[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
B01J 20/281 (2006.01)
G01N 30/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 200610007260.7

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100408163C

[22] 申请日 2006.2.16

[21] 申请号 200610007260.7

[73] 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

[72] 发明人 沈建忠 史为民 何继红 何方洋 侯晓林 吴聪明

[56] 参考文献

CN1733910 A 2006.2.15

多拉菌素人工抗原的制备与鉴定. 何继红等. 中国兽医杂志，第 41 卷第 01 期. 2005

抗阿维菌素抗体的研制. 李俊锁等. 畜牧兽医学报，第 27 卷第 06 期. 1996

兽药残留免疫分析及其进展. 李俊锁等. 中国兽医学报，第 18 卷第 04 期. 1998

猪肝中阿维菌素类药物残留的液相色谱检测方法. 王海等. 农业质量标准，第 03 期. 2005

审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称

净化阿维菌素类药物的方法及其免疫亲和色谱柱

[57] 摘要

本发明公开了一种净化阿维菌素类药物的方法及其免疫亲和色谱柱。 该净化阿维菌素的免疫亲和色谱柱装载有免疫亲和吸附剂，该吸附剂是由固相载体和与其偶联的阿维菌素多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述阿维菌素多克隆抗体或阿维菌素单克隆抗体是以阿维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述阿维菌素半抗原是将阿维菌素 -4″-OH 与琥珀酸酐酯化得到阿维菌素的琥珀酸衍生物即为阿维菌素半抗原。 本发明的提纯方法结合色谱法高效检测阿维菌素的含量，弥补了单纯免疫测定技术直接测定样本的信息量太少、定量准确差，或理化方法选择性低等不足，体现了免疫学技术和常规理化技术在分析机制的互补性。

1、一种净化阿维菌素和/或伊维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素的免疫亲和吸附剂，由固相载体和与其偶联的阿维菌素单克隆抗体组成；所述阿维菌素单克隆抗体为单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 分泌的单克隆抗体。

2、根据权利要求1所述的吸附剂，其特征在于：所述固相载体为纤维素、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、多孔玻璃、琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺-琼脂糖凝胶。

3、根据权利要求 2 所述的吸附剂，其特征在于：所述固相载体为 Sepharose 4B。

4、以权利要求1－3任一所述的免疫亲和吸附剂为填料的免疫亲和色谱柱。

5、含有权利要求1－3任一所述的免疫亲和吸附剂的试剂盒。

6、根据权利要求5所述试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还包括洗脱液，所述洗脱液为甲醇。

7、根据权利要求 6 所述试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还包括洗涤液Ⅰ、洗涤液Ⅱ、洗涤液Ⅲ和保存液；所述保存液为 0.01 M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液，所述 0.01 M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液为 1L 中含有 0.2 g KH_2PO_4, 0.2 g KCl，2.9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$，8.8 gNaCl，0.02g NaN_3 的溶液；所述洗涤液Ⅰ为 1L 中含有体积百分含量 20％的甲醇，0.2gKH_2PO_4，0.2gKCl，2.9g$Na_2HPO_4.12H_2O$ 和 29.3gNaCl，pH 7.4 的溶液；所述洗涤液Ⅱ为体积百分含量为 20％的甲醇溶液；所述洗涤液Ⅲ为体积百分含量为 50％的甲醇溶液。

8、含有权利要求4所述的免疫亲和色谱柱的试剂盒。

9、根据权利要求8所述试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还包括洗脱液，所述洗脱液为甲醇。

10、根据权利要求 9 所述试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还包括洗涤液Ⅰ、洗涤液Ⅱ、洗涤液Ⅲ和保存液；所述保存液为 0.01 M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液，所述 0.01 M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液为 1L 中含有 0.2 g KH_2PO_4, 0.2 g KCl，2.9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$，8.8 gNaCl，0.02g NaN_3 的溶液；所述洗涤液Ⅰ为 1L 中含有体积百分含量 20％的甲醇，0.2gKH_2PO_4，0.2gKCl，2.9g$Na_2HPO_4.12H_2O$ 和 29.3gNaCl，pH 7.4 的溶液；所述洗涤液Ⅱ为体积百分含量为 20％的甲醇溶液；所述洗涤液Ⅲ为体积百分含量为 50％的甲醇溶液。

11、一种净化阿维菌素和/或伊维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素的方法，包括以下步骤：

1）样品的前处理：

取动物组织匀浆物按5±0.01 g的量加入15 mL甲醇，充分混匀，然后在振荡器上中速振荡30 min， 3000 rpm离心10分钟，得到上清液即为样品溶液；

2）取3ml样品溶液与20 mL 的权利要求7中所述的保存液混合，过权利要求4所述的免疫亲和色谱柱，然后先后用20 mL权利要求7中所述的洗涤液Ⅰ、15mL权利要求7中所述的洗涤液Ⅱ和3mL权利要求7中所述的洗涤液Ⅲ洗涤，然后用4mL权利要求6中所述的洗脱液洗脱，收集洗脱液，得到纯化的阿维菌素和/或多拉菌素和/或伊维菌素和/或埃比菌素溶液。

12、根据权利要求11所述的方法，其特征在于：所述动物组织样品包括肌肉、肝、肺、心、肾和血浆。

净化阿维菌素类药物的方法及其免疫亲和色谱柱

技术领域

本发明涉及一种净化阿维菌素类药物(Aermectins，AVMs)，包括阿维菌素（Aermectin，AVM），多拉菌素（Doramectin,DOR），埃比菌素（Eprinomectin, EP）和伊维菌素(Ivermectin, IVM)的方法及其专用免疫亲和色谱柱。

背景技术

随着生命科学的发展，人们对生物体内的物质及其变化产生了越来越浓厚的兴趣，而生物样本的分析就成为探索和发现生命奥秘的必要手段。由于生物样本成分复杂，待测物浓度较低，而且大多数取样量很少，这就对分析方法的选择性和灵敏度提出了更高的要求。免疫亲和色谱（IAC,immunoaffinity chromatography）是一种将免疫反应与色谱分析方法相结合的分析方法。它的高度选择性和高亲和性无疑使分析过程简化。在兽药残留分析中，IAC 最简单而且最有效的应用方式是作为理化测定技术（如 HPLC,GC）的样品净化手段，这种联用方法可使免疫学技术和理化技术在选择性、分离能力、速度和灵敏度方面得到互补，并避免了免疫分析法（如 ELISA,RIA）直接测定样品的诸多不足。目前，该方法在抗体、激素、多肽、酶、重组蛋白、受体病毒及小分子化合物的分析中被广泛应用。

AVMs 包括阿维菌素（Avermectin，AVM）、伊维菌素（Ivermectin, IVM）、多拉菌素（Doramectin，DOR）、埃普里诺菌素（埃比菌素、依普菌素，Eprinomectin，EP）、莫西菌素（Moxidectin，MOX）和塞拉菌素（Selamectin，SEL）等药物，其中，AVMs 的共有结构如图 2 所示。

阿维菌素(Avermectin,AVM)，多拉菌素，埃比菌素和伊维菌素属于大环内酯类广谱抗寄生虫抗生素类药，对本类药物的抗虫谱包括牛羊的多种线虫如哥伦比亚结节虫、辐射结节虫及其幼虫、毛圆线虫、血柔属线虫、牛副丝虫、马属动物各类圆虫、副蛔虫、蛲虫、血柔线虫、蟠尾丝蚴，猪的食道口线虫、肺丝虫、旋毛虫及其移行蚴、包囊蚴、肾虫、犬的蛔虫、蛲虫、心丝虫、钩虫及各种动物的体外寄生虫如螨虫、蜱、虱、蝇类及蝇类蚴、日痒恙虫等本类药物的抗虫谱包括牛羊的多种线虫如哥伦比亚结节虫、辐射结节虫及其幼虫、毛圆线虫、血柔属线虫、牛副丝虫、马属动物各类圆虫、副蛔虫、蛲虫、血柔线虫、蟠尾丝蚴，猪的食道口线虫、肺丝虫、旋毛虫及其移行蚴、包囊蚴、肾虫、犬的蛔虫、蛲虫、心丝虫、钩虫及各种动物的体外寄生虫如螨虫、蜱、虱、蝇类及蝇类蚴、日痒恙虫等。许多国家建立了阿

维菌素类药物的残留检测方法并作出了残留限量的规定。AVMs 作为脂溶性化合物，在动物体内残效时间较长，因而 WHO 将其列为高毒化合物，其动物源食品中的残留检测工作引起各国的极大关注，并制定最高残留限量。

目前检测阿维菌素，多拉菌素，埃比菌素和伊维菌素的方法主要有高效液相色谱法-荧光（HPLC-FLD）、液一质联机（LC-MS-MS）和酶联免疫法（ELISA）等。这些方法的前处理利用液一液分配，常规的 SPE 柱净化和分离，都在不同程度地存在着处理过程繁琐、净化效果差、有机溶剂浪费多、所需时间长等缺点。免疫亲和技术是 90 年代在分析领域得到应用的新技术，但用免疫亲和柱净化基质中的阿维菌素，多拉菌素，埃比菌素和伊维菌素未见报道，更无商品化的 IAC 柱出售。

发明内容

本发明的目的是提供一种净化阿维菌素和/或伊维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素的方法及其专用免疫亲和色谱柱。

本发明所提供的净化阿维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素和/或伊维菌素的免疫亲和吸附剂是由固相载体和与其偶联的阿维菌素多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述阿维菌素多克隆抗体或阿维菌素单克隆抗体是以阿维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述阿维菌素半抗原是在阿维菌素的C4″ 位置上连接琥珀酸酐得到的4″ -羟-琥珀酸酐阿维菌素（4″ -o-succinoyl AVM ）即为阿维菌素半抗原。

阿维菌素是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。本发明将阿维菌素用琥珀酸酐酰化，再与载体蛋白偶联得到免疫原。半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利，半抗原与卵清蛋白（OVA）、牛血清蛋白(BSA)的结合摩尔比分别为 31.6:1 和 23：1。

所述固相载体可为纤维素、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、多孔玻璃、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺-琼脂糖凝胶等，优选为Sepharose 4B。

所述阿维菌素多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述阿维菌素单克隆抗体优选为阿维菌素鼠单克隆抗体，所述阿维菌素多克隆抗体为优选阿维菌素兔多克隆抗体。

所述阿维菌素鼠单克隆抗体优选为对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株A-1-4 CGMCC No.1606。

所述对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 已于 2006 年 2 月 9 日保藏于中国微生物菌种保藏

管理委员会普通微生物中心（简称CGMCC）。

所述载体蛋白可为牛血清白蛋白或卵清蛋白等常用载体蛋白。

所述免疫亲和吸附剂可装载入柱中制成免疫亲和色谱柱，该免疫亲和色谱柱也属于本发明的保护范围。

含有上述免疫亲和吸附剂或免疫亲和色谱柱的试剂盒也属于本发明的保护范围。

所述试剂盒中还包括洗脱液，所述洗脱液可为甲醇。

所述试剂盒中还包括洗涤液Ⅰ、洗涤液Ⅱ、洗涤液Ⅲ和保存液；所述保存液可为0.01 M, pH 7.4的磷酸盐缓冲液，所述0.01 M, pH 7.4的磷酸盐缓冲液可为1L中含有0.2 g KH_2PO_4，0.2 g KCl，2.9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$，8.8 g NaCl，0.02g NaN_3的溶液；所述洗涤液Ⅰ可为1L中含有体积百分含量20%的甲醇，0.2 g KH_2PO_4，0.2 g KCl，2.9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$，和29.3 g NaCl， pH 7.4的溶液；所述洗涤液Ⅱ为体积百分含量为20%的甲醇溶液；所述洗涤液Ⅲ可为体积百分含量为50%的甲醇溶液。

该免疫亲和吸附剂以及含有该免疫亲和吸附剂的色谱柱基于免疫反应和色谱反应，适合从生物样品（如肌肉、肝、肺、肾血浆）中净化阿维菌素，多拉菌素，埃比菌素和伊维菌素，便于残留分析。在该免疫亲和吸附剂中，阿维菌素鼠单克隆抗体和阿维菌素兔多克隆抗体与溴化氰活化的Sepharose 4B的偶联率分别是99.7%，98.1%，偶联有阿维菌素鼠单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对阿维菌素，伊维菌素，埃比菌素和多拉菌素动态柱容量分别为3884 ng/mL、3896 ng/mL、3612 ng/mL、3897 ng/mL，绝对柱容量分别为545 ng/mg IgG、549 ng/mg IgG、506 ng/mg IgG、542 ng/mg IgG；使用了15次后动态柱容量为1300-1500 ng/mL。

本发明所提供的提纯阿维菌素和/或伊维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素的方法，包括以下步骤：

1）样品的前处理：

取动物组织匀浆物按5±0.01 g的量加入15 mL甲醇，充分混匀，然后在振荡器上中速振荡30 min， 3000 rpm 离心10 分钟，得到上清液即为样品溶液；

2）取3ml样品溶液与20 mL 的上述保存液混合，过上述免疫亲和色谱柱，然后先后用20 mL洗涤液Ⅰ、15 mL洗涤液Ⅱ和3 mL洗涤液Ⅲ洗涤，然后用4 mL洗脱液洗脱，收集洗脱液，得到纯化的阿维菌素和/或伊维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素溶液。

本发明的免疫亲和色谱柱具有高选择性，使样品前处理过程大大简化，尤其适

用于肌肉、肝和血浆中微量阿维菌素类药物的前处理，分析质量得到改善。免疫亲和吸附剂的高选择性使得阿维菌素，伊维菌素，埃比菌素和多拉菌素分析方法的检测限将主要取决于取样量，这是单纯理化手段难以达到的；本发明的免疫亲和色谱柱对待测组分有很强的保留和浓缩能力，只要加样量不超过柱容量，在实测样品条件下免疫亲和吸附剂对组分的保留能力几乎不受样品体积或组分浓度的影响。本发明的方法对组分净化的同时还可提供定性信息。本发明的方法水相操作，操作简单，净化效果好，免疫亲和色谱柱能重复使用，能节省大量的有机溶剂，降低分析成本和环境污染。本发明的净化方法结合色谱法高效检测阿维菌素，伊维菌素，埃比菌素和多拉菌素的含量，弥补了单纯免疫测定技术直接测定样本的信息量太少、定量准确差，或理化方法选择性低等不足，体现了免疫学技术和常规理化技术在分析机制的互补性。

附图说明

图 1 为 AVMs 的标准品、空白肌肉组织和添加样本的液相色谱图

图 2 为 AVMs 的共有结构图

具体实施方式

下述实施例中的实验方法，如无特别说明，均为常规方法。

实施例 1、净化阿维菌素和/或伊维菌素和/或埃比菌素和/或多拉菌素的免疫色谱柱的制备

1、阿维菌素兔多克隆抗血清的制备

阿维菌素半抗原的合成分三步：

（1）5-o-t-$BuMe_2Si$-AVM-4″-OH 的合成：将 1.0g 阿维菌素置于 25mL 三口鸡心瓶中，6 mL N,N-二甲基酰胺（DMF）溶解，加 0.47g 咪唑，混合。机械搅拌下，将 2 mL DMF 稀释的 0.52 g t-$BuMe_2SiCl$（tert-butyldimethylchlorosilane）逐滴加入，30℃反应 2 h。向反应液中加入 100 mL 乙酸乙酯(EtoAc)混合。混合液用 50 mL 水洗涤 3 次。分离 EtoAc 层，$MgSO_4$干燥，减压浓缩得到微黄色粘稠物。将该微黄色粘稠物用 CH_2Cl_2溶解，硅胶柱层析分离产物，干燥后得到 5-o-t-$BuMe_2Si$-AVM-4″-OH。

（2）5-o-t-BuM_2Si- AVM-4″-o-succinoyl 的合成：取 0.50 g 5-o-t-BuM_2Si-R-4″-OH 置于 50 mL 三口鸡心瓶中，加 12 mLCH_2Cl_2使其溶解,依次加入 0.28 g 4-二甲氨基吡啶（DMAP）、 0.45 g 三乙胺和 0.92 g 琥珀酸酐,水浴中回流 2.5 小时，溶液由无色变为棕色、黑色（与反应原料无关）。减压蒸干 CH_2Cl_2后，加入 100 mL 乙醚，过滤除去不溶物后转至 250 mL 分液漏斗中，乙醚层用 100 mL 3.6%（质量百分含量）HCl 洗涤 2 次，再用 100 mL 水洗涤 2 次。$MgSO_4$干燥，浓缩，得淡黄色粘稠物，用

CH_2Cl_2溶解后，用薄层色谱(TLC) 对产物进行分离(展开剂各成分体积比为 CH_2Cl_2: 四氢呋喃（THF）:CH_3OH=95：5：5）。TLC 出现三条区带，将中间最大的区带刮下，用 CH_2Cl_2和 CH_3OH（体积比为 1：1）淋洗，减压浓缩，真空干燥 24 h（避光）得到 5-o-t-BuM₂Si- AVM-4″-o-succinoyl。

（3）将步骤 2）得到的产物脱去保护基 5-o-t-BuM₂Si- AVM，得到 4″-o-succinoyl-AVM，该阿维菌素的琥珀酸衍生物即为阿维菌素半抗原。

免疫原的制备：本试验采用 N-羟基琥珀酰亚胺酯法（NHS）将阿维菌素半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)偶联，得到 BSA-AVM 偶联物或 OVA-AVM 偶联物即为免疫抗原。

免疫原合成的具体步骤如下：

1)取 12 mg 阿维菌素半抗原置于 5 mL 圆底烧瓶中，加 0.4 mL 二甲基甲酰胺(DMF)使阿维菌素半抗原溶解，再加入 2.7 mg N-羟基琥珀酰亚胺酯和 4.7 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC.HCl），混合后，室温(18-20℃)避光搅拌 10 小时。

2）搅拌下，在 1 h 内将步骤 1）得到的反应液逐滴加到 6 mL 含 30 mg BSA 或 OVA 和 0.6ml DMF 的硼酸盐缓冲液（0.2 M, pH 9.4）。溶液开始略显混浊，最后有少量沉淀出现，继续搅拌 1 小时，再转至 4℃下搅拌 10-12 小时，立即进行下述透析纯化。

3）将步骤 2）得到的反应液转入透析袋（截止分子量 10,000 Da）4℃搅拌下，透析 2 d，其间换 PBS 三次。将透析物 1000 rpm 离心 5 min, 除去沉淀，得到的上清液即为免疫原 BSA-AVM 偶联物或 OVA-AVM 偶联物。

动物免疫：采用新西兰大白兔作为免疫动物，免疫剂量为 $1mg \cdot ml^{-1}$ BSA-AVM 偶联物或 $1mg \cdot ml^{-1}$ OVA-AVM 偶联物。将新西兰兔子饲养数周后接种免疫，首次免疫用 1ml 完全弗氏佐剂乳化，加强免疫用 1ml 不完全弗氏佐剂乳化。每次免疫间隔 3-4 周，一共免疫 5 次，最后一次不加佐剂直接肌肉注射，最后一次免疫 7-10d 后采血检测，测定血清效价和交叉反应后，颈动脉放血，收集血清。

2、阿维菌素鼠单克隆抗体的制备

动物免疫：采用 BALA/C 小鼠作为免疫动物、以上述阿维菌素半抗原与蛋白质载体的偶联物 BSA-AVM 偶联物或 OVA-AVM 偶联物为免疫原，免疫剂量为 50μg /只（体积为 0.1ml） 加等体积的完全弗氏佐剂乳化，进行首次免疫。一个月后，取同样量免疫抗原加不完全弗氏佐剂，乳化，进行加强免疫，再过一个月后同法再次进行加强免疫，二免后 10 天采血，测定抗体效价和交叉反应后，取脾细胞。

细胞融合：脾细胞按5:1比例与SP2/0骨髓瘤细胞进行细胞融合。

杂交瘤细胞克隆化：采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，直到得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株A-1-4 CGMCC No.1606，该单克隆杂交瘤细胞株对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应。对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606已于2006年2月9日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称CGMCC）。

单克隆抗体大量生长及提纯：采用体内诱生法，将BALB/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油，7-14天后腹腔注射对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 5×10^5-10^6个/只，7-10天后采集腹水。

单克隆抗体的保存：在液氮-20℃下保存，使用时37℃水浴快速解冻。

3、IgG的纯化：

采用饱和硫酸胺盐法（SAS）和DEME纤维素离子交换层析法纯化抗血清或腹水，首先用饱和硫酸铵法将IgG进行粗提和浓缩，再用DEAE52纤维素阴离子交换法将IgG进一步纯化。其具体步骤如下：

粗提：取3 mL阿维菌素多克隆抗体血清或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606腹水与3 mL PBS（0.01 M, pH 7.0），混匀，吸取饱和硫酸铵溶液6 mL，边缓慢滴加边搅拌加入血清或腹水溶液中，使硫酸铵溶液的饱和度达到50%。4℃放置60 min后，3000g离心15 min。将所得沉淀再溶于3 mL PBS(0.01 M, pH 7.0)中，缓慢滴加饱和硫酸铵溶液1.6 mL，使硫酸铵溶液饱和度达35%。4℃放置20 min后，以3000g离心15 min。沉淀再用上述方法在饱和度为35%的硫酸铵溶液中沉淀一次。

脱盐：将沉淀溶于（0.0175 M, pH 6.7）PBS中，装入透析袋，并将透析袋置于1000 mL的PBS（0.0175 M, pH 6.7）溶液中 于4℃下搅拌透析24小时，在此过程中置换缓冲液3次，得到粗提的IgG溶液。

纯化：称取2g DE-52（DEAE-52）纤维素粉末，置于盛有重蒸馏水的烧杯中，充分搅拌，静置后去掉多余溶液，然后加入0.5mol/L NaOH溶液，搅拌均匀，1h后布氏漏斗抽滤，接着用重蒸水充分洗涤至中性。再用0.5 mol/L HCl溶液以同样的方法处理。最后换用0.5 mol/LNaOH溶液处理一次，充分水洗至中性，然后将处理的DEAE-52装入层析柱中（2.0×20 cm），于0.0175 M, pH 6.7的PBS中平衡。将盐析所得粗提的IgG溶液滴入层析柱，待全部样本进入柱后，关闭柱下口，并在柱上

覆盖 3-5 cm 0.0175 M, pH 6.7 的 PBS 洗脱，连接洗脱瓶，控制流速为 1.0 mL/min，用紫外检测器收集蛋白组分。将含有抗体蛋白的洗脱液用 50%的饱和硫酸铵进行沉淀，所得沉淀脱盐后，得到对伊维菌素、埃比菌素和多拉菌素都有交叉反应的阿维菌素兔多克隆抗体或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 分泌的单克隆抗体，将抗体分装并于-20℃保存。

4、免疫色谱柱（IAC）的制备

基质的准备：取溴化氰活化的 Sepharose 4B 干冻粉，在盛有 1.0mmol l^{-1}HCl 的 G_3漏斗中膨胀。

偶联反应：将凝胶用 0.1 mol/L $NaHCO_3$溶液平衡后，与 20 mg 的上述纯化抗体（溶于 5 mL 0.1mol/L $NaHCO_3$溶液）混合，在 4℃搅拌 20 h。

反应液转入 G3 漏斗中，用 100 mL 0.01 M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液（1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g，12 水合磷酸氢二钠 2.86g，氯化钾 0.2g，氯化钠 8.8g）洗涤，收集洗涤液，紫外鉴定，计算偶联率。偶联率计算公式为：

$$偶联率（\%）= \frac{偶联前 IgG 总量 - 未偶联 IgG 量}{偶联前 IgG 总量} \times 100\%$$

偶联率的检测结果表明，兔多克隆抗体和对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 分泌的单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 的偶联率分别是 99.7±1.5%、98.1±1.6%。

活化位点的封闭：将上述偶联后的凝胶转入盛有 0.1mol/L、pH8.0 的 Tris－HCl 缓冲液中，混合，4℃下缓慢搅拌 2hr，以封闭未偶联的活化位点。

洗涤：凝胶用 5 倍体积的 0.1mol/L、pH4.0 醋酸盐缓冲液和 0.1mol/L、pH8.0Tris－HCl 缓冲液交替冲洗 3 次。用 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS（1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g，12 水合磷酸氢二钠 2.86g，氯化钾 0.2g，氯化钠 8.8g）平衡后，抽干的凝胶转入 0.01 mol/L、pH7.4 的含 0.1%NaN_3磷酸盐缓冲液（1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g，12 水合磷酸氢二钠 2.86g，氯化钾 0.2g，氯化钠 8.8g，$NaN_3$1g）中，4℃下存放备用。

装柱：将偶联有阿维菌素兔多克隆抗体或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 分泌的单克隆抗体的免疫吸附剂转入到含 G_3滤板的玻璃柱里，制成偶联有兔多克隆抗体或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株

A-1-4 CGMCC No.1606 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱（IAC 柱）。

5、IAC 柱容量的确定

将步骤 4 制备的偶联有兔多克隆抗体或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱，分别用保存液洗柱，平衡。轻轻上下晃动 IAC 柱，赶走柱里的气泡。将 2mL 含有 $2000ng\cdot ml^{-1}$阿维菌素（AVM）、$2000ng\cdot ml^{-1}$伊维菌素（IVM）、$2000ng\cdot ml^{-1}$埃比菌素（EP）和 $2000ng\cdot ml^{-1}$多拉菌素 4 种药物的混合标准品的保存液分别连续加到免疫亲和色谱柱上，自然重力下流出。当柱达到饱和后（流出液中样品浓度和加样液浓度相同），先后用 20 mL 洗涤液 I （1L 中含有体积百分含量 20%的甲醇，0.2 g KH_2PO_4，0.2 g KCl，2.9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$，和 29.3 g NaCl，pH 7.4），15 mL 洗涤液II（体积百分含量为 20%的甲醇溶液）和 3 mL 洗涤液III（体积百分含量为 50%的甲醇溶液）洗涤免疫亲和色谱柱，除去干扰杂质。最后用 4ml 洗脱液（甲醇）将阿维菌素类药物洗脱，自然重力下流出，收集，吹干，进行 HPLC 测定。计算出动态柱容量和绝对柱容量。动态柱容量(dynamic column capacity)是指每毫升免疫吸附剂（或柱床体积）对待测物的最大吸收值。绝对柱容量(specific column capacity)是指每毫克固定抗体对待测物的最大结合容量。结果表明偶联有对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱的动态柱容量和绝对柱容量分别为 3884ng/mL，545 ng/mg IgG（阿维菌素）；3896 ng/mL，549 ng/mg IgG（伊维菌素）；3612 ng/mL，506 ng/mg IgG（埃比菌素）；3897 ng/mL，542 ng/mg IgG（多拉菌素）。

实施例 2、含有偶联有兔多克隆抗体或鼠单克隆抗体的免疫色谱柱的试剂盒的制备及其对阿维菌素类药物的提纯净化效果

1、阿维菌素的试剂盒的制备

该试剂盒主要由盒体，免疫色谱柱（IAC 柱），阿维菌素标准溶液，伊维菌素标准溶液，多拉菌素标准溶液，埃比菌素标准溶液，洗涤液 I，洗涤液II，洗涤液III，洗脱液，保存液，海绵托架所组成，海绵托架上设有孔和凹槽。海绵托架的凹槽内有装有阿维菌素标准溶液，伊维菌素标准溶液，多拉菌素标准溶液，埃比菌素标准溶液，涤液 I，洗涤液II，洗涤液III，洗脱液，保存液的试剂瓶，海绵托架的孔内装有 IAC 柱。其中免疫色谱柱为实施例 1 制备的偶联有兔多克隆抗体或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱。

洗脱液为甲醇。

保存液为0.01 M, pH 7.4的磷酸盐缓冲液，即1L中含有0.2gKH_2PO_4，0.2 g KCl，2.9gNa_2HPO_4.$12H_2O$，8.8gNaCl，0.02g NaN_3的溶液；

洗涤液Ⅰ为1L中含有体积百分含量20%的甲醇，0.2gKH_2PO_4，0.2 gKCl，2.9 g Na_2HPO_4.$12H_2O$，和29.3gNaCl，pH 7.4的溶液；

洗涤液Ⅱ为体积百分含量为20%的甲醇溶液；

洗涤液Ⅲ为体积百分含量为50%的甲醇溶液。

将含有偶联有兔多克隆抗体或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱的试剂盒分别放在4℃。

2、阿维菌素类药物的提纯净化效果实验

IAC提取原理是，将特异性抗体阿维菌素兔多克隆抗体或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606分泌的单克隆抗体和惰性基质偶联，制备免疫吸附剂，装柱。当含阿维菌素和/或伊维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素的混合物流过IAC柱时，固定抗体选择性地结合阿维菌素和/或伊维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素，其它不被识别的样品杂质则不受阻碍地流出IAC柱，经洗涤后，将抗原-抗体复合物解离洗脱，阿维菌素和/或伊维菌素和/或多拉菌素和/或埃比菌素得到净化。IAC柱经再生处理后可重复使用。

检测样品的处理：动物组织样品：分别取猪肌肉，牛的肝、肺、肌肉、心、肾各组织样品匀浆物5.0±0.01 g，于50ml塑料离心管中，每个样本按10 ng/g浓度分别添加阿维菌素，伊维菌素，多拉菌素和埃比菌素标准品，静置15 min后，加入甲醇15 mL，充分混匀，在振荡器上振荡30 min，3000 rpm 离心10 min，取上清液3 mL，与20 mL 的保存液混合，作为样品溶液。

分别将偶联有兔多克隆抗体IgG或对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4 CGMCC No.1606分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱平衡到室温，然后将上述的样品溶液过柱，自然重力下流出，先后用20 mL洗涤液Ⅰ，15 mL洗涤液Ⅱ和3 mL洗涤液Ⅲ洗涤免疫亲和色谱柱，最后用4 mL洗脱液洗脱，收集洗脱液，氮气吹干。

加入100 μL衍生化试剂A液（由体积比为3：4的1-甲基咪唑和乙腈组成），涡动0.5分钟，再加入100 μL衍生化试剂B液（由体积比为2：5的醋酸酐和乙腈组成），涡动0.5 min，密闭，于96℃衍生化反应100分钟，用乙腈定容至2.5 mL，

过0.45 μm针筒滤膜，进HPLC分析（色谱条件：C_{18}反相色谱柱，Inertsil ODS-3（4.6 mm×250 mm，粒径5 μm）；流动相为体积百分含量为97%的甲醇溶液；流速为1 mL/min；进样量为20 μL；激发波长为365 nm，发射波长475 nm）。IAC柱用20ml的保存液平衡保存在4℃冰箱里备用。结果表明，用IAC进行样品净化，不干扰药物色谱峰，能够完全分离，说明本发明制备的IAC非特异性吸附极小，其中猪肌肉中的阿维菌素，伊维菌素，多拉菌素和埃比菌素净化效果如图1所示，图1中，A为含有阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素各10 ng/mL的标准品溶液；B为添加10 ng/g阿维菌素、10 ng/g伊维菌素、10 ng/g多拉菌素和10 ng/g埃比菌素标准品的猪肌肉样本浓度；C为未添加阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃比菌素的猪肌肉组织；图1中，1为埃比菌素B1a，2为阿维菌素B1a，3为多拉菌素，4为伊维菌素B1a。

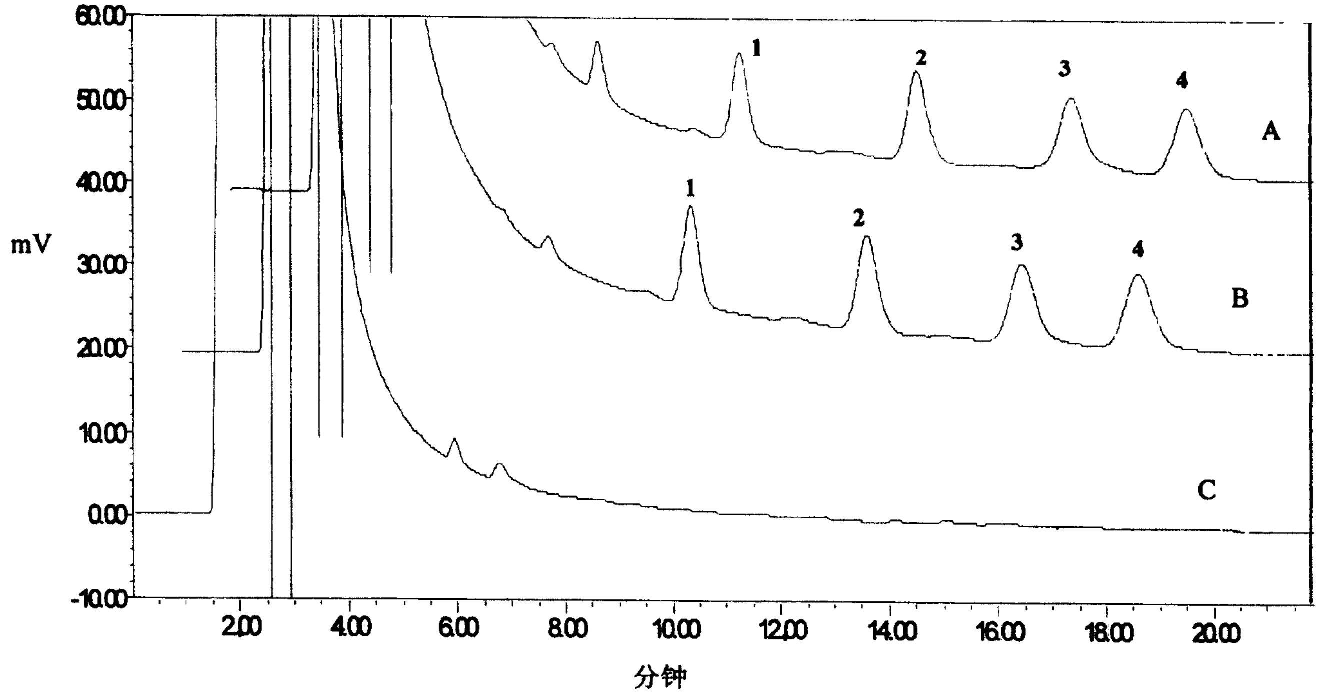
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
-10.00
mV
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
分钟
1
2
3
4
A
B
C

图 1

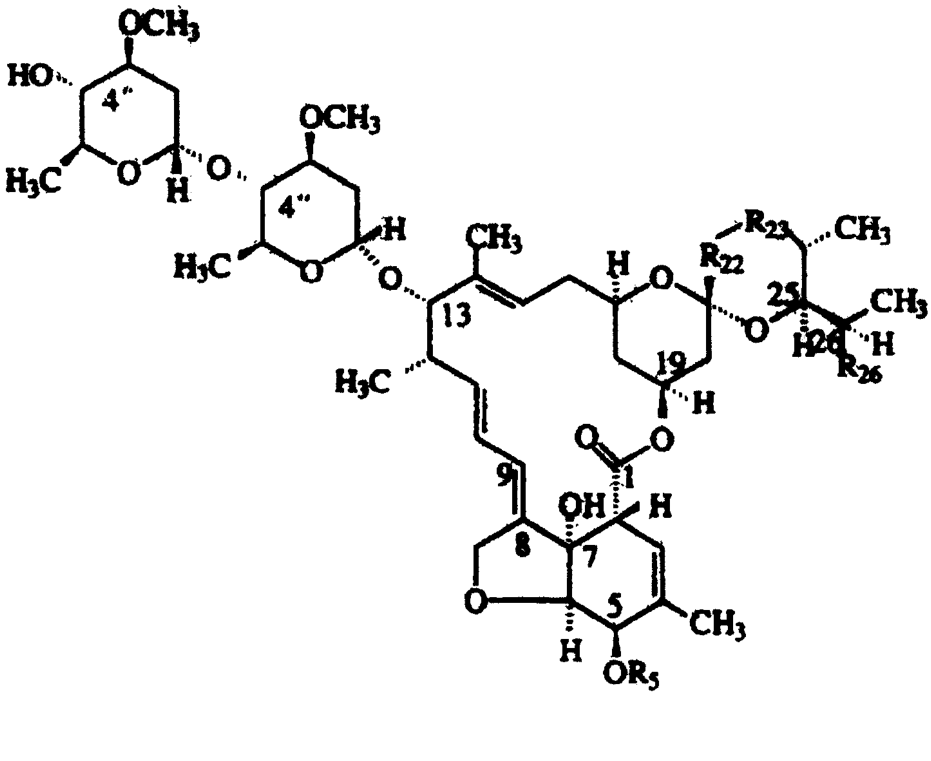
OCH3
HO
4"
H3C
O
H
O
OCH3
4"
H
H3C
O
O
CH3
13
H3C
H
O
R22
R23
CH3
25
O
CH3
H
26
H
R26
19
H
O
O
1
9
OH
H
8
7
O
5
CH3
H
OR5

图 2

专利名称(译)	净化阿维菌素类药物的方法及其免疫亲和色谱柱		
公开(公告)号	CN100408163C	公开(公告)日	2008-08-06
申请号	CN200610007260.7	申请日	2006-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 史为民 何继红 何方洋 侯晓林 吴聪明		
发明人	沈建忠 史为民 何继红 何方洋 侯晓林 吴聪明		
IPC分类号	B01J20/281 G01N30/00 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN1830547A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种净化阿维菌素类药物的方法及其免疫亲和色谱柱。该净化阿维菌素的免疫亲和色谱柱装载有免疫吸附剂，该吸附剂是由固相载体和与其偶联的阿维菌素多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述阿维菌素多克隆抗体或阿维菌素单克隆抗体是以阿维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述阿维菌素半抗原是将阿维菌素-4″-OH与琥珀酸酐酯化得到阿维菌素的琥珀酸衍生物即为阿维菌素半抗原。本发明的提纯方法结合色谱法高效检测阿维菌素的含量，弥补了单纯免疫测定技术直接测定样本的信息量太少、定量准确差，或理化方法选择性低等不足，体现了免疫学技术和常规理化技术在分析机制的互补性。

$$\text{偶联率}(\%)=\frac{\text{偶联前 IgG 总量}-\text{未偶联 IgG 量}}{\text{偶联前 IgG 总量}}\times 100\%$$