



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101980020 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 23

(21) 申请号 201010284339. 0

(22) 申请日 2010. 09. 17

(71) 申请人 颜世敢

地址 250100 山东省济南市历城区桑园路
10 号

(72) 发明人 朱丽萍 颜世敢 颜士勇

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

C07K 14/405(2006. 01)

C07K 1/18(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种 R-藻蓝蛋白标记的荧光抗抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种 R-藻蓝蛋白(R-phycocyanin, RPC) 标记的荧光抗抗体的制备方法。制备过程为:阴离子交换层析法制备 RPC, 分别用摩尔比 20-30 : 1、50-100 : 1 的双功能化学交联剂 SPDP 将 RPC、抗抗体衍生, 衍生物以适宜摩尔比液相交联, 经高压液相色谱纯化制备出 RPC 标记的荧光抗抗体。本法制备的 RPC 标记的荧光抗抗体交联效率高, 纯度达电泳纯, 红色荧光明亮, 荧光抗体活性稳定, 可作为通用荧光探针用于动物传染病的间接免疫荧光检测。

1. 一种 R-藻蓝蛋白(RPC)标记的荧光抗抗体的制备方法,包括:阴离子交换层析法制备多管藻 RPC,分别用摩尔比 20-30 : 1、50-100 : 1 的交联剂 SPDP 将 RPC、抗抗体衍生,抗抗体的 SPDP 衍生物经摩尔比 50-100 : 1 的 DTT 还原获得带 -HS 的抗抗体,带 -HS 的抗抗体与 RPC 的衍生物以摩尔比 1 : 2-3 液相交联,经 HPLC 纯化制备出荧光抗抗体,制备的荧光抗抗体得率高、纯度高、稳定性好、荧光呈明亮的红色,可作为通用荧光探针用于鸡、猪传染病的间接免疫荧光检测。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中 RPC 的制备由多管藻中采用阴离子交换层析法分离纯化,纯化步骤为:取冷冻保存的多管藻,加入 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8),4℃下溶胀 24h,多层纱布过滤、挤压获得褐色浸提液,然后加入固体硫酸铵至浓度为 60% (w/v),4℃放置 24h,离心收集沉淀,将沉淀溶于 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 中,然后对 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 透析,透析液加到用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) (含 50mM NaCl) 预平衡过的阴离子交换柱,用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) 冲洗掉阴离子交换柱上过量的样品和杂质,用 20mM 醋酸缓冲液 (pH4.8) (含 50mM NaCl) 一步洗脱就可得到大量纯的 RPC,纯化的多管藻 RPC 纯度达电泳纯,纯度指数 $A_{620}/A_{280} > 4.5$,结构式为 $(\alpha\beta)_3$,分子量约为 110kDa,最大吸收峰分别位于 540、620nm,室温荧光发射峰位于 640nm,纯化的 RPC 硫酸铵沉淀 4℃避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 5mg/mL。

3. 根据权利要求 1 的方法,其中抗抗体为抗鸡 IgG 抗体、抗猪 IgG 抗体,购自 Sigma 公司,电泳检测纯度达电泳纯,对流免疫电泳法检测抗抗体具有良好的生物学活性,标记时用 PBS 透析,调整蛋白浓度为 5mg/ml。

4. 根据权利要求 1 的方法,其中荧光抗抗体的制备采用蛋白质交联技术在液相体系中化学交联制备,制备方法为:以 DMSO 准确配制 SPDP 母液,分别用双功能化学交联剂 SPDP 衍生 RPC、抗抗体,SPDP 与 RPC、抗抗体的摩尔比分别为 20-30 : 1、30-60 : 1,混匀、铝箔封好后于室温旋转反应 2h,超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 30-60 : 1 的摩尔比与抗抗体衍生物充分混匀,室温静置反应 1h,超滤离心除去多余的 DTT,抗抗体 -HS 与 RPC 衍生物以摩尔比 1 : 2-3 混匀,铝箔封好后于 20-25℃振荡反应 20h,加 NEM 封闭多余巯基,室温旋转反应 60min。

5. 根据权利要求 1 的方法,其中荧光抗抗体经 HPLC 纯化,纯化在液相色谱工作站上进行,液相柱型号 TSK G3000sw (规格 7.5mm×60cm),流动相为 50mM pH 7.5PBS,流速 0.5ml/min,检测波长 190-800nm,收集洗脱 19.57min 出现的产物峰,置 4℃避光保存。

一种 R-藻蓝蛋白标记的荧光抗抗体的制备方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种 R-藻蓝蛋白(R-phyococyanin, RPC) 标记的荧光抗抗体的制备方法,属于免疫荧光检测领域。

技术背景

[0002] 免疫荧光检测法是一种历史悠久的标记分析法,兼具有抗原、抗体反应的特异性及荧光检测的灵敏性,广泛应用于疾病检测和生物科学研究中。免疫荧光检测法的特异性和敏感性依赖于荧光染料、抗体及荧光探针的属性和质量。在实际应用时,由于血清和其他生物样品发射波长为 400 ~ 600nm 的本底荧光,与常用的 FITC 等传统荧光染料的荧光发射光谱重叠,严重降低荧光检测的灵敏度,造成一段时期内免疫荧光检测法发展缓慢。

[0003] 多管藻是生长在我国沿海地区潮间带的特有海洋红藻,含有大量的 R-藻蓝蛋白,是提取 R-藻蓝蛋白的比较理想的试材。R-藻蓝蛋白的稳定态为 $(\alpha\beta)_3$,分子量约为 104.9kDa,是唯一同时含有 PEB 和 PCB 的藻胆蛋白。多管藻 RPC 有 2 个吸收峰,最大吸收峰分别位于 540、620nm。540nm 激发光激发时室温最大荧光发射峰位于 632nm。与传统的荧光染料相比,RPC 具有水溶性、无毒性、摩尔消光系数大、荧光量子产率高、斯托克位移大、发射红色荧光、背景光干扰小、不易淬灭等特点,因而是一类优秀的荧光染料。

[0004] RPC 用于免疫荧光检测需要将其与抗体或抗抗体交联制备荧光探针,RPC 与抗体交联得率低,造成 RPC 荧光标记物生产成本居高不下,成为限制其应用的瓶颈因素。本发明选择温和型的异型双功能化学交联剂 SPDP 将 RPC 与抗抗体液相化学交联制备通用型荧光抗抗体,通过优化交联剂浓度既保证了交联效率又不影响荧光亮度和抗体活性,成功制备出 RPC 标记的荧光二抗,可方便地用于传染病病原的间接免疫荧光检测,省去了直接免疫荧光检测时需要针对每种病原的抗体制备荧光标记抗体的麻烦,同时采用标记的抗抗体作为信号放大系统,还能提高免疫荧光检测的灵敏度。目前国内外尚没有 RPC 应用到动物疫病检测中的报道。

发明内容

[0005] 本发明涉及一种 R-藻蓝蛋白(RPC) 标记的荧光抗抗体的制备方法。

[0006] 本发明采用的 R-藻蓝蛋白(RPC) 是纯化自多管藻的典型的二峰型藻蓝蛋白,是唯一同时含有 PEB 和 PCB 的藻胆蛋白,具有无毒性、水溶性大、荧光明亮且不易淬灭等特点。RPC 的组成和晶体结构特点决定了低稳定性,因此在蛋白质交联是控制交联剂的浓度是关键,浓度过高会造成 RPC 的变性和荧光丧失,浓度过低则交联效率降低。

[0007] 本发明的解决方案如下：

[0008] RPC 的制备:RPC 的制备由多管藻中采用阴离子交换层析法分离纯化,纯化过程为:取冷冻保存的多管藻,加入 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8),4℃下溶胀 24h,多层纱布过滤、挤压获得褐色浸提液,然后加入固体硫酸铵至浓度为 60% (w/v),4℃放置 24h,离心收集沉淀,将沉淀溶于 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 中,然后对 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 透

析,透析液加到用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) (含 50mM NaCl) 预平衡过的阴离子交换柱,用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) 冲洗掉阴离子交换柱上过量的 R-藻蓝蛋白,用 20mM 醋酸缓冲液 (pH4.8) (含 50mMNaCl) 一步洗脱就可得到大量纯的 R-藻蓝蛋白,纯化的多管藻 RPC 纯度达电泳纯,纯度指数 $A_{620}/A_{280} > 4.5$,结构式为 $(\alpha\beta)_3$,分子量约为 110kDa,最大吸收峰分别位于 540、620nm,室温荧光发射峰位于 640nm,纯化的 RPC 硫酸铵沉淀 4℃避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 10mg/mL。

[0009] RPC 标记荧光抗抗体的制备:抗抗体为抗鸡 IgG 抗体、抗猪 IgG 抗体,购自 Sigma 公司,标记时用 PBS 透析,调整蛋白浓度为 5mg/ml。RPC 与抗抗体的交联采用蛋白质交联法。利用异型双功能交联剂 SPDP 分别在 RPC、抗抗体上衍生吡啶二硫基团,然后用 DTT 还原抗抗体的衍生物引入游离 -SH,将携带吡啶二硫基的 RPC 与携带巯基的抗抗体按一定摩尔比交联制备荧光抗抗体。以 DMSO 准确配制 SPDP 母液,SPDP 与 RPC、抗抗体的摩尔比分别为 20-30 : 1、50-100 : 1,混匀、铝箔封好后于室温旋转反应 2h,超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 50-100 : 1 的摩尔比与抗抗体衍生物充分混匀,室温静置反应 1h,超滤离心除去多余的 DTT,抗抗体 -HS 与 RPC 衍生物以摩尔比 1 : 2-3 混匀,铝箔封好后于 20-25℃振荡反应 20h。加 NEM 封闭多余巯基,室温旋转反应 60min。

[0010] RPC 标记抗荧光抗抗体的纯化和交联效率分析:液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行荧光抗抗体的交联效率分析和纯化,流动相为 50mM PBS pH 7.5,流速 0.5mL/min,检测波长 190-800nm。采用分子筛高压液相色谱柱纯化,液相柱型号 TSK G3000sw(规格 7.5mm×60cm),荧光标记抗抗体最先被洗脱下来(附图 1)。目标产物的洗脱峰面积占有所有洗脱峰面积的比例即为交联效率。收集各洗脱峰,进行光谱学、抗体活性、电泳检测。

[0011] RPC 标记荧光抗抗体的光谱检测:吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定,扫描波长区间 250-700nm。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,用 540nm 的激发光激发,荧光发射波长扫描范围为 550-700nm,检测步长为 0.2nm,狭缝宽度为 3nm,检测灵敏度为中等,扫描速度为 1000nm/min,每个样品扫描 3 次取平均值,用不含蛋白的相同溶液作背景扣除。在紫外区,RPC 标记荧光抗抗体的吸光度明显高于对照 RPC,吸收峰位置相同,这是因为 RPC 表面交联了抗抗体分子,而抗抗体在 280nm 有较强的光吸收;在 450-700nm 范围内,交联物的吸收光谱与对照 RPC 的吸收峰及吸光度相似,是由于抗抗体在该范围内无光吸收,因而不影响 RPC 的吸收光谱。通过吸收光谱检测可判定交联成功,同时交联反应没有导致 RPC 变性。RPC 标记荧光抗抗体与对照 RPC 在 540nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 632nm,没有发生斯托克位移的改变,仍具有 RPC 的特征荧光发射光谱,且荧光亮度无明显降低。荧光光谱检测结果再次证实 RPC 与抗抗体交联成功。

[0012] RPC 标记荧光抗抗体的效价检测:对流免疫电泳法检测 RPC 标记荧光抗抗体的免疫学活性。RPC 标记荧光抗抗体与动物 IgG 形成青色免疫沉淀线,不用染色就可清晰地观察到沉淀线的位置。免疫沉淀线的形成说明抗抗体与 RPC 交联成功,同时也说明交联反应对抗抗体的免疫学活性影响不大,交联物能够进行抗原抗体反应,仍然保留较高的抗体活性。

[0013] RPC 标记荧光抗抗体的电泳检测:SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%。恒压电泳,电压为 218V。用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后观察结果。SDS-PAGE 电泳发现 RPC 标记荧光抗抗体既具有 RPC 的 α 、 β 亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带(附图 2),证实 RPC 与抗抗体交联成功。

[0014] RPC 标记荧光抗抗体的稳定性检测 :纯化的 RPC 标记荧光抗抗体中加入 0.02%叠氮化钠,4℃避光保存,每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价。RPC 标记的荧光抗抗体稳定性较好,在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃保存 60 天,荧光抗抗体的荧光强度保持不变,抗体效价维持在 5Log 2。

[0015] 综上所述,RPC 标记的通用荧光探针荧光明亮,稳定性好,可用于动物传染病的病原或抗体的间接免疫荧光检测,省去了直接免疫荧光检测时需要针对每种病原的抗体制备荧光标记抗体的麻烦,采用标记抗抗体还能起到信号放大作用。

附图说明

[0016] 附图 1 为 RPC 标记荧光抗抗体的 HPLC 洗脱图。液相柱型号为 TSK G3000sw,流动相为 50mM pH7.5 的 PBS,流速 0.5mL/min,RPC 标记荧光抗抗体、抗抗体、RPC 的洗脱时间为分别为 19.57min、27.32、31.26min。

[0017] 附图 2 为 RPC 标记荧光抗抗体的 SDS-PAGE 电泳。RPC 标记荧光抗抗体既具有 RPE 的 α 、 β 亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带。

[0018] 附图 3 为不同保存时间的 RPC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体的荧光亮度和抗体活性。RPC 标记荧光抗抗体在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃保存 60 天,荧光强度保持不变,随后随着保存时间推移荧光强度缓慢降低。荧光抗抗体 4℃保存 90 天抗体效价维持在 5Log 2,随后抗体效价随保存时间推迟而缓慢降低。

具体实施方式：

[0019] 实施方式 1 :RPC 标记的抗鸡 IgG 荧光抗抗体的制备

[0020] RPC 的分离纯化 :冷冻保存的多管藻加入 6 倍体积的 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8),4℃下溶胀 24h,多层纱布过滤、挤压获得褐色浸提液,然后加入固体硫酸铵至浓度为 60% (w/v),4℃放置 24h,离心收集沉淀,将沉淀溶于 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 中,然后对 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 透析,透析液加到用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) (含 50mM NaCl) 预平衡过的阴离子交换柱,用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) 冲洗掉阴离子交换柱上过量的样品及杂质,用 20mM 醋酸缓冲液 (pH4.8) (含 50mM NaCl) 一步洗脱就可得到大量纯的 RPC,纯化的多管藻 RPC 纯度达电泳纯,纯度指数 $A_{620}/A_{280} > 4.5$,结构式为 $(\alpha \beta)_3$,分子量约为 110kDa,最大吸收峰分别位于 540、620nm,室温荧光发射峰位于 632nm,纯化的 RPC 硫酸铵沉淀 4℃避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 10mg/mL。

[0021] RPC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体的高效制备 :抗鸡 IgG 抗体购自 Sigma 公司,标记时用 PBS 透析,调整蛋白浓度为 5mg/ml。以 DMSO 准确配制 SPDP 母液,SPDP 与 RPC、抗抗体的摩尔比分别为 20 : 1、50 : 1,混匀、铝箔封好后于室温旋转反应 2h,超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 50 : 1 的摩尔比与抗抗体衍生物充分混匀,室温静置反应 1h,超滤离心除去多余的 DTT,抗抗体 -HS 与 RPC 衍生物以摩尔比 1 : 2 混匀,铝箔封好后于 20-25℃振荡反应 20h。加 NEM 封闭多余巯基,室温旋转反应 60min。

[0022] RPC 标记抗鸡 IgG 荧光抗抗体的交联效率分析和高效纯化 :液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行荧光抗抗体的交联效率分析和纯化,流动相为 50mM PBS pH 7.5,流速 0.5mL/min,检测波长 190-800nm。采用分子筛高压液相色谱柱纯化,液相柱型号 TSK

G3000sw (规格 7.5mm×60cm), 荧光标记抗抗体最先被洗脱下来 (附图 1)。收集第一个洗脱峰, 即为纯化的荧光抗抗体。通过计算目标产物的洗脱峰面积与全部洗脱峰面积的比例即交联效率为 88%。

[0023] RPC 标记荧光抗抗体的光谱检测: 吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定, 扫描波长区间 250-700nm。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定, 用 540nm 的激发光激发, 荧光发射波长扫描范围为 550-700nm, 检测步长为 0.2nm, 狭缝宽度为 3nm, 检测灵敏度为中等, 扫描速度为 1000nm/min, 每个样品扫描 3 次取平均值, 用不含蛋白的相同溶液作背景扣除。在紫外区, RPC 标记荧光抗抗体的吸光度明显高于对照 RPC, 吸收峰位置相同, 这是因为 RPC 表面交联了抗抗体分子, 而抗抗体在 280nm 有较强的光吸收; 在 450-700nm 范围内, 交联物的吸收光谱与对照 RPC 的吸收峰及吸光度相似, 是由于抗抗体在该范围内无光吸收, 因而不影响 RPC 的吸收光谱。通过吸收光谱检测可判定交联成功, 同时交联反应没有导致 RPC 变性。RPC 标记荧光抗抗体与对照 RPC 在 540nm 激发光的激发下, 室温荧光发射波长均位于 632nm, 没有发生斯托克位移的改变, 仍具有 RPC 的特征荧光发射光谱, 且荧光亮度无明显降低。荧光光谱检测结果再次证实 RPC 与抗抗体交联成功。

[0024] RPC 标记荧光抗抗体的效价检测: 对流免疫电泳法检测 RPC 标记荧光抗抗体的免疫学活性。RPC 标记荧光抗抗体与鸡 IgG 形成青色免疫沉淀线, 不用染色就可清晰地观察到沉淀线的位置。免疫沉淀线的形成说明抗抗体与 RPC 交联成功, 同时也说明交联反应对抗抗体的免疫学活性影响不大, 交联物能够进行抗原抗体反应, 仍然保留较高的抗体活性。

[0025] RPC 标记荧光抗抗体的电泳检测: SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行, 分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 5%。恒压电泳, 电压为 218V。用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后观察结果。SDS-PAGE 电泳发现 RPC 标记荧光抗抗体既具有 RPC 的 α 、 β 亚基条带, 又具有抗体的 H、L 链条带 (附图 2), 证实 RPC 与抗抗体交联成功。

[0026] RPC 标记荧光抗抗体的稳定性检测: 纯化的 RPC 标记荧光抗抗体中加入 0.02% 叠氮化钠, 4℃ 避光保存, 每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价。RPC 标记的荧光抗抗体稳定性较好, 在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃ 保存 60 天, 荧光抗抗体的荧光强度保持不变, 抗体效价维持在 5Log 2。

[0027] 实施方式 2: RPC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体制备

[0028] RPC 的分离纯化: RPC 的制备由多管藻中采用阴离子交换层析法分离纯化, 取冷冻保存的多管藻, 加入 6 倍体积的 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8), 4℃ 下溶胀 24h, 多层纱布过滤、挤压获得褐色浸提液, 然后加入固体硫酸铵至浓度为 60% (w/v), 4℃ 放置 24h, 离心收集沉淀, 将沉淀溶于 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 中, 然后对 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 透析, 透析液加到用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) (含 50mM NaCl) 预平衡过的阴离子交换柱, 用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) 冲洗掉阴离子交换柱上过量的样品及杂质, 用 20mM 醋酸缓冲液 (pH4.8) (含 50mM NaCl) 一步洗脱就可得到大量纯的 RPC, 纯化的多管藻 RPC 纯度达电泳纯, 纯度指数 $A_{620}/A_{280} > 4.5$, 结构式为 $(\alpha\beta)_3$, 分子量约为 110kDa, 最大吸收峰分别位于 540、620nm, 室温荧光发射峰位于 640nm, 纯化的 RPC 硫酸铵沉淀 4℃ 避光保存, 使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐, 调整浓度为 10mg/mL。

[0029] RPC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的高效制备: 抗猪 IgG 抗体购自 Sigma 公司, 标记时用 PBS 透析, 调整蛋白浓度为 5mg/ml。以 DMSO 准确配制 SPDP 母液, SPDP 与 RPC、抗抗体的

摩尔比分别为 30 : 1、100 : 1,混匀、铝箔封好后于室温旋转反应 2h,超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 100 : 1 的摩尔比与抗抗体衍生物充分混匀,室温静置反应 1h,超滤离心除去多余的 DTT,抗抗体 -HS 与 RPC 衍生物以摩尔比 1 : 3 混匀,铝箔封好后于 20-25℃振荡反应 20h。加 NEM 封闭多余巯基,室温旋转反应 60min。

[0030] RPC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的交联效率分析和高效纯化:液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行荧光抗抗体的交联效率分析和纯化,流动相为 50mM PBS pH 7.5,流速 0.5mL/min,检测波长 190-800nm。采用分子筛高压液相色谱柱纯化,液相柱型号 TSK G3000sw(规格 7.5mm×60cm),荧光标记抗抗体最先被洗脱下来,收集第一个洗脱峰,即为纯化的荧光抗抗体。通过计算目标产物的洗脱峰面积与全部洗脱峰面积的比例即交联效率为 90%。

[0031] RPC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的光谱检测:吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定,扫描波长区间 250-700nm。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,用 580nm 的激发光激发,荧光发射波长扫描范围为 600-700nm,检测步长为 0.2nm,狭缝宽度为 3nm,检测灵敏度为中等,扫描速度为 1000nm/min,每个样品扫描 3 次取平均值,用不含蛋白的相同溶液作背景扣除。RPC 标记荧光抗抗体与 RPC 的吸收峰位置相同,但在紫外区吸光度明显高于 RPC,这是因为 RPC 表面交联了抗抗体分子,而抗抗体在 280nm 有较强的光吸收,在 450-700nm 范围内抗抗体无光吸收。RPC 标记荧光抗抗体与对照 RPC 在 540nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 632nm,没有发生斯托克位移的改变,且荧光亮度无明显降低。

[0032] RPC 抗猪 IgG 荧光抗抗体的效价检测:对流免疫电泳法检测 RPC 标记荧光抗抗体的免疫学活性。RPC 标记荧光抗抗体与动物 IgG 形成青色免疫沉淀线,不用染色就可清晰地观察到沉淀线的位置。免疫沉淀线的形成说明抗抗体与 RPC 交联成功,同时也说明交联物仍然保留较高的抗体活性。

[0033] RPC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的电泳检测:SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%。恒压电泳,电压为 218V。用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后观察结果。SDS-PAGE 电泳发现 RPC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体同样既具有 RPC 的 α 、 β 亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带。

[0034] RPC 标记抗猪 IgG 荧光抗抗体的稳定性检测:纯化的 RPC 标记荧光抗抗体中加入 0.02%叠氮化钠,4℃避光保存,每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价。RPC 标记的抗猪 IgG 荧光抗抗体稳定性同 RPC 标记的抗鸡 IgG 荧光抗抗体相似,在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃保存 60 天,荧光抗抗体的荧光强度保持不变,抗体效价维持在 5Log 2。

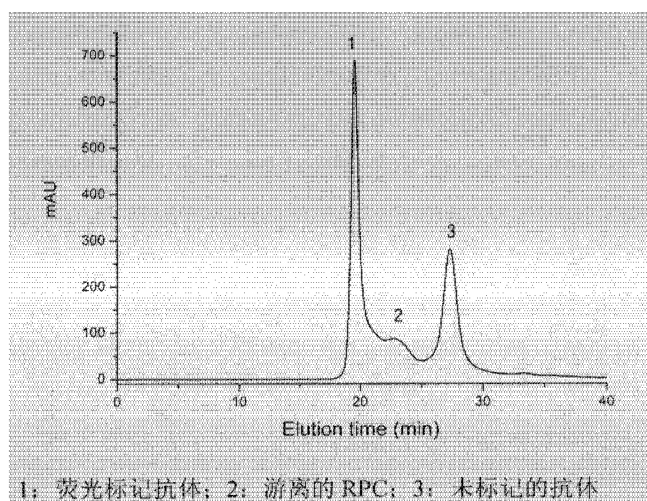


图 1

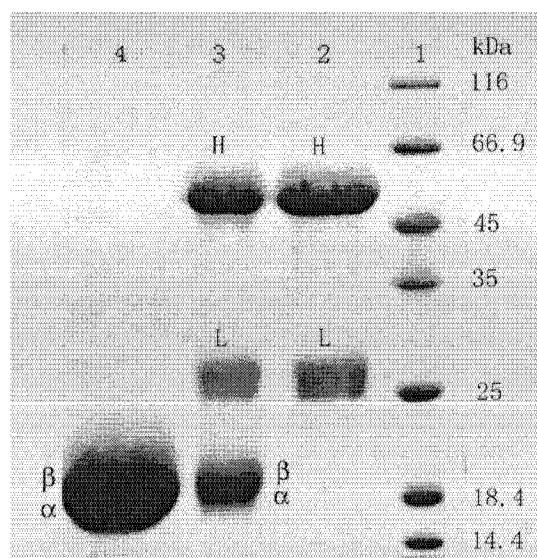


图 2

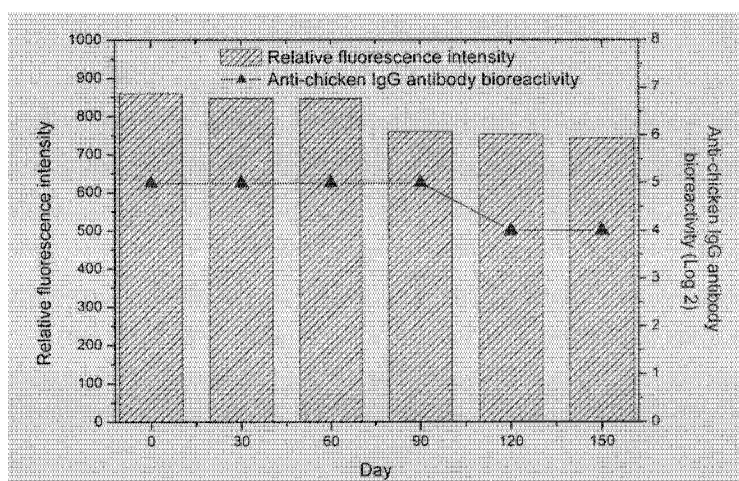


图 3

专利名称(译)	一种R-藻蓝蛋白标记的荧光抗抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN101980020A	公开(公告)日	2011-02-23
申请号	CN201010284339.0	申请日	2010-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	颜世敢		
申请(专利权)人(译)	颜世敢		
当前申请(专利权)人(译)	颜世敢		
[标]发明人	朱丽萍 颜世敢 颜士勇		
发明人	朱丽萍 颜世敢 颜士勇		
IPC分类号	G01N33/533 C07K14/405 C07K1/18		
其他公开文献	CN101980020B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种R-藻蓝蛋白(R-phycoerythrin, RPE)标记的荧光抗抗体的制备方法。制备过程为：阴离子交换层析法制备RPE，分别用摩尔比20-30:1、50-100:1的双功能化学交联剂SPDP将RPE、抗抗体衍生，衍生物以适宜摩尔比液相交联，经高压液相色谱纯化制备出RPE标记的荧光抗抗体。本法制备的RPE标记的荧光抗抗体交联效率高，纯度达电泳纯，红色荧光明亮，荧光抗体活性稳定，可作为通用荧光探针用于动物传染病的间接免疫荧光检测。