



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103071315 B

(45) 授权公告日 2015.03.04

(21) 申请号 201210589292.8

(22) 申请日 2012.12.31

(73) 专利权人 南宁市蓝光生物技术有限公司

地址 530007 广西壮族自治区南宁市科园大道68号软件园二期11号楼二层203号

专利权人 广西出入境检验检疫局检验检疫技术中心
广西壮族自治区分析测试研究中心

(72) 发明人 潘丽金 宁欢欢 刘晓松 谢体三
吕春秋 张兰 叶开富 萧浩

(74) 专利代理机构 广西南宁明智专利商标代理有限公司 45106

代理人 黎明天

(51) Int. Cl.

- G01N 33/53(2006.01)
- G01N 1/34(2006.01)
- G01N 1/40(2006.01)
- G01N 30/08(2006.01)
- C07K 16/06(2006.01)

(56) 对比文件

- CN 102553297 A, 2012.07.11, 摘要.
- CN 1830546 A, 2006.09.13, 全文.

CN 1548224 A, 2004.11.24, 全文.

US 2009/0269859 A1, 2009.10.29, 全文.

GB 2238050 A, 1991.05.22, 说明书第3页第9-16行.

Wang J P, Shen J Z..Immunoaffinity chromatography for purification of Salbutamol and Clenbuterol followed screening and confirmation by ELISA and GC-MS. 《Food and agricultural immunology》.2007, 第18卷(第2期), 第107-115页.

Wang, Guomin

Li, Yingguo

Li, Xianliang

等..Preparation and Characterization of an immunoaffinity Column for the Selective Extraction of Salbutamol from Pork Sample. 《Journal of Chromatographic Science》.2011, 第49卷(第2期), 第276-280页.

龚雄麒. 蛋白质交联方法及其应用. 《国外医学药学分册》.1988, (第2期), 第65-73页.

审查员 许远平

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

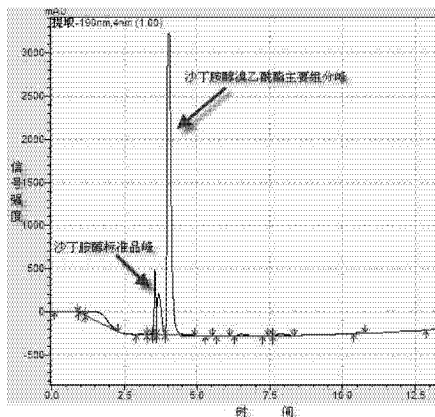
(54) 发明名称

微型高效沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱制备及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种微型高效沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱制备及应用,本发明所提供的免疫亲和纯化富集柱包括偶联有沙丁胺醇特异性抗体的活化琼脂糖填料和装载该亲和填料的塑料柱。所述的亲和填料偶联的沙丁胺醇特异性抗体是用免疫亲和法提取得到的,所述的免疫亲和纯化富集柱是将免疫亲和填料装载入特制的塑料柱得到的。该免疫亲和纯化富集柱装载填料体积小、富集沙丁胺醇能力强,与色谱法、胶体金试纸条联合使用,可高效、准确检测沙丁胺醇的含量。

CN 103071315 B



1. 一种微型高效沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱的制备,其特征在于:

1) 将经免疫亲和纯化的沙丁胺醇特异性多克隆抗体和过碘酸活化的琼脂糖混匀,在摇床上室温反应 30 分钟,然后在 4℃冰箱静置 30 分钟后加入硼氢化钠还原,用蒸馏水清洗未结合的抗体,用磷酸缓冲液清洗填料,10 倍填料体积/次,洗 4 次,滴干磷酸缓冲液后加入等体积甘油,混匀,得到沙丁胺醇免疫亲和填料;

2) 在特制的塑料柱内下端装上过滤膜,将沙丁胺醇免疫亲和填料装入柱中,25 μL/柱,填料上层盖上过滤膜,即得所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱。

2. 根据权利要求 1 所述的方法制备的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱,包括偶联有免疫亲和纯化的沙丁胺醇特异性多克隆抗体的琼脂糖填料及装载该填料的特制塑料柱。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱的制备,其特征在于:所述的免疫亲和纯化的沙丁胺醇特异性多克隆抗体是用沙丁胺醇与溴乙酰氯反应得到衍生物沙丁胺醇溴乙酰酯溶液,用反向高效液相色谱 HPLC 纯化该溶液得到纯化后的沙丁胺醇溴乙酰酯,将纯化后的沙丁胺醇溴乙酰酯与载体蛋白偶联,得到的偶联物作为免疫原免疫动物,得到抗血清,同时用该纯化后的沙丁胺醇溴乙酰酯与经活化的琼脂糖反应制备纯化抗体用的免疫亲和柱,用该亲和柱一步提取抗血清得到沙丁胺醇特异性多克隆抗体。

4. 根据权利要求 3 所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱的制备,其特征在于:所述的沙丁胺醇溴乙酰酯是将沙丁胺醇标准品在三乙胺催化下与溴乙酰氯反应得到衍生物沙丁胺醇溴乙酰酯溶液;将此沙丁胺醇溴乙酰酯溶液用制备型高效液相色谱仪反向柱色谱分离纯化出相对于沙丁胺醇标准品峰后移,且具有沙丁胺醇紫外光吸收光谱特征的单一主峰组分,收集该主峰组分得到纯化的沙丁胺醇溴乙酰酯。

5. 根据权利要求 3 所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱的制备,其特征在于:所述的沙丁胺醇溴乙酰酯与载体蛋白偶联制备免疫原,是用十二烷基硫酸钠 SDS 变性牛血清蛋白 BSA 或卵清蛋白 OVA,再与碘乙酸-羧基琥珀酰亚胺酯即 NHS-碘乙酸反应,再用二巯苏糖醇 DTT 还原,得到巯基化的 BSA 或 OVA;通过葡聚糖凝胶 G25 Sephadex 脱盐去掉多余的二巯苏糖醇后,将沙丁胺醇溴乙酰酯与巯基化的 BSA 或 OVA 混合,调 pH=8.5,在室温摇动反应 60 分钟,经 G25 Sephadex 脱盐后得到的为免疫原。

6. 根据权利要求 3 所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱的制备,其特征在于:所述的用纯化后的沙丁胺醇溴乙酰酯与经活化的琼脂糖反应制备纯化抗体用的免疫亲和柱,是将经活化的琼脂糖与赖氨酸反应得到氨基化的琼脂糖,再将氨基化的琼脂糖与 NHS-碘乙酸反应后,再用 DTT 还原,得到巯基化的琼脂糖,将巯基化的琼脂糖和沙丁胺醇溴乙酰酯快速混匀,室温反应 60 分钟,得到化学共价键复合体沙丁胺醇溴乙酰-琼脂糖填料,将填料装柱,洗去多余的 DTT,得到提纯沙丁胺醇特异性抗体用的免疫亲和柱。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱和沙丁胺醇胶体金试纸条联用。

微型高效沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱制备及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物分离、纯化富集装置,尤其是一种微型高效沙丁胺醇免疫亲和层析柱的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 沙丁胺醇(Sal)属于 β -兴奋剂,可以提高瘦肉率、促进动物生长。因其经济效益明显,利益驱使养殖户或养殖企业大量使用,导致畜产品中沙丁胺醇大量残留,人食用这类畜产品后,可引发肌肉震颤、心悸、神经过敏、头痛、目眩、恶心等中毒症状,特别是对血压、心脏病患者危害更大,长期使用可能导致染色体畸变,诱发恶性肿瘤。沙丁胺醇在许多国家,特别是欧盟和中国,被禁止用做家畜促生长剂。所以,对动物来源的食品中沙丁胺醇残留进行严格地检测是非常重要的。

[0003] 由于生物样本成分复杂,待测物浓度低,大多数取样量少,而我国明确规定禁止沙丁胺醇及其衍生物在动物的饲养过程中使用。这就对分析方法的灵敏度、准确度有更高的要求。采用免疫亲和色谱柱提取样品中沙丁胺醇,再与高效液相色谱法(HPLC-UV)、气-质联机法(GC-UV)、胶体金快速试纸条检测法确证是必然的趋势。但是,现有的提取沙丁胺醇免疫亲和色谱柱的技术与工艺存在活化后填料不稳定、非亲和法提纯的抗体特异性差、抗体和填料偶联不稳定,造成偶联在填料上的抗体脱落、装柱体积偏大(装柱体积 1 毫升以上),提取沙丁胺醇时造成洗脱体积大、富集效率低,减低了确证的准确度和灵敏度。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种高效、准确纯化富集沙丁胺醇的免疫亲和纯化富集柱及其制备方法和用途。

[0005] 发明采取的技术方案:

[0006] 为达上述目的,本发明 2 次采用抗原抗体的特异性反应和可离解的特性 $Ag + Ab$ (固相) \rightleftharpoons $Ag-Ab$ (固相) 原理,具体如下:

[0007] 首先利用这一原理将沙丁胺醇乙酰酯偶联到活化琼脂糖(Agarose)上制得 Sal - Agarose 亲和柱,用于提取沙丁胺醇特异性多克隆抗体。

[0008] 再利用这一原理将提取所得的抗沙丁胺醇特异性抗体(Anti-Sal)偶联到 Agarose 上制得 Anti-Sal- Agarose 免疫亲和纯化富集柱,用于分离纯化、富集待检样品中的沙丁胺醇。

[0009] 根据上述机理,本发明采用如下技术步骤:

[0010] 一种沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱的制备,其特征在于:

[0011] 1) 将经免疫亲和纯化的沙丁胺醇特异性多克隆抗体和过碘酸活化的琼脂糖 Agarose 混匀,在摇床上室温反应 30 分钟,然后在 4℃ 冰箱静置 30 分钟后加入硼氢化钠还原,用蒸馏水清洗未结合的抗体,用磷酸缓冲液(PBS)清洗填料,10 倍填料体积 / 次,洗 4 次,滴干 PBS 后加入等体积甘油,混匀,得到沙丁胺醇免疫亲和填料;

[0012] 2) 在特制的塑料柱内下端装上过滤膜,将沙丁胺醇免疫亲和填料装入柱中,25 μ L/ 柱,填料上层盖上过滤膜,即得所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱。

[0013] 所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱,包括偶联有免疫亲和纯化的沙丁胺醇特异性多克隆抗体的琼脂糖填料及装载该填料的特制塑料柱。

[0014] 所述的免疫亲和纯化的沙丁胺醇特异性多克隆抗体是用沙丁胺醇与溴乙酰氯反应得到衍生物沙丁胺醇溴乙酰酯溶液,用反向高效液相色谱 HPLC 纯化该溶液,得到纯化后的沙丁胺醇溴乙酰酯,将纯化后的沙丁胺醇溴乙酰酯与载体蛋白偶联,得到该偶联物作为免疫原免疫动物,得到抗血清,同时用该纯化后的沙丁胺醇溴乙酰酯与经活化的琼脂糖珠反应制备纯化抗体用的免疫亲和柱,用该亲和柱一步提取抗血清得到沙丁胺醇特异性多克隆抗体。

[0015] 所述的沙丁胺醇溴乙酰酯制备方法是沙丁胺醇标准品在三乙胺催化下与溴乙酰氯反应得到衍生物沙丁胺醇溴乙酰酯溶液。将此沙丁胺醇溴乙酰酯溶液用制备型高效液相色谱仪反向柱色谱分离纯化出相对于沙丁胺醇标准品峰后移,且具有沙丁胺醇紫外光吸收光谱特征的单一主峰组分,收集该主峰组分得到纯化的沙丁胺醇溴乙酰酯。

[0016] 所述的沙丁胺醇溴乙酰酯与载体蛋白偶联制备免疫原,是用十二烷基硫酸钠 SDS 变性牛血清蛋白 BSA 或卵清蛋白 OVA 等常用载体蛋白,再与碘乙酸-羟基琥珀酰亚胺酯即 NHS-碘乙酸反应,再用二硫苏糖醇 DTT 还原,得到巯基化的 BSA 或 OVA ;通过葡聚糖凝胶 G25 Sephadex 脱盐去掉多余的二硫苏糖醇后,将沙丁胺醇溴乙酰酯与巯基化的 BSA 或 OVA 混合,调 pH=8.5,在室温摇动反应 60 分钟,经 G25 Sephadex 脱盐后得到的为免疫原。

[0017] 所述的用纯化后的沙丁胺醇溴乙酰酯与经活化的琼脂糖反应制备纯化抗体用的免疫亲和柱,是将经活化的琼脂糖与赖氨酸反应得到氨基化的琼脂糖,再将氨基化的琼脂糖与 NHS-碘乙酸反应后,再用 DTT 还原,得到巯基化的琼脂糖,将巯基化的琼脂糖和沙丁胺醇溴乙酰酯快速混匀,室温反应 60 分钟,得到化学共价键复合体沙丁胺醇溴乙酰-琼脂糖填料,将填料装柱,洗去多余的 DTT,得到提纯沙丁胺醇特异性抗体用的免疫亲和柱。

[0018] 所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱和沙丁胺醇胶体金试纸条联用的技术。

[0019] 本发明的优点:

[0020] 1) 本亲和纯化富集柱所用偶联的抗体为经过免疫亲和一步法提纯的,抗体特异性高;采用高密度、大容量将特异性抗体偶联于活化的琼脂糖填料,使得本发明亲和纯化富集柱抗体和填料结合稳定,柱容量、回收率明显优于当前同类产品,达到排除杂质干扰、提高检测准确性和可靠性。

[0021] 2) 本亲和纯化富集柱装载填料的微型化,填料装柱体积仅需 25 μ L/ 柱,能使洗脱体积缩小,非常明显地提高检测的灵敏度。

[0022] 3) 本发明转载填料的塑料柱为特制的,能达到灵活掌握上样体积、提高过柱效率的效果。

附图说明

[0023] 图 1 为经制备型高效液相色谱分离纯化的沙丁胺醇色谱图及主要衍生组分收集峰图。

[0024] 图 2 为沙丁胺醇多克隆抗体间接竞争 ELISA 的 IC₅₀ 图。

[0025] 图 3 为沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱和沙丁胺醇胶体金试纸条联用效果图,图中的 1、2 为用胶体金试纸条测试沙丁胺醇猪阴性尿液;2、3 为用胶体金试纸条检测在沙丁胺醇阴性尿液中加入沙丁胺醇标准品使浓度是 0.01ng/mL;5、6 为用胶体金试纸条检测在沙丁胺醇阴性尿液中加入沙丁胺醇标准品使浓度为 0.01ng/mL 经过沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱富集后的洗脱液。

具体实施方式

[0026] 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。

[0027] 实施例 1 沙丁胺醇特异性多克隆抗体的制备。

[0028] 1.1 沙丁胺醇溴乙酰脂的制备:

[0029] 1.1.1 取 50 mg 的沙丁胺醇溶于 500 μ L 的富马酸二甲酯(DMF)溶液中,充分溶解冰冻 10 分钟,再与 40 μ L 的溴乙酰氯摇匀冰冻 2 分钟后加入 25 μ L 三乙胺摇匀,在 60 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟;加入 500 μ L 的 50% 甲醇。

[0030] 1.1.2 离心,取上清用制备型高效液相色谱仪(C-18 HPLC)反向柱色谱分离纯化。分别收集相对于沙丁胺醇标准品峰后移的峰,且有沙丁胺醇紫外光(UV)吸收光谱特征的主要组分(大约 20 mg),冻干。

[0031] 1.1.3 收集冻干后的衍生物立即用 1 mL 甲醇复溶,用 0.1 mol/L Na_2CO_3 调 PH>8。

[0032] 1.2 沙丁胺醇免疫原、配对检测抗原制备

[0033] 1.2.1 沙丁胺醇免疫原

[0034] 取 250 mg BSA, 加入 5 mL 0.1 mol/L Na_2CO_3 、0.5 mL 10% 的 SDS 混匀后煮沸 5 分钟变性后冷却至室温,加入 100 mg 现制的 NHS- 碘乙酸活性酯(碘乙酸-NHS),4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 分钟,立即脱盐,收集 10 mL,然后加入 50 mg 的 DTT 保持 pH>8.5 下室温避光反应 60 分钟,再加入 50 mg DTT 煮沸 5 分钟还原。冷却至室温,还原后的 BSA 经过脱盐柱 G25 Sephadex 去掉多余的 DTT 后加入上述 1.1.3 的经 HPLC 纯化的沙丁胺醇溴乙酰酯 400 μ L,用 0.1 mol/L Na_2CO_3 调 pH=8.5, 室温避光反应 60 分钟后生成沙丁胺醇溴乙酰-BSA 共价键复合物,经 G25 Sephadex 脱盐、分装保存待用。

[0035] 1.2.2 配对检测抗原

[0036] 取 10 mg 卵清蛋白 OVA,溶解于 400 μ L 含 0.1 mol/L EDTA 的 0.1 mol/L Na_2CO_3 溶液,充分溶解后,加入 40 μ L 10% 的 SDS 混匀后煮沸 5 分钟变性,然后加入 6 mg 的 DTT 煮沸 10 分钟还原。冷却至室温,还原后的 OVA 经脱盐柱 G25 Sephadex 去掉多余的 DTT 后加入上述经 HPLC 纯化的沙丁胺醇溴乙酰酯 200 μ L,用 0.1 mol/L Na_2CO_3 调 pH=8.5,室温避光反应 60 分钟后,生成沙丁胺醇溴乙酰-OV 共价键复合物,经 G25 Sephadex 脱盐后得到的为配对检测抗原。

[0037] 1.3 沙丁胺醇多克隆抗血清制备

[0038] 用新西兰大白兔为免疫动物,疫苗浓度为 1 mg/mL,首次免疫用 0.5 mL 疫苗加 0.5 mL PBS 加 1 mL 完全佐剂混匀多点注射,加强免疫用 0.25 mL 疫苗加 0.75 mL PBS 加 1 mL 不完全佐剂混匀分 2 点注射,首次免疫后,每间隔 2 周加强免疫一次,35-40 天采集 0.5 mL 血清检测滴度,用配对检测抗原包被做血清的间接 ELISA 检测,血清滴度达到 1:6400 后进行

大量血清制备。

[0039]

实验方案	二抗	羊抗兔 HRP1/50000
	注射疫苗	Sal-BSA
	检测用包被疫苗	Sal-OV
实验数据	血清滴度	OD 值
	空白	0
	1/364500	0.352
	1/121500	0.562
	1/40500	1.003
	1/13500	1.215
	1/4500	1.515
	1/1500	1.798
	1/500	1.934
实验结论	血清滴度	1/40500

[0040] 1.4 提取抗体用的亲和柱制备

[0041] 1.4.1 称取赖氨酸(Lysine) 2 g 溶解于 10 mL 0.1 mol/L Na_2CO_3 中,加入到 20 mL 活化的 Agarose 混匀,60°C 反应 5 分钟,摇匀再次反应 10 分钟,转 4°C 静置 20 分钟,冷却后加入硼氢化钠 100 mg,摇床摇动过夜,次日用 5 倍填料体积蒸馏水洗,得到 Lysine-Agarose 20 mL。排干水分备用。

[0042] 1.4.2 将 20 mL Lysine-Agarose 加入 2 mL 饱和 Na_2CO_3 , PH>8,振荡器上逐滴加入 15 mL 丙酮。

[0043] 1.4.3 加入 100 mg 活化碘乙酸(现配现用), PH>8.5 下摇动避光反应 30 分钟

[0044] 1.4.4 抽干经碘乙酸活化的 Lysine-Agarose,用 10 倍 Lysine-Agarose 体积的蒸馏水洗,把填料排出到小烧杯,加入用 0.1mol/L Na_2CO_3 配制的 DTT 溶液(200 mg/10 mL)10 mL,瞬间将二者混匀,室温避光反应 60 分钟。

[0045] 1.4.5 用 5 倍填料体积水洗,去掉残余 DTT,得到巯基化填料(-SH Agarose)

[0046] 1.4.6 将 1.1.3 的经 HPLC 纯化的沙丁胺醇溴乙酰酯 400 μ l 滴入填料中,加入 0.1 mol/L Na_2CO_3 5 mL,室温避光反应过夜,装柱,用 PBSt 充分清洗后,再用 PBS 中和至 PH=7。

[0047] 1.5 抗沙丁胺醇特异性抗体制备

[0048] 将 150 mL 的免疫血清流过步骤 1.4.6 所制的亲和柱。依次用 10 倍填料体积的 PBSt、10 倍填料体积的 1 mol/L 氯化钠清洗掉杂质后,柱上的特异性抗沙丁胺醇抗体用 2% 乙酸洗脱。洗脱的抗体用透析袋透析去掉乙酸,冻干备用。

[0049]

表2 间接竞争 ELISA 检测沙丁胺醇抗体特异性结果

实验方案	抗原: Sal-OV BrAc 法	0.1ug/mL	0.1ug/mL	OD 均值
	一抗浓度	0.5ug/mL	0.5ug/mL	
	二抗: 羊抗兔 IgG-HRP	羊抗兔 IgG-HRP	羊抗兔 IgG-HRP	
实验数据	Sal 标准品浓度 ng/mL	OD	OD	
	0	1.235	1.212	1.224
	0.16	1.108	1.009	1.059
	0.8	0.775	0.77	0.773
	4	0.468	0.473	0.471
	20	0.213	0.22	0.217
	100	0.116	0.12	0.118
	500	0.059	0.053	0.056
	空白	0	0	0
实验结论	R ²	0.9858	0.941	0.9634
	IC50	1.7	2	1.85

沙丁胺醇多克隆抗体间接竞争 ELISA 的 IC50 图如图 2 所示。

[0050] 经间接 ELISA 及间接竞争 ELISA 检测,结果表明本发明所制的多克隆抗体效价很高,特异性很高。

[0051] 实施例 2 高密度高特异性沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱制备。

[0052] 2.1 取经过碘酸钠活化的 Agarose 12 mL 转入柱子中,用 400 mL 蒸馏水洗,滴干,再过 Agarose 的 2 倍体积的 0.1 mol/L Na₂CO₃,滴干备用;

[0053] 2.2 将 1200 mg 经免疫亲和纯化的 D-tag 特异性多克隆抗体用 0.1 mol/L Na₂CO₃ 溶解使浓度达 20 mg/mL,完全溶解后离心取上清;

[0054] 2.3 上清加入步骤 2.1 的亲和纯化富集柱中,收集流出液再次过柱,反复 3-5 次;

[0055] 2.4 用 80 mL 蒸馏水把未结合的抗体洗出来,收集在一起;

[0056] 2.5 用蒸馏水配制浓度为 10 mg/mL 的硼氢化钠溶液 4.8 mL,加入柱子中,振荡混匀,4℃反应 30 分钟;

[0057] 2.6 用 10 倍填料体积的 PBS 洗填料,滴干 PBS,将填料移入干净的试管中,加入与填料体积相等的甘油,即得沙丁胺醇免疫亲和纯化富集填料。

[0058] 2.7 在特制塑料柱内下端装上过滤膜,将沙丁胺醇免疫亲和纯化富集填料装载入柱中,25 μl/柱,然后填料上层盖上过滤膜,即得所述的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱。

[0059] 2.8 该免疫亲和纯化富集柱保存条件为:-20℃。

[0060] 实施例 3 沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱容量测定

[0061] 3.1 将已知空白(已经检测确定为沙丁胺醇阴性)尿液 2 mL。加入沙丁胺醇标准品使浓度为 2.5 μg/mL,5000 转/分离心 10 分钟,取上清待用。

[0062] 3.2 从-20℃冰箱取出本发明的沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱,室温平衡 20 分钟,滴干储存缓冲液,依次用 1 mL PBST 过柱清洗填料、0.05% 吐温 20 和 1 mg/mL BSA 的 3% 乙

- 酸水溶液 500 μ l 过柱清洗,再用 PBS 过柱中和填料至中性 PH=7.0 \pm 0.5,滴干 PBS,待用;
- [0063] 3.2 将处理好的样品 2 mL 过柱,接流出液重复过柱 1 次。
- [0064] 3.3 用 2 mL PBST 过柱清洗,再用 1.5 mL PBS 过柱清洗。
- [0065] 3.4 用含 80% 甲醇 3% 乙酸的水溶液 100 μ L 洗脱,收集所有洗脱液;再用含 1% 乙酸水溶液 300 μ L 洗脱,收集所有洗脱液。整个洗脱过程共收集 400 μ L 洗脱液。
- [0066] 3.5 用高效液相色谱检测洗脱液中沙丁胺醇的含量。
- [0067]

检测项目	填料体积(μ L)	洗脱液体积(μ L)	实测洗脱液平均浓度 (ng/mL)	填料平均容量 (ng/mL)
sal 洗脱液	25	400	2750	44000

- [0068] 检测结果说明沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱的容量达到 40000 ng/mL。如此高的容量对沙丁胺醇具有很好的富集功效。
- [0069] 实施例 4 沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱回收率测定
- [0070] 4.1 将已知空白(已经检测确定为沙丁胺醇阴性)尿液 5 mL。加入沙丁胺醇标准品使浓度为 100 ng/mL,5000 转 / 分离心 10 分钟,取上清待用。
- [0071] 4.2 从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱,室温平衡 20 分钟,滴干储存缓冲液,依次用 1 mL PBST 过柱清洗、0.05% 吐温 20 和 1 mg/mL BSA 的 3% 乙酸水溶液 500 μ L 过柱清洗,再用 PBS 过柱中和填料至中性 PH=7.0 \pm 0.5,滴干 PBS,待用;
- [0072] 4.3 将处理好的样品 5 mL 过亲和纯化富集柱,接流出液重复过柱 1 次。
- [0073] 4.4 用 1 mL PBST 过柱清洗,再用 1 mL PBS 过柱清洗。
- [0074] 4.5 先用 80% 甲醇 +3% 乙酸 + 蒸馏水的洗脱液洗脱 100 μ L,然后用 3% 乙酸洗 300 μ L。总量为 400 μ L。
- [0075] 4.6 用高效液相色谱检测加了标准品但未过柱的样品及洗脱液中沙丁胺醇的含量。
- [0076]

检测项目	配制标准品实测平均浓度 (ng/mL)	标准品过柱体积 (mL)	实测洗脱液平均浓度 (ng/mL)	洗脱液体积 (mL)	回收率 (%)
Sal	105.7	5	1298.1	0.4	98.2%

- [0077] 测定结果说明亲和填料回收率为大于 95%。
- [0078] 实施例 5 沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱和沙丁胺醇胶体金试纸条联用
- [0079] 5.1 取沙丁胺醇阴性尿液各 25 μ L 点 2 片胶体金试纸条,确定其为阴性尿液(如图 3 中的 1、2)。
- [0080] 5.2 取该阴性尿液 100 mL,加入沙丁胺醇标准品使浓度是 0.01 ng/mL,各取 25 μ L 点 2 片胶体金试纸条,结果试纸条仍显示为阴性(如图 3 中的 3、4)。

[0081] 5.3 从 -20°C 冰箱取出沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱, 室温平衡 20 分钟, 滴干储存缓冲液, 依次用 1 mL PBST、0.05% 吐温 20 和 1mg/mL BSA 的 3% 乙酸水溶液 $200\ \mu\text{L}$ 过柱清洗, 再用 PBS 过柱中和填料至中性 $\text{PH}=7.0\pm 0.5$, 滴干 PBS, 待用;

[0082] 5.4 将处理好的样品 100 mL 过亲和纯化富集柱, 接流出液重复过柱 1 次。

[0083] 5.5 用 1 mL PBST 过柱清洗, 再用 1 mL PBS 过柱清洗。

[0084] 5.6 用含 0.05% 吐温 20 和 1 mg/mL BSA 的 3% 乙酸水溶液 $150\ \mu\text{L}$ 洗脱, 收集洗脱液。

[0085] 5.7 用饱和三羟甲基氨基甲烷 Tris 调洗脱液 $\text{PH}=7.0\pm 0.5$ 。

[0086] 5.8 各取中和后的洗脱液 $25\ \mu\text{L}$ 点 2 片胶体金试纸条, 结果试纸条显示为阳性(如图 3 中的 5、6)。说明经亲和纯化富集柱的富集, 可将检测下限降低至 0.01ng/mL 。和单独用胶体金试纸条直接检测的检测下限 $5\ \text{ng/mL}$ 相比, 检测敏感度提高了 500 倍。

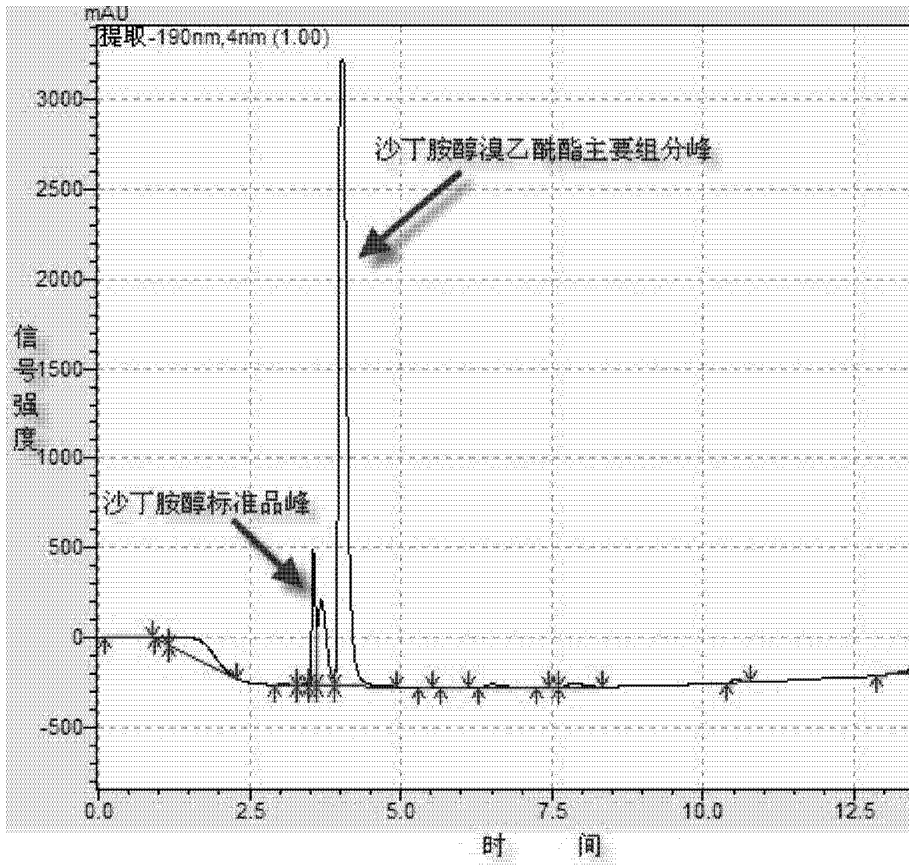


图 1

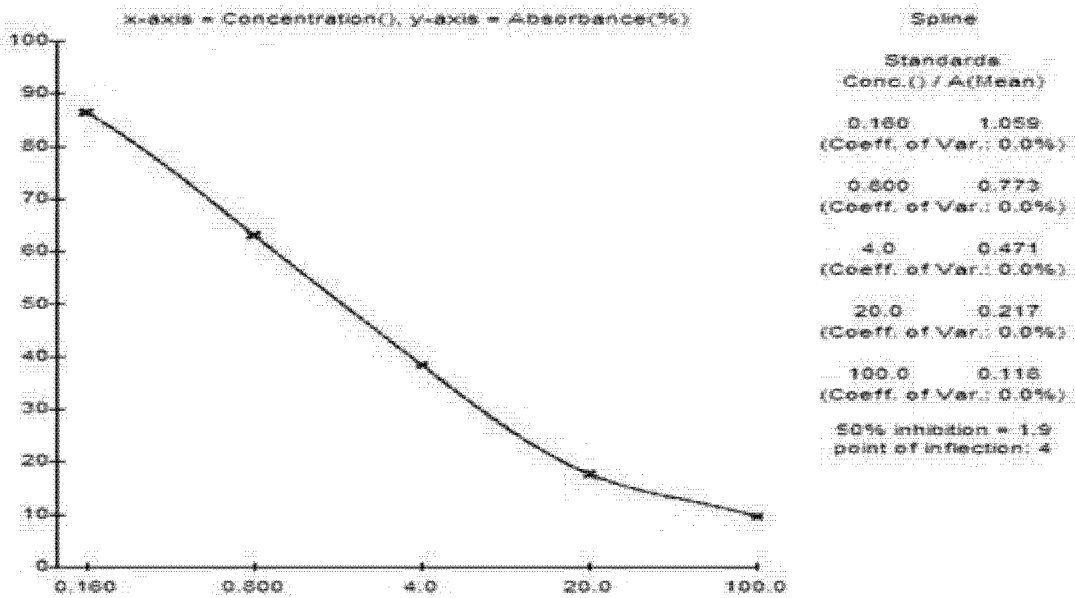


图 2

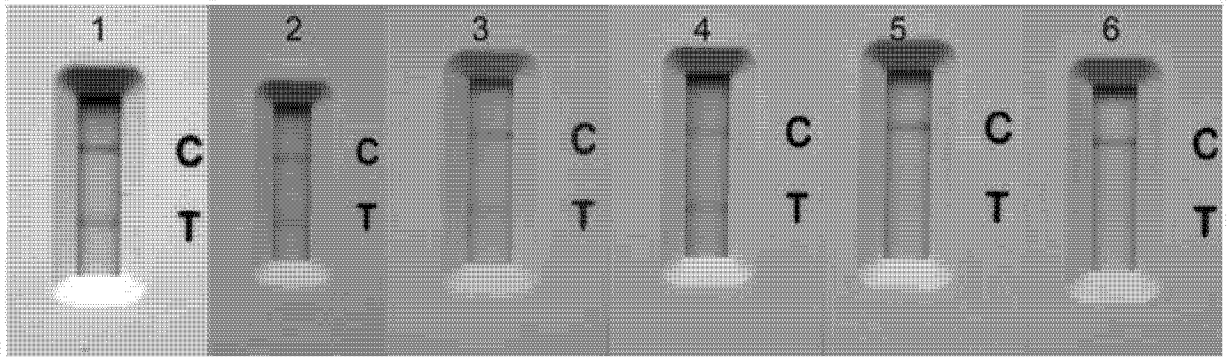


图 3

专利名称(译)	微型高效沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱制备及应用		
公开(公告)号	CN103071315B	公开(公告)日	2015-03-04
申请号	CN201210589292.8	申请日	2012-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区分析测试研究中心		
申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区分析测试研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区分析测试研究中心		
[标]发明人	潘丽金 宁欢欢 刘晓松 谢体三 吕春秋 张兰 叶开富 萧浩		
发明人	潘丽金 宁欢欢 刘晓松 谢体三 吕春秋 张兰 叶开富 萧浩		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/34 G01N1/40 G01N30/08 C07K16/06		
其他公开文献	CN103071315A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种微型高效沙丁胺醇免疫亲和纯化富集柱制备及应用，本发明所提供的免疫亲和纯化富集柱包括偶联有沙丁胺醇特异性抗体的活化琼脂糖填料和装载该亲和填料的塑料柱。所述的亲和填料偶联的沙丁胺醇特异性抗体是用免疫亲和法提取得到的，所述的免疫亲和纯化富集柱是将免疫亲和填料装载入特制的塑料柱得到的。该免疫亲和纯化富集柱装载填料体积小、富集沙丁胺醇能力强，与色谱法、胶体金试纸条联合使用，可高效、准确检测沙丁胺醇的含量。

