



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 204330780 U

(45) 授权公告日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201420839763. 0

(22) 申请日 2014. 12. 26

(73) 专利权人 北京康源泰博生物科技有限公司

地址 102600 北京市大兴区工业开发区科苑
路 18 号

(72) 发明人 张波 谢刚 王松雪 付晓玲
雷达 刘向阳

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

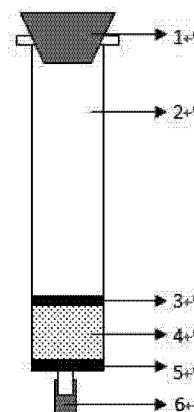
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 实用新型名称

一种黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮的复合免疫亲和柱

(57) 摘要

本实用新型涉及一种黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮的复合免疫亲和柱,由柱管、琼脂糖凝胶、筛板、上下帽组成,琼脂糖凝胶上偶联了抗黄曲霉毒素 B₁单克隆抗体和抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体,由上下各一块筛板固定在柱管底部,柱管的两端分别盖有上帽和下帽。本实用新型能够与黄曲霉毒素 B₁和玉米赤霉烯酮特异结合,可用于饲料、食品等样本中黄曲霉毒素 B₁和玉米赤霉烯酮污染检测的样本前处理,起到净化、富集作用。



1. 一种黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮的复合免疫亲和柱,由柱管、琼脂糖凝胶、筛板、上下帽组成;琼脂糖凝胶上偶联了抗黄曲霉毒素 B₁单克隆抗体和抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体,由上下各一块筛板固定在柱管底部;柱管的两端分别盖有上帽和下帽。

2. 根据权利要求 1 所述免疫亲和柱,其特征在于所述的琼脂糖凝胶为 CNBr-Sephrose 4B。

3. 根据权利要求 1 所述免疫亲和柱,其特征在于每根亲和柱所含抗黄曲霉毒素 B₁单克隆抗体和抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体分别为 0.4 mg -1mg 和 0.5 mg -2mg。

4. 根据权利要求 1 所述免疫亲和柱,其特征在于每根亲和柱所含琼脂糖凝胶为 0.3ml-0.5ml。

5. 根据权利要求 1 所述免疫亲和柱,其特征在于所述的柱管为 3ml 或 1ml 的柱管。

一种黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮的复合免疫亲和柱

技术领域

[0001] 本实用新型属于分析检测技术领域,具体涉及一种黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮的复合免疫亲和柱。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素是主要由黄曲霉和寄生曲霉等真菌产生的一类有毒次生代谢产物,迄今为止,已经发现并鉴定出包括黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ 等 17 种之多,其结构特征为都含有一个双呋喃环和一个氧杂萘邻酮。黄曲霉毒素的毒性为氰化钾的 10 倍,砒霜的 68 倍,能引起人急性中毒死亡,与人的肝癌有密切关系,能使家畜、家禽及多种实验动物诱发癌症,国际癌症中心 将其定为一类致癌剂,其中 B₁、B₂、G₁、G₂ 是最主要的毒素物质,而 AFB₁ 是目前发现的真菌类毒素中毒性最大、污染范围最广的毒素之一。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。

[0003] 玉米赤霉烯酮是一种酚的二羟基苯酸的内酯结构,主要由禾谷镰刀菌产生,粉红镰刀菌、甾珠镰刀菌、三线镰刀菌等多种镰刀菌也能产生,首先由赤霉病玉米中分离得出。玉米赤霉烯酮具有雌激素样作用,具有较强的生殖毒性和致畸作用,可引起动物发生雌激素亢进症,导致动物流产、死胎、返情等生殖异常现象,对家禽、猪、牛和羊的影响较大,给畜牧业带来很大的经济损失。2003 年止,据世界粮农组织公布已有 19 个国家制定了食物中玉米赤霉烯酮的限量标准。

[0004] 目前,真菌毒素的检测方法主要有薄层色谱法,免疫分析法及精密仪器分析法。其中,免疫分析方法主要有酶联免疫法和胶体金免疫层析法,可以对样品中的真菌毒素进行快速的定量、定性检测;精密仪器分析法主要有高效液相色谱法、超高效液相色谱法和液质联用法,可以对样品中的真菌毒素进行精确定性、定量分析,是真菌毒素检测的确认方法。但是,由于需要检测样品种类繁多,影响因素各种各样,要想使这些检测方法能够达到理想的检测效果,则需要将样品进行不同程度的前处理。

[0005] 免疫亲和柱是利用抗原抗体反应的高特异性和高亲和力,用适当的方法将特异性的抗体结合到固相载体上,以便有效的分离、纯化目标物质,具有选择性高、富集能力强等优点,用于真菌毒素检测的样本前处理,可以更好的消除影响因素,减小基质效应,减少假阳性和假阴性的出现。

实用新型内容

[0006] 本实用新型的目的在于提供一种黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮复合免疫亲和柱,用于样品中黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮检测的样品前处理方法。

[0007] 本实用新型所述的免疫亲和柱由柱管、琼脂糖凝胶、筛板、上下帽组成;琼脂糖凝胶上偶联了抗黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体和抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体,由上下各一块筛板固定在柱管底部;柱管的两端分别盖有上帽和下帽。所用琼脂糖凝胶为 CNBr-Sephrose

4B ;每根亲和柱所含抗黄曲霉毒素 B₁单克隆抗体和抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体分别为 0.4 mg -1mg 和 0.5 mg -2mg,以及含 0.3ml-0.5ml 琼脂糖凝胶 ;使用 3ml 或 1ml 的柱管。

[0008] 本实用新型所述的免疫亲和柱的制备方法,按照下述步骤进行 :

[0009] (1) 抗体预处理 :将纯化好的抗黄曲霉毒素 B₁单克隆抗体及抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体置于 pH8.3 含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃缓冲液中透析 12h ;

[0010] (2) 凝胶活化 :称取适量的 CNBr-Sepharose 4B 干粉,用 1mM 盐酸浸泡使其充分溶胀后,在砂心漏斗中用 pH8.3 含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃缓冲液快速抽洗 3 次 ;

[0011] (3) 偶联 :将活化好的凝胶加入到透析好的抗体溶液中,迅速混匀,室温下震荡充分反应 2h,在砂心漏斗抽滤中用 5 倍体积的 0.1M NaHCO₃缓冲液抽洗 ;

[0012] (4) 封闭 :将凝胶转入 5 倍体积 pH8.0 含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液中,室温下震荡充分反应 2h ;

[0013] (5) 洗涤 :用 5—10 倍凝胶体积的 pH4.0 含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸盐缓冲液和 5—10 倍凝胶体积的 pH8.0 含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液交替抽洗三次,然后用 5—10 倍凝胶体积的 pH7.3 含 0.5M NaCl 的 0.05M PBS 缓冲液抽洗三次 ;

[0014] (6) 装柱 :将偶联好的凝胶分装入 1ml 或者 3ml 的空柱中,用筛板将凝胶固定在柱的底部,并用 pH7.3 含 0.5M NaCl 的 0.05M PBS 缓冲液平衡,盖上上下帽,4℃ 保存。

[0015] 本实用新型试纸条具有如下有益效果 :

[0016] (1) 特异性好。本实用新型亲和柱使用的是分别针对黄曲霉毒素 B₁和玉米赤霉烯酮的单克隆抗体,只特异性纯化、富集黄曲霉毒素 B₁和玉米赤霉烯酮。

[0017] (2) 减少了样品前处理过程中有机化合物的使用。

[0018] (3) 可以对样品中的黄曲霉毒素 B₁和玉米赤霉烯酮同时进行纯化、富集。

附图说明

[0019] 图 1 :亲和柱结构示意图,其中 1 为上帽,2 为柱管,3、5 为筛板,4 为凝胶,6 为下帽。

图 2 :亲和柱样本纯化流程图。

具体实施方式

[0020] 1、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮复合免疫亲和柱的制备

[0021] (1) 抗体预处理 :将纯化好的抗黄曲霉毒素 B₁单克隆抗体及抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体置于 pH8.3 含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃缓冲液中透析 12h ;

[0022] (2) 凝胶活化 :称取适量的 CNBr-Sepharose 4B 干粉,用 1mM 盐酸浸泡使其充分溶胀后,在砂心漏斗中用 pH8.3 含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃缓冲液快速抽洗 3 次 ;

[0023] (3) 偶联 :将活化好的凝胶加入到透析好的抗体溶液中,迅速混匀,室温下震荡充分反应 2h,在砂心漏斗抽滤中用 5 倍体积的 0.1M NaHCO₃缓冲液抽洗 ;

[0024] (4) 封闭 :将凝胶转入 5 倍体积 pH8.0 含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液中,室温下震荡充分反应 2h ;

[0025] (5) 洗涤 :用 5—10 倍凝胶体积的 pH4.0 含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸盐缓冲液和 5—10 倍凝胶体积的 pH8.0 含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液交替抽洗三次,然后用 5—10 倍凝胶体积的 pH7.3 含 0.5M NaCl 的 0.05M PBS 缓冲液抽洗三次 ;

[0026] (6)装柱:将偶联好的凝胶分装入 1ml 或者 3ml 的空柱中,用筛板将凝胶固定在柱的底部,并用 pH7.3 含 0.5M NaCl 的 0.05M PBS 缓冲液平衡,盖上上下帽,4℃保存。

[0027] 2、黄曲霉毒素 B1、玉米赤霉烯酮复合免疫亲和柱的使用方法

[0028] (1)取 25g 粉碎的样品与 100ml 甲醇-水(7:3)溶液混合;

[0029] (2)加入 5.0g 氯化钠以均质器高速搅拌,提取 2 分钟;

[0030] (3)4000r/min 离心 5min 或用定性滤纸过滤;

[0031] (4)取 10ml 滤液并加入 40ml 水稀释,用玻璃微纤维滤纸过滤;

[0032] (5)取 20ml (4)步滤液,以约 6ml/min 流速缓慢通过免疫亲和柱;

[0033] (6)以 10.0ml 水淋洗柱子 2 次,弃去全部流出液,并使 2ml~3ml 空气通过柱体;

[0034] (7)准确加入 1.0ml 色谱级甲醇洗脱,流速为 1 ml/min ~2ml/min,收集全部洗脱液于玻璃试管中,供检测用。

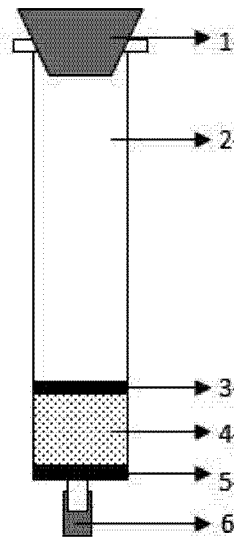


图 1

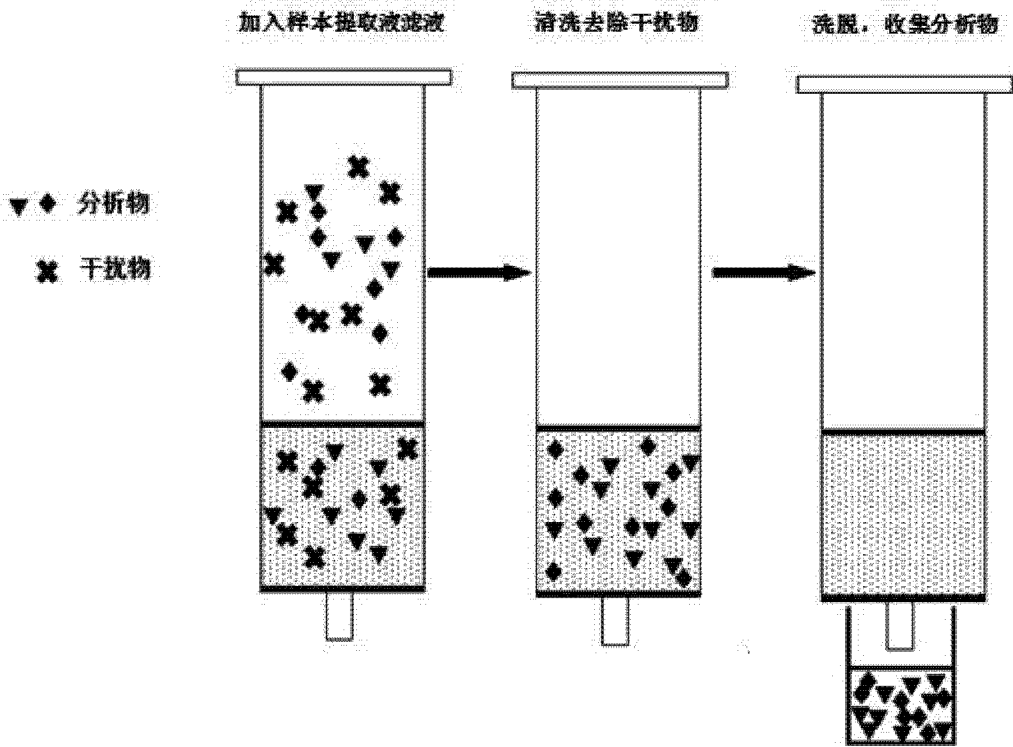


图 2

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮的复合免疫亲和柱		
公开(公告)号	CN204330780U	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	CN201420839763.0	申请日	2014-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京康源泰博生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京康源泰博生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京康源泰博生物科技有限公司		
[标]发明人	张波 谢刚 王松雪 付晓玲 雷达 刘向阳		
发明人	张波 谢刚 王松雪 付晓玲 雷达 刘向阳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮的复合免疫亲和柱，由柱管、琼脂糖凝胶、筛板、上下帽组成，琼脂糖凝胶上偶联了抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体和抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体，由上下各一块筛板固定在柱管底部，柱管的两端分别盖有上帽和下帽。本实用新型能够与黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮特异结合，可用于饲料、食品等样本中黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮污染检测的样本前处理，起到净化、富集作用。

