

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6092486号
(P6092486)

(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(51) Int.Cl.		F I	
CO7K 16/14 (2006.01)		CO7K	16/14 ZNA
GO1N 33/53 (2006.01)		GO1N	33/53 G
GO1N 33/548 (2006.01)		GO1N	33/548 Z
GO1N 33/552 (2006.01)		GO1N	33/552
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/00 A

請求項の数 8 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-547211 (P2016-547211)	(73) 特許権者	516109152
(86) (22) 出願日	平成26年8月27日 (2014. 8. 27)		中国農業科学院油料作物研究所
(65) 公表番号	特表2016-536353 (P2016-536353A)		中華人民共和国 430062 湖北省武漢市武昌区徐東二路2号
(43) 公表日	平成28年11月24日 (2016. 11. 24)	(74) 代理人	100095407
(86) 国際出願番号	PCT/CN2014/085316		弁理士 木村 満
(87) 国際公開番号	W02015/143834	(74) 代理人	100109449
(87) 国際公開日	平成27年10月1日 (2015. 10. 1)		弁理士 毛受 隆典
審査請求日	平成28年4月12日 (2016. 4. 12)	(74) 代理人	100132883
(31) 優先権主張番号	201410121834.8		弁理士 森川 泰司
(32) 優先日	平成26年3月28日 (2014. 3. 28)	(74) 代理人	100148633
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		弁理士 桜田 圭
		(74) 代理人	100147924
			弁理士 美恵 英樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤、免疫親和性カラム並びにその調製方法およびその応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

固体ベクターと、

該固体ベクターとカップリングするアフラトキシンに対するナノ抗体と、を含有し、

前記アフラトキシンに対するナノ抗体は、アフラトキシン B 1 のナノ抗体 2014AFB - G 15 であり、そのアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 7 で表され、その遺伝子コード配列は、SEQ ID NO : 8 で表されることを特徴とするアフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤。

【請求項2】

前記アフラトキシン B 1 のナノ抗体 2014AFB - G 15 の相補性決定領域のアミノ酸配列のそれぞれは、CDR 1 のアミノ酸配列が SEQ ID NO : 1 で表され、CDR 2 のアミノ酸配列が SEQ ID NO : 2 で表され、CDR 3 のアミノ酸配列が SEQ ID NO : 3 で表され、

相補性決定領域の遺伝子コード配列のそれぞれは、CDR 1 の遺伝子コード配列が SEQ ID NO : 4 で表され、CDR 2 の遺伝子コード配列が SEQ ID NO : 5 で表され、CDR 3 の遺伝子コード配列が SEQ ID NO : 6 で表されることを特徴とする請求項1に記載のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤。

【請求項3】

前記固体ベクターは、アガロースゲル、またはシリカマイクロスフィアであることを特徴とする請求項1に記載のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤。

10

20

【請求項4】

請求項1乃至3の何れか1項に記載のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤の調製方法であって、

前記固体ベクターとしてシリカマイクロスフィアを用いる場合、

シリカマイクロスフィア1～5gを秤量し、純水とpH6のリン酸緩衝液で交互に洗い流し、さらにpH6のリン酸緩衝液5～25mLを量取しシリカマイクロスフィアを溶解させ、シリカマイクロスフィアの全体がサスペンドするように攪拌し、シリカマイクロスフィアのサスペンションを獲得し、

そしてpH6のリン酸緩衝液1～5mLを用いて2～10mgのアフラトキシンB1のナノ抗体2014AFB-G15を溶解させ、それをシリカマイクロスフィアのサスペンションに滴加し、

10

最後に、70～350mgのカルボジイミドを秤量し、前記シリカマイクロスフィアのサスペンションに快速的に添加し、4で攪拌しながら18～22h反応させた後に、シリカマイクロスフィアを固体ベクターとするアフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤を得ること、また、

前記固体ベクターとしてアガロースゲルを用いる場合、

0.3～1gのアガロースを秤量し、1mMのHCl溶液を用いて繰り返し洗い流し、そして、アガロースゲルを5～15mLのカップリング緩衝液に溶解させ、さらに、0.6～2mgのアフラトキシンB1のナノ抗体2014AFB-G15を添加し、室温において1～2h攪拌し反応させ、アガロースゲル溶液を得て、

20

アガロースゲル溶液中のアガロースゲルとカップリングしない抗体溶液を濾過してから、カップリング緩衝液を用いてアガロースゲルを洗い流し、そして、0.1MのpH8.0のTris-HCl緩衝液を添加し、室温下に2h反応させ、その後、0.1M、pH8.0のTris-HCl緩衝液と0.1M、pH4.0のTris-HCl緩衝液によって交互に洗い流し、アガロースゲルを固体ベクターとするアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性吸着剤を得て、

前記カップリング緩衝液は、pH8.3の0.1M NaCO₃または0.5M NaClであること、

を特徴とするアフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤の調製方法。

【請求項5】

30

請求項1乃至3の何れか1項に記載のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤を搭載するアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラム。

【請求項6】

アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤を固相抽出管に入れ、pH6、0.01Mのリン酸緩衝液を添加し自然に沈殿させ、その後、pH6、0.01Mのリン酸緩衝液で洗浄してから、0.02wt%のアジ化ナトリウムを含有するpH6、0.01Mのリン酸緩衝液中に保存し、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムを得ることを特徴とする請求項5に記載のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムの調製方法。

【請求項7】

40

前記アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムを用いて、テスト機器に乗る前のサンプル抽出液を精製および濃縮することを特徴とする請求項5に記載のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムの応用。

【請求項8】

まず、調製し得たアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムを純水で洗い流し、続いてサンプル抽出液を添加し、最後に、純水で溶離し、液体が流しきれてからメタノールで再度溶離し、溶離液を収集し、前記溶離液が、直接にテスト機器に乗せられる精製および濃縮したサンプル抽出液であることを特徴とする請求項7に記載のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムの応用。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤、免疫親和性カラム並びにその調製方法およびその応用に関する。

【背景技術】

【0002】

アフラトキシンは、主にアスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*) 及びアスペルギルス・パラシチクス (*Aspergillus parasiticus*) の分泌に由来する二次代謝産物であり、ヒトおよび動物に様々な害を引き起こす可能性のある天然毒性化合物である。アフラトキシンは、現在20種以上が発見され、主に、アフラトキシンB1 (AFB₁)、B2 (AFB₂)、AFG及びM1 (AFM₁) などを含む。その中、AFB₁の毒性が最も強く、その毒性がシアン化カリウムの10倍であり、ヒ素の68倍である。早くも1993年に、アフラトキシンB1が、世界保健機関(WHO)のがん研究機関によって、最強の既知発癌化学物質の一つ、即ちI類発癌物質と区分された。我が国は、アフラトキシンの汚染が比較的ひどい区域であり、さまざまな食品および農産物、特にトウモロコシ、ピーナッツおよびそれらの製品は、アフラトキシンに汚染される可能性がある。よって、アフラトキシンの検出、特に快速測定を強化し、各種の食品や農産物の健康情報をタイムリーに理解および把握することは、我が国の食品安全性の保証に重要な意味を有する。

【0003】

従来のアフラトキシンの検出方法として、薄層クロマトグラフィー、精密機器分析方法、および免疫学的分析方法が挙げられる。その中、薄層クロマトグラフィーは、アフラトキシンの検定に早くも用いられ、最も一般的に使用される検出方法であり、該方法は、特別な装置設備が不要で、通常の実験室内で行うことが可能だが、試薬の投与量が多く、操作が複雑であり、また、その他にも成分により深刻な干渉を齎すため、精度が悪くて、正確に定量することができず、且つ研究室の職員および周辺環境への汚染に大きな被害を齎すため、快速的なオンサイト検出に適用することができない。精密機器分析方法は、主に蛍光分光光度法および高速液体クロマトグラフィーを含む。それらの方法は、高感度、良好な精度であるが、アフラトキシンサンプルの浄化度が高く要求され、従来サンプル前処理技術、例えば、液体-液体抽出、固相抽出、固相マイクロ抽出などは、処理プロセスが複雑であり、特異性は強くない。よって、快速かつ有効なサンプル前処理技術を確立することは、アフラトキシン検出分析において解決すべく主要なボトルネックとなっている。免疫親和性カラムは、新規かつ効率的なサンプル前処理技術であり、抗原-抗体の間の特異的可逆結合に基づいて、複雑なサンプルにおける標的物質に対する富化精製を達成する。免疫親和性カラムと液体クロマトグラフ、蛍光スペクトロスコピー、及びELISA法とを組み合わせ、農作物及び食品中のアフラトキシン検出に広く応用することができる。

【0004】

現在、アフラトキシン免疫親和性カラムの調製は、主に伝統的な抗体(ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体)をアガロースゲル、シリカマイクロスフィアなどとカップリングさせることによって調製し得る。伝統的な抗体は、使用中に活性の退化が速くて、市販の従来の免疫親和性カラムは、重複使用可能な回数が少なすぎるという技術課題を有する。一方、ナノ抗体は、ラクダ科の動物の体内に自然に存在する重鎖抗体であり、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤及び免疫親和性カラムに関する報道はまだない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤、免疫親和性カラム並びにその調製方法およびその応用を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の目的を達成するために、本発明で用いられる実施態様は、下記のとおりである。

固体ベクターと、該固体ベクターとカップリングするアフラトキシンに対するナノ抗体と、を含有し、前記アフラトキシンに対するナノ抗体は、アフラトキシン B 1 のナノ抗体 2014AFB-G15 であり、そのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 7 で表され、その遺伝子コード配列は、SEQ ID NO: 8 で表されることを特徴とするアフラトキシンに対するナノ抗体の免疫吸着剤。

【0007】

上記の実施態様において、前記アフラトキシン B 1 のナノ抗体 2014AFB-G15 の相補性決定領域のアミノ酸配列のそれぞれは、CDR 1 のアミノ酸配列が SEQ ID NO: 1 で表され、CDR 2 のアミノ酸配列が SEQ ID NO: 2 で表され、CDR 3 のアミノ酸配列が SEQ ID NO: 3 で表され、相補性決定領域の遺伝子コード配列のそれぞれは、CDR 1 の遺伝子コード配列が SEQ ID NO: 4 で表され、CDR 2 の遺伝子コード配列が SEQ ID NO: 5 で表され、CDR 3 の遺伝子コード配列が SEQ ID NO: 6 で表される。

【0008】

上記の実施態様において、前記固体ベクターは、アガロースゲル、またはシリカマイクロスフィアである。

【0009】

アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤の調製方法であって、前記固体ベクターとしてシリカマイクロスフィアを用いる場合、シリカマイクロスフィア 1 ~ 5 g を秤量し、純水と pH 6 のリン酸緩衝液で交互に洗い流し、さらに pH 6 のリン酸緩衝液 5 ~ 25 mL を量取し、シリカマイクロスフィアを溶解させ、シリカマイクロスフィアの全体がサスペンドするように攪拌し、シリカマイクロスフィアのサスペンションを獲得し、

そして pH 6 のリン酸緩衝液 1 ~ 5 mL を用いて 2 ~ 10 mg のアフラトキシン B 1 のナノ抗体 2014AFB-G15 を溶解させ、それをシリカマイクロスフィアのサスペンションに滴加し、

最後に、70 ~ 350 mg のカルボジイミドを秤量し、前記シリカマイクロスフィアのサスペンションに快速的に添加し、4 で攪拌しながら 18 ~ 22 h 反応させた後に、シリカマイクロスフィアを固体ベクターとするアフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤を得ること、また、

前記固体ベクターとしてアガロースゲルを用いる場合、

0.3 ~ 1 g のアガロースゲルを秤量し、1 mM の HCl 溶液を用いて繰り返し洗い流し、そして、アガロースゲルを 5 ~ 15 mL のカップリング緩衝液に溶解させ、さらに、0.6 ~ 2 mg のアフラトキシン B 1 のナノ抗体 2014AFB-G15 を添加し、室温において 1 ~ 2 h 攪拌し反応させ、アガロースゲル溶液を得て、

アガロースゲル溶液中のアガロースゲルとカップリングしない抗体溶液を濾過してから、カップリング緩衝液を用いてアガロースゲルを洗い流し、そして、0.1 M の pH 8.0 の Tris-HCl 緩衝液を添加し、室温下に 2 h 反応させ、その後、0.1 M、pH 8.0 の Tris-HCl 緩衝液と 0.1 M、pH 4.0 の Tris-HCl 緩衝液によって交互に洗い流し、アガロースゲルを固体ベクターとするアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性吸着剤を得て、

前記カップリング緩衝液は、pH 8.3 の 0.1 M NaCO₃ または 0.5 M NaCl である。

【0010】

上記アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤を搭載するアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラム。

10

20

30

40

50

【0011】

上記アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムの調製方法であって、前記アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤を固相抽出管に入れ、pH 6、0.01Mのリン酸緩衝液を添加し自然に沈殿させ、その後、pH 6、0.01Mのリン酸緩衝液で洗浄してから、0.02wt%のアジ化ナトリウムを含有するpH 6、0.01Mのリン酸緩衝液中に保存し、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムを得る。

【0012】

上記アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムの応用であって、前記アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムを用いて、テスト機器に乗る前のサンプル抽出液を精製および濃縮する。具体的な操作は、下記のとおりである。まず、調製し得たアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムを純水で洗い流し、続いてサンプル抽出液を添加し、最後に、純水で溶離し、液体が流しきれてからメタノールで再度溶離し、溶離液を収集し、前記溶離液が、直接にテスト機器に乗せられる精製および濃縮したサンプル抽出液である。

【発明の効果】

【0013】

本発明の有益な効果は、下記のとおりである。

(1) 本発明に記載のアフラトキシンB1のナノ抗体2014AFB-G15は、アフラトキシンB1に対する50%阻害濃度 IC_{50} が0.66ng/mLであり、アフラトキシンB2、G1、G2、M1に対する交叉反応率が、それぞれ22.6%、10.95%、32.1%及び26%である。調製し得たアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムは、そのカラム容量が500~600ngであり、アフラトキシンB1に対する標準品の平均添加回収率が、80~100wt%である。

【0014】

(2) 本発明のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムは、安定性が高く、耐高温、耐アルカリ性、及び耐有機試薬性が高いなどのメリットがあり、カラムの棚期間が長くて、また多数回繰り返し使用することができ、テスト機器に乗る前のサンプル抽出液の精製および濃縮に用いられる。

【0015】

(3) 本発明のアフラトキシンに対するナノ抗体は、遺伝子工程手段で生産され、コストが低く、製造に便利などのメリットを有し、よって、調製し得たアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムは、通常の抗体親和性カラムと比べて、さらに有利である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

(実施例1)

アフラトキシンに対するナノ抗体の遺伝子バンク構築およびナノ抗体の調製

1. 動物免疫

2歳のオスのアルパカ1匹を購入して、アフラトキシンB1抗原(AFB1-BSA, Sigma公司)を免疫した。200 μ gアフラトキシンB1抗原を不完全フロイントアジュバントと乳化してから、アルパカに対して皮下に数点注射した。2週間あけて1回免疫を行って、毎回の免疫後7-10日にアルパカに対して静脈血を採って、間接ELISA法を用いて血清抗体価を測定して、抗体価が最も高い免疫後に、血10mLを採って、総RNAを抽出した。

【0017】

2. cDNAバンクの構築

(1) 総RNAの抽出

アルパカの血清抗体価の最も高い免疫を選んで、免疫後7-10日に、アルパカに対して静脈血10mLを採って、総RNAを抽出した。Life Technology社のLeukoLOCK総RNA分離試薬キットを用いて、アルパカ血液中の総RNAを抽出した。

10

20

30

40

50

pCANTAB 5 E (his) vector 30 μ l
Sfi I 1 μ l
10xM Buffer 10 μ l

ddH₂O 残量分 (全体100 μ l)

50 の水浴で2h保温した後に、アガロースゲルDNA純化試薬キットを用いて回収した。

【0023】

Not Iのダイジェスト(enzyme digestion)処理

下記のように、反応液を配合した。

pCANTAB 5 E (his)の、Sfi Iシングルダイジェスト処理産物 30 μ l 10

Not I I 1 μ l

10xH Buffer 10 μ l

ddH₂O 残量分 (全体100 μ l)

37 の水浴で4h保温した後に、アガロースゲルDNA純化試薬キットを用いて回収した。

(4) VHH遺伝子と、ダブルダイジェスト処理したpCANTAB 5 E (his)ベクターとの連結

下記のようにIn-Fusionの連結を行った。

Sfi I/Not Iダブルダイジェスト処理したpCANTAB 5 E (his) vector 120 ng 20

VHH遺伝子 40 ng

5xIn-Fusion buffer 2 μ l

In-Fusion Enzyme 1 μ l

ddH₂O残量分 (全体10 μ l)

37 の水浴で15min保温した後に、50 の水浴でさらに15min保温して、その直後に氷上に55min置いて、40 μ LのTE緩衝液を添加して、アガロースゲルDNA純化試薬キットを用いて回収して-20 で保存し用意した。

(5) 連結産物の電気変換

上記連結産物5 μ lを採って、50 μ lのE. coli TG1エレクトロポレーション-コンピテントセルにいれて、均一に混合させてから、あらかじめ冷却した0.1 cmの電気変換カップ(Bio-RAD)に入れて、氷上に10min放置した。その後、Bio-rad電気変換器上に電気変換させて、電気変換条件は、下記のとおりであった。1.8 kV、200 、25 μ F。電気変換の直後、電気変換カップに1mLの2YT液体培地を添加して吹き付けてから、滅菌したきれいな15mLのテストチューブに入れて、37 でゆっくり振りながら1h回復させた。2 μ lの菌液を採って倍に希釈してからLBセファレキシントレットにコーティングして、37 で1晩転置して、翌日にコロニー数を計数してバンク容量を計算した。 30

【0024】

(6) アフラトキシンに対するナノ抗体遺伝子バンクの回収

上記電気変換を10回行って、回復後の菌液のすべてを200mLのSB培地に移して、37 、250rpmでOD₆₀₀値が0.5となるまでシェイキングして、そして、1mL、 1×10^{12} pfuの補助ファージM13KO7を添加して、37 で1h静置した後に、続いて2hシェイキングして、最終濃度70 μ g/mLであるカナマイシンを添加して、さらに1晩シェイキングした。翌日に、1晩経過した菌を4 、10000rpmで15min遠心分離して、上清を無菌の遠心分離ボトルにうつして、さらに1/4体積の5xPEG/NaClを添加して、氷上に2h静置した後に、4 、10000rpmで20min遠心分離して、10mL無菌の再懸溶液(resuspension solution, 1xプロテアーゼ阻害剤、0.02% NaN₃及び0.5% BSAのPBS緩衝液を含有する)で沈殿を溶解させて、ファージに回収したアフラトキシンに対するナノ抗体遺伝子バンクを得た。 40 50

【0025】

4. アフラトキシンB1ナノ抗体のパンニング

AFB₁-BSA (1 μg/ウェル) 及び3%のBSA-PBS溶液(陰性対照組とする)でそれぞれELISAプレートをコーティングして、4で1晩コーティングした。翌日に、コーティングバッファーを捨てて、PBSTでプレートを3回洗浄して、そして、3%の脱脂粉乳-PBSで1h閉じた。PBSTでプレートを3回洗浄して、AFB₁-BSAをコーティングしているウェルに上記したアフラトキシンに対するナノ抗体遺伝子バンク50 μlを添加して、37で1h培養した。PBSTでプレートを10回洗浄して、各ウェルに100 μl、100 ng/mLのAFB₁溶液を添加して、室温(20~30)で30 minシェイキングしながら溶離した。溶離液を、AFB₁-BSAをコーティングしているウェルに移して、37で1h培養した(非特異的吸着の除去)。培養後に、上清を取って、2 mLの対数増殖期まで成長したTG1菌液を感染成長して、37で20 min感染成長した。そして、1 μl、10 μlを取って、それぞれLBセファレキシンタブレットにコーティングして、37の培養オープンにて1晩静置して、翌日にタブレット上のコロニー数を数いて、溶離液中のファージの力価を確定した。また、残った感染成長したTG1菌液を6 mLのSB培地に移して、100 mg/mLのアンピシリンを1.5 μl添加して、37で1hシェイキングした。そして、アンピシリンの最終濃度を50 μg/mLまで調整して、さらに1hシェイキングして、1 mLの補助ファージM13KO7(1 × 10¹² pfu/mL)を添加して、37で30 min静置した。その後、100 mLのSB培地に移して、アンピシリン(100 mg/mL) 46 μlを追加して、さらに2hシェイキングして、アンピシリンの最終濃度を70 μg/mLまで調整して、37で1晩シェイキングした。翌日に、菌液を10000 rpm、4で15 min遠心分離して、上清を取り除いて、1/4体積のPEG/NaCl溶液を添加して、氷上で2h培養した。12000 rpm、4で20 min遠心分離して、1%のBSA-PBS溶液で沈殿を溶解させて、1回目パンニング増幅産物を得て、それを次のパンニングに用いた。続いてのパンニングに、コーティング用抗原AFB₁-BSAの濃度は、それぞれ0.5 μg/ウェル、0.1 μg/ウェル、0.05 μg/ウェルであって、溶離液は、それぞれ、500 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mLのAFB₁溶液であった。

【0026】

5. 陽性クローンの同定

4回パンニングした後に、2 μlの溶離液を倍に希釈してから対数増殖期まで成長したTG1菌液を感染成長して、LBセファレキシンタブレットにコーティングして、37で1晩転置した。翌日に、30個のクローンをランダムに取り出して、それぞれ3 mLのSBアンピシリン培地において、37で6-8hシェイキングしながら培養して、OD₆₀₀が0.6程度になったら、30 μlの補助ファージM13KO7(1 × 10¹² pfu/mL)を添加して、37で30 min静置した後に、続いて2hシェイキングして、最終濃度70 μg/mLであるカナマイシンを添加して、さらに1晩シェイキングした。翌日に、菌液を4、10000 rpmで15 min遠心分離して、上清を得た。

【0027】

コーティングバッファーで最終濃度0.2 μg/mlとなるようにAFB₁-BSAを調製して、96ウェルのELISAプレートをコーティングして、ウェル毎に100 μlとなつて、また、別のELISAプレートを取って、その中の32ウェルについて3%のBSAでコーティングして、4で1晩コーティングした。翌日に、コーティングバッファーを捨てて、PBSTでプレートを3回洗浄して、そして、3%の脱脂粉乳-PBSで1h閉じて、AFB₁の標準原液を取り10%メタノール/PBSによって100 ng/mL、0 ng/mLの作動流体に調製して、AFB₁-BSA抗原をコーティングしているウェルに添加して、各ウェルにさらに50 μlの上記菌液上清を添加して、入れずの作動流体について3回繰り返し操作した。また、対照組として、BSAがコーティングしているウェルに10%メタノール/PBSと50 μlの上記菌液上清を添加して、プレートを

10

20

30

40

50

軽くシェイキングして均一に混合させて、37 のオープンにおいて1 h 反応させた。P B S Tでプレートを10回洗浄した後に、各ウェルに100 μ lのP B Sによって1 : 5000の比率で希釈したH R P / A N T I - M 13を添加して、37 で1 h保温した。P B S T でプレートを6回洗浄した後に、各ウェルに新たに調製したT M B基質溶液を添加して、37 で15 min保温した。各ウェルに2 mol / LのH₂ S O₄を50 μ l添加し反応を中止させて、酵素標識装置によってそれぞれのO D₄₅₀値を測定した。B S Aに対して吸着せず、A F B₁ - B S Aに対して吸着して、且つアフラトキシンを添加した後に競合が存在しているのは、陽性ファージクローンであって、それに基づいてスクリーニングして、吸光度と感度の高いウェルをスクリーニングし得て、ファージによって表されたアフラトキシンB1ナノ抗体2014 A F B - G 15を得た。

10

【0028】

間接競合E L I S Aを用いてアフラトキシンB1ナノ抗体2014 A F B - G 15の抗体特異性を測定して、具体的には、交差反応率で表示して、測定方法は、下記のとおりであった。A F B₁、A F B₂、A F G₁、A F G₂及びA F M₁の5種異なる標準原液を、10%メタノール / P B Sで段階的に10つの異なる作動濃度に希釈して、同じ条件下に、間接競合E L I S A方法で測定して、5種のアフラトキシンの競合E L I S Aグラフを順番に描画して、各自の阻害率が50%となるとき標準品濃度を求めて、I C₅₀と表示して、また、下記の計算式で交差反応率を計算した。交差反応率(%) = (A F B₁ I C₅₀ / 類似物 I C₅₀) × 100%，前記類似物は、A F B₂、A F G₁、A F G₂ またA F M₁であった。計算の結果、アフラトキシンB1ナノ抗体2014 A F B - G 15のアフラトキシンB1に対する50%阻害濃度I C₅₀は、0.66 ng / mLであって、アフラトキシンB2、G1、G2、M1に対する交差反応率は、それぞれ22.6%、10.95%、32.1%及び26%であった。よって、アフラトキシンB1ナノ抗体2014 A F B - G 15は、抗アフラトキシンB1のの特異性ナノ抗体であった。薬物耐性試験の結果によれば、アフラトキシンに対するナノ抗体2014 A F B - G 15は、常規ネズミ源と兔源抗体と比べて、耐有機溶媒性能が35%上がって、耐高温性能が、46%上がった。

20

【0029】

同時に、スクリーニングし得たアフラトキシンB1ナノ抗体2014 A F B - G 15を含有するクローン菌液を、上海桑尼科技有限公司によって測定分析を行って、測定プライマーは、ファージベクターの通用プライマーR1 : 5' - C C A T G A T T A C G C C A A G C T T T G G A G C C - 3'であった。得られたアフラトキシンB1ナノ抗体2014 A F B - G 15のアミノ酸配列は、S E Q I D N O : 7で表されて、遺伝子コード配列は、S E Q I D N O : 8で表された。その中、相補性決定領域のアミノ酸配列のそれぞれは、C D R 1のアミノ酸配列がS E Q I D N O : 1で表されて、C D R 2のアミノ酸配列がS E Q I D N O : 2で表されて、C D R 3のアミノ酸配列がS E Q I D N O : 3で表されて、相補性決定領域の遺伝子コード配列のそれぞれは、C D R 1の遺伝子コード配列がS E Q I D N O : 4で表されて、C D R 2の遺伝子コード配列がS E Q I D N O : 5で表されて、C D R 3の遺伝子コード配列がS E Q I D N O : 6で表された。

30

40

【0030】

6. アフラトキシンに対するナノ抗体2014 A F B - G 15の調製と純化

(1) アフラトキシンB1のナノ抗体2014 A F B - G 15を分泌できるT G 1菌液を採って、Q i a g e nのDNA少量抽出試薬キットでプラスミドを抽出して、H B 2 1 5 1コンピテントセル中に変換し、そして、L Bセファレキシントラレットにコーティングした。

(2) アフラトキシンB1ナノ抗体2014 A F B - G 15プラスミドを含有するH B 2 1 5 1コロニーを選択して、100 mLのS Bアミノベンジル液体培地に入れて、250 r p m、37 でO D₆₀₀ = 0.5 - 0.8まで培養して、200 μ lの0.5 M I P T G溶液を添加して1晩誘導した。

50

【0031】

(3)4、10000 rpmで、15 min冷凍遠心分離した。無菌コンソールで注意深く上清を取り除いて、菌体沈殿物に対して、浸透ショック法を用いて可溶性蛋白の抽出を行って、上清のタンパク質を得た。該上清のタンパク質が0.22 μmの濾膜を通して、平衡緩衝液(50 mMリン酸塩、300 mM塩化ナトリウム、20 mMイミダゾール; pH 7.4)を用いて1晩透析した。

【0032】

(4)His 60のニッケルカラム(Clontech Technology)を用いて抗体を純化する。まず、カラム体積10倍分の平衡緩衝液を用いてニッケルカラムを洗い流して、ステップ(3)中の透析後の上清のタンパク質をHis 60ニッケルカラム(Clontech Technology)に乗せて抗体を純化して、そして、カラム体積10倍分の洗い流す用緩衝液(50 mMのリン酸塩、300 mMの塩化ナトリウム、40 mMのイミダゾール、pH 7.4)でカラムを洗浄した。最後に、カラム体積10倍分の溶離緩衝液(50 mMのリン酸塩、300 mMの塩化ナトリウム、300 mMのイミダゾール、pH 7.4)で抗体2014 AFB-G15を溶離して、溶離液を収集して透析袋にいれて、0.01 M、pH 7.4のリン酸緩衝液で2-3日透析した後に濃縮して、小分けして-20 で保存し備用した。

【0033】

(実施例2)

アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性吸着剤と免疫親和性カラムを調製

本実施例の免疫親和性吸着剤は、固体ベクター(シリカマイクロスフィア)と、該固体ベクターとカップリングするアフラトキシンB1のナノ抗体2014 AFB-G15とを含有し、その調製方法は、下記のとおりであった。1gのアクリルアミドシリカマイクロスフィアを秤量してコニカル瓶に入れて、純水とpH6のリン酸緩衝液で該マイクロスフィアを交互に洗い流して、そして、pH6のリン酸緩衝液5 mLを量取りシリカマイクロスフィアを溶解させて、シリカマイクロスフィアの溶液を得た。該シリカマイクロスフィアの溶液を攪拌カップに移して、攪拌機をオンにして、シリカマイクロスフィアの全体をサスペンドさせて、そしてpH6のリン酸緩衝液1 mLを用いて2 mgのアフラトキシンB1のナノ抗体2014 AFB-G15を溶解させて、それを上記シリカマイクロスフィアの溶液に滴加した。続いて、70 mgのEDCを量って、素早く上記攪拌カップに導入して、4 で、攪拌しながら18-22 h反応させた後に、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性吸着剤を得た。

【0034】

アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムの調製

上記のように調製した免疫親和性吸着剤(0.2 mL)を固相抽出管に入れて、pH6、0.01 Mのリン酸緩衝液を添加して自然に沈殿させた後に、pH6、0.01 Mのリン酸緩衝液で洗浄して、0.02 wt%のアジ化ナトリウムを含有するpH6、0.01 Mのリン酸緩衝液中に保存して、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムを得て、4 で保存した。

【0035】

(実施例3)

アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性吸着剤と免疫親和性カラムを調製

本実施例の免疫親和性吸着剤は、固体ベクター(アガロース)と、該固体ベクターとカップリングするアフラトキシンB1のナノ抗体2014 AFB-G15とを含有し、その調製方法は、下記のとおりであった。0.3 gのアガロースを秤量して、1 mMのHCl溶液を用いて繰り返し洗い流して、そして、アガロースを5 mLのカップリング緩衝液(0.1 MのNaCO₃または0.5 MのNaCl, pH 8.3)に溶解させて、さらに、0.6 mgのアフラトキシンB1のナノ抗体2014 AFB-G15を添加して、室温において150 rpmの速度で攪拌しながら1 h反応させて、アガロースゲル溶液を得た。そして、該アガロースゲル溶液を砂コア漏斗にうつして、カップリングされていなかっ

10

20

30

40

50

た抗体を含有する溶液を流せた。そして、アガロースゲル溶液の体積5倍分のカップリング緩衝液でアガロースゲルを洗い流して、アガロースゲル溶液の体積2倍分の閉鎖緩衝液(0.1M Tris-HCl緩衝液、pH8.0)をさらに添加して室温で2h反応させた。その後、高pH緩衝液(0.1MのTris-HCl緩衝液、pH8.0)と低pH緩衝液(0.1MのTris-HCl緩衝液、pH4.0)で3回交互にゲルを洗い流して、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性吸着剤を得た。

【0036】

アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムの調製：上記のように調製しえた免疫親和性吸着剤(0.2mL)を固相抽出管に入れて、pH6、0.01Mのリン酸緩衝液を添加して自然に沈殿させた後に、pH6、0.01Mのリン酸緩衝液で洗浄して、0.02wt%のアジ化ナトリウムを含有するpH6、0.01Mのリン酸緩衝液中に保存して、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムを得た。4 で保存した。

【0037】

(実施例4)

アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムのカラム容量の測定

実施例2または実施例3で調製し得た免疫親和性カラムを10mLの純水で洗い流して、10mLの10%メタノール/PBSで溶解したアフラトキシンB1の標準品溶液(濃度：100ng/mL、アフラトキシンB1の含有量総計：1mg)をカラムに通して、結合されていないアフラトキシンを除去するように10mLの純水でカラムを洗い流して、最後に、5mLのメタノール溶液で溶離して、1mL/管となるように管に分けて収集して、液体クロマトグラフ法を用いて溶離液中のアフラトキシンの含有量を測定する。測定結果に表されるように、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムのカラム容量は、500~600ngであった。該免疫親和性カラムを5回繰り返し使用後に、再度そのカラム容量を測定した結果、依然として480ngまで達成した。その結果に表されるように、該免疫親和性カラムを繰り返し使用することができる。また、交叉反応の測定結果に表されるように、本発明に記載のアフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムは、同時にアフラトキシンB1、B2、G1、G2、及びM1と特異的に結合することができ、ゼアラレノン、嘔吐毒素、オクラトキシンなど他の真菌毒素と結合することがない。

【0038】

(実施例5)

アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムの標準品添加回収率の測定

アフラトキシンを含有しないブランクサンプルであるピーナッツ、トウモロコシ、植物油、飼料のそれぞれ、各3部を秤量して、各部毎は5gであって、その中にそれぞれアフラトキシンB1の標準物質50ng、250ng、500ngを添加して、下記のように通常の方法によってサンプル抽出液を抽出した。15mLの70%メタノール溶液(4%のNaClを含有する)を用いて、50 で10分間超音波抽出を行って、その抽出液を濾紙で濾過した。4mLの濾過液を取って、その中に2mLの石油エーテルを添加して、渦巻きによって均一に混合させて、静置によって分層させた。下層の3mLを取って、8mLの純水を添加して、0.45μmの有機膜で濾過して、サンプル抽出液である濾過液を得た。実施例2または実施例3で調製し得た免疫親和性カラムを10mLの純水で洗い流して、その中、8mLの上記サンプル抽出液を添加して、最後に10mLの純水で溶離し、液体が流しきれた後に、1mLのメタノールで再度に溶離して、溶離液を収集して高速液体クロマトグラフィーに乗せて、溶離液中のアフラトキシン含有量を測定して、そして、回収率を計算した。結果に表されるように、アフラトキシンに対するナノ抗体免疫親和性カラムは、アフラトキシンB1に対する平均回収率が80~100wt%であった。

【配列表】

0006092486000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

- (72)発明者 李 培武
 中華人民共和国 4 3 0 0 6 2 湖北省武漢市武昌区徐東二路2号
- (72)発明者 張 奇
 中華人民共和国 4 3 0 0 6 2 湖北省武漢市武昌区徐東二路2号
- (72)発明者 王 妍入
 中華人民共和国 4 3 0 0 6 2 湖北省武漢市武昌区徐東二路2号
- (72)発明者 張 兆威
 中華人民共和国 4 3 0 0 6 2 湖北省武漢市武昌区徐東二路2号
- (72)発明者 丁 小霞
 中華人民共和国 4 3 0 0 6 2 湖北省武漢市武昌区徐東二路2号

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 特許第5 1 4 9 8 0 6 (J P , B 1)
 中国特許出願公開第1 0 3 8 6 6 4 0 1 (C N , A)
 中国特許出願公開第1 0 3 8 6 9 0 6 5 (C N , A)
 MA F. et al. , *Molecules* , 18(2013) , p.2222-2235
 WANG Y. et al. , *Anal. Chem.* , 85(2013) , p.8298-8303
 HE T. et al. , *Anal. Chem.* , 86(2014 Jul) , p.8873-8880
 LEI J. et al. , *Anal. Chem.* , 86(2014 Oct) , p.10841-10846
 FENG F. et al. , *Journal of Food Safety and Quality* , Vol.4 No.4(2013) , p.1222-1227

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C 0 7 K 1 6 / 1 4
 G 0 1 N 3 3 / 5 3
 G 0 1 N 3 3 / 5 4 8
 G 0 1 N 3 3 / 5 5 2
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 C 1 2 P 2 1 / 0 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 P u b M e d
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q

专利名称(译)	用于黄曲霉毒素的纳米抗体免疫吸附剂，免疫亲和柱及其制备方法和应用		
公开(公告)号	JP6092486B2	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	JP2016547211	申请日	2014-08-27
[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)	中国農業科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国農業科学院油料作物研究所		
[标]发明人	李培武 張奇 王妍入 張兆威 丁小霞		
发明人	李培武 張奇 王妍入 張兆威 丁小霞		
IPC分类号	C07K16/14 G01N33/53 G01N33/548 G01N33/552 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/14 C07K1/22 C07K2317/22 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/56961 G01N2333/38		
FI分类号	C07K16/14.ZNA G01N33/53.G G01N33/548.Z G01N33/552 C12N15/00.A C12P21/08		
代理人(译)	木村充 箕櫻		
优先权	201410121834.8 2014-03-28 CN		
其他公开文献	JP2016536353A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及一种黄曲霉毒素纳米抗体免疫吸附剂，免疫亲和柱，其制备方法及其应用。本发明中，固体载体的免疫吸附剂，固体载体连接到含有黄曲霉毒素B1的纳米抗体2014AFB-G15，50%抑制浓度IC的黄曲霉毒素B1的纳米抗体2014AFB-G15的黄曲霉毒素B1 50 是0.66ng / mL时，黄曲霉毒素B2，G1，G2，和交叉反应M1速率是Zorezore 22.6%，10.95%，32.1%和26%，其氨基酸序列由SEQ ID NO：7表示，基因编码序列由SEQ ID NO：8表示。黄曲霉毒素本发明的纳米抗体免疫亲和柱被用于纯化和骑测试设备和免疫亲和柱可以反复使用多次之前浓缩样品提取液。【选择图】无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6092486号 (P6092486)
(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)	(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)	
(51) Int. Cl.	F I	
C07K 16/14 (2006.01)	C07K 16/14	ZNA
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	G
GO1N 33/548 (2006.01)	GO1N 33/548	Z
GO1N 33/552 (2006.01)	GO1N 33/552	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A
		請求項の数 8 (全 12 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2016-547211(P2016-547211)	(73) 特許権者 516109152 中国農業科学院油料作物研究所 中華人民共和国 430062 湖北省武漢市武昌区徐東二路2号	
(86) (22) 出願日 平成28年8月27日(2014.8.27)	(74) 代理人 100095407 弁理士 木村 満	
(65) 公表番号 特表2016-536353(P2016-536353A)	(74) 代理人 100109449 弁理士 毛受 隆典	
(43) 公表日 平成28年11月24日(2016.11.24)	(74) 代理人 100132883 弁理士 森川 泰司	
(86) 国際出願番号 PCT/CN2014/085316	(74) 代理人 100148633 弁理士 坂田 圭	
(87) 国際公開番号 W02015/143834	(74) 代理人 100147924 弁理士 美恵 英樹	
(87) 国際公開日 平成27年10月1日(2015.10.1)		
審査請求日 平成28年4月12日(2016.4.12)		
(31) 優先権主張番号 201410121834.8		
(32) 優先日 平成26年3月28日(2014.3.28)		
(33) 優先権主張国 中国(CN)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 アフラトキシンに対するナノ抗体免疫吸着剤、免疫親和性カラム並びにその調製方法およびその応用		