

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810034739.9

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月13日

[11] 公开号 CN 101241128A

[22] 申请日 2008.3.18

[21] 申请号 200810034739.9

[71] 申请人 上海大学

地址 200444 上海市宝山区上大路99号

[72] 发明人 陈宇光 戴小峰 田汉莉 沈彦萍
顾 鸣 黎双华

[74] 专利代理机构 上海上大专利事务所
代理人 何文欣

权利要求书2页 说明书6页

[54] 发明名称

黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法。该方法的具体步骤为：酰肼化抗体的制备：用过碘酸钠将抗体非结合活性区域Fc端羟基氧化成醛基，再与己二酸二酰肼反应，生成酰肼化抗体；醛基化固相基质的制备：将含有连二醇结构的固相基质用过碘酸钠氧化，得到醛基化的固相基质；抗体与固相基质的偶联：将酰肼化抗体和醛基化的固相基质混合，振荡反应，待反应结束后，再加入硼氢化钠封闭固相基质上未反应的醛基，得到偶联抗体的固相基质；装柱。本发明将抗体的非结合活性区域Fc端定向偶联到固相基质上，更好地保持抗体的活性；将抗体衍生上酰肼，而不是固相基质，避免酰肼基团可能带来的非特异性吸附；合成好的亲和柱，除偶联抗体外，未引入新基团(如羧基、氨基等)，避免由此可能引起的非特异性吸附。

1. 一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法，其特征在于该方法的具体步骤为：
 - a. 酰肼化抗体的制备：用过碘酸钠将抗体非结合活性区域Fc端羟基氧化成醛基，再与己二酸二酰肼反应，生成酰肼化抗体；
 - b. 醛基化固相基质的制备：将含有连二醇结构的固相基质用过碘酸钠氧化，得到醛基化的固相基质；
 - c. 抗体与固相基质的偶联：将步骤a所得酰肼化抗体和步骤b所得醛基化的固相基质混合，振荡反应，待反应结束后，再加入硼氢化钠封闭固相基质上未反应的醛基，得到偶联抗体的固相基质；
 - d. 装柱。
2. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法，其特征在于所述的含有连二醇结构的固相基质有：糖类或硅胶。
3. 根据权利要求2所述的黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法，其特征在于所述的糖类有：sepharsoe、sephadex 或纤维素。
4. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法，其特征在于所述的酰肼化抗体的具体步骤为：
 - a. 将黄曲霉毒素抗体用蒸馏水溶解，再将该抗体溶液对 pH 5.8 0.2M 磷酸钠缓冲液透析；
 - b. 在步骤a所得抗体溶液中按抗体：过碘酸钠=1：0.05~0.2 的质量比加入过碘酸钠，室温避光搅拌反应1小时，过 Sephadex G25 分离抗体，得到醛基化的抗体；
 - c. 向步骤b所得醛基化的抗体中加入 pH 5.8 的己二酸二酰肼水溶液，加入量为每毫克抗体加入 0.5~2 毫克己二酸二酰肼，4℃反应过夜，对 0.2M 磷酸钠 pH 5.8 透析，即得酰肼化抗体。
5. 根据权利要求1、2或3所述的黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法，其特征在于所述的醛基化固相基质的具体步骤如下：将含有连二醇结构的固相基质，用 0.5M NaCl 淋洗，再用蒸馏水洗涤，抽干；再将该固相基质和过碘酸钠按 1：0.1~0.2 的质量比溶于蒸馏水中，室温振荡反应2小时，用 0.5M NaCl 淋洗，再用蒸馏水、0.2M 磷酸钠 pH 5.8 洗涤，抽干，即得醛基化的固相基质。
6. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法，其特征在于所述的抗体与固相基质的偶联的具体步骤为：

-
- a. 抗体与固相基质的偶联：将上述的酰肼化抗体溶液的浓度调整为 3~5mg/ml，加入到上述的醛基化的固相基质中，其用量比为：每克醛基化的固相基质加入 3~5 毫克酰肼化抗体，4℃振荡反应 24 小时，依次用蒸馏水、1M NaCl、蒸馏水及 0.2M pH 7.0 磷酸钠缓冲液洗涤，抽干，得到偶联抗体的固相基质；
 - b. 将步骤 a 所得偶联抗体的固相基质和硼氢化钠溶于 pH 7.0 磷酸钠缓冲液中，其用量为：每克偶联抗体的固相基质加入 4~12 毫克硼氢化钠；4℃振荡反应 4 小时，依次用蒸馏水、1M NaCl、蒸馏水，0.5 M NaCl 洗涤，即得到所需的偶联抗体的固相基质。

黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法

技术领域:

本发明涉及一种免疫亲和柱的制备方法,特别是一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法。

背景技术:

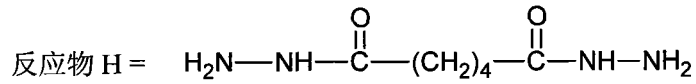
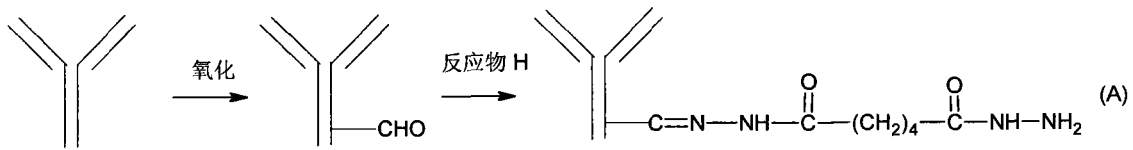
黄曲霉毒素(AFT)是一组真菌的次级代谢毒性产物。在全世界范围内,AFT污染比较严重。1993年AFT被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为I类致癌物。在天然污染的食品和饲料中以黄曲霉毒素 B_1 (AFB₁)最为常见,是黄曲霉菌产生毒素中的主要成分,其毒性和致癌性也最强,不仅给社会带来重大的经济损失,而且严重威胁消费者的健康。世界各国及地区均制定了严格的AFT限量标准,且限量要求日益严格。目前黄曲霉毒素的检测方法有薄层层析法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附法、放射免疫测定法、免疫亲和层析柱-高效液相色谱法、免疫亲和层析柱-荧光光度法等。薄层层析法,耗时,需大量接触标准品,不利于操作者的健康及环保,灵敏度低。放射免疫测定法,存在放射线辐射和污染等问题。酶联免疫吸附测定法重复性差,试剂寿命短。高效液相色谱法样品处理烦琐,操作复杂。而免疫亲和层析柱-高效液相色谱法和免疫亲和层析柱-荧光光度法,快速、灵敏、准确,已被国家标准GB/T 18979-2003所采用。因此有必要制备性能稳定、结果可靠的黄曲霉毒素免疫亲和柱。目前制备免疫亲和柱的方法大概有:溴化氰,环氧氯丙烷法,过碘酸钠法,蛋白A法等。其中溴化氰偶联效率高,但基质和配体偶联后生成的异脲衍生物中氨基的 $pK_a=10.4$,所以通常会带一定的正电荷,从而使基质可能有阴离子离子交换作用,增大了非特异性吸附,另外溴化氰活化的基质与配体结合不够稳定,可能会出现配体脱落现象,而且溴化氰有剧毒、易挥发,所以操作不便。环氧氯丙烷法用于偶联大分子时,偶联效率低。蛋白A法用于偶联抗体,可以使抗体的非结合活性区域Fc连接到载体上,更好的保持抗体活性,但蛋白A较贵,用于交联抗体不经济。

发明内容

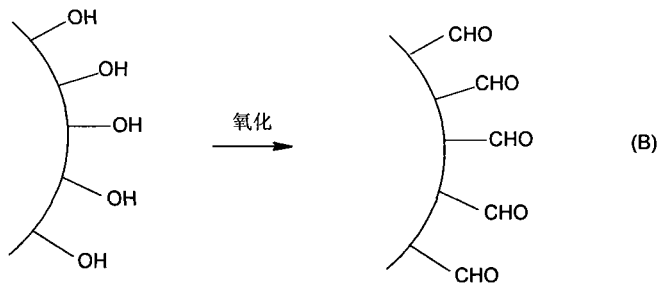
本发明的目的在于克服现有技术中存在的问题,提供一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法。

为达到上述目的,本发明采用如下反应机理:首先用过碘酸钠将黄曲霉毒素抗体Fc端衍生出酰肼;再利用过碘酸钠将固相基质氧化产生醛基,最后将含酰肼的抗体与含醛基的固相基质偶联。具体如下:

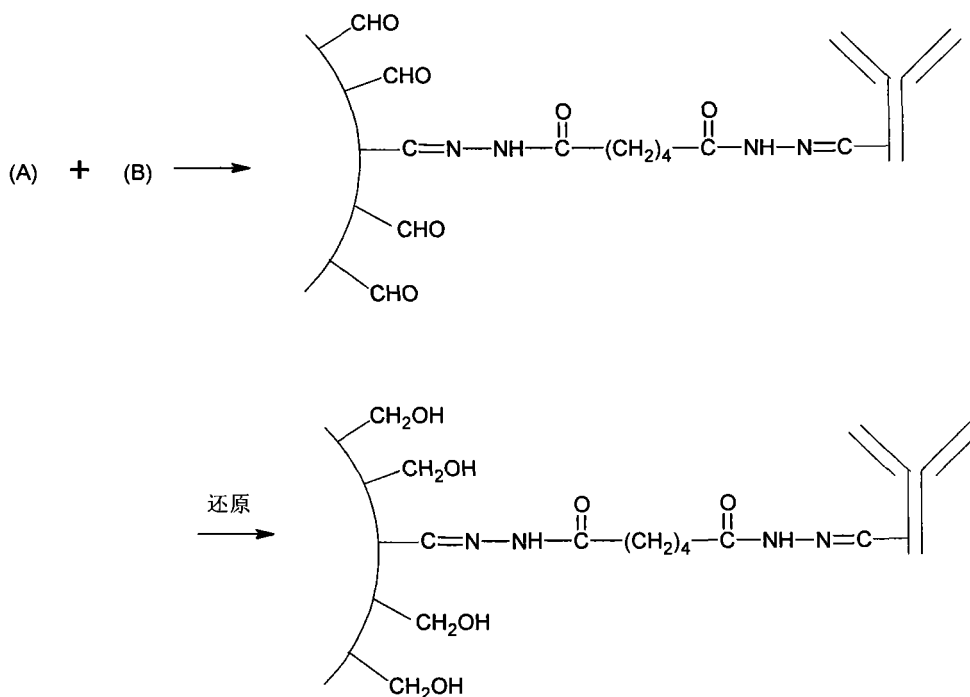
1. 酰肼化抗体的制备



2. 醛基化固相基质的制备



3. 抗体与固相基质的偶联



根据上述机理，本发明采用如下技术方案：

一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法，其特征在于该方法的具体步骤为：

a. 酰肼化抗体的制备：用过碘酸钠将抗体非结合活性区域 Fc 端羟基氧化成醛基，

再与己二酸二酰肼反应，生成酰肼化抗体；

- b. 醛基化固相基质的制备：将含有连二醇结构的固相基质用过碘酸钠氧化，得到醛基化的固相基质；
- c. 抗体与固相基质的偶联：将步骤 a 所得酰肼化抗体和步骤 b 所得醛基化的固相基质混合，振荡反应，待反应结束后，再加入硼氢化钠封闭固相基质上未反应的醛基，得到偶联抗体的固相基质；
- d. 装柱。

上述的含有连二醇结构的固相基质有：糖类或硅胶。

上述的糖类有：sepharsoe、sephadex 或纤维素。

上述的酰肼化抗体的具体步骤为：

- a. 将黄曲霉毒素抗体用蒸馏水溶解，再将该抗体溶液对 pH 5.8 0.2M 磷酸钠缓冲液透析；
- b. 在步骤 a 所得抗体溶液中按抗体：过碘酸钠=1：0.05~0.2 的质量比加入过碘酸钠，室温避光搅拌反应 1 小时，过 Sephadex G25 分离抗体，得到醛基化的抗体；
- c. 向步骤 b 所得醛基化的抗体中加入 pH 5.8 的己二酸二酰肼水溶液，加入量为每毫克抗体加入 0.5~2 毫克己二酸二酰肼，4℃反应过夜，对 0.2M 磷酸钠 pH 5.8 透析，即得酰肼化抗体。

上述的醛基化固相基质的具体步骤如下：将含有连二醇结构的固相基质，用 0.5M NaCl 淋洗，再用蒸馏水洗涤，抽干；再将该固相基质和过碘酸钠按 1：0.1~0.2 的质量比溶于蒸馏水中，室温振荡反应 2 小时，用 0.5M NaCl 淋洗，再用蒸馏水、0.2M 磷酸钠 pH 5.8 洗涤，抽干，即得醛基化的固相基质。

上述的抗体与固相基质的偶联的具体步骤为：

- a. 抗体与固相基质的偶联：将上述的酰肼化抗体溶液的浓度调整为 3~5mg/ml，加入到上述的醛基化的固相基质中，其用量比为：每克醛基化的固相基质加入 3~5 毫克酰肼化抗体，4℃振荡反应 24 小时，依次用蒸馏水、1M NaCl、蒸馏水及 0.2M pH 7.0 磷酸钠缓冲液洗涤，抽干，得到偶联抗体的固相基质；
- b. 将步骤 a 所得偶联抗体的固相基质和硼氢化钠溶于 pH 7.0 磷酸钠缓冲液中，其用量为：每克偶联抗体的固相基质加入 4~12 毫克硼氢化钠；4℃振荡反应 4 小时，依次用蒸馏水、1M NaCl、蒸馏水，0.5 M NaCl 洗涤，即得到所需的偶联抗体的固相基质。

与现有技术相比,本发明抗体偶联方法具有以下显而易见的特点和显著的优点:1)将抗体的非结合活性区域 Fc 端定向偶联到固相基质上,更好地保持抗体的活性;2)将抗体衍生上酰肼,而不是固相基质,避免酰肼基团可能带来的非特异性吸附;3)合成好的亲和柱,除偶联抗体外,未引入新基团(如羧基、氨基等),避免由此可能引起的非特异性吸附。

具体实施方式

实施例一:本发明的一个优选实施例的具体步骤为:

1) 酰肼化抗体的制备

用硫酸胺沉淀腹水(黄曲霉毒素抗体),离心,去上清,沉淀加蒸馏水溶解,使抗体浓度约大于 25mg/ml,对 pH 5.8 0.2M 磷酸钠缓冲液透析。向抗体溶液中加入十分之一体积的 20~40mg/ml 过碘酸钠水溶液,室温避光搅拌反应 1 小时,过 Sephadex G25 分离抗体。向上述过碘酸钠氧化抗体加入过量己二酸二酰肼水溶液(pH 5.8)(每毫克抗体加入 0.5~2 毫克己二酸二酰肼),4℃反应过夜,对 0.2M 磷酸钠 pH 5.8 透析。

2) 醛基化固相基质(Sepharose 4B)的制备

取适量 Sepharose 4B 抽干,称取 15g,用 200ml 0.5M NaCl 淋洗,再用 500ml 蒸馏水洗涤,抽干。于胶中加入 150ml 蒸馏水及 2g 过碘酸钠。室温振荡反应 2 小时后,用 200ml 0.5M NaCl 淋洗,再用 500ml 蒸馏水、50ml 0.2M 磷酸钠 pH 5.8 洗涤,抽干、待用。

3) 抗体与固相基质的偶联

将酰肼化抗体的浓度将抗体浓度调为 3~5mg/ml,加入到上述醛基化 Sepharose 4B 中(每克 Sepharose 4B 加入 3~5 毫克酰肼化抗体),4℃振荡反应 24 小时,用 300ml 蒸馏水、300ml 1M NaCl、300ml 蒸馏水及 100ml 0.2M pH 7.0 磷酸钠缓冲液洗涤,抽干。向上述抽干的 Sepharose 4B 中加入 20ml pH 7.0 磷酸钠缓冲液及 100mg 硼氢化钠,4℃振荡反应 4 小时,用 300ml 蒸馏水、300ml 1M NaCl、300ml 蒸馏水,300ml 0.5 M NaCl 洗涤,待用。

4) 装柱

- ①取 1ml 注射器的注射针管,去除金属针头,酒精灯上烧结,密封出液口,做为亲和柱的下层密封盖。
- ②用下层密封盖,密封注射器的下端出液口,加入适合大小的垫片,用 1ml 枪吸取适量偶联黄曲霉毒素抗体的 Sepharose 4B 悬液注入注射器,加入 0.5M NaCl

注满注射器，静置使 Sepharose 4B 自然沉降，加入适合大小的垫片。

③放开下层密封盖，让溶液自然流出，去除下层空气。

④盖上下层密封盖，用 0.5M NaCl 注满注射器，用一个小塞子将注射针管上端密封,存于 4℃。

实施例二 免疫亲和柱荧光光度法测定黄曲霉毒素

在不含 AFT 的空白样品（加拿大小麦）中，分别添加 1、5、20、50ppb 黄曲霉毒素混合标准品（AFB₁，AFB₂，AFG₁，AFG₂），样品提取液用实施例一制备的亲和柱纯化，用荧光光度计测定浓度。具体操作方法参照国家标准 GB/T 18979-2003。结果如下参见表 1：

表 1 采用本发明制备的免疫亲和柱和荧光光度法测定黄曲霉毒素的结果

添加 AFT 浓度 (ppb)	实测值 (ppb)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	变异系数 (%)
1.0	0.93	93.0	99.3	8.7
	1.1	110.0		
	0.98	98.0		
	0.95	95.0		
	0.9	90.0		
	1.1	110.0		
5.0	4.3	86.0	97.0	5.9
	5.0	100.0		
	5.0	100.0		
	4.9	98.0		
	4.8	96.0		
	5.1	102.0		
20.0	19	95.0	96.7	5.3
	20	100.0		
	18	90.0		
	19	95.0		
	21	105.0		
	19	95.0		
50.0	38	76.0	82.7	9.3
	41	82.0		
	38	76.0		
	47	94.0		
	45	90.0		
	39	78.0		

从以上数据可以看出，在空白样品加拿大小麦中对 AFT 进行 4 个水平浓度添加回收率实验，平均回收率 82.7~99.3%，变异系数 5.3~9.3%，这表明用本发明制备的黄曲霉毒素免疫亲和柱性能稳定、结果可靠，完全可以满足黄曲霉毒素检测的要求。

专利名称(译)	黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法		
公开(公告)号	CN101241128A	公开(公告)日	2008-08-13
申请号	CN200810034739.9	申请日	2008-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海大学		
申请(专利权)人(译)	上海大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海大学		
[标]发明人	陈宇光 戴小峰 田汉莉 沈彦萍 顾鸣 黎双华		
发明人	陈宇光 戴小峰 田汉莉 沈彦萍 顾鸣 黎双华		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	何文欣		
其他公开文献	CN101241128B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种黄曲霉毒素免疫亲和柱的制备方法。该方法的具体步骤为：酰肼化抗体的制备：用过碘酸钠将抗体非结合活性区域Fc端羟基氧化成醛基，再与己二酸二酰肼反应，生成酰肼化抗体；醛基化固相基质的制备：将含有连二醇结构的固相基质用过碘酸钠氧化，得到醛基化的固相基质；抗体与固相基质的偶联：将酰肼化抗体和醛基化的固相基质混合，振荡反应，待反应结束后，再加入硼氢化钠封闭固相基质上未反应的醛基，得到偶联抗体的固相基质；装柱。本发明将抗体的非结合活性区域Fc端定向偶联到固相基质上，更好地保持抗体的活性；将抗体衍生上酰肼，而不是固相基质，避免酰肼基团可能带来的非特异性吸附；合成好的亲和柱，除偶联抗体外，未引入新基团(如羧基、氨基等)，避免由此可能引起的非特异性吸附。

