



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101059512 B

(45) 授权公告日 2012. 02. 15

(21) 申请号 200710099885. 5

C12N 5/12(2006. 01)

(22) 申请日 2007. 05. 31

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 2065 2007. 05. 28

CN 1766631 A, 2006. 05. 03, 说明书全文.

CN 1547016 A, 2004. 11. 17, 说明书全文.

沈红 等. 磺胺甲恶唑单克隆抗体的研

制. 《中国兽医杂志》. 2006, 第 42 卷 (第 3 期), 第 12-14 页.

(73) 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号
院 10 号房

专利权人 北京望尔康泰生物技术有限公司

审查员 唐华东

(72) 发明人 沈建忠 曹兴元 何方洋 李柄玉

丁双阳 万宇平 江海洋 冯才伟

史为民 孙倩

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 30/60(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种免疫亲和色谱柱及其在净化磺胺类药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了一种免疫亲和色谱柱, 该色谱柱由磺胺类药物单克隆抗体与固相载体偶联后装柱获得, 其能够至少能够净化 6 种磺胺类药物, 包括磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑; 本发明还提供了一种产生磺胺类药物单克隆抗体的杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065。本发明的色谱柱能够高效检测上述 6 种磺胺类药物的含量, 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. 一种单克隆抗体,其由杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 生产获得。
2. 一种杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065。
3. 一种免疫亲和吸附剂,其由权利要求 1 所述的单克隆抗体与固相载体偶联获得。
4. 如权利要求 3 所述的免疫亲和吸附剂,其特征在于,所述的固相载体为: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。
5. 权利要求 4 所述的免疫亲和吸附剂,其特征在于所述的固相载体为 Sepharose 4B。
6. 含有权利要求 3~5 之任一项所述吸附剂的试剂盒。
7. 含有权利要求 3~5 之任一项所述免疫亲和吸附剂的免疫亲和色谱柱。
8. 含有权利要求 7 所述免疫亲和色谱柱的试剂盒。
9. 权利要求 8 所述试剂盒在纯化磺胺类药物中的应用。

一种免疫亲和色谱柱及其在净化磺胺类药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,具体地说是一种用于净化磺胺类药物免疫亲和色谱柱。

[0002] 背景资料

[0003] 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。

[0004] 磺胺药具有抗菌谱广,性质稳定,使用方便,体内分布广泛等优点。对许多革兰氏阳性菌和一些革兰氏阴性菌都有抑制作用,甚至对衣原体属和某些原虫都有效,为广谱抑制剂。对磺胺药高度敏感的病原菌有:革兰氏阳性菌的链球菌、肺炎球菌;革兰氏阴性菌的沙门氏菌、大肠杆菌和脑膜炎球菌;中度敏感菌有革兰氏阳性菌的葡萄球菌,产气荚膜杆菌及革兰氏阴性菌的巴氏杆菌、变形杆菌及痢疾杆菌;放线菌及弓形虫也很敏感。为临床治疗细菌感染广泛应用的重要药物。缺点是抗菌作用弱,抑菌,无杀菌,不良反应多,易耐药,用量大,疗程长。

[0005] 磺胺类药物属化学合成抗菌药物。其抗菌谱广,毒性小、口服收、生产量大,价格低廉,供应充足,抑菌效果强,广泛应用于畜牧业。但由于不合理使用甚至滥用兽药,造成磺胺类药物于动物性食品中残留现象较为严重,极大地影响了人们的健康,也影响我国畜产品的正常出口贸易,发展兽药残留监控和检测技术,有利于保障人民健康,促进畜牧业的可持续发展和正常的畜禽产品的国际贸易。

[0006] 近几十年来,各学者针对食品和饲料中SAs的残留分析进行了深入全面的研究。其化学检测方法包括薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)、气谱-质谱联机(GC/MS)、高压液相色谱法(HPLC)、高压液相色谱-质谱联机(HPLC/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。免疫亲和技术是90年代在分析领域得到应用的新技术,但用免疫亲和柱同时净化基质中的6种磺胺类药物未见报道,更无商品化的IAC柱出售。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种净化磺胺类药物免疫亲和色谱柱。

[0008] 本发明的免疫亲和色谱柱是以免疫亲和吸附剂为填料装柱而成;所述免疫亲和吸附剂是由固相载体和与其偶联的磺胺类药物单克隆抗体组成;所述磺胺类药物单克隆抗体是以磺胺甲噁唑合成半抗原,再将半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的。

[0009] 本发明的另一个目的是提供一种产生上述单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0010] 磺胺甲噁唑是磺胺类药物特征基团最不突出的磺胺类药物,将磺胺甲噁唑用马来酸酐酰化,得到具有磺胺类药物结构特征的磺胺类药物半抗原,与大分子载体蛋白偶联后得到具有免疫源性的抗原。本发明是以磺胺甲噁唑合成磺胺类药物半抗原,再将半抗原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,磺胺类药物半抗原与卵清蛋白(OVA)、牛血清蛋白(BSA)的结合摩尔比分别为 31.6:1 和 23:1。

[0011] 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 Sepharose4B。

[0012] 所述磺胺类药物单克隆抗体优选为对 6 种磺胺类药物磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 分泌得到。

[0013] 所述对 6 种磺胺类药物磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 已于 2007 年 5 月 28 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)。

[0014] 所述载体蛋白可为牛血清白蛋白或卵清蛋白等常用载体蛋白。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 所述试剂盒中还包括洗脱液,所述洗脱液可为甲醇-磷酸盐缓冲液(9:1,V:V)。磷酸盐缓冲液,即 1L 中含有 0.2gKH₂PO₄,0.2g KCl,2.9gNa₂HPO₄·12H₂O,8.8gNaCl 的溶液。所述试剂盒中还包括洗涤液和保存液;所述保存液可为 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液,所述 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液可为 1L 中含有 0.2g KH₂PO₄,0.2g KCl,2.9g Na₂HPO₄·12H₂O,8.8g NaCl,0.02g NaN₃ 的溶液;所述洗涤液可为磷酸盐缓冲液,即 1L 中含有 0.2gKH₂PO₄,0.2g KCl,2.9gNa₂HPO₄·12H₂O,8.8gNaCl 的溶液。

[0018] 该免疫亲和吸附剂以及含有该免疫亲和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、肺、肾、血浆等)中净化 6 种磺胺类药物,便于残留分析。在该免疫亲和吸附剂中,单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose4B 的偶联率是 89.1%。

[0019] 偶联有磺胺类药物单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑的动态柱容量分别为 1048、1117、1235、1400、1391、1328ng/mL,绝对柱容量分别为 225、240、265、301、299、285ng/mg,使用了 15 次后柱容量为总柱容量的 35%左右,保存期为 1 年。

[0020] 本发明所提供的提纯 6 种磺胺类药物的方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 样品的前处理:

[0022] 取动物组织样品匀浆物 2.0±0.01g,于 50ml 塑料离心管中,每个样本按 10ng/g 浓度分别添加标准品,静置 15min 后,加入提取液 8mL,涡动 3min,3500rpm 离心 10min,取上清液,重复提取一次,合并上清液,涡动混匀。

[0023] 2) 取 4mL,与 20mL 的磷酸盐缓冲液混合,过上述免疫亲和色谱柱,然后先后用 20mL 洗涤液、15mL 水,然后用 4mL 洗脱液洗脱,收集洗脱液,得到纯化的磺胺类药物溶液。

[0024] 本发明的免疫亲和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、肝和血浆中微量磺胺类药物类药物的前处理,分析质量得到改善。免疫亲和吸附剂的高选择性使得磺胺类药物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磺胺类药物的含量,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。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0026] 实施例 1

[0027] 1. 磺胺类药物单克隆抗体的制备

[0028] 动物免疫:采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物,以磺胺类药物半抗原与蛋白质载体的偶联物为免疫原,免疫剂量为 $50 \mu\text{g}/\text{只}$ (体积为 0.1ml) 加等体积的完全弗氏佐剂乳化,进行首次免疫。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,测定抗体效价和交叉反应后,取脾细胞。

[0029] 细胞融合:脾细胞按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合。

[0030] 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磺胺类药物单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065,磺胺类药物单克隆杂交瘤细胞株对磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑都具有交叉反应。对磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 已于 2007 年 5 月 28 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)。

[0031] 单克隆抗体大量生长及提纯:采用体内诱生法,将 BALB/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油,7-14 天后腹腔注射单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4A-4-2CGMCC No. 2065, 5×10^5 - 10^6 个/只,7-10 天后采集腹水。

[0032] 单克隆抗体的保存:在液氮 -20°C 下保存,使用时 37°C 水浴快速解冻。

[0033] 3、IgG 的纯化:

[0034] 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,首先用饱和硫酸铵法将 IgG 进行粗提和浓缩,再用 DEAE52 纤维素阴离子交换法将 IgG 进一步纯化。其具体步骤如下:

[0035] 粗提:取 3mL 单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 腹水与 3mL PBS(0.01M , $\text{pH}7.0$),混匀,吸取饱和硫酸铵溶液 6mL,边缓慢滴加边搅拌加入血清或腹水溶液中,使硫酸铵溶液的饱和度达到 50%。 4°C 放置 60min 后,3000g 离心 15min。将所得沉淀再溶于 3mL PBS(0.01M , $\text{pH}7.0$) 中,缓慢滴加饱和硫酸铵溶液 1.6mL,使硫酸铵溶液饱和度达 35%。 4°C 放置 20min 后,以 3000g 离心 15min。沉淀再用上述方法在饱和度为 35%的硫酸铵溶液

中沉淀一次。

[0036] 脱盐:将沉淀溶于(0.0175M, pH6.7)PBS中,装入透析袋,并将透析袋置于1000mL的PBS(0.0175M, pH6.7)溶液中于4℃下搅拌透析24小时,在此过程中置换缓冲液3次,得到粗提的IgG溶液。

[0037] 纯化:称取2g DE-52(DEAE-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/LNaOH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/LNaOH溶液处理一次,充分水洗至中性,然后将处理的DEAE-52装入层析柱中(2.0×20cm),于0.0175M, pH6.7的PBS中平衡。将盐析所得粗提的IgG溶液滴入层析柱,待全部样本进入柱后,关闭柱下口,并在柱上覆盖3-5cm0.0175M, pH6.7的PBS洗脱,连接洗脱瓶,控制流速为1.0mL/min,用紫外检测器收集蛋白组分。将含有抗体蛋白的洗脱液用50%的饱和硫酸铵进行沉淀,所得沉淀脱盐后,得到对磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑都具有交叉反应的磺胺类药物单克隆杂交瘤细胞株A-1-4CGMCC No.1607分泌的单克隆抗体。将抗体分装并于-20℃保存。

[0038] 4、免疫色谱柱(IAC)的制备

[0039] 基质的准备:取1g溴化氰活化的Sepharose4B干冻粉,在盛有1.0mmol/L HCl的G3漏斗中膨胀。

[0040] 偶联反应:将凝胶用0.1mol/L NaHCO₃溶液平衡后,与20mg的上述纯化抗体(溶于5mL0.1mol/L NaHCO₃溶液)混合,在4℃搅拌20h。

[0041] 反应液转入G3漏斗中,用100mL0.01mol/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)洗涤,收集洗涤液,紫外鉴定,计算偶联率。偶联率计算公式为:

[0042]

$$\text{偶联率}(\%) = \frac{\text{偶联前IgG总量} - \text{未偶联IgG量}}{\text{偶联前IgG总量}} \times 100\%$$

[0043] 偶联率的检测结果表明,单克隆杂交瘤细胞株A-4-2CGMCCNo.2065分泌的单克隆抗体与溴化氰活化的Sepharose4B的偶联率是89.1%。

[0044] 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。

[0045] 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、pH8.0Tris-HCl缓冲液交替冲洗3次。用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)平衡后,抽干的凝胶转入0.01mol/L、pH7.4的含0.1%NaN₃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,NaN₃1g)中,4℃下存放备用。

[0046] 装柱:将偶联有对6种磺胺类药物都具有交叉反应的磺胺类药物单克隆杂交瘤细胞株A-4-2CGMCC No.2065分泌的单克隆抗体的免疫吸附剂转入到含G3滤板的玻璃柱里,制成偶联有对6种磺胺类药物都具有交叉反应的磺胺类药物单克隆杂交瘤细胞株A-4-2CGMCCNo.2065分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱(IAC柱)。

[0047] 5、IAC 柱容量的确定

[0048] 将步骤 4 制备的偶联有对 6 种磺胺类药物都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱,用保存液洗柱,平衡。轻轻上下晃动 IAC 柱,赶走柱里的气泡。将 10mL 含有 6 种磺胺类药物各 300ng/ml 的混合标准品的混合标准品的保存液连续加到免疫亲和色谱柱上,自然重力下流出。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 20mL 洗涤液,15mL 水洗涤免疫亲和色谱柱,除去干扰杂质。最后用 4ml 洗脱液将 6 种磺胺类药物洗脱,自然重力下流出,收集,吹干,进行 HPLC 测定。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。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。结果表明偶联有对 6 种磺胺类药物都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-4CGMCC No. 1607 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 1048ng/mL,225ng/mg IgG(磺胺嘧啶);1117ng/mL,240ng/mg IgG(磺胺噻唑);1235ng/mL,265ng/mg IgG(磺胺吡啶);1400ng/mL,301ng/mg IgG(磺胺甲噻二唑);1391ng/mL,299ng/mg IgG(磺胺间甲氧嘧啶);1328ng/mL,285ng/mg IgG(磺胺甲噁唑)。

[0049] 实施例 2 含有偶联有单克隆抗体的免疫色谱柱的试剂盒的制备及其对磺胺类药物的提纯净化效果

[0050] 1、含有免疫色谱柱的试剂盒的制备

[0051] 该试剂盒主要由盒体,免疫色谱柱(IAC 柱),6 种磺胺类药物标准溶液,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 6 种磺胺类药物标准溶液,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 制备的偶联有对 6 种磺胺类药物都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱。

[0052] 洗脱液为甲醇-磷酸盐缓冲液(9:1, v:v)。

[0053] 保存液为 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液,即 1L 中含有 0.2gKH₂PO₄,0.2g KCl,2.9gNa₂HPO₄·12H₂O,8.8gNaCl,0.02g NaN₃ 的溶液;

[0054] 洗涤液为磷酸盐缓冲液,即 1L 中含有 0.2gKH₂PO₄,0.2g KCl,2.9gNa₂HPO₄·12H₂O,8.8gNaCl。;

[0055] 将含有偶联有对 6 种磺胺类药物都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱的试剂盒放在 4℃。

[0056] 2、磺胺类药物提纯净化效果实验

[0057] IAC 提取原理是,将对 6 种磺胺类药物都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 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 6 种磺胺类药物标准溶液的混物流过 IAC 柱时,固定抗体选择性地结合 6 种磺胺类药物,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,6 种磺胺类药物得到净化。IAC 柱经再生处理后可重复使用。

[0058] 检测样品的处理:分别取动物组织样品匀浆物 2.0±0.01g,于 50ml 塑料离心管中,每个样本按 10ng/g 浓度分别添加标准品,静置 15min 后,加入提取液 8mL,涡动 3min,3500rpm 离心 10min,取上清液,重复提取一次,合并上清液,涡动混匀,取 4mL,与 20mL 的磷

酸盐缓冲液混合,作为样品溶液。

[0059] 分别将偶联有对 6 种磺胺类药物具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-2CGMCC No. 2065 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱平衡到室温,然后将上述的样品溶液过柱,自然重力下流出,先后用 20mL 洗涤液,15mL 水,最后用 4mL 洗脱液洗脱,收集洗脱液,氮气吹干。用磷酸盐缓冲液定容至 1mL,过 0.45 μ m 针筒滤膜,进 HPLC 分析(色谱条件:C18 反相色谱柱, Symmetry C18 (4.6mm \times 250mm, 粒径 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液;流速为 1mL/min;进样量为 100 μ L;紫外检测器:检测波长 278nm)。IAC 柱用 20ml 的保存液平衡保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱里备用。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,说明本发明制备的 IAC 非特异性吸附极小。

专利名称(译)	一种免疫亲和色谱柱及其在净化磺胺类药物中的应用		
公开(公告)号	CN101059512B	公开(公告)日	2012-02-15
申请号	CN200710099885.5	申请日	2007-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司 北京望尔康泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司 北京望尔康泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司 北京望尔康泰生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 曹兴元 何方洋 李柄玉 丁双阳 万宇平 江海洋 冯才伟 史为民 孙倩		
发明人	沈建忠 曹兴元 何方洋 李柄玉 丁双阳 万宇平 江海洋 冯才伟 史为民 孙倩		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N30/60 C12N5/12		
代理人(译)	王朋飞		
审查员(译)	唐华东		
其他公开文献	CN101059512A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种免疫亲和色谱柱，该色谱柱由磺胺类药物单克隆抗体与固相载体偶联后装柱获得，其能够至少能够净化6种磺胺类药物，包括磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑；本发明还提供了一种产生磺胺类药物单克隆抗体的杂交瘤细胞株A-4-2CGMCC No.2065。本发明的色谱柱能够高效检测上述6种磺胺类药物的含量，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。

$$\text{偶联率}(\%) = \frac{\text{偶联前IgG总量} - \text{未偶联IgG量}}{\text{偶联前IgG总量}} \times 100\%$$