



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110196321 A

(43)申请公布日 2019. 09. 03

(21)申请号 201910514467.0

B01D 15/10(2006.01)

(22)申请日 2019.06.14

(71)申请人 中国计量科学研究院

地址 100029 北京市朝阳区北三环东路18
号

(72)发明人 谢洁 龚晓云 翟睿 黄泽建
刘梅英 曾伟杰 江游 戴新华
方向

(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 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

B01D 15/26(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

OLA和MQCA免疫亲和柱及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明涉及喹噁啉类化合物的检测,具体涉及OLA和MQCA免疫亲和柱及其制备方法与应用。本发明提供的OLA和MQCA免疫亲和柱,包括偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质;所述固相介质为CNBr活化的Sephrose 4B;它是由CNBr活化的Sephrose 4B经溶胀后分别与OLA和MQCA的mAb偶联,然后对未偶联的活化位点进行封闭后而获得分别偶联有OLA、MQCA单克隆抗体的固相介质。本发明提供一种OLA和MQCA免疫亲和柱,可以对目标物进行高效净化,回收率高、操作简单。

1. 一种OLA和MQCA免疫亲和柱,其特征在于,包括位于上部的偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和位于下部的偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质,二者以筛板隔开;所述固相介质为CNBr活化的Sepharose 4B。

2. 根据权利要求1所述的OLA和MQCA免疫亲和柱,其特征在于,所述免疫亲和柱中装填的所述偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质的厚度均为50mm。

3. 一种OLA和MQCA免疫亲和柱的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 基质制备:取适量溴化氰活化的琼脂糖干粉Sepharose 4B用1mM盐酸使其溶胀,抽滤,使用1mM HCl洗涤;

(2) 偶联:使用偶联缓冲液(0.1mol/L NaHCO₃,0.5mol/L NaCl,pH 8.4)洗涤溶胀后的经CNBr活化的Sepharose 4B;洗涤后,迅速将CNBr活化的Sepharose 4B分别转移到含有适量OLA单克隆抗体的偶联缓冲液中及MQCA单克隆抗体的偶联缓冲液中;混匀,柔和震荡反应;

用所述偶联缓冲液分别洗去未偶联的OLA单克隆抗体、MQCA单克隆抗体,分别得到琼脂糖-OLA单抗偶联复合物和琼脂糖-MQCA单抗偶联复合物;

(3) 封闭活性基团:将所得琼脂糖-OLA单抗偶联复合物和琼脂糖-MQCA单抗偶联复合物分别转入0.1M Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中,封闭所有残留的活性基团;

(4) 洗涤:依次用0.1mol/L醋酸-醋酸钠,pH 4.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液和0.1mol/L Tris-HCl,pH 8.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液分别洗涤步骤(3)所得琼脂糖-OLA单抗偶联复合物和琼脂糖-MQCA单抗偶联复合物;以除去偶联后未偶联上的多余的配体;洗涤后用200mL PBS充分平衡,分别制得偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质,待用;

(5) 装柱:下层装填偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质,上层装填偶联有OLA单克隆抗体的固相介质。

4. 一种OLA和MQCA免疫亲和柱的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 基质制备:称取1g基质粉末,溶于5mL 1mmol/L HCl中;基质将会立即溶胀,然后置于砂芯漏斗中使用1mmol/L HCl洗涤15min;使用大约1mmol/L HCl 200mL,分次洗涤;

(2) 偶联:

1:使用100mL偶联缓冲液(0.1mol/L NaHCO₃,0.5mol/L NaCl,pH 8.4)洗涤溶胀后的经CNBr活化的Sepharose 4B,洗涤后,迅速将CNBr活化的Sepharose 4B转移到30mL含有适量OLA或MQCA单克隆抗体的偶联缓冲液中;

2:室温条件下采用end-over-end的方式充分混匀上述的混和物2h,或者在4℃下混匀过夜;也可以采用其他较为轻柔缓和的搅拌方法;

3:在4℃5000rpm离心5min,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,用NanoDrop One测定上清液在280nm下的OD值,从而计算偶联率;

4: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,除去多余的配体;

(3) 封闭

1:封闭所有残留的活性基团;转移基质至50mL 0.1mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.0)中;

室温条件下温和搅拌反应2h或者4℃条件下16h;

2'为除去偶联后未偶联上的多余的配体,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;

每个洗涤循环步骤:先用0.1mol/L醋酸-醋酸钠,pH 4.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液洗涤,接着再用0.1mol/L Tris-HCl,pH 8.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液进行洗涤;洗涤后的凝胶用200mL PBS充分平衡,待用;

(4)装柱:采用湿法装柱,装柱缓冲液为0.02%NaN₃-PBS,并用0.02%NaN₃-PBS、4℃保存;取3mL空柱管,装好底层筛板,将2mL PBS缓冲液(0.01mol/L pH 7.4)悬浮的MQCA偶联胶装柱,至胶高度为0.5mL,装入中间层筛板,再将2mL PBS缓冲液(0.01mol/L pH 7.4)悬浮的OLA偶联胶装柱,装入顶层筛板,0.02%NaN₃-PBS平衡,用塞子和帽子封住底端和上端口,冰箱4℃保存。

5.根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述OLA和MQCA单克隆抗体通过如下步骤获取:

1)取腹水5mL,加入10mL 0.06mol/L pH5.0的乙酸钠缓冲液,用0.1mol/L HCl调pH至4.8;

2)室温搅拌条件下逐滴加入165μL(11*5*3)辛酸,继续磁力搅拌20min,4℃静置2h,10000rpm4℃离心30min,弃沉淀;

3)上清中加入2mL 0.1mol/L PBS,用1mol/L NaOH调pH至7.4;

4)逐滴加入适量饱和硫酸铵使溶液成45%饱和度(上清液:硫酸铵=1:1,搅拌30min,期间逐滴加完),继续搅拌30min后,4℃静置2h;4℃10000rpm离心30min,弃上清;

5)沉淀溶于5mL pH 7.4的PBS中,透析2天,离心后分装,-20℃保存备用。

6.权利要求3-5任一项所述方法制备的OLA和MQCA免疫亲和柱。

7.权利要求1、2、6任一项所述OLA和MQCA免疫亲和柱的性能评价方法,包括最大容量的测定和溶剂加标回收测定。

8.权利要求1、2、6任一项所述的OLA和MQCA免疫亲和柱在OLA和MQCA检测中的应用。

9.OLA和MQCA的检测方法,其特征在于,采用权利要求1、2、6任一项所述的OLA和MQCA免疫亲和柱,具体方法包括样品前处理和采用HPLC-MS/MS法进行检测。

OLA和MQCA免疫亲和柱及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及喹噁啉类化合物的检测,具体涉及喹乙醇和MQCA免疫亲和柱及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 民以食为天,食以安为先。随着人民生活水平的提高,人们对食品的安全要求越来越高。喹噁啉类化合物(Quinoxaline, QELs)是一类具有抗菌活性的物质,主要通过抑制DNA合成达到抗菌作用,广泛应用于畜禽动物和水生动物疾病的防治,喹乙醇(Olaquinox, OLA)是该类药物的典型代表物质。世界卫生组织和世界粮农组织等已经确定OLA的残留标示物为MQCA(3-甲基喹噁啉-2-羧酸)。目前有关喹噁啉类药物及其代谢物残留检测的仪器分析方法比较多,如气相色谱质谱联用(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱串联质谱联用(LC-MS/MS)。样品前处理主要包括目标物的提取分析和对目标物的分离净化,其中对OLA与MQCA进行有效的富集净化是质谱定量分析的关键。

[0003] 近年来,在净化步骤,新型材料得到了较为广泛的关注和应用。然而由于动物可食性组织中内源性物质多,常规的液液萃取不能有效排除这些物质的干扰,尤其是在使用LC-MS/MS检测时,这些干扰物质会产生严重的基质效应,干扰检测器、增加基线噪音、降低柱效、阻塞色谱管路、污染色谱柱等。因此使用较多的是固相萃取净化方法。免疫前处理方法中免疫亲和层析(Immunoaffinity Chromatography, IAC)是目前发展较为广泛和成熟的分离手段之一。IAC是以抗原与抗体之间的特异性、可逆性结合反应为基础的亲和色谱,该方法具有其他方式不可比拟的选择性和极高的灵敏度(亲和常数高达 10^{10} - 10^{12}),通常只需“加样-洗涤-洗脱”一步层析(one-step system)就可使复杂样品中痕量的特定组分得到高度净化与浓缩,净化后的样品可直接用于GC、HPLC或HPLC-MS/MS分析,同时,IAC柱能方便地获得再生。所以,IAC在食品安全检测中有广泛应用,其优点是回收率高、操作简单、净化效果好等。

发明内容

[0004] 为实现喹噁啉类化合物及其代谢产物的快速检测,本发明提供一种OLA和MQCA双层串联免疫亲和柱,可以对目标物进行高效净化,回收率高、操作简单。

[0005] 具体而言,本发明提供一种OLA和MQCA免疫亲和柱,包括位于上部的偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和位于下部的偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质,二者以筛板隔开;所述固相介质为CNBr活化的Sephacrose 4B。

[0006] 研究发现,相对于直接将偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质混合装填于柱管中,本发明采用将二者以筛板隔开并且将偶联有OLA单克隆抗体的固相介质置于上部的优点在于同种固相介质的均匀分布可以有效避免空间位阻和竞争反应,保证目标物OLA和MQCA的充分吸附,更有利于对复杂样品基质中痕量或超痕量OLA和MQCA的特异性选择和高亲和分离。

[0007] 本发明所述上部是指距离免疫亲和柱上样口近的一端,而所述下部是指距离免疫亲和柱洗脱液出口近的一端。

[0008] 进一步地,免疫亲和柱中装填的所述偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质的厚度均优选为50mm。其优点在于保证充足的CNBr活化的Sephacrose 4B固相介质,偶联足够量的抗体,又不至于过厚而导致过柱堵塞现象。

[0009] 进一步地,本发明OLA和MQCA免疫亲和柱还包括底层筛板,用于承载所述偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质;顶层筛板,位于所述偶联有OLA单克隆抗体的固相介质上方;以及本领域常规组件例如用于封住底端的塞子和用于封住上端口的帽子。

[0010] 具体地,本发明是将由CNBr活化的Sephacrose 4B(琼脂糖凝胶4B)经溶胀后分别与OLA和MQCA的mAb(单克隆抗体)偶联,然后对未偶联的活化位点进行封闭后而获得分别偶联有OLA、MQCA单克隆抗体的固相介质。

[0011] 本发明还提供一种OLA和MQCA免疫亲和柱的制备方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 基质制备:取适量溴化氰活化的琼脂糖干粉Sephacrose 4B用1mM盐酸使其溶胀,抽滤,使用1 mM HCl洗涤;

[0013] (2) 偶联:使用偶联缓冲液(0.1mol/L NaHCO₃,0.5mol/L NaCl,pH 8.4)洗涤步骤1)溶胀后的经CNBr活化的Sephacrose 4B;洗涤后,迅速将CNBr活化的Sephacrose 4B分别转移到含有适量OLA单克隆抗体的偶联缓冲液中及MQCA单克隆抗体的偶联缓冲液中;混匀,柔和震荡反应;

[0014] 用所述偶联缓冲液分别洗去未偶联的OLA单克隆抗体、MQCA单克隆抗体,分别得到琼脂糖-OLA单抗偶联复合物和琼脂糖-MQCA单抗偶联复合物;

[0015] (3) 封闭活性基团:将所得琼脂糖-OLA单抗偶联复合物和琼脂糖-MQCA单抗偶联复合物分别转入0.1M Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中,封闭所有残留的活性基团;

[0016] (4) 洗涤:依次用0.1mol/L醋酸-醋酸钠,pH 4.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液和0.1mol/L Tris-HCl,pH 8.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液分别洗涤步骤(3)所得琼脂糖-OLA单抗偶联复合物和琼脂糖-MQCA单抗偶联复合物;以除去偶联后未偶联上的多余的配体;洗涤后用200mL PBS充分平衡,分别制得偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质,待用;

[0017] (5) 装柱:下层装填偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质,上层装填偶联有OLA单克隆抗体的固相介质。

[0018] 上述制备方法中,偶联步骤较为关键,溴化氰活化的琼脂糖干粉Sephacrose4B经溶胀后应立即与含有单克隆抗体的偶联缓冲液混合。

[0019] 具体地,所述OLA和MQCA免疫亲和柱的制备方法,包括如下步骤:

[0020] (1) 基质制备:称取1g基质粉末(CNBr-Sephacrose 4B,CNBr活化琼脂糖),溶于5mL 1mmol/L HCl中(1g基质5mL 1mmol/L HCl溶胀,可得约3.5mL胶)。基质将会立即溶胀,然后置于砂芯漏斗(孔径:40-60μm)中使用1mmol/L HCl洗涤15min。使用大约1mmol/L HCl 200mL,分次洗涤。

[0021] (2) 偶联:

[0022] 1°使用100mL偶联缓冲液(0.1mol/L NaHCO₃,0.5mol/L NaCl,pH 8.4)洗涤溶胀后的经CNBr活化的Sephacrose 4B,洗涤后,迅速将CNBr活化的Sephacrose4B转移到30mL含有适

量OLA或MQCA单克隆抗体的偶联缓冲液中。

[0023] 2°室温条件(20~25℃)下采用end-over-end的方式充分混匀上述的混和物2h,或者在4℃下混匀过夜。也可以采用其他较为轻柔缓和的搅拌方法。

[0024] 3°在4℃5000rpm离心5min,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,用NanoDrop OneC测定上清液在280nm下的OD值,从而计算偶联率。

[0025] 4°取离心管底的sepharose 4B,使用至少5倍基质(gel)体积的偶联缓冲液进行洗涤,除去多余的配体;

[0026] (4) 封闭

[0027] 1°封闭所有残留的活性基团。转移基质至50mL 0.1mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中。室温条件下温和搅拌反应2h或者4℃条件下16h。

[0028] 2°为除去偶联后未偶联上的多余的配体,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。

[0029] 每个洗涤循环步骤:先用0.1mol/L醋酸-醋酸钠,pH 4.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液洗涤,接着再用0.1mol/L Tris-HCl,pH 8.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液进行洗涤。洗涤后的凝胶用200mL PBS充分平衡,待用;

[0030] (4) 装柱:采用湿法装柱,装柱缓冲液为0.02%NaN₃-PBS,并用0.02%NaN₃-PBS、4℃保存。取3mL空柱管,装好底层筛板,将2mL PBS缓冲液(0.01mol/L pH 7.4)悬浮的MQCA偶联胶装柱,至胶高度为0.5mL,装入中间层筛板,再将2mL PBS缓冲液(0.01mol/L pH 7.4)悬浮的OLA偶联胶装柱,装入顶层筛板,0.02%NaN₃-PBS平衡,用塞子和帽子封住底端和上端口,冰箱4℃保存。

[0031] 上述制备方法中,步骤(2)中,所述OLA和MQCA单克隆抗体通过如下步骤获取:

[0032] 1) 取腹水5mL,加入10mL0.06mol/L pH 5.0的乙酸钠缓冲液,用0.1mol/L HCl调pH至4.8;

[0033] 2) 室温搅拌条件下逐滴加入165μL(11*5*3)辛酸,继续磁力搅拌20min,4℃静置2h,10000rpm 4℃离心30min,弃沉淀;

[0034] 3) 上清中加入2mL 0.1mol/L PBS,用1mol/L NaOH调pH至7.4;

[0035] 4) 逐滴加入适量饱和硫酸铵使溶液成45%饱和度(上清液:硫酸铵=1:1,搅拌30min,期间逐滴加完),继续搅拌30min后,4℃静置2h。4℃10000rpm离心30min,弃上清;

[0036] 5) 沉淀溶于5mL pH 7.4的PBS中,透析2天,离心后分装,-20℃保存备用。

[0037] 本发明还包括上述方法制备的OLA和MQCA免疫亲和柱。

[0038] 本发明进一步提供上述OLA和MQCA免疫亲和柱性能评价方法,它包括最大容量的测定和溶剂加标回收测定。

[0039] 最大容量的测定方法如下:准确量取0.2mL浓度为5000ng/mL的OLA和MQCA混合标准品工作液(相当于1000ng的OLA和MQCA)于20mL PBS溶液中,涡旋混匀,将上述混合液过双层串联复合IAC柱,流速为1mL/min,待全部加载液全部流过小柱后,加20mL超纯水洗涤IAC柱,流速为1.5mL/min,至液体排干,最后,8mL 2%乙酸-甲醇以重力速度洗脱,收集于玻璃试管中,50℃氮气吹干,1mL初始流动相(20%乙腈-水溶液,含0.01%甲酸)复溶,过0.22μm的PTFE滤膜,滤液收集于棕色进样小瓶中,LC-MS/MS进行检测。用计算动态柱容量和绝对柱容量。按下列公式计算动态柱容量和绝对柱容量:

$$[0040] \quad \text{动态柱容量} = \frac{\text{药物浓度} \times \text{体积}}{\text{柱床体积}} \times 100\%$$

$$[0041] \quad \text{绝对柱容量} = \frac{\text{动态柱容量}}{\text{单位体积 IgG 偶联量}} \times 100\%$$

[0042] 溶液加标回收率计算方法如下:准确量取0.1mL浓度为100ng/mL的OLA和MQCA混合标准品工作液(相当于10ng的OLA和MQCA)分别于20mL PBS溶液中,涡旋混匀,将上述混合液过双层串联复合IAC柱,流速为1mL/min,待全部加载液全部流过小柱后,加20mL超纯水洗涤IAC柱,流速为1.5mL/min,至液体排干,最后,8mL 2%乙酸-甲醇以重力速度洗脱,收集于玻璃试管中,50℃氮气吹干,1mL初始流动相(20%乙腈-水溶液,含0.01%甲酸)复溶,过0.22μm的PTFE滤膜,滤液收集于棕色进样小瓶中,LC-MS/MS进行检测。计算回收率。

[0043] 综上,最大容量和溶剂加标回收测定结果如下:本发明OLA和MQCA免疫亲和柱以CNBr-Sepharose 4B为载体,分别偶联OLA-mAb和MQCA-mAb,偶联率均大于90%,对OLA和MQCA的柱容量分别为260和345ng/mL。双层串联复合IAC对OLA和MQCA的回收率大于90.6%,RSDs小于6.6%。

[0044] 本发明还包括上述OLA和MQCA免疫亲和柱在OLA和MQCA检测中的应用。具体可进一步采用HPLC-MS/MS法进行检测。检测样品可为鱼肉等。实验证明,本发明的OLA和MQCA免疫亲和柱尤其适用于鱼肉组织样品中基于检测OLA和MQCA目的的净化处理。

[0045] 本发明还提供OLA和MQCA的检测方法,采用上述OLA和MQCA免疫亲和柱,具体包括样品前处理和采用HPLC-MS/MS法进行检测;其中,所述样品前处理包括:直接提取、碱解、酶解、酸解比较、有机萃取、IAC净化条件优化、氮吹、复溶。

附图说明

[0046] 图1为本发明OLA和MQCA免疫亲和柱结构示意及原理图。

[0047] 图2为实验例1不同提取方法对回收率的影响结果。

[0048] 图3表示实验例2加载液pH、加载液甲醇比例、洗脱液类型、洗脱液体积对IAC净化效果的影响。

[0049] 图4表示实验例3LC-MS/MS检测多反应监测谱图。

具体实施方式

[0050] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购买得到的常规产品。

[0051] 材料和试剂

	喹乙醇 (OLA)	德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司
	3-甲基-喹噁啉-2-羧酸 (MQCA)	德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司
	OLA 单克隆抗体 (OLA-mAb)	北京维德维康生物技术有限公司
	MQCA 单克隆抗体 (MQCA-mAb)	北京维德维康生物技术有限公司
	溴化氰 (CNBr) 活化的 Sepharose 4B	GE Healthcare (pharmacia) 公司
	甲醇 (HPLC 级)	美国 J.T. Baker 公司
	乙腈 (HPLC 级)	美国 J.T. Baker 公司
	甲酸 (HPLC 级)	美国 Sigma-Aldrich 公司
[0052]	三羟甲基氨基甲烷 (Tris-HCl)	美国 Sigma-Aldrich 公司
	叠氮化钠 (NaN_3)	北京偶合科技有限公司
	磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	国药集团化学试剂有限公司
	十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	国药集团化学试剂有限公司
	二水合磷酸二氢钾 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	国药集团化学试剂有限公司
	氯化钠 (NaCl)	国药集团化学试剂有限公司
	氯化钾 (KCl)	国药集团化学试剂有限公司
	碳酸氢钠 (NaHCO_3)	国药集团化学试剂有限公司
	碳酸钠 (Na_2CO_3)	国药集团化学试剂有限公司
	氢氧化钠 (NaOH)	国药集团化学试剂有限公司
	三水醋酸钠 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	国药集团化学试剂有限公司
[0053]	硫酸铵 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	国药集团化学试剂有限公司
	盐酸 (HCl)	国药集团化学试剂有限公司
	辛酸	国药集团化学试剂有限公司
	冰醋酸 (CH_3COOH)	国药集团化学试剂有限公司
[0054]	仪器设备	

[0055]

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪	日本岛津公司
AB SCIEX 5000 三重四级杆质谱仪	美国 AB SCIEX 公司
Waters BEH C18 色谱柱	美国 Waters 公司
NanoDrop One ^c 型紫外分光光度计	美国 Thermo 公司
AL204 电子分析天平	瑞士 Mettler Toledo 集团
恒温磁力搅拌器	德国 Heigoph 公司
LE438 型 pH 计	瑞士 Mettler Toledo 集团
5804R 型高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
KB-5010 型涡旋仪	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
N-EVAP 112MA 氮吹仪	美国 Organomation 公司
PM4-1300TD 型超声仪	英国 PRIMA 公司
微量可调移液器	德国 Eppendorf 公司
DGG-9146A 电热恒温古风干燥箱	上海精密试验设备有限公司
Milli-Q 型超纯水仪	美国 Millipore 公司
QB-206 多用途旋转摇床	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
BETS-010 振荡器	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
冰箱	韩国 LG 集团
真空减压抽滤槽	美国 Supelco 公司
GM-0.33A 隔膜真空泵	天津津腾实验设备有限公司
BW-4T 恒温水浴槽	北京柏莱斯特科技发展有限公司
HX-J3011 绞肉机	奥克斯集团
免疫亲和柱聚丙烯空柱管套装	深圳逗点生物技术有限公司

[0056] 实施例1

[0057] (1) 基质制备:称取1g基质粉末(CNBr-Sepharose 4B,CNBr活化琼脂糖),溶于5mL 1mmol/L HCl中(1g基质5mL 1mmol/L HCl溶胀,可得约3.5mL胶)。基质将会立即溶胀,然后置于砂芯漏斗(孔径:40-60μm)中使用1mmol/L HCl洗涤15min。使用大约1mmol/L HCl 200mL,分次洗涤。

[0058] (2) 偶联:

[0059] 1°使用100mL偶联缓冲液(0.1mol/L NaHCO₃,0.5mol/L NaCl,pH 8.4)洗涤溶胀后的经CNBr活化的Sepharose 4B,洗涤后,迅速将CNBr活化的Sepharose 4B转移到30mL含有10mg OLA或MQCA单克隆抗体的偶联缓冲液中。

[0060] 2°室温条件(20~25℃)下采用end-over-end的方式充分混匀上述的混和物2h,或者在4℃下混匀过夜。也可以采用其他较为轻柔缓和的搅拌方法。

[0061] 3°在4℃5000rpm离心5min,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,用NanoDrop One^c测定上清液的OD_{280nm}值,计算偶联率。

[0062] 4°取离心管底的sepharose 4B,使用至少5倍基质(gel)体积的偶联缓冲液进行洗涤,除去多余的配体;

[0063] (5) 封闭

[0064] 1°封闭所有残留的活性基团。转移基质至50mL 0.1mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中。室温条件下温和搅拌反应2h或者4℃条件下16h。

[0065] 2°为除去偶联后未偶联上的多余的配体,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。

[0066] 每个洗涤循环步骤:先用0.1mol/L醋酸-醋酸钠,pH 4.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液洗涤,接着再用0.1mol/L Tris-HCl,pH 8.0内含0.5mol/L NaCl的缓冲液进行洗涤。洗涤后的凝胶用200mL PBS充分平衡,待用;

[0067] (4)装柱:采用湿法装柱,装柱缓冲液为0.02%NaN₃-PBS,并用0.02%NaN₃-PBS、4℃保存。取3mL空柱管,装好底层筛板,将2mL PBS缓冲液(0.01mol/L pH 7.4)悬浮的MQCA偶联胶装柱,至胶高度为0.5mL,装入中间层筛板,再将2mL PBS缓冲液(0.01mol/L pH 7.4)悬浮的OLA偶联胶装柱,装入顶层筛板,0.02%NaN₃-PBS平衡,用塞子和帽子封住底端和上端口,制成OLA和MQCA免疫亲和柱(如图1所示),冰箱4℃保存。

[0068] 为更好地使本发明OLA和MQCA免疫亲和柱用于鱼肉组织样品的净化处理,本发明还提供鱼肉组织样品的前处理方法,如实验例1-3。

[0069] 实验例1

[0070] 样品提取上,本发明还对酸解,碱解,酶解,直接提取效果进行比较,确定对样品酸解是一种较好的选择,结果见图2(Recovery表示回收率;Without hydrolysis表示直接提取,Alkali hydrolysis表示碱解,Enzymolysis表示酶解,Acidolysis表示酸解)。具体操作如下:

[0071] 准确称取2.0g(±0.02g)均质的鱼肉组织样品于50ml离心管,加入8mL提取液(乙酸乙酯:乙腈=1:1),300rpm振荡提取30min;10000rpm,4℃离心10min,上清液转移至另一干净的50mL离心管;加入1mL 2mol/L HCl,涡旋混匀2min,60℃水浴酸解60min;冷却至室温,加入8mL乙酸乙酯,振荡提取30min;10000rpm,4℃离心10min;合并上清液,乙酸乙酯定容至20mL;取10mL于50mL离心管中,50℃水浴氮吹至干;10mL PBS复溶,再加入5mL正己烷,涡旋1min去脂,静置后取全部下层溶液于另一干净50mL离心管中,待下一步采用本发明OLA和MQCA免疫亲和柱进行净化。

[0072] 实验证明,鱼肉样品用乙酸乙酯+乙腈(50+50)提取,然后进行酸解,采用本发明OLA和MQCA免疫亲和柱,对基质净化过程中的上样和洗脱条件进行了优化,在最优条件进行净化洗脱后LC-MS/MS测定,得到了较为满意的结果。

[0073] 实验例2

[0074] 此部分工作主要是IAC净化条件优化,对IAC净化不同的样本基质使用过程中的条件进行优化,包括加载液pH(4、5、6、7、8、9)、加载液甲醇比例(0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%)、洗脱液(甲醇、乙腈、丙酮、乙醇、异丙醇)和洗脱体积(2、4、6、8、10mL)。经过优化,最佳条件如下:加载液pH为7,加载液甲醇比例为5%,洗脱液2%乙酸-甲醇和2%乙酸-乙醇依次洗脱,洗脱液体积为4mL。结果见图3(a-d分别表示加载液pH、加载液甲醇比例、洗脱液类型、洗脱液体积对IAC净化效果的影响)。

[0075] 实验例3

[0076] 准确称取2.0g(±0.02g)均质的鱼肉组织样品于50ml离心管,加入8mL提取液(乙酸乙酯:乙腈=1:1),300rpm振荡提取30min;10000rpm,4℃离心10min,上清液转移至另一

干净的50mL离心管;加入1mL 2mol/L HCl,涡旋混匀2min,60℃水浴酸解60min;冷却至室温,加入8mL乙酸乙酯,振荡提取30min;10000rpm,4℃离心10min;合并上清液,乙酸乙酯定容至20mL;取10mL于50mL离心管中,50℃水浴氮吹至干;10mL PBS复溶,再加入5mL正己烷,涡旋1min去脂,静置后取全部下层溶液于另一干净50mL离心管中,待下一步采用本发明实施例1制备的OLA和MQCA免疫亲和柱进行净化。

[0077] 样品提取步骤中待净化的提取液,用0.1M NaOH调至pH 7~8,全部过双层复合IAC柱,流速1~2滴/秒,至液体排干;20mL去离子水洗涤,流速2~3滴/秒,至液体排干;4mL 2%乙酸-甲醇溶液洗脱,用10mL离心管接洗脱液,流速1滴/秒;50℃水浴,氮气吹干;初始流动相(20%乙腈-水溶液,含0.01%甲酸)复溶,涡旋混匀1min,超声5min,再涡旋混匀2min,过0.22μm滤膜,滤液收集于棕色进样小瓶中;LC-MS/MS检测。结果见图4。实验结果证明,OLA和MQCA的检测限(limit of detection,LOD)分别为0.013和0.152μg/kg,定量限(Limit of Quantity,LOQ)分别为0.045和0.505μg/kg。以1.0,5.0,10.0μg/kg三个浓度添加,添加回收率范围在81.2%-94.6%之间,RSD≤8.1%。实现对鱼肉中OLA和MQCA的有效测定。

[0078] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

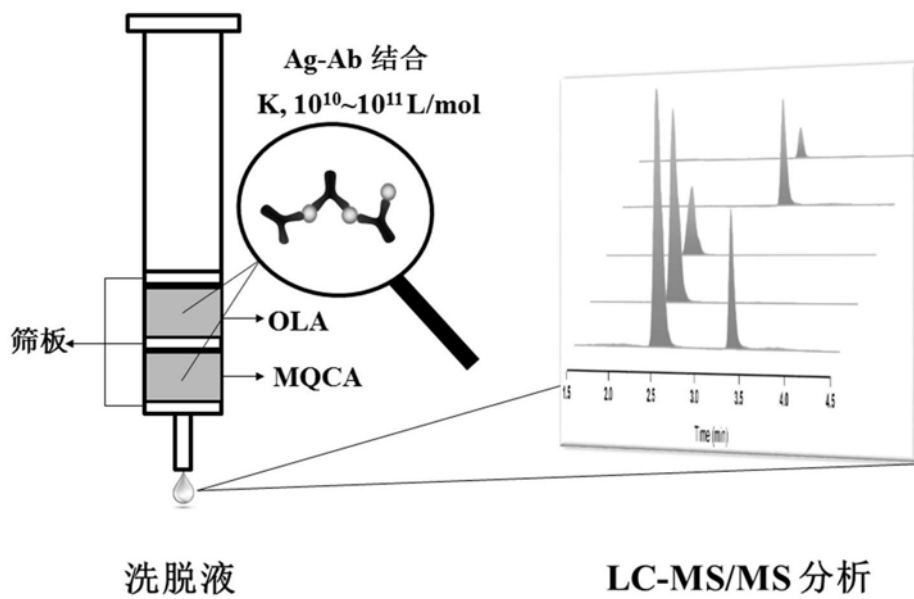


图1

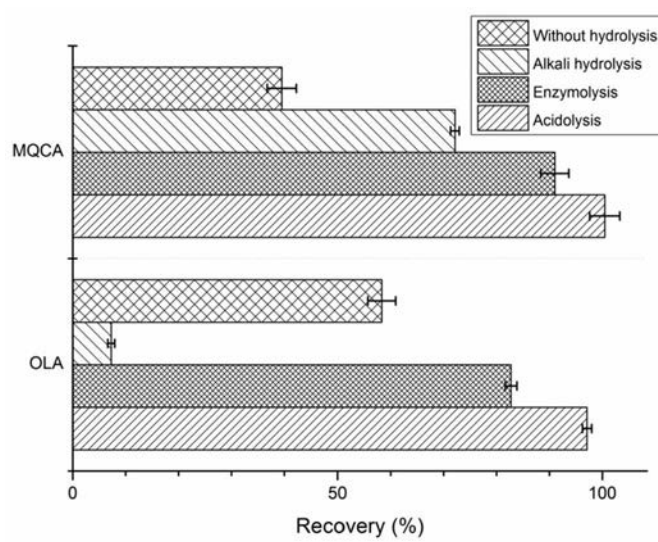


图2

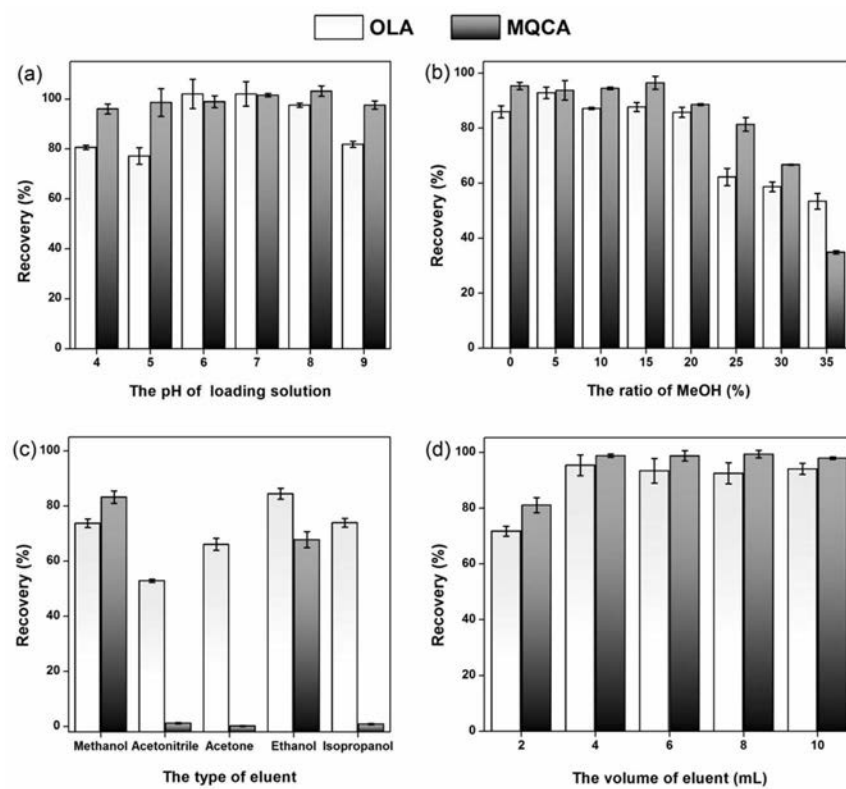


图3

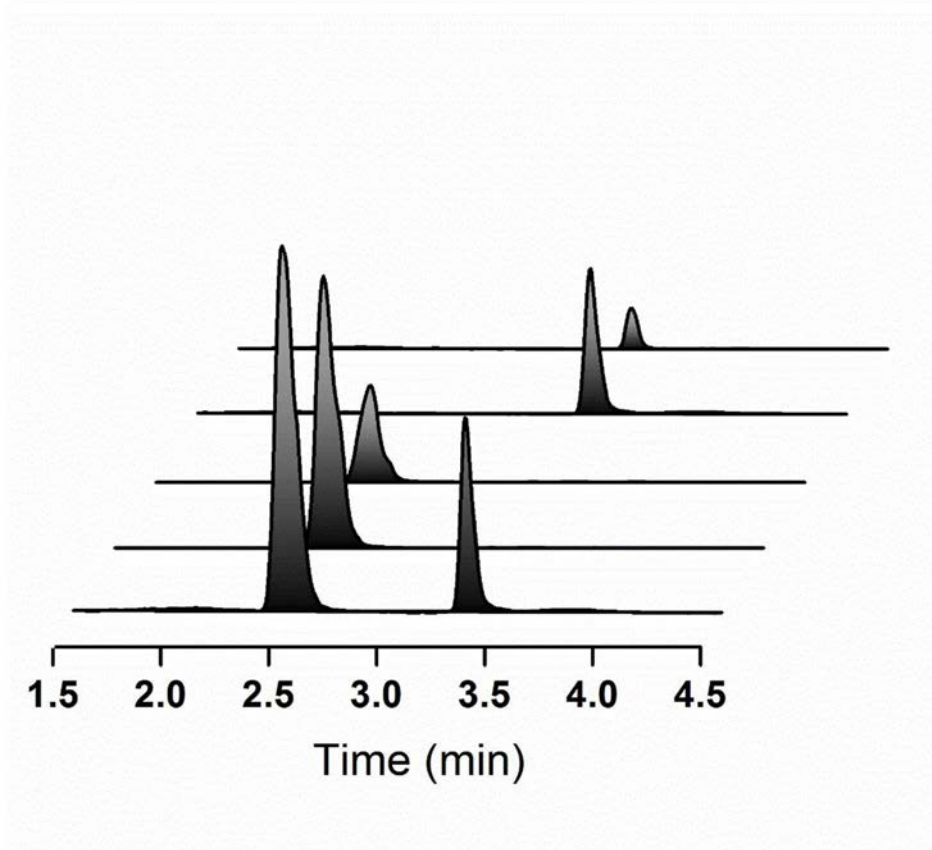


图4

专利名称(译)	OLA和MQCA免疫亲和柱及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110196321A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201910514467.0	申请日	2019-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国计量科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量科学研究院		
[标]发明人	谢洁 龚晓云 翟睿 黄泽建 刘梅英 曾伟杰 江游 戴新华 方向		
发明人	谢洁 龚晓云 翟睿 黄泽建 刘梅英 曾伟杰 江游 戴新华 方向		
IPC分类号	G01N33/531 G01N30/06 B01D15/26 B01D15/10		
CPC分类号	B01D15/10 B01D15/265 G01N30/06 G01N33/531		
代理人(译)	王文君 陈征		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及喹噁啉类化合物的检测，具体涉及OLA和MQCA免疫亲和柱及其制备方法与应用。本发明提供的OLA和MQCA免疫亲和柱，包括偶联有OLA单克隆抗体的固相介质和偶联有MQCA单克隆抗体的固相介质；所述固相介质为CNBr活化的Sephacrose 4B；它是由CNBr活化的Sephacrose 4B经溶胀后分别与OLA和MQCA的mAb偶联，然后对未偶联的活化位点进行封闭后而获得分别偶联有OLA、MQCA单克隆抗体的固相介质。本发明提供一种OLA和MQCA免疫亲和柱，可以对目标物进行高效净化，回收率高、操作简单。

$$\text{动态柱容量} = \frac{\text{药物浓度} \times \text{体积}}{\text{柱床体积}} \times 100\%$$