

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910092287.4

[51] Int. Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/02 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月17日

[11] 公开号 CN 101648997A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/569 (2006.01)

[22] 申请日 2009.9.9

[21] 申请号 200910092287.4

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街20号

[72] 发明人 王慧 史晶 刘昊 侯晓军  
王琴 李涛

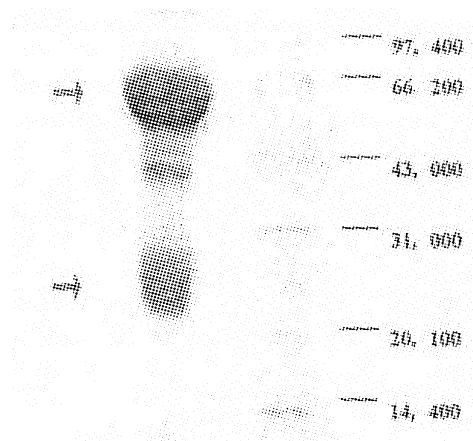
权利要求书2页 说明书15页 附图2页

## [54] 发明名称

一种抗肉毒毒素底物肽 SubA 的 IgY 抗体，其制备方法和用途

## [57] 摘要

本发明公开了一种抗肉毒毒素底物肽的 IgY 抗体，该抗体可以通过以下方法制备：化学合成或基因重组表达的方法制备 SNAP25 短肽 subA，通过 subA 免疫产蛋鸡，收集鸡蛋，应用生物化学方法提取和纯化卵黄免疫球蛋白。该抗体具有高特异性的结合底物线性短肽 subA，而不结合完整底物 SNAP25 的特点，具有特异识别 A 型肉毒毒素酶解 SNAP25 作用的能力，可以作为检测试剂应用于 A 型肉毒毒素的检测和神经毒力或内肽酶活性分析，以及临床肉毒中毒诊断，具有良好的市场前景和重要的社会意义。



1. 一种抗肉毒毒素底物肽的 IgY 抗体，其特征在于特异识别肉毒毒素底物肽 SubA，该底物肽 SubA 的氨基酸序列如序列表中序列 1 所示。

2. 权利要求 1 所述抗肉毒毒素底物肽的 IgY 抗体的衍生物，是 IgY 抗体的蛋白酶消化产物，其特征在于保留 IgY 抗体的抗原结合活性。

3. 权利要求 1 所述抗肉毒毒素底物肽的 IgY 抗体，其特征在于通过将肉毒毒素底物肽抗原免疫鸡，然后从其蛋黄中提取卵黄免疫球蛋白，进一步纯化或蛋白酶消化进行制备，该 IgY 抗体分子量为 180,000，制备纯度大于 85%。

4. 权利要求 1 所述抗肉毒毒素底物肽 IgY 抗体的制备方法，包括如下步骤：

- (1) 重组制备肉毒毒素底物肽抗原（底物肽 SubA 或其修饰体）；
- (2) 应用肉毒毒素底物肽抗原多次加强免疫产蛋鸡；
- (3) 收集鸡蛋，分离出蛋黄，提取卵黄免疫球蛋白；
- (4) 纯化 IgY 抗体或进一步蛋白酶消化加工。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法，其中制备肉毒毒素底物肽抗原采用化学合成或基因工程重组表达方法。

6. 根据权利要求 4 所述的制备方法，其中提取卵黄免疫球蛋白采用水稀释法、盐析或 PEG 法。

7. 根据权利要求 4 所述的制备方法，其中纯化 IgY 抗体采用 DEAE 色谱、凝胶过滤或亲和层析分离纯化方法。

8. 权利要求 1 所述抗肉毒毒素底物肽的 IgY 抗体或权利要求 2 所述抗肉

---

毒毒素底物肽的 IgY 抗体的衍生物在制备检测 A 型肉毒毒素以及产 A 型肉毒毒素病原菌的诊断试剂中的用途。

9. 根据权利要求 8 所述用途, 其中肉毒毒素来自产生肉毒毒素的微生物: 肉毒梭菌。

## 一种抗肉毒毒素底物肽 SubA 的 IgY 抗体，其制备方法和用途

### 技术领域

本发明涉及一种 IgY 抗体，具体说涉及一种抗肉毒毒素底物肽的 IgY 抗体，还涉及该抗体的制备方法及其用途。

### 背景技术

肉毒毒素 (botulinum neurotoxin, BoNT) 是世界上已知毒性最强的物质，由肉毒梭状芽孢杆菌 (clostridium botulinum) 在厌氧条件下产生，共有 7 种血清型 (A-G)，其中引起人类致病的主要是 A、B、E 型。而 A 型肉毒毒素比其它型又能引起更为严重的中毒症状，导致更高的死亡率，人体的半数致死剂量 LD50 仅为 0.1-1ng/kg。中毒通常表现为眼部及喉部肌群的麻痹，然后发展为全身骨骼肌麻痹，最终由于呼吸衰竭而死。近几年，肉毒中毒事件时有发生，虽然肉毒中毒主要以食物污染、伤口感染、婴儿肠道中毒等方式出现，但由于肉毒毒素的毒性强烈，易于制备获得，使得其成为潜在的生物恐怖剂之一。

肉毒毒素由肉毒梭状芽孢杆菌产生，最初是以无毒的单链多肽形式存在，约 150kDa，之后经菌体蛋白酶或体外蛋白酶作用，将毒素前体消化成为一个二硫键相连的双链形式多肽存在才具有毒性，包括通过羧基端与靶细胞受体结合并通过氨基端介导细胞内吞将毒素转运至细胞内部的重链部分 (Heavy chain, Hc)，约 100kDa，以及具有锌依赖内肽酶活性的轻链部分 (Light

chain,Lc), 约 50kDa, 可以特异切割靶细胞内肉毒毒素的底物, 而发挥神经毒力。其中, 重链是毒素的非毒性部分, 而轻链则是毒素的毒性部分。肉毒毒素的底物根据其血清型不同而不同, 并且针对同一种底物的几种不同血清型毒素各自的作用位点也不同。A、E、C1 型肉毒毒素作用的底物为突触小体相关蛋白 (Synaptosomal associated protein of molecular mass 25kDa, SNAP-25), 作用位点分别为: A 型: Q197-R198; E 型: R180-I181; C1 型: R198-A199; B、D、F、G 型肉毒毒素作用的底物为囊泡相关膜蛋白 (Vesicle associated membrane protein, VAMP or Synaptobrevin), 作用位点分别为: B 型: Q76-F77; D 型: K59-L60; F 型: Q58-K59; G 型: A81-A82; C1 型肉毒毒素还可以切割可溶 N2 乙基马来酰亚胺敏感因子胞膜整合蛋白 (Syntaxin), 位点为 K253-A254。这些底物共同被称为 SNARE 蛋白, 在介导小泡定向和融合方面起重要作用。

根据现有文献报道, 肉毒毒素的致病分子机制主要包括以下几步: (1) 肉毒毒素通过重链羧基端特异识别并结合靶细胞表面的特异受体; (2) 受体介导发生能量依赖性细胞内吞作用 (endocytosis), 通过重链氨基端将肉毒毒素轻链内化进入胞浆; (3) 肉毒毒素轻链部分发挥其锌依赖的内肽酶活性, 选择性切割在神经递质释放过程中起重要作用的 SNARE 蛋白, 从而封闭乙酰胆碱的释放, 进而造成肉毒中毒。

目前对于肉毒中毒主要使用肉毒多价抗毒素——马血清进行临床治疗, 但只有在中毒前及中毒后 24 小时使用才能保证效果。因此, 对于肉毒中毒的防治来说, 及时、准确地采取措施才能最大限度地发挥效果。而实现对于微量肉毒毒素的快速、准确的检测分析, 无疑是及时准确采取防治措施、减少

其危害的前提和最重要的手段之一。

迄今为止，对于肉毒毒素的检测分析法中，唯一公认的金标准是小鼠分析法（mouse bioassay），这种分析方法主要通过向小鼠腹腔注射待测样品，进而观察小鼠是否出现中毒症状，如出现蜂腰，皮毛倒立，呼吸微弱，四肢麻痹，甚至死亡等症状，从而分析待测样品中毒素量的多少并用特异抗体确定型别如何，可以实现对皮克级（pg）毒素的分析。虽然传统金标准对绝大部分样品分析的结果都是真实可靠的，但也存在许多缺点，主要表现在成本高（对动物饲养条件要求高，对操作人员专业技能要求高）；耗时长（需要4天）；样品需要量大，不易推广等。因此传统金标准无法满足突发公共卫生事件中样本应急分析的要求，亟需简便、快速、灵敏的新技术方法实现对传统金标准的有效替代。

近几年，国内外许多学者在肉毒毒素的分析方法方面开展了相关研究，也已经有一些新型的分析方法问世，除了上面提到过的传统金标准外，主要包括：（1）内肽酶活性分析法（endopeptidase activity assay），可以使用人工合成的含有酶切位点的肽段作为底物，利用检测标记的荧光信号等方法对待测样品中毒素进行分析；（2）质谱分析法，对毒素酶解底物产物直接进行检测，可以达到小鼠分析法的灵敏度甚至更高，但依赖特殊设备，且其结果容易被待测样品中其他物质所干扰；（3）细胞分析法，可以体外模拟肉毒中毒的过程，解决了小鼠分析法使用大量动物的问题，但操作较复杂，耗时长。

根据文献报道，在正确折叠的 SNAP-25 蛋白上，A 型肉毒毒素特异切割位点之前的数个氨基酸残基包埋于 $\alpha$ 螺旋之中，经过毒素切割后便会失去空间构象（见图 8）。依据底物的这一构象变化，可以针对底物酶解产物的线性肽

设计特异抗体，应用其对内肽酶切割前后底物识别的差异，进行肉毒毒素的检测分析。

到目前为止，尚未见到利用 SNAP-25 蛋白制备鸡卵黄免疫球蛋白（IgY 抗体）进行肉毒毒素的检测分析的报道。

## 发明内容

针对快速、灵敏、便捷的肉毒毒素检测和毒力甄别方法的需求，本发明提供了一种 IgY 抗体，该抗体特异抗肉毒毒素底物肽 SubA，并能高效检测 A 型肉毒毒素及其毒力。该抗体所针对的底物肽 SubA 的氨基酸序列为 NKTRIDEANQ，如序列表中序列 1 所示。

本发明还公开了上述抗肉毒毒素的 IgY 抗体的衍生物，是 IgY 抗体的蛋白酶消化产物，它保留了 IgY 抗体的抗原结合活性。

本发明的抗肉毒毒素的 IgY 抗体分子量为 180,000，制备纯度大于 85%，具有较好的稳定性且易于保存、运输。

本发明还公开了上述抗肉毒毒素的 IgY 抗体的制备方法。首先选择 A 型肉毒毒素切割 SNAP25 位点前 10 个氨基酸残基，即 189N-198Q（命名 SubA），通过化学合成的方法进行合成，并在肽 N'端进行 KLP 修饰。合成制备 KLP-SubA 做为免疫抗原，选用产蛋鸡，通过动物定向免疫方法，在动物体内诱导产生特异抗肉毒毒素底物肽 SubA 的 IgY 抗体。收集产蛋，采用水稀释法、盐析或 PEG 法等提取卵黄免疫球蛋白，可以进一步采用 DEAE 色谱、凝胶过滤或亲和层析分离纯化方法等进行纯化。

本发明的 IgY 抗体可以通过本领域已知的生物化学的方法进行大量制备。

在 IgY 抗体全分子基础上, 可以应用蛋白酶消化方法制备 F(ab)' 等衍生物, 以优化改善其理化性质、提高或增加其应用性和应用范围。

通过试验测定本发明 IgY 抗体可特异识别底物肽 SubA, 并具有良好结合活性, 而与完整底物 SNAP25 不结合, 显示其结合特异性, 这种结合特异性可能是非构象依赖的, 与抗体识别位点在线性底物肽 SubA 暴露而在完整底物 SNAP25 中不暴露或包埋有关。

本发明同时公开了特异抗肉毒毒素底物肽 SubA 的 IgY 抗体在 A 型肉毒毒素检测分析中的应用以及相关试剂的制备。具体包括: (1) 重组 SNAP25 蛋白的制备。基因工程技术和分子生物学方法, 设计一对引物, 通过 RT-PCR 从小鼠全脑组织总 RNA 中克隆得到 SNAP25 编码基因, 并通过基因亚克隆手段构建重组表达 SNAP25 的原核基因工程菌—重组大肠杆菌, 然后诱导表达并通过一系列纯化步骤, 制备高纯度具有生物学活性的重组 SNAP25 蛋白。鉴定结果证明重组 SNAP25 蛋白具有能被 A 型肉毒毒素特异切割的活性, 可以作为肉毒毒素底物制剂应用于神经毒的检测。(2) 应用特异抗肉毒毒素底物肽 SubA 的 IgY 抗体检测 A 型肉毒毒素的主要步骤如下 (ELISA): 首先包被重组 SNAP25 蛋白于酶联板上, 0.4ug/孔, 4℃过夜或 37℃ 2h; 3% BSA 封闭 37℃ 1h; 加入待检样品, 以 A 型肉毒毒素或其 ALc 片段为对照, 37℃ 反应 1h; 洗板去除未反应物, 再加入特异 IgY 抗体, 37℃ 反应 1h; 加入 HRP 标记的抗 IgY 抗体, 37℃ 反应 30min, 显色处理并记录结果。

在对 A 型肉毒毒素标准品分析实验中, 获得本分析系统的 LOD 为 0.1 LD50 (小鼠) /ml (相当于 0.4 pg/ml), LOQ 为 1.6 LD50 (小鼠) /ml (相当于 6.4 pg/ml); 使用 E 型肉毒毒素对分析系统的特异性进行验证, 显示特异性良好; 将 A 型肉毒毒素混入牛奶、人血清作为模拟样品对方法的精确性进行验证,

结果显示在牛奶或人血清混合物中分析方法均具有良好的精确性 (88%<Recovery<111%, inter-assay and intra-assay CV<20%)。

基于特异抗肉毒毒素底物肽 SubA 的 IgY 抗体建立的检测分析系统操作简便, 不依赖于特殊仪器设备, 只需一般 ELISA 操作条件即可完成; 分析效率高, 能在 3h 内得到结果; 结果灵敏度高, 可以达到 0.1 LD<sub>50</sub>/ml (相当于 0.4 pg/ml), 且特异性、精确性良好。

本发明利用 A 型肉毒毒素特异切割点, 选择 A 型肉毒毒素切割 SNAP25 位点 N'端 10 个氨基酸残基, 即 189N-198Q (命名 SubA) 做为免疫抗原制备特异 IgY 抗体, 并将其成功应用于 A 型肉毒毒素检测和毒力分析。提供了快速、灵敏、便捷的肉毒毒素检测试剂和毒力甄别方法, 具有非常良好的市场前景, 同时也具有重要的社会意义。

## 附图说明

图1为重组大肠杆菌 *pET-SNAP25/BL21* 诱导表达产物的 SDS-PAGE 图谱, 其中 M. 蛋白分子量标准; 1. 重组大肠杆菌诱导表达 (箭头所指处为目的蛋白 SNAP25); 2. 重组菌未诱导对照。

图2为重组 SNAP25 纯化产物的 SDS-PAGE (A) 和 Western 印迹 (B) 图谱, 其中 1. 纯化后的 SNAP25; M. 蛋白分子量标准。

图3为 A 型肉毒毒素对重组底物 SNAP25 的内肽酶活性分析 SDS-PAGE 图谱, 其中 M. 蛋白分子量标准; 1. 10  $\mu$ l SNAP25; 2. 10  $\mu$ l SNAP25+5  $\mu$ l 毒素; 3. 10  $\mu$ l SNAP25+10  $\mu$ l 毒素; 4. 10  $\mu$ l SNAP25+15  $\mu$ l 毒素 c; 5. 10  $\mu$ l SNAP25+20  $\mu$ l 毒素。

图 4 为 anti-SubA IgY 抗体纯化产物的 SDS-PAGE 图谱, 其中箭头所指处

分别为 IgY 的重链和轻链。

图 5 为 IgY 抗体的特异性验证 (ELISA)，其中，包被抗原分别为 SubA、SNAP25 和 BSA。

图6为应用anti-SubA IgY对A型肉毒毒素进行检测分析 (ELISA) 及分析系统的特异性验证，其中底物SNAP25包被量为 $0.4 \mu\text{g}/\text{孔}$ ，毒素与底物反应条件 $37^\circ\text{C}$ ，1h。数据处理方法为：A型肉毒毒素标准品的量（小鼠LD50）进行对数变换后作为X轴，OD<sub>450</sub>读数作为Y轴作图。使用E型肉毒毒素（BoNT/E）作为对照。

## 具体实施方式

### 实施例 1 重组 SNAP-25 的表达与纯化

#### 1. 材料

##### 1.1 菌株

工程菌株 *pET-SNAP25/BL21* 应用分子生物学方法构建（刘昊等，军事医学科学院院刊，2009），根据 GenBank 中已报道的 SNAP25 编码基因序列，设计特异引物，通过 RT-PCR 从小鼠全脑组织总 RNA 中得到 *SNAP25* 基因，将全长基因克隆至原核表达载体 pET22b 中，获得的重组质粒转化入大肠杆菌 *E. coli* BL21 构建工程菌株 *pET-SNAP25/BL21*，用于外源蛋白 SNAP25 表达。

##### 1.2 试剂

Ni 亲和层析柱 HisTRAP FF™ 购自 GE 公司。

#### 2. 方法与结果

##### 2.1 重组 SNAP-25 在大肠杆菌中的诱导表达

将工程菌株 *pET-SNAP25/BL21* 接种至含 100 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基，37 $^{\circ}$ C 振荡过夜，次日以 1:100 接种至 LB 液体培养基，继续在 37 $^{\circ}$ C 振荡培养，至菌液浓度达到 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6，加入 IPTG 至终浓度为 1mM，25 $^{\circ}$ C，120r/min 水浴摇床振荡培养过夜。诱导培养产物 4 $^{\circ}$ C，6000r/min 离心 20min 收集菌体。

SDS-PAGE 分析：收集经过诱导的重组菌体进行 SDS-PAGE 电泳，结果显示重组菌体样品中出现分子量为 28kDa 的蛋白条带，与 SNAP-25 预期分子量相符（附图 1）。

## 2.2 重组 SNAP25 的纯化

将离心收集的菌体用缓冲液 A（0.02M 磷酸钠、0.5M 氯化钠、0.04M 咪唑，pH7.4）悬浮，置于冰浴中超声波破碎菌体，每次 300W 超声波处理 20s，间隙 10s，90 个循环。破碎后的菌体悬液 4 $^{\circ}$ C 10000g 离心 10min 收集上清样品。以缓冲液 A 平衡亲和柱 HisTRAP FF<sup>TM</sup>，样品以 2mL/min 速度上样后仍以缓冲液 A 平衡，以缓冲液 B（0.02M 磷酸钠、0.5M 氯化钠、0.4M 咪唑，pH7.4）线性梯度洗脱，60min 内缓冲液 B 升至 100%浓度，收集 280nm 洗脱峰。纯化产物经 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析（附图 2），结果显示重组目的蛋白纯度大于 85%，可以被特异抗体所识别。

## 2.3 重组 SNAP-25 蛋白可以被 A 型肉毒毒素特异切割

将 A 型肉毒毒素与反应缓冲液（50mmol/L HEPES，2mmol/L DTT，10 $\mu$ mol/L ZnCl<sub>2</sub>，pH7.5）按 2:1 的比例 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min 后，分别取 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 $\mu$ l 与 10 $\mu$ l SNAP-25 纯化产物在 37 $^{\circ}$ C 下共孵育 1h，经 SDS-PAGE 分析肉毒毒素与 SNAP-25 蛋白的反应结果。结果显示，随着毒素量的增加，SNAP-25 的

量逐渐减少，而在预期位置出现的切割后产物量逐渐增加（附图3），说明重组蛋白 SNAP-25 具有能被 A 型肉毒毒素特异切割的活性，可以应用于肉毒毒素内肽酶活性的检测分析。

## 实施例 2 特异抗肉毒毒素底物肽 SubA 的 IgY 抗体制备

### 1. 材料

产蛋来航鸡由北京实验动物中心提供，完全和不完全佐剂均购自 Sigma 公司。底物肽 SubA 序列为 188NKTRIDEANQ197，如序列表中序列 1 所示，SubA 及其修饰多肽 KLP-SubA 由上海波泰生物技术有限公司合成，纯度 90%。

### 2. 方法与结果

#### 2.1 动物免疫

使用合成短肽 KLP-SubA 抗原免疫 SPF 来航蛋鸡，首次免疫使用福氏完全佐剂与短肽按照 1: 1 的比例混匀，乳化后以 1.0mg/kg 的剂量进行注射，使用福氏不完全佐剂分别于 3w, 6w, 11w 进行第 2、3、4 次免疫。收集免疫后的鸡蛋。

#### 2.2 IgY 抗体的提取

将免疫来航鸡所产鸡蛋于消毒液中浸泡 15 分钟，灭菌纱布拭净。去蛋青留取蛋黄，按 1: 8 的体积比加入灭菌蒸馏水 (pH 4.2-4.4)，充分搅拌混匀，4℃静置过夜。移液管小心吸取上清液，滴加饱和硫酸铵溶液至终浓度 20%并搅拌均匀，4℃静置 4 小时以上。10000g 离心 10 分钟后吸取上清液，向其中继续滴加饱和硫酸铵溶液至终浓度 40%并搅拌均匀，4℃静置过夜。10000g 离心 15 分钟，去尽上清，沉淀重溶于 10mM PBS (pH 7.4) 溶液中，经 10mM PBS (pH 7.4) 透析后，即为提取的 IgY。对提取的 IgY 进行 SDS-PAGE 分析，结

果显示提取的抗体纯度大于 85%（附图 4）。

### 2.3 anti-subA IgY 抗体效价的动态检测（ELISA）

以 SubA 为抗原包被酶联板，每孔 100ng，ELISA 方法检测 IgY 效价，二抗为 HRP 标记兔抗鸡抗体（SIGMA 公司）。结果显示，随着免疫次数增加，抗体效价呈明显上升趋势，经四次免疫后，抗体效价可达  $5.12 \times 10^5$ ，在免疫结束后一年效价保持稳定。

取 12 周所产蛋，按照如前所述的方法使用硫酸铵沉淀法提取鸡卵黄抗体，使用 Bradford 法进行蛋白含量测定，经计算可知其蛋白含量为 35.51mg/ml；对其效价进行测定，结果如表 1 所示，抗体在 1: 32000 时仍具有良好的结合活性。

表1 IgY-BoNT/A的效价测定

梯度	1: 1000	1: 2000	1: 4000	1: 8000	1: 16000	1: 32000						
OD <sub>450</sub>	0.495	0.454	0.201	0.222	0.109	0.109	0.049	0.059	0.059	0.046	0.047	0.045
BSA	0.073	0.053	0.011	0.008	0.011	0.009	0.009	0.024	0.027	0.006	0.016	0.011

### 2.4 鸡卵黄抗体 anti-subA IgY 特异性的验证

通过 ELISA 法对 anti-subA IgY 的特异性进行验证。使用 anti-subA IgY，分别对其与重组 SNAP-25、人工合成 subA 的结合活性进行检测，方法如下：

(1) 将 SNAP-25、subA 以 50ng/100ul/孔，三复孔包被，以 BSA 为空白对照，4℃包被过夜；

(2) 0.1%PBST 洗涤三次，每次 3min，3%BSA 37℃封闭 30min；

(3) 0.1%PBST 洗涤三次，每次 3min，加入 1: 40000 稀释的鸡卵黄抗体，100 μ l/孔，37℃1h；

(4) 0.1%PBST 洗涤三次，每次 3min，加入 HRP 标记的兔抗鸡二抗，100 μ l/

孔, 37°C 30min;

(5) 加入 A、B 液显色, 使用 2M  $H_2SO_4$  终止,  $OD_{450}$  读数。

结果如附图 5 所示, anti-subA IgY 对 subA 有显著结合活性, 对未经 A 型肉毒毒素切割的完整重组底物 SNAP-25 不具有结合活性, 表明 anti-subA IgY 具有底物切割产物线性肽特异识别活性, 可以应用于 A 型肉毒毒素的检测和内肽酶活性 (神经毒力) 分析。

### 实施例 3 IgY 抗体在 A 型肉毒毒素检测中的应用

#### 1. 材料

SpectroPlus 全自动酶联免疫检测仪为 MD 公司产品, 抗 IgY-HRP 购自 SIGMA 公司, 酶联板及显色试剂购自百奥康公司。

#### 2. 方法与结果

##### 2.1 对 A 型肉毒毒素标准品进行分析

操作步骤为:

将溶解于 Ni-NTA 洗脱缓冲液 (0.02M 磷酸钠、0.5M 氯化钠、0.4M 咪唑, pH7.4) 中的 SNAP-25 三复孔包被于酶联板上, 每孔  $0.4 \mu g$ , 4°C 过夜;

拍掉包被液, 使用 0.1%PBST 洗涤三次, 每孔  $200 \mu l$ , 每次 3min;

使用 3%BSA 封闭, 每孔  $200 \mu l$ , 室温 2h;

拍掉封闭液, 将溶解于切割反应缓冲液 (50mmol/L HEPES, 2mmol/L DTT,  $10 \mu mol/L ZnCl_2$ , pH7.5) 中的 A 型肉毒毒素标准品按照梯度浓度加入到酶联板中, 使用切割反应缓冲液补齐每孔  $100 \mu l$ , 37°C 反应 1h;

拍掉反应液, 使用 0.1%PBST 洗涤三次, 每孔  $200 \mu l$ , 每次 3min;

加入 anti-subA IgY (一抗), 1: 40000 稀释使用, 每孔  $100\ \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  1h;  
拍掉一抗, 使用 0.1%PBST 洗涤三次, 每孔  $200\ \mu\text{l}$ , 每次 3min;

加入 HRP 标记兔抗鸡抗体 (二抗), 1: 2000 稀释使用, 每孔  $100\ \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  30min;

加入 AB 液显色 10min,  $2\text{M H}_2\text{SO}_4$  终止, OD<sub>450</sub> 读数;

根据分析结果确定分析系统对 A 型肉毒毒素的 LOD (Limit of Detection) 及 LOQ (Limit of Quantitation)。

结果显示:

对毒素反应温度  $37^\circ\text{C}$ 、反应时间 1h, 底物包被每孔  $0.4\ \mu\text{g}$  条件下使用分析系统对 A 型肉毒毒素标准品分析的结果进行处理 (结果见表 2), 将 A 型肉毒毒素标准品的量 (小鼠 LD<sub>50</sub>) 进行对数变换后作为 X 轴, OD<sub>450</sub> 读数作为 Y 轴作图 (附图 6), 结果显示, OD<sub>450</sub> 读数随加入的 A 型肉毒毒素标准品的量的增加而变大, 呈现出量效关系。

表2. 分析系统对BoNT/A的毒力分析数值

LD <sub>50</sub>	0	0.015	0.03	0.06	0.12	0.24	0.48	0.96	1.92	7.68	15.36
	0.022	0.038	0.043	0.06	0.078	0.123	0.153	0.218	0.272	0.401	0.627
OD <sub>450</sub>	0.03	0.029	0.056	0.083	0.127	0.144	0.119	0.21	0.295	0.504	0.7
	0.027	0.04	0.063	0.072	0.115	0.127	0.162	0.237	0.266	0.542	0.697
Mean OD <sub>450</sub>	0.026	0.036	0.054	0.072	0.107	0.131	0.145	0.222	0.278	0.482	0.675
SD	0.00404	0.0058 6	0.0101 5	0.0115	0.0255 4	0.0111 5	0.0226 8	0.0138 7	0.0153 1	0.0729 6	0.0413 1
CV	15.35%	16.43%	18.79%	16.05 %	23.94%	8.49%	15.68%	6.26%	5.51%	15.13%	6.12%

对 BoNT/A 加入量的值进行对数变换后得到公式： $y = 0.219e^{0.9326x}$ ， $R^2 = 0.9931$ 。根据背景平均值加两倍标准差为 cutoff 值计算， $0.01LD_{50}/100\mu l$ （相当于  $0.4\text{ pg/ml}$ ）为分析系统的 LOD（Limit of Detection），以  $CV < 16\%$  为限，则  $0.16LD_{50}/100\mu l$ （相当于  $6.4\text{ pg/ml}$ ）为分析系统的 LOQ（Limit of Quantitation）。

## 2.2 分析系统的特异性验证

使用分析系统在反应温度  $37^\circ\text{C}$ ，反应时间 1h，底物包被量每孔  $0.4\mu\text{g}$  条件下，对 E 型肉毒毒素进行分析，操作方法同前。

将结果与同样条件下对 A 型肉毒毒素分析得到的结果进行对比。将毒素量（小鼠  $LD_{50}$ ）进行对数变换后作为 X 轴，以 OD<sub>450</sub> 读数为 Y 轴作图（见附图 6），结果显示 BoNT/E 的分析结果并未呈现量效关系，证明分析系统的特异性良好。

## 2.2 模拟样品的检测分析

使用模拟样品对分析系统的可靠性进行验证，方法如下：

将待测的 A 型肉毒毒素分别使用反应缓冲液、人血清和牛奶对倍稀释混匀，分别取出梯度浓度的样品作为待测样品。使用分析系统在反应温度  $37^\circ\text{C}$ ，反应时间 1h，底物包被量每孔  $0.4\mu\text{g}$  条件下，对待测样品进行分析，操作方法同前。

对结果进行处理，根据 OD<sub>450</sub> 读数按照前述公式分别计算出模拟样品中毒素的含量，并与模拟样品中毒素的实际含量进行比较，计算出组内及组间 CV、Recovery 值（见表 4）。结果显示，使用分析系对反应缓冲液或人血清、牛

奶中的模拟样品进行分析的结果其 Recovery 均在 88%-111%之间, 证明分析系统具有良好的组内精确性 (accuracy); 对组内及组间 CV 值进行比较, 其 CV 值均小于 20% (inter-assay and intra-assay CV<20%), 证明分析系统具有良好的精确性 (precision)。

表 4. 使用模拟样品对分析系统的精确性进行验证

毒素实际 值(LD <sub>50</sub> ) 组别	0.24 LD <sub>50</sub>			0.32 LD <sub>50</sub>			0.48 LD <sub>50</sub>		
	B 组	M 组	S 组	B 组	M 组	S 组	B 组	M 组	S 组
	0.120	0.125	0.124	0.146	0.138	0.141	0.159	0.163	0.148
OD <sub>450</sub>	0.129	0.115	0.123	0.141	0.128	0.133	0.157	0.142	0.164
	0.119	0.132	0.137	0.139	0.138	0.130	0.151	0.161	0.152
毒素计算 值 (LD <sub>50</sub> )	0.2265	0.2505	0.2455	0.3675	0.3198	0.3372	0.4536	0.4823	0.3801
	0.2707	0.2039	0.2407	0.3372	0.2656	0.2919	0.4397	0.3431	0.4897
	0.2218	0.2865	0.3141	0.3255	0.3198	0.2759	0.3994	0.4679	0.4059
Intra-M	0.2397	0.2470	0.2668	0.3434	0.3017	0.3017	0.4309	0.4311	0.4252
Intra-SD	0.0270	0.0414	0.0410	0.0217	0.0313	0.0318	0.0281	0.0765	0.0573
Intra-CV	11.3%	16.8%	15.4%	6.3%	10.4%	10.5%	6.5%	17.8%	13.5%
Recovery	99.9%	102.9%	111.2%	107.3%	94.3%	94.3%	89.8%	89.8%	88.6%
Inter-M		0.2511			0.3156			0.4291	
Inter-SD		0.0344			0.0324			0.0499	
Inter-CV		13.7%			10.3%			11.6%	

(Intra and inter-assay precision presentation as CV, accuracy presentation as Recovery.)

(B 组. 将待测的 A 型肉毒毒素使用反应缓冲液对倍稀释混匀; M 组. 将待测的 A 型肉毒毒素使用牛奶对倍稀释混匀; S 组. 将待测的 A 型肉毒毒素使用人血清对倍稀释混匀; M. mean 计算值平均值; intra. 组内; inter. 组间)

## 抗肉毒底物肽抗体

## 序 列 表

<110> 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

<120> 一种抗肉毒毒素底物肽SubA的IgY抗体, 其制备方法和用途

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213>

<400> 1

Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln  
1                   5                   10

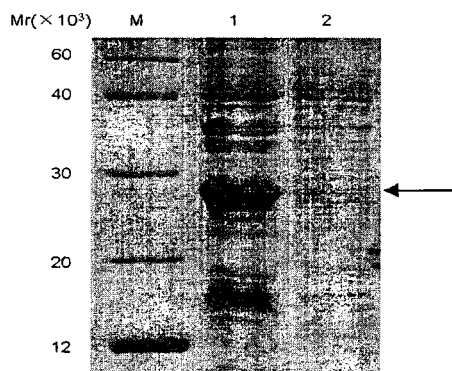


图1

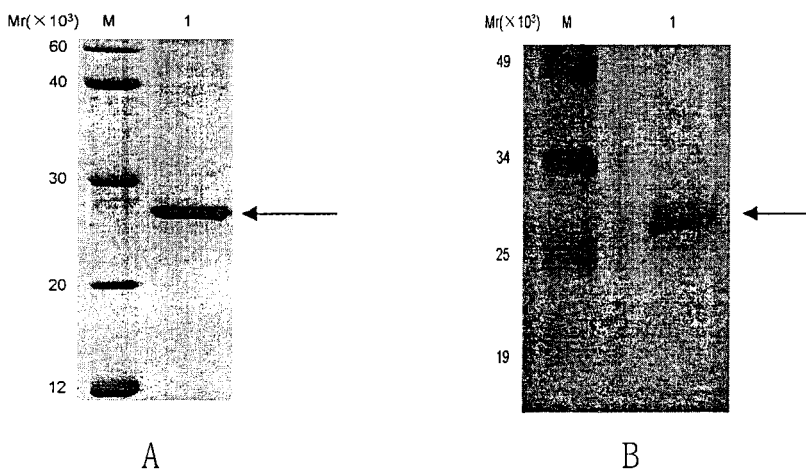


图2

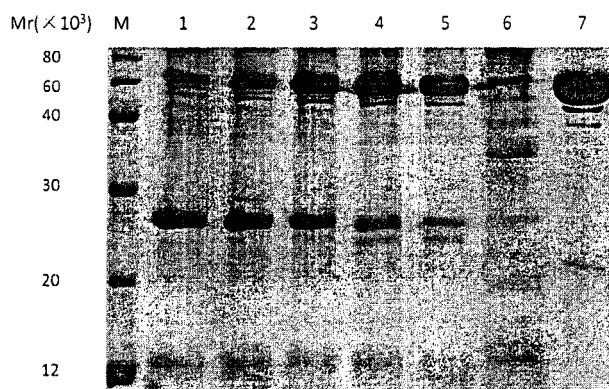


图3

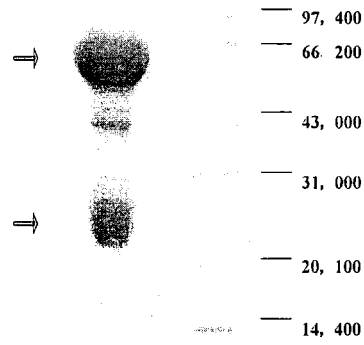


图4

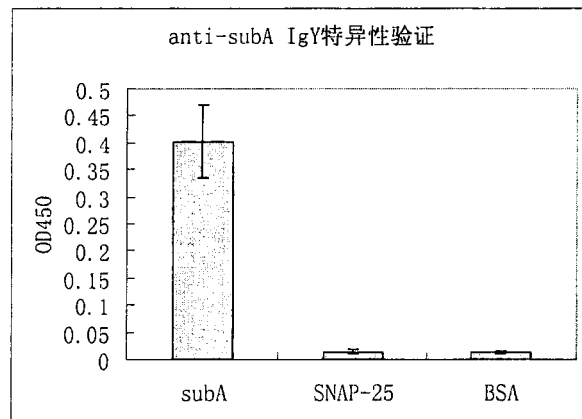


图5

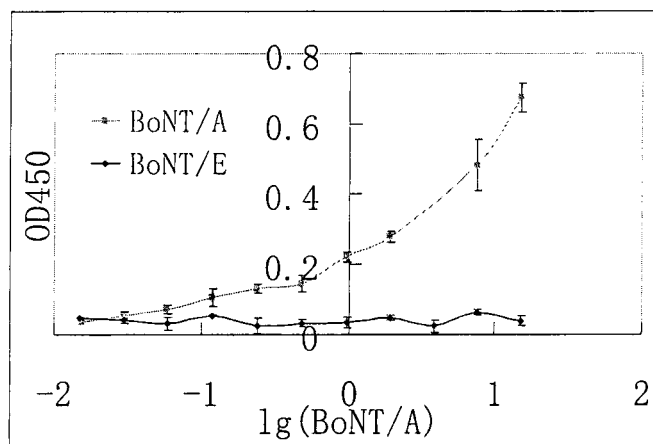


图6

专利名称(译)	一种抗肉毒毒素底物肽SubA的IgY抗体，其制备方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101648997A</a>	公开(公告)日	2010-02-17
申请号	CN200910092287.4	申请日	2009-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	王慧 史晶 刘昊 侯晓军 王琴 李涛		
发明人	王慧 史晶 刘昊 侯晓军 王琴 李涛		
IPC分类号	C07K16/12 C07K16/02 C07K11/14 C12P21/06 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种抗肉毒毒素底物肽的IgY抗体，该抗体可以通过以下方法制备：化学合成或基因重组表达的方法制备SNAP25短肽subA，通过subA免疫产蛋鸡，收集鸡蛋，应用生物化学方法提取和纯化卵黄免疫球蛋白。该抗体具有高特异性的结合底物线性短肽subA，而不结合完整底物SNAP25的特点，具有特异识别A型肉毒毒素酶解SNAP25作用的能力，可以作为检测试剂应用于A型肉毒毒素的检测和神经毒力或内肽酶活性分析，以及临床肉毒中毒诊断，具有良好的市场前景和重要的社会意义。

