

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

B01J 20/281 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610007259.4

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100406116C

[22] 申请日 2006.2.16

[21] 申请号 200610007259.4

[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 何方洋 王建平 史为民
吴聪明

[56] 参考文献

CN1402004 A 2003.3.12

免疫法制备色谱样品的研究——血清中沙丁胺醇的分析. 袁倚盛等. 金陵医院学报, 第 09 卷第 04 期. 1996

免疫法制备液相色谱生物样品的研究——血中沙丁胺醇的分析. 袁倚盛等. 色谱, 第 15 卷第 01 期. 1997

沙丁胺醇单克隆抗体的制备及其鉴定. 邱阳生等. 中国兽医科技, 第 32 卷第 10 期. 2002

盐酸克伦特罗的残留危害及检测方法. 成亚宁等. 中国畜牧杂志, 第 41 卷第 10 期. 2005

审查员 周洋

[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 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称

净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法及专用试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法及其专用试剂盒。本发明净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的试剂盒, 它包括装载有免疫亲和吸附剂的免疫亲和色谱柱, 洗脱液 I, 洗脱液 II, 洗涤液和保存液; 其中, 所述免疫亲和吸附剂由固相载体和与其偶联的沙丁胺醇单克隆抗体组成; 所述固相载体为经溴化氰活化的 Sepharose 4B, 所述单克隆抗体是由单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 分泌的。本发明的提纯方法结合色谱法高效检测沙丁胺醇和克伦特罗的含量, 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、一种净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的试剂盒，它包括装载有免疫亲和吸附剂的免疫亲和色谱柱，洗脱液 I，洗脱液 II，洗涤液和保存液；其中，

所述免疫亲和吸附剂由固相载体和与其偶联的沙丁胺醇单克隆抗体组成；所述固相载体为经溴化氰活化的Sepharose 4B，所述单克隆抗体是由单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607分泌的；

所述洗脱液 I 为甲醇；

所述洗脱液 II 为体积份数比为80:15:5的乙醇：水：pH4.0的乙酸缓冲液的混合液；

所述洗涤液为pH7.4，0.01mol/L的磷酸盐缓冲液，所述磷酸盐缓冲液为1L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的水溶液；

所述保存液为1L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 0.2g的水溶液，pH7.4。

2、一种利用权利要求 1 所述净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的试剂盒净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法，包括以下步骤：

1) 样品的前处理：

动物尿样：将样品用洗涤液稀释 10 倍；动物组织：在动物组织样品匀浆物中，加入 0.01M 盐酸溶液，涡动 3 分钟，3000g 离心 10 分钟，将得到的上清液经 0.2um 的滤膜过滤后，用洗涤液稀释 10 倍，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，然后用去离子水洗涤，再用 3ml 洗脱液 I 和 1ml 洗脱液 II 同时洗脱，得到纯化的沙丁胺醇和/或克伦特罗溶液。

净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法及专用试剂盒

技术领域

本发明涉及一种净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法及其专用试剂盒。

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。其高度选择性和高亲和力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/MS）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。

沙丁胺醇（SAL）与克伦特罗（CL）都属于苯乙醇胺类 β -兴奋剂，用于医学临床，主要用于扩张支气管和增加肺通气量，可治疗支气管哮喘、阻塞性肺炎、平滑肌痉挛和休克等症，在兽医临床用作牛、马的产道松弛剂，如 SAL 用于平喘，CL 作为子宫松弛剂等，近年来作为饲料添加剂，在畜牧业非法使用的情况越来越严重。

许多国家建立了沙丁胺醇与克伦特罗的残留检测方法并且多数国家都禁止其在动物生产过程中使用。有些国家执行最高残留量（MRLs）限制，如英国规定的 MRLs 为 0.5ng/g，荷兰规定的 MRLs 为 1ng/g。我国明确规定禁止 CL、SAL 及其制剂在食品动物的饲养过程中使用。

目前检测沙丁胺醇与克伦特罗的方法主要有高效液相色谱法（HPLC-UV）、气-质联机法（GC-UV）、液-质联机（LC-MS-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。

发明内容

本发明的目的是提供一种净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法及其专用免疫亲和色谱柱。

本发明所提供的净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的免疫亲和吸附剂是由固相载体

和与其偶联的沙丁胺醇多克隆抗体或沙丁胺醇单克隆抗体组成；所述沙丁胺醇多克隆抗体或沙丁胺醇单克隆抗体是以沙丁胺醇半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的；所述沙丁胺醇半抗原是将沙丁胺醇完全溶于甲醇，然后将甲醇蒸干，得到油状物，溶解于无水乙醇中，在振荡的同时加入琥珀酸酐，室温振荡反应3小时，便有白色混悬物出现，该白色混悬物即为半抗原。

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。

沙丁胺醇是小分子物质，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。本发明将沙丁胺醇(SAL)用琥珀酸酐酰化，接出了一个含4个碳的间隔臂形成半抗原，这样突出了沙丁胺醇半抗原决定簇的特征结构，有助于制出针对沙丁胺醇抗原特异性较强的抗体。再将沙丁胺醇半抗原采用混合酸酐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12:1和15:1。

所述沙丁胺醇鼠单克隆抗体优选为对沙丁胺醇和克伦特罗都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株A-2-1 CGMCC No. 1607分泌的单克隆抗体。

所述对沙丁胺醇和克伦特罗都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株A-2-1 CGMCC No. 1607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。

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I和洗脱液II；所述洗脱液I为甲醇；所述洗脱液II为乙醇；去离子水：pH4.0的乙酸缓冲液的体积比为80:15:5的混合液。

所述试剂盒中还包括洗涤液、保存液；所述洗涤液为pH7.4, 0.01mol/L的磷酸盐缓冲液，所述pH7.4, 0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为1L水中含磷酸二氢钾0.27g, 12水合磷酸氢二钠2.86g, 氯化钾0.2g, 氯化钠8.8g；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, NaN₃0.2g, pH7.4。

该免疫亲和吸附剂基于免疫反应和色谱反应，适合从生物样品(如动物尿液)

中提纯沙丁胺醇和克伦特罗，便于残留分析。在该免疫亲和吸附剂中，沙丁胺醇鼠单克隆抗体和沙丁胺醇兔多克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 的偶联率分别是 $97.2 \pm 1.5\%$ ， $96.7 \pm 1.5\%$ ，该沙丁胺醇多克隆抗体或对沙丁胺醇和克伦特罗都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 分泌的单克隆抗体对克伦特罗有很高的交叉反应性，偶联有对沙丁胺醇和克伦特罗都具有交叉反应的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 分泌的单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对沙丁胺醇和克伦特罗动态柱容量分别为 400ng/mL 和 419ng/mL ，绝对柱容量分别为 40 ng/mg IgG 和 42 ng/mg IgG ，连续使用 10 次后柱容量降为总柱容量的 55% 左右，保存期为 1 年。

本发明所提供的净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法，包括以下步骤：

1) 样品的前处理：

动物尿样：将样品用洗涤液稀释 10 倍；动物组织：在匀浆样品中，加入 0.01M 盐酸溶液，涡动 3 分钟， 3000g 离心 10 分钟，将得到上清液经 $0.2\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后，用洗涤液稀释 10 倍，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，然后用去离子水洗涤，再用上述 3ml 洗脱液 I 和 1ml 洗脱液 II 同时洗脱，得到纯化的沙丁胺醇和/或克伦特罗溶液。

本发明的免疫亲和吸附剂具有高选择性，使样品前处理过程大大简化，尤其适用于动物尿样、肝脏、肌肉样品中沙丁胺醇和/或克伦特罗的前处理，分析质量得到改善。免疫亲和吸附剂的高选择性使得沙丁胺醇和/或克伦特罗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。本发明的提纯方法结合色谱法高效检测沙丁胺醇和克伦特罗的含量，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 为沙丁胺醇和克伦特罗标准品的色谱图

图 2 为在猪尿中沙丁胺醇和克伦特罗净化样品效果色谱图

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、净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的免疫色谱柱的制备

1、沙丁胺醇多克隆抗血清的制备

沙丁胺醇半抗原的合成：将沙丁胺醇完全溶于甲醇中，在旋转蒸发仪上将甲醇蒸干，得到油状物，振荡溶解于 20ml 无水乙醇中，在振荡的同时加入与沙丁胺醇同摩尔数的琥珀酸酐，室温振荡反应 3 小时，得到白色混悬物，即为沙丁胺醇半抗原。

免疫原的制备：采用混合酸酐法将沙丁胺醇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- SAL 或 OVA- SAL 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- SAL 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 2 周，一共免疫 8 次，最后一次免疫不加佐剂直接耳静脉注射，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。所获得的沙丁胺醇抗血清经竞争 ELISA 检测，结果显示对克伦特罗具有很高的交叉反应性。

2、多克隆抗血清的纯化：

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。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 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) 分别溶解步骤 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 0.5 mol/L HCl 溶液以同样的方法处理。最后换用 0.5 mol/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) 测定 IgG 溶液在 280nm 和 260nm 处的 OD 值，结果表明纯化后的兔多克隆抗体的浓度为 27mg/mL。

3、沙丁胺醇鼠单克隆抗体的制备

免疫原的制备：采用混合酸酐法，将沙丁胺醇半抗原与蛋白质载体牛血清蛋白 (BSA) 偶联，制成 BSA-SAL，即免疫原。

动物免疫：采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物、以上述沙丁胺醇半抗原与蛋白质载体的偶联物 BSA-SAL 为免疫原，免疫剂量为 100 μ g /只，加等体积的完全弗氏佐剂乳化，进行首次免疫。两周后，取同样量免疫抗原加不完全弗氏佐剂，乳化，进行第二次免疫。间隔两周，进行第三次免疫，方法同第二次免疫。再隔两周，进行第四次免疫，方法同第二次免疫。融合前 3 天再对 BALB/C 小鼠加强免疫一次，腹腔注射 100 μ g 抗原，不加佐剂。融合前摘眼球放血，获得阳性血清，然后将小鼠拉颈脱臼处死，取脾脏。

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对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株 - 对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607。对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 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）。

单克隆杂交瘤细胞的保存：在液氮-20℃下保存，使用时 37℃水浴快速解冻。

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 天后腹腔注射对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 5×10^5 - 10^6 个/只，7-10 天后采集腹水。

4、单克隆抗体的纯化：

采用辛酸-饱和硫酸铵法纯化单克隆抗体。其具体步骤如下：

取上述方法腹腔注射对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 得到的腹水 5mL，加入 0.06 mol/L、pH4.0 的 NaAc-HAc 缓冲液 10mL，搅拌均匀，用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.2。在室温下边搅拌边加入 165 μ L 辛酸，搅拌 30min。在 4℃ 6000g 离心 30min，取上清液，用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.2。然后在 4℃ 条件下，边搅拌边加入 15mL 饱和硫酸铵溶液，使硫酸铵的最终质量百分含量为 50%，搅拌 30min 后，在 4℃ 6000g 离心 30min，弃上清液，将沉淀悬浮于 5.5mL 0.01M pH7.2 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。将沉淀悬浮液边搅拌边加入 4.5mL 饱和硫酸铵溶液，此操作在 4℃ 条件下完成。此时硫酸铵终浓度为 45%，搅拌 30min 后，4℃ 6000g 离心 30min，弃上清液，将沉淀悬浮于 1mL 0.01M pH7.2 PBS 中。将沉淀悬浮液装入透析袋中，用 0.01M pH7.2 PBS 透析，4~6 小时换液一次，换液 2~3 次。用紫外分光光度计测定 IgG 溶液在 280nm 和 260nm 处的 OD 值，得到对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 分泌的单克隆抗体，纯化后的 IgG 在-20℃冰箱保存。

5、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对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 分泌的单克隆抗体稀释至适宜浓度，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，转入上述兔多克隆抗体或沙丁胺醇单克隆抗体溶液中，混合，4℃ 下缓慢搅拌 20—24hr。偶联率的检测结果表明，兔多克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 的偶联率是 96.7 \pm 1.5%，对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 分泌的沙丁胺醇单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 的偶联率是 97.2 \pm 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、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。

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，NaN₃1g）中，4℃下存放备用。

装柱：将偶联有沙丁胺醇多克隆抗体或沙丁胺醇单克隆抗体的免疫吸附剂转入到含 G₃ 滤板的层析柱里，制成偶联有沙丁胺醇多克隆抗体或沙丁胺醇单克隆抗体的免疫色谱柱（IAC 柱）。

6、IAC 柱容量的确定

将步骤 5 制备的偶联有沙丁胺醇多克隆抗体或沙丁胺醇单克隆抗体的免疫色谱柱，用 20ml 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）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（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。将含有 100ng · ml⁻¹ 沙丁胺醇或克伦特罗的 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（流出液中沙丁胺醇或克伦特罗浓度和加样液浓度相同），用 20ml 去离子水洗涤，除去提取液中干扰杂质。最后用 3ml 甲醇与 1ml 分析纯乙醇：去离子水：pH4.0 的乙酸缓冲液的体积比为 80:15:5 的混合液将沙丁胺醇和克伦特罗洗脱，自然重力下流出，收集，吹干，进行 GC/MS 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。结果表明偶联有沙丁胺醇鼠单克隆抗体的免疫亲和色谱柱对沙丁胺醇和克伦特罗动态柱容量分别为 400ng/mL 和 419ng/mL，绝对柱容量分别为 40 ng/mg IgG 和 42 ng/mg IgG，

实施例 2、偶联有沙丁胺醇兔多克隆抗体或对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 分泌的沙丁胺醇单克隆抗体的免疫色谱柱的试剂盒的制备及其对沙丁胺醇和/或克伦特罗的净化效果

1、净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的试剂盒的制备

主要由盒体，免疫色谱柱（IAC 柱），沙丁胺醇、克伦特罗标准溶液，洗涤液，洗脱液 I，洗脱液 II，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沙丁胺醇、克伦特罗标准溶液、洗涤液、洗脱液 I、洗脱液 II、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 制备的偶联有沙丁胺醇多克隆抗体或对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No.1607 分泌的沙丁胺醇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），配制方法为：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。

洗脱液 I 为色谱级的甲醇。

洗脱液 II 为分析纯乙醇：去离子水：pH4.0 的乙酸缓冲液的体积比为 80:15:5 的混合液。

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，NaN₃ 0.2g，pH7.4。

将偶联有沙丁胺醇多克隆抗体或单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No.1607 分泌的沙丁胺醇单克隆抗体的免疫色谱柱的试剂盒放在 4℃，有效期为 12 个月。

2、沙丁胺醇和克伦特罗的净化效果实验

IAC 净化原理是，将沙丁胺醇多克隆抗体或对沙丁胺醇与克伦特罗都具有交叉反应性的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No.1607 分泌的沙丁胺醇单克隆抗体和惰性基质偶联，制备免疫吸附剂，装柱。当含待测的沙丁胺醇和/或克伦特罗的混合物流过 IAC 柱时，固定抗体选择性地结合沙丁胺醇和/或克伦特罗，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，沙丁胺醇和/或克伦特罗得到净化或分离。IAC 柱经再生处理后可重复使用。

检测样品的处理：取未接触过沙丁胺醇和克伦特罗猪尿样品 2g (mL)，分别添加沙丁胺醇标准品和克伦特罗标准品，使沙丁胺醇和克伦特罗的终浓度均为 10μg/mL，经上述试剂盒中所述的洗涤液稀释 10 倍得到尿样溶液；

取未接触过沙丁胺醇和克伦特罗猪肌肉、猪肝匀浆物样品，分别添加沙丁胺醇标准品和克伦特罗标准品，使沙丁胺醇和克伦特罗的终浓度均为 10μg/kg，然后分别加入 10ml 0.01M 盐酸溶液，涡动 3 分钟，3000g 离心 10 分钟，取上清液过 0.20 μM 滤膜，滤液即为样品溶液。

将偶联有沙丁胺醇多克隆抗体或单克隆杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No.1607 分泌的沙丁胺醇单克隆抗体的免疫色谱柱平衡到室温，用 20ml 上述试剂盒中的洗涤液冲洗，然后将上述的样品溶液分别过柱，再用 20ml 去离子水洗涤，目的是为了除去

非特异性吸附的杂质。用 3ml 上述试剂盒中的洗脱液 I 和 1ml 上述试剂盒中的洗脱液 II 共同洗脱，在 45℃ N₂气流下吹干，然后进行 GC/MS 分析，测定沙丁胺醇和克伦特罗的含量，以沙丁胺醇和克伦特罗标准品（10μg/kg）为对照。IAC 柱用 20ml 的保存液平衡保存在 4℃冰箱里备用。测定结果表明用 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，偶联有杂交瘤细胞株 A-2-1 CGMCC No. 1607 分泌的沙丁胺醇单克隆抗体的免疫色谱柱在添加 10μg/kg 浓度的沙丁胺醇和克伦特罗标准品的猪尿样品中净化效果如图 1 和图 2 所示。

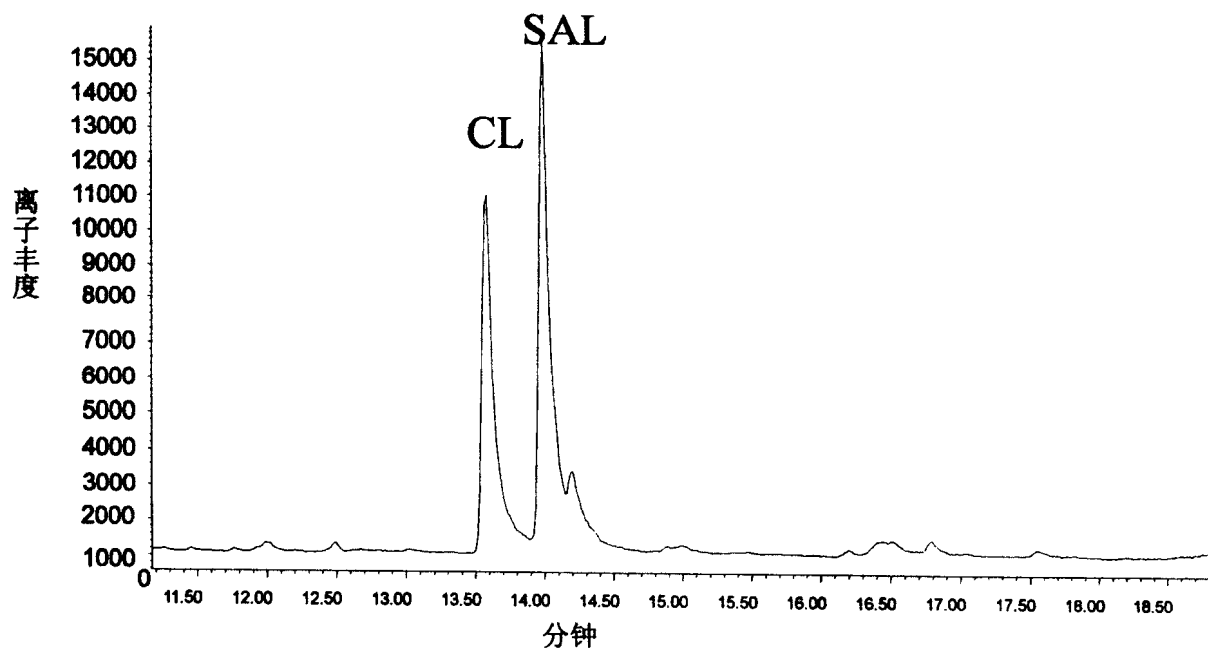


图 1

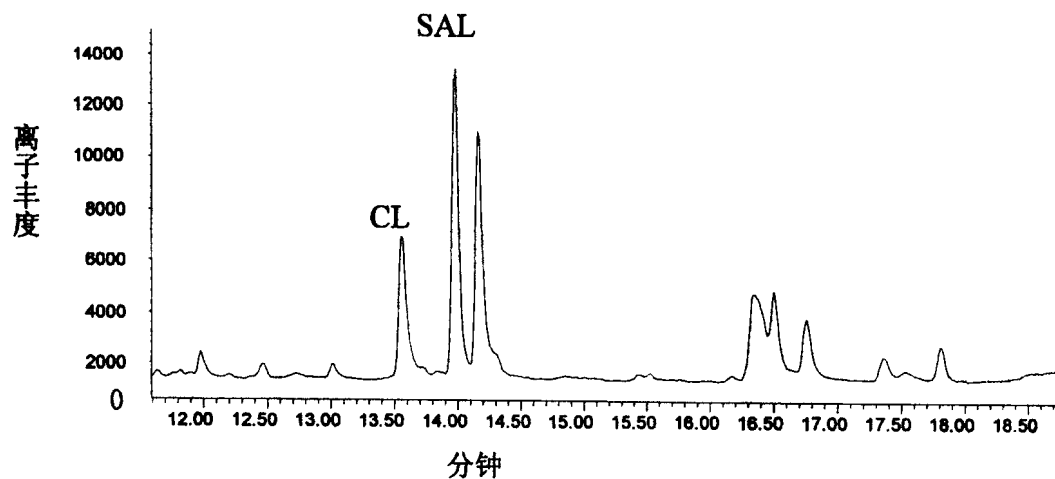


图 2

专利名称(译)	净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法及专用试剂盒		
公开(公告)号	CN100406116C	公开(公告)日	2008-07-30
申请号	CN200610007259.4	申请日	2006-02-16
[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 何方洋 王建平 史为民 吴聪明		
发明人	沈建忠 何方洋 王建平 史为民 吴聪明		
IPC分类号	B01J20/281 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN1830546A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的方法及其专用试剂盒。本发明净化沙丁胺醇和/或克伦特罗的试剂盒，它包括装载有免疫亲和吸附剂的免疫亲和色谱柱，洗脱液I，洗脱液II，洗涤液和保存液；其中，所述免疫亲和吸附剂由固相载体和与其偶联的沙丁胺醇单克隆抗体组成；所述固相载体为经溴化氰活化的Sephrose 4B，所述单克隆抗体是由单克隆杂交瘤细胞株A-2-1 CGMCC No.1607分泌的。本发明的提纯方法结合色谱法高效检测沙丁胺醇和克伦特罗的含量，弥补了单纯免疫测定技术直接测定样本的信息量少、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。

