ 透析 6h。

[0023] 所述的一种花生致敏蛋白 Arah2 标准品的制备方法, 其特征在于所述的步骤 7) 中制备免疫亲和柱具体包括:

[0024] a 处理凝胶

[0025] b 偶联抗体

[0026] 更换抗体缓冲液: 把纯化的抗 Arah2 致敏蛋白的单克隆抗体在偶联缓冲液中进行透析;

[0027] 偶联: 用一个带有塞子的玻璃容器, 把准备好的介质悬浮液加到含抗体的偶联缓冲液中, 然后上下颠倒均匀, 室温 1 h 或者是 4℃ 过夜, 利用紫外分光光度计测定溶液中剩余抗体的方法评定免疫亲和柱的偶联率;

[0028] 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;

[0029] 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 2 h, 封闭任何活化的集团, 或者是放置于 pH8.0、浓度 0.1 M 的 Tris-HCl 缓冲液中, 放置 2h;

[0030] 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, 每一次循环清洗都应包含有 0.1M 的乙酸 / 乙酸钠, 后面紧接着用 0.1 M Tris-HCl;

[0031] c 填装亲和柱

[0032] 将偶联好抗体的免疫亲和介质填装到层析柱中, 最后将混合膜按照柱子孔径大小

进行裁剪,放入柱中,与凝胶界面紧贴。

[0033] 本发明通过液氮超微粉碎,低温离心,有机脱脂萃取等多种方法相结合制得脱脂花生蛋白粉,最大程度的保留了其生物活性,并通过硫酸铵沉淀,等电点沉淀,离子交换层析和结合单抗的免疫亲和层析,最大程度的提高了花生过敏原的纯度和免疫活性,并可达到了规模化制备的要求。

#### 附图说明

[0034] 图1为花生蛋白免疫层析后图,其中M为Maker,2为实施例1中0.1 mol/L的glycine-HCL溶液洗脱后所收集的峰液。

#### 具体实施方式

[0035] 以下结合实施例来进一步说明本发明。

[0036] 实施例1:一种花生致敏蛋白Arah2标准品的制备

[0037] 1) 脱脂

[0038] 取花生种子在60℃的烘箱中烘烤6小时,去红皮,液氮冻融后用粉碎机粉碎,按照花生粉末质量:正己烷体积为1:2进行-20℃过夜萃取,4℃下10000r/m离心10min,倾去正己烷,脱脂粉风干后过60目筛,4℃保存备用,得到花生粉。

[0039] 2) 粗提液的制备

[0040] 花生粉以10ml/g加入pH8.0、浓度0.5M的Tris-HCL(含1mol/L NaCl,8mol/L 尿素,0.07% β-巯基乙醇0.5mg/ml EDTA),漩涡混合器混合,在200W的超声破碎仪中超声100s,每次5s,间隔1s(为了破碎细胞),然后超速离心(10000-12000r,4℃,10-15min)以去除脂肪,得到花生蛋白上清液。

[0041] 3) 硫酸铵分级沉淀

[0042] 花生蛋白上清液中缓慢加入硫酸铵,边加边搅拌,直至溶液中硫酸铵饱和度达30%,4℃静置8h,4℃10000-12000r/min离心10-15min,离心后的上清液中继续缓慢加入硫酸铵直至饱和度达50%,4℃静置8h,4℃10000-12000r/min离心10-15min,离心后的上清液中继续缓慢加入硫酸铵直至饱和度达70%,4℃静置8h,4℃10000-12000r/min离心10min,收集沉淀,用0.01mol/L(pH 7.4)的PBS缓冲液复溶,4℃保存,得到沉淀复溶物I。

[0043] 4) 等电点沉淀

[0044] 在PH计的监控下等电点沉淀,沉淀复溶物I加1mol/l的HCL至pI5.2,4℃下静置8h,4℃10000-12000r/min离心10-15min,所得的沉淀用0.01mol/L(pH 7.4)的PBS缓冲液复溶,4℃保存,得到沉淀复溶物II。

[0045] 5) 透析

[0046] 取沉淀复溶物II装入透析袋中,用PEG20000于4℃透析6h,得到花生蛋白粗提液。

[0047] 6) 离子交换层析

[0048] 采用阴离子交换树脂DEAE-Sepharose Fast Flow(16×250mm)进行分离,花生蛋白粗提液上柱前,用pH8.0、浓度50mol/L Tris-HCl缓冲溶液平衡DEAE-Sepharose Fast Flow层析柱,花生粗提液上柱后,280nm检测蛋白峰,用0~1mol/L NaCl连续梯度洗脱,

收集 0.3mol/L NaCl 洗脱溶液,透析,浓缩,得到花生致敏粗蛋白。

[0049] 8) 免疫亲和层析。

[0050] 制备免疫亲和柱,用 pH2.4、浓度 0.1 mol/L 的 glycine-HCl 溶液(7.5 甘氨酸用蒸馏水溶解,调 pH2.4,并定容 1L 作为洗脱液,洗脱流速为 0.5 ~ 2ml/min,收集洗脱液,得到花生致敏蛋白 Arah2 标准品。

[0051] 其中制备免疫亲和柱具体包括:

[0052] a 处理凝胶

[0053] b 偶联抗体

[0054] 更换抗体缓冲液:把纯化的抗 Arah2 致敏蛋白的单克隆抗体在偶联缓冲液中进行透析,所述的偶联缓冲液为:0.2 mol/L NaHCO<sub>3</sub>, 包含 0.5mol/L 的 NaCl,配制:称取 16.8gNaHCO<sub>3</sub>,29.22gNaCl 溶解到 1L 蒸馏水中,调 pH8.3;

[0055] 偶联:用一个带有塞子的玻璃容器,把准备好的介质悬浮液加到含抗体的偶联缓冲液中,然后上下颠倒均匀,室温 1 h 或者是 4℃过夜,利用紫外分光光度计测定溶液中剩余抗体的方法评定免疫亲和柱的偶联率;

[0056] 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;

[0057] 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 2 h,封闭任何活化的集团,或者是放置于 pH8.0,0.1 M 的 Tris-HCl 缓冲液中,放置 2h,所述的封闭缓冲液为:0.2mol/L 甘氨酸,配制:称取 15.014g 甘氨酸,,用蒸馏水溶解,调 pH8.0,并定容到 1 L;

[0058] 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,每一次循环清洗都应包含有 0.1M 的乙酸/乙酸钠,后面紧接着是用 0.1 M Tris-HCl;

[0059] c 填装亲和柱

[0060] 将偶联好抗体的免疫亲和介质填装到层析柱中,最后将混合膜按照柱子孔径大小进行裁剪,放入柱中,与凝胶界面紧贴。

[0061] 实施例 2:花生蛋白过敏原 Arah2 的 SDS-PAGE 鉴定

[0062] 对实施例 1 得到的花生致敏蛋白 Arah2 标准品进行 SDS-PAGE 电泳法分析主要过敏原组分鉴定。结果如图 1 所示。

[0063] 图 1 中花生蛋白相对分子量为 19Kda 处条带明显,与文献报道一致,确定该蛋白为花生蛋白过敏原 Arah2。

[0064] 实施例 3:用 ELISA 测定抗体效价

[0065] 1、包被:将酶标板每孔加入 100 μl 制备的过敏蛋白液(用 0.05mol/L, pH9.6 的 NaCO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>缓冲液从 1g/L 倍稀释),4℃,静置过夜。取出,用 0.1 mol/L、pH7.4 的 PBS Tween 缓冲液(含 0.5 mol/L Tween-20)满孔洗涤 3 次,扣干。

[0066] 2、封闭:每孔加 250 μl 10g/L BSA-PBS 溶液(溶于 0.01mol/L, PBS, pH7.4)进行封闭,37℃保温 2h,弃去封闭液,PBST 洗涤 3 次,每次 1min,扣干;

[0067] 3、加抗体:将抗体用 1g/L BSA-PBS 溶液倍比稀释,每孔加 100 μl 不同稀释度抗体,做 3 个平行,37℃孵育 1h。PBS Tween 洗涤,扣干 3 次。

[0068] 4、加酶标二抗:每孔加 100 μl 羊抗兔 IgG-HRP 结合物(用 1L BSA-PBS 溶液按体积

比 1:6000 稀释), 37℃ 孵育 0.5h, 然后用 PBST 缓冲液洗涤扣干 3 次。

[0069] 5、显色反应: 每孔加入配制好的四甲基联苯二胺底物液 100  $\mu$  l 孵育 15min, 取出, 立即加入 50  $\mu$  l 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 用酶标仪测 A450 值。

[0070] 6、效价确定: 以阴性血清的吸光值为基准, 阳性 OD 值大于阴性 OD 值的 3 倍, 且 od 值大于 0.25 所对应的抗血清的稀释度即为该血清效价。通过下表的实验结果, 可知以新西兰大白兔为模式动物, 使用实施例 1 制得的花生过敏原制备的抗体, 效价达到 1:81000。

[0071] 花生过敏原 Arah2 标准物免疫后兔血清效价的测定

[0072]

Clone ID	Blank	1:1,000	1:3,000	1:9,000	1:27,000	1:81,000	1:243,000	1:729,000
E12H1	0.073	1.868	1.379	0.924	0.605	0.374	0.169	0.104
D1A1	0.073	1.69	1.207	0.821	0.589	0.312	0.154	0.148

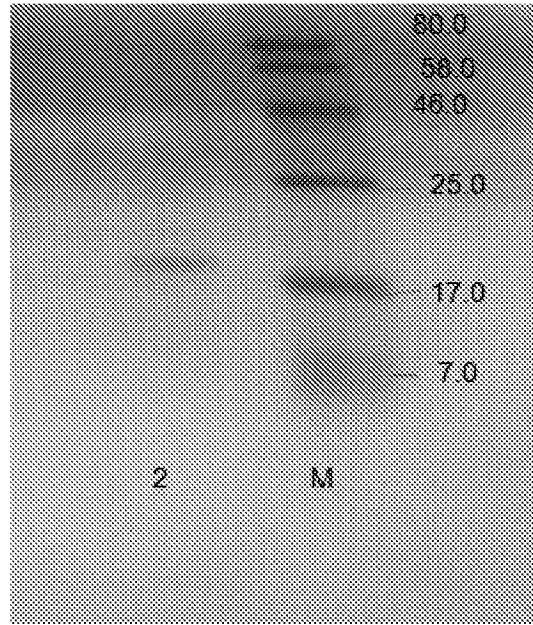


图 1

专利名称(译)	一种花生致敏蛋白Arah2标准品的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103645328B</a>	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	CN201310691700.5	申请日	2013-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
[标]发明人	诸葛洁婧 潘家荣 潘文彬 梁世正 张弛 冯涛		
发明人	诸葛洁婧 潘家荣 潘文彬 梁世正 张弛 冯涛		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	C07K14/415		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN103645328A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种花生致敏蛋白Arah2标准品的制备方法，属于蛋白的制备方法。其包括以下工艺步骤：1) 脱脂；2) 粗提液的制备；3) 硫酸铵分级沉淀；4) 等电点沉淀；5) 透析；6) 离子交换层析；7) 免疫亲和层析。本发明通过液氮超微粉碎，低温离心，有机脱脂萃取等多种方法相结合制得脱脂花生蛋白粉，最大程度的保留了其生物活性，并通过硫酸铵沉淀，等电点沉淀，离子交换层析和结合单抗的免疫亲和层析，最大程度的提高了花生过敏原的纯度和免疫活性，并可达到了规模化制备的要求。

