



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103869065 B

(45) 授权公告日 2015.03.11

(21) 申请号 201410121748.7

(22) 申请日 2014.03.28

(73) 专利权人 中国农业科学院油料作物研究所
地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二路
2号

(72) 发明人 李培武 张奇 何婷 张兆威
丁小霞

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102

代理人 乔宇

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102989416 A, 2013.03.27, 全文.

US 4716109 A, 1987.12.29, 全文.

CN 103157296 A, 2013.06.19, 全文.

孙兴荣等. 抗黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱的

制备.《现代食品科技》.2011,第27卷(第3期),
第306-309页.

孙兴荣等. 抗黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱的
制备.《现代食品科技》.2011,第27卷(第3期),
第306-309页.

肖志军等. 粮油黄曲霉毒素 B1 高效快速检
测微珠的研究.《中国粮油作物学报》.2006,第
28卷(第3期),第335-341页.

王莹等. 黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱的制备
及使用条件优化.《中国奶牛》.2011,(第1期),
第44-46页.

审查员 王晓媛

权利要求书1页 说明书7页
序列表3页

(54) 发明名称

一种黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂、免
疫亲和柱及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸
附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用。本发明
免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的
黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,所述黄曲霉
毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 对黄曲霉毒素 M1 的
50% 抑制浓度 IC₅₀为 0.208ng/mL,与黄曲霉毒素
B1, B2, G1, G2 交叉反应率分别为 9.43%、5.93%、
4.87% 和 6.17%;其氨基酸序列如 SEQIDNO:7 所
示,编码基因序列如 SEQIDNO:8 所示,本发明黄曲
霉毒素纳米抗体免疫亲和柱可用于净化与浓缩上
机检测前样品提取液,且该免疫亲和柱可以多次
重复使用。

1. 一种黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂,其特征在于:该免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的黄曲霉毒素纳米抗体,所述黄曲霉毒素纳米抗体为黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示,编码基因序列如 SEQ IDNO:8 所示;所述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 三个互补决定区的氨基酸序列分别为:CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示、CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示、CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示;三个互补决定区的编码基因序列分别为:CDR1 的编码基因序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 的编码基因序列如 SEQ ID NO:5 所示,CDR3 的编码基因序列如 SEQ ID NO:6 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂,其特征在于,所述固相载体为琼脂糖凝胶或硅胶微球。

3. 权利要求 1~2 所述的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂的制备方法,其特征在于:所述固相载体选用硅胶微球时,制备方法为:称取 1~5g 硅胶微球,用纯水和 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液交替冲洗,再量取 5~25mL pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液溶解硅胶微球,搅拌后使硅胶微球全部悬起,得到硅胶微球悬浮液;用 1~5mL pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液溶解 2~10mg 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,然后逐滴加入到硅胶微球悬浮液中;最后称取 70~350mg 碳二亚胺,快速加入到硅胶微球悬浮液中,4℃搅拌反应 18~22h 后,得到以硅胶微球为固相载体的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂;或者

所述固相载体选用琼脂糖凝胶时,制备方法为:称取 0.3~1g 琼脂糖,用 1mM HCl 溶液反复冲洗,将琼脂糖溶于 5~15mL 偶联缓冲液中,再加入 0.6~2mg 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,在室温下搅拌反应 1~2h,得到琼脂糖凝胶溶液,将琼脂糖凝胶溶液中未与琼脂糖凝胶偶联的抗体溶液过滤后,用偶联缓冲液冲洗琼脂糖凝胶,再加入 0.1M、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液,室温下反应 2h,然后用 0.1M、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液和 0.1M、pH4.0 的 Tris-HCl 缓冲液交替冲洗琼脂糖凝胶后,得到以琼脂糖凝胶为固相载体的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和吸附剂,所述偶联缓冲液为 0.1MNaCO₃、0.5M NaCl、pH8.3。

4. 装载有权利要求 1~2 所述的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱。

5. 权利要求 4 所述的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂填充于固相萃取管中,加入 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液后自然沉淀,然后用 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液洗涤后,保存于含 0.02wt% 叠氮钠的 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液中,得到黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱。

6. 权利要求 4 所述的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的应用,其特征在于,利用所述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱对上机前样品提取液进行净化与浓缩。

7. 根据权利要求 6 所述的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的应用,其特征在于,具体操作为:首先将制备好的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱用纯水冲洗,然后加入样品提取液,最后用纯水淋洗,待液体流干后,再用甲醇洗脱,收集洗脱液,所述洗脱液即为净化与浓缩后的样品提取液,可直接用于上机检测。

一种黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素是一类主要由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生的剧毒代谢产物,是迄今发现的最强致癌物质之一。黄曲霉毒素目前已发现 20 余种,主要包括黄曲霉毒素 B1 (AFB₁)、B2 (AFB₂)、G1 (AFG₁)、G2 (AFG₂) 和 M1 (AFM₁) 等,其中 AFB₁ 的毒性最强。黄曲霉毒素 M1 (AFM₁) 是 AFB₁ 的羟基化代谢产物,哺乳动物摄入 AFB₁ 污染的饲料后,在体内经羟基化会分泌于乳汁当中。通常,当动物摄入了 AFB₁ 污染的食物后,黄曲霉毒素 M1 的排出量为 AFB₁ 摄入量的 1% ~ 3%。大量的研究者对黄曲霉毒素 M1 的毒性和致癌性进行了深入的研究,研究结果也促使国际癌症研究机构将黄曲霉毒素 M1 的致癌等级由二类致癌物质变为一类致癌物质。黄曲霉毒素 M1 性质稳定,即使经过巴氏杀菌,也几乎完全不能被破坏。在许多乳制品中均含有黄曲霉毒素 M1,由于乳制品是婴幼儿食物的主要来源,因此黄曲霉毒素 M1 污染问题引起了世界各国的广泛关注,并对黄曲霉毒素 M1 进行了严格的限量。我国属于黄曲霉毒素污染较重的地区,因此加强乳及乳制品中黄曲霉毒素 M1 的检测、特别是速测,及时了解和掌握乳及乳制品的卫生信息,对保障我国食品消费安全具有重要意义。

[0003] 现有黄曲霉毒素的检测方法包括薄层层析法、精密仪器分析法和免疫学分析法。其中薄层层析法是较早用于检测黄曲霉毒素最常用的检测方法,该法不需要特殊的仪器设备,一般实验室都可进行,但试剂用量大、操作繁琐、其它组分干扰严重、准确性差,不能准确定量,且对实验人员和周围环境污染危害较大,不适于现场快速检测。精密仪器分析法主要包括荧光分光光度法和高效液相色谱法,这些方法灵敏度高,准确性好,然而要求黄曲霉毒素样品纯化程度高,传统的样品前处理技术,如液-液萃取、固相萃取、固相微萃取等,前处理过程繁琐、特异性不强。因此,建立快捷有效的样品前处理技术已成为黄曲霉毒素检测分析中需解决的首要 and 瓶颈问题。免疫亲和柱是一种新型高效的样品前处理技术,基于抗原抗体间特异性的可逆结合来实现对复杂样品中目标物质的富集净化。免疫亲和柱与液相色谱分析、荧光速测仪以及 ELISA 法结合,可广泛应用于农产品及食品黄曲霉毒素检测中。

[0004] 目前,黄曲霉毒素免疫亲和柱制备主要采用传统抗体(多克隆抗体或单克隆抗体)与琼脂糖凝胶、硅胶微球等偶联制备而成,由于传统抗体使用过程中活性退化较快,市场现有免疫亲和柱一直存在可重复使用次数偏少的技术难题。纳米抗体是在骆驼科动物体内天然存在的重链抗体,与传统的抗体相比,具有稳定性好、耐高温、耐酸碱、耐有机试剂等优点,可用于免疫亲和柱的制备中,延长亲和柱的货架期;此外,纳米抗体的生产采用基因工程手段,具有成本低、制备方便等优点,因此,纳米抗体在免疫亲和柱的制备中与常规抗体相比更具有优势。目前,尚未有黄曲霉毒素纳米抗体免疫吸附剂和免疫亲和柱的相关报道。

发明内容

[0005] 本发明的发明目的是提供一种黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用。

[0006] 为实现本发明目的,本发明所采用的技术方案为:

[0007] 一种黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂,其特征在于:该免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体上偶联的黄曲霉毒素纳米抗体,所述黄曲霉毒素纳米抗体为黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示,编码基因序列如 SEQ ID NO:8 所示。

[0008] 按上述方案,所述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 的三个互补决定区的氨基酸序列分别为:CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示、CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示、CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示;三个互补决定区的编码基因序列分别为:CDR1 的编码基因序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 的编码基因序列如 SEQ ID NO:5 所示,CDR3 的编码基因序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0009] 按上述方案,所述固相载体为琼脂糖凝胶或硅胶微球。

[0010] 上述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂的制备方法,其特征在于:

[0011] 所述固相载体选用硅胶微球时,制备方法为:称取 1~5g 硅胶微球,用纯水和 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液交替冲洗,再量取 5~25mL pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液溶解硅胶微球,搅拌后使硅胶微球全部悬起,得到硅胶微球悬浮液;用 1~5mL pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液溶解 2~10mg 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,然后逐滴加入到硅胶微球悬浮液中;最后称取 70~350mg 碳二亚胺(EDC),快速加入到硅胶微球悬浮液中,4℃搅拌反应 18~22h 后,得到以硅胶微球为固相载体的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂;或者

[0012] 所述固相载体选用琼脂糖凝胶时,制备方法为:称取 0.3~1g 琼脂糖,用 1mM HCl 溶液反复冲洗,将琼脂糖溶于 5~15mL 偶联缓冲液中,再加入 0.6~2mg 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,在室温下搅拌反应 1~2h,得到琼脂糖凝胶溶液,将琼脂糖凝胶溶液中未与琼脂糖凝胶偶联的抗体溶液过滤后,用偶联缓冲液冲洗琼脂糖凝胶,再加入 0.1M、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液,室温下反应 2h,然后用 0.1M、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液和 0.1M、pH4.0 的 Tris-HCl 缓冲液交替冲洗琼脂糖凝胶后,得到以琼脂糖凝胶为固相载体的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和吸附剂,所述偶联缓冲液为 0.1MNaCO₃、0.5M NaCl、pH8.3。

[0013] 装载有上述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫吸附剂的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱。

[0014] 上述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的制备方法,具体包括如下步骤:首先将黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和吸附剂填充于固相萃取管中,然后加入 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液后自然沉淀,再用 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液洗涤后,保存于含 0.02wt% 叠氮钠的 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液中,得到黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱。

[0015] 上述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的应用,其特征在于,利用所述的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱对上机前的样品提取液进行净化与浓缩。具体操作为:首先将制备好的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱用纯水冲洗,然后加入样品提取液,最后用纯水淋洗,待液体流干后,再用甲醇洗脱,收集洗脱液,所述洗脱液即为净化与浓缩后的样品提取液,可直接用于上机检测。

[0016] 本发明的有益效果在于：

[0017] (1) 本发明所述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 对黄曲霉毒素 B1 的 50% 抑制浓度 IC_{50} 为 0.208 ng/mL, 与黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2 交叉反应率分别为 9.43%、5.93%、4.87% 和 6.17% ; 制备得到的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的柱容量为 500~600ng, 对黄曲霉毒素 M1 的平均加标回收率为 84~100wt%。

[0018] (2) 本发明黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱具有稳定性好、耐高温、耐酸碱、耐有机试剂等优点, 所述亲和柱的货架期长、且可以重复多次使用, 可用于净化与浓缩上机检测前的样品提取液。

[0019] (3) 本发明黄曲霉毒素 M1 纳米抗体是采用基因工程手段生产得到, 具有成本低、制备方便等优点, 因此由其制备得到的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱与常规抗体亲和柱相比更有优势。

[0020] 具体实施方式

[0021] 实施例 1 黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建与纳米抗体的制备

[0022] 1. 动物免疫

[0023] 购买 2 岁龄的雄性羊驼一只, 免疫黄曲霉毒素 M1 完全抗原 (AFM₁-BSA, Sigma 公司)。将 200 μ g 黄曲霉毒素 M1 完全抗原与弗氏不完全佐剂乳化后, 对羊驼进行皮下多点注射。间隔 2 周免疫一次, 每次免疫后 7-10 天对羊驼进行静脉取血, 采用间接 ELISA 法测定血清效价, 选取效价最高的一次免疫后, 取血 10mL, 提取总 RNA。

[0024] 2. cDNA 文库的构建

[0025] (1) 提取总 RNA : 选取羊驼血清效价最高的一次免疫, 免疫后 7-10 天, 对羊驼进行静脉取血 10mL, 提取总 RNA : 采用 Life Technology 公司的 LeukoLOCK 总 RNA 分离试剂盒提取羊驼血液中的总 RNA。

[0026] (2) 合成 cDNA : 以步骤 1 获得的总 RNA 为模板, oligo (dT)₁₅ 为引物, 按照 Promega 公司的反转录酶说明书进行反转录, 合成 cDNA 第一链, 获得 cDNA 文库。

[0027] 3. 黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建

[0028] (1) 以步骤 2 中合成的 cDNA 为模板, R1、F 或 R2、F 为引物, 进行 PCR 扩增得到羊驼重链抗体可变区基因, 即 VHH 基因 : 取 cDNA 2 μ l, 10 \times PCR Buffer 5 μ l, MgSO₄ (50mM) 2 μ l, dNTP (10mmol/L) 1 μ l, F 引物 (10 μ mol/L) 1 μ l, R1 (或 R2) 引物 (10 μ mol/L) 1 μ l, DNA 酶 0.1 μ l, 无菌纯水 37.9 μ l 至 50 μ l, 涡旋混匀, 短暂离心后, 进行 PCR 扩增反应, 反应条件为 : 94 $^{\circ}$ C 变性 2min 后 ; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 30 个循环 ; 68 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

[0029] R1: 5' -CGG CGC ACC TGC GGC CGCATGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3'

[0030] R2: 5' -CGG CGC ACC TGC GGC CGCGTCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3' ;

[0031] F: 5' -TCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCCAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3', 其中横线部分表示的引物序列为与载体 pCANTAB 5E(his) 同源的位点 ; 以 R1、F 为引物进行 4 个 PCR 扩增反应, 以 R2、F 为引物进行 6 个 PCR 扩增反应。PCR 产物经过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 用试剂盒纯化回收 450bp 大小的 DNA 片段。

[0032] (2) pCANTAB 5E (his) 载体构建 : 以 pCANTAB5E 载体质粒为模板, 通过上游引物 : p5E SfiI-F: 5' -ATGCGGCCAGCCGGCC-3' (Sfi I) ; 下游引物 : p5E N-P-H-R: 5' - GATCGGGC

CCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGTGCGGCCCGTTTC-3' 进行 PCR 扩增 pCANTAB5E 载体质粒上 Sfi I 到 NotI 之间的 DNA 片段, 得到 p5E-his 片段; 然后将 p5E-his 片段, 先做 SfiI 单酶切再做 PspMI 单酶切, 得 p5E-his (SfiI/PspMI) 粘性末端, 将 pCANTAB5E 载体质粒先做 SfiI 单酶切再做 Not I 单酶切, 得 p5E (SfiI/NotI) 粘性末端; 最后将 p5E-his (SfiI/PspMI) 粘性末端和 p5E (SfiI/NotI) 粘性末端连接后, 得到含有六聚组氨酸标签的 pCANTAB 5E (his) 载体。

[0033] (3) 双酶切处理 pCANTAB 5 E (his):

[0034] Sfi I 单酶切:

[0035] 按照如下体系配制反应液: pCANTAB 5 E (his) vector 30 μ l

[0036] Sfi I 1 μ l

[0037] 10 \times M Buffer 10 μ l

[0038] ddH₂O 补至总体系 100 μ l

[0039] 50 $^{\circ}$ C 水浴 2 h 后用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒进行回收。

[0040] Not I 酶切:

[0041] 按照如下体系配制反应液:

[0042] pCANTAB 5 E (his) Sfi I 单酶切回收产物 30 μ l

[0043] Not I 1 μ l

[0044] 10 \times H Buffer 10 μ l

[0045] ddH₂O 补至总体系 100 μ l

[0046] 37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h 后用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒进行回收;

[0047] (4) VHH 基因与双酶切处理的 pCANTAB 5 E (his) 载体的连接

[0048] 按照如下体系进行 In-Fusion 连接:

[0049] Sfi I/Not I 双酶切处理的 pCANTAB 5 E (his) vector 120ng

[0050] VHH 基因 40ng

[0051] 5 \times In-Fusion buffer 2 μ l

[0052] In-Fusion Enzyme 1 μ l

[0053] ddH₂O 补至总体系 10 μ l

[0054] 37 $^{\circ}$ C 水浴 15min 后, 放入 50 $^{\circ}$ C 水浴 15min, 水浴后立即放在冰上 5min, 加入 40 μ l TE 缓冲液, 用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒进行回收, -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

[0055] (5) 连接产物的电转化

[0056] 将上述连接产物取 5 μ l 加入到 50 μ l *E. coli* TG1 电转化感受态细胞中, 混匀后, 加入到预冷的 0.1 cm 电转化杯 (Bio-RAD) 中, 冰上放置 10min, 然后放在 Bio-rad 电转化仪上进行电转化, 电转化条件: 1.8 kV, 200 Ω , 25 μ F, 电转化后立即在电转化杯中加入 1 mL 2YT 液体培养基吹打后转移至一灭菌后的干净 15 mL 摇菌管中, 37 $^{\circ}$ C 缓慢振摇复苏 1 h。取 2 μ l 菌液倍比稀释后涂布于 LB 氨苄平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置过夜, 第二天数菌落个数计算库容量。

[0057] (6) 黄曲霉毒素纳米抗体基因库的拯救: 共进行上述十次电转化, 将复苏后的菌液全部转入 200mL SB 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 250rpm 振摇至 OD₆₀₀ 值为 0.5 时, 加入 1mL, 1×10^{12} pfu 的辅助噬菌体 M13K07, 37 $^{\circ}$ C 静置 1h 后, 继续振摇 2h, 加入卡那霉素至终浓度为 70 μ g/mL, 并振摇过夜。次日, 将过夜菌于 4 $^{\circ}$ C 10000rpm 离心 15min, 将上清转移至无菌的离心瓶中, 加

入 1/4 体积的 5x PEG/NaCl, 于冰上静置 2h 后, 4℃ 12000rpm 离心 20min, 用 10mL 无菌的重悬溶液(含 1× 蛋白酶抑制剂, 0.02% NaN_3 和 0.5% BSA 的 PBS 缓冲液)溶解沉淀得到噬菌体拯救后的黄曲霉毒素纳米抗体基因库。

[0058] 4. 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体的淘选

[0059] 用 AFM_1 -BSA(1 μg /孔)及 3% 的 BSA-PBS 溶液(用作阴性对照)分别包被 ELISA 板, 4℃ 过夜; 次日, 倾掉包被液后, PBST 洗板 3 次, 然后用 3% 脱脂奶粉封闭 1 h; PBST 洗板 3 次, 在包被有 AFM_1 -BSA 的孔中加入上述拯救后的黄曲霉毒素纳米抗体基因库 50 μl , 37℃ 孵育 1 h; PBST 洗板 10 次后, 每孔加入 100 μl 、100ng/mL AFM_1 溶液, 室温(20℃ ~ 30℃)震荡 30min 洗脱。将洗脱液转至包被有 3%BSA-PBS 溶液的孔中, 37℃ 孵育 1h (去除非特异性吸附); 孵育后, 取上清侵染 2mL 生长至对数期的 TG1 菌液, 37℃ 侵染 20min, 取 1 μl 、10 μl 分别涂布 LB 氨苄平板上, 并于 37℃ 培养箱中静置过夜, 次日数平板上的菌落数确定洗脱液中噬菌体滴度。另将上述剩余的被侵染后的 TG1 菌液转入 6mLSB 培养基中, 加 100mg/mL 的氨苄青霉素 1.5 μl , 37℃ 振摇 1h, 补加氨苄青霉素至终浓度为 50 μg /mL, 继续振摇 1h 后, 加入 1mL 辅助噬菌体 M13K07 (1×10¹²pfu/mL), 37℃ 静置 30min, 转入 100mL SB 培养基, 补加氨苄青霉素(100mg/mL)46 μl , 继续振摇 2h 后, 加入卡那霉素至终浓度为 70 μg /mL, 并于 37℃ 振摇过夜。次日, 将菌液于 10000rpm 4℃ 离心 15min, 转移上清, 并加入 1/4 体积 PEG/NaCl 溶液, 于冰上孵育 2h, 12000rpm 4℃ 离心 20min, 用 1%BSA-PBS 溶液溶解沉淀, 得到第一轮淘选扩增产物, 并用于下一轮淘选。在随后几轮的淘选中, 包被抗原 AFM_1 -BSA 的浓度分别为 0.5 μg /孔、0.1 μg /孔、0.05 μg /孔, 洗脱液分别为 500ng/mL、100ng/mL、50ng/mL 的 AFM_1 溶液。

[0060] 5. 阳性克隆的鉴定:

[0061] 经过 4 轮淘选后, 取 2 μl 洗脱液倍比稀释后侵染生长至对数期的 TG1 菌液, 涂布 LB 氨苄平板上, 37℃ 倒置过夜。次日, 随机挑取 30 个克隆分别于 3mL SB-氨苄培养基中, 37℃ 震荡培养 6-8h, 至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右, 加入 30 μl 辅助噬菌体 M13K07 (1×10¹²pfu/mL), 37℃ 静置 30min 后继续振摇 2h, 加入卡那霉素至终浓度为 70 μg /mL, 并震荡培养过夜; 次日, 将菌液于 10000rpm 4℃ 离心 15min 后, 得到菌液上清。

[0062] 用包被液配制 AFM_1 -BSA 至终浓度 0.2 μg /ml, 包被 96 孔 ELISA 板, 每孔 100 μl , 同时另取 ELISA 板, 其中的 32 个孔用 3%BSA 包被, 4℃ 包被过夜; 次日, 倾掉包被液后, PBST 洗板 3 次, 然后用 3% 脱脂奶粉-PBS 封闭 1 h; 取 AFM_1 标准品储存液, 用 10% 甲醇/PBS 配制成 100ng/mL、0ng/mL 的工作液, 分别加入到包被有 AFM_1 -BSA 抗原的孔中, 再每孔加入 50 μl 上述菌液上清, 每种工作液浓度重复 3 次; 在包被有 BSA 的孔加入 10% 甲醇/PBS 和 50 μl 上述菌液上清作为对照, 轻摇板子混匀后, 置 37℃ 温箱反应 1 h; PBST 洗板 10 次后, 每孔加入 100 μl 用 PBS 按 1:5000 比例稀释的 HRP/ANTI-M13, 37℃ 保温 1 h; PBST 洗板 6 次, 每孔加入 100 μl 新鲜配制的 TMB 底物溶液, 37℃ 保温 15 min; 加 2mol/L H_2SO_4 , 每孔 50 μl 中止反应, 用酶标仪分别测定 OD₄₅₀ 值; 对 BSA 不吸附, 对 AFM_1 -BSA 有吸附, 并且加入黄曲霉毒素后存在竞争的即为阳性噬菌体克隆, 由此筛选得到吸光值和灵敏度均较高的孔, 得到噬菌体展示的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2。

[0063] 采用间接竞争 ELISA 方法测定黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 的抗体特异性, 具体用交叉反应率描述, 测试方法如下: 将 AFM_1 、 AFB_1 、 AFB_2 、 AFG_1 和 AFG_2 五种不同标准品

储存液,用 10% 甲醇/PBS 梯度稀释至十个不同的工作浓度,同等条件下采用间接竞争 ELISA 方法进行测定,依次绘制五种黄曲霉毒素的竞争 ELISA 曲线,求出各自抑制率为 50% 时的标准品浓度,用 IC_{50} 表示,并根据下述计算公式计算交叉反应率:交叉反应率(%)= (AFM₁IC₅₀/类似物 IC₅₀) × 100%,所述类似物为 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 或 AFG₂,得到黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 对于对黄曲霉毒素 M1 的 50% 抑制浓度 IC_{50} 为 0.208 ng/mL,与黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2 的交叉反应率分别为 9.43%、5.93%、4.87% 和 6.17%。因此,黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 是一种抗黄曲霉毒素 M1 的特异性纳米抗体。经耐受性试验,黄曲霉毒素纳米抗体 2014AFM-G2 比常规鼠源与兔源抗体耐有机溶剂能力提高 35%,耐高温能力提高 45%,因此能有效降低检测时样品提取液中有有机溶剂等其他成分的干扰,从而提高检测灵敏度。

[0064] 同时将筛选到的含有黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 的克隆菌液送至上海桑尼科技有限公司进行测序分析,测序引物为噬菌体载体通用引物 R1 :5' -CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3'。得到黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示,编码基因序列如 SEQ ID NO:8 所示,其中三个互补决定区的氨基酸序列分别为:CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示、CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示、CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示;三个互补决定区的编码基因序列分别为:CDR1 的编码基因序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 的编码基因序列如 SEQ ID NO:5 所示,CDR3 的编码基因序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0065] 6. 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 的制备与纯化:

[0066] (1) 获得能分泌黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 的 TG1 菌液,使用 Qiagen 的 DNA 小量提取试剂盒提取质粒,转化到 HB2151 感受态细胞中,并涂布到 LB 氨苄平板上;

[0067] (2) 挑取含有黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2 质粒的 HB2151 菌落于 100mLSB 氨苄液体培养基中,250 rpm,37℃ 培养至 OD600 = 0.5-0.8,加入 200 μl 0.5M IPTG 溶液诱导过夜。

[0068] (3) 4℃,10 000 rpm,冷冻离心 15 min,无菌操作台中小心去除上清,菌体沉淀采用渗透休克法进行可溶性蛋白提取,得到上清蛋白。将上清蛋白过 0.22μm 滤膜后,用平衡缓冲液(50mM 磷酸盐,300mM 氯化钠,20mM 咪唑;pH 7.4)透析过夜。

[0069] (4) 采用 His60 镍柱(Clontech Technology)纯化抗体:首先用 10 倍柱体积的平衡缓冲液冲洗镍柱,将步骤(3)中透析后的上清蛋白上样 His60 镍柱(Clontech Technology)进行抗体纯化,再用 10 倍柱体积淋洗缓冲液(50mM 磷酸盐,300mM 氯化钠,40mM 咪唑;pH 7.4)洗涤柱子,最后用 10 倍柱体积的洗脱缓冲液(50mM 磷酸盐,300mM 氯化钠,300mM 咪唑;pH 7.4)洗脱抗体 2014AFM-G2,收集洗脱液,装入透析袋,用 0.01M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 2-3 天后浓缩,分装于 -20℃ 保存备用。

[0070] 实施例 2:黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和吸附剂和免疫亲和柱的制备

[0071] 本实施例免疫亲和吸附剂包括固相载体(硅胶微球)和与该固相载体偶联的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,具体制备方法如下:

[0072] 称取 1g 丙烯酰胺硅胶微球,放入锥形瓶中,用纯水和 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液交替冲洗微球;量取 5mL pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液溶解微球,得微球溶液,将微球溶液转移至搅拌杯中,开启搅拌器使微球全部悬起,用 1mL pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液溶解 2mg 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,然后逐滴加入到上述微球溶液中,称取 70mg EDC,迅速导入

搅拌杯中,4℃搅拌反应 18-22h 后,得到黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和吸附剂。

[0073] 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的制备:将上述制备的免疫亲和吸附剂(0.2mL)填充于固相萃取管中,加入 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液后自然沉淀,再用 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液洗涤后,保存于含 0.02wt% 叠氮钠的 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液,即得到黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱,于 4℃保存待用。

[0074] 实施例 3:黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和吸附剂和免疫亲和柱的制备

[0075] 本实施例免疫亲和吸附剂包括固相载体(琼脂糖)和与该固相载体偶联的黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,具体制备方法如下:

[0076] 称取 0.3g 琼脂糖,放入锥形瓶中,用 1mM HCl 溶液反复冲洗 15min 以上,将琼脂糖溶于 5mL 偶联缓冲液中(0.1M 的 NaCO₃,0.5M NaCl,pH8.3),再加入 0.6mg 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体 2014AFM-G2,在室温下以 150rpm 的速度搅拌反应 1h,得到琼脂糖凝胶溶液,将琼脂糖凝胶溶液转移到砂氏漏斗中,使得未偶联的含抗体的溶液流出,然后用体积是琼脂糖凝胶溶液 5 倍的偶联缓冲液冲洗琼脂糖凝胶,再加入体积是琼脂糖凝胶溶液 2 倍的封闭缓冲液(0.1M Tris-HCl 缓冲液,pH8.0)室温反应 2h,然后用高 pH 缓冲液(0.1M Tris-HCl 缓冲液,pH8.0)和低 pH (0.1M Tris-HCl 缓冲液,pH4.0)缓冲液交替冲洗凝胶三次后,得到黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和吸附剂。

[0077] 黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的制备:将上述制备的免疫亲和吸附剂(0.2mL)填充于固相萃取管中,加入 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液后自然沉淀,再用 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液洗涤后,保存于含 0.02wt% 叠氮钠的 pH 6.0,0.01M 的磷酸盐缓冲液,即得到黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱,于 4℃保存待用。

[0078] 实施例 4:黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱柱容量的测定:

[0079] 将实施例 2 或实施例 3 制备得到的免疫亲和柱用 10mL 纯水冲洗,将 10mL 10% 甲醇/PBS 溶解的黄曲霉毒素 M1 标准品溶液(浓度为 100ng/mL,黄曲霉毒素 M1 的含量总计为 1mg)过柱,用 10mL 纯水冲洗柱子去除未结合的黄曲霉毒素 M1,最后用 5mL 甲醇溶液洗脱,1mL/管分管收集,用液相色谱法检测洗脱液中黄曲霉毒素 M1 含量。结果表明,黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱的柱容量为 500~600ng。将免疫亲和柱重复使用 5 次后,测定其柱容量,柱容量仍然能达到 480ng;该结果表明免疫亲和柱可以多次重复使用。同时交叉反应测定结果表明,本发明所述黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱可特异性结合黄曲霉毒素 M1,而不会结合玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、赭曲霉毒素等其他真菌毒素。

[0080] 实施例 5:黄曲霉毒素 M1 纳米抗体免疫亲和柱加标回收率的测定:

[0081] 取 10 mL 乳制品装入 50 mL 离心管中在 3500 g,4℃下离心 10 min,去掉上层乳脂部分,保留中间部分(即牛奶样品);称取 10 g 奶粉准确溶于 50℃预热纯水中,定容至 100mL,3500 g,4℃下离心 10 min,去掉上层乳脂部分,保留中间部分(即奶粉样品)。向牛奶样品和奶粉样品中分别加 AFM1 标准品至浓度为 50、100、500pg/mL,用 15mL 70% 甲醇水(含 4% NaCl)于 50℃超声提取 10min,提取液用滤纸过滤,取 4mL 滤液加 2mL 石油醚,涡旋混匀,静置分层;取下层 3mL,加 8mL 纯水,用 0.45μm 有机膜过滤,得到过滤液。将制备好的免疫亲和柱用 10mL 纯水冲洗,加 8mL 上述过滤液,最后用纯水 10mL 淋洗,待液体流干后,用 1mL 甲醇洗脱,收集洗脱液上机检测。检测结果显示:牛奶样品黄曲霉毒素 M1 的平均回收率为 97.3wt%,奶粉样品黄曲霉毒素 M1 的平均回收率为 98wt%。

<400> 4

ggacgcacct tcagtagcta tgcc 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 羊驼

<400> 5

gttaactgga gtggtcgccg caca 24

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> 羊驼

<400> 6

gcagccggga aggatggtag ttactatggc gctcctgact ac 42

<210> 7

<211> 130

<212> PRT

<213> 羊驼

<400> 7

Gln	Leu	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser
				20					25					30
Ser	Tyr	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg
				35					40					45
Glu	Phe	Val	Ala	Val	Val	Asn	Trp	Ser	Gly	Arg	Arg	Thr	Tyr	Tyr
				50					55					60
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Asn	Cys	Ala	Ala	Gly	Lys	Asp	Gly	Ser	Tyr	Tyr

	95	100	105
Gly Ala Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser			
	110	115	120
Ser Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Asp			
	125	130	

<210> 8

<211> 390

<212> DNA

<213> 羊驼

<400> 8

```

cagttgcagc tcgtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggacg caccttcagt agctatgcca tgggctgggt cgcagcagct 120
ccaggaagg agcgtgagtt tgtagcagtc gttaactgga gtggtcgccg cacatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccate tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggctgttt ataactgtgc agccgggaag 300
gatggtagtt actatggcgc tctgactac tggggccagg ggacccaggt caccgtctcc 360
tcagaacca agacacaaa accacaagac                                     390

```

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素M1纳米抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103869065B	公开(公告)日	2015-03-11
申请号	CN201410121748.7	申请日	2014-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	李培武 张奇 何婷 张兆威 丁小霞		
发明人	李培武 张奇 何婷 张兆威 丁小霞		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/544 G01N33/531		
CPC分类号	G01N30/48 G01N33/54346 G01N2030/486		
代理人(译)	乔宇		
审查员(译)	王晓媛		
其他公开文献	CN103869065A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及黄曲霉毒素M1纳米抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用。本发明免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的黄曲霉毒素M1纳米抗体2014AFM-G2，所述黄曲霉毒素M1纳米抗体2014AFM-G2对黄曲霉毒素M1的50%抑制浓度IC₅₀为0.208ng/mL，与黄曲霉毒素B1，B2，G1，G2交叉反应率分别为9.43%、5.93%、4.87%和6.17%；其氨基酸序列如SEQIDNO:7所示，编码基因序列如SEQIDNO:8所示，本发明黄曲霉毒素纳米抗体免疫亲和柱可用于净化与浓缩上机检测前样品提取液，且该免疫亲和柱可以多次重复使用。