



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103197072 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201310096123. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 03. 22

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 7201 2013. 01. 23

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学

(72) 发明人 匡华 郭靖男 胥传来 徐利广

刘丽强 马伟 王利兵 丁利

宋姗姗

(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

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

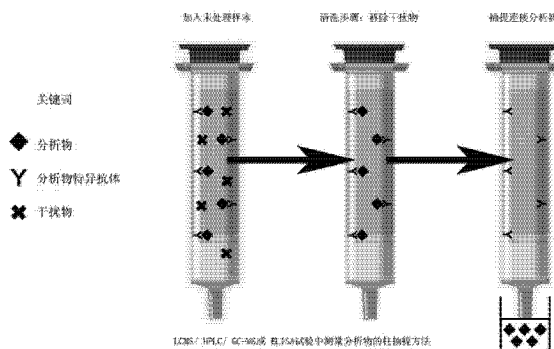
(54) 发明名称

一种头孢类抗生素的免疫亲和柱及其制备方法

(57) 摘要

一种检测头孢类抗生素的免疫亲和柱及其制备方法,属于免疫学检测领域,本发明免疫亲和柱由空柱管和琼脂糖凝胶组成,琼脂糖凝胶上偶联了抗头孢类抗生素的单克隆抗体;以一种抗头孢类抗生素的簇特异性抗体与凝胶的偶联物作为填充物组装成免疫亲和柱。本发明制备的免疫亲和柱能够与头孢类抗生素特异性结合,其最大结合容量约为 160ngDMT;采用的洗脱液为 80% 的甲醇-水溶液时,液质联用法平均加标回收率为 99. 62%;重复使用 4 次,回收率不低于 90%。进行检测头孢类抗生素时候的样品前处理成本低廉,快速,便携,可以用于不同样品的头孢类抗生素残留检测的前处理。

免疫亲和柱样本纯化原理



1. 一种检测头孢类抗生素的免疫亲和柱,由空柱管和琼脂糖凝胶组成,琼脂糖凝胶上偶联了抗头孢类抗生素的单克隆抗体;

所述单克隆抗体为单克隆细胞株,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号 CGMCC No. 7201。

2. 权利要求 1 所述检测头孢类抗生素的免疫亲和柱的制备方法,其特征在于制备步骤为:

(1) 偶联:预先将纯化好的抗头孢类抗生素单克隆抗体 CGMCC No. 7201 置于 pH8.3 含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃ 偶联缓冲液中透析 12h;将用适量溴化氰活化的琼脂糖干粉 Sepharose4B 用 1mM 盐酸使其溶胀,然后在砂心漏斗中用偶联缓冲液快速抽洗除去杂质;然后迅速倒入抗头孢氨苄单克隆抗体溶液中,混匀,室温下震荡充分反应 1h;用 5 倍体积以上的偶联缓冲液洗去未偶联的抗头孢类抗生素单克隆抗体,得到琼脂糖-单抗偶联复合物;

(2) 封闭活性基团:将琼脂糖-单抗偶联复合物转入 5 倍体积 pH8.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液中,保持 2h,以封闭琼脂糖凝胶中多余的活性基团;

(3) 洗涤:步骤(2)得到的琼脂糖-单抗偶联复合物用 5 倍载体体积的 pH4.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸缓冲液和 5 倍载体体积的 pH8.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液各淋洗一次,此洗涤过程重复三次,然后用 5 倍载体体积的 PBS 洗涤两次;

(4) 防腐处理:步骤(3)制备好的琼脂糖-单抗偶联复合物如需放置一段时间,应使用含有 1 / 10000 叠氮钠的 PBS 缓冲液浸泡,然后沥去多余的溶液后放入包装袋或瓶中在 4℃ 密封保存;

(5) 装柱:将步骤(3)或(4)得到的琼脂糖-单抗偶联复合物填充入 55×6mm 固相萃取空柱管中,在一定负压下用 PBS 将凝胶压紧,5% 甲醇平衡备用,即制成头孢类抗生素免疫亲和柱;

(6) 保存:琼脂糖-单抗偶联复合物或填充好的头孢类抗生素免疫亲和柱切勿冷冻,保存在 4℃ 的冰箱内。

一种头孢类抗生素的免疫亲和柱及其制备方法

技术领域

[0001] 一种检测头孢类抗生素的免疫亲和柱及其制备方法,本发明涉及免疫学检测领域,具体涉及到头孢类单克隆抗体的制备及免疫亲和柱的制备。

背景技术

[0002] 因为现有兽药种类繁多,就头孢类抗生素也有很多种,其广泛的使用也使得其残留于各种物质中,而样品中复杂的组成会对头孢类抗生素的检测造成影响。现有的检测头孢类抗生素的方法主要是仪器分析和免疫检测,前者包括高效液相色谱法、液质联用(HPLC-MS)、气质联用(GC-MS)等。但要想使这些检测方法能达到理想的检测效果,则需将样品进行不同程度的前处理,因此实现具有快速、便携优点的样品前处理方法具有现实意义。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种检测头孢类抗生素的免疫亲和柱及其制备方法,为了克服现有检测技术的缺陷,提供一种快速,便携优点的样品前处理方法。同时提供该亲和柱的制备方法。

[0004] 本发明的技术方案:一种检测头孢类抗生素的免疫亲和柱,由空柱管和琼脂糖凝胶组成,琼脂糖凝胶上偶联了抗头孢类抗生素的单克隆抗体。所述单克隆抗体为单克隆细胞株,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号 CGMCC No. 7201。

[0005] 所述检测头孢类抗生素的免疫亲和柱的制备方法,制备步骤为:

[0006] (1)偶联:预先将纯化好的抗头孢类抗生素单克隆抗体 CGMCC No. 7201 置于 pH8.3 含有 0.5mol / L NaCl 的 0.1mol / L NaHCO₃ 偶联缓冲液中透析 12h;将用适量溴化氰活化的琼脂糖干粉 Sepharose4B,用 1mM 盐酸使其溶胀,然后在砂心漏斗中用偶联缓冲液快速抽洗除去杂质;然后迅速倒入抗头孢氨苄单克隆抗体溶液中,混匀,室温下震荡充分反应 1h;用 5 倍体积以上的偶联缓冲液洗去未偶联的抗头孢类抗生素单克隆抗体,得到琼脂糖-单抗偶联复合物;

[0007] (2)封闭活性基团:将琼脂糖-单抗偶联复合物转入 5 倍体积 pH8.0 的含 0.5mol / L NaCl 的 0.1mol / L Tris-HCl 缓冲液中,保持 2h,以封闭琼脂糖凝胶中多余的活性基团;

[0008] (3)洗涤:步骤(2)得到的琼脂糖-单抗偶联复合物用 5 倍体积的 pH4.0 的含 0.5mol / L NaCl 的 0.1mol / L 醋酸缓冲液和 5 倍载体体积的 pH8.0 的含 0.5mol / L NaCl 的 0.1mol / L Tris-HCl 缓冲液各淋洗一次,此洗涤过程重复三次,然后用 5 倍载体体积的 PBS 洗涤两次;

[0009] (4)防腐处理:步骤(3)制备好的琼脂糖-单抗偶联复合物如需放置一段时间,应使用含有 1 / 10000 叠氮钠的 PBS 缓冲液浸泡,然后沥去多余的溶液后放入包装袋或瓶中在 4℃密封保存;

[0010] (5)装柱:将步骤(3)或(4)得到的琼脂糖-单抗偶联复合物填充入 55×6mm 固相

萃取空柱管中,在一定负压下用 PBS 将凝胶压紧(负压不能太低,否则会破坏凝胶结构),5%甲醇平衡备用,即制成头孢类抗生素 IAC 柱。

[0011] (6)保存:琼脂糖-单抗偶联复合物或填充好的头孢类抗生素 IAC 柱切勿冷冻,保存在 4℃的冰箱内。

[0012] 抗头孢类抗生素的单克隆抗体的制备:用戊二醛法制备免疫原,使戊二醛:头孢氨苄:KLH=4200:3000:1(摩尔比),先将头孢氨苄和戊二醛混合 20min,然后再与 KLH 反应 5h,透析得免疫原。用此免疫原 100 μg / 50 μL 与 50 μL 弗氏完全佐剂乳化后皮下注射每只 10 周龄 BALB / C 雄性小鼠,每隔 20 天后进行加强免疫。皮下注射 50 μg / 50 μL 抗原(与弗氏不完全佐剂乳化)。加强免疫 4 次后第 7 至 10 天采用腹腔注射,剂量为 50 μg / 50 μL 抗原。3 天后取脾脏细胞融合。第二次免疫后 7 天从小鼠尾静脉采血用间接 ELISA 测血清效价。融合后筛选得合格的阳性脾细胞,将此细胞扩培后注射至小鼠腹腔,数日后抽取腹水,纯化后得到抗头孢类抗生素的单克隆抗体。

[0013] 生物材料样品保藏:一株单克隆细胞株,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,保藏编号 CGMCC No. 7201,保藏日期 2013 年 1 月 23 日。

[0014] 本发明的有益效果:本发明制备的免疫亲和柱能够与头孢类抗生素特异性结合,其最大结合容量约为 160ngDMT;采用的洗脱液为 80%的甲醇-水溶液时,液质联用法平均加标回收率为 99.62%;重复使用 4 次,回收率不低于 90%。进行检测头孢类抗生素时候的样品前处理成本低廉,快速,便携,可以用于不同样品的头孢类抗生素残留检测的前处理。该免疫亲和柱便携,适合现场检测;操作简便,不需要专业技术人员。

附图说明

[0015] 图 1 组装完成的免疫亲和柱结构和使用原理示意图。

具体实施方式

[0016] 实施例 1

[0017] 一种检测头孢类抗生素的免疫亲和柱,由空柱管和凝胶组成,凝胶上偶联了抗头孢类抗生素的单克隆抗体。该免疫亲和柱按以下步骤制备:

[0018] (1)偶联:预先将纯化好的抗头孢类抗生素单克隆抗体置于 pH8.3 含有 0.5mol / L NaCl 的 0.1mol / L NaHCO₃ 偶联缓冲液中透析 12h;将用适量溴化氰活化的琼脂糖干粉 Sepharose4B,用 1mM 盐酸使其溶胀,然后在砂心漏斗中用偶联缓冲液快速抽洗除去杂质;然后迅速倒入抗头孢氨苄单克隆抗体溶液中,混匀,室温下震荡充分反应 1h;用 5 倍体积以上的偶联缓冲液洗去未偶联的抗头孢类抗生素单克隆抗体,得到琼脂糖-单抗偶联复合物;

[0019] (2)封闭活性基团:将琼脂糖-单抗偶联复合物转入 5 倍体积 pH8.0 的含 0.5mol / L NaCl 的 0.1mol / L Tris-HCl 缓冲液中,保持 2h,以封闭琼脂糖凝胶中多余的活性基团;

[0020] (3)洗涤:步骤(2)得到的琼脂糖-单抗偶联复合物用 5 倍体积的 pH4.0 的含 0.5mol / L NaCl 的 0.1mol / L 醋酸缓冲液和 5 倍载体体积的 pH8.0 的含 0.5mol / L NaCl 的 0.1mol / L Tris-HCl 缓冲液各淋洗一次,此洗涤过程重复三次,然后用 5 倍载体体积的

PBS 洗涤两次；

[0021] (4) 防腐处理：步骤(3)制备好的琼脂糖-单抗偶联复合物如需放置一段时间，应使用含有 1 / 10000 叠氮钠的 PBS 缓冲液浸泡，然后沥去多余的溶液后放入包装袋或瓶中在 4℃密封保存；

[0022] (5) 装柱：将步骤(3)或(4)得到的琼脂糖-单抗偶联复合物填充入 1mL 固相萃取空柱管中，在一定负压下用 PBS 将凝胶压紧（负压不能太低，否则会破坏凝胶结构），5% 甲醇平衡备用，即制成头孢类抗生素 IAC 柱。

[0023] (6) 保存：琼脂糖-单抗偶联复合物或填充好的头孢类抗生素 IAC 柱切勿冷冻，保存在 4℃的冰箱内。

[0024] 实施例 2

[0025] 用免疫亲和柱液质联用法测定头孢类抗生素。

[0026] 在不含头孢类抗生素的样品(脱脂牛奶)中分别添加 1ppb、5ppb、10ppb、50ppb 的头孢氨苄、头孢羟氨苄和头孢拉定的混合样品，样品提取液用实施例 1 制备的亲和柱纯化，用液质联用法测定浓度。具体操作方法参照 GB/T22989-2008，结果如下，参见表 1。

[0027] 表 1 采用本发明制备的免疫亲和柱液质联用法测定头孢类抗生素的结果

[0028]

添加头孢类抗生素的浓度(ppb)	实测值(ppb)	回收率(%)	平均回收率(%)	变异系数(%)
1ppb	0.95	95	99.2	8.5
	0.99	99		
	1.01	101		
	1.12	112		
	0.89	89		

[0029]

5ppb	4.77	95.4	98.64	2.46
	4.91	98.2		
	4.88	97.6		
	5.01	100.2		
	5.09	101.8		
10ppb	11.2	112	99.76	9.42
	10.7	107		
	8.99	89.9		
	9.71	97.1		
	9.28	92.8		
50ppb	48.9	97.8	100.88	3.54
	49.1	98.2		
	51.7	103.4		
	52.9	105.8		
	49.6	99.2		

[0030] 从以上数据可以看出,在空白样品脱脂牛奶中对头孢类抗生素进行 4 个浓度水平的添加回收率实验,平均回收率在 98.64% ~ 100.88%,变异系数 2.46% ~ 9.42%,这表明本发明制备的免疫亲和柱性能稳定、结果可靠,完全可以满足头孢类抗生素的检测需要。

免疫亲和柱样本纯化原理

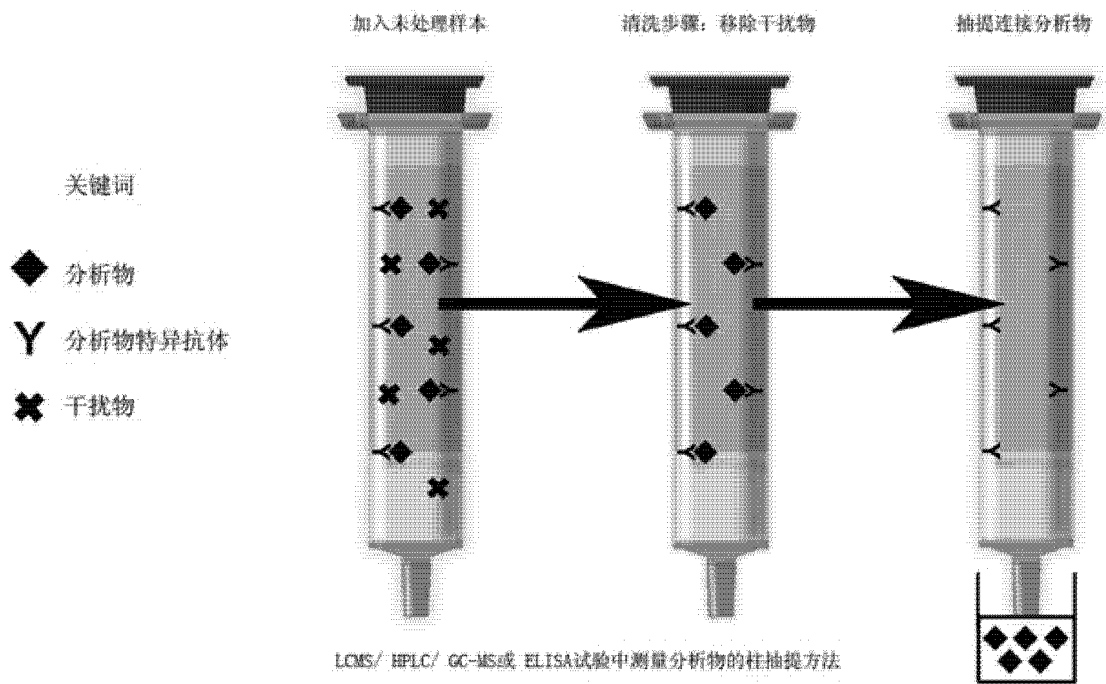


图 1

专利名称(译)	一种头孢类抗生素的免疫亲和柱及其制备方法		
公开(公告)号	CN103197072A	公开(公告)日	2013-07-10
申请号	CN201310096123.5	申请日	2013-03-22
[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	匡华 郭靖男 胥传来 徐利广 刘丽强 马伟 王利兵 丁利 宋姗姗		
发明人	匡华 郭靖男 胥传来 徐利广 刘丽强 马伟 王利兵 丁利 宋姗姗		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN103197072B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测头孢类抗生素的免疫亲和柱及其制备方法，属于免疫学检测领域，本发明免疫亲和柱由空柱管和琼脂糖凝胶组成，琼脂糖凝胶上偶联了抗头孢类抗生素的单克隆抗体；以一种抗头孢类抗生素的簇特异性抗体与凝胶的偶联物作为填充物组装成免疫亲和柱。本发明制备的免疫亲和柱能够与头孢类抗生素特异性结合，其最大结合容量约为160ngDMT；采用的洗脱液为80%的甲醇-水溶液时，液质联用法平均加标回收率为99.62%；重复使用4次，回收率不低于90%。进行检测头孢类抗生素时候的样品前处理成本低廉，快速，便携，可以用于不同样品的头孢类抗生素残留检测的前处理。

免疫亲和柱样品纯化原理

