



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101241128 B

(45) 授权公告日 2012.05.02

(21) 申请号 200810034739.9

(22) 申请日 2008.03.18

(73) 专利权人 上海大学

地址 200444 上海市宝山区上大路 99 号

(72) 发明人 陈宇光 戴小峰 田汉莉 沈彦萍
顾鸣 黎双华

(74) 专利代理机构 上海上大专利事务所(普通合伙) 31205

代理人 何文欣

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2003/0018170 A1, 2003.01.23,

张国华等. 免疫亲和色谱的原理及其在食品安全检测中的应用. 《食品科学》. 2007, 第 28 卷 (第 10 期), 577-581.

王海花等. 黄曲霉毒素检测技术的研究进展. 《食品研究与开发》. 2006, 第 27 卷 (第 4 期), 176-178.

审查员 张丽华

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法。该方法的具体步骤为:酰肼化抗体的制备:用过碘酸钠将抗体非结合活性区域 Fc 端羟基氧化成醛基,再与己二酸二酰肼反应,生成酰肼化抗体;醛基化固相基质的制备:将含有连二醇结构的固相基质用过碘酸钠氧化,得到醛基化的固相基质;抗体与固相基质的偶联:将酰肼化抗体和醛基化的固相基质混合,振荡反应,待反应结束后,再加入硼氢化钠封闭固相基质上未反应的醛基,得到偶联抗体的固相基质;装柱。本发明将抗体的非结合活性区域 Fc 端定向偶联到固相基质上,更好地保持抗体的活性;将抗体衍生上酰肼,而不是固相基质,避免酰肼基团可能带来的非特异性吸附;合成好的亲和柱,除偶联抗体外,未引入新基团(如羧基、氨基等),避免由此可能引起的非特异性吸附。

1. 一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法,其特征在于该方法的具体步骤为:

a. 酰肼化抗体的制备:用过碘酸钠将抗体非结合活性区域Fc端羟基氧化成醛基,再与己二酸二酰肼反应,生成酰肼化抗体;

b. 醛基化固相基质的制备:将含有连二醇结构的固相基质用过碘酸钠氧化,得到醛基化的固相基质;

c. 抗体与固相基质的偶联:将步骤a所得酰肼化抗体和步骤b所得醛基化的固相基质混合,振荡反应,待反应结束后,再加入硼氢化钠封闭固相基质上未反应的醛基,得到偶联抗体的固相基质;

d. 装柱;

所述的抗体为黄曲霉毒素抗体;所述的含有连二醇结构的固相基质有:spharose、sephadex、纤维素或硅胶。

2. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法,其特征在于所述的酰肼化抗体的具体步骤为:

a. 将黄曲霉毒素抗体用蒸馏水溶解,再将该抗体溶液对pH 5.8 0.2M磷酸钠缓冲液透析;

b. 在步骤a所得抗体溶液中按抗体:过碘酸钠=1:0.05~0.2的质量比加入过碘酸钠,室温避光搅拌反应1小时,过Sephadex G25分离抗体,得到醛基化的抗体;

c. 向步骤b所得醛基化的抗体中加入pH 5.8的己二酸二酰肼水溶液,加入量为每毫克抗体加入0.5~2毫克己二酸二酰肼,4℃反应过夜,对0.2M磷酸钠pH5.8透析,即得酰肼化抗体。

3. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法,其特征在于所述的醛基化固相基质的具体步骤如下:将含有连二醇结构的固相基质,用0.5M NaCl淋洗,再用蒸馏水洗涤,抽干;再将该固相基质和过碘酸钠按1:0.1~0.2的质量比溶于蒸馏水中,室温振荡反应2小时,用0.5M NaCl淋洗,再用蒸馏水、0.2M磷酸钠pH 5.8洗涤,抽干,即得醛基化的固相基质。

4. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法,其特征在于所述的抗体与固相基质的偶联的具体步骤为:

a. 抗体与固相基质的偶联:将上述的酰肼化抗体溶液的浓度调整为3~5mg/ml,加入到上述的醛基化的固相基质中,其用量比为:每克醛基化的固相基质加入3~5毫克酰肼化抗体,4℃振荡反应24小时,依次用蒸馏水、1M NaCl、蒸馏水及0.2M pH 7.0磷酸钠缓冲液洗涤,抽干,得到偶联抗体的固相基质;

b. 将步骤a所得偶联抗体的固相基质和硼氢化钠溶于pH 7.0磷酸钠缓冲液中,其用量为:每克偶联抗体的固相基质加入4~12毫克硼氢化钠;4℃振荡反应4小时,依次用蒸馏水、1M NaCl、蒸馏水、0.5M NaCl洗涤,即得到所需的偶联抗体的固相基质。

黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种免疫亲和柱的制备方法，特别是一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法。

背景技术：

[0002] 黄曲霉毒素 (AFT) 是一组真菌的次级代谢毒性产物。在全世界范围内，AFT 污染比较严重。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。在天然污染的食品和饲料中以黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 最为常见，是黄曲霉菌产生毒素中的主要成分，其毒性和致癌性也最强，不仅给社会带来重大的经济损失，而且严重威胁消费者的健康。世界各国及地区均制定了严格的 AFT 限量标准，且限量要求日益严格。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、酶联免疫吸附法、放射免疫测定法、免疫亲和层析柱 - 高效液相色谱法、免疫亲和层析柱 - 荧光光度法等。薄层层析法，耗时，需大量接触标准品，不利于操作者的健康及环保，灵敏度低。放射免疫测定法，存在放射线辐射和污染等问题。酶联免疫吸附测定法重复性差，试剂寿命短。高效液相色谱法样品处理烦琐，操作复杂。而免疫亲和层析柱 - 高效液相色谱法和免疫亲和层析柱 - 荧光光度法，快速、灵敏、准确，已被国家标准 GB/T 18979-2003 所采用。因此有必要制备性能稳定、结果可靠的黄曲霉毒素免疫亲和柱。目前制备免疫亲和柱的方法大概有：溴化氰，环氧氯丙烷法，过碘酸钠法，蛋白 A 法等。其中溴化氰偶联效率高，但基质和配体偶联后生成的异脲衍生物中氨基的 pK_a = 10.4，所以通常会带一定的正电荷，从而使基质可能有阴离子离子交换作用，增大了非特异性吸附，另外溴化氰活化的基质与配体结合不够稳定，可能会出现配体脱落现象，而且溴化氰有剧毒、易挥发，所以操作不便。环氧氯丙烷法用于偶联大分子时，偶联效率低。蛋白 A 法用于偶联抗体，可以使抗体的非结合活性区域 Fc 连接到载体上，更好的保持抗体活性，但蛋白 A 较贵，用于交联抗体不经济。

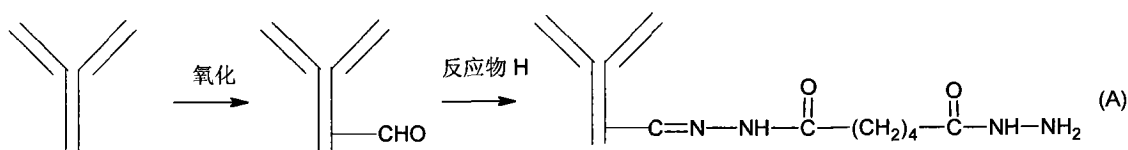
发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术中存在的问题，提供一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法。

[0004] 为达到上述目的，本发明采用如下反应机理：首先用过碘酸钠将黄曲霉毒素抗体 Fc 端衍生出酰肼；再利用过碘酸钠将固相基质氧化产生醛基，最后将含酰肼的抗体与含醛基的固相基质偶联。具体如下：

[0005] 1. 酰肼化抗体的制备

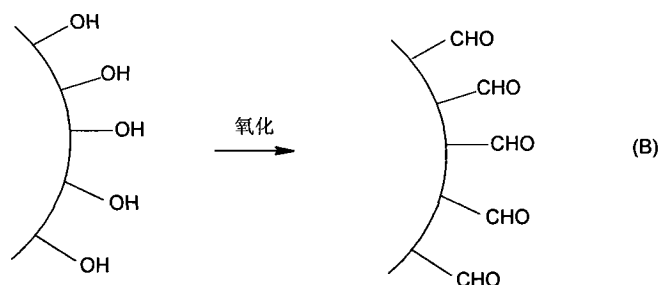
[0006]



[0007] 反应物 $H = H_2N-NH-C(=O)-(CH_2)_4-C(=O)-NH-NH_2$

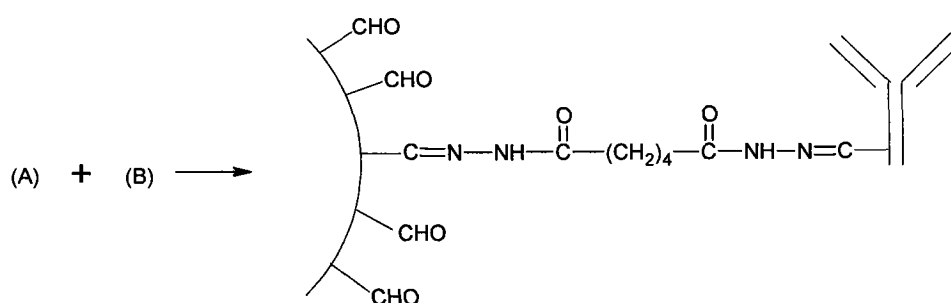
[0008] 2. 醛基化固相基质的制备

[0009]

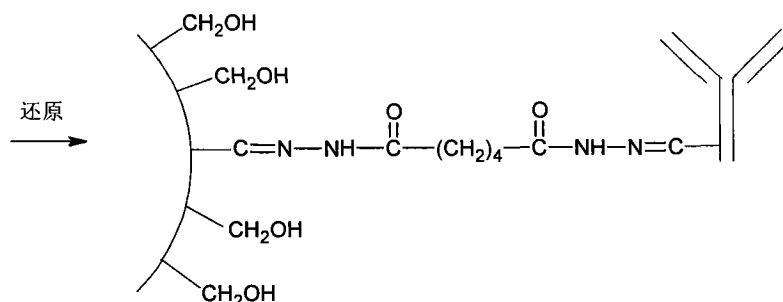


[0010] 3. 抗体与固相基质的偶联

[0011]



[0012]



[0013] 根据上述机理,本发明采用如下技术方案:

[0014] 一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法,其特征在于该方法的具体步骤为:

[0015] a. 酰肼化抗体的制备:用过碘酸钠将抗体非结合活性区域Fc端羟基氧化成醛基,再与己二酸二酰肼反应,生成酰肼化抗体;

[0016] b. 醛基化固相基质的制备:将含有连二醇结构的固相基质用过碘酸钠氧化,得到醛基化的固相基质;

[0017] c. 抗体与固相基质的偶联:将步骤a所得酰肼化抗体和步骤b所得醛基化的固相基质混合,振荡反应,待反应结束后,再加入硼氢化钠封闭固相基质上未反应的醛基,得到偶联抗体的固相基质;

[0018] d. 装柱。

[0019] 上述的含有连二醇结构的固相基质有:糖类或硅胶。

[0020] 上述的糖类有:sepharsoe、sephadex 或纤维素。

[0021] 上述的酰肼化抗体的具体步骤为:

[0022] a. 将黄曲霉毒素抗体用蒸馏水溶解,再将该抗体溶液对 pH 5.8 0.2M 磷酸钠缓冲

液透析；

[0023] b. 在步骤 a 所得抗体溶液中按抗体：过碘酸钠 = 1 : 0.05 ~ 0.2 的质量比加入过碘酸钠，室温避光搅拌反应 1 小时，过 Sephadex G25 分离抗体，得到醛基化的抗体；

[0024] c. 向步骤 b 所得醛基化的抗体中加入 pH 5.8 的己二酸二酰肼水溶液，加入量为每毫克抗体加入 0.5 ~ 2 毫克己二酸二酰肼，4℃ 反应过夜，对 0.2M 磷酸钠 pH 5.8 透析，即得酰肼化抗体。

[0025] 上述的醛基化固相基质的具体步骤如下：将含有连二醇结构的固相基质，用 0.5M NaCl 淋洗，再用蒸馏水洗涤，抽干；再将该固相基质和过碘酸钠按 1 : 0.1 ~ 0.2 的质量比溶于蒸馏水中，室温振荡反应 2 小时，用 0.5M NaCl 淋洗，再用蒸馏水、0.2M 磷酸钠 pH 5.8 洗涤，抽干，即得醛基化的固相基质。

[0026] 上述的抗体与固相基质的偶联的具体步骤为：

[0027] a. 抗体与固相基质的偶联：将上述的酰肼化抗体溶液的浓度调整为 3 ~ 5mg/ml，加入到上述的醛基化的固相基质中，其用量比为：每克醛基化的固相基质加入 3 ~ 5 毫克酰肼化抗体，4℃ 振荡反应 24 小时，依次用蒸馏水、1M NaCl、蒸馏水及 0.2M pH 7.0 磷酸钠缓冲液洗涤，抽干，得到偶联抗体的固相基质；

[0028] b. 将步骤 a 所得偶联抗体的固相基质和硼氢化钠溶于 pH 7.0 磷酸钠缓冲液中，其用量为：每克偶联抗体的固相基质加入 4 ~ 12 毫克硼氢化钠；4℃ 振荡反应 4 小时，依次用蒸馏水、1M NaCl、蒸馏水、0.5M NaCl 洗涤，即得到所需的偶联抗体的固相基质。

[0029] 与现有技术相比，本发明抗体偶联方法具有以下显而易见的特点和显著的优点：1) 将抗体的非结合活性区域 Fc 端定向偶联到固相基质上，更好地保持抗体的活性；2) 将抗体衍生上酰肼，而不是固相基质，避免酰肼基团可能带来的非特异性吸附；3) 合成好的亲和柱，除偶联抗体外，未引入新基团（如羧基、氨基等），避免由此可能引起的非特异性吸附。

具体实施方式

[0030] 实施例一：本发明的一个优选实施例的具体步骤为：

[0031] 1) 酰肼化抗体的制备

[0032] 用硫酸胺沉淀腹水（黄曲霉毒素抗体），离心，去上清，沉淀加蒸馏水溶解，使抗体浓度约大于 25mg/ml，对 pH 5.8 0.2M 磷酸钠缓冲液透析。向抗体溶液中加入十分之一体积的 20 ~ 40mg/ml 过碘酸钠水溶液，室温避光搅拌反应 1 小时，过 Sephadex G25 分离抗体。向上述过碘酸钠氧化抗体加入过量己二酸二酰肼水溶液（pH 5.8）（每毫克抗体加入 0.5 ~ 2 毫克己二酸二酰肼），4℃ 反应过夜，对 0.2M 磷酸钠 pH 5.8 透析。2) 醛基化固相基质（Sephacrose 4B）的制备

[0033] 取适量 Sepharose 4B 抽干，称取 15g，用 200ml 0.5M NaCl 淋洗，再用 500ml 蒸馏水洗涤，抽干。于胶中加入 150ml 蒸馏水及 2g 过碘酸钠。室温振荡反应 2 小时后，用 200ml 0.5M NaCl 淋洗，再用 500ml 蒸馏水、50ml 0.2M 磷酸钠 pH 5.8 洗涤，抽干、待用。

[0034] 3) 抗体与固相基质的偶联

[0035] 将酰肼化抗体的浓度将抗体浓度调为 3 ~ 5mg/ml，加入到上述醛基化 Sepharose 4B 中（每克 Sepharose 4B 加入 3 ~ 5 毫克酰肼化抗体），4℃ 振荡反应 24 小时，用 300ml

蒸馏水、300ml 1M NaCl、300ml 蒸馏水及 100ml 0.2M pH 7.0 磷酸钠缓冲液洗涤，抽干。向上述抽干的 Sepharose 4B 中加入 20ml pH 7.0 磷酸钠缓冲液及 100mg 硼氢化钠，4℃振荡反应 4 小时，用 300ml 蒸馏水、300ml 1M NaCl、300ml 蒸馏水，300ml 0.5M NaCl 洗涤，待用。

[0036] 4) 装柱

[0037] ①取 1ml 注射器的注射针管，去除金属针头，酒精灯上烧结，密封出液口，做为亲和柱的下层密封盖。

[0038] ②用下层密封盖，密封注射器的下端出液口，加入适合大小的垫片，用 1ml 枪吸取适量偶联黄曲霉毒素抗体的 Sepharose 4B 悬液注入注射器，加入 0.5M NaCl

[0039] 注满注射器，静置使 Sepharose 4B 自然沉降，加入适合大小的垫片。

[0040] ③放开下层密封盖，让溶液自然流出，去除下层空气。

[0041] ④盖上下层密封盖，用 0.5M NaCl 注满注射器，用一个小塞子将注射针管上端密封，存于 4℃。

[0042] 实施例二免疫亲和柱荧光光度法测定黄曲霉毒素

[0043] 在不含 AFT 的空白样品（加拿大小麦）中，分别添加 1、5、20、50ppb 黄曲霉毒素混合标准品（AFB₁，AFB₂，AFG₁，AFG₂），样品提取液用实施例一制备的亲和柱纯化，用荧光光度计测定浓度。具体操作方法参照国家标准 GB/T 18979-2003。结果如下参见表 1：

[0044] 表 1 采用本发明制备的免疫亲和柱和荧光光度法测定黄曲霉毒素的结果

[0045]

添加 AFT 浓度 (ppb)	实测值 (ppb)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	变异系数 (%)
1.0	0.93	93.0	99.3	8.7
	1.1	110.0		
	0.98	98.0		
	0.95	95.0		
	0.9	90.0		
	1.1	110.0		
5.0	4.3	86.0	97.0	5.9
	5.0	100.0		
	5.0	100.0		
	4.9	98.0		
	4.8	96.0		
	5.1	102.0		
20.0	19	95.0	96.7	5.3
	20	100.0		
	18	90.0		
	19	95.0		
	21	105.0		
	19	95.0		
50.0	38	76.0	82.7	9.3
	41	82.0		
	38	76.0		
	47	94.0		
	45	90.0		
	39	78.0		

[0046] 从以上数据可以看出，在空白样品加拿大小麦中对 AFT 进行 4 个水平浓度添加回

收率实验,平均回收率 82.7 ~ 99.3%,变异系数 5.3 ~ 9.3%,这表明用本发明制备的黄曲霉毒素免疫亲和柱性能稳定、结果可靠,完全可以满足黄曲霉毒素检测的要求。

专利名称(译)	黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法		
公开(公告)号	CN101241128B	公开(公告)日	2012-05-02
申请号	CN200810034739.9	申请日	2008-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海大学		
申请(专利权)人(译)	上海大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海大学		
[标]发明人	陈宇光 戴小峰 田汉莉 沈彦萍 顾鸣 黎双华		
发明人	陈宇光 戴小峰 田汉莉 沈彦萍 顾鸣 黎双华		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	何文欣		
审查员(译)	张丽华		
其他公开文献	CN101241128A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法。该方法的具体步骤为：酰肼化抗体的制备：用过碘酸钠将抗体非结合活性区域Fc端羟基氧化成醛基，再与己二酸二酰肼反应，生成酰肼化抗体；醛基化固相基质的制备：将含有连二醇结构的固相基质用过碘酸钠氧化，得到醛基化的固相基质；抗体与固相基质的偶联：将酰肼化抗体和醛基化的固相基质混合，振荡反应，待反应结束后，再加入硼氢化钠封闭固相基质上未反应的醛基，得到偶联抗体的固相基质；装柱。本发明将抗体的非结合活性区域Fc端定向偶联到固相基质上，更好地保持抗体的活性；将抗体衍生上酰肼，而不是固相基质，避免酰肼基团可能带来的非特异性吸附；合成好的亲和柱，除偶联抗体外，未引入新基团(如羧基、氨基等)，避免由此可能引起的非特异性吸附。

