



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104117227 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 201310153241.5

柱的研制.《食品安全》.2007,(第2期),

(22)申请日 2013.04.28

审查员 江涵

(73)专利权人 北京华安麦科生物技术有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区超前路6号

(72)发明人 张彦明

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

B01D 15/38(2006.01)

B01J 20/281(2006.01)

G01N 1/34(2006.01)

(56)对比文件

CN 102115493 A,2011.07.06,

CN 101846685 A,2010.09.29,

邓舜洲.脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和层析

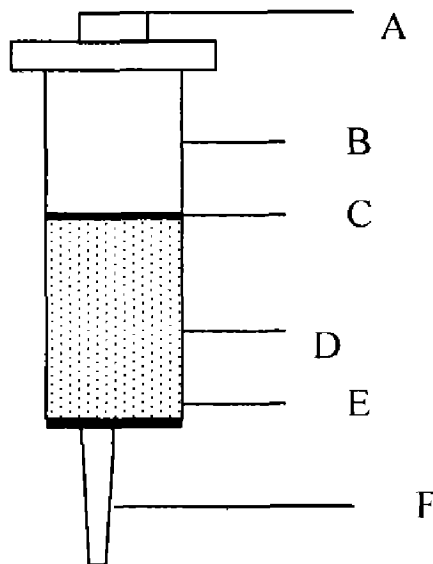
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱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亲和柱及其制备方法和用途。该免疫亲和柱利用蛋白G偶联到琼脂糖凝胶载体上,然后用抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇的抗体与琼脂糖上的蛋白G偶联。然后再利用交联剂对脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体-蛋白G-琼脂糖凝胶载体进行交联后装填亲和柱。该免疫亲和柱主要用于对于食品、饲料、调味品、酒和饮料以及其他多种样本中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇的纯化。



1. 一种纯化脱氧雪腐镰刀菌烯醇的免疫亲和柱的制备方法,其特征在于:

(1)载体活化

选择琼脂糖载体sepharose4B,以环氧氯丙烷活化法进行活化,取2%的预溶胀的琼脂糖凝胶sepharose4B,用20倍体积的蒸馏水充分冲洗,称取滤去水分后的湿凝胶5克,加入7.5毫升0.8M的NaOH,30%的环氧氯丙烷2毫升,5毫升2mg/ml的硼氢化钠NaBH<sub>4</sub>,反应后用蒸馏水洗涤;

(2)将蛋白G与活化载体sepharose4B的偶联

将活化好的琼脂糖凝胶sepharose4B用0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.8M NaCl,pH8.9偶联缓冲液洗涤,加入2mg/ml的蛋白G,室温偶联,将偶联好的琼脂糖载体用20mM,pH7.4的磷酸缓冲液PBS洗涤3次,制成蛋白G-sepharose;

(3)抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体与蛋白G-sepharose载体上的蛋白G连接

将抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体溶于20mM、pH7.4的PBS中,终浓度2mg/ml,将抗体加入用20mM、pH7.4的PBS缓冲液洗涤过的蛋白G-sepharose中,室温结合,结合后的载体用PBS洗涤,连接有抗体的载体命名为抗体-蛋白G-sepharose;

(4)载体交联

将抗体-蛋白G-sepharose用0.1M pH9.0的硼酸缓冲液洗涤3次,然后加入0.1M pH9.0的硼酸缓冲液,在缓冲液中加入庚二亚氨酸二甲酯DMP至终浓度20mM,室温交联1小时,加入50mM、pH9.0的乙醇胺终止反应,用50mM的乙醇胺封闭10分钟,交联后的抗体-蛋白G-sepharose载体用20mM、pH7.4的PBS洗涤3次;

(5)装柱

将交联后的抗体-琼脂糖载体根据需要装入层析柱中。

## 一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱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亲和柱及其制备方法和用途。属食品安全检测领域。

### 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0.1~0.2mg/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] 3.1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[7]。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] 3.2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色谱中存在如下问题: 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。MacDonald SJ,等对免疫亲和柱净化处理脱氧雪腐镰刀菌烯醇样本,然后进行HPLC检测的方法进行了详细的描述。[MacDonald SJ J AOAC Int,2005,88(4):1197~1204]

[0009] 用于目前制备免疫亲和纯化柱的方法大概有:溴化氰活化直接偶联法、环氧氯丙烷法、过碘酸钠法等。这些方法的基本原理都是将载体基质进行化学活化后,将抗体偶联到载体上。但是由于偶联是非特异性的,抗体的任何部位都有可能和载体偶联,方向性是不可控制的。势必影响亲和纯化柱纯化脱氧雪腐镰刀菌烯醇的效率。

### 发明内容:

[0010] 本发明的目的在于提供一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱及其制备方法和用途

[0011] 为了达到上述目的,在本发明中,利用了蛋白G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。我们克隆了蛋白G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。将基因重组的蛋白G偶联到载体上后,再将脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体偶联到蛋白G上,制备出了脱氧雪腐镰刀菌烯醇—蛋白G—载体,再用交联剂将载体进行交联。交联后的载体装柱后就形成了高亲和力的脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱。该亲和柱操作简便,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和荧光仪检测。

[0012] 具体操作如下:

[0013] 本发明最大的优势就是利用了蛋白G与IgG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。

[0014] 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。本发明的蛋白G包括按照GenBank CAA27638.1序列表达的蛋白G,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。并且只有抗体能与蛋白G结合,其余蛋白均不能与蛋白G结合,特异性很高。以此蛋白G为基础制备的免疫亲和柱具有特异性好,脱氧雪腐镰刀菌烯醇结合量大,纯化效率高的特点。

[0015] 脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱及其制备方法说明如下:

[0016] 1.载体活化

[0017] 选择琼脂糖载体,sepharose4B,以环氧氯丙烷活化法进行活化。

[0018] 取2%的预溶胀的琼脂糖凝胶sepharose4B,用20倍体积的蒸馏水充分冲洗,洗去残存的乙醇,用漏斗过滤掉水分。

[0019] 称取滤去水份后的湿凝胶5克,加入7.5毫升0.8M的NaOH,30%的环氧氯丙烷2毫升,2mg/ml的硼氢化钠NaBH<sub>4</sub>,5毫升,在25℃下摇床反应8小时。

[0020] 反应后,用大量的蒸馏水洗涤,去除凝胶中混杂的环氧氯丙烷。

[0021] 2.将蛋白G与活化载体sepharose4B的偶联

[0022] 将活化好的琼脂糖凝胶sepharose4B用偶联缓冲液(0.1M的NaHCO<sub>3</sub>,0.8MNaCl,pH8.9)洗涤3次。加入2mg/ml的蛋白G,室温偶联4小时。

[0023] 将偶联好的琼脂糖载体用20mM,pH7.4的磷酸缓冲液PBS洗涤3次。偶联有蛋白G的琼脂糖载体sepharose命名为蛋白G-sepharose。

[0024] 3.抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体与蛋白G-sepharose载体上的蛋白G连接

[0025] 蛋白G与抗体具有特异性的亲和力,在一定的反应条件下,将偶联有蛋白G的琼脂糖凝胶与抗体进行连接。将抗体连接于琼脂糖上。由于蛋白G与抗体的结合部位是抗体的Fc区域,抗体的抗原结合区不受影响,充分保证了抗体的抗原结合能力。

[0026] 将抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体溶于20mM,pH7.4的PBS中,终浓度2mg/ml。将抗体加入用20mM pH7.4的PBS缓冲液洗涤过的蛋白G-sepharose中。室温结合30分钟。

[0027] 结合后的载体用PBS洗涤。连接有抗体的载体命名为抗体-蛋白G-sepharose。

[0028] 4.载体交联

[0029] 将抗体-蛋白G-sepharose用0.1M pH9.0的硼酸缓冲液洗涤3次。然后加入0.1M pH9.0的硼酸缓冲液,在缓冲液中加入交联剂如庚二亚氨酸二甲酯(DMP)至终浓度20mM。室温交联1小时。

[0030] 加入50mM,pH9.0的乙醇胺终止反应。并用50mM的乙醇胺封闭10分钟。

[0031] 交联后的抗体-蛋白G-sepharose载体用20mM,pH7.4的PBS洗涤3次。

[0032] 5.装柱

[0033] 将交联后的抗体-琼脂糖载体根据需要装入层析柱中,可根据需要制备不同容量的脱氧雪腐镰刀菌烯醇亲和纯化柱。层析柱的结构如附图1所示。

[0034] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0035] 1)充分的利用了蛋白G与IgG抗体特异性结合的特性,使抗体通过蛋白G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。

[0036] 2)本发明使用了基因改造后的蛋白G,通过对密码子的优化和IgG结合域基因的优化。使蛋白G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。

[0037] 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。

[0038] 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

[0039] 图1:脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱结构示意图

[0040] A:进样口;B:柱体;C:筛板;D:脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体-蛋白G-sepharose填料E:筛板;F:出样口

[0041] 图2:面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量检测HPLC图谱

[0042] DON:脱氧雪腐镰刀菌烯醇检出峰;

## 具体实施方式

[0043] 实施例1:脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和纯化柱的制备

[0044] 本发明制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和纯化柱的一个优选的实施方案如下:

[0045] 1. 琼脂糖凝胶活化

[0046] 取2%的琼脂糖凝胶sepharose2B,用20倍体积的蒸馏水充分冲洗,洗去残存的乙醇。用漏斗过滤掉水分。称取滤去水份后的湿凝胶5克,加入7.5毫升0.8M的NaOH,30%的环氧氯丙烷2毫升,2mg/ml的硼氢化钠 $\text{NaBH}_4$ ,5毫升,在25℃下摇床反应8小时。

[0047] 反应后,用50毫升蒸馏水洗涤,去除凝胶中混杂的环氧氯丙烷。

[0048] 2. 蛋白G与活化的琼脂糖凝胶的偶联

[0049] 取1克活化后的琼脂糖凝胶,用偶联缓冲液(0.1M的 $\text{NaHCO}_3$ ,0.8M NaCl,pH8.9)洗涤3次。加入2mg/ml的蛋白G20ml,室温偶联4小时。

[0050] 将偶联好的琼脂糖载体用20mM,pH7.4的磷酸缓冲液PBS洗涤3次。偶联有蛋白G的琼脂糖载体sepharose命名为蛋白G-sepharose。

[0051] 3. 抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇IgG单抗与蛋白G-sepharose结合

[0052] 将抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体溶于20mM、pH7.4的PBS中,终浓度2mg/ml,总体积10ml。

[0053] 将蛋白G-sepharose用20mM pH7.4的PBS缓冲液洗涤三次,每次30ml。将溶解于PBS中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体加入洗涤过的蛋白G-sepharose中。室温结合30分钟。

[0054] 结合后的载体用20mM pH7.4的PBS洗涤三次,每次30ml。连接有抗体的载体命名为抗体-蛋白G-sepharose。

[0055] 4. 结合IgG的琼脂糖sepharose交联

[0056] 将抗体-蛋白G-sepharose用0.1M pH9.0的硼酸缓冲液洗涤3次,每次30ml。

[0057] 将湿凝胶固体,加入0.1M pH9.0的硼酸缓冲液20ml,在缓冲液中加入交联剂庚二亚氨酸二甲酯(DMP)至终浓度20mM。室温交联1小时。

[0058] 加入100mM,pH9.0的乙醇胺20ml终止反应。并用50mM的乙醇胺20ml封闭10分钟。

[0059] 交联后的抗体-蛋白G-sepharose载体用20mM,pH7.4的PBS洗涤3次,每次30ml。

[0060] 5. 装柱

[0061] 将交联后的sepharose用10毫升20mM PBS pH7.4重悬,然后装入空的亲和纯化柱柱体中。

[0062] 实施例2:利用脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱纯化和检测面粉中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇

[0063] 1. 面粉样品处理:

[0064] ——称取面粉样品25g,5g聚乙二醇,加入100ml蒸馏水;

[0065] ——摇床剧烈振荡20min,使其完全混匀;

[0066] ——用微纤维滤纸过滤,收集滤液;

[0067] ——取1mL滤液用于上样检测。

[0068] 2. 将脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和纯化柱室温平衡30分钟。

[0069] 3. 取出免疫亲和柱,进样口与注射器针筒连接,注射器接入到气控操作架上。

[0070] 4.用去离子水洗涤亲和柱3次,每次10毫升,调节气孔操作架气泵压力,使液体以3滴/秒的流速流出。

[0071] 5.将样品加入纯化柱中,调节流量至1-2滴/秒。直至样品全部流出纯化柱。

[0072] 6.用蒸馏水洗涤纯化柱3次,每次5毫升。

[0073] 7.加入1ml甲醇,收集洗脱产物。

[0074] 8.洗脱产物用高效液相色谱HPLC检测。

[0075] 9.高效液相色谱检测结果见表1,脱氧雪腐镰刀菌烯醇色谱图如附图2:

[0076]

保留时间 [min]	类型	峰面积 [LU*S]	含量/峰面积	含量 [ng/ul]	组	名称
13.973	BB	18.40413	44.54380	819.78972		
总量:				819.78972		

[0077] 从检测图谱看出,面粉样品经脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱纯化后,用高效液相色谱(HPLC)检测可以检测到脱氧雪腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素),其含量为819.78972ng/ul。

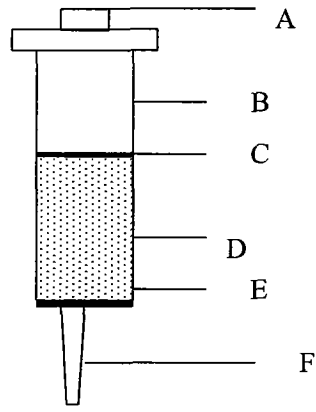


图1

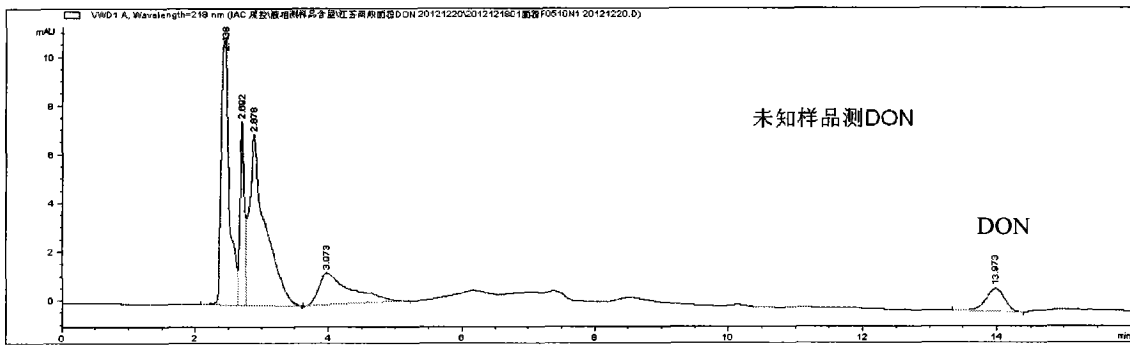


图2

专利名称(译)	一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱及其制备方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN104117227B</a>	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	CN201310153241.5	申请日	2013-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京华安麦科生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京华安麦科生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京华安麦科生物技术有限公司		
[标]发明人	张彦明		
发明人	张彦明		
IPC分类号	G01N33/531 B01D15/38 B01J20/281 G01N1/34		
审查员(译)	江涵		
其他公开文献	CN104117227A		
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亲和柱及其制备方法和用途。该免疫亲和纯化柱利用蛋白G偶联到琼脂糖凝胶载体上，然后用抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇的抗体与琼脂糖上的蛋白G偶联。然后再利用交联剂对脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体-蛋白G-琼脂糖凝胶载体进行交联后装填亲和柱。该免疫亲和柱主要用于对于食品、饲料、调味品、酒和饮料以及其他多种样本中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇的纯化。

