



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105396560 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201510869869. 4

(22) 申请日 2015. 12. 02

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府
大道 999 号

(72) 发明人 涂迨 许杨 熊勇华 李燕萍
黄志兵

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

B01J 20/24(2006. 01)

B01J 20/30(2006. 01)

B01J 20/281(2006. 01)

B01D 15/10(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表4页

(54) 发明名称

基于抗黄曲霉毒素单域重链抗体的亲和吸附
材料

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,涉及一种基于单域重链抗体的免疫亲和吸附材料,特别是针对黄曲霉毒素的免疫亲和吸附材料。包括载体,搭载在载体上的配基,其特征在于该材料以特异性识别黄曲霉毒素的单域重链抗体作为配基,所述特异性识别黄曲霉毒素的单域重链抗体具有SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列。该抗体具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性,对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

1. 一种黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料,包括载体,搭载在载体上的配基,其特征在于该材料以特异性识别黄曲霉毒素的单域重链抗体作为配基,所述特异性识别黄曲霉毒素的单域重链抗体具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料,其特征在于,所述配基为在 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列基础上通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与黄曲霉毒素特异性结合的抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料,其特征在于,所述载体为磁珠。

4. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料,其特征在于,所述载体为琼脂糖凝胶或硅胶微球或多孔材料。

5. 装载有权利要求 1 所述黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料的亲和层析柱。

6. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料在黄曲霉毒素免疫检测、富集以及纯化中的应用。

7. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料在去除黄曲霉毒素、净化黄曲霉毒素污染物料中的应用。

基于抗黄曲霉毒素单域重链抗体的亲和吸附材料

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于单域重链抗体（又称纳米抗体技术）的免疫亲和吸附材料，特别是针对黄曲霉毒素的免疫亲和吸附材料。

技术背景

[0002] 黄曲霉毒素是一类主要由黄曲霉菌、寄生曲霉菌等真菌产生的剧毒次级代谢产物。它们的化学结构类似，为二呋喃香豆素衍生物，主要包括黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、B₂ (AFB₂)、G₁ (AFG₁)、G₂ (AFG₂) 和 M₁ (AFM₁) 等。在天然污染的食品和饲料中，AFB₁ 的污染最为常见，其毒性和致癌性也最强，被世界卫生组织的癌症研究机构划定为 I 类致癌物。世界各国及地区指定了严格的黄曲霉毒素限量标准，例如欧盟婴幼儿食品中 AFB₁ 允许量 $\leq 0.10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0003] 现有的黄曲霉毒素检测方法主要有仪器分析法、免疫分析法以及薄层层析法。其中仪器分析法具有灵敏度高、准确性和重复性好等优点，但是对于分析样品前处理要求较高，需要尽量去除样品中的杂质以减少对后续检测的干扰。传统的前处理方法有液相萃取、固相萃取等，处理过程繁琐且特异性不高。亲和层析技术基于配基与待测物质之间特异性的识别，可通过一步操作实现对复杂混合样品中待测物的分离纯化。目前使用的黄曲霉毒素亲和纯化介质一般采用多克隆抗体或单克隆抗体作为配基，存在不耐有机试剂、活性迅速降低的问题。因此，需要开发活性高、稳定性好的新型配基替换传统抗体。单域重链抗体是由羊驼重链抗体的可变区组成，又称为纳米抗体，具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性，相较于传统抗体具有明显的优势。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种针对黄曲霉毒素的免疫亲和吸附材料及其应用。

[0005] 为实现上述目的，本发明采用如下技术方案：

[0006] 针对黄曲霉毒素的免疫亲和吸附材料包括载体和配基，所述配基为单域重链抗体，具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列。该配基可特异性识别黄曲霉毒素。

[0007] 所述配基还可以为在前述单域重链抗体基础上通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与黄曲霉毒素特异性结合的抗体。

[0008] 所述载体为磁珠、琼脂糖凝胶微球、硅胶微球或多孔材料。

[0009] 上述黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料的制备方法，其特征为：

[0010] 所述载体为磁珠时，制备方法为：取 1mg 羧基磁珠于离心管中，加入 500 ~ 1000 μl 活化缓冲液 (10mM, NaH₂PO₄, pH6.0)，涡旋混合均匀，磁力架回收磁珠，再用活化缓冲液洗涤 2 遍。分别加入 1 ~ 5mg 碳二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，涡旋混合后，静置 30min。用偶联缓冲液 (10mM, Na₂HPO₄, pH 7.4) 洗涤磁珠 3 遍，加入抗黄曲霉毒素单域重链抗体，室温反应 2 ~ 6h，得到共价偶联了抗黄曲霉毒素单域重链抗体的免疫磁珠；

[0011] 所述载体为琼脂糖凝胶微球时，制备方法为：将 CNBr 活化的干胶用 0.1M HCl 洗涤

10 ~ 15 次,每次平衡 5 ~ 10min。用偶联缓冲液 (10mM, Na_2HPO_4 , pH 7.4) 洗涤 5 ~ 15 次,加入抗黄曲霉毒素单域重链抗体,室温反应 2 ~ 10h,得到共价偶联了抗黄曲霉毒素单域重链抗体的免疫亲和吸附材料;

[0012] 所述载体为硅胶微球时,制备方法为:将硅胶微球用纯水和磷酸缓冲液 (PBS, 10mM, pH 6.0) 交替洗涤 5 ~ 10 次,用 PBS 缓冲液悬浮硅胶微球,加入抗黄曲霉毒素单域重链抗体,混匀,加入终浓度 1 ~ 10mg/ml 的碳二亚胺 (EDC),迅速混匀,4℃ 搅拌反应 12 ~ 24h,得到共价偶联了抗黄曲霉毒素单域重链抗体的免疫亲和吸附材料。

[0013] 将上述免疫亲和吸附材料 (载体为琼脂糖凝胶微球和硅胶微球) 装填至层析柱,即得到黄曲霉毒素免疫亲和层析柱,方法为:根据层析柱容量,取适量上述免疫亲和吸附材料于层析柱,加入 5 ~ 10 倍柱床体积的 PBS (10mM, pH 7.4) 洗涤后,4℃,保存于 20% 乙醇溶液。

[0014] 共价偶联了抗黄曲霉毒素单域重链抗体的免疫磁珠无需装柱,直接吸附后磁铁分离。

[0015] 本发明还涉及装载有所述黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料的亲和层析柱。

[0016] 上述黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料的应用,用所述黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料对样品提取液进行净化,富集黄曲霉毒素 (AFB_1 、 AFB_2 、 AFG_1 或 AFG_2)。黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料在去除黄曲霉毒素、净化黄曲霉毒素污染物料中的应用。这种处理不以疾病诊断治疗为目的。当免疫吸附材料的载体为琼脂糖凝胶微球和硅胶微球时,方法为:首先用纯水清洗免疫吸附材料,加入样品提取液,然后用纯水淋洗,再用甲醇洗脱特异性吸附的黄曲霉毒素,收集的洗脱液,即为净化和富集后的样品提取液,可用于后续分析检测。当载体为磁珠时,方法为:将免疫磁珠加入纯水中,磁力架回收磁珠,重复清洗 3 ~ 5 次,然后将免疫磁珠加入样品提取液中,混匀,磁力架回收磁珠,纯水清洗 1 ~ 3 次后,甲醇洗脱特异性吸附的黄曲霉毒素,收集的洗脱液,即为净化和富集后的样品提取液,可用于后续分析检测。

[0017] 本发明针对黄曲霉毒素的免疫亲和吸附材料配基为单域重链抗体,具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列,该配基可特异性识别黄曲霉毒素。该单域重链抗体容易获得,可以通过生物学方法大量培养生产配基为单域重链抗体,避免了人工抗体等繁琐生产方法,大大降低了生产成本。生产过程无需接触黄曲霉毒素,避免了对生产人员身体伤害。具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性,这些特性对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

具体实施方式

[0018] 下面通过黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料的制备及应用,对本发明做进一步说明,这些具体实施例不应以任何方式被解释为限制本发明的应用范围。

[0019] 实施例 1:

[0020] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体 (即针对黄曲霉毒素的单域重链抗体) 免疫文库的构建

[0021] 将黄曲霉毒素 B_1 与匙孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 共价偶联,得到黄曲霉毒素人工抗原 AFB_1 -KLH,取 300 μg AFB_1 -KLH 与弗氏完全佐剂乳化后,对羊驼 (Lama pacos) 进行皮下多点注射免疫。加强免疫采用 150 μg AFB_1 -KLH 与弗氏不完全佐剂

乳化,间隔 2 周进行,每次免疫 7 天后静脉取血,采用间接 ELISA 法测定血清效价,选择血清效价最高的样品分离淋巴细胞,提取 RNA。

[0022] RNA 的提取参照 TAKARA 公司 RNAiso 试剂说明书进行。以 RNA 为模板,oligo dT 为引物,参照 TAKARA 公司反转录酶说明书合成 cDNA 第一链。

[0023] 采用 PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶,经巢式 PCR 获得重链抗体的可变区编码基因(采用的引物见表 1)。第一轮 PCR 分别以引物 AlpVh-LD 和 CH2-R 扩增 cDNA,反应条件为,98℃,10s,55℃,20s,72℃,1min,20 个循环,98℃,10s,68℃,1min,72℃延伸 10min。

[0024] 将第一轮 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,回收 600bp ~ 750bp 的 DNA 片段,作为第二轮 PCR 的模板,分别用引物 AlpVh-SfiI 和 AlpVHHR1-NotI, AlpVh-SfiI 和 AlpVHHR2-NotI,进行扩增,反应条件为,98℃,10s,50℃,20s,72℃,40s,5 个循环,98℃,10s,68℃,40s,30 个循环,72℃延伸 10min。经 DNA 片段回收试剂盒回收、定量,于 -20℃ 保存备用。将噬菌粒 pHEN1 和 PCR 扩增产物分别用 Sfi I、Not I 双酶切,经琼脂糖凝胶回收、定量后,以 1 : 3 摩尔比,在 16℃,过夜连接。

[0025] 表 1 文库构建及鉴定所用的引物

[0026]

引物名称	序列
AlpVh-LD	5'-CTTGGTGGTCCTGGCTGC-3'
AlpVh-SfiI	5'-tcgcggccagccgcccattggccCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG-3'
AlpVHHR1-NotI	5'-cgagtgcggccgcGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'
AlpVHHR2-NotI	5'-cgagtgcggccgcTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'
CH ₂ -R	5'-GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3'

[0027]

M13-R	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'
pHEN-R	5'-GCCCCATTGAGATCCTCTTC-3'

[0028] 注:下划线表示限制性内切酶识别序列

[0029] 连接产物经乙醇沉淀后,溶于 10 μL 无菌水,分十次进行电穿孔转化大肠杆菌 TG1。取 10 μL 电击、培养后的菌液倍比稀释,涂布氨苄青霉素 2×YT 培养板,37℃,倒置培养 12 ~ 16h,采用引物 M13-R 和 pHEN-R 进行菌落 PCR,计算库容;其余部分全部涂布于 24cm×24cm 氨苄青霉素 2×YT 培养板,37℃,倒置培养 12 ~ 16h。用 10mL,2×YT 培养基将培养板上的菌苔刮洗后,加入终浓度 15 ~ 30% 甘油,分装,-80℃ 保存备用。

[0030] 根据计算的库容量结果,接种 10 倍库容量的活细胞于 20mL 的 2×YT(含 2% 葡萄糖,100 μg/mL 氨苄青霉素),30℃,220r/min 培养至 OD600 达 0.5,按感染复数 20 : 1 加入辅助噬菌体,37℃,220r/min,60min。将培养物离心,用 50mL 的 2×YT(含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 50 μg/mL 卡那霉素)重悬沉淀,30℃,220r/min 过夜培养后,3000g 离心取上清,加入 5×PEG/NaCl 溶液,冰上放置 1h 或 4℃过夜,12000rpm 离心 30min,重悬沉淀于含 10% 甘油的磷酸缓冲液(PBS,0.01M, pH 7.4),即得到抗黄曲霉毒素单域重链抗体免疫文库,取 10 μL 测定滴度,其余分装于 -80℃ 保存备用。

[0031] 实施例 2 :

[0032] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体的淘选与鉴定

[0033] 采用固相亲和淘选的方法从实施例 1 所得抗黄曲霉毒素单域重链抗体免疫文库文库中淘选针对黄曲霉毒素的单域重链抗体。将 AFB₁与卵清白蛋白(albumin, OVA) 共价

偶联,得到人工抗原 AFB₁-OVA。每孔加入 100 μL 用 PBS 稀释的人工抗原 AFB₁-OVA,4℃,包被过夜,每轮淘选的包被浓度分别为 100,75,50 μg/mL;吸出包被液,PBS 洗板 3 次,每孔加入 300 μL 3% BSA-PBS,37℃,封闭 2h;PBS 洗板 6 次,加入 100 μL 噬菌体抗体文库(约含 2×10^{11} CFU),37℃,孵育 1.5h;吸出未结合的噬菌体,用 PBST(含 0.5% Tween-20)洗板 5 次(逐轮增加 5 次),再用 PBS 洗板 10 次(洗板次数逐轮增加 5 次);以 100 μL 洗脱液(甘氨酸-盐酸,pH2.2)洗脱吸附在酶标孔中的噬菌体,用 50 μL Tris-HCl(1mol/L,pH 8.0)中和洗脱物,取 10 μL 用于滴度测定,其余洗脱物扩增后用于下一轮淘选。第二轮和第三轮淘选采用竞争洗脱,分别用 50 和 25ng/mL 的 AFB₁溶液在 37℃,孵育 1h。

[0034] 经三轮淘选后,采用辅助噬菌体 KM13 对随机挑取的单克隆进行救援,分别得到展示抗体可变区的噬菌体颗粒,再用间接 phage-ELISA 和间接竞争 phage-ELISA 测定噬菌体颗粒的结合活性和特异性,实验设定阴性对照及背景对照,具体加样步骤见表 2。

[0035] 表 2 间接 phage-ELISA 加样表

[0036]

	实验组	加标竞争	背景对照	空白对照 a
包被	AFB ₁ -OVA	AFB ₁ -OVA	OVA	AFB ₁ -OVA
封闭	1×Blocking buffer (3%脱脂牛奶 W/V)			
结合	噬菌体	噬菌体+ 黄曲霉毒素标准品	噬菌体	PBS
二抗	HRP/anti-M13			

[0037] 将 ELISA 阳性克隆送生物技术服务公司进行序列测定,得到插入片段的 DNA 序列,其编码针对黄曲霉毒素的单域重链抗体,具体如下 (SEQ ID NO. :2):

[0038] CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCGGGTGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGAAGCATCTATAGCCTCGTTGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCAGTGGGTGCGCAGATATTACTCGTGTGGTAACACAAACCATGCGAACTCCAGGGAGGACCGATTACCATCTCGACAGGTGTCCCCTGGAACACGGTGATTCTGTCTATGAACAGCCTGGAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTAATGCCCGAGTTACCTCCGGGCTTAATACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0039] 依据 DNA 测序结果及密码子表可获得针对黄曲霉毒素的单域重链抗体的氨基酸序列 (SEQ ID NO. :1):

[0040] QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIYSLVAMGWYRQAPGKQREWVADITRVGNTNHANSREDRFTISTGV PWNTVILSMNSLEPEDTAVYYCNARVTSGLNWYWGQGTQVTVSS

[0041] 采用间接竞争 phage-ELISA 法对阳性克隆与几种不同黄曲霉毒素亚型的交叉反应率进行测定,将 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂和 AFM₁五种标准品稀释至 12 个不同的工作浓度,在同样的条件下进行间接竞争 phage-ELISA 测定,分别绘制竞争 ELISA 曲线,计算抑制率为 50%时的标准品浓度 (IC₅₀),按照公式:交叉反应率(%) = (AFB₁IC₅₀/类似物 IC₅₀) × 100%,所述类似物为 AFB₂、AFG₁、AFG₂或 AFM₁,得到本发明阳性克隆(针对黄曲霉毒素的单域重链抗体)对于 AFB₁的 50%抑制浓度。结果表明,本发明阳性克隆(针对黄曲霉

毒素的单域重链抗体)对于 AFB₁ 具有较好的特异性,对 AFG₁和 AFG₂也有一定的结合能力。

[0042] 实施例 3:

[0043] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体的规模制备

[0044] 编码抗 AFB₁单域重链抗体的 DNA 片段的获取:1. 采用限制性内切酶 SfiI/NotI, 双酶切噬菌粒 pHEN- 抗 AFB₁单域重链抗体基因,琼脂糖凝胶电泳回收抗 AFB₁单域重链抗体基因;2. 直接将抗 AFB₁单域重链抗体编码序列送生物技术服务公司进行化学合成;3. 设计特异性引物,通过 PCR 技术从羊驼 (Lama pacos) 来源的 cDNA 库中扩增。

[0045] 将得到的抗 AFB₁单域重链抗体基因片段克隆至表达载体 pET25,经 PCR 和酶切鉴定,构建完成抗 AFB₁单域重链抗体的大肠杆菌表达质粒。

[0046] 将表达质粒转化至大肠杆菌 BL21,挑取单菌落进行诱导表达。将单菌落接入 4mL LBA (Luria-Bertani broth with 100 μg/mL ampicillin) 液体培养基中,37℃、250r/min 振荡培养 12h;以 1%培养基体积的接种量将其转接到 50mL LBA 液体培养基中,37℃、250r/min 振荡培养至 OD₆₀₀达到 0.5 (约需 2.5 ~ 3h),加入终浓度 0.1mM 的 IPTG,30℃、200r/min 诱导培养。

[0047] 诱导培养物 8000r/min 离心,在细胞沉淀中加入 20mL 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 混匀,8000r/min 离心,去上清,保留细胞沉淀;在细胞沉淀中加入 10mL 相同缓冲液,混匀,冰上超声波细胞破碎处理,超声破碎条件为 200W,破碎 2s,间歇 3s,共 240 个循环,在 4℃下对细胞破碎物 12000r/min 离心 20min,取上清进行亲和层析纯化和 SDS-PAGE 电泳分析,或在上清中加入终浓度 30%的甘油,混匀,保存于 -20℃冰柜待用。

[0048] 通过优化诱导表达条件 (如宿主菌、表达载体、诱导培养时间、温度以及 IPTG 浓度等),可以进一步提高目的蛋白 (单域重链抗体) 表达量,为大量制备抗 AFB₁单域重链抗体提供了途径。

[0049] 实施例 4 黄曲霉毒素免疫亲和磁珠的小量制备

[0050] 采用纳米磁珠作为载体,偶联抗黄曲霉单域重链抗体后,得到黄曲霉毒素免疫磁珠,具体制备方法如下:

[0051] 取 1mg 羧基修饰的磁珠 (购自无锡百运纳米科技有限公司,羧基磁珠 300nm) 于离心管中,加入 500 μl 活化缓冲液 (10mM, NaH₂PO₄, pH 6.0),涡旋混合均匀,磁力架回收磁珠,再用活化缓冲液洗涤 2 遍。分别加入 2mg 碳二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),涡旋混合后,静置 30min。用偶联缓冲液 (10mM, Na₂HPO₄, pH 7.4) 洗涤磁珠 3 遍,加入溶于偶联缓冲液的抗黄曲霉毒素单域重链抗体 1mg,室温反应 3h,用偶联缓冲液洗涤磁珠 3 次,加入 500 μl 含 1% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 或 1% (w/v) 卵清蛋白 (OVA) 的偶联缓冲液封闭未反应的活性基团,室温反应 30min。用偶联缓冲液洗涤磁珠 3 次,PBS 溶液 (10mM, pH 7.4, 0.02% w/v, Na₃N) 重悬后保存于 4℃。

[0052] 实施例 5 黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料及亲和柱的制备

[0053] 采用琼脂糖微球作为载体,偶联抗黄曲霉单域重链抗体,具体制备方法如下:

[0054] 将 CNBr 活化的干胶用 0.1M HCl 洗涤 10 次,每次平衡 5min。用偶联缓冲液 (10mM, Na₂HPO₄, pH 7.4) 洗涤 10 次,加入抗黄曲霉毒素单域重链抗体 (2mg/ 每克琼脂糖微球),室温反应 4h,使抗黄曲霉毒素单域重链抗体与 CNBr 活化的琼脂糖凝胶微球共价偶联。用偶联缓冲液 (10mM, Na₂HPO₄, pH 7.4) 洗涤 2 次后,加入封闭液室温反应 2h 以封闭未反应的活性

基团。用 5 被胶体积的磷酸缓冲液 (10mM, pH 7.4) 和醋酸缓冲液 (0.1M, pH 4.0) 交替洗涤 3 次, 得到共价偶联了抗黄曲霉毒素单域重链抗体的免疫亲和吸附材料。取 0.2ml 上述免疫亲和吸附材料于容量为 1ml 的层析柱, 5 ~ 10 倍柱床体积的 PBS (10mM, pH 7.4) 洗涤后, 加入 20% 乙醇溶液, 4℃ 保存。

[0055] 实施例 6 黄曲霉毒素免疫亲和吸附材料及亲和柱的制备

[0056] 采用硅胶微球作为载体, 偶联抗黄曲霉单域重链抗体, 具体制备方法如下:

[0057] 取 2g 硅胶微球用纯水和磷酸缓冲液 (PBS, 10mM, pH 6.0) 交替洗涤 5 ~ 10 次, 用 10ml PBS 缓冲液悬浮硅胶微球, 加入 5mg 抗黄曲霉毒素单域重链抗体, 混匀, 加入终浓度 5mg/ml 的碳二亚胺 (EDC), 迅速混匀, 4℃ 搅拌反应 12 ~ 24h, 得到共价偶联了抗黄曲霉毒素单域重链抗体的免疫亲和吸附材料。取 0.2ml 上述免疫亲和吸附材料于容量为 1ml 的层析柱, 5 ~ 10 倍柱床体积的 PBS (10mM, pH 6) 洗涤后, 加入含 0.02% (w/v) Na_3N 的 PBS (10mM, pH 6), 4℃ 保存。

[0058] 实施例 7 黄曲霉毒素免疫亲和柱柱容量、加标回收率、重复使用测定

[0059] 将实施例 5 或实施例 6 制备的亲和层析柱用 5ml PBS (10mM, pH 7.4) 洗涤, 加入 5ml 浓度为 100ng/ml 的 AFB_1 标准品溶液, 10ml 纯水淋洗, 用 1ml 甲醇洗脱, 收集洗脱液用高效液相色谱检测洗脱液中 AFB_1 的含量, 计算得出亲和层析柱的容量为 650 ~ 800ng。

[0060] 取 5g 粉碎的花生、玉米样品 (不含黄曲霉毒素), 分别加入 50ng、100ng 和 200ng 的 AFB_1 或 AFG_1 标准品, 用 60% (v/v) 甲醇 - 水溶液提取样品, 涡旋振荡 15min, 快速定性滤纸过滤, 取 5ml 滤液, 加 PBS (10mM, pH 7.4) 稀释。

[0061] 将实施例 5 或实施例 6 制备的亲和层析柱用 5ml PBS (10mM, pH 7.4) 洗涤, 加入 10ml 样品提取稀释液, 10ml 纯水淋洗, 用 1ml 甲醇洗脱, 收集洗脱液用高效液相色谱检测 AFB_1 或 AFG_1 的含量, 计算回收率。结果显示制备的亲和柱对 AFB_1 或 AFG_1 的平均回收率分别为 85 ~ 101%, 80 ~ 97%。重复使用 10 次后, 亲和柱对 AFB_1 或 AFG_1 的平均回收率 > 80%。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 南昌大学

<120> 基于抗黄曲霉毒素单域重链抗体的亲和吸附材料

<130> 2015

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ser Ile Tyr Ser Leu Val
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asp Ile Thr Arg Val Gly Asn Thr Asn His Ala Asn Ser Arg Glu
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Thr Gly Val Pro Trp Asn Thr Val Ile Leu
65 70 75 80

Ser Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Arg Val Thr Ser Gly Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val

[0002]

100	105	110
Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 2		
<211> 348		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 2		
cagttgcagc tcgtggagtc ggggtggagc ttggtgcagc ctgggggggc tetgagactc	60	
tctgttacag cctctggaag catctatagc ctctgtgccg tgggctggta ccgccaggtc	120	
ccaggggaagc agcgcgagtg ggctgcagat attactcttg ttgtaacac aaaccatgcg	180	
aactccaggg aggaccgatt caccatctcg acaggtgtcc cctggaacac ggtgattctg	240	
tctatgaaca gcctggaacc tgaggacacg gccgtctatt attgtaatgc cagagttacc	300	
tccgggctta actactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctctca	348	
<210> 3		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工引物		
<400> 3		
cttgggtggc ctggctgc	18	
<210> 4		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> 人工引物		
<220>		
<221> misc feature		
<222> (44)..(44)		

[0003]

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)..(47)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 4

tcgcggccca gccggccatg gccagktgc agctcgtgga gtcnggngg

49

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 5

cgagtgcggc cgcgggtct tcgtgtggt gcg

33

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 6

cgagtgcggc cgcttgggt ttggtgtct tggg

34

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 7

ggtacgtgct gtgaactgt tcc

23

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 8

[0004]

agcggataac aattcacac agga

24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 9

gecccatcca gatcccttc

20

专利名称(译)	基于抗黄曲霉毒素单域重链抗体的亲和吸附材料		
公开(公告)号	CN105396560A	公开(公告)日	2016-03-16
申请号	CN201510869869.4	申请日	2015-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	涂追 许杨 熊勇华 李燕萍 黄志兵		
发明人	涂追 许杨 熊勇华 李燕萍 黄志兵		
IPC分类号	B01J20/24 B01J20/30 B01J20/281 B01D15/10 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，涉及一种基于单域重链抗体的免疫亲和吸附材料，特别是针对黄曲霉毒素的免疫亲和吸附材料。包括载体，搭载在载体上的配基，其特征在于该材料以特异性识别黄曲霉毒素的单域重链抗体作为配基，所述特异性识别黄曲霉毒素的单域重链抗体具有SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列。该抗体具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性，对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

引物名称	序列
AlpVh-LD	5'-CTTGGTGGTCCTGGCTGC-3'
AlpVh-SfiI	5'-tcggggccagccggccagccCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNG-3'
AlpVHHR1-NotI	5'-cgagtcggggccGGGGTCTTCGCTGTGGTGG-3'
AlpVHHR2-NotI	5'-cgagtcggggccTTGTGGTTTGGGTGCTTGGG-3'
CH ₂ -R	5'-GGTACGTGCTGTTGAAGTGTTC-3'