

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610007225.5

[51] Int. Cl.
C07C 231/24 (2006.01)
C07C 233/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/559 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年9月19日

[11] 授权公告号 CN 100338030C

[22] 申请日 2006.2.14

[21] 申请号 200610007225.5

[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

[72] 发明人 沈建忠 张素霞 史为民 周金慧
何方洋 吴聪明

[56] 参考文献

US2005277161A1 2005.12.15

WO2005007695 A2 2005.1.27

审查员 张 靖

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

[54] 发明名称

一种净化氯霉素的方法及其专用免疫亲和色谱柱

[57] 摘要

本发明公开了一种净化氯霉素的方法及其专用免疫亲和色谱柱。该色谱柱的填料为净化氯霉素的免疫亲和吸附剂，该免疫亲和吸附剂是由固相载体和与其偶联的氯霉素多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述氯霉素多克隆抗体或氯霉素单克隆抗体是以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述氯霉素半抗原是将氯霉素琥珀酸酯溶于蒸馏水中，再加入吗啉代碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺混合后，得到氯霉素的琥珀酸衍生物即为氯霉素半抗原。本发明的净化方法结合色谱法高效检测氯霉素的含量，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. 一种净化氯霉素的免疫亲和吸附剂，是由固相载体和与其偶联的氯霉素多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述固相载体为纤维素、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；所述氯霉素多克隆抗体或氯霉素单克隆抗体是以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述氯霉素半抗原是将氯霉素琥珀酸酯溶于蒸馏水中，再加入吗啉代碳化二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺混合，室温搅拌后得到氯霉素的琥珀酸衍生物即为氯霉素半抗原。

2. 根据权利要求1所述的吸附剂，其特征在于：所述固相载体为Sepharose 4B；所述氯霉素单克隆抗体为氯霉素鼠单克隆抗体；所述氯霉素多克隆抗体为氯霉素兔多克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的吸附剂，其特征在于：所述氯霉素鼠单克隆抗体为氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的吸附剂，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

5. 以权利要求1-4任一所述的免疫亲和吸附剂为填料的免疫亲和色谱柱。

6. 含有权利要求1-4任一所述的免疫亲和吸附剂的试剂盒或含有权利要求5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，所述洗脱液为甲醇。

8. 根据权利要求7所述试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还包括洗涤液、保存液和稀释液；所述洗涤液为 pH7.4，含 10% 甲醇的 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液，所述 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液为 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，100mL 甲醇；所述保存液为 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， NaN_3 0.2g，pH7.4；所述稀释液为 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。

9. 一种净化氯霉素的方法，包括以下步骤：

1) 样品的前处理：

动物组织样品匀浆物以 10.0 克的量加入 20ml 乙酸乙酯，涡动混匀，静置 10 分钟，3800g 离心 5 分钟，吸取上清，50℃ 旋转蒸干，加入 5ml 质量百分含量为 4% 的

NaCl 溶液，50℃旋转蒸发 5 分钟，冷却至室温，加入 5ml 正己烷，振荡，弃上层正己烷相，得到含有样品的溶液；

2) 将步骤 1) 得到的样品溶液过权利要求 5 所述的免疫亲和色谱柱，然后用权利要求 8 所述的洗涤液洗涤，再用权利要求 7 所述的洗脱液洗脱，得到纯化的氯霉素溶液。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：所述动物组织样品包括肌肉、肝、肺、肾和血浆。

一种净化氯霉素的方法及其专用免疫亲和色谱柱

技术领域

本发明涉及一种净化氯霉素的方法及其专用免疫亲和色谱柱。

背景技术

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。

氯霉素（CAP）为广谱抗生素，对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、支原体、衣原体、立克氏体均有抑制作用。一直作为治疗伤寒、副伤寒、沙门氏菌的首选药物。氯霉素有较强的副作用和毒性作用，如果氯霉素在食用动物中残留，可通过食物链传给人类，长期微量摄入氯霉素，不仅使大肠杆菌、沙门氏菌等产生耐药性，而且会引起机体正常菌群失调，使人们易感染各种疾病，对人类的健康造成危害，如长期摄入可导致再生障碍性贫血和粒细胞缺乏症，婴儿长期食用氯霉素污染的乳汁，可能会引起“灰婴综合征”。许多国家建立了氯霉素的残留检测方法并作出了残留限量的规定。联合国粮农组织于1994 年决定禁止使用氯霉素，世界上许多国家禁止此药用于生产食品动物，并规定了其在畜产品中最高残留限量。欧盟、美国等均在法规中规定氯霉素的残留限量标准为“零容许量”，即不得检出。检测限问题已成为人们关注的焦点，发达国家对检出限的要求越来越严格。欧盟规定为0.1 μ g/kg, 美国FDA规定为0.3 μ g/kg, 且目前正在研究应用更灵敏的方法，可使检出限达到0.1 μ g/kg。因此氯霉素的检测方法和检出限已成为国际贸易中的新的技术壁垒。

目前检测氯霉素的方法主要有气相色谱法（GC-ECD）、高效液相色谱法（HPLC-UV）液-质联机（LC-MS）、气-质联机（GC-MS）和酶联免疫法 ELISA 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，但用免疫亲和柱净化基质中的氯霉素报道很少，且检测限较高。

发明内容

本发明的目的是提供一种净化氯霉素的方法及其专用免疫亲和吸附剂。

本发明所提供的净化氯霉素的免疫亲和吸附剂是由固相载体和与其偶联的氯霉素多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述氯霉素多克隆抗体或氯霉素单克隆抗体是以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述氯霉素半抗原是将氯霉素琥珀酸酯溶于蒸馏水中，再加入吗啉代碳化二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺混合，室温搅拌后得到氯霉素的琥珀酸衍生物即为氯霉素半抗原。

氯霉素是小分子物质，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。本发明将氯霉素（CAP）用吗啉代碳化二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺酰化，接出了一个含4个碳的间隔臂形成半抗原，这样突出了氯霉素半抗原决定簇的特征结构，有助于制出针对氯霉素抗原特异性较强的多克隆抗体。再将氯霉素采用N-羟基琥珀酸亚胺活性脂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，半抗原与卵清蛋白（OVA）、牛血清蛋白(BSA)的结合摩尔比分别为17:1和19:1。

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（糖浓度为4%的琼脂糖凝胶）。

所述氯霉素多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述氯霉素单克隆抗体优选为氯霉素鼠单克隆抗体，所述氯霉素多克隆抗体优选为氯霉素兔多克隆抗体。

所述氯霉素鼠单克隆抗体优选为氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体。

所述氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 已于 2006 年 2 月 9 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）。

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。

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。

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。

所述试剂盒中还包括洗脱液，所述洗脱液可为甲醇。

所述试剂盒中还包括洗涤液、稀释液和保存液；所述洗涤液为 pH7.4，含 10%甲

醇的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液为 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, 100mL 甲醇; 所述保存液为 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, NaN_3 0.2g, pH7.4; 所述试剂盒中还包括稀释液为 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。

该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、肺、肾、血浆)中净化氯霉素, 便于残留分析。在该免疫亲和色谱柱中, 兔多克隆抗体和氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 的偶联率分别是 $85.21\% \pm 1.5\%$ 、 $88.2 \pm 1.5\%$ 。动态柱容量为 2800-3500ng, 在使用了 16 次后柱容量为总柱容量的 58% 左右, 保存期为 1 年。

本发明所提供的净化氯霉素的方法, 包括以下步骤:

1) 样品的前处理:

动组织样品匀浆物以 10.0 克的量加入 20ml 乙酸乙酯, 涡动混匀, 静置 10 分钟, 3800g 离心 5 分钟, 吸取上清, 50℃ 旋转蒸发至近干, 加入 5ml 质量百分含量为 4% 的 NaCl 溶液, 50℃ 旋转蒸干, 冷却至室温, 加入 5ml 正己烷, 振荡, 弃上层正己烷相, 得到样品溶液;

2) 将步骤 1) 得到的样品溶液过免疫亲和色谱柱, 然后用洗涤液和水洗涤, 再用上述洗脱液洗脱, 得到纯化的氯霉素溶液。

本发明的免疫亲和吸附剂及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 CAP 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氯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可高效检测氯霉素的含量, 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。

附图说明

图 1 为未添加氯霉素标准品的鸡肌肉组织气相色谱图

图 2 为添加 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氯霉素样品的鸡肌肉组织的气相色谱图

图 3 为未添加氯霉素标准品的鸡肝脏气相色谱图

图 4 为添加 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氯霉素标准品的鸡肝脏气相色谱图

具体实施方式

下述实施例中的实验方法，如无特别说明，均为常规方法。

实施例 1、净化氯霉素的免疫色谱柱的制备

1、氯霉素兔多克隆抗血清的制备

氯霉素半抗原的合成：将氯霉素琥珀酸酯溶于蒸馏水中，再加入吗啉代碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺混合，室温搅拌后得到氯霉素的琥珀酸衍生物即为氯霉素半抗原。具体方法如下所述：

(1) 将 700 mg 氯霉素琥珀酸酯 (1.6 m mol) 溶于 500ml 蒸馏水中。

(2) 635 mg 吗啉代碳化二亚胺 (CMC, 1.5 m mol) 溶于 10ml 蒸馏水中，与 175mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 1.5 m mol) 混合加入步骤 (1) 得到的溶液中，调节 PH 至 5.3，在室温搅拌反应 1 小时，得到氯霉素半抗原。

免疫原的制备：采用 N-羟基琥珀酸亚胺活性脂法，将氯霉素半抗原与蛋白质载体牛血清蛋白 (BSA) 或卵清蛋白 (OVA) 偶联，制成 BSA-CAP 或 OVA-CAP 偶联物，即免疫原。

动物免疫：采用新西兰大白兔作为免疫动物，免疫剂量为 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ BSA-CAP 偶联物或 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ OVA-CAP 偶联物。将新西兰兔子饲养数周后接种免疫，首次免疫用 1ml 完全弗氏佐剂乳化，加强免疫用 1ml 不完全弗氏佐剂乳化。每次免疫间隔 3-4 周，一共免疫 5 次，最后一次不加佐剂直接肌肉注射，最后一次免疫 7-10d 后采血检测，测定血清效价后，颈动脉放血，收集血清。

2、氯霉素鼠单克隆抗体的制备

动物免疫：采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物、以上述氯霉素半抗原与蛋白质载体的偶联物 BSA-CAP 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，取脾细胞。

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。

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单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株-氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605。氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 已于 2006 年 2 月 9 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）。

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 天后腹腔注射氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 5×10^3 - 10^6 个/只，7-10 天后采集腹水。

单克隆抗体的保存：在液氮-20℃下保存，使用时 37℃水浴快速解冻。

3、IgG 的纯化：

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。其具体步骤如下：

（1）SAS 盐析：1）50%饱和度盐析：取上述制备的兔抗血清和注射氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 得到的鼠腹水各 5ml，加等量 0.01 mol/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，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 0.01 mol/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 0.01 mol/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，装于透吸袋中，悬于盛有 0.01 mol/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。

（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 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 0.01 mol/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 0.01 mol/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 IgG 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% 磺基水杨酸检测 IgG 洗脱情况。6) 用紫外分光光度计测定 IgG 溶液在 280nm 和 260nm 处的 OD 值, 得到纯化的氯霉素兔多克隆抗体和氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体, 纯化后的 IgG 在 -20℃ 冰箱保存。

4、免疫色谱柱(IAC)的制备

基质的准备：取溴化氰活化的 Sepharose 4B 干冻粉, 在盛有 1.0mmol l⁻¹HCl 的 G₃漏斗中膨胀。

抗体 IgG 的准备：用 0.1mol/L 的 NaHCO₃ 溶液将纯化的兔多克隆抗体或氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体稀释, 调溶液的 pH 值为 8.4。

偶联反应：将膨胀的溶胶用 0.1mol/L 的 NaHCO₃ 溶液平衡后, 转入上述单克隆抗体溶液中, 混合, 4℃ 下缓慢搅拌 20—24hr。偶联率的检测结果表明, 兔多克隆抗体和氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 的偶联率分别是 85.21%±1.5%、88.2±1.5%。

活化位点的封闭：将上述偶联后的凝胶转入盛有 0.1mol/L、pH4.0 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。

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、pH8.0 Tris-HCl 缓冲液交替冲洗 3 次。用 0.01 mol/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 0.01 mol/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, NaN₃ 1g) 中, 4℃ 下存放备用。

装柱：将偶联有氯霉素兔多克隆抗体或氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体的免疫吸附剂转入到含 G₃ 滤板的柱里, 制成偶联有兔多克隆抗体或氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱 (IAC 柱)。

5、IAC 柱容量的确定

将步骤4制备的偶联有兔多克隆抗体或氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No.1605 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱,用 10ml 0.01 mol/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)、5ml 纯水、和 5ml 甲醇洗柱,轻轻上下晃动 IAC 柱,赶走柱里的气泡,再以 10ml 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS 平衡。将含有 $500\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 氯霉素 (CAP) 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) 连续加到 IAC 柱,自然重力下流出。当柱达到饱和后(流出液中 CAP 和加样液浓度相同),用 10ml 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、100ml 甲醇)、5ml 纯水洗 IAC 柱,除去提取液中干扰杂质。最后用 6ml 甲醇将 CAP 洗脱,自然重力下流出,收集,吹干,然后加入 $40\mu\text{l}$ 衍生化试剂 sylon BFT 涡动混匀,用封口膜封口, 60°C 衍生化 30 分钟,冷却至室温,然后加入 $450\mu\text{l}$ 甲苯并迅速加入 $150\mu\text{l}$ 纯水,涡动 30s,静置分层后,吸取上层甲苯相 $3\mu\text{l}$ 进行 GC 分析。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。结果表明偶联有兔多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 3100ng/ml 、 690ng/mg ; 偶联有杂交瘤细胞株氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No.1605 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 3500ng/ml 、 850ng/mg 。

实施例 2、偶联有兔多克隆抗体或鼠单克隆抗体的免疫色谱柱的试剂盒的制备及其对氯霉素的净化效果

1、净化氯霉素的试剂盒的制备

该试剂盒由免疫色谱柱(IAC 柱),标准 CAP 试剂,稀释液,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标准 CAP 试剂,稀释液,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 制备的偶联有兔多克隆抗体或氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No.1605 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱。

洗涤液为磷酸盐缓冲液(0.01M, pH7.4): 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, 100mL 甲醇。

洗脱液为色谱级的甲醇。

保存液为 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, NaN_3 0.2g, pH7.4。

稀释液为 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。

将含有偶联有兔多克隆抗体或氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 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。

2、氯霉素的提取效果实验

IAC 提取原理是, 将特异性抗体氯霉素兔多克隆抗体或氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体和惰性基质偶联, 制备免疫吸附剂, 装柱。当含氯霉素的混物流过 IAC 柱时, 固定抗体选择性地结合氯霉素, 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, 氯霉素得到净化或分离。IAC 柱经再生处理后可重复使用。

检测样品的处理: 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。分别称取 10.0 克已匀浆的鸡肌肉和鸡肝脏组织样品, 置于 100ml 聚丙烯离心管中, 鸡肌肉样本按 0.05μg/kg 氯霉素标准品添加氯霉素、鸡肝脏组织样品按 0.1μg/kg 浓度的氯霉素标准品添加氯霉素, 再加入 20ml 乙酸乙酯, 涡动混匀 1 分钟, 静置 10 分钟, 3800g 离心 5 分钟, 吸取上清置于 100ml 鸡心瓶中, 50℃ 旋转蒸干, 加入质量百分含量为 4% 的 NaCl 溶液 5ml, 50℃ 旋转蒸发 5 分钟, 冷却至室温, 加入 5ml 正己烷, 振荡, 弃上层正己烷相, 收集下层 (4% NaCl 层) 即得样品溶液。

将偶联有兔多克隆抗体或氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体的免疫色谱柱平衡到室温, 用 10ml 的试剂盒中的洗涤液冲洗, 然后将上述的样品溶液过柱, 用 10ml 洗涤液、5ml 纯水洗涤, 目的是为了除去非特异性吸附的杂质。用 4ml 洗脱液洗脱, 在 50℃ N₂ 气流下吹干, 然后加入 40 μl 衍生化试剂 sylon BFT 涡动混匀, 用封口膜封口, 60℃ 衍生化 30 分钟, 冷却至室温, 然后加入 450 μl 甲苯并迅速加入 150 μl 纯水, 涡动 30s, 静置分层后, 吸取上层甲苯相 3 μl 进行气相色谱 GC 分析, 测定氯霉素的含量, 氯霉素标准品用稀释液稀释。其中, 进样口温度: 260℃; 检测器温度: 300℃。柱温: 采用程序升温, 初温: 150℃ (0.5min), 升温速率: 30℃/min。终温: 270℃ 保持 5 分钟。平均线速度: 50cm/sec; 恒压: 无分流模式; μECD 检测器; 载气: 高纯氮; 进样体积: 3μl。IAC 柱用 20ml 的保存液平衡保存于 4℃ 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, 说明制备的 IAC 非特异性吸附极小, 其中偶联有氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对于鸡肌肉的净化效果如图 1 和图 2 所示; 偶联有氯霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-1-3 CGMCC No. 1605 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对于鸡肝脏的净化效果如图 3 和图 4 所示, 其中图 2 和图 4 中的箭头示氯霉素。

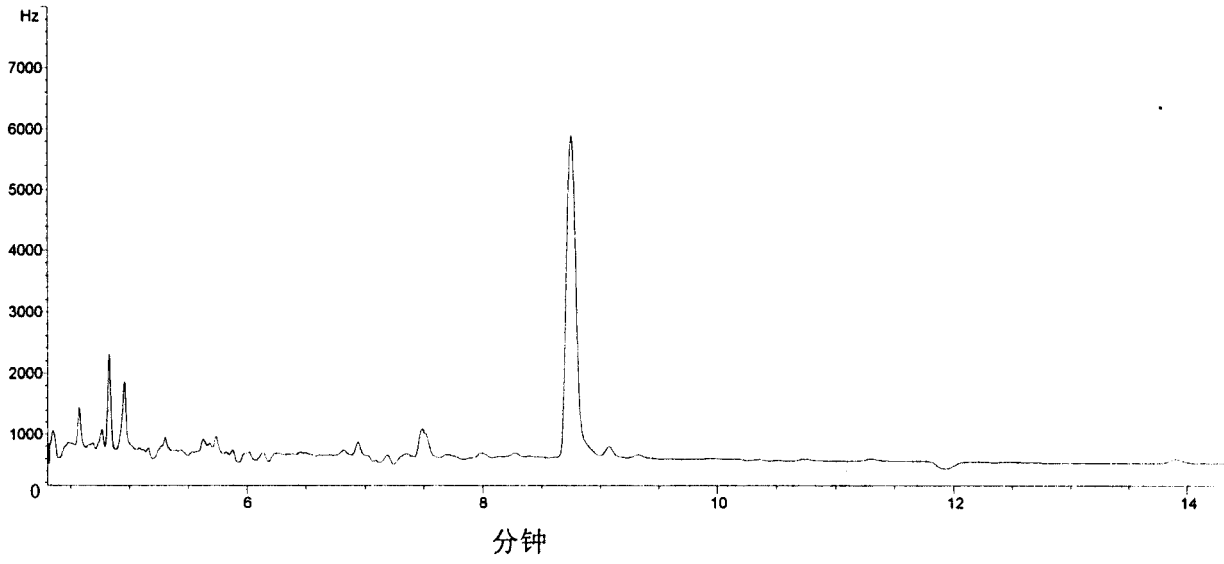


图 1

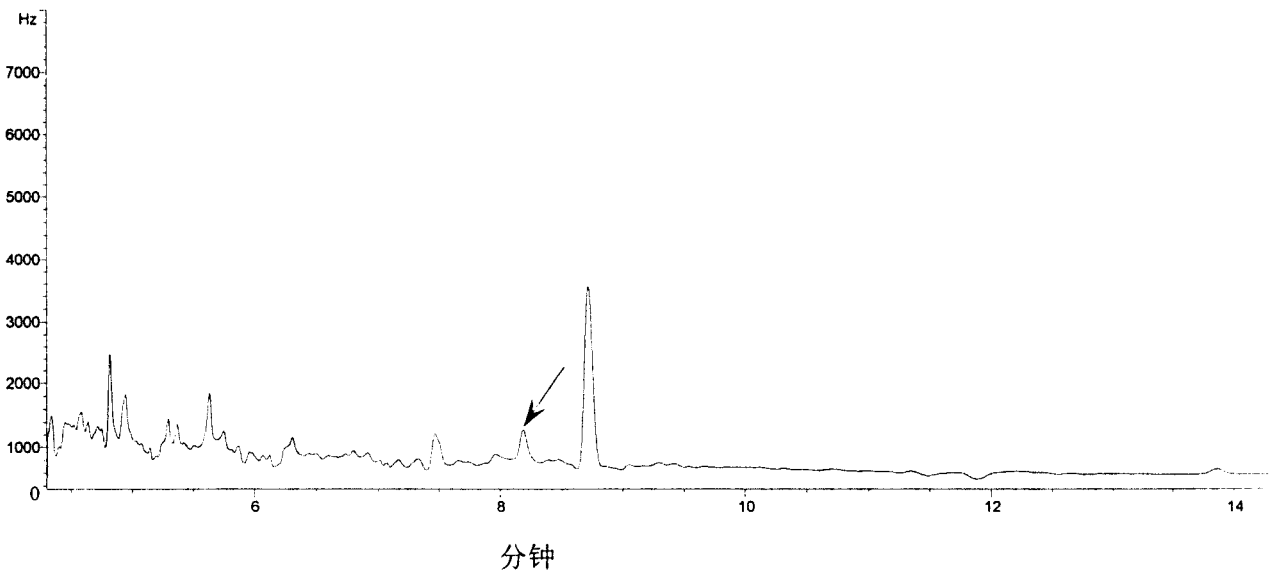


图 2

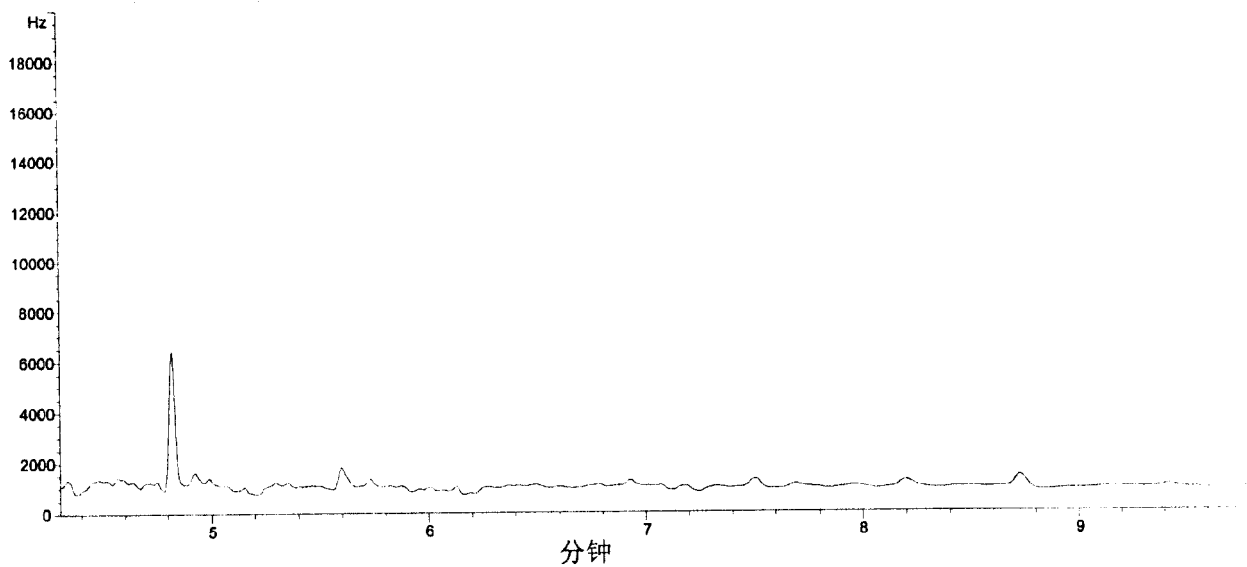


图 3

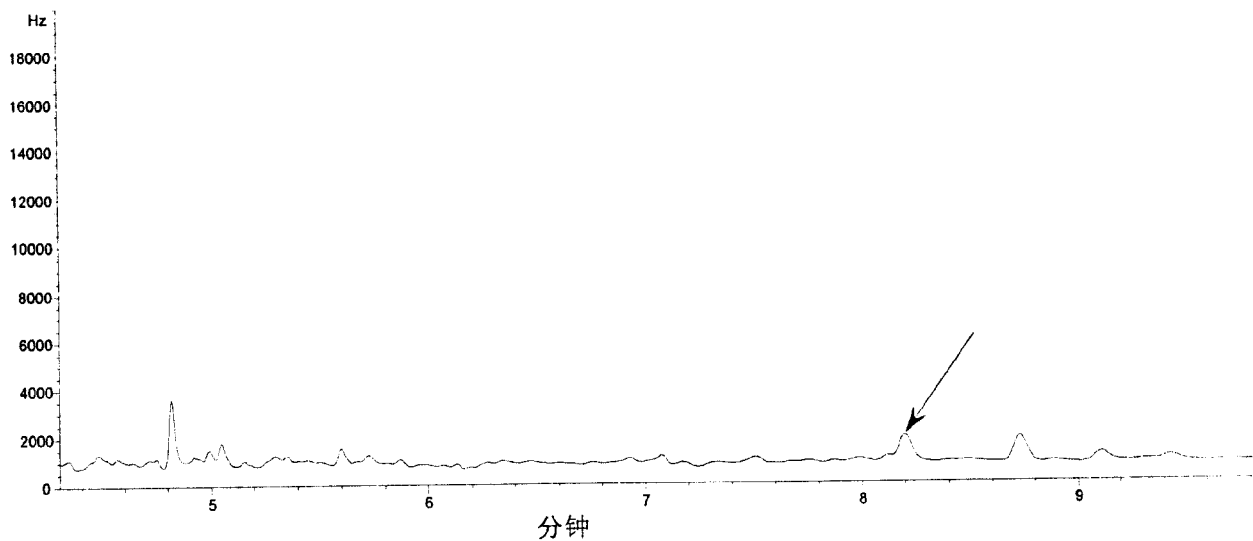


图 4

专利名称(译)	一种净化氯霉素的方法及其专用免疫亲和色谱柱		
公开(公告)号	CN100338030C	公开(公告)日	2007-09-19
申请号	CN200610007225.5	申请日	2006-02-14
[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 周金慧 何方洋 吴聪明		
发明人	沈建忠 张素霞 史为民 周金慧 何方洋 吴聪明		
IPC分类号	C07C231/24 C07C233/18 G01N33/53 G01N33/559		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	张靖		
其他公开文献	CN1807402A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种净化氯霉素的方法及其专用免疫亲和色谱柱。该色谱柱的填料为净化氯霉素的免疫亲和吸附剂，该免疫亲和吸附剂是由固相载体和与其偶联的氯霉素多克隆抗体或单克隆抗体组成；所述氯霉素多克隆抗体或氯霉素单克隆抗体是以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述氯霉素半抗原是将氯霉素琥珀酸酯溶于蒸馏水中，再加入吗啉代碳化二亚胺和N-羧基琥珀酰亚胺混合后，得到氯霉素的琥珀酸衍生物即为氯霉素半抗原。本发明的净化方法结合色谱法高效检测氯霉素的含量，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。

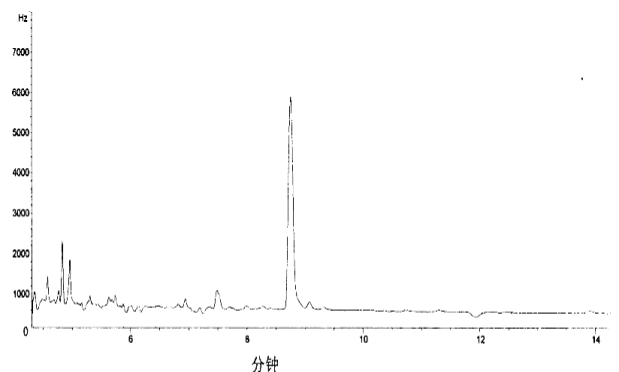


图 1