



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108553940 A

(43)申请公布日 2018.09.21

(21)申请号 201810269400.0

(22)申请日 2018.03.29

(71)申请人 山东美正生物科技有限公司

地址 276801 山东省日照市东港区昭阳北路69号

(72)发明人 柳家鹏 王涛 于蓉 龚利新

(74)专利代理机构 青岛高晓专利事务所(普通合伙) 37104

代理人 白莹 于正河

(51)Int.Cl.

B01D 15/20(2006.01)

B01D 15/22(2006.01)

B01D 15/38(2006.01)

B01J 20/281(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

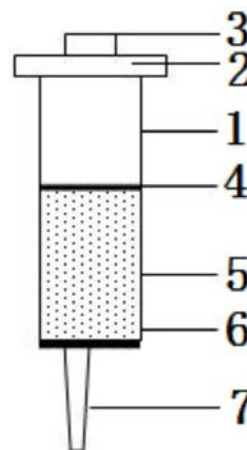
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种四环素类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明属于食品安全检测技术领域,具体涉及一种四环素类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途,首先将采用环氧氯丙烷活化法活化的琼脂糖凝胶作为载体,然后将基因重组蛋白G偶联到载体上,得到了蛋白G-sepharose,再将四环素类抗生素抗体连接到蛋白G-sepharose上,得到了抗体-蛋白G-sepharose,再用交联剂进行交联,得到了抗体-蛋白G-sepharose填料,最后将抗体-蛋白G-sepharose填料装柱后形成了高纯度和亲和力的四环素类抗生素免疫亲和柱,充分利用基因重组蛋白G与四环素类抗生素抗体特异性结合的特点,四环素类抗生素抗体的Fab片段暴露在外,大幅度提高了基因重组蛋白G的抗体结合能力、四环素类抗生素的捕捉能力和四环素类抗生素的纯化效率。



1. 一种四环素类抗生素免疫亲和柱,其特征就在于主体结构包括柱体、盖板、进样口、第一筛板、填料、第二筛板和出样口;圆管状结构的柱体的顶部设置有圆形片状结构的盖板,盖板的中心设置有圆管状结构的进样口,柱体的内部上部空间为空腔,柱体的内部中间设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第一筛板,柱体的内部下部空间填充有填料,柱体的底部设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第二筛板,第二筛板上设置有上宽下窄的锥形管状结构的出样口;填料为腹泻性贝类毒素抗体-蛋白G-sepharose填料。

2. 一种四环素类抗生素免疫亲和柱制备方法,其特征就在于具体工艺过程包括活化、偶联、连接、交联和装柱共五个步骤:

(一) 活化:用蒸馏水充分冲洗浓度为2%的预溶胀琼脂糖凝胶sepharose4B,洗去琼脂糖凝胶sepharose4B中残存的乙醇,蒸馏水与琼脂糖凝胶sepharose4B的体积比为20:1,用漏斗过滤掉液体,得到湿凝胶,称取5克湿凝胶与7.5毫升摩尔质量为0.8M的NaOH水溶液、2毫升质量百分比浓度为30%的环氧氯丙烷水溶液和5毫升浓度为2mg/mL的NaBH₄水溶液在温度为25℃的条件下进行8小时的摇床反应,反应结束后,用50毫升蒸馏水洗涤湿凝胶,洗去湿凝胶中混杂的环氧氯丙烷,完成琼脂糖凝胶sepharose4B的活化,活化后的琼脂糖凝胶sepharose4B作为载体备用;

(二) 偶联:取1克载体用偶联缓冲液洗涤3次,将载体加入20毫升浓度为2mg/mL的基因重组蛋白G中在室温条件下偶联4小时,偶联缓冲液选取为pH值为8.9的摩尔质量为0.1M的NaHCO₃水溶液和摩尔质量为0.8M的NaCl水溶液的混合液,将偶联后的载体用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,得到偶联有基因重组蛋白G的琼脂糖凝胶sepharose4B,简称为蛋白G-sepharose;

(三) 连接:将四环素类抗生素抗体溶解于pH值为7.4和浓度为20mM的PBS中,得到10毫升浓度为2mg/mL的抗体,将蛋白G-sepharose用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,PBS的每次使用量为30毫升,将抗体加入到洗涤过的蛋白G-sepharose中在室温条件下结合30分钟,得到连接有抗体的蛋白G-sepharose,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤连接有抗体的蛋白G-sepharose 3次,PBS的每次使用量为30毫升,连接有抗体的蛋白G-sepharose简称为抗体-蛋白G-sepharose;

(四) 交联:用pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液洗涤抗体-蛋白G-sepharose 3次,硼酸缓冲液的每次使用量为30毫升,在抗体-蛋白G-sepharose中加入pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液以及交联剂,交联剂为庚二亚氨酸二甲酯,当抗体-蛋白G-sepharose的浓度为20mM时停止交联剂的加入,使抗体-蛋白G-sepharose、硼酸缓冲液和交联剂在室温条件下交联1小时,加入pH值为9.0和浓度为50mM的乙醇胺终止交联,并用浓度为50mM的乙醇胺封闭10分钟,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤交联后的抗体-蛋白G-sepharose 3次,得到抗体-蛋白G-sepharose填料;

(五) 装柱:将用10毫升pH值为7.4和浓度为20mM的PBS重悬后的抗体-蛋白G-sepharose填料装入到柱体1的下部空间中,得到四环素类抗生素免疫亲和柱,完成四环素类抗生素免疫亲和柱的制备;抗体-蛋白G-sepharose填料的装入量根据需要制备的四环素类抗生素免疫亲和柱的容量选取。

3. 根据权利要求1所述的四环素类抗生素免疫亲和柱,其特征就在于用途包括净化 and 富集饲料、粮食、水产和食品领域中的四环素类抗生素,净化 and 富集饲料中的四环素类抗生素

的具体工艺过程为：首先，在置有5.0g均质鸡肉的一号50毫升具塞离心管中加入25毫升质量百分比为70%的甲醇水溶液，涡旋振荡2min后以12000rpm的转速离心10min，将上清液移至二号50毫升具塞离心管中，再向二号50毫升具塞离心管中加入体积是上清液体积的6倍的浓度为10mM的PBS对上清液进行稀释，得到四环素类抗生素饲料溶液，最后，调节气控操作架的气泵压力，使四环素类抗生素饲料溶液经注射器以2-3滴/秒的流速流过四环素类抗生素免疫亲和柱，待四环素类抗生素饲料溶液全部流出四环素类抗生素免疫亲和柱后，用5毫升去离子水洗涤四环素类抗生素免疫亲和柱，调节气控操作架的气泵压力，使3毫升甲醇经注射器流过四环素类抗生素免疫亲和柱，收集洗脱产物，在温度为40℃的条件下用氮气吹干洗脱产物，采用液相色谱的流动相复溶洗脱产物后进行高效液相色谱检测，得到的高效液相色谱检测图谱如图3所示，根据色谱峰面积计算能够得出饲料中四环素类抗生素的含量为4ppm。

4. 根据权利要求2所述的四环素类抗生素免疫亲和柱制备方法，其特征在于琼脂糖凝胶能够被溴化氰活化的琼脂糖凝胶、交联的琼脂糖凝胶、聚丙烯酸琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶或纤维素代替；四环素类抗生素抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

5. 根据权利要求2所述的四环素类抗生素免疫亲和柱制备方法，其特征在于基因重组蛋白G的基因序列为GenBank CAA27638.1在大肠杆菌中表达出了与四环素类抗生素抗体的高亲和力，基因重组蛋白G的1个分子的蛋白G可以结合3个分子的四环素类抗生素抗体，并且只有四环素类抗生素抗体能与基因重组蛋白G结合，其余抗体均不能与基因重组蛋白G结合，特异性高，以基因重组蛋白G为基础制备的四环素类抗生素免疫亲和柱具有特异性高，四环素类抗生素结合量大，纯化效率高的特点。

6. 根据权利要求2所述的四环素类抗生素免疫亲和柱制备方法，其特征在于所述琼脂糖凝胶sepharose4B替换为琼脂糖凝胶sepharose2B。

一种四环素类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途

技术领域：

[0001] 本发明属于食品安全检测技术领域，具体涉及一种四环素类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途。

背景技术：

[0002] 亲和柱是将与纯化对象有专一结合作用的物质连接在不溶性载体上，制成亲和吸附剂后所装的柱，多用做亲和层析。

[0003] 四环素类抗生素(Tetracyclines)是由放线菌产生的一类广谱抗生素，包括金霉素(chlortetracycline)、土霉素(oxytetracycline)、四环素(tetracycline)及半合成衍生物甲烯土霉素、强力霉素、二甲胺基四环素等，其结构均含并四苯基本骨架；其中四环素、土霉素、金霉素及多西环素以其优良的抗菌性、稳定的药性及低廉的价格，在畜牧业生产中广泛用于疾病的治疗和预防及促进生长，但该类药物过量使用会导致畜产品中高浓度药物残留，直接影响消费者身体健康，四环素类抗生素的不良反应包括胃肠道反应、二重感染(菌群交替症)、对骨、牙生长的影响、肝损害、维生素缺乏和肾毒性，此外，四环素类抗生素偶尔还可引起药热和皮疹等过敏反应。

[0004] 四环素类药物的检测方法常用的有：微生物法、免疫法和理化检测法：微生物法包括棉签(拭子)法、杯碟法、纸片法和TTC法(氯化三苯基氮唑法)，微生物法是目前公认的而又广泛应用的测定抗生素的方法，根据对抗生素敏感的实验菌在适当条件下所产生的抑菌圈大小和药物浓度成比例的关系设计而成，许多发达国家都有一套微生物法快速检测抗生素药物在动物组织中残留的方法(程序)，美国和加拿大使用微生物拭子检测法和快速抗生素筛选实验法，欧盟常用德国三碟实验法、欧盟四碟实验法和新的荷兰肾实验法等；免疫法包括酶联免疫分析法和金标检测试纸法，酶联免疫吸附测定法一般采用间接竞争ELISA方法，在酶标板微孔条上预包被四环素类药物抗原，样本残留的四环素类药物和微孔条上预包被的抗原竞争抗四环素类药物抗体(抗试剂)，加入酶标二抗(酶标物)，经TMB底物显色，样本吸光度值与其残留物四环素类药物呈负相关，检测样品中四环素类药物的含量；理化检测法包括薄层色谱法、高效液相色谱法和液相色谱质谱联用法，薄层色谱法可分为正相薄层色谱(NP-TLC)和反相薄层色谱(RP-TLC)两种方法，已经报道显示以纤维素、硅胶、硅藻土为吸附剂的薄层色谱方法用于四环素类抗生素的分离，由于四环素类药物可以与吸附剂中存在的痕量金属离子形成稳定的络合物，从而使分离效果较差，高效液相色谱法是最主要的残留分析方法之一，该方法灵敏度、特异性都非常高，能够对被测物准确定量，由于四环素容易与金属离子形成螯合物，并在反相色谱柱的硅醇基上吸附，常常产生拖尾峰，为避免这种情况，常在流动相中加入各种有机酸，如磷酸、草酸或酒石酸等。中国专利201510138304.9公开的四环素类抗生素或其药用盐在制备抗EV71型肠病毒药物中的应用，所述四环素类抗生素为四环素、金霉素、土霉素、地美环素、强力霉素、美他环素、米诺环素或替加环素，所述药物为局部施用制剂，所述局部施用制剂为软膏剂，所述药用盐为盐酸盐；中国专利201610866312.X公开的一种高选择性四环素类抗生素分子印迹聚合物的制备

方法利用模板分子、甲基丙烯酸(MAA, 6mmol)、交联剂(TRIM, 3mL)、引发剂进行高选择性四环素类抗生素分子印迹聚合物的制备,所述方法包括下述步骤:(1)、制备目标抗生素模板分子;(2)、在容器中加入第一预定量致孔剂;(3)、将所述模板分子、甲基丙烯酸(MAA, 6mmol)、交联剂(TRIM, 3mL)、引发剂分别溶入所述致孔剂中;(4)、对所得到的混合溶液进行超声脱气;(5)、对所述混合溶液进行通氮除氧;(6)、封闭所述容器;(7)、将所述容器置于预定温度的水浴环境中,进行搅拌,使其发生反应;(8)、反应结束后,收集所得到的聚合物微粒,利用甲醇/乙酸的混合液进行索氏提取,除去模板分子;(9)、利用甲醇对剩余聚合物进行索氏提取,以除去乙酸;(10)、将剩余聚合物置于真空干燥箱中干燥至恒重,得到用于对抗生素残留进行检测的分子印迹聚合物(MIPs);中国专利201510019156.9公开的一种四环素类抗生素的纳米纤维分子印迹聚合物的制备方法以纳米纤维素分子作为支撑载体,对其表面进行硅烷化,以强力霉素为模板分子、乙腈/甲醇为致孔剂、甲基丙烯酸为功能单体、三羟基甲基丙烷三甲基丙烯酸酯为交联剂、偶氮二异丁腈为引发剂,合成四环素类抗生素的纳米纤维分子印迹聚合物,具体包括如下步骤:(1)纳米纤维的制备,(2)硅烷化纳米纤维的制备,(3)硅烷化纳米纤维的变性处理,(4)沉淀聚合法合成纳米纤维分子印迹聚合物。

[0005] 对于四环素类抗生素的液相色谱检测来说,样品采集和前处理是目前分析方法中的瓶颈,也是测定误差的主要来源,样品前处理分为提取和净化2个步骤,实验中大多采用固相萃取柱对样品提取液中的四环素类抗生素进行净化,可以说样品的前处理技术是目前四环素类抗生素分析研究的难点和热点之一。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,具有很高的亲和力,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,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。因此,需要研发设计一种操作简单和净化效率高的四环素类抗生素免疫亲和柱,利用四环素类抗生素特异性抗体对待检样本中的四环素类抗生素进行分离和净化,很有社会和经济价值,应用前景广阔。

发明内容:

[0006] 本发明的发明目的在于克服现有技术存在的缺点,设计一种四环素类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途,使亲和柱的结构简单,亲和柱的制备方法操作简便,亲和柱使用时的净化效率高。

[0007] 为了实现上述目的,本发明涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱的主体结构包括柱体、盖板、进样口、第一筛板、填料、第二筛板和出样口;圆管状结构的柱体的顶部设置有圆形片状结构的盖板,盖板的中心设置有圆管状结构的进样口,柱体的内部上部空间为空腔,柱体的内部中间设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第一筛板,柱体的内部下部空间填充有填料,柱体的底部设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第二筛板,第二筛板上设置有上宽下窄的锥形管状结构的出样口;填料为腹泻性贝类毒素抗体-蛋白G-sepharose填料。

[0008] 本发明涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱制备方法的具体工艺过程包括活化、偶联、连接、交联和装柱共五个步骤:

[0009] (一)活化:用蒸馏水充分冲洗浓度为2%的预溶胀琼脂糖凝胶sepharose4B,洗去琼脂糖凝胶sepharose4B中残存的乙醇,蒸馏水与琼脂糖凝胶sepharose4B的体积比为20:1,用漏斗过滤掉液体,得到湿凝胶,称取5克湿凝胶与7.5毫升摩尔质量为0.8M的NaOH水溶

液、2毫升质量百分比浓度为30%的环氧氯丙烷水溶液和5毫升浓度为2mg/mL的NaBH₄水溶液在温度为25℃的条件下进行8小时的摇床反应,反应结束后,用50毫升蒸馏水洗涤湿凝胶,洗去湿凝胶中混杂的环氧氯丙烷,完成琼脂糖凝胶sepharose4B的活化,活化后的琼脂糖凝胶sepharose4B作为载体备用;

[0010] (二) 偶联:取1克载体用偶联缓冲液洗涤3次,将载体加入20毫升浓度为2mg/mL的基因重组蛋白G中在室温条件下偶联4小时,偶联缓冲液选取为pH值为8.9的摩尔质量为0.1M的NaHCO₃水溶液和摩尔质量为0.8M的NaCl水溶液的混合液,将偶联后的载体用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,得到偶联有基因重组蛋白G的琼脂糖凝胶sepharose4B,简称为蛋白G-sepharose;

[0011] (三) 连接:将四环素类抗生素抗体溶解于pH值为7.4和浓度为20mM的PBS中,得到10毫升浓度为2mg/mL的抗体,将蛋白G-sepharose用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,PBS的每次使用量为30毫升,将抗体加入到洗涤过的蛋白G-sepharose中在室温条件下结合30分钟,得到连接有抗体的蛋白G-sepharose,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤连接有抗体的蛋白G-sepharose 3次,PBS的每次使用量为30毫升,连接有抗体的蛋白G-sepharose简称为抗体—蛋白G—sepharose;

[0012] (四) 交联:用pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液洗涤抗体—蛋白G—sepharose 3次,硼酸缓冲液的每次使用量为30毫升,在抗体—蛋白G—sepharose中加入pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液以及交联剂,交联剂为庚二亚氨酸二甲酯,当抗体—蛋白G—sepharose的浓度为20mM时停止交联剂的加入,使抗体—蛋白G—sepharose、硼酸缓冲液和交联剂在室温条件下交联1小时,加入pH值为9.0和浓度为50mM的乙醇胺终止交联,并用浓度为50mM的乙醇胺封闭10分钟,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤交联后的抗体—蛋白G—sepharose 3次,得到抗体—蛋白G—sepharose填料;

[0013] (五) 装柱:将用10毫升pH值为7.4和浓度为20mM的PBS重悬后的抗体—蛋白G—sepharose填料装入到柱体1的下部空间中,得到四环素类抗生素免疫亲和柱,完成四环素类抗生素免疫亲和柱的制备;抗体—蛋白G—sepharose填料的装入量根据需要制备的四环素类抗生素免疫亲和柱的容量选取。

[0014] 本发明涉及的琼脂糖凝胶能够被溴化氰活化的琼脂糖凝胶、交联的琼脂糖凝胶、聚丙烯酸琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶或纤维素代替;四环素类抗生素抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

[0015] 本发明涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱的用途包括净化和富集饲料、粮食、水产和食品领域中的四环素类抗生素。

[0016] 本发明涉及的基因重组蛋白G的基因序列为GenBank CAA27638.1) 在大肠杆菌中表达出了与四环素类抗生素抗体的高亲和力,基因重组蛋白G的1个分子的蛋白G可以结合3个分子的四环素类抗生素抗体,并且只有四环素类抗生素抗体能与基因重组蛋白G结合,其余抗体均不能与基因重组蛋白G结合,特异性高,以基因重组蛋白G为基础制备的四环素类抗生素免疫亲和柱具有特异性高,四环素类抗生素结合量大,纯化效率高的特点。

[0017] 本发明与现有技术相比,首先将采用环氧氯丙烷活化法活化的琼脂糖凝胶作为载体,然后将基因重组蛋白G偶联到载体上,得到了蛋白G-sepharose,再将四环素类抗生素抗体连接到蛋白G-sepharose上,得到了抗体—蛋白G—sepharose,再用交联剂进行交联,得

到了抗体—蛋白G—sepharose填料,最后将抗体—蛋白G—sepharose填料装柱后形成了高纯度和亲和力的四环素类抗生素免疫亲和柱,充分利用基因重组蛋白G与四环素类抗生素抗体特异性结合的特点,四环素类抗生素抗体的Fab片段暴露在外,大幅度提高了基因重组蛋白G的抗体结合能力、四环素类抗生素的捕捉能力和四环素类抗生素的纯化效率;其亲和柱的结构简单,亲和柱制备方法操作简便,充分保证了抗体的抗原结合能力,亲和柱不需纯化处理即可直接用于高效液相色谱检测和荧光仪检测,降低了时间和经济成本。

附图说明:

[0018] 图1为本发明实施例1涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱的主体结构原理示意图。

[0019] 图2为本发明实施例2涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱制备方法的流程框图。

[0020] 图3为本发明实施例3涉及的高效液相色谱的检测图谱。

具体实施方式:

[0021] 下面通过实施例并结合附图对本发明做进一步描述。

[0022] 实施例1:

[0023] 本实施例涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱的主体结构包括柱体1、盖板2、进样口3、第一筛板4、填料5、第二筛板6和出样口7;圆管状结构的柱体1的顶部设置有圆形片状结构的盖板2,盖板2的中心设置有圆管状结构的进样口3,柱体1的内部上部空间为空腔,柱体1的内部中间设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第一筛板4,柱体1的内部下部空间填充有填料5,柱体1的底部设置有开设有筛孔的圆形片状结构的第二筛板6,第二筛板6上设置有上宽下窄的锥形管状结构的出样口7;填料5为四环素类抗生素抗体-蛋白G-sepharose填料。

[0024] 实施例2:

[0025] 本实施例涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱制备方法的具体工艺过程包括活化、偶联、连接、交联和装柱共五个步骤:

[0026] (一)活化:用蒸馏水充分冲洗浓度为2%的预溶胀琼脂糖凝胶sepharose4B,洗去琼脂糖凝胶sepharose4B中残存的乙醇,蒸馏水与琼脂糖凝胶sepharose4B的体积比为20:1,用漏斗过滤掉液体,得到湿凝胶,称取5克湿凝胶与7.5毫升摩尔质量为0.8M的NaOH(氢氧化钠)水溶液、2毫升质量百分比浓度为30%的环氧氯丙烷水溶液和5毫升浓度为2mg/mL的NaBH₄(硼氢化钠)水溶液在温度为25℃的条件下进行8小时的摇床反应,反应结束后,用50毫升蒸馏水洗涤湿凝胶,洗去湿凝胶中混杂的环氧氯丙烷,完成琼脂糖凝胶sepharose4B的活化,活化后的琼脂糖凝胶sepharose4B作为载体备用;

[0027] (二)偶联:取1克载体用偶联缓冲液洗涤3次,将载体加入20毫升浓度为2mg/mL的基因重组蛋白G中在室温条件下偶联4小时,偶联缓冲液选取为pH值为8.9的摩尔质量为0.1M的NaHCO₃(碳酸氢钠)水溶液和摩尔质量为0.8M的NaCl(氯化钠)水溶液的混合液,将偶联后的载体用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤3次,得到偶联有基因重组蛋白G的琼脂糖凝胶sepharose4B,简称为蛋白G-sepharose;

[0028] (三)连接:将四环素类抗生素抗体溶解于pH值为7.4和浓度为20mM的PBS中,得到10毫升浓度为2mg/mL的抗体,将蛋白G-sepharose用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3

次,PBS的每次使用量为30毫升,将抗体加入到洗涤过的蛋白G-sepharose中在室温条件下结合30分钟,得到连接有抗体的蛋白G-sepharose,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤连接有抗体的蛋白G-sepharose 3次,PBS的每次使用量为30毫升,连接有抗体的蛋白G-sepharose简称为抗体—蛋白G—sepharose;

[0029] (四) 交联:用pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液洗涤抗体—蛋白G—sepharose 3次,硼酸缓冲液的每次使用量为30毫升,在抗体—蛋白G—sepharose中加入pH值为9.0和浓度为0.1M的硼酸缓冲液以及交联剂,交联剂为庚二亚氨酸二甲酯,当抗体—蛋白G—sepharose的浓度为20mM时停止交联剂的加入,使抗体—蛋白G—sepharose、硼酸缓冲液和交联剂在室温条件下交联1小时,加入pH值为9.0和浓度为50mM的乙醇胺终止交联,并用浓度为50mM的乙醇胺封闭10分钟,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤交联后的抗体—蛋白G—sepharose 3次,得到抗体—蛋白G—sepharose填料;

[0030] (五) 装柱:将用10毫升pH值为7.4和浓度为20mM的PBS重悬后的抗体—蛋白G—sepharose填料装入到柱体1的下部空间中,得到四环素类抗生素免疫亲和柱,完成四环素类抗生素免疫亲和柱的制备;抗体—蛋白G—sepharose填料的装入量根据需要制备的四环素类抗生素免疫亲和柱的容量选取。

[0031] 实施例3:

[0032] 本实施例涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱净化和富集饲料中的四环素类抗生素的具体工艺过程为:首先,在置有5.0g均质鸡肉的一号50毫升具塞离心管中加入25毫升质量百分比为70%的甲醇水溶液,涡旋振荡2min后以12000rpm的转速离心10min,将上清液移至二号50毫升具塞离心管中,再向二号50毫升具塞离心管中加入体积是上清液体积的6倍的浓度为10mM的PBS对上清液进行稀释,得到四环素类抗生素饲料溶液,最后,调节气控操作架的气泵压力,使四环素类抗生素饲料溶液经注射器以2-3滴/秒的流速流过四环素类抗生素免疫亲和柱,待四环素类抗生素饲料溶液全部流出四环素类抗生素免疫亲和柱后,用5毫升去离子水洗涤四环素类抗生素免疫亲和柱,调节气控操作架的气泵压力,使3毫升甲醇经注射器流过四环素类抗生素免疫亲和柱,收集洗脱产物,在温度为40℃的条件下用氮气吹干洗脱产物,采用液相色谱的流动相复溶洗脱产物后进行高效液相色谱检测,得到的高效液相色谱检测图谱如图3所示,根据色谱峰面积计算能够得出饲料中四环素类抗生素的含量为4ppm。

[0033] 实施例4:

[0034] 本实施例涉及的四环素类抗生素免疫亲和柱制备方法的具体工艺过程包括活化、偶联、连接、交联和装柱共五个步骤:

[0035] (一) 活化:用蒸馏水充分冲洗浓度为2%的预溶胀琼脂糖凝胶sepharose2B,洗去琼脂糖凝胶sepharose2B中残存的乙醇,蒸馏水与琼脂糖凝胶sepharose2B的体积比为20:1,用漏斗过滤掉液体,得到湿凝胶,称取5克湿凝胶与7.5毫升摩尔质量为0.8M的NaOH水溶液、2毫升质量百分比浓度为30%的环氧氯丙烷水溶液和5毫升浓度为2mg/mL的NaBH₄水溶液在温度为25℃的条件下进行8小时的摇床反应,反应结束后,用50毫升蒸馏水洗涤湿凝胶,洗去湿凝胶中混杂的环氧氯丙烷,完成琼脂糖凝胶sepharose2B的活化,活化后的琼脂糖凝胶sepharose2B作为载体备用;

[0036] (二) 偶联:按照每克载体配比30-200nmol基因重组蛋白G的比例取载体和基因重

组蛋白G置于pH值为8.8的摩尔质量为0.1M的NaHCO₃水溶液和摩尔质量为0.5M的NaCl水溶液构成的偶联缓冲液中偶联,当在室温条件下时,偶联2小时,当在4℃条件下时,偶联过夜,偶联产物与pH值为8.0的摩尔质量为1M的Tris.HCl(三(羟甲基)氨基甲烷)缓冲液在室温条件下反应2小时后用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤,得到偶联有基因重组蛋白G的琼脂糖凝胶sepharose2B,简称为蛋白G-sepharose;

[0037] (三) 连接:将四环素类抗生素抗体溶解于pH值为7.4和浓度为20mM的PBS中,得到10毫升浓度为2mg/mL的抗体,将蛋白G-sepharose用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤3次,PBS的每次使用量为30毫升,按照每克蛋白G-sepharose配比200nmol-1.2umol抗体的比例将抗体加入到洗涤过的蛋白G-sepharose中在室温条件下反应30分钟,得到连接有抗体的蛋白G-sepharose,用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤连接有抗体的蛋白G-sepharose 3次,PBS的每次使用量为30毫升,连接有抗体的蛋白G-sepharose简称为抗体—蛋白G—sepharose;

[0038] (四) 交联:用pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤抗体—蛋白G—sepharose,在抗体—蛋白G—sepharose中加入浓度为0.2M的三乙醇胺与浓度为20mM的二甲基庚二酸脂构成的pH值为9.0的交联剂在室温条件下反应1小时,加入pH值为7.4和浓度为20mM的乙醇胺终止反应,用含有质量百分比为0.01%的硫柳汞的pH值为7.4和浓度为20mM的PBS洗涤交联后的抗体—蛋白G—sepharose,得到抗体—蛋白G—sepharose填料;

[0039] (五) 装柱:将抗体—蛋白G—sepharose填料装入到柱体1的下部空间中,得到四环素类抗生素免疫亲和柱,置于4℃的环境中保存,完成四环素类抗生素免疫亲和柱的制备;抗体—蛋白G—sepharose填料的装入量根据需要制备的四环素类抗生素免疫亲和柱的容量选取。

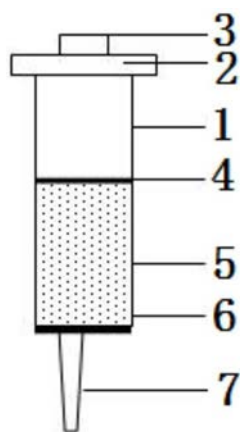


图1

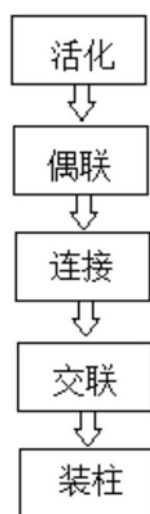


图2

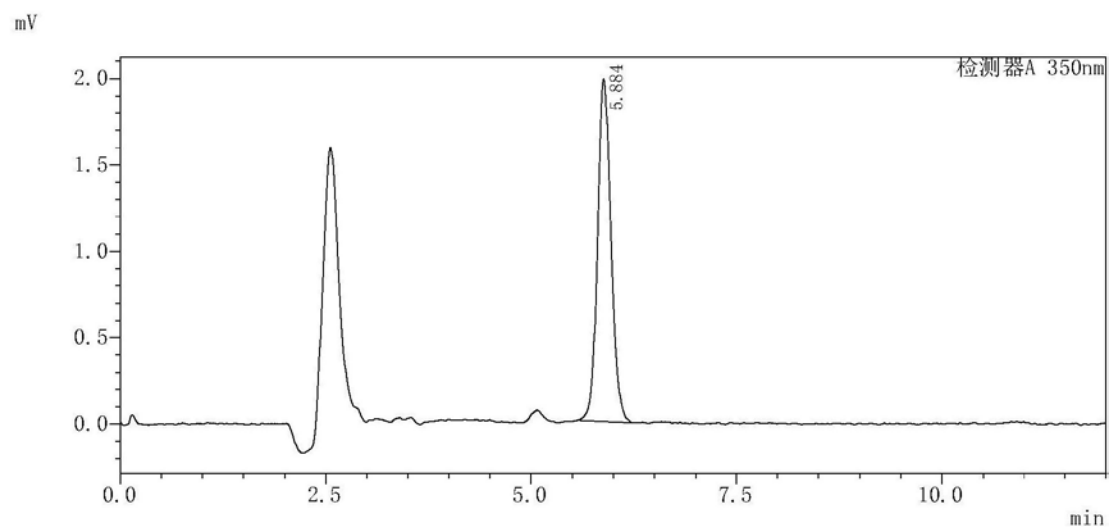


图3

专利名称(译)	一种四环素类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN108553940A	公开(公告)日	2018-09-21
申请号	CN201810269400.0	申请日	2018-03-29
[标]发明人	柳家鹏 王涛 于蓉 龚利新		
发明人	柳家鹏 王涛 于蓉 龚利新		
IPC分类号	B01D15/20 B01D15/22 B01D15/38 B01J20/281 G01N33/531		
CPC分类号	B01D15/3823 B01D15/206 B01D15/22 B01J20/281 G01N33/531		
代理人(译)	白莹 于正河		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于食品安全检测技术领域，具体涉及一种四环素类抗生素免疫亲和柱及其制备方法和用途，首先将采用环氧氯丙烷活化法活化的琼脂糖凝胶作为载体，然后将基因重组蛋白G偶联到载体上，得到了蛋白G-sepharose，再将四环素类抗生素抗体连接到蛋白G-sepharose上，得到了抗体—蛋白G—sepharose，再用交联剂进行交联，得到了抗体—蛋白G—sepharose填料，最后将抗体—蛋白G—sepharose填料装柱后形成了高纯度和亲和力的四环素类抗生素免疫亲和柱，充分利用基因重组蛋白G与四环素类抗生素抗体特异性结合的特点，四环素类抗生素抗体的Fab片段暴露在外，大幅度提高了基因重组蛋白G的抗体结合能力、四环素类抗生素的捕捉能力和四环素类抗生素的纯化效率。

