



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105842448 A

(43) 申请公布日 2016. 08. 10

(21) 申请号 201510016973. 9

(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 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 30/06(2006. 01)

G01N 1/34(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

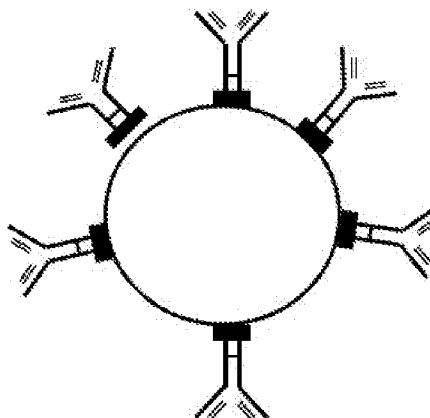
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠及其制备方法
和用途

(57) 摘要

本发明涉及一种黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠及其制备方法和用途。该定向抗体免疫磁珠利用蛋白G或者蛋白A共价偶联到磁珠上,然后用抗黄曲霉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黄曲霉毒素抗体的蛋白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抗体的Fc片段特异性结合的特点。主要用于对于食品中、饲料、牛奶、血样以及其他多种样本中的黄曲霉毒素的结合和纯化。可以用于黄曲霉毒素检测前样品前期处理,样品中黄曲霉毒素检测以及黄曲霉毒素纯化。



1. 一种黄曲霉毒素的定向抗体免疫磁珠,其特征在于包含有磁珠载体、蛋白 G 或者蛋白 A 和黄曲霉毒素抗体。

2. 根据权利要求 1 中所述的定向抗体免疫磁珠,其特征在于蛋白 G 或者蛋白 A 通过化学键偶联在载体上,然后黄曲霉毒素抗体与蛋白 G 结合,然后用交联剂交联,形成载体-蛋白 G/蛋白 A-黄曲霉毒素抗体形式的偶联载体。

3. 根据权利要求 1 中所述的黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠,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 中所述的黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠,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 中所述的抗黄曲霉毒素抗体,其特征在于包括单克隆 IgG 抗体和多克隆抗体。

9. 一种纯化黄曲霉毒素的定向抗体免疫磁珠制备方法,其特征在于

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 SuIfu-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) 在磁珠中加入抗黄曲霉毒素抗体,使抗体量与磁珠中蛋白 G 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;

13) 将黄曲霉毒素抗体-蛋白 G/蛋白 A-磁珠载体加入终浓度 0.2M 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 洗涤黄曲霉毒素抗体-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℃ 保存。

10. 一种黄曲霉毒素的定向抗体免疫磁珠,其用途在于包括粮食、饲料、牛奶及乳制品、水产、血液、尿液、水中黄曲霉毒素的分离纯化,纯化后的黄曲霉毒素可以用于高效液相色谱

谱等方法检测。

一种黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种黄曲霉毒素的定向抗体免疫磁珠及其制备方法和用途。该免疫磁珠利用蛋白 G 或者蛋白 A 与磁珠共价偶联,然后将黄曲霉毒素抗体连接到蛋白 G 或者蛋白 A 上,再采用交联剂进行交联,制备成稳定的黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠。该磁珠具有特异性强,黄曲霉毒素纯化效率高和使用简便的特点。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(aflatoxin,AFT)主要是由黄曲霉和寄生曲霉等真菌产生的一类有毒次生代谢物。在世界不同地区都发现了这些真菌大量存在于供人类食用的食品中,黄曲霉毒素污染已导致严重的食品安全问题。黄曲霉毒素是一类毒性极强的物质,具有强致癌性和强免疫抑制性。1993 年 AFT 被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为 I 类致癌物。黄曲霉毒素广泛的分布于发霉的粮食及其制品中,特别是花生、花生油、玉米及其制品、乳及乳制品,发霉的饲料中也有发现含有较多的黄曲霉毒素。迄今为止,已经发现的黄曲霉毒素至少包含黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1、M2 等 17 种结构相似且特征已知的化合物。其中黄曲霉毒素 B1 是(AFTB1)是自然发生潜力最大、最为常见的一种毒素。是黄曲霉毒素中的主要成份。其毒性和致癌性也最强。

[0003] 世界各国和地区均制定了严格的 AFT 限量标准,且限量要求日益严格。

[0004] 目前黄曲霉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)、放射免疫分析法、微柱法等。

[0005] 其中薄层层析法是最早使用也是最广泛使用的检测黄曲霉毒素的方法,但是薄层层析法对样品处理繁琐,实验过程复杂,所需时间较多,容易受到杂质的干扰。比较适合黄曲霉毒素的定性检测。

[0006] 放射免疫分析法由于使用到放射性元素,容易造成放射性污染,目前已经很少人使用。微柱法主要用于快速筛选出超标样本,很难对毒素进行种类区分和定量检验。仅仅适用于定性检测。

[0007] 高效液相色谱法(HPLC)在操作上较为简便,可同时检测多个黄曲霉毒素种类,适于大批量的样品分析。但是高效液相色谱检测收到前期样本处理的限制,只有前期将样本进行纯化才能得到更好的检测结果。而免疫亲和纯化柱很好的解决了这一问题。利用免疫亲和纯化柱和高效液相色谱联用能快速、准确的得到结果,并且灵敏度很高。目前已经被国家标准 GB/T18979-2003 采用。

[0008] 酶联免疫分析法(ELISA)操作简便,使用较为安全。主要通过酶促反应的放大作用来将检测信号放大,然后通过仪器检测酶促反应底物的颜色变化来进行定性或者定量。酶联免疫检测目前已经成为黄曲霉毒素检测的常用方法。

[0009] 高效液相色谱(HPLC)和酶联免疫分析(ELISA)等检测方法都需要将样本进行前期处理。由于检测黄曲霉毒素的样本来源复杂,不仅包括玉米、花生、中药材等单一样品,还包括动物饲料,食品等组分比较复杂的样本。因此将样本进行前期处理已经成为黄曲霉毒

素检测不可缺少的步骤。

[0010] 由于检测原理的不同,高效液相色谱法对样本的处理要求更高。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黄曲霉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黄曲霉毒素结合更多,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黄曲霉毒素。

[0011] 酶联免疫检测法(ELISA)相对来说对样本的要求比较宽松。一般的样本经过简单的粉碎—提取—过滤就可以检测。但是由于待检样本中黄曲霉毒素含量差别较大。这一样本处理过程会造成一些毒素的损失,影响最终的检测结果。

[0012] 如果利用黄曲霉毒素的免疫磁珠对样本中的黄曲霉毒素进行纯化,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黄曲霉毒素吸附,磁珠利用磁性原理贴壁后,将其余的部分去除。然后再将结合在免疫磁珠上面的黄曲霉毒素洗脱下来。不但操作简单,而且还可以对样本中的黄曲霉毒素进行富集。可以检测低含量的样本。此外,由于完全在液相条件下进行黄曲霉毒素纯化,每个磁珠对于毒素的结合能力都是相同的。

[0013] 目前市场上常见的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。由于黄曲霉毒素分子很小,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。是的抗体的抗原结合区域(Fab区)全部暴露在外,大大增加了免疫磁珠的抗原结合能力。我们称之为定向抗体免疫磁珠。

发明内容

[0014] 本发明的目的在于提供一种黄曲霉毒素定向抗体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。蛋白A也具有抗体结合能力,也是通过抗体的Fc区域与抗体结合。微生物来源的蛋白G和蛋白A这一特性预期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,再将黄曲霉毒素抗体偶联到蛋白G或蛋白A上,制备出了黄曲霉毒素—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黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠。该磁珠操作简便,纯化黄曲霉毒素效率高。样本经过简单的处理后就可以进行纯化,得到纯度很高的黄曲霉毒素,用

于高效液相色谱检测和 ELISA 检测。

[0015] 具体操作如下：

本发明最大的优势就是利用了蛋白 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。

[0016] 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。

[0017] 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。以此蛋白 G 或者蛋白 A 为基础制备的定向抗体免疫磁珠具有特异性好，黄曲霉毒素结合量大，纯化效率高的特点。

[0018] 黄曲霉毒素定向抗体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。

[0019] 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) (SuIfu-NHS) 至终浓度 10-25mg/mL。

[0020] 3. 室温反应 15-60 分钟。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 6. 室温反应 2-4 小时。

[0024] 7. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6.0 洗涤 3 次。

[0025] 8. 反应后的磁珠用 1M 的乙醇胺室温封闭。

[0026] 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。

[0027] 10. 在磁珠中加入抗黄曲霉毒素抗体，使抗体量与磁珠中蛋白 G 量摩尔比达到 3-5:1。

[0028] 11. 将加入抗体的磁珠在 37℃ 反应 10-40 分钟。

[0029] 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。

[0030] 13. 将黄曲霉毒素抗体—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。

[0031] 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 洗涤黄曲霉毒素抗体—蛋白 G/ 蛋白 A —磁珠 3 次。

[0032] 15. 将磁珠重悬在含有 0.01% 硫柳汞的 10mMPBS PH7.4 中，放于 4℃ 保存。

[0033] 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,大幅度提高了黄曲霉毒素的捕捉能力,黄曲霉毒素的纯化效率也得到有效提高。

[0034] 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,进而提高了黄曲霉毒素的纯化效率。

[0035] 3. 使用本发明纯化黄曲霉毒素操作简便,几步就可以得到纯度较高的黄曲霉毒素。更方便操作者使用。

[0036] 4. 使用本发明得到的黄曲霉毒素纯度很高,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。节省了操作者的时间和费用。

附图说明

[0037] 图 1、蛋白 G 偶联的黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠结构示意图。

[0038] 图 2、玉米中 AFB1 含量检测 HPLC 图谱。

[0039] 图 3、饲料样本中 AFB1 含量检测 HPLC 图谱。

[0040] 图中 A :磁珠, B :蛋白 G, C :黄曲霉毒素抗体。

具体实施例

[0041] 实施例 1 :利用基因重组蛋白 G 制备黄曲霉毒素 B1 定向抗体免疫磁珠

本发明制备黄曲霉毒素定向抗体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。

[0042] 2. 在磁珠中加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)100mgI,再加入硫化-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (SuIfo-NHS) 100mg,室温反应 15 分钟。

[0043] 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。

[0044] 4. 在磁珠中加入 50mg 蛋白 G,室温反应 4 小时。

[0045] 5. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6.0 洗涤 3 次。

[0046] 6. 反应后的磁珠用 20mI 1M 的乙醇胺室温封闭 2 小时。

[0047] 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。

[0048] 8. 在磁珠中加入 200mg 抗黄曲霉毒素 B1 抗体,将加入抗体的磁珠在 37℃反应 30 分钟。

[0049] 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。

[0050] 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 0.1 M 硼 PH9.0 的硼酸缓冲液中。

[0051] 11. 称取 26mg 二甲基庚二酸酯(DMP)加入含黄曲霉毒素抗体—蛋白 G—磁珠的 PBS 缓冲液中,然后加入 100uI 2M 的三乙醇胺至调 PH8.3. 室温反应 1 小时。

[0052] 12. 用 25mI 50mM PH9.0 的乙醇胺终止反应。

[0053] 13. 用含有 0.01% 硫柳汞的 10mMPBS PH7.4 洗涤黄曲霉毒素抗体—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。

[0054] 实施例 2:利用基因重组蛋白 A 制备黄曲霉毒素 B1 定向抗体免疫磁珠

本发明制备黄曲霉毒素定向抗体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。

[0055] 2. 在磁珠中加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)100mgI,再加入硫化-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (SuIfu-NHS) 100mg,室温反应 15 分钟。

[0056] 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。

[0057] 4. 在磁珠中加入 60mg 蛋白 A,室温反应 4 小时。

[0058] 5. 反应后的磁珠用 50mM MES 缓冲液 PH6.0 洗涤 3 次。

[0059] 6. 反应后的磁珠用 20mI 1M 的乙醇胺室温封闭 2 小时。

[0060] 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。

[0061] 8. 在磁珠中加入 300mg 抗黄曲霉毒素 B1 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。

[0062] 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 0.1 M 硼 PH9.0 的硼酸缓冲液中。

[0063] 11. 称取 26mg 二甲基庚二酸酯(DMP)加入含黄曲霉毒素抗体—蛋白 A—磁珠的 PBS 缓冲液中,然后加入 100uI 2M 的三乙醇胺至调 PH8.3. 室温反应 1 小时。

[0064] 12. 用 25mI 50mM PH9.0 的乙醇胺终止反应。

[0065] 13. 用含有 0.01% 硫柳汞的 10mMPBS PH7.4 洗涤黄曲霉毒素抗体—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。

[0066] 实施例 3:利用蛋白 G 偶联的黄曲霉毒素 B1 定向抗体免疫磁珠纯化和检测玉米中的黄曲霉毒素

1. 将玉米样品用钢磨粉碎,过 2mm 分样筛;

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

3. 加入 1mg/ml 蛋白 G 偶联的黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠 10mI,混匀后室温放置 30 分钟。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 6. 重复洗涤步骤 3 次。

[0070] 7. 在磁珠中加入 5mI 0.1M PH3.0 的甘氨酸缓冲液,混匀。使磁珠上的黄曲霉毒素

洗脱下来。

[0071] 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。

[0072] 9. 洗脱后的缓冲液用高效液相色谱(HPLC)检测其含量。

[0073] 10. 高效液相色谱检测结果如图 2 所示。

11. 根据 HPLC 检测图谱可以得出该玉米样本中黄曲霉毒素 B1 出峰时间为 15.637 分钟,含量为 3.487ppb。

[0074] 实施例 4:利用蛋白 A 偶联的黄曲霉毒素 B1 定向抗体免疫磁珠纯化和检测饲料中的黄曲霉毒素

1. 将饲料样品用钢磨粉碎,过 2mm 分样筛。

[0075] 2. 取 10g 过筛粉碎的样品加入 50mL 100mM PH8.0 Tris 缓冲液溶液混匀。

[0076] 3. 加入 1mg/mL 蛋白 A 偶联的黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠 10mL,混匀后室温放置 30 分钟。

[0077] 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。

[0078] 5. 在磁珠中加入 50mL 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。

[0079] 6. 重复洗涤步骤 3 次。

[0080] 7. 在磁珠中加入 5mL 0.1M PH5.0 的柠檬酸缓冲液,混匀。使磁珠上的黄曲霉毒素洗脱下来。

[0081] 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。

[0082] 9. 洗脱后的缓冲液用高效液相色谱(HPLC)检测其含量。

[0083] 10. 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黄曲霉毒素 B1 出峰时间为 15.298 分钟,含量为 62.804ppb。

蛋白 G 基因序列

1 efnykgvsdy yknlinnakt vegvkdIlaq vvesakkari seatdgl sdf Iksqtpaedt
61 vksielaeak vIlanreIdky gvsdyhknli nnaktvegk dIlaqvvesa kkariseatd
121 glsdfIksqt paedtvksie laeakvIlanr eIdkygvsdy yknlinnakt vegvkaIide
181 ilaaIpktdt ykIiIngktI kgettteavd aataekvfkq yandngvdge wtyddatktf
241 tvtekpevid aseItpavtt yklvingktI kgettteavd aataekvfkq yandngvdge
301 wtyddatktf tvtekpevid aseItpavtt yklvingktI kgetttkavd aetaekafkq
361 yandngvdgv wtyddatktf tvtemvtevp gdaptepekp easipIvpIt patpiakdda
421 kkddtkkeda kkpeakkeda kkaetIpttg eg snpffftaa aIavmagaga Iavaskrked

GenBank: CAA27638.1

蛋白 A 基因序列

1 mkkkkiysir kIlgvgiasvt IgtIIisggv tpaanaaqhd eaqqnafyqv InmpnInadq
61 rngfiqslkd dpsqsanvlg eaqkIindsqa pkadaqqnkf nkdqqsafye iInmpnInee
121 qrngfiqslk ddpsqstnvl geakkInesq apkadnnfnk eqqnafyeil nmpnIneeqr
181 ngfiqslkdd psqsanIIae akkIndaqap kadnkfnkeq qnafyeilhl pnIteeqrng
241 fiqslkddps vskeilaek kIndaqapke ednnkpgked gnkpgkedgn kpgkednkkp
301 gkedgnkpgk ednkkpgked gnkpgkedgn kpgkedgnkp gkedgnkpgk edgngvhvkv
361 pgdtvndiak angttadkia adnkladknm ikpgqeIvvd kkqpanhada nkaqaIpetg
421 eenpfigttv fggIsIalga allagrpspn yknkqyttid iilskpilty ir

GenBank: AAB05743.1

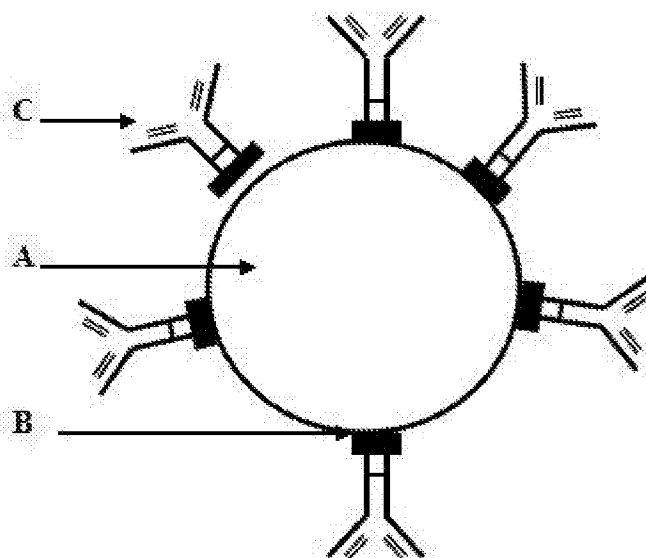


图 1

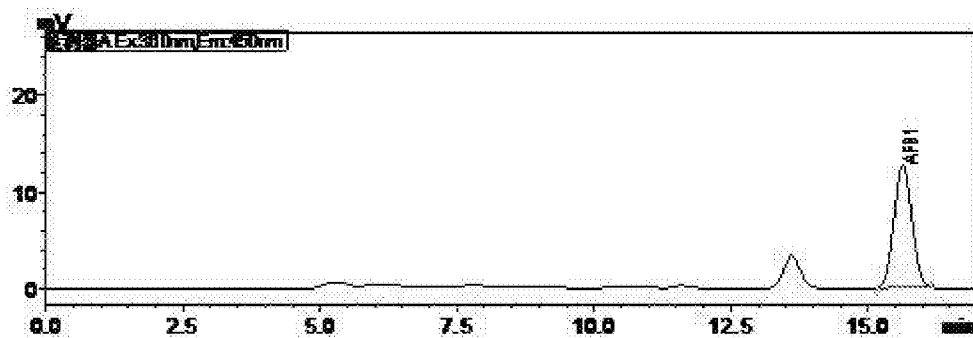


图 2

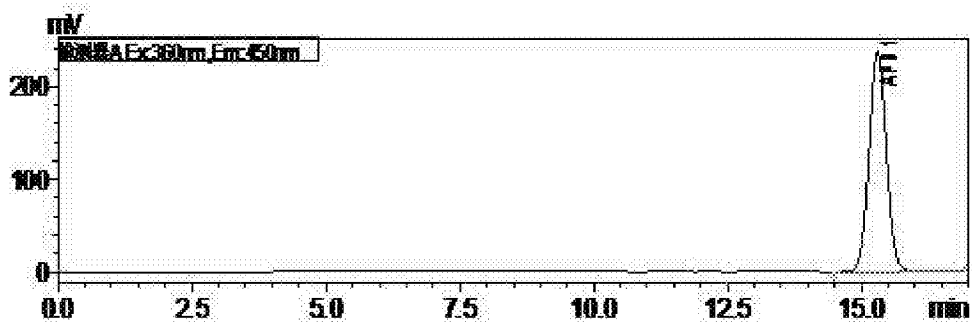


图 3

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN105842448A	公开(公告)日	2016-08-10
申请号	CN201510016973.9	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	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531 G01N30/06 G01N1/34		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种黄曲霉毒素定向抗体免疫磁珠及其制备方法和用途。该定向抗体免疫磁珠利用蛋白G或者蛋白A共价偶联到磁珠上，然后用抗黄曲霉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黄曲霉毒素抗体的蛋白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。主要用于对于食品中、饲料、牛奶、血样以及其他多种样本中的黄曲霉毒素的结合和纯化。可以用于黄曲霉毒素检测前样品前期处理，样品中黄曲霉毒素检测以及黄曲霉毒素纯化。

