



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106754733 A

(43) 申请公布日 2017.05.31

(21) 申请号 201510812395.X

代理人 严政 李婉婉

(22) 申请日 2015.11.20

(51) Int. Cl.

(83) 生物保藏信息

C12N 5/20(2006.01)

CGMCC NO. 9206 2014.05.05

C07K 16/44(2006.01)

CGMCC NO. 9203 2014.05.05

G01N 33/577(2006.01)

(71) 申请人 中国检验检疫科学研究院

G01N 33/531(2006.01)

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲3号

B01J 20/24(2006.01)

申请人 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心

B01J 20/30(2006.01)

北京中检维康生物技术有限公司

B01J 20/281(2006.01)

中检维康(湖北)食品安全科技有限公司

B01D 15/10(2006.01)

C07C 317/32(2006.01)

C07C 315/06(2006.01)

C07D 239/62(2006.01)

(72) 发明人 陈冬东 代汉慧 章骅 王伟

果旗 王雄 姚佳 王彦斐

陈旭光

(74) 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

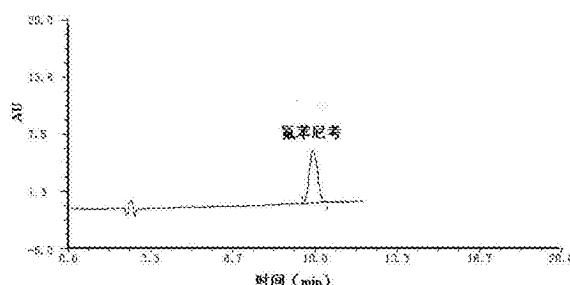
(54) 发明名称

氟苯尼考杂交瘤细胞株和单克隆抗体及复合免疫吸附剂和免疫亲和柱与试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种保藏编号为CGMCC NO.9206的杂交瘤细胞株和由该细胞株分泌得到的抗氟苯尼考的单克隆抗体及其应用。本发明还提供了一种免疫吸附剂，该免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗体，所述抗体包括上述单克隆抗体和抗苯巴比妥的抗体。本发明还提供了装载该免疫吸附剂的免疫亲和柱。本发明还提供了含有上述免疫吸附剂或免疫亲和柱的试剂盒，以及上述免疫吸附剂、免疫亲和柱或试剂盒在纯化和/或检测氟苯尼考和苯巴比妥中的应用，并提供了纯化方法和检测方法。通过使用本发明提供的产品和方法实现了对氟苯尼考和苯巴比妥的同时纯化和/或检测。

A
CN 106754733 A



1. 一种杂交瘤细胞株,其特征在于,该杂交瘤细胞株的保藏编号为 CGMCC NO. 9206。
2. 由权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株分泌得到的单克隆抗体。
3. 权利要求 2 所述的单克隆抗体在纯化和 / 或检测氟苯尼考中的应用。
4. 一种免疫吸附剂,其特征在于,该免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗体,所述抗体包括权利要求 2 所述的单克隆抗体和抗苯巴比妥的抗体;其中,所述抗苯巴比妥的抗体优选为由保藏编号为 CGMCCNO. 9203 的杂交瘤细胞株分泌得到的单克隆抗体;
优选地,在所述免疫吸附剂中,权利要求 2 所述的单克隆抗体与抗苯巴比妥的抗体的重量比为 1:0.8-2,优选为 1:1-2。
5. 装载有权利要求 4 所述的免疫吸附剂的免疫亲和柱。
6. 含有权利要求 4 所述的免疫吸附剂或含有权利要求 5 所述的免疫亲和柱的试剂盒;
优选地,所述试剂盒中还包括洗脱液和 / 或保存液,所述洗脱液优选为甲醇、乙腈和丙酮中的至少一种,所述保存液优选为含有 0.001-0.1 重量% 的 NaN₃ 的 PBS 缓冲液。
7. 权利要求 4 所述的免疫吸附剂、权利要求 5 所述的免疫亲和柱、或权利要求 6 所述的试剂盒在纯化和 / 或检测氟苯尼考和苯巴比妥中的应用。
8. 一种纯化氟苯尼考和苯巴比妥的方法,该方法包括:使含有氟苯尼考和苯巴比妥的液体样品通过权利要求 5 所述的免疫亲和柱,使得所述液体样品中的至少部分氟苯尼考和至少部分苯巴比妥吸附至该免疫亲和柱上,然后用洗脱液将所述至少部分氟苯尼考和至少部分苯巴比妥洗脱下来,所述洗脱液优选为甲醇、乙腈和丙酮中的至少一种。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述含有氟苯尼考和苯巴比妥的液体样品为饲料的液体提取物、食品的液体提取物、生物样品的液体提取物和中药的液体提取物中的至少一种;
优选地,在所述含有氟苯尼考和苯巴比妥的液体样品中,氟苯尼考的浓度为 1-100 μg/L,优选为 1.5-50 μg/L,更优选为 2.5-10 μg/L;苯巴比妥的浓度为 1-100 μg/L,优选为 1.5-50 μg/L,更优选为 2.5-10 μg/L。
10. 一种检测氟苯尼考和苯巴比妥的方法,该方法包括以下步骤:(1) 根据权利要求 8 或 9 所述的方法制备得到待测液,所述待测液为使用洗脱液将所述至少部分氟苯尼考和至少部分苯巴比妥洗脱下来而得到的溶液;(2) 使所述待测液进入检测系统,并通过与标准品比较进行定性或定量检测。

氟苯尼考杂交瘤细胞株和单克隆抗体及复合免疫吸附剂和 免疫亲和柱与试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种杂交瘤细胞株、由该杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体及其应用，由该抗体制得的免疫吸附剂，以及装载该免疫吸附剂的免疫亲和柱和试剂盒，及其它它们在纯化和 / 或检测氟苯尼考和苯巴比妥中的应用。

背景技术

[0002] 氟苯尼考为广谱抗菌药，被广泛应用于畜牧、水产养殖业。氟苯尼考是上世纪 80 年代研发的氯霉素类广谱抗生素，是氯霉素禁用后的替代药物。但随着使用的增多和研究的进展，研究发现其会在动物性食品中残留，人类食用该动物性食品后会对健康造成影响，例如，对造血功能造成危害。苯巴比妥具有镇静、催眠、抗惊厥作用，并且可以抗癫痫，对癫痫大发作与局限性发作及癫痫持续状态具有良好的效果；对癫痫小发作疗效差；而对精神运动性发作则往往无效，且单用本药治疗时还可能使发作加重。苯巴比妥还有增强解热镇痛药之作用，并能诱导肝脏微粒体葡萄糖醛酸转移酶活性，促进胆红素与葡萄糖醛酸结合，降低血浆胆红素浓度，治疗新生儿高胆红素血症（脑核性黄疸）。不良反应包括：(1) 用药后出现头晕、困倦等后遗效应，久用可产生耐受性及依赖性，多次连用需要警惕蓄积中毒；(2) 少数患者可出现皮疹、药热、剥脱性皮炎等过敏反应。

[0003] 目前，几乎没有关于同时检测氟苯尼考和苯巴比妥的方法，仅有少量关于氟苯尼考和苯巴比妥的单独检测方法的报道，主要为酶联免疫法 (ELISA)、液相色谱法、液相色谱串联质谱法等。然而，酶联免疫法具有特异性不强，线性范围小，且很容易出现假阳性和假阴性结果的缺点；而液相色谱法和液相色谱串联质谱法的样品前处理操作繁琐，灵敏度受样品的纯化、浓缩等步骤的影响较大，并且需要使用如丙酮或二氯甲烷等有毒的试剂。因此，有必要寻找一种尽量少使用有毒试剂的氟苯尼考和苯巴比妥的定量检测方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服上述用于氟苯尼考和苯巴比妥含量检测的方法所具有的缺陷，提供一种杂交瘤细胞株、由该杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体，由该抗体制得的免疫吸附剂及其在纯化和 / 或检测氟苯尼考和苯巴比妥中的应用，以及装载该免疫吸附剂的免疫亲和柱 (IAC) 和试剂盒，及其它它们在纯化和 / 或检测氟苯尼考和苯巴比妥中的应用，以及提供一种纯化氟苯尼考和苯巴比妥的方法和一种检测氟苯尼考和苯巴比妥的方法。

[0005] 第一方面，本发明提供了一种杂交瘤细胞株，其中，该杂交瘤细胞株的保藏编号为 CGMCC NO. 9206。

[0006] 第二方面，本发明提供了由上述杂交瘤细胞株分泌得到的单克隆抗体。

[0007] 第三方面，本发明提供了上述单克隆抗体在纯化和 / 或检测氟苯尼考中的应用。

[0008] 第四方面，本发明提供了一种免疫吸附剂，其特征在于，该免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗体，所述抗体包括上述抗氟苯尼考的抗体和抗苯巴比妥的抗

体。

[0009] 第五方面,本发明提供了一种装载有上述免疫吸附剂的免疫亲和柱。

[0010] 第六方面,本发明提供了一种含有上述免疫吸附剂或上述免疫亲和柱的试剂盒。

[0011] 第七方面,本发明提供了上述免疫吸附剂、上述免疫亲和柱、或上述试剂盒在纯化和 / 或检测氟苯尼考和苯巴比妥的应用。

[0012] 第八方面,本发明提供了一种纯化氟苯尼考和苯巴比妥的方法,该方法包括,使含有氟苯尼考和苯巴比妥的液体样品通过上述免疫亲和柱,使得所述液体样品中的至少部分氟苯尼考和至少部分苯巴比妥吸附至该免疫亲和柱上,然后用洗脱液将所述至少部分氟苯尼考和至少部分苯巴比妥洗脱下来。

[0013] 第九方面,本发明提供了一种检测氟苯尼考和苯巴比妥的方法,该方法包括以下步骤:(1)根据上述纯化氟苯尼考和苯巴比妥的方法制备得到待测液,所述待测液为使用洗脱液将所述至少部分氟苯尼考和至少部分苯巴比妥洗脱下来而得到的溶液;(2)使所述待测液进入检测系统,并通过与标准品比较进行定性或定量检测。

[0014] 本发明建立了免疫亲和层析 - 液相色谱法检测氟苯尼考和苯巴比妥的方法,当含有氟苯尼考和苯巴比妥的样品通过装载有本发明提供的免疫吸附剂的免疫亲和柱时,免疫吸附剂可以特异性地吸附氟苯尼考和苯巴比妥,其它的杂质则流出免疫亲和柱,然后使用洗脱剂将氟苯尼考和苯巴比妥从免疫亲和柱中洗脱下来,从而使样品得到了很好的纯化;进一步地,将洗脱后得到的溶液进入检测系统,并通过与标准品比较进行定性或定量检测。综上所述,通过使用本发明提供的产品和方法实现了对氟苯尼考和苯巴比妥的同时纯化和 / 或检测。免疫亲和层析 - 液相色谱法由于采用了先进的生物技术,不仅可以检测出许多商品中的氟苯尼考和苯巴比妥的含量,而且其具有特异性强且无需使用如丙酮或二氯甲烷等有毒的试剂等优点。进一步地,在免疫亲和层析 - 液相色谱法中,还可以将抗氟苯尼考的抗体和抗苯巴比妥的抗体装载在同一亲和柱上,这样通过一次提取、纯化和富集过程,即可以完成两种目标物的纯化和富集,大大简化了前处理过程,提高了检测效率。

[0015] 本发明的其它特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

[0016] 生物保藏

[0017] 本发明提供的杂交瘤细胞株为抗氟苯尼考单克隆抗体细胞,保藏编号为 CGMCC NO. 9206。该杂交瘤细胞株已于 2014 年 5 月 5 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(缩写为 CGMCC,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,邮政编码:100101)。

[0018] 保藏编号为 CGMCC NO. 9203 的杂交瘤细胞株为抗苯巴比妥单克隆抗体细胞,已于 2014 年 5 月 5 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(缩写为 CGMCC,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,邮政编码:100101)。

附图说明

[0019] 附图是用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与下面的具体实施方式一起用于解释本发明,但并不构成对本发明的限制。在附图中

[0020] 图 1 为在本发明的实施例 1 中饲料液体样品中氟苯尼考的液相色谱图;

[0021] 图 2 为在本发明的实施例 1 中饲料液体样品中苯巴比妥的液相色谱图。

具体实施方式

[0022] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明，并不用于限制本发明。

[0023] 本发明提供一种杂交瘤细胞株，其中，该杂交瘤细胞株的保藏编号为 CGMCC NO. 9206。

[0024] 本发明还提供由上述杂交瘤细胞株分泌得到的单克隆抗体。其中，该单克隆抗体可以为抗氟苯尼考的抗体。

[0025] 根据本发明，本发明提供的上述单克隆抗体可以应用于纯化和 / 或检测氟苯尼考。

[0026] 在本发明中，保藏编号为 CGMCC NO. 9206 的杂交瘤细胞株及其分泌得到的单克隆抗体的制备方法可以为本领域常规的制备方法，例如，首先将氟苯尼考半抗原与载体蛋白偶联，制备作为免疫原，然后将该免疫原对小鼠进行免疫，通过将脾细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合和杂交瘤细胞克隆化筛选得到所需的杂交瘤细胞株以及由其分泌的单克隆抗体。其中，所述载体蛋白可以为牛血清蛋白或卵清蛋白；在优选情况下，所述免疫原与载体蛋白的相对用量可以为本领域常规的选择，例如，所述免疫原与载体蛋白的摩尔比优选为 30-40:1，更优选为 35 :1。

[0027] 在一种优选的实施方式中，上述保藏编号为 CGMCC NO. 9206 的杂交瘤细胞株和单克隆抗体的制备方法可以包括以下步骤：

[0028] (1) 制备氟苯尼考免疫原

[0029] 将氟苯尼考溶于有机溶剂中，然后除去有机溶剂（如挥发干燥），以得到氟苯尼考半抗原；然后将上述氟苯尼考半抗原与载体蛋白偶联，制备得到氟苯尼考免疫原。在优选的情况下，所述有机溶剂为吡啶，所述载体蛋白为牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清蛋白。

[0030] (2) 制备杂交瘤细胞和抗氟苯尼考的单克隆抗体

[0031] 动物免疫：使用氟苯尼考免疫原对免疫动物进行免疫，具体为将氟苯尼考免疫原加入弗氏完全佐剂，制成乳化剂进行免疫，之后佐剂改用不完全佐剂，免疫动物数次，免疫结束后处死动物，取脾细胞。

[0032] 细胞融合：将被免疫小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合试验，优选情况下，被免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞的比例为 8-12:1，更优选为 9-11:1。

[0033] 杂交瘤细胞克隆化：采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，直到得到对氟苯尼考有很好的特异性反应的细胞。最后，筛选出分泌氟苯尼考抗体的杂交瘤细胞 CGMCC NO. 9206，培养该杂交瘤细胞即可制备出抗氟苯尼考的单克隆抗体。

[0034] 本发明还提供了一种免疫吸附剂，其特征在于，该免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗体，所述抗体包括由上述保藏编号为 CGMCC NO. 9206 的杂交瘤细胞株分泌得到的单克隆抗体（抗体 A）和抗苯巴比妥的抗体（抗体 B）。

[0035] 在本发明中，对所述抗体 B 没有特别的限定，可以为本领域的常规选择，例如，可以为市售的各种抗苯巴比妥的抗体，优选地，抗苯巴比妥的抗体制备的免疫亲和柱的回收率大于 80%。进一步优选地，抗体 B 为由保藏编号为 CGMCC NO. 9203 的杂交瘤细胞株分泌得到的单克隆抗体。

[0036] 在本发明中，所述固相载体可以为本领域常规的各种适用于与抗体进行偶联的固相载体，例如为纤维素、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、多孔玻璃、琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺-琼脂糖凝胶中的至少一种，优选为溴化氰(CNBr)活化的琼脂糖凝胶；所述琼脂糖凝胶的浓度可以为常规的各种选择，如4%。该CNBr活化的琼脂糖凝胶可以以干粉形式商购获得，如购自美国GE公司，使用时，加入酸溶液进行溶胀即可，该酸处理方法已为本领域技术人员公知，在此不再赘述。当使用冻干形式并含有添加剂的CNBr活化的琼脂糖凝胶时，优选在低pH值（如pH值为2-3）的条件下洗去添加剂，然后再与抗体进行偶联。

[0037] 在本发明中，所述将抗体A和抗体B与固相载体偶联的方法可以为本领域常规的方法，在优选的情况下，该方法可以包括以下步骤：

[0038] (1) 使用偶联缓冲液溶解抗体，所述抗体为抗体A和抗体B，得到第一抗体溶液；

[0039] (2) 将所述第一抗体溶液与活化的固相载体接触进行偶联，得到偶联液；

[0040] (3) 将偶联液中偶联后的固相载体转移至偶联缓冲液中静置，以封闭偶联液中偶联后的固相载体上的残留活性位点；

[0041] (4) 用洗涤液洗涤静置后的固相载体，以去除未偶联的抗体，得到洗涤后的固相载体；

[0042] (5) 用含有0.001-0.1重量%的NaN₃的PBS缓冲液清洗洗涤后的固相载体。

[0043] 在本发明中，对所述抗体和固相载体的用量比没有特别的限定，一般地，使所述抗体与固相载体尽可能饱和偶联，因此，所述抗体一般过量于固相载体。但是，本领域技术人员也可以根据需要选择抗体与固相载体的用量比。本发明中，所述抗体与固相载体的重量比优选为1:30-60，优选为1:40-55。

[0044] 在优选情况下，在所述免疫吸附剂中，抗体A与抗体B的重量比为1:0.8-2，优选为1:1-2。

[0045] 在本发明中，在步骤(1)中，所述偶联缓冲液可以为本领域常规的各种选择，如0.1-0.3M的NaHCO₃溶液，pH值可以为8-8.5。

[0046] 在本发明中，在步骤(2)中，所述偶联的条件和偶联方法可以为常规的选择，例如，可以在20-25℃条件下，采用翻转式(end-over-end)的方法将抗体与固相载体充分均匀混合1-24小时。

[0047] 在本发明中，在步骤(3)中，所述封闭偶联液中偶联后的固相载体上的残留活性位点的方法也可以为本领域的常规方法，例如，可以将固相载体转移至0.05-1M的Tris-HCl缓冲液(pH 8)或者0.8-1.2M的乙醇胺(pH 8-8.5)中静置，其中，所述静置的条件可以为，在4-25℃下静置2-20h，优选为在20-25℃下静置2-6h或者在4-6℃下静置16-20h。

[0048] 在本发明中，在步骤(4)中，所述用洗涤液洗涤静置后的固相载体中的洗涤液可以为低、高两种pH值的缓冲液，在优选情况下，可以为pH 4-4.5的醋酸盐缓冲液和pH 8-8.5的Tris-HCl缓冲液；所述洗涤的条件只要使得未偶联的抗体基本被除去即可，在优选情况下，按照依次用低、高pH的缓冲液洗涤的顺序至少洗涤3个循环。

[0049] 在本发明中，可以通过测量未偶联的抗体的量来计算两种抗体总的偶联率，偶联率计算公式为：

$$[0050] \text{ 偶联率} (\%) = \frac{\text{偶联前抗体总量 (A+B)} - \text{未偶联的抗体量 (A+B)}}{\text{偶联前抗体总量 (A+B)}} \times 100\% \quad \text{公}$$

式 I

[0051] 所述测量未偶联的抗体的量的方法可以为本领域常规的方法,例如,可以通过紫外测定偶联后的上清液中的蛋白浓度。

[0052] 本发明还提供了装载有上述免疫吸附剂的免疫亲和柱。其中,将免疫吸附剂制备成免疫亲和柱的方法为本领域技术人员公知。例如,将经上述步骤(5)清洗后的固相载体装柱。所述含有0.001-0.1重量%的NaN₃的PBS缓冲液(PBS缓冲液的组成为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)可以作为该免疫亲和柱的保存液。

[0053] 在本发明中,装柱的方法可以为本领域的常规选择,例如可以为:将凝胶和保存液进行混合以制成浆液,以连续性的操作向柱内倾入浆液进行填柱。填柱后,插入顶端筛板至亲和柱中,并使用经无菌过滤的保存液过柱。

[0054] 本发明还提供了含有上述免疫吸附剂或含有上述免疫亲和柱的试剂盒。优选地,所述试剂盒中还包括洗脱液和/或保存液。所述洗脱液优选为甲醇、乙腈和丙酮中的至少一种,最优选为色谱级甲醇。所述保存液优选为含有0.001-0.1重量%的NaN₃的PBS缓冲液。

[0055] 在本发明中,上述试剂盒还可以包括盒体、氟苯尼考和苯巴比妥的标准品、洗涤液、海绵托架中的至少一种。其中,所述洗涤液可以为常规使用的磷酸盐缓冲液(即1L水中含有0.2g磷酸二氢钾、0.2g氯化钾、2.9g十二水合磷酸氢二钠和8.8g氯化钠的溶液)或水;所述海绵托架上设有孔和凹槽,所述凹槽中装有上述标准品溶液、装有上述各种溶液的试剂瓶,以及装有上述免疫吸附剂的免疫亲和柱。

[0056] 本发明还提供了上述免疫吸附剂、上述免疫亲和柱、或上述试剂盒在纯化和/或检测氟苯尼考和苯巴比妥中的应用。

[0057] 本发明还提供了一种纯化氟苯尼考和苯巴比妥的方法,该方法包括:使含有氟苯尼考和苯巴比妥的液体样品通过上述免疫亲和柱,使得所述液体样品中的至少部分(或全部)氟苯尼考和至少部分(或全部)苯巴比妥吸附至该免疫亲和柱上,然后用洗脱液将所述至少部分氟苯尼考和至少部分苯巴比妥洗脱下来。所述洗脱液优选为甲醇、乙腈和丙酮中的至少一种,优选为色谱纯甲醇。

[0058] 在本发明中,上述纯化氟苯尼考和苯巴比妥的方法还可以包括在洗脱液洗脱之前,用洗涤液对免疫亲和柱进行洗涤,以除去免疫亲和柱上非特异性吸附的残余的液体样品。所述洗涤液可以为水、磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液)和甲醇中的至少一种。

[0059] 根据本发明,所述含有氟苯尼考和苯巴比妥的液体样品为饲料的液体提取物、食品的液体提取物、生物样品的液体提取物和中药的液体提取物中的至少一种,优选为饲料的液体提取物。

[0060] 在本发明中,将所述饲料、食品、生物制品和中药制成液体提取物的方法可以为本领域常规的方法,例如,可以包括以下步骤:将乙腈/水(6.5-7.5:3,体积比)与样品(饲料、食品、生物制品或中药)混合进行萃取,将萃取液进行固液分离即得到液体提取物。优选地,所述固液分离的方式包括:使用槽纹滤纸进行过滤,将得到的滤液稀释(如使用磷酸

盐缓冲液稀释 5 倍) 后再用玻璃纤维滤纸进行二次过滤。

[0061] 根据本发明,在优选的情况下,在所述含有氟苯尼考和苯巴比妥的液体样品中,氟苯尼考的浓度可以为 1-100 $\mu\text{g}/\text{L}$,优选为 1.5-50 $\mu\text{g}/\text{L}$,更优选为 2.5-10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。苯巴比妥的浓度可以为 1-100 $\mu\text{g}/\text{L}$,优选为 1.5-50 $\mu\text{g}/\text{L}$,更优选为 2.5-10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[0062] 本发明还提供了一种检测氟苯尼考和苯巴比妥的方法,该方法包括以下步骤:

[0063] (1) 根据上述方法制备得到待测液,所述待测液为使用洗脱液将所述至少部分氟苯尼考和至少部分苯巴比妥洗脱下来而得到的溶液;

[0064] (2) 使所述待测液进入检测系统,并通过与标准品比较进行定性或定量检测。

[0065] 在本发明中,对于检测的具体方式没有特别的限定,例如,可以是先收集得到待测液,然后再手动使待测液进入检测系统,也可以为连用系统,使待测液自动进入检测系统进行检测。其中,所述检测系统可以为本领域常规的各种用于分析检测的仪器,优选使用液相色谱仪。

[0066] 在本发明中,在步骤(2)中,所述“与标准品比较”的方法可以为本领域的常规方法,例如,首先通过液相色谱对准确配置成一定浓度的标准品进行检测,确定该标准品的特征峰位置以及峰面积(或峰高)与浓度之间的关系;然后,在同样条件下对待测液进行检测,通过与标准品出峰位置的比较,确认待测液中是否存在与标准品相同的物质,通过与标准品的峰面积(或峰高)的比较,确定待测液中与标准品相同的物质和 / 或其含量。

[0067] 以下将通过实施例对本发明进行详细描述。以下实施例中,室温指 25℃。

[0068] 制备例 1

[0069] 本制备例用于制备氟苯尼考免疫原

[0070] 准确称量氟苯尼考 10mg,溶于 1000 μL 吡啶中,加入 104mg 丁基硼酸。混合物在室温下搅拌 20h。然后在搅拌的情况下加入 1.7mol/L 琥珀酰吡啶溶液 2000 μL ,反应管密闭,混合物在沸水浴中搅拌反应 3h,然后将溶剂吡啶在 100℃ 氮气下挥发干燥,以得到半抗原。

[0071] 分别称取 N,N-二环己碳二亚胺 8mg、N-羟基琥珀酰亚胺 15mg,和上述步骤制备得到的半抗原溶于 1000 μL 的二甲基甲酰胺(DMF) 中,室温搅拌 2h,以得到半抗原溶液;并称取 5mg BSA 溶于 2mL pH7.0 PBS 缓冲液中,然后在搅拌的同时缓慢滴加 400 μL 半抗原溶液。4℃下缓慢搅拌反应 24h。用 pH7.0 PBS 溶液透析 3d,每天换透析液 3 次,以得到氟苯尼考免疫原。

[0072] 制备例 2

[0073] 本制备例用于制备抗氟苯尼考的单克隆抗体(抗体 A)

[0074] (1) 抗氟苯尼考的单克隆抗体的制备

[0075] 动物免疫:免疫动物为 6-8 周龄左右的雌性 BALB/c 小鼠。使用氟苯尼考免疫原免疫 5 只小鼠。取适量氟苯尼考免疫原(100mg/只)加等量弗氏完全佐剂,制成乳化剂进行免疫,之后佐剂改为不完全佐剂,共免疫 6 次,每次间隔 2 周。除第一次为颈背部皮下多点注射外,其余均为腹腔注射。免疫结束后处死小鼠,取脾细胞。

[0076] 细胞融合:被免疫小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞按照 10:1 的比例进行细胞融合试验。

[0077] 杂交瘤细胞克隆化:采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞,直到得到对氟苯尼考有很好的特异性反应的细胞。最后,筛选出分泌氟苯尼考抗体的杂交瘤细胞 CGMCC NO. 9206,

并参照《精编蛋白质科学实验指南》(科利根等人,科学出版社,2007)第8章从细胞 CGMCC NO. 9206 的培养液中提取和纯化单克隆抗体,获得纯化的抗体 A(或参照 CN 101560255A 中权利要求 2 记载的方法获得)。

[0078] (2) 抗苯巴比妥的单克隆抗体的制备

[0079] 按照上述步骤(1)中描述的杂交瘤细胞克隆化的方法,从保藏编号为 CGMCC NO. 9203 的细胞培养液中提取和纯化单克隆抗体,获得纯化的抗体 B。

[0080] 制备例 3

[0081] 本制备例用于制备免疫亲和柱

[0082] (1) 抗体偶联

[0083] a、用 0.1moI/L NaHCO₃pH 8.3 偶联缓冲液 4℃透析抗体 A 和抗体 B 24h,抗体 A 与抗体 B 的重量比为 1:1.5,然后用偶联缓冲液控制抗体总浓度,约 2mg/mL,以备偶联使用。使用 10mL 偶联缓冲液洗涤溶涨后的经 CNBr 活化的琼脂糖凝胶 (Sepharose 4B),洗涤后,迅速将 CNBr 活化的 Sepharose4B 转移到抗体溶液中。2g 基质 Sepharose 4B 与 10mg 单克隆抗体偶联。

[0084] b、室温条件 (25℃) 下采用 end-over-end 的方式充分混匀上述的混合物 2h。

[0085] c、2000rpm 离心 1min,将 Sepharose 4B 离心至管底,将上清液转移至新的离心管中,冰浴保存,测定上清液中蛋白质的含量。通过公式 I 计算出抗体 A 和抗体 B 的总偶联率为 99.8%,说明偶联很成功。

[0086] d、取离心管底的 Sepharose 4B,使用至少 5 倍基质体积的偶联缓冲液进行洗涤,除去未偶联的抗体。

[0087] e、封闭所有残留的活性基团。转移基质至 0.1moI/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8)。4℃条件下静置 16h。

[0088] f、为除去未偶联的抗体,依次用低、高两种 pH 的缓冲液对基质进行洗涤,至少洗涤 3 个循环,每种缓冲液的使用量至少 5 倍基质体积。

[0089] 每个洗涤循环步骤:先用 0.1moI/L 醋酸-醋酸钠,含 0.5moI/L NaCl 的缓冲液 (pH 4) 洗涤,接着再用 0.1moI/L Tris-HCl,含 0.5moI/L NaCl 的缓冲液 (pH 8) 进行洗涤。

[0090] (2) 装柱

[0091] 使用保存液制备浆液,以 75% 琼脂糖凝胶和 25% 保存液的比例进行混合。以连续性的操作向柱内倾入浆液。使用一个斜靠在柱内壁上的玻璃棒进行填柱操作,将有助于减少气泡的产生。填柱后,关闭亲和柱下端的开口,并取下亲和柱的顶端部件。仔细操作,加入保存液充填亲和柱的余下部分,以在亲和柱的顶端形成一个向上的弯液面。将顶端筛板以一定的角度插入到亲和柱中,确保在筛板的下方没有空气。将筛板锁定在基质表面适当的位置上,打开亲和柱下方的开口,用 5 倍柱床体积的无菌过滤的保存液过柱,并使用保存液保存,至此,亲和柱已装填并平衡完毕,可供直接使用。

[0092] 实施例 1

[0093] 本实施例用于检测饲料样品中的氟苯尼考和苯巴比妥

[0094] (1) 饲料样品的前处理

[0095] 同时添加质量含量为 50 μg/kg 氟苯尼考和 50 μg/kg 苯巴比妥、100 μg/kg 氟苯尼考和 100 μg/kg 苯巴比妥、或 200 μg/kg 氟苯尼考和 200 μg/kg 苯巴比妥至饲料样品中,磨

细添加后的饲料样品（粒度小于 1mm）并准确称取 25g 于 250mL 具塞锥形瓶中，加入 100mL 乙腈 / 水 (7:3, v/v) 溶液，以均质器高速搅拌提取 2min。槽纹滤纸过滤，准确移取 5mL 滤液于 25mL 容量瓶中，用 pH7.4 的 PBS 定容至 25mL，用玻璃纤维滤纸过滤，至滤液澄清，以制得液体样品。

[0096] (2) 加标回收实验

[0097] 将复合免疫亲和柱连接于 10mL 玻璃注射器下。准确移取 8mL 液体样品提取液注入玻璃注射器中，将空气压力泵与玻璃注射器连接，调节压力使溶液以约 2mL/min(1 滴 / 秒) 流速缓慢通过复合免疫亲和柱，直至 2mL 空气通过柱体。以 2mL/min(1 滴 / 秒) 流速用 10mL 水淋洗柱子 1 次，弃去全部流出液，并使 2mL 空气通过柱体。准确加入 2mL 色谱级甲醇洗脱，流速为 2mL/min(1 滴 / 秒)，收集全部洗脱液于玻璃试管中，50℃ 下氮气浓缩吹干后，用流动相定容至 0.5mL，供高效液相色谱 (HPLC) 分析。

[0098] (3) 高效液相色谱检测

[0099] HPLC 条件：

[0100] 氟苯尼考的色谱条件可以为：

[0101] 色谱柱 :Cloversil-C18, 4.6×250mm

[0102] 流动相：乙腈：水 = 27:73 (v/v)

[0103] 流速 :0.8mL/min

[0104] 检测器 :紫外检测器，波长 223nm

[0105] 进样量 :50 μ L

[0106] 苯巴比妥的色谱条件可以为：

[0107] 色谱柱 :Cloversil-C18, 4.6×250mm

[0108] 流动相：甲醇：水 = 50:50 (v/v)

[0109] 流速 :0.8mL/min

[0110] 检测器 :紫外检测器，波长 254nm

[0111] 进样量 :50 μ L

[0112] 用进样器吸取 50 μ L 饲料液体样品注入高效液相色谱仪，在上述色谱条件下测定饲料液体样品的响应值（峰高或峰面积）。

[0113] 图 1 为饲料样品（添加 100 μ g/kg 氟苯尼考和 100 μ g/kg 苯巴比妥）中氟苯尼考添加回收实验的液相色谱图；

[0114] 图 2 为饲料样品（添加 100 μ g/kg 氟苯尼考和 100 μ g/kg 苯巴比妥）中苯巴比妥品添加回收实验的液相色谱图。

[0115] 根据公式 II 计算添加回收率。

$$\text{添加回收率} = \frac{\text{检测出的某物质的量}}{\text{最初添加的该物质的量}} \times 100\% \quad \text{公式 II}$$

[0117] 检测结果如表 1 和表 2 所示。其中，表 1 中表示的是饲料样品中氟苯尼考的添加回收率和相对标准偏差 (RSD)；表 2 中表示的是饲料样品中苯巴比妥的添加回收率和相对标准偏差 (RSD)。

[0118] 表 1

[0119]

添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 1 (%)	回收率 2 (%)	回收率 3 (%)	回收率 4 (%)	回收率 5 (%)	RSD (%)
50	88.6	84.2	95.6	88.3	80.5	6.45
100	88.5	92.1	86.8	92.6	91.3	2.77
200	96.5	92.6	91.7	91.2	88.9	3.01

[0120] 表 2

[0121]

添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 1 (%)	回收率 2 (%)	回收率 3 (%)	回收率 4 (%)	回收率 5 (%)	RSD (%)
50	87.5	91.7	86.9	88.6	81.2	4.38
100	87.9	89.6	91.3	89.1	91.6	1.72
200	93.3	96.9	92.5	93.9	94.5	1.77

[0122] 由表 1 和表 2 的检测结果可以看出, 饲料样品中的氟苯尼考和苯巴比妥的添加回收率都在 80.5–96.9% 之间, RSD 均小于 7%, 这表明本发明提供的方法完全满足饲料中氟苯尼考和苯巴比妥检测的分析要求。

[0123] 以上详细描述了本发明的优选实施方式, 但是, 本发明并不限于上述实施方式中的具体细节, 在本发明的技术构思范围内, 可以对本发明的技术方案进行多种简单变型, 这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0124] 另外需要说明的是, 在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征, 在不矛盾的情况下, 可以通过任何合适的方式进行组合。为了避免不必要的重复, 本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0125] 此外, 本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合, 只要其不违背本发明的思想, 其同样应当视为本发明所公开的内容。

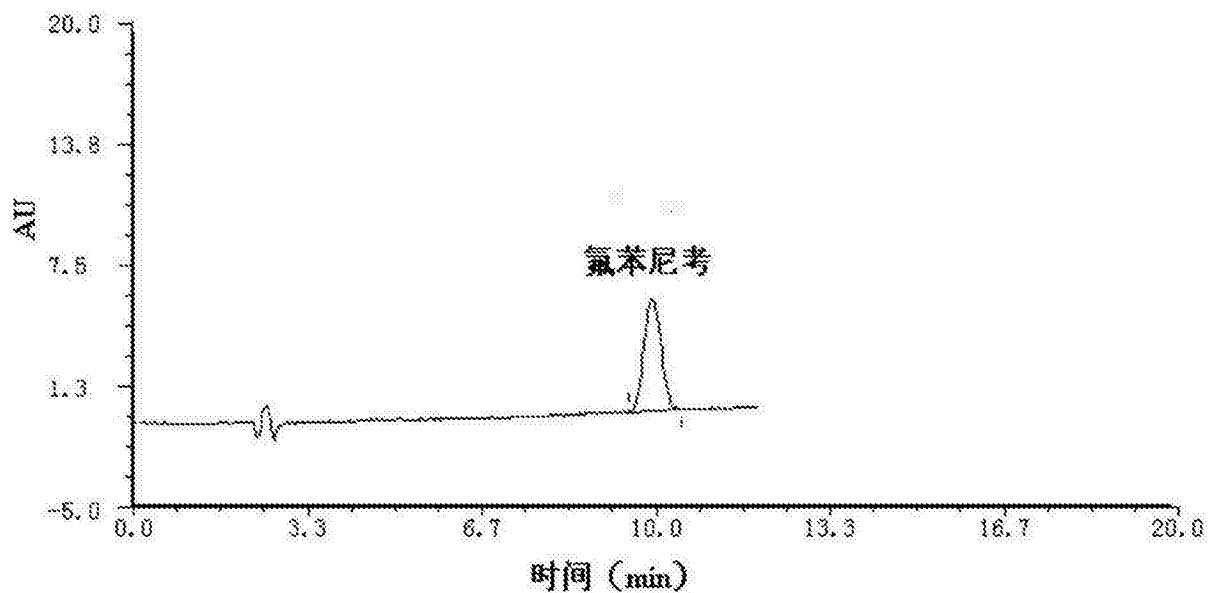


图 1

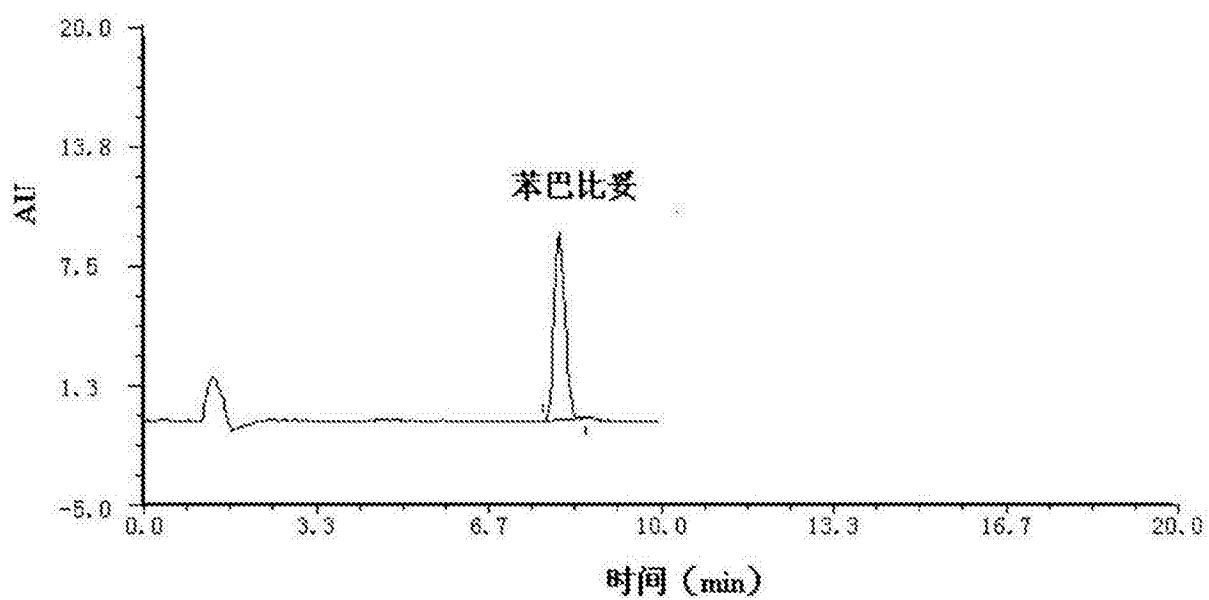


图 2

专利名称(译)	氟苯尼考杂交瘤细胞株和单克隆抗体及复合免疫吸附剂和免疫亲和柱与试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN106754733A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201510812395.X	申请日	2015-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心 北京中检维康生物技术有限公司 中检维康湖北食品安全科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心 北京中检维康生物技术有限公司 中检维康(湖北)食品安全科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心 北京中检维康生物技术有限公司 中检维康(湖北)食品安全科技有限公司		
[标]发明人	陈冬东 代汉慧 章骅 王伟 果旗 王雄 姚佳 王彦斐 陈旭光		
发明人	陈冬东 代汉慧 章骅 王伟 果旗 王雄 姚佳 王彦斐 陈旭光		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/531 B01J20/24 B01J20/30 B01J20/281 B01D15/10 C07C317/32 C07C315/06 C07D239/62		
代理人(译)	严政 李婉婉		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种保藏编号为CGMCC NO.9206的杂交瘤细胞株和由该细胞株分泌得到的抗氟苯尼考的单克隆抗体及其应用。本发明还提供了一种免疫吸附剂，该免疫吸附剂包括固相载体和与该固相载体偶联的抗体，所述抗体包括上述单克隆抗体和抗苯巴比妥的抗体。本发明还提供了装载该免疫吸附剂的免疫亲和柱。本发明还提供了含有上述免疫吸附剂或免疫亲和柱的试剂盒，以及上述免疫吸附剂、免疫亲和柱或试剂盒在纯化和/或检测氟苯尼考和苯巴比妥中的应用，并提供了纯化方法和检测方法。通过使用本发明提供的产品和方法实现了对氟苯尼考和苯巴比妥的同时纯化和/或检测。

