



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108727502 A
(43)申请公布日 2018.11.02

(21)申请号 201810411301.1

(22)申请日 2018.05.02

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 雷红涛 甘庆庆 沈兴 曾皓鹏
孙远明 徐振林 李向梅 王兰腾

(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 任重

(51)Int.Cl.

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

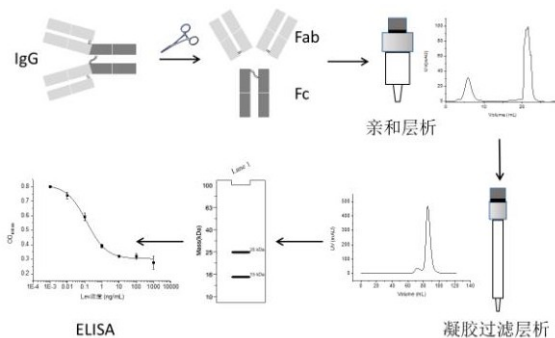
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种左旋氧氟沙星抗体的Fab片段制备方法
及应用

(57)摘要

本发明公开了一种左旋氧氟沙星抗体Fab片段的制备方法。所述方法包括以下步骤:制备左氧氟沙星的单克隆抗体;用蛋白酶酶切获得的单克隆抗体;去除蛋白酶,终止酶切反应;采用两步纯化法纯化目的Fab片段。本发明设计了一种蛋白酶酶切制备左旋氧氟沙星抗体Fab片段的方法,所述操作简便,转化率高;本发明设计了一种新型抗体纯化工艺制备左旋氧氟沙星抗体Fab片段,所述纯化工艺简单,仅需两步纯化得到纯度达95%以上的抗体Fab片段;本发明运用所制备的左旋氧氟沙星抗体Fab片段建立的ELISA方法灵敏度高,对左旋氧氟沙星的半抑制浓度为0.13 ng/mL,线性检测范围为0.02-0.8 ng/mL,检测限为0.007 ng/mL。



1. 一种左旋氧氟沙星抗体Fab片段的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - S1. 制备左氧氟沙星的单克隆抗体;
 - S2. 用蛋白酶酶切步骤S1切获得的单克隆抗体;
 - S3. 去除蛋白酶,终止酶切反应;
 - S4. 采用两步纯化法纯化目的Fab片段。
2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S1中,左氧氟沙星偶联载体蛋白作为免疫抗原。
3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S2中,所述蛋白酶为木瓜蛋白酶。
4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S4中,所述两步纯化法为亲和层析和凝胶过滤层析两步纯化。
5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤S4中,所述亲和层析为采用蛋白L预装柱进行亲和层析。
6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤S4中,所述凝胶过滤层析采用Superdex 200进行凝胶过滤层析。
7. 权利要求1所述制备方法制备得到的左旋氧氟沙星抗体Fab片段。
8. 权利要求7所述左旋氧氟沙星抗体Fab片段在检测喹诺酮类抗生素中的应用。
9. 一种喹诺酮类抗生素免疫学的检测方法,其特征在于,利用权利要求1所述的左旋氧氟沙星抗体Fab片段。
10. 根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,所述喹诺酮类抗生素为左旋氧氟沙星。

一种左旋氧氟沙星抗体的Fab片段制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,具体地,涉及一种新型左旋氧氟沙星抗体Fab片段的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 左旋氧氟沙星(Levofloxacin, Lev)是第三代氟喹诺酮类(Fluoroquinolones, FQs)抗生素,因其有效抑制细菌DNA回旋酶的超螺旋活性,在临床医学和兽医学中广泛用于治疗泌尿生殖系统疾病,呼吸道、皮肤组织细菌感染等。由于其在畜禽养殖行业不合理使用或滥用的现象屡禁不止,在动物体内、土壤、水体等环境中发现大量左旋氧氟沙星残留。这不仅会影响环境中微生物的生长和分布,大幅提高了引发耐药菌的概率,还会通过食物链传递进而严重危害消费者健康。为保证消费者健康,在食品加工、贮藏和销售等环节加强左旋氧氟沙星残留的监控,建立一种快速有效的检测方法是十分必要和紧迫的。

[0003] 基于抗原-抗体相互作用的免疫检测方法已广泛应用于兽药残留的快速检测,例如酶联免疫检测方法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。ELISA免疫检测方法具有仪器成本低,操作简便快捷,灵敏度高等特点,相比传统仪器分析方法,更适用于大批量样品的快速检测。其中,抗体的性能直接决定了免疫检测方法的特异性和灵敏度。研究表明抗体的恒定区常与待检分析物发生非特异性相互作用,二者的相互结合会导致在样品检测过程中出现假阳性或错误的结果,而缺少恒定区的抗体片段很好地规避了这一现象。抗体片段不仅可避免在样品检测时发生非特异性结合,还能减少由于糖基化修饰等引起的抗体表面电荷异质现象的产生,从而具有更高的检测灵敏性。

[0004] 抗体Fab片段保留完整的抗原抗体相互识别的区域,由轻链和重链Fd片段(VH-CH1结构域)组成,是研究较为彻底、应用较广泛的一种抗体片段。目前制备抗体Fab片段的方法主要为重组表达和酶切法。重组法制备Fab片段会面临着无法表达或表达量低的情况,还会出现由于错误折叠导致表达的蛋白质活性低或丧失活性等问题。传统的酶切法制备Fab片段是利用蛋白酶水解完整的抗体,具有工艺简便,转化率高的特点,只需要简单的纯化操作便可得到高纯度的Fab片段,因此酶切法是制备Fab片段首选的便捷且有效的途径。抗体Fab片段的纯化主要是通过利用抗体亲和层析的手段实现目的片段与其他杂蛋白分离。然而在纯化酶切反应混合物时发现,常见的用于抗体亲和纯化的蛋白A、G配体,对于酶切反应产物中的Fab和Fc片段均有结合作用,因此无法高效分离理化性质相似的Fab和Fc片段。而蛋白L配体只与kappa型轻链发生特异性结合,可使不含轻链的Fc片段与目的Fab片段实现高效分离。

[0005] 目前尚无使用抗体Fab片段检测左旋氧氟沙星的报道。于海峰制备了左旋氧氟沙星单克隆抗体用于建立间接竞争性ELISA检测方法,最低检测限为1.43 ng/mL;蒋兴东等建立了左旋氧氟沙星多克隆抗体的间接竞争性ELISA检测方法,最低检测限为10 ng/mL,药物的半抑制浓度为64 ng/mL。这些已有的左旋氧氟沙星免疫检测方法检测限较高,灵敏度较低。因此,可通过酶切法和蛋白L亲和纯化手段制备左旋氧氟沙星抗体Fab片段,为建立一种

灵敏度高的左旋氧氟沙星免疫检测方法提供核心原材料。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术中缺乏能够高灵敏度检测左旋氧氟沙星的技术缺陷和不足,提供一种蛋白酶酶切和两步纯化制备左旋氧氟沙星抗体Fab片段的方法。本发明运用一种木瓜蛋白酶酶切的策略和蛋白L与凝胶过滤层析结合的两步纯化工艺首次获得左旋氧氟沙星抗体Fab片段,采用该新型纯化工艺制备得到的抗体Fab片段同时具备高灵敏度的性能,为建立左旋氧氟沙星的免疫检测方法提供了核心原材料,具有广阔的发展前景。

[0007] 本发明的第一个目的是提供一种左旋氧氟沙星抗体Fab片段的制备方法。

[0008] 本发明的第二个目的是提供所述的制备方法制备得到的左旋氧氟沙星抗体Fab片段。

[0009] 本发明的第三个目的是提供所述左旋氧氟沙星抗体Fab片段在检测喹诺酮类抗生素中的应用。

[0010] 本发明的第四个目的是提供一种喹诺酮类抗生素免疫学的检测方法。

[0011] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案予以实现的:

一种左旋氧氟沙星抗体Fab片段的制备方法,包括以下步骤:

- S1. 制备左氧氟沙星的单克隆抗体;
- S2. 用蛋白酶酶切步骤S1获得的单克隆抗体;
- S3. 去除蛋白酶,终止酶切反应;
- S4. 采用两步纯化法纯化目的Fab片段。

[0012] 优选地,步骤S1中,左氧氟沙星偶联载体蛋白作为免疫抗原。

[0013] 优选地,步骤S2中,所述蛋白酶为木瓜蛋白酶。

[0014] 优选地,步骤S2中,所述木瓜蛋白酶为固定化木瓜蛋白酶。

[0015] 优选地,步骤S2中,酶切步骤为:蛋白酶活化后,在半胱氨酸存在的条件下与单克隆抗体混匀,形成酶切体系,于37 °C反应。

[0016] 优选地,步骤S2中,反应产物去除蛋白酶和半胱氨酸后经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定。

[0017] 优选地,步骤S2中,半胱氨酸浓度为20 mM。

[0018] 优选地,步骤S2中,木瓜蛋白酶与抗体的比例为1:80(w/w)。

[0019] 优选地,步骤S2中,酶切体系37 °C反应10 h。

[0020] 最优选地,步骤S2中,所述蛋白酶酶切抗体的步骤如下:

- S21. 以木瓜蛋白酶与抗体1:80(w/w)的比例吸取固定化木瓜蛋白酶;
- S22. 在20 mM半胱氨酸的条件下,木瓜蛋白酶在10 mM Na₂HP0₄缓冲液(pH 10.0)中活化;
- S23. 活化后的固定化木瓜蛋白酶与左旋氧氟沙星单克隆抗体充分混匀,并在半胱氨酸终浓度为20 mM的条件下于37 °C恒温摇床反应10 h;
- S24. 反应产物经离心与木瓜蛋白酶分离,终止酶切反应,并通过透析去除残留半胱氨酸。

[0021] 优选地,步骤S4中,所述两步纯化法为亲和层析和凝胶过滤层析两步纯化。

[0022] 优选地,步骤S4中,所述两步纯化法是指通过亲和层析和凝胶过滤层析得到高纯度的Fab片段,包括如下步骤:酶切反应液经过亲和层析,将酶切产物中的Fc片段与Fab片段分离,收集洗脱液经超滤浓缩后再通过凝胶过滤层析,将未完全酶切的单克隆抗体与目的Fab片段分离。

[0023] 优选地,步骤S4中,所述亲和层析为采用蛋白L预装柱进行亲和层析。

[0024] 优选地,步骤S4中,所述凝胶过滤层析采用Superdex 200进行凝胶过滤层析。

[0025] 优选地,步骤S4中,所述两步纯化法的步骤如下:

本发明同时还保护所述制备方法制备得到的左旋氧氟沙星抗体Fab片段。

[0026] 以上所述左旋氧氟沙星抗体Fab片段在检测喹诺酮类抗生素中的应用也在本发明的保护范围内。

[0027] 一种喹诺酮类抗生素免疫学的检测方法,利用以上所述的左旋氧氟沙星抗体Fab片段。

[0028] 优选地,所述喹诺酮类抗生素为左旋氧氟沙星。

[0029] S41. 所述酶切左旋氧氟沙星抗体的反应产物,经蛋白L亲和层析,流穿部分为Fc组分,结合在亲和填料上为含有轻链的组分(Fab和IgG),经酸性缓冲液淋洗柱子,收集洗脱组分;

S42. 所述洗脱组分超滤浓缩后,经Superdex 200凝胶过滤层析,使未完全酶切的抗体与Fab片段根据分子大小先洗脱,分子小的分子后出峰的原理,收集分子量较小的Fab片段。

[0030] S43. 亲和层析和凝胶过滤层析纯化的片段经SDS-PAGE电泳鉴定。

[0031] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

(1)本发明设计了一种蛋白酶酶切制备左旋氧氟沙星抗体Fab片段的方法,且操作简便,转化率高;

(2)本发明设计了一种新型抗体纯化工艺制备左旋氧氟沙星抗体Fab片段,所述纯化工艺简单,仅需两步纯化得到纯度达95%以上的抗体Fab片段;

(3)本发明运用所制备的左旋氧氟沙星抗体Fab片段建立的ELISA方法灵敏度高,对左旋氧氟沙星的半抑制浓度为0.13 ng/mL,线性检测范围为0.02-0.8 ng/mL,检测限为0.007 ng/mL。

附图说明

[0032] 图1为左旋氧氟沙星抗体Fab片段制备流程图。

[0033] 图2为左旋氧氟沙星抗体Fab片段亲和纯化示意图和SDS-PAGE电泳图。

[0034] 图3为左旋氧氟沙星抗体Fab片段凝胶过滤层析示意图和电泳图。

[0035] 图4为左旋氧氟沙星抗体Fab片段对左旋氧氟沙星的间接竞争ELISA标准曲线。

具体实施方式

[0036] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂

和材料。

[0037] 以下实施例包括左旋氧氟沙星抗体酶切,酶切产物经亲和层析和凝胶过滤层析,以及制备得到的左旋氧氟沙星抗体Fab片段的间接竞争ELISA工作曲线的建立,流程如图1所示。

[0038] 实施例1 左旋氧氟沙星抗体的酶切

1、实验操作

(1)根据酶与抗体1:80(w/w)的比例吸取固定化木瓜蛋白酶,5000 × g离心1 min去除储存液;

(2)在2 mL活化液(10 mM Na₂HPO₄, pH 10.0)中称量7 mg半胱氨酸至终浓度为20 mM,并与木瓜蛋白酶置37 °C恒温摇床混匀;

(3)活化反应10 min后取出5000 × g离心弃除活化液

(4)往固定化木瓜蛋白酶中添加1 mL左旋氧氟沙星单克隆抗体,并称量3.5 mg半胱氨酸至终浓度为20 mM,37 °C恒温摇床反应10 h;

(5)反应结束后经5000 × g离心分离固定化木瓜蛋白酶与抗体酶切产物,并通过透析的方法置换缓冲液为20 mM PB, 150 mM NaCl(pH 7.4)结合缓冲液,达到去除残留半胱氨酸的目的;

(6)酶切反应产物与原单克隆抗体经SDS-PAGE电泳鉴定反应产物。

[0039] 2、实验结果

SDS-PAGE凝胶电泳鉴定结果:90%以上的左旋氧氟沙星抗体已被固定化木瓜蛋白酶酶切,非还原电泳图显示IgG 150 kD条带很浅,但尚未完全酶切(还原电泳图显示重链50 kD条带),主要产物为Fc和Fab片段及少量未被完全酶切的全抗IgG分子。通过计算产物浓度,酶切效率为60%左右。

[0040] 实施例2 左旋氧氟沙星抗体Fab片段的亲和纯化

1、实验操作

(1)使用结合缓冲液平衡5 mL蛋白L预装柱,设置流速为1 mL/min,系统压力0.5 MPa,平衡5个柱体积;

(2)将所述酶切反应产物使用注射器小心缓慢地注入层析柱上,结合缓冲液淋洗柱子,经紫外检测器监控280 nm的蛋白吸收峰,收集流穿的蛋白组分,即酶切产物中的Fc片段;

(3)待紫外稳定后,使用洗脱缓冲液淋洗柱子,经紫外检测器监控收集洗脱下的蛋白组分,即酶切产物中的少量IgG和Fab片段。

[0041] 其中,结合缓冲液的配方:NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.8736 g,Na₂HPO₄ · 12H₂O 5.1572 g,NaCl 4.3875 g,溶解后NaOH溶液调节pH至7.4,最后加超纯水定容至1 L;洗脱缓冲液的配方:甘氨酸3.7535 g溶解后,浓盐酸调节pH至7.4,最终超纯水定容至500 mL。

[0042] (3)分别将亲和层析收集的流穿组分和洗脱组分进行非还原和还原SDS-PAGE电泳鉴定。

2、实验结果

结果表明(图2),Fc组分与Fab片段实现100%分离。在非还原电泳中,Fc和Fab条带迁移位置相近,对比蛋白标志物分子量大小约为38 kD;在还原电泳中,Fc片段仅有一条带,对应Fc片段的轻链,而洗脱组分中既含少量的IgG(50 kD重链条带),也包括目的Fab片段,电泳

条带分别在25 kD和15 kD,依次对应着Fab片段的重链和轻链。说明木瓜蛋白酶亲和纯化可制备高纯度Fab片段。

[0043] 实施例3 左旋氧氟沙星抗体Fab片段的凝胶过滤层析

1、实验操作

为去除亲和层析洗脱组分中含有的少量IgG杂质,使用凝胶过滤层析手段纯化的方法如下:

(1) 由于Superdex 200 (16/600)层析柱有上样量限制,因此需将所述亲和层析洗脱组分超滤浓缩(截留分子量30 kD)至体积小于5 mL后再上样;

(2) 使用结合缓冲液平衡层析柱至少1个柱体积,设置流速1 mL/min,系统压力0.3 MPa;

(3) 根据紫外检测器监控280 nm蛋白吸收峰,按每管1 mL体积收集流穿的蛋白组分;

(4) SDS-PAGE电泳鉴定收集到的每管蛋白峰。

[0044] 2、实验结果

根据纯化层析和电泳结果(图3),说明所述亲和层析洗脱组分中的少量IgG分子可与目的Fab片段实现很好的分离,Fab片段的纯度可达95%以上。

[0045] 实施例4 左旋氧氟沙星抗体Fab片段的ELISA检测

1、ELISA检测方法

(1) 将左旋氧氟沙星-OVA人工抗原用包被液稀释至2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度,包被96孔酶标板,每孔加入100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜;

(2) 弃去包被液,洗涤2次;

(3) 每孔加入120 μL 封闭液(5%脱脂奶粉),37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭3 h;

(4) 弃去封闭液,拍板,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干备用;

(5) 用PBST 1:2000倍稀释左旋氧氟沙星抗体Fab片段,并将左旋氧氟沙星稀释至1000,100,10,1,0.1,0.01,0.001 ng/mL ;

(6) 每行加50 μL 左旋氧氟沙星稀释液(三组平行),再加50 μL 抗体Fab片段稀释液/孔,在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育40 min,洗涤5次;

(7) 加入羊抗鼠二抗-HRP(4000倍稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤5次,拍板;

(8) 加入显色液显色10 min;

(9) 加入50 μL 10% H_2SO_4 终止反应,并在450 nm处读取OD值。

[0046] 2、实验结果

左旋氧氟沙星抗体Fab片段的间接竞争ELISA标准曲线如图4所示,所述左旋氧氟沙星抗体Fab片段对左旋氧氟沙星的半抑制浓度为0.13 ng/mL ,线性检测范围为0.02-0.8 ng/mL ,检测限为0.007 ng/mL 。

[0047] 与亲本左旋氧氟沙星单克隆抗体的ELISA检测活性比较,本法所制备的左旋氧氟沙星抗体Fab片段的ELISA免疫检测方法具有更高的灵敏度,在检测左旋氧氟沙星残留的应用上可发挥巨大的潜能。

[0048] 表1为抗体Fab片段与亲本单克隆抗体的ELISA免疫检测方法比较结果

	Fab	IgG
灵敏度 (IC ₅₀ , ng/mL)	0.13	0.65
线性范围 (IC ₂₀ -IC ₈₀ , ng/mL)	0.02-0.8	0.34-1.27
检测限 (IC ₁₀ , ng/mL)	0.007	0.228

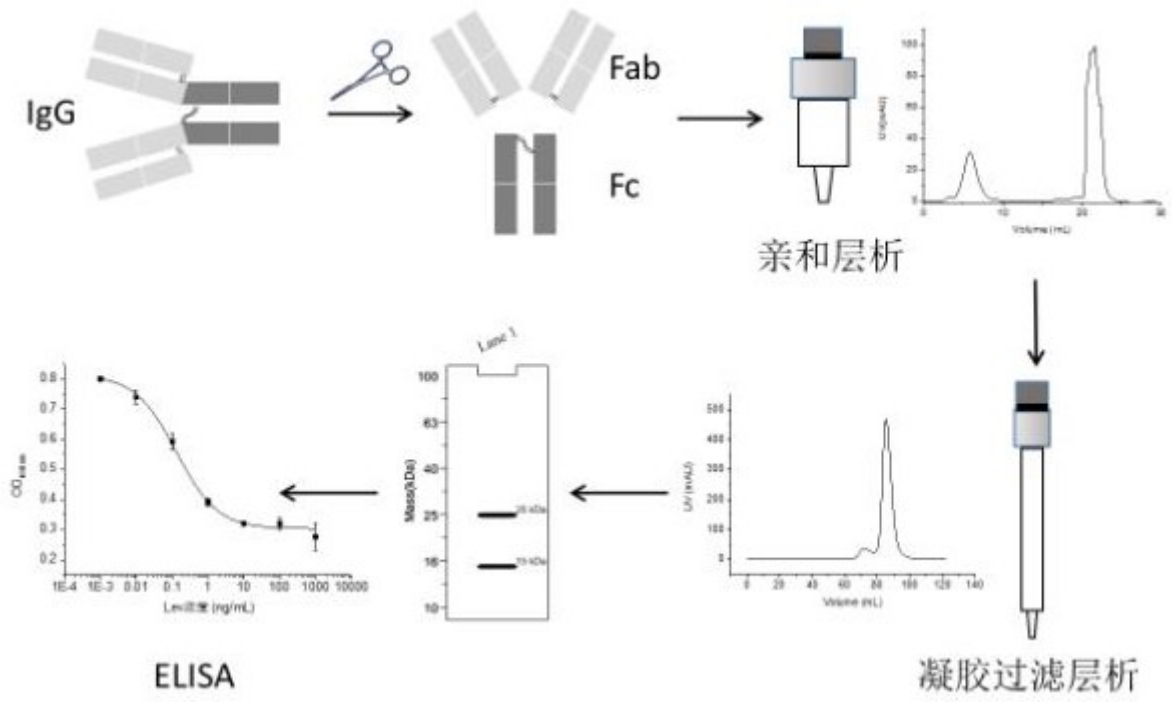


图1

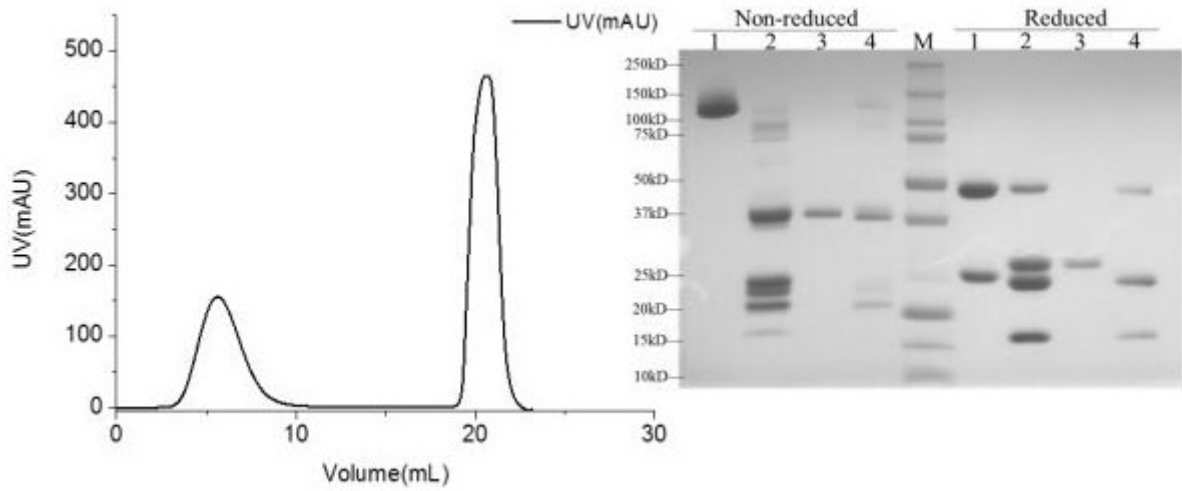


图2

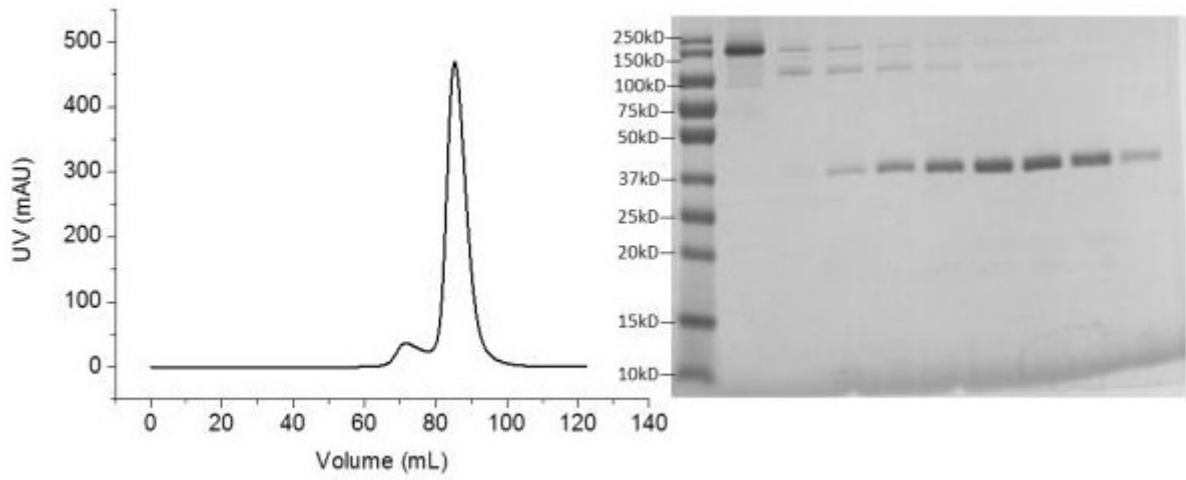


图3

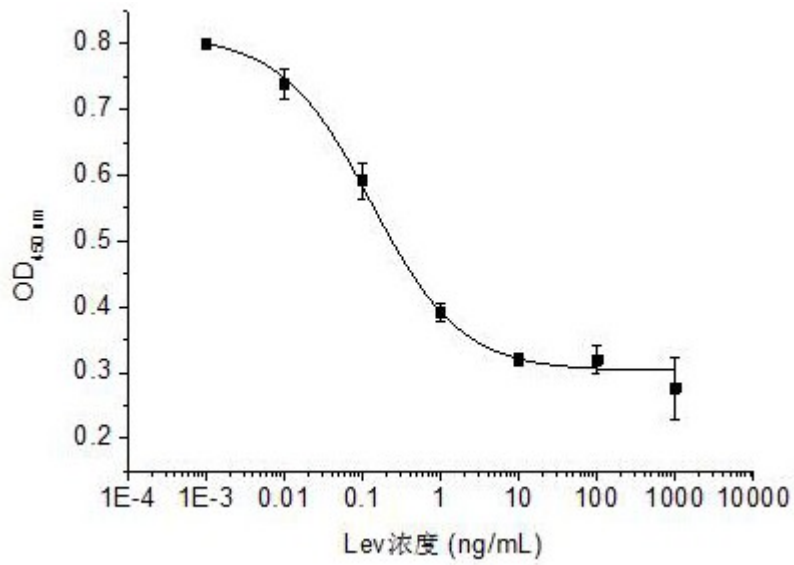


图4

专利名称(译)	一种左旋氧氟沙星抗体的Fab片段制备方法及应用		
公开(公告)号	CN108727502A	公开(公告)日	2018-11-02
申请号	CN201810411301.1	申请日	2018-05-02
[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 甘庆庆 沈兴 曾皓鹏 孙远明 徐振林 李向梅 王兰腾		
发明人	雷红涛 甘庆庆 沈兴 曾皓鹏 孙远明 徐振林 李向梅 王兰腾		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/55 G01N33/9446		
代理人(译)	任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种左旋氧氟沙星抗体Fab片段的制备方法。所述方法包括以下步骤：制备左氧氟沙星的单克隆抗体；用蛋白酶酶切获得的单克隆抗体；去除蛋白酶，终止酶切反应；采用两步纯化法纯化目的Fab片段。本发明设计了一种蛋白酶酶切制备左旋氧氟沙星抗体Fab片段的方法，所述操作简便，转化率高；本发明设计了一种新型抗体纯化工艺制备左旋氧氟沙星抗体Fab片段，所述纯化工艺简单，仅需两步纯化得到纯度达95%以上的抗体Fab片段；本发明运用所制备的左旋氧氟沙星抗体Fab片段建立的ELISA方法灵敏度高，对左旋氧氟沙星的半抑制浓度为0.13 ng/mL，线性检测范围为0.02-0.8 ng/mL，检测限为0.007 ng/mL。

