



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102353784 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 15

(21) 申请号 201110187475. 2

(22) 申请日 2011. 07. 06

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 王利兵 胥传来 孙凤霞 刘丽强
匡华 宋姗姗

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

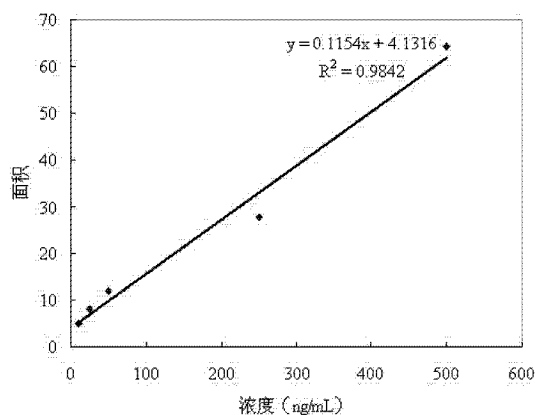
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱及用其净化三聚氰胺的方法

(57) 摘要

净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱及用其净化三聚氰胺的方法,属于免疫亲和层析及三聚氰胺检测技术领域。本发明为一种净化三聚氰胺的试剂盒,由净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱,三聚氰胺标准溶液,淋洗液,洗脱液,再生液,平衡保存液和海绵托架所组成;所述净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱是将三聚氰胺单克隆抗体包埋于固相载体上而后作为填料装柱而成;经样品前处理和免疫层析处理后,所得净化三聚氰胺溶液用于后续仪器分析样品中三聚氰胺含量。本发明的免疫亲和色谱柱具有高选择性,且方法操作简单,净化效果好,避免杂质对测定结果产生的干扰,免疫亲和色谱柱可重复使用,降低分析成本和环境污染。



1. 一种净化三聚氰胺的试剂盒,其特征在于由净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱,三聚氰胺标准溶液,淋洗液,洗脱液,再生液,平衡保存液和海绵托架所组成;

所述净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱是将三聚氰胺单克隆抗体包埋于固相载体上而后作为填料装柱而成;

所述的三聚氰胺单克隆抗体是以三聚氰胺为半抗原与载体蛋白偶联而成的完全抗原为免疫原得到的三聚氰胺鼠单克隆抗体;

所述固相载体为四甲氧基硅烷;

所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白;

所述淋洗液为 0.01M, pH7.4, 含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液;

所述洗脱液为甲醇-甘氨酸盐酸溶液,甲醇:甘氨酸盐酸溶液 v:v 为 1:1;甘氨酸盐酸溶液为甘氨酸 7.5g, 12mol/L HCL 10mL, 用高纯水定容至 500mL; 甲醇 500mL;

所述再生液为含 0.01% 叠氮钠、含 0.05% Tween-20 的 0.01M, pH7.4 的 PBS 溶液;

所述平衡保存液为 0.01M, pH7.4 的 PBS 溶液。

2. 一种用权利要求 1 所述的净化三聚氰胺的试剂盒净化样品中三聚氰胺的方法,其特征在于步骤为:

1)样品的前处理:参照国家标准 GB/T 22388-2008:称取 1g 的奶粉样品于 50mL 塑料离心管中,加入 8mL 三氯乙酸和 2mL 乙腈,超声提取 10min,再震荡提取 10min,然后以不低于 4000r/min 离心 10min,取上清液,经三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤,取滤液;

2)净化:免疫亲和色谱柱使用前用 10mL 的 PBS 平衡保存液平衡;然后将步骤 1)得到的滤液通过所述的免疫亲和色谱柱层析;然后用所述的淋洗液及超纯水洗涤,再用所述的洗脱液洗脱,收集洗脱液经 0.22 μ m 孔径的聚四氟乙烯膜过滤后即得到净化的三聚氰胺溶液,用于后续仪器分析样品中三聚氰胺含量。

净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱及用其净化三聚氰胺的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种三聚氰胺免疫亲和色谱柱的制备和使用方法,属于免疫亲和层析及三聚氰胺检测技术领域。

背景技术

[0002] 近年来频频发生的在食品和饲料中违法添加三聚氰胺而导致的中毒事件引起了广泛的关注。尤其是 2008 年我国的三鹿奶粉事件使得食品安全问题成为国家和人民关注的新焦点。三聚氰胺(MEL)是一种用途广泛的有机化工原料,其主要用途是用来生产三聚氰胺甲醛树脂,用以制造涂料、模塑粉、装饰面板等。目前,对奶粉等食品中蛋白质的测试方法通常采用“凯氏定氮法”,其原理是通过测出总含氮量来间接推算出蛋白质的含量。三聚氰胺分子含氮量高达 66%,最重要的是,三聚氰胺是一种无色,无味的白色结晶粉末,掺杂后不易被发现,而且成本低廉,在巨大利益的驱动下,三聚氰胺这一化工原料被一些不法商贩添加到奶粉及其他食品中以牟取暴利。

[0003] 毒理学研究表明,三聚氰胺是一种低毒或微毒的化学物质,但如果长期摄入会对动物泌尿系统造成损害,其作用的靶器官为肾脏,从而导致膀胱癌和结石的发生。其机理在于三聚氰胺和其水解产物三聚氰酸在肾脏可形成一种不溶于水的大分子的网络结构复合物,这种复合物不能透过肾小球,当沉积下来后就会形成结石,造成肾小管的物理性阻塞,尿液无法排出,最终导致肾结石甚至肾脏衰竭,这也与 2008 年的“三鹿奶粉事件”中那些受害婴儿所表现的“肾结石”症状相一致。

[0004] 目前,三聚氰胺的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱质谱法(GC-MS)、液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS)等,但这些方法前处理过程均比较繁琐,如 GC 法需要衍生化,过程复杂,后经常规的 SPE 柱净化和分离,存在着净化效果差,有机溶剂掺杂,所需时间长等缺点。免疫亲和技术是 90 年代在分析领域发展起来的新技术,免疫亲和柱(IAC)是利用免疫亲和层析原理制作的分离分析预装柱,由于抗原与抗体作用的高度特异性,待测样品通过 IAC 柱后能有效,快速,灵敏,准确的去除绝大部分杂质从而净化富集目标物。但是,用免疫亲和柱净化基质中的三聚氰胺未见报道,更无商品化的 IAC 柱出售。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱,及由其为主组成的净化三聚氰胺的试剂盒,得到被测样品中所含的净化的三聚氰胺溶液,用于后续仪器分析样品中三聚氰胺含量。

[0006] 本发明的技术方案:一种净化三聚氰胺的试剂盒,由净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱,三聚氰胺标准溶液,淋洗液,洗脱液,再生液,平衡保存液和海绵托架所组成;

所述净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱是将三聚氰胺单克隆抗体包埋于固相载体上而

后作为填料装柱而成；

所述的三聚氰胺单克隆抗体是以三聚氰胺为半抗原与载体蛋白偶联而成的完全抗原为免疫原得到的三聚氰胺鼠单克隆抗体；

“一种三聚氰胺人工抗原的合成方法”已获中国专利 ZL200810234130.6, 授权公告号 CN101402683B, 公告日 2011 年 3 月 30 日。

[0007] 所述固相载体为四甲氧基硅烷(TMOS)；

所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白；

所述淋洗液为 0.01M, pH7.4, 含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液；

所述洗脱液为甲醇-甘氨酸盐酸溶液, 甲醇:甘氨酸盐酸溶液 v:v 为 1:1; 甘氨酸盐酸溶液为甘氨酸 7.5g, 12mol/L HCL 10mL, 用高纯水定容至 500mL, 甲醇 500mL；

所述再生液为含 0.01% 叠氮钠、含 0.05% Tween-20 的 0.01M, pH7.4 的 PBS 溶液；

所述平衡保存液为 0.01M, pH7.4 的 PBS 溶液。

[0008] 所述 PBS 缓冲液为 1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 十二水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g。

[0009] 用所述的净化三聚氰胺的试剂盒净化样品中三聚氰胺的方法, 步骤为：

1) 样品的前处理: 参照国家标准 GB/T 22388-2008: 称取 1g 的奶粉样品于 50mL 塑料离心管中, 加入 8mL 三氯乙酸和 2mL 乙腈, 超声提取 10min, 再震荡提取 10min, 然后以不低于 4000r/min 离心 10min, 取上清液, 经三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤, 取滤液；

2) 净化: 免疫亲和色谱柱使用前用 10mL 的 PBS 平衡保存液平衡; 然后将步骤 1) 得到的滤液通过所述的免疫亲和色谱柱层析; 然后用所述的淋洗液及超纯水洗涤, 再用所述的洗脱液洗脱, 收集洗脱液经 0.22 μ m 孔径的聚四氟乙烯膜过滤后即可得到净化的三聚氰胺溶液, 用于后续仪器分析样品中三聚氰胺含量。

[0010] 本发明的免疫亲和色谱柱基于免疫反应和色谱原理, 适合从各种基质样品(如奶粉, 液态奶)中净化三聚氰胺, 便于后续分析。在所述免疫亲和色谱柱中, 三聚氰胺的单克隆抗体与四甲氧基硅烷(TMOS)的偶联率为 $72.57 \pm 1.2\%$ 。动态柱容量为 $80 \mu\text{g/mL}$, 绝对柱容量为 $16.5 \mu\text{g/mg}$, 使用了 8 次后柱容量为总柱容量的 38% 左右, 保存期为 1 年。

[0011] 本发明的有益效果: 本发明的免疫亲和色谱柱具有高选择性, 将抗体的非结合活性区域 Fc 端定向的包埋于载体, 更好的保持抗体的活性, 且方法操作简单, 净化效果好, 避免杂质对测定结果产生的干扰, 免疫亲和色谱柱可重复使用, 降低分析成本和环境污染。本发明的净化方法结合色谱法可用于奶粉, 液态奶, 酸奶等样品中三聚氰胺的高效检测。

附图说明

[0012] 图 1 三聚氰胺不同浓度标准品的液相质谱图。

[0013] 图 2 三聚氰胺不同浓度标准品的液相质谱图的标准曲线。

[0014] 图 3 在奶粉中三聚氰胺净化提纯样品效果的液相质谱图。

具体实施方式

[0015] 为更好的理解本发明, 下面结合具体的实施例来进一步阐明, 应理解, 这些实施例仅用于说明本发明, 而不用来限制本发明的范围。

[0016] 实施例 1 三聚氰胺单克隆抗体的制备

动物免疫：以三聚氰胺为半抗原，经戊二醛法与载体蛋白 BSA 偶联为免疫原，选用 BALB/C 小鼠为免疫动物，免疫剂量为 100 μ g/只，首免时混合等体积的完全弗氏佐剂，21 天后，加等体积的不完全弗氏佐剂以同样剂量进行加强免疫，二免后第 10 天采血进行检测，以后每间隔 21 天进行一次加强免疫，直到血清效价和特异性达到要求，然后免疫剂量减半进行冲刺免疫，3 天后取脾细胞进行融合。

[0017] 细胞融合：融合前一天制备饲养细胞，融合当天取脾细胞按 5:1 的比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合。

[0018] 杂交瘤细胞克隆化：融合后采用间接竞争 ELISA 法筛选出阳性孔，而后采用有线稀释法进行亚克隆并进行阳性率的检测，直至得到完全同质的三聚氰胺单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株。

[0019] 单克隆抗体的大量生产：采用体内诱生法，选用 BALB/C 小鼠为实验动物，首先对其腹腔注入灭菌石蜡油，7-10 天后腹腔注射上述的单克隆杂交瘤细胞株， 1×10^6 - 2×10^6 个/只，待 7-10 天后采集腹水。

[0020] 腹水纯化：采用辛酸-硫酸铵法进行抗体的纯化。具体步骤如下：1)辛酸法沉淀：取上述腹水首先 12000r/min, 20min, 取上清。加 2 倍体积的 0.06mol/L pH5.0 醋酸缓冲液稀释，用 1mol/L HCL 调 pH 至 4.8。按每 mL 稀释腹水加 11 μ L 辛酸的比例，室温搅拌下逐滴加入辛酸，于 30min 内加完，4 $^{\circ}$ C 静置 2h, 取出 8000r/min, 30min, 弃沉淀。2) 50% 饱和硫酸铵盐析：将所得的上清加入 1/10 体积的 0.01M PBS, 用 1M NaOH 调 pH 至 7.2。缓慢加入等量的饱和硫酸铵溶液，混匀，4 $^{\circ}$ C 静置 1h, 5000r/min, 20min, 弃上清留沉淀。3) 33% 饱和硫酸铵盐析：将步骤 2) 得到的沉淀溶于 2mL 0.01mol/L PBS 中，再加 1mL 的饱和硫酸铵使其达到 33% 饱和度，混匀，4 $^{\circ}$ C 静置 1h, 5000r/min, 20min, 弃上清留沉淀。4) 透析除盐：将步骤 3) 所得沉淀溶于 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS, 装入透析袋，用 0.01M、pH7.4 的 PBS 透析，4 $^{\circ}$ C 静置，每天换水 3 次以上。5) 透析完毕，5000r/min, 10min, 将所得上清液置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0021] 实施例 2 免疫亲和色谱柱(IAC)的制备

其具体步骤如下：取 0.2mL、0.04 mol/L HCL, 0.75mL 去离子水和 3.4mL 四甲氧基硅烷 TMOS 混匀，在 4 $^{\circ}$ C 保存 2-3min。将上述 TMOS 溶液温度控制在 0 $^{\circ}$ C 左右时超声混匀 30min。取一烧杯，称取重量，吸取一定量的抗体溶液，用 0.01M、pH7.4 PBS 缓冲液稀释至 1mg/mL, 4 $^{\circ}$ C 保存。待 TMOS 溶液超声完全后，吸取其中 1mL, 加入至 4 $^{\circ}$ C 保存的抗体溶液中，使之形成凝胶。待凝胶结束后，再将烧杯称重，并置于 37 $^{\circ}$ C 恒温烘箱凝胶老化。待凝胶失去初重的 50% 时，老化过程结束。将老化后的凝胶(约 1g)研磨碎，并进行装柱。待柱中凝胶沉积稳定后，用 5mL 0.01M、pH7.4 PBS 预淋洗，洗去未包埋的抗体和其他干扰杂质，最后用 5mL 0.01M、pH7.4 PBS 平衡。制备好的 IAC 柱上部用 0.01M、pH7.4 PBS 保存，并在 4 $^{\circ}$ C 环境中保存备用，长期保存则在 PBS 中加入 0.01% 叠氮钠。

[0022] 实施例 3 IAC 柱容量的确定：

将实施例 2 所制备的 IAC 柱取出，取下柱子上下端的塞子，将柱子与真空泵连接，调节流速，使液体以 2d/s 的速度流出(不超过 1mL/min)，待液体排干后，将 10mL、10 μ g/mL 处理后的样品溶液(样品溶解于上样缓冲液中)上样，流速同上，收集上样滤液，测定 OD₂₄₀。液体排干后，分别用 10mL 0.01M、pH7.4 PBST 和 10mL 纯水淋洗，流速同上。收集淋洗滤液，并

测定 OD_{240} 。如该 OD_{240} 值大于 0.02, 则重复淋洗, 直至小于 0.02, 计算淋洗滤液体积以及滤液中三聚氰胺含量。液体排干后, 上样 1mL 含 50% 甲醇的 0.01M、pH3.5 甘氨酸盐酸溶液, 流速 1d/s (不超过 0.5mL/min), 将收集的洗脱液直接用于检测。液体排干后, 分别用 10mL 0.01M、pH7.4 PBST, 10mL 0.01M、pH7.4 PBS 清洗, 收集清洗液, 测定清洗液中 OD_{240} 。然后, 柱子下端用塞子密封, 加入 3mL 0.01M、pH7.4 PBS 平衡保存液, 上端用塞子密封, 置于 4℃ 保存。计算出动态柱容量和绝对柱容量。动态柱容量是指每毫升免疫包埋剂(或柱床体积)对待测物的最大吸收值。绝对柱容量是指每毫克固定抗体对待测物的最大结合容量。结果表明本发明制备的免疫亲和柱动态柱容量为 80 μ g/mL, 绝对柱容量为 16.5 μ g/mg。

[0023] 实施例 4 含有三聚氰胺免疫亲和色谱柱的试剂盒的制备及其对三聚氰胺的提纯净化效果

1、含有三聚氰胺免疫亲和色谱柱的试剂盒的制备

该试剂盒主要有纸质盒体, IAC 柱, 三聚氰胺标准溶液, 洗脱液, 再生液, 平衡保存液, 海绵托架所组成, 其中海绵托架上有放置上述各种溶液的凹槽和放置 IAC 柱的孔。其中, 所述的 IAC 柱为实施例 2 制备的偶联有对三聚氰胺特异性识别的单克隆杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱。所述洗脱液为甲醇-甘氨酸盐酸溶液(1:1, v:v), 包括甘氨酸 7.5g, 12mol/L HCL 10mL, 高纯水 500mL, 甲醇 500mL; 所述再生液为含 0.01% 叠氮钠、0.05% Tween-20 的 0.01M, pH7.4 的 PBS 溶液; 所述 PBS 缓冲液为 1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g; 所述平衡保存液为 0.01M, pH7.4 的 PBS 溶液。将组合好的含有三聚氰胺免疫亲和色谱柱的试剂盒放在 4℃ 保存。

[0024] 2、奶粉样品中三聚氰胺的检测

在空白样品(奶粉)中, 分别添加 1, 10, 50, 100ppb 三聚氰胺标准品, 样品提取液用实施例 2 制备的免疫亲和色谱柱净化, 而后用 HPLC 进行测定。具体操作方法参照国家标准 GB/T 22388-2008。以三聚氰胺含量为 10 ppb 为例, 结果如图 3 所示。结果表明, 本发明制备的三聚氰胺免疫亲和色谱柱非特异性吸附极小, 结果可靠, 完全可以满足三聚氰胺实际检测的要求。

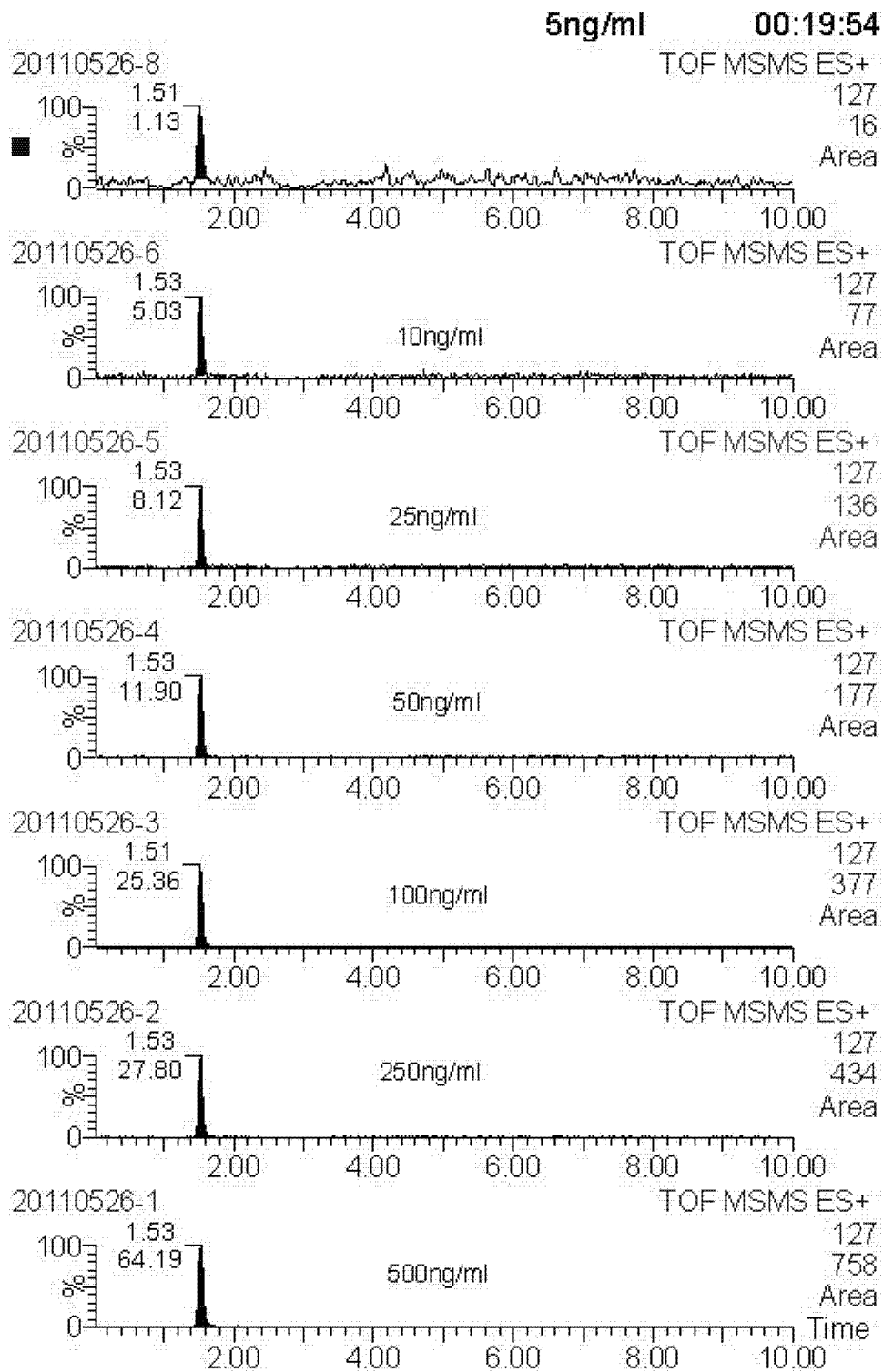


图 1

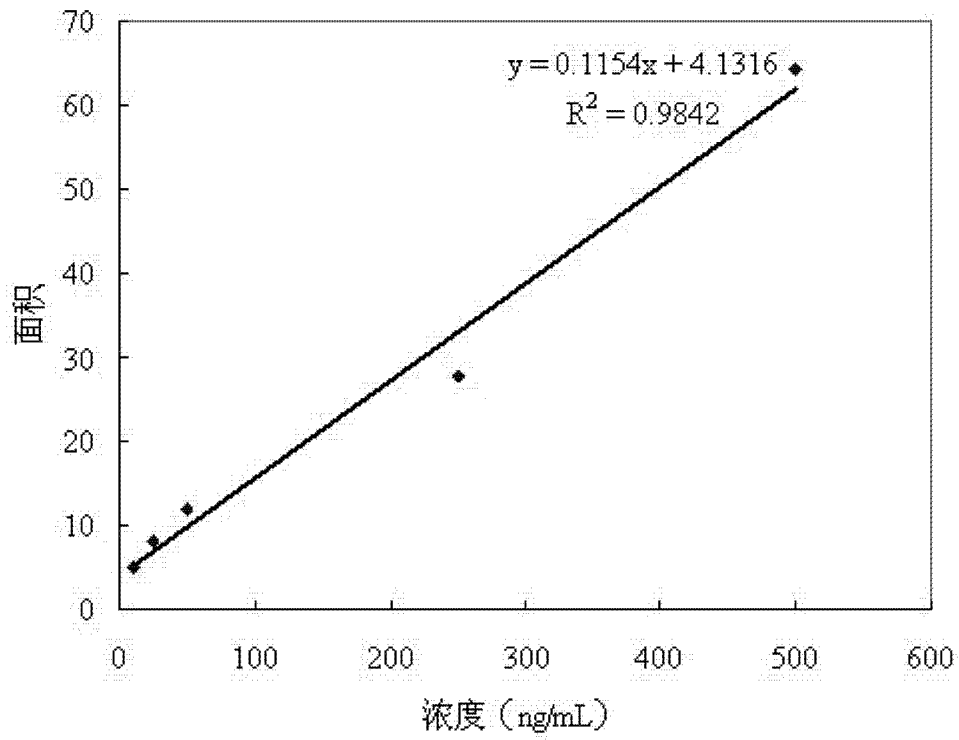


图 2

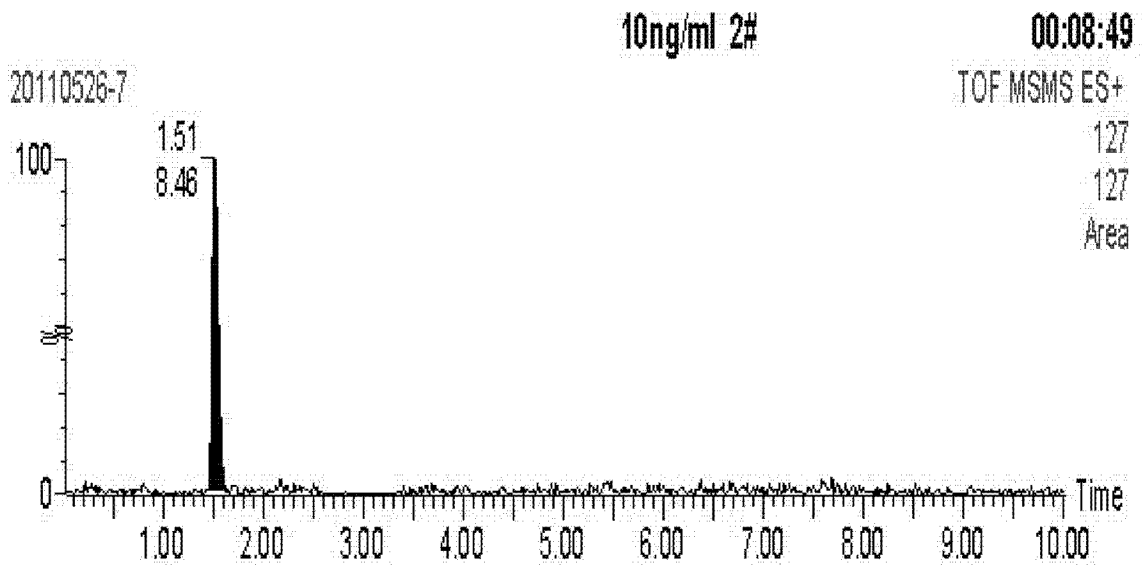


图 3

专利名称(译)	净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱及用其净化三聚氰胺的方法		
公开(公告)号	CN102353784A	公开(公告)日	2012-02-15
申请号	CN201110187475.2	申请日	2011-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	王利兵 胥传来 孙凤霞 刘丽强 匡华 宋姗姗		
发明人	王利兵 胥传来 孙凤霞 刘丽强 匡华 宋姗姗		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱及用其净化三聚氰胺的方法，属于免疫亲和层析及三聚氰胺检测技术领域。本发明为一种净化三聚氰胺的试剂盒，由净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱，三聚氰胺标准溶液，淋洗液，洗脱液，再生液，平衡保存液和海绵托架所组成；所述净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱是将三聚氰胺单克隆抗体包埋于固相载体上而后作为填料装柱而成；经样品前处理和免疫层析处理后，所得净化三聚氰胺溶液用于后续仪器分析样品中三聚氰胺含量。本发明的免疫亲和色谱柱具有高选择性，且方法操作简单，净化效果好，避免杂质对测定结果产生的干扰，免疫亲和色谱柱可重复使用，降低分析成本和环境污染。

