



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115282934 A

(43) 申请公布日 2022.11.04

(21) 申请号 202210922358.4

(22) 申请日 2022.08.02

(71) 申请人 杭州博岳生物技术有限公司
地址 310018 浙江省杭州市钱塘新区和享
科技中心3幢701、702室

(72) 发明人 章璿 崔春华 李因来

(74) 专利代理机构 北京精翰专利代理有限公司
11921
专利代理师 杨晓丽

(51) Int. Cl.

B01J 20/24 (2006.01)

B01D 15/22 (2006.01)

B01D 15/42 (2006.01)

C07K 14/02 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种纳米抗体荧光亲和柱以及利用该亲和柱纯化HbeAg抗原的方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种纳米抗体荧光亲和柱以及利用该亲和柱纯化HbeAg抗原的方法。所述纳米抗体荧光亲和柱以琼脂糖构建基架,在琼脂糖基架上偶联有含抗His蛋白的纳米抗体,以及荧光基团和/或荧光染料。本发明通过凝胶柱结合特定的含抗His蛋白的纳米抗体,能够实现对目标HbeAg抗原的有效且高效的纯化,减少杂质干扰,纯化效果优异、纯化后检测精度高。

1. 一种纳米抗体荧光亲和柱,其特征在于,
所述纳米抗体荧光亲和柱以琼脂糖构建基架,在琼脂糖基架上偶联有含抗His蛋白的纳米抗体,以及荧光基团和/或荧光染料。
2. 根据权利要求1所述的一种纳米抗体荧光亲和柱,其特征在于,
所述纳米抗体荧光亲和柱采用以下方法进行构建:
通过环氧乙烷基活化方法对琼脂糖凝胶进行活化处理,并通过环氧预活化填料后,通过巯基与配基偶联的方式将含抗His蛋白的纳米抗体偶联指经过活化的琼脂糖凝胶上,通过配基偶联荧光基团再与填料连接的方式构建形成基架;即得到纳米抗体荧光亲和柱。
3. 根据权利要求1或2所述的一种纳米抗体荧光亲和柱,其特征在于,
所述含抗His蛋白的纳米抗体通过哺乳动物表达系统利用噬菌体展示技术获取;
所述噬菌体展示技术获取的具体过程为:
 - 1) 细胞复苏;
 - 2) 细胞转染;
 - 3) 对转染后的细胞进行检测;
 - 4) 细胞计数;
 - 5) 离心取上清。
4. 根据权利要求1或2所述的一种纳米抗体荧光亲和柱,其特征在于,
所述荧光基团包括:FAM或TET;
所述荧光染料包括:藻红蛋白或异硫氰酸荧光素或Gel-Green染料。
5. 根据权利要求1或2所述的一种纳米抗体荧光亲和柱,其特征在于,
所述纳米抗体荧光亲和柱pH值为4~13。
6. 一种纯化HbeAg抗原的方法,其特征在于,
所述方法包括:
取表达的HbeAg样本并将其破碎,取含目的蛋白的上清液,除杂后通过纳米抗体荧光亲和柱进行上样,所述上样流速为1.0mL/min,温度为2~8℃,上样结束后洗脱并收集洗脱液,即完成HbeAg抗原纯化。
7. 根据权利要求6所述的一种纯化HbeAg抗原的方法,其特征在于,
所述除杂包括过滤。
8. 根据权利要求6所述的一种纯化HbeAg抗原的方法,其特征在于,
所述洗脱所用的解离液为2~8mol/L的尿素溶液。
9. 根据权利要求6或8所述的一种纯化HbeAg抗原的方法,其特征在于,
所述洗脱过程连接核算蛋白检测仪,至无蛋白检出即完成洗脱;
所述洗脱过程连接荧光检测仪,利用荧光检测仪检测是否产生配基脱落。
10. 根据权利要求6所述的一种纯化HbeAg抗原的方法,其特征在于,
所述洗脱液进行蛋白凝胶电泳。

一种纳米抗体荧光亲和柱以及利用该亲和柱纯化HbeAg抗原的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种纳米抗体荧光亲和柱以及利用该亲和柱纯化HbeAg抗原的方法。

背景技术

[0002] 乙型肝炎E抗原,英文缩写为HBeAg,是乙肝病毒核心颗粒中的一种可溶性蛋白质。在一般情况下,HBeAg埋藏于HBcAg内部,当HBcAg裂解时,HBeAg从肝细胞核内溶入血清,它的出现迟于HBsAg,而消失却早于HBsAg,所以是人体感染HBV后跟随HBsAg出现的第2个血清学抗原标志物。其具有带His标签的显著识别特征。

[0003] 但现有技术对于纯化带His标签的蛋白首选都是Ni填料,但用Ni填料纯化带His标签的蛋白可能会因为蛋白表达折叠过程中His标签裸露不完全,His标签结合填料不够牢固,Ni柱针对His标签的特异性不够强,导致蛋白在FT中或在低浓度咪唑中会很容易和杂蛋白一起被洗脱下来,这样获得的蛋白纯度较低。另外在用咪唑洗脱时,因为咪唑本身在A280也会有一定的背景吸收峰,无法很直观的判断洗脱下来的溶液中是否含有目的蛋白。

[0004] 因而现有的纯化效果和效率较差,亟待改进。

发明内容

[0005] 为解决现有的HbeAg抗原纯化效果较差,容易引入杂质导致纯度下降等问题,本发明提供了一种纳米抗体荧光亲和柱以及利用该亲和柱纯化HbeAg抗原的方法。

[0006] 本发明的目的在于:

- 一、提供一种能够有效用于HbeAg抗原纯化的亲和柱;
- 二、提高亲和柱的结合特异性和牢固度;
- 三、能够有效识别杂质,确保纯化效果较佳;
- 四、能够有效用于实现HbeAg抗原的纯化,并提高纯化后的检测精度。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案

一种纳米抗体荧光亲和柱,所述纳米抗体荧光亲和柱以琼脂糖构建基架,在琼脂糖基架上偶联有含抗His蛋白的纳米抗体,以及荧光基团和/或荧光染料。

[0008] 作为优选,

所述纳米抗体荧光亲和柱采用以下方法进行构建:

通过环氧乙烷基活化方法对琼脂糖凝胶进行活化处理,并通过环氧预活化填料后,通过巯基与配基偶联的方式将含抗His蛋白的纳米抗体偶联指经过活化的琼脂糖凝胶上,通过配基偶联荧光基团再与填料连接的方式构建形成基架;即得到纳米抗体荧光亲和柱。

[0009] 作为优选,

所述含抗His蛋白的纳米抗体通过哺乳动物表达系统利用噬菌体展示技术获取;

所述噬菌体展示技术获取的具体过程为：

- 1) 细胞复苏；
- 2) 细胞转染；
- 3) 对转染后的细胞进行检测；
- 4) 细胞计数；
- 5) 离心取上清。

[0010] 作为优选，

所述荧光基团包括：FAM或TET；

所述荧光染料包括：藻红蛋白或异硫氰酸荧光素或Gel-Green染料。

[0011] 作为优选，

所述纳米抗体荧光亲和柱pH值为4~13。

[0012] 一种纯化HbeAg抗原的方法，

所述方法包括：

取表达的HbeAg样本并将其破碎，取含目的蛋白的上清液，除杂后通过纳米抗体荧光亲和柱进行上样，所述上样流速为1.0mL/min，温度为2~8℃，上样结束后洗脱并收集洗脱液，即完成HbeAg抗原纯化。

[0013] 作为优选，

所述除杂包括过滤。

[0014] 作为优选，

所述洗脱所用的解离液为2~8mol/L的尿素溶液。

[0015] 作为优选，

所述洗脱过程连接核算蛋白检测仪，至无蛋白检出即完成洗脱；

所述洗脱过程连接荧光检测仪，利用荧光检测仪检测是否产生配基脱落。

[0016] 作为优选，

所述洗脱液进行蛋白凝胶电泳。

[0017] 由于现有的Ni填料柱在纯化HbeAg抗原时，Ni柱对于His标签的特异性捕集效果相对较弱，捕集效果较差，实际纯化过程中容易导致HbeAg损失而导致漏检，具体使用时相当于提高了检测阈值，无法有效实现患病早期的HbeAg抗原检测，并且配合Ni柱洗脱时需要采用咪唑，咪唑洗脱产生了较大的背景噪音，容易出现假阳性等问题。而本发明通过采用特定的方式，制备了一种凝胶柱。本发明凝胶柱能够十分有效地结合含抗His蛋白的纳米抗体，其对His标签的特异性捕集、富集效果显著优于Ni柱，并且能够减少杂质干扰，大大降低了纯化HbeAg抗原时的纯化阈值，实际使用时相当于降低了检测阈值，能够实现更有效、更广泛的检测。

[0018] 且对于本发明技术方案而言，以尿素进行洗脱，能够减少洗脱液产生的背景噪音干扰，与此同时，本发明通过对纯化柱的荧光化，能够以荧光检测仪检测配基，以减少、避免配基脱落对检测结果产生的干扰，提高检测精度。

[0019] 本发明的有益效果在于：

本发明通过凝胶柱结合特定的含抗His蛋白的纳米抗体，能够实现对目标HbeAg抗原的有效且高效的纯化，减少杂质干扰，纯化效果优异、纯化后检测精度高。

具体实施方式

[0020] 以下结合具体实施例对本发明作出进一步清楚详细的描述说明。本领域普通技术人员在基于这些说明的情况下将能够实现本发明。此外,下述说明中涉及到的本发明的实施例通常仅是本发明一部分的实施例,而不是全部的实施例。因此,基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

[0021] 如无特殊说明,本发明实施例所用原料均为市售或本领域技术人员可获得的原料;如无特殊说明,本发明实施例所用方法均为本领域技术人员所掌握的方法。

[0022] 实施例1

一种纳米抗体荧光亲和柱,所述纳米抗体荧光亲和柱以琼脂糖构建基架,在琼脂糖基架上偶联有含抗His蛋白的纳米抗体,以及荧光基团和/或荧光染料;

具体的,所述纳米抗体荧光亲和柱采用以下方法进行构建:

将质量比为3:1的环氧氯丙烷与琼脂糖凝胶混合,并在1h内匀速滴加与环氧氯丙烷等体积的50wt%NaOH溶液,于70℃条件下反应3h即实现通过环氧乙烷基对琼脂糖凝胶的活化得到活化基质,将活化基质填充在管状载体中,取巯基乙酸、去离子水和过硫酸铵浸润活化基质,所述巯基乙酸、去离子水、过硫酸铵和活化基质的用量比为1.5mL:10mL:0.3g:10mL,于60℃条件下反应8h,去除溶剂后依次用30wt%丙酮溶液、70wt%丙酮溶液和100wt%丙酮溶液清洗,再以100wt%二氧六环清洗3次,得到中间体基质,最后向中间体基质中加入二氧六环、N-羟基丁二酰亚胺和含抗His蛋白的纳米抗体的上清液浸润,所述二氧六环、N-羟基丁二酰亚胺、含抗His蛋白的纳米抗体的上清液和中间体基质的用量比为10mL:0.5g:0.5g:10mL,于25℃条件下振荡12h反应,即实现将含His蛋白的纳米抗体偶联至琼脂糖凝胶上,得到抗体偶联凝胶,随后再以1mL:10mL:10mL的比例将Gel-Green染料、去离子水和抗体偶联凝胶混合,对抗体偶联凝胶进行浸润和染色,最后依次以100wt%二氧六环清洗3次、100wt%甲醇清洗3次和100wt%丙酮清洗3次,即得到纳米抗体荧光亲和柱。

[0023] 其中,所述含抗His蛋白的纳米抗体通过哺乳动物表达系统利用噬菌体展示技术获取;所述噬菌体展示技术获取的具体过程为:

- 1) 细胞复苏;
- 2) 细胞转染;
- 3) 对转染后的细胞进行检测;
- 4) 细胞计数;
- 5) 离心取上清。

[0024] 所述含抗His蛋白的纳米抗体也可以通过直接采购现有的His-tag抗体配制,配制所得的含抗His蛋白的纳米抗体溶液浓度至5000~50000IU/mL。

[0025] 对本实施例所制得的纳米抗体荧光亲和柱的pH值进行检测,所述纳米抗体荧光亲和柱pH值符合4~13的标准。

[0026] 实施例2

一种纯化HbeAg抗原的方法,取表达HbeAg的大肠杆菌,将其破碎后取1mL上清液,滤布过滤去除固体杂质后,于4℃条件下以1.0mL/min的流速上样,将其通过实施例1所制得的纳米抗体荧光亲和柱(填料体积为10mL),随后以2mol/L的尿素水溶液洗脱,洗脱过程中

连接至核酸蛋白检测仪和荧光检测仪,至无蛋白检出即完成洗脱,若出现荧光反应则判定洗脱过程产生配基脱落,收集洗脱完成且无荧光反应(配基脱落)的洗脱液样品,对其进行凝胶电泳分析计算上清液中的HbeAg抗原蛋白含量,进行20次上述纯化和凝胶电泳分析试验,并取20次计算结果均值记录为 $C(HbeAg)_1$ 。

[0027] 取上述相同的1mL上清液,以Abbott ARCHITECT i2000发光免疫分析仪对上清液中HbeAg抗原蛋白含量进行检测,取20次检测结果均值记录为 $C(HbeAg)_2$ 。

[0028] 以 $C(HbeAg)_2$ 作为标准结果,计算结果偏差Rb。

[0029] 所述结果偏差的计算式为:

$$Rb = \frac{|C(HbeAg)_1 - C(HbeAg)_2|}{C(HbeAg)_2} \times 100\%$$

计算结果显示, $Rb < 0.1\%$ 。表明本发明纯化能够非常有效且高效地分离纯化HbeAg抗原蛋白,用于进行简洁高效且低成本的凝胶电泳含量分析,且能够有效提高凝胶电泳含量分析的检测精度。

[0030] 对比例1

一种纯化HbeAg抗原的方法,取表达HbeAg的大肠杆菌,将其破碎后取1mL上清液,滤布过滤去除固体杂质后,于4℃条件下以1.0mL/min的流速上样,将其通过常规用于HbeAg抗原蛋白分离的Ni柱,随后以2.0mol/L咪唑水溶液洗脱,收集洗脱完成的洗脱液样品,对其进行凝胶电泳分析计算上清液中的HbeAg抗原蛋白含量,进行20次上述纯化和凝胶电泳分析试验,取20次计算结果均值记录为 $C(HbeAg)_1'$ 。

[0031] 以实施例2所得的 $C(HbeAg)_2$ 作为标准结果,计算结果偏差 Rb' 。

[0032] 所述结果偏差的计算式为:

$$Rb' = \frac{|C(HbeAg)_1' - C(HbeAg)_2|}{C(HbeAg)_2} \times 100\%$$

计算结果显示, $Rb' = 2.82\%$,出现较大的结果偏差,并且20次试验中出现较大的偏差,主要原因在于咪唑干扰,产生了较大的检测误差。

[0033] 实施例3

一种纯化HbeAg抗原的方法,配制500IU/mL的HbeAg抗原蛋白溶液作为测试样,取1mL于4℃条件下以1.0mL/min的流速上样,将其通过实施例1所制得的纳米抗体荧光亲和柱(填料体积为10mL),随后以2mol/L的尿素水溶液洗脱,洗脱过程中连接至核酸蛋白检测仪和荧光检测仪,至无蛋白检出即完成洗脱,若出现荧光反应则判定洗脱过程产生配基脱落,收集洗脱完成且无荧光反应(配基脱落)的洗脱液样品,对其进行凝胶电泳分析计算上清液中的HbeAg抗原蛋白含量,进行20次上述纯化和凝胶电泳分析试验,并取20次计算结果均值记录为 $C(HbeAg)_3$ 。

[0034] 一种纯化HbeAg抗原的方法,

配制500IU/mL的HbeAg抗原蛋白溶液作为基样,取1mL与100μL可疑干扰物(黄疸和类风湿因子阳性样本以1:1混合,500IU/mL)混合作为测试样,于4℃条件下以1.0mL/min的流速上样,将其通过实施例1所制得的纳米抗体荧光亲和柱(填料体积为10mL),随后以2mol/L的尿素水溶液洗脱,洗脱过程中连接至核酸蛋白检测仪和荧光检测仪,至无蛋白检出即完成洗脱,若出现荧光反应则判定洗脱过程产生配基脱落,收集洗脱完成且无荧光反

应(配基脱落)的洗脱液样品,对其进行凝胶电泳分析计算上清液中的HbeAg抗原蛋白含量,进行20次上述纯化和凝胶电泳分析试验,并取20次计算结果均值记录为C(HbeAg)₄。

[0035] 以C(HbeAg)₃作为标准结果,计算结果偏差Rb''。

[0036] 所述结果偏差的计算式为:

$$Rb'' = \frac{|C(HbeAg)_4 - C(HbeAg)_3|}{C(HbeAg)_3} \times 100\%$$

计算结果显示,Rb'' < 0.1%,可以看出本发明亲和柱以及纯化方法能够非常有效地克服可疑干扰物对测试结果的干扰,亲和柱对于含His标签的抗原蛋白(HbeAg抗原蛋白)具有非常高的特异性和分离效果,可以有效分离并纯化HbeAg抗原蛋白。

[0037] 通过上述各例及测试结果可以看出,本发明通过凝胶柱结合特定的含抗His蛋白的纳米抗体,能够实现对目标HbeAg抗原的有效且高效的纯化,减少杂质干扰,纯化效果优异、纯化后检测精度高。