



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104844685 B

(45)授权公告日 2018.10.16

(21)申请号 201510320920.6

WO 03033695 A1,2003.04.24,

(22)申请日 2015.06.12

CN 102942627 A,2013.02.27,

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 尹军团

申请公布号 CN 104844685 A

(43)申请公布日 2015.08.19

(73)专利权人 中国科学院植物研究所

地址 100093 北京市海淀区香山南辛村20
号新实验楼E222室

(72)发明人 田世平 秦国政 王豫颖

(51)Int.Cl.

C07K 1/22(2006.01)

(56)对比文件

CN 103333252 A,2013.10.02,

CN 102407098 A,2012.04.11,

CN 102660569 A,2012.09.12,

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种变性抗原亲和纯化抗体方法

(57)摘要

本发明涉及一种抗原亲和纯化抗体的新方法,其在制备抗原层析柱过程中,先将抗原在含尿素的介质中与固相载体发生偶联;随后将尿素浓度逐渐降低,使与固相物相连的抗原实现“原位复性”,从而保证了后续抗体亲和纯化过程在水溶液介质中完成。本发明的有益效果是,可以将变性抗原蛋白(如原核表达的包涵体蛋白)直接偶联在固相载体以纯化抗体,简化了操作步骤,即制备可溶性抗原蛋白过程。该方法可操作性强,耗费低廉,所得抗体具有极高的纯度和特异性,适合于实验室制备和工业生产中应用。

1. 一种变性抗原亲和纯化抗体方法,其特征在于:

在制备抗原层析柱过程中,先将不溶性抗原蛋白溶解于含6M尿素的磷酸缓冲液,即偶联缓冲液中,再用20~40 μ l的5M氰基硼氢化钠和1M NaOH的偶联剂将1~2ml的8~10mg/ml的抗原蛋白连接在2ml的AminoLink Coupling Resin固相载体上,随后用含有梯度浓度6M、4M、2M、1M、0.5M和0M的尿素的洗涤液洗去未结合的抗原和偶联剂,完成抗原层析柱制备,进而使后续抗体亲和过程在水溶液介质中完成。

2. 根据权利要求1中所述的变性抗原亲和纯化抗体方法,其特征在于:

所述的偶联缓冲液中包含0.1M PB pH7.4,6M尿素;

所述的洗涤液中包括1M NaCl,梯度浓度6M、4M、2M、1M、0.5M和0M尿素。

3. 根据权利要求1中所述的变性抗原亲和纯化抗体方法,其特征在于:该方法适用于应用变性抗原蛋白亲和纯化抗体。

4. 根据权利要求1中所述的变性抗原亲和纯化抗体方法,其特征在于:所述方法的步骤如下:

1) 抗原制备:

将纯化的抗原蛋白溶解在含尿素的偶联缓冲液中,利用超滤管将抗原蛋白浓缩至浓度为8-10mg/ml⁻¹;

2) 抗原与固相载体的偶联:

将固相载体装载于层析管中,加入浓缩的抗原溶液和偶联剂,室温旋转孵育4小时,再用含梯度降低浓度尿素的洗涤液淋洗,从而完成抗原柱制备;

3) 样本准备:

取待纯化的抗体混合物,用0.1M PB,pH7.4的磷酸缓冲液按照1:1-1:3体积比进行稀释;

4) 抗体纯化:

将稀释后的样本载入制备好的抗原柱孵育1小时,然后用0.1M PB,pH7.4的磷酸缓冲液洗涤,最后用pH2.5-3.0的甘氨酸-盐酸缓冲液进行抗体洗脱,洗脱下来的抗体分管收集。

一种变性抗原亲和纯化抗体方法

技术领域

[0001] 本发明是一种以变性抗原偶联固相载体反应为主要创新点的抗体亲和纯化的技术方案,尤其适用于应用原核表达制备的不溶性蛋白为抗原的多克隆抗体纯化,属于抗体亲和纯化技术领域。

背景技术

[0002] 抗体纯化的方法有很多,早先人们采用盐析法,后来又发展为离子交换层析的方法,目前较为常用的方法是应用Protein A(A型金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白)、G(G型金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白)、A/G或抗原本身偶联至活化的基质上进行抗体亲和纯化。相比较,应用抗原亲和纯化获得的抗体亲和力好、特异性强、纯度高,较好的适用于后续分子免疫生物学实验。

[0003] 在抗原亲和纯化抗体过程中,纯化的抗原蛋白在偶联剂(如氰基硼氢化钠、溴化氢)催化下共价连接在活化的固相载体(如琼脂糖beads)上,抗体混合物中能与该抗原特异结合的抗体被吸附在固相载体上,最后特异抗体被洗脱收集获得。在此过程中,影响抗体特异性的主要因素是抗原的浓度和纯度。

[0004] 为了保证抗原蛋白浓度和纯度,目前多采用PET原核细胞表达系统并结合多种纯化方式来获得高纯度的抗原蛋白。该系统的主要特点是目的蛋白表达量大,通常可以占到细菌总蛋白的50%以上。超量表达的目的蛋白,在大肠杆菌中主要以不溶的包涵体形式存在,不易被蛋白酶和机械外力所降解,同时易于被分离和纯化,有利于保证蛋白完整性和纯度。但在抗原亲和纯化抗体的第一步反应,即抗原偶联固相载体的反应中,抗原蛋白通常是可溶的。因此,作为抗原蛋白的包涵体在反应液中也必须是可溶的。目前多采用的策略是将包涵体蛋白先溶解在变性剂(如尿素、盐酸胍)中,随后在进行偶联反应前将变性蛋白复性,使之溶解于水溶液,再进行抗原偶联和抗体纯化反应;极少数案例将抗原偶联反应和后续抗体纯化过程均处于变性剂条件下进行。但由于大多包涵体在水溶液中难以复性,以及抗体活性容易受到变性剂破坏的原因,应用变性抗原蛋白(如包涵体)亲和纯化抗体的技术一直是个难点。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于避免现有方法在抗原亲和纯化抗体前必须制备可溶性抗原或将不溶性抗原在水溶液中复性等繁杂技术,提供一种变性抗原偶联固相载体的方法,操作简便,耗费低廉,实验室条件要求不高,相对省时省力。该方案纯化所得的多克隆抗体特异性和纯度很高,可以适用于各类分子免疫学实验。

[0006] 本发明采用的技术方案是:

[0007] 在抗原偶联固相载体的过程中,先将不溶性抗原溶解于含6M尿素的磷酸缓冲液,即偶联缓冲液中,再用偶联剂将抗原连接在固相载体上,随后用含有梯度浓度尿素(6M、4M、2M、1M、0.5M和0M)的洗涤液洗去未结合的其它物质,完成抗原-层析柱制备。在此过程中,抗

原在含尿素的介质中与固相载体发生偶联;随后随着尿素浓度逐渐降低至零,与固相物相连的抗原实现“原位复性”,从而保证了后续抗体亲和纯化过程在水溶液介质中完成。

[0008] 本发明包括的实验步骤如下:

[0009] 1) 抗原制备:构建PET原核表达载体在大肠杆菌BL21 (DE3) 中过量表达抗原蛋白,分离纯化抗原蛋白,将纯化的抗原蛋白溶解在偶联缓冲液(0.1M PB, pH7.4, 6M尿素)中,利用超滤管将抗原蛋白离心浓缩至浓度为 $8\sim 10\text{mg}/\text{ml}^{-1}$ 。

[0010] 2) 抗原与固相载体的偶联:将固相载体装载于层析管中,先用偶联缓冲液洗涤2次,再加入浓缩的抗原溶液和偶联剂,扣紧层析管的顶盖和底帽,室温旋转混匀4小时以上。此时固相载体上的羧基或醛基在偶联剂的催化下与抗原上的氨基共价连接,使抗原“牢固”的连接在固相载体上。再用洗涤液(1M NaCl, 并含依次浓度为6、4、2、1、0.5和0M尿素)淋洗,以除去多余的偶联剂和未发生反应的抗原蛋白,以及使抗原“原位复性”,从而完成抗原柱制备。

[0011] 3) 样本准备:取待纯化的抗体混合物,用磷酸缓冲液(0.1M PB, pH7.4)按照1:1~1:3体积比进行稀释。

[0012] 4) 抗体纯化:将稀释后的样本载入制备好的抗原层析柱孵育1小时,然后用磷酸缓冲液(0.1M PB, pH7.4)洗涤,最后用甘氨酸-盐酸缓冲液(pH2.5~3.0)进行抗体洗脱。将洗脱下来的抗体分管收集。

[0013] 5) 抗原柱的保存:用贮存液(0.1M PB pH7.4, 0.05%NaN₃)淋洗纯化抗体后的抗原柱,扣紧层析管的顶盖和底帽,保存于4℃,可重复用于抗体纯化。

[0014] 6) 抗体检测:利用紫外分光光度计、SDS-PAGE电泳、免疫印迹反应(Western-blot)和免疫共沉淀实验(co-immunoprecipitation, Co-IP)检测纯化抗体的浓度、纯度、效价和活性。

[0015] 本发明的有益效果是,可以在抗原亲和纯化抗体过程中将变性抗原蛋白(如原核表达的包涵体蛋白)直接偶联在固相载体以纯化抗体,简化了操作步骤,即制备可溶性抗原蛋白过程,节约材料、仪器及耗材等成本。本发明的变性抗原亲和纯化洗脱体系可在实验室制备及生命科学研究中为操作者提供可操作性强的实验方法,为抗体制备工艺改进提供帮助。

附图说明:

[0016] 图1为实施例中SDS-PAGE电泳检测抗原的偶联反应;

[0017] 其中上样液为偶联反应载入的抗原蛋白,6M~0M Wash为偶联反应后用含梯度降低浓度的尿素洗涤下来的抗原蛋白。

[0018] 图2为实施例中SDS-PAGE电泳检测纯化抗体的纯度;

[0019] 其中1~4为洗脱液1洗脱下来的抗体,5~8为洗脱液2洗脱下来的抗体。

[0020] 图3为实施例中Western-blot检测抗体活性;

[0021] 其中M为分子量Marker,1~4分别为番茄不同成熟度果实(绿熟、破色、粉红和红熟期)的细胞核蛋白。

[0022] 图4为实施例中Co-IP检测抗体活性

[0023] 其中M为分子量Marker, Input为未加入抗体前细胞核溶液,上清为加入抗体和

Protein A-beads孵育后的细胞核溶液,洗液1~2为洗Beads的洗液,Beads为Protein A-beads-抗体复合物。

具体实施方式

[0024] 实施实例

[0025] 为了更好地理解本发明,本实施例应用变性抗原亲和纯化抗体的方法从兔多克隆抗体中获得DOF纯化抗体,并用所获得的抗体检测番茄果实内源DOF蛋白的表达以及纯化抗体与内源DOF蛋白的免疫结合能力,验证变性抗原纯化抗体体系在工艺过程中是可行的。

[0026] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0027] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0028] 1材料

[0029] 1.1主要实验设备及耗材

[0030] 1) 固相树脂:AminoLink Coupling Resin,50%Slurry (Thermo公司)

[0031] 1) 层析柱子:规格5ml (Millipore公司)

[0032] 2) 旋转混合仪

[0033] 3) 北京六一垂直电泳仪

[0034] 4) 超速冷冻离心机

[0035] 5) PVDF膜

[0036] 6) 半干转仪

[0037] 2方法

[0038] 2.1溶液配制

[0039] 偶联缓冲液:0.1M PBS,pH7.4,6M尿素;

[0040] 偶联剂:5M氰基硼氰化钠,1M NaOH;

[0041] 洗涤液:1M NaCl,6M(4、2、1、0.5和0M) 尿素;

[0042] 贮藏缓冲液:0.1M PBS pH7.4,0.05%NaN₃;

[0043] 洗脱液1:0.1M glycine-HCl,pH3.0;

[0044] 洗脱液2:0.2M glycine-HCl,pH2.5;

[0045] 中和液:1M Tris-HCl,pH9.0,0.5%NaN₃;

[0046] 2.2实验方法

[0047] 2.2.1抗原制备

[0048] 克隆番茄DOF(基因编号ITAG:Solyc01g096120.2.1)序列,连入pET原核表达载体PET30a,转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株。原核表达的诱导条件和分析方法参照PET系统操作手册(Novagen公司)。包涵体分离和目的蛋白纯化的方法参考柱亲和层析试剂盒操作指南(Novagen公司)。用截留体积为30kD的超滤管离心浓缩纯化蛋白,使其浓度达到8-10mg ml⁻¹。

[0049] 2.2.2兔多抗血清制备

[0050] 将2.2.1步骤中的2~3mg纯化DOF蛋白用SDS-PAGE进一步分离,切取含有目的条带的胶条,在液氮中研磨成粉末,加入适量的PBS溶解释放目的蛋白。然后,将目的蛋白分3~4次免疫家兔。免疫成功后,取兔子全血,先室温放置2小时左右,再在4℃放置过夜,最后离心

(4℃, 5000rpm, 10min) 提取多抗血清。

[0051] 2.2.3 抗体纯化

[0052] 1) 抗原偶联

[0053] 取2ml固相载体装载于层析柱, 自然沉降, 再用2~3ml偶联缓冲液淋洗, 以平衡柱子。取2.2.1步骤制备的抗原浓缩液1~2ml和偶联剂20~40 μ l载入层析柱, 扣紧层析管的顶盖和底帽, 室温旋转孵育4小时以上, 打开底帽以排出柱内液体。依次加入含梯度尿素浓度(依次为6M、4M、2M、1M、0.5M、0M)的洗涤液洗除偶联剂和未偶联的蛋白。每个梯度洗涤液用2ml。

[0054] 2) 抗原柱保存

[0055] 加入3ml贮藏缓冲液, 打开层析柱底帽, 当液体流出距离上沿半个体积的时候, 扣上底帽和顶盖。垂直放在4℃保存或者直接进入下面的亲和纯化步骤。

[0056] 3) 抗体纯化

[0057] 样品准备: 取2.2.2步骤制备的兔多抗血清1ml, 用0.1M磷酸缓冲液(pH7.4)按1:1~1:3的比例进行稀释, 再用0.45 μ m滤器进行过滤。

[0058] 上样: 将偶联好的抗原柱从4℃取出平衡至室温, 打开层析管顶盖和底帽将贮藏液排出。用3ml磷酸缓冲液平衡, 排出。将样品(2~3ml)载入层析柱, 待全部样品进柱后, 扣紧层析管的盖子和底帽, 室温孵育1小时。随后打开盖子和底帽, 将液体排出。

[0059] 洗涤和洗脱: 先加入6ml磷酸缓冲液洗涤柱子, 排出。再依次分别加入4ml的洗脱液1和2洗脱抗体。其中, 按每0.2~0.5ml为1管进行收集, 收集管内提前加入的50 μ l的中和液。

[0060] 4) 抗原柱保存

[0061] 抗体洗脱后的层析柱立即加入8ml的磷酸缓冲液, 去除残留的蛋白并恢复柱子的活性。最后加入4ml的贮存缓冲液平衡, 并放4℃保存。

[0062] 2.2.4 抗体纯度和活力检测

[0063] 1) 浓度测定

[0064] 用紫外分光光度计在OD280检测。

[0065] 2) SDS-PAGE电泳分析

[0066] 电泳采用12%的分离胶, 5%浓缩胶分离抗体, 考马斯亮蓝染色, 电泳过程采用恒压100V。

[0067] 3) Western-blot分析

[0068] 提取不同成熟度番茄果实的细胞核蛋白, 取10 μ g进行SDS-PAGE电泳, 利用电转法将蛋白转移到PVDF膜上(电流34mA, 转膜1h)。随后将膜先在封闭液(0.01mM PBS, 0.05% Tween20, 0.1% BSA)中室温孵育2小时, 再加入5 μ g纯化抗体继续孵育1小时, 然后用洗液(0.01mM PBS, 0.05% Tween20)洗膜3次。加入HRP标记的羊抗兔二抗, 然后再洗膜3次。最后覆盖2ml BCIP/NBT显色液, 孵育3min, 在暗室压片曝X光片, 洗片扫描。

[0069] 4) Co-IP分析

[0070] 提取番茄果实细胞核, 加入IP缓冲液(25mM Tris-HCl pH7.4, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 5% glycerol和1M PMSF)超声破碎(功率30%), 然后在4℃20000g离心10分钟获得细胞核裂解液。加入5~10 μ g纯化抗体在4℃过夜孵育, 再加入偶联有Protein A蛋白的琼脂糖树脂20~30 μ l在4℃孵育1小时, 200~300g离心收集树脂。用IP缓冲液淋洗后, 向

树脂中加入SDS蛋白上样缓冲液(0.3M Tris-HCl pH6.8,5%SDS,50%glycerol,0.1%Bromophenol bluer)并在沸水中煮10分钟,随后利用SDS-PAGE电泳分离,最后用2.2.2.3步骤的Western-blot分析。

[0071] 3实验结果

[0072] 3.1SDS-PAGE电泳检测抗原的偶联反应,如图1所示:

[0073] 通过电泳结果分析,偶联反应后用洗液淋洗时,仅有少量抗原蛋白被洗液洗下来,说明偶联反应发生的较为充分,大部分抗原蛋白被连接在固相载体上;随着洗液中尿素浓度的降低,没有抗原蛋白被洗下来,说明变性抗原与固相载体结合“牢固”,并实现了“原位变性”。

[0074] 3.2纯化的抗体浓度

[0075]

洗脱管编号	OD280	体积(μ l)
1-1	0.2578	500
1-2	0.4197	500
1-3	1.0502	500
1-4	0.4192	500
2-1	0.2941	500
2-2	0.1336	500
2-3	0.1991	500
2-4	0.1301	500

[0076] 小结:通过洗脱蛋白的浓度来看,随着洗脱液的依次加入,抗体洗脱的浓度呈现由低到高再降低的变化趋势,符合正态分布,说明洗脱液能够有效从抗原柱洗脱下来。

[0077] 3.3SDS-PAGE电泳检测纯化抗体的纯度,如图2所示:

[0078] 通过电泳结果分析,洗脱液1和2均能洗脱下出特异抗体,抗体除了包含明显的重链和轻链外,存在少量非特异条带。其中,洗脱液2获得的抗体杂带较少,抗体纯度达到95%以上,更适合后续较高纯度要求的分子免疫试验。

[0079] 3.3Western-blot检测抗体活性:

[0080] 如图3所示,免疫印迹呈现单一条带,且条带大小正确,印迹信号强弱趋势与DOF蛋白在果实不同发育期的量的变化相一致,说明应用变性抗原亲和纯化抗体方法获得的抗体特异性很强,能够识别番茄细胞核蛋白中的内源DOF蛋白。

[0081] 3.4Co-IP检测抗体活性:

[0082] 如图4所示,加入抗体和Protein A-beads孵育后的细胞核溶液中DOF蛋白明显减少,而在抗体-Protein A-beads复合物中出现了明显的DOF蛋白条带。说明应用变性抗原亲和纯化抗体方法获得的DOF抗体对果实细胞核内正常状态下的抗原蛋白具有很好的识别和亲和能力。

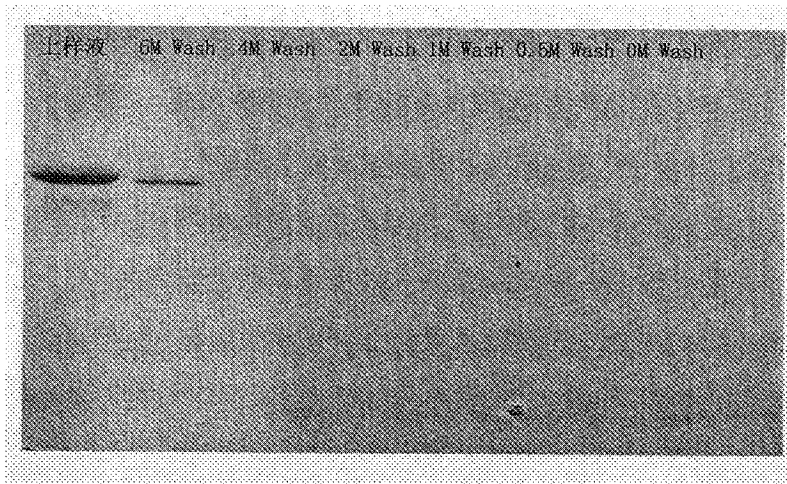


图1

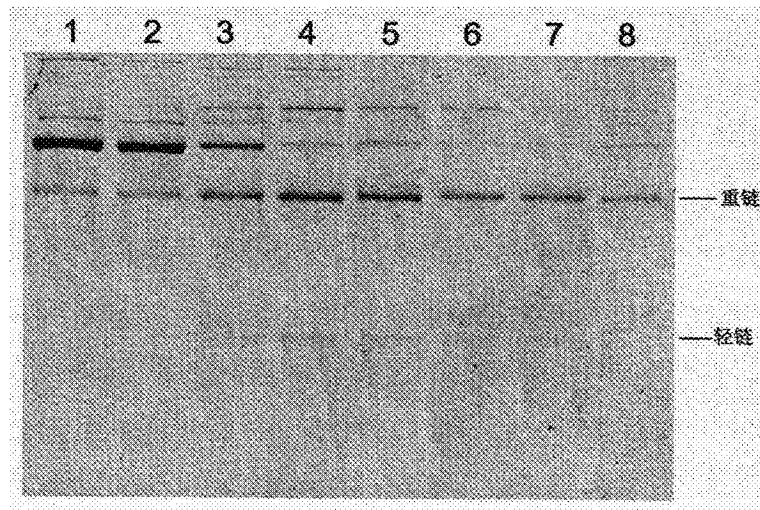


图2

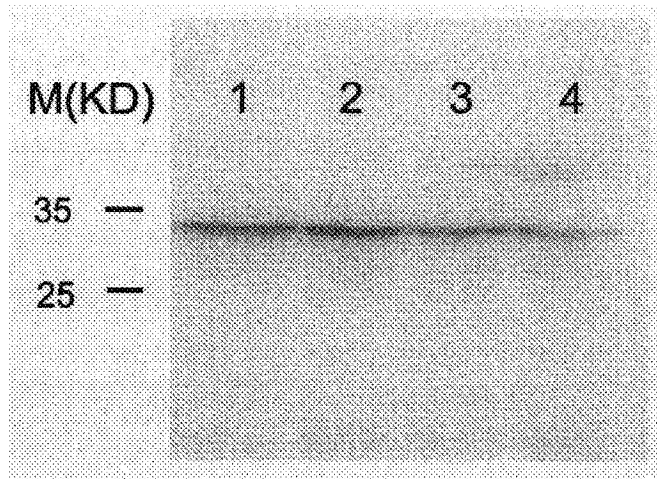


图3

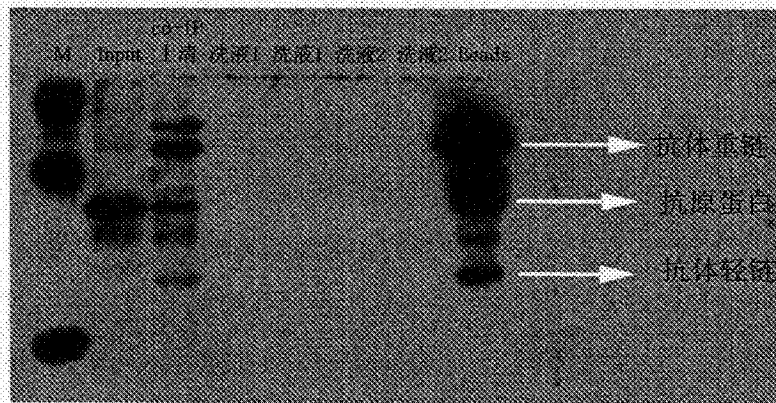


图4