(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 110133250 A
(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910363222.2

(22)申请日 2019.04.30

(83)生物保藏信息
CCTCC NO. C201871 2018.03.23

(71)申请人 中国农业科学院油料作物研究所
地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二路2号

(72)发明人 张奇 李培武 姜俊 白艺珍 张文

(74)专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限公司 42102
代理人 乔宇

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 30/02(2006.01)
G01N 30/08(2006.01)
B01J 20/286(2006.01)
B01D 15/22(2006.01)
B01D 15/08(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页
序列表2页

(54)发明名称

净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂及复合亲和柱

(57)摘要

本发明提供了一种净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂及复合亲和柱。黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗杂色曲霉毒素单克隆抗体和抗环匹阿尼酸单克隆抗体，所述的环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生的单克隆抗体。本发明提供的黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫亲和柱可用于同时含有三种黄曲霉菌毒素样品的净化-检测前处理，三种之间无相互干涉影响，性能稳定，进而通过使用本亲和柱建立了一种经济，快捷，精确，安全的高效液相色谱-质谱联用仪检测方法。

CN 110133250 A

1.黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂，其特征在于：所述的免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗杂色曲霉毒素单克隆抗体和抗环匹阿尼酸单克隆抗体，所述的环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生的单克隆抗体。

2.根据权利要求1所述的黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂，其特征在于：所述黄曲霉毒素通用单克隆抗体为黄曲霉毒素通用单克隆抗体，由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生；所述的杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生；所述固相载体为琼脂糖凝胶。

3.装载有权利要求1所述的黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸复合亲和柱。

4.权利要求3所述的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免复合亲和柱的制备，其特征在于：包括以下步骤：

a)固相载体基质处理

将CNBr活化的琼脂糖凝胶基质粉末在pH2-3的条件下用HCl洗涤除杂；

CNBr活化的琼脂糖凝胶是以冻干形式提供。

b)配体偶联

使用偶联缓冲液溶解待偶联的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗杂色曲霉毒素单克隆抗体、抗环匹阿尼酸单克隆抗体，获得各抗体溶液，迅速将步骤a)活化的琼脂糖凝胶基质转移到所述抗体溶液中，进行偶联；

c)配体封闭

封闭所有残留的活性基团；

d)除去偶联后未偶联上的多余的配体

e)装柱。

5.根据权利要求4所述的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免复合亲和柱的制备，其特征在于：所述步骤a)中洗涤用HCl浓度为1mmol/L，洗涤时间为15min；步骤b)中的偶联缓冲液为0.2mol/L $NaHCO_3$，pH8.3。

6.权利要求4所述的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免复合亲和柱的制备，其特征在于：步骤b)中各抗体溶液的浓度为10-15mg/mL；偶联条件为：室温条件20-25℃下充分混匀上述混和物2-4h。

7.权利要求4所述的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免复合亲和柱的制备，其特征在于：步骤c)的配体封闭过程为：转移经步骤b)处理的琼脂糖凝胶基质至0.1mol/LTris-HCl缓冲液中，室温条件下静置2-4h。

8.权利要求4所述的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免复合亲和柱的制备，其特征在于：步骤d)为：依次用pH值为4和pH值为8的缓冲液对经步骤c)处理后的琼脂糖凝胶基质进行洗涤，至少洗涤3个循环；pH值为4和pH值为8的缓冲液分别可选0.1mol/L醋酸/醋酸钠缓冲液和0.1mol/L Tris-HCl缓冲液。

9.权利要求4所述的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免复合亲和柱的制备，其特征在于：步骤d)处理后，用5倍琼脂糖凝胶体积的0.01％NaN_3-PBS洗涤，并使用0.01％NaN_3-PBS保存，然后装柱。

10.基于权利要求3所述的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸复合亲和柱检测黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸含量的方法，其特征在于：将含有黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的样品通过免疫亲和柱时，免疫吸附剂会特异性的吸附黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸，其他的杂质则流出免疫亲和柱，然后用色谱级甲醇洗脱亲和柱，收集洗脱液即净化浓缩后的样品供高效液相色谱-质谱联用仪检测，分析样品中各毒素含量。

净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂及复合亲和柱

技术领域

[0001] 本发明涉及净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂及复合亲和柱。

背景技术

[0002] 黄曲霉菌一种常见腐生真菌，生长温度范围较宽，易在温湿度较高的环境中生长繁殖，且能在极端环境条件下存活并生长繁殖。黄曲霉菌侵染花生、玉米、坚果等农产品后，能产生多种有毒真菌毒素，引起人和动物的健康问题。

[0003] 黄曲霉毒素是黄曲霉和寄生曲霉等产生的一组结构类似的次生代谢产物，是一组以双呋喃环和香豆素为基本结构的化合物，化学结构十分稳定，且具有非常强的毒性和致癌性，广泛存在于粮食谷物和饲料及其加工品中。黄曲霉毒素已被世界卫生组织的癌症研究机构将其定I类致癌物质，其中AFB1的毒性最强，它的毒性是氰化钾的10倍，砒霜的68倍。黄曲霉毒素是一类剧毒化合物，具有致癌、致畸、致突变的作用，主要作用于肝脏，长期食用含有低水平黄曲霉毒素食物的人其肝脏也将受到损害。

[0004] 杂色曲霉毒素是由杂色曲霉、黄曲霉、构巢曲霉等真菌产生的次级代谢产物，是黄曲霉毒素生物合成的前体物。杂色曲霉毒素的化学结构与黄曲霉毒素结构相似，都有两个呋喃环。杂色曲毒在自然界中分布广发，易存在于饲草、小麦、花生、玉米等农产品。杂色曲霉毒素毒性仅次于黄曲霉毒素，具有肝毒性，肾毒性，细胞遗传毒性和强致癌性，污染词料以及农产品后， 会直接或间接进入人类食物链，从而严重威胁人类健康以及生命安全，其危害程度摄入量成正相关。

[0005] 环匹阿尼酸主要是由黄曲霉和寄生曲霉分泌产生的次生代谢产物，是一种能引起人畜各种损害的天然有毒化合物。环匹阿尼酸化学性质稳定，一般的储存条件和加工过程不能破坏，即使经过巴氏杀菌，也几乎完全不能被破坏。环匹阿尼酸广泛存在于大米、玉米、花生、饲料等农产品和奶酪等食品中，污染食品及饲料后，会直接或间接进入食物链，威胁人畜的健康和生命安全。因此加强对农产品及食品中环匹阿尼酸的检测、特别是速测，以便及时了解和掌握食品及饲料的卫生信息。

[0006] 目前，现有环匹阿尼酸等毒素的检测方法包括薄层层析法、高效液相色谱法、液相色谱 -质谱联用法等。其中薄层层析法不需要特殊的仪器设备，但不能准确定量，且对实验人员和周围环境污染危害较大。高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等精密仪器分析法灵敏度高，准确性好，样品前处理过程繁琐。免疫亲和色谱柱是一种新型的样本前处理技术，它是将免疫反应与色谱分析方法相结合，利用抗原抗体结合的高度特异性和亲和力，用化学偶联键合方法将特异性抗体结合到层析吸附剂上，基于免疫学可逆结合来实现对复杂样品中目标物质的效的分离和富集净化。目前，尚未见有化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免复合亲和柱的相关报道。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足，本发明提供了一种净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂、复合亲和柱及应用。

[0008] 为了实现上述目的本发明采用的技术方案是：

[0009] 黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸抗体免疫吸附剂，所述的免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗杂色曲霉毒素单克隆抗体和抗环匹阿尼酸单克隆抗体，所述的环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生的单克隆抗体。

[0010] 按上述方案，所述抗黄曲霉毒素单克隆抗体为黄曲霉毒素通用单克隆抗体，由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生，所述的杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生。

[0011] 按上述方案，所述固相载体为琼脂糖凝胶。

[0012] 装载有黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸抗体免疫吸附剂的净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸复合亲和柱。

[0013] 净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免复合亲和柱的制备，包括：

[0014] a)固相载体基质处理

[0015] 将CNBr活化的琼脂糖凝胶基质粉末在pH2-3的条件下用HCl洗涤除杂；CNBr活化的琼脂糖凝胶是以冻干形式提供。

[0016] b)配体偶联

[0017] 使用偶联缓冲液溶解待偶联的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗杂色曲霉毒素单克隆抗体、抗环匹阿尼酸单克隆抗体，获得各抗体溶液，迅速将步骤a)活化的琼脂糖凝胶基质转移到所述抗体溶液中，进行偶联；

[0018] c)配体封闭

[0019] 封闭所有残留的活性基团；

[0020] d)除去偶联后未偶联上的多余的配体

[0021] e)装柱。

[0022] 按上述方案，所述步骤a)中洗涤用HCl浓度为1mmol/L，洗涤时间为15min。

[0023] 按上述方案，步骤b)中的偶联缓冲液为0.2mol/L $NaHCO_3$，pH8.3，各抗体溶液的浓度为10-15mg/mL。

[0024] 按上述方案，步骤b)中的偶联条件为：室温条件(20-25℃)下充分混匀上述混和物2-4h。

[0025] 按上述方案，步骤c)的配体封闭过程为：转移经步骤b)处理的琼脂糖凝胶基质至0.1mol/LTris-HCl缓冲液中，室温条件下静置2-4h。

[0026] 按上述方案，步骤d)为：依次用pH值为4和pH值为8的缓冲液对经步骤c)处理后的琼脂糖凝胶基质进行洗涤，至少洗涤3个循环；pH值为4和pH值为8的缓冲液分别可选0.1mol/L醋酸/醋酸钠缓冲液和0.1mol/L Tris-HCl缓冲液。

[0027] 按上述方案，步骤d)处理后用5倍琼脂糖凝胶体积的0.01％NaN_3-PBS洗涤，并使用0.01％NaN_3-PBS保存，然后装柱。

[0028] 在此基础上本发明建立了免疫亲和柱净化-高效液相色谱-质谱联用仪法检测黄

曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸含量的方法，当含有黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的样品通过免疫亲和柱时，免疫吸附剂会特异性的吸附黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸，其他的杂质则流出免疫亲和柱，然后用色谱级甲醇洗脱亲和柱，洗脱流速1mL/min～ 2mL/min，将黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸从柱子中洗脱下来，样品即得到了很好的净化，由此收集的洗脱液供高效液相色谱-质谱联用仪检测用。

[0029] 基于上述复合亲和柱检测黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸含量的方法，将含有黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的，样品通过免疫亲和柱时，免疫吸附剂会特异性的吸附黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸，其他的杂质则流出免疫亲和柱，然后用色谱级甲醇洗脱亲和柱，收集洗脱液即净化浓缩后的样品供高效液相色谱-质谱联用仪检测，分析样品中的各毒素含量。

[0030] 本发明提供的黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫亲和柱可用于同时含有三种黄曲霉菌毒素样品的净化-检测前处理，三种之间无相互干涉影响，性能稳定，进而通过使用本亲和柱建立了一种经济，快捷，精确，安全的高效液相色谱-质谱联用仪检测方法，用于黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的高效液相色谱-质谱联用仪-质谱联用仪检测。

具体实施方式

[0031] 实施例1：黄曲霉毒素通用单克隆抗体的获得

[0032] 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11 分泌产生，具体根据申请号201010245095.5的专利中报道的方法预先制得，制备方法为：将获得的杂交瘤细胞株1C11腹腔注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠体内，收集小鼠的腹水，纯化处理后获得抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体。其中，纯化方法为辛酸-硫酸铵法，具体操作为：将腹水从-20℃冰箱拿出室温解冻。用双层滤纸过滤小鼠腹水，过滤后的腹水于4℃，12000r/min离心15min以上，吸取上清，将上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合，边搅拌边缓慢加入正辛酸，每毫升腹水所需的正辛酸体积为30～35μL，室温混合30～60min，4℃静置2h以上，然后4℃，12000r/min离心30min以上，弃沉淀，将得到的上清液用双层滤纸过滤后，加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和pH7.4的磷酸盐缓冲液，用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4，4℃预冷，缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL，4℃静置2h以上，然后4℃，12000r/min离心30min以上，弃上清，将所得沉淀用原腹水体积1/10的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬，装入透析袋，用纯水透析，将充分透析好的蛋白溶液置-70℃冰箱冷冻，然后用冷冻真空干燥机冻干，收集冻干粉，即得纯化好的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体，将抗体置-20℃冰箱中备用；

[0033] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠，0.141mL醋酸加水定容至100mL所得；所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.9g氯化钠，0.29g十二水磷酸氢二钠，0.02g氯化钾，磷酸二氢钾0.02g，加水定容至100mL所得。

[0034] 实施例2：抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的获得

[0035] 抗杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株1C11 分泌产生，具体根据申请号201410115952.8的专利中报道的方法预先制得，制备方法为：将获得的杂交瘤细胞株ST03腹腔注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠体

内，收集小鼠的腹水，纯化处理后获得抗杂色曲霉毒素单克隆抗体。其中，纯化方法为辛酸-硫酸铵法，具体操作为：将腹水从-20℃冰箱拿出室温解冻。用双层滤纸过滤小鼠腹水，过滤后的腹水于4℃，12000r/min离心15min以上，吸取上清，将上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合，边搅拌边缓慢加入正辛酸，每毫升腹水所需的正辛酸体积为30～35μL，室温混合30～60min，4℃静置2h以上，然后4℃，12000r/min离心30min以上，弃沉淀，将得到的上清液用双层滤纸过滤后，加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和pH7.4的磷酸盐缓冲液，用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4，4℃预冷，缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL，4℃静置2h以上，然后4℃，12000r/min离心30min以上，弃上清，将所得沉淀用原腹水体积1/10的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬，装入透析袋，用纯水透析，将充分透析好的蛋白溶液置-70℃冰箱冷冻，然后用冷冻真空干燥机冻干，收集冻干粉，即得纯化好的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体，将抗体置-20℃冰箱中备用；

[0036] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠，0.141mL醋酸加水定容至100mL所得；所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.9g氯化钠，0.29g十二水磷酸氢二钠，0.02g氯化钾，磷酸二氢钾0.02g，加水定容至100mL所得。

[0037] 实施例3：抗环匹阿尼酸单克隆抗体的获得

[0038] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO.C C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生。具体如下：

[0039] 将环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株YTT-2腹腔注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠体内，收集小鼠的腹水，采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体，具体操作为：用双层滤纸过滤小鼠腹水，过滤后的腹水于4℃，12000r/min离心15min以上，吸取上清，将上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合，边搅拌边缓慢加入正辛酸，每毫升腹水所需的正辛酸体积为30～35μL，室温混合30～60min，4℃静置2h以上，然后4℃，12000r/min离心30min 以上，弃沉淀，将得到的上清液用双层滤纸过滤后，加入1/10滤液体积的摩尔浓度为 0.1mol/L和pH7.4的磷酸盐缓冲液，用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4， 4℃预冷，缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL，4℃静置2h以上，然后4℃， 12000r/min离心30min以上，弃上清，将所得沉淀用原腹水体积1/10的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬，装入透析袋，用纯水透析，将充分透析好的蛋白溶液置-70℃冰箱冷冻，然后用冷冻真空干燥机冻干，收集冻干粉，即得纯化好的抗环匹阿尼酸单克隆抗体，将抗体置-20℃冰箱中备用；

[0040] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠，0.141mL醋酸加水定容至100mL所得；所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.9g氯化钠，0.29g十二水磷酸氢二钠，0.02g氯化钾，磷酸二氢钾0.02g，加水定容至100mL所得。

[0041] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株YTT-2分泌的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的亚型为IgG2a型。

[0042] 用常规间接非接竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)法测得YTT-2的鼠腹水抗体的效价可达1.2×10^5，即鼠腹水抗体稀释1.2×10^5倍时的溶液测定结果为阳性。常规间接竞争ELISA法鉴定其对环匹阿尼酸的灵敏度(IC_{50})为0.84ng/mL，对黄曲霉毒素B1，B2，G1，G2，M1和杂色曲霉毒素的交叉反应率均小于0.1％。

[0043] 杂交瘤细胞株YTT-2的筛选：

[0044] 1.抗原合成及动物免疫

[0045] 购买市售环匹阿尼酸标准品进行完全抗原合成，具体的合成步骤如下：将1mg CPA溶于1mL0.05M $NaHCO_3$的50％甲醇水溶液中；取2mg血蓝蛋白(KLH)加入0.4ml3M醋酸钠，在室温搅拌条件下，1min内逐滴加入0.2mL甲醛，持续搅拌10min；将CPA逐滴缓慢加入到KLH中，室温条件下持续搅拌16h以上。将最终反应产物CPA-KLH置于合适大小透析袋内，于PBS中4℃揽拌透析三天。同样方法合成检测原CPA-OVA。

[0046] 购买6周龄雌性BaLb/c小鼠6只，免疫自行合成的环匹阿尼酸完全抗原CPA-KLH，免疫剂量为100μg/只。第一次免疫将完全抗原CPA-KLH与弗氏完全佐剂混合乳化，进行背部皮下多点注射免疫。初免间隔3周，之后每次间隔2周进行免疫，使用弗氏不完全佐剂乳化进行免疫。从第三次免疫一周后，进行尾静脉采血，分离血清，采用间接ELISA法监测小鼠血清抗体效价，用间接竞争ELISA法测定小鼠血清灵敏度，选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行最后一次冲刺免疫，融合前3天取100μg免疫原溶于200μL PBS直接注射腹腔。弗氏佐剂购于Sigma-Aldrich公司。

[0047] 2.细胞融合

[0048] 最后一次冲刺免疫3天后，采用50％(重量百分数)的聚乙二醇即PEG(分子量为1450)作融合剂，按常规方法进行细胞融合，具体步骤如下：

[0049] 颈椎脱臼法处死免疫小鼠，在无菌条件下摘取脾脏，研磨分离脾细胞，与鼠源骨髓瘤细胞SP2/0按5:1个数比混合，用RPMI-1640基础培养液洗混合细胞，用50％PEG融合，融合1 分钟，然后加满RPMI-1640基础培养液，离心，移去上清，小鼠脾细胞和鼠源骨髓瘤细胞SP2/0形成的融合细胞用72mLRPMI-1640基础培养液重悬，将重悬起来的细胞滴加到96孔细胞培养板内，2滴/孔，置37℃二氧化碳培养箱养，所述的RPMI-1640基础培养液为含有 20％(体积百分数)胎牛血清，2％(重量百分数)生长因子和1％(重量百分数)次黄嘌呤- 氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT。上述SP2/0购于上海泛柯生物科技有限公司；RPMI-1640 基础培养液购于Hyclone公司；1％次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT购于Sigma- Aldrich公司。

[0050] 3.细胞株的筛选及克隆

[0051] 待细胞融合后第12天左右，细胞集落长到占孔底1/2面积大小，培养液变黄，即可进行抗体检测。采用ELISA方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选，筛选分两步进行，第一步采用间接非竞争ELISA法筛选出抗环匹阿尼酸而不抗载体蛋白KLH的阳性孔；第二步采用间接竞争ELISA法对第一步筛选出的阳性孔进行检测，以环匹阿尼酸作为竞争原，选择吸光值和灵敏度均较高的孔(吸光值较高指竞争原为0的孔即阳性对照孔的最终测定值较高，灵敏度较高指抑制率为50％时的竞争原浓度亦即IC_{50}值较小)，采用有限稀释法进行克隆，克隆后10天左右采用同样的两步法进行检测，如此重复克隆2-3次后，获得杂交瘤细胞株YTT-2，保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏地址是，中国，武汉，武汉大学，保藏编号为CCTCC NO.C201871，保藏日期为2018年3月23日。

[0052] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株系YTT-2抗体可变区序列测定

[0053] (1)提取总RNA：采用天根公司的总RNA提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株YTT-2的总RNA。

[0054] (2)合成cDNA：以步骤1获得的总RNA为模板，$oligo(dT)_{15}$为引物，按照SuperScript™-2II反转录酶说明书进行反转录，合成cDNA第一链；引物$oligo(dT)_{15}$由

Invitrogen购得；

[0055] (3)PCR法克隆可变区基因：根据GENBANK中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物，以CDNA为模版扩增抗体重链、轻链可变区基因。PCR程序为：94℃30s、55℃50s、72℃1min，扩增30个循环，最后72℃延伸10min。PCR产物经过1％(重量百分数)的琼脂糖凝胶电泳分离后，用试剂盒纯化回收DNA片段，连接在载体pMD18-T中，转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞，挑取阳性克隆，送至苏州泓迅生物科技有限公司进行测序。其中引物的序列分别为：重链可变区引物为5’-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3’(22mer)和5’- TGA GGA GACGGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3’(32mer)其中S、M、R和W为兼并碱基，M＝A/C，R＝A/G，S＝C/G，W＝A/T，轻链可变区引物为5’-GAC ATT GAG CTC ACC CAG CTT GGT GCC-3’(24mer)和5’-CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC-3’ (24mer)。

[0056] 得到的基因序列结果：重链可变区编码基因序列长360bp，序列如SEQ ID NO:1所示，根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由120个氨基酸组成，序列如 SEQ ID NO:3所示。轻链可变区编码基因序列长322bp，序列如SEQ ID NO:2所示，根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由107个氨基酸组成，序列如SEQ ID NO:4所示。

[0057] 实施例4：

[0058] 净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸复合免疫亲和柱的制备

[0059] 1.基质制备

[0060] 称取所需1g的琼脂糖凝胶(Sepharose)冻干基质粉末(每克冻干基质粉末可形成3.5mL终体积的溶胀基质)，溶于1mmol/L HCl中。基质将会立即溶胀，然后置于烧结玻璃过滤器中使用1mmol/L HCl洗涤15min。

[0061] 2.配体(抗体)偶联

[0062] a使用偶联缓冲液0.2mol/L $NaHCO_3$ pH8.3溶解待偶联的上述黄曲霉毒素通用单克隆抗体、杂色曲霉毒素单克隆抗体和环匹阿尼酸单克隆抗体，每个抗体浓度为12.5mg/mL，溶解的抗体置于冰浴中暂存。在一个带盖的可完全密封的容器中加入上述含有抗体的偶联缓冲液。迅速将CNBr活化的Sepharose转移到抗体溶液中。室温条件(20-25℃)下充分混匀上述的混和物2-4h。

[0063] b偶联率的计算：2,000rpm离心，将sepharose离心至管底，将上清液转移至新的离心管中，测定上清液的蛋白质含量值。计算偶联率为98.5％(说明偶联很成功)。取离心至管底的sepharose，使用偶联缓冲液进行洗涤，除去多余的配体。

[0064] c封闭：转移基质至0.1mol/L Tris-HCl缓冲液中。室温条件下静置2-4h，封闭所有残留的活性基团。

[0065] d为除去偶联后未偶联上的多余的配体，依次用pH值为4和8的缓冲液即0.1mol/L醋酸/ 醋酸钠缓冲液和0.1mol/L Tris-HCl缓冲液对基质进行洗涤，至少洗涤3个循环，每种缓冲液的使用量至少5倍基质体积。每个洗涤循环步骤：先用0.1mol/L醋酸/醋酸钠缓冲液洗涤，接着再用0.1mol/L Tris-HCl缓冲液进行洗涤。

[0066] e用5倍胶体积的0.01％NaN_3-PBS洗涤，并使用0.01％NaN_3-PBS保存。

[0067] 3.装柱使用结合缓冲液制备浆液，以75％沉降基质和25％磷酸盐缓冲液(pH7.0)的比例进行混合。以连续性的操作向柱内倾入浆液。使用一个斜靠在柱内壁上的玻璃棒进

行填柱操作，将有助于减少气泡的产生。填柱后，关闭亲和柱下端的开口，并取下亲和柱的顶端部件。仔细操作，使用pH7.0的PBS缓冲液加入充填亲和柱的余下部分，以在亲和柱的顶端形成一个向上的弯液面。将顶端筛板以一定的角度插入到亲和柱中，确保在筛板的下方没有空气。将筛板锁定在基质表面适当的位置上，打开亲和柱下方的开口，用5倍柱床体积的无菌过滤的0.01％NaN3-PBS过柱，并使用0.01％NaN3-PBS保存，至此黄曲霉菌真菌毒素亲和柱已装填并平衡完毕，可直接供使用。

[0068] 实施例5：玉米中的黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸的检测

[0069] 1.玉米中的黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸的检测

[0070] 玉米添加回收实验：阴性玉米样品磨细，分别添加500μg/kg，1000μg/kg，2000μg/kg三个浓度梯度的环匹阿尼酸和10μg/kg，20μg/kg，50μg/kg三个浓度梯度的黄曲霉毒素B_1、黄曲霉毒素B_2、黄曲霉毒素G_1、黄曲霉毒素G_1和杂色曲霉毒素。每个实验做五组平行试验。

[0071] 三个梯度：

[0072] 第1个实验添加量：500μg/kg环匹阿尼酸、10μg/kg黄曲霉毒素B_1、10μg/kg黄曲霉毒素B_2、10μg/kg黄曲霉毒素G_1、10μg/kg黄曲霉毒素G_2和10μg/kg杂色曲霉毒素。

[0073] 第2个实验添加量：1000μg/kg环匹阿尼酸、20μg/kg黄曲霉毒素B_1、20μg/kg黄曲霉毒素 B_2、20μg/kg黄曲霉毒素G_1、20μg/kg黄曲霉毒素G_2和20μg/kg杂色曲霉毒素。

[0074] 第3个实验添加量：2000μg/kg环匹阿尼酸、50μg/kg黄曲霉毒素B_1、50μg/kg黄曲霉毒素 B_2、50μg/kg黄曲霉毒素G_1、50μg/kg黄曲霉毒素G_2和50μg/kg杂色曲霉毒素。

[0075] 加标玉米中黄曲霉毒素B_1、黄曲霉毒素B_2、黄曲霉毒素G_1、黄曲霉毒素G_1、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的提取：

[0076] 称取5g上述加标玉米样品，加入20mL体积浓度为70％的甲醇水溶液，涡旋震荡提取 30分钟，离心取上清，将上层清液用pH7.4 PBS稀释10倍，得到待测提取液。将免疫亲和柱连接于10.0mL玻璃注射器下。准确移取10.0mL样品提取液注入玻璃注射器中，将空气压力泵与玻璃注射器连接，调节压力使溶液以约6mL/min流速缓慢通复合过免疫亲和柱，直至2～3mL空气通过柱体。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。准确加入1.0mL色谱级甲醇洗脱，流速为1mL/min～2mL/min，收集全部洗脱液于玻璃试管中，供检测用。

[0077] 2.定量

[0078] 用进样器吸取不同浓度的黄曲霉毒素B_1、黄曲霉毒素B_2、黄曲霉毒素G_1、黄曲霉毒素 G_1、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的标准工作液注入高效液相色谱-质谱联用仪，得到各种毒素的高效液相色谱-质谱联用仪图和各毒素标准溶液的峰面积，绘制出各毒素的标准曲线，利用外标法标测得各毒素的含量。

[0079] 3.结果

[0080] 玉米加标回收率结果都在88.9-104.4％之间，RSD均小于10％。结果表明该方法完全满足玉米中黄曲霉毒素B_1、黄曲霉毒素B_2、黄曲霉毒素G_1、黄曲霉毒素G_1、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸检测的分析要求。结果分别见表1-表6。

[0081] 表1玉米中黄曲霉毒素B_1添加回收率结果

[0082]

黄曲霉毒素 B_1 添加浓度 μg/kg	回收率 1 %	回收率 2 %	回收率 3 %	回收率 4 %	回收率 5 %	RSD %
10.0	94.5	98.2	103.3	90.7	92.3	5.3
20.0	90.1	99.1	92.6	94.8	88.9	4.4
50.0	94.6	87.6	95.3	100.5	95.4	4.9

[0083]

[0084] 表2玉米中黄曲霉毒素B_2添加回收率结果

黄曲霉毒素 B_2 添加浓度 μg/kg	回收率 1 %	回收率 2 %	回收率 3 %	回收率 4 %	回收率 5 %	RSD %
10.0	89.6	102.1	96.3	90.4	88.9	6.0
20.0	90.7	91.6	89.7	96.1	90.1	2.8
50.0	97.6	90.4	89.3	94.6	98.2	4.3

[0085]

[0086] 表3玉米中黄曲霉毒素G_1添加回收率结果

黄曲霉毒素 G_1 添加浓度 μg/kg	回收率 1 %	回收率 2 %	回收率 3 %	回收率 4 %	回收率 5 %	RSD %
10.0	98.1	89.6	103.2	90.3	96.2	5.9
20.0	88.7	90.4	94.4	97.5	96.1	4.0
50.0	96.2	101.4	89.8	92.7	97.6	4.7

[0087]

[0088] 表4玉米中黄曲霉毒素G_2添加回收率结果

黄曲霉毒素 G_2 添加浓度 μg/kg	回收率 1 %	回收率 2 %	回收率 3 %	回收率 4 %	回收率 5 %	RSD %
10.0	103.3	91.6	98.4	91.9	88.9	6.2
20.0	103.5	89.6	101.1	95.8	93.5	5.8
50.0	90.3	96.6	104.4	97.2	102.4	5.6

[0089]

[0090] 表5玉米中杂色曲霉毒素添加回收率结果

杂色曲霉毒素添加浓度 μg/kg	回收率 1 %	回收率 2 %	回收率 3 %	回收率 4 %	回收率 5 %	RSD %
10.0	96.4	93.7	89.3	92.2	98.4	3.8
20.0	91.5	92.8	93.5	89.6	97.5	3.2
50.0	101.9	103.1	99.3	97.5	92.9	4.1

[0091]

[0092] 表6玉米中环匹阿尼酸添加回收率结果

[0093]

环匹阿尼酸加浓度 μg/kg	回收率 1 %	回收率 2 %	回收率 3 %	回收率 4 %	回收率 5 %	RSD %
500.0	91.6	95.7	94.5	92.3	99.2	3.2
1000.0	103.1	101.6	98.8	94.5	97.3	3.5
2000.0	94.6	89.8	95.6	92.7	96.5	2.8

[0094]

<110> 中国农业科学院油料作物研究所
<120> 净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂及复合亲和柱
<160> 4
<210> 1
<211> 360bp
<212> DNA
<213> 小鼠
<400> 1
gagatccagc tgcagcagtc tggacctgac ctgatgaagc ctggggcttc 50
agtgaagata tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact acctactaca 100
tgcactgggt gaagcagagc catggaaaga gccttgagtg gattggatat 150
attgatcctt tcaatggtga tactaggtac aacccgaaat tcaaggccaa 200
ggccacattg actgtagaca aatcttccag cacagcctac atgcagctca 250
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagtttat 300
tactacggta gtagctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac 350
tgtctctgca 360
<210> 2
<211> 322bp
<212> DNA
<213> 小鼠
<400> 2
gacatcctga tgacccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga 50
cacagtcacc atcacttgcc atgcaagtca gggcattagc agtaatatag 100
ggtggttgca gcagaaacca gggaaatcat ttaagggcct gatctatcaa 150
ggaagcaact tggaagatgg agttccatca aggttcagtg gcagtggatc 200
tggagcagat tattctctca ccatcagcag cctggaatat gaagattttg 250
cagactatta ctgtgtacag tttgctcagt ttcctcccac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa ac 322
<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 3
Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Met Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
20 25 30
Thr Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Asp Thr Arg Tyr
50 55 60

Asn Pro Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser
95 100 105

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
110 115 120

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser
20 25 30

Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln
80 85 90

Phe Ala Gln Phe Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
95 100 105

Leu Lys

107

专利名称(译)	净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂及复合亲和柱		
公开(公告)号	CN110133250A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910363222.2	申请日	2019-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	张奇 李培武 姜俊 白艺珍 张文		
发明人	张奇 李培武 姜俊 白艺珍 张文		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/531 G01N30/02 G01N30/08 B01J20/286 B01D15/22 B01D15/08		
CPC分类号	B01D15/08 B01D15/22 B01J20/286 G01N30/02 G01N30/08 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/577 G01N2030/067		
代理人(译)	乔宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种净化黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂及复合亲和柱。黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗杂色曲霉毒素单克隆抗体和抗环匹阿尼酸单克隆抗体，所述的环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生的单克隆抗体。本发明提供的黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、环匹阿尼酸免疫亲和柱可用于同时含有三种黄曲霉菌毒素样品的净化-检测前处理，三种之间无相互干涉影响，性能稳定，进而通过使用本亲和柱建立了一种经济，快捷，精确，安全的高效液相色谱-质谱联用仪检测方法。

黄曲霉毒素B1添加浓度	回收率1	回收率2	回收率3	回收率4	回收率5	RSD
μg/kg	%	%	%	%	%	%
10.0	94.5	98.2	103.3	90.7	92.3	5.3