

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610003549.1

[51] Int. Cl.
C07D 401/06 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/559 (2006.01)

[43] 公开日 2006年7月26日

[11] 公开号 CN 1807425A

[22] 申请日 2006.2.13

[21] 申请号 200610003549.1

[71] 申请人 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 丁双阳 史为民 侯亚莉
何方洋

[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8页 附图1页

[54] 发明名称

一种净化常山酮的方法及其专用免疫亲和色谱柱

[57] 摘要

本发明公开了一种净化常山酮的方法及其免疫亲和色谱柱。该净化常山酮的免疫亲和吸附色谱柱装载的吸附剂是由固相载体和与其偶联的常山酮多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述常山酮多克隆抗体或常山酮单克隆抗体是以常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述常山酮半抗原是将氢溴酸常山酮溶于N,N-二甲基甲酰胺中，再加入三甲基硅烷咪唑，得到常山酮的琥珀酸衍生物即为常山酮半抗原。本发明的净化方法结合色谱法高效检测常山酮的含量，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. 一种净化常山酮的免疫亲和吸附剂，是由固相载体和与其偶联的常山酮多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述常山酮多克隆抗体或常山酮单克隆抗体是以常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述常山酮半抗原是将氢溴酸常山酮溶于N,N-二甲基甲酰胺中，再加入N-三甲基硅烷基咪唑，得到常山酮的琥珀酸衍生物即为常山酮半抗原。

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，优选为Sephrose 4B；所述常山酮单克隆抗体为常山酮鼠单克隆抗体；所述常山酮多克隆抗体为常山酮兔多克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的吸附剂，其特征在于：所述常山酮鼠单克隆抗体为常山酮的单克隆杂交瘤细胞株A-2-2 CGMCC No. 1608分泌的单克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的吸附剂，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

5. 装载有权利要求1-4任一所述的免疫亲和吸附剂的免疫亲和柱。

6. 含有权利要求1-4任一所述的免疫亲和吸附剂的试剂盒或含有权利要求5所述的免疫亲和色谱柱的试剂盒。

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脱液，所述洗脱液为甲醇。

8. 根据权利要求7所述试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还包括洗涤液和保存液；所述洗涤液为pH7.4, 0.01mol/L的磷酸盐缓冲液，所述0.01mol/L磷酸盐缓冲液为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；所述保存液为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 0.2g, pH7.4。

9. 一种净化常山酮的方法，包括以下步骤：

1) 样品的前处理：

将动物组织样品按照2g的量加入5ml浓度为 $0.5\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 胰蛋白酶，用质量百分含量为10%的 NaCO_3 溶液调pH值为7-8，在40℃水浴锅里酶解3h，取出放至室温，加入2ml的质量百分含量为10%的 NaCO_3 溶液，混匀，再加入10ml乙酸乙酯，涡动40s，在冰水混合物静置3min, 2000g离心两分钟，取出上清液，加入5ml的0.125mol/L

乙酸铵溶液，涡动 1min，在冰水混合物静置 3min，立即 2000g 离心两分钟，收集下层水相加入 5ml 的正己烷轻轻振摇 20s，取下层水相为样品溶液；

2) 将步骤 1) 得到的样品溶液过权利要求 5 所述的免疫亲和色谱柱，然后用权利要求 8 所述的洗涤液洗涤，再用权利要求 7 所述的洗脱液洗脱，得到净化的常山酮溶液。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：所述动物组织样品包括肌肉、肝、肺、肾和血浆。

一种净化常山酮的方法及其专用免疫亲和色谱柱

技术领域

本发明涉及一种净化常山酮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。

常山酮（Halofuginone）是一种广谱抗寄生虫药，对鸡的柔嫩、毒害、堆型、变位、巨型、布氏艾美耳球虫均有效，对球虫的子孢子、第一代裂殖体和第二代裂殖体均有明显的抑杀作用。对大多数革兰氏阳性菌也有效，且无交叉耐药性。在家禽业中，常山酮作为一种饲料添加剂被广泛用来预防和治疗家禽的球虫病。这样就潜在进入人们的食物链中的危险。许多国家建立了常山酮的残留检测方法并作出了残留限量的规定。在美国，常山酮已被列入 FSIS 的国家残留检测计划中，规定在鸡肝中常山酮的最高残留检测限为 $0.16\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，休药期为 4 天。我国规定常山酮在鸡肝、肌肉中最高残留限量分别为 $0.13\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，休药期为五天。

目前检测常山酮的方法主要有气相色谱法（GC-UV）、高效液相色谱法（HPLC-UV）、液-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-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常山酮未见报道，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常山酮的方法及其专用免疫亲和吸附剂。

本发明所提供的净化常山酮的免疫亲和吸附剂是由固相载体和与其偶联的常山

酮多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述常山酮多克隆抗体或常山酮单克隆抗体是以常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述常山酮半抗原是将氢溴酸常山酮（HAL）溶于N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，再加入N-三甲基硅烷基咪唑（TMSI，N-Trimethylsilylimidazole）进行反应，得到常山酮的琥珀酸衍生物即为常山酮半抗原。

常山酮是小分子物质，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。本发明将氢溴酸常山酮（HAL）用N,N-二甲基甲酰胺（DMF）酰化，接出了一个含4个碳的间隔臂形成半抗原，这样突出了常山酮半抗原决定簇的特征结构，有助于制备出针对常山酮抗原特异性较强的多克隆抗体。再将常山酮采用N-羟基琥珀酸亚胺法（活性脂法）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不利于特异性抗体的产生，半抗原与卵清蛋白（OVA）、牛血清蛋白（BSA）的结合摩尔比分别为5:1和9.5:1。

所述固相载体有纤维素、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。

所述常山酮抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述常山酮单克隆抗体优选为常山酮鼠单克隆抗体，所述常山酮多克隆抗体优选为常山酮兔多克隆抗体。

所述常山酮鼠单克隆抗体优选为常山酮的单克隆杂交瘤细胞株A-2--2 CGMCC No. 1608分泌的单克隆抗体。

所述常山酮的单克隆杂交瘤细胞株A-2--2 CGMCC No. 1608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，所述洗脱液为色谱级的甲醇。

所述试剂盒中还包括洗涤液和保存液；所述洗涤液为0.01mol/L，pH7.4的磷酸盐缓冲液，为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；所述保存液为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，NaN₃0.2g，pH7.4。

该免疫亲和剂及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）中净化常山酮，便于残留分析。在该免疫亲和吸附剂及色谱柱中，

兔多克隆抗体IgG和杂交瘤细胞株常山酮的单克隆杂交瘤细胞株A-2--2 CGMCC No. 1608分泌的单克隆抗体与溴化氰活化的Sepharose 4B的偶联率分别是 $96.7 \pm 1.5\%$ 、 $97.3 \pm 1.5\%$ 。动态柱容量为1500—6000ng，在使用20次后柱容量为原总柱容量的51%左右。

本发明所提供的净化常山酮的方法，包括以下步骤：

1) 样品的前处理：

在2g动物组织样品中加入5ml浓度为 $0.5\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 胰蛋白酶，用质量百分含量为10%的 NaCO_3 溶液调pH值为7—8，在40℃水浴锅里酶解3h，取出放至室温，加入2ml的质量百分含量为10%的 NaCO_3 溶液，混匀，再加入10ml乙酸乙酯，涡动40s，在冰水混合物静置3min，2000g离心两分钟，取上清液，加入5ml的 0.125mol/L 乙酸铵溶液，涡动1min，在冰水混合物静置3min，立即2000g离心两分钟，收集下层水相加入5ml的正己烷轻轻振摇20s，除去乙酸乙酯和正己烷，得到的水相为样品溶液；

2) 将步骤1)得到的样品溶液过免疫亲和色谱柱，然后用洗涤液洗涤，再用上述洗脱液洗脱，得到纯化的常山酮溶液。

本发明的免疫亲和吸附剂及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HAL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常山酮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；本发明的免疫亲和吸附剂及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常山酮的含量，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为免疫亲和色谱柱净化的鱼肌肉中氢溴酸常山酮的高效液相色谱效果图

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、净化常山酮的免疫色谱柱的制备

1、常山酮兔多克隆抗体的制备

常山酮半抗原的合成：将氢溴酸常山酮（HAL）溶于N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，加入N-三甲基硅烷基咪唑（TMSI, N-Trimethylsilylimidazole），产生的白色沉

淀是常山酮琥珀酸衍生物，即为常山酮半抗原。

免疫原的制备：采用 N-羟基琥珀酸亚胺活（活性脂法），将常山酮半抗原与蛋白质载体牛血清蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)偶联，制成免疫原 BSA-HAL 或 OVA-HAL。

动物免疫：采用新西兰大白兔作为免疫动物，免疫剂量为 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ BSA-HAL 偶联物或 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ OVA-HAL 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，最后一次免疫不加佐剂直接肌肉注射，最后一次免疫 7-10d 后采血检测，测定血清效价后，颈动脉放血，收集血清。

2、常山酮鼠单克隆抗体的制备

动物免疫：采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物，以上述常山酮半抗原与蛋白质载体的偶联物 BSA-HAL 或 OVA-HAL 为免疫原，免疫剂量为 $50\mu\text{g}$ /只。首次免疫用免疫原与等体积完全弗氏佐剂的乳化物。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，取脾细胞。

细胞融合：脾细胞按 5:1 的比例与 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常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608。常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 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）。

单克隆抗体大量生产及提纯：采用体内诱生法，将 BALB/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油，7 天后腹腔注射常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 $5 \times 10^5 - 10^6$ 个/只，7-10 天后采集腹水。

单克隆抗体的保存：在 -20°C 下保存，使用时 37°C 水浴快速解冻。

3、IgG 的纯化：

采用饱和硫酸铵盐法 (SAS) 和 DEME 纤维素离子交换层析法纯化抗血清或腹水。其具体步骤如下：

(1) SAS 盐析：1) 50%饱和度盐析：取上述制备的兔抗血清或注射常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 得到的鼠腹水 5ml，加等量 0.01 mol/L 、 $\text{pH}7.4$ 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) 混匀，然后逐滴加入等体积的饱和硫酸铵 ($\text{pH}7.4$) 溶液，边加边搅拌，室温放置 30min， 3000g 离心 30min，弃去上清液。2) 33%饱和度盐析：将步骤 1) 所得沉淀溶于 5ml 0.01 mol/L PBS，再加饱和硫酸铵溶液达到 33%的饱和度，

边加边搅拌，室温放置 30min，弃去上清液。此步重复操作 2 次。3) 脱盐：将步骤 2) 得到的沉淀溶于 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS 中（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），装于透吸袋中，悬于盛有 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）的烧杯中透析脱盐，放置于 4℃，每天换液 3—4 次，以 1%BaCl₂ 检测直至透析液中无硫酸根离子为止。4) 透析完毕，3000g 离心 5min，取上清液进行 DEME-纤维素离子交换层析。

(2) DEME-纤维素离子交换层析：1) DE-52 纤维素的处理：称取 2g DE-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/L NaOH 溶液处理一次，充分水洗至中性。2) 平衡：将经步骤 1) 处理的 DE-52 纤维素浸泡于 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）中，充分洗涤，静置后去掉多余溶液，如此反复 2-3 次，直至上清液 pH 达到 7.4 为止。3) 装柱：将平衡后的 DE-52 纤维素用滴管连续加入层析柱中，用洗脱液（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）连续洗脱，充分流洗，直到流出液 pH 值与洗脱液的 pH 值相同为止。4) 加样：将 SAS 盐析所得抗体用 0.01 mol/L、pH7.4 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）稀释，然后沿层析柱壁缓慢加入，打开层析柱出口，让 IgG 稀释液流入柱床内，再用磷酸盐缓冲液冲洗柱壁。5) 洗脱和收集：加入洗脱液 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），每管 2ml 收集，边收集边用 20% 碘基水杨酸检测 IgG 洗脱情况。6) 用紫外分光光度计测定 IgG 溶液在 280nm 和 260nm 处的 OD 值，表明得到纯化的常山酮兔多克隆抗体和常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体。纯化后的 IgG 在 -20℃ 冰箱保存。

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⁻¹HCl 的 G₃ 漏斗中膨胀。

抗体 IgG 的准备：用 0.01mol/L 的 NaHCO₃ 溶液将纯化的兔多克隆抗体 IgG 或常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体稀释，调溶液的 pH 值为 8.4。

偶联反应：将膨胀的溶胶用 0.01mol/L 的 NaHCO_3 溶液平衡后，转入上述抗体溶液中，混合，4℃下缓慢搅拌 20—24hr。偶联率的检测结果表明，兔多克隆抗体 IgG 和常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 的偶联率分别是 $96.7 \pm 1.5\%$ 、 $97.3 \pm 1.5\%$ 。

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、pH8.0 Tris-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：将偶联有常山酮兔多克隆抗体 IgG 或常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体的免疫吸附剂转入到含 G_3 滤板的玻璃柱中，制成偶联有兔多克隆抗体或常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱（IAC 柱）。

5、IAC 柱容量的确定

将步骤 4 制备的免疫亲和色谱柱，用 10ml 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）洗柱，轻轻上下晃动 IAC 柱，赶走柱里的气泡，再以 10ml 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。将含有 $100\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 氢溴酸常山酮（HAL）的 PBS 溶液（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）连续加到 IAC 柱，自然重力下流出。当柱达到饱和后（流出液中 HAL 的浓度和加样液浓度相同），用 20ml 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）洗涤 IAC 柱，除去干扰杂质。最后用 3ml 甲醇将 HAL 洗脱，自然重力下流出，收集，吹干，用流动相定容到 1ml，过 0.25 微孔滤膜，进行 HPLC 测定，计算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。结果表明偶联有兔多克隆抗体 IgG 的免疫亲和色谱柱的动态柱容量和绝对柱容量分别为 1800ng/mL 和 400ng/mg，偶联有常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱动态柱容量和绝对柱容量分别为 2000ng/mL 和 600ng/mg。

实施例 2、偶联有兔多克隆抗体 IgG 或鼠单克隆抗体的免疫亲和色谱柱的试剂盒的制备及其对常山酮的净化效果

1、净化常山酮的试剂盒的制备

主要由盒体，免疫亲和色谱柱（IAC 柱），HAL 标准溶液，稀释液，洗涤液，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 HAL 标准溶液，稀释液，洗涤液，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 IgG 或常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱。

其中，洗涤液为磷酸盐缓冲液（0.01M, pH7.4），组成为：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；

洗脱液为色谱级的甲醇；

保存液为 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 0.2g，pH7.4。

2、常山酮的提取效果实验

IAC 提取原理是，将特异性抗体常山酮兔多克隆抗体 IgG 或常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体和惰性基质偶联，制备免疫吸附剂，装柱。当含常山酮的混物流过 IAC 柱时，固定的抗体选择性地结合常山酮，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，常山酮得到净化或分离。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：分别取鱼肌肉，猪的肝、肺、肌肉、心、肾各组织样品 2g 于 50ml 塑料离心管中，每份样本按 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度添加常山酮标准品，加入胰蛋白酶（5ml, 0.5mg $\cdot\text{l}^{-1}$ ），用质量百分含量为 10% 的 NaCO_3 溶液调 pH 值在 7—8 之间。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅里酶解 3h。取出放至室温，加入 2ml 的质量百分含量为 10% NaCO_3 溶液，混匀，再加入 10ml 乙酸乙酯，涡动 40s，在冰水混合物静置 3min，立即 2000g 离心两分钟，将上清液转入另一个干净的离心管中。用 10ml 乙酸乙酯再提取一次，合并乙酸乙酯层。加入 5ml 的 0.125M 乙酸铵溶液，涡动 1min，在冰水混合物静置 3min，立即 2000g 离心两分钟，收集水层，再加入 5ml 的 0.125M 乙酸铵溶液再提取一次。合并水层，加入 5ml 的正己烷轻轻振摇 20s，取下层水相为样品溶液。

分别将偶联有兔多克隆抗体 IgG 或常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱平衡到室温，分别用 10ml 的试剂盒中的洗涤液冲洗，然后将上述的样品溶液过柱，用 3ml 洗涤液洗涤，除去非特异性吸附的杂质。用 3ml 洗脱液洗脱，然后在 40 $^{\circ}\text{C}$ N_2 气流下蒸干，加入 1ml 的流动相（250ml 乙

脘, 150ml 0.25mol/L 乙酸铵缓冲液(用冰乙酸调 pH=4.3), 然后用纯水定容至 1000ml, 0.45 μm 滤膜过滤), 涡动, 过 0.25 μm 微孔滤膜, 在 HPLC-UV 下测定常山酮的含量, 其中, 标准品为 50μg/kg 氢溴酸常山酮标准品, 用稀释液(1L 溶液中含有 9.64g 乙酸铵和 15ml 冰醋酸) 稀释。IAC 柱用 20ml 的保存液平衡保存于 4℃ 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, 说明制备的 IAC 非特异性吸附极小, 其中偶联有常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对于鱼肌肉的净化效果如图 1 所示, 图 1 中 A 为标准溶液色谱图(50ng/mL); B 为空白鱼肌肉(未添加常山酮的鱼肌肉样品) 色谱图; C 为添加样品色谱图(50ng/g)。

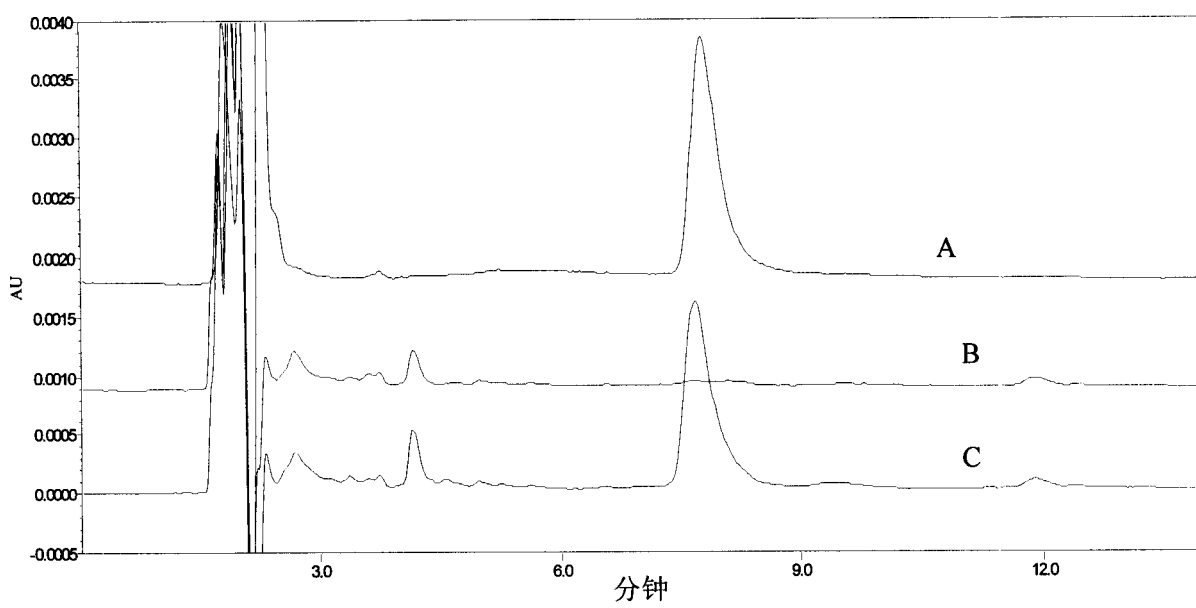


图 1

专利名称(译)	一种净化常山酮的方法及其专用免疫亲和色谱柱		
公开(公告)号	CN1807425A	公开(公告)日	2006-07-26
申请号	CN200610003549.1	申请日	2006-02-13
[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 丁双阳 史为民 侯亚莉 何方洋		
发明人	沈建忠 丁双阳 史为民 侯亚莉 何方洋		
IPC分类号	C07D401/06 G01N33/53 G01N33/559		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN100402522C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种净化常山酮的方法及其免疫亲和色谱柱。该净化常山酮的免疫亲和吸附色谱柱装载的吸附剂是由固相载体和与其偶联的常山酮多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述常山酮多克隆抗体或常山酮单克隆抗体是以常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述常山酮半抗原是将氢溴酸常山酮溶于N,N-二甲基甲酰胺中，再加入三甲基硅烷咪唑，得到常山酮的琥珀酸衍生物即为常山酮半抗原。本发明的净化方法结合色谱法高效检测常山酮的含量，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。

