



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104117229 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 201310153243.4

(22)申请日 2013.04.28

(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 王莹

(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,

孙兴荣.“抗黄曲霉毒素M1免疫亲和柱的制备”.《现代食品科技》.2011,(第3期),第306页摘

要,第307页第1.2.2节.

徐红.利用蛋白质A-琼脂糖CL-4B亲和层析柱纯化兔血清免疫球蛋白.《北京医科大学学报》.1986,第18卷(第1期),第71页.

审查员 江涵

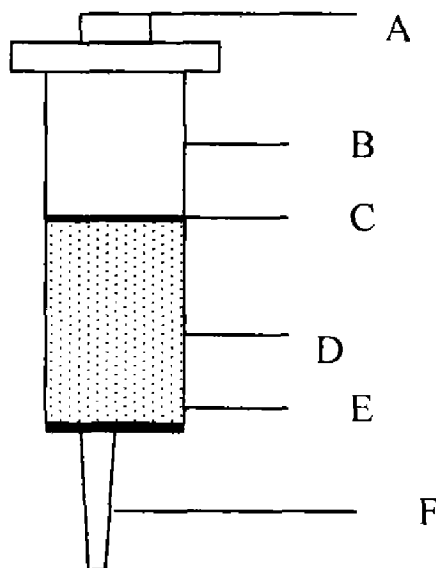
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种黄曲霉毒素免疫亲和柱及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明涉及一种黄曲霉毒素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,然后用抗黄曲霉毒素的抗体与琼脂糖上的蛋白G偶联。然后再利用交联剂对黄曲霉毒素抗体-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、牛奶、血样以及其他多种样本中的黄曲霉毒素的纯化,以便于后期对样本中黄曲霉毒素的高效液相色谱(HPLC)检测和荧光检测。



1. 一种纯化黄曲霉毒素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NaBH₄,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 NaHCO₃、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)抗黄曲霉毒素抗体与蛋白G-sepharose载体上的蛋白G连接

将抗黄曲霉毒素抗体溶于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,根据需要制备不同容量的黄曲霉毒素亲和纯化柱。

一种黄曲霉毒素免疫亲和柱及其制备方法和用途

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种黄曲霉毒素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] 黄曲霉毒素(aflatoxin,AFT)主要是由黄曲霉和寄生曲霉等真菌产生的一类有毒次生代谢物。在世界不同地区都发现了这些真菌大量存在于供人类食用的食品中,黄曲霉毒素污染已导致严重的食品安全问题。黄曲霉毒素是一类毒性极强的物质,具有强致癌性和强免疫抑制性。1993年AFT被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为1类致癌物。黄曲霉毒素广泛的分布于发霉的粮食及其制品中,特别是花生、花生油、玉米及其制品、乳及乳制品,发霉的饲料中也有发现含有较多的黄曲霉毒素。迄今为止,已经发现的黄曲霉毒素至少包含黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2、M1、M2等17种结构相似且特征已知的化合物。其中黄曲霉毒素B1是(AFTB1)是自然发生潜力最大、最为常见的一种毒素。是黄曲霉毒素中的主要成份。其毒性和致癌性也最强。

[0003] 世界各国和地区均制定了严格的AFT限量标准,且限量要求日益严格。

[0004] 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(HPLC)、酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫分析法、微柱法等。

[0005] 其中薄层层析法是最早使用也是最广泛使用的检测黄曲霉毒素的方法,但是薄层层析法对样品处理繁琐,实验过程复杂,所需时间较多,容易受到杂质的干扰。比较适合黄曲霉毒素的定性检测。

[0006] 放射免疫分析法由于使用到放射性元素,容易造成放射性污染,目前已经很少人使用。酶联免疫分析法操作简便,使用较为安全。但由于酶本身不稳定,用此方法检测有可能带来一定的假阳性和假阴性的问题。微柱法主要用于快速筛选出超标样本,很难对毒素进行种类区分和定量检验,仅仅适用于定性检测。

[0007] 高效液相色谱法在操作上较为简便,可同时检测多个黄曲霉毒素种类,适于大批量的样品分析。但是高效液相色谱检测收到前期样本处理的限制,只有前期将样本进行纯化才能得到更好的检测结果。而免疫亲和纯化柱很好的解决了这一问题。利用免疫亲和纯化柱和高效液相色谱联用能快速、准确的得到结果,并且灵敏度很高,目前已经被国家标准GB/T18979-2003采用。

[0008] 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黄曲霉毒素的效率。对于这一弊端,目前有了一些解决办法,上海大学的陈宇光等(CN 101241128A)通过将抗体进行酰肼化修饰,然后与醛基化的基质相结合。使抗体的Fc片段与基质结合,抗体的Fab片段暴露在外,提高了抗体捕捉抗原的效率。但是由于需要对抗体进行酰肼化的化学修饰,步骤较繁琐,并且化学修饰抗体可能会影

响抗体本身的亲和力,进而影响黄曲霉毒素的纯化效率。

发明内容:

[0009] 本发明的目的在于提供一种黄曲霉毒素免疫亲和柱及其制备方法和用途

[0010] 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,再将黄曲霉毒素抗体偶联到蛋白G上,制备出了黄曲霉毒素—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黄曲霉毒素免疫亲和柱。该亲和柱操作简便,纯化黄曲霉毒素效率高。样本经过简单的处理就可以进行纯化,得到纯度很高的黄曲霉毒素。用于高效液相色谱检测和荧光仪检测。

[0011] 具体操作如下:

[0012] 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。

[0013] 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,黄曲霉毒素结合量大,纯化效率高的特点。

[0014] 黄曲霉毒素免疫亲和柱及其制备方法说明如下

[0015] 1. 载体活化

[0016] 选择琼脂糖载体,sepharose4B,以环氧氯丙烷活化法进行活化。

[0017] 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。

[0018] 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NaBH₄,5毫升,在25℃下摇床反应8小时。

[0019] 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。

[0020] 2. 将蛋白G与活化载体sepharose4B的偶联

[0021] 将活化好的琼脂糖凝胶sepharose4B用偶联缓冲液(0.1M的NaHCO₃,0.8M NaCl,pH8.9)洗涤3次。加入2mg/ml的蛋白G,室温偶联4小时。

[0022] 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。

[0023] 3. 抗黄曲霉毒素抗体与蛋白G-sepharose载体上的蛋白G连接

[0024] 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。

[0025] 将抗黄曲霉毒素抗体溶于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。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。

[0026] 4. 载体交联

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] 交联后的抗体-蛋白G-sepharose载体用20mM, pH7.4的PBS洗涤3次。

[0030] 5. 装柱

[0031] 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黄曲霉毒素亲和纯化柱。层析柱的结构如附图1所示。

[0032] 本发明所述的琼脂糖凝胶包括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;所述的抗黄曲霉毒素抗体包括单克隆IgG抗体和多克隆抗体;可用于包括粮食、饲料、牛奶及乳制品、水产、血液、尿液、水中黄曲霉毒素的分离纯化。

[0033] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0034] 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,大幅度提高了黄曲霉毒素的捕捉能力,黄曲霉毒素的纯化效率也得到有效提高。

[0035] 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,进而提高了黄曲霉毒素的纯化效率。

[0036] 3)使用本发明纯化黄曲霉毒素操作简便,几步就可以得到纯度较高的黄曲霉毒素,更方便操作者使用。

[0037] 4)使用本发明得到的黄曲霉毒素纯度很高,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

[0038] 图1:黄曲霉毒素免疫亲和柱结构示意图

[0039] A:进样口;B:柱体;C:筛板;D:黄曲霉毒素抗体-蛋白G-sepharose填料

[0040] E:筛板;F:出样口

[0041] 图2:花生粕中AFT含量检测HPLC图谱

[0042] A:黄曲霉毒素B1检出峰;B:黄曲霉毒素B2检出峰;C:黄曲霉毒素G2检出峰

[0043] 实施例1:黄曲霉毒素免疫亲和纯化柱的制备

[0044] 本发明制备黄曲霉毒素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,2mg/ml的硼氢化钠NaBH₄,5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NaHCO₃,0.8M 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. 抗黄曲霉毒素IgG单抗与蛋白G-sepharose结合
- [0052] 将抗黄曲霉毒素抗体溶于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中的黄曲霉毒素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:利用黄曲霉毒素免疫亲和柱纯化和检测玉米中的黄曲霉毒素
- [0063] 1. 玉米样品处理:
- [0064] 将玉米样品粉碎,过2mm分样筛;
- [0065] ——25g过筛粉碎的样品加入125mL 2×的上样缓冲液溶液混匀;
- [0066] ——高速匀浆1min(或用摇床剧烈振荡20min),用快速定性滤纸过滤;
- [0067] ——用10mL蒸馏水稀释10mL滤液,再用微纤维滤纸过滤;
- [0068] ——取10mL上样检测。
- [0069] 2. 将黄曲霉毒素免疫亲和纯化柱室温平衡30分钟。
- [0070] 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。
- [0071] 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。
- [0072] 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。
- [0073] 6. 用蒸馏水洗涤纯化柱3次,每次5毫升。
- [0074] 7. 加入1ml甲醇,收集洗脱产物。
- [0075] 8. 洗脱产物用高效液相色谱HPLC检测。
- [0076] 9. 高效液相色谱检测结果见表1,色谱图见附图2:
- [0077] 表1花生粕中黄曲霉毒素含量HPLC检测结果

[0078]

保留时间 [min]	类型	峰面积 [LU*S]	含量/峰面积	含量 [ng/ul]	组	名称
16.133		—	—	—	—	—
19.459	G2	1.06642	1.74E-02	1.74E-02		
23.711	B2	423.42651	4.21E-03	3.56339		
29.202	B1	1046.61926	8.55E-03	17.90694		

总量:

21.50744

[0079] 从检测结果可以看出,花生粕样品经黄曲霉毒素免疫亲和柱纯化后,用高效液相色谱HPLC可以检测到3个峰,峰值分别为19.459、23.711、29.202.出峰位置分别对应黄曲霉毒素G2、B2、B1。

[0080] 结果说明这一份花生粕样品中含有黄曲霉毒素B1、B2和G1.含量分别为黄曲霉毒素G2:含量0.037ng/ul;

[0081] 黄曲霉毒素B2:含量3.56ng/ul;

[0082] 黄曲霉毒素B1:含量17.91ng/ul

[0083] 黄曲霉毒素总量:21.51ng/ul。

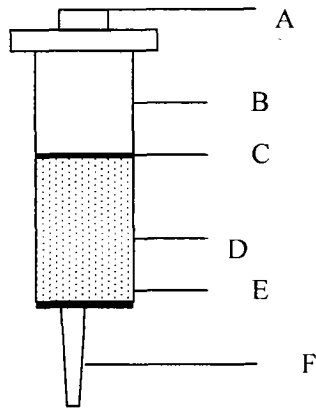


图1

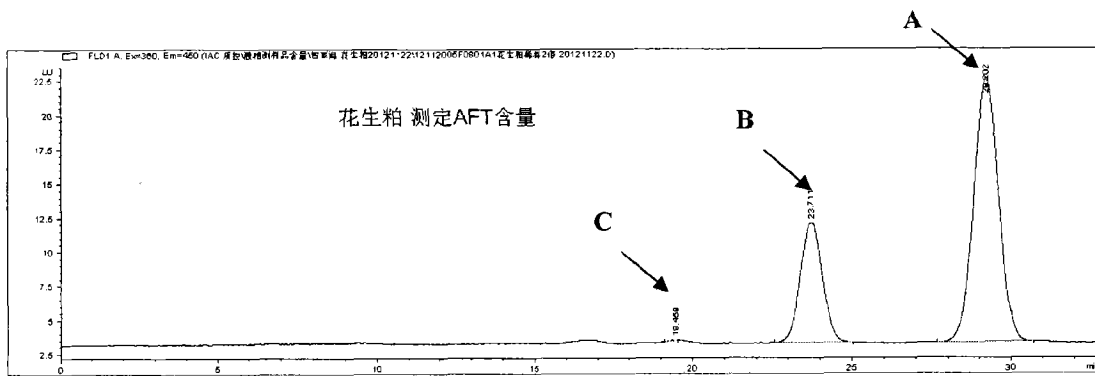


图2

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素免疫亲和柱及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN104117229B	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	CN201310153243.4	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	王莹		
发明人	王莹		
IPC分类号	G01N33/531 B01D15/38 B01J20/281 G01N1/34		
审查员(译)	江涵		
其他公开文献	CN104117229A		
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，然后用抗黄曲霉毒素的抗体与琼脂糖上的蛋白G偶联。然后再利用交联剂对黄曲霉毒素抗体-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、牛奶、血样以及其他多种样本中的黄曲霉毒素的纯化，以便于后期对样本中黄曲霉毒素的高效液相色谱(HPLC)检测和荧光检测。

