



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108761059 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201810269407.2

(22)申请日 2018.03.29

(71)申请人 山东美正生物科技有限公司

地址 276801 山东省日照市东港区昭阳北路69号

(72)发明人 柳家鹏 王涛 于蓉 龚利新

(74)专利代理机构 青岛高晓专利事务所(普通合伙) 37104

代理人 白莹 于正河

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

B01J 20/286(2006.01)

B01D 15/38(2006.01)

B01J 20/30(2006.01)

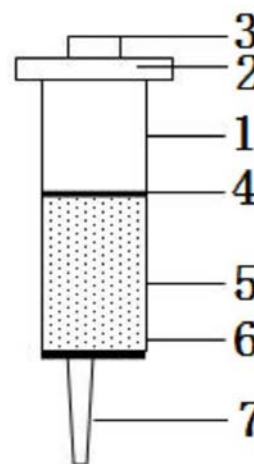
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

### (54)发明名称

一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱及其制备方法 and 用途

### (57)摘要

本发明属于食品安全检测技术领域,具体涉及一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途,首先将采用环氧氯丙烷活化法活化的琼脂糖凝胶作为载体,然后将基因重组蛋白G偶联到载体上,得到了蛋白G-sepharose,再将己烯雌酚抗体连接到蛋白G-sepharose上,得到了抗体-蛋白G-sepharose,再用交联剂进行交联,得到了抗体-蛋白G-sepharose填料,最后将抗体-蛋白G-sepharose填料装柱后形成了高纯度和亲和力的己烯雌酚免疫亲和柱,充分利用基因重组蛋白G与己烯雌酚抗体特异性结合的特点,己烯雌酚抗体的Fab片段暴露在外,大幅度提高了基因重组蛋白G的抗体结合能力、己烯雌酚的捕捉能力和己烯雌酚的纯化效率;其亲和柱的结构简单,亲和柱制备方法操作简便,降低了时间和经济成本。



1. 一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱,其特征主体结构包括柱体、盖板、进样口、第一筛板、填料、第二筛板和出样口;圆管状结构的柱体的顶部设置有圆形片状结构的盖板,盖板的中心设置有圆管状结构的进样口,柱体的内部上部空间为空腔,柱体的内部中间设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第一筛板,柱体的内部下部空间填充有填料,柱体的底部设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第二筛板,第二筛板上设置有上宽下窄的锥形管状结构的出样口;填料为腹泻性贝类毒素抗体-蛋白G-sepharose填料。

2. 一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱制备方法,其特征主体具体工艺过程包括活化、偶联、连接、交联和装柱共五个步骤:

(一) 活化:用蒸馏水充分冲洗浓度为2%的预溶胀琼脂糖凝胶sepharose2B,洗去琼脂糖凝胶sepharose2B中残存的乙醇,蒸馏水与琼脂糖凝胶sepharose2B的体积比为20:1,用漏斗过滤掉液体,得到湿凝胶,称取5克湿凝胶与7.5毫升摩尔质量为0.8M的NaOH水溶液、2毫升质量百分比浓度为30%的环氧氯丙烷水溶液和5毫升浓度为2mg/mL的NaBH<sub>4</sub>水溶液在温度为25℃的条件下进行8小时的摇床反应,反应结束后,用50毫升蒸馏水洗涤湿凝胶,洗去湿凝胶中混杂的环氧氯丙烷,完成琼脂糖凝胶sepharose2B的活化,活化后的琼脂糖凝胶sepharose2B作为载体备用;

(二) 偶联:取1克载体用偶联缓冲液洗涤3次,将载体加入20毫升浓度为2mg/mL的基因重组蛋白G中在室温条件下偶联4小时,偶联缓冲液选取为pH值为8.9的摩尔质量为0.1M的NaHCO<sub>3</sub>水溶液和摩尔质量为0.8M的NaCl水溶液的混合液,将偶联后的载体用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,得到偶联有基因重组蛋白G的琼脂糖凝胶sepharose2B,简称为蛋白G-sepharose;

(三) 连接:将己烯雌酚抗体溶解于pH值为7.4和浓度为20mM的PBS中,得到10毫升浓度为2mg/mL的抗体,将蛋白G-sepharose用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,PBS的每次使用量为30毫升,将抗体加入到洗涤过的蛋白G-sepharose中在室温条件下结合30分钟,得到连接有抗体的蛋白G-sepharose,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤连接有抗体的蛋白G-sepharose 3次,PBS的每次使用量为30毫升,连接有抗体的蛋白G-sepharose简称为抗体-蛋白G-sepharose;

(四) 交联:用pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液洗涤抗体-蛋白G-sepharose 3次,硼酸缓冲液的每次使用量为30毫升,在抗体-蛋白G-sepharose中加入pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液以及交联剂,交联剂为庚二亚氨酸二甲酯,当抗体-蛋白G-sepharose的浓度为20mM时停止交联剂的加入,使抗体-蛋白G-sepharose、硼酸缓冲液和交联剂在室温条件下交联1小时,加入pH值为9.0和浓度为50mM的乙醇胺终止交联,并用浓度为50mM的乙醇胺封闭10分钟,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤交联后的抗体-蛋白G-sepharose 3次,得到抗体-蛋白G-sepharose填料;

(五) 装柱:将用10毫升pH值为7.4和浓度为20mM的PBS重悬后的抗体-蛋白G-sepharose填料装入到柱体1的下部空间中,得到己烯雌酚免疫亲和柱,完成己烯雌酚免疫亲和柱的制备;抗体-蛋白G-sepharose填料的装入量根据需要制备的己烯雌酚免疫亲和柱的容量选取。

3. 一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱用途,其特征主体在于包括净化和富集鸡肉、粮食、水产和食品领域中的己烯雌酚、己烷雌酚和双烯雌酚抗生素,净化和富集鸡肉中的己烯雌酚

的具体工艺过程为：首先，在置有5.0g均质鸡肉的一号50毫升具塞离心管中加入10毫升甲醇水溶液，涡旋振荡2min后超声提取5min，再以6000r/min的转速离心5min，将上清液移至二号50毫升具塞离心管中，再向一号50毫升具塞离心管中加入10毫升甲醇水溶液，涡旋振荡2min后超声提取5min，再次将上清液移至二号50毫升具塞离心管中，用甲醇水溶液将上清液定容至25毫升，移取5毫升上清液至三号50毫升离心管中后加入20毫升PBS对上清液进行稀释；其次，取出在室温条件下平衡30分钟后的己烯雌酚免疫亲和柱，将进样口3与注射器的针筒连接，注射器接入到气控操作架上，调节气控操作架的气泵压力，使三号50毫升离心管中的混合液经注射器流过己烯雌酚免疫亲和柱以实现三号50毫升离心管中的混合液的净化目的；然后，调节气控操作架的气泵压力，使5毫升PBS以2-3滴/秒的流速经注射器流过己烯雌酚免疫亲和柱，对己烯雌酚免疫亲和柱进行淋洗，待己烯雌酚免疫亲和柱内的残留液流净，调节气控操作架的气泵压力，用使5毫升去离子水以2-3滴/秒的流速经注射器流过己烯雌酚免疫亲和柱，取2毫升质量百分比浓度为1%的氨水甲醇溶液并使其以1滴/秒的流速经注射器流过己烯雌酚免疫亲和柱，收集洗脱产物，在温度为40℃的条件下用氮气吹干洗脱产物，再用1毫升质量百分比浓度为1%的氨水甲醇溶液复溶洗脱产物，得到洗脱产物溶液，将洗脱产物溶液过0.22 $\mu$ m滤膜后采用高效液相色谱法检测。

4. 根据权利要求2所述的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱制备方法，其特征在于琼脂糖凝胶能够被溴化氰活化的琼脂糖凝胶、交联的琼脂糖凝胶、聚丙烯酸琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶或纤维素代替；己烯雌酚抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

5. 根据权利要求2所述的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱制备方法，其特征在于基因重组蛋白G的基因序列为GenBank CAA27638.1在大肠杆菌中表达出了与己烯雌酚抗体的高亲和力，基因重组蛋白G的1个分子的蛋白G可以结合3个分子的己烯雌酚抗体，并且只有己烯雌酚抗体能与基因重组蛋白G结合，其余抗体均不能与基因重组蛋白G结合，特异性高，以基因重组蛋白G为基础制备的己烯雌酚免疫亲和柱具有特异性高，己烯雌酚结合量大，纯化效率高的特点。

6. 根据权利要求2所述的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱制备方法，其特征在于所述琼脂糖凝胶sepharose2B替换为琼脂糖凝胶sepharose4B。

## 一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途

### 技术领域：

[0001] 本发明属于食品安全检测技术领域，具体涉及一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途。

### 背景技术：

[0002] 亲和柱是将与纯化对象有专一结合作用的物质连接在不溶性载体上，制成亲和吸附剂后所装的柱，多用做亲和层析。

[0003] 己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)、己烷雌酚(hexestrol, HEX)和双烯雌酚(dienestrol, DS)是结构相近的人工合成雌激素，均含有酚羟基，均为弱酸性化合物，由于其结构简单、易于合成和成本低等特点，近年来逐渐在饲料工业得到广泛应用，主要用于促进动物生长；其中的己烯雌酚(Diethylstilbestrol)是人工合成的非甾体雌激素物质，能产生与天然雌二醇相同的所有药理与治疗作用，主要用于雌激素低下症及激素平衡失调引起的功能性出血、闭经，还可用于死胎引产前，以提高子宫肌层对催产素的敏感性；但随着其致癌性的发现，2017年10月27日，世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单初步整理参考，己烯雌酚在一类致癌物清单中，许多国家已规定己烯雌酚在畜禽与水产养殖中禁用。我国于1999年制定的《中华人民共和国动物及动物源食品残留监控计划》中规定己烯雌酚(DES)最大残留检测量为不得检出，而对于己烷雌酚(HEX)和双烯雌酚(DS)残留的测定标准尚待制定。

[0004] 己烯雌酚的检测方法常用的有酶联免疫吸附分析法、高效液相色谱法和气相色谱法：酶联免疫吸附分析法(ELISA)的原理为在酶标板微孔上预包被己烯雌酚抗体，样本中己烯雌酚和加入酶标的己烯雌酚(酶标物)共同竞争微孔上预包被的己烯雌酚抗体，经TMB底物显色，样本吸光度值与己烯雌酚含量呈负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样本中己烯雌酚的含量；高效液相色谱法因具有高压、高速、高效、高灵敏度的特点在己烯雌酚、己烷雌酚和双烯雌酚的检测中得到了广泛的应用，中国国家标准方法GB/T 22992-2008、GB/T 22963-2008和GB/T 20766-2006分别使用了高效液相色谱法测定牛奶、奶粉、河豚鱼、鳗鱼、烤鳗、牛猪肝肾和肌肉组织中己烯雌酚、己烷雌酚和双烯雌酚残留；气相色谱法是在70年代建立的另一种有效检测DES残留的方法，其灵敏度较高，但需要衍生化过程，近年来，人们采用专属性、灵敏度都很好的气相色谱-质谱联机方法(GC-MS)检测DES残留，检测限可低于0.1ppb，GC-MS方法在检测药物时具有其独特的优点，但其使用时仪器的专用性强，使用的技术性要求高，测定样品的成本也较高。中国专利201510117235.3公开的一种吸附己烯雌酚类药物的免疫亲和搅拌棒是由固相载体和与其偶联的己烯雌酚鼠单克隆抗体组成，其中固相载体与偶联的己烯雌酚DES-6B4鼠单克隆抗体的偶联长度与重量比为1cm:2mg，所述的固相载体为10cm×4mm玻璃棒，偶联抗体的有效长度为2.5cm，所述的单克隆杂交瘤细胞株DES-6B4注入小鼠腹腔，纯化小鼠腹水得到；中国专利201410290593.X公开的一种己烯雌酚磁性分子印迹聚合物的制备方法包括如下步骤：(1)采用共沉淀法制备四氧化三铁粒子；(2)采用stober法制备硅烷化的四氧化三铁，将四氧化

三铁粒子导入装有水和无水乙醇的圆底烧瓶中,加入正硅酸乙酯,机械搅拌混匀3-5min,其中四氧化三铁粒子的质量与正硅酸乙酯的体积比为1g:4-5mL,水与无水乙醇的体积比为1:4,然后在氮气的保护下加入氨水,继续搅拌反应2-3h,紧接着50-60℃下水浴1-2h,用磁铁收集反应产物,并用去离子水与无水乙醇反复冲洗反应产物直至洗液呈中性,将产物置于真空干燥箱中于50-80℃下干燥,制得表面包覆有二氧化硅的磁性微球;(3)采用本体聚合法制备有机-无机杂化己烯雌酚磁性分子印迹聚合物,将模板分子、溶剂及功能单体混合,超声10-20min后放入4℃条件下静置30-60min,其中模板分子的质量与溶剂的体积比为1g:30-50mL,然后加入磁性微球、交联剂及引发剂,通入氮气保护,于50-70℃条件下机械搅拌20-24h,进行聚合反应,制得含有模板分子的磁性分子印迹聚合物,其中模板分子、功能单体和交联剂的摩尔比为1:30:30,磁性微球的质量与聚合溶剂的体积比为1g:10-15mL,引发剂的质量与聚合溶剂的体积比为1g:80-120mL;(4)将含有模板分子的磁性分子印迹聚合物研磨过筛,然后填入索氏提取器中,加入洗脱剂萃取洗脱,再于50-80℃下真空干燥至恒重;中国专利201010218944.8公开的一种己烯雌酚抗体的制备方法包括如下步骤:(1)己烯雌酚与4-溴丁酸己酯反应,经皂化水解暴露羧基,合成己烯雌酚人工半抗原;(2)用混合酸酐法通过己烯雌酚人工半抗原与牛血清蛋白反应,得到己烯雌酚人工免疫原;(3)将己烯雌酚人工免疫原与弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂乳化后对家兔进行皮下注射,当抗体效价稳定时分离血清,得到己烯雌酚抗体。

[0005] 对于己烯雌酚的液相色谱检测来说,样品采集和前处理是目前分析方法中的瓶颈,也是测定误差的主要来源,样品前处理分为提取和净化2个步骤,实验中大多采用固相萃取柱对样品提取液中的己烯雌酚进行净化,可以说样品的前处理技术是目前己烯雌酚分析研究的难点和热点之一。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,具有很高的亲和力,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。因此,需要研发设计一种操作简单和净化效率高的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱,利用己烯雌酚特异性抗体对待检样本中的己烯雌酚进行分离和净化,很有社会和经济价值,应用前景广阔。

#### 发明内容:

[0006] 本发明的发明目的在于克服现有技术存在的缺点,设计一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途,使亲和柱的结构简单,亲和柱的制备方法操作简便,亲和柱使用时的净化效率高。

[0007] 为了实现上述目的,本发明涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱的主体结构包括柱体、盖板、进样口、第一筛板、填料、第二筛板和出样口;圆管状结构的柱体的顶部设置有圆形片状结构的盖板,盖板的中心设置有圆管状结构的进样口,柱体的内部上部空间为空洞,柱体的内部中间设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第一筛板,柱体的内部下部空间填充有填料,柱体的底部设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第二筛板,第二筛板上设置有上宽下窄的锥形管状结构的出样口;填料为己烯雌酚抗体-蛋白G-sepharose填料。

[0008] 本发明涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱制备方法的具体工艺过程包括活化、偶联、连接、交联和装柱共五个步骤:

[0009] (一)活化:用蒸馏水充分冲洗浓度为2%的预溶胀琼脂糖凝胶sepharose2B,洗去琼脂糖凝胶sepharose2B中残存的乙醇,蒸馏水与琼脂糖凝胶sepharose2B的体积比为20:1,用漏斗过滤掉液体,得到湿凝胶,称取5克湿凝胶与7.5毫升摩尔质量为0.8M的NaOH水溶液、2毫升质量百分比浓度为30%的环氧氯丙烷水溶液和5毫升浓度为2mg/mL的NaBH<sub>4</sub>水溶液在温度为25℃的条件下进行8小时的摇床反应,反应结束后,用50毫升蒸馏水洗涤湿凝胶,洗去湿凝胶中混杂的环氧氯丙烷,完成琼脂糖凝胶sepharose2B的活化,活化后的琼脂糖凝胶sepharose2B作为载体备用;

[0010] (二)偶联:取1克载体用偶联缓冲液洗涤3次,将载体加入20毫升浓度为2mg/mL的基因重组蛋白G中在室温条件下偶联4小时,偶联缓冲液选取为pH值为8.9的摩尔质量为0.1M的NaHCO<sub>3</sub>水溶液和摩尔质量为0.8M的NaCl水溶液的混合液,将偶联后的载体用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,得到偶联有基因重组蛋白G的琼脂糖凝胶sepharose2B,简称为蛋白G-sepharose;

[0011] (三)连接:将己烯雌酚抗体溶解于pH值为7.4和浓度为20mM的PBS中,得到10毫升浓度为2mg/mL的抗体,将蛋白G-sepharose用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,PBS的每次使用量为30毫升,将抗体加入到洗涤过的蛋白G-sepharose中在室温条件下结合30分钟,得到连接有抗体的蛋白G-sepharose,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤连接有抗体的蛋白G-sepharose 3次,PBS的每次使用量为30毫升,连接有抗体的蛋白G-sepharose简称为抗体-蛋白G-sepharose;

[0012] (四)交联:用pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液洗涤抗体-蛋白G-sepharose 3次,硼酸缓冲液的每次使用量为30毫升,在抗体-蛋白G-sepharose中加入pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液以及交联剂,交联剂为庚二亚氨酸二甲酯,当抗体-蛋白G-sepharose的浓度为20mM时停止交联剂的加入,使抗体-蛋白G-sepharose、硼酸缓冲液和交联剂在室温条件下交联1小时,加入pH值为9.0和浓度为50mM的乙醇胺终止交联,并用浓度为50mM的乙醇胺封闭10分钟,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤交联后的抗体-蛋白G-sepharose 3次,得到抗体-蛋白G-sepharose填料;

[0013] (五)装柱:将用10毫升pH值为7.4和浓度为20mM的PBS重悬后的抗体-蛋白G-sepharose填料装入到柱体1的下部空间中,得到己烯雌酚免疫亲和柱,完成己烯雌酚免疫亲和柱的制备;抗体-蛋白G-sepharose填料的装入量根据需要制备的己烯雌酚免疫亲和柱的容量选取。

[0014] 本发明涉及的琼脂糖凝胶能够被溴化氰活化的琼脂糖凝胶、交联的琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶或纤维素代替;己烯雌酚抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

[0015] 本发明涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱的用途包括净化和富集鸡肉、粮食、水产和食品领域中的己烯雌酚、己烷雌酚和双烯雌酚抗生素。

[0016] 本发明涉及的基因重组蛋白G的基因序列为GenBank CAA27638.1在大肠杆菌中表达出了与己烯雌酚抗体的高亲和力,基因重组蛋白G的1个分子的蛋白G可以结合3个分子的己烯雌酚抗体,并且只有己烯雌酚抗体能与基因重组蛋白G结合,其余抗体均不能与基因重组蛋白G结合,特异性高,以基因重组蛋白G为基础制备的己烯雌酚免疫亲和柱具有特异性高,己烯雌酚结合量大,纯化效率高的特点。

[0017] 本发明与现有技术相比,首先将采用环氧氯丙烷活化法活化的琼脂糖凝胶作为载体,然后将基因重组蛋白G偶联到载体上,得到了蛋白G-sepharose,再将己烯雌酚抗体连接到蛋白G-sepharose上,得到了抗体—蛋白G—sepharose,再用交联剂进行交联,得到了抗体—蛋白G—sepharose填料,最后将抗体—蛋白G—sepharose填料装柱后形成了高纯度和亲和力的己烯雌酚免疫亲和柱,充分利用基因重组蛋白G与己烯雌酚抗体特异性结合的特点,己烯雌酚抗体的Fab片段暴露在外,大幅度提高了基因重组蛋白G的抗体结合能力、己烯雌酚的捕捉能力和己烯雌酚的纯化效率;其亲和柱的结构简单,亲和柱制备方法操作简便,充分保证了抗体的抗原结合能力,亲和柱不需纯化处理即可直接用于高效液相色谱检测和荧光仪检测,降低了时间和经济成本。

#### 附图说明:

[0018] 图1为本发明实施例1涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱的主体结构原理示意图。

[0019] 图2为本发明实施例2涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱制备方法的流程框图。

#### 具体实施方式:

[0020] 下面通过实施例并结合附图对本发明做进一步描述。

[0021] 实施例1:

[0022] 本实施例涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱的主体结构包括柱体1、盖板2、进样口3、第一筛板4、填料5、第二筛板6和出样口7;圆管状结构的柱体1的顶部设置有圆形片状结构的盖板2,盖板2的中心设置有圆管状结构的进样口3,柱体1的内部上部空间为空腔,柱体1的内部中间设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第一筛板4,柱体1的内部下部空间填充有填料5,柱体1的底部设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第二筛板6,第二筛板6上设置有上宽下窄的锥形管状结构的出样口7;填料5为己烯雌酚抗体-蛋白G-sepharose填料。

[0023] 实施例2:

[0024] 本实施例涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱制备方法的具体工艺过程包括活化、偶联、连接、交联和装柱共五个步骤:

[0025] (一)活化:用蒸馏水充分冲洗浓度为2%的预溶胀琼脂糖凝胶sepharose2B,洗去琼脂糖凝胶sepharose2B中残存的乙醇,蒸馏水与琼脂糖凝胶sepharose2B的体积比为20:1,用漏斗过滤掉液体,得到湿凝胶,称取5克湿凝胶与7.5毫升摩尔质量为0.8M的NaOH(氢氧化钠)水溶液、2毫升质量百分比浓度为30%的环氧氯丙烷水溶液和5毫升浓度为2mg/mL的NaBH<sub>4</sub>(硼氢化钠)水溶液在温度为25℃的条件下进行8小时的摇床反应,反应结束后,用50毫升蒸馏水洗涤湿凝胶,洗去湿凝胶中混杂的环氧氯丙烷,完成琼脂糖凝胶sepharose2B的活化,活化后的琼脂糖凝胶sepharose2B作为载体备用;

[0026] (二)偶联:取1克载体用偶联缓冲液洗涤3次,将载体加入20毫升浓度为2mg/mL的基因重组蛋白G中在室温条件下偶联4小时,偶联缓冲液选取为pH值为8.9的摩尔质量为0.1M的NaHCO<sub>3</sub>(碳酸氢钠)水溶液和摩尔质量为0.8M的NaCl(氯化钠)水溶液的混合液,将偶联后的载体用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤3次,得到偶联有基因重

组蛋白G的琼脂糖凝胶sepharose2B,简称为蛋白G-sepharose;

[0027] (三) 连接:将己烯雌酚抗体溶解于pH值为7.4和浓度为20mM的PBS中,得到10毫升浓度为2mg/mL的抗体,将蛋白G-sepharose用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,PBS的每次使用量为30毫升,将抗体加入到洗涤过的蛋白G-sepharose中在室温条件下结合30分钟,得到连接有抗体的蛋白G-sepharose,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤连接有抗体的蛋白G-sepharose 3次,PBS的每次使用量为30毫升,连接有抗体的蛋白G-sepharose简称为抗体—蛋白G—sepharose;

[0028] (四) 交联:用pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液洗涤抗体—蛋白G—sepharose 3次,硼酸缓冲液的每次使用量为30毫升,在抗体—蛋白G—sepharose中加入pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液以及交联剂,交联剂为庚二亚氨酸二甲酯,当抗体—蛋白G—sepharose的浓度为20mM时停止交联剂的加入,使抗体—蛋白G—sepharose、硼酸缓冲液和交联剂在室温条件下交联1小时,加入pH值为9.0和浓度为50mM的乙醇胺终止交联,并用浓度为50mM的乙醇胺封闭10分钟,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤交联后的抗体—蛋白G—sepharose 3次,得到抗体—蛋白G—sepharose填料;

[0029] (五) 装柱:将用10毫升pH值为7.4和浓度为20mM的PBS重悬后的抗体—蛋白G—sepharose填料装入到柱体1的下部空间中,得到己烯雌酚免疫亲和柱,完成己烯雌酚免疫亲和柱的制备;抗体—蛋白G—sepharose填料的装入量根据需要制备的己烯雌酚免疫亲和柱的容量选取。

[0030] 实施例3:

[0031] 本实施例涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱净化和富集鸡肉中的己烯雌酚的具体工艺过程为:首先,在置有5.0g均质鸡肉的一号50毫升具塞离心管中加入10毫升甲醇水溶液,涡旋振荡2min后超声提取5min,再以6000r/min的转速离心5min,将上清液移至二号50毫升具塞离心管中,再向一号50毫升具塞离心管中加入10毫升甲醇水溶液,涡旋振荡2min后超声提取5min,再次将上清液移至二号50毫升具塞离心管中,用甲醇水溶液将上清液定容至25毫升,移取5毫升上清液至三号50毫升离心管中后加入20毫升PBS对上清液进行稀释;其次,取出在室温条件下平衡30分钟后的己烯雌酚免疫亲和柱,将进样口3与注射器的针筒连接,注射器接入到气控操作架上,调节气控操作架的气泵压力,使三号50毫升离心管中的混合液经注射器流过己烯雌酚免疫亲和柱以实现三号50毫升离心管中的混合液的净化目的;然后,调节气控操作架的气泵压力,使5毫升PBS以2-3滴/秒的流速经注射器流过己烯雌酚免疫亲和柱,对己烯雌酚免疫亲和柱进行淋洗,待己烯雌酚免疫亲和柱内的残留液流净,调节气控操作架的气泵压力,用使5毫升去离子水以2-3滴/秒的流速经注射器流过己烯雌酚免疫亲和柱,取2毫升质量百分比浓度为1%的氨水甲醇溶液并使其以1滴/秒的流速经注射器流过己烯雌酚免疫亲和柱,收集洗脱产物,在温度为40℃的条件下用氮气吹干洗脱产物,再用1毫升质量百分比浓度为1%的氨水甲醇溶液复溶洗脱产物,得到洗脱产物溶液,将洗脱产物溶液过0.22μm滤膜后采用高效液相色谱法检测,得到的己烯雌酚、己烷雌酚和双烯雌酚的回收率见表1:

[0032]

| 物质名称 | 检测前无处理    |           |         |
|------|-----------|-----------|---------|
|      | 理论值 (ppb) | 实际值 (ppb) | 回收率 (%) |
| DES  | 10        | 9.01      | 90.1    |
| DS   | 10        | 9.173     | 91.73   |
| HEX  | 10        | 9.251     | 92.51   |

[0033] 实施例4:

[0034] 本实施例涉及的己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱制备方法的具体工艺过程包括活化、偶联、连接、交联和装柱共五个步骤:

[0035] (一) 活化: 用蒸馏水充分冲洗浓度为2%的预溶胀琼脂糖凝胶sepharose4B, 洗去琼脂糖凝胶sepharose4B中残存的乙醇, 蒸馏水与琼脂糖凝胶sepharose4B的体积比为20:1, 用漏斗过滤掉液体, 得到湿凝胶, 称取5克湿凝胶与7.5毫升摩尔质量为0.8M的NaOH水溶液、2毫升质量百分比浓度为30%的环氧氯丙烷水溶液和5毫升浓度为2mg/mL的NaBH<sub>4</sub>水溶液在温度为25℃的条件下进行8小时的摇床反应, 反应结束后, 用50毫升蒸馏水洗涤湿凝胶, 洗去湿凝胶中混杂的环氧氯丙烷, 完成琼脂糖凝胶sepharose4B的活化, 活化后的琼脂糖凝胶sepharose4B作为载体备用;

[0036] (二) 偶联: 按照每克载体配比30-200nmol基因重组蛋白G的比例取载体和基因重组蛋白G置于pH值为8.8的摩尔质量为0.1M的NaHCO<sub>3</sub>水溶液和摩尔质量为0.5M的NaCl水溶液构成的偶联缓冲液中偶联, 当在室温条件下时, 偶联2小时, 当在4℃条件下时, 偶联过夜, 偶联产物与pH值为8.0的摩尔质量为1M的Tris.HCl (三(羟甲基)氨基甲烷) 缓冲液在室温条件下反应2小时后用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS (磷酸盐缓冲液) 洗涤, 得到偶联有基因重组蛋白G的琼脂糖凝胶sepharose4B, 简称为蛋白G-sepharose;

[0037] (三) 连接: 将己烯雌酚抗体溶解于pH值为7.4和浓度为20mM的PBS中, 得到10毫升浓度为2mg/mL的抗体, 将蛋白G-sepharose用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次, PBS的每次使用量为30毫升, 按照每克蛋白G-sepharose配比200nmol-1.2umol抗体的比例将抗体加入到洗涤过的蛋白G-sepharose中在室温条件下反应30分钟, 得到连接有抗体的蛋白G-sepharose, 用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤连接有抗体的蛋白G-sepharose 3次, PBS的每次使用量为30毫升, 连接有抗体的蛋白G-sepharose简称为抗体-蛋白G-sepharose;

[0038] (四) 交联: 用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤抗体-蛋白G-sepharose, 在抗体-蛋白G-sepharose中加入浓度为0.2M的三乙醇胺与浓度为20mM的二甲基庚二酸脂构成的pH值为9.0的交联剂在室温条件下反应1小时, 加入pH值为7.4和浓度为20mM的乙醇胺终止反应, 用含有质量百分比为0.01%的硫柳汞的pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤交联后的抗体-蛋白G-sepharose, 得到抗体-蛋白G-sepharose填料;

[0039] (五) 装柱: 将抗体-蛋白G-sepharose填料装入到柱体1的下部空间中, 得到己烯雌酚免疫亲和柱, 置于4℃的环境中保存, 完成己烯雌酚免疫亲和柱的制备; 抗体-蛋白G-sepharose填料的装入量根据需要制备的己烯雌酚免疫亲和柱的容量选取。

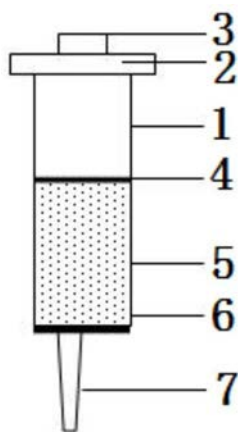


图1

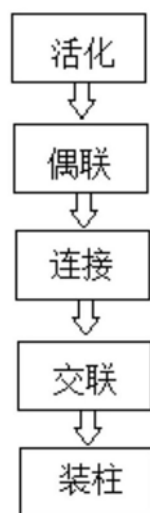


图2

|         |                                                     |         |            |
|---------|-----------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途                            |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN108761059A</a>                        | 公开(公告)日 | 2018-11-06 |
| 申请号     | CN201810269407.2                                    | 申请日     | 2018-03-29 |
| [标]发明人  | 柳家鹏<br>王涛<br>于蓉<br>龚利新                              |         |            |
| 发明人     | 柳家鹏<br>王涛<br>于蓉<br>龚利新                              |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/531 G01N30/02 B01J20/286 B01D15/38 B01J20/30 |         |            |
| CPC分类号  | G01N33/531 B01D15/3809 B01J20/286 G01N30/02         |         |            |
| 代理人(译)  | 白莹<br>于正河                                           |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>      |         |            |

#### 摘要(译)

本发明属于食品安全检测技术领域，具体涉及一种己烯雌酚类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途，首先将采用环氧氯丙烷活化法活化的琼脂糖凝胶作为载体，然后将基因重组蛋白G偶联到载体上，得到了蛋白G-sepharose，再将己烯雌酚抗体连接到蛋白G-sepharose上，得到了抗体—蛋白G—sepharose，再用交联剂进行交联，得到了抗体—蛋白G—sepharose填料，最后将抗体—蛋白G—sepharose填料装柱后形成了高纯度和亲和力的己烯雌酚免疫亲和柱，充分利用基因重组蛋白G与己烯雌酚抗体特异性结合的特点，己烯雌酚抗体的Fab片段暴露在外，大幅度提高了基因重组蛋白G的抗体结合能力、己烯雌酚的捕捉能力和己烯雌酚的纯化效率；其亲和柱的结构简单，亲和柱制备方法操作简便，降低了时间和经济成本。

