



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108341867 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201810116100.9

(22)申请日 2018.02.06

(71)申请人 上海蓝怡科技股份有限公司
地址 201199 上海市闵行区友东路85号
申请人 浙江蓝怡医药有限公司

(72)发明人 李子樵 康绍乐

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51) Int. Cl.

C07K 16/00(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种生物素化抗体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供一种生物素化抗体及其制备方法和应用,所述制备方法包括以下步骤:制备待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入生物素溶液,进行反应;将反应后的体系在缓冲液中进行渗析,而后进行纯化处理,得到所述生物素化抗体。本发明制备的生物素化抗体可以显著增加免疫检测的灵敏度和信号强度,并且本方法操作简单,易于完成且不会引入其他不确定因素,对免疫检测试剂盒质量的提高有可预见的作用,具有广阔的应用前景。

1. 一种生物素化抗体的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 制备待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

(2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入生物素溶液,进行反应;

(3) 将步骤(2)反应后的体系在缓冲液中进行渗析,而后进行纯化处理,得到所述生物素化抗体。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述制备待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系的方法为:使用缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至0.5-2mg/mL,而后在缓冲液中渗析得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述缓冲液为碳酸盐缓冲液;

优选地,使用缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至0.1mg/mL;

优选地,所述碳酸盐缓冲液的pH值为8.0-8.5;

优选地,所述碳酸盐缓冲液中溶质的浓度为0.02-0.2mol/L。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的制备方法,其特征在于,所述渗析时的温度为2-10℃;

优选地,所述渗析每2-6小时更换一次渗析缓冲液,渗析12-48小时后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

优选地,步骤(1)所述待生物素化的抗体蛋白为鼠抗人IgE抗体。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述生物素溶液为N-羧基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液;

优选地,所述生物素溶液的浓度为0.5-2mg/mL,优选1mg/mL;

优选地,步骤(2)中,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的生物素溶液的体积为50-200μL。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述反应的温度为2-10℃;

优选地,步骤(2)所述反应在搅拌下进行;

优选地,步骤(2)所述反应的时间为1-8小时。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述缓冲液与步骤(1)和步骤(2)的缓冲液相同,均为碳酸盐缓冲液;

优选地,步骤(3)所述渗析的温度为2-10℃;

优选地,步骤(3)所述渗析每2-6小时更换一次渗析缓冲液,渗析12-48小时后,进行纯化处理;

优选地,所述纯化处理为柱层析纯化;

优选地,所述柱层析纯化的方法为:将步骤(3)渗析后的样品加于Sephadex G-25层析柱上,使用含有1%BSA的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到纯化的生物素化抗体;

优选地,所述PBS缓冲液的pH为6.8-7.4;

优选地,所述PBS缓冲液中溶质的浓度为0.02-0.2mol/L;

优选地,在步骤(3)纯化后的生物素化抗体中加入0.1%叠氮化钠,4℃保存备用。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步

骤:

(1) 使用溶质的浓度为0.02-0.2mol/L、pH值为8.0-8.5的碳酸盐缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至0.5-2mg/mL,而后在所述碳酸盐缓冲液中于4-10℃下渗析,每2-6小时更换一次渗析缓冲液,渗析12-48小时后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

(2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入浓度为0.5-2mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的生物素溶液的体积为50-200 μ L,4-10℃下反应1-8小时;

(3) 将步骤(2)反应后的体系在所述碳酸盐缓冲液中于4-10℃下渗析,每2-6小时更换一次渗析缓冲液,渗析12-48小时后,将渗析后的样品加于Sephadex G-25层析柱上,使用含有1%BSA的溶质浓度为0.02-0.2mol/L、pH为6.8-7.4的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到所述生物素化抗体。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的制备方法制备得到的生物素化抗体。

10. 根据权利要求9所述的生物素化抗体在制备免疫检测试剂或免疫检测试剂盒中的应用。

一种生物素化抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物材料技术领域,涉及一种生物素化抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 由于细胞因子在体内含量甚微,对其进行检索面临这一定困难,目前主要应用的检测方法主要有三类,即生物学方法、免疫学方法和核酸检测法,其中生物学方法和核酸检测方法虽然灵敏度较高,但实验操作繁琐复杂,所需实验条件较为严苛,而免疫学方法以其方法简单、操作容易、不需要复杂仪器,一次可检索多个样品而深受欢迎,然而普通的ELISA方法敏感性较低,达不到检测要求。

[0003] 因此,在本领域中如何进一步提高检测的灵敏度是解决问题的关键,期望开发出一种能够提高检测灵敏度并且不引入其他不确定因素的生物素化抗体以解决所述技术问题。

发明内容

[0004] 针对现有技术的问题,本发明的目的在于提供一种生物素化抗体及其制备方法和应用。本发明生物素化抗体的制备方法可以使得制备得到的生物素化抗体应用于免疫检测时增强信号强度,提高检测的灵敏度,且不会引入其他不确定因素,对免疫检测试剂盒质量的提高有可预见的作用。

[0005] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 一方面,本发明提供一种生物素化抗体的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0007] (1) 制备待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

[0008] (2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入生物素溶液,进行反应;

[0009] (3) 将步骤(2)反应后的体系在缓冲液中进行渗析,而后进行纯化处理,得到所述生物素化抗体。

[0010] 在本发明中利用所述制备方法可以制备出一种应用于免疫检测的生物素化抗体,抗体经过生物素化后利用生物素-链霉亲和素放大系统,与抗原抗体系统相比可以使连接强度增加100倍以上,显著增加免疫检测的灵敏度和信号强度,并且本方法操作简单,易于完成且不会引入其他不确定因素,对免疫检测试剂盒质量的提高有可预见的作用。

[0011] 优选地,步骤(1)所述制备待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系的方法为:使用缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至0.5-2mg/mL,而后在缓冲液中渗析得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系。

[0012] 优选地,所述缓冲液为碳酸盐缓冲液。

[0013] 在本发明中,使用缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至0.5-2mg/mL,例如0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.1mg/mL、1.2mg/mL、1.3mg/mL、1.4mg/mL、1.5mg/mL、1.6mg/mL、1.7mg/mL、1.8mg/mL、1.9mg/mL或2.0mg/mL,优选1mg/mL。

[0014] 在本发明中,所述碳酸盐缓冲液的pH值为8.0-8.5,例如8.0、8.1、8.2、8.3、8.4或8.5。

[0015] 在本发明中,所述碳酸盐缓冲液中溶质的浓度为0.02-0.2mol/L,例如0.02mol/L、0.04mol/L、0.06mol/L、0.08mol/L、0.1mol/L、0.12mol/L、0.14mol/L、0.16mol/L、0.18mol/L或0.2mol/L。

[0016] 优选地,所述渗析时的温度为2-10℃,例如2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃或10℃。在本发明中,渗析需要在较低温度下进行,从而为后续反应提供一个温和的反应环境,并且低温有助于蛋白质的稳定,高温会降低蛋白质性能,对制备得到的生物素化抗体的性能以及应用效果产生不利影响或者失去应用效果。

[0017] 优选地,所述渗析每2-6小时(例如2小时、3小时、4小时、5小时或6小时)更换一次渗析缓冲液,渗析12-48小时(例如12小时、15小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、33小时、36小时、38小时、40小时、44小时或48小时)后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系。

[0018] 优选地,步骤(1)所述待生物素化的抗体蛋白为鼠抗人IgE抗体。

[0019] 优选地,步骤(2)所述生物素溶液为N-羟基琥珀酰亚胺生物素(NHSB)的二甲亚砜(DMSO)溶液。

[0020] 优选地,所述生物素溶液的浓度为0.5-2mg/mL,例如0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.1mg/mL、1.2mg/mL、1.3mg/mL、1.4mg/mL、1.5mg/mL、1.6mg/mL、1.7mg/mL、1.8mg/mL、1.9mg/mL或2.0mg/mL,优选1mg/mL。

[0021] 优选地,步骤(2)中,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的生物素溶液的体积为50-200 μ L,例如50 μ L、60 μ L、70 μ L、80 μ L、90 μ L、100 μ L、110 μ L、120 μ L、130 μ L、140 μ L、150 μ L、160 μ L、170 μ L、180 μ L、190 μ L或200 μ L。

[0022] 优选地,步骤(2)所述反应的温度为2-10℃,例如2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃或10℃。在本发明中步骤(2)所述反应需要在低温下进行,以在完成生物素化的同时保证抗体蛋白的活性,避免对生物素化抗体的应用效果产生不利影响。

[0023] 优选地,步骤(2)所述反应在搅拌下进行。

[0024] 优选地,步骤(2)所述反应的时间为1-8小时,例如1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、4.5小时、5小时、5.5小时、6小时、6.5小时、7小时、7.5小时或8小时。

[0025] 在本发明中,步骤(3)所述缓冲液与步骤(1)和步骤(2)的缓冲液相同,均为碳酸盐缓冲液。

[0026] 优选地,步骤(3)所述渗析的温度为2-10℃,例如2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃或10℃。

[0027] 优选地,步骤(3)所述渗析每2-6小时(例如2小时、3小时、4小时、5小时或6小时)更换一次渗析缓冲液,渗析12-48小时(例如12小时、15小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、33小时、36小时、38小时、40小时、44小时或48小时)后,进行纯化处理。

[0028] 优选地,所述纯化处理为柱层析纯化。

[0029] 优选地,所述柱层析纯化的方法为:将步骤(3)渗析后的样品加于Sephadex G-25

层析柱上,使用含有1%BSA(牛血清白蛋白)的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到纯化的生物素化抗体。

[0030] 优选地,所述PBS缓冲液的pH为6.8-7.4,例如6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3或7.4。

[0031] 优选地,所述PBS缓冲液中溶质的浓度为0.02-0.2mol/L,例如0.02mol/L、0.04mol/L、0.06mol/L、0.08mol/L、0.1mol/L、0.12mol/L、0.14mol/L、0.16mol/L、0.18mol/L或0.2mol/L。

[0032] 在本发明中,在步骤(3)纯化后的生物素化抗体中加入0.1%叠氮化钠,4℃保存备用。

[0033] 作为本发明的优选技术方案,所述生物素化抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0034] (1) 使用溶质的浓度为0.02-0.2mol/L、pH值为8.0-8.5的碳酸盐缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至0.5-2mg/mL,然后在所述碳酸盐缓冲液中于4-10℃下渗析,每2-6小时更换一次渗析缓冲液,渗析12-48小时后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

[0035] (2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入浓度为0.5-2mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的生物素溶液的体积为50-200μL,4-10℃下反应1-8小时;

[0036] (3) 将步骤(2)反应后的体系在所述碳酸盐缓冲液中于4-10℃下渗析,每2-6小时更换一次渗析缓冲液,渗析12-48小时后,将渗析后的样品加于Sephadex G-25层析柱上,使用含有1%BSA的溶质浓度为0.02-0.2mol/L、pH为6.8-7.4的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到所述生物素化抗体。

[0037] 第二方面,本发明提供了如上所述制备方法制备得到的生物素化抗体。

[0038] 第三方面,本发明提供了如上所述生物素化抗体在制备免疫检测试剂或免疫检测试剂盒中的应用。

[0039] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0040] 在本发明中利用所述制备方法可以制备出一种应用于免疫检测的生物素化抗体,抗体经过生物素化后利用生物素-链霉亲和素放大系统,与抗原抗体系统相比可以使连接强度增加100倍以上,显著增加免疫检测的灵敏度和信号强度,并且本方法操作简单,易于完成且不会引入其他不确定因素,对免疫检测试剂盒质量的提高有可预见的作用,具有广阔的应用前景。

具体实施方式

[0041] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0042] 实施例1

[0043] 在本实施例中,提供一种生物素化抗体的制备方法,具体包括以下步骤:

[0044] (1) 使用溶质的浓度为0.1mol/L、pH值为8.3的碳酸盐缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至1mg/mL,然后在所述碳酸盐缓冲液中于4℃下渗析,每8小时更换一次渗析缓冲液,渗析40小时后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

[0045] (2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入浓度为1mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的

生物素溶液的体积为100 μ L,4 $^{\circ}$ C下反应4小时;

[0046] (3) 将步骤(2)反应后的体系在所述碳酸盐缓冲液中于4 $^{\circ}$ C下渗析,每8小时更换一次渗析缓冲液,渗析40小时后,将渗析后的样品加于SephadexG-25层析柱上,使用含有1%BSA的溶质浓度为0.1mol/L、pH为7.4的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到所述生物素化抗体。

[0047] 实施例2

[0048] 在本实施例中,提供一种生物素化抗体的制备方法,具体包括以下步骤:

[0049] (1) 使用溶质的浓度为0.05mol/L、pH值为8.0的碳酸盐缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至1.5mg/mL,而后在所述碳酸盐缓冲液中于8 $^{\circ}$ C下渗析,每6小时更换一次渗析缓冲液,渗析24小时后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

[0050] (2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入浓度为1.5mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的生物素溶液的体积为150 μ L,8 $^{\circ}$ C下反应6小时;

[0051] (3) 将步骤(2)反应后的体系在所述碳酸盐缓冲液中于8 $^{\circ}$ C下渗析,每6小时更换一次渗析缓冲液,渗析24小时后,将渗析后的样品加于Sephadex G-25层析柱上,使用含有1%BSA的溶质浓度为0.1mol/L、pH为7.4的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到所述生物素化抗体。

[0052] 实施例3

[0053] 在本实施例中,提供一种生物素化抗体的制备方法,具体包括以下步骤:

[0054] (1) 使用溶质的浓度为0.2mol/L、pH值为8.5的碳酸盐缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至2mg/mL,而后在所述碳酸盐缓冲液中于10 $^{\circ}$ C下渗析,每4小时更换一次渗析缓冲液,渗析12小时后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

[0055] (2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入浓度为1.0mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的生物素溶液的体积为50 μ L,10 $^{\circ}$ C下反应1小时;

[0056] (3) 将步骤(2)反应后的体系在所述碳酸盐缓冲液中于10 $^{\circ}$ C下渗析,每4小时更换一次渗析缓冲液,渗析20小时后,将渗析后的样品加于SephadexG-25层析柱上,使用含有1%BSA的溶质浓度为0.1mol/L、pH为7.0的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到所述生物素化抗体。

[0057] 实施例4

[0058] 在本实施例中,提供一种生物素化抗体的制备方法,具体包括以下步骤:

[0059] (1) 使用溶质的浓度为0.02mol/L、pH值为8.4的碳酸盐缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至2mg/mL,而后在所述碳酸盐缓冲液中于6 $^{\circ}$ C下渗析,每2小时更换一次渗析缓冲液,渗析12小时后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

[0060] (2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入浓度为0.5mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的生物素溶液的体积为200 μ L,6 $^{\circ}$ C下反应6小时;

[0061] (3) 将步骤(2)反应后的体系在所述碳酸盐缓冲液中于6 $^{\circ}$ C下渗析,每6小时更换一次渗析缓冲液,渗析48小时后,将步骤(3)渗析后的样品加于Sephadex G-25层析柱上,使用

含有1%BSA的溶质浓度为0.02mol/L、pH为6.8的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到所述生物素化抗体。

[0062] 实施例5

[0063] 在本实施例中,提供一种生物素化抗体的制备方法,具体包括以下步骤:

[0064] (1) 使用溶质的浓度为0.2mol/L、pH值为8.3的碳酸盐缓冲液将待生物素化的抗体蛋白稀释至0.5mg/mL,然后在所述碳酸盐缓冲液中于2℃下渗析,每5小时更换一次渗析缓冲液,渗析20小时后得到所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系;

[0065] (2) 向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入浓度为1mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,相对于1mL所述待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系,加入的生物素溶液的体积为50 μ L,4℃下反应8小时;

[0066] (3) 将步骤(2)反应后的体系在所述碳酸盐缓冲液中于2℃下渗析,每5小时更换一次渗析缓冲液,渗析20小时后,将渗析后的样品加于Sephadex G-25层析柱上,使用含有1%BSA的溶质浓度为0.2mol/L、pH为7.2的PBS缓冲液洗脱,收集第一洗脱峰洗脱液,得到所述生物素化抗体。

[0067] 本发明通过上述实施例来说明本发明的生物素化抗体及其制备方法和应用,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

专利名称(译)	一种生物素化抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108341867A	公开(公告)日	2018-07-31
申请号	CN201810116100.9	申请日	2018-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技有限公司 浙江蓝怡医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技股份有限公司 浙江蓝怡医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技股份有限公司 浙江蓝怡医药有限公司		
[标]发明人	李子樵 康绍乐		
发明人	李子樵 康绍乐		
IPC分类号	C07K16/00 C07K1/107 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/00 C07K1/1077 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种生物素化抗体及其制备方法和应用，所述制备方法包括以下步骤：制备待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系；向待生物素化的抗体蛋白的缓冲液体系中加入生物素溶液，进行反应；将反应后的体系在缓冲液中进行渗析，而后进行纯化处理，得到所述生物素化抗体。本发明制备的生物素化抗体可以显著增加免疫检测的灵敏度和信号强度，并且本方法操作简单，易于完成且不会引入其他不确定因素，对免疫检测试剂盒质量的提高有可预见的作用，具有广阔的应用前景。