



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101726589 B

(45) 授权公告日 2012.08.08

(21) 申请号 200910222578.0

(22) 申请日 2009.11.20

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 胥传来 匡华 马伟 彭池方
陈伟 李灼坤 徐丽广(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 30/56 (2006.01)

G01N 30/50 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 33/12 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101215247 A, 2008.07.09,

张洪兰等. 用 X-5 树脂柱浓集生物体液中六种除虫菊脂类杀虫剂.《色谱》.1995, 第 13 卷 (第 1 期),

K.R.Kranthi et al..development of a colloidal-gold based lateral-flow immunoassay kit for quality-assessment of pyrethroid and endosulfan formulations in a novel single strip format.《crop protection》.2009, 第 28 卷

审查员 张丽玮

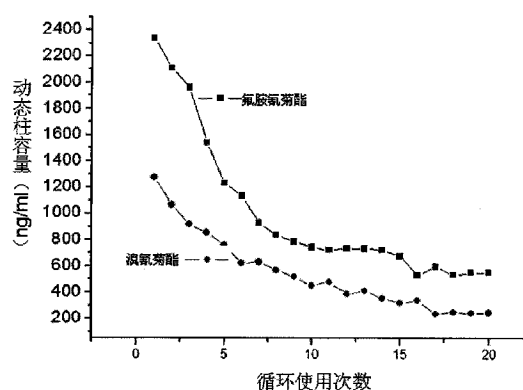
权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的制备方法

(57) 摘要

一种拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的制备方法,属于免疫分析技术领域。本发明利用群特异性抗体的免疫亲和层析净化技术,能同时对拟除虫菊酯类药物多种组分进行分离净化。本发明利用实验所获得的抗体与 ProteinA-Sepharose 4B 偶联,装填免疫亲和层析柱。Protein A 特异地与抗体的重链恒定区 (Fc) 结合,将其可变区释放出来,使得抗体定向地偶联到基质载体上,其结合区手臂充分地展开,有利于和目标分子结合。与常用的 spharose 4B 相比,后者依靠基质骨架上游离的羟基非特异性地与抗体相连,由于结合的非特异性,抗体的结合部位也可被埋没,使得只有部分结合部位裸露,在相同的胶体量和抗体量下,定向结合的 Protein A 载体使得 IAC 柱有更高的柱容量。



1. 一种拟除虫菊酯类药物筛选性免疫亲和层析柱的制备方法,其特征在于:

(1) 拟除虫菊酯类药物筛选型抗体的制备

a. 3-间苯氧甲酸-酰氯的合成,3-间苯氧甲酸简写为 3-PBA:

2. 2g 3-PBA 溶于 3mL 三氯甲烷中,在磁力搅拌器上轻柔搅拌,在 N_2 流中加入 $1\mu L$ N, N'-二甲基甲酰胺,然后将加热温度调为 $65^\circ C$,加入 1mL 亚硫酸氯,反应 1h 后,加入正己烷 2mL,然后用氮气吹干,反复进行加入正己烷 2mL,然后用氮气吹干共 3 次该操作,得 1.5mL 深棕色的液体即为 3-PBA-酰氯;

b. 3-间苯氧甲酸缩 γ -氨基丁酸的合成:

将 0.79g γ -氨基丁酸预先溶于 10mL 2mol/L 的 KOH 溶液中,加入 2.65mL 吡啶,于冰水浴中冷却,将上述 1.5mL 3-PBA-酰氯溶液于 10min 内加入该冷却后的 γ -氨基丁酸溶液中,激烈搅拌 40min,并监测其 pH 的变化情况,直到 pH 降低到 7 时,反应结束;

然后加入 1mL 1mol/L NaOH 溶液,强力搅拌,反应进行 15min 后停止,使用 6mol/L HCl 酸化至 $pH < 7$,用 10mL 二氯甲烷液液萃取 2 次,萃取液合并后与 20mL 水进行分配,收集有机相,过装有 5g 无水硫酸镁的漏斗,收集流出液并浓缩,结晶出来的晶体 3-间苯氧甲酸缩 γ -氨基丁酸,简写为 3-PBA- γ -AJDS,转移到具塞瓶中, $4^\circ C$ 保存;

c. 3-PBA- γ -AJDS 与载体蛋白偶联制备免疫原:

4. $2\mu L$ 、0.032mol/L 氯甲酸异丁酯逐滴加入预先冷却至 $13^\circ C$ 的溶液,溶液中包含 0.032mol/L 的半抗原 3-PBA- γ -AJDS 和 $9.8\mu L$ 、0.041mol/L 三丁胺,溶剂是 0.5mL 的二恶烷,在 $12-14^\circ C$ 搅拌反应 45min,所产生的混合酸酐溶液逐滴加入至 $pH 7.5$ 、含 54mg BSA 蛋白、水:二恶烷 v/v 为 5:1 的 1.5mL 水-二恶烷溶液中,混合物在 $4^\circ C$ 反应 5h,使用 1mol/L NaOH 调整 pH 始终在 7.5,交联物超滤净化,然后进行冷冻干燥,制得免疫原;

免疫原按常规免疫方法制备抗体;经 ELISA 鉴定,抗体的检测限为 $0.5-1\mu g/kg$;与氟胺氰菊酯,甲氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯,氟氯氰菊酯,氯氰菊酯及溴氰菊酯的交叉反应率分别为 100%,18%,76%,39%,8%,7%;

(2) 载体与抗体的偶联:

a. 偶联:将 CNBr 活化的 protein A-Sepharose 4B 胶体从 $4^\circ C$ 冰箱中取出,回复至室温,小心将胶体打散;取出 20mL 打散后胶体,用 $pH 7.4$ 、0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液充分洗涤,去除其保存液;之后,用 $pH 7.4$ 、0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液将胶体稀释至 40mL,使其充分悬浮,平均分配到 2 个 50mL 的离心管中;将 29.7mg 抗体用 PBS 缓冲溶液稀释到 20mL,然后分别取 10mL 加入到含有胶体的离心管;室温下小心搅拌 30min,而后 1000rpm 离心 10min 回收所得载体与抗体偶联的胶体;

b. 测定偶联率:

用 $pH 7.4$ 、0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液多次洗涤载体与抗体偶联的胶体以除去未结合的抗体,分管收集淋洗流出液,用紫外扫描仪检测流出液在 280nm 下的紫外吸收,直到在该波长下无吸收为止;计算洗涤液中的蛋白浓度,进而推算抗体的偶联率,公式如下:

$$\text{偶联率(\%)} = \frac{\text{偶联前抗体总量} - \text{洗涤液中抗体重量}}{\text{偶联前抗体总量}} \times 100\% ;$$

(3) 封闭活化位点,加固抗体与基质支持物的连接:

用 pH 8.2、0.2mol/L 的三乙胺缓冲液充分洗涤步骤 (2) 所得载体与抗体偶联的胶体, 使该胶体溶液微环境处于三乙胺缓冲体系中, 随后往离心管中加用 pH 8.2、0.1mol/L 三乙胺缓冲液新鲜配制的偶联剂邻苯二甲酸二甲酯 DMP50mL, 之后, 室温下颠倒混匀 45min, 然后将离心管置于 1000rpm 下离心 10min 回收胶体, 用 20mmol/L 二乙胺水溶液 50mL 封闭未反应的偶联剂位点, 室温静置 5min;

(4) 装免疫亲和柱 IAC 柱:

将空柱用大量 pH 7.4、0.01mol/L PBS 缓冲液洗涤, 将疏水的筛板置于底部; 用大量 PBS 溶液充分洗涤步骤 (3) 处理后的胶体, 更换其缓冲体系为 PBS, 之后将胶体小心荡起, 平均分装于聚丙烯小柱内, 按 1mL 柱床体积/柱, 小心地以流线式灌入, 避免产生过多气泡; 然后将顶部滤片加上, 小心将其推送至胶体表面; 在筛板上加 0.5cm 高的 Sepharose 4B 胶体; 用大量 PBS 溶液冲洗, 以去除柱床中的气泡; 最后用含有质量浓度 0.01% 叠氮钠的 PBS 溶液保存小柱, 胶体上方留 0.3cm 高的缓冲液, 于 4℃ 冰箱中保存待用;

(5) 测定柱容量:

从冰箱中取出制备的 IAC 柱 3 支, PBS 平衡后, 将含 8000ng 的 6 种菊酯农药氟胺氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯, 氟氯氰菊酯, 甲氰菊酯, 氯氰菊酯, 溴氰菊酯的混合标准品溶解于 40mL PBS-甲醇, PBS: 甲醇体积比 80:20, 连续加到 IAC 柱上, 自然重力下流出, 然后用 20mL PBS、20mL 水洗涤, 最后用 4mL 甲醇洗脱, 收集流出液, 挥干溶剂, 正己烷复溶后, 用气相-电子捕获检测器 GC-ECD 检测; 按下列公式计算每种动态柱容量和绝对柱容量;

$$\text{动态柱容量}(\text{ng/ml}) = \frac{\text{上样液药物浓度}(\text{ng/ml}) \times \text{上样液体积}(\text{ml})}{\text{柱床胶体积}(\text{ml})} \times 100\%$$

$$\text{绝对柱容量} = \frac{\text{动态柱容量}(\text{ng/ml})}{\text{单位体积胶的抗体}(\text{ng/ml})} \times 100\%$$

空白对照柱按照上述 (1) ~ (4) 进行, 只是不加抗体溶液;

(6) 洗脱液的选择:

将总体积为 10mL 含有氟胺氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯, 氟氯氰菊酯, 甲氰菊酯, 氯氰菊酯和溴氰菊酯各 100ng 的含有 10% 甲醇的 PBS 溶液连续加到 IAC 柱上, 依次用 20mL PBS、水洗涤柱, 最后分别用不同比例的 PBS 溶液-甲醇溶液, 醋酸溶液-甲醇, 柠檬酸缓冲液-甲醇, 甲醇溶液进行洗涤; 收集洗脱液, 用 GC-ECD 测定, 计算回收率;

(7) 上样溶液和再生介质确定:

由于拟除虫菊酯类药物的弱极性, 在溶剂中加入一定比例助溶剂甲醇来改变其水溶性; 上样液选择 PBS, 9:1v/v PBS-甲醇, 8:2v/v PBS-甲醇, 75:25v/v PBS-甲醇, 7:3v/v PBS-甲醇, 6:4v/v PBS-甲醇, 5:5v/v PBS-甲醇;

将含有 50ng 的氟胺氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯, 氟氯氰菊酯, 甲氰菊酯, 氯氰菊酯或溴氰菊酯的 40mL 8:2v/v PBS-甲醇溶液连续加到 IAC 柱上, 依次用 9:1v/v PBS-甲醇, 8:2v/v PBS-甲醇, 75:25v/v PBS-甲醇, 7:3v/v PBS-甲醇, 9:1v/v 水-甲醇, 8:2v/v 水-甲醇, 75:25v/v 水-甲醇, 7:3v/v 水-甲醇进行洗涤, 测定回收率; 再生介质选为 PBS;

(8) 重复使用和柱容量:

用氟胺氰菊酯或溴氰菊脂标准品为代表化合物进行实验测定,时间为 2 个月,考察免疫亲和柱在此期间连续使用 20 次的动态柱容量的变化;一次使用包括:加样、洗涤、洗脱和再生;含 20% 甲醇的 pH 7.4、0.01M 的 PBS 溶液作为上样溶液;洗脱液用 4mL 甲醇洗脱,再生用 pH 7.4、0.01M 的 PBS 溶液,GC-ECD 测定柱容量变化。

2. 用权利要求 1 所述方法制备的拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的应用,其特征在于:

实际样品处理:肉类组织经研钵磨碎,添加水平:每 kg 肉添加 5, 20 或 50 μ g 的拟除虫菊酯类药物的试样,取样本 5g,加无水硫酸钠 10g,混匀溶于 30mL 石油醚-乙醚溶液中,石油醚:乙醚体积比为 1:1,涡旋 1min 后,超声提取 10min,离心,上清液挥干,溶于正己烷 20mL 和乙腈 30mL 的介质中,液液分配,将乙腈层浓缩,溶于 20mL 上样溶液中,上样溶液为甲醇:PBS 体积比 2:8, PBS 为 pH 7.4、0.01M;

检测条件:GC-ECD:检测器 300 $^{\circ}$ C;进样口 280 $^{\circ}$ C;不分流进样;载气:高纯氮;色谱柱:DM-5, 30m $\times$ 0.32mm I.D/0.25 μ m;程序升温:初始 60 $^{\circ}$ C 维持 1min, 25 $^{\circ}$ C/min 升至 175 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C/min 升至 300 $^{\circ}$ C, 300 $^{\circ}$ C 维持 5min。

一种拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的制备方法

技术领域

[0001] 本发明设计一种免疫亲和层析柱(IAC)的制备方法,特别是一种拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的制备方法,属于免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 拟除虫菊酯类农药是一类模拟天然除虫菊酯化学结构合成的高效低毒杀虫剂,多数品种对周围神经有影响,也能作用于中枢神经。主要中毒表现为头昏、恶心、全身不适、肌颤等。中毒较重者可有抽搐、肺水肿及意识障碍。严重者会出现呼吸、循环衰竭。

[0003] 目前拟除虫菊酯类药物的检测方法有薄层层析法,高效液相色谱法,酶联免疫吸附法,放射免疫测定法等,这些检测方法中大多需要样品前处理,因此有必要研制性能稳定,结果可靠灵敏的免疫亲和柱。目前免疫亲和柱的制备方法大概有溴化氰法,过碘酸钠法,蛋白 A 法等,免疫吸附剂主要是由惰性基质和抗体组成的,惰性基质是构成 IAC 疏松空间的主要组分。通常,基质需要具有一定的刚性,具有疏松的多孔结构,要求颗粒均匀、大小一致,理化性质稳定,易于活化,并具有亲水性以避免非特异性吸附等特点。普遍用于离线 IAC 的基质主要有琼脂糖(agarose)、葡聚糖(dextran)、纤维素(cellulose)、聚丙烯酰胺(polyacrylamide)、三丙烯酰胺(trisacryl)、聚甲基丙烯酸酯(polymethacrylate)等。由于这些物质多不能耐受压力,只能在重力作用的低流速条件下使用,常用来制备离线 IAC。

[0004] 目前广泛使用的商品化的琼脂糖凝胶(型号 4B, Sepharose 4B)(Sepharose 公司)是一种珠状的琼脂糖,它具备性质独特的疏松网状立体结构,结构有序,规则均一,能容许大分子物质自由扩散,适合抗体偶联和抗原抗体进行反应。Sepharose 4B 有一定的刚性,可耐受 1 磅/平方英尺(1psi)的柱压;具有良好的亲水性;可耐受 pH 4-9,高浓度的盐和水溶性有机溶剂;多糖骨架几乎不带电荷使得非特异性吸附大大降低。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的制备方法,本发明利用群特异性抗体的免疫亲和层析净化技术,能同时对拟除虫菊酯类药物多种组分进行分离净化,具备了处理多残留组分的能力。

[0006] 本发明的技术方案:一种拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的制备方法:

[0007] (1) 拟除虫菊酯类药物群选型抗体的制备

[0008] a. 3-间苯氧甲酸-酰氯的合成,3-间苯氧甲酸简称为 3-PBA:

[0009] 2. 2g 3-PBA 溶于 3mL 三氯甲烷中,在磁力搅拌器上轻柔搅拌,在 N_2 流中加入 1 μ L N,N'-二甲基甲酰胺,然后将加热温度调为 65℃,加入 1mL 亚硫酰氯,反应 1h 后,加入正己烷 2mL,然后用氮气吹干,反复进行 3 次该操作,得 1.5mL 深棕色的液体即为 3-PBA-酰氯;

[0010] b. 3-间苯氧甲酸缩 γ -氨基丁酸的合成:

[0011] 将 0.79g γ -氨基丁酸预先溶于 10mL 2mol/L 的 KOH 溶液中,加入 2.65mL 吡啶,于冰水浴中冷却,将上述 1.5mL 3-PBA-酰氯溶液于 10min 内加入 γ -氨基丁酸溶液中,激

烈搅拌 40min,并监测其 pH 的变化情况,直到 pH 降低到 7 时,反应结束;

[0012] 然后加入 1mL 1mol/L NaOH 溶液,强力搅拌,反应进行 15min 后停止,使用 6mol/L HCl 酸化至 pH < 7,用 10mL 二氯甲烷液液萃取 2 次,萃取液合并后与 20mL 水进行分配,收集有机相,过装有 5g 无水硫酸镁的漏斗,收集流出液并浓缩,结晶出来的晶体 3-间苯氧甲酸缩 γ -氨基丁酸,简称为 3-PBA- γ -AJDS,转移到具塞瓶中,4℃ 保存;

[0013] c. 3-PBA- γ -AJDS 与载体蛋白偶联制备免疫原:

[0014] 4.2 μ L、0.032m mol/L 氯甲酸异丁酯逐滴加入预先冷却至 13℃ 的溶液,溶液中包含 0.032m mol/L 的半抗原 3-PBA- γ -AJDS 和 9.8 μ L、0.041m mol/L 三丁胺,溶剂是 0.5mL 的二恶烷,在 12-14℃ 搅拌反应 45min,所产生的混合酸酐溶液逐滴加入至 pH 7.5、含 54mg BSA 蛋白、水:二恶烷 v/v 为 5:1 的 1.5mL 水-二恶烷溶液中,混合物在 4℃ 反应 5h,使用 1mol/L NaOH 调整 pH 始终在 7.5,交联物超滤净化,然后进行冷冻干燥,制得免疫原;

[0015] 免疫原按常规免疫方法制备抗体;经 ELISA 鉴定,抗体的检测限为 0.5-1 μ g/kg;与氟胺氰菊酯,甲氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯,氟氯氰菊酯,氯氰菊酯及溴氰菊酯的交叉反应率分别为 100%,18%,76%,39%,8%,7%;

[0016] (2) 载体与抗体的偶联:

[0017] a. 偶联:将 CNBr 活化的 protein A-Sepharose 4B 胶体 (Pharmacia 公司) 从 4℃ 冰箱中取出,回复至室温,小心将胶体打散;取出 20mL 打散后胶体,用 pH 7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液充分洗涤,去除其保存液;之后,用 pH 7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液将胶体稀释至 40mL,使其充分悬浮,平均分配到 2 个 50mL 的离心管中;将 29.7mg 抗体用 PBS 缓冲溶液稀释到 20mL,然后分别取 10mL 加入到含有胶体的离心管;室温下小心搅拌 30min,而后 1000rpm 离心 10min 回收所得载体与抗体偶联的胶体;

[0018] b. 测定偶联率

[0019] 用 pH 7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液多次洗涤载体与抗体偶联的胶体以除去未结合的抗体,分管收集淋洗流出液,用紫外扫描仪检测流出液在 280nm 下的紫外吸收,直到在该波长下无吸收为止;计算洗涤液中的蛋白浓度,进而推算抗体的偶联率,公式如下:

[0020]

$$\text{偶联率(\%)} = \frac{\text{偶联前抗体总量} - \text{洗涤液中抗体重量}}{\text{偶联前抗体总量}} \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

[0021] (3) 封闭活化位点,加固抗体与基质支持物的连接:

[0022] 用 pH 8.2、0.2mol/L 的三乙胺缓冲液充分洗涤胶体,使胶体溶液微环境处于三乙胺缓冲体系中,随后往离心管中加用 pH 8.2、0.1mol/L 三乙胺缓冲液新鲜配制的偶联剂邻苯二甲酸二甲酯 DMP 50mL (Pierce Chemical 公司),之后,室温下颠倒混匀 45min,然后将离心管置于 1000rpm 下离心 10min 回收胶体,用 20m mol/L 二乙胺水溶液 50mL 封闭未反应的偶联剂位点,室温静置 5min;

[0023] (4) 装免疫亲和柱 IAC 柱:

[0024] 将空柱用大量 pH 7.4、0.01mol/L PBS 缓冲液洗涤,将疏水的筛板置于底部;用大量 PBS 溶液充分洗涤胶体,更换其缓冲体系为 PBS,之后将胶体小心荡起,平均分装于聚丙烯小柱 (GE 公司) 内,按 1mL 柱床体积/柱,小心地以流线式灌入,避免产生过多气泡;然后将顶部滤片加上,小心将其推送至胶体表面;在顶部筛板上加 0.5cm 高的 Sepharose 4B 胶

体 ;用大量 PBS 溶液冲洗,以去除柱床中的气泡 ;最后用含有质量浓度 0.01%叠氮钠的 PBS 溶液保存小柱,胶体上方留 0.3cm 高的缓冲液,于 4℃冰箱中保存待用 ;

[0025] (5) 测定柱容量 :

[0026] 从冰箱中取出制备的 IAC 柱 3 支, PBS 平衡后,将含 8000ng 的 6 种菊酯农药氟胺氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯,氟氯氰菊酯,甲氰菊酯,氯氰菊酯,溴氰菊酯的混合标准品溶解于 40mL PBS- 甲醇, PBS : 甲醇体积比 80 : 20,连续加到 IAC 柱上,自然重力下流出,然后用 20mL PBS、20mL 水洗涤,最后用 4mL 甲醇洗脱,收集流出液,挥干溶剂,正己烷复溶后,用气相 - 电子捕获检测器 GC-ECD (气相 - 电子捕获检测器) 检测 ;按下列公式计算每种动态柱容量和绝对柱容量 ;

[0027]

$$\text{动态柱容量}(\text{ng/ml}) = \frac{\text{上样液药物浓度}(\text{ng/ml}) \times \text{上样液体积}(\text{ml})}{\text{柱床胶体积}(\text{ml})} \times 100\% \quad (\text{公式 2})$$

[0028]

$$\text{绝对柱容量} = \frac{\text{动态柱容量}(\text{ng/ml})}{\text{单位体积胶的抗体}(\text{ng /ml})} \times 100\% \quad (\text{公式 3})$$

[0029] 空白对照柱按照上述 (1)-(4) 进行,只是不加抗体溶液 ;

[0030] (6) 洗脱液的选择 :

[0031] 将总体积为 10mL 含有氟胺氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯,氟氯氰菊酯,甲氰菊酯,氯氰菊酯和溴氰菊酯各 100ng 的含有 10% 甲醇的 PBS 溶液连续加到 IAC 柱上,依次用 20mL PBS、水洗涤柱,最后分别用不同比例的 PBS 溶液 - 甲醇溶液,醋酸溶液 - 甲醇,柠檬酸缓冲液 - 甲醇,甲醇溶液进行洗涤 ;收集洗脱液,用 GC-ECD 测定,计算回收率 ;

[0032] (7) 上样溶液和再生介质确定 :

[0033] 由于拟除虫菊酯类药物的弱极性,在溶剂中加入一定比例助溶剂甲醇来改变其水溶性 ;上样液选择 PBS, PBS- 甲醇 (9 : 1, v/v), PBS- 甲醇 (8 : 2, v/v), PBS- 甲醇 (75 : 25, v/v), PBS- 甲醇 (7 : 3, v/v), PBS- 甲醇 (6 : 4, v/v), PBS- 甲醇 (5 : 5, v/v) ;上样液初选为 PBS- 甲醇 (8 : 2, v/v) ;

[0034] 将含有 50ng 的氟胺氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯,氟氯氰菊酯,甲氰菊酯,氯氰菊酯或溴氰菊酯的 40mL 溶液 (PBS- 甲醇 8 : 2, v/v) 连续加到 IAC 柱上,依次用 PBS- 甲醇 (9 : 1, v/v), PBS- 甲醇 (8 : 2, v/v), PBS- 甲醇 (75 : 25, v/v), PBS- 甲醇 (7 : 3, v/v), 水 - 甲醇 (9 : 1, v/v), 水 - 甲醇 (8 : 2, v/v), 水 - 甲醇 (75 : 25, v/v), 水 - 甲醇 (7 : 3, v/v) 进行洗涤,测定回收率 ;再生溶液初选为 PBS ;

[0035] (8) 重复使用和柱容量 :

[0036] 用氟胺氰菊酯和溴氰菊酯标准品为代表化合物进行实验测定,时间为 2 个月,考察免疫亲和柱在此期间连续使用 20 次的动态柱容量的变化。一次使用包括 :加样、洗涤、洗脱和再生。20% 甲醇的 PBS (0.01M, pH 7.4) 溶液作为上样溶液。洗脱液用 4mL 甲醇洗脱,再生用 PBS (0.01M, pH 7.4) 溶液, GC-ECD 测定柱容量变化。

[0037] 用所述方法制备的拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的应用 :

[0038] 实际样品处理 :肉类组织经研钵磨碎,添加水平 :每 kg 肉添加 5, 20 或 50 μ g 的拟除虫菊酯类药物的试样,取样本 5g,加无水硫酸钠 10g,混匀溶于 30mL 石油醚 - 乙醚溶液

中,石油醚:乙醚体积比为 1 : 1,涡旋 1min 后,超声提取 10min,离心,上清液挥干,溶于正己烷 20mL 和乙腈 30mL 的介质中,液液分配,将乙腈层浓缩,溶于 20mL 上样溶液中,上样溶液为甲醇:PBS 体积比 2 : 8, PBS 为 pH 7.4、0.01M;

[0039] 检测条件:GC-ECD:检测器 300℃;进样口 280℃;不分流进样;载气:高纯氮;色谱柱:DM-5, 30m×0.32mm I.D, 0.25 μm (Dikma);程序升温:初始 60℃维持 1min, 25℃/min 升至 175℃, 10℃/min 升至 300℃, 300℃维持 5min。

[0040] 本发明的有益效果:本发明利用群特异性抗体的免疫亲和层析净化技术,能同时对拟除虫菊酯类药物多种组分进行分离净化,具备了处理多残留组分的能力。本发明利用实验所获得的抗体与 Protein A-Sepharose 4B 偶联,装填免疫亲和层析柱。Protein A 特异性地与抗体的重链恒定区 (Fc) 结合,将其可变区释放出来,使得抗体定向地偶联到基质载体上,其结合区手臂充分地展开,有利于和目标分子结合。与常用的 spharose 4B 相比,后者依靠基质骨架上游离的羟基非特异性地与抗体相连,由于结合的非特异性,抗体的结合部位也可被埋没,使得只有部分结合部位裸露,在相同的胶体量和抗体量下,定向结合的 Protein A 载体使得 IAC 柱有更高的柱容量。

附图说明

[0041] 图 1 洗脱液体积的选择。

[0042] 图 2 上样溶液中甲醇组分的比例的选择。

[0043] 图 3 20 次使用期间小柱的柱容量变化曲线。

[0044] 图 4 6 种菊酯在气相色谱上的分离。1、甲氰菊酯, 2、λ-氯氟氰菊酯, 3、氟氯氰菊酯, 4、氯氰菊酯, 5、氟胺氰菊酯, 6、溴氰菊酯。

具体实施方式

[0045] (1) 拟除虫菊酯类药物群选型抗体的制备

[0046] a. 3-PBA-酰氯的合成

[0047] 2. 2g 3-PBA 溶于 3mL 三氯甲烷中,在磁力搅拌器上轻柔搅拌,在 N₂ 流中加入 1 μL N, N' -二甲基甲酰胺,然后将加热温度调为 65℃,加入约 1mL 亚硫酰氯,反应 1 小时后,加入正己烷 2mL,然后用氮气吹干,反复进行 3 次该操作,最后约 1.5mL 深棕色的液体即为 3-PBA-酰氯。

[0048] b. 将 0.79g γ-氨基丁酸预先溶于 10mL 2M 的 KOH 溶液中,加入 2.65mL 吡啶,于冰水浴中冷却,将上述 1.5mL 3-PBA-酰氯溶液于 10min 内加入 γ-氨基丁酸溶液中,激烈搅拌 40min,并监测其 pH 的变化情况,直到 pH 降低到 7 时,反应结束。

[0049] 然后加入 1mL 1M NaOH,强力搅拌,观察 pH 的变化情况,反应进行 15min 后停止,使用 6N HCl 酸化至 pH < 7,用 10mL 二氯甲烷液液萃取 2 次。萃取液合并后与 20mL 水进行分配,收集有机相,过装有约 5g 无水硫酸镁的漏斗,收集流出液并浓缩,结晶出来的晶体转移到具塞瓶中,4℃保存。

[0050] c. 与载体蛋白的偶联

[0051] 氯甲酸异丁酯 (4.2 μL, 0.032mM) 逐滴加入预先冷却的溶液 (13℃),溶液中包含 0.032mM 的半抗原 3-PBA-γ-AJDS 和三丁胺 (9.8 μL, 0.041mM),溶剂是 0.5mL 的二恶烷,在

12-14℃下搅拌反应 45min, 所产生的混合酸酐溶液逐滴加入蛋白溶液 (BSA 54mg) 于 1.5mL 水 / 二恶烷 (5 : 1, v/v) pH 7.5, 混合物在 4℃反应 5h, 使用 1M NaOH 调整 pH 始终在 7.5, 交联物超滤净化, (PM 10,000 膜), 然后进行冷冻干燥。

[0052] d. 免疫原经常规流程制备抗体。经 ELISA 鉴定, 抗体的检测限为 0.5-1 μg/kg。与 氟胺氰菊酯, 甲氰菊酯, λ-氯氟氰菊酯, 氟氯氰菊酯, 氯氰菊酯和溴氰菊酯的交叉反应率为 100%, 18%, 76%, 39%, 8%, 7%。

[0053] (2) 载体与抗体的偶联:

[0054] a 偶联: 将 CNBr 活化的 protein A-Sepharose 4B 胶体从 4℃冰箱中取出, 回复至室温。小心将胶体打散, 取出 20mL 打散后的胶体, 用 PBS 充分洗涤, 去除其保存液。之后, 用 PBS 溶液将胶体稀释至 40mL, 使其充分悬浮, 平均分配到 2 个 50mL 的离心管中。将事先抗血清纯化好的抗体 (29.7mg) 用 PBS 稀释到 20mL, 然后分别取 10mL 加入到含有胶体的离心管。室温下小心搅拌约 30min, 而后低速离心 (1000rpm) 10min 回收胶体。

[0055] b. 测定偶联率:

[0056] 用 PBS 缓冲液多次洗涤胶体以除去未结合的抗体, 分管收集淋洗流出液, 用紫外扫描仪检测流出液在 280nm 下的紫外吸收, 直到在该波长下无吸收为止。计算洗涤液中的蛋白浓度, 进而推算抗体的偶联率, 公式如下:

[0057]

$$\text{偶联率(\%)} = \frac{\text{偶联前抗体总量} - \text{洗涤液中抗体重量}}{\text{偶联前抗体总量}} \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

[0058] 多克隆抗体溶液与溴化氰活化的 Protein A-Sepharose 4B 偶联后, 用大量的 PBS 洗去未结合的抗体分子, 将收集的洗涤液进行紫外测定, 偶联结果如下表 1。利用上述公式, 计算偶联上的抗体量为 27.2mg, 偶联率为 91.6%。

[0059] 表 1 抗体偶联率

[0060]

	抗体量 (mg)	偶联率 (%)
抗体总量	29.7	-
已偶联的抗体	27.2	91.6
未偶联的抗体	2.5	8.4

[0061] (3) 封闭活化位点, 加固抗体与基质支持物的链接:

[0062] 用 0.2M 的三乙胺缓冲液 (pH 8.2) 充分洗涤胶体, 使其溶液微环境处于三乙胺缓冲体系中, 将胶体装于离心管中, 随后往离心管中加偶联剂 DMP (dimethylpimelimidate) 50 mL (0.1M, 用 pH 8.2 三乙胺缓冲液新鲜配制), 之后, 室温下颠倒混匀 45min。然后将离心管置于 1000rpm 下离心 10min 回收胶体, 用二乙胺水溶液 50mL (20mM) 封闭未反应的交联剂位点, 室温静置 5min。

[0063] (4) 装柱:

[0064] 将空柱用大量 PBS 缓冲液洗涤, 将疏水的筛板置于底部。用大量 PBS 溶液充分洗涤

胶体,更换其缓冲体系为 PBS,之后将胶体小心荡起,平均分装于聚丙烯小柱内,按 1mL 柱床体积 / 柱,小心地以流线式灌入,避免产生过多气泡。然后将顶部滤片加上,小心将其推送至胶体表面。在顶部筛板上加约 0.5cm 高的 Sepharose 4B 胶体。用大量 PBS 溶液冲洗,以去除柱床中的气泡。最后用含有 0.01% 叠氮钠的 PBS 溶液保存小柱,胶体上方留约 0.3cm 高的缓冲液,于 4℃ 冰箱中保存待用。

[0065] (5) 测定柱容量:

[0066] 从冰箱中取出制备的 IAC 柱 3 支, PBS 平衡后,将含 8000ng 的 6 种菊酯农药的混合标准品溶解于 40mL PBS- 甲醇 (80-20, v/v) 连续加到 IAC 柱上,自然重力下流出,然后用 20mL PBS、20mL 水洗涤,最后用 4mL 甲醇洗脱,收集流出液,挥干溶剂,正己烷复溶后,用 GC-ECD 检测。按下列公式计算动态柱容量和绝对柱容量。

[0067]

$$\text{动态柱容量}(\text{ng/ml}) = \frac{\text{上样液药物浓度}(\text{ng/ml}) \times \text{上样液体积}(\text{ml})}{\text{柱床胶体积}(\text{ml})} \times 100\% \quad (\text{公式 2})$$

[0068]

$$\text{绝对柱容量} = \frac{\text{动态柱容量}(\text{ng/ml})}{\text{单位体积胶的抗体}(\text{ng/ml})} \times 100\% \quad (\text{公式 3})$$

[0069] 空白对照柱按照上述 (1) ~ (4) 进行,只是不加抗体溶液。

[0070] 根据所获得的 IAC 柱,测定其对氟胺氰菊酯、λ-氯氟氰菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯、氟氯氰菊酯以及溴氰菊酯 6 种药物的柱容量。结果如表 2 所示,该柱对 6 种药物的绝对柱容量为 195-415ng/mg IgG,动态柱容量为 1289-2340ng/mL。可以满足残留分析的需要。

[0071] 表 2 亲和层析柱的动态和绝对柱容量

[0072]

药物名称	抗体 IgG	
	动态柱容量 (ng/mL)	绝对柱容量 (ng/mg IgG)
氟胺氰菊酯	2340 ± 43	415 ± 19
λ-氯氟氰菊酯	2048 ± 37	383 ± 24
甲氰菊酯	1827 ± 39	265 ± 32
氯氰菊酯	1361 ± 26	214 ± 15
氟氯氰菊酯	1824 ± 42	253 ± 21
溴氰菊酯	1289 ± 57	195 ± 13

[0073] (6) 洗脱液的选择:

[0074] 将 10mL 含有氟胺氰菊酯, λ-氯氟氰菊酯, 氟氯氰菊酯, 甲氰菊酯, 氯氰菊酯, 溴氰菊酯各 100ng 的 PBS 溶液 (含有 10% 甲醇) 连续加到 IAC 柱上,依次用 20mL PBS、水洗涤柱,最后分别用不同比例的 PBS 溶液-甲醇溶液,醋酸溶液-甲醇,柠檬酸缓冲液-甲醇,甲醇溶液进行洗涤。收集洗脱液,用 GC-ECD 测定,计算回收率。

[0075] 分别使用不同酸碱度和不同甲醇含量的 PBS 溶液对目的药物进行洗脱,测定其回收率,综合考虑回收率和 IAC 柱的寿命,最终选择了 4mL 甲醇作为最终的洗脱液 (见图 1)。在此条件下,各个药物的回收率均在 93% 以上,可以满足残留分析的要求。

[0076] 表 3 洗脱溶液对药物回收率的影响

[0077]

洗脱溶液	6 种药物的回收率 %
pH 2.0、2%醋酸缓冲液-20%甲醇	43-67
pH 3.0、0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液-20%甲醇	52-78
pH 4.0、0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液-20%甲醇	24-49
pH4.0、0.1M 醋酸盐缓冲液-20%甲醇	34-65
pH 5.0、0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液-20%甲醇	21-47
pH 7.4、0.01M 磷酸盐缓冲液-50%甲醇	37-71
pH 7.4、0.01M 磷酸盐缓冲液-70%甲醇	65-79
pH 7.4、0.01M 磷酸盐缓冲液-90%甲醇	68-92
甲醇	93-97

[0078] 洗脱体积也是一个重要的参数,洗脱体积太大不方便浓度且可能破坏抗体的稳定性。试验中我们对洗脱液甲醇的使用量进行了优化,见图 1 所示,随着甲醇体积的增加,回收率增加,由于有机溶剂对抗体的活性有损害,为了增加柱的可重复使用频率,我们选择了 4mL 甲醇,既可以满足较高的回收率又不至于洗脱体积太大而降低 IAC 柱的寿命,同时也缩短了分析时间。

[0079] (7) 淋洗液的选择

[0080] 动物性组织样本中油脂、蛋白等干扰物质会显著降低抗原-抗体反应的特异性,大量的非特异性结合反应引入了干扰物质,降低了净化效果。试验中,我们对猪肉样品的提取物分别在 IAC 柱上进行了净化,并通过改变淋洗液 PBS 中 NaCl 的含量可以显著地减少非特异性结合。结果表明, PBS-0.2M NaCl-20% 甲醇可以在保证各个药物较好的回收率的情况下减少非特异性结合。

[0081] (8) 上样溶液和再生介质确定

[0082] 由于拟除虫菊酯类药物的弱极性,在溶剂中加入一定比例助溶剂甲醇来改变其水溶性。将含有 50ng 的氟胺氰菊酯, λ -氯氟氰菊酯,氟氯氰菊酯,甲氰菊酯,氯氰菊酯或溴氰菊酯的 40mL 溶液 (PBS- 甲醇 9 : 1, v/v) 连续加到 IAC 柱上,依次用 PBS- 甲醇 (9 : 1, v/v), PBS- 甲醇 (8 : 2, v/v), PBS- 甲醇 (75 : 25, v/v), PBS- 甲醇 (7 : 3, v/v), 水- 甲醇 (9 : 1, v/v), 水- 甲醇 (8 : 2, v/v), 水- 甲醇 (75 : 25, v/v), 水- 甲醇 (7 : 3, v/v) 进行洗涤,测定回收率。再生溶液初选为 PBS。

[0083] 上样溶液中甲醇的含量:由于拟除虫菊酯类药物的弱极性,上样溶液中含有一定比例的有机溶剂可以增强其溶解性,然而有机溶剂会破坏抗原-抗体结合,试验中对不同比例的甲醇-PBS 上样溶液进行了测试,见图 2,结果表明,随着甲醇含量的增加,目标化

合物在上样流出液中的损失随之增加,在甲醇比例为 25% 以下,测定回收率在 90% 以上,而甲醇比例超过 30% 则目标化合物回收率急剧下降。因此,试验中选择含 20% 甲醇的 PBS(0.01M, pH 7.4) 溶液作为上样溶液。

[0084] (9) 重复使用和柱容量

[0085] 用氟胺氰菊酯和溴氰菊酯标准品为代表化合物进行实验测定,时间为 2 个月,考察免疫亲和柱在此期间连续使用 20 次的动态柱容量的变化。一次使用包括:加样、洗涤、洗脱和再生。20% 甲醇的 PBS(0.01M, pH 7.4) 溶液作为上样溶液。洗脱液用 4mL 甲醇洗脱,再生用 PBS(0.01M, pH 7.4) 溶液,GC-ECD 测定柱容量变化。

[0086] 试验中在 2 个月内考察了 IAC 柱的稳定性,追踪了在此期间的柱容量变化。图 3 以氟胺氰菊酯或溴氰菊酯的柱容量变化表明了 20 次重复使用过程中,在前 6 次过程中,柱容量迅速下降,此后趋于平稳,尤其是在 10 次使用之后柱容量变化较小,此时的柱容量下降至最初的 1/3。(见图 3)

[0087] (10) 标准曲线

[0088] 配制浓度为 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200ng/mL 的标准溶液,用 GC-ECD 测定,以各组分色谱峰面积对浓度进行线性回归。菊酯为手性药物,对于在非手性柱上出现簇峰的,以各个峰面积总和计算,如氟氯氰菊酯为混旋体,有四个峰,以 4 峰面积总和计算。回归方程见表 4,由表 4 知,在上述浓度范围内,每种药物的响应与浓度呈线性关系,相关系数大于 99%,典型色谱图见图 4。

[0089] 表 4 6 种化合物标准曲线方程及线性回归系数

[0090]

药物	线性范围 ng/mL	线性方程	回归系数
甲氰菊酯	1-200	$y = 0.9772x + 9.6031$	0.9946
λ -氯氟氰菊酯	0.5-200	$y = 1.5552x + 13.811$	0.9970
氟氯氰菊酯	2-200	$y = 0.5598x + 1.6764$	0.9995
氯氰菊酯	2-200	$y = 1.639x + 20.011$	0.9936
氟胺氰菊酯	2-200	$y = 0.6366x + 0.2786$	0.9971
溴氰菊酯	2-200	$y = 0.1143x - 0.8006$	0.9980

[0091] (11) 实际样品处理

[0092] 肉类组织经研钵磨碎,添加水平 5, 20 或 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$,取样本 (5g),加无水硫酸钠 (10g),混匀溶于石油醚-乙醚 (1 : 1, v/v, 30mL) 溶液中,涡旋 (1min) 后,超声提取 (10min),离心,上清液挥干,溶于正己烷 (20mL) 和乙腈 (30mL),液液分配,将乙腈层浓缩,溶于上样溶液 (甲醇 : PBS(0.01M, pH 7.4) = 2 : 8, 20mL)。

[0093] 检测条件:GC-ECD:检测器 (300℃);进样口 (280℃);不分流进样;载气 (高纯氮);色谱柱:DM-5, 30m $\times$ 0.32mm I.D., 0.25 μm (Dikma);程序升温:初始 60℃维持 1min,

25℃ /min 升至 175℃, 10℃ /min 升至 300℃, 300℃ 维持 5min。

[0094] 表 5 猪肉添加回收试验

[0095]

分析物	添加水平 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	日内 (n=5, n 为重复)		日间 (n=10)	
		回收率%	变异系数 (CV,%)	回收率%	变异系数(CV,%)
甲氰菊酯	5	92.6	6.2	84.4	9.5
	20	90.7	5.2	92.1	7.7
	50	89.5	4.7	93.0	6.3
λ -氯氟氰菊酯	5	87.2	5.7	83.8	8.8
	20	94.2	4.6	84.3	6.8
	50	86.3	4.4	88.0	7.3
氟氯氰菊酯	5	81.4	8.2	81.2	13.2
	20	86.3	7.1	78.4	9.3
	50	84.5	7.2	87.1	7.4
氯氰菊酯	5	76.5	6.7	79.3	11.2
	20	86.4	7.5	82.5	9.3
	50	88.5	6.9	82.4	8.9
氟胺氰菊酯	5	73.7	9.3	78.1	12.3
	20	83.5	8.2	82.4	10.7
	50	89.8	6.5	85.3	9.8
溴氰菊酯	5	78.2	8.3	77.2	9.3
	20	81.4	9.1	79.4	8.2
	50	79.5	5.8	83.9	7.8

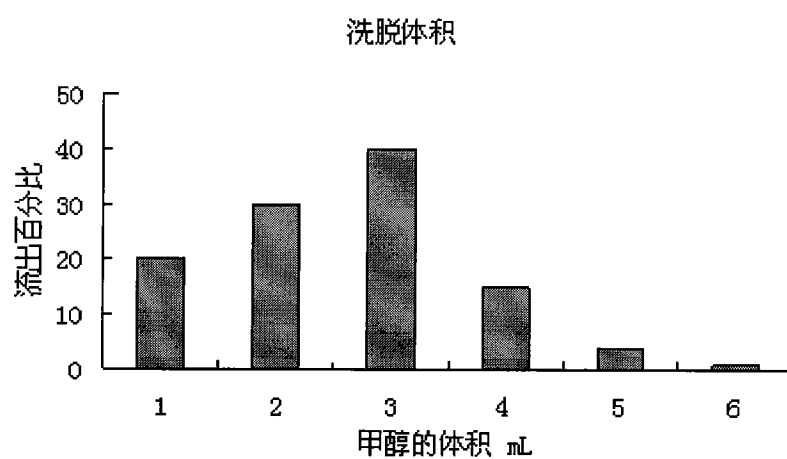


图 1

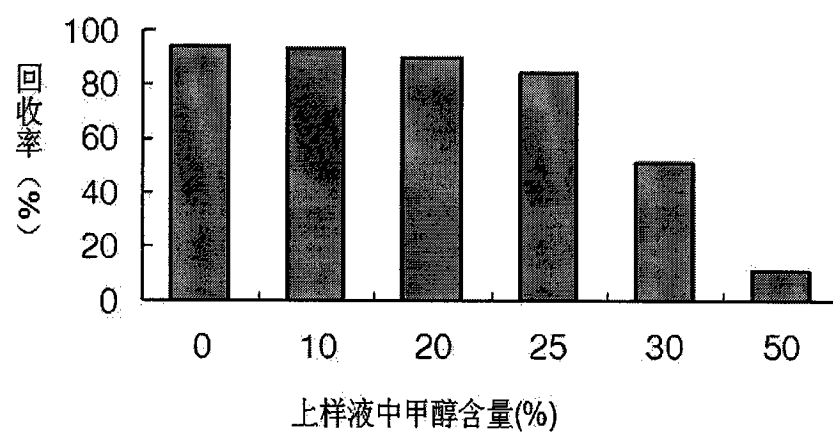


图 2

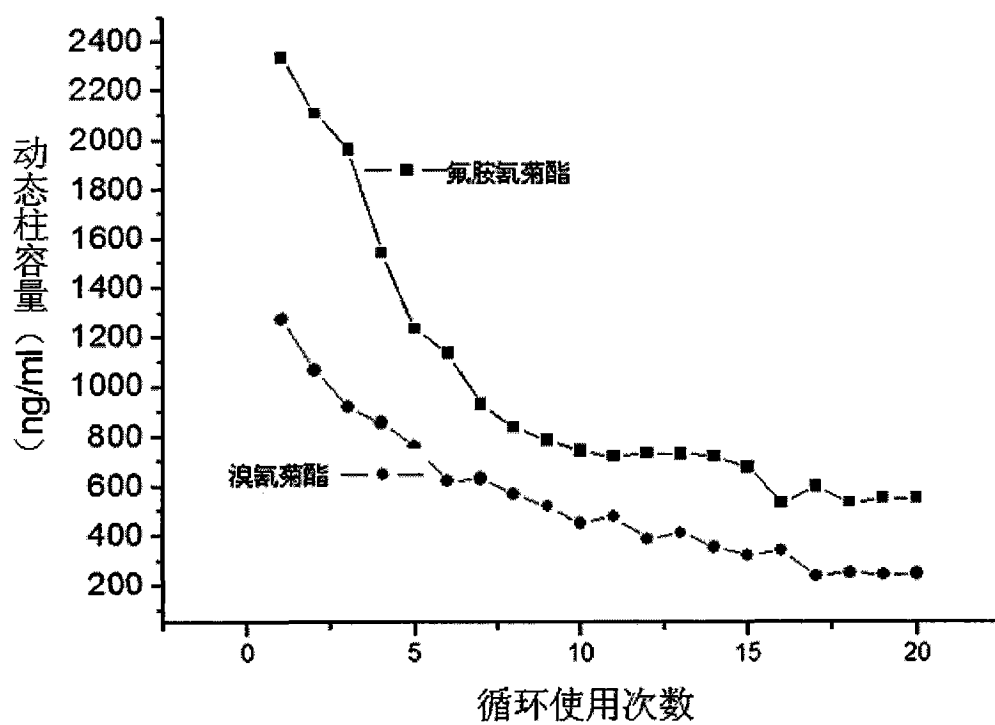


图 3

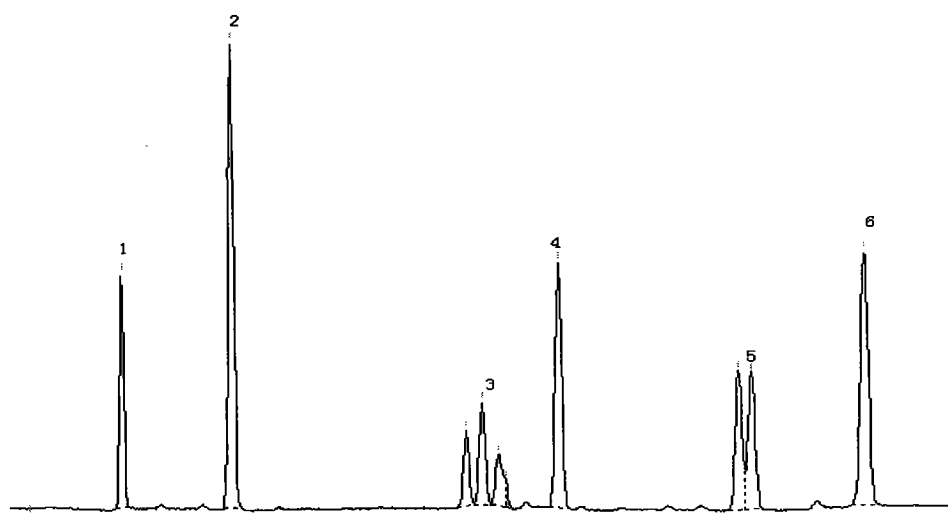


图 4

专利名称(译)	一种拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的制备方法		
公开(公告)号	CN101726589B	公开(公告)日	2012-08-08
申请号	CN200910222578.0	申请日	2009-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 匡华 马伟 彭池方 陈伟 李灼坤 徐丽广		
发明人	胥传来 匡华 马伟 彭池方 陈伟 李灼坤 徐丽广		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/566 G01N30/56 G01N30/50 G01N30/02 G01N33/12		
其他公开文献	CN101726589A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种拟除虫菊酯类药物群选择性免疫亲和层析柱的制备方法，属于免疫分析技术领域。本发明利用群特异性抗体的免疫亲和层析净化技术，能同时对拟除虫菊酯类药物多种组分进行分离净化。本发明利用实验所获得的抗体与ProteinA-Sepharose 4B偶联，装填免疫亲和层析柱。Protein A特异地与抗体的重链恒定区(Fc)结合，将其可变区释放出来，使得抗体定向地偶联到基质载体上，其结合区手臂充分地展开，有利于和目标分子结合。与常用的spharose 4B相比，后者依靠基质骨架上游离的羟基非特异性地与抗体相连，由于结合的非特异性，抗体的结合部位也可被埋没，使得只有部分结合部位裸露，在相同的胶体量和抗体量下，定向结合的Protein A载体使得IAC柱有更高的柱容量。

