



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105842439 A

(43) 申请公布日 2016. 08. 10

(21) 申请号 201510016965. 4

(22) 申请日 2015. 01. 14

(71) 申请人 北京康诺生物科技有限公司

地址 102101 北京市延庆县八达岭经济开发
区康西路 1629 号

(72) 发明人 张彦明 柳家鹏

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 30/06(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

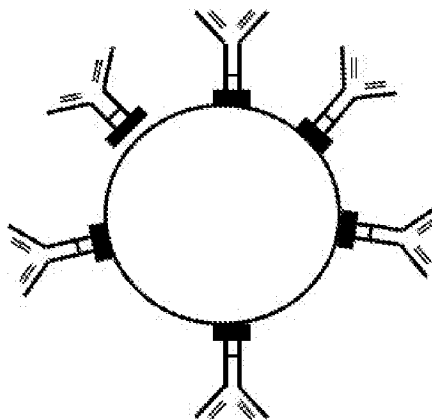
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种伏马毒素定向免疫磁珠及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及一种伏马毒素定向免疫磁珠及其制备方法和用途。该定向免疫磁珠利用蛋白 G 或者蛋白 A 偶联到磁珠上,然后用抗伏马毒素的抗体与磁珠上的蛋白 G 或者蛋白 A 偶联。然后再利用交联剂对结合伏马毒素抗体的蛋白 G/蛋白 A 磁珠进行交联。该免疫制备方法充分利用了蛋白 G 与蛋白 A 与抗体亲和力高以及与抗体的 Fc 片段特异性结合的特点。主要用于对于粮食、食品、饲料、牛奶、血样以及其他多种样本中的伏马毒素的结合和纯化。可以用于伏马毒素检测前样品前期处理,样品中伏马毒素检测以及伏马毒素纯化。



1. 一种伏马毒素的定向免疫磁珠,其特征在于包含有磁珠载体、蛋白G或者蛋白A和伏马毒素抗体。

2. 根据权利要求1中所述的定向免疫磁珠,其特征在于蛋白G或者蛋白A通过共价键偶联在载体上,然后伏马毒素抗体与蛋白G结合,然后用交联剂交联,形成磁珠-蛋白G/蛋白A-伏马毒素抗体形式的偶联载体。

3. 根据权利要求1中所述的伏马毒素定向免疫磁珠,其特征在于所用的蛋白G是天然的蛋白G或者基因重组表达的蛋白G。

4. 根据权利要求1中所述的伏马毒素定向免疫磁珠,其特征在于所用的蛋白A是天然的蛋白A或者基因重组表达的蛋白A。

5. 根据权利要求3中所述的蛋白G,包括按照序列1表达的蛋白G,以及经过序列优化后表达的蛋白G。

6. 根据权利要求4中所述的蛋白A,包括按照序列2表达的蛋白A,以及经过序列优化后表达的蛋白A。

7. 根据权利要求1中所述的载体,包括纳米磁珠以及直径超过 $1\mu\text{m}$ 的普通磁珠。

8. 根据权利要求2中所述的抗伏马毒素抗体,其特征包括单克隆IgG抗体和多克隆抗体。

9. 一种纯化伏马毒素的定向免疫磁珠制备方法,其特征包括:

1) 将磁珠用含0.01% SDS的50mM PH6.0 MES缓冲液悬起;

2) 在磁珠中加入EDC至终浓度5-20mg/ml,再加入SuIfo-NHS至终浓度10-25mg/ml;

3) 室温反应15-60分钟;

4) 反应后的磁珠用50mM MES缓冲液PH6.0洗涤3次,然后重悬在50mM PH6.0的MES缓冲液中;

5) 将蛋白G或者蛋白A加入重悬后的磁珠中,使蛋白量与磁珠表面配基的摩尔比达到5-10:1;

6) 室温反应2-4小时;

7) 反应后的磁珠用50mM MES缓冲液PH6.0洗涤3次;

8) 反应后的磁珠用1M的乙醇胺室温封闭;

9) 磁珠用20mM PBS缓冲液PH7.4洗涤3次,然后重悬在20mM PBS PH7.4缓冲液中;

10) 在磁珠中加入抗伏马毒素抗体,使抗体量与磁珠中蛋白G量摩尔比达到3-5:1;

11) 将加入抗体的磁珠在37°C反应10-40分钟;

12) 磁珠用0.1M硼酸缓冲液PH9.0洗涤3次,然后磁珠重悬在1M PH9.0的硼酸缓冲液中;

13) 将伏马毒素抗体-蛋白G/蛋白A-磁珠载体加入终浓度0.2M的三乙醇胺和20mM的DMP,PH8.3. 室温反应1-2小时;

14) 用50mM PH9.0的乙醇胺终止反应,用含有0.01%硫柳汞的10mMPBS PH7.4洗涤伏马毒素抗体-蛋白G/蛋白A-磁珠3次;

15) 将磁珠重悬在含有0.01%硫柳汞的10mMPBS PH7.4中,放于4°C保存。

10. 一种伏马毒素的定向免疫磁珠,其用途包括粮食、饲料、牛奶及乳制品、水产、血液、尿液、水中伏马毒素的分离纯化,纯化后的伏马毒素可以用于高效液相色谱及其它方

法检测。

一种伏马毒素定向免疫磁珠及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种伏马毒素的定向免疫磁珠及其制备方法和用途,属于伏马毒素纯化与检测领域。

背景技术

[0002] 伏马毒素 (Fumonisin) 是一组主要由串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 在一定温度和湿度条件下繁殖所产生的真菌毒素。伏马毒素在自然界中分布广泛,且危害性大,逐渐引起了国内外学者的高度重视。目前,已发现的伏马毒素结构类似物主要分为 A、B、C、P 四类。研究证实伏马毒素可致马大脑白质软化症 (EL-EM),神经性中毒而表现意识障碍、失明和运动失调等症状,严重者甚至造成死亡。对猪造成肺水肿综合征 (PPE),并能造成肝脏和食道损伤。伏马毒素还可引起灵长类动物的动脉粥样硬化样改变,诱发大鼠肝癌。与人类食道癌的发生也密切相关。国际癌症研究机构与加利福尼亚环境保护机构已宣布伏马毒素为人类潜在的致癌物质 (2B 级致癌物)。伏马毒素污染的主要是玉米及其制品,此外还有一些如大米、高粱、小米、牛奶、啤酒等食品。目前世界各地关于伏马毒素污染的报导较多,其中玉米及其制品的污染占了大部分。高含量的伏马毒素在很多国家和地区玉米及玉米制品中都有报道,如韩国、中国、巴西、尼日利亚、南非、英国、法国和意大利。中国四川、浙江、河南等省份也有伏马毒素污染情况的调查,阳性检出率都较高。

[0003] 基于伏马毒素的污染范围较广,毒性作用也较基于伏马毒素的污染范围较广,毒性作用也较大,许多国家和地区对伏马毒素进行了系统研究。但目前国际上对于食品与饲料中伏马毒素的限量及检测方法尚无统一标准。瑞典规定人类食物中伏马毒素的限量为 1mg/kg,美国食品与药品管理局 (FDA) 发布了供人类食用的玉米和玉米产品伏马毒素的最高限量指导性公告,规定人类食用玉米中伏马毒素最高限量为 2mg/kg。同时, FDA 的畜牧医学中心 (CVM) 也发布了动物饲料中伏马毒素的最高限量指导性公告,规定其限量范围为 1~ 50mg/kg。在 FAO/WHO 联合会上关于食品添加剂的会议 (2001 年 2 月) 中规定,伏马毒素对人体的安全限量为每天摄入量按人体体重算 FB1、FB2、FB3 量不超过 2ug/kg。我国对此的相关法规也正在制定中。在出入境检验检疫行业推荐标准中,液相色谱法对伏马毒素 B1、B2 的测定低限均为 0.05mg/kg。

[0004] 目前伏马毒素的检测方法有薄层层析法、高效液相色谱法 (HPLC)、酶联免疫吸附法 (ELISA)、酶联免疫分析法等。

[0005] 其中薄层层析法是最早使用也是最广泛使用的检测伏马毒素的方法,其优点是适合于没有经过专门培训的人员操作,且成本低,无需价格昂贵的仪器,。但是薄层层析法对样品处理繁琐,实验过程复杂,所需检测周期较长,容易受到杂质的干扰。测定时用目测半定量,主观影响较大,灵敏度不高等,已远远不能满足现代检测要求。

[0006] 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测方法检测特异、快速、灵敏度高、并且成本较低。成本低的特点,适用于基层机构大量样品的筛选和普查,可以大大节省时间和费用,因此越来越受到基层检验单位的欢迎。ELISA 方法的主要问题是容易造成假阳性。因此主要用于基

层的筛查检测。

[0007] 高效液相色谱法 (HPLC) 具有准确度高、灵敏性强、可微量测定等优点,是目前常用于食品中毒素检测的方法。但因其对样品中毒素纯度的要求较高,导致检测成本高、周期长,无法满足大批量样品快速筛选的需要,所以使用受到限制。今年来发展起来的免疫亲和柱-高效液相色谱(IAC-HPLC)将免疫亲和纯化技术与高效液相色谱相结合。使HPLC的使用更加广泛。免疫亲和柱作为一种新的净化技术,在真菌毒素的分析检测中应用越来越广泛。它是将特异性抗体结合到活化的固相载体上填充而成。当样品提取液通过柱子时,其中的抗原与抗体结合,其他杂质则通过水溶液洗掉,再用有机溶剂将抗原即毒素洗脱下来,从而使样品中的毒素得以净化。

[0008] 由于检测原理的不同,高效液相色谱法对样本的处理要求高。对于目前常用的样本前处理方法主要是通常的做法都是先将待检样本通过粉碎,过滤等步骤后,利用免疫亲和柱对样本进行伏马毒素的免疫亲和净化。然后将洗脱产物进行高效液相色谱检测。由于待检样本比较复杂,尽管前期经过了过滤等步骤,但是在用免疫亲和柱的时候还是会发生亲和柱堵塞的现象。亲和柱堵塞会降低毒素结合力,减缓反应溶液的通过率,进而影响亲和柱的纯化效率。此外,由于免疫亲和柱自身的特点,会造成类似于塔板效应,位于亲和柱顶部的凝胶与伏马毒素结合更多,而越到亲和柱底部,毒素结合越少。导致亲和柱底部的凝胶往往不能有效的结合样本中的伏马毒素。

[0009] 如果利用伏马毒素的定向免疫磁珠对样本中的伏马毒素进行纯化,对样本的要求就会放宽,只需要将粉碎后的样本在一定的溶液中与磁珠混合,磁珠上面的抗体就可以将样本中的伏马毒素吸附,磁珠利用磁性原理贴壁后,将其余的部分去除。然后再将结合在定向免疫磁珠上面的伏马毒素洗脱下来。不但操作简单,而且还可以对样本中的伏马毒素进行富集。可以检测低含量的样本。此外,由于完全在液相条件下进行伏马毒素纯化,每个磁珠对于毒素的结合能力都是相同的。

[0010] 目前市场上常见的定向免疫磁珠都是将抗体直接偶联到磁珠表面,但是由于抗体分子较大,偶联不受控制,抗体可能以任何方向偶联到磁珠上。某些抗体偶联方向会导致在抗原分子结合时由于空间位阻的原因无法结合,更有些情况下,抗体的抗原结合区域偶联到磁珠上导致这一抗原结合区域被封闭掉。由于伏马毒素分子很小,携带的抗原表位只有1-2个,一个抗原结合区域的封闭就可能这一分子的抗体失去抗原结合能力。因而会影响到整个定向免疫磁珠的抗原结合效率。利用蛋白A或者蛋白G能够特异性结合抗体恒定区(Fc区)的特点,通过蛋白A或者蛋白G将抗体固定在磁珠表面。使得抗体的抗原结合区域(Fab区)全部暴露在外,大大增加了定向免疫磁珠的抗原结合能力,我们称之为定向免疫磁珠。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种伏马毒素定向免疫磁珠及其制备方法和用途,为了达到上述目的,在本发明中,利用了蛋白G或者蛋白A的功能,蛋白G是一种G型链球菌细胞壁上的蛋白,能特异性的与多种动物抗体的Fc部位相结合,并且具有很高的亲和力。蛋白A是葡萄球菌细胞壁上的一种蛋白,与蛋白G类似,具有抗体结合能力,通过抗体的Fc区域与抗体结合,微生物来源的蛋白G和蛋白A这一特性与其多年来进化获得的宿主逃避和自

我保护能力密切相关。我们克隆了野生蛋白 G 和蛋白 A 的基因序列，并且对其密码子进行了优化、重组后，在大肠杆菌中表达出了与抗体有高亲和力的基因重组蛋白 G 和蛋白 A。将基因重组的蛋白 G 或蛋白 A 偶联到磁珠上后，再将伏马毒素抗体偶联到蛋白 G 或蛋白 A 上，制备出了伏马毒素—蛋白 G/ 蛋白 A—磁珠，再用交联剂将载体进行交联。就形成了高亲和力的伏马毒素定向免疫磁珠。该磁珠操作简便，纯化伏马毒素效率高。样本经过简单的处理后就可以进行纯化，得到纯度很高的伏马毒素。用于高效液相色谱检测。

[0012] 本发明利用了蛋白 G 与蛋白 A 与 Ig 抗体特异性结合的特点，IgG 抗体由两条重链和两条轻链构成，抗体分为 Fab 区和 Fc 区，其中，Fab 区是抗原结合的区域。蛋白 G 是链球菌细胞壁上的一种特殊的蛋白，与抗体的 Fc 区域有特异性的结合能力。蛋白 G 与抗体结合后，抗体的 Fab 区域游离在外，不影响抗体的抗原结合能力。经过我们基因优化重组后的蛋白 G，1 个分子的蛋白 G 可以结合 3 个分子的 IgG 抗体，具有很高的抗体亲和力。与蛋白 G 类似，蛋白 A 是葡萄球菌细胞壁上的一种特殊的蛋白，与抗体的 Fc 区域有特异性的结合能力。蛋白 A 与抗体结合后，抗体的 Fab 区域游离在外，不影响抗体的抗原结合能力。经过我们基因优化重组后的蛋白 A，1 个分子的蛋白 G 可以结合 6 个分子的 IgG 抗体，具有很高的抗体亲和力。

[0013] 以此蛋白 G 或者蛋白 A 为基础制备的定向免疫磁珠具有特异性好，伏马毒素结合量大，纯化效率高的特点。

[0014] 伏马毒素定向免疫磁珠及其制备方法说明如下：

1. 将磁珠用含 0.01% SDS 的 50mM PH6.0 MES 缓冲液悬起。

[0015] 2. 在磁珠中加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)至终浓度 5-20mg/ml，再加入硫化-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (SuIfo-NHS) 至终浓度 10-25mg/ml。

[0016] 3. 室温反应 15-60 分钟。

[0017] 4. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6.0 洗涤 3 次，然后重悬在 50mM PH6.0 的 MES 缓冲液中。

[0018] 5. 将蛋白 G 或者蛋白 A 加入重悬后的磁珠中，使蛋白量与磁珠表面配基的摩尔比达到 5-10:1。

[0019] 6. 室温反应 2-4 小时。

[0020] 7. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6.0 洗涤 3 次。

[0021] 8. 反应后的磁珠用 1M 的乙醇胺室温封闭。

[0022] 9. 磁珠用 20mM PBS 缓冲液 PH7.4 洗涤 3 次，然后重悬在 20mM PBS PH7.4 缓冲液中。

[0023] 10. 在磁珠中加入抗伏马毒素抗体，使抗体量与磁珠中蛋白 G 量摩尔比达到 3-5:1。

11. 将加入抗体的磁珠在 37℃ 反应 10-40 分钟。

12. 磁珠用 0.1 M 硼酸缓冲液 PH9.0 洗涤 3 次，然后磁珠重悬在 1M PH9.0 的硼酸缓冲液中。

[0024] 13. 将伏马毒素抗体—蛋白 G/ 蛋白 A—磁珠载体加入终浓度 0.2M 的三乙醇胺和 20mM 的二甲基庚二酸酯(DMP)，PH8.3。室温反应 1-2 小时。

[0025] 14. 用 50mM PH9.0 的乙醇胺终止反应，用含有 0.01% 硫柳汞的 10mMPBS PH7.4 洗

涤伏马毒素抗体—蛋白 G/ 蛋白 A —磁珠 3 次。

[0026] 15. 将磁珠重悬在含有 0.01% 硫柳汞的 10mMPBS PH7.4 中。放于 4℃ 保存。

[0027] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

1. 充分的利用了蛋白 G 与蛋白 A 与 IgG 抗体特异性结合的特性,使抗体通过蛋白 G/ 蛋白 A 偶联到载体上。并且 IgG 抗体的 Fab 片段充分的暴露在外,大幅度提高了伏马毒素的捕捉能力,伏马毒素的纯化效率也得到有效提高。

[0028] 2. 本发明使用了基因改造后的蛋白 G 和蛋白 A,通过对密码子的优化和 IgG 结合域基因的优化,使蛋白 G 和蛋白 A 的抗体结合能力大幅度提高,进而提高了伏马毒素的纯化效率。

[0029] 3. 使用本发明纯化伏马毒素操作简便,几步就可以得到纯度较高的伏马毒素,更方便操作者使用。

[0030] 4. 使用本发明得到的伏马毒素纯度很高,后续不用再做别的纯化处理就可以直接用于高效液相色谱检测或者荧光检测,节省操作者的时间和费用。

附图说明

[0031] 图 1、蛋白 G 偶联的伏马毒素定向免疫磁珠结构示意图。

[0032] 图 2、玉米样本中伏马毒素含量检测 HPLC 图谱。

[0033] 图 3、饲料样本中伏马毒素含量检测 HPLC 图谱。

[0034] 图中 A :磁珠, B :蛋白 G, C :伏马毒素抗体。

具体实施例

[0035] 实施例 1 :利用基因重组蛋白 G 制备伏马毒素定向免疫磁珠

本发明制备伏马毒素定向免疫磁珠的一个优选的实施方案如下:

1. 磁珠活化

取 5mg 羧基修饰的纳米磁珠,用含 0.01% SDS 的 50mM PH6.0 MES 缓冲液洗涤 3 次,然后将磁珠用 5mI 的 50mM PH6.0 MES 缓冲液悬起。

[0036] 2. 在磁珠中加入 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺(EDC) 100mg,再加入硫化 -N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS) (SuIfo-NHS) 100mg,室温反应 15 分钟。

[0037] 3. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6.0 洗涤 3 次,然后重悬在 5mI 50mM PH6.0 的 MES 缓冲液中。

[0038] 4. 在磁珠中加入 20mg 蛋白 G,室温反应 4 小时。

[0039] 5. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6.0 洗涤 3 次。

[0040] 6. 反应后的磁珠用 20mI 1M 的乙醇胺室温封闭 2 小时。

[0041] 7. 磁珠用 50mI 20mM PBS 缓冲液 PH7.4 洗涤 3 次,然后重悬在 5mI 20mM PBS PH7.4 缓冲液中。

[0042] 8. 在磁珠中加入 200mg 抗伏马毒素抗体,将加入抗体的磁珠在 37℃ 反应 30 分钟。

9. 磁珠用 20mM PBS 缓冲液 PH7.4 洗涤 3 次,然后重悬在 20mM PBS PH7.4 缓冲液中。

[0043] 10. 磁珠用 0.1 M 硼酸缓冲液 PH9.0 洗涤 3 次,然后磁珠重悬在 5mI 0.1M PH9.0 的硼酸缓冲液中。

[0044] 11. 称取 26mg 二甲基庚二酸酯(DMP) 加入含伏马毒素抗体—蛋白 G—磁珠的 PBS 缓冲液中, 然后加入 100uI 2M 的三乙醇胺调至 PH8. 3, 室温反应 1 小时。

[0045] 12. 用 25mI 50mM PH9. 0 的乙醇胺终止反应。

[0046] 13. 用含有 0. 01% 硫柳汞的 10mMPBS PH7. 4 洗涤伏马毒素抗体—蛋白 G—磁珠 3 次, 然后将磁珠重悬在 5mI 的该缓冲液中, 放于 4℃ 保存。

[0047] 实施例 2 : 利用基因重组蛋白 A 制备伏马毒素定向免疫磁珠

本发明制备伏马毒素定向免疫磁珠的一个优选的实施方案如下 :

1. 磁珠活化。

[0048] 2. 取 5mg 羧基修饰的纳米磁珠, 用含 0. 01% SDS 的 50mM PH6. 0 MES 缓冲液洗涤 3 次, 然后将磁珠用 5mI 的 50mM PH6. 0 MES 缓冲液悬起。

[0049] 3. 在磁珠中加入 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺(EDC) 100mg, 再加入硫化 -N- 羧基琥珀酰亚胺(NHS) (SuIfo-NHS) 100mg, 室温反应 20 分钟。

[0050] 4. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6. 0 洗涤 3 次, 然后重悬在 5mI 50mM PH6. 0 的 MES 缓冲液中。

[0051] 5. 在磁珠中加入 30mg 蛋白 A, 室温反应 4 小时。

[0052] 6. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6. 0 洗涤 3 次。

[0053] 7. 反应后的磁珠用 20mI 1M 的乙醇胺室温封闭 2 小时。

[0054] 8. 磁珠用 50mI 20mM PBS 缓冲液 PH7. 4 洗涤 3 次, 然后重悬在 5mI 20mM PBS PH7. 4 缓冲液中。

[0055] 9. 在磁珠中加入 300mg 抗伏马毒素抗体, 将加入抗体的磁珠在 37℃ 反应 30 分钟。

[0056] 10. 磁珠用 20mM PBS 缓冲液 PH7. 4 洗涤 3 次, 然后重悬在 20mM PBS PH7. 4 缓冲液中。

[0057] 11. 磁珠用 0. 1 M 硼酸缓冲液 PH9. 0 洗涤 3 次, 然后磁珠重悬在 5mI 0. 1 M 硼 PH9. 0 的硼酸缓冲液中。

[0058] 12. 称取 26mg 二甲基庚二酸酯(DMP) 加入含伏马毒素抗体—蛋白 A—磁珠的 PBS 缓冲液中, 然后加入 100uI 2M 的三乙醇胺调至 PH8. 3, 室温反应 1 小时。

[0059] 13. 用 25mI 50mM PH9. 0 的乙醇胺终止反应。

[0060] 14. 用含有 0. 01% 硫柳汞的 10mMPBS PH7. 4 洗涤伏马毒素抗体—蛋白 A—磁珠 3 次, 然后将磁珠重悬在 5mI 的该缓冲液中, 放于 4℃ 保存。

[0061] 实施例 3 : 利用蛋白 G 偶联的伏马毒素定向免疫磁珠纯化和检测玉米样本中的伏马毒素

1. 将玉米样品用钢磨粉碎, 过 2mm 分样筛。

[0062] 2. 取 10g 过筛粉碎的样品加入 50mL 20mM PH7. 4 PBS 缓冲液溶液混匀。

[0063] 3. 加入 1mg/ml 蛋白 G 偶联的黄曲霉素定向免疫磁珠 10mI, 混匀后室温放置 30 分钟。

[0064] 4. 将反应后的磁珠混合液放到磁力架上 2 分钟, 待磁珠贴壁, 用吸管去掉其余的缓冲液。

[0065] 5. 在磁珠中加入 50mI 20mM PH7. 4 PBS 洗涤磁珠, 然后将磁珠放入磁力架中待磁珠贴壁后, 用吸管去除缓冲液。

- [0066] 6. 重复洗涤步骤 3 次。
- [0067] 7. 在磁珠中加入 5mI 0.1M PH3.0 的甘氨酸缓冲液,混匀。使磁珠上的伏马毒素洗脱下来。
- [0068] 8. 将磁珠放入磁力架中使磁珠贴壁,将洗脱的缓冲液取出到另一试管中,马上加入 500uI PH9.0 1M Tris 缓冲液,充分混合。
- [0069] 9. 洗脱后的缓冲液用高效液相色谱(HPLC)检测其含量。
- [0070] 10. 高效液相色谱检测结果如图 2 所示,根据 HPLC 检测图谱可以得出该玉米样本中伏马毒素含量为 3.31ppm。
- [0071] 实施例 4:利用蛋白 A 偶联的伏马毒素定向免疫磁珠纯化和检测饲料样本中的伏马毒素
1. 将饲料样品用钢磨粉碎,过 2mm 分样筛。
- [0072] 2. 取 10g 过筛粉碎的样品加入 50mL 100mM PH8.0 Tris 缓冲液溶液混匀。
- [0073] 3. 加入 1mg/ml 蛋白 A 偶联的黄曲霉素定向免疫磁珠 10mI,混匀后室温放置 30 分钟。
- [0074] 4. 将反应后的磁珠混合液放到磁力架上 2 分钟,待磁珠贴壁,用吸管去掉其余的缓冲液。
- [0075] 5. 在磁珠中加入 50mI 100mM PH8.0 Tris 缓冲液洗涤磁珠,然后将磁珠放入磁力架中待磁珠贴壁后,用吸管去除缓冲液。
- [0076] 6. 重复洗涤步骤 3 次。
- [0077] 7. 在磁珠中加入 5mI 0.1M PH5.0 的柠檬酸缓冲液,混匀,使磁珠上的伏马毒素洗脱下来。
- [0078] 8. 将磁珠放入磁力架中使磁珠贴壁,将洗脱的缓冲液取出到另一试管中,洗脱后的缓冲液用高效液相色谱(HPLC)检测其含量。
- [0079] 9. 高效液相色谱检测结果如图 3 所示,根据 HPLC 检测图谱可以得出该饲料样本中伏马毒素含量为 4.87ppm。

蛋白 G 基因序列

1 efnykgyvsdy yknInnakt vegvkdIqaq vvesakkari seatdGIsdf Iksqtpaedt
 61 vksieIaeak vIanreIdky gvsdyhknIi nnaktvegvk dIqaqvvesa
 kkariseatd
 121 gIsdfIksqt paedtvksie IaeakvIanr eIdkygvsdy yknInnakt
 vegvkaIide
 181 iIaaIpktdt ykIiIngktI kgettteavd aataekvfkq yandngvdge
 wtyddatktf
 241 tvtekpevid aseItpavtt ykIvingktI kgettteavd aataekvfkq
 yandngvdge
 301 wtyddatktf tvtekpevid aseItpavtt ykIvingktI kgetttkavd
 aetaekafkq
 361 yandngvdgv wtyddatktf tvtemvtevp gdaptepekp easipIvpIt
 patpiakdda
 421 kkddtkkeda kkpeakkeda kkaetIpttg eg SNPfftaa aIavmagaga
 Iavaskrked

GenBank: CAA27638.1

蛋白 A 基因序列

1 mkkkkiysir kIgvGiasvt IgtIIisggv tpaanaaqhd eaqqnafyqv InmpnInadq
 61 rngfiqsIkD dpsqsanvIg eaqkIndsqa pkadaqqnkf nkDqqsafye
 iInmpnInee
 121 qrngfiqsIk ddpsqstnVI geakkInesq apkadnnfnk eqqnafyeiI
 nmpnIneeqr
 181 ngfiqsIkdd psqsanIIae akkIndaqap kadnkfnkeq qnafyeiIhI
 pnIteeqrng
 241 fiqsIkddps vskeiIaeak kIndaqapke ednnkpgked gnkpgkedgn
 kpgkednkpp
 301 gkedgnkpgk ednkpgked gnkpgkedgn kpgkedgnkp gkedgnkpgk
 edngvvhvk
 361 pgdtvndiak angttadkia adnkIadknm ikpgqeIvvd kkqpanhada
 nkaqaIpetg
 421 eenpfigttv fggIsIaIga allagrpspn yknkqyttid iilskpilty ir

GenBank: AAB05743.1

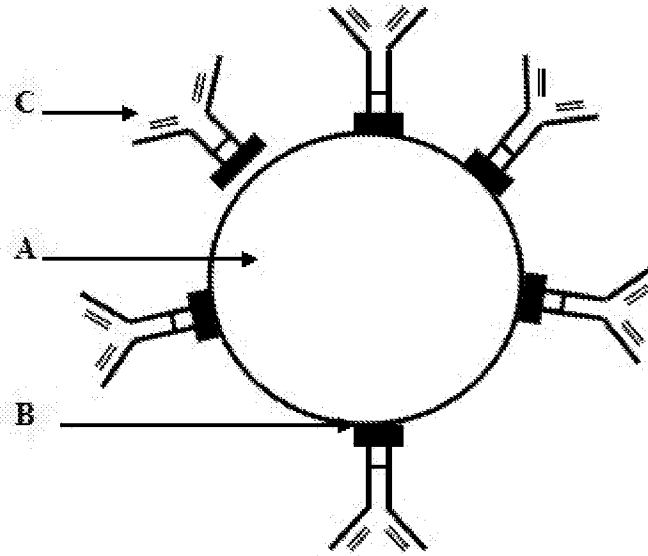


图 1

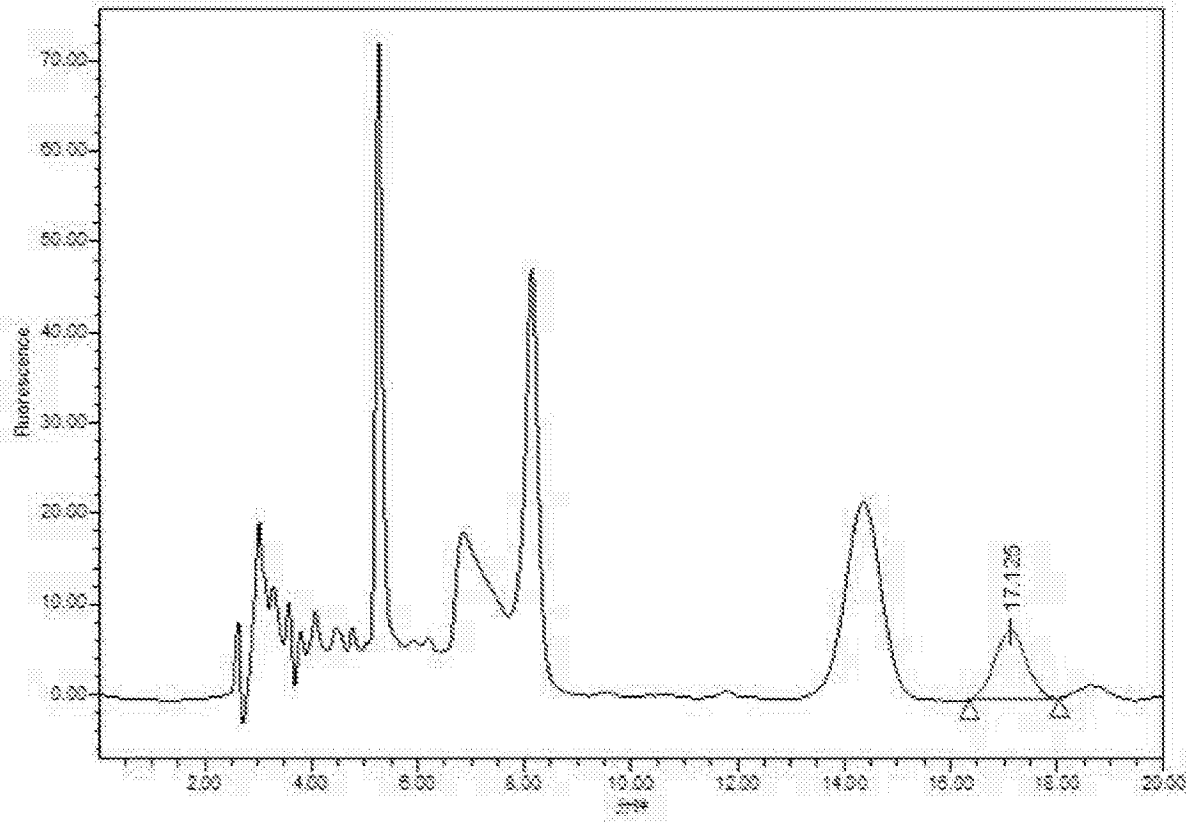


图 2

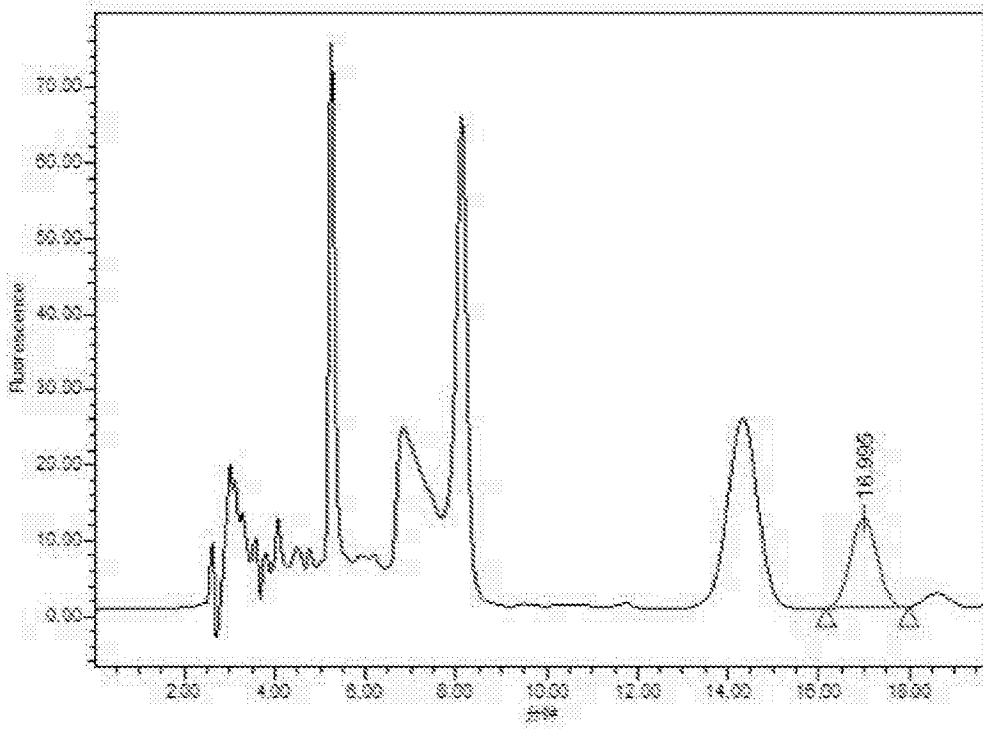


图 3

专利名称(译)	一种伏马毒素定向免疫磁珠及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN105842439A	公开(公告)日	2016-08-10
申请号	CN201510016965.4	申请日	2015-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	北京康诺生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京康诺生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京康诺生物科技有限公司		
[标]发明人	张彦明 柳家鹏		
发明人	张彦明 柳家鹏		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N33/569 G01N30/06		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种伏马毒素定向免疫磁珠及其制备方法和用途。该定向免疫磁珠利用蛋白G或者蛋白A偶联到磁珠上，然后用抗伏马毒素的抗体与磁珠上的蛋白G或者蛋白A偶联。然后再利用交联剂对结合伏马毒素抗体的蛋白G/蛋白A磁珠进行交联。该免疫制备方法充分利用了蛋白G与蛋白A与抗体亲和力高以及与抗体的Fc片段特异性结合的特点。主要用于对于粮食、食品、饲料、牛奶、血样以及其他多种样本中的伏马毒素的结合和纯化。可以用于伏马毒素检测前样品前期处理，样品中伏马毒素检测以及伏马毒素纯化。

