



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104383889 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201410673369.9

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2014.11.21

G01N 33/531(2006.01)

(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

(56)对比文件

CN 102020580 A, 2011.04.20, 全文.

GB 1058828 A, 1967.02.15, 全文.

CN 102680608 A, 2012.09.19, 全文.

CN 103951577 A, 2014.07.30, 说明书第

0004-0033段、第0045-0046段.

CN 102928532 A, 2013.02.13, 全文.

(72)发明人 李培武 马飞 张奇 杨青青
张良晓 丁小霞

审查员 罗永霞

(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.

B01J 20/24(2006.01)

B01J 20/281(2006.01)

B01J 20/30(2006.01)

B01D 15/38(2006.01)

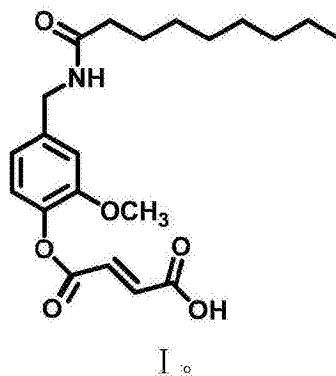
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

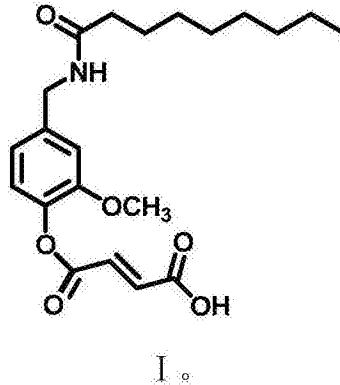
一种二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂、免
疫亲和柱及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸
附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用。该免疫
吸附剂包括固相载体和该固相载体上偶联的二
氢辣椒素多克隆抗体,所述二氢辣椒素多克隆抗
体是采用式I所述的二氢辣椒素人工半抗原(E)-
4-[2-甲氧基-4-(壬酰胺甲基)苯氧基]-4-氧-2-
丁烯酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到的二氢辣
椒素人工抗原免疫动物,并分离纯化后冷冻干燥
获得的。本发明的免疫亲和柱能够与二氢辣椒素
特异性结合,最大柱容量为220-250ng;采用甲醇
进行洗脱,添标回收率可达83.1%,RSD均小于
6%。可用于二氢辣椒素含量的样品前处理,操作
简单、成本低、效率高、有机试剂消耗少。



1. 一种二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂,其特征在於:所述免疫吸附剂包括固相载体和该固相载体上偶联的二氢辣椒素多克隆抗体,所述二氢辣椒素多克隆抗体是采用式I所述的二氢辣椒素人工半抗原(E)-4-[2-甲氧基-4-(壬酰胺甲基)苯氧基]-4-氧-2-丁烯酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到的二氢辣椒素人工抗原免疫动物,并分离纯化后冷冻干燥获得的二氢辣椒素多克隆抗体,



2. 根据权利要求1所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂,其特征在於:所述的免疫为将二氢辣椒素人工抗原采用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂乳化后间隔重复免疫动物,其中;初次免疫用弗氏完全佐剂,后续免疫用弗氏不完全佐剂,至抗血清效价达到4000以上,即处死Ba1b/c小鼠,取全部抗血清;所述的纯化为辛酸硫酸铵法纯化。

3. 根据权利要求1所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂,其特征在於:所述的二氢辣椒素人工半抗原通过N,N'-二环己基碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化后,再与牛血清白蛋白进行偶联得到。

4. 根据权利要求1所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂,其特征在於:所述固相载体为琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺硅胶微球。

5. 权利要求1所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂的制备方法,其特征在於:

所述固相载体选用聚丙烯酰胺硅胶微球时,制备方法为:将聚丙烯酰胺硅胶微球用纯水和pH=6的磷酸盐缓冲液交替冲洗,用pH=6的磷酸盐缓冲液配得聚丙烯酰胺硅胶微球悬浮液;用pH=6的磷酸盐缓冲液溶解二氢辣椒素多克隆抗体,然后逐滴加入到聚丙烯酰胺硅胶微球悬浮溶液中,再加入碳二亚胺(EDC),4℃条件搅拌反应20-22h后,得到以聚丙烯酰胺硅胶微球为固相载体的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂;

所述固相载体选用琼脂糖凝胶时,制备方法为:将琼脂糖凝胶经盐酸反复冲洗去除杂质活化后溶于偶联缓冲液中,加入上述二氢辣椒素多克隆抗体,在室温条件下搅拌,得到琼脂糖凝胶溶液,然后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,pH=8.0的Tris-HCl缓冲液,室温反应1.5-2.5h,然后用0.1M,pH=8.0的Tris-HCl缓冲液和0.1M,pH=4.0的Tris-HCl缓冲液交替冲洗琼脂糖凝胶,除去未偶联的二氢辣椒素多克隆抗体及其他杂质,得到纯化的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂。

6. 根据权利要求5所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂的制备方法,其特征在於:

所述固相载体选用聚丙烯酰胺硅胶微球时:聚丙烯酰胺硅胶微球、二氢辣椒素多克隆抗体、碳二亚胺的质量比为0.4-1.2g:0.8-4.0mg:28-84mg;所述pH=6的磷酸盐缓冲液的体

积和聚丙烯酰胺硅胶微球质量的比例为1-5mL/g;

所述固相载体选用琼脂糖凝胶时:所述琼脂糖凝胶和二氢辣椒素多克隆抗体的质量比为0.2-0.6g:0.4-2mg;所述溶解琼脂糖凝胶的偶联缓冲液的体积和琼脂糖凝胶的质量的比例为20-40mL/g。

7. 装载有权利要求1所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱。

8. 权利要求7所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱的制备方法,其特征在于:具体步骤如下:首先将权利要求1所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂填充于固相萃取柱中,加入0.01M, pH=6的磷酸盐缓冲液后自然沉淀,然后用0.01M, pH=6的磷酸盐缓冲液洗涤,保存于含0.02wt%叠氮钠的pH 6, 0.01M的磷酸盐缓冲液。

9. 权利要求7所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱的应用,其特征在于,利用权利要求7所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱对上机前的样品提取液进行富集与净化。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于:具体操作为:首先将权利要求7所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱用纯水冲洗,加入待处理的样品提取液,然后用纯水淋洗,待液体流干后,用甲醇洗脱,收集洗脱液,所述洗脱液即为净化与富集后的样品提取液。

一种二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用

技术领域：

[0001] 本发明涉及二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 近年来,把非正常食用油(俗称地沟油)掺入合格食用油中以获取利益的行为屡禁不止,严重威胁着消费者的健康,成为当前我国食品安全领域亟须解决的问题。在我国传统饮食习惯中辣椒是使用量较大、应用范围广泛的调味品,二氢辣椒素是引起辣味的主要化学成分,主要存在于辣椒属植物的果实及种子中。二氢辣椒素具有脂溶性、强稳定性好、沸点高等性质,而餐饮行业的泔水油是地沟油的主要来源之一,目前地沟油加工方法很难完全去除具有以上性质的化合物。正常食用油基本不含二氢辣椒素,而接触过辣椒的餐厨废弃油脂难以避免地含有这类成分,因此二氢辣椒素能够作为鉴别餐厨废弃油脂的特征指标。

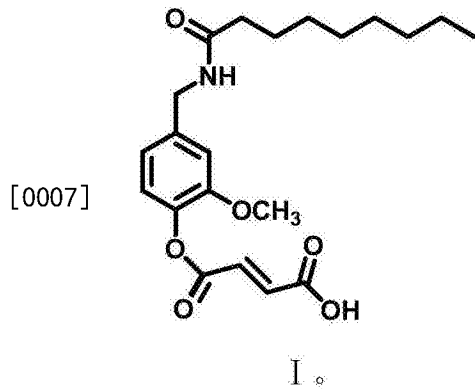
[0003] 现有二氢辣椒素的检测方法包括薄层层析法和精密仪器分析法,薄层层析法是较早用于检测二氢辣椒素的常规检测方法,该法不需要特殊的仪器设备,一般实验室都可进行,但有机试剂用量大、步骤繁琐、其它组分干扰严重、准确性差,不能准确定量,且对实验人员和周围环境污染危害较大、刺激性强,不适于现场快速检测。精密仪器分析法主要包括高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱质谱联用法(LC-MS/MS),这些方法灵敏度高,准确性好,然而要求二氢辣椒素样品纯化程度高,传统的样品前处理技术,如液-液萃取、固相萃取、固相微萃取等,前处理过程繁琐、特异性不强。因此,建立快捷有效的样品前处理技术已成为二氢辣椒素检测分析中需解决的首要 and 瓶颈问题。免疫亲和色谱柱(Immunoaffinity Chromatography)是一种新型高效的样品前处理技术,利用抗原抗体结合的高度特异性和亲和力,用化学偶联键合方法将特异性抗体结合到层析吸附剂上,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。目前,尚未见有二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱的相关报道。

发明内容

[0004] 本发明目的是提供一种二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂、其制备方法及其在样品检测中的应用。

[0005] 为解决实现本发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 一种二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂,其特征在于:该免疫吸附剂包括固相载体和该固相载体上偶联的二氢辣椒素多克隆抗体,所述二氢辣椒素多克隆抗体是采用式I所述的二氢辣椒素人工半抗原(E)-4-[2-甲氧基-4-(壬酰胺甲基)苯氧基]-4-氧-2-丁烯酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到的二氢辣椒素人工抗原免疫动物,并分离纯化后冷冻干燥获得的二氢辣椒素多克隆抗体,



[0008] 按上述方案,所述的免疫为将二氢辣椒素人工抗原采用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂乳化后间隔重复免疫动物,其中;初次免疫用弗氏完全佐剂,后续免疫用弗氏不完全佐剂,至抗血清效价达到4000以上,即处死Balb/c小鼠,取全部抗血清;所述的纯化为辛酸硫酸铵法纯化。

[0009] 按上述方案,所述的二氢辣椒素多克隆抗体对二氢辣椒素的50%抑制浓度为3.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经常规交叉反应测定,该抗体与氰戊菊酯、溴氰菊酯等化学残留污染物及黄曲霉毒素生物毒素污染物均无交叉反应。

[0010] 按上述方案,所述的二氢辣椒素人工半抗原通过N,N'-二环己基碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化后,再与牛血清白蛋白进行偶联得到。

[0011] 按上述方案,所述的偶联具体步骤为:

[0012] (1)将二氢辣椒素人工半抗原在N,N-二甲基甲酰胺(DMF)与N-羟基琥珀酰亚胺的混合溶液中室温反应1-2小时,然后加入N,N'-二环己基碳二亚胺的N,N-二甲基甲酰胺溶液,室温反应4-6小时,静置过夜,取上清液即活化的二氢辣椒素人工半抗原溶液;

[0013] (2)将上清液滴加到载体蛋白浓度大于等于2mg/mL的载体蛋白的磷酸盐缓冲液中,室温反应12-14h,其中:所述步骤(1)中的二氢辣椒素人工半抗原与载体蛋白的摩尔比大于5:1,然后透析得到二氢辣椒素人工抗原,即化合物11。

[0014] 按上述方案,所述步骤(1)中N-羟基琥珀酰亚胺和N,N'-二环己基碳二亚胺的摩尔比为1:1-1.1。

[0015] 按上述方案,所述步骤(2)中的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液是将牛血清白蛋白用0.2M pH 8的磷酸盐缓冲液溶解得到的。

[0016] 按上述方案,所述固相载体为琼脂糖凝胶或硅胶微球。

[0017] 上述二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂的制备方法,其特征在于:

[0018] 所述固相载体选用聚丙烯酰胺硅胶微球时,制备方法为:将聚丙烯酰胺硅胶微球用纯水和pH=6的磷酸盐缓冲液交替冲洗,用pH=6的磷酸盐缓冲液配得聚丙烯酰胺硅胶微球悬浮液;用pH=6的磷酸盐缓冲液溶解二氢辣椒素多克隆抗体,然后逐滴加入到聚丙烯酰胺硅胶微球悬浮溶液中,再加入碳二亚胺(EDC),4 $^{\circ}\text{C}$ 条件搅拌反应20-22h后,得到以聚丙烯酰胺硅胶微球为固相载体的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂;

[0019] 所述固相载体选用琼脂糖凝胶时,制备方法为:将琼脂糖凝胶经盐酸反复冲洗去除杂质活化后溶于偶联缓冲液中,加入上述二氢辣椒素多克隆抗体,在室温条件下搅拌,得到琼脂糖凝胶溶液,然后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,pH=8.0的Tris-HCl缓冲液,室温反应1.5-2.5h,然后用0.1M,pH=8.0的Tris-HCl缓冲液和0.1M,pH=4.0的Tris-HCl缓冲液交替冲洗琼脂糖凝胶,除去未偶联的二氢辣椒素多克隆抗体及其他杂质,得到纯化的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂。

[0020] 按上述方案,所述固相载体选用聚丙烯酰胺硅胶微球时:聚丙烯酰胺硅胶微球、二氢辣椒素多克隆抗体、碳二亚胺的质量比为0.4-1.2g:0.8-4.0mg:28-84mg;所述pH=6的磷酸盐缓冲液的体积和聚丙烯酰胺硅胶微球质量的比例为1-5mL/g;

[0021] 所述固相载体选用琼脂糖凝胶时:所述琼脂糖凝胶和二氢辣椒素多克隆抗体的质量比为0.2-0.6g:0.4-2mg;所述溶解琼脂糖凝胶的偶联缓冲液的体积和琼脂糖凝胶的质量的比例为20-40mL/g。

[0022] 按上述方案,所述的偶联缓冲液为0.1M Na₂CO₃、0.5M NaCl、pH=8.3。

[0023] 装载有上述二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱。

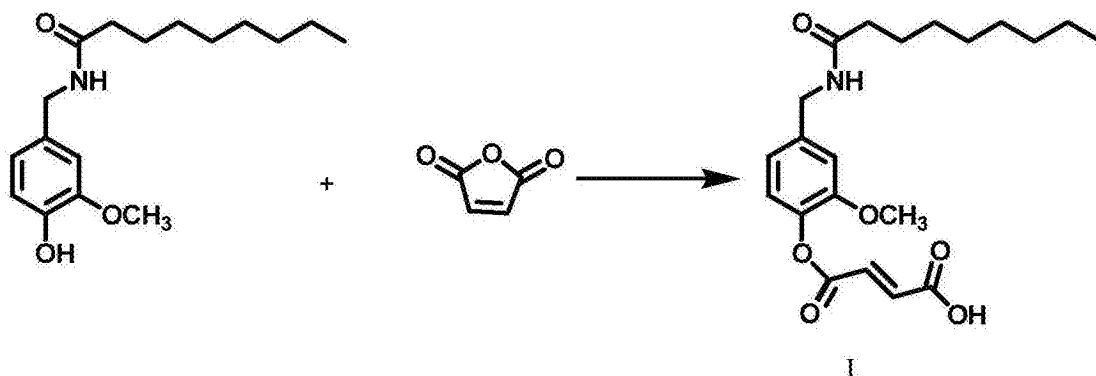
[0024] 上述二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱的制备方法,具体步骤如下:首先将二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂填充于固相萃取柱中,加入0.01M,pH=6的磷酸盐缓冲液后自然沉淀,然后用0.01M,pH=6的磷酸盐缓冲液洗涤,保存于含0.02wt%叠氮钠的pH 6,0.01M的磷酸盐缓冲液。

[0025] 上述二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱的应用,其特征在于,利用所述的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱对上机前的样品提取液进行富集与净化。

[0026] 按上述方案,所述的应用方法具体操作为:首先将二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱用纯水冲洗,加入待处理的样品提取液,然后用纯水淋洗,待液体流干后,用甲醇洗脱,收集洗脱液,所述洗脱液即为净化与富集后的样品提取液。净化与富集后的样品提取液可直接用于LC-MS/MS等检测。

[0027] 上述特异性二氢辣椒素人工半抗原可以N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺与顺丁烯二酸酐为原料经酯缩合反应得二氢辣椒素人工半抗原即化合物I,合成路线如下:

[0028]



[0029] 具体步骤为:将摩尔比为1:(1.2~1.5):(0.12~0.15)的N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺、顺丁烯二酸酐和二环己基碳二亚胺(DCC)于二氯甲烷中室温搅拌反应,然后置于冰浴中,在0-5℃条件下,将4-二甲氨基吡啶的二氯甲烷溶液缓慢滴加到上述溶液中,所述的N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺和4-二甲氨基吡啶的摩尔比为1:(0.12~0.15),撤去水浴,室温反应5-7h,后处理得到二氢辣椒素人工半抗原。

[0030] 其中,所述后处理为:将反应液过滤,减压蒸馏除去溶剂得淡黄色的油状物粗产品,然后将该粗产品通过硅胶柱层析,柱层析试剂:体积比为1:1的石油醚和乙酸乙酯的混合溶液,脱色即得二氢辣椒素人工半抗原1。

[0031] 本发明的有益效果在于:

[0032] 本发明制备的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱能够与二氢辣椒素特异性结合,其最大柱容量为220-250ng;采用洗脱液甲醇进行洗脱,对植物油样品的二氢辣椒素添标回收率可达83.1以上,RSD均小于6%。可用于二氢辣椒素含量的样品前处理,具有操作简单、成本低、效率高、有机试剂消耗少,能够应用于复杂脂质基质中二氢辣椒素类化合物的前处理。

附图说明

[0033] 图1本发明合成的二氢辣椒素人工抗原紫外光谱图。图中:1:二氢辣椒素半抗原,2:载体蛋白,3:二氢辣椒素人工抗原。

具体实施方式

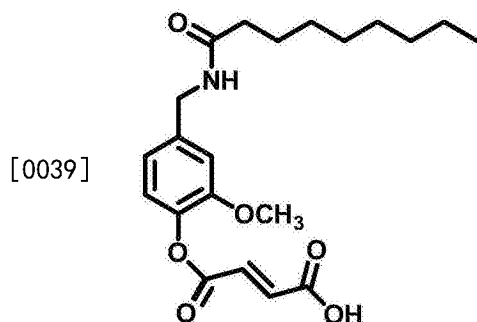
[0034] 下述实例中所使用的试验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0035] 下述实例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0036] 实施例1:二氢辣椒素人工抗原的制备

[0037] 称取N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺5.86g、顺丁烯二酸酐2.36g和N,N'-二环己基碳二亚胺0.49g,25mL二氯甲烷于反应瓶中室温反应0.5h,然后将上述反应液置于冰浴中使其温度控制在0~5℃范围内,取4-二甲氨基吡啶0.30g和4mL二氯甲烷置于恒压滴液漏斗中充分混匀,缓慢向反应瓶中滴加,0.5h滴加完毕,待滴加完毕,保持室温25℃条件继续搅拌6小时,将反应液过滤,减压蒸馏除去溶剂得淡黄色的油状物粗产品,然后将该粗产品通过硅胶柱层析,柱层析试剂:石油醚和乙酸乙酯体积比为1:1的混合溶液,脱色得到二氢辣椒素半抗原(E)-4-[2-甲氧基-4-(壬酰胺甲基)苯氧基]-4-氧-2-丁烯酸,分子式为C₂₁N₀H₂₉。

[0038] 该化合物与二氢辣椒素化合物的同源性大于90%。经质谱鉴定,其分子离子峰为ES1-MS 390(M-H)⁻,与其结果的理论值一致,表明该半抗原化合物成功合成。



[0040] 称取二氢辣椒素半抗原(E)-4-[2-甲氧基-4-(壬酰胺甲基)苯氧基]-4-氧-2-丁烯酸6mg,再称取10mgNHS,用0.2mL DMF溶解于反应装置中,反应在磁力搅拌下室温(25-27℃)进行1h;称取DCC 20mg溶于200uL DMF中,逐滴加入上述反应装置中,室温反应4h,白色沉淀生成,静置过夜,8000r/min,5min离心,取上清;

[0041] 将上清液缓慢分别滴加到10ml 2mg/mL的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液中室温搅拌反应12h;所述牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液是将牛血清白蛋白用0.2M pH 8的磷酸盐缓冲液溶解得到的。然后用0.01M PBS缓冲液透析72h,4-8h更换一次透析液,即得到二氢辣椒素人工抗原。紫外-可见光谱连续扫描图谱见图1,鉴定结果表明人工抗原偶联成功。

[0042] 实施例2:二氢辣椒素多克隆抗体的制备

[0043] 本实施例以实施例1制得的二氢辣椒素人工抗原为免疫原,免疫得到二氢辣椒素抗血清,采用饱和硫酸铵两步法沉淀纯化得到抗血清即二氢辣椒素多克隆抗体,具体操作如下:

[0044] 将二氢辣椒素人工抗原采用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂乳化,首次免疫采用弗氏完全佐剂,后续免疫均用弗氏不完全佐剂进行乳化,采用背部皮下注射与腿部肌肉注射相结合的方法免疫Ba1b/c小鼠,每隔3周免疫一次,并于第三次免疫开始,在每次免疫后一周取得Ba1b/c小鼠的血液样品离心处理后,得到抗血清,采用间接酶联免疫方法测定抗血清效价,待其抗血清效价达到4000以上,即处死Ba1b/c小鼠,取全部抗血清,然后用辛酸硫酸铵法纯化后冷冻干燥得到二氢辣椒素多克隆抗体,将其保存在-20℃条件待用。

[0045] 经测定:所述的二氢辣椒素多克隆抗体对二氢辣椒素的50%抑制浓度为3.06μg/mL,表明成功制备出二氢辣椒素抗体。经常规交叉反应测定,该抗体与氰戊菊酯、溴氰菊酯等化学残留污染物及黄曲霉毒素等生物毒素污染物均无交叉反应,表明抗体可以特异性与二氢辣椒素反应。

[0046] 实施例3:二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱吸附剂和免疫亲和柱的制备

[0047] 本实施例免疫亲和柱吸附剂包括固相载体(聚丙烯酰胺硅胶微球)和与该固相载体偶联的二氢辣椒素多克隆抗体,具体制备方法如下:

[0048] 称取1.0g聚丙烯酰胺硅胶微球,放入锥形瓶中,用纯水和pH=6的磷酸盐缓冲液交替冲洗微球;量取5mL pH=6的磷酸盐缓冲液溶解聚丙烯酰胺硅胶微球,室温25℃搅拌均匀10min,逐滴加入用1mL pH=6的二氢辣椒素多克隆抗体溶液(浓度为2mg/mL),加入70mgEDC,4℃条件搅拌反应20-22h后,得到以聚丙烯酰胺硅胶微球为固相载体的二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂。

[0049] 二氢辣椒素多克隆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)填充于固相萃取柱中,加入0.01M,pH=6的磷酸盐缓冲液后自然沉淀,用0.01M,pH=6的磷酸盐缓冲液溶液洗涤后,保存于含0.02%叠氮钠的pH=6,0.01M的磷酸盐缓冲液,得到二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱,于4℃保持待用。

[0050] 实施例4:二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱吸附剂和免疫亲和柱的制备

[0051] 本实施例免疫亲和柱吸附剂包括固相载体(琼脂糖凝胶)和与该固相载体偶联的二氢辣椒素多克隆抗体,具体制备方法如下:

[0052] 称取0.2g琼脂糖凝胶,放入锥形瓶中,用1mM HCl溶液反复冲洗20min,将琼脂糖凝胶溶于5mL偶联缓冲液(0.1M Na₂CO₃、0.5M NaCl、pH=8.3),加入0.6mg二氢辣椒素多克隆抗体,在室温条件下以150rpm搅拌2h,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,使得未与琼脂糖凝胶偶联的抗体溶液流出,然后用体积是琼脂糖凝胶溶液5倍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倍的封闭缓冲溶液(0.1M,pH=8.0的Tris-HCl缓冲液)室温反应2h,然后用高pH(0.1M,pH=8.0的Tris-HCl缓冲液)和低pH

(0.1M, pH=4.0的Tris-HCl缓冲液)缓冲溶液交替冲洗凝胶三次后,得到二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和吸附剂。

[0053] 二氢辣椒素多克隆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)填充于固相萃取柱中,加入0.01M, pH=6的磷酸盐缓冲液后自然沉淀,用0.01M, pH=6的磷酸盐缓冲液洗涤后,保存于含0.02%叠氮钠的pH=6, 0.01M的磷酸盐缓冲液,得到二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱,于4℃保持待用。

[0054] 实施例5:二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱容量的测定:

[0055] 将实施例3或实施例4制备的二氢辣椒素多克隆免疫亲和柱用10mL纯水冲洗,将10mL 10%甲醇/水溶解的二氢辣椒素标准品溶液(浓度为50ng/mL,二氢辣椒素的含量总计为500ng)过柱,用10mL纯水冲洗柱子去除未结合的二氢辣椒素,最后用5mL甲醇溶液洗脱,1mL/管分管收集,用LC-MS/MS检测洗脱液中二氢辣椒素含量。结果表明,二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱的柱容量为220-250ng。同时交叉反应测定结果表明,本发明所述二氢辣椒素免疫亲和多克隆抗体亲和柱能够特异性结合二氢辣椒素,且与氰戊菊酯、溴氰菊酯等化学残留污染物及黄曲霉毒素等生物毒素污染物均无交叉反应。

[0056] 实施例6:实施例3的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱加标回收率的测定:

[0057] 取20mL不含二氢辣椒素的植物油空白样品置于50mL离心管中,分别加入二氢辣椒素标准品浓度至2、10、20 μ g/kg,加入20mL甲醇振荡10min,4℃条件下4500rpm离心10min,取上层清液用0.45 μ m有机滤膜过滤,取1.0mL滤液纯水定容至20mL,得到样品提取液待用。将实施例3制备好的免疫亲和柱用10mL纯水洗脱,加入10mL样品提取液,用10mL纯水淋洗,最后用0.5mL甲醇水溶液洗脱,收集洗脱液用LC-MS/MS上机检测。上述实验重复进行5次,检测结果如表1所示:植物油样品的二氢辣椒素添标回收率都在83.1-96.3%之间,RSD(相对标准偏差)均小于6%,其结果表明:本发明的方法满足植物油样品二氢辣椒素含量检测要求。

[0058] 表1 植物油样品二氢辣椒素添标回收率和相对标准偏差

[0059]

回收率 (%)	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5	相对标准偏差
加标浓度						
2 μ g/kg	86.3	93.1	94.2	84.5	92.1	4.8%
10 μ g/kg	87.2	94.5	96.3	85.9	89.8	5.0%
20 μ g/kg	88.0	92.8	95.1	83.1	91.3	5.2%

[0060] 实施例7:实施例4的二氢辣椒素多克隆抗体免疫亲和柱加标回收率的测定:

[0061] 取20mL不含二氢辣椒素的植物油空白样品置于50mL离心管中,分别加入二氢辣椒素标准品浓度至2、10、20 μ g/kg,加入20mL甲醇振荡10min,4℃条件下4500rpm离心10min,取上层清液用0.45 μ m有机滤膜过滤,取1.0mL滤液纯水定容至20mL,得到样品提取液待用。将实施例4制备好的免疫亲和柱用10mL纯水洗脱,加入10mL样品提取液,用10mL纯水淋洗,最后用0.5mL甲醇水溶液洗脱,收集洗脱液用LC-MS/MS上机检测。上述实验重复进行5次,检测结果如表1所示:植物油样品的二氢辣椒素添标回收率都在86.5-97.1%之间,RSD(相对标准偏差)均小于5%,其结果表明:本发明的方法满足植物油样品二氢辣椒素含量检测要求。

[0062] 表2 植物油样品二氢辣椒素添标回收率和相对标准偏差

[0063]

回收率 (%) 加标浓度	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5	相对标准偏差
2 μ g/kg	97.1	90.2	93.5	87.1	95.6	4.4%
10 μ g/kg	90.5	91.2	93.5	91.8	86.5	2.9%
20 μ g/kg	90.3	94.1	91.2	84.5	93.1	4.1%

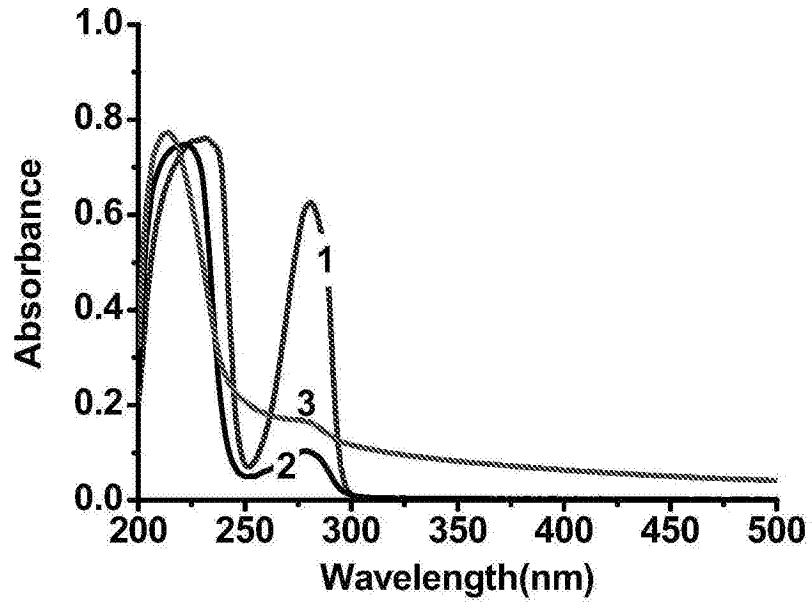


图1

专利名称(译)	一种二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104383889B	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	CN201410673369.9	申请日	2014-11-21
[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 马飞 张奇 杨青青 张良晓 丁小霞		
发明人	李培武 马飞 张奇 杨青青 张良晓 丁小霞		
IPC分类号	B01J20/24 B01J20/281 B01J20/30 B01D15/38 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	B01D15/3823 B01J20/24 B01J20/265 B01J20/28021 B01J20/28047 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	乔宇		
审查员(译)	罗永霞		
其他公开文献	CN104383889A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及二氢辣椒素多克隆抗体免疫吸附剂、免疫亲和柱及其制备方法和应用。该免疫吸附剂包括固相载体和该固相载体上偶联的二氢辣椒素多克隆抗体，所述二氢辣椒素多克隆抗体是采用式I所述的二氢辣椒素人工半抗原(E)-4-[2-甲氧基-4-(壬酰胺甲基)苯氧基]-4-氧-2-丁烯酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到的二氢辣椒素人工抗原免疫动物，并分离纯化后冷冻干燥获得的。本发明的免疫亲和柱能够与二氢辣椒素特异性结合，最大柱容量为220-250ng；采用甲醇进行洗脱，添标回收率可达83.1%，RSD均小于6%。可用于二氢辣椒素含量的样品前处理，操作简单、成本低、效率高、有机试剂消耗少。

