



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108794580 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810650332.2

(22)申请日 2018.06.22

(71)申请人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街61号

(72)发明人 赵凤春 杨正友 申强 朱常香

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 王志坤

(51)Int.Cl.

C07K 7/08(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

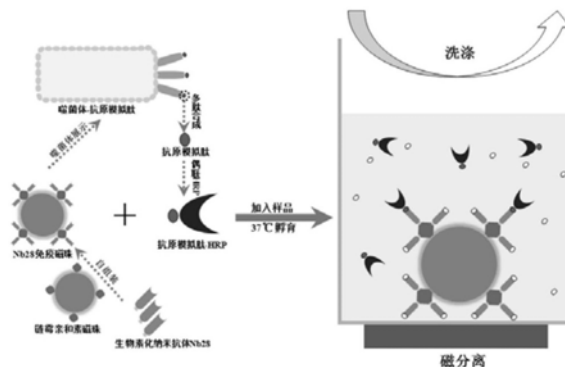
权利要求书1页 说明书8页
序列表3页 附图7页

(54)发明名称

基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附检测方法

(57)摘要

本发明涉及检测技术领域,具体涉及一种基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附检测方法。本发明黄曲霉毒素抗原模拟肽,以黄曲霉毒素纳米抗体Nb28制备的免疫为靶标,通过噬菌体展示技术筛选得到,其氨基酸序列如SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5或SEQ ID NO.6所示。本发明首次将纳米抗体Nb28与之相应的抗原模拟肽同时用于黄曲霉毒素免疫磁珠-ELISA检测,可实现对黄曲霉毒素的快速检测。本发中使用的基因工程抗体及抗原模拟肽的基因及氨基酸序列都可确定,易于生产、推广和应用。



1. 一种黄曲霉毒素抗原模拟肽,其对应于黄曲霉毒素纳米抗体Nb28,通过噬菌体展示技术筛选得到,其特征在于,氨基酸序列如SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5或SEQ ID NO.6所示。

2. 根据权利要求1所述黄曲霉毒素抗原模拟肽,其特征在于,氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

3. 一种基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附的建立方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 纳米抗体Nb28免疫磁珠的制备;

(2) 酶标抗原模拟肽的制备:以权利要求1所述黄曲霉毒素抗原模拟肽为模板进行多肽合成,通过双功能交联剂Sulfo-SMCC将抗原模拟肽与辣根过氧化物酶偶联,即得;

(3) 黄曲霉毒素直接竞争磁珠-ELISA的建立

将步骤(1)制备得到的纳米抗体Nb28免疫磁珠与步骤(2)制备得到的酶标抗原模拟肽组合,建立黄曲霉毒素直接竞争磁珠-ELISA。

4. 根据权利要求3所述建立方法,其特征在于,步骤(1)纳米抗体Nb28免疫磁珠的制备方法为:将合成的Nb28基因插入到pET-BAD质粒中构建表达载体pET-Nb28-BAD,表达载体转化大肠杆菌BL21(DE3)制备Nb28-BAD表达菌株;将表达菌株在20℃诱导表达过夜,诱导后将菌体收集破碎后离心,将上清液转移至新离心管,加入生物素化缓冲液和生物素连接酶,室温反应;生物素化反应后通过Ni-IDA resin纯化获得生物素化Nb28-BAD融合蛋白;将纯化的生物素化Nb28-BAD融合蛋白与链霉亲和素磁珠混合并室温孵育,磁分离并使用PBS洗涤后,即得。

5. 根据权利要求3所述建立方法,其特征在于,步骤(2)具体方法为以SEQ ID NO.4所示氨基酸序列为模板,并添加连接臂,合成得到ME17-17AA,其氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示。

6. 根据权利要求3所述建立方法,其特征在于,步骤(2)酶标抗原模拟肽稀释液为含8%脱脂奶粉的PBS。

7. 根据权利要求3所述建立方法,其特征在于,步骤(3)纳米抗体Nb28免疫磁珠酶标抗原模拟肽孵育时间为20min。

8. 根据权利要求3所述建立方法,其特征在于,步骤(3)黄曲霉毒素直接竞争磁珠-ELISA的工作条件为:离子浓度为10-150mM,甲醇浓度为5-35%,pH值为7.0-9.0。

9. 根据权利要求8所述建立方法,其特征在于,步骤(3)黄曲霉毒素直接竞争磁珠-ELISA的工作条件为:离子浓度为50mM,甲醇浓度为17.5%,pH值为7.4。

10. 权利要求1所述黄曲霉毒素抗原模拟肽和/或权利要求3-9任一所述建立方法得到的黄曲霉毒素直接竞争磁珠-ELISA在检测黄曲霉毒素中的应用。

基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测技术领域,具体涉及一种基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附检测方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素主要由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 与寄生曲霉 (*Aspergillus paraciticus*) 等产生的有毒次生代谢产物,目前共分离出20多种,包括AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFB_{2a}、AFGM、AFH₁、AFM₁、AFM₂、AFP₁、AFQ和毒醇。其中AFB₁的毒害作用最大,1993年,世界卫生组织(WHO)将AFB₁及黄曲霉毒素混合物列为I类致癌物。世界范围内黄曲霉毒素的污染极为广泛,尤其在湿热环境中污染最为严重,比如我国长江流域因其气候特点成为黄曲霉毒素的高污染地区。鉴于真菌毒素具有污染范围广、毒性强等特点,建立能够满足快速、方便、准确、灵敏的真菌毒素检测技术极为必要。

[0003] 目前,黄曲霉毒素的检测方法主要有仪器分析法(如:高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)等)和免疫分析法(如:酶联免疫吸附法(ELISA)、免疫胶体金技术(ICGT)、荧光免疫检测(IFA)等)。仪器分析法虽然具有灵敏度高、准确性好等优点,但是其往往需要繁琐的样品处理过程且需要昂贵的仪器,无法满足大批量样品的快速筛查;免疫分析法是一种快速、灵敏、经济、高通量的分析方法,适用于大量样品快速分析的需要。

[0004] 传统的黄曲霉毒素ELISA检测法大多是基于单克隆抗体与化学合成抗原配对建立的,这类方法存在着抗体制备难度大,抗原合成过程具有毒性等缺点。近年来研究者们针对真菌毒素的免疫检测方法中抗体及抗原做了如下改进:第一、使用基因工程抗体代替单克隆抗体与化学合成抗原的配对使用,第二、使用抗原模拟肽代替化学合成抗原与单克隆抗体的配对使用。但是,同时对免疫分析中使用的抗体和抗原进行改进,即同时利用基因工程抗体和抗原模拟肽配对建立真菌毒素免疫检测方法的研究未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的主要目的是,提供一种基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附检测方法。本发明将黄曲霉毒素纳米抗体Nb28制备成免疫磁珠,并利用噬菌体展示技术筛选得到Nb28对应的抗原模拟肽;本发明首次将基因工程抗体和抗原模拟肽配对,建立了黄曲霉毒素直接竞争磁珠-ELISA,实现了对黄曲霉毒素的准确、快速检测。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 本发明目的之一,提供一种黄曲霉毒素抗原模拟肽,所述抗原模拟肽以Nb28免疫磁珠为靶标,通过噬菌体展示技术筛选得到,其氨基酸序列如SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5或SEQ ID NO.6所示。与真菌毒素的化学合成抗原相比,抗原模拟肽易于获得且无毒,有利于推动绿色免疫分析技术的发展。

[0008] 本发明目的之二,提供一种基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附的建立方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 纳米抗体Nb28免疫磁珠的制备;

[0010] (2) 酶标抗原模拟肽的制备:根据以上所述黄曲霉毒素抗原模拟肽氨基酸序列进行多肽合成,通过双功能交联剂Sulfo-SMCC将半胱氨酸的巯基与辣根过氧化物酶的氨基偶联,即得;

[0011] (3) 黄曲霉毒素直接竞争磁珠-ELISA (MB-dcELISA) 的建立

[0012] 利用步骤(1)制备得到的纳米抗体Nb28免疫磁珠与步骤(2)制备得到的酶标抗原模拟肽建立黄曲霉毒素MB-dcELISA检测方法。

[0013] 进一步的,步骤(1)纳米抗体Nb28免疫磁珠的制备方法为:将合成的Nb28基因插入到pET-BAD质粒中构建表达载体pET-Nb28-BAD,表达载体转化大肠杆菌BL21 (DE3) 制备Nb28-BAD表达菌株;将表达菌株在20℃诱导表达过夜,诱导后将菌体收集破碎后离心,将上清液转移至新离心管,加入生物素化缓冲液和生物素连接酶,混匀并室温反应;生物素化反应后通过Ni-IDA resin纯化获得生物素化Nb28-BAD融合蛋白;将纯化的生物素化Nb28-BAD融合蛋白与链霉亲和素磁珠(SA-MB)混合并室温孵育,通过生物素与链霉亲和素的高亲和力实现纳米抗体与SA-MB的自组装,磁分离并使用PBS洗涤后,即得。

[0014] 进一步的,步骤(2)具体方法为以SEQ ID NO.4所示氨基酸序列为模板,并添加连接臂,合成得到ME17-17AA,其氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示。

[0015] 进一步的,步骤(2)酶标抗原模拟肽稀释液为含8%脱脂奶粉的PBS。

[0016] 进一步的,步骤(3)纳米抗体Nb28免疫磁珠酶标抗原模拟肽孵育时间为20min。

[0017] 进一步的,步骤(3)黄曲霉毒素MB-dcELISA的工作条件为:离子浓度为50mM,甲醇浓度为17.5%,pH值为7.4。

[0018] 本发明首次将纳米抗体Nb28与之相应的抗原模拟肽同时用于黄曲霉毒素免疫检测。本发明将基因工程抗体和抗原模拟肽的优势集于一体,基因工程抗体及抗原模拟肽的基因及氨基酸序列都可确定,易于生产、推广和应用。本发明采用的检测方法为MB-dcELISA检测方法,可实现对黄曲霉毒素的快速检测。

[0019] 本发明目的之三,提供所述黄曲霉毒素抗原模拟肽和/或上述建立方法得到的黄曲霉毒素直接竞争磁珠-ELISA在检测黄曲霉毒素中的应用。

[0020] 本发明取得的有益效果:

[0021] (1) 本发明所建立的AFB₁免疫检测方法是在ELISA模式下,利用基因工程抗体与抗原模拟肽配对建立的竞争性免疫分析方法。该方法的成功建立表明,在获得真菌毒素纳米抗体的基础上再次通过噬菌体展示技术可筛选获得相应的抗原模拟肽,这不仅使得所建立的检测方法更加的绿色安全,而且纳米抗体及抗原模拟肽的氨基酸序列的获得和发表,将使得很多研究人员都可以通过蛋白表达或多肽合成快速的制备出所需的抗原和抗体。

[0022] (2) 本发明建立的MB-dcELISA仅用一步20min的免疫磁珠与酶标抗原模拟肽的结合步骤代替了常规的ELISA中的包被、封闭和抗原抗体结合步骤,并减少了ELISA中的洗涤步骤、降低了劳动强度,这充分展现出了MB-ELISA的优势。

[0023] (3) 本发明建立的MB-dcELISA,在甲醇-水溶液中,对AFB₁的IC₅₀为0.75ng/mL,检测限为0.13ng/mL,检测线性范围为0.24ng/mL~2.21ng/mL;用于样品分析时MB-dcELISA可分

析玉米、大米、花生和小麦样品的检测限为 $2.6\mu\text{g}/\text{kg}$,线性范围为 $4.8\mu\text{g}/\text{kg}\sim 44.2\mu\text{g}/\text{kg}$;本发明检测方法线性范围宽,检测快速,可用于黄曲霉毒素的快速检测。

附图说明

[0024] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0025] 图1本发明原理示意图。

[0026] 图2表达载体pET-Nb28-BAD示意图。

[0027] 图3原核表达的Nb28-BAD融合蛋白SDS-PAGE电泳图。

[0028] 图4生物素化Nb28-BAD融合蛋白的SDS-PAGE (A) 和Western blot (B) 验证。

[0029] 图5ME17-13AA-HRP和ME17-17AA-HRP合成的SDS-PAGE电泳图。

[0030] 图6基于ME17-13AA-HRP和ME17-17AA-HRP的MB-dcELISA对应的AFB₁抑制曲线。

[0031] 图7Nb28-SA-MB与ME17-17AA-HRP的孵育时间对MB-dcELISA的影响。

[0032] 图8离子强度对MB-dcELISA的影响。

[0033] 图9甲醇对AFB₁MB-dcELISA的影响。

[0034] 图10pH值对AFB₁MB-dcELISA的影响。

[0035] 图11脱脂奶粉浓度对MB-dcELISA的影响。

[0036] 图12在最佳MB-dcELISA条件下测定AFB₁在甲醇-水溶液和样品基质中的抑制曲线。

具体实施方式

[0037] 应该指出,以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0038] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作和/或它们的组合。

[0039] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本发明的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本发明的技术方案。

[0040] 实施例一:黄曲霉毒素纳米抗体Nb28免疫磁珠的制备

[0041] 本研究按照文献中提供的黄曲霉毒素纳米抗体Nb28的氨基酸序列,如SEQ ID NO.1所示(He T,Wang Y,Li P,et al.Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol[J].Analytical chemistry,2014,86(17):8873-8880.),经DNAMAN软件反向翻译获得相应DNA序列,并将大肠杆菌稀有密码子替换,优化后的DNA序列SEQ ID NO.2所示。经基因合成、PCR扩增、酶切、连接pET-BAD质粒,pET-BAD质粒构建方法参照(Zhao F,Wang H,Han X,et al.Development and comparative study of chemosynthesized antigen and mimotope-based immunoassays for class-specific analysis of 0,0-dimethyl

organophosphorus pesticides[J].Scientific reports,2016,6:37640.),构建表达载体(pET-Nb28-BAD),pET-Nb28-BAD示意图如图2所示。将表达载体转化大肠杆菌BL21(DE3)制备Nb28-BAD融合蛋白的表达菌株。

[0042] Nb28-BAD融合蛋白的表达步骤如下:

[0043] (1) 将100 μ L表达菌株接种于10mL LB液体培养基中(含50 μ g/mL卡那霉素),37 $^{\circ}$ C,200rpm振荡培养10h;

[0044] (2) 将上述培养产物全部转接到100mL LB液体培养基中(含50 μ g/mL卡那霉素),37 $^{\circ}$ C,200rpm振荡培养1h;

[0045] (3) 加入500 μ L 0.1M的IPTG溶液,并于20 $^{\circ}$ C,200rpm振荡培养过夜;

[0046] (4) 离心收集菌体,用20mL BirA buffer A洗涤菌体三次,并悬浮到10mL BirA buffer A中进行超声波破碎(BirA buffer A:10mM Tris-HCl,20mM NaCl,用NaOH调节至pH 8.0);

[0047] (5) 将破碎后的菌液于4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心15min,离心后对表达菌上清液和沉淀进行SDS-PAGE检测,以确定Nb28-BAD的表达形式,结果如图3所示。结果表明Nb28-BAD融合蛋白既能以可溶性蛋白形式表达,又能以包涵体形式表达,且细胞破碎液上清液中的可溶性蛋白含量较高。

[0048] Nb28-BAD融合蛋白生物素化及纯化步骤如下:

[0049] (1) 向Nb28-BAD表达菌破碎后上清液中加入生物素连接酶(BirA)和1.2mL BirA Buffer B,混匀后室温孵育4h进行位点特异性生物素化(BirA bufferB:10mM Tris-HCl,1mM D-Biotin,100mM ATP-Na₂,用NaOH调节至pH 8.0);

[0050] (2) 通过Ni-IDA resin纯化获得生物素化的Nb28-BAD;

[0051] (3) 生物素化Nb28-BAD的纯化效果通过SDS-PAGE电泳检测,生物素化效果使用Western blot进行验证(使用SA-HRP对生物素化纳米抗体进行检测),结果如图4所示。结果表明,获得了较纯的Nb28-BAD融合蛋白且生物素化成功。

[0052] Nb28免疫磁珠的制备步骤如下:

[0053] (1) 将生物素化Nb28-BAD使用1 \times PBS稀释至0.5mg/mL,每毫升生物素化Nb28-BAD溶液中加入5mg的SA-MB,室温孵育2h,轻轻摇动以防止沉淀;

[0054] (9) 孵育后将反应产物置于磁力架进行磁分离,弃去上清液,并使用PBS洗涤6次即获得纳米抗体免疫磁珠Nb28-SA-MB,将免疫磁珠悬浮于保存液中(保存液为含有2%脱脂奶粉和50%甘油的1 \times PBS),免疫磁珠的浓度调整为5mg/mL,混匀后置于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0055] 实施例二、Nb28抗原模拟肽的筛选

[0056] 本发明以制备的纳米抗体免疫磁珠Nb28-SA-MB为靶标,对噬菌体随机十二肽库进行了三轮淘选,来富集Nb28对应的噬菌体抗原模拟肽。具体过程如下:

[0057] (1) 取20 μ L Nb28-SA-MB稀释到1mL 1 \times PBS中,加入50 μ L噬菌体展示随机十二肽库(2.0×10^{13} pfu/mL),震荡混匀后置于37 $^{\circ}$ C孵育40min;

[0058] (2) 孵育后将离心管置于磁力架上进行磁分离,吸取上清液并弃去,然后加入1mL PBST洗涤3次(洗涤时加入PBST震荡混匀,瞬时离心后置于磁力架上进行磁分离);

[0059] (3) 加入1mL洗脱液(0.2M Glycine-HCl,1mg/mL BSA,pH 2.2),震荡混匀并置于37 $^{\circ}$ C孵育10min;

[0060] (4) 洗脱后进行磁分离,上清液转移到一新的1.5mL离心管,然后加入适量Tris-HCl缓冲液(1M,pH 9.1)将洗脱液调至pH 7.0~8.0;

[0061] (5) 取出10 μ L洗脱液进行系列稀释用于噬菌体滴度的测定,其余洗脱液用于噬菌体扩增,待扩增产物纯化后用于下一轮淘选;

[0062] (6) 第二轮淘选噬菌体用量为 2.0×10^{11} pfu,PBST洗涤次数为5次,免疫磁珠与噬菌体库的结合时间为20min,其余步骤同第一轮;

[0063] (7) 第三轮淘选噬菌体用量为 2.0×10^{11} pfu,PBST洗涤次数为7次,免疫磁珠与噬菌体库的结合时间为20min,其余步骤同第一轮。

[0064] 对每轮淘选获得的噬菌体进行滴度测定,经三轮淘选噬菌体回收率提高了近三百倍。分别从第一轮滴度板中挑取12个噬菌斑(P1~P12)、从第二轮滴度板中挑取36个噬菌斑(P13~P48)和从第三轮滴度板中挑取24个噬菌斑(P49~P72)进行噬菌体单克隆扩增。

[0065] 噬菌体单克隆的扩增步骤如下:

[0066] (1) 进行噬菌体单克隆扩增的前一天晚上接种E.coli ER2738于10mL的LB液体培养基中(含有20 μ g/mL四环素),37 $^{\circ}$ C 200rpm振荡培养过夜;

[0067] (2) 将1mL过夜培养产物加入到100mL的LB液体培养基中(含有20 μ g/mL四环素)并摇匀,并分装到2mL灭菌的离心管,每个离心管分装800 μ L,共分装72管;

[0068] (3) 使用灭菌枪头挑取噬菌体滴度培养皿中的单个蓝色噬菌斑,接种到上述离心管中,37 $^{\circ}$ C,225rpm振荡培养3h;

[0069] (4) 培养后将离心管置于离心机中12000rpm离心5min,上清液直接用于噬菌体-间接竞争磁珠-ELISA(phage-MB-icELISA)检测。

[0070] 噬菌体单克隆的phage-MB-icELISA步骤如下:

[0071] (1) 向96孔板中加入50 μ L 20%甲醇-水或20%甲醇-水稀释的AFB₁标准品(10ng/mL),然后每孔中加入25 μ L的噬菌体单克隆扩增上清液,再向每孔中加入25 μ L PBS(含2%脱脂奶粉)稀释的免疫磁珠(0.2 μ L Nb28-SA-MB/孔),混匀后放置于37 $^{\circ}$ C湿盒中孵育20min;

[0072] (2) 取出96孔板,置于96孔板磁力架上2min进行磁分离,弃去上清液并于吸水纸上拍打三次,并使用PBST洗涤一次;

[0073] (3) 每孔中加入100 μ L PBS(含1%脱脂奶粉)稀释的M13二抗(稀释5000倍),混匀后放置于37 $^{\circ}$ C湿盒中孵育20min;

[0074] (4) 取出96孔板,置于96孔板磁力架上2min进行磁分离,并使用PBST(0.025% Tween-20(v/v))洗板2次,每次洗板后在纸巾上拍打三次;

[0075] (5) 加入TMB底物溶液(100 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C反应15min;

[0076] (6) 加入终止液终止(50 μ L/孔),然后使用酶标仪测定450nm处吸光度值。

[0077] 选取竞争反应较好的噬菌体单克隆进行测序分析,测序结果表明,共获得了四种不同的抗原模拟肽对应的基因序列,分别对应于噬菌体单克隆P14、P17、P18和P72,所对应的四种抗原模拟肽命名为ME14、ME17、ME18和ME72,其氨基酸序列如表1所示。抗原模拟肽的氨基酸序列通过ExPASy ProtParam tool进行在线分析多肽的亲水性平均值(Grand average of hydropathicity,GRAVY)如表1所示,结果表明所获得的四种抗原模拟肽中ME17亲水性平均值最小即亲水性最好。

[0078] 表1 Nb28抗原模拟肽的氨基酸序列及GRAVY值

[0079]

抗原模拟肽名称 Mimotope name	氨基酸序列 Amino acid sequence	亲水性平均值 GRAVY
ME14	SEQ ID NO.3: S V F P F E V W E S L R	0.183
ME17	SEQ ID NO.4: Y S W H E W Y I P Q L S	-0.792
ME18	SEQ ID NO.5: S M P Y I A W L A L R G	0.675
ME72	SEQ ID NO.6: H S T L L N H T T G V L	0.2

[0080] 实施例三、酶标抗原模拟肽的制备

[0081] 本发明选择亲水性最好的Nb28抗原模拟肽ME17进行多肽合成,为了后续与HRP的偶联,在多肽的C端增加一个半胱氨酸(Cysteine),以引入一个巯基基团(-SH)。根据抗原模拟肽与半胱氨酸之间连接臂(Gly-Gly-Gly-Ser)的有无,共设计合成两种抗原模拟肽,,分别为不含连接臂的ME17-13AA,氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示(Y-S-W-H-E-W-Y-I-P-Q-L-S-C)和含连接臂的ME17-17AA SEQ ID NO.8所示(Y-S-W-H-E-W-Y-I-P-Q-L-S-G-G-G-S-C),氨基酸序列如由南京肽业生物科技有限公司进行化学合成。抗原模拟肽与HRP的合成步骤如下:

[0082] (1) 称取10mg HRP加入到棕色瓶中,然后加入1mL Conjugation Buffer,室温搅拌溶解(Conjugation Buffer:82mM Na₂HPO₄,18mM NaH₂PO₄,150mM NaCl,pH 7.2);

[0083] (2) 称取2mg Sulfo-SMCC加入1mL去离子水中,50℃水浴并旋涡震荡使其溶解,然后将其加入到HRP溶液中,室温搅拌反应2h;

[0084] (3) 将反应产物加入到超滤管中,并加入10mL Conjugation Buffer稀释混匀,5000rpm离心15min;

[0085] (4) 倒掉下层管液体,将浓缩产物使用Conjugation Buffer稀释到约12mL,5000rpm离心15min,重复一次;

[0086] (5) 将浓缩产物稀释到2mL,等分到两个玻璃瓶中;

[0087] (6) 将合成的两种抗原模拟肽使用Conjugation Buffer稀释到1.67mM,然后各取1mL加入到相应的玻璃瓶中(抗原模拟肽与HRP摩尔比为15:1),室温搅拌反应过夜;

[0088] (7) 第二天将反应产物取出,12000rpm离心15min,将上清液转移至超滤管中,并加入10mL 1×PBS稀释混匀,5000rpm离心15min;

[0089] (8) 倒掉下层管液体,将浓缩产物使用PBS稀释到12mL,5000rpm离心15min,重复6次;

[0090] (9) 将产物取出,即为抗原模拟肽-HRP,使用PBS稀释至1mL,然后加入1mL甘油,漩涡震荡混匀后于-20℃保存;

[0091] (10) 通过SDS-PAGE验证多肽与HRP偶联效果,结果如图5所示。结果显示偶联后的ME17-13AA-HRP和ME17-17AA-HRP与HRP及HRP-SMCC相比分子量明显增加,表明偶联成功。

[0092] 实施例四、黄曲霉毒素MB-dcELISA检测方法的建立

[0093] 利用Nb28-SA-MB和抗原模拟肽-HRP组合建立的黄曲霉毒素的MB-dcELISA检测法。

[0094] MB-dcELISA操作步骤如下:

[0095] (1) 向96孔板中加入50μL甲醇-水稀释的AFB₁标准品或样品,然后每孔中加入25μL PBS(含有8%的脱脂奶粉)稀释抗原模拟肽-HRP,再向每孔中加入25μL PBS(100mM)稀释的

免疫磁珠 (0.2 μ L Nb28-SA-MB/孔), 混匀后放置于37 $^{\circ}$ C湿盒中孵育20min;

[0096] (2) 取出96孔板, 置于96孔板磁力架上2min进行磁分离, 使用150 μ L PBST洗板2次, 每次洗板后在纸巾上拍打三次;

[0097] (3) 加入TMB底物溶液 (100 μ L/孔), 37 $^{\circ}$ C反应15min;

[0098] (4) 加入终止液终止反应 (50 μ L/孔), 然后使用酶标仪测定450nm处吸光度值。

[0099] ME17-13AA-HRP和ME17-17AA-HRP的比较:

[0100] 为了验证合成的ME17-13AA-HRP和ME17-17AA-HRP的活性以及比较他们在应用中的区别, 利用Nb28-SA-MB分别与ME17-13AA-HRP和ME17-17AA-HRP组合初步建立MB-dcELISA, 结果如图6所示。结果表明, 利用ME17-13AA和ME17-17AA初步建立的MB-dcELISA具有相似的AFB₁抑制曲线及灵敏度, 其中利用ME17-17AA-HRP建立的MB-dcELISA效果略好, 因此, 选取ME17-17AA-HRP用于最终MB-dcELISA的建立。

[0101] MB-dcELISA工作条件的优化

[0102] 本发明对Nb28-SA-MB与ME17-17AA-HRP的孵育时间进行了优化:

[0103] 测定了孵育时间为10min、20min和30min时MB-dcELISA的AFB₁的抑制曲线, 结果如图7所示。结果表明, 最大吸光度值 (OD_{max}) 和50%抑制浓度 (IC₅₀) 随着孵育时间的增长而变大, 但在孵育时间为10min和20min时IC₅₀变化不大而OD_{max}增加幅度较大, 而孵育时间为30min时IC₅₀增加幅度较大。因此, 选择20min为最佳的孵育时间。

[0104] 本发明对黄曲霉毒素MB-dcELISA工作缓冲液优化, 具体优化以下三个方面:

[0105] (1) 离子强度: 离子强度对MB-dcELISA的影响如图8所示。结果表明, 离子强度为50mM时, 不仅IC₅₀降到了最低 (1.12ng/mL), 同时OD_{max}达到了最高 (1.833)。因此, 选取50mM离子强度为最佳离子强度。

[0106] (2) 甲醇浓度: 甲醇浓度对MB-dcELISA的影响如图9所示。结果表明, 在甲醇浓度为5%、10%、17.5%和35%时MB-dcELISA对应的IC₅₀分别为0.64、0.82、0.71和2.04ng/mL, 相当于70%的甲醇-水溶液中的8.96、5.74、2.84和4.08ng/mL。考虑到实际样品检测时使用70%的甲醇-水为萃取液进行AFB₁的萃取, 因此选择17.5%为最佳甲醇浓度。

[0107] (3) pH值: pH值对MB-dcELISA的影响如图10所示。结果表明, 在pH值为6.0时OD_{max}有较大幅度的降低, 而当pH值为7.0到9.0时OD_{max}和IC₅₀变化都较小, 且当pH值为7.4时IC₅₀最低 (0.64ng/mL)。因此, 选择pH7.4为最佳pH值。

[0108] 本发明对样品的基质效应对MB-dcELISA的影响进行了优化:

[0109] 使用含不同浓度脱脂奶粉的PBS来稀释ME17-17AA-HRP并用于MB-dcELISA测定甲醇-水和玉米萃取液中AFB₁的抑制曲线。在不同脱脂奶粉浓度下测定的甲醇-水和玉米萃取液的OD_{max}和AFB₁的IC₅₀变化如图11所示。结果表明, 在脱脂奶粉浓度为2%、4%和10%时甲醇-水和玉米萃取液对应的OD_{max}相差较大, 在脱脂奶粉浓度为6%和8%时OD_{max}相差较小; 在脱脂奶粉浓度为2%和10%时甲醇-水和玉米萃取液对应的AFB₁的IC₅₀相差较大, 在脱脂奶粉浓度为4%、6%和8%时IC₅₀相差较小, 且脱脂奶粉浓度为8%时甲醇-水和玉米萃取液对应的OD_{max}和IC₅₀相差最小, 因此, 选择含8%的脱脂奶粉的PBS用于AFB₁的MB-dcELISA。

[0110] 使用含8%脱脂奶粉的PBS作为ME17-17AA-HRP稀释液, 在最佳工作缓冲液条件下测定AFB₁在甲醇-水中以及在玉米基质、大米基质、花生基质和小麦基质中MB-dcELISA的标准抑制曲线如图12所示。结果表明样品基质对应的AFB₁抑制曲线和甲醇-水对应的AFB₁抑制

曲线的重合性较高,说明基本消除了样品的基质效应对AFB₁MB-dcELISA的影响。在该条件下测定,在甲醇-水溶液中,MB-dcELISA对AFB₁的IC₅₀为0.75ng/mL,检测限为0.13ng/mL,检测线性范围为0.24ng/mL~2.21ng/mL。由于样品在萃取和检测过程中共稀释了20倍,所以建立的MB-dcELISA可分析玉米、大米、花生和小麦样品的检测限为2.6μg/kg,线性范围为4.8μg/kg~44.2μg/kg。

[0111] 使用MB-dcELISA测定AFB₁在样品中的添加回收率

[0112] 本发明在添加回收率测定实验中分别向5g的玉米粉、大米粉、花生粉和小麦粉样品中添加10、20和30μg/kg的AFB₁。添加后的样品干燥后加入25mL的70%甲醇-水溶液(v/v)室温震荡萃取3min(250rpm),将萃取液6000rpm离心5min,将上清液使用去离子水稀释4倍后用于MB-dcELISA测定和回收率计算,结果如表2所示,结果表明该方法对AFB₁的添加回收率为84.2%~114.4%,变异系数为2.2%~15.9%,能够满足样品分析的需求。

[0113] 表2 AFB₁MB-dcELISA测定AFB₁在样品中的添加回收率(n=3)

[0114]

样品 Samples	添加量 Spiked (μg/kg)	测定值 Measured (μg/kg)	回收率 Recovery (%)	变异系数 CV (%)
Corn	10	11.1	110.6	5.0
Corn	20	19.7	98.3	9.3
Corn	30	30.5	101.8	6.4
Rice	10	11.4	114.4	9.2
Rice	20	21.0	105.0	12.8
Rice	30	25.5	84.9	5.4
Peanut	10	10.1	101.0	12.6
Peanut	20	17.2	86.0	7.2
Peanut	30	28.7	95.7	3.6
Feedstuff	10	10.2	101.7	15.9
Feedstuff	20	19.7	98.7	3.3
Feedstuff	30	25.3	84.2	2.2

[0115] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 山东农业大学

<120> 基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附检测方法

<130>

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Asn Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Phe Trp Ser Gly Asn Tyr Tyr Arg Thr Pro Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro Lys
 115 120 125
 Pro Gln Asp Gly Gln Ala Gly
 130 135

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

caattacagt tgggtgaatc tgggtggcgga cttgtccaag ctgggggttc cctccgtctt 60
 tcatgtgccg catcgggccc cacttttagt agctatgcga tgggatggtt ccggcaggct 120
 cctgggaaaag agcgggaatt tgtagccgca atttcttggc cgggtggctc aacctactat 180
 acagattcgg tgaagggacg cttcagatc aatcgggaca acgcgaaaaa tactgtttac 240

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Tyr Ser Trp His Glu Trp Tyr Ile Pro Gln Leu Ser Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

Cys

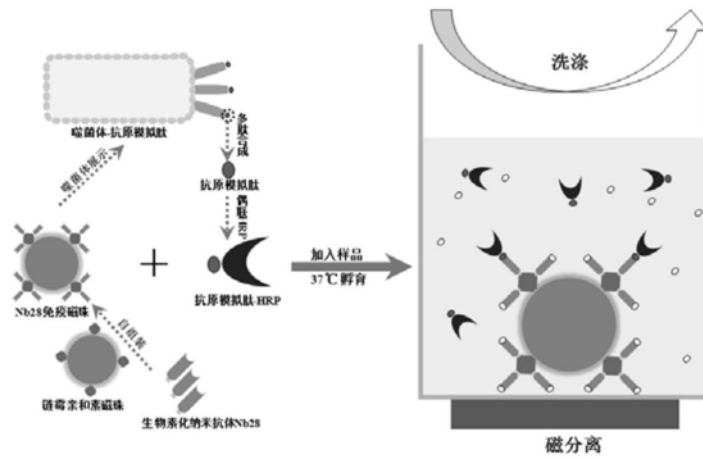


图1

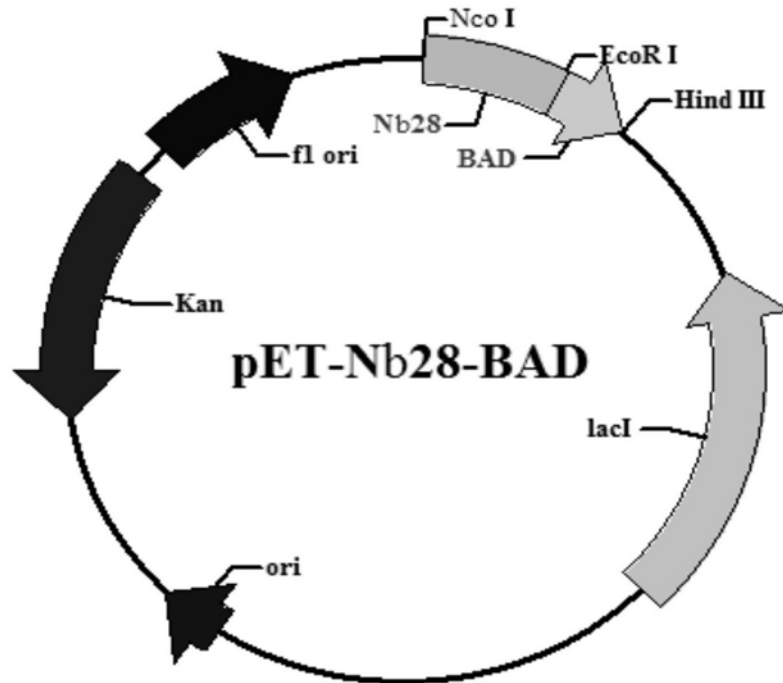


图2

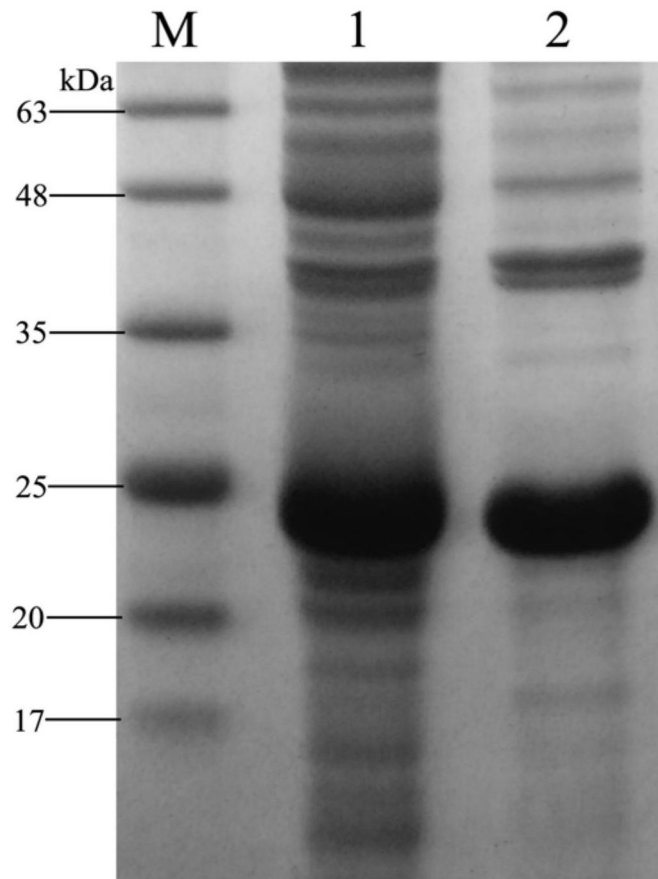


图3

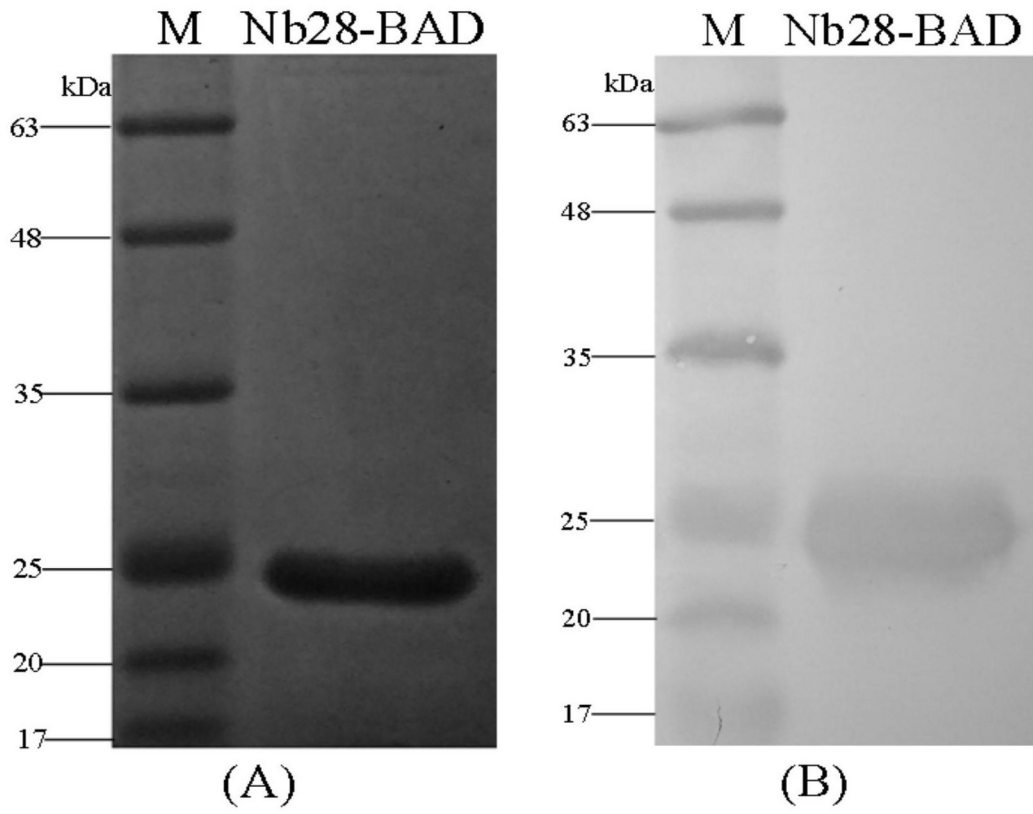


图4

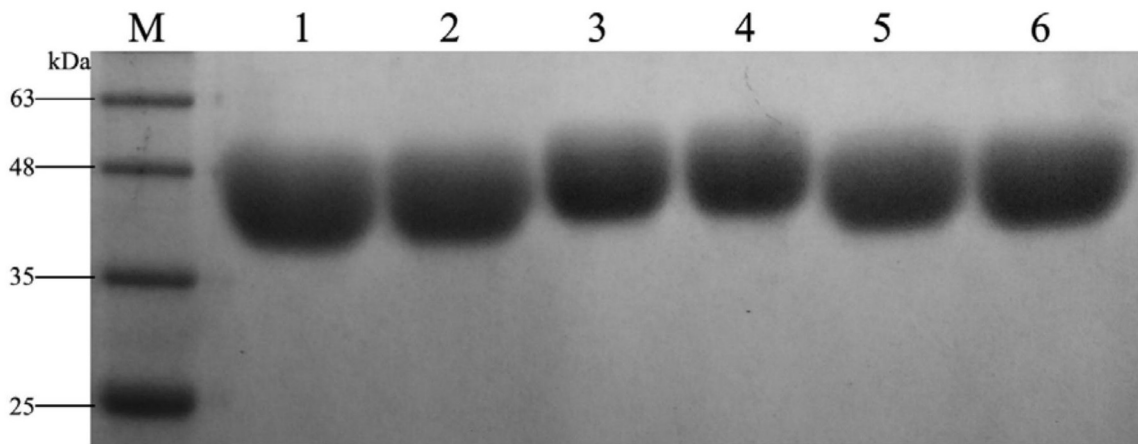


图5

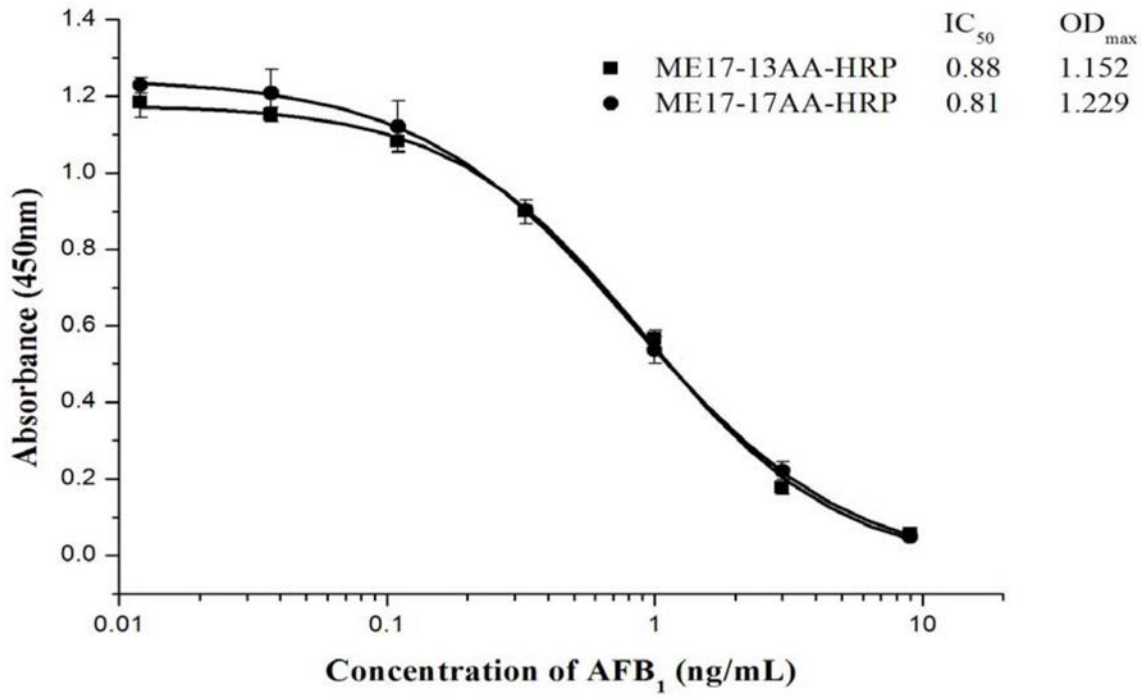


图6

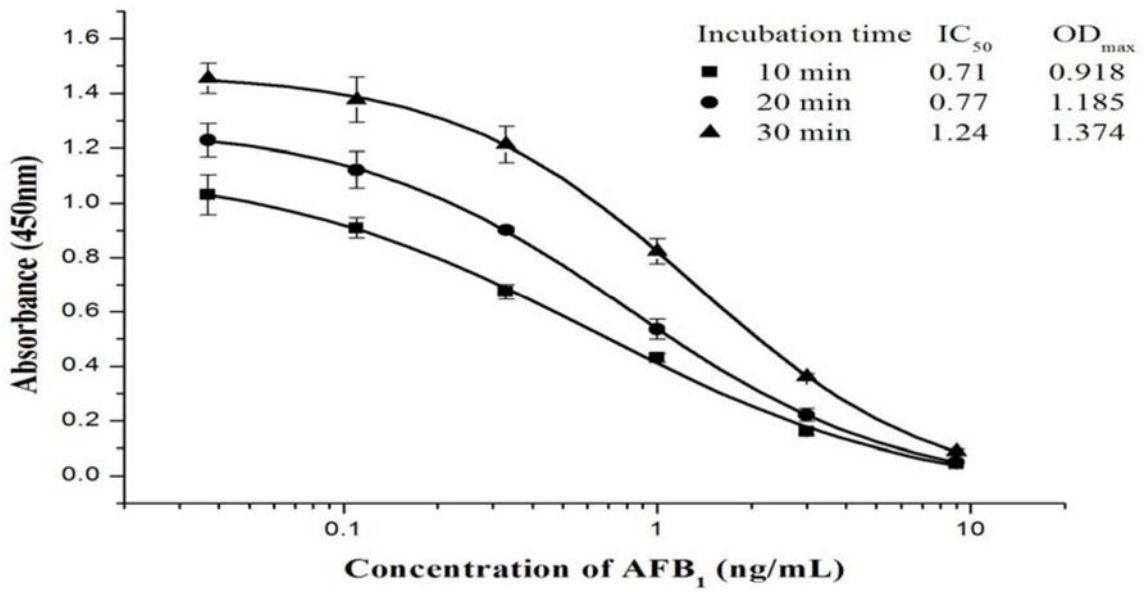


图7

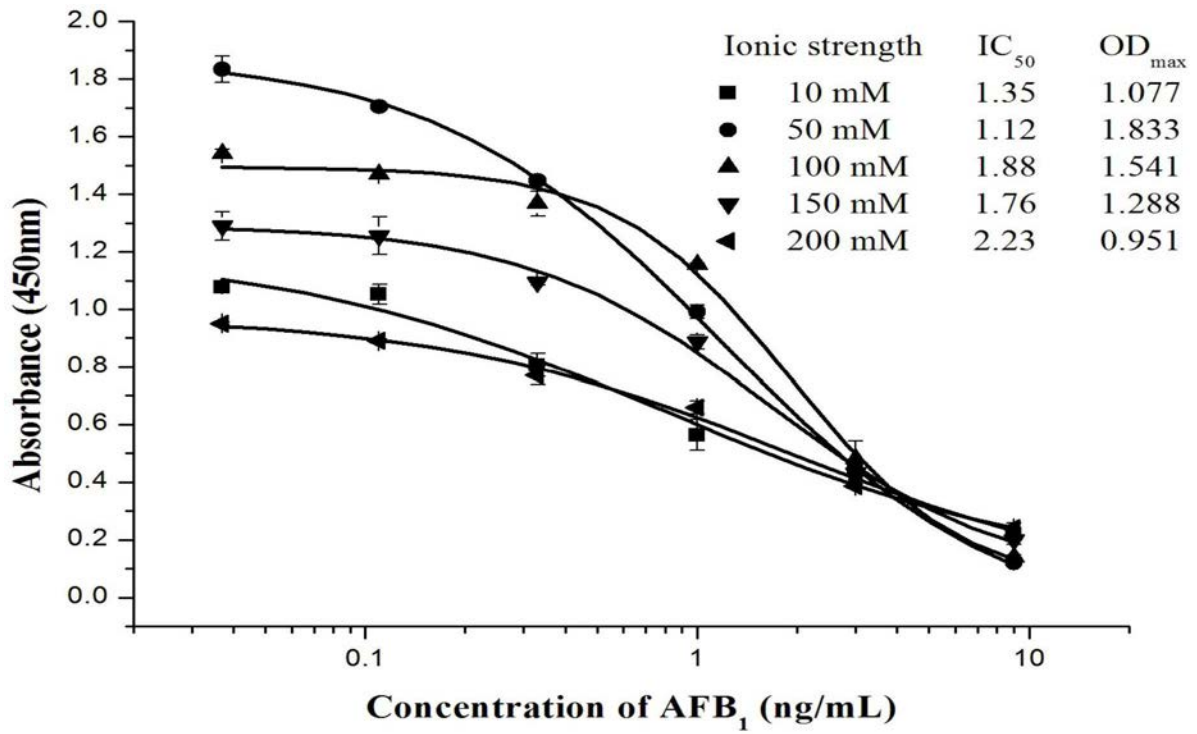


图8

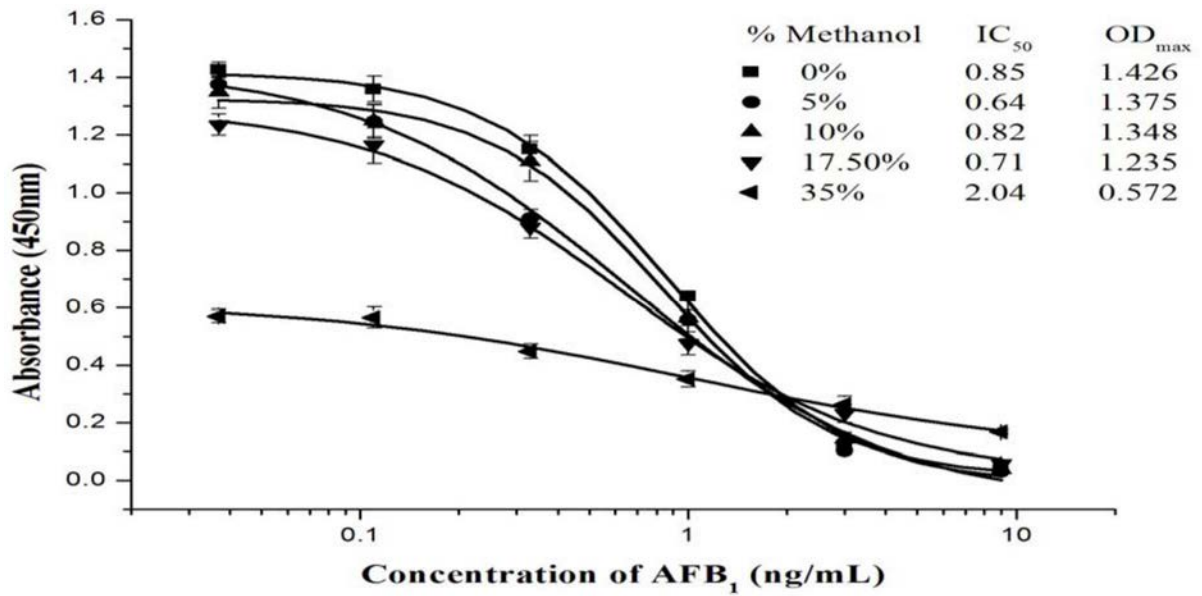


图9

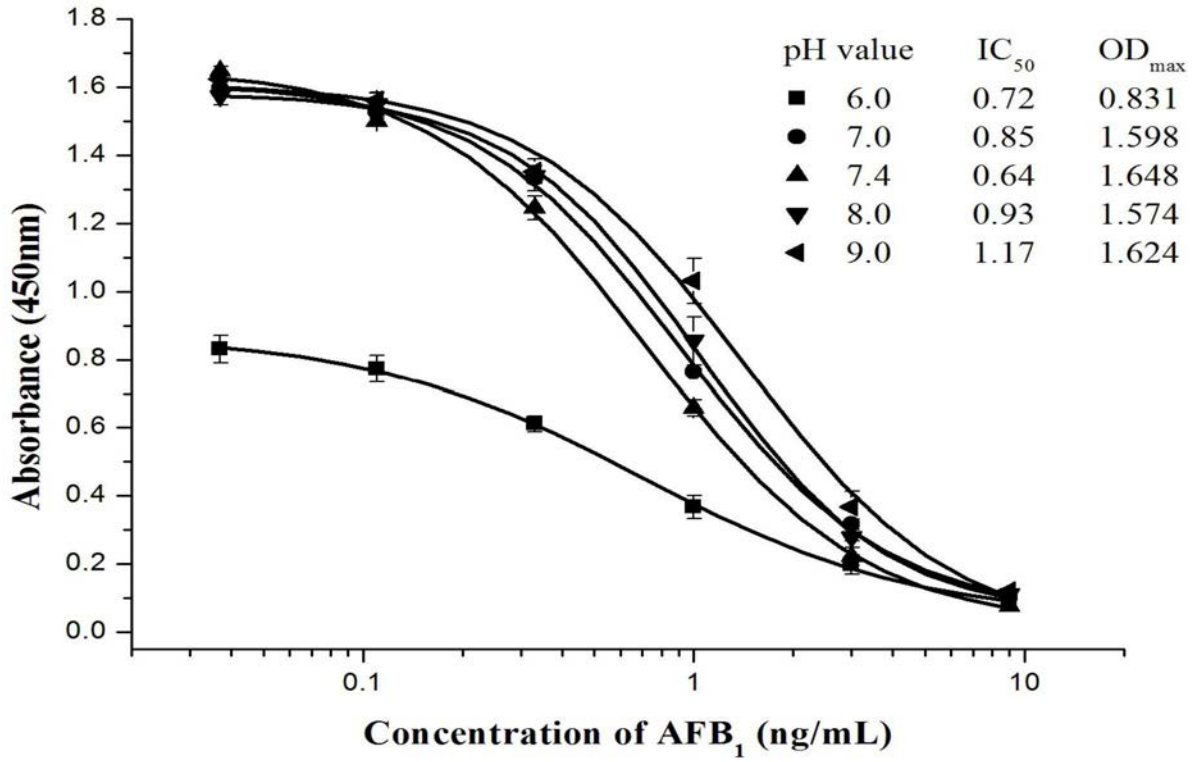


图10

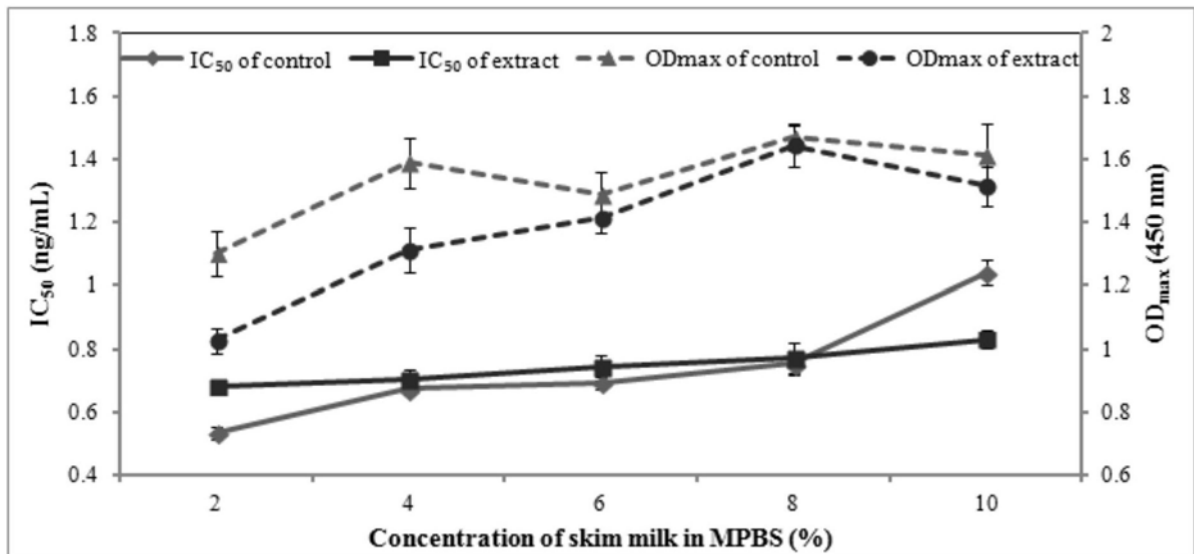


图11

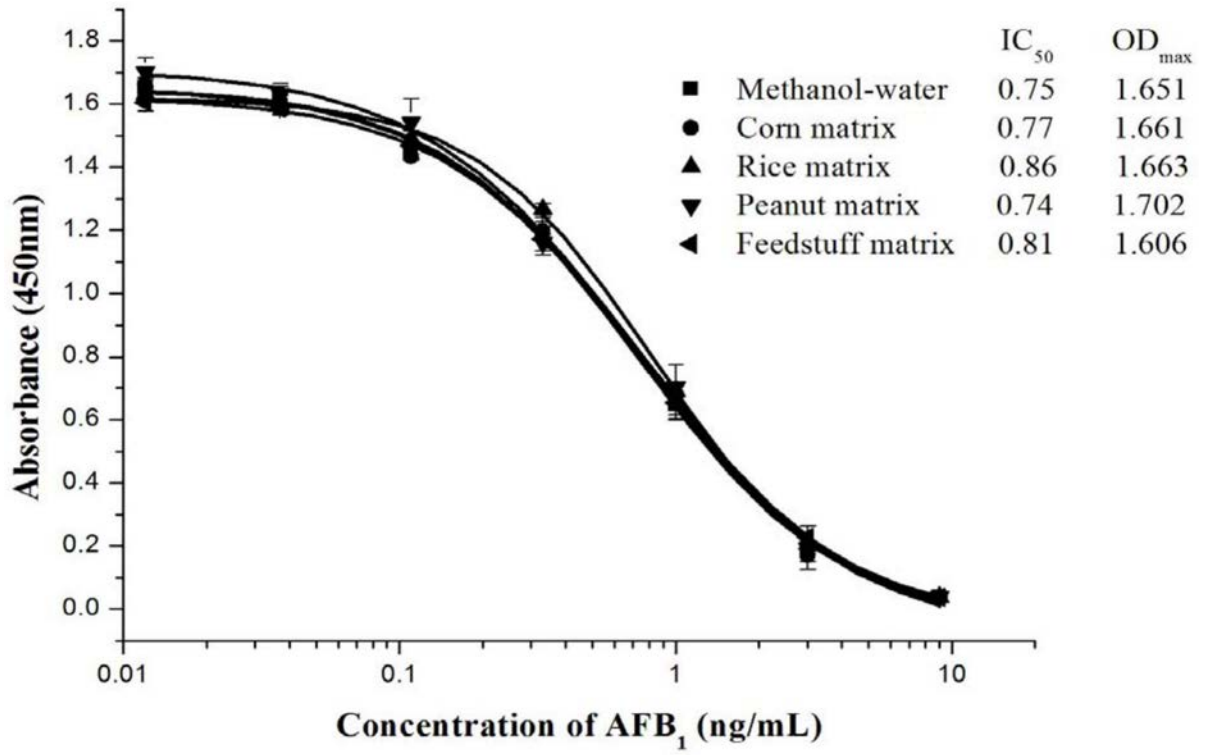


图12

专利名称(译)	基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附检测方法		
公开(公告)号	CN108794580A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN201810650332.2	申请日	2018-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
[标]发明人	赵凤春 杨正友 申强 朱常香		
发明人	赵凤春 杨正友 申强 朱常香		
IPC分类号	C07K7/08 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	C07K7/08 G01N33/535 G01N33/54326 G01N2333/38		
代理人(译)	王志坤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测技术领域，具体涉及一种基于纳米抗体和抗原模拟肽的黄曲霉毒素磁珠-酶联免疫吸附检测方法。本发明黄曲霉毒素抗原模拟肽，以黄曲霉毒素纳米抗体Nb28制备的免疫为靶标，通过噬菌体展示技术筛选得到，其氨基酸序列如SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5或SEQ ID NO.6所示。本发明首次将纳米抗体Nb28与之相应的抗原模拟肽同时用于黄曲霉毒素免疫磁珠-ELISA检测，可实现对黄曲霉毒素的快速检测。本发明中使用的基因工程抗体及抗原模拟肽的基因及氨基酸序列都可确定，易于生产、推广和应用。

