

# 基于蛋白A-琼脂糖凝胶黄曲霉毒素B<sub>1</sub>免疫亲和柱的制备

龚燕<sup>1</sup>, 杨婷婷<sup>1</sup>, 莫晓嵩<sup>2</sup>, 张海涛<sup>1</sup>, 黄伟<sup>2</sup>, 陆廷瑾<sup>1</sup>, 张东升<sup>1\*</sup>, 汪海峰<sup>3</sup>

(1.江苏省苏微微生物研究有限公司, 江苏 无锡 214063; 2.江苏省粮食局粮油质量监测所, 江苏 南京 210011; 3.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏 南京 210011)

**摘要:** 将初步纯化的抗黄曲霉毒素B<sub>1</sub>单克隆抗体, 定向偶联于蛋白A-琼脂糖凝胶, 制备成免疫亲和层析柱。结果显示, 辛酸-饱和硫酸铵纯化后的单抗质量浓度为17.5 mg/mL, 纯度为45.1%, 抗体亚型为IgG<sub>1</sub>。取纯化后抗体48 μL与1 mL蛋白A凝胶偶联, 偶联率达98.1%, 高效液相色谱测定其平均相对柱容量为105 ng/0.125 mL凝胶、柱空白为0, 不同样品(玉米粉、面粉、花生油、酱油、醋等)平均加标回收率在80%以上。该亲和柱在2~8 ℃保存12个月, 相对柱容量仍可达72 ng/0.125 mL凝胶。该法制备的亲和柱相对柱容量大, 稳定性好, 可用于样品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>分离净化的要求。

**关键词:** 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>; 蛋白A-琼脂糖凝胶; 定向偶联; 免疫亲和柱

Preparation of Immunoaffinity Column for AFB<sub>1</sub> with Monoclonal Antibodies Immobilized on Protein A-Sepharose

GONG Yan<sup>1</sup>, YANG Tingting<sup>1</sup>, MO Xiaosong<sup>2</sup>, ZHANG Haitao<sup>1</sup>, HUANG Wei<sup>2</sup>, LU Tingjin<sup>1</sup>, ZHANG Dongsheng<sup>1,\*</sup>, WANG Haifeng<sup>3</sup>

(1. Jiangsu Suwei Institute of Microbiology Co. Ltd., Wuxi 214063, China;

2. Grain and Oil Quality Monitoring Bureau of Grain in Jiangsu Province, Nanjing 210011, China;

3. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210011, China)

**Abstract:** The immunoaffinity column (IAC) for aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) was prepared by directed coupling of protein A-sepharose with the anti-AFB<sub>1</sub> monoclonal antibody which was preliminarily purified by caprylic acid-ammonium sulfate method. The results showed that the concentration, purity and antibody subtype of the purified monoclonal antibody were 17.5 mg/mL, 45.1% and IgG<sub>1</sub>, respectively. When coupling 48 μL of purified antibody with protein A-sepharose, and the coupling rate was 98.1%. The average relative column capacity and column blank were 105 ng/0.125 mL gel and 0, respectively. The average recoveries of standard addition in different samples (corn flour, wheat flour, peanut oil, soy sauce) were all above 80%. After being stored at 2–8 ℃ for 12 months, the relative capacity of the IAC was 72 ng/0.125 mL gel. These results show that the anti-AFB<sub>1</sub> affinity column prepared by this method has large relative capacity and good stability which meet the requirement for separation and purification of AFB<sub>1</sub> from real samples.

**Key words:** aflatoxin B<sub>1</sub>; protein A-sepharose; directed coupling; immunoaffinity column

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 10-0216-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201510043

黄曲霉毒素是由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生的一组结构类似的代谢物, 其中黄曲霉毒素B<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 的毒性和致癌性最强, 被称为第一大类致癌物<sup>[1]</sup>。目前, 对于AFB<sub>1</sub>的检测方法有薄层层析法<sup>[2-3]</sup>、酶联免疫吸附法<sup>[4-9]</sup>、免疫亲和层析-高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法<sup>[10-12]</sup>、免疫亲和层析-荧光光度法等<sup>[13-14]</sup>。免疫亲和层析柱 (immunoaffinity column,

IAC) 因其高特异性、高灵敏度及净化效果好等优势, 是目前真菌毒素净化和富集效能最强的样品前处理技术。为避免非特异性吸附的杂质干扰后续使用和加快分析速度, 增加一次性IAC用量, 针对真菌毒素残留IAC柱的制备成为当前的研究热点。

目前, 国内外多采用溴化氰活化的琼脂糖为载体<sup>[15-17]</sup>, 以随机偶联的方式将抗体分子无序地固定在层析介质上

收稿日期: 2014-09-26

基金项目: 无锡市农业科技支撑项目 (CLE02N1405)

作者简介: 龚燕 (1974—), 女, 副研究员, 学士, 研究方向为食品安全。E-mail: 526137895@qq.com

\*通信作者: 张东升 (1975—), 男, 副研究员, 学士, 研究方向为食品安全。E-mail: zds0127@sina.com

制备亲和柱,而当键合位置靠近抗体的结合位点指向有碍与待测物结合的空间时,则抗体的结合能力下降,造成抗体分子被低效利用<sup>[18]</sup>。为了克服现有技术中存在的问题,本研究采用蛋白A-琼脂糖凝胶作为固相载体,与辛酸-饱和硫酸铵初步纯化的抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体定向偶联,制备一次性、高载量、低成本的IAC,考察较小的柱床体积下完成样品净化的能力。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

玉米粉(散装)、面粉(风筝牌)、黄豆酱油(好太太)、香醋(镇江恒顺)等样品均为市购;花生油(CNCA能力验证样品,编号CNCA-13-B15-8) 青岛出入境检验检疫局;抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体细胞株SW-1 E10由江苏省苏微微生物研究有限公司实验室筛选并冻存。

蛋白A-琼脂糖凝胶 美国GE Healthcare公司;二甲基庚二亚胺二盐酸盐、AFB<sub>1</sub>标准品、石蜡、弗氏完全、不完全佐剂 美国Sigma公司;甲醇(色谱纯) 德国Merck公司;AFB<sub>1</sub>酶联免疫试剂盒 江苏省苏微微生物研究有限公司;小鼠亚类鉴定试剂盒 美国Proteintech公司;雌性BALB/c小鼠 扬州大学比较医学中心;实验用水均为超纯水。

### 1.2 仪器与设备

紫外-可见分光光度计 奥地利GBC公司;LC-20AT HPLC仪(含RF-20Axs) 日本岛津公司;Nova-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>色谱柱(3.9 mm×150 mm, 4 μm) 美国Waters公司;PHRED-HR后光化学衍生器 北京中科汇仁科技有限公司;HS-3垂直混匀器 宁波新芝生物公司;DYY-6C型电泳仪 北京六一仪器厂;ZKY-1001真空泵 上海嘉鹏科技有限公司;砂芯漏斗、CO<sub>2</sub>培养箱 赛默飞世尔科技公司;净化工作台 苏州冯氏实验动物设备有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 腹水的制备、纯化及鉴定

抗AFB<sub>1</sub>小鼠腹水的制备参考Chu等<sup>[19]</sup>的操作步骤。取制备的抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体的小鼠腹水,采用辛酸-饱和硫酸铵法<sup>[20]</sup>进行初步纯化,0.01 mol/L、pH 7.0的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)透析得纯化抗体,小份量分装并-70 °C保存。纯化后的抗体采用小鼠亚类鉴定试剂盒进行亚型鉴定。取1 mL纯化单抗过蛋白A亲和层析柱,甘氨酸-HCl(pH 3.0)洗脱蛋白A亲和柱上的结合单抗,收集流出液、洗脱液,紫外分光光度法测定蛋白质质量浓度。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法<sup>[21]</sup>测定纯化后抗AFB<sub>1</sub>单

克隆抗体的纯度。蛋白质质量浓度见式(1),抗体纯度计算见式(2)。

$$\text{蛋白质质量浓度}(\text{mg/mL}) = 1.45 \times A_{280\text{nm}} - 0.74 \times A_{260\text{nm}} \quad (1)$$

$$\text{抗体纯度}/\% = \frac{\text{洗脱蛋白量}/\text{mg}}{\text{纯化蛋白量}/\text{mg}} \times 100 \quad (2)$$

#### 1.3.2 亲和柱的制备

参照Sisson等<sup>[22]</sup>的方法略有改变。1) 胶的洗涤:取1 mL蛋白A-琼脂糖凝胶于砂芯漏斗中,用20 mL PBS冲洗2次,之后用10 mL PBS转移至50 mL离心管中;2) 偶联:取48 μL纯化后的单抗(1.3.1节)加入到处理好的胶中,室温垂直混匀1 h,使抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体与蛋白A充分偶联。反应结束后,抽滤,收集反应液,紫外分光光度法测定反应液中未偶联的蛋白含量,计算偶联率,见公式(3);3) 交联:抽干胶后,用0.2 mol/L三乙醇胺溶液洗胶1次,最后用10 mL 0.2 mol/L三乙醇胺溶液转移胶至离心管中,并缓慢加入20 mg DMP,室温垂直混匀反应30 min;4) 终止反应:抽干胶后,用20 mL 0.2 mol/L三乙醇胺溶液洗涤1次,然后加入20 mL 50 mmol/L乙醇胺溶液,室温反应5 min;5) 洗涤:抽干胶后,加入20 mL甘氨酸-HCl(pH 3.0),室温反应5 min,反应结束后,20 mL PBS洗涤2次,并用PBS(含5%防腐剂)悬浮至4 mL;6) 装柱:取处理好的1 mL柱管及筛板,将下筛板垫好后,取500 μL悬好的胶(相当于0.125 mL胶/支)加入管中,4 °C沉降过夜后,将上筛板及上下堵头塞好,2~8 °C冰箱保存。

$$\text{偶联率}/\% = \frac{\text{偶联前蛋白总量}/\text{mg} - \text{偶联后蛋白总量}/\text{mg}}{\text{偶联前蛋白总量}/\text{mg} \times \text{抗体纯度}/\%} \times 100 \quad (3)$$

#### 1.3.3 AFB<sub>1</sub> HPLC测定色谱条件

色谱柱: Nova-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>(3.9 mm×150 mm, 4 μm);流动相: 甲醇-水(45:55, V/V);流速: 0.7 mL/min;柱后光化学衍生系统;荧光检测器: 发射波长365 nm、激发波长440 nm;柱温30 °C;进样体积: 20 μL。

#### 1.3.4 抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体含量与相对柱容量的关系

取1 mL凝胶分别加入30、65、480、900 μL单抗,按照1.3.2节制备AFB<sub>1</sub>免疫亲和柱。分别测定其相对柱容量(各取3支亲和柱平行测定,取其平均值,即n=3),通过公式(4)、(5)计算柱容量和单抗有效的利用率。

$$\text{理论柱容量}/\text{ng} = \frac{\text{有效单抗量}/\text{ng}}{\text{单抗摩尔质量}/(\text{g/mol}) \times 8} \times 2 \times \text{AFB}_1 \text{摩尔质量}/(\text{g/mol}) \quad (4)$$

$$\text{抗体有效利用率}/\% = \frac{\text{实测柱容量}/(\text{ng}/0.125 \text{ mL})}{\text{理论柱容量}/(\text{ng}/0.125 \text{ mL})} \times 100 \quad (5)$$

#### 1.3.5 亲和柱的评价

##### 1.3.5.1 相对柱容量

取制备好的亲和柱,将一定体积的50 ng/mL AFB<sub>1</sub>标准品溶液(10%甲醇-PBS溶液配制)以1滴/2 s的速率

过亲和柱, 流出液重复过柱一次, 当IAC柱结合能力饱和后, 收集流出液, 用20 mL水溶液洗涤除杂, 最后用1.0 mL甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液, 用HPLC检测, 按式(6)计算相对柱容量。

$$\text{相对柱容量} = \frac{\text{洗脱液AFB}_1\text{含量/ng}}{0.125\text{ mL凝胶}} \quad (6)$$

### 1.3.5.2 柱空白

按照1.3.2节制备步骤, 仅在偶联过程中用PBS取代单抗, 其他步骤都一样, 制备空白柱。按照1.3.5.1节柱容量的测定过程来检测AFB<sub>1</sub>在该空白柱中的保留情况。

### 1.3.6 上样缓冲液流速的选择

AFB<sub>1</sub>的上样量为45 ng, 分别以2、1滴/s、1滴/2 s的流速通过柱体, 收集流出液及甲醇洗脱液, HPLC法测定其中AFB<sub>1</sub>的含量, 进而确定最佳上样流速。

### 1.3.7 洗脱液体积及甲醇体积分数的选择

AFB<sub>1</sub>上样量为45 ng, 分别用1~3 mL 50%、80%甲醇溶液和100%甲醇进行洗脱, 收集洗脱液, 用HPLC法测定其中AFB<sub>1</sub>含量, 确定最佳洗脱条件。

### 1.3.8 不同质量浓度的回收率

分别取1 mL质量浓度为0、1、5、10、20、50 ng/mL AFB<sub>1</sub>标准溶液过6支免疫亲和柱, 用1 mL纯甲醇洗脱, 收集洗脱液用HPLC法测定AFB<sub>1</sub>含量, 计算回收率。

### 1.3.9 不同样品加标回收率的测定

#### 1.3.9.1 玉米粉不同加标水平回收率

分别将25、100、250 ng AFB<sub>1</sub>标准品加入到5 g粉碎的玉米样品(经HPLC及酶联免疫吸附测定AFB<sub>1</sub>含量为0水平)中, 加入1 g NaCl, 再加入25 mL 70%甲醇-水, 振荡30 min, 过滤收集滤液。取10 mL滤液加入20 mL水混匀, 用玻璃纤维滤纸过滤, 取15 mL滤液过柱。收集1 mL纯甲醇洗脱液, 待测。

#### 1.3.9.2 面粉、花生油加标回收

分别将110 ng AFB<sub>1</sub>标准品加入到5.0 g的面粉样品及花生油中, 样品提取及过柱纯化方法同1.3.9.1节, 同时做空白对照。

#### 1.3.9.3 酱油加标回收

将100 ng的AFB<sub>1</sub>标准品加入到5.0 g阴性样品中, 加入0.25 g NaCl, 再加入80%甲醇-水至10 mL, 振荡30 min, 过滤收集滤液。取5 mL滤液加入20 mL水混匀, 用1 mol/L NaOH溶液调pH值至7.0左右, 玻璃纤维滤纸过滤, 取10 mL过柱。收集1 mL色谱纯甲醇洗脱液, 待测。

#### 1.3.9.4 醋加标回收

将100 ng AFB<sub>1</sub>标准品加入到5.0 g样品中, 加入1.0 g NaCl, 用pH 7.0的PBS稀释至25 mL, 振荡30 min, 过滤收集滤液。取10 mL滤液加入10 mL pH 7.0的PBS混匀, 玻璃纤维滤纸过滤, 取10 mL过柱。收集1 mL色谱纯甲醇洗脱液, 待测。同时做空白对照。样品的加标回收率按公式(7)计算:

$$\text{回收率}/\% = \frac{\text{加标样中AFB}_1\text{含量} - \text{空白样中AFB}_1\text{含量}}{\text{加标量}} \times 100 \quad (7)$$

### 1.3.10 重复使用次数和稳定性

同一支使用后的亲和柱经2 mL 70%甲醇溶液冲洗再生, 最后用10 mL PBS缓冲溶液冲洗柱子, 放4 °C保存, 隔天测定相对柱容量。将60支制备好的亲和柱, 于2~8 °C保存, 每隔1个月取3支测定相对柱容量, 绘制变化曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体纯化前后蛋白质浓度和SDS-PAGE测定结果

表1 纯化单抗的质量浓度及纯度测定结果  
Table 1 The concentration and purity of Mc-Ab

项目	稀释倍数	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	体积/mL	蛋白质总量/mg	蛋白质纯度/%
上样前	20	17.5	1	17.5	
流出液	10	8.5	1	8.5	
5 mL PBS淋洗液	1	0.27	5	1.4	
3 mL酸洗脱液	2	2.4	3	7.2	45.1

辛酸-饱和硫酸铵纯化后, 结果见表1。蛋白质浓度为17.5 mg/mL, 蛋白A柱纯化流出液蛋白质浓度为8.5 mg/mL, 酸洗脱得到的蛋白质浓度为2.4 mg/mL。通过计算得抗体纯度为45.1%, 通过小鼠亚类鉴定试剂盒测定的单抗亚型为IgG<sub>1</sub>。

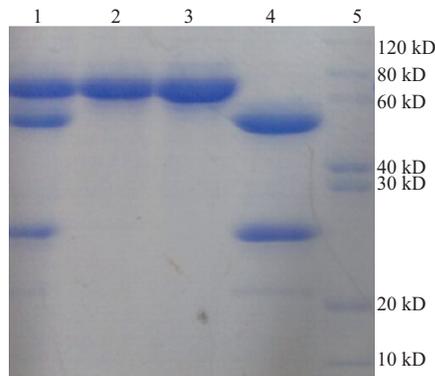


图1 抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体纯化前后SDS-PAGE图  
1.辛酸-硫酸铵纯化单抗; 2.蛋白A柱纯化时的流出液(杂蛋白); 3.抗体与蛋白A凝胶偶联后的反应上清液(杂蛋白); 4.蛋白A柱纯化的单抗; 5. Marker。

图1 抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体纯化前后SDS-PAGE图

Fig.1 SDS-PAGE of anti-AFB<sub>1</sub> Mc-Ab before and after purification

由图1可以看出, 辛酸-硫酸铵纯化后的抗体仍含较多的杂蛋白, 通过蛋白A亲和柱纯化后抗体较纯, 有重链(约57 kD)和轻链(约25 kD) 2条清晰的条带。通过2、3泳道的条带发现结果一致, 辛酸-饱和硫酸铵纯化后的抗体再经过蛋白A亲和柱纯化, 流出液为杂蛋白, 而偶联后有效单抗基本结合, 杂蛋白保留在反应液中, 通过计算偶联率为98.1%。

## 2.2 抗AFB<sub>1</sub>单克隆抗体含量与相对柱容量的关系

取纯化抗体体积为30、65、480、900 μL时,制备的AFB<sub>1</sub>亲和柱平均相对柱容量分别为61.7 (变异系数(coefficient of variation, CV)为5.3%)、135.0 (CV为6.6%)、994.2 (CV为4.7%)、1 816 (CV为3.3%) ng/0.125 mL, 相对柱容量随抗体含量的增加而增大。以每支固载的抗体含量 (mg) 为横坐标, 以相对柱容量 (ng/0.125 mL) 为纵坐标, 得线性回归方程:  $y=2\ 047.9x+6.719\ 3$ ,  $R^2=0.999\ 8$ 。结果表明, 7.10 mg单抗 (900 μL 纯化单抗所含有的抗AFB<sub>1</sub>单抗的量) 与1 mL蛋白A-凝胶偶联, 远没有超过蛋白A-凝胶 (1 mL至少结合30 mg 人IgG) 的结合上限。

IgG的摩尔质量为 $1.5 \times 10^5$  g/mol, 理想状态下每个抗体分子可以与2个抗原分子结合, 那么固载了48.0 μg 抗AFB<sub>1</sub>单抗的理想柱容量为199.7 ng/0.125 mL变异系数 (coefficient of variation, CV) 胶。实验测得的柱容量为105 ng/0.125 mL, 即抗体有效利用率为52.6%。因为空间位阻、热力学参数、反应平衡系数K等原因, 即使在溶液中免疫反应也无法达到每个抗体分子与2个分子抗原结合的理想状态<sup>[16]</sup>。由于105 ng/0.125 mL的IAC柱已满足市场需求, 制备该亲和柱来评价和应用。

## 2.3 亲和柱的评价

HPLC测定结果表明, 1.3.2节中制备的亲和柱平均相对柱容量为105 ng/0.125 mL, 需要辛酸-饱和硫酸铵纯化单抗48.0 μg。

当免疫亲和柱被过量上样时, 样品中的AFB<sub>1</sub>除可与抗体特异性结合外, 还可与琼脂糖凝胶基质或非抗体蛋白发生非特异性吸附<sup>[23]</sup>。因此, 甲醇洗脱液中的AFB<sub>1</sub>是特异性作用和非特异性作用的加和值。而相对柱容量应该只是由抗体引起的吸附量, 因此需从实验得到的加和值中扣除非特异性吸附作用部分。由于无法在亲和柱上直接测量AFB<sub>1</sub>的非特异性吸附量, 因此制备了蛋白A空白凝胶柱, 5支空白柱平行测定柱空白为0, 说明偶联载体对AFB<sub>1</sub>无非特异性吸附, 以较小的柱体积完成净化是可行的。

## 2.4 上样缓冲液流速的选择

对上样流出液和甲醇洗脱液进行监测, 发现上样流速不小于2滴/s时, 样品中的AFB<sub>1</sub>有一部分流出, 说明该流速过快, 使得亲和柱内的抗体和抗原 (AFB<sub>1</sub>) 结合不充分。在1滴/s、1滴/2 s时流出液中的均没有检出AFB<sub>1</sub>, 建议上样流速最快不能超过1滴/s。

## 2.5 洗脱液体积及甲醇体积分数的选择

由图2可看出, 80%甲醇溶液和100%甲醇的洗脱效果相近, 某种程度上可替换100%洗脱; 而50%甲醇溶液洗脱明显不够, 还有50%以上的AFB<sub>1</sub>尚未洗脱下来。对于80%甲醇溶液和100%甲醇的洗脱, 1 mL甲醇洗脱率即可达到95%以上, 第2~3毫升基本没有AFB<sub>1</sub>洗脱下来, 考

虑到增加洗脱液体积会引起样品的稀释, 降低检测灵敏度, 因此, 选择1 mL纯甲醇洗脱液较为合适。

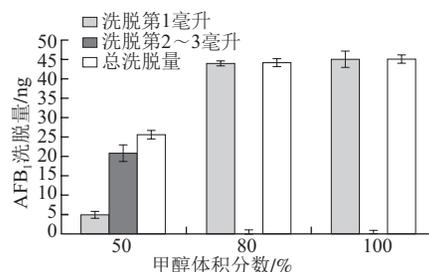


图2 不同体积分数的甲醇的洗脱效果 (n=3)

Fig.2 Elution of AFB<sub>1</sub> by different concentrations of methanol (n = 3)

## 2.6 线性关系

表2 不同质量浓度AFB<sub>1</sub>过亲和柱含量测定及回收率

Table 2 Recovery rates of AFB<sub>1</sub> at different initial concentrations after affinity column chromatography

指标	AFB <sub>1</sub> 质量浓度/(ng/mL)					
	0	1	5	10	20	50
平均实测质量浓度/(ng/mL)	0	0.98	4.87	9.66	20.2	47.5
平均回收率/%		98	97.4	96.6	101	95
CV/(n=3)		3.1	2.3	5.6	4.7	7.5

6组不同质量浓度的AFB<sub>1</sub>过免疫亲和柱后, 通过HPLC法测定的含量及回收率结果如表2所示。说明该亲和柱在高、中、低AFB<sub>1</sub>含量时, 吸附和洗脱AFB<sub>1</sub>效果理想。低质量浓度 (1、5 ng/mL) 标准柱回收率均达到了95%以上, 提示对于低含量样品净化时, 亲和柱对AFB<sub>1</sub>无截留。

## 2.7 不同样品的加标回收率

表3 不同样品的加标回收结果 (n=3)

Table 3 Recoveries of AFB<sub>1</sub> spiked in different samples (n = 3)

样品	空白/(μg/kg)	加标水平/(μg/kg)	平均测定值/(μg/kg)	平均回收率/%	变异系数/%
玉米加标 (低)	0	5	4.13	82.6	4.6
玉米加标 (中)	0	20	16.32	81.6	3.8
玉米加标 (高)	0	50	37.26	74.5	5.1
面粉	0	6	4.92	82.0	4.2
花生油	6.1	22	27.80	98.6	4.7
酱油	0	5	4.09	81.8	7.3
醋	0.51	5	4.56	91.2	8.1

对玉米、面粉、花生油、酱油、醋等样品的加标回收结果见表3。3次重复平均回收率均在80%以上, CV为3.8%~8.1%。说明亲和柱适应性广, 净化效率高。

## 2.8 重复使用次数和稳定性

使用后的亲和柱通过再生, 当第5次使用后, 亲和柱的相对柱容量从105 ng/0.125 mL凝胶下降至65 ng/0.125 mL凝胶。有实验<sup>[24-25]</sup>表明导致IAC柱容量下降的主要因素是洗脱步骤, 其次是固定抗体的逸失, 贮

存时间和样品基质对柱容量影响不明显,因此,纯甲醇洗脱后,迅速用70%甲醇溶液除杂质后,立即用5~10倍柱体积PBS缓冲溶液平衡亲和柱,有利于保护亲和柱中抗体的活性。图3显示,亲和柱在2~8℃保存前6个月,相对柱容量缓慢下降20%左右,之后6~12个月相对柱容量基本保持稳定,12个月后相对柱容量又开始缓慢下降。保存12个月后,相对柱容量仍可达72 ng/0.125 mL凝胶,此时,通过减少上样体积等方法,该亲和柱仍可满足实验要求。

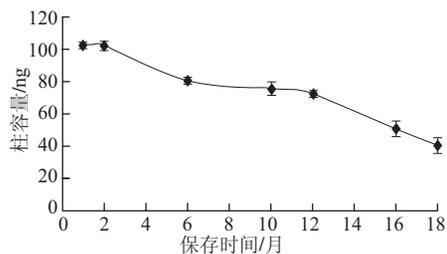


图3 亲和柱(2~8℃贮存)相对柱容量随时间变化曲线(n=3)

Fig.3 Relative column capacity of the affinity column as a function of storage time at 2-8 °C (n=3)

### 3 结论

以蛋白A-琼脂糖凝胶为配基定向偶联单抗,成功制备了AFB<sub>1</sub>免疫亲和柱。单抗偶联率达98.1%,取48 μL纯化抗体偶联,平均相对柱容量在105 ng/0.125 mL凝胶。柱空白测试表明蛋白A空白凝胶对AFB<sub>1</sub>无非特异性吸附。不同样品不同质量浓度添加回收实验表明,较小的柱体积能满足样品中AFB<sub>1</sub>的净化。

偶联时单抗纯度要求不高。从偶联后的反应液电泳结果可知,条带为杂蛋白,且有效单抗全部偶联在蛋白A上,揭示该法偶联单抗对其纯度没有过高的要求,由于蛋白A对IgG<sub>1</sub>有特异性结合,辛酸-饱和硫酸铵初步纯化抗体即可满足偶联要求。

定向偶联过程中单抗有效利用率为52.7%。章英等<sup>[17]</sup>将纯化好的单抗与溴化氰活化的4FF葡聚糖偶联制备抗ZEN单克隆抗体免疫亲和柱,固载350 μg ZEN单克隆抗体的容量为0.40 μg,则抗体的有效利用率为26.93%。从不同偶联方法制备真菌毒素亲和柱的单抗有效利用率来比较,蛋白A-凝胶的定向偶联是溴化氰活化随机偶联的1.96倍。该结果与黄昕等<sup>[26]</sup>报道MG<sub>31</sub>-r protein A-Sepharose FF的抗原结合容量是MG<sub>31</sub>-CNBr-Sepharose 4B抗原结合容量的1.8倍结论相同,说明定向偶联有助于提高免疫亲和吸附剂的抗原结合容量。定向偶联过程中交联条件的优化及2种偶联方法制备AFB<sub>1</sub>免疫亲和柱的比较是下一步研究的方向。

为避免重复使用带来杂质的干扰和加快分析速度,

一次性IAC柱成为期待,但单抗的低效利用及凝胶载体的浪费是成本居高不下的主要因素。传统CNBr活化的琼脂糖凝胶制备IAC柱时,凝胶成本占50%,单抗占30%。虽然蛋白A-琼脂糖凝胶较CNBr活化的琼脂糖凝胶贵近50%,但是通过定向偶联单抗有效利用率提高了1倍,且在柱容量不变的情况下IAC柱体积缩减一半,使得制备总成本节约了近30%。随着重组蛋白A、单抗等规模化生产,低成本、大容量、一次性IAC柱的使用将变为现实。

### 参考文献:

- [1] 黄慧明,徐群英,胡敏.黄曲霉毒素检测方法研究的概述[J].中国卫生检验杂志,2001,8(11):156-158.
- [2] STROKA J, ANKLAM E. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 904(2): 263-268.
- [3] 柳其芳.酶联免疫吸附法和薄层色谱法联合分析黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的研究[J].中国热带医学,2006,6(2):246-248.
- [4] 王坤,胡晓飞,王耀,等.食品中黄曲霉毒素高灵敏检测方法研究进展[J].中国公共卫生,2013,29(7):1079-1082.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局.GB/T 17480—2008 饲料中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的测定:酶联免疫吸附法[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [6] SUN Xiulan, ZHAO Xiaolian, TANG Jian, et al. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. International Journal of Food Microbiol, 2005, 99(2): 185-194.
- [7] ARDIC M, KARAKAYA Y, ATASEVER M, et al. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(5): 1596-1599.
- [8] 孙秀兰,张银志,汤坚,等.黄曲霉毒素B<sub>1</sub>完全抗原构建中结合位点研究[J].食品与生物技术学报,2007,26(5):99-103.
- [9] 邓省亮,赖卫华,许杨.胶体金免疫层析法快速检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的研究[J].食品科学,2007,28(2):232-235.
- [10] 姜兆兴,刘振伟,曹旭,等.免疫亲和柱高效液相色谱法测定饲料中黄曲霉毒素[J].饲料工业,2007,28(20):52-54.
- [11] 王桂苓,邢化冰,李琳琳,等.光化学柱后衍生-高效液相色谱法测定婴幼儿营养米粉中的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>[J].化学分析计量,2014,23(3):28-31.
- [12] 李友平,黄艳伟,刘彬彬,等.柱后光化学衍生-HPLC法检测药材中黄曲霉毒素[J].分子科学学报,2014,30(3):226-231.
- [13] 黄鹰,陶文沂,张莲芬,等.黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的高灵敏度时间分辨荧光免疫分析[J].核技术,2006,29(4):295-300.
- [14] 王勇,陈定虎,张宪臣,等.免疫亲和和层析净化荧光光度法快速检测鸡饲料中黄曲霉毒素[J].粮食与饲料工业,2013(11):62-64.
- [15] 徐燕,王云,张勋,等.去氢甲睾酮多克隆抗体免疫亲和柱的制备研究[J].中国食品学报,2011,11(7):195-199.
- [16] 王迪,杨曙明,刘潇威,等.莱克多巴胺免疫亲和柱的制备与应用研究[J].分析测试学报,2010,29(8):812-816.
- [17] 章英,黄志兵,邓舜洲,等.抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体免疫亲和柱的制备研究[J].中华预防医学杂志,2007,41(2):110-113.
- [18] 李金锁,邱月明,王超.兽药残留分析[M].上海:上海科学技术出版社,2002:214.
- [19] CHU F S, UENO I. Production of antibody against aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 33(5): 1125-1128.
- [20] 梁荣,伊岚,李健强.小鼠IgG类单克隆抗体三种纯化方法的比较[J].细胞与分子免疫学杂志,1996,12(1):55-58.
- [21] 张权庚,张玉祥,丁卫,等.抗体制备与使用实验指南[M].北京:科学出版社,2010:109-111.
- [22] SISSON T H, CASTOR C W. An improved method for immobilizing IgG antibodies on protein A-agarose[J]. Journal of Immunological Methods, 127: 215-220.
- [23] 张秀莉.免疫亲和萃取-LC-MS联用技术在痕量农残分析中的应用研究[D].大连:中国科学院大连化学物理研究所,2006:93-96.
- [24] 赵丽元,郝爱鱼,刘英慧.黄曲霉毒素免疫亲和柱重复利用的探讨[J].中国现代药物应用,2014,8(1):37-39.
- [25] 胡桂林,赵源,王志萍,等.大麦中赭曲霉毒素A的检测及免疫亲和柱重复使用的研究[J].中国食品工业,2009(4):48-49.
- [26] 黄昕,邱宗荫.免疫亲和色谱定向偶联方法的研究[J].重庆医科大学学报,1999,24(2):132-134.