



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101781365 A

(43) 申请公布日 2010.07.21

(21) 申请号 201010105939.6

(22) 申请日 2010.01.29

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山华南
农业大学

(72) 发明人 雷红涛 钟青萍 刘燕婷 张挺
孙远明 余海虎

(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 林丽明

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

C07D 491/22(2006.01)

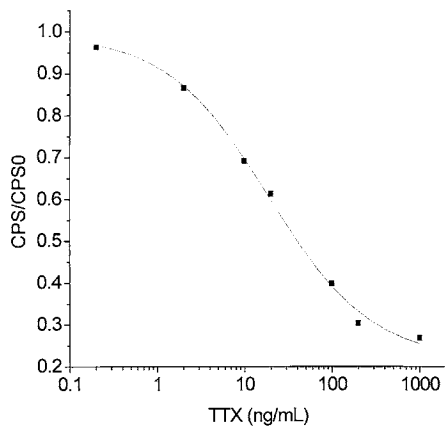
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种河豚毒素的人工抗原、相应的特异性抗体及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种河豚毒素的人工抗原、相应的特异性抗体及其制备方法与应用。本发明河豚毒素的人工抗原中,河豚毒素与载体蛋白的质量比为 1 : 10。本发明将河豚毒素通过曼尼希法和蛋白载体偶联制备人工抗原,将人工抗原免疫动物来制备特异性抗体。本发明针对河豚毒素的人工抗原的特异性抗体可以用于河豚毒素的提取纯化,还可用于建立时间分辨荧光免疫分析法或酶联免疫吸附法来快速、灵敏地检测河豚毒素。



1. 一种河豚毒素的人工抗原,其中河豚毒素与载体蛋白的质量比为 1 : 10。
2. 根据权利要求 1 所述的河豚毒素的人工抗原,其特征在于所述载体蛋白为 KLH。
3. 权利要求 1 或 2 所述河豚毒素的人工抗原的制备方法,其特征在于包括如下步骤:
 - (1) 以 PB 缓冲液或醋酸 - 醋酸钠缓冲液分别溶解载体蛋白和河豚毒素后,将两种溶液混合;
 - (2) 混合液中滴加 37wt% 的甲醛溶液,使甲醛在混合液中的最终体积百分数为 3.5%,避光搅拌反应 72h;
 - (3) 将上述液体进行透析,得到河豚毒素的人工抗原。
4. 根据权利要求 3 所述河豚毒素的人工抗原的制备方法,其特征在于步骤 (1) 中所述 PB 缓冲液是 0.04mol/L、pH = 7.4 的 PB 缓冲液;所述醋酸 - 醋酸钠缓冲液是 0.04mol/L、pH = 4.8 的醋酸 - 醋酸钠缓冲液。
5. 根据权利要求 3 所述河豚毒素的人工抗原的制备方法,其特征在于步骤 (3) 中透析是用 0.01mol/L、pH = 7.4 的 PBS 缓冲液或 0.01mol/L、pH = 4.8 的醋酸 - 醋酸钠缓冲液进行透析。
6. 根据权利要求 5 所述河豚毒素的人工抗原的制备方法,其特征在于所述透析的时间为 48h,透析温度为 4℃。
7. 权利要求 1 所述河豚毒素的人工抗原相应的特异性抗体,其特征在于所述抗体为单克隆抗体。
8. 权利要求 7 所述河豚毒素的人工抗原相应的特异性抗体的制备方法,其特征在于所述单克隆抗体的制备方法是将河豚毒素人工抗原与弗氏佐剂等体积混合乳化后免疫小鼠,取特异性高的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合获得细胞株,即获得单克隆抗体。
9. 权利要求 7 所述河豚毒素的人工抗原相应的特异性抗体的应用,其特征在于所述单克隆抗体用于检测河豚毒素或对河豚毒素进行提取纯化。
10. 权利要求 9 所述河豚毒素的人工抗原相应的特异性抗体的应用,其特征在于所述检测河豚毒素是通过单克隆抗体建立直接或间接竞争时间分辨荧光免疫分析法来检测。

一种河豚毒素的人工抗原、相应的特异性抗体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及河豚毒素的人工抗原、抗体的制备领域,具体涉及一种河豚毒素的人工抗原、相应的特异性抗体及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 河豚毒素 (TTX) 的化学研究始于 1909 年,1964 年以后由 Woodward 测定了 TTX 的结构,1972 年 Kishi 等采用化学方法成功合成了河豚毒素。河豚毒素分子式为 $C_{11}H_{17}N_3O_8$, 分子量为 319.27。分子主要由 3 个氮原子组成,它们与氢氧原子形成特殊的结构:含有 1 个碳环,1 个胍基,6 个羟基,在 C-5 和 C-10 位有一个半醛糖内酯连接着分开的环。有专家将其称为“自然界最奇特的分子之一”,也是世界上最致命的毒药之一。1g 河豚毒素的毒性是 1g 氰化物的 1 万倍。

[0003] TTX 粗制品为棕黄色粉末,纯品为无色晶体,呈针状或菱形,无臭,无味,易吸湿潮解,不溶于无水乙醇、乙醚、苯等有机溶剂,微溶于水,极易溶于稀酸水溶液。TTX 在溶液中存在 TTX、半缩醛型 TTX、内酯型 TTX 动态平衡的三种结构。TTX 理化性质比较稳定,在中性和酸性条件下对热稳定,240℃ 开始碳化,但 300℃ 以上也不分解。在碱水溶液中易分解,在 5% 氢氧化钾溶液中于 80 ~ 100℃ 可分解成黄色结晶 2- 氨基 -6- 羟甲基 -8- 羟基 - 喹啉,这也是 TTX 化学检测法的理论基础。

[0004] TTX 是典型的钠离子通道阻断剂,构效关系表明,TTX 的活性基团是 1,2,3 位的胍氨基和附近的 C-4,C-9,C-10 位的羟基,胍基在生理 pH 值下发生质子化,形成正电活性区域与钠离子通道受体蛋白的负电性羧基相互作用,从而阻碍离子进入通道。它能选择性与肌肉、神经细胞的细胞膜表面的钠离子通道受体结合,阻断电压依赖性钠离子通道,从而阻滞动物电位,抑制神经肌肉间兴奋的传导,导致与之相关的生理机能的障碍,造成肌肉和呼吸麻痹,导致人畜死亡。河豚毒素比较稳定,用盐腌、日晒、一般加热烧煮等方法都不易消除。1990 年我国出台的《水产品卫生管理办法》明文规定:河豚鱼有剧毒,不得流入市场。

[0005] TTX 中毒多是由于误食有毒河豚鱼或含有 TTX 的海产品引起。河豚鱼肉味鲜美,蛋白含量很高,营养丰富,在日本,河豚鱼被奉为美食,而且以肝脏为佳品,素有“拼死吃河豚”的说法,但其卵巢、肝脏等内脏器官却富含 TTX,由于 TTX 化学性质稳定,一般的烹饪手段难以破坏,因而日本也成为 TTX 中毒多发的国家。1960 年以前,日本每年因食用河豚鱼而中毒者达 100 多人,死亡率 60%。除日本之外 TTX 中毒还发生在其它国家和地区,如新加坡、泰国、马来西亚、香港、台湾、朝鲜、孟加拉国、美国、澳大利亚等。TTX 中毒发病时间快,死亡率高,目前为止还未能找到特异性的解救药物。早期可催吐,洗胃,用 2% 的碳酸氢钠中和胃内毒素,活性炭能有效地与 TTX 结合,抑制毒素的吸收;呼吸困难者可注射可拉明等,必要时可切开气管。因 TTX 在碱性条件下不稳定,也可静脉注射碳酸氢钠降低血中 TTX 含量。国外报道,可逆性胆碱酯酶抑制剂如新斯的明,藤喜龙等在 TTX 中毒后能增强肌肉的收缩能力,可早期使用。但这些药物均无严格的临床对照,目前还没有一种药物被公认为是有效的。

[0006] 自 20 世纪 60 年代 TTX 的化学结构阐明后,有关其药理作用的报道逐渐增多。尽管 TTX 具有多种生物学功能,其剧毒性限制了它在临床上的应用,但只要确定适当的剂量、给药途径、适应症及药物的配伍禁忌,TTX 临床应用还是可行的。随着科学技术的发展,对 TTX 的研究会更加深入,尤其是在医学上用于神经生理学,肌肉生理学等的研究。

[0007] 目前,检测 TTX 的方法主要有生物检测法、免疫检测法、化学检测法、气液相色谱等仪器分析的方法。TTX 的免疫检测法的基础是单克隆抗体 (McAb)。TTX 是小分子物质,只有反应原性,没有免疫原性,典型的半抗原,所以必须连接到大分子载体上,使其成为完全抗原再免疫动物。最早的免疫检测法是 1989 年 Watabe 用牛血清白蛋白 (BSA) 连接河豚毒素 (TTX 衍生物) 作为抗原制备 McAb 的方法,但得到的 McAb 反应性较低。后来人们改用匙孔血蓝蛋白 (KLH),中国鲎血蓝蛋白 (TTH) 代替 BSA,用甲醛作为偶联剂,采用小剂量长周期免疫方案。1992 年 Raybould 用碱性磷酸酶标记 McAb,直接法的最高灵敏度为 $2.0 \sim 3.0 \times 10^{-3} \text{mg/L}$,间接法为 $3.0 \times 10^{-2} \text{mg/L}$ 。此法对样品处理要求较低,抗干扰能力较强。除 McAb 外,还可通过制备抗 TTX 血清来检测 TTX,Matsumura 等研制了抗 TTX 兔血清 (免疫方法同 McAb)。用生物素一亲和素作为标记系统,从血清中分离出的 IgG 做间接竞争性酶免疫试验检测 TTX 含量,检出限为 $5.0 \sim 1000.0 \mu\text{g/L}$,最低检出限可达 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{g/L}$ 。抗血清为多克隆抗体,其特异性不及 McAb,可能存在交叉反应。王健伟等用 BSA-HCHO-TTX 作抗原免疫动物,经 5 周免疫后取脾融合,其加强免疫后的血清抗体滴度为 $1 : 200$,而用 KLH-HCHO-TTX 免疫后血清抗体滴度可达 $1 : 10^7$ 。D. Neagu 等通过琥珀酰亚胺酯反应合成河豚毒素与碱性磷酸酶的偶联物,并优化了分光光度分析和电气化学传感器两个免疫化学分析系统来检测河豚毒素,其动力范围分别为 $:4\text{-}15\text{ng/ml}$ 、 $2\text{-}50\text{ng/ml}$,检测限分别为 $:2\text{ng/ml}$ 、 1ng/ml 。林洪等人建立了固定化草酸氧化酶法检测河豚毒素。将河豚毒素用氢氧化钠处理,得到定量的草酸盐,利用戊二醛法将草酸氧化酶固定于聚丙烯膜上,通过比色法检测草酸含量,测算出河豚毒素的含量,检测限量为 $0.80 \mu\text{g/g}$ 。杨军等人已经研制出快速检测河豚鱼类中河豚毒素的试剂盒。该试剂盒的最低检出浓度为 5ng/ml 。它是在制备单克隆抗体的基础上研制的 ELISA 试剂盒,可以定量检测河豚毒素,样品的提取操作简单,可对不同时间、不同海域、不同产品中豚毒鱼类的带毒状况进行分析。

[0008] 免疫分析越来越多地用于测定含量极微的具有重要生物学意义的物质,使得可检测性的标记物充分挖掘免疫分析超灵敏检测的潜力。酶的催化反应具有强大的信号放大效果,采用酶作为免疫分析的标记物可以得到高度放大的检测信号。但测量酶反应生色产物 OD 值的酶标记免疫分析 (EIA) 难以对高浓度待测物直接准确定量。

[0009] 时间分辨荧光免疫分析法 (Time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 是近十年发展起来的一种微量分析方法,是利用免疫反应的高度特异性和标记示踪物的高度灵敏性相结合而建立的一类非放射性的新兴检测技术。近年来以其特出的优点逐渐为人们所重视,目前,该技术已不局限于临床诊断领域,而渗透到生物学研究的各个领域。它是目前最灵敏的超微量分析技术之一,其灵敏度高达 10^{-19}mol/L ,较 RIA 的 10^{-16}mol/L 高出 3 个数量级。采用 TRFIA 方法建立的试剂盒具有有效期长、无放射性污染、操作流程短、灵敏度高、标准曲线量程宽、可全自动操作及应用范围十分广泛等优点。

[0010] TRFIA 就是以三价稀土离子及其螯合物作为示踪物,代替荧光物质、同位素、酶和化学发光物质,标记抗原、抗体、核酸探针等物质,当免疫反应发生后,根据稀土离子 (Re)

螯合物的荧光光谱的特点,用时间分辨荧光分析仪,测定免疫反应最后产物的荧光强度。根据荧光强度和相对荧光强度比值,判断反应体系中分析物的浓度,达到定量分析的目的。目前应用在时间分辨荧光免疫分析技术中的稀土离子有四种:铕(Eu)、钐(Sm)、镝(Dy)、铽(Te),其中铕的应用较为成熟。TRFIA运用独特的解离-增强技术可使其荧光性提高100万倍。这些优势都使得TRFIA在多元待测物免疫分析中具有独特优势,是方法学上最具优势的非放射免疫分析技术之一。Re螯合物的荧光特点使背景信号的干扰降低到很低水平,加上荧光生成体系可重复激发的特点,使Re螯合物荧光具有高度的可检测性。商品化试剂盒有灵敏度高、线性范围宽、试剂有效期长、易于自动化等优势,TRFIA试剂盒商品市场有着广阔前景。TRFIA检测方法以其分析灵敏度高、安全、操作简便而快速而成为国际上最具前景的检测分析方法之一。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于根据现有技术中存在的河豚毒素检测灵敏度较低、操作繁琐的问题,提供一种用于快速简便检测河豚毒素的人工抗原及其相应的特异性抗体。

[0012] 本发明另一目的在于提供上述人工抗原及抗体的制备方法。

[0013] 本发明还有一个目的是提供上述特异性抗体的应用。

[0014] 本发明上述目的通过以下技术方案予以实现:

[0015] 一种河豚毒素的人工抗原,该人工抗原中河豚毒素与载体蛋白的质量比为1:10。

[0016] 其中,所述载体蛋白为KLH。

[0017] 本发明河豚毒素的人工抗原,是采用曼尼希法制备得到的,步骤如下:

[0018] (1) 以PB缓冲液或醋酸-醋酸钠缓冲液分别溶解载体蛋白和河豚毒素后,将两种溶液混合;

[0019] (2) 混合液中滴加37wt%的甲醛溶液,使甲醛在混合液中的最终体积百分数为3.5%,避光搅拌反应72h;

[0020] (3) 将上述液体进行透析,得到河豚毒素的人工抗原。

[0021] 作为一种优选方案,步骤(1)中所述PB缓冲液是0.04mol/L、pH=7.4的PB缓冲液;所述醋酸-醋酸钠缓冲液是0.04mol/L、pH=4.8的醋酸-醋酸钠缓冲液;步骤(3)中透析是用0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液或0.01mol/L、pH=4.8的醋酸-醋酸钠缓冲液进行透析;所述透析的时间为48h,透析温度为4℃。

[0022] 本发明河豚毒素的人工抗原相应的特异性抗体,单克隆抗体。其中,所述单克隆抗体的制备方法是将河豚毒素人工抗原与弗氏佐剂等体积混合乳化后免疫小鼠,取特异性高的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合获得细胞株,即获得单克隆抗体。

[0023] 本发明河豚毒素的人工抗原相应的特异性抗体中,所述单克隆抗体可以用于对河豚毒素进行提取纯化;还可通过该抗体建立时间分辨荧光免疫分析法和酶联免疫吸附法,用于快速、灵敏检测河豚毒素

[0024] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0025] 本发明河豚毒素的人工抗原的单克隆抗体用于河豚毒素的检测时快速、灵敏,可以对河豚毒素进行定性、定量分析,还可通过建立直接或间接竞争时间分辨荧光免疫分析

法来对河豚毒素进行提取纯化。

附图说明

[0026] 图 1 为 ELISA 检测标准曲线；

[0027] 图 2 为时间分辨荧光免疫检测标准曲线。

具体实施方式

[0028] 以下结合实施例来进一步解释本发明，但实施例并不对本发明做任何形式的限定。

[0029] 实施例 1 河豚毒素人工抗原的制备

[0030] (1) 免疫原的制备

[0031] TTX-HCHO-KLH 的制备：2.2mg 河豚毒素溶于 3mLPB(0.04M pH7.4)，用注射器取 1mL 的 KLH 溶液（浓度为 10mg/mL），在搅拌下缓慢加入 KLH 溶液，逐滴加入 150uL 的 37wt% 甲醛，室温下避光搅拌反应 72h。每次用 1L 的 PBS(0.05M pH7.0) 4℃透析 48h。抗原经紫外扫描鉴定。

[0032] (2) 包被抗原的制备

[0033] TTX-HCHO-BSA 的制备：1.1mg 河豚毒素溶于 1.5mLPB(0.04M pH7.4)，加入 7.5mgBSA，逐滴加入 60uL 的 37wt% 甲醛，室温下避光搅拌反应 72h。收集反应液，每次用 1L 的 PBS(0.05M pH7.0) 4℃透析 48h。紫外扫描证实透析完全后收集反应液，-20℃保存。

[0034] TTX-HCHO-OVA 的制备：1mg 河豚毒素溶于 1mL PB(0.04M pH7.4)，加入 1mLOVA 溶液（8.3mgOVA 溶于 1mL 0.04M pH7.4PB），逐滴加入 60uL 的 37wt% 甲醛，室温下搅拌避光反应 72h。每次用 1L 的 PBS(0.05M pH7.0)，4℃透析 48h。紫外扫描证实透析完全后收集反应液，-20℃保存。

[0035] 实施例 2 河豚毒素人工抗原的特异性抗体的制备

[0036] (1) 免疫动物

[0037] 首次免疫，取一定量蛋白浓度的免疫抗原（TTX-HCHO-BSA、TTX-HCHO-KLH）加入等体积弗氏完全佐剂，乳化完全，小鼠进行背部皮下及腹腔注射。每只小鼠每次注射 100 μL，含 100 μg 的免疫原（按蛋白含量计算）。以后每两周免疫一次，使用等体积弗氏不完全佐剂乳化。尾部取血检测血清效价。

[0038] 第 2 次免疫后 1 周，用 TTX-HCHO-OVA 作包被抗原，间接 ELISA 法检测 TTX-HCHO-BSA 免疫小鼠抗血清抗体效价，TTX-HCHO-KLH 免疫鼠用 TTX-HCHO-OVA 或 TTX-HCHO-BSA 作包被抗原检测。以后每隔 2 周检测 1 次。

[0039] 抗血清经间接酶联免疫吸附法（iELISA）以及间接竞争酶联免疫吸附法（icELIA）检测其效价、特异性、稳定性。结果可知，抗血清效价高于 1：32,000，并具有很好的特异性、稳定性。

[0040] (2) 制备抗河豚毒素单克隆抗体

[0041] 取特异性高的小鼠脾细胞进行融合获得细胞株，大量制备单克隆抗体。单克隆抗体制备具体步骤如下：

[0042] 1) 选效价值高的 KLH-TTX 免疫 Balb/c 小鼠，摘除眼球放血，分离阳性血清供检测

抗体用,并拉颈脱臼处死小鼠,浸泡于75wt%酒精中,随即放入超净台内。用无菌手术开腹,取出脾脏,放入已盛有基础培养液的平皿中洗一次,细心剥去周围结缔组织;

[0043] 2) 将脾脏移入另一盛有基础培养液平皿的不锈钢网筛中,用剪刀把脾脏剪成小块,用注射器针柱研磨脾脏小块,反复至脾细胞洗出;

[0044] 3) 将脾细胞溶液转至 50mL 离心管,1000r/min 离心 8min,将上清液尽量弃去;

[0045] 4) 加入 5mL 0.91wt%冰冷的氯化铵溶液,在冰浴条件下作用 5min,破坏脾脏细胞释放的红细胞,加入基础培养液稀释氯化铵,1000r/min 离心 8min,将上清液尽量弃去。基础培养液重悬脾细胞;

[0046] 5) 取脾细胞悬液,加台盼兰染液作活细胞计数后备用;

[0047] 6) 分别吸取含脾细胞和骨髓瘤细胞的悬浮液,加入 50mL 离心管中,补加不完全培养液,充分混匀;

[0048] 7) 1000r/min 离心 8min,将上清液尽量弃去。轻轻弹击管底,使沉淀细胞松散均匀成糊状;

[0049] 8) 一手均匀转动离心管,另一手用 1mL 吸管吸取 50% PEG 溶液沿转动的管壁(尽量接近细胞处)加入,从加入到加完的时间控制在 60s 左右,然后立即将细胞悬液全部吸入吸管,静置 30s,再将其吹入离心管内;

[0050] 9) 立即在 5min 内加入不完全培养液使 PEG 稀释而失去促融作用;

[0051] 10) 1000r/min 离心 8min,弃去上清;

[0052] 11) 加入 HAT 培养液,轻轻吹吸沉淀的细胞,使其悬浮并混匀;

[0053] 12) 将细胞悬液加入铺有饲养细胞的 24 孔培养板中,每孔 0.5mL,培养板置 37℃,含 5% CO₂ 的培养箱内培养;

[0054] 13) 将融合后的细胞悬浮于 HAT 培养液中置 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱内培养,按一定时间间隔更换培养液(一般首次换液在融合后 4d,以后根据情况每 3~4d 更换培养液一次)。换液时吸去 1/2 培养液,加入等量新鲜培养液。所用的培养液应按培养的时间不同而有所不同:在融合后 7d 内用 HAT 培养液;第 7~14d 用 HT 培养液,第 14d 以后用普通的完全培养液。并观测细胞的生长情况

[0055] 14) 采用间接 ELISA 方法检测抗体:

[0056] 包被抗原:用包被液将包被抗原 TTX-OVA 稀释至 0.5 μg/mL,每孔加 100 μL,4℃过夜,然后弃去孔内的液体。

[0057] 封闭:5%脱脂奶粉,每孔加 200 μL,37℃温育 2h,洗涤,拍干。

[0058] 加培养上清液:将上清液顺序加入,每孔 100 μL;每块板同时设空白对照、阴性对照和阳性对照各 2 孔。37℃水浴 1h,洗涤、拍干。

[0059] 加酶标第二抗体:用稀释液将酶标二抗体稀释(1:10000),每孔加 100 μL,置 37℃水浴 1h,洗涤、拍干。

[0060] 加底物液:各孔加新鲜配置的显色液各 100 μL,37℃水浴 15min。

[0061] 终止反应:每孔加终止液 50 μL。

[0062] 测定 OD₄₅₀ 值。

[0063] 判定结果:阴性对照孔(阴性血清),阳性对照孔(免疫鼠抗血清)。测定 OD 值,若待测孔 OD 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍,即为阳性。

[0064] 15) 采用有限稀释法进行阳性杂交瘤细胞的克隆化,将细胞克隆悬液连续稀释至统计上每孔加样仅含单个细胞,接种到培养板中,就可由此单个细胞繁殖形成同源性的细胞克隆。

[0065] 16) 采用动物体内诱生单克隆抗体的方法

[0066] 取健康 Balb/c 雌性小鼠 5 只,每只腹腔注射 0.5mL 液体石蜡,1~2 周后备用。将培养的阳性克隆杂交瘤细胞吹下来,1000rpm 离心 10min,弃上清液,收集细胞。用不完全培养基将细胞悬浮,混匀,并将细胞数调至 2×10^6 个/mL,每只预处理的小鼠腹腔注射 0.5mL 阳性克隆杂交瘤细胞;7~9d 后收集腹水,3000rpm 离心 10min,弃脂肪层和细胞层,收集中间澄清层,小管分装,-20℃ 冻存。

[0067] 17) 辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水

[0068] ①预处理过的腹水中加入等体积 0.06mol/L pH5.0 的醋酸缓冲液;

[0069] ②于室温搅拌下 30min 内逐滴缓慢加入辛酸,每毫升稀释前腹水加 33 μ L,4℃ 静置 2h,12000rpm 离心 30min,弃沉淀;

[0070] ③上清经滤纸过滤,加入 1/10 体积的 0.01mol/L PBS;调 pH 至 7.4;

[0071] ④在 4℃ 水浴下 30min 内加入 0.277g/ml 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,使成 45% 的饱和度,静置过夜。4℃ 下 10000rpm 离心 30min,弃上清;

[0072] ⑤沉淀溶于适量 pH7.4PBS 中,于 4℃ 1LPBS 中透析。用 BaCl_2 检测透析是否完全;

[0073] ⑥透析完全,收集蛋白溶液于 4℃ 下 10000rpm 离心 30min,除去不溶性沉渣。获得的抗河豚毒素单克隆抗体小管分装,保存于 -20℃。

[0074] 实施例 3 河豚毒素的快速检测

[0075] (1) 间接竞争时间分辨荧光免疫分析法

[0076] Eu^{3+} 标羊抗鼠抗体的制备与纯化:50 μ L(20mg/mL) 的羊抗鼠二抗加入含 250 μ L(1mg/mL) 的 $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-}[\beta\text{-异氰酸-苄基}]\text{-二乙烯三胺四乙酸}(\text{Eu}^{3+}\text{-DTTA})$ 的小瓶中,再加入 200 μ L A 液,调 pH9.5,轻轻摇动,室温下避光反应 18h。反应液经用 50mmol/L Tris-HCl pH7.6 缓冲液平衡的 Sephadex G25 柱 (1 \times 40cm) 层析, A_{280} 监测收集蛋白峰。

[0077] 记录收集第一个峰为铕标记羊抗鼠二抗,第二个峰为铕试剂的螯合物。每管收集产物 1mL,各管取 5 μ L 于 96 孔空的酶标板中,加入荧光增强液 200 μ L,室温振荡 5min 后测荧光值,以荧光值为纵坐标,管标号为横坐标,绘制曲线。测出 Eu^{3+} 标羊抗鼠二抗的最佳稀释度。

[0078] 将 TTX-OVA 以包被缓冲液稀释成合适的包被浓度,每孔加 100 μ L,室温振荡 20min 后置于 4℃ 冰箱过夜,次日甩干板条,以 5wt% 脱脂奶粉封闭液 200 μ L,37℃ 封闭 2h,洗板 6 次,于无尘吸水纸上拍干,分别加入 TTX 系列标准品 50 μ L,然后加抗河豚毒素特异性抗体 50 μ L,37℃ 1h,洗板 6 次, Eu^{3+} 标羊抗鼠抗体稀释成合适浓度,每孔 100 μ L,37℃ 1h,洗板 6 次拍干,加增强液 200 μ L,振荡 5min,测荧光值作曲线。

[0079] (2) 直接竞争时间分辨荧光免疫分析法

[0080] Eu^{3+} 标抗河豚毒素单克隆抗体的制备与纯化:100 μ L(6mg/mL) 的抗河豚毒素单克隆抗体加入含 200 μ L(1mg/mL) 的 $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-}[\beta\text{-异氰酸-苄基}]\text{-二乙烯三胺四乙酸}(\text{Eu}^{3+}\text{-DTTA})$ 的小瓶中,再加入 200 μ L A 液,调 pH9.5,轻轻摇动,室温下避光反应 18h。反应液经用 50mmol/L Tris-HCl pH7.6 缓冲液平衡的 Sephadex G25 柱 (1 \times 40cm) 层析, A_{280} 监

测收集蛋白峰。记录收集第一个峰为铕标记抗河豚毒素单克隆抗体,第二个峰为铕试剂的螯合物。每管收集产物 1mL,各管取 5 μ L 于 96 孔空的酶标板中,加入荧光增强液 200 μ L,室温振荡 5min 后测荧光值,以荧光值为纵坐标,管标号为横坐标,绘制曲线。测出 Eu^{3+} 标抗河豚毒素单克隆抗体的最佳稀释度。

[0081] 将 TTX-OVA 以包被缓冲液稀释成合适的包被浓度,每孔加 100 μ L,室温振荡 20min 后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,次日甩干板条,以 5wt% 脱脂奶粉封闭液 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,洗板 6 次,于无尘吸水纸上拍干,分别加入 TTX 系列标准品 50 μ L,然后加 Eu^{3+} 标抗河豚毒素特异性抗体 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 1h,洗板 6 次拍干,加增强液 200 μ L,振荡 5min,测荧光值作曲线。

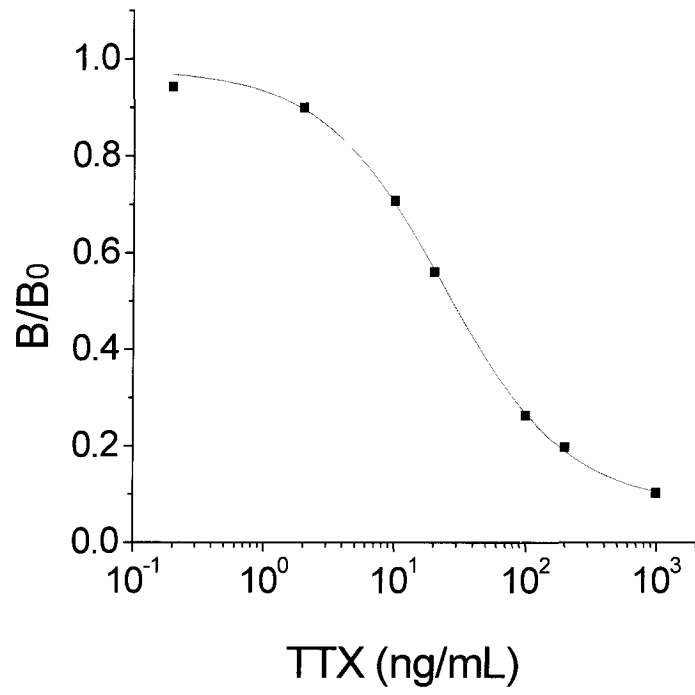


图 1

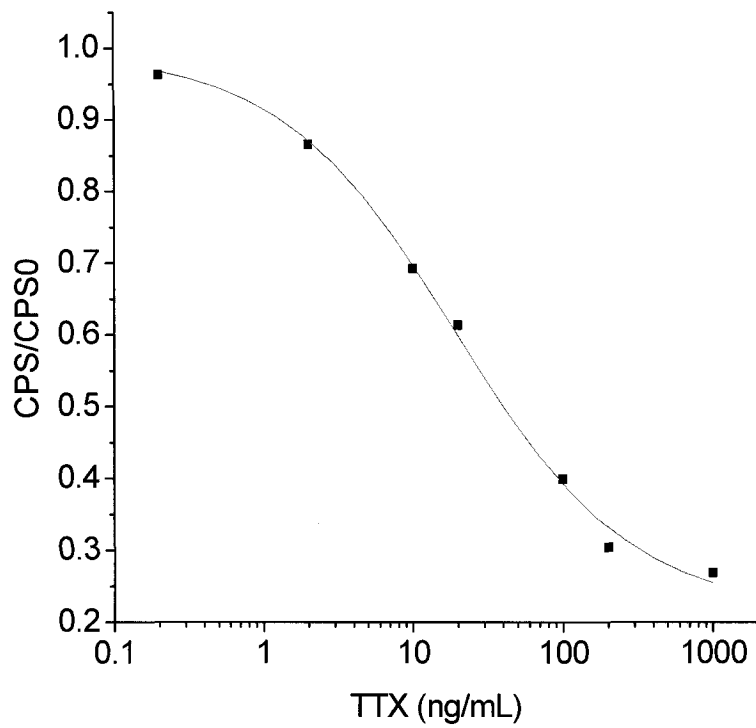


图 2

专利名称(译)	一种河豚毒素的人工抗原、相应的特异性抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101781365A	公开(公告)日	2010-07-21
申请号	CN201010105939.6	申请日	2010-01-29
[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	雷红涛 钟青萍 刘燕婷 张挺 孙远明 余海虎		
发明人	雷红涛 钟青萍 刘燕婷 张挺 孙远明 余海虎		
IPC分类号	C07K14/435 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/533 C07D491/22		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种河豚毒素的人工抗原、相应的特异性抗体及其制备方法与应用。本发明河豚毒素的人工抗原中，河豚毒素与载体蛋白的质量比为1:10。本发明将河豚毒素通过曼尼希法和蛋白载体偶联制备人工抗原，将人工抗原免疫动物来制备特异性抗体。本发明针对河豚毒素的人工抗原的特异性抗体可以用于河豚毒素的提取纯化，还可用于建立时间分辨荧光免疫分析法或酶联免疫吸附法来快速、灵敏地检测河豚毒素。

