



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105842449 A

(43) 申请公布日 2016. 08. 10

(21) 申请号 201510017377. 2

(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

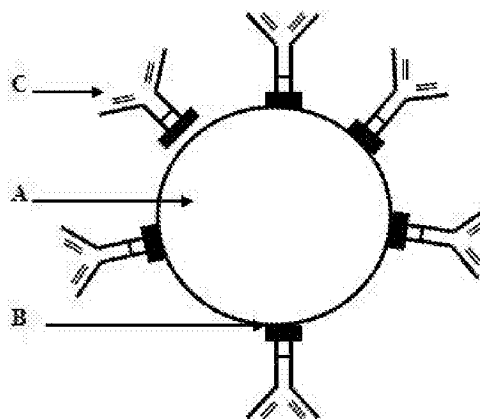
序列表1页 附图1页

### (54) 发明名称

一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫磁珠及其制备方法  
和用途

### (57) 摘要

本发明涉及一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇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,然后用抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇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脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体的蛋白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脱氧雪腐镰刀菌烯醇的结合和纯化。可以用于脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测前样品前期处理,样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测以及脱氧雪腐镰刀菌烯醇纯化。



1. 一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇的定向免疫磁珠,其特征包含有磁珠载体、蛋白 G 或者蛋白 A 和脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体。
2. 根据权利要求 1 中所述的定向免疫磁珠,其特征包含有蛋白 G 或者蛋白 A 通过共价键偶联在载体上,然后脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体与蛋白 G 结合,然后用交联剂交联,形成磁珠-蛋白 G/蛋白 A-脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体形式的偶联载体。
3. 根据权利要求 1 中所述的脱氧雪腐镰刀菌烯醇定向免疫磁珠,其特征包含有所用的蛋白 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 中所述的脱氧雪腐镰刀菌烯醇定向免疫磁珠,其特征包含有所用的蛋白 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,包含按照序列 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,包含按照序列 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,包含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 中所述的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体,其特征包含有单克隆 IgG 抗体和多克隆抗体。
9. 一种纯化脱氧雪腐镰刀菌烯醇的定向免疫磁珠制备方法,其特征包含有:
  - 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) 在磁珠中加入抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体,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 0.1 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) 将脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体-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 洗涤脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体-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. 一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇的定向免疫磁珠,其用途包含有包括粮食、饲料、牛奶及乳

制品、水产、血液、尿液、水中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的分离纯化,纯化后的脱氧雪腐镰刀菌烯醇可以用于高效液相色谱及其它方法检测。

## 一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫磁珠及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇的免疫磁珠及其制备方法和用途,属于脱氧雪腐镰刀菌烯醇的纯化与检测领域。

### 背景技术

[0002] 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON) 又名呕吐毒素 (vomitoxin, VT), 主要是由某些镰刀菌产生的次级代谢产物之一, 一种单端孢霉烯族毒素。DON 是单端孢霉烯族毒素中最常见的一种, 研究表明 DON 虽然没有明显的致癌、致突变性, 但具有广泛的毒性, 特别是对免疫功能具有明显的影响, 根据 DON 的剂量和暴露时间不同可引起免疫抑制或免疫刺激。动物采食带有霉菌毒素的饲料均可发生中毒, 猪对 DON 的致吐作用最敏感, 经口最小呕吐量为 0.1 ~ 0.2 mg/kg, 主要产毒菌是禾谷镰刀菌、雪腐镰刀菌等。DON 是全世界饲料和粮食的污染霉菌毒素之一, 也是我国恶性肿瘤高发区居民粮食主要污染霉菌毒素之一。国家标准 GB2761- 2005 《食品中真菌毒素限量》中, 小麦及玉米中 DON 的限量为 1000  $\mu$ g/kg。2007 年 3 月 1 日实施的国家强制性标准 GB20833- 2007 中猪配合饲料中 DON 的允许量  $\leq$  1mg/kg。

[0003] 目前脱氧雪腐镰刀菌烯醇常用的检测方法有薄层层析法 (TLC)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、气相色谱法 (GC) 和高效液相色谱法 (HPLC) 等。

[0004] 薄层色谱测定法 (thin layer chromatography, TLC) 这是最早建立的一种检测方法, 具有简便、经济、对设备和检验人员要求不高等特点。是我国国家标准检测方法之一。但由于 TLC 法的精确度低, 操作过程复杂, 分析结果的可重复性和再现性差, 该法目前仍是除北美和欧洲以外其他国家, 尤其是发展中国家检测食品和饲料中真菌毒素的常规方法。

[0005] 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 酶联免疫吸附试验又称之为免疫测定法, 是以免疫抗体为基础的免疫检测技术, 是一类快速、灵敏且操作简单的分析方法, 在毒素和有毒化合物等小分子化合物的检测中应用已十分广泛, 目前已经有检测呕吐毒素的 ELISA 方法和产品。但目前检测 DON 的 ELISA 方法的主要缺点是由于存在所用抗体与 DON 的乙酰化类似物的交叉反应致使其检出值偏高, 较易出现假阳性。另外, 使用 ELISA 方法难以在纯有机溶液剂中检测 DON。

[0006] 气相色谱法 (gas chromatography GC), 由于 DON 分子中含有 3 个羟基, 易形成稳定的氢键, 降低挥发性, 因此在进行气相色谱分析前必须进行衍生化, 将 DON 衍生形成三甲基硅烷物, 但是衍生试剂如七氟丁酸酐 (HFBA) 价格昂贵, 且易挥发。GC 具有灵敏、高选择性、准确性和精确性等优点, 另外, 用 GC 还能实现对多种真菌毒素的同时检测。但 GC 色谱中存在标准曲线线性关系不好、响应漂移、上一次进样样品的滞留和记忆效应、MS 检测时重复进样变异系数大以及存在基质干扰等问题。

[0007] 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 高效液相色谱方法 (HPLC) 高效液相色谱对样品的适用性广, 不受分析对象挥发性和热稳定性的限制, 因而弥补了气相色谱法的不足。是定量分析真菌毒素最常用的方法。

[0008] 在使用高效液相色谱检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇时,需要先将脱氧雪腐镰刀菌烯醇样品进行净化处理。目前常用的净化处理方法就是固相萃取法,也叫柱层析法。是目前真菌毒素净化使用最广泛的方法。其中,免疫亲和柱方法的分析速度快,灵敏度高,分离效率和回收率高,不需要剧毒的真菌毒素标准物来标定,安全可靠,因而成为最常用的方法。

[0009] 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脱氧雪腐镰刀菌烯醇的免疫亲和净化。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脱氧雪腐镰刀菌烯醇结合更多,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脱氧雪腐镰刀菌烯醇。

[0010] 如果利用脱氧雪腐镰刀菌烯醇的定向免疫磁珠对样本中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇进行纯化,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脱氧雪腐镰刀菌烯醇吸附,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脱氧雪腐镰刀菌烯醇洗脱下来。不但操作简单,而且还可以对样本中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇进行富集,可以检测低含量的样本,此外,由于完全在液相条件下进行脱氧雪腐镰刀菌烯醇纯化,每个磁珠对于毒素的结合能力都是相同的。

[0011] 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。由于脱氧雪腐镰刀菌烯醇分子很小,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。

## 发明内容

[0012] 本发明的目的在于提供一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇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。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,再将脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体偶联到蛋白 G 或蛋白 A 上,制备出了脱氧雪腐镰刀菌烯醇—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脱氧雪腐镰刀菌烯醇定向免疫磁

珠。该磁珠操作简便,纯化脱氧雪腐镰刀菌烯醇效率高。样本经过简单的处理后就可以进行纯化,得到纯度很高的脱氧雪腐镰刀菌烯醇。用于高效液相色谱检测。

[0013] 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。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,脱氧雪腐镰刀菌烯醇结合量大,纯化效率高的特点。

[0014] 脱氧雪腐镰刀菌烯醇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. 在磁珠中加入抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体,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 0.1 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. 将脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体—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 洗涤脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体—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°C 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,大幅度提高了脱氧雪腐镰

刀菌烯醇的捕捉能力,脱氧雪腐镰刀菌烯醇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,进而提高了脱氧雪腐镰刀菌烯醇的纯化效率。

[0029] 3. 使用本发明纯化脱氧雪腐镰刀菌烯醇操作简便,几步就可以得到纯度较高的脱氧雪腐镰刀菌烯醇。更方便操作者使用。

[0030] 4. 使用本发明得到的脱氧雪腐镰刀菌烯醇纯度很高,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

[0031] 图 1、蛋白 G 偶联的脱氧雪腐镰刀菌烯醇定向免疫磁珠结构示意图。

[0032] 图 2、麸皮中 DON 含量检测 HPLC 图谱。

[0033] 图 3、猪饲料样本中 DON 含量检测 HPLC 图谱。

[0034] 图中 A :磁珠, B :蛋白 G, C :脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体。

## 实施例

[0035] 实施例 1 :利用基因重组蛋白 G 制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇定向免疫磁珠  
本发明制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇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 抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体,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 0.1 M 硼 PH9.0 的硼酸缓冲液中。

[0044] 11. 称取 26mg 二甲基庚二酸酯(DMP)加入含脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体—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。

[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 洗涤脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体—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 制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇定向免疫磁珠

本发明制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇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-羟基琥珀酰亚胺(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 抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体,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 PH9.0 的硼酸缓冲液中。

[0058] 12. 称取 26mg 二甲基庚二酸酯(DMP)加入含脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体—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。

[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 洗涤脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体—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 偶联的脱氧雪腐镰刀菌烯醇定向免疫磁珠纯化和检测麸皮中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇

1. 将麸皮样品用钢磨粉碎,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,使磁珠上的脱氧雪腐镰刀菌烯醇洗脱下来。

[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麸皮样本中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量为 1081ppb。

[0071] 实施例 4:利用蛋白 A 偶联的脱氧雪腐镰刀菌烯醇定向免疫磁珠纯化和检测猪饲料中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇

将猪饲料样品用钢磨粉碎,过 2mm 分样筛;

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

[0072] 2. 加入 1mg/ml 蛋白 A 偶联的黄曲霉素定向免疫磁珠 10mL,混匀后室温放置 30 分钟。

[0073] 3. 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。

[0074] 4. 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。

[0075] 5. 重复洗涤步骤 3 次。

[0076] 6. 在磁珠中加入 5mL 0.1M PH5.0 的柠檬酸缓冲液,混匀,使磁珠上的脱氧雪腐镰刀菌烯醇洗脱下来。

[0077] 7. 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。

[0078] 8. 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脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量为 727ppb。

## 蛋白 G 基因序列

1 efnkygvsdy yknInnakt vegvkdIqaq vvesakkari seatdglSdf Iksqtpaedt  
61 vksieIaeak vIanreIdky gvsdyhknli nnaktvegvk dIqaqvvesa kkariseatd  
121 glSdfIksqt 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 egsnpfftaa 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 kpgkednkkp  
301 gkedgnkpgk ednkkpgked gnkpgkedgn kpgkedgnkp gkedgnkpgk edgngvhvkv  
361 pgdtvndiak angttadkia adnkIadknm ikpgqeIvvd kkqpanhada nkaqaIpetg  
421 eenpfigttv fggIsIaIga aIIagrpspn yknkqyttid iIIskpilty ir

GenBank: AAB05743.1

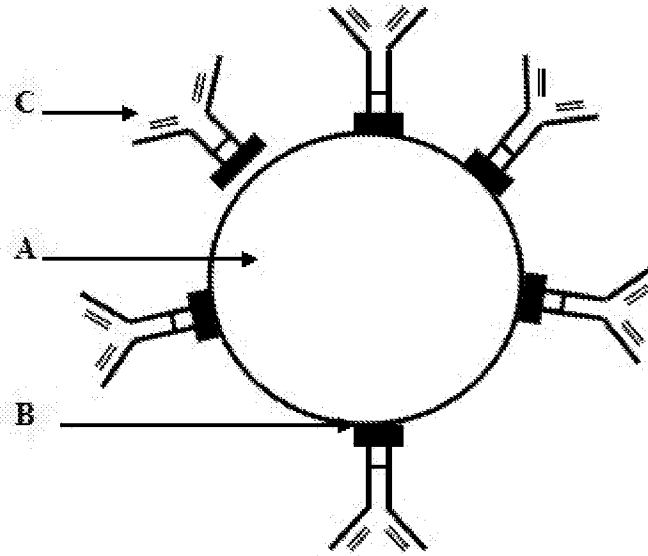


图 1

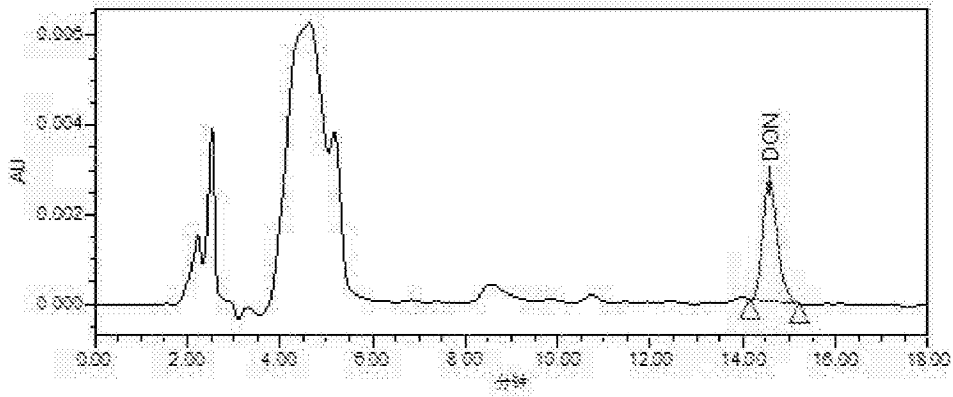


图 2

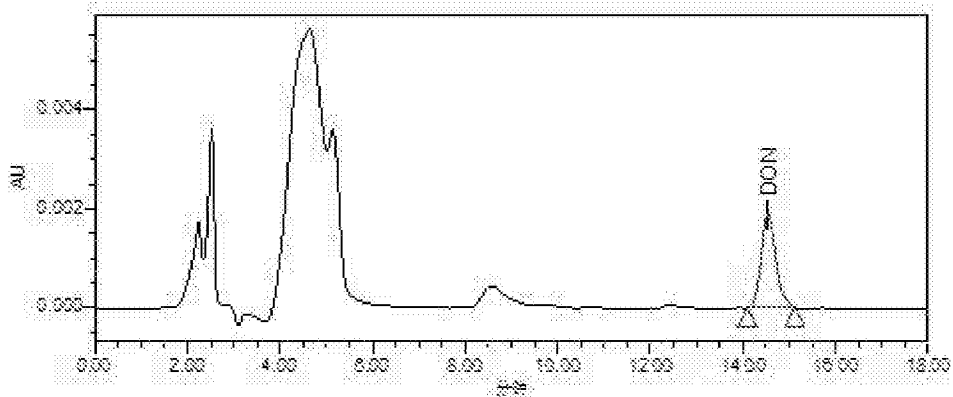


图 3

专利名称(译)	一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫磁珠及其制备方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN105842449A</a>	公开(公告)日	2016-08-10
申请号	CN201510017377.2	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	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇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，然后用抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇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脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体的蛋白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脱氧雪腐镰刀菌烯醇的结合和纯化。可以用于脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测前样品前期处理，样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测以及脱氧雪腐镰刀菌烯醇纯化。

