



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106841592 B

(45)授权公告日 2019.03.29

(21)申请号 201710068288.X

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.02.08

审查员 刘彦宁

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106841592 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(73)专利权人 潍坊市康华生物技术有限公司

地址 261023 山东省潍坊市经济开发区月
河路699号

(72)发明人 杨致亭 王好玉 马金环 胡学亭
于刚 王婷

(74)专利代理机构 潍坊正信致远知识产权代理
有限公司 37255

代理人 王伟霞

(51)Int.Cl.

C07K 1/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

子宫内膜抗原的制备方法

(57)摘要

本发明属于生物学检测技术领域,具体提供了一种制备子宫内膜抗原的方法。本发明提供的方法是将牛的新鲜子宫内膜剥离,多次冲洗后加入胶原蛋白酶使子宫内膜上的胶原蛋白溶解,过筛网冲洗后,收集筛网上的子宫内膜腺体。在提前-20℃冰箱预冷的丙酮中,用组织匀浆器匀浆过滤,4℃电磁搅拌过夜,高速离心后弃沉淀,上清液用ProG亲和吸附柱除去人血清中免疫球蛋白成分,制备成子宫内膜抗原。利用本发明的制备方法原料易得,工艺简便快捷,成本低廉,可满足临床检验的需求。

1. 子宫内膜抗原的制备方法,其特征在于所述制备方法包括以下步骤:

(1) 胶原酶母液的配置:取胶原酶,然后用0.1M、pH为7.4的PBS缓冲液溶解,得到终浓度为10-20mg/ml的胶原酶母液;

(2) 获取子宫内膜腺体:将步骤(1)中的胶原酶母液稀释,得到浓度1-2mg/ml的胶原酶稀释液,然后取冲洗干净的牛子宫内膜,按照料液比30-50:1的比例加入胶原酶稀释液,在37°C水浴或者恒温摇床上温育消化4-48小时,在筛网上用冲洗液冲洗得到子宫内膜腺体;

(3) 匀浆处理:取步骤(2)中的子宫内膜腺体,加入到-18~-22°C预冷的丙酮溶液中,匀浆处理60-120s,然后用滤纸过滤或布氏漏斗抽滤,去除滤液,收集过滤物;

(4) 子宫内膜抗原的提取纯化:取步骤(3)中的过滤物,用缓冲溶液溶解,搅拌过夜,离心处理得到的上清液用0.45um的滤膜过滤,然后再用ProG亲和层析柱分离纯化,收集蛋白峰出峰位置的流出液,浓缩得到子宫内膜抗原;

其中步骤(4)中的缓冲溶液为0.01M-0.05M Tris、0.01M-0.05M EDTA、0.1M-0.15M 氯化钠、1mM-1.5mM PMSF、1mM-1.5mM DTT和1mM-1.5mM 亚硫酸氢钠的混合液。

2. 根据权利要求1所述的子宫内膜抗原的制备方法,其特征在于:步骤(2)中的胶原酶稀释液浓度为1mg/ml。

3. 根据权利要求1所述的子宫内膜抗原的制备方法,其特征在于:步骤(2)中的筛网为孔径250um、60um、40um筛网中任意两种。

4. 根据权利要求1所述的子宫内膜抗原的制备方法,其特征在于:步骤(2)中的冲洗液为0.01MPBS或等渗生理盐水。

5. 根据权利要求1所述的子宫内膜抗原的制备方法,其特征在于:步骤(3)中丙酮溶液的体积浓度为30%-50%。

6. 根据权利要求1所述的子宫内膜抗原的制备方法,其特征在于:步骤(4)中的缓冲溶液用之前在4°C冰箱中预冷10-30min。

子宫内膜抗原的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学检测技术领域,具体涉及一种子宫内膜抗原的制备方法。

背景技术

[0002] 目前临床上用子宫内膜抗原检测抗子宫内膜抗体,依此诊断子宫内膜的免疫病理损伤。其中在子宫内膜异位症血清中,抗子宫内膜抗体检出率达到70%-80%。这严重干扰妊娠导致不孕、停孕,甚至发生流产。另外初次妊娠时作了人工流产,胚囊也可能作为抗原刺激机体产生抗体,这种抗体继而引发不孕。抗子宫内膜抗体阳性引起的不孕就是免疫不孕。

[0003] 正常情况下,子宫内膜为胚胎着床和生长提供发育之地,未孕妇女子宫内膜在卵巢激素的调节下,产生周期性的剥脱,这并不会产生子宫内膜抗体。在某种病理状态下如子宫内膜异位症患者受到异位内膜的刺激,或者机体的免疫系统失常等因素导致诱发机体产生自身免疫反应,免疫应答紊乱后就产生抗子宫内膜抗体,影响患者的健康。

[0004] 子宫内膜抗原主要存在子宫内膜腺体上皮细胞的胞液中,属于糖蛋白,分子量为26-40kd,多见于分泌期子宫内膜中。南京军区南京总医院生殖遗传研究室20世纪90年代从正常女性分泌期子宫内膜纯化子宫内膜抗原,建立抗子宫内膜抗体作为早期诊断。但该方法使用原料为人的子宫内膜,取材不便,而且所得的抗原产品纯度不高,因此建立用牛正常分泌期子宫内膜纯化子宫内膜抗原成为一条可行的路径。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于:针对现有技术存在的不足,提供一种采用健康分泌期牛的子宫内膜制备子宫内膜抗原的方法,该方法取材方便,而且所得抗原对子宫内膜抗体有很好的特异性和敏感性。

[0006] 为了实现上述实验新型的目的,本发明的技术方案是:

[0007] 子宫内膜抗原的制备方法,其特征在于所述制备方法包括以下步骤:

[0008] (1) 胶原酶母液的配置:取胶原酶,然后用0.1M、pH为7.4的PBS缓冲液溶解,得到终浓度为10-20mg/ml的胶原酶母液;

[0009] (2) 获取子宫内膜腺体:将步骤(1)中的胶原酶母液稀释,得到浓度1-2mg/ml的胶原酶稀释液,然后取冲洗干净的牛子宫内膜,按照料液比30-50:1的比例加入胶原酶稀释液,在37℃水浴或者恒温摇床上温育消化4-48小时,在筛网上用冲洗液冲洗得到子宫内膜腺体;

[0010] (3) 匀浆处理:取步骤(2)中的子宫内膜腺体,加入到-18~-22℃预冷的丙酮溶液中,匀浆处理60-120s,然后用滤纸过滤或布氏漏斗抽滤,去除滤液,收集过滤物;

[0011] (4) 子宫内膜抗原的提取纯化:取步骤(3)中的过滤物,用缓冲溶液溶解,搅拌过夜,离心处理得到的上清液用0.45um的滤膜过滤,然后再用ProG亲和层析柱分离纯化,收集蛋白峰出峰位置的流出液,浓缩得到子宫内膜抗原。

- [0012] 作为一种优选的技术方案,步骤(2)中的胶原酶稀释液浓度为1mg/ml。
- [0013] 作为一种优选的技术方案,步骤(2)中的筛网为孔径250um筛网、孔径60um筛网、孔径40um筛网中任意两种。
- [0014] 作为一种优选的技术方案,步骤(3)中丙酮溶液的体积浓度为30%-50%。
- [0015] 作为一种改进的技术方案,步骤(4)中的缓冲溶液为0.01M-0.05M Tris、0.01M-0.05M EDTA、0.1M-0.15M氯化钠、1mM-1.5mM PMSF、1mM-1.5mM DTT和1mM-1.5mM亚硫酸氢钠的混合液。
- [0016] 作为一种改进的技术方案,步骤(4)中的缓冲溶液用之前在4℃冰箱中预冷10-30min。
- [0017] 本发明采用以上技术方案,与现有技术相比,具有以下优点:
- [0018] (1) 本发明选用牛子宫内膜为原料制备子宫内膜抗原,原料易得,价格低廉,来源充足,产品生产成本低;
- [0019] (2) 本发明采用胶原酶对牛的子宫内膜进行消化,在维持生理在生理pH和温度,胶原酶可特异性地水解天然胶原蛋白的三维螺旋结构,而不损伤其它蛋白质和组织,有助于暴露腺体;
- [0020] (3) 本发明在匀浆处理时,采用冰的丙酮一方面可保证在匀浆的时候蛋白就沉淀下来了,另一方面冰的丙酮可以降低蛋白降解,可防止一些组织的酶发挥作用;
- [0021] (4) 采用Tris、氯化钠、EDTA、PMSF、DTT和亚硫酸氢钠的混合液可防止子宫内膜抗原的降解,防止子宫内膜抗原被氧化或者还原,起到稳定抗原的作用,进一步提高了抗原的纯度。
- [0022] 综上所述,本发明中的制备方法选用牛子宫内膜为原料制备子宫内膜抗原,与现有技术相比原料易得,价格低廉,来源充足,产品生产成本低,工艺操作简单,而且所得抗原对对子宫内膜抗体有很好的特异性和敏感性。

具体实施方式

- [0023] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。
- [0024] 实施例1
- [0025] 子宫内膜抗原的制备
- [0026] (1) 将新鲜牛子宫解剖后,剥取子宫内膜,切成小块后洗净冲洗至无血液残留;称量0.5g的组织小块,加入含有10ml胶原酶的离心管中,37℃恒温摇床上消化过夜,转速为150rpm;
- [0027] (2) 消化液先过250um的筛网,再过40um的筛网,并用等渗生理盐水冲洗数次,获得子宫内膜腺体;
- [0028] (3) 将获得的腺体加到组织匀浆机中,匀浆液为-20℃预冷的50%的丙酮液,此丙酮液已经在-20℃冰箱中预冷30分钟;用组织匀浆机最低档匀浆1分钟后,用普通滤纸过滤(此操作在4℃冰箱中进行),得到过滤物;
- [0029] (4) 将上述过滤物加入20ml缓冲溶液(为0.05M Tris-HCL,0.15M氯化钠,0.01M EDTA,胰蛋白酶抑制剂4ug/ml,亚硫酸氢钠1.5mM,PMSF 1.5mM和DTT1mM的混合液),4℃条件

下电磁搅拌过夜,取混合液在4℃离心机中离心10分钟,转速为10000rpm;

[0030] (5)取上清过0.45um的微孔滤膜后,上ProG亲和层析柱,收集蛋白出峰位置的流出液,浓缩得到子宫内膜抗原。

[0031] 实施例2

[0032] 间接ELISA方法评价子宫内膜抗原的抗原性

[0033] 1.包被:用包被缓冲液(pH9.6的碳酸盐缓冲液)将提取的子宫内膜抗原稀释至一定浓度,以100u1/孔加到酶标反应96孔板中,4℃包被过夜,PBST洗涤五次,吸水纸拍干;

[0034] 2.封闭:取酶标反应96孔板,然后每孔加入200u1封闭液(封闭液为含10%血清的PBS),37℃温育2h,用pH7.4的PBST洗涤五次,吸水纸拍干后待用;

[0035] 3.加入稀释度1:20的临床阳性血清,100u1/孔,同时设阴性对照和空白对照。37℃温育30min后,洗涤,拍干;

[0036] 4.以10%小牛血清的PBS稀释酶标二抗至1:5000,50u1/孔加到孔中,37℃温育20min,后洗涤拍干;

[0037] 5.配置底物缓冲液,加10u1 30%过氧化氢,充分混匀后,100u1/孔加到孔中温育10min,50u1/孔2M硫酸终止反应;

[0038] 6.用酶标仪测定双波长450nm的光密度值(OD值),若样品孔OD值大于等于空白对照孔的2.1倍即为阳性。

[0039] 本专利不局限于上述具体的实施方式,本领域的普通技术人员从上述构思出发,不经过创造性的劳动,所作出的种种变换,均落在本专利的保护范围之内。

专利名称(译)	子宫内膜抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN106841592B	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201710068288.X	申请日	2017-02-08
当前申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
[标]发明人	杨致亭 王好玉 马金环 胡学亭 于刚 王婷		
发明人	杨致亭 王好玉 马金环 胡学亭 于刚 王婷		
IPC分类号	C07K1/14 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	王伟霞		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN106841592A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物学检测技术领域，具体提供了一种制备子宫内膜抗原的方法。本发明提供的方法是将牛的新鲜子宫内膜剥离，多次冲洗后加入胶原蛋白酶使子宫内膜上的胶原蛋白溶解，过筛网冲洗后，收集筛网上的子宫内膜腺体。在提前-20℃冰箱预冷的丙酮中，用组织匀浆器匀浆过滤，4℃电磁搅拌过夜，高速离心后弃沉淀，上清液用ProG亲和吸附柱除去人血清中免疫球蛋白成分，制备成子宫内膜抗原。利用本发明的制备方法原料易得，工艺简便快捷，成本低廉，可满足临床检验的需求。