



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104678093 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 03

(21) 申请号 201510123379. X

(22) 申请日 2015. 03. 20

(71) 申请人 上海理工大学

地址 200093 上海市杨浦区军工路 516 号

(72) 发明人 曹慧 徐斐 陈曦 于劲松 袁敏

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

31001

代理人 吴宝根 马文峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法,包括抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水的制备、含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水的纯化、固定化载体预处理和抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的原位固定等 4 个步骤,最终得固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体。该制备方法的制备过程简单,成本低,易于实现规模化生产,在对含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水进行纯化的同时,实现了分散于 PEG 相中含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的原位固定及 PEG 的再利用;制得的固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体柱在免疫传感器中能快速装卸,可快速检测肉及肉制品中盐酸克伦特罗的残留量。

1. 一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法,其特征在于具体包括如下步骤:

(1)、含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水的制备

①、通过细胞融合技术及间接酶联免疫法筛选出稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

②、将①中获得的稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株进行扩增培养,每隔 24h 传代一次,使其处于对数生长期;

③、将②中处于对数生长期的稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞注射于用石蜡初步免疫过的小鼠腹部,两周后采集腹水,即得到含有抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的腹水;

(2)、含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水的纯化

①、配制 PEG6000/ 磷酸盐双水相体系,所述的 PEG6000/ 磷酸盐双水相体系,按重量百分比计算,含 15% 的分子量为 6000 的 PEG,15% 的 pH8.0 的磷酸氢二钾 / 磷酸二氢钠溶液、15% 的 NaCl 和余量的去离子水构成;

②、将含有抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的腹水置于 PEG6000/ 磷酸盐双水相体系中,混合均匀后,于 4℃ 静置 60min;

③、将②中静置后的体系 4000r/min 离心 10min,收集上相即得到纯化后的含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的 PEG 相;

(3)、固定化载体预处理

①、将聚苯乙烯小球浸入质量百分比浓度为 0.01% 的新洁尔灭水溶液中,4℃ 搅拌过夜;

②、依次采用去离子水和 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸氢二钠和磷酸二氢钾缓冲液清洗聚苯乙烯小球,然后置于 35℃ 烘箱烘干,得到预处理后的聚苯乙烯小球;

(4)、抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的原位固定

①、按聚苯乙烯小球:纯化后的含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的 PEG 相为 1 粒聚苯乙烯小球:0.65mL 纯化后的含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的 PEG 相的比例,将步骤(3)中预处理后的聚苯乙烯小球完全浸没于步骤(2)中所得的纯化后的含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的 PEG 相中,4℃ 条件下缓慢搅拌吸附 90min,即得固定化抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的微球;

②、用双蒸水对①中获得的固定化抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的微球进行清洗,直到清洗液中检不出抗盐酸克伦特罗单克隆抗体活力为止;

③、将②中清洗后的固定化抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的微球控制在 4℃ 的条件进行脱水,脱水完成后,即得固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体。

2. 如权利要求 1 所述的一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法,其特征在于步骤(1)中含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水的制备,步骤如下:

①、将 25mg 盐酸克伦特罗溶解于 10mL 的浓度为 1mol/L 的盐酸水溶液中,向其中缓慢滴加 0.27mol/L 的亚硝酸钠溶液,直至淀粉 KI 试纸颜色变为深紫色后停止滴加,并继续反应 45min,再加入 0.1mL 质量百分比浓度为 5% 的氨基磺酸铵水溶液终止反应,即得重氮化的盐酸克伦特罗;

将上述所得的重氮化的盐酸克伦特罗加入到 5mL 的浓度为 100mg/mL 的牛血清白蛋白水溶液中,4℃下缓慢搅拌反应 24h,反应过程中以 1mol/L 的 NaOH 溶液维持 pH 为 9.0-9.5,反应完毕后,对反应液进行透析,得到盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白偶联物;

②、对 6-8 周龄、体重 18-22g 的雌性纯系 Balb/C 小鼠进行腹腔注射免疫;

初次免疫采用充分乳化的等体积的盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白偶联物与福氏完全佐剂,剂量为 50 μg/只;

2 周后加强免疫,每隔两周一次,加强免疫以福氏不完全佐剂代替福氏完全佐剂,剂量为 100 μg/只;

从第三次加强免疫开始,每次加强免疫后第三天进行眼眶采血,通过间接酶联免疫法测定其血清中抗体活性,直至血清 OD_{450nm} 大于 1.0 时停止免疫;

③、停止加强免疫后,取出小鼠脾脏破碎成单个的细胞悬液,并与 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 3-10 :1 的比例混匀,得到混悬液;

向所得的混悬液中加入 1mL 质量百分比浓度为 50% 的 PEG4000 水溶液,缓慢摇匀融合 1min 后,得到融合细胞,将所得的融合细胞放入 96 孔细胞培养板中,加入 100 μL/孔的 HAT 培养基,并控制温度为 37℃,CO₂和空气按体积比计算,CO₂:空气为 5:100 的环境下培养两周,得到融合细胞;

向上述所得的融合细胞中加入 100 μL/孔的 HT 培养基进行培养 24h,所得的细胞培养液离心,所得的上清液进行 IELISA 检测,最终筛选到能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的高特异性的杂交瘤细胞株,其效价大于 3×10⁶;

④、取 6-8 周的 Balb/C 小鼠,按照 1ml/只的量,向 Balb/C 小鼠腹腔注射液体石蜡,七天后腹腔接种上述处于对数生长期的能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的高特异性的杂交瘤细胞,每只注射 1×10⁶个对数生长期的能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的高特异性的杂交瘤细胞,两周后采集腹水,即得到含有抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的腹水。

3. 如权利要求 1 或 2 的制备方法所得的固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体装填到干净的两端带筛网的柱式壳体中作为免疫传感器的敏感元件对瘦肉精进行检测。

一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗(CL)俗名“瘦肉精”,可显著提高胴体的瘦肉率,因而被滥用于饲养业,并通过食物链在人体内富集,对人体造成多种毒副作用,甚至死亡。基于抗原抗体特异识别的免疫检测技术因其具有高度特异性、敏感性和稳定性等优点,已成为较常用的 CL 残留的检测方法。但这种方法存在检测时间长、需要专业人员操作等缺点,不能用于现场和快速检测。

[0003] 免疫传感器是一种将固定化抗体与换能器密切配合,对特定目标分析物具有选择性和响应的分析装置。该装置既具有免疫检测技术的优点,又具有传感器操作简单、方便、快捷的特点,已成为 CL 快速检测领域的研究开发热点。

[0004] 在免疫传感器制备过程中,固定化抗体的稳定性和活性是保证该法测定 CL 灵敏度与特异性的关键因素。目前对抗盐酸克伦特罗单克隆抗体(以下简称 CL mAb)的固定方式主要为物理吸附或化学交联法,采用物理吸附方式制备的固定化抗体在使用过程中存在不稳定、容易脱落和渗漏等技术问题,而通过化学交联方式制备的固定化抗体虽稳定,但存在活性损失严重等技术问题。为了保证固定化抗体的生物活性,固定前一般需采用色谱联用技术对含抗体的小鼠腹水进行分离纯化,整个分离过程繁琐耗时,难以实现快速、高通量分离目的。这些都严重限制了以固定化抗体为敏感元件的免疫传感器在 CL 检测中的应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决固定化抗体在免疫传感器的应用中存在不稳定、容易脱落、渗漏或活性较低的技术问题,而提供一种固定化抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法。

[0006] 本发明的技术原理

双水相萃取技术是依据物质在两相间的选择性分配对进入体系的物质进行分离。具有分离时间短(一般只需 30-60min)、选择性好、易于实现放大和进行连续性操作等优点。但经双水相系统提纯富集后,对分散于 PEG 相中抗体的进一步分离及 PEG 的回收是目前存在的技术难点。采用原位固定的方式将分散于 PEG 相中的抗体直接固定于载体上,可同时实现抗体的固定和 PEG 相的回收再利用,同时由 PEG 形成的网络结构可防止固定化抗体的渗漏,增加了固定化抗体的稳定性和活性。

[0007] 本发明的技术方案

一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体(CL mAb)的制备方法,具体包括如下步骤:

(1)、含 CL mAb 腹水的制备,即通过细胞融合技术及间接酶联免疫法筛选出 稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株;然后进行扩增培养,每隔 24h 传代一次,使其处于对数生长期;然后将处于对数生长期的稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤

细胞注射于用石蜡初步免疫过的小鼠腹部,两周后采集腹水,即得到含有抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的腹水,步骤如下;

①、将 25mg 盐酸克伦特罗(以下简称 CL)溶解于 10mL 的浓度为 1mol/L 的盐酸水溶液中,向其中缓慢滴加 0.27mol/L 的亚硝酸钠溶液,直至淀粉 KI 试纸颜色变为深紫色后停止滴加,并继续反应 45min,再加入 0.1mL 质量百分比浓度为 5% 的氨基磺酸铵水溶液终止反应,即得重氮化的 CL;

将上述所得的重氮化的 CL 加入到 5mL 浓度为 100mg/mL 的牛血清白蛋白(以下简称 BSA)水溶液中,4℃ 下缓慢搅拌反应 24h,反应过程中以 1mol/L 的 NaOH 溶液维持 pH 为 9.0-9.5,反应完毕后,对反应液进行透析,得到 CL-BSA 偶联物;

②、对 6-8 周龄、体重 18-22g 的雌性纯系 Balb/C 小鼠进行腹腔注射免疫;

初次免疫采用充分乳化的等体积的 CL-BSA 偶联物与福氏完全佐剂,剂量为 50 μ g/只;

2 周后加强免疫,每隔两周一次,加强免疫以福氏不完全佐剂代替福氏完全佐剂,剂量为 100 μ g/只;

从第三次加强免疫开始,每次加强免疫后第三天进行眼眶采血,通过间接酶联免疫法(以下简称 IELISA)测定其血清中抗体活性,直至血清 OD_{450nm} 大于 1.0 时停止免疫;

③、停止加强免疫后,取出小鼠脾脏破碎成单个的细胞悬液,并与 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 3-10:1 的比例混匀,得到混悬液;

向所得的混悬液中加入 1ml 质量百分比浓度为 50% 的 PEG4000 水溶液,缓慢摇匀融合 1min 后,得到融合细胞,将所得的融合细胞放入 96 孔细胞培养板中,加入 100 μ L/孔的 HAT 培养基,并控制温度为 37℃,CO₂和空气按体积比计算,CO₂:空气为 5:100 的环境下培养两周,得到融合细胞;

向上述所得的融合细胞中加入 100 μ L/孔的 HT 培养基进行培养 24h,所得的细胞培养液离心,所得的上清液进行 IELISA 检测,最终筛选到能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的高特异性的杂交瘤细胞株,其效价大于 3×10^6 ;

④、取 6-8 周的 Balb/C 小鼠,按照 1mL/只的量,向 Balb/C 小鼠腹腔注射液体石蜡,七天后腹腔接种上述处于对数生长期的能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞,每只注射 1×10^6 个对数生长期的能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞,两周后采集腹水,即得到含有抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的腹水,记为含有 CL mAb 的腹水;

(2)、含有抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的腹水的纯化

①、配制 PEG6000/磷酸盐双水相体系,所述的 PEG6000/磷酸盐双水相体系,按重量百分比计算,含 15% 的分子量为 6000 的 PEG,15% 的磷酸氢二钾(K₂HPO₄)/磷酸二氢钠(NaH₂PO₄)溶液(pH8.0)、15% 的 NaCl 和余量的去离子水构成;

②、将步骤(1)所得的含有 CL mAb 的腹水置于 PEG6000/磷酸盐双水相体系中,混合均匀后,于 4℃ 静置 60min;

③、将②中静置 60min 后的体系 4000r/min 离心 10min,收集上相即得到纯化后的含有 CL mAb 的 PEG 相;

(3)、聚苯乙烯小球的预处理

①、将直径为 3mm 的聚苯乙烯小球浸入质量百分比浓度为 0.01% 的新洁尔灭水溶液中，4℃ 搅拌过夜；

②、依次采用去离子水和 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸氢二钠和磷酸二氢钾缓冲液清洗聚苯乙烯小球，然后在控制温度为 35℃ 的烘箱中烘干，即得预处理后的聚苯乙烯小球；

(4)、抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的原位固定

①、按聚苯乙烯小球：纯化后的含有 CL mAb 的 PEG 相为 1 粒聚苯乙烯小球：0.65 mL 纯化后的含有 CL mAb 的 PEG 相的比例，将步骤 (3) 中预处理后的聚苯乙烯小球完全浸没于步骤 (2) 中所得的纯化后的含有 CL mAb 的 PEG 相中，4℃ 条件下缓慢搅拌吸附 90min，即得固定化抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的微球，记为固定化 CL mAb 的微球；

②、用双蒸水对①中获得的固定化 CL mAb 的微球进行清洗，直到清洗液中检不出 CL mAb 活力为止；

③、将②中清洗后的固定化 CL mAb 的微球控制在 4℃ 的条件进行脱水，脱水完成后，即完成了 CL mAb 的固定化，得到固定化抗盐酸克伦特罗单克隆抗体，即为固定化的 CL mAb。

[0008] 上述所得的固定化的 CL mAb 置于 0.02M、pH9.6 的碳酸钠和碳酸氢钠缓冲液中，控制温度为 4℃ 贮存备用。

[0009] 将上述所得的固定化的 CL mAb 充满到干净的两端带筛网的柱式壳体中，即得固定化 CL mAb 的小柱，在 4℃ 贮藏 30 天后，固定化 CL mAb 的小柱仍保留初始活性的 95%，用恒流泵以 1ml/min 的流速连续冲刷 30ml 的 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸氢二钠和磷酸二氢钾缓冲液后，固定化 CL mAb 的小柱仍保留初始活性的 98%。

[0010] 本发明的有益效果

本发明的一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法，由于采用操作条件温和的 PEG6000/磷酸盐双水相体系纯化和原位固定结合的方法，因此不仅能够更高效的对小鼠腹水中的 CL mAb 进行分离纯化，CL mAb 的回收率达 85% 以上。还能获得活力较高的固定化的 CL mAb，其 OD450nm 为 1.8。同时也实现了 PEG 相的再利用。

[0011] 本发明提供的一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法，由于形成 PEG6000/磷酸盐双水相体系的相组分价格较低，且 PEG6000/磷酸盐双水相体系纯化和原位固定方法操作简便，因此其制备成本低廉，可适用于规模化生产。

[0012] 进一步，本发明提供的一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法，由于直接在含有 CL mAb 的 PEG 相中进行原位固定，因此 PEG 形成的网络结构增加了固定化的 CL mAb 的稳定性。固定化的 CL mAb 柱在 4℃ 贮藏 30 天后，固定化的 CL mAb 仍保留初始活性的 95%。用恒流泵以 1mL/min 的流速连续冲刷 30mL 后，固定化的 CL mAb 仍保留初始活性的 98%。

具体实施方式

[0013] 下面通过具体实施例对本发明进一步阐述，但并不限制本发明。

[0014] 本发明所用的 HAT 培养基、HT 培养基、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (免疫球蛋白)、福氏完全佐剂及福氏不完全佐剂购自于生工生物工程(上海)股份有限公司；

本发明中的效价定义，即在 96 孔板内使 CL-BSA 偶联物与倍比稀释的 CL mAb 发生特异

性结合,再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG,根据显色反应来鉴定抗体与抗原的结合情况,并且以吸光度值大于阴性对照 2.1 倍时的稀释倍数作为 CL mAb 的效价。

[0015] 实施例 1

一种抗盐酸克伦特罗单克隆抗体在双水相体系中的原位固定方法,具体包括如下步骤:

(1)、含 CL mAb 腹水的制备

①、将 25mg CL 溶解于 1mol/L 的盐酸溶液中,向其中缓慢滴加 0.27mol/L 的亚硝酸钠溶液,直至淀粉 KI 试纸颜色变为深紫色后停止滴加,并继续反应 45min,再加入 5%氨基磺酸铵终止反应,得到重氮化的 CL;

将该重氮物滴入 100mg/mL 的 BSA 溶液中,4℃ 下缓慢搅拌反应 24h,反应过程中以 1mol/L 的 NaOH 溶液维持 pH 为 9.0-9.5,反应完毕后,对反应液进行透析即获得 CL-BSA 偶联物;

②、对 6-8 周龄、体重 18-22g 的雌性纯系 Balb/C 小鼠进行腹腔注射免疫,初次免疫采用充分乳化的等体积的 CL-BSA 偶联物与福氏完全佐剂,剂量为 50 μg/只;

2 周后加强免疫,加强免疫时以福氏不完全佐剂代替福氏完全佐剂,剂量为 100 μg/只;

从第三次免疫开始,每次免疫后第三天进行眼眶采血,通过 IELISA 法测定其血清中抗体活性,直至血清 OD_{450nm} 大于 1.0 时停止免疫;

③、停止免疫后,取出小鼠脾脏破碎成单个的细胞悬液,并与 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 3-10:1 的比例混匀,向其中加入质量分数为 50% 的 PEG4000 溶液进行缓慢摇匀融合。融合 1min 后,将融合细胞放入 96 孔细胞培养板中,加入 HAT 培养基,并置于 5%CO₂、37℃ 培养箱培养两周;两周后再用 HT 培养基进行培养,并对细胞培养液的上清进行 IELISA 检测,最终筛选到能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的高特异性的杂交瘤细胞株,其效价大于 3×10⁶;

④、将③中获得的能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株接种于 80% DMEM 高糖培养基(含 20% 胎牛血清),并置于 37℃,5% CO₂培养箱内进行扩增培养,每隔 24h 传代一次,使其处于对数生长期;

取 6-8 周的 Balb/C 小鼠,按照 1ml/只向其腹腔注射液体石蜡,七天后腹腔接种上述处于对数生长期的能稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞,每只注射 1×10⁶ 个;

两周后采集腹水,即得含有抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的腹水,记为含有 CL mAb 的腹水;

(2)、含有抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的腹水的纯化

①、配制 PEG6000/磷酸盐双水相体系,所述的 PEG6000/磷酸盐双水相体系,按重量百分比计算,含 15% 的分子量为 6000 的 PEG,15% 的磷酸氢二钾和磷酸二氢钠磷酸盐(pH8.0)、15% 的 NaCl 和余量的去离子水构成;

②、将步骤(1)所得的含有 CL mAb 的腹水置于 PEG6000/磷酸盐双水相体系中,混合均匀后,于 4℃ 静置 60min;

③、将②中静置 60min 后的体系控制 4000r/min 离心 10min, 收集上相即得到纯化后的含有 CL mAb 的 PEG 相;

(3)、聚苯乙烯小球的预处理

①、将直径为 3mm 聚苯乙烯小球浸入质量百分比浓度为 0.01% 的新洁尔灭水溶液中, 4℃ 搅拌过夜;

②、依次采用去离子水和 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸氢二钠和磷酸二氢钾缓冲液清洗聚苯乙烯小球, 然后置于 35℃ 烘箱中烘干, 即得预处理后的聚苯乙烯小球;

(4)、抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的原位固定

①、按聚苯乙烯小球: 纯化后的含有 CL mAb 的 PEG 相为 1 粒聚苯乙烯小球: 0.65 mL 纯化后的含有 CL mAb 的 PEG 相的比例, 将步骤(3)中预处理后的聚苯乙烯小球完全浸没于步骤(2)中所得的纯化后的含有 CL mAb 的 PEG 相中, 4℃ 条件下缓慢搅拌吸附 90min, 即得固定化抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的微球, 记为固定化 CL mAb 的微球;

②、用双蒸水对①中获得的固定化 CL mAb 的微球进行清洗, 直到清洗液中检不出 CL mAb 活力为止;

③、将②中清洗后的固定化 CL mAb 的微球控制在 4℃ 的条件进行脱水, 脱水完成后, 即完成了 CL mAb 的固定化, 得到固定化抗盐酸克伦特罗单克隆抗体, 即为固定化的 CL mAb。

[0016] 将固定化的 CL mAb 置于 0.02M、pH9.6 的碳酸钠和碳酸氢钠缓冲液中, 控制温度为 4℃ 贮存备用。

[0017] 固定化的 CL mAb 柱的制备, 具体包括如下步骤:

(1)、将干净的两端带滤网的柱壳的上盖打开;

(2)、用吸管吸取碳酸钠和碳酸氢钠缓冲液中的固定化的 CL mAb, 从柱壳的上端口注入, 这时, 固定化的 CL mAb 会均匀地沉降在柱壳的底部;

重复上述步骤, 直至将上述所得的固定化的 CL mAb 充满到干净的两端带筛网的柱式壳体中, 即得固定化的 CL mAb 柱;

将上述所得的固定化的 CL mAb 柱在 4℃ 贮藏 30 天后, 仍保留初始活性的 95%。用恒流泵以 1mL/min 的流速连续冲刷 30mL 的 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸氢二钠和磷酸二氢钾缓冲液后, 仍保留初始活性的 98%。

[0018] 应用实施例 1

将上述实施例 1 所得的固定化的 CL mAb 柱作为免疫传感器的敏感元件对 CL 进行检测, 步骤如下:

(1)、20 μ L 溶于双蒸水中的 CL (浓度分别为 0.05 ng/mL、0.5 ng/mL、0.8 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL) 与 20 μ L、双蒸水稀释 40 倍的辣根过氧化物酶标记的 CL 溶液混合, 得到的混合溶液注入免疫传感器;

混合溶液流经固定化的 CL mAb 柱的时候, 样品溶液中的 CL 与辣根过氧化物酶标记的 CL (以下简称 CL-HRP) 竞争性的与固定化的 CL mAb 柱中的 CL mAb 结合;

采用 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸氢二钠和磷酸二氢钾缓冲液洗去未结合于固定化的 CL mAb 柱的 CL;

(2)、20 μ L 的 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺注射入固定化的 CL mAb 柱, 与固定化的 CL mAb 柱中 CL mAb 结合, 进行 CL-HRP 进行反应, 于 450 nm 波长处测定吸光值。

[0019] 根据以上步骤,以固定化的 CL mAb 柱为敏感元件的免疫传感器对 CL 的线性检测范围为 0.24-28.61 ng/mL,检测限为 0.0859 ng/mL。

[0020] 5 个标准浓度 CL (0.25 ng/ml、0.5 ng/ml、1.00 ng/ml、5 ng/ml、25 ng/mL) 的重复检测的批次内变异系数均小于 10%,批次间变异系数均小于 15%。表明本发明采用 ATPS 纯化与原位固定结合的方法获得的固定化的 CL mAb 因其具有活力高、耐冲刷的优点,可提高 CL 检测的灵敏度和稳定性。

[0021] 以上所述仅是本发明的实施方式的举例,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变形,这些改进和变形也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN104678093A	公开(公告)日	2015-06-03
申请号	CN201510123379.X	申请日	2015-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海理工大学		
申请(专利权)人(译)	上海理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海理工大学		
[标]发明人	曹慧 徐斐 陈曦 于劲松 袁敏		
发明人	曹慧 徐斐 陈曦 于劲松 袁敏		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 C07K16/44 G01N33/577		
代理人(译)	吴宝根 马文峰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备方法，包括抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水的制备、含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水的纯化、固定化载体预处理和抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的原位固定等4个步骤，最终得固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体。该制备方法的制备过程简单，成本低，易于实现规模化生产，在对含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体腹水进行纯化的同时，实现了分散于PEG相中含抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的原位固定及PEG的再利用；制得的固定化的抗盐酸克伦特罗单克隆抗体柱在免疫传感器中能快速装卸，可快速检测肉及肉制品中盐酸克伦特罗的残留量。