



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106243224 A

(43)申请公布日 2016.12.21

(21)申请号 201610633975.7

(22)申请日 2016.08.05

(71)申请人 安徽威尔试剂盒科技有限责任公司

地址 237000 安徽省六安市六安集中示范
园区(六安大学科技园内)

(72)发明人 韦传宝

(74)专利代理机构 安徽合肥华信知识产权代理
有限公司 34112

代理人 方峥

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法,及在用于检测判断被尖吻蝮蛇咬伤方面的应用,首先用CM-SEphadex C 50离子交换层析法初步纯化尖吻蝮蛇毒特异蛋白,用0.2M NaCl的0.05M pH 5.6 HAc-NaAc洗脱获得初步纯化的尖吻蝮蛇毒特异蛋白;其次用12% PAGE制备凝胶电泳并用考马斯亮蓝染色,第二条带为获得的尖吻蝮蛇毒特异蛋白;最后将含有特异蛋白的聚丙烯酰胺凝胶磨细后直接免疫注射小鼠,间隔1周,注射4次,第4次注射后3天断头取血,血液放置6小时后离心获得抗血清。本发明可以准确鉴定是否被尖吻蝮蛇咬伤,鉴定方法简单而成熟,检测费用很低。

1. 一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法,其特征在于包括以下步骤:
 - a、用CM-SEphadex C 50 离子交换层析法初步纯化尖吻蝮蛇毒特异蛋白,用0.2M NaCl的0.05M pH 5.6 HAc-NaAc洗脱获得初步纯化的尖吻蝮蛇毒特异蛋白;
 - b、用12% PAGE制备凝胶电泳并用考马斯亮蓝染色,第二条带为获得的尖吻蝮蛇毒特异蛋白;
 - c、将含有特异蛋白的聚丙烯酰胺凝胶磨细后直接免疫注射小鼠,共注射4次,每次间隔7天,第4次注射后3天断头取血,血液放置5-7小时后离心获得抗血清。
2. 如权利要求1所述的一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法制得的抗血清。
3. 权利要求2所述的抗血清在检测判断被尖吻蝮蛇咬伤上的应用。

一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法及其应用。一种检测被尖吻蝮蛇咬伤抗血清的制备方法,属于免疫学领域。

背景技术

[0002] 尖吻蝮蛇又名俗称五步蛇(*Agkistrodon acutus*),属于蝮亚科、蝮属,是我国特有蛇种,为血循环型毒蛇,剧毒。该蛇分布于我国长江以南地区,包括中国台湾,因蛇毒中含有多种出血毒素,被咬伤后伤口和内脏出血,继而坏死,被该蛇咬伤后如不及时治疗,致死、致残率极高。

[0003] 尖吻蝮蛇栖息地还有其他毒蛇,如江浙蝮蛇、眼镜蛇、眼睛王蛇、蝰蛇、竹叶青、烙铁头、金环蛇和银环蛇,被毒蛇咬伤有的患者有时不能够确定是被哪种毒蛇咬伤,因此不能够对症治疗,耽误了治疗的宝贵时间。如果能够生产一种抗血清,该抗血清中的抗体能够与尖吻蝮蛇毒中的某种成分结合,与其他蛇毒成分都不结合,因此可以通过酶联免疫检测(ELISA)的方法确定是否为尖吻蝮蛇咬伤。

发明内容

[0004] 本发明公开了一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法及应用。本发明通过CM-SEphadex C 50 离子交换层析和制备凝胶电泳分离出尖吻蝮蛇毒中特异的蛋白质,注射免疫小鼠制备抗血清,由于该蛋白质仅仅存在于尖吻蝮蛇毒中,其他蛇毒如江浙蝮蛇毒、眼镜蛇蛇毒、眼睛王蛇毒、蝰蛇毒、竹叶青蛇毒、烙铁头蛇毒、金环蛇毒和银环蛇毒不含这种蛋白质,取含蛇毒的伤口流出液进行ELISA检测就可以确定是否被尖吻蝮蛇咬伤,避免误诊。

[0005] 本发明的具体技术方案如下:

一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法,其特征在于包括以下步骤:

a、用CM-SEphadex C 50 离子交换层析法初步纯化尖吻蝮蛇毒特异蛋白,用0.2M NaCl的0.05M pH 5.6 HAc-NaAc洗脱获得初步纯化的尖吻蝮蛇毒特异蛋白;

b、用12% PAGE制备凝胶电泳并用考马斯亮蓝染色,第二条带为获得的尖吻蝮蛇毒特异蛋白;

c、将含有特异蛋白的聚丙烯酰胺凝胶磨细后直接免疫注射小鼠,共注射4次,每次间隔7天,第4次注射后3天断头取血,血液放置5-7小时后离心获得抗血清。

[0006] 所述的一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法制得的抗血清。

[0007] 所述的抗血清在检测判断被尖吻蝮蛇咬伤上的应用。

[0008] 本发明的技术效果体现在二个方面:

1、鉴定方法简单、结果准确

由于从尖吻蝮蛇毒中纯化的蛋白质是特异的,其他蛇毒不含这种蛋白质,也没有与此有亲缘关系的蛋白质,因此制备的抗血清中的抗体仅仅能够与尖吻蝮蛇毒中的这个特异蛋

白质结合,与其他蛇毒不结合,确保了结果的准确性。由于检测采用常规的酶联免疫检测(ELISA)的方法,从伤口取少量液体(含毒液)通过常规ELISA检测即可。

[0009] 2、鉴定费用很低

需要的主要试剂为抗血清,据估算,一只小鼠产生的抗血清能够满足800次的检测,因此检测费用很低。

具体实施方式

[0010] 一、特异性蛇毒蛋白的纯化

取1克皖南产尖吻蝮蛇毒,用15mL 0.05M pH 5.6 HAc-NaAc 缓冲液溶解,13000转/分钟离心去除不溶性杂质,将蛇毒溶液上长60cm,直径2cm的CM-Sephadex C 50离子交换层析柱,用3倍柱体积的0.05M pH 5.6 HAc-NaAc缓冲液充分洗脱未结合的酸性蛋白,然后用1.5倍柱体积的含0.1M NaCl 的0.05M pH 5.6 HAc-NaAc洗脱不需要的杂蛋白,然后用1.5倍柱体积的含0.2M NaCl 的0.05M pH 5.6 HAc-NaAc洗脱,特异蛋白被洗脱下来。收集洗脱溶液,透析袋浓缩至5mL,然后对0.05M pH 5.6 HAc-NaAc 缓冲液透析12小时去除多余的盐,获得初步纯化的尖吻蝮蛇特异性蛋白,1mL/管分装,-20℃冷冻备用。取1管蛇毒分离物进行12% PAGE制备电泳(配制见表1,浓缩胶不插梳子),电泳后考马斯亮蓝染色、脱色后获得三条蓝色蛋白质条带,第二条为特异性蛋白条带,用手术刀片切下蛋白质条带,胶体含特异性蛋白,将胶条分成4份冷冻备用。

[0011] 表1 12% PAGE

试剂	分离胶(12%) 36mL	浓缩胶(5%)10mL
dd H ₂ O	11.88	6.8
30%丙烯酰胺	14.4	1.7
1.5M Tris-HCl(pH 8.8)	9.0	
1.0M Tris-HCl(pH 6.8)		1.25
10%过硫酸胺	0.36	0.1
TEMED	0.015	0.01

二、免疫小鼠并制备抗血清

取1份含特异蛋白的胶体,加2mL生理盐水,于研钵内充分磨细,吸入到5mL规格的一次性注射器中,免疫注射18-22克规格的小鼠,每只小鼠0.5mL,第一次注射每只小鼠皮下注射0.25mL,腹腔注射0.25mL,第二、第三、第四间隔7天,均为腹腔注射,每只小鼠腹腔注射0.5mL,第四次注射后第3天断头取血,6小时后离心获得抗血清,冷冻保存。

[0012] 三、抗血清特异性的筛选

将常见的蛇毒江浙蝮蛇毒、眼镜蛇蛇毒、眼睛王蛇毒、蝰蛇毒、竹叶青蛇毒、烙铁头蛇毒、金环蛇毒和银环蛇毒8种蛇毒分别用包被液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液,pH 9.6)配制0.1%浓度溶液作为样品抗原,进行常规ELISA检测,以没有抗原的包被液作为阴性对照孔,0.1%浓度尖吻蝮蛇作为阳性对照孔,用制备的抗血清作为一抗(抗尖吻蝮蛇特异性蛋白),羊抗兔IgG-碱性磷酸酶为二抗,1 mg/mL的p-NPP为底物,显色45分钟后在酶标仪上测定OD₄₀₅值,以阴性对照OD₄₀₅值为标准,样品值超过2.1倍阴性对照OD₄₀₅值确定为阳性,否则为阴性。结果表明:8种蛇毒均显色阴性结果,尖吻蝮蛇抗原显色阳性结果,说明8种蛇毒都

不含与尖吻蝮蛇毒特异蛋白相同或者抗原性相同的蛋白质,制备的抗血清仅能够与尖吻蝮蛇毒中的特异蛋白结合。

[0013] 四、模拟检测

实施例一:

第一步:咬伤模拟

用3公斤雄性实验家兔模拟实验,将腿部毛剃除,用1公斤重尖吻蝮蛇咬家兔腿部,伤口简单冲洗;

第二步:检测样品的获得

30分钟后从伤口取约50uL血液,离心去除细胞等颗粒,加200uL包被液稀释作为待测样品溶液;

第三步:ELISA检测

分别设二个阴性对照孔(包被液)、二个阳性对照孔(0.1%尖吻蝮蛇毒)、二个样品孔。用制备的抗血清作为一抗(抗尖吻蝮蛇特异性蛋白),羊抗兔IgG-碱性磷酸酶为二抗,1 mg/mL的p-NPP为底物,显色45分钟后在酶标仪上测定OD₄₀₅,平均值分别为,OD₄₀₅阴性对照=0.045; OD₄₀₅阳性对照=1.246; OD₄₀₅样品=1.421;说明制备的抗血清能够检测被尖吻蝮蛇咬伤的动物。

[0014] 实施例二:

第一步:咬伤模拟

用2.8公斤雌性实验家兔模拟实验,将腿部毛剃除,用另一条1.1公斤重尖吻蝮蛇咬家兔腿部,伤口简单冲洗;

第二步:检测样品的获得

40分钟后从伤口取约50uL血液,离心去除细胞等颗粒,加200uL包被液稀释作为抗原溶液;

第三步:ELISA检测

与“实施例一”第三步相同。显色45分钟后在酶标仪上测定OD₄₀₅平均值分别为, OD₄₀₅阴性对照=0.050; OD₄₀₅阳性对照=1.189; OD₄₀₅样品=1.240;说明制备的抗血清能够检测被尖吻蝮蛇咬伤的动物。

[0015] 实施例三:

第一步:咬伤模拟

用2.9公斤雌性实验家兔模拟实验,将腿部毛剃除,用另一条0.9公斤重尖吻蝮蛇咬家兔腿部,伤口简单冲洗;

第二步:检测样品的获得

50分钟后从伤口取约50uL血液,离心去除细胞等颗粒,加200uL包被液稀释作为抗原溶液;

第三步:ELISA检测

与“实施例一”第三步相同。显色45分钟后在酶标仪上测定OD₄₀₅平均值分别为, OD₄₀₅阴性对照=0.048; OD₄₀₅阳性对照=1.521; OD₄₀₅样品=1.210;说明制备的抗血清能够检测被尖吻蝮蛇咬伤的动物。

[0016] 本发明三个实施例用不同重量家兔、不同重量的尖吻蝮蛇、不同时间取样品获得的检测结果相似,说明该发明制备的抗血清能够检测尖吻蝮蛇咬伤,稳定且可靠。

专利名称(译)	一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法及其应用		
公开(公告)号	CN106243224A	公开(公告)日	2016-12-21
申请号	CN201610633975.7	申请日	2016-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	安徽威尔试剂盒科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	安徽威尔试剂盒科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽威尔试剂盒科技有限责任公司		
[标]发明人	韦传宝		
发明人	韦传宝		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/06 G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/06 C07K16/18		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用尖吻蝮蛇毒特异蛋白制备抗血清的方法，及在用于检测判断被尖吻蝮蛇咬伤方面的应用，首先用CM-SEphadex C 50离子交换层析法初步纯化尖吻蝮蛇毒特异蛋白，用0.2M NaCl的0.05M pH 5.6 HAc-NaAc洗脱获得初步纯化的尖吻蝮蛇毒特异蛋白；其次用12% PAGE制备凝胶电泳并用考马斯亮蓝染色，第二条带为获得的尖吻蝮蛇毒特异蛋白；最后将含有特异蛋白的聚丙烯酰胺凝胶磨细后直接免疫注射小鼠，间隔1周，注射4次，第4次注射后3天断头取血，血液放置6小时后离心获得抗血清。本发明可以准确鉴定是否被尖吻蝮蛇咬伤，鉴定方法简单而成熟，检测费用很低。

[0011] 表1 12% PAGE

试剂	分离胶(12%) 36mL	浓缩胶(5%)10mL
dd H ₂ O	11.88	6.8
30%丙烯酰胺	14.4	1.7
1.5M Tris-HCl(pH 8.8)	9.0	
1.0M Tris-HCl(pH 6.8)		1.25
10%过硫酸胺	0.36	0.1
TEMED	0.015	0.01

二、免疫小鼠并制备抗血清