

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105301254 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201510671374. 0

(22) 申请日 2015. 12. 22

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 罗晓琴 曹东山 赵正苗 贾芳芳
魏力杰 朱亮亮 何方洋 冯月君

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

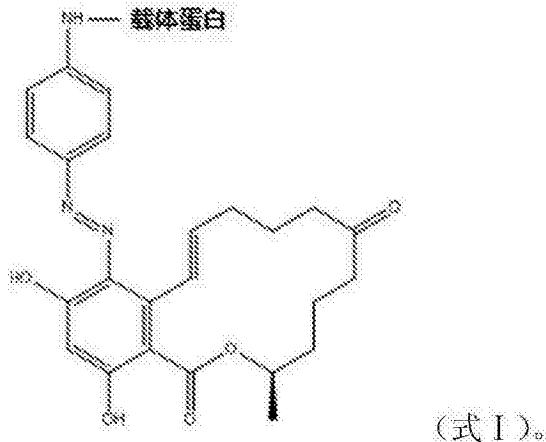
(54) 发明名称

一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠
及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠及其制备方法和应用,它是以羧基磁珠为载体,玉米赤霉烯酮单克隆抗体为识别中间体,经过活化-偶联-洗涤-封闭的过程制备出偶联有玉米赤霉烯酮单克隆抗体的免疫磁珠,在合适的缓冲液中于一定条件下孵育可以高效捕捉、富集检测样本中的玉米赤霉烯酮。本发明用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠具有浓缩待测样品中玉米赤霉烯酮浓度、提高检测下限、排除杂质干扰、提高检测准确性和可靠性、减少样品处理时间达到快速检测的优点。

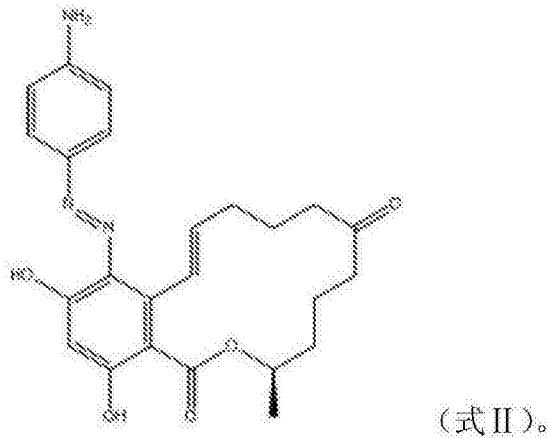
1. 一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠, 其特征在于: 所述免疫磁珠上偶联有玉米赤霉烯酮单克隆抗体; 所述玉米赤霉烯酮单克隆抗体是用玉米赤霉烯酮人工抗原免疫白鼠所得到的; 所述玉米赤霉烯酮人工抗原是玉米赤霉烯酮半抗原与载体蛋白的偶联物, 其分子结构式如式 I 所示:



2. 根据权利要求 1 所述的免疫磁珠, 其特征在于: 所述玉米赤霉烯酮人工抗原是按照如下方法制备得到的:

取半抗原 20mg 用 2ml 水溶解, 得到溶液 A, 取戊二醛 50 μl 逐滴加入到溶液 A 中, 室温搅拌反应 24h。取 BSA 50mg 用 4ml 水溶解, 得到溶液 B, 将溶液 A 缓慢加入到溶液 B 中, 室温搅拌反应过夜。加入 NaBH 430mg 还原, 用 0.02mol/L 的 PBS 透析三天, 每天更换透析液三次, 得到所述玉米赤霉烯酮人工抗原;

所述玉米赤霉烯酮半抗原的分子结构式如式 II 所示:



3. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫磁珠, 其特征在于: 所述玉米赤霉烯酮半抗原是按照如下方法制备得到的: 110mg 对苯二胺, 溶入 15ml 0.2mol/L 的 HCl 水溶液中, 0~4°C 下滴加 70mg NaNO₂ 的 2ml 水溶液, 避光反应 0.5~1 小时, 然后缓慢滴加 110mg 玉米赤霉烯酮在 2ml 0.5mol/L 醋酸钠水溶液中的混合物。避光反应 1~3 小时。加入适量浓盐酸酸化, 产生沉淀, 离心, 水洗, 乙酸乙酯提取, 除去溶剂后得到玉米赤霉烯酮的偶氮衍生物, 得到玉米赤霉烯酮半抗原, 得率 65%。

4. 一种权利要求 1 所述免疫磁珠的制备方法, 其特征在于: 以粒径 2.8 μm 的羧基磁珠为载体, 羧基磁珠末端具有反应活性的羧基基团, 在经活化剂 EDC-NHS 组合处理后, 活化磁珠可与玉米赤霉烯酮单克隆抗体进行偶联, 制备成能够富集净化玉米赤霉烯酮的免疫磁

珠。

5. 根据权利要求 4 所述免疫磁珠的制备方法, 其特征在于 : 具体包括如下步骤 :

(1) 清洗 : 取 100 μ L 羧基磁珠于离心管中, 用 100 μ L 含 0.05% 吐温 -20 的 pH5.0、25mmol/L 的 MES 溶液洗涤 2 次, 磁分离后移除上清 ;

(2) 活化 : 用 4℃ 贮存的 pH5.0、25mmol/L MES 溶液分别配制 50mmol/L 的 EDC、NHS 溶液 ; 分别加入 50 μ L 新配制的 EDC 和 NHS 溶液到装有磁珠的离心管中, 涡旋混匀, 室温活化 30min, 磁分离后移除上清, 同 (1) MES 溶液洗涤 2-3 次 ;

(3) 偶联 : 将玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶解到 60 μ L pH5.0、25mmol/L MES 溶液中, 用所述 MES 溶液调节总体积至 100 μ L, 轻柔加入到已活化磁珠中, 室温偶联 30min 或 4℃ 偶联 2h, 期间使磁珠保持混匀状态 ;

(4) 封闭 : 磁分离后移除上清, 加入 100 μ L pH7.4 的 TRIS 溶液反应 15min 封闭磁珠 ;

(5) 保存 : 磁分离后移除上清, 用 100 μ L 含 0.1% -0.3% 牛血清白蛋白、0.1% 吐温 -20 的 TRIS 溶液洗涤封闭好的磁珠 3-5 次, 磁分离后移除上清, 将磁珠复溶于含 0.1% -0.5% 牛血清白蛋白、0.01% -0.1% 吐温 -20、0.02% NaN_3 的 TRIS 溶液中, 2-8℃ 保存备用。

6. 权利要求 1 所述免疫磁珠在富集净化玉米赤霉烯酮中的应用。

一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠及其制备方法 和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及玉米赤霉烯酮样本的富集净化处理工艺,具体涉及一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 为一种白色结晶,又称 F-2 毒素,是由禾谷镰刀菌等菌种产生的有毒代谢产物。ZEN 主要污染玉米、高粱、小麦、大麦等粮谷类作物及其制品。Toshitsugu 对 19 个国家和地区的谷物、食品及饲料中所含的 ZEN 进行了调查发现,包括中国、阿根廷、加拿大、波兰及也门等众多国家和地区的样品均有不同程度的污染。借助被污染的乳制品、肉制品等动物源性食品, ZEN 及其代谢产物可以进入人体,给人类的健康造成威胁。ZEN 对动物及人类危害主要表现在影响和破坏生长发育及生殖系统方面,人畜误食含有该毒素的食物后,会引起雌性激素中毒症,造成生殖系统的严重损伤。此外, ZEN 及其衍生物对肝脏系统,免疫系统均有很大的危害,并且有引发肿瘤的可能性。Schoental R 在进行致癌试验时发现,试验组大鼠出现由致癌剂处理而诱发的肿瘤;此外,试验组和对照组大鼠还发生了乳腺纤维瘤、腺瘤、腺癌、垂体腺癌、睾丸间质肿瘤以及子宫纤维瘤等。在其他致癌试验中也有类似情况发生,这些肿瘤所涉及的器官表明,它们可能与动物饲料中的雌激素物质有关。因此认为,它们是由污染饲料的 ZEN 或其代谢产物引起的。

[0003] 目前大多数国家对食品、谷物、饲料中的玉米赤霉烯酮含量都有十分严格的规定。例如澳大利亚规定谷物中玉米赤霉烯酮的含量不能超过 0.05mg/kg;意大利规定在谷物和谷类产品中玉米赤霉烯酮的含量不能超过 0.1mg/kg;而在法国,植物油和谷类当中玉米赤霉烯酮的含量必须低于 0.2mg/kg。中国则规定小麦、玉米中的玉米赤霉烯酮含量不得超过 0.06mg/kg。

[0004] 目前食品中玉米赤霉烯酮的主要提取方法包括有机溶剂萃取法、免疫亲和层析法等。有机溶剂萃取法是目前最普遍的提取方法,但有机溶剂的萃取存在过程复杂、毒性大、所需时间长等缺点,而且由于最终提取物中可能存在其他荧光物质、色素、结构类似物,从而对检测结果产生干扰;免疫亲和层析提高了试样的净化效果,同时可显著减少有毒有害试剂的使用,但样品前处理较复杂,所用设备价格昂贵,对操作人员的技术要求也比较高,不适合于大批量样本检测及大范围推广的应用。

[0005] 免疫磁珠分离技术 (Immunomagnetic bead-based separation, IMS) 是近年来发展起来的一项新的免疫学技术。免疫磁珠 (Immunomagnetic bead, IMB) 既可结合活性蛋白质抗体,又可被磁铁吸引,经过处理后,可将抗体结合在磁珠上,使之成为抗体的载体,磁珠上抗体与特异性抗原物质结合后,则形成抗原 - 抗体 - 磁珠免疫复合物,这种复合物在磁力作用下发生力学移动,使复合物与其它物质分离,而达到分离特异性抗原的目的。免疫磁珠 (IMB) 是一个平台,凡是利用抗原抗体结合原理进行工作的领域都可以应用,并且已在医学和生物学的骨髓移植、分离干细胞、细胞器、癌细胞、激素、病原菌以及毒素等方面取得

了显著成绩。近年来 IMB 以其高度的敏感性和特异性被广泛应用于食品、水、生物样品、环境等标本中真菌毒素的分离和检测工作中,显示出良好的开发利用前景。

[0006] 在分离真菌毒素方面,IMB 可有效地收集、浓缩大量样品中的少量真菌毒素,可避免有机溶剂萃取法、免疫亲和层析法提取时存在的缺点。IMB 对目的毒素的富集具有高分离率、高特异性、高稳定性、无污染、无毒性、操作简便、样品用量少且不会破坏毒素结构等优点,与常规方法相比,不需要多加纯化步骤去除杂质,可直接对真菌毒素产生富集分离纯化的效果,并可在 2-5h 内完成。并且磁珠上偶联的抗体可准确识别真菌毒素上的特征基团,从而减少漏检,减少安全隐患。

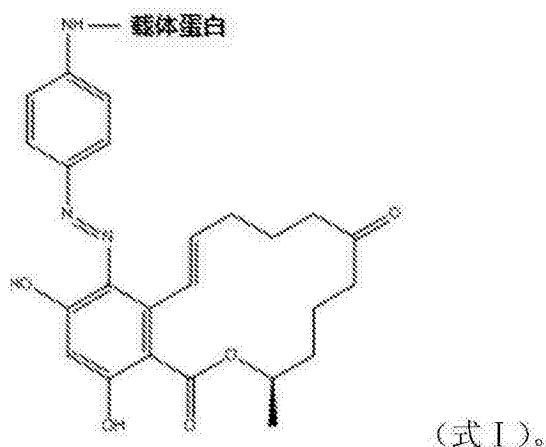
[0007] 本发明利用磁珠与抗体的偶联原理对可富集玉米赤霉烯酮的免疫磁珠的制备工艺及应用条件进行了优化,大大提高了对玉米赤霉烯酮的富集能力和检测灵敏度,同时凭借免疫磁珠自身的快速方便、价格低廉的特点,将其应用于谷物及饲料中玉米赤霉烯酮的分离与富集,可以进一步提高快速检测玉米赤霉烯酮的效率。

发明内容

[0008] 本发明的目的是为了弥补现有技术存在的不足,提供一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠及其制备方法和应用,以解决玉米赤霉烯酮样品净化分离操作复杂、分离效率低、存在较大安全隐患的技术问题。

[0009] 为实现上述发明目的,本发明采取的技术方案是:提供一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠,所述免疫磁珠上偶联有玉米赤霉烯酮单克隆抗体;所述玉米赤霉烯酮单克隆抗体是用玉米赤霉烯酮人工抗原免疫白鼠所得到的;所述玉米赤霉烯酮人工抗原是玉米赤霉烯酮半抗原与载体蛋白的偶联物,其分子结构式如式 I 所示:

[0010]



[0011] 所述玉米赤霉烯酮半抗原是按照如下方法制备得到的:

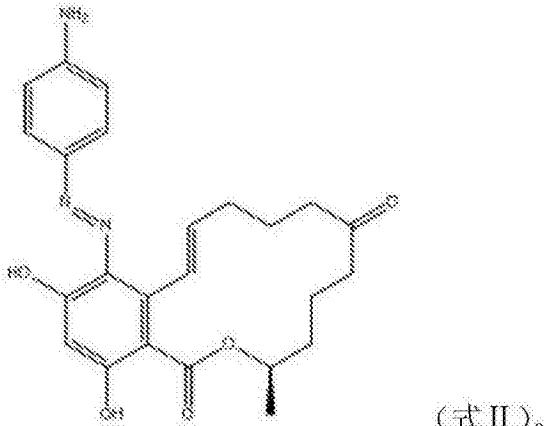
[0012] 110mg 对苯二胺,溶入 15ml 0.2mol/L 的 HCl 水溶液中,0-4℃下滴加 70mg NaNO₂ 的 2ml 水溶液,避光反应 0.5-1 小时,然后缓慢滴加 110mg 玉米赤霉烯酮在 2ml 0.5mol/L 醋酸钠水溶液中的混合物。避光反应 1-3 小时。加入适量浓盐酸酸化,产生沉淀,离心,水洗,乙酸乙酯提取,除去溶剂后得到玉米赤霉烯酮的偶氮衍生物,得到玉米赤霉烯酮半抗原,得率 65%。

[0013] 所述玉米赤霉烯酮人工抗原是按照如下方法制备得到的:

[0014] 取半抗原 20mg 用 2ml 水溶解, 得到溶液 A, 取戊二醛 50 μl 逐滴加入到溶液 A 中, 室温搅拌反应 24h。取 BSA50mg 用 4ml 水溶解, 得到溶液 B, 将溶液 A 缓慢加入到溶液 B 中, 室温搅拌反应过夜。加入 NaBH 430mg 还原, 用 0.02mol/L 的 PBS 透析三天, 每天更换透析液三次, 得到所述玉米赤霉烯酮人工抗原。

[0015] 所述玉米赤霉烯酮半抗原的分子结构式如式 II 所示:

[0016]



[0017] 本发明还提供了一种上述免疫磁珠的制备方法, 是以粒径 2.8 μm 的羧基磁珠为载体, 羧基磁珠末端具有反应活性的羧基基团, 在经活化剂 EDC-NHS 组合处理后, 活化磁珠可与玉米赤霉烯酮单克隆抗体进行偶联, 制备成能够富集净化玉米赤霉烯酮的免疫磁珠;

[0018] 上述免疫磁珠的制备方法具体描述如下:

[0019] (1) 清洗: 取 100 μL 羧基磁珠于离心管中, 用 100 μL 含 0.05% 吐温 -20 的 pH5.0、25mmol/L 的 MES 溶液洗涤 2 次, 磁分离后移除上清;

[0020] (2) 活化: 用 4℃ 贮存的 pH5.0、25mmol/L MES 溶液分别配制 50mmol/L 的 EDC、NHS 溶液; 分别加入 50 μL 新配制的 EDC 和 NHS 溶液到装有磁珠的离心管中, 涡旋混匀, 室温活化 30min, 磁分离后移除上清, 同 (1) MES 溶液洗涤 2-3 次;

[0021] (3) 偶联: 将玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶解到 60 μL pH5.0、25mmol/L MES 溶液中, 用所述 MES 溶液调节总体积至 100 μL, 轻柔加入到已活化磁珠中, 室温偶联 30min 或 4℃ 偶联 2h, 期间使磁珠保持混匀状态;

[0022] (4) 封闭: 磁分离后移除上清, 加入 100 μL pH7.4 的 TRIS 溶液反应 15min 封闭磁珠;

[0023] (5) 保存: 磁分离后移除上清, 用 100 μL 含 0.1% -0.3% 牛血清白蛋白 (BSA)、0.1% 吐温 -20 的 TRIS 溶液洗涤封闭好的磁珠 3-5 次, 磁分离后移除上清, 将磁珠复溶于含 0.1% -0.5% BSA、0.01% -0.1% 吐温 -20、0.02% NaN₃ 的 TRIS 溶液中, 2-8℃ 保存备用。

[0024] 本发明同时提供了上述免疫磁珠在富集净化玉米赤霉烯酮中的应用。

[0025] 实验证明, 本发明用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠对玉米赤霉烯酮有很高的富集率和回收率, 对玉米赤霉烯酮的富集率为 50ng/mg (每毫克免疫磁珠可以捕获 50ng 玉米赤霉烯酮), 对玉米赤霉烯酮的回收率达到 85% 以上。本发明用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠可以高效、准确、可靠、快速、简便地把待检样品中的玉米赤霉烯酮富集起来, 以便进一步应用于化学分析仪器检测 (HPLC, 高效液相色谱法)、酶联免疫吸附法检测和胶体金测试条的快速测试, 具有浓缩待测样品中玉米赤霉烯酮浓度、提高检测下限、排除

杂质干扰、提高检测准确性和可靠性、减少样品处理时间达到快速检测的优点。

附图说明

[0026] 图 1 玉米赤霉烯酮半抗原合成路线图

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明。下述实施例中所使用的实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，即为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0028] 实施例 1 用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠的制备

[0029] 本实施例给出了由玉米赤霉烯酮单克隆抗体和含羧基的免疫磁珠偶联得到的偶联物作为富集净化玉米赤霉烯酮的免疫磁珠的制备方法。该方法包括：

[0030] 一、玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备

[0031] 1、玉米赤霉烯酮半抗原的合成（合成路线见附图 1）及鉴定

[0032] 110mg 对苯二胺，溶入 15ml 0.2mol/L 的 HCl 水溶液中，0~4℃下滴加 70mg NaNO₂ 的 2ml 水溶液，避光反应 0.5~1 小时，然后缓慢滴加 110mg 玉米赤霉烯酮在 2ml 0.5mol/L 醋酸钠水溶液中的混合物。避光反应 1~3 小时。加入适量浓盐酸酸化，产生沉淀，离心，水洗，乙酸乙酯提取，除去溶剂后得到玉米赤霉烯酮的偶氮衍生物，得到玉米赤霉烯酮半抗原，得率 65%。

[0033] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定，7.5ppm 左右增加的两组芳环信号峰，说明半抗原合成成功。图谱中化学位移 δ = 11 的为羧基氢，δ = 2.71、2.59 的为巯基丙酸支链上亚甲基氢，这些化学位移的氢的吸收峰的存在证明偶联成功，玉米赤霉烯酮半抗原结构正确。

[0034] 2、玉米赤霉烯酮人工抗原的合成及鉴定

[0035] 取半抗原 20mg 用 2ml 水溶解，得到溶液 A，取戊二醛 50 μl 逐滴加入到溶液 A 中，室温搅拌反应 24h。取 BSA 50mg 用 4ml 水溶解，得到溶液 B，将溶液 A 缓慢加入到溶液 B 中，室温搅拌反应过夜。加入 NaBH4 30mg 还原，用 0.02mol/L 的 PBS 透析三天，每天更换透析液三次，得到所述玉米赤霉烯酮人工抗原，分装后 -20℃ 保存。

[0036] 按合成玉米赤霉烯酮人工抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，进行紫外（200nm ~ 400nm）扫描测定，通过比较三者分别在 260nm 和 280nm 的吸光值计算其结合比。偶联物玉米赤霉烯酮半抗原-BSA 的最大吸收峰与玉米赤霉烯酮半抗原、BSA 的最大吸收峰相比发生了明显的变化，表明玉米赤霉烯酮半抗原-BSA 的合成是成功的。经计算，半抗原与 BSA 的结合比为 17:1。

[0037] 3、玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备

[0038] (1) 杂交瘤细胞的获得

[0039] 1) 首次免疫：将玉米赤霉烯酮半抗原-BSA 偶联物（免疫原）与等量的弗氏完全佐剂充分乳化，皮下注射 6 周龄的 Balb/c 小鼠，每只 0.2mL；

[0040] 2) 加强免疫两次：从首次免疫开始，每两周加强免疫一次，用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂，方法和剂量同首次免疫；

[0041] 3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫:腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1mL,三天后处死小鼠,取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

[0042] 4) 采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立稳定分泌玉米赤霉烯酮单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

[0043] (2) 单克隆抗体的制备

[0044] 1) 细胞复苏:取出玉米赤霉烯酮单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

[0045] 2) 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0046] (3) 单克隆抗体效价的测定

[0047] 用竞争ELISA法测定抗体的效价为1:(100000~150000)。

[0048] 竞争ELISA方法:用玉米赤霉烯酮人工抗原包被酶标板,加入玉米赤霉烯酮标准品溶液、辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体,25℃反应10min,倒出孔内液体,用PBST洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃反应5min后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长450nm处测定每孔吸光度值。

[0049] (4) 单克隆抗体特异性的测定

[0050] 抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。1

[0051] 本实验将玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素M1、T-2毒素、赭曲霉毒素A、展青霉素做系列稀释,分别与单克隆抗体进行竞争ELISA,制作标准曲线,分析得到IC₅₀,然后按下式计算交叉反应率:

[0052]

$$\text{交叉反应率} (\%) = \frac{\text{引起 } 50\% \text{ 抑制的玉米赤霉烯酮浓度}}{\text{引起 } 50\% \text{ 抑制的其他真菌毒素浓度}} \times 100\%$$

[0053] 结果显示各类似物的交叉反应率为:玉米赤霉烯酮100%、黄曲霉毒素B1<1%、黄曲霉毒素M1<1%、T-2毒素<1%、赭曲霉毒素A<1%、展青霉素<1%。本发明抗体对黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素M1、T-2毒素、赭曲霉毒素A、展青霉素等其他真菌毒素无交叉反应,只针对玉米赤霉烯酮有特异性结合。

[0054] 二、免疫磁珠的制备

[0055] 该过程以粒径2.8μm的羧基磁珠为载体,羧基磁珠末端具有反应活性的羧基基团,在经活化剂EDC-NHS组合处理后,活化磁珠可与玉米赤霉烯酮单克隆抗体进行偶联,制备成能够富集净化玉米赤霉烯酮的免疫磁珠。具体步骤如下:

[0056] (1) 清洗:取100μL羧基磁珠(购于DYNAL,粒径为2.8μm,含量是0.15eq/g)于离心管中,用100μL含0.05%吐温-20的pH5.0、25mmol/L的MES溶液洗涤2次,磁分离后移除上清;

[0057] (2) 活化 :用 4℃ 贮存的 pH5.0、25mmol/L MES 溶液分别配制 50mmol/L 的 EDC、NHS 溶液 ; 分别加入 50 μL 新配制的 EDC 和 NHS 溶液到装有磁珠的离心管中, 涡旋混匀, 室温活化 30min, 磁分离后移除上清, 同 (1)MES 溶液洗涤 2-3 次 ;

[0058] (3) 偶联 : 将玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶解到 60 μL pH5.0、25mmol/L MES 溶液中, 用所述 MES 溶液调节总体积至 100 μL, 轻柔加入到已活化磁珠中, 室温偶联 30min 或 4℃ 偶联 2h, 期间使磁珠保持混匀状态 ;

[0059] (4) 封闭 : 磁分离后移除上清, 加入 100 μL pH7.4 的 TRIS 溶液反应 15min 封闭磁珠 ;

[0060] (5) 保存 : 磁分离后移除上清, 用 100 μL 含 0.1% -0.3% BSA、0.1% 吐温 -20 的 TRIS 溶液洗涤封闭好的磁珠 3-5 次, 磁分离后移除上清, 将磁珠复溶于含 0.1% -0.5% BSA、0.01% -0.1% 吐温 -20、0.02% NaN₃ 的 TRIS 溶液中 (浓度为 10mg/mL), 2-8℃ 保存备用。

[0061] 实施例 2 免疫磁珠的特性检测

[0062] 取按照实施例 1 制备的富集玉米赤霉烯酮的免疫磁珠 0.1mL (浓度为 10mg/mL) 于 10mL 离心管中, 用 5mL 去离子水润洗磁珠 2 次, 磁分离后移除上清 ; 然后加入 1mL 待测样品 (将玉米赤霉烯酮标准品用 PBS 缓冲液分别配制成浓度为 10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL 的玉米赤霉烯酮溶液作为待测样品, 并以 PBS 缓冲液作为空白待测样品), 混匀, 25℃ 捕获 20min, 期间 5min 混匀一下磁珠 ; 磁分离后移除上清, 用 5mL 去离子水润洗磁珠 2 次, 除去干扰杂质。最后加入 1mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 用 HPLC 法按照 “GB/T 28716-2012 饲料中玉米赤霉烯酮的测定免疫亲和柱净化 - 高效液相色谱法” 检测待测样品中玉米赤霉烯酮的含量。结果见表 1。

[0063] 表 1 免疫磁珠的特性检测结果

[0064]

标准品量 (ng)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
检测结果 (ng)	0	9.41	17.25	26.87	38.33	47.29	49.63	51.08	61.82
回收率 (%)	—	94.1	86.3	89.6	95.8	94.6	82.7	73.0	77.3

[0065] 结果表明 : ① 空白待测样品用洗脱液洗脱, 未检出玉米赤霉烯酮 ; ② 当标准品量在 10ng ~ 80ng 之间时, 用洗脱液洗脱出的玉米赤霉烯酮分别为 9.41ng、17.25ng、26.87ng、38.33ng、47.29ng, 回收率均达到了 85% 以上 ; ③ 当标准品量大于 50ng 时, 免疫磁珠偶联上的玉米赤霉烯酮趋向饱和, 回收率反而下降。说明用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠对玉米赤霉烯酮的富集率为 50ng/mg (每毫克免疫磁珠可以捕获 50ng 玉米赤霉烯酮), 对玉米赤霉烯酮的回收率达到 85% 以上。

[0066] 实施例 3 免疫磁珠的使用方法

[0067] 1. 样品前处理

[0068] 用均质器均质样品 ; 称取 5.0 ± 0.05g 样品至样品瓶中, 分别加入 1.0 ± 0.05g 氯化钠, 25ml 60% 甲醇溶液, 用涡旋仪涡旋 5min, 或者摇床震荡 20min, 3000g 以上, 室温 (20-25℃ / 68-77°F) 离心 5min ; (如不具备离心条件, 该步骤也可用如下操作替代 : 静置后

取 10ml 上清液过滤) 吸取 5ml(相当于 1g 样品) 离心上清液 / 滤液, 加入 5ml 去离子水, 混匀, 待用。(用于磁珠捕获)。

[0069] 2、免疫磁珠捕获

[0070] 取玉米赤霉烯酮免疫磁珠 0.2ml 于 10ml 离心管中, 用 5ml 去离子水润洗磁珠 2 次, 每次用磁分离架分离洗液(每次在磁分离架上静置 3min, 确保磁珠全部吸附); 向润洗好的玉米赤霉烯酮免疫磁珠中加入处理好的样本 5ml, 混匀, 25℃, 20min, 期间 5min 混匀一下磁珠; 用磁分离架分离免疫磁珠, 用去离子水液冲润洗免疫磁珠 2 次, 每次 5ml(方法同免疫磁珠润洗)。

[0071] 3、免疫磁珠洗脱

[0072] 用 1ml 甲醇洗免疫磁珠, 混匀, 静置 1min, 用磁分离架分离免疫磁珠, 回收甲醇液, 即为富集净化后的玉米赤霉烯酮样品, 可应用于化学分析仪器检测 (HPLC, 高效液相色谱法)、酶联免疫吸附法检测或胶体金测试条的快速测试。

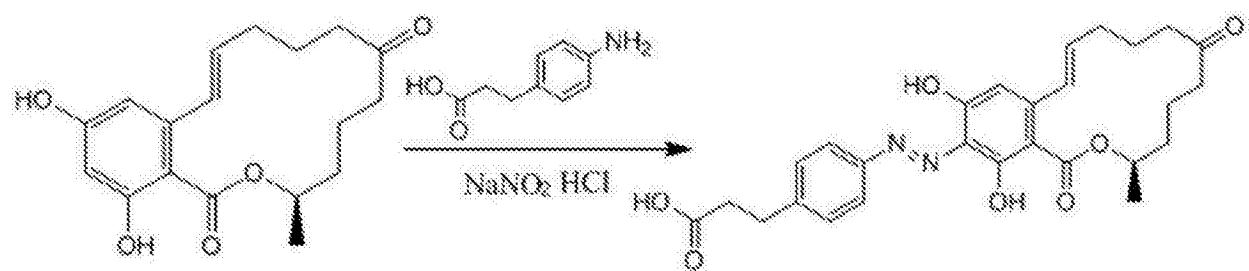


图 1

专利名称(译)	一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105301254A	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201510671374.0	申请日	2015-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	罗晓琴 曹东山 赵正苗 贾芳芳 魏力杰 朱亮亮 何方洋 冯月君		
发明人	罗晓琴 曹东山 赵正苗 贾芳芳 魏力杰 朱亮亮 何方洋 冯月君		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠及其制备方法和应用，它是以羧基磁珠为载体，玉米赤霉烯酮单克隆抗体为识别中间体，经过活化-偶联-洗涤-封闭的过程制备出偶联有玉米赤霉烯酮单克隆抗体的免疫磁珠，在合适的缓冲液中于一定条件下孵育可以高效捕捉、富集检测样本中的玉米赤霉烯酮。本发明用于玉米赤霉烯酮富集净化的免疫磁珠具有浓缩待测样品中玉米赤霉烯酮浓度、提高检测下限、排除杂质干扰、提高检测准确性和可靠性、减少样品处理时间达到快速检测的优点。

