

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610164979.1

[51] Int. Cl.

G01N 30/56 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月13日

[11] 公开号 CN 1979158A

[22] 申请日 2006.12.11

[21] 申请号 200610164979.1

[71] 申请人 北京中德大地食品安全技术开发有限公司
地址 100044 北京市海淀区车公庄西路38号

[72] 发明人 熊勇华 张波 王迪 杨晓慧

杨曙明 于洪侠

[74] 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司
代理人 李浩成

权利要求书1页 说明书8页

[54] 发明名称

一种 β - 兴奋剂克仑特罗免疫亲和柱及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明公开了一种提取 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)免疫亲和柱。本发明所提供的免疫亲和柱用来提取饲料和畜产品中的违禁药物 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗), 包括 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)特异性抗体、偶联有 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)特异性抗体 Sepharose4B、装载亲和材料的塑料柱、上样缓冲液、淋洗液及洗脱液。本发明的 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)免疫亲和柱使用方便, 具有高特异性、可快速提取饲料及畜产品中残留的 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)。

1. 一种制备克仑特罗免疫亲和柱的方法，该方法包括下列步骤：
 - a) 将克仑特罗特异性抗体与溴化氰活化的 Sepharose4B 胶混合，用转鼓搅拌，偶联过夜；烧结玻璃滤器抽滤偶联胶，PBS 洗脱未结合抗体，每次 5 毫升，洗 4 次；用 1M 乙醇胺封闭未结合位点，加过量乙醇胺孵育 2.5 小时，抽滤乙醇胺，用偶联缓冲液抽洗，然后再用 HAC，Tris-HCl 缓冲液交替洗涤共 4 次，每次 5ml；
 - b) 将偶联后的胶装入亲和层析塑料柱中，装注 1ml / 柱，稍用力压紧，即得所述的克仑特罗免疫亲和柱。
2. 根据权利要求 1 所述方法制备的克仑特罗免疫亲和柱，该免疫亲和柱包括偶联有克仑特罗特异性抗体的 Sepharose4B 与装载该亲和材料的塑料柱。
3. 权利要求 2 所述的克仑特罗免疫亲和柱，其中所述的克仑特罗特异性抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。
4. 权利要求 2 或 3 所述的克仑特罗免疫亲和柱，其进一步还包括上样缓冲液、淋洗液及洗脱液。
5. 权利要求 4 所述的克仑特罗免疫亲和柱，其中所述的上样缓冲液为 PBS，所述淋洗液为 PBST，所述的洗脱液为体积比为 97:3 的甲醇/1M 乙酸混合物。
6. 权利要求 2 所述的克仑特罗免疫亲和柱的使用方法，该方法包括：
 - a) 取出 4℃ 保存的免疫亲和柱及上样缓冲液、淋洗液及洗脱液，回至室温，用上样缓冲液充分淋洗亲和柱，除去储存 Buffer 中含的蛋白和防腐剂；
 - b) 将处理好的待检样品用上样缓冲液稀释至所需体积，上样，上样液滴干后，淋洗液淋洗柱体，弃去，吸耳球吹干柱内溶液；
 - c) 用洗脱液洗脱特异性结合的克仑特罗，收集洗脱液，保存待检。
7. 权利要求 2 所述的克仑特罗免疫亲和柱在提取饲料以及动物源性产品和动物代谢物中克仑特罗残留的用途。
8. 权利要求 7 所述的用途，其中所述的动物代谢物为尿液。

一种 β -兴奋剂克仑特罗免疫亲和柱及其制备方法和用途

技术领域

本发明属于食品安全领域中违禁农兽药检测分析技术领域。具体而言，本发明涉及一种 β -兴奋剂—克仑特罗免疫亲和层析柱其制备方法及其用途。

发明背景

克仑特罗（Clenbuterol）俗名瘦肉精，属于 β 2-受体兴奋剂，曾经作为治疗哮喘的药物，目前被非法用于畜牧生产中，其不易在动物体内代谢，具有累积残留毒性，曾在国内外引起多次中毒事件。

当人食用了残留有“瘦肉精”畜产品，出现严重的中毒反应，症状表现为骨骼肌收缩增加，破坏快缩肌纤维与慢缩肌纤维之间的融合，引发肌肉震颤，四肢和肌肉尤为明显，其他中毒症状包括心动过速、心律失常、腹痛、肌肉疼痛、恶心和晕眩等，严重危害人体健康。因此我国严禁此类药物在饲料和动物饮用水中使用。但是由于利益驱使，在畜牧业生产中仍有非法使用。鉴于此，对动物性食品中“瘦肉精”残留进行严格检测是非常必要的。

但是，目前所用的确证方法对样品要求高，前处理复杂，目前其提取方法均采用化学方法，不适应快速简单的要求，限制了监测的效率。实际工作中，由于生物样本的成分复杂，而且大多数取样量很少，这对分析方法的特异性和灵敏度提出了很高的要求。因此，有必要建立一种操作快捷，且具有很高的特异性和灵敏度的方法。

免疫亲和层析技术是一种将免疫反应和层析技术相结合的分析方法，在提纯物质上是一项效率高、提纯物质纯度高、快速的技术，可以使免疫检测技术（如ELISA等）和层析技术在特异性、分离能力、速度和灵敏度方面得到互补，避免了免疫分析法直接测定样品的不足。

免疫亲和柱是上个世纪90年代在分析领域中得到应用的技术，但用免疫亲和柱提取样品中的克仑特罗尚未见报道。因此，本发明人通过大量试验，研制成功了一种具有高特异性和灵敏度且操作快捷的克仑特罗免疫亲和柱。

发明内容

本发明目的是提供一种快速提取 β 2-兴奋剂—克仑特罗的免疫亲和柱及其制备方法和用途。

本发明的原理是根据抗原抗体的特异性反应和可解离的特性，用 β 2-受体兴奋剂—克仑特罗抗体提取食品中的 β 2-受体兴奋剂克仑特罗残留。

一方面，本发明提供了一种制备克仑特罗免疫亲和柱的方法，该方法包括下列步骤：

- a) 将克仑特罗特异性抗体与溴化氰活化的 Sepharose4B 胶混合，转鼓搅拌，偶联过夜；

烧结玻璃滤器抽滤偶联胶，PBS 洗脱未结合抗体，每次 5 毫升，洗 4 次；用 1M 乙醇胺封闭未结合位点，加过量乙醇胺孵育 2.5 小时，抽滤乙醇胺，用偶联缓冲液抽洗，然后再用 HAC，Tris-Hcl 缓冲液交替洗涤共 4 次，每次 5ml；

b) 将偶联后的胶装入亲和层析塑料柱中，装注 1ml / 柱，稍用力压紧，即得所述的克仑特罗免疫亲和柱。

在本发明的一个优选实施方案中，所述的克仑特罗免疫亲和柱的制备方法具体操作为：

取 Sepherose 4B (100—120 目) 湿重 4g (6ml)，用 0.1M pH9.5 Na₂CO₃ 溶液浸泡 4 小时。通风厨中称取溴化氰 0.8g 溶于 1.2ml Na₂CO₃ (2g 溶液 3ml 缓冲液)，电磁搅拌 10 分钟。冰浴电磁搅拌下，将溴化氰溶液加入 Sepherose4B 中，2 分钟内完成，滴加 2N NaOH，使 pH 值保持在 11，冰浴反应 10 分钟。

将反应后的 Sepherose4B 倒入布氏漏斗中，用预冷的 Na₂CO₃ 溶液 4-10℃洗 2-3 分钟内完成，抽洗 25 倍体积的液体准备交联蛋白。

4℃下，将实施例 1 制备的抗体（多克隆抗体或单克隆抗体）溶液与溴化氰活化的 Sepherose4B 胶混合，转鼓搅拌，偶联反应过夜。

烧结玻璃滤器抽滤偶联胶，PBS 洗脱未结合抗体，每次 5 毫升，洗 4 次。分别测定抗体含量。

用 1M 乙醇胺 (ethanolamine) 封闭未结合位点，加过量乙醇胺孵育 2.5 小时。抽滤乙醇胺，用偶联缓冲液抽洗。然后再用交替的 HAC，Tris-Hcl 缓冲液洗 4 次，每次 5ml。

最后，将偶联后的胶装入亲和层析塑料柱中，装注 1ml / 柱，稍用力压紧，即得到本发明所述的克仑特罗免疫亲和柱。

另一方面，本发明提供了一种克仑特罗免疫亲和柱，该免疫亲和柱包括偶联有克仑特罗特异性抗体的 Sepharose4B 与装载该亲和材料的塑料柱。

其中所述的克仑特罗特异性抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。本发明所述的克仑特罗特异性抗体通过下述方法制备：1) 按小分子半抗原的偶联方法制备克仑特罗与载体蛋白偶联物；以及，2) 用该偶联物作为免疫原免疫动物（例如，兔），分离血清，纯化得到多克隆抗体；或者 3) 免疫小鼠，通过杂交瘤技术获得单克隆抗体；4) 用不同载体蛋白的偶联物为包被原用于检测抗体质量。

其中所述的载体蛋白包括但不限于，例如牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白、卵清蛋白和钥孔铜兰蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH)。所述的克仑特罗与载体蛋白的偶联

物采用重氮化法、戊二醛法、活性酯法或多元酸酐法与混合酸酐法联合方法偶联。

本发明所述免疫亲和柱的保存条件为：0.01%硫柳汞钠的磷酸盐缓冲液（PBS，0.01mol/L，pH7.4），4℃保存。

另外，为方便现场应用，本发明所述免疫亲和柱还可以进一步包括上样缓冲液、淋洗液及洗脱液。

在本发明的一个优选实施方案中，所述的上样缓冲液为 PBS（0.02MPB-0.05MNaCl，PH7.2），所述的淋洗液为 PBST（0.02MPB-0.05MNaCl-0.2%Tween20，PH7.2）；所述的亲和柱洗脱液为甲醇/1M 乙酸(V/V 为 97/3)。

另一方面，本发明提供了一种克仑特罗免疫亲和柱的使用方法，该方法包括：

- a) 取出 4℃保存的免疫亲和柱及上样缓冲液、淋洗液及洗脱液，回至室温，用上样缓冲液充分淋洗亲和柱，除去储存 Buffer 中含的蛋白和防腐剂；
- b) 将处理好的待检样品用上样缓冲液稀释至所需体积，上样，上样液滴干后，淋洗液淋洗柱体，弃去，吸耳球吹干柱内溶液；
- c) 用洗脱液洗脱特异性结合的克仑特罗，收集洗脱液，保存待检。

本发明使用饲料、猪肉及生猪尿液进行了回收率实验，结果表明克仑特罗免疫亲和柱的回收率在 80%—110%之间，回收率达到了分析方法的回收率要求。

因此，另一方面，本发明提供了所述克仑特罗免疫亲和柱在提取饲料以及动物源性产品和动物代谢物中克仑特罗残留的用途。

一个具体实施方案中，所述的动物源性产品为猪肉。

另一个具体实施方案中，所述的动物代谢物为猪尿。

提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明，而决不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

实施例

实施例 1 抗克仑特罗多克隆抗体的制备

1.1 抗克仑特罗多克隆抗体的制备

参考现有技术中偶联物合成方法（Itaru Yamamoto, Kohji Iwata Enzyme immunoassay for

clenbuterol, an β 2-adrenergic stimulant *Journal of Immunoassay*, 3(2), 155-171 (1982)), 合成克仑特罗-载体蛋白偶联物。具体操作如下, 称取盐酸克仑特罗 31.3 mg (约 0.1 mmol), 溶解于 4 ml 去离子水中, 用 1 M 盐酸调 pH 值至 1.5-2, 4°C 黑暗条件下逐滴加入 0.1 M 的 NaNO_2 , 不停搅拌反应 30 分钟, 用 KI 淀粉试纸检验, 直至试纸变灰蓝色后停止反应, 用氨基磺酸铵除去多余的 NaNO_2 , 得到重氮化的克仑特罗。

取适量重氮化的盐酸克仑特罗溶液逐滴加入到 10 ml、0.1 M pH 7.5 冰冷载体蛋白 PB 溶液中, 半小时内加完, 反应过程中用 1 M 的氢氧化钠溶液使 pH 保持 7.5, 反应后 4°C 放置过夜。载体用量: BSA: 100 mg, KLH: 50g。偶联物过 SephadexG-25M 层析柱提纯。用紫外吸收法测定载体浓度作为偶联物浓度。提纯的偶联物加等量甘油 -20°C 保存。

选择健康、无病、雄性、体重 1.5 kg 纯种新西兰白兔 5 只。首免用注射器对抽法将弗氏完全佐剂与免疫原按 1:1 混合成油包水的乳浊液, 每只兔 0.25 mg 免疫原, 背部皮下多点注射, 注射剂量多点平均分配。每隔两周加强免疫一次, 用弗氏不完全佐剂, 剂量、方法同首免。从第三次免疫开始, 免疫后 10 天, 耳缘静脉取血 1 ml, 室温凝固 2 h 后 4°C 过夜, 8000 r/min 分离血清, 用以检测抗体效价。效价不再升高时, 不加佐剂末次免疫 (第八次) 后 7 天, 颈动脉放血, 分离出抗全血清, 用 40% 的饱和硫酸铵溶液沉淀, 得粗多克隆抗体, 然后用 DE-52 离子交换层析分离除去其他血清蛋白, 得纯多克隆抗体。

通过间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 测定, 结果表明本发明制备的多克隆抗体具有很高的效价和良好的特异性。

1.2 抗克仑特罗单克隆抗体的制备

1.2.1 克仑特罗的重氮化

在一试管中, 取盐酸克仑特罗溶于去离子水中, 以 1 M 盐酸将 pH 调至 1.5, 在黑暗 4°C 条件下缓慢滴加亚硝酸钠的去离子水并时时搅拌。反应混合物放置 30 分钟。

1.2.2 重氮化的克仑特罗与 HAS 的偶联

将上述溶液中缓缓加入到 BSA 的 0.1 mol / L PB (pH 7.5) 中, 反应过程中用 1 M 的氢氧化钠溶液使 pH 保持 7.5, 反应后 4°C 放置过夜。

SephadexG-25M 凝胶进一步层析柱去除小分子

1.2.3 免疫动物及细胞融合

对 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠 (体重 18~22g), 首次免疫用 100 μg CL-BSA 与等量福氏完全佐剂混匀, 腹腔注射。3 周后第一批用 10 μg CL-BSA 脾内注射, 3 天后取脾融合。第二批再用 100 μg CL-BSA 与等量福氏不完全佐剂混匀后, 腹腔注射追加免疫, 3 周后用 10 μg CL-BSA 脾内注射, 3 天后按常规方法取脾融合。当镜检杂交瘤克隆生长达 1/3~1/2 视野时, 取上清液进行筛选。

1.2.4 杂交瘤筛选及抗体检测 以 CL-BSA 为包被抗原, 用间接非竞争性 ELISA 法筛选分泌抗 CL 抗体的细胞孔, 用间接竞争抑制性 ELISA 法确证。以免疫小鼠的血清为阳性对照, 以 Sp2/0 细胞培养的上清液为阴性对照, 阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$ 。

1.2.5 杂交瘤细胞的克隆化 采用培养瓶内准确计数稀释法, 将阳性克隆细胞吹匀, 取一微滴至培养瓶内, 倒置显微镜下准确计数细胞个数, 稀释为 70 个/ml, 再取 1ml 稀释 20 倍, 接种入 96 孔培养板中进行亚克隆。直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止。

1.2.6 单克隆抗体的生产 采用动物体内诱生单克隆抗体的方法。吹打培养的杂交瘤细胞, 1000r/min 离心 10min, 弃上清, 用生理盐水将杂交瘤细胞悬浮混匀, 并将细胞数调至 2×10^6 /ml, 每只 Balb/c 小鼠腹腔注射 0.5ml 杂交瘤细胞, 并同时于对侧腹腔注射 0.5ml 降植烷和不完全福氏佐剂混合物(1:1 混合), 14 天后收集腹水。

1.2.7 单克隆抗体的纯化 采用硫酸铵沉淀法对腹水进行纯化或用离子交换法提纯。

实施例 2 用 Sepherose 4B 作基质的克仑特罗免疫亲和柱制备

本实施例是用 Sepherose 4B 作基质的克仑特罗免疫亲和柱的制备

取 Sepherose 4B (100—120 目) 湿重 4g (6ml), 用 0.1M pH9.5 Na_2CO_3 溶液浸泡 4 小时。通风厨中称取溴化氰 0.8g 溶于 1.2ml Na_2CO_3 (2g 溶液 3ml 缓冲液), 电磁搅拌 10 分钟。冰浴电磁搅拌下, 将溴化氰溶液加入 Sepherose4B 中, 2 分钟内完成, 滴加 2N NaOH, 使 pH 值保持在 11, 冰浴反应 10 分钟。

将反应后的 Sepherose4B 倒入布氏漏斗中, 用预冷的 Na_2CO_3 溶液 4-10℃ 洗 2-3 分钟内完成, 抽洗 25 倍体积的液体准备交联蛋白。

4℃ 下, 将实施例 1 制备的抗体 (多克隆抗体或单克隆抗体) 溶液与溴化氰活化的 Sepherose4B 胶混合, 转鼓搅拌, 偶联反应过夜。

烧结玻璃滤器抽滤偶联胶, PBS 洗脱未结合抗体, 每次 5 毫升, 洗 4 次。分别测定抗体含量。

用 1M 乙醇胺 (ethanolamine) 封闭未结合位点, 加过量乙醇胺孵育 2.5 小时。抽滤乙醇胺, 用偶联缓冲液抽洗。然后再用交替的 HAC, Tris-Hcl 缓冲液洗 4 次, 每次 5ml。

最后, 将偶联后的胶装入亲和层析塑料柱中, 装柱, 1ml / 柱, 稍用力压紧, 即得所述的克仑特罗免疫亲和柱。

保存条件: 0.01% 硫柳汞钠的磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01mol/L, pH7.4), 4℃ 保存。

实施例 3 用葡聚糖作基质的克仑特罗免疫亲和柱的制备

本实施例是用葡聚糖作基质的克仑特罗免疫亲和柱的制备

取葡聚糖（100—120 目）湿重 4g（6ml），用 0.1M pH9.5 Na₂CO₃ 溶液浸泡 4 小时。通风厨中称取过碘酸钠 0.8g 溶于 1.2ml Na₂CO₃ (2g 溶液 3ml 缓冲液)，电磁搅拌 10 分钟。冰浴电磁搅拌下，将过碘酸钠溶液加入葡聚糖中，2 分钟内完成，滴加 2N NaOH，使 pH 值保持在 11，冰浴反应 10 分钟。

将反应后的葡聚糖倒入布氏漏斗中，用预冷的 Na₂CO₃ 溶液 4-10℃洗 2-3 分钟内完成，抽洗 25 倍体积的液体准备交联蛋白。

4℃下，将实施例 1 制备的抗体（多克隆抗体或单克隆抗体）溶液与过碘酸钠活化的葡聚糖胶混合，转鼓搅拌，偶联反应过夜。

烧结玻璃滤器抽滤偶联胶，PBS 洗脱未结合抗体，每次 5 毫升，洗 4 次。分别测定抗体含量。

用 1M 乙醇胺（ethanolamine）封闭未结合位点，加过量乙醇胺孵育 2.5 小时。抽滤乙醇胺，用偶联缓冲液抽洗。然后再用交替的 HAC，Tris-Hcl 缓冲液洗 4 次，每次 5ml。

最后，将偶联后的胶装入亲和层析塑料柱中，装柱，1ml / 柱，稍用力压紧，即得所述的克仑特罗免疫亲和柱。

保存条件：0.01% 硫柳汞钠的磷酸盐缓冲液（PBS，0.01mol/L, pH7.4），4℃保存。

实施例 4

用实施例 2 或 3 所述方法制备的克仑特罗免疫亲和柱提取饲料中克仑特罗残留。

取空白（事先经检测确定为克仑特罗阴性）饲料 6 份，每份 5g；取 3 份，每份加入克仑特罗，使其添加浓度为 20mg/kg，另外 3 份作为空白对照。

将上述饲料样本用 80% 甲醇抽提，取一定量的抽提液氮气吹干后用上样缓冲液溶解，准备上亲和柱。

将从 4℃ 冰箱中取出的免疫亲和柱及所有试剂室温放置 1 小时，用上样缓冲液充分淋洗亲和柱 5ml×6 次，除去储存 Buffer 中含的蛋白和防腐剂。

将待检饲料的空白和添加样品各 5ml，循环上样 5 次，（接取上样流出液再次上此亲和柱）。上样液滴干后，用淋洗液淋洗 5 次，每次 1ml，吸耳球吹干柱内溶液。

先加 1ml 洗脱液浸泡亲和柱 10 分钟，然后用吸耳球吹干柱内溶液；再加 1ml 洗脱液浸泡 3 分钟，最后用 2 ml 洗脱液分 4 次洗脱，即每次 0.5ml。整个洗脱过程共用洗脱液 4ml。

GC/MS (NY/XQ421-2003) 标准方法检测克仑特罗洗脱液含量。

测定饲料添加样品的克仑特罗含量为 90—110ng 之间, 因为此亲和柱的柱容量为 110ng, 结果表明该亲和柱满足提取要求。

实施例 5

取阴性 (事先经检测确定为克仑特罗阴性) 猪肉 12 份, 每 5 份 5g; 先将猪肉匀浆后, 取 9 份, 分 3 组, 每组添加克仑特罗浓度分别为 50ug/kg、80ug/kg、100ug/kg 作为阳性样品, 另外 3 份作为阴性对照。

将上述猪肉样本用 10ml80% 甲醇溶解, 离心取上清, 氮气吹干后用上样缓冲液溶解, 准备上亲和柱。

将从 4℃ 冰箱中取出的免疫亲和柱及所有试剂室温放置 1 小时, 用上样缓冲液充分淋洗亲和柱 5ml×6 次, 除去储存 Buffer 中含的蛋白和防腐剂。

将待检阴性猪肉提取液和添加样品提取液各 5ml, 循环上样 5 次, (接取上样流出液再次上此亲和柱)。上样液滴干后, 用淋洗液淋洗 5 次, 每次 1ml, 吸耳球吹干柱内溶液。

先加 1ml 洗脱液浸泡亲和柱 10 分钟, 然后用吸耳球吹干柱内溶液; 再加 1ml 洗脱液浸泡 3 分钟, 最后用 2 ml 洗脱液分 4 次洗脱, 即每次 0.5ml。整个洗脱过程共用洗脱液 4ml。

GC/MS (NY/XQ421-2003) 标准方法检测克仑特罗洗脱液含量。

测定猪肉添加样品的平均回收率为 90—110% 之间, 表明该方法满足分析方法要求。

实施例 6

用实施例 2 或 3 所述方法制备的克仑特罗免疫亲和柱提取生猪尿样中克仑特罗免疫残留。

将已知空白 (事先经检测确定为克仑特罗阴性) 尿样 12 份, 每 5 份 10ml, 取其中 9 份, 分 3 组, 每组添加克仑特罗浓度分别为 1ug/kg、5ug/kg、10ug/kg 作为阳性样品, 另外 3 份作为阴性对照。将上述样品 4000rpm 离心 20 分钟, 每个样品取 3ml 上清, 用 1M NaOH 调 pH 致 7.1~7.3 备用。用上样缓冲液将上述处理后的尿样稀释 10 倍, 从中各取 5ml, 准备过柱。

将从 4℃ 冰箱中取出的免疫亲和柱及所有试剂室温放置 1 小时, 用上样缓冲液充分淋洗亲和柱 5ml×6 次, 除去储存 Buffer 中含的蛋白和防腐剂。

将处理好的尿样各 5ml, 循环上样 5 次, (接取上样流出液再次上此亲和柱)。上样液滴干后, 淋洗液洗 5 次, 每次 1ml, 吸耳球吹干柱内溶液。

先加 1ml 洗脱液浸泡亲和柱 10 分钟, 然后用吸耳球吹干柱内溶液; 再加 1ml 洗脱液浸泡

3 分钟，最后用 2 ml 洗脱液分 4 次洗脱，即每次 0.5ml。整个洗脱过程共用洗脱液 4ml。

GC/MS (NY/XQ421-2003) 标准方法检测克仑特罗洗脱液含量。

测定阳性添加尿样的平均回收率为克仑特罗 80—110%之间，表明该方法满足分析方法要求。

专利名称(译)	一种 β - 兴奋剂克仑特罗免疫亲和柱及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN1979158A	公开(公告)日	2007-06-13
申请号	CN200610164979.1	申请日	2006-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	北京中德大地食品安全技术开发有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京中德大地食品安全技术开发有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京中德大地食品安全技术开发有限责任公司		
[标]发明人	熊勇华 张波 王迪 杨晓慧 杨曙明 于洪侠		
发明人	熊勇华 张波 王迪 杨晓慧 杨曙明 于洪侠		
IPC分类号	G01N30/56 G01N33/53 G01N33/558		
代理人(译)	李浩成		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种提取 β 2-兴奋剂(克仑特罗)免疫亲和柱。本发明所提供的免疫亲和柱用来提取饲料和畜产品中的违禁药物 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗), 包括 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)特异性抗体、偶联有 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)特异性抗体Sepharose4B、装载亲和材料的塑料柱、上样缓冲液、淋洗液及洗脱液。本发明的 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)免疫亲和柱使用方便, 具有高特异性、可快速提取饲料及畜产品中残留的 β 2 - 兴奋剂(克仑特罗)。