



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101433825 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 23

(21) 申请号 200810227785. 0

C07D 493/20 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 12. 03

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 2587 2008. 07. 11

CN 1811441 A, 2006. 08. 02, 说明书第 1 页第 3 行到第 4 页第 2 行.

(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

CN 1811441 A, 2006. 08. 02, 说明书第 1 页第 3 行到第 4 页第 2 行.

WO 99/08704 A1, 1999. 02. 25, 全文.

(72) 发明人 沈建忠 张素霞 史为民 万宇平
曹兴元 江海洋 冯才伟 李建成
王战辉

李晓云 等. 直接竞争 ELISA 检测氯霉素残留的方法建立及初步应用. 中国兽医学报. 2007, 27 (5), 723-727.

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

审查员 王旭涛

代理人 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

B01J 20/286 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法及其专用免疫亲和吸附剂

(57) 摘要

本发明公开了一种自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法及其专用免疫亲和吸附剂。该用于自动动物样品中提取盐霉素类化合物的免疫亲和吸附剂,是由固相载体和与其偶联的盐霉素单克隆抗体组成;所述盐霉素单克隆抗体是以盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的抗体;所述盐霉素类化合物为盐霉素或甲基盐霉素。本发明的免疫亲和吸附剂及色谱柱使用了高特异性的盐霉素单克隆抗体,具有高选择性,保证了检测效果的可靠性,同时还样品前处理过程大大简化,尤其适用于肌肉和肝中微量盐霉素和甲基盐霉素的前处理,分析质量得到改善。本发明检测法可高效检测盐霉素和甲基盐霉素的含量,弥补了单纯免疫测定技术直接测定样本的信息量少、定量准确性差,或理化方法选择性低等不足。因此,本发明免疫亲和吸附剂、色谱柱和试剂盒,及提取和检测动物样品中盐霉素类化合物的方法适合于推广应用。

CN 101433825 B

1. 一种用于自动动物样品中提取盐霉素类化合物的免疫亲和吸附剂,它是由固相载体和与其偶联的盐霉素单克隆抗体组成;所述盐霉素单克隆抗体是由盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌产生。

2. 以权利要求 1 所述的免疫亲和吸附剂为填料的免疫亲和色谱柱。

3. 含有权利要求 1 所述的免疫亲和吸附剂的试剂盒。

4. 根据权利要求 3 所述试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中还包括洗脱液、洗涤液和保存液;

所述洗涤液为含有终浓度为 0.2-0.3g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.5-3.5g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的氯化钾、终浓度为 8.0-9.5g/L 的氯化钠、0.01-0.02M、pH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液;所述终浓度均为各物质在所述洗涤液中的浓度;

所述洗脱液为甲醇与水以 8-10 : 1 体积比混合的溶液;

所述保存液为含有终浓度为 0.2-0.3g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.5-3.5g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的氯化钾、终浓度为 8.0-9.5g/L 的氯化钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的 NaN_3 、0.01-0.02M、pH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液;所述终浓度均为各物质在所述保存液中的浓度。

5. 根据权利要求 4 所述试剂盒,其特征在于:所述洗涤液为含有终浓度为 0.27g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.9g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.2g/L 的氯化钾、终浓度为 8.8g/L 的氯化钠、0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液;

所述洗脱液为甲醇与水以 9 : 1 体积比混合的溶液;

所述保存液为含有终浓度为 0.27g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.9g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.2g/L 的氯化钾、终浓度为 8.8g/L 的氯化钠、终浓度为 0.2g/L 的 NaN_3 、0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液。

6. 含有权利要求 2 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、洗涤液和保存液;

所述洗涤液为含有终浓度为 0.2-0.3g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.5-3.5g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的氯化钾、终浓度为 8.0-9.5g/L 的氯化钠、0.01-0.02M、pH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液;所述终浓度均为各物质在所述洗涤液中的浓度;

所述洗脱液为甲醇与水以 8-10 : 1 体积比混合的溶液;

所述保存液为含有终浓度为 0.2-0.3g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.5-3.5g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的氯化钾、终浓度为 8.0-9.5g/L 的氯化钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的 NaN_3 、0.01-0.02M、pH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液;所述终浓度均为各物质在所述保存液中的浓度。

8. 根据权利要求 7 所述试剂盒,其特征在于:所述洗涤液为含有终浓度为 0.27g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.9g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.2g/L 的氯化钾、终浓度为 8.8g/L 的氯化钠、0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液;

所述洗脱液为甲醇与水以 9 : 1 体积比混合的溶液;

所述保存液为含有终浓度为 0.27g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.9g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.2g/L 的氯化钾、终浓度为 8.8g/L 的氯化钠、终浓度为 0.2g/L 的 NaN_3 、0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液。

9. 一种自动物样品中提取盐霉素类化合物的方法,包括以下步骤:

1) 样品的前处理:

取动物组织匀浆,加入硫酸盐,再加入提取液进行提取,然后进行离心力是 3000g-4000g 的离心,取上清液作为样品溶液;所述提取液为乙腈或甲醇;

2) 将步骤 1) 得到的样品溶液与 PBS 缓冲液混合,过权利要求 2 所述的免疫亲和色谱柱,然后依次用权利要求 7 中所述的洗涤液、水、权利要求 7 中所述的洗脱液进行洗脱,收集得到盐霉素类化合物溶液;所述盐霉素类化合物为盐霉素或甲基盐霉素。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:步骤 1) 中,所述离心力为 3500g。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法,其特征在于:所述动物组织样品为肌肉、肝。

12. 一种检测动物样品中盐霉素类化合物含量的方法,是用权利要求 9 中所述方法从动物样品中提取得到盐霉素类化合物后,再对所述盐霉素类化合物的量进行检测。

13. 由盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体。

14. 盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587。

自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法及其专用免疫亲和吸附剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法及其专用免疫亲和吸附剂。

背景技术

[0002] 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。

[0003] 盐霉素(Salinomycin)和甲基盐霉素(Narasin)属于聚醚类兽用抗生素,对大多数革兰氏阳性菌和部分霉菌起抗菌作用,单独使用对鸡球虫病有良好的预防作用。盐霉素和甲基盐霉素的使用不可过量,否则其将会在动物体内大量蓄积,通过食物链而危及人类健康,重者会使所食用动物中毒死亡。2002年12月我国农业部公告第235号文规定盐霉素和甲基盐霉素在鸡肌肉中最高残留量为600 μ g/kg,在皮肤、脂肪中的最高残留量为1200 μ g/kg,在肝中的最高残留量为1800 μ g/kg。欧盟自2006年,不再允许盐霉素-钠在饲料中添加。因此,检测盐霉素和甲基盐霉素在动物性食品中的残留量非常重要。

[0004] 检测盐霉素和甲基盐霉素残留量的方法主要有高效液相色谱分析法(HPLC)、液-质联机(LC-MS)、液质串联质谱法(LC-MS/MS)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。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种用于自动动物样品中提取盐霉素类化合物的免疫亲和吸附剂。

[0006] 本发明所提供的用于自动动物样品中提取盐霉素类化合物的免疫亲和吸附剂,是由固相载体和与其偶联的盐霉素单克隆抗体组成;所述盐霉素单克隆抗体是以盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的抗体;所述盐霉素类化合物为盐霉素或甲基盐霉素。

[0007] 其中,所述盐霉素半抗原是通过将盐霉素和氯化亚砷缩合反应得到盐霉素酰氯,再将所述盐霉素酰氯与氨基乙酸反应得到的;所述盐霉素单克隆抗体为盐霉素鼠单克隆抗体。所述盐霉素单克隆抗体可以为盐霉素鼠单克隆抗体。

[0008] 所述盐霉素单克隆抗体具体是由盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株

C-3-3CGMCCNo. 2587 分泌产生。

[0009] 所述盐霉素单克隆抗体是用盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述盐霉素半抗原将盐霉素和氯化亚砷通过缩合反应得到盐霉素酰氯，再将盐霉素酰氯与氨基乙酸反应得到盐霉素半抗原。

[0010] 盐霉素是小分子物质，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。本发明将盐霉素反应合成盐霉素半抗原，有助于制出针对盐霉素抗原特异性较强的多克隆抗体。再将盐霉素半抗原采用碳化二亚胺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对免疫不利，半抗原与 OVA、RSA 和 KLH 的结合摩尔比分别为 11 : 1、17 : 1、17 : 1。

[0011] 所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白等常用载体蛋白；

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 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。

[0015] 所述试剂盒中还可包括洗脱液、洗涤液和保存液；

[0016] 所述洗涤液为含有终浓度为 0.2-0.3g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.5-3.5g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的氯化钾、终浓度为 8.0-9.5g/L 的氯化钠、0.01-0.02M、pH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液；所述终浓度均为各物质在所述洗涤液中的浓度；

[0017] 所述洗脱液为甲醇与水以 8-10 : 1 体积比混合的溶液；

[0018] 所述保存液为含有终浓度为 0.2-0.3g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.5-3.5g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的氯化钾、终浓度为 8.0-9.5g/L 的氯化钠、终浓度为 0.1-0.3g/L 的 NaN_3 、0.01-0.02M、pH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液；所述终浓度均为各物质在所述保存液中的浓度；

[0019] 所述洗涤液优选为含有终浓度为 0.27g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.9g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.2g/L 的氯化钾、终浓度为 8.8g/L 的氯化钠、0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液；

[0020] 所述洗脱液优选为甲醇与水以 9 : 1 体积比混合的溶液；

[0021] 所述保存液优选为含有终浓度为 0.27g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.9g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.2g/L 的氯化钾、终浓度为 8.8g/L 的氯化钠、终浓度为 0.2g/L 的 NaN_3 、0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0022] 本发明的另一个目的是提供一种自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法。

[0023] 本发明所提供的自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法，包括以下步骤：

[0024] 1) 样品的前处理：

[0025] 取动物组织匀浆，加入硫酸盐，再加入提取液进行提取，然后进行离心力是 3000g-4000g 的离心，取上清液作为样品溶液；所述提取液为乙腈或甲醇；所述离心力优选为 3500g；

[0026] 2) 将步骤 1) 得到的样品溶液与 PBS 缓冲液混合, 过上述免疫亲和色谱柱, 然后依次用上述任一洗涤液、水、上述任一洗脱液进行洗脱, 收集得到盐霉素类化合物溶液; 所述盐霉素类化合物为盐霉素或甲基盐霉素。

[0027] 其中, 所述动物组织样品包括肌肉、肝。

[0028] 本发明的最后一个目的是提供一种检测动物样品中盐霉素类化合物含量的方法。

[0029] 本发明所提供的检测动物样品中盐霉素类化合物含量的方法, 是用上述自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法从动物样品中提取得到盐霉素类化合物后, 再对所述盐霉素类化合物的量进行检测。

[0030] 由盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体或盐霉素的单克隆杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 也属于本发明的保护范围。

[0031] 本发明免疫亲和吸附剂以及装载有该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)中净化盐霉素和甲基盐霉素, 便于残留分析。在该免疫亲和色谱柱中, 盐霉素的单克隆杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 的偶联率是 94%。动态柱容量为 1800ng/mL(盐霉素)、2000ng/mL(甲基盐霉素), 在使用了 20 次后柱容量为总柱容量的 25% 左右, 保存期为 1 年。

[0032] 本发明的免疫亲和吸附剂及色谱柱使用了高特异性的盐霉素单克隆抗体, 具有高选择性, 保证了检测效果的可靠性, 同时还样品前处理过程大大简化, 尤其适用于肌肉和肝中微量盐霉素和甲基盐霉素的前处理, 分析质量得到改善。免疫亲和吸附剂的高选择性使得盐霉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。本发明的提取方法对组分净化的同时还可提供定性信息, 方法操作简单, 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。本发明检测法可高效检测盐霉素和甲基盐霉素的含量, 弥补了单纯免疫测定技术直接测定样本的信息量太少、定量准确性差, 或理化方法选择性低等不足。因此, 本发明免疫亲和吸附剂、色谱柱和试剂盒, 及提取和检测动物样品中盐霉素类化合物的方法适合于推广应用。

附图说明

[0033] 图 1 为盐霉素和甲基盐霉素标准品 5 μ g/kg 的色谱图。

[0034] 图 2 为未添加盐霉素和甲基盐霉素标准品的鸡肌肉组织的液相色谱图。

[0035] 图 3 为添加 5 μ g/kg 盐霉素和甲基盐霉素样品鸡肌肉组织的液相色谱图。

[0036] 图 4 为盐霉素和甲基盐霉素标准品 25 μ g/kg 的色谱图。

[0037] 图 5 为未添加盐霉素和甲基盐霉素标准品的鸡肝脏液相色谱图。

[0038] 图 6 为添加 25 μ g/kg 盐霉素和甲基盐霉素标准品的鸡肝脏液相色谱图。

具体实施方式

[0039] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法; 所使用的材料试剂等如无特殊说明, 均可从市面公司购买得到。

[0040] 实施例 1、净化盐霉素和甲基盐霉素的免疫色谱柱的制备

[0041] 盐霉素购自美国 Sigma 公司,其产品目录号为 53003-10-4。

[0042] 一、盐霉素单克隆抗体的制备

[0043] (一) 盐霉素半抗原的合成:

[0044] 将盐霉素和氯化亚砷通过缩合反应得到盐霉素酰氯,再将盐霉素酰氯与氨基乙酸反应得到盐霉素半抗原。

[0045] 半抗原合成的具体步骤为:

[0046] (1) 盐霉素与氯化亚砷以 1:1 的摩尔比搅拌混合均匀,在室温 (25℃) 条件下反应 4 小时,得到盐霉素酰氯;

[0047] (2) 盐霉素酰氯与氨基乙酸以 1:1 的体积比例混合均匀,加入吡啶进行催化,在冰浴条件下搅拌反应,得到盐霉素半抗原。

[0048] (二) 免疫原的合成:

[0049] 采用碳化二亚胺法将盐霉素半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联得到免疫原。

[0050] 免疫原合成的具体步骤:

[0051] (1) 取盐霉素半抗原 5mg 溶于 0.5ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,再向其中加入 25mg 碳化二亚胺 (DEC),室温 (25℃) 条件下活化反应 30min 得到 I 液;

[0052] (2) 取卵清蛋白 20mg,用 2.7ml pH8.0PBS 液溶解,得到 II 液;

[0053] (3) 将 I 液加到 II 液后,室温 (25℃) 搅拌反应过夜,得到免疫原。

[0054] 利用紫外吸收光谱对半抗原与载体蛋白进行鉴定,并按下面的公式计算结合比 (每分子载体蛋白连接的半抗原数目)。

[0055]

$$\text{结合比} = \frac{\sum \text{偶合物} - \sum \text{载体}}{\sum \text{半抗原}} (\sum \text{为摩尔吸光系数})$$

[0056] 得到的免疫原中半抗原与 OVA 的摩尔结合比为 11:1。

[0057] 合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为 98.6%。

[0058] (三) 动物免疫:采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以盐霉素半抗原与卵清蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 100 μg/只,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,四免后腹腔加强免疫一次,3 天后取脾细胞。

[0059] (四) 细胞融合:取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞,按 5:1 比例 (数量配比) 与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合。

[0060] 杂交瘤细胞克隆化:采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,将此细胞株命名为盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3,该细胞株已于 2008 年 7 月 11 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,地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏号为 CGMCCNo. 2587。

[0061] (五) 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 用冻存液制成 5×10^6 个 /ml 的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0062] (六) 单克隆抗体的制备与纯化

[0063] 增量培养法:将杂交瘤细胞 CGMCC No. 2587 置于细胞培养基中,在 37℃ 条件下进行培养,用下述辛酸-饱和硫酸铵法和 DEME 纤维素离子交换层析法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体, -20℃ 保存。

[0064] 所述细胞培养基为向 RPMI-1640 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (体积百分含量),使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为 0.2% (质量百分含量);所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

[0065] 1、SAS 盐析:1) 50% 饱和度盐析:取上述细胞培养液 5ml,加等量 0.01mol/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) 混匀,然后逐渐滴加等体积的饱和硫酸铵 (pH7.4) 溶液(使硫酸铵溶液的饱和度达到 50%),边加边搅拌,室温放置 30min,3000g 离心 30min,弃上清液留沉淀。2) 33% 饱和度盐析:在步骤 1) 得到的沉淀中分别加入 5ml 0.01mol/L 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) 溶解沉淀,再加饱和硫酸铵溶液达到 33% 饱和度,边加边搅拌,室温放置 30min,弃上清液留沉淀。重复操作 2 次。3) 脱盐:取 0.01mol/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) 溶解步骤 2) 得到的沉淀,装于透析袋中,悬于盛有 0.01mol/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) 的烧杯中脱盐,放置于 4℃,每天换液 3—4 次,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,取上清液置 -20℃ 冰箱保存,进行 DEME-纤维素离子交换层析。

[0066] (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 800ml 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 0.5mol/L HCl 溶液以同样的方法处理。最后换用 0.5mol/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 0.01mol/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(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, pH7.4) 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:将经步骤 (1) SAS 盐析得到的抗体用 0.01mol/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,让抗体稀释液流入柱床内,再用磷酸盐缓冲液冲洗柱壁。5) 洗脱和收集:加入洗脱液(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, pH7.4),每管 2ml 收集,边收集边用 20% 碘基水杨酸检测抗体洗脱情况。6) 用紫外分光光度计测定抗体溶液在 280nm 和 260nm 处的 OD 值,得到纯化的盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体,纯化后的单抗在 -20℃ 冰箱保存。

[0067] (七) 单抗对甲基盐霉素、马杜霉素、莫能菌素的交叉反应实验

[0068] 间接竞争 ELISA 方法测定杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 产生的盐霉素单克

隆抗体对甲基盐霉素、马杜霉素、莫能菌素的交叉反应。抗体抑制物分别采用倍比稀释的甲基盐霉素、马杜霉素、莫能菌素；具体步骤为：①用包被液将抗原（盐霉素）稀释成适当浓度，以每孔 100 μL 的量加入酶联反应板中；②放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中 2h，取出后倒掉余液并用 200 μL /孔的洗液洗板三次，间隔每次 3min，之后拍干；③每孔加入 150 μL 的封闭液放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 2h，取出后直接拍干；④加入倍比稀释的甲基盐霉素、马杜霉素、莫能菌素每孔 50 μL ；⑤同时向每孔加入上述由盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体，每孔 50 μL ；37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30min；用洗涤液洗板 4 次，甩干；⑥每孔加入 100 μL 的酶标二抗，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 30min，取出后洗涤同上，之后拍干；⑦每孔加入四甲基联苯胺 (TMB) 溶液 100 μL ，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 15min，取出后每孔加入 50 μL 终止液；⑧用酶

[0069] 标仪中测定光密度值。根据以下公式，分别根据 IC_{50} (ng/mL) 计算交叉反应率：
[0070]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{IC}_{50} (\text{SAL})}{\text{IC}_{50} (\text{竞争物})} \times 100\%$$

[0071] 盐霉素单克隆抗体对甲基盐霉素、马杜霉素、莫能菌素的交叉反应分别为 80%，1%，0.1%。表明，本发明单抗对盐霉素和甲基盐霉素的特异性强。

[0072] 二、免疫色谱柱 (IAC) 的制备

[0073] (一) 免疫色谱柱 (IAC) 的制备

[0074] 基质的准备：取 2 克溴化氰活化的 Sepharose 4B 干冻粉，在盛有 1.0mmol L^{-1} HCl 的 G_3 漏斗中膨胀。用 200mL1.0mmol L^{-1} HCl 充分洗涤，整个过程不超过 15 分钟。

[0075] 抗体的准备：用 5mL0.1mol/L 的 NaHCO_3 溶液 (含 0.5mol/L 的 NaCl, pH8.4) 将 35mg 纯化的盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体稀释。

[0076] 偶联反应：将膨胀的溶胶用 0.1mol/L 的 NaHCO_3 溶液 (含 0.5mol/L 的 NaCl, pH8.4) 平衡后，转入上述单克隆抗体稀释液中溴化氰活化的 Sepharose 4B 干冻粉与纯化抗体的质量比为 2g : 35mg，混合，4 $^{\circ}\text{C}$ 下 150rpm 搅拌 20—24hr。

[0077] 反应液转入 G_3 漏斗中，用 100mL0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (1L 水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，将洗涤液稀释后分别测其 260nm、280nm 的紫外吸光度。计算单抗量的公式为：

[0078] 单抗量 = $(1.45 \times \text{OD}_{280\text{nm}} - 0.74 \times \text{OD}_{260\text{nm}}) \times \text{稀释倍数} \times \text{溶液的体积}$

[0079] 计算偶联率计算公式为：

[0080]

$$\text{偶联率 (\%)} = \frac{\text{偶联前单抗总量} - \text{未偶联单抗量}}{\text{偶联前单抗总量}} \times 100\%$$

[0081] 三次重复实验的偶联率检测结果表明，盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose4B 的偶联率是 94%。

[0082] 活化位点的封闭：将上述偶联后的凝胶转入 0.1mol/L 的 Tris—HCl 缓冲液 (含 0.5mol/L 的 NaCl, pH8.0) 中，混合，4 $^{\circ}\text{C}$ 下缓慢搅拌 2hr，以封闭未偶联的活化位点。

[0083] 洗涤：凝胶用 5 倍体积的 0.1mol/L 醋酸盐缓冲液 (含 0.5mol/L 的 NaCl, pH4.0) 和 0.1mol/L Tris—HCl 缓冲液 (含 0.5mol/L 的 NaCl, pH8.0) 交替冲洗 3 次。用 0.01mol/L

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 2.9g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 平衡后, 抽干的凝胶转入 0.01mol/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 2.9g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g, NaN_3 0.2g) 中, 4℃ 下存放备用。

[0084] 装柱: 将偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 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, 制成偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱 (IAC 柱)。

[0085] (二) IAC 柱容量的确定

[0086] 本实验中所使用的 PBS 缓冲液如无特殊说明, 均为如下组成: 1L PBS 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.9g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g。

[0087] 将上述制备的偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱, 用 10ml 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 平衡。

[0088] 将含有 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 盐霉素 (SAL) 和 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲基盐霉素 (NAR) 的 PBS 连续加到 IAC 柱, 自然重力下流出。

[0089] 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 10ml PBS、10ml 纯水洗涤 IAC 柱, 除去提取液中干扰杂质。

[0090] 最后用 6ml 甲醇/水 (体积比 90/10) 将 SAL、NAR 洗脱, 自然重力下流出, 收集, 吹干, 用 1ml 甲醇复溶后取 $100 \mu\text{L}$ 进 HPLC 分析。其中, HPLC 色谱条件: C_{18} 反相色谱柱 (Supelcosil LC-18) ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 4.6\text{mm}$ i. d.); 流动相为甲醇-水-乙酸 (940-30-30, v:v), 采用等度洗脱, 流速为 1ml/min, 温度: 室温 25℃; 衍生化试剂为甲醇 300ml 中缓慢加入 10ml 硫酸, 混匀待温度降至室温后, 加入 20g 香草醛, 混匀, 流速为 0.5ml/min, 衍生化温度: 95℃; 检测波长: 520nm。

[0091] 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。其计算公式为:

[0092]

$$\text{动态柱容量 (ng/mL)} = \frac{\text{药物浓度 (ng/mL)} \times \text{体积 (mL)}}{\text{柱床体积 (mL)}}$$

[0093] 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。其计算公式为:

[0094]

$$\text{绝对柱容量 (ng/mg IgG)} = \frac{\text{动态柱容量 (ng/mL)}}{\text{单位体积凝胶 IgG 偶联量 (mg/mL)}}$$

[0095] 实验设 3 次重复, 结果取平均数。结果表明偶联有杂交瘤细胞株盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 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 1800ng/mL、192ng/mL (SAL), 2000ng/mL、213ng/mL (NAR)。

[0096] 实施例 2、含有实施例 1 中免疫色谱柱的试剂盒的制备及其对盐霉素和甲基盐霉素的净化效果

[0097] 1、净化盐霉素和甲基盐霉素的试剂盒的制备

[0098] 该试剂盒由免疫色谱柱 (IAC 柱), 盐霉素、甲基盐霉素标准品溶液, 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盐霉素、甲基盐霉素标准溶液,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 制备的偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱。

[0099] 所述洗涤液为含有终浓度为 0.27g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.9g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.2g/L 的氯化钾、终浓度为 8.8g/L 的氯化钠、0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液;所述终浓度均为各物质在所述洗涤液中的浓度;

[0100] 所述洗脱液为甲醇与水以 9:1 体积比混合的溶液;

[0101] 所述保存液为含有终浓度为 0.27g/L 的磷酸二氢钾、终浓度为 2.9g/L 的 12 水合磷酸氢二钠、终浓度为 0.2g/L 的氯化钾、终浓度为 8.8g/L 的氯化钠、终浓度为 0.2g/L 的 NaN_3 、0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液;所述终浓度均为各物质在所述保存液中的浓度;

[0102] 将含有偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱的试剂盒分别放在 4℃,有效期为 12 个月。

[0103] 2、盐霉素、甲基盐霉素的提取效果实验

[0104] IAC 提取原理是,将特异性抗体盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体和惰性基质偶联,制备免疫吸附剂,装柱。当含盐霉素和甲基盐霉素的混物流过 IAC 柱时,固定抗体选择性地结合盐霉素和甲基盐霉素,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,盐霉素和甲基盐霉素得到净化或分离。IAC 柱经再生处理后可重复使用。

[0105] 检测样品的处理:

[0106] 1) 分别取不含盐霉素和甲基盐霉素的鸡肌肉和鸡肝脏组织置于匀浆机中,于 10000rpm 下匀浆 3 分钟。置于一 20℃ 保存备用。

[0107] 2) 未添加盐霉素和甲基盐霉素的样品处理:分别称取 5.0 克已匀浆的鸡肌肉和鸡肝脏组织样品,分别置于 100ml 聚丙烯离心管中,再分别向管中加入 10g 无水硫酸钠,用玻璃棒捣匀,静置 5min 后加入 20ml 乙腈(肌肉)或甲醇(肝脏),涡动混匀,振荡 20 分钟,3500g 离心 10 分钟,取上清液,重复提取一次,合并上清,将其装入鸡心瓶。50℃ 旋转蒸发至余 2-3ml,将其转至 10ml 离心管,用 2ml 甲醇洗涤鸡心瓶后并入,3500g 离心 10 分钟,将上清加至 20ml PBS 中,混匀,得到样品溶液。

[0108] 添加盐霉素和甲基盐霉素的样品处理:分别称取 5.0 克已匀浆的鸡肌肉和鸡肝脏组织样品,分别置于 100ml 聚丙烯离心管中,向管中添加盐霉素和甲基盐霉素标准品,使盐霉素和甲基盐霉素在鸡肌肉匀浆中的终浓度均为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,使盐霉素和甲基盐霉素在鸡肝脏组织中的终浓度均为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,再分别向管中加入 10g 无水硫酸钠,用玻璃棒捣匀,静置 5min 后加入 20ml 乙腈(肌肉)或甲醇(肝脏),涡动混匀,振荡 20 分钟,3500g 离心 10 分钟,取上清液,重复提取一次,合并上清,将其装入鸡心瓶。50℃ 旋转蒸发至余 2-3ml,将其转至 10ml 离心管,用 2ml 甲醇洗涤鸡心瓶后并入,3500g 离心 10 分钟,将上清加至 20ml PBS 中,混匀,得到样品溶液。

[0109] 将偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱平衡到室温,然后将上述的样品溶液过柱,用 10ml 洗涤液、10ml 纯水洗涤,目的是为了除去非特异性吸附的杂质。用 6ml 洗脱液洗脱,在 50℃ N_2 气流下吹干,然后用

1mL 甲醇复溶（肝脏样品用 1mL 甲醇 / 水 (90/10, v/v) 复溶），过 0.2 μm 有机滤膜后取 100 μL 进行 HPLC 分析，测定盐霉素和甲基盐霉素的含量。

[0110] 其中，肌肉样品的色谱条件为：流动相为甲醇 - 水 - 乙酸 (940-30-30, v : v : v)，采用等度洗脱，流速为 1mL/min，温度：室温；衍生化试剂为甲醇 300mL 中缓慢加入 10mL 硫酸，混匀待温度降至室温后，加入 20g 香草醛，混匀，流速为 0.5mL/min，衍生化温度：95℃；检测波长：520nm。

[0111] 肝脏样品的色谱条件为：流动相为甲醇 - 水 - 乙酸 (935-50-15, v : v : v)，采用等度洗脱，流速为 0.8mL/min，温度：室温；衍生化试剂为甲醇 500mL 中缓慢加入 10mL 硫酸，混匀待温度降至室温后，加入 20g 香草醛，混匀，流速为 0.7mL/min，衍生化温度：95℃。

[0112] 标准品的色谱条件为： C_{18} 反相色谱柱 (Supelcosil LC-18) (5 μm, 250×4.6mm i. d.)；流动相为甲醇 - 水 - 乙酸 (940-30-30, v : v : v)，采用等度洗脱，流速为 1mL/min，温度：室温；衍生化试剂为甲醇 300mL 中缓慢加入 10mL 硫酸，混匀待温度降至室温后，加入 20g 香草醛，混匀，流速为 0.5mL/min，衍生化温度：95℃；检测波长：520nm。IAC 柱用 20ml 的保存液平衡保存于 4℃ 备用。盐霉素 5 μg/kg 和甲基盐霉素 5 μg/kg 标准品的图谱如图 1 所示；盐霉素 25 μg/kg 和甲基盐霉素 25 μg/kg 标准品的图谱如图 4 所示。

[0113] 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。其中偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对于未添加盐霉素和甲基盐霉素的鸡肌肉的净化效果如图 2 所示，添加盐霉素和甲基盐霉素的鸡肌肉的净化效果图 3 所示；偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对于未添加盐霉素和甲基盐霉素的鸡肝脏的净化效果如图 5 所示，对于添加盐霉素和甲基盐霉素的鸡肝脏的净化效果图 6 所示。

[0114] 实施例 3、用实施例 2 中所述试剂盒检测样品中的盐霉素和甲基盐霉素

[0115] 1、样品前处理：

[0116] 1) 分别取鸡肌肉和鸡肝脏组织置于匀浆机中，于 10000rpm 下匀浆 3 分钟。置于 -20℃ 保存备用。

[0117] 2) 分别称取 5.0 克已匀浆的鸡肌肉和鸡肝脏组织样品，分别置于 100ml 聚丙烯离心管中，再分别向管中加入 10g 无水硫酸钠，用玻璃棒捣匀，静置 5min 后加入 20ml 乙腈（肌肉）或甲醇（肝脏），涡动混匀，振荡 20 分钟，3500g 离心 10 分钟，取上清液，重复提取一次，合并上清，将其装入鸡心瓶。50℃ 旋转蒸发至余 2-3ml，将其转至 10ml 离心管，用 2ml 甲醇洗涤鸡心瓶后并入，3500g 离心 10 分钟，将上清加至 20ml PBS 中，混匀，得到样品溶液。

[0118] 2、盐霉素和甲基盐霉素的提取

[0119] 将偶联有盐霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 C-3-3CGMCC No. 2587 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱平衡到室温，然后将上述的样品溶液过柱，用 10ml 洗涤液、10ml 纯水洗涤，目的是为了除去非特异性吸附的杂质。用 6ml 洗脱液洗脱，在 50℃ N_2 气流下吹干，然后用 1mL 甲醇复溶（肝脏样品用 1mL 甲醇 / 水 (90/10, v/v) 复溶），过 0.2 μm 有机滤膜，得到盐霉素和甲基盐霉素提取液，取 100 μL 进行后续分析。

[0120] 3、HPLC 分析，测定盐霉素和甲基盐霉素的含量。

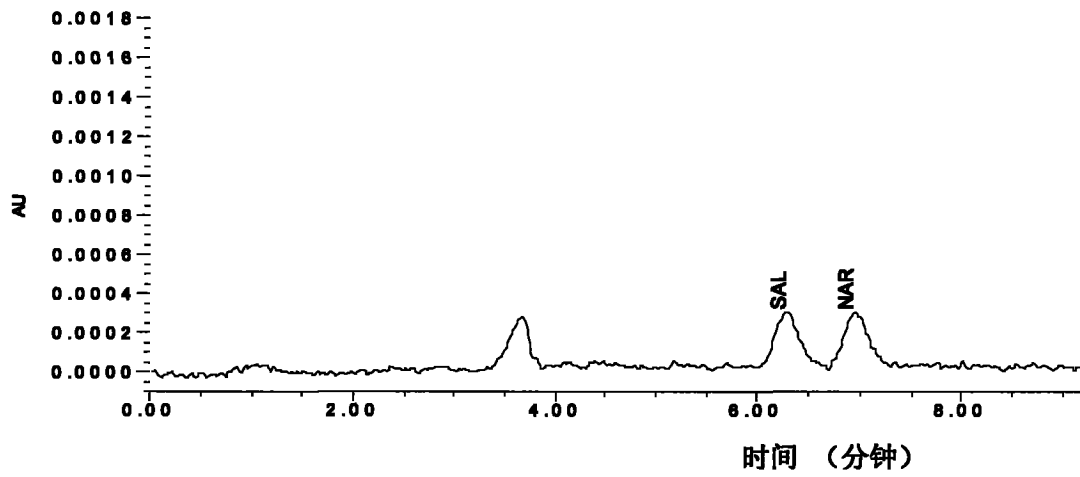


图 1

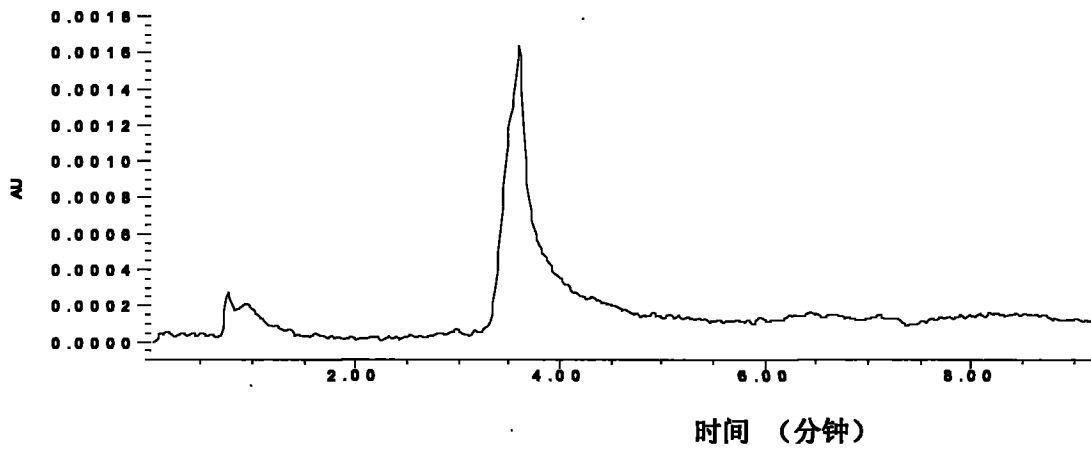


图 2

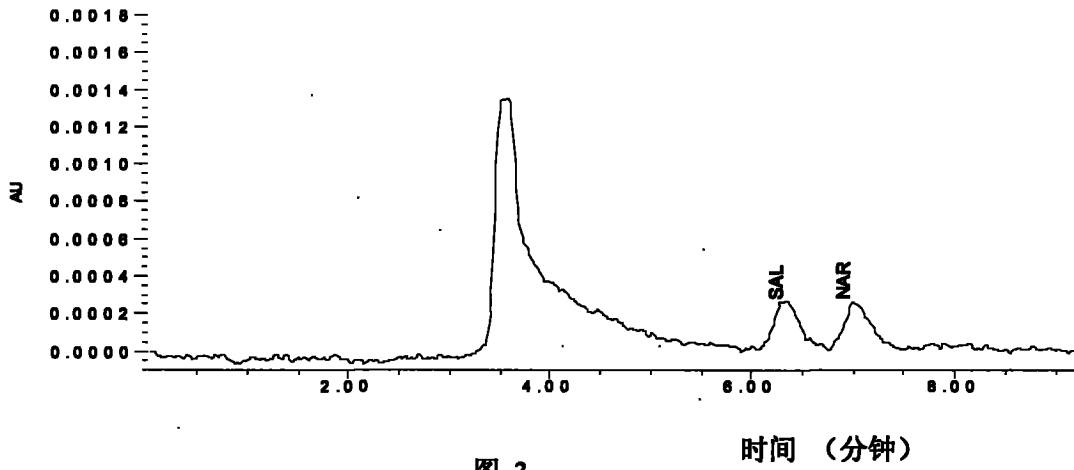


图 3

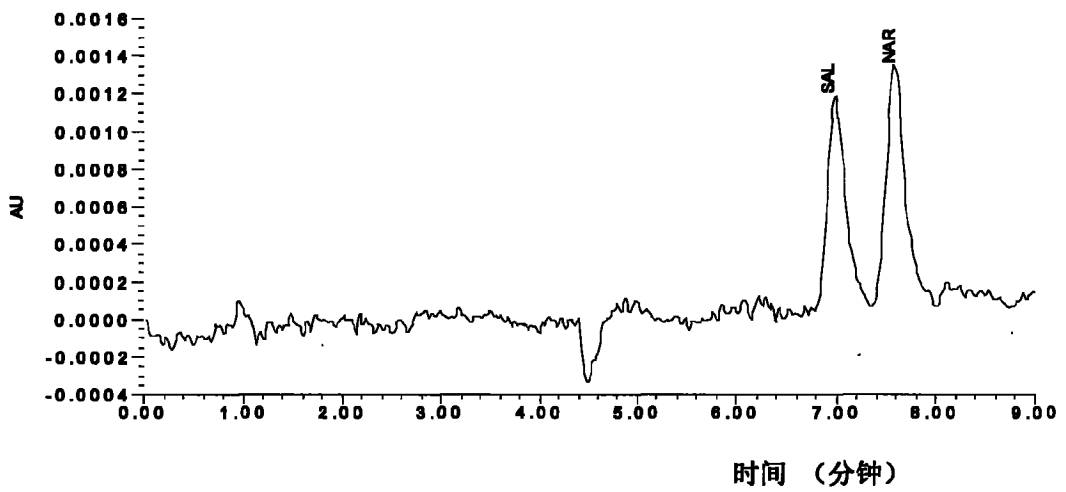


图 4

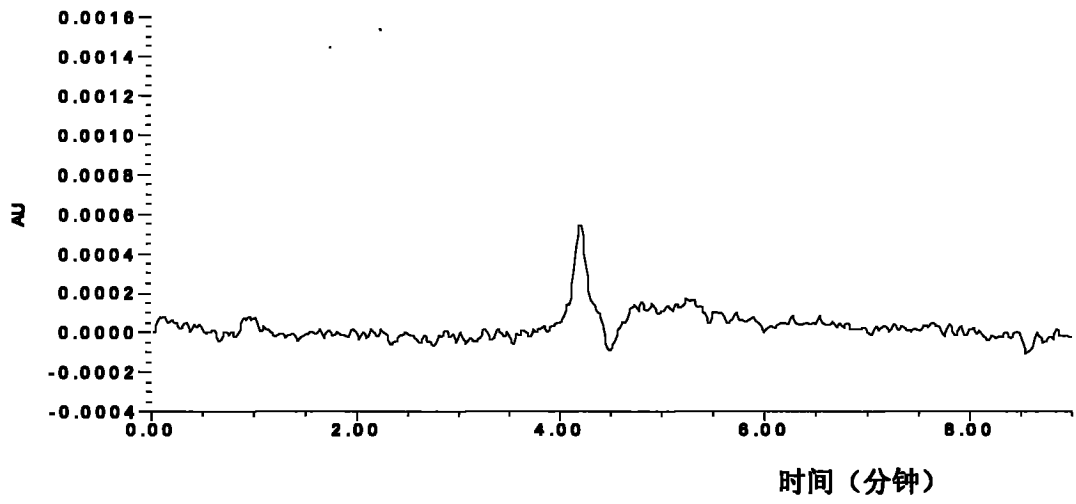


图 5

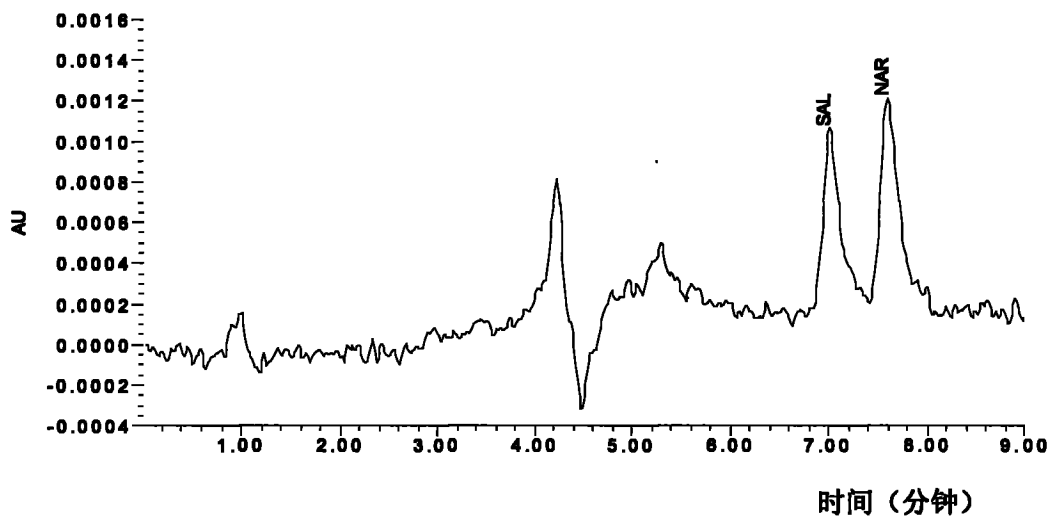


图 6

专利名称(译)	自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法及其专用免疫亲和吸附剂		
公开(公告)号	CN101433825B	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN200810227785.0	申请日	2008-12-03
[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 张素霞 史为民 万宇平 曹兴元 江海洋 冯才伟 李建成 王战辉		
发明人	沈建忠 张素霞 史为民 万宇平 曹兴元 江海洋 冯才伟 李建成 王战辉		
IPC分类号	G01N33/53 B01J20/286 C07D493/20		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	王旭涛		
其他公开文献	CN101433825A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种自动动物样品中提取盐霉素类化合物的方法及其专用免疫亲和吸附剂。该用于自动动物样品中提取盐霉素类化合物的免疫亲和吸附剂，是由固相载体和与其偶联的盐霉素单克隆抗体组成；所述盐霉素单克隆抗体是以盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的抗体；所述盐霉素类化合物为盐霉素或甲基盐霉素。本发明的免疫亲和吸附剂及色谱柱使用了高特异性的盐霉素单克隆抗体，具有高选择性，保证了检测效果的可靠性，同时还样品前处理过程大大简化，尤其适用于肌肉和肝中微量盐霉素和甲基盐霉素的前处理，分析质量得到改善。本发明检测法可高效检测盐霉素和甲基盐霉素的含量，弥补了单纯免疫测定技术直接测定样本的信息量太少、定量准确性差，或理化方法选择性低等不足。因此，本发明免疫亲和吸附剂、色谱柱和试剂盒，及提取和检测动物样品中盐霉素类化合物的方法适合于推广应用。

$$\text{结合比} = \frac{\sum \text{偶合物} - \sum \text{载体}}{\sum \text{半抗原}} \quad (\sum \text{为摩尔吸光系数})$$