



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106565737 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201610875386.X

C07K 16/14(2006.01)

(22)申请日 2016.10.08

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 雷红涛 张雅琼 沈兴 陆宁
徐振林 孙远明 杨金易 肖治理

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51)Int.Cl.

C07D 493/14(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/02(2006.01)

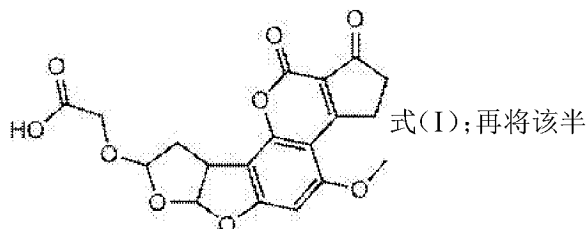
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

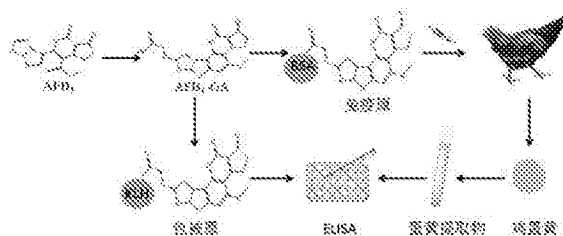
一种黄曲霉毒素B₁半抗原、人工抗原及其卵
黄抗体的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种黄曲霉毒素B₁半抗原、人
工抗原及其高灵敏度、高特异性卵黄抗体的制备
方法。本发明首先将黄曲霉毒素B₁分子上双呋喃
环中的碳碳双键进行加成反应引入游离羧基形
成黄曲霉毒素B₁半抗原,其结构式如式(I)所示:

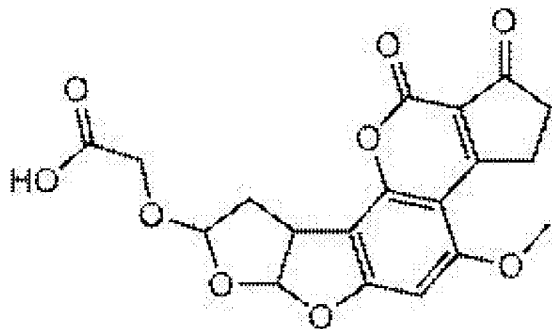


发明的抗体同时具备高灵敏、特异性的特点,具
有广阔的应用前景。



抗原与载体蛋白偶联得到黄曲霉毒素B₁人工抗
原;由该人工抗原乳化后免疫鸡,得到黄曲霉毒
素B₁卵黄抗体。所述抗体对黄曲霉毒素B₁的半抑
制浓度(IC₅₀)为4.23ng/mL,定量检测范围为
0.29~61.83ng/mL,检测限为0.06ng/mL,且该抗
体对AFB₂、AFG₁和AFG₂的交叉反应率均低于1%。本

1. 一种黄曲霉毒素B₁半抗原,其特征在于,其结构式如式(I)所示:



式(I)。

2. 权利要求1所述黄曲霉毒素B₁半抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将黄曲霉毒素B₁溶解于乙腈后,与乙醇酸和三氟乙酸进行反应,反应产物经乙酸乙酯和饱和食盐水萃取后,用无水硫酸钠干燥,最后液相纯化得到黄曲霉毒素B₁半抗原。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述液相纯化的流动相为乙腈和水,或流动相为0.1% 乙酸,柱温35℃,流速1 mL/min。

4. 一种黄曲霉毒素B₁人工抗原,其特征在于,是由权利要求1所述黄曲霉毒素B₁半抗原经活泼酯法和载体蛋白偶联得到。

5. 根据权利要求4所述的黄曲霉毒素B₁人工抗原,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清蛋白或钥孔血蓝蛋白。

6. 一种黄曲霉毒素B₁卵黄抗体的制备方法,其特征在于,将权利要求4所述黄曲霉毒素B₁人工抗原乳化后免疫鸡,得到黄曲霉毒素B₁卵黄抗体。

7. 根据权利要求6所述黄曲霉毒素B₁卵黄抗体的制备方法,其特征在于,免疫鸡后,采用盐析法分离纯化鸡蛋蛋液得到黄曲霉毒素B₁卵黄抗体。

8. 权利要求6或7所述方法制备得到的黄曲霉毒素B₁卵黄抗体。

9. 一种检测黄曲霉毒素B₁的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含有权利要求8所述的黄曲霉毒素B₁卵黄抗体。

10. 权利要求8所述黄曲霉毒素B₁卵黄抗体或权利要求9所述试剂盒在黄曲霉毒素B₁的免疫检测中的应用。

一种黄曲霉毒素B₁半抗原、人工抗原及其卵黄抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,具体地,涉及一种新型黄曲霉毒素B₁半抗原、人工抗原及其高灵敏度、高特异性卵黄抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素是一种重要的真菌毒素,主要由产毒黄曲霉和寄生曲霉等霉菌产生。它在农产品和食品中分布极为广泛,尤其是以花生、玉米及其制品为主。黄曲霉毒素是一种毒性极强的物质,是目前发现的最强的致癌物质,在1993年黄曲霉毒素被世界卫生组织(WTO)的癌症研究机构划定为I类致癌物,主要诱发肝癌。黄曲霉毒素主要有黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁和G₂,其中黄曲霉毒素B₁占70%以上,黄曲霉毒素B₁(AFB₁)由于分子量过小无免疫活性,必须连接蛋白分子才可以引起机体免疫应答,因此获得可靠的黄曲霉毒素人工抗原制备方法是十分必要的。

[0003] 目前,黄曲霉毒素的检测方法主要有薄层色谱(Thin Layer chromatography, TLC)、高效液相色谱(High performance Liquid chromatography, HPLC)、气相色谱(Gas chromatography, GC)、质谱(Mass Sepectrum, MS)以及高效液相-质谱联用(High performance Liquid chromatography-Mass sepectrum, HPLC-MS)等方法。这些方法虽然准确度高,但仪器设备昂贵、样品前处理复杂繁琐、检测成本高且需要专业人员操作。而免疫检测方法具备快速、灵敏、准确、操作简便等特点,且对样品纯度要求不高,特别适用于大批量样品的检测。

[0004] 卵黄抗体,是指从免疫禽蛋中提取出的针对特定抗原的抗体,又称其为卵黄免疫球蛋白(EggYolk Immunoglobulins),简称IgY。所得抗体可以用来特异性进行微量小分子毒性物质检测。较哺乳动物抗体IgG的优势在于:产量上,IgG和IgY分别为15 g/只和150 mg/只,可见IgY抗体的产量显著高于IgG;IgY在蛋黄中,显然较IgG更加易于分离提取,而且不必要对动物进行取血提纯抗体;IgY抗体更加稳定,而且已经被用于检测多种细菌和蛋白;IgY具有无毒、无残留、不产生抗药性等优点,是一种颇具潜力的抗生素替代品;IgY不激活补体,不与Fc受体和人类风湿因子结合,可与哺乳动物抗原上更多表位发生反应,因此提高了检测的特异性和灵敏度;IgY制备成本低、产出率高、提纯简便快捷,并具有耐热、稳定性好,免疫后高效价稳定周期长等优点。

[0005] 目前IgY技术在小分子物质免疫检测上已见报道量极少。李培武等人制备了杂交瘤细胞分泌黄曲霉毒素B₁单克隆抗体对AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂的交叉反应率均在65.2%-100%之间;陈福生等人制备了黄曲霉毒素B₁-IgY抗体,使用脲化法合成黄曲霉毒素B₁半抗原后免疫鸡得到IgY抗体,但其检测限为6 ng/mL,且与AFB₁的其他结构类似物AFB₂、AFG₁和AFG₂均有较高的交叉反应率。这些已有方法制备的黄曲霉毒素B₁抗体特异性较差,普遍对其他黄曲霉毒素有较强的交叉反应,在专一检测黄曲霉毒素B₁时会造成假阳性,且黄曲霉毒素B₁-IgY抗体的检测限较高。因此,迫切需要建立一种高灵敏、能专一检测黄曲霉毒素B₁的方法。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术中缺乏能够高灵敏和高特异性检测黄曲霉毒素B₁的IgY抗体的技术缺陷和不足,提供一种新型黄曲霉毒素B₁半抗原及人工抗原,采用该新型人工抗原制备得到的卵黄抗体(AFB₁-IgY抗体)同时具有高灵敏度和特异性的特性,为建立特异性黄曲霉毒素B₁的免疫检测方法提供了核心原材料,具有广阔的发展前景。

[0007] 本发明的目的是提供一种新型黄曲霉毒素B₁半抗原及其制备方法。

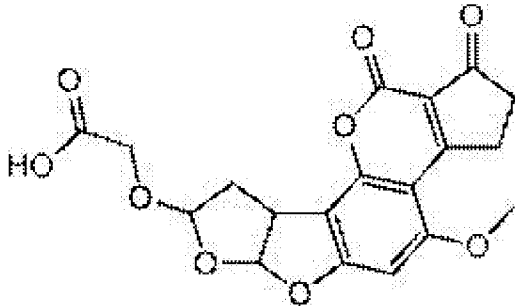
[0008] 本发明的另一个目的是提供一种黄曲霉毒素B₁人工抗原及其制备方法。

[0009] 本发明的再一目的是提供一种黄曲霉毒素B₁卵黄抗体及其制备方法。

[0010] 本发明的再一目的是提供一种检测黄曲霉毒素B₁的试剂盒。

[0011] 本发明的上述目的是通过以下技术方案给予实现的。

[0012] 一种黄曲霉毒素B₁半抗原,其结构式如式(I)所示:



式(I)。

[0013] 所述黄曲霉毒素B₁半抗原采用系统命名法命名为:2-((4-甲氧基-1,11-双氧-2,3,6a,8,9,9a,10,11-顺式环戊二烯并[5,6]甲萘酚[2,1-b]呋喃并[3,2-d]呋喃-8-基)氧)乙酸(即:2-((4-methoxy-1,11-dioxo-2,3,6a,8,9,9a,10,11-octahydro-1H-cyclopenta[5,6]naphtho[2,1-b]furo[3,2-d]furan-8-yl)oxy)acetic acid)。

[0014] 进一步地,所述黄曲霉毒素B₁半抗原的制备方法,包括如下步骤:将黄曲霉毒素B₁溶解于乙腈后,与乙醇酸和三氟乙酸进行反应,反应产物经乙酸乙酯和饱和食盐水萃取后,用无水硫酸钠干燥,最后液相纯化得到黄曲霉毒素B₁半抗原。

[0015] 其中,优选地,所述液相纯化的流动相为乙腈和水,或流动相为0.1%乙酸,柱温35℃,流速1 mL/min。更具体地,作为一种优选的实施方式,所述黄曲霉毒素B₁半抗原的具体制备方法包括以下步骤:

(1) 黄曲霉毒素B₁(AFB₁)溶解于乙腈后,与乙醇酸和三氟乙酸进行反应,反应产物用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取两次后,向乙酸乙酯相中加入无水硫酸钠干燥;

(2) 将液体真空旋转蒸干后,用液相纯化产物,流动相为乙腈(0.1%乙酸)和水(0.1%乙酸),柱温35℃,流速1 mL/min,收集目标峰并冻干后,进行¹H-NMR和质谱鉴定,确定最终产物。

[0016] 其中,优选地,所述黄曲霉毒素B₁和乙腈4 mL的质量体积比为:2~5mg:1mL。

[0017] 更优选地,所述黄曲霉毒素B₁和乙腈4 mL的质量体积比为:3mg:1mL。

[0018] 优选地,所述乙醇酸和三氟乙酸的质量体积比为:1g:3~6mL。

- [0019] 更优选地,所述乙醇酸和三氟乙酸的质量体积比为:1g:5mL。
- [0020] 优选地,乙醇酸和黄曲霉毒素B₁的质量比为1:10~15。
- [0021] 更优选地,乙醇酸和黄曲霉毒素B₁的质量比为1:12。
- [0022] 另外,由上述黄曲霉毒素B₁半抗原经活泼酯法和载体蛋白偶联得到的黄曲霉毒素B₁人工抗原也在本发明的保护范围之内。
- [0023] 优选地,所述载体蛋白为牛血清蛋白或钥孔血蓝蛋白等。
- [0024] 优选地,所述黄曲霉毒素B₁人工抗原的制备方法,包括如下步骤:将式(I)所示的黄曲霉毒素B₁半抗原经活泼酯法与载体蛋白偶联,透析后获得黄曲霉毒素B₁人工抗原。
- [0025] 一种黄曲霉毒素B₁卵黄抗体的制备方法,将上述黄曲霉毒素B₁人工抗原乳化后免疫鸡,收集鸡蛋,采用盐析法分离纯化鸡蛋蛋液得到黄曲霉毒素B₁卵黄抗体。
- [0026] 优选地,所述盐析法为硫酸铵沉淀法。
- [0027] 作为优选的实施方式,所述新型黄曲霉毒素B₁卵黄抗体的具体制备方法包括以下步骤:
- (1) 首先用黄曲霉毒素B₁人工抗原(1mg/mL) 300 μL,按体积比1:1与弗式完全佐剂乳化,免疫产蛋鸡,之后将等体积的AFB₁-GA-BSA与弗式不完全佐剂乳化,每隔三周加强免疫一次,共加强免疫三次;
 - (2) 首次免疫后当天开始收集鸡蛋,标记后4℃保存备用;
 - (3) 鸡蛋洗净后用75%酒精棉擦拭蛋壳,去蛋壳,去蛋清,用针头将蛋黄膜轻轻挑破,流出的卵黄液用0.06 mol/L的NaAc按1:9体积稀释,边搅拌边加入终浓度为8%的辛酸,室温放置20 min,8000 r/min离心20 min,过滤去沉淀,获得去脂的卵黄水溶提取物(WSF);
 - (4) 再加入40%的饱和硫酸铵溶液,室温放置20 min,12000 r/min离心20 min,分离上清及沉淀,所得沉淀即为黄曲霉毒素B₁-IgY抗体。
- [0028] 由上述方法制备得到的黄曲霉毒素B₁卵黄抗体也在本发明的保护范围之内。
- [0029] 一种检测黄曲霉毒素B₁的试剂盒,所述试剂盒包含有上述黄曲霉毒素B₁卵黄抗体。
- [0030] 另外,上述黄曲霉毒素B₁卵黄抗体或试剂盒在黄曲霉毒素免疫检测方面的应用亦在本发明的保护范围内。
- [0031] 本发明与现有技术相比,具有以下有益效果:
- (1) 本发明设计了一种新型半抗原结构,且半抗原制备方法简单;
 - (2) 本发明得到的黄曲霉毒素B₁-IgY抗体药物半抑制浓度(IC₅₀)为4.23 ng/mL,定量检测范围为0.29~61.83 ng/mL,检测限为0.06 ng/mL,且对AFB₂、AFG₁和AFG₂的交叉反应率均低于1%;
 - (3) 本发明制得的黄曲霉毒素B₁-IgY抗体灵敏度高,特异性好,为建立特异性黄曲霉毒素B₁的免疫检测方法提供了核心原材料,具有广阔的发展前景。

附图说明

- [0032] 图1为黄曲霉毒素B₁-IgY抗体制备流程图。
- [0033] 图2为黄曲霉毒素B₁半抗原合成过程示意图。
- [0034] 图3为黄曲霉毒素B₁人工抗原紫外扫描鉴定曲线。
- [0035] 图4为黄曲霉毒素B₁-IgY抗体间接竞争ELISA标准曲线。

具体实施方式

[0036] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0037] 以下实施例包括黄曲霉毒素B₁半抗原、黄曲霉毒素B₁人工抗原的合成以及黄曲霉毒素B₁-1gY抗体的制备,流程如图1所示。

[0038] 实施例1 黄曲霉毒素B₁半抗原的合成与鉴定

1、黄曲霉毒素B₁半抗原的合成

(1) 向反应的圆底瓶中加入乙醇酸1g,充入氮气保护,加入三氟乙酸5 mL,吸取乙腈4 mL,称取黄曲霉毒素B₁(AFB₁) 12 mg完全溶解于乙腈中,加入到圆底烧瓶中,反应式如图2所示,用TLC监控至反应完毕,用乙酸乙酯和饱和氯化钠分别萃取两次后,向乙酸乙酯相中加入无水硫酸钠干燥;

(2) 将液体真空旋转蒸干后,用液相纯化产物,流动相为乙腈(0.1%乙酸)和水(0.1%乙酸),柱温35℃,流速1 mL/min,收集目标峰并冻干后,进行¹H-NMR和质谱鉴定,确定最终产物,记为黄曲霉毒素B₁半抗原AFB₁-GA。

[0039] 2、鉴定:

取黄曲霉毒素B₁的标准品进行核磁鉴定谱图,取黄曲霉毒素B₁半抗原AFB₁-GA进行氢谱鉴定和质谱鉴定谱图。

[0040] 氢谱结果如下:¹H-NMR(600 MHz,CD₃OD)

Δ_{ppm} 6.54 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.47 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 4.16 (dd, $J=9.0, 6.0\text{Hz}$, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.93 (d, $J=16.2\text{Hz}$, 1H), 3.77 (d, $J=16.2\text{Hz}$, 1H), 3.42-3.46 (m, 2H), 2.59-2.63 (m, 2H), 2.52 (d, $J=13.2\text{Hz}$, 1H), 2.34-2.44 (m, 1H)。

[0041] 质谱结果如下:MS: C₁₉H₁₆O₉:388,ESI⁻ [M-H]⁻:387。

[0042] 两者结果皆表明衍生位点正确且成功。成功合成得到黄曲霉毒素B₁半抗原(AFB₁-GA)。

[0043] 实施例2 黄曲霉毒素B₁人工抗原的合成与鉴定

1、黄曲霉毒素B₁人工抗原的合成

(1) 称取AFB₁-GA半抗原3 mg,2 mg的NHS 和3 mg的EDC 溶解于100uL DMF中,搅拌过夜;

(2) 称取9.4 mg 牛血清蛋白(BSA)加入到1 mL的PBS缓冲液中;

(3) 将步骤(1)所得溶液逐滴缓慢加入到步骤(2)所得溶液中,搅拌8 h;

(4) 用PBS缓冲液透析两天,每天4次,透析结束后得到黄曲霉毒素B₁-GA -BSA人工抗原(AFB₁-GA-BSA)。

[0044] 其中,磷酸盐缓冲溶液的配方:Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.90 g,NaCl 8.50 g,KCl 0.20 g,KH₂PO₄ 0.20 g,加蒸馏水定容至1000 mL。

[0045] 同理,采用钥孔血蓝蛋白(KLH)替换BSA作为载体蛋白,得到目的产物黄曲霉毒素B₁-GA -KLH,过程与制备黄曲霉毒素B₁-GA -BSA人工抗原相同。

[0046] 2、鉴定：

取黄曲霉毒素B₁人工抗原,进行紫外全波长扫描,结果如图3所示。

[0047] BSA、KLH、人工抗原分别进行紫外(200~400 nm)扫描鉴定,比较偶联前后的各物质的最高吸光值,黄曲霉毒素B₁人工抗原的吸收曲线与载体蛋白明显不同,且在365 nm处出现黄曲霉毒素B₁的特征吸收峰,故黄曲霉毒素B₁人工抗原的曲线是两者的累加吸收特征,说明黄曲霉毒素B₁半抗原与BSA成功偶联制得人工抗原。

[0048] 实施例3 黄曲霉毒素B₁-1gY抗体的制备

黄曲霉毒素B₁-1gY抗体的制备方法如下：

(1)用3只20周大的产蛋鸡进行免疫,人工抗原为AFB₁-GA-BSA(1 mg/mL) 300 μL,初次免疫时将AFB₁-GA-BSA按体积比1:1与弗式完全佐剂乳化,免疫鸡。之后将AFB₁-GA-BSA按体积比1:1与弗式不完全佐剂乳化,每隔三周进行一次加强免疫,共加强免疫三次；

(2)首次免疫后当天开始收集鸡蛋,标记后4℃保存备用；

(3)取保存的鸡蛋洗净后用75%酒精棉擦拭鸡蛋外壳,去蛋壳后用卵黄分离器尽量去除蛋清,将蛋黄倒进量筒中,测量体积并记录,将蛋黄倒出置于滤纸上,滚动,去除粘附与蛋黄表面的蛋清。用针头将蛋黄膜轻轻挑破,蛋黄流出至量筒中,蛋黄膜则粘于滤纸表面,放入搅拌子,于磁力搅拌器上搅拌,卵黄液(约10 mL/枚)用卵黄稀释液0.06 M的醋酸钠(pH=5.0)按1:9体积稀释。将蛋黄倒进量筒中,测量体积并记录。

[0049] (4)边搅拌边加入终浓度为8%的辛酸,室温放置20 min,之后8000 r/min离心20 min,用定性滤纸过滤除去沉淀,获得去脂的卵黄水溶提取物(WSF)；

(5)再加入终浓度为40%的饱和硫酸铵溶液,室温放置20 min,12000 r/min离心20 min,分离上清及沉淀,所得沉淀为黄曲霉毒素B₁-1gY抗体。

[0050] 实施例4 黄曲霉毒素B₁-1gY抗体的ELISA检测**1、ELISA检测**

(1)将蛋黄提取物用PBST稀释为1:6400,同时设置空白对照孔(未加入蛋黄提取物1g Y,用PBST代替)；

(2)将黄曲霉毒素B₁人工抗原用包被液稀释至1 μg/mL的浓度,包被96孔酶标板,每孔加入100 μL,37℃温育过夜,弃去包被液,洗涤2次；

(3)每孔加入120 μL封闭液(5%脱脂奶粉),37℃封闭30 min,弃去封闭液,拍板,37℃烘干备用；

(4)用PBST500倍稀释蛋黄提取物,并将黄曲霉毒素B₁稀释至1000,200,40,8,1.6,0.32,0.064 ng/mL；

(5)每行加50 μL黄曲霉毒素B₁稀释液(三组平行),再加50 μL蛋黄提取物稀释液/孔,在37℃温育40 min,洗涤5次；

(6)加入羊抗鸡二抗1gY-HRP(5000倍稀释),37℃温育30 min,洗涤5次,拍板；

(7)加入显色液显色10 min；

(8)加入50 μL10% H₂SO₄终止反应,并在450 nm处读取OD值；

(9)将上述药物AFB₁换成AFB₂、AFG₁和AFG₂,并以同样的稀释倍数进行上述试验,测定该抗体对黄曲霉毒素其他结构类似物的交叉反应率。

[0051] 2、结果,黄曲霉毒素B₁-1gY抗体间接竞争ELISA标准曲线如图4所示。

[0052] 所述黄曲霉毒素B₁-1gY抗体对AFB₁的半抑制浓度(1C₅₀)为4.23 ng/mL,定量检测线性范围(1C₂₀~1C₈₀)为0.29~61.83 ng/mL,最低检测限为0.06 ng/mL,且对AFB₂、AFG₁和AFG₂的交叉反应率均低于1%。

[0053] 本法所得黄曲霉毒素B₁-1gY抗体可以满足检测要求,且对黄曲霉毒素B₁同时具备高灵敏度和高特异性识别能力。

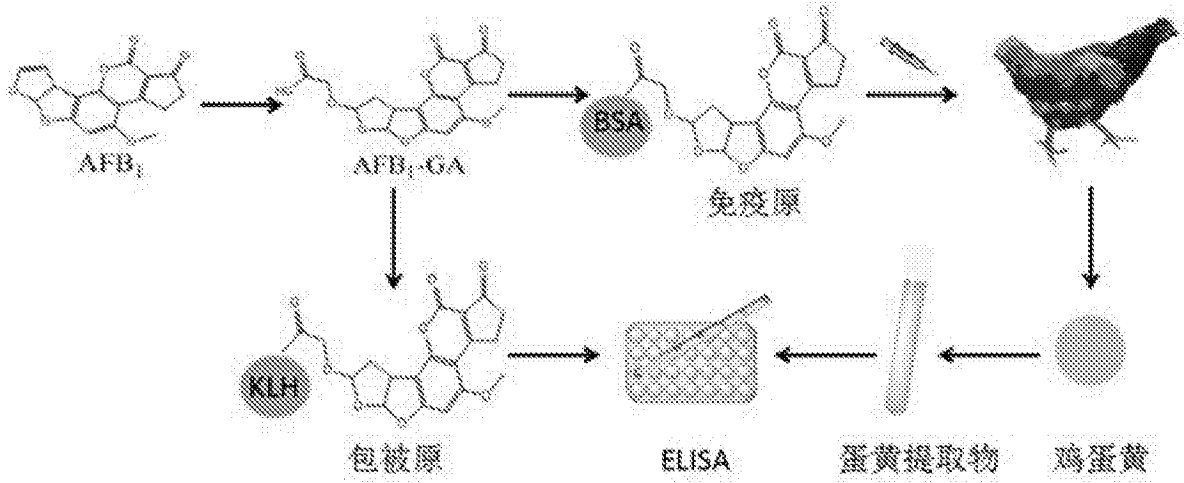


图1

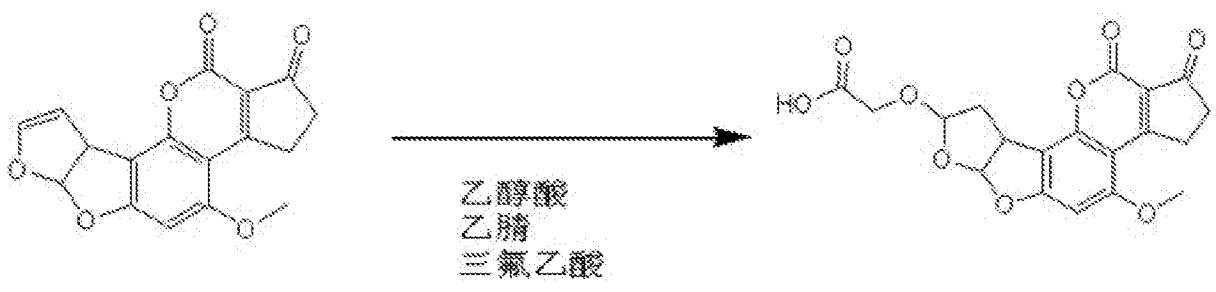


图2

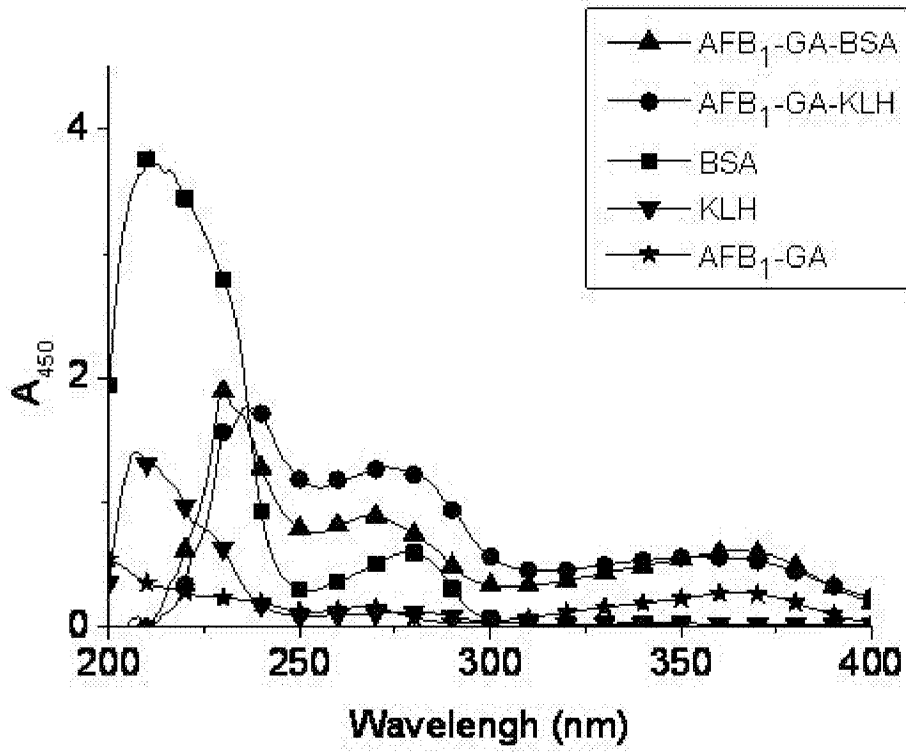


图3

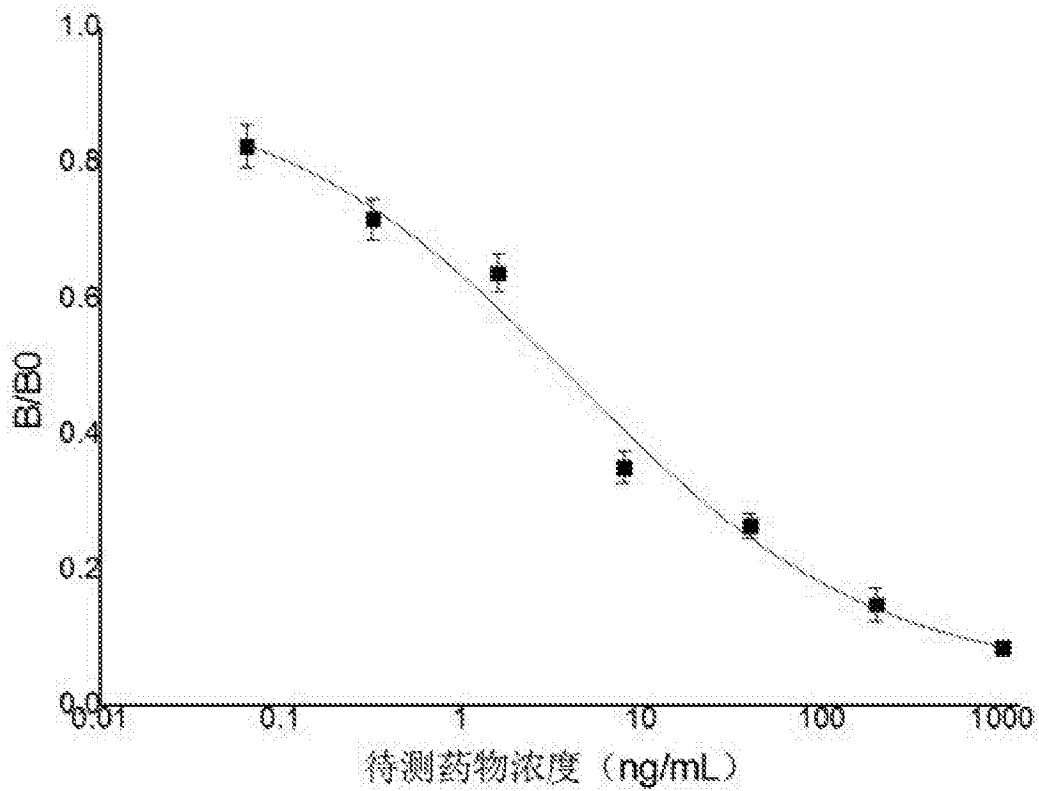


图4

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素B1半抗原、人工抗原及其卵黄抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN106565737A	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201610875386.X	申请日	2016-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	雷红涛 张雅琼 沈兴 陆宁 徐振林 孙远明 杨金易 肖治理		
发明人	雷红涛 张雅琼 沈兴 陆宁 徐振林 孙远明 杨金易 肖治理		
IPC分类号	C07D493/14 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/02 C07K16/14 G01N33/53		
CPC分类号	C07D493/14 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/02 C07K16/14 G01N33/53		
代理人(译)	林丽明		
其他公开文献	CN106565737B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种黄曲霉毒素B1半抗原、人工抗原及其高灵敏度、高特异性卵黄抗体的制备方法。本发明首先将黄曲霉毒素B1分子上双呋喃环中的碳碳双键进行加成反应引入游离羧基形成黄曲霉毒素B1半抗原，其结构式如式(1)所示：式(1)；再将该半抗原与载体蛋白偶联得到黄曲霉毒素B1人工抗原；由该人工抗原乳化后免疫鸡，得到黄曲霉毒素B1卵黄抗体。所述抗体对黄曲霉毒素B1的半抑制浓度(IC50)为4.23ng/mL，定量检测范围为0.29~61.83ng/mL，检测限为0.06ng/mL，且该抗体对AFB2、AFG1和AFG2的交叉反应率均低于1%。本发明的抗体同时具备高灵敏、特异性的特点，具有广阔的应用前景。

