



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110286240 A

(43)申请公布日 2019.09.27

(21)申请号 201910645174.6

C07C 27/02(2006.01)

(22)申请日 2019.07.17

C07C 275/42(2006.01)

(71)申请人 北京市疾病预防控制中心

C07C 273/18(2006.01)

地址 100013 北京市东城区和平里中街16号

C07K 14/765(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

(72)发明人 邵兵 姚凯 张晶 温凯 杨蕴嘉
沈建忠

(74)专利代理机构 北京领科知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11690

代理人 艾变开

(51)Int.Cl.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

C07C 59/68(2006.01)

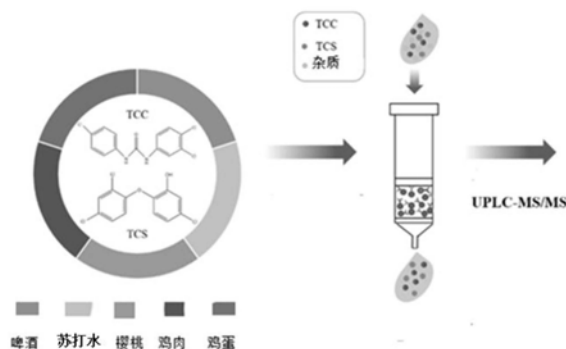
权利要求书3页 说明书23页 附图13页

(54)发明名称

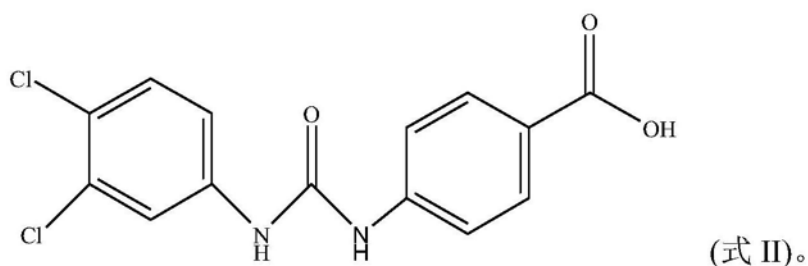
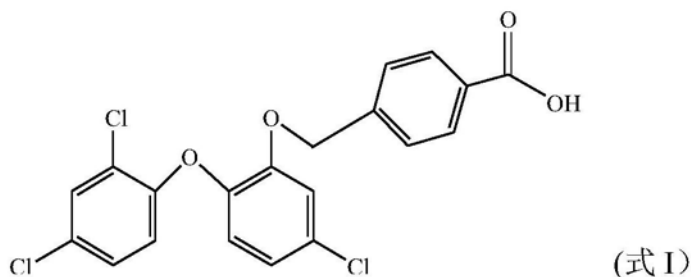
一种三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体在检测三氯生和/或三氯卡班中的用途

(57)摘要

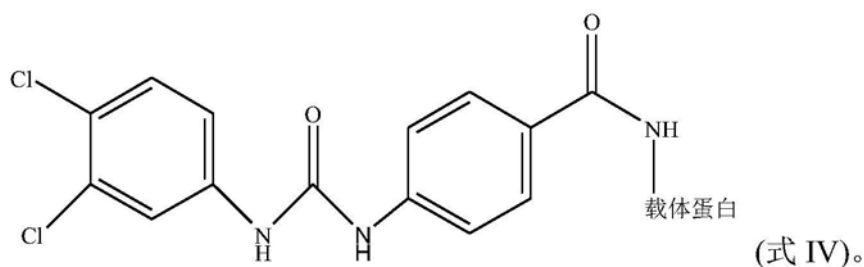
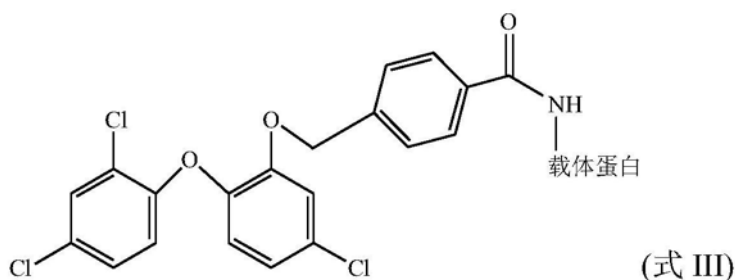
本发明提供了一种三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体在检测三氯生和/或三氯卡班中的用途,并具体提供了一种检测样品中痕量三氯生和/或三氯卡班的方法,包括利用免疫亲和柱-超高效液相色谱串联质谱的检测方法。其中,免疫亲和柱中基质与三氯生和三氯卡班的单克隆抗体偶联。本发明提供的检测方法灵敏度高,精密度、回收率、LOD和LOQ均能满足检测分析的要求,有效解决前处理中样品净化不理想的问题,并减少样品基质干扰,缩短分析时间,提高回收率,可以在复杂基质中,特别是各类食品中特异性地检测痕量三氯生和/或三氯卡班,不会出现假阳性的检测结果。



1. 一种三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体在检测三氯生和/或三氯卡班中的用途,其特征在于,所述三氯生单克隆抗体是通过式I所示的三氯生半抗原制备得到,所述三氯卡班单克隆抗体是通过式II所示三氯卡班半抗原制备得到,



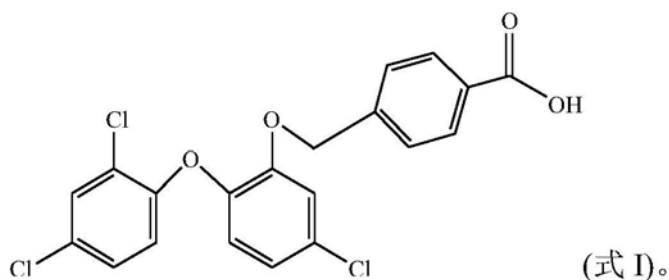
2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,制备所述三氯生单克隆抗体所用的三氯生人工抗原如式III所示,是式I所示三氯生半抗原和载体蛋白结合得到;制备所述三氯卡班单克隆抗体所用的三氯卡班人工抗原如式IV所示,是式II所示三氯生半抗原和载体蛋白结合得到,



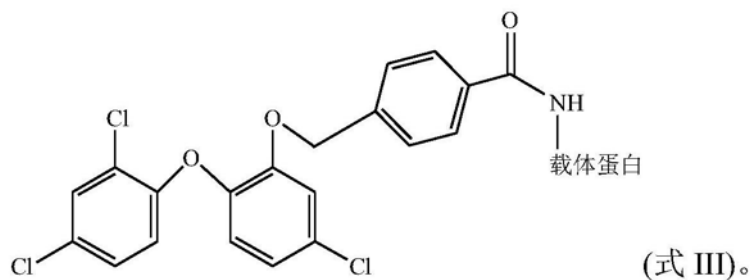
3. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述检测的方法包括免疫分析方法、生物传感器、表面增强拉曼散射;所述的免疫分析方法包括免疫亲和层析、酶联免疫分析、胶体金免疫层析、化学发光免疫分析或悬浮阵列。

4. 根据权利要求3所述的用途,其特征在于,所述检测的方法还包括与超高效液相色谱、质谱或者超高效液相色谱与质谱联用。

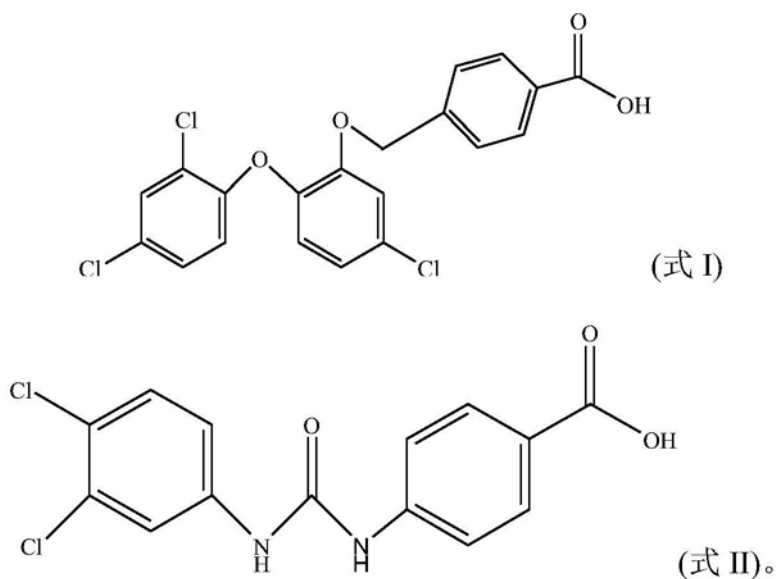
5. 一种三氯生半抗原化合物,结构如式I所示:



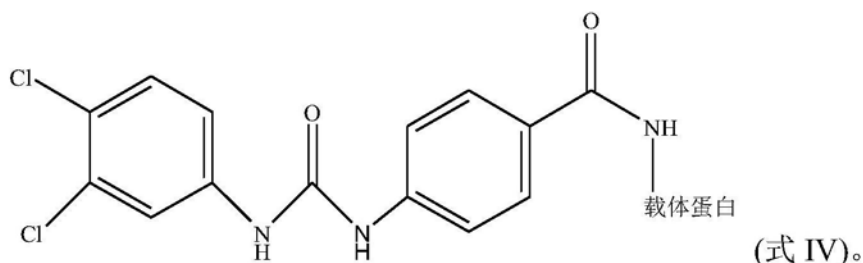
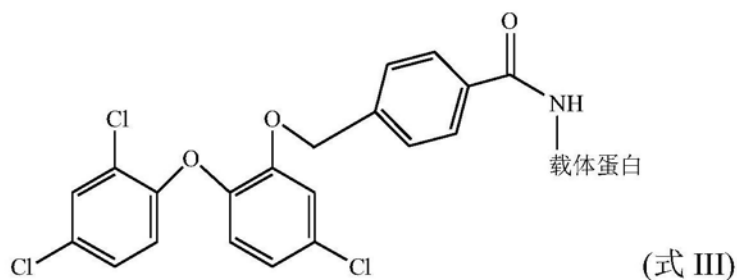
6. 一种三氯生人工抗原, 结构如式III所示, 其中, 三氯生半抗原与载体蛋白的偶联比为0.5-1:1, 优选为0.7:1。



7. 一种检测三氯生和/或三氯卡班的方法, 包括以下步骤: 采用三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体制备免疫亲和柱, 利用免疫亲和柱对三氯生和/或三氯卡班进行选择性和富集后, 再检测三氯生和/或三氯卡班, 其特征在于, 制备所述的三氯生单克隆抗体所用的三氯生半抗原如式I所示, 制备所述的三氯卡班单克隆抗体所用的三氯卡班半抗原如式II所示,



8. 一种检测三氯生和/或三氯卡班的方法, 包括以下步骤: 采用三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体制备免疫亲和柱, 利用免疫亲和柱对三氯生和/或三氯卡班进行选择性和富集和提纯后, 再检测三氯生和/或三氯卡班, 其特征在于, 所述的三氯生单克隆抗体所用的三氯生人工抗原如式III所示, 制备所述的三氯卡班单克隆抗体所用的三氯卡班人工抗原如式IV所示,



9. 如权利要求7或8所述的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1) 将样品上样于免疫亲和柱、洗脱;
- 2) 检测洗脱产物中三氯生和/或三氯卡班。

10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,步骤1) 中免疫亲和柱的填料中基质与单克隆抗体的体积比为1:1~1:1.5;和/或

步骤2) 中检测三氯生和/或三氯卡班采用超高效液相色谱和质谱联用的方法;

所述的样品选自食品、体液、污水、纺织或日化用品;和/或所述检测包括样品前处理,所述的固体样品前处理包括将固体样品与乙腈混合、超声,离心取上清,氮吹;所述的液体样品前处理包括将液体样品超声脱气;优选的免疫亲和柱层析的操作条件是上样液为15-20vol% 甲醇含量的PBS溶液;和/或洗脱液为纯甲醇;和/或当样品为固体时,洗脱液和样品的体积质量比为3-5:1 (mL/g);当样品为液体时,洗脱液和样品的体积比为3-5:10;和/或洗脱液使用玻璃纤维过滤器进行过滤。

一种三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体在检测三氯生和/或三氯卡班中的用途

技术领域

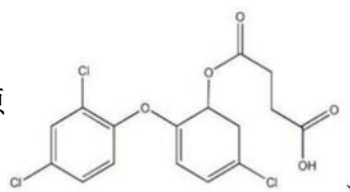
[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体在检测三氯生和/或三氯卡班中的用途,更具体涉及一种食品中痕量三氯生和/或三氯卡班的免疫亲和柱-超高效液相色谱串联质谱检测方法。

背景技术

[0002] 内分泌干扰物(Environmental endocrine disrupting chemicals,EDCs),是一种在环境中存在的干扰人或动物内分泌系统的外源性化学物质,多数通过食物链进入生物体内,引起生物体自身荷尔蒙被干扰,在血液中循环、脂肪中积累,从而导致生物体正常的生殖、发育、免疫、行为活动等生理系统异常。三氯生(triclosan,TCS)和三氯卡班(triclocarban,TCC)均属于内分泌干扰物,其作为高效广谱抗菌剂被广泛添加于个人护理品及日化产品中,可通过皮肤接触、口腔黏膜吸收等途径进入人体内。TCS能够降低孕期大鼠的甲状腺激素水平,TCC可以增强雄性大鼠的睾酮的生物活性,且能够引起人体肝细胞的DNA损伤,存在一定的遗传毒性。

[0003] 因此对食物中的TCS和TCC的残留水平进行准确测定是非常必要的。三氯生和三氯卡班目前的检测方法主要有气相色谱法和气-质联用法、液相色谱法和液-质联用法等,检测过程中基质的干扰比较大。目前检测的净化方法主要包括液液萃取、固相萃取、基质固相分散萃取和加速溶剂萃取等,操作复杂、选择性差,且净化效果不理想,杂质干扰很大,回收率和重复性比较差。免疫分析方法基于抗原-抗体免疫反应的特异性,较仪器分析其剪异性强、剪剪度高,不仅可以大大简化甚至可以省去样品前处理的复杂过程,而且避免了因大量使用溶剂而对环境的污染。因此对TCS和TCC的免疫分析研究是剪剪可少的。专利

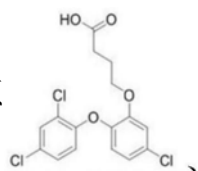
CN105085204A公开了一种三氯生的半抗原



人工抗原及制备相应

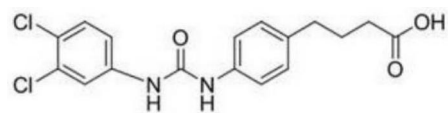
抗体的方法,但是未公开制备的抗体用于免疫层析检测三氯生。CN109956848A公开了一种

三氯生半抗原



抗原及相应抗体的制备方法和用途,泛泛的提到可以用于制备

酶联免疫试剂盒、胶体金检测卡和免疫亲和柱,并只是单纯的制备了免疫亲和柱,并未证实可以用于三氯生的检测。专利CN109959784A公开了三氯卡班半抗原



抗原及其制备方法和制备抗体中的应用,泛泛的提到可

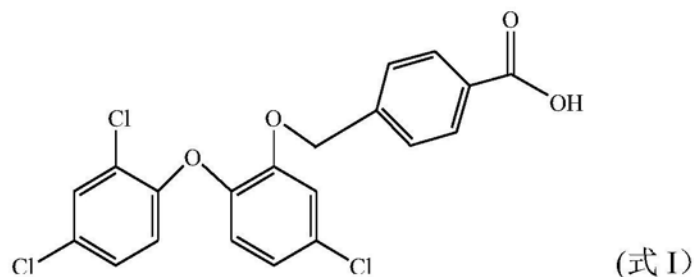
以用于制备酶联免疫试剂盒、胶体金检测卡和免疫亲和柱,并只是单纯的制备了免疫亲和柱,并未证实可以用于三氯生的检测。文献:Detection of the Antimicrobial Triclosan in Environmental Samples by Immunoassay(Ahn et al.,Environ.Sci.Technol,2016,50:3754-3761)公开了替换TCS的4-Cl或4'-Cl位,偶联载体蛋白制备半抗原,免疫兔获得了TCS抗体,并利用酶联免疫吸附检测TCS,与LC-MS/MS检测的结果接近。文献:An immunoassay to evaluate human/environmental exposure to the antimicrobial triclocarban(Ahn et al.,Environ.Sci.Technol,2012,46:374-381)公开了采用酶联免疫吸附实验检测TCC的方法,其中采用的半抗原为通过对苯基取代获得的衍生物。但是上述现有技术检测TCC和/或TCS的灵敏度,准确性还不能满足实际需求,因此需要开发一类高效准确,痕量快速的TCC和/或TCS检测方法。

发明内容

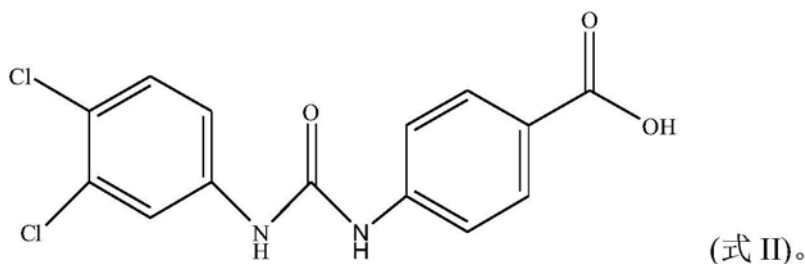
[0004] 为弥补现有技术的不足,本发明提供了一种利用免疫亲和柱和包括超高效液相色谱串联质谱在内的方法联用,检测样品中痕量三氯生和/或三氯卡班的方法。其中,免疫亲和柱中基质与三氯生和三氯卡班的单克隆抗体偶联。本发明提供的检测方法灵敏度高,精密密度、回收率、LOD和LOQ均能满足检测分析的要求,有效解决前处理中样品净化不理想的问题,并减少样品基质干扰,缩短分析时间,提高回收率。

[0005] 同时,本发明人通过创造性劳动制备了三氯生半抗原和三氯卡班半抗原,并将该半抗原与载体蛋白偶联制备三氯生人工抗原和三氯卡班人工抗原,采用这两种人工抗原制备得到的单克隆抗体特异性强,能实现对TCC/TCS痕量检测。经过试验证明,采用本发明制备的三氯生半抗原和三氯卡班半抗原获得了更高效价的三氯生/三氯卡班单克隆抗体所得抗体IC₅₀低,能实现对TCC/TCS痕量检测。

[0006] 本发明的第一个目的是提供三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体在检测三氯生和/或三氯卡班中的用途,所述三氯生单克隆抗体是通过式I所示的三氯生半抗原制备得到,所述三氯卡班单克隆抗体是通过式II所示三氯卡班半抗原制备得到,



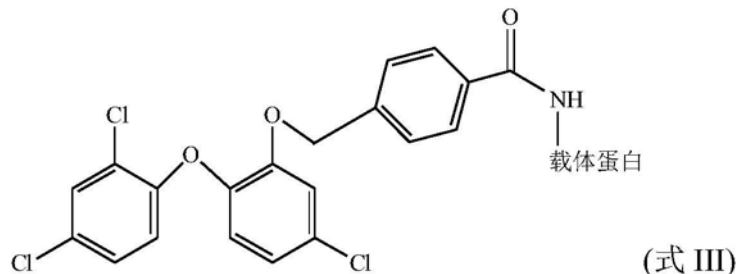
[0007]



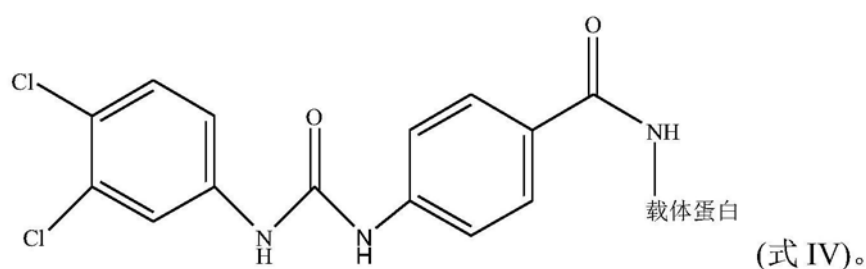
[0008] 其中所述三氯生单克隆抗体用于检测三氯生,所述三氯卡班单克隆抗体用于检测

三氯卡班,还可以用所述三氯生单克隆抗体和三氯卡班单克隆抗体检测三氯生和三氯卡班的混合物。

[0009] 制备所述三氯生单克隆抗体所用的三氯生人工抗原如式III所示,是式I所示三氯生半抗原和载体蛋白结合得到;制备所述三氯卡班单克隆抗体所用的三氯卡班人工抗原如式IV所示,是式II所示三氯生半抗原和载体蛋白结合得到,



[0010]

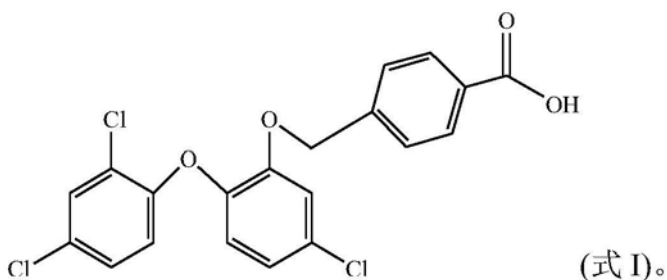


[0011] 优选的,所述检测的方法包括免疫分析方法、生物传感器、表面增强拉曼散射,所述的免疫分析方法包括免疫亲和层析、酶联免疫分析、胶体金免疫层析技术、化学发光免疫分析法或悬浮阵列技术,进一步优选为免疫亲和层析。

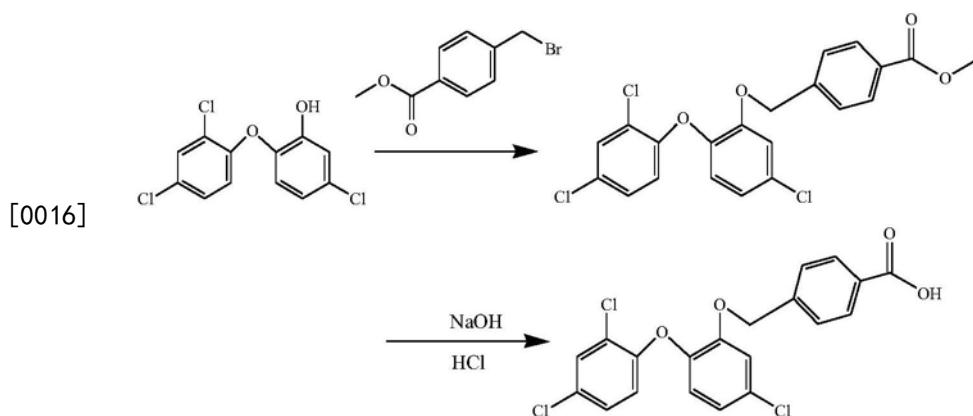
[0012] 优选的,所述检测的方法还包括和其它检测方法联用的方法,所述联用的检测方法包括但不限于超高效液相色谱、质谱或者超高效液相色谱与质谱联用。

[0013] 本发明的第二个目的是提供一种式I所示的三氯生半抗原化合物,由该半抗原生产的人工抗原(式II),单克隆抗体,以及它们的制备方法。

[0014]



[0015] 本发明还提供了式I化合物的制备方法,合成路线如下:



[0017] 具体的,式I化合物的制备方法包括如下步骤:将三氯生溶于有机溶剂中,加入4-溴甲基苯甲酸甲酯,NaH做催化剂,40-50℃反应4-6h,分离提纯,在碱性条件下水解,经过萃取、洗涤、干燥后得到目标式(I)化合物。

[0018] 所述有机溶剂为DMF、THF、DMSO、二氯甲烷、乙腈、甲醇、乙醇中的至少一种。

[0019] 本发明还提供了式(III)所示的三氯生人工抗原,其是通过上述式(I)的三氯生半抗原和载体蛋白结合制得,其中三氯生半抗原与载体蛋白的偶联比为0.5-1:1,优选为0.7:1。

[0020] 所述的载体蛋白选自牛血清白蛋白BSA、卵清白蛋白OVA、人血清白蛋白HSA、牛甲状腺球蛋白BTG或血匙蓝蛋白KLH中的一种或两种以上的组合。优选的,所述的载体蛋白为BSA,包被原优选为OVA。

[0021] 式III所示的三氯生人工抗原的制备方法通过包括以下步骤的方法得到:a)取式I结构式的三氯生半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌,获得反应液I;b)取载体蛋白溶解于PBS中制得反应液II;c)将反应液I加入到反应液II中,室温搅拌,获得三氯生人工抗原。

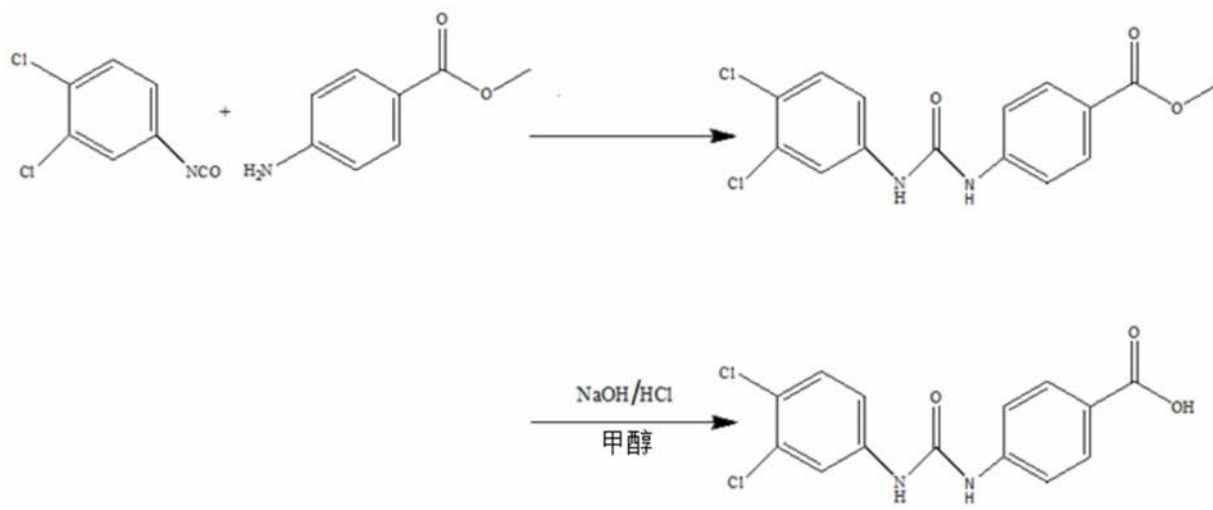
[0022] 一种三氯生单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:1)采用式III所示三氯生人工抗原免疫动物;2)抗血清筛选,选取血清效价高的动物用作制备单克隆抗体;3)细胞融合和筛选,细胞融合后,筛选效价高的阳性细胞;4)进行细胞克隆,纯化后得到三氯生单克隆抗体。

[0023] 上述单克隆抗体的制备方法是本领域技术人员所公知的,优选地,所述抗血清筛选和细胞筛选采用间接竞争ELISA法;采用方阵滴定法确定包被原、抗体的最适工作浓度;和/或细胞克隆采用有限稀释法;和/或单克隆抗体采用体内诱生腹水法;和/或单克隆抗体的纯化采用辛酸-硫酸铵沉淀法。

[0024] 本发明的第三个目的在于提供一种式II所示的三氯卡班半抗原化合物,由该半抗原生产的人工抗原(式IV),单克隆抗体,以及它们的制备方法。

[0025] 所述式II化合物的制备方法,其合成路线如下:

[0026]



[0027] 具体的,所述的三氯卡班半抗原的制备方法,包括如下步骤:称取异氰酸3,4-二氯苯酯和4-氨基苯基丁酸甲酯,加入有机溶剂,40-50℃在氮气保护下反应6-8h,旋干,甲醇溶解,加入反应物1-2倍物质的量的碱液水解,水解完全后用酸调节pH至2-3;萃取,有机相中加入无水硫酸钠,搅拌,过滤,干燥,得到三氯卡班半抗原。

[0028] 所述有机溶剂为所述有机溶剂为DMF、THF、DMSO、二氯甲烷、乙腈、甲醇、乙醇中的至少一种;所述液碱液为NaOH、KOH的水溶液;所述酸为HCl, HNO₃, H₂SO₄中的至少一种。

[0029] 所述式IV所示的三氯卡班人工抗原,是式II所示的三氯生半抗原和载体蛋白结合得到,其中,三氯卡班半抗原与载体蛋白的偶联比为6-7.5 1,优选为6.8:1。

[0030] 优选的,所述的载体蛋白选自牛血清白蛋白BSA、卵清白蛋白OVA、人血清白蛋白HSA、牛甲状腺球蛋白BTG或血匙蓝蛋白KLH中的一种或两种以上的组合。在本发明的一个具体实施方式中,所述的载体蛋白为BSA,包被原优选为OVA。

[0031] 所述式IV所示的三氯卡班人工抗原的制备方法,包括如下步骤:(1)将式II所示的三氯卡班半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌,制得反应液I;(2)将载体蛋白溶解于PBS中,制得反应液II;(3)将反应液I加入反应液II中,室温搅拌,获得三氯卡班人工抗原。

[0032] 一种三氯卡班单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:1)采用式IV所示三氯卡班人工抗原免疫动物;2)抗血清筛选,选取血清效价高的动物用作制备单克隆抗体;3)细胞融合和筛选,细胞融合后,筛选效价高的阳性细胞;4)进行细胞克隆,纯化后得到三氯生单克隆抗体。

[0033] 本发明的第四个目的是提供一种检测样品中三氯生和/或三氯卡班的方法,包括采用三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体制备免疫亲和柱以检测三氯生和/或三氯卡班,其中,制备所述的三氯生单克隆抗体所用的三氯生半抗原如式I所示,制备所述的三氯卡班单克隆抗体所用的三氯卡班半抗原如式II所示。

[0034] 一种检测样品中三氯生和/或三氯卡班的方法,包括以下步骤:采用三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体制备免疫亲和柱以检测三氯生和/或三氯卡班,其中,制备所述的三氯生单克隆抗体所用的三氯生人工抗原如式III所示,制备所述的三氯卡班单克隆抗体所用的三氯卡班人工抗原如式IV所示。

[0035] 所述的制备免疫亲和柱的方法包括：柱料基质制备，三氯生和/或三氯卡班的单克隆抗体与基质偶联，偶联后洗涤、重悬装柱。

[0036] 其中，所述的基质经过活化，所述活化步骤是经过NHS活化。

[0037] 优选的，所述的方法中，所述免疫亲和柱的填料中基质与单克隆抗体的体积比为1:1~1:1.5。

[0038] 进一步优选的，所述的基质为琼脂糖凝胶，比如Sephacrose 4B、Sephacrose 6B、玻璃微球和壳聚糖。在本发明的一个具体实施方式中，所述的琼脂糖凝胶由NHS活化后经HCl洗脱、偶联缓冲液平衡后与三氯生和/或三氯卡班的单克隆抗体偶联。

[0039] 优选的，所述的样品为固体样品或液体样品；优选的，所述的样品选自食品、体液、污水、纺织或日化用品；更优选的，所述的样品为食品。进一步优选的，所述的日化用品包括但不限于洗发水、香皂、沐浴露、化妆品、洗衣粉、护肤品、洗漱用品或厨房用品等。在本发明的一个具体实施方式中，所述的检测样品为食品。

[0040] 优选的，所述检测包括样品前处理，所述的固体样品前处理包括将固体样品与乙腈混合、超声，离心取上清，氮吹。进一步优选的，所述的超声时间为10-30min。最为优选的，所述的超声时间为15-25min。进一步优选的，所述的离心为10000rpm离心5-15min。进一步优选的，取上清后余下液体再次与乙腈混合、超声、离心提取一次后合并提取液。进一步优选的，所述的氮吹温度为30-50℃。

[0041] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的固体样品前处理包括称取样品匀质后与乙腈混合；振荡，超声10-30min，10000rpm离心5-15min后取上清；乙腈重复提取上述匀质样品至离心取上清的步骤再提取一次，合并提取液；30-50℃氮吹，加入PBS混匀。

[0042] 优选的，所述的液体样品前处理包括将液体样品超声脱气。进一步优选的，所述的超声脱气时间为10-50min。最为优选的，所述的超声脱气时间为20-40min。在本发明的一个具体实施方式中，所述的液体样品前处理包括将样品超声脱气10-50min；然后取超声脱气后的液体样品与PBS按体积比1-1.5:1稀释；用1M NaOH溶液调节pH到8-10。

[0043] 在本发明的一个具体实施方式中，所述检测三氯生和/或三氯卡班的方法，包括如下步骤：

[0044] 1) 按照填料中基质与单克隆抗体的体积比为1:1~1:1.5制备免疫亲和柱；

[0045] 所述的单克隆抗体为三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体，所述三氯生单克隆抗体采用式I所示三氯生半抗原或者式III所示三氯生人工抗原制得，所述三氯卡班单克隆抗体采用式II所示三氯卡班半抗原或者式IV所示三氯卡班人工抗原制得；

[0046] 2) 称取样品进行样品前处理；

[0047] 其中，固体样品前处理包括将固体样品与乙腈混合、超声，离心取上清，氮吹；液体样品前处理包括将液体样品超声脱气；

[0048] 3) 将经过前处理的样品上样于制备的免疫亲和柱、洗脱，将洗脱后的洗脱产物进行三氯生和/或三氯卡班的检测。

[0049] 其中三氯生和/或三氯卡班的检测优选为用超高效液相色谱和质谱串联的检测方法；其中，超高效液相色谱条件：色谱柱：C18柱，100mm×2.1mm，1.7μm或其他等效柱；流动相：A，甲醇、B，水；流动相梯度洗脱程序：0.00-6.00min 30%-100%流动相A、6.00-8.00min 100%流动相A、8.00-8.10min 100%-30%流动相A、8.10-11.00min 30%流动相A；柱温：40

℃；样品室温度：4℃；进样量：10μL。所述质谱的条件为：电离源：ESI(-)；毛细管电压：2.5kV；离子源温度：150℃；脱溶剂气温度：400℃；脱溶剂气流量：900L/h；TCC母离子313.0m/z，子离子160.0、126.0m/z；TCS母离子286.8m/z、288.8m/z，子离子35.0m/z。

[0050] 本发明还提供了一种免疫亲和柱，填充有上述三氯生单克隆抗体(TCC mAb)和/或三氯卡班单克隆抗体(TCS mAb)。

[0051] 本发明所述的单克隆抗体可以为IgG、IgA、IgM、IgD或IgE亚型。在本发明的一个具体实施方式中，所述的单克隆抗体为IgG。

[0052] 以下十多本发明采用的一些术语的解释：“OPD”为邻苯二胺；“DMEM”为杜氏培养基(dulbecco's modified eagle medium)，是在MEM培养基基础上研制的含有各种氨基酸和葡萄糖的培养基；“IAC”为免疫亲和层析净化方法；“RSD”为相对标准偏差；“ME”为Matrix effect，即基质效应，指的是混合样品的共洗脱残余基体组分对目标分析物电离的影响；“TMB”为3,3',5,5'-四甲基联苯胺；“BSA”为牛血清白蛋白；“NHS”为N-羟基丁二酰亚胺；“BPA”为双酚A；“LOD”为检出限；“LOQ”为定量限，即实际检测时可以定量的最低的值，

[0053] 先对于现有技术，本发明取得了以下有益效果：

[0054] 一、本发明创造性地提出采用三氯生半抗原和/或三氯卡班半抗原化合物，最终制备得到的三氯生半和/或三氯卡班单克隆抗体用于检测三氯生和/或三氯卡班，检测方法灵敏度高，精密度、回收率、LOD和LOQ均能满足检测分析的要求，有效解决前处理中样品净化不理想的问题，并减少样品基质干扰，缩短分析时间，提高回收率。

[0055] 二、采用式(I)所示三氯生半抗原化合物所得到的三氯生单克隆抗体，以及采用式(II)所示的三氯卡班半抗原化合制得的三氯卡班单克隆抗体，分别对三氯生和三氯卡班具有优异的选择性，与其结构类似物的交叉反应率低，用于三氯生和/或三氯卡班检测的IC₅₀值低，可以在复杂基质中特异性性地检测痕量三氯生和/或三氯卡班，不会出现假阳性的检测结果。

附图说明

[0056] 图1：式I所示的三氯生半抗原的LC-MS/MS鉴定图。

[0057] 图2：式I所示的三氯生半抗原的¹H-NMR鉴定图。

[0058] 图3A为BSA的MALDI-TOF鉴定图，图3B为三氯生半抗原与BSA偶联后的MALDI-TOF鉴定图。

[0059] 图4：三氯生单克隆抗体检测的标准曲线。

[0060] 图5：式II所示的三氯卡班半抗原的LC-MS/MS鉴定图。

[0061] 图6：式II所示的三氯卡班半抗原的¹H-NMR鉴定图。

[0062] 图7为三氯卡班半抗原与BSA偶联后的MALDI-TOF鉴定图。

[0063] 图8：三氯卡班单克隆抗体检测的标准色谱曲线。

[0064] 图9：三氯生和三氯卡班标准品色谱图。

[0065] 图10：加载液中甲醇含量对分析物(TCC、TCS)回收率的影响。

[0066] 图11：洗脱液中甲醇的含量对分析物(TCC、TCS)回收率的影响。

[0067] 图12：洗脱液体积对分析物(TCC、TCS)回收率的影响。

[0068] 图13：选择尼龙或纤维玻璃作为UPLC-MS/MS进样前的过滤，对分析物(TCC、TCS)的

损耗。

[0069] 图14:免疫亲和柱净化与常用的三种净化方式(C18、GCB、HLB)进行净化的净化性能对比。

[0070] 图15:本发明利用免疫亲和层析检测TCC和/或TCS的示意图。

具体实施方式

[0071] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的部分实施例,而不是全部。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0072] 本实施例所用的材料、试剂的来源(所有的化学试剂或溶液至少为分析纯):

[0073] TCC标准品(纯度>99.0%),购自Toronto Research Chemicals(加拿大安大略省北约克);TCS标准品(纯度>99.5%),购自Dr.Ehrenstorfer GmbH(德国奥格斯堡);双苯基脲(纯度>98%)、甲基TCS、双酚A(纯度>99.0%)和2,2',4,4'-四溴联苯醚,购自Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯);NHS活化的Sepharose 4B、6B凝胶,购自韦氏博慧(中国北京);PP柱(聚丙烯柱、3mL)购自Biocomma(中国深圳);Waters Sep-Pak C18固相萃取柱(200mg,3mL)、Oasis HLB固相萃取柱(60mg,3mL),购自Milford(美国马萨诸塞州);Supelclean ENVI-Carb固相萃取柱(500mg、6mL),购自Supelco(美国利方特市);液质联用纯度级别试剂的甲醇(MeOH)、乙腈(MeCN)由Merck(德国达姆施塔特)提供;制备超纯水的Milli-Q超纯系统购买自Millipore(美国马萨诸塞州贝德福德);分析纯NaOH和盐酸(36% HCl)购买自北京化工厂(中国北京);磷酸盐缓冲液(PBS, pH9.5, 0.02mol/L)为NaCl(17.6g)、KCl(0.04g)、NaH₂PO₄·2H₂O(5.8g)和Na₂HPO₄·12H₂O(1.18g)溶解在1L超纯水中获得;微孔板酶标仪购自Sunnyvale(美国加利福尼亚);尼龙过滤器(0.22μm)购买自津腾(中国天津);玻璃纤维过滤器(0.22μm)购买自美国Pall;食品和饮料购买自中国北京的超市。

[0074] 实施例1 三氯生单克隆抗体(TCS mAb)的制备

[0075] 1、三氯生半抗原式I化合物的制备

[0076] 在50mL圆底烧瓶中将424mg三氯生溶于7mL的N,N-二甲基甲酰胺中,冰浴磁力搅拌下分批加入48mg氢化钠,待不再有气泡冒出时撤去冰浴,常温反应40min。缓慢加入229mg4-溴甲基苯甲酸甲酯,薄层色谱板点板监测反应进程。将其放入40℃油浴中反应,不断点板,待反应完全时,停止加热。将反应液用乙酸乙酯萃取两次,收集有机相。将有机相旋蒸干,瓶中加入12mL乙酸乙酯将残留物溶解,称量残留物2倍重量的硅胶加入其中,旋蒸干,准备硅胶柱上样。将反应液与硅胶混合好的硅胶样品使用干样加样法进行加样,用石油醚:乙酸乙酯(8:1,v/v)的混合液作为淋洗剂进行淋洗,10mL离心管收集淋洗液,薄层色谱板点板,通过与原料液进行比对,确定目标物的出现时间以及消失时间。将所有在硅胶柱层析时薄层色谱点板在同一目标产物位置的离心管中的液体都收集到100mL旋蒸瓶中进行旋蒸。用7mL甲醇溶解,按2倍物质的量加入2M NaOH溶液,40℃下加热,水解完全后,用6mol/L的HCl调节pH到2。将反应液用50mL乙酸乙酯萃取两次,向收集的有机相中加入无水硫酸钠,加入后磁力搅拌1h。过滤,旋蒸干,得到纯化后的式I所示三氯生半抗原。

[0077] 分别采用高效液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)和核磁共振(Nuclear magnetic

resonance, NMR) 对合成的半抗原进行鉴定, 经鉴定, 半抗原被成功制备。LC-MS/MS 鉴定图见附图1, ^1H -NMR 鉴定图见附图2。

[0078] 2、三氯生人工抗原(式III)的制备

[0079] 以三氯生半抗原(式I)与载体蛋白BSA的偶联比为0.7:1, 进行式III所示三氯生人工抗原的制备, 即三氯生免疫原的制备。具体步骤如下:

[0080] 取60载体蛋白当量的式I所示三氯生半抗原溶于1mL N,N-二甲基甲酰胺中, 分别加入180个BSA当量的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺, 常温下搅拌2h, 制得反应液I; 取一定量的BSA 50mg充分溶解于5mL pH7.4的PBS中制得反应液II, 将反应液I逐滴缓慢加入反应液II中, 并于室温下搅拌24h; 将反应终产物装入透析袋, 用0.01M的PBS缓冲液透析3天, 每天换3次透析液以除去未反应的小分子物质; 以10000rpm离心10min, 收集上清液分装后于-20℃保存备用。

[0081] 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF)进行鉴定, 鉴定结果显示, 三氯生人工抗原合成成功, BSA及BSA与三氯生半抗原偶联后的三氯生人工抗原的MALDI-TOF鉴定结果见附图3A和图3B。

[0082] 3、三氯生单克隆抗体(TCS mAb)的制备

[0083] 1) 动物免疫

[0084] 采用小剂量短周期方案免疫BALB/c雌性小鼠。用上述制备出的三氯生免疫原按100μg/只, 以生理盐水溶解三氯生人工抗原与弗氏完全佐剂等体积混匀, 颈背部皮下注射免疫6~8周龄Balb/c雌鼠, 初次免疫后第7、14、28天以免疫原与弗氏不完全佐剂等体积混匀, 各追加免疫一次。

[0085] 2) 抗血清筛选

[0086] 第4次免疫之后7~10天, 于小鼠眼眶下静脉采血200μL, 采集的血液4℃静置2h后, 37℃孵育8h, 血液完全凝固, 血清析出。采用间接ELISA法筛选包被原稀释度以及抗血清的稀释度, 再采用间接竞争ELISA法测定其特异性。采用方阵滴定法确定包被原、抗体的最适工作浓度, 具体步骤如下:

[0087] (1) 包被: 用包被液将包被原稀释成一系列浓度加至酶标板, 100μL/孔, 4℃孵育过夜; 按照上述制备三氯生人工抗原相同的方法制备三氯生包被原, 只替换载体蛋白为OVA;

[0088] (2) 洗涤: 倾去孔内液体, 用洗涤液洗一遍, 280μL/孔, 在吸水纸上拍干;

[0089] (3) 封闭: 加入封闭液150μL/孔, 37℃孵育1h, 倾去孔内液体后直接拍干;

[0090] (4) 加样: 加入稀释成一系列浓度的待检血清, 100μL/孔, 37℃孵育30min;

[0091] (5) 洗涤: 倾去孔内液体, 用洗液洗4遍, 280μL/孔, 在吸水纸上拍干;

[0092] (6) 加酶: 加入HRP-羊抗鼠IgG (1:5000倍稀释) 100μL/孔, 37℃孵育30min; 洗板同(5);

[0093] (7) 显色: 加入新鲜配置的TMB溶液, 100μL/孔, 避光37℃显色15min;

[0094] (8) 终止: 加入2mol/L H_2SO_4 , 50μL/孔;

[0095] (9) 测定: 用酶标仪读取各孔OD450nm (双波长, 630nm为参考滤光片波长)。

[0096] 间接竞争ELISA方法如下:

[0097] (1) 包被: 用包被液将包被原适当稀释后加至酶标板, 100μL/孔, 4℃孵育过夜;

- [0098] (2) 洗涤:倾去孔内液体,用洗涤液洗一遍,280μL/孔,在吸水纸上拍干;
- [0099] (3) 封闭:加入封闭液150μL/孔,37℃孵育1h,倾去孔内液体后直接拍干;
- [0100] (4) 加样:加入不同浓度的三氯生标准品和对应稀释度的抗血清,50μL/孔,37℃孵育30min;
- [0101] (5) 洗涤:倾去孔内液体,用洗液洗4遍,280μL/孔,在吸水纸上拍干;
- [0102] (6) 加酶:加入HRP-羊抗鼠IgG (1:5000倍稀释) 100μL/孔,37℃孵育30min;洗板同(5);
- [0103] (7) 显色:加入新鲜配置的TMB溶液,100μL/孔,避光37℃显色15min;
- [0104] (8) 终止:加入2mol/L H₂SO₄,50μL/孔;
- [0105] (9) 测定:用酶标仪读取各孔OD_{450nm} (双波长,630nm为参考滤光片波长),以OD值为纵坐标,标准品浓度的对数为横坐标,用软件Origin8.5绘制标准曲线,得到IC₅₀ (半数抑制浓度) 值。根据间接ELISA和间接竞争ELISA的结果。选取抑制较好,血清效价高的小鼠用作制备单克隆抗体。
- [0106] 3) 骨髓瘤细胞的复苏和培养
- [0107] 将骨髓瘤细胞从液氮罐中取出,迅速放入37℃水浴中,待完全融化后,将细胞悬液移至15mL的离心管中,缓慢加入细胞培养液,边加边混合,1000rpm离心4min。弃去上清液,将沉淀细胞移至细胞瓶中,加入DMEM完全培养液,置于CO₂培养箱中培养,由于冻存液中含有DMSO,复苏后培养液中仍有残余,应于复苏后第二天及时换液。复苏后的骨髓瘤细胞用含有20%小牛血清的完全培养液培养,当细胞处于对数生长期时,形态良好的细胞供融合使用。融合时用移液管将细胞从瓶壁上吹下,收集于50mL离心管中,1000rpm离心4min,用不完全培养基清洗细胞2次,用不完全培养基重悬备用。
- [0108] 4) 脾淋巴细胞的制备
- [0109] 细胞融合前3天对阳性小鼠加强免疫一次,腹腔注射25μg抗原,不加佐剂,用灭菌的生理盐水稀释抗原至0.8mL。融合前,将小鼠摘眼球放血,分离血清,至于-20℃保存,作为抗体阳性对照。
- [0110] (1) 将阳性小鼠颈椎脱臼处死,浸泡于75%酒精中,约3min后,放入平皿内移入超净台;
- [0111] (2) 打开腹腔,无菌取出脾脏,放入盛有10mL不完全培养液的平皿内清洗,剥离脾脏周围的脂肪和结缔组织;
- [0112] (3) 将脾脏移入另一个盛有10mL不完全培养液的平皿中的200目滤网上,将脾脏剪碎,用高压灭菌的玻璃注射器内芯在滤网上研磨脾脏,再用不完全培养液冲洗滤网,直到滤网上只剩下白色结缔组织;
- [0113] (4) 将脾细胞悬液转移至50mL离心管中,加不完全培养液至35mL,混匀。1000rpm离心10min,弃上清,用不完全培养液清洗细胞1-2次,进一步除去细胞悬液中的结缔组织;
- [0114] (5) 10mL不完全培养液重悬细胞,吹打混匀,细胞计数后备用。
- [0115] 5) 细胞融合
- [0116] (1) 分别吸取含 1×10^8 个脾淋巴细胞和含 2×10^7 个骨髓瘤细胞的细胞悬液,混合于50mL离心管中,补加不完全培养液至35mL。1000rpm离心6min,弃上清。(2) 加不完全培养液使细胞悬浮,补加不完全培养液至35mL,1000rpm离心6min,弃上清。将离心管倒置,用吸

水纸将残留的液体吸干。(3)用手弹离心管管底,使沉淀细胞呈均匀松散状,置于37℃水中预热;(4)取分装好的37℃预热的50%PEG一管,左手匀速转动离心管,右手持1mL移液管吸取50%PEG 0.8mL,沿管壁缓缓加入,1min内加完,静置1.5min;

[0117] (5)3min内将5mL预热的不完全培养液加到融合管中,终止反应;(6)800rpm离心7min,弃上清,加入5mLHAT培养液,轻轻吹吸沉淀细胞,使其悬浮并混匀,再补加HAT培养液至总体积约为70mL;(7)将细胞悬液加入已铺有饲养细胞的96孔细胞培养板中,100μL/孔,镜检,置37℃含5%CO₂的细胞培养箱中培养;(8)每天观察并记录细胞生长情况,融合后第5天用HAT培养液换液。

[0118] 6) 杂交瘤细胞的筛选

[0119] 融合后一周,对所有克隆生长孔的培养上清进行抗体检测,首先采用间接ELISA筛选效价高的阳性细胞。向已经包被封闭好的酶标板的每孔中加灭菌的PBS,50μL/孔,再加入杂交瘤细胞上清液,50μL/孔,然后按照间接ELISA的步骤进行操作,选出OD_{450nm}>1的细胞孔,采用间接竞争ELISA检测这些孔的细胞分泌的抗体是否对三氯生具有特异性。

[0120] 7) 阳性杂交瘤细胞的克隆化

[0121] 采用有限稀释法进行细胞克隆,具体操作如下:(1)克隆化的前一天制备饲养细胞;(2)将待克隆的阳性孔中的细胞悬浮,吸取悬浮液至含有1mLHT培养液的无菌瓶中;(3)细胞悬液台盼蓝染色计数;根据计数结果,用HT培养基进行稀释;(4)细胞培养板置于37℃5%CO₂的培养箱培养7-10天,当克隆细胞长至孔底面积的1/4-1/3时,对其上清液按照6)的方法步骤进行检测;(5)取阳性克隆扩大培养、冻存,同时按照上述方法继续克隆至阳性率100%;(6)将阳性单克隆细胞扩大培养至24孔板,长满后扩至细胞瓶,一部分冻存;一部分继续培养,用于生产腹水,制备单克隆抗体。

[0122] 8) 杂交瘤细胞的冻存:

[0123] (1)将预备冻存的细胞用不完全培养基洗两遍,然后从瓶壁上吹下,移入离心管中,1000rpm离心4min,弃去上清;(2)根据细胞量的多少,加入1.5-2mL冻存液悬浮细胞,然后转移到冻存管中;(3)把做好标记的冻存管置于4℃冰箱中0.5-1h后,移入-80℃冰箱中24h,然后移入到液氮罐中保存。

[0124] 9) 杂交瘤细胞的复苏:

[0125] (1)从液氮管中取出准备复苏的细胞冻存管,迅速投入到37℃水浴中,不断搅动,使其在1min溶解,在超净台中转移至离心管中,室温,1000rpm离心4min;(2)弃去上清,加入完全培养液,轻轻吹打使细胞悬浮,转移至细胞培养瓶中;(3)做好标记,将细胞瓶置于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中培养,过夜后换液,继续培养备用。

[0126] 10) 单克隆抗体的生产,采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体:

[0127] (1)选用健康的Balb/c雌性小鼠,在接种杂交瘤细胞前1-2周,先给小鼠腹腔内注射无菌石蜡油0.5mL。预处理过的小鼠2-3个月内均可使用;(2)将生长良好的杂交瘤细胞,1000rpm离心4min,重悬,调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL,每只小鼠腹腔注射0.5mL细胞悬液;(3)接种细胞10天后,可见小鼠腹部膨大,从腹腔抽取腹水,抬高小鼠头部,消毒腹部皮肤,用5mL注射器刺入腹腔,一般每次可抽取5-10mL。此后每隔1-3天取一次;(4)3000rpm离心10min,吸取上层淡黄色腹水,分装,-20℃备用。

[0128] 11) 单克隆抗体的纯化:采用辛酸-硫酸铵沉淀法粗提腹水;具体步骤如下:

[0129] (1)取腹水5mL,加入10mL 0.06mol/L, pH 5.0的乙酸缓冲液,用0.1mol/L HCl调节pH至4.8; (2)室温搅拌条件下,逐渐加入160 μ L辛酸,4℃静置2h,8000rpm离心10min,弃沉淀; (3)上清中加入0.2mL 0.1mol/L PBS,用1mol/L NaOH调节pH至7.4; (4)逐滴加入适量饱和硫酸铵使溶液呈45%饱和度,静置1h,4℃8000rpm离心30min,弃上清; (5)沉淀溶于5mL的PBS中,在PBS中透析2天。

[0130] 结果显示,制备得到的三氯生单克隆抗体IC₅₀为0.855ng/mL,绘制标准曲线的数据见表1,抑制曲线见附图4,图4显示相关系数为0.8977,拐点数为2个。说明本发明制备得到的三氯生人工抗原免疫小鼠制备的三氯生单克隆抗体的效价更高、IC₅₀值更低。

[0131] 表1标准曲线数据

	标准浓度 ppb	(Mean)	B/BO %	计算浓度 ppb	拟合误差 %
	0.000	2.269	100.0	0.000	0.0
[0132]	1.000	1.010	44.5	1.000	0.0
	3.000	0.591	26.0	3.000	0.0
	9.000	0.321	14.1	9.000	0.0
	27.000	0.242	10.7	26.999	0.0
	81.000	0.230	10.1	81.002	0.0

[0133] 实施例2三氯卡班单克隆抗体(TCC mAb)的制备

[0134] 1、三氯卡班半抗原(式II)的制备

[0135] 称取相等物质的量的异氰酸3,4-二氯苯酯和4-氨基丁酸甲酯于50mL圆底烧瓶中。加入10mL二氯甲烷,氮气保护下反应。薄层色谱板监测反应,确定反应完全后,将反应液放入40℃水浴旋蒸干,产物称重后,用7mL甲醇溶解,按2倍物质的量加入1mol/L NaOH溶液,40℃下加热,薄层色谱板监测水解情况。水解完全后,用6mol/L的HCl调节pH到2。将反应液用50mL乙酸乙酯萃取两次。分别将萃取的水相和有机相TLC点板,确定水相中无目标产物后,向收集的有机相中加入无水硫酸钠(无水硫酸钠按10%有机相体积的量加入),加入后磁力搅拌1h。过滤,旋干,得到三氯卡班半抗原。

[0136] 分别采用LC-MS/MS和NMR对合成的三氯卡班半抗原进行鉴定,经鉴定,三氯卡班半抗原被成功制备。LC-MS/MS鉴定图见附图5,1H-NMR鉴定图见附图6。

[0137] 2、三氯卡班人工抗原(式IV)的制备

[0138] 以三氯卡班半抗原(式II)与载体蛋白BSA的偶联比为6.8:1,进行式IV所示三氯卡班人工抗原的制备,即三氯卡班免疫原的制备。具体步骤如下:

[0139] 取60载体蛋白BSA当量的三氯卡班半抗原(式II)溶于1mL N,N-二甲基甲酰胺中,分别加入180个载体蛋白BSA当量的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺,常温下搅拌2h,制得反应液I;取一定量的载体蛋白BSA 50mg充分溶解于5mL pH7.4的PBS中制得反应液II,将反应液I逐滴缓慢加入反应液II中,并于室温下搅拌24h。将反应终产物装入透析袋,用0.01mol/L的PBS缓冲液透析3天,每天换3次透析液以除去未反应的小分子物质;以10000rpm离心10min,收集上清液分装后于-20℃保存备用。用MALDI-TOF进行鉴定,鉴定结果显示,三氯卡班人工抗原合成成功,BSA与三氯卡班半抗原偶联后的三氯卡班人工抗原的MALDI-TOF鉴定结果见附图7。

[0140] 3、三氯卡班单克隆抗体(TCC mAb)的制备

[0141] 按照高上述制备TCS mAb相同的方法制备TCC mAb,区别在于使用三氯卡班免疫原(式IV)替换三氯生免疫原(式III)。制得的三氯卡班单克隆抗体(TCC mAb) IC₅₀为1.307ng/mL,绘制标准曲线的数据见表2,抑制曲线见附图8,其中,相关系数为0.9751,拐点数为2。

[0142] 表2标准曲线数据

	标准浓度 ppb	(Mean)	B/BO %	计算浓度 ppb	拟合误差 %
[0143]	0.000	1.993	100.0	0.000	0.0
	0.030	1.778	89.2	0.030	0.0
	0.090	1.669	83.7	0.090	0.0
	0.270	1.481	74.3	0.270	0.0
	0.810	1.217	61.1	0.810	0.0
	2.430	0.711	35.7	2.430	0.0

[0144] 实施例3检测TCC mAb和TCS mAb与分析物(TCC和/或TCS)的特异性

[0145] 采用酶联免疫吸附法测定结构相似化合物的IC₅₀,评价制备的TCC mAb和TCS mAb的交叉反应率(CR)。

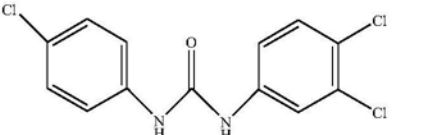
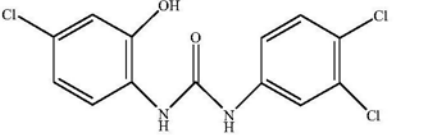
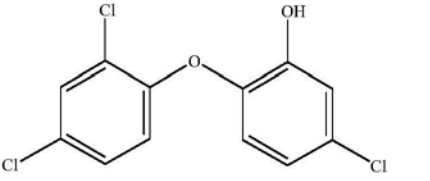
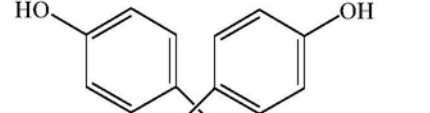
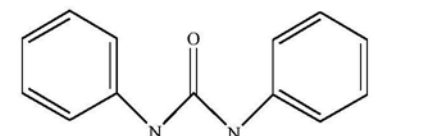
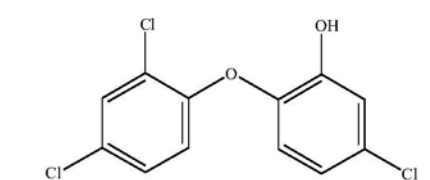
[0146] 1) 实验步骤

[0147] 包被缓冲液(13mM Na₂CO₃和35mM NaHCO₃,pH 9.6)稀释的包被原(每孔100μL),加入96孔板,4℃孵育过夜。清洗缓冲液(0.01M PBS,pH 7.4,0.05%吐温20)清洗3次之后,150μL封闭缓冲液(0.01M磷酸盐缓冲液,pH 7.4,包含0.5%BSA,0.05%吐温20)封闭游离的活性成分1h、37℃。清洗缓冲液清洗3次,然后37℃干燥1h。依次加入50μLTCC,TCS或者结构相似物的标准品和50μL用PBS稀释后的抗体到孔中,随后37℃孵育30min。清洗缓冲液清洗5次之后,在孔中加入100μL山羊抗兔免疫球蛋白过氧化物酶标签,随后37℃孵育30min。清洗缓冲液清洗5次,向孔中加入100μL TMB底物溶液,随后37℃孵育10min。最后,向孔中加入50μL终止液(2M H₂SO₄)终止酶促反应,并且,微孔板酶标仪检测450nm吸光度。

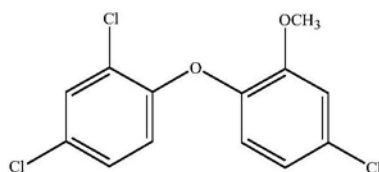
[0148] 2) 结果

[0149] 交叉反应率结果见表3和表4,其中,交叉反应率(CR) = (抗体对目标化合物的IC₅₀/抗体对检测化合物的IC₅₀) × 100%。表3为本发明制得TCC mAb对分析物TCC及其类似物的交叉反应率测试结果,表4为本发明制得TCS mAb对分析物TCS及其类似物的交叉反应率测试结果。

[0150] 表3 TCC mAb对TCC及其结构相似物的交叉反应率

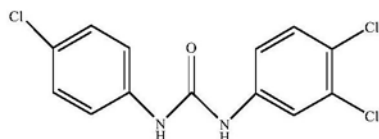
	化合物	结构	CR(%)
	TCC		100.0
	2'-OH TCC		<11.0
[0151]	TCS		<1.0
	双酚 A		<1.0
	双苯基脲		<1.0
[0152]	表4 TCS mAb对TCC及其结构相似物的交叉反应率		
	化合物	结构	CR(%)
[0153]	TCS		100.0

甲基 TCS



56.0

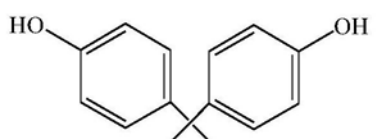
TCC



<1.0

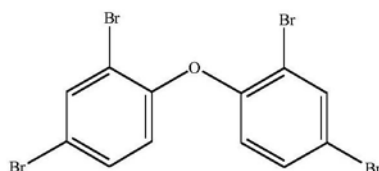
[0154]

双酚 A



<1.0

2,2',4,4'-四溴二苯醚



<1.0

[0155] 实施例4免疫亲和柱的制备

[0156] 1、基质制备

[0157] (1) 上下混匀柱料,用1mL移液枪(蓝枪头口稍剪粗)取4mL NHS活化的Sepharose 4B,加到6mL的空反应柱管中,待自然沉降后体积为3mL柱床体积。(2) 重力柱作用流出保存柱料的异丙醇,用10mL预冷1mM HCl洗掉柱床中的有机溶剂。(3) 加2mL偶联缓冲液至柱料中,迅速用注射器反抽吸走液体。

[0158] 2、三氯生和/或三氯卡班IgG单抗与Sepharose 6B偶联

[0159] (1) 将柱管底端封口,将0.3mg三氯生单克隆抗体、0.3mg三氯卡班单克隆抗体或者0.3mg三氯生单克隆抗体、0.3mg三氯卡班单克隆抗体的混合溶液(0.2M NaHCO₃缓冲液中)分别加入到制备好的柱料基质中,盖好上盖,上下混匀柱料及溶液。(注:柱床体积与抗体溶液的最佳体积比为1:1.5);

[0160] (2) 室温条件(20~25℃)下采用上下颠倒的方式充分混匀上述的混和物反应2h;

[0161] (3) 使柱管内液体自然沉降后,收集流出液,用紫外分光光度计在OD280测有无IgG流出柱管。若OD280无峰,可以认为抗体都偶联到柱料上,若OD280有峰,根据浓度折算柱料上偶联的抗体量;

[0162] (4) 偶联缓冲液2mL洗柱料至无液滴流出后,加封闭缓冲液约1.5倍柱床体积,室温条件(20~25℃)下采用上下颠倒的方式充分混匀上述的混和物反应2h;

[0163] (5) 反应结束后流出液体至无液滴流出为止。用3mL 0.1M Tris-HCl pH 8.0洗涤,再换3mL 0.1mol/L醋酸/醋酸钠(含0.5mol/L NaCl),pH 4.0洗涤。如此再循环一次酸碱洗

柱后,用5mL 20mM PBS洗涤;

[0164] (6) 加含0.05%NaN₃的PBS缓冲液于4℃保存柱料,备用。

[0165] 3、装柱

[0166] 将交联后的Sepharose 6B用10mL 20mM PBS pH 7.4洗涤后再用10mL PBS重悬,装入空的亲和纯化柱柱体中。

[0167] 4、测定柱容量

[0168] 通过在甲醇/水(1:9,v/v)中加入过量的TCC(800ng)和TCS(800ng)的溶液来确定。

5、测定0.3mg三氯生单克隆抗体、0.3mg三氯卡班单克隆抗体或者0.3mg三氯生单克隆抗体、0.3mg三氯卡班单克隆抗体的混合溶液3种固定方式对柱的吸附容量和偶联率的影响情况,其中双酚A单克隆抗体作为对照,偶联率=(加入mAb的总量-流出mAb的量)/加mAb的总量×100%,结果见表5。

[0169] 表5固定方式对柱的吸附容量和偶联率的影响

	固定方式	加入量(mg)	吸附容量(ng)		偶联率 (%)
			TCC	TCS	
[0170]	TCC mAb	0.3	315	0	97.9
	TCS mAb	0.3	0	139	98.7
	TCC mAb+TCS mAb	0.3+0.3	332	128	98.2
	BPA mAb	0.3	0	0	98.0

[0171] 由表5可知,三种固定方式中免疫亲和柱的偶联率近似,平均为98.3%,且三种固定方式中TCC、TCS单克隆抗体对TCC和TCS的吸附容量基本相同。后续实施例检测中采用同时偶联TCC和TCS单克隆抗体的免疫亲和柱。

[0172] 实施例5对样品中TCC和/或TCS的痕量检测

[0173] 一、样品前处理

[0174] 1、固体样品(蔬菜、鸡蛋、鸡肉)前处理

[0175] (1) 称取1g样品匀质后与5mL乙腈混合;(2) 振荡30s,超声20min,10000rpm离心10min后取上清;(3) 5mL乙腈重复提取一次,合并提取液;(4) 40℃氮吹至体积小于1mL,加入10mL PBS混匀。

[0176] 2、液体样品(饮料、啤酒)前处理

[0177] (1) 将样品超声脱气30min;(2) 取10mL样品与PBS按体积比1:1稀释;(3) 用1M NaOH溶液调节pH到9。

[0178] 二、检测步骤

[0179] 1、免疫亲和柱净化条件选择

[0180] 1) 选择15%的甲醇作为上样液

[0181] 防止抗体活性被破坏选择甲醇/PBS作为上样液,为确定甲醇在上样液中的最佳浓度,将含有0%、5%、10%、15%、20%(体积含量)甲醇的PBS溶液(10mL)与5ng的TCC和TCS加载到免疫亲和柱中,结果如图10所示。当甲醇含量为15vol%时,回收率没有进一步增长,表明适当的甲醇含量可以减少非特异性吸附,故选择15vol%甲醇含量的PBS溶液作为加载液进行后续试验。

[0182] 2) 选择纯甲醇作为洗脱液

[0183] 合适的洗脱条件有助于分离分析物与抗体的相互作用,将分析物返回流动相。甲醇及甲醇的水溶液通常用于免疫亲和柱洗脱液。本实施例对比了洗脱液中甲醇的浓度对TCC、TCS回收率的影响,确定了洗脱液中甲醇的最佳浓度。结果如图11所示,随着甲醇浓度的增加,TCC回收率从58.5%提高到75.6%,TCS回收率从53.2%提高到106.9%。因此选择纯甲醇作为洗脱液进行后续试验。并且为确保完全洗脱分析物,验证1-5mL洗脱液体积对回收率的影响(参见图12),最终确定3mL作为最佳洗脱液体积。

[0184] 2、免疫亲和柱净化步骤

[0185] (1) 安装:取出实施例2制备的免疫亲和柱,恢复至室温后,将上方塞子取出剪断,重新盖上,与泵流操作架上的注射器连接,打开下端堵头。(2) 活化:依次将10mL水、10mL PBS流过免疫亲和柱,流速2-3滴/秒。(3) 上样:将前处理好的样品液流经免疫亲和柱,保持流速1-2滴/秒。(4) 淋洗:依次用10mL PBS和10mL水对亲和柱进行淋洗,尽可能的吸干柱内残留液体。(5) 洗脱:加入3mL色谱级甲醇洗脱,1-2滴/秒,收集于玻璃试管中。

[0186] 三、检测结果对比

[0187] 通过在免疫亲和层析纯化(实施例4制备的亲和层析柱)或未纯化的空白食品样品中加入一系列的分析物标准浓度,从而使基质对检测结果的干扰最小化。直接用UPLC-MS/MS测定分析物标准品(其中,5ng/mL三氯生和三氯卡班混合标准品的色谱图见图9,图9a和9b分别为TCC标准品离子对313>160和离子对313>126的色谱图,图9c和9d分别为TCS标准品离子对288.8>35和离子对286.8>35的色谱图),建立标准曲线。检测不同样品中TCC的方法验证结果如表6所示,检测不同样品中TCS的方法验证结果如表7所示。其中^a啤酒和饮料单位为μg/L,^b用免疫亲和柱纯化的样品,^c未经纯化的样品。标准曲线的相关系数(R^2)均大于0.99,线性良好。

[0188] 表6检测不同样品中TCC的方法验证结果

[0189]

样 品	加入标 准品含 量 ^a ($\mu\text{g/kg}$)	回收 率 (%) n=5	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/kg}$) ^a	LOQ ($\mu\text{g/kg}$) ^a	标准曲线斜率		
						基质匹配 曲线	溶剂曲线	ME (%)
啤 酒	0.001	70.6	4.3	0.0003	0.001	90777 ^b	100871	-10.0 ^b
	0.01	73.1	8.8			35506 ^c		-64.8 ^c
	0.05	82.8	12.9					
	0.10	75.7	4.3					
苏 打 水	0.001	75.9	3.9	0.0003	0.001	81487 ^b	67910	19.9 ^b
	0.01	70.1	4.1			14736 ^c		-78.3 ^c
	0.05	74.3	7.2					
	0.10	86.4	10.4					
鸡 肉	0.02	83.4	6.5	0.007	0.02	32978 ^b	32147	2.6 ^b
	0.1	88.9	12.3			1832 ^c		-94.3 ^c

[0190]

樱 桃	0.5	78.4	9.6	0.003	0.01	51891 ^b 29061 ^c	64724	-19.8 ^b -55.1 ^c
	1.0	86.7	12.4					
	0.01	84.9	8.3					
	0.1	80.4	6.4					
鸡 蛋	0.5	92.8	11.8	0.003	0.01	65230 ^b 22259 ^c	69345	-5.9 ^b -67.9 ^c
	1.0	78.4	6.5					
	0.01	79.2	5.1					
	0.1	88.2	3.8					
	0.5	84.6	8.1					
	1.0	73.0	4.4					

[0191] 表7检测不同样品中TCS的方法验证结果

[0192]

样品	加入标准品含量 ^a (μg/kg)	回收率 (%) n=5	RSD (%)	LOD (μg/kg) ^a	LOQ (μg/kg) ^a	标准曲线斜率		
						基质匹配曲线	溶剂曲线	ME (%)
啤酒	0.03	85.7	3.7	0.01	0.03	3165 ^b	3544	-10.7 ^b
	0.1	80.4	6.4			1754 ^c		-50.5 ^c
	0.5	93.3	9.1					
	1	82.5	7.4					
苏打水	0.03	86.4	7.9	0.01	0.03	2677 ^b	2384	12.3 ^b
	0.1	94.2	9.5			591 ^c		-75.2 ^c
	0.5	87.2	6.9					
	1	100.8	3.2					
鸡肉	0.3	88.7	4.3	0.1	0.3	2837 ^b	2379	19.2 ^b
	1	91.3	7.9			200 ^c		-91.6 ^c
	5	76.6	5.2					
	10	93.2	1.5					
樱桃桃	0.2	90.2	8.6	0.06	0.2	2758 ^b	3006	-8.3 ^b
	1	97.7	4.9			1034 ^c		-65.6 ^c
	5	102.5	4.3					
	10	91.8	14.5					
鸡蛋	0.2	83.5	10.3	0.06	0.2	3125 ^b	3390	-7.8 ^b
	1	81.4	5.4			1329 ^c		-60.8 ^c
	5	87.2	8.1					
	10	76.7	5.7					

[0193] “ME”为Matrix effect,即基质效应,指的是混合样品的共洗脱残余基体组分对目标分析物电离的影响。由于强ME可能导致分析物灵敏度下降/增加,从而导致UPLC-MS/MS分析结果的不精确和不准确。因此,应尽量降低基质效应的影响,以确保分析物的准确分析。克服ME的常用方法是使用有效的样品净化方法和直接稀释法。然而,直接稀释法会损失方法的灵敏度。因此,选择有效的净化方法是降低ME绝对值必不可少的。通过比较基质匹配和溶剂标准曲线的斜率来评价ME。其中 $ME = [(基质匹配标准曲线斜率/溶剂标准曲线斜率) - 1] \times 100\%$ 。如果值为正,则为基质增强效应,检测信号增强;如果值为负,则为基质抑制效应,检测信号被抑制。如果ME绝对值在20%范围内,则可以忽略ME。因此,免疫亲和柱的净化效果,可以通过计算ME的绝对值来评价。

[0194] 如表6、7所示,通过免疫亲和层析净化后的ME绝对值在可忽略的范围内。相反,没有任何净化步骤的ME绝对值显示出很强的基质抑制效果。综上所述,证明了免疫亲和层析

净化在检测TCC和TCS的优势,既不需要基质匹配校准,也不需要使用昂贵的稳定同位素内标。

[0195] 检测方法的LOD和LOQ分别为信噪比3:1和10:1时能检测到的TCC和TCS的最低浓度。表6、7显示,饮料样品中TCC的LOD值为0.3ng/L,食品中为3-7ng/kg。饮料样品中TCS的LOD为0.01μg/L,食品中为0.06-0.1μg/kg。饮料样品中TCC的LOQ值为1ng/L,食品中为0.01-0.02μg/kg。饮料样品中TCS的LOQ值为0.03μg/L,食品中为0.2-0.3μg/kg。

[0196] 通过表5-7的数据可以确认,本发明提供的TCC半抗原(式I)和TCS半抗原(式II)得到的单克隆抗体(TCC mAb和TCS mAb)用于免疫亲和层析检测中,TCC和TCS与其相应单克隆抗体的结合是特异性的。重复五次实验,评价本发明所述的检测方法的准确度(通过回收率表示)和精确度(通过RSD表示)。结果显示,TCC和TCS的平均回收率分别为70.1-92.8%和76.6-102.5%,RSD低于14.5%,表明该方法的准确性良好,具有很高的重现性。

[0197] 四、与其他净化方法对比

[0198] 采用三种常用的固相萃取吸附剂C18、GCB和HLB进行空白饮料样品的净化,通过添加一定浓度的TCC(0.5ng/mL)和TCS(5ng/mL)标准混合物,比较它们与免疫亲和层析的净化效果,其中,各固相萃取吸附剂的操作条件见表8。净化性能的对照结果见图14,饮料样品分别用C18、GCB和HLB净化时,TCC的信噪比(signal to noise ratio,S/N)分别为391、458和412,TCS的S/N分别为335、663和595。样品经IAC净化后,TCC和TCS的S/N分别为700和1033,与其余三种净化方法相比,S/N明显升高,使方法的灵敏度得到提升。此外,用IAC对样品进行净化,在目标化合物色谱峰之前,并没有出现C18净化时在1.51min、GCB净化时在1.83min和HLB净化时在1.69min出现的杂质干扰峰,说明IAC可有效的去除样品中的杂质,从而取得更良好的净化效果。说明本发明提供的免疫亲和柱层析方法(IAC)可以去除食品样品中的杂质,降低LC-MS/MS检测的基线噪声,提高方法的信噪比。

[0199] 表8采用C18、GCB、HLB固相萃取柱净化的操作条件

[0200]

固相萃取方法	活化	清洗剂	洗脱剂
C18	6 mL MeOH 和 6 mL H ₂ O	6 mL 50% MeOH	6 mL MeOH

[0201]

GCB	12 mL MeOH 和 6 mL H ₂ O	6 mL 50% MeOH	6 mL MeOH: 丙酮(60:40, v/v)
HLB	6 mL MeOH 和 6 mL H ₂ O	6 mL 50% MeOH	6 mL MeOH

[0202] 实施例6食品中的三氯生和三氯卡班的检测

[0203] 按照实施例5中所述样品前处理方法及免疫亲和柱的最佳条件进行样品的净化,净化后的洗脱产物用超高效液相色谱串联质谱检测。

[0204] 1、确定UPLC-MS/MS检测前使用的过滤器

[0205] 为了防止样品中的一些固体小颗粒进入UPLC-MS/MS系统中堵塞管路或色谱柱,通常在UPLC-MS/MS进样前需要将样品用针筒式过滤器过滤。选择两种不同的针筒式过滤器进行测试,尼龙(0.22 μ m)和玻璃纤维(0.22 μ m)过滤器对TCC和TCS的混合标准溶液(5ng/mL)过滤后,收集滤液,用UPLC-MS/MS分析,其中,滤液中残留分析物的比例(保留率) = (过滤后的混合标准溶液峰面积/混合标准溶液峰面积) $\times$ 100%。结果见图13,图13显示使用尼龙过滤器时,TCC的损耗约为36.7%,TCS基本无损耗。使用玻璃纤维进行过滤后,在玻璃纤维上没有观察到目标分析物,且TCC和TCS的损耗基本可以忽略,故最终选择了玻璃纤维过滤器进行过滤后,再进行UPLC-MS/MS分析。

[0206] 因此,按照上述实验,确认优选的免疫亲和柱层析的操作条件是上样液为15-20%甲醇含量的PBS溶液;和/或洗脱液为纯甲醇;和/或当样品为固体时,洗脱液和样品的体积质量比为3-5:1 (mL/g);当样品为液体时,洗脱液和样品的体积比为3-5:10;和/或洗脱液使用玻璃纤维过滤器进行过滤。

[0207] 2、超高效液相色谱及质谱的检测条件如下:

[0208] (1) 超高效液相色谱 (UPLC) 条件

[0209] 色谱柱:Waters ACQUITY UPLC™ BEH C18柱(100mm $\times$ 2.1mm,1.7 μ m)。流动相:A,甲醇;B,水。流动相梯度洗脱程序:见表9。柱温:40℃。样品室温度:4℃。进样量:10 μ L。

[0210] 表9三氯生和三氯卡班液相色谱梯度洗脱程序

	时间 (min)	甲醇 (%)	水 (%)
	0	30	70
[0211]	6.0	100	0
	8.0	100	0
	8.1	30	70
	11.0	30	70

[0212] (2) 质谱 (MS) 参考条件:

[0213] 电离源:ESI (-)。毛细管电压:2.5kV。离子源温度:150℃。脱溶剂气温度:400℃。脱溶剂气流量:900L/h。三氯生和三氯卡班定性定量离子对、碰撞能量见表10。

[0214] 表10目标化合物的质谱参数

[0215]

化合物	母离子(m/z)	定量离子		定性离子	
[0216]					
		离子(m/z)	碰撞能量(eV)	离子(m/z)	碰撞能量 (eV)
TCC	313.0	160.0	15	126.0	30
TCS	286.8*/288.8	35.0	15	35.0	15

[0217] 注:*定量离子

[0218] 3、结果

[0219] 三氯生及三氯卡班的载样量及回收率考察,采用复合免疫亲和柱的最优条件,结果表明三氯生和三氯卡班的最大吸附容量分别为332ng和128ng。

[0220] 1) 蔬菜、饮料样品中TCC和TCS的检测

[0221] 三氯生及三氯卡班在蔬菜和饮料中的回收率见表11。

[0222] 表11 TCC和TCS在蔬菜和饮料中的回收率和相对标准偏差

化合物	加标水平 ($\mu\text{g/kg}$)	蔬菜		饮料	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
[0223] TCC	0.5	94.2	9.8	80.5	3.3
	1.0	99.8	15.4	86.9	9.1
	5.0	90.5	7.2	91.8	8.3
TCS	0.5	92.5	5.6	94.1	2.7
	1.0	88.7	7.7	88.4	4.5
	5.0	84.4	9.4	82.9	12.6

[0224] 2) 鸡肉鸡蛋样品中TCC和TCS的检测见表12。

[0225] 表12实际样品中TCC和TCS的浓度

样品编号	TCC ($\mu\text{g/kg}$)或 ($\mu\text{g/L}$)	TCS ($\mu\text{g/kg}$) 或 ($\mu\text{g/L}$)
鸡肉		
1	nd	nd
[0226] 2	0.1	nd
3	nd	nd
4	nd	nd
鸡蛋		

1	0.1	below LOQ
2	nd	0.7
3	0.08	nd
4	nd	nd
5	nd	6.7

啤酒

[0227]

1	nd	nd
2	nd	nd
3	nd	nd

樱桃

1	nd	nd
2	nd	nd
3	nd	nd

[0228] 表12中的检测结果经过分散固相萃取-高效液相色谱检测鉴定(具体方法参见“分散固相萃取-高效液相色谱法测定水果中三氯生及三氯卡班”,王丽等,《食品安全质量检测学报》,2015(10):4205-4211.),结果与表12中基本一致。在鸡肉和鸡蛋样品中检测到TCC和TCS,其中,TCC检测到的浓度范围从0.08-0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,TCS检测到的浓度范围从低于LOQ到6.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。鸡蛋和鸡肉中的TCC和TCS可能是由受污染的水或饲料含有,生物积累导致。另一方面,也可能是因为使用海绵或者食品湿巾清洁食品表面所受污染导致。食用含有TCC和TCS的鸡源性食品对人类健康构成潜在威胁。这也从侧面反映了TCC和TCS检测精确度的重要性。

[0229] 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。

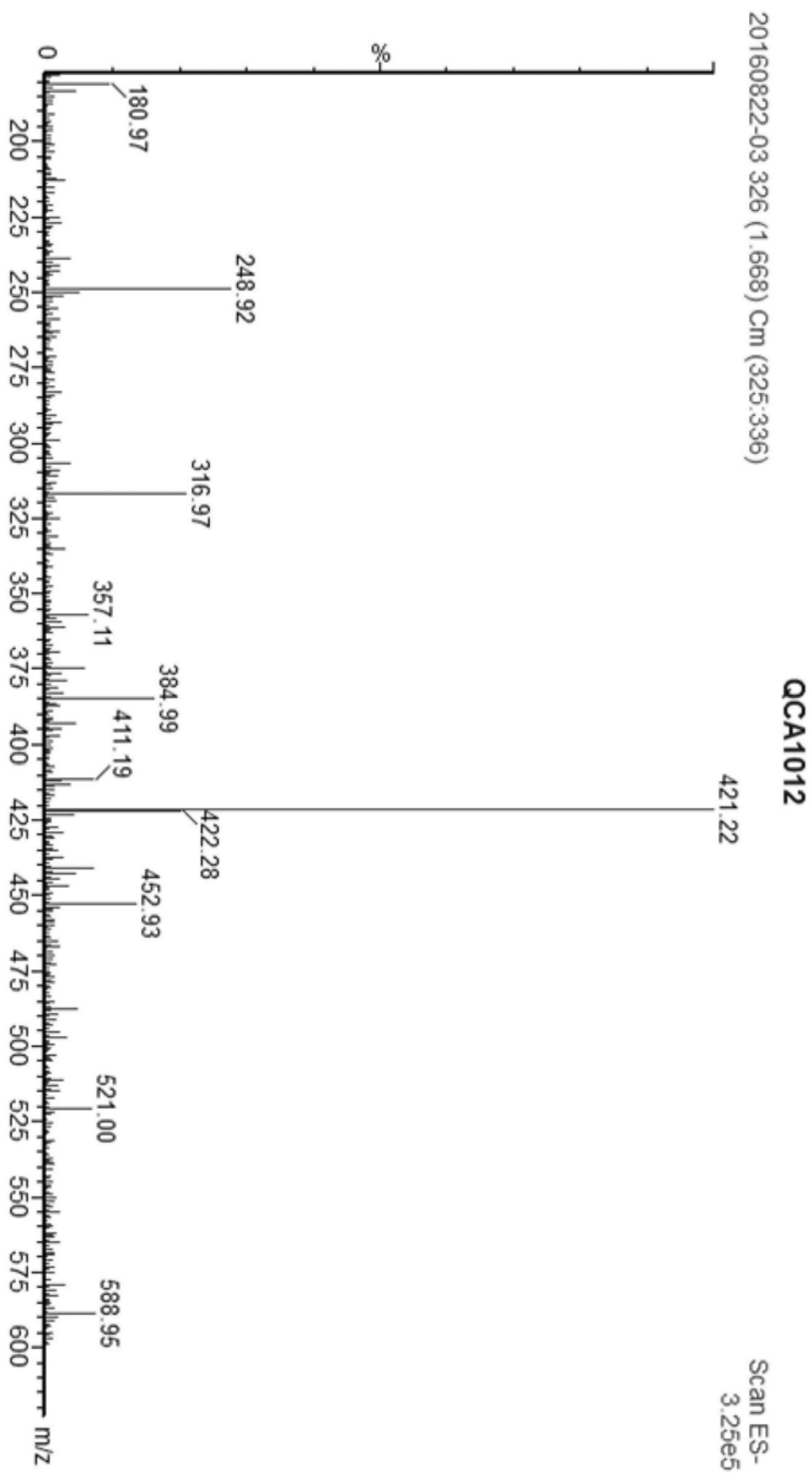


图1

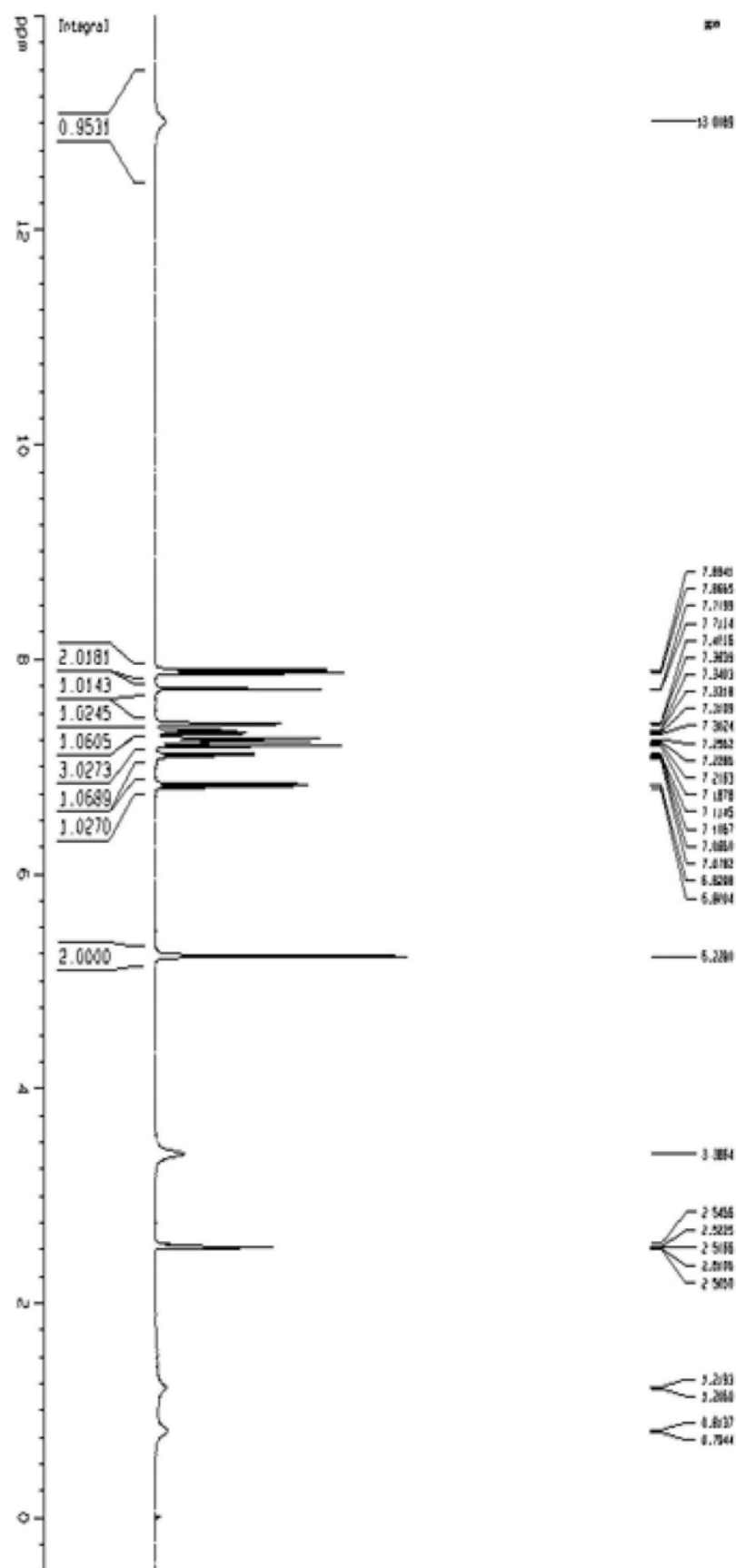


图2

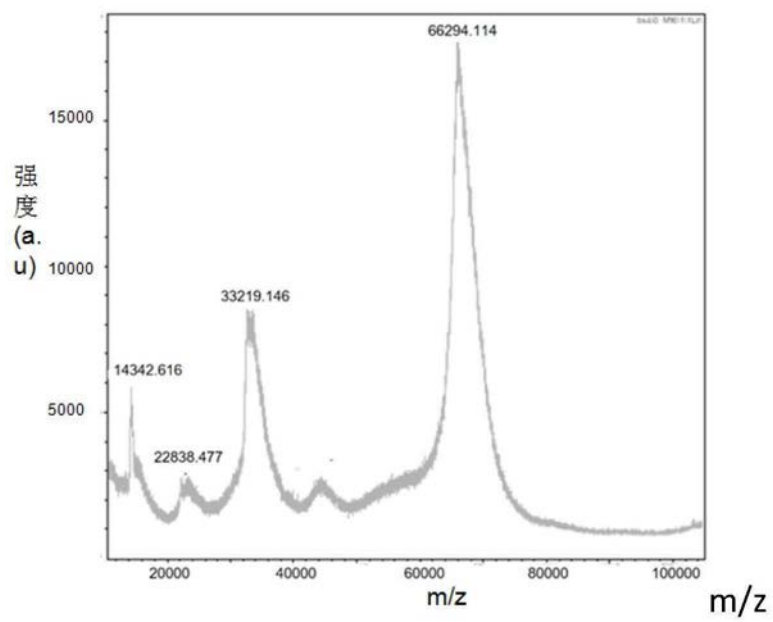


图3A

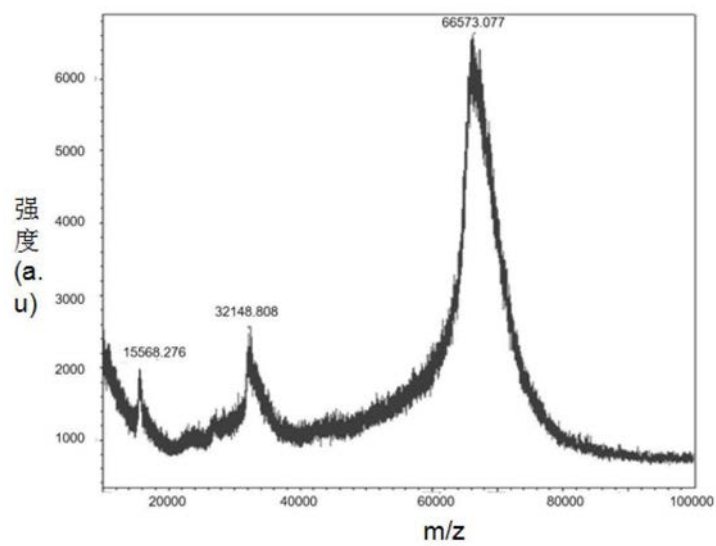


图3B

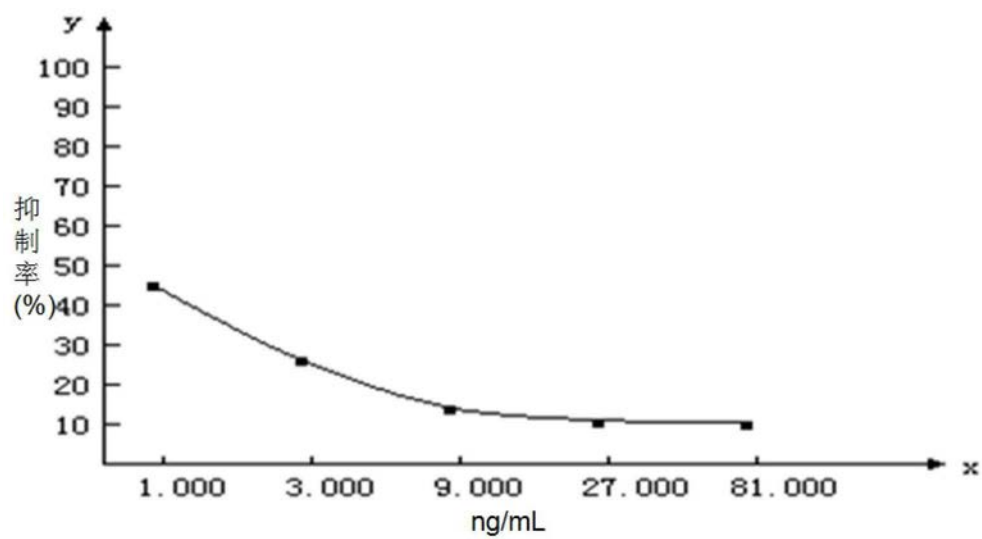


图4

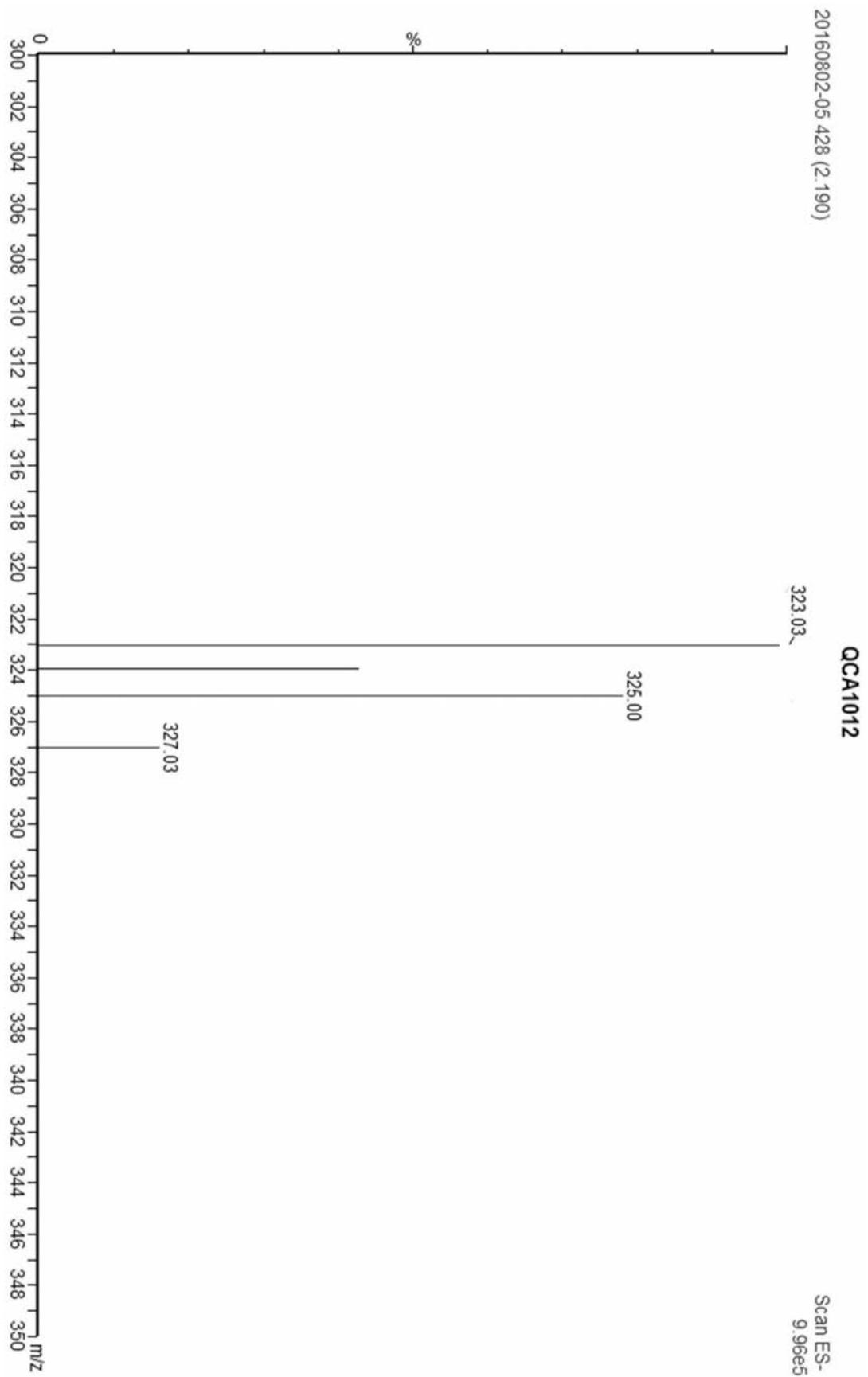


图5

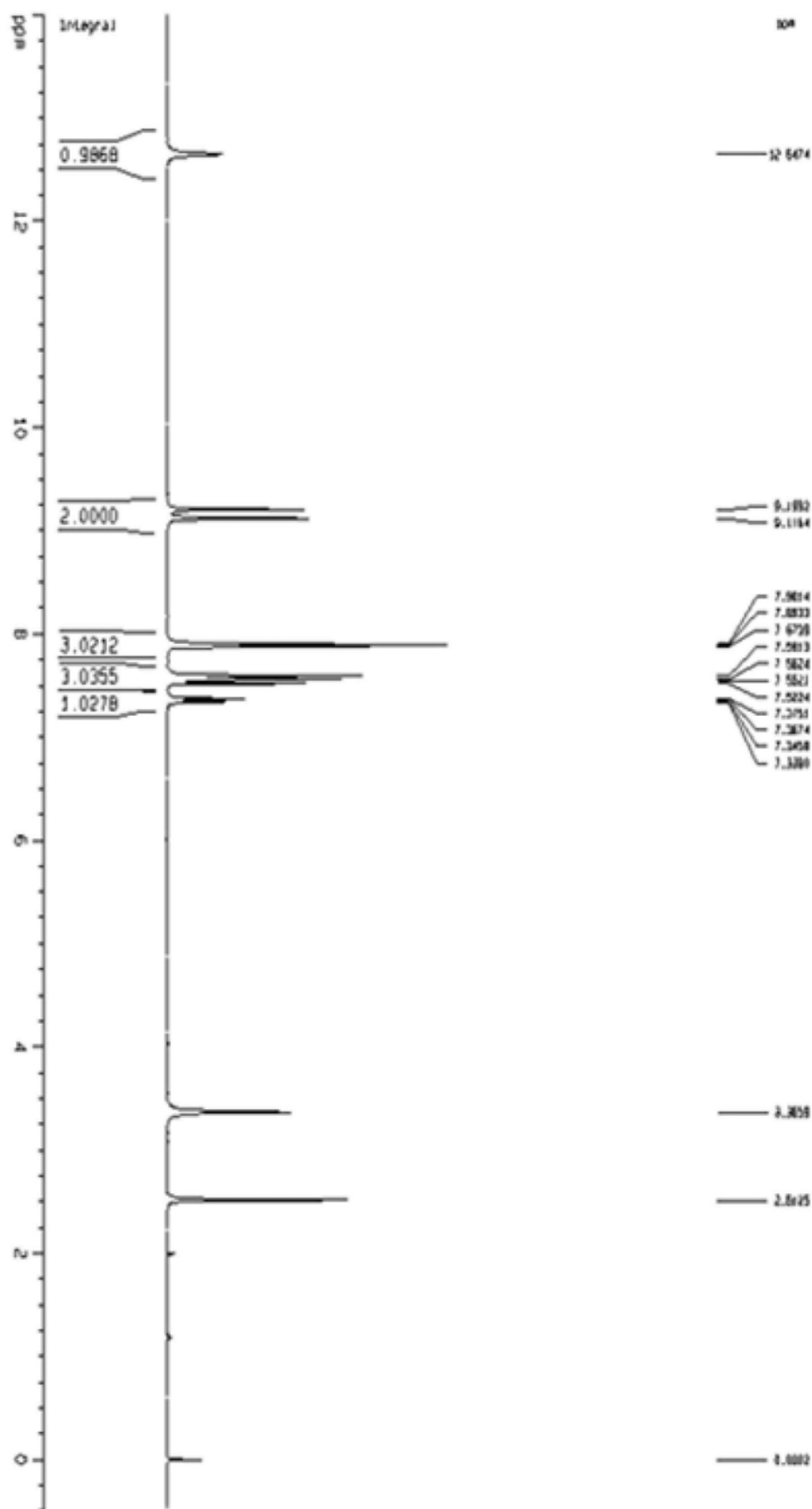


图6

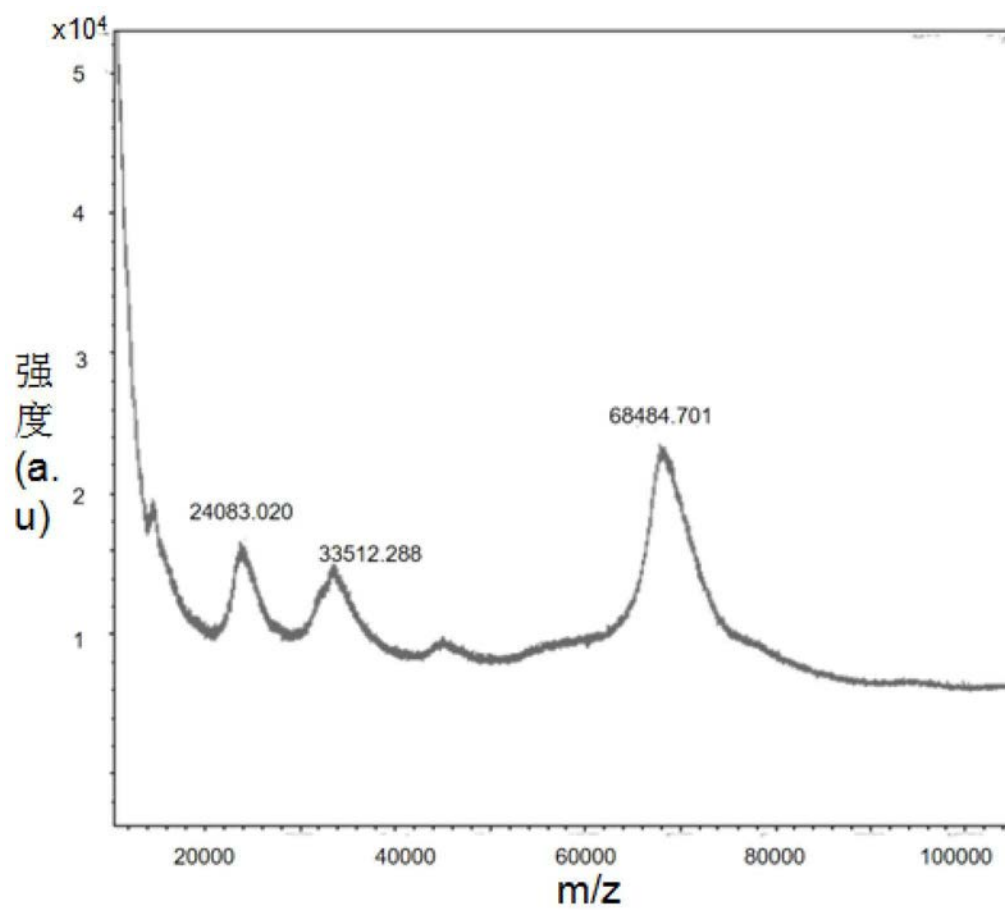


图7

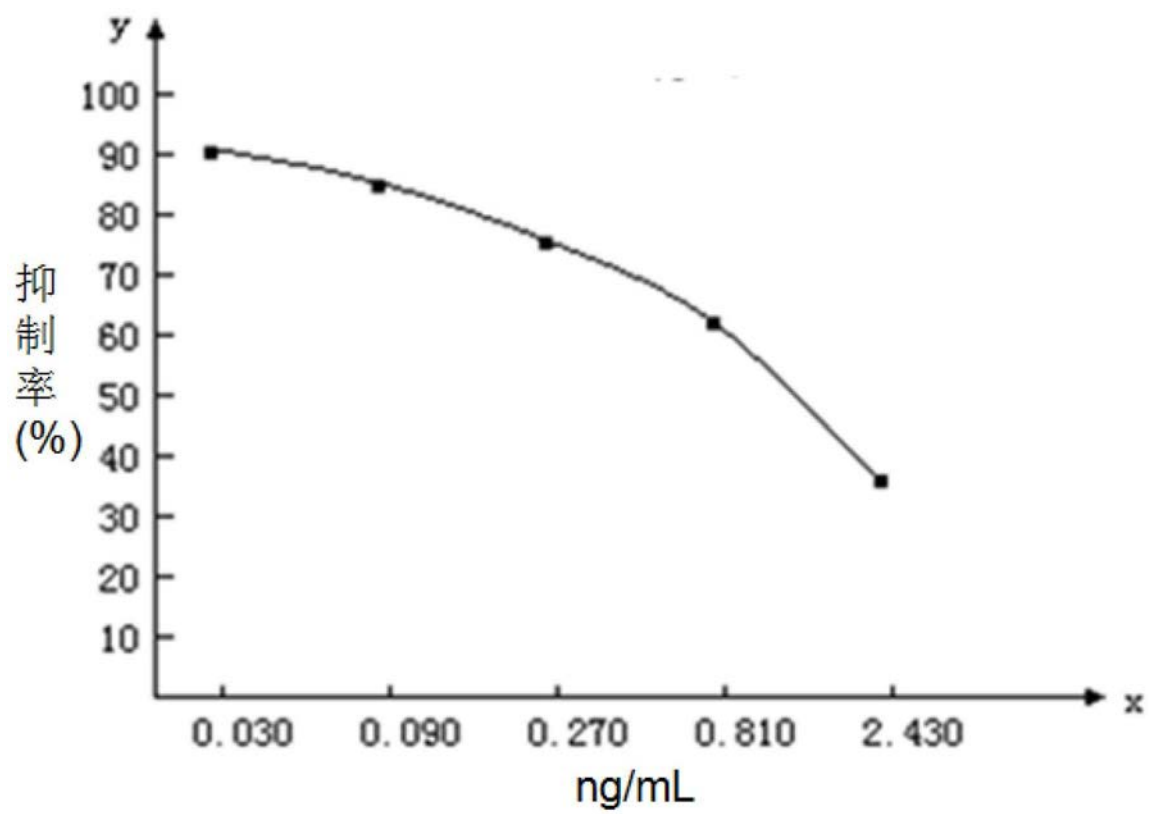


图8

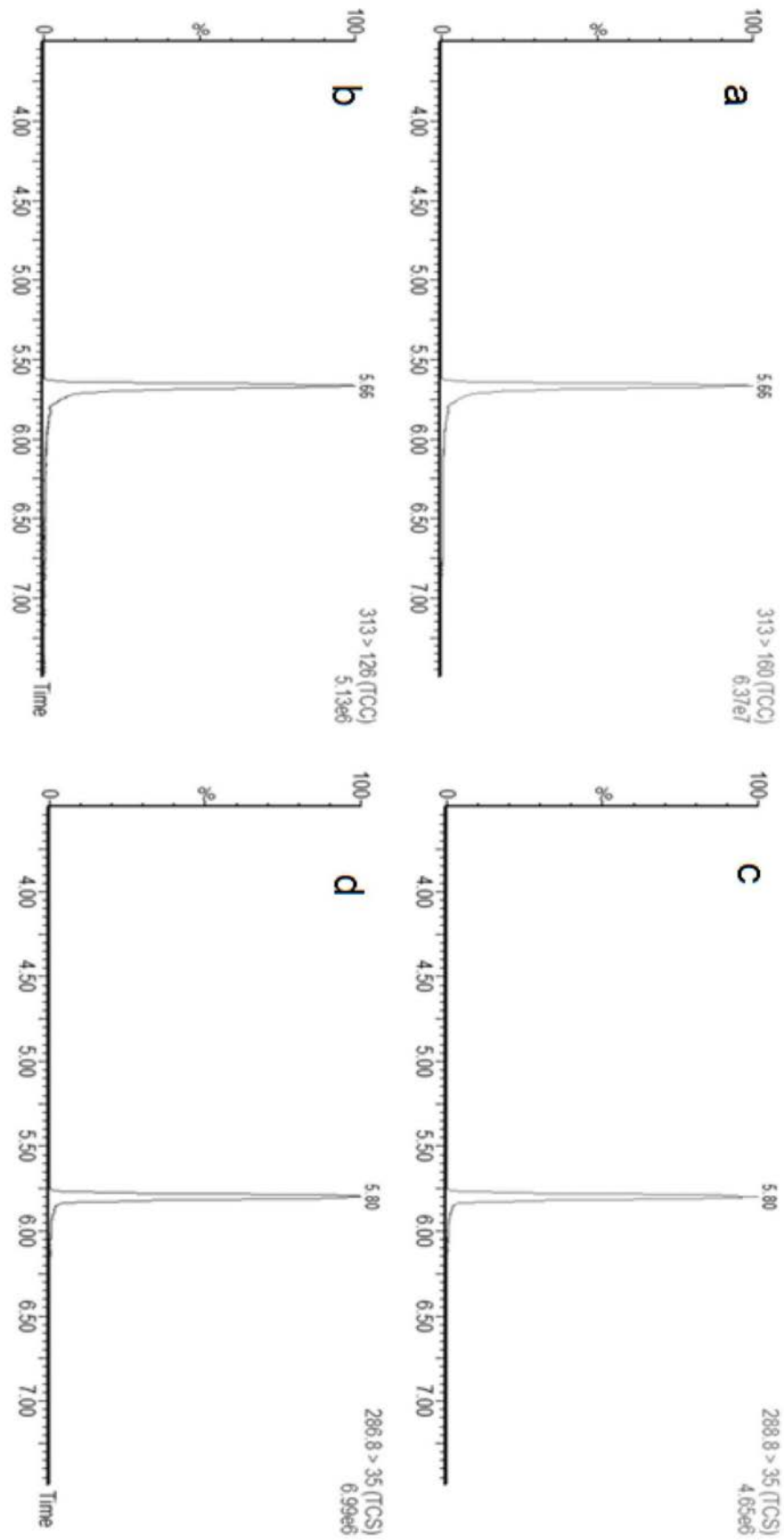


图9

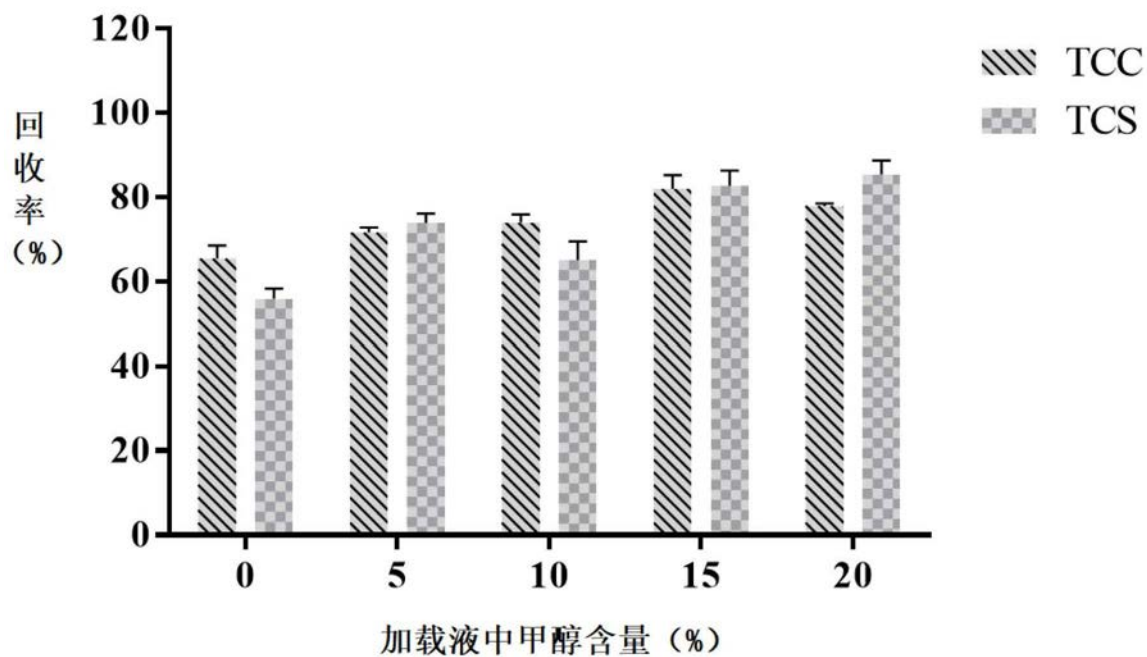


图10

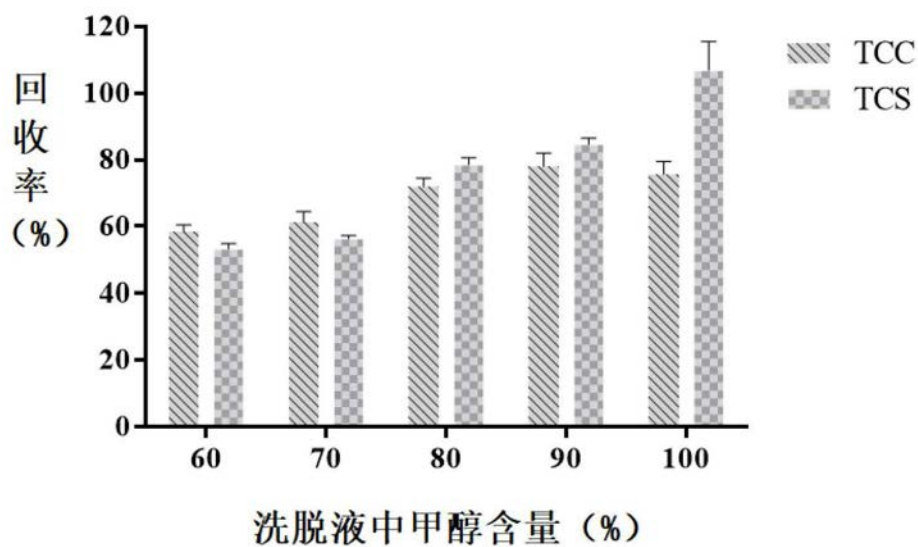


图11

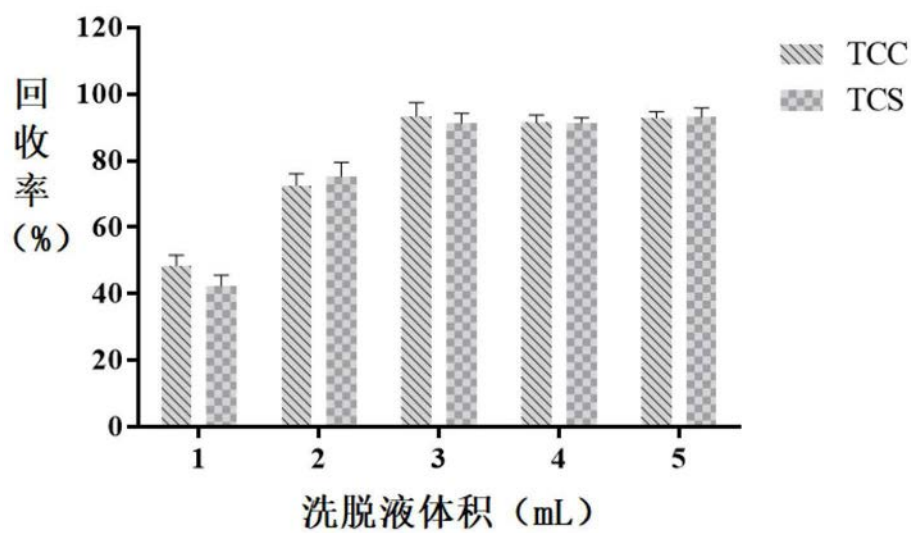


图12

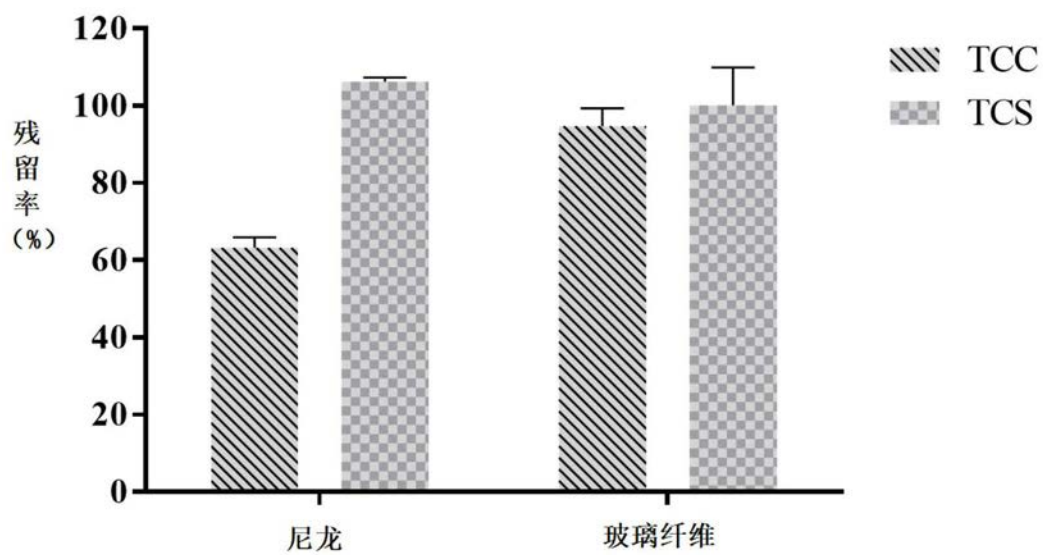


图13

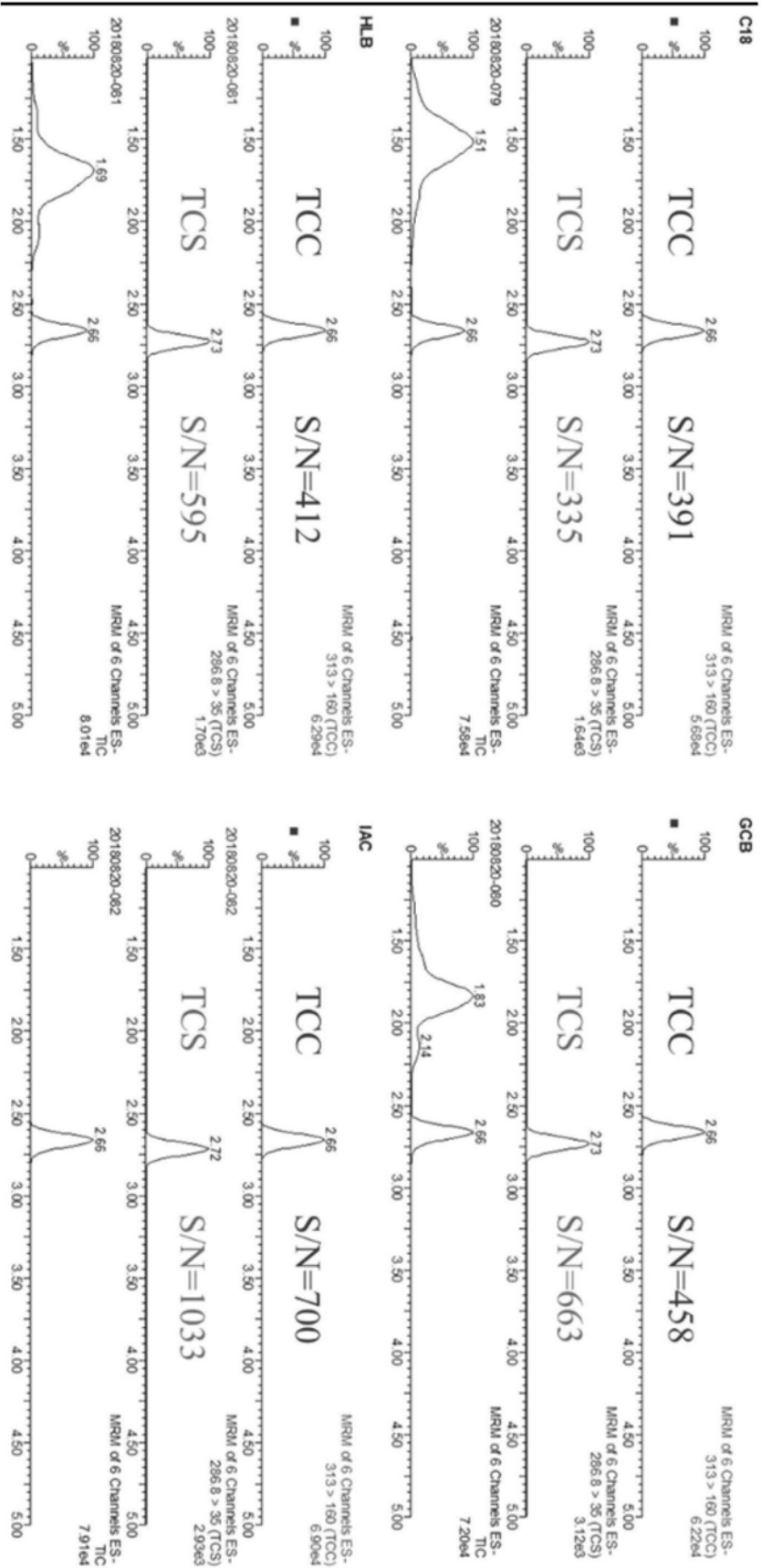


图14

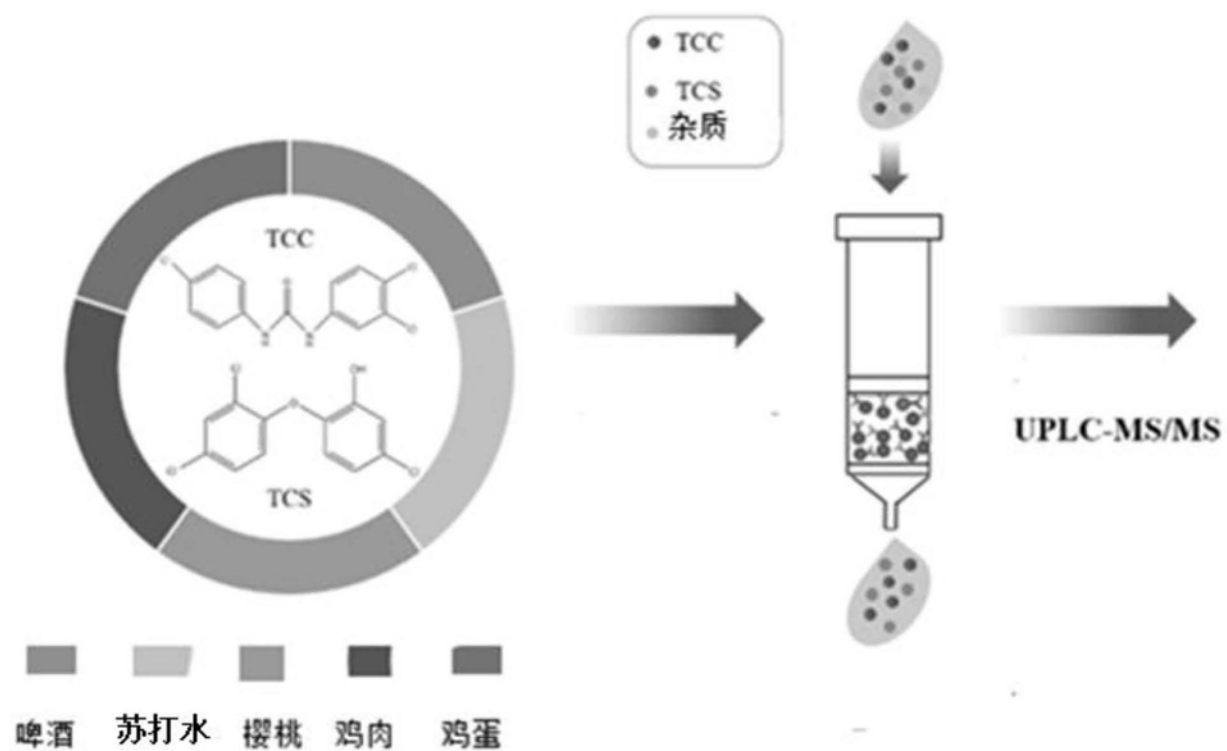


图15

专利名称(译)	一种三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体在检测三氯生和/或三氯卡班中的用途		
公开(公告)号	CN110286240A	公开(公告)日	2019-09-27
申请号	CN201910645174.6	申请日	2019-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	北京市疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	北京市疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	北京市疾病预防控制中心		
[标]发明人	邵兵 姚凯 张晶 温凯 沈建忠		
发明人	邵兵 姚凯 张晶 温凯 杨蕴嘉 沈建忠		
IPC分类号	G01N33/94 G01N33/531 G01N30/02 C07C59/68 C07C27/02 C07C275/42 C07C273/18 C07K14/765 C07K16/44		
CPC分类号	C07C59/68 C07C275/42 C07K14/765 C07K16/44 C07K19/00 G01N30/02 G01N33/531 G01N33/9446		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种三氯生单克隆抗体和/或三氯卡班单克隆抗体在检测三氯生和/或三氯卡班中的用途，并具体提供了一种检测样品中痕量三氯生和/或三氯卡班的方法，包括利用免疫亲和柱-超高效液相色谱串联质谱的检测方法。其中，免疫亲和柱中基质与三氯生和三氯卡班的单克隆抗体偶联。本发明提供的检测方法灵敏度高，精密度、回收率、LOD和LOQ均能满足检测分析的要求，有效解决前处理中样品净化不理想的问题，并减少样品基质干扰，缩短分析时间，提高回收率，可以在复杂基质中，特别是各类食品中特异性地检测痕量三氯生和/或三氯卡班，不会出现假阳性的检测结果。

