



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109112112 B

(45) 授权公告日 2021.10.22

(21) 申请号 201810712045.X	C07K 16/44 (2006.01)
(22) 申请日 2018.07.03	G01N 33/577 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	G01N 33/559 (2006.01)
申请公布号 CN 109112112 A	G01N 33/531 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.01.01	C12R 1/91 (2006.01)
(83) 生物保藏信息	(56) 对比文件
CCTCC NO:C2016208 2016.12.04	CN 101942415 A, 2011.01.12
(73) 专利权人 苏州大学	CN 102617516 A, 2012.08.01
地址 215104 江苏省苏州市相城区济学路8号	CN 103013925 A, 2013.04.03
(72) 发明人 吴康 黄芳 胡仁莉 原茵	张建群. β -肾上腺素受体激动剂莱克多巴胺兔单克隆抗体的制备.《农业生物技术学报》.2007,第15卷(第3期),第398-403段.
(74) 专利代理机构 宁波高新区核心力专利代理事务所(普通合伙) 33273	陈观银.一种新的沙丁胺醇人工抗原的合成及单克隆抗体的制备.《华南农业大学学报》.2014,第35卷(第1期),第23-28页.
代理人 袁丽花	审查员 冷千里
(51) Int. Cl.	
C12N 5/20 (2006.01)	权利要求书2页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称

一种抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其分泌的单抗和应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,公开了一种抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其分泌的单抗。本发明杂交瘤细胞株由沙丁胺醇人工抗原制备,其分泌的单抗可同时识别沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗等 β -受体激动剂,具有簇特异性;由此制备免疫亲和层析胶与其他 β -受体激动剂,如莱克多巴胺的免疫亲和层析胶混合作为机测前处理净化试剂与HPLC-FLD、LC-MS/MS检测技术联合能够高效的检测猪肉、猪肝以及猪尿样品中的多种瘦肉精成分,具备较高的准确度、灵敏度。

1. 抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株,其特征在於,保藏编号为CCTCC NO.C2016208。

2. 保藏编号为CCTCC NO.C2016208的杂交瘤细胞株在 β -受体激动剂残留样本检测中的应用;所述 β -受体激动剂选自沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗中的一种或两种以上。

3. 抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体,其特征在於,由保藏编号为CCTCC NO.C2016208的杂交瘤细胞株分泌产生。

4. 保藏编号为CCTCC NO.C2016208的杂交瘤细胞株分泌产生的抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体在 β -受体激动剂残留样本检测和/或 β -受体激动剂残留免疫检测产品制备中的应用;所述 β -受体激动剂选自沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗中的一种或两种以上。

5. 根据权利要求4所述应用,其特征在於,所述免疫检测产品为免疫亲和层析色谱胶或由该胶预填装的免疫亲和层析色谱柱。

6. 一种 β -受体激动剂簇特异性免疫亲和层析色谱胶,其特征在於,由保藏编号CCTCC NO.C2016208的杂交瘤细胞株分泌产生单抗经纯化再与CNBr-activated Sepharose-4B胶化学交联形成固相化抗体蛋白而获得。

7. 根据权利要求6所述免疫亲和层析色谱胶,其特征在於,所述纯化单抗蛋白与CNBr-activated Sepharose-4B胶的用量比:5mg纯化单抗蛋白:1ml CNBr-activated Sepharose-4B溶胀胶。

8. 权利要求6所述免疫亲和层析色谱胶的制备方法,其特征在於,包括:

步骤1、用保藏编号CCTCC NO.C2016208的杂交瘤细胞获取单克隆抗体蛋白并进行纯化,纯化后单抗蛋白进行透析预处理,备用;

将CNBr-activated Sepharose-4B进行溶胀、淘洗预处理后获得处理胶备用;

步骤2、向经过预处理的纯化单抗蛋白中加入步骤1所述处理胶,室温下摆动孵育,然后离心弃上清,加入 $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ 缓冲溶液,室温下继续摆动孵育,离心弃上清,洗涤,获得抗体蛋白交联胶;

步骤3、取步骤2中抗体蛋白交联胶加入Tris-HCl置于室温下摆动孵育以封闭该胶中未与单抗蛋白交联的过量活化基团,离心弃上清,然后用HAC/NaCl与Tris-HCl/NaCl二种缓冲液交替离心洗涤,最后将交联胶重悬于Tris-HCl-NaCl缓冲液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,即获得所述免疫亲和层析色谱胶。

9. 根据权利要求8所述制备方法,其特征在於,所述纯化后单抗蛋白进行透析预处理为:

纯化后单抗蛋白置于7500-14000MW透析袋中,再置于100-200 \times 0.1M $\text{NaHCO}_3/0.5\text{M}$ NaCl缓冲溶液中4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜,每4-6h换液一次,透析后蛋白于0.22 μM 滤膜过滤,并于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

10. 根据权利要求8所述制备方法,其特征在於,所述将CNBr-activated Sepharose-4B进行溶胀、淘洗预处理为:

称取CNBr-activated Sepharose 4B固体粉末加入稀HCl溶胀,离心弃上清,加入稀HCl离心洗涤以去除CNBr-activated Sepharose 4B胶中其他小分子化学试剂后,再用 $\text{NaHCO}_3/$

NaCl缓冲溶液离心洗涤一次,备用。

11. 根据权利要求10所述制备方法,其特征在于,所述将CNBr-activated Sepharose-4B进行溶胀、淘洗预处理为:

称取1g CNBr-activated Sepharose 4B固体粉末于50ml离心管中,离心管加30ml 1mM HCl室温于摆床中轻轻摆动溶胀30min,室温2000r/min 3min弃上清,离心管加30ml 1mM HCl用同样的方法离心洗涤重复8-10次充分去除上述胶中其他小分子化学试剂后,再用30ml 0.1M NaHCO₃/0.5M NaCl缓冲溶液离心洗涤一次,备用。

12. 根据权利要求8所述制备方法,其特征在于,步骤2为:

步骤1所述预处理纯化单抗蛋白加入至含步骤1所述处理胶的50ml离心管中,盖好盖并用parafilm膜封口,置于摆床中室温摆动孵育1h,室温2000r/min 10min弃上清,离心管加30ml 0.1M NaHCO₃/0.5M NaCl缓冲溶液,置于摆床中室温摆动孵育10min,室温2000r/min 10min弃上清,再用NaHCO₃/NaCl缓冲溶液离心洗涤5-6次以充分去除未交联的蛋白,获得抗体蛋白交联胶。

13. 根据权利要求8所述制备方法,其特征在于,步骤3为:

取步骤2抗体蛋白交联胶,离心管加入30ml 0.1M Tris-HCl置于摆床中室温摆动孵育2h以充分封闭抗体蛋白交联胶中未与蛋白交联的活化基团,室温2000r/min离心10min弃上清,离心管分别用30ml 0.1M HAC/0.5M NaCl以及30ml 0.1M Tris-HCl/0.5M NaCl二种缓冲液交替离心洗涤三个循环后,将交联胶重悬于30ml 0.1M Tris-HCl/0.5M NaCl缓冲液补加0.02%NaN₃,于4℃保存备用,即获得所述免疫亲和层析色谱胶。

14. 一种检测β-受体激动剂的免疫亲和层析色谱柱,其特征在于,包括权利要求6或7所述色谱胶,以及柱床。

15. 根据权利要求14所述色谱柱,其特征在于,还包括由莱克多巴胺单克隆抗体制备的色谱胶。

16. 一种检测猪肉、猪尿或猪肝中β-受体激动剂的方法,其特征在于,采用权利要求6-7任一项所述色谱胶,或权利要求14-15任一项所述色谱柱,通过LC-MS/MS进行检测,所述β-受体激动剂选自沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗中的一种或两种以上。

一种抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其分泌的单抗和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其分泌的单抗和应用。

背景技术

[0002] 以盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇为代表三种主要瘦肉精在肉类食品和动物内脏残留事件屡禁不止时有发生因而成食品安全监管部门监测监管的兽药残留首要目标物。以ELISA检测试剂盒和免疫胶体金测试条为代表的免疫检测技术已广泛应用于上述三种目标物残留样本的高通量快速定性筛查。但要对上述目标物残留确证以及精确定量必须经高效液相色谱配荧光检测器(HPLC-FLD)甚至液-质串联谱(LC-MS/MS)测定。以Waters和Agilent公司提供上述仪器设备在色谱分离效率、定量限、精度等指标可满足实际检测需求,但实际检测效果压倒性取决于机测进样样品前处理效果。

[0003] 对于上述三种瘦肉精为代表多组分 β -受体激动剂残留精确定量分析,农业部于2008年公布了国家标准《动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测-液相色谱-串联质谱检测法》并规定采用固相萃取净化处理进样检测,该法存在以下四大制约因素严重影响检测效果:

[0004] 第一、操作步骤多、有毒有害有机溶剂用量大、需仪器设备多(如旋转蒸发仪、氮吹仪等)、液相溶解体系转换多、耗时长。

[0005] 第二、目标物损失率高:在生物大分子去除、液-液萃取/固相萃取、净化目标物进样缓冲液复溶等多个操作环节中均有可能造成目标物损失。

[0006] 第三、尽管盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇在化学结构上均属苯乙胺类药物,但三者理化性质有较大差异,很难用统一提取液和萃取液或单一固相萃取柱并保证每种药物均能获得满意提取-净化效果。

[0007] 第四、液-液萃取/固相萃取仅有一定选择性,在净化到目标物同时,不可避免混入与目标物理化性质相近的基质干扰物(尤其动物肝、肾等基质复杂样本),其干扰峰如出现在目标物保留时间区域会严重影响机测数据的判读。

[0008] 免疫亲和层析色谱IAC(Immunoaffinity chromatography)相比于SPE(solid phase extraction)净化方法其巨大技术优势主要表现为:

[0009] 第一、目标物从生物样本中提取简单,反应体系温和,仅需极少量甚至不使用有机溶剂。

[0010] 第二、目标物提取步骤无需大量去除样本中生物大分子(如样本中脂肪含量过高可适当去除部分脂肪以免影响免疫小珠对目标物特异性结合),因此可避免因大分子去除造成目标物部分丢失。

[0011] 第三、对目标物强大选择性,其由抗原-抗体强特异性结合反应特性所决定,阳性样本经IAC净化的上机样品HPLC-FLD测定后色谱图中各目标物峰形尖锐、各组分保留时间

明确、无杂峰或极少有杂峰干扰。

[0012] 第四、对免疫亲和层析洗脱液的精心设计和反复优化,可将洗脱液与进样缓冲液统一成同一缓冲液,或在带有目标物的洗脱样本中补加一定体积比的有机相(如一定比例甲醇或乙腈)直接进样。

[0013] 相比于目前广泛使用的固相萃取柱SPE(solid phase extraction),免疫亲和层析柱缺乏竞争力在于抗体用量大而造成高成本,只有拥有独立知识产权单抗细胞株-可极大降低纯化单抗蛋白生产成本,使之广泛应用成为可能。

[0014] 正因为其强选择性大大地限制了其在多组分目标物混合残留样本机测前处理中的应用;因此制备针对 β -激动剂多组分簇特异性单抗扩大其目标物覆盖面替代SPE柱成为可能。

发明内容

[0015] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种针对 β -受体激动剂具有簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗,使得所述杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体同时对沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗有较高的交叉反应,为 β -受体激动剂多组分混合残留样本快速筛查提供了免疫检测核心试剂;

[0016] 本发明的另外一个目的在于提供一种采用上述单克隆抗体制备的免疫亲和层析色谱胶及其制备方法,使得所述免疫亲和层析色谱胶不仅对各 β -受体激动剂有较大的交叉反应率,而且能够在免疫亲和色谱检测中,比国标SPE方法具备更佳的净化处理能力和加标回收率。

[0017] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0018] 抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株,保藏编号为CCTCC NO.C2016208,命名为1C3A,并于2016年12月4日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址为武汉市武昌珞珈山武汉大学内。

[0019] 本发明以沙丁胺醇联合OVA载体蛋白作为免疫原免疫小鼠,经过筛选获得上述1C3A杂交瘤细胞株,其诱生的单抗与多种 β -受体激动剂进行交叉反应率的检测,当认定沙丁胺醇的CR值为100%时,发现盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗交叉反应率较大,CR值分别为66.8%、57.3%、42.1%、121.5%。

[0020] 基于上述优异的技术效果,本发明提供了所述杂交瘤细胞及其产生的单克隆抗体在 β -受体激动剂残留样本检测和/或 β -受体激动剂残留免疫检测产品制备中的应用;其中,所述 β -受体激动剂优选为瘦肉精,所述瘦肉精选自沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗中的一种或两种以上;其中沙丁胺醇、盐酸克伦特罗可作为权重目标物进行重点分析。

[0021] 本发明所述 β -受体激动剂残留免疫检测产品优选为免疫亲和层析色谱胶或由此预填装的免疫亲和层析色谱柱。

[0022] 本发明具体提供了一种 β -受体激动剂簇特异性免疫亲和层析色谱胶,由保藏编号CCTCC NO.C2016208的杂交瘤细胞株分泌产生单抗经纯化再与CNBr-activated Sepharose-4B胶化学交联形成固相化抗体蛋白而获得。

[0023] 作为优选,所述纯化单抗蛋白与CNBr-activated Sepharose-4B胶的用量比:5mg

纯化单抗蛋白:1ml CNBr-activated Sepharose-4B溶胀胶。

[0024] 由于本发明所述单克隆抗体所具备的优异特性,使得本发明所述的免疫亲和层析色谱胶或免疫亲和层析色谱柱(由免疫亲和层析色谱胶装填于柱床获得)同样具有较优的性能。同时,所述免疫亲和层析色谱胶或免疫亲和层析色谱柱在免疫亲和层析色谱法中,相比国标(农业部1025公告-18-2008动物源性食品中 β -激动剂残留检测-液相色谱-串联质谱法)的固相萃取SPE(solid phase extraction)净化方法具备更佳的加标回收率和净化处理能力。

[0025] 同时,本发明还提供了所述免疫亲和层析色谱胶的制备方法,包括:

[0026] 步骤1、用保藏编号CCTCC NO.C2016208的杂交瘤细胞获取单克隆抗体蛋白并进行纯化,纯化后单抗蛋白进行透析预处理,备用;

[0027] 将CNBr-activated Sepharose-4B进行溶胀、淘洗预处理后获得处理胶备用;

[0028] 步骤2、向经过预处理的纯化单抗蛋白中加入步骤1所述处理胶,室温下摆动孵育,然后离心弃上清,加入 $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ 缓冲溶液,室温下继续摆动孵育,离心弃上清,洗涤,获得抗体蛋白交联胶;

[0029] 步骤3、取步骤2中抗体蛋白交联胶加入Tris-HCl置于室温下摆动孵育以封闭该胶中未与单抗蛋白交联的过量活化基团,离心弃上清,然后用HAC/NaCl与Tris-HCl/NaCl二种缓冲液交替离心洗涤,最后将交联胶重悬于Tris-HCl-NaCl缓冲液,于4℃保存备用,即获得所述免疫亲和层析色谱胶。

[0030] 本发明免疫亲和层析胶中由保藏编号为CCTCC NO.C2016208杂交瘤细胞株分泌产生的单克隆抗体可采用本技术领域常规方法进行制备,如用杂交瘤细胞株通过体内诱生方式获取小鼠腹水样本,具体可参照如下方法:

[0031] 在接种杂交瘤细胞前一周,先给雄性Ba1b/c小鼠腹腔注射0.5mL降植烷致敏。然后每只小鼠腹腔注射 5×10^5 左右的杂交瘤细胞。接种10天后,小鼠腹部明显肿胀,当小鼠处于濒临死亡状态时,将其处死,浸泡在75%酒精中体表消毒,无菌剖开腹部,用滴管取出腹水,腹水中含有目标抗体。将收集好的腹水离心,去除血细胞和血浆,得到淡黄色的腹水。往腹水中加入甘油和0.01mol/L PBS(pH 7.4),体积比为50:45:5,分装置于-20℃或-80℃冰箱中保存。

[0032] 本发明按照上述方法获得诱生腹水样本通过protein G resin一步法纯化单抗蛋白,SDS-PAGE电泳鉴定结果显示:腹水纯化物只含有IgG型,含50Kd(抗体重链)和25Kd(抗体轻链)二条明显蛋白条带,无其他杂蛋白带,表明通过该杂交瘤细胞株诱生腹水途径可获得高纯度单抗蛋白,可以满足制备免疫亲和层析胶中检测抗体需求。

[0033] 作为优选,所述纯化单抗与CNBr-activated Sepharose-4B胶的用量比:5mg纯化单抗蛋白:1ml CNBr-activated Sepharose-4B溶胀胶。

[0034] 作为优选,所述纯化单抗蛋白的透析预处理为:

[0035] 纯化单抗蛋白置于透析袋中,于 $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ 缓冲溶液中4℃透析过夜,透析后单抗蛋白微孔滤膜过滤,滤液于4℃保存备用。

[0036] 进一步优选地,所述纯化单抗蛋白进行透析预处理为:

[0037] 纯化单抗蛋白置于7500-14000MW透析袋中,于100-200 \times 0.1M $\text{NaHCO}_3/0.5\text{M NaCl}$ (pH8.3)缓冲溶液中4℃透析过夜,每4-6h换液一次,透析后蛋白用0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤

液于4℃保存备用。

[0038] 作为优选,所述将CNBr-activated Sepharose-4B进行溶胀、淘洗预处理为:

[0039] 称取CNBr-activated Sepharose 4B固体粉末加入稀HCl溶胀,离心弃上清,加入稀HCl离心洗涤以去除CNBr-activated Sepharose 4B胶中其他小分子化学试剂后,再用NaHCO₃/NaCl缓冲溶液离心洗涤一次,备用。

[0040] 进一步优选地,所述将CNBr-activated Sepharose-4B进行溶胀、淘洗预处理为:

[0041] 称取1g CNBr-activated Sepharose 4B固体粉末于50ml离心管中,离心管加30ml 1mM HCl室温于摆床中轻轻摆动溶胀30min,室温2000r/min 3min弃上清,离心管加30ml 1mM HCl用同样的方法离心洗涤重复8-10次充分去除上述胶中其他小分子化学试剂后,再用30ml 0.1M NaHCO₃/0.5M NaCl (pH8.3) 缓冲溶液离心洗涤一次,备用。

[0042] 作为优选,步骤2为:

[0043] 步骤1所述预处理纯化单抗蛋白加入至含步骤1所述处理胶的50ml离心管中,盖好盖并用parafilm膜封口,置于摆床中室温摆动孵育1h,室温2000r/min 10min弃上清,离心管加30ml 0.1M NaHCO₃/0.5M NaCl (pH8.3) 缓冲溶液,置于摆床中室温摆动孵育10min,室温2000r/min 10min弃上清,再用NaHCO₃/NaCl缓冲溶液离心洗涤5-6次以充分去除未交联的蛋白,获得抗体蛋白交联胶。

[0044] 作为优选,步骤3为:

[0045] 取步骤2抗体蛋白交联胶,离心管加入30ml 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) 置于摆床中室温摆动孵育2h以充分封闭抗体蛋白交联胶中未与蛋白交联的活化基团,室温2000r/min 离心10min弃上清,离心管分别用30ml 0.1M HAC/0.5M NaCl (pH4.0) 以及30ml 0.1M Tris-HCl/0.5M NaCl (pH 8.0) 二种缓冲液交替离心洗涤三个循环后,将交联胶重悬于30ml 0.1M Tris-HCl/0.5M NaCl (pH 8.0) 缓冲液补加0.02%NaN₃,于4℃保存备用,即获得所述免疫亲和层析色谱胶。

[0046] 在免疫亲和层析色谱胶的制备中,本发明通过纯化单抗蛋白与CNBr-activated Sepharose-4B胶化学交联形成固相化抗体蛋白而获得,而所述免疫亲和层析色谱柱是将所述免疫亲和层析色谱胶填充于柱床中获得。根据检测的需要,所述色谱柱还可以添加除沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗之外的其他瘦肉精单克隆抗体制备的色谱胶,比如莱克多巴胺,制备色谱胶的方法可参照本发明之前制备方法。

[0047] 根据上述免疫亲和层析色谱胶/柱的性能,本发明还对应提供了一种检测猪肉、猪尿或猪肝中β-受体激动剂的方法,采用所述色谱胶或所述色谱柱,通过LC-MS/MS进行检测。

[0048] 在本发明具体实施方式中,提供了针对猪肉、猪尿或猪肝的LC-MS/MS检测方法,用以检测沙丁胺醇、盐酸克伦特罗和莱克多巴胺,其中莱克多巴胺单抗采用专利CN104311438A中的杂交瘤细胞株诱导腹水获得,并优选采用中国专利201711065894.2的中制备的莱克多巴胺免疫亲和层析胶与本发明所述免疫亲和层析色谱胶混合。

[0049] 在样品处理中,称取数份2g/份均质化的猪肉或猪肝样品分别分装于50mL离心管中,加入不同体积的三种瘦肉精混合标准溶液,使各组分浓度为1,5,20ng g⁻¹于三份基质样本中(1ng/g:2g基质中掺入的莱克多巴胺、沙丁胺醇、盐酸克伦特罗均为1ng/g作试样,5ng/g:2g基质中掺入的莱克多巴胺、沙丁胺醇、盐酸克伦特罗均为5ng/g作试样,20ng/g:2g基质中掺入的莱克多巴胺、沙丁胺醇、盐酸克伦特罗均为20ng/g作试样),然后每管加入4mL丙

酮,振荡提取目标物15min,10000×g离心15min,将丙酮上清液移至另一15mL干净的离心管中;重复此步骤两次,得到12mL丙酮上清,50℃氮气吹干;之后用2mL稀盐酸复溶,使目标物形成盐酸盐的形式,确保其存在于水相中;再加入2mL正己烷反相萃取去脂,10000×g离心15min后,收集水相,用2mol L⁻¹的NaOH调节溶液pH至7.4,再加入等体积的PBS混合均匀,取1mL水相加入到免疫亲和层析胶/柱中(每1.5mL色谱胶中含0.5mL莱克多巴胺单克隆抗体制备的色谱胶);

[0050] 而对于猪尿样品,将猪尿在10000×g下离心10min,取数份5mL/份猪尿分装于15mL离心管各管中,加入不同体积的三种瘦肉精混合标准溶液,使各组分加标浓度为1,5,20ng mL⁻¹(1ng/ml:2ml基质中掺入的莱克多巴胺、沙丁胺醇、盐酸克伦特罗均为1ng/ml作试样,5ng/ml:2ml基质中掺入的莱克多巴胺、沙丁胺醇、盐酸克伦特罗均为5ng/ml作试样,20ng/ml:2ml基质中掺入的莱克多巴胺、沙丁胺醇、盐酸克伦特罗均为20ng/ml作试样);再加入5mL 0.01mol L⁻¹PBS(pH 7.4)混合均匀,取1mL尿样加入到免疫亲和层析胶/柱中(每1.5mL色谱胶中含0.5mL莱克多巴胺单克隆抗体制备的色谱胶)。

[0051] 样品和色谱柱/胶混合后于摇床室温摆动孵育1h,1000r/min离心3min,弃上清,用0.01mol/L PBS(pH 7.4)离心洗涤3次,再用纯水离心洗涤3次,最后每支离心管中分别加1mL 0.1mol/L洗脱液(甲醇-水-氨水=90:9.8:0.2),置于摇床室温摇动孵育15min,1000r/min离心3min,将洗脱上清液一一对应收集至干净的1.5mL离心管中,50℃氮气吹干,用1mL流动相复溶,过滤膜后进入LC-MS/MS中检测分析。

[0052] 由以上技术方案可知,本发明选取对沙丁胺醇亲和力以及对多种β-受体激动剂免疫交叉反应均佳的单抗杂交瘤细胞株源制备其纯化抗体蛋白,利用该抗体蛋白的易获得、良好均一性、可重复性、尤其是对目标物和多种目标物结构类似物强大亲和力等优点,并按GE公司标准操作规程制备免疫亲和层析胶,获取层析胶/柱产品后,通过LC-MS/MS进行检测,与国标SPE方法相比具备更佳的加标回收率和净化处理能力。

[0053] 生物保藏信息说明

[0054] 用于保藏的杂交瘤细胞株1C3A的分类命名为:杂交瘤细胞株1C3A;

[0055] 保藏单位全称:中国典型培养物保藏中心;

[0056] 保藏单位简称:CCTCC;

[0057] 保藏单位地址:武汉市武昌珞珈山武汉大学内;

[0058] 保藏日期:2016年12月21日;

[0059] 保藏编号:CCTCC NO.C2016208。

附图说明

[0060] 图1所示为本发明所述杂交瘤细胞株以及专利CN104311438A杂交瘤细胞诱生腹水和纯化单抗的凝胶电泳图;其中,泳道1和4是标记物,泳道2和5分别是本发明沙丁胺醇和现有专利莱克多巴胺腹水,泳道3和6分别是沙丁胺醇和现有专利莱克多巴胺纯化后的抗体;

[0061] 图2所示为本发明LC-MS/MS方法条件优化结果;其中,a为上样条件;b为淋洗条件;c为洗脱条件;d为免疫亲和时间;

[0062] 图3所示为沙丁胺醇、克伦特罗和莱克多巴胺在混合免疫亲和层析柱中(Sal-IAC+ Rac-IAC)中的最大吸附容量;

[0063] 图4所示为经本发明前处理净化方法处理的样品的HPLC荧光色谱图(沙丁胺醇);其中,a、c分别是空白猪肉和猪肝;b、d为加标后的空白猪肉和猪肝;

[0064] 图5所示为经SPE前处理净化方法处理的样品的HPLC荧光色谱图(沙丁胺醇);其中,e、g分别是空白猪肉和猪肝;f、h为加标后的空白猪肉和猪肝;

[0065] 图6所示为经本发明前处理净化方法处理的样品的HPLC荧光色谱图(莱克多巴胺);其中,a、c分别是空白猪肉和猪肝;b、d为加标后的空白猪肉和猪肝;

[0066] 图7所示为经SPE前处理净化方法处理的样品的HPLC荧光色谱图(莱克多巴胺);其中,e、g分别是空白猪肉和猪肝;f、h为加标后的空白猪肉和猪肝。

具体实施方式:

[0067] 本发明公开了一种抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其分泌的单抗和应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的杂交瘤细胞及其单抗和应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的杂交瘤细胞及其单抗和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0068] 结合具体实施方式中的试验结果可知,本发明将沙丁胺醇和莱克多巴胺单克隆抗体分别与CNBr活化的琼脂糖偶联,制备了 β -受体激动剂混合免疫亲和层析胶/柱,同时捕捉三种 β -受体激动剂,并与LC-MS/MS设备联用进行定量测定。本发明在筛选出最优的上样、淋洗、洗脱等条件后,对三种空白猪样进行了加标回收实验,三种目标物各个浓度的回收率均在合理范围内,相对标准偏差低于4.1%;最后本发明还将所述检测方法的净化方法(LC-MS/MS上机检测前的步骤)与国标中规定使用的SPE净化方法(LC-MS/MS上机检测前的步骤)做了定性和定量对比检测,发现无论是在回收率方面,还是荧光色谱图上,本发明的检测方法都展现出了强大的优越性,表明本发明所制备的混合免疫亲和层析胶/柱可以有效的去除基质效应,能够准确有效的应用到实际中。

[0069] 下面就本发明提供的一种抗 β -受体激动剂簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其分泌的单抗和应用做进一步说明。

[0070] 实施例1:本发明所述含单克隆抗体腹水样本的获取

[0071] 1、杂交瘤细胞株1C3A和专利CN104311438A杂交瘤细胞的复苏与增殖

[0072] 从液氮罐中取杂交瘤细胞株的冻存管,于37℃水浴中迅速融化,600r/min离心5min,弃上清,加15%FBS/RPMI-1640培养液悬浮细胞,各补加上述培养液至5ml后,种植于50ml细胞培养瓶中,置二氧化碳培养箱培养,待细胞生长至30%密度后半换液,待细胞生长60%左右(处于对数生长期)传代,每隔2-3天按1:3-4传代一次。

[0073] 2、单抗蛋白体内诱生与腹水获取

[0074] 在体内种植杂交瘤细胞前7-10d,取12只8-10周龄雄性BALB/c鼠按0.5ml/只腹腔注射降植烷,注射后精心饲养备用。

[0075] 取上述处于对数生长期细胞的培养瓶,轻轻拍打细胞瓶壁使细胞脱落,计数后将细胞悬液转至50ml离心管中,600r/min离心12min,弃培养液,加等体积无血清RPMI-1640重悬细胞,再离心一次弃RPMI-1640,按 $1-2 \times 10^6/0.5\text{ml}$ 用无血清RPMI-1640重悬细胞备用。

[0076] 致敏7-10天后,0.5ml上述细胞悬液/只腹腔注射上述致敏鼠,7~10天后采集腹水,1000rpm离心10min以去除腹水中细胞,取上清后12000rpm离心30min以去除腹水中细胞碎片,再取上清,紫外分光光度计分别测 OD_{280} 和 OD_{260} 值,按 $1.53 \times OD_{280} - 0.71 \times OD_{260}$ 公式粗略估其总蛋白量,并将上述腹水分成三份,一分用抗体效价测定,一分用于抗体蛋白的纯化,其余 -20°C 冻存储用。

[0077] 实施例2:本发明所述单克隆抗体蛋白以及专利CN104311438A杂交瘤细胞的莱克多巴胺单抗的纯化

[0078] 吸取2mL protein G resin悬液,将其转移至柱容量为12mL的一次性PE柱中,之后加入20mL结合缓冲液(3.3768g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.0888g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,8.5g NaCl ,1L H_2O 配制),流速为 1mL min^{-1} ,去除悬液中的杂质,使悬液沉淀。接着缓慢加入4mL单克隆抗体腹水,使其缓慢流经凝胶层,protein G是G群链球菌的细胞壁蛋白,可捕获IgG型抗体的Fc区域,而其他亚型不可捕获,从而达到纯化的目的。待腹水完全流过凝胶层,加入100mL结合缓冲液洗涤,去除非特异吸附,之后加入15mL甘氨酸缓冲液(0.1mol L^{-1} , $\text{pH}=2.5$)洗脱,预先在1.5mL PE离心管中加入100 μL 中和缓冲液(1mol L^{-1} Tris-HCl, $\text{pH}=8.5$),之后逐滴收集洗脱液,每管1mL,收集前10管,用BCA试剂盒测蛋白浓度,选出浓度最高的几管蛋白溶液,在 0.01mol L^{-1} PBS ($\text{pH} 7.4$) 溶液中透析一天,每隔3小时换一次透析液。之后再通过BCA试剂盒测总蛋白浓度,SDS-PAGE测纯度。

[0079] 图1所示是两种抗体的凝胶电泳图,泳道1和4是标记物,泳道2和5分别是本发明沙丁胺醇和现有专利莱克多巴胺腹水,泳道3和6分别是两种纯化后的抗体。纯化的抗体只含有IgG型,只会在25和50KD上出现条带;从图中可看出,两种抗体的纯度较高。纯化后的抗体可确定浓度,采用BCA试剂盒,以标准BCA蛋白浓度与对应吸光度做出标准曲线,通过外标法可测出纯化后的抗体浓度,沙丁胺醇和莱克多巴胺抗体最终浓度分别为 1.95 和 2.23mg mL^{-1} 。

[0080] 实施例3:免疫交叉性分析

[0081] 本发明选用了盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗、西布特罗、这4种 β -肾上腺素受体激动剂进行交叉反应率的检测。沙丁胺醇浓度范围 $0-30\text{ng mL}^{-1}$,交叉物浓度范围是 $0.1-10000\text{ng mL}^{-1}$ 。分别作出沙丁胺醇及其它4种交叉物的标准曲线,计算出各自的 IC_{50} ,从而求得各自的CR值,结果见表1。

[0082] 表1

	交叉反应物	单克隆抗体	
		IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)	CR (%)
[0083]	沙丁胺醇	0.41	100
	盐酸克伦特罗	0.61	66.8
	特布他林	0.72	57.3
	溴布特罗	0.97	42.1
	西布特罗	0.38	121.5

[0084] 从表1中可看出,当认定沙丁胺醇的CR值为100%时,发现盐酸克伦特罗、特布他林、溴布特罗和西布特罗交叉反应率很大,CR值分别为66.8%、57.3%、42.1%、121.5%。而这四种物质与沙丁胺醇结构非常类似,都具有与氮原子相连的叔丁基,表明本发明筛选的沙丁胺醇单克隆抗体,与其互补的抗原决定簇为远离沙丁胺醇主体结构的叔丁基,也就是说,此单抗具有簇特异性。

[0085] 实施例4:单克隆抗体蛋白与SepharoseTM 4B化学交联

[0086] 1、交联前单克隆抗体蛋白预处理

[0087] 取约40mg实施例2纯化单克隆抗体蛋白置于透析袋(7500-14000MW)中,于100-200×0.1M NaHCO₃/0.5M NaCl (pH 8.3)溶液4℃透析过夜(每4-6h换液一次),透析后蛋白用0.22μm微孔滤膜过滤,过滤后于4℃保存备用。

[0088] 2、交联前CNBr-activated Sepharose 4B预处理

[0089] 分别称取二份1g CNBr-activated Sepharose 4B冻干粉于2支50ml离心管(corning公司产品),每支离心管加30ml 1mM HCl室温于摆床中轻轻摆动溶胀30min,室温2000r/min 10min弃上清,同法离心洗涤重复8-10次充分去除CNBr-activated Sepharose 4B其他小分子化学试剂后,每支离心管再用30ml 0.1M NaHCO₃/0.5M NaCl (pH 8.3)离心洗涤一次,取沉淀胶备用。

[0090] 3、单抗蛋白与Sepharose 4B化学交联

[0091] 将上述预处理的单抗蛋白液分成二等份分别加入含处理Sepharose 4B胶的2支50ml离心管中,盖好盖并用parafilm膜封口,置于摆床中室温摆动孵育1h,室温2000r/min 10min弃上清,从该上清中取少许以Bradford法分析单抗蛋白与Sepharose 4B交联效果。每支离心管加30ml 0.1M NaHCO₃/0.5M NaCl (pH 8.3)溶液,置于摆床中室温摆动孵育10min,室温2000r/min 10min弃上清,再用该交联缓冲液重复上述步骤离心洗涤5-6次以充分去除未交联的蛋白,取沉淀胶。

[0092] 取上述沉淀胶,每支离心管加入30ml 0.1M Tris-HCl (pH 8.0)置于摆床中室温摆动孵育2h以充分封闭Sepharose 4B胶中未与蛋白交联的活化基团,室温2000r/min离心10min,取沉淀胶。

[0093] 取沉淀胶,分别用30ml 0.1M HAC/0.5M NaCl (pH4.0)和30ml 0.1M Tris-HCl/0.5M NaCl (pH 8.0)二种缓冲液交替离心洗涤三个循环后,将胶重悬于30ml 0.1M Tris-

HCl/0.5M NaCl (pH 8.0) 液补加0.02%NaN₃,于4℃保存备用,即制得沙丁胺醇免疫亲和层析胶(Sal-IAC)/莱克多巴胺免疫亲和层析胶(Rac-IAC)。

[0094] 实施例5:本发明检测猪肉、猪尿或猪肝中沙丁胺醇、盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的LC-MS/MS方法

[0095] 1、样品处理

[0096] 猪肉猪肝样品匀浆均由苏州市农产品质量安全监测中心提供。称取数份2g/份均质化的样品于分装于50mL离心管各管中,加入不同体积的三种瘦肉精混合标准溶液,使各组份加标浓度为1,5,20ng g⁻¹分别添加于含试样的各离心管;然后加入4mL/管丙酮,振荡提取目标物15min,10000×g离心15min,将丙酮上清液移至另一15mL干净的离心管中;重复此步骤两次,得到12mL丙酮上清,50℃氮气吹干;之后用2mL稀盐酸复溶,使目标物形成盐酸盐的形式,确保其存在于水相中;再加入2mL正己烷反相萃取去脂,10000×g离心15min后,收集水相,用2mol L⁻¹的NaOH调节溶液pH至7.4,再加入等体积的PBS混合均匀,取1mL水相加入到混合免疫亲和层析胶中(1.0mL Sal-IAC+0.5mL Rac-IAC)。

[0097] 猪尿亦是由苏州市农产品质量安全监测中心提供。首先将猪尿在10000×g下离心10min,取数份5mL/份尿分装于15mL离心管各管中,加入不同体积的三种瘦肉精混合标准溶液,使加标浓度为1,5,20ng mL⁻¹;再加入5mL 0.01mol L⁻¹PBS (pH 7.4) 混合均匀,取1mL尿样加入到混合免疫亲和层析胶中(1.0mL Sal-IAC+0.5mL Rac-IAC)。

[0098] 2、免疫亲和及LC-MS/MS检测

[0099] 取若干1.5mL离心管,每管分别加入1mL Sal-IAC和500μL Rac-IAC,用0.01mol/L PBS (pH 7.4) 离心洗涤5次后离心,弃去上清后最终胶体体积约为150μL。再将样品溶液一一对应移入含混合免疫层析胶的离心管中,混合后于摇床室温摆动孵育1h,1000r/min离心3min,弃上清,用0.01mol/L PBS (pH 7.4) 离心洗涤3次,再用纯水离心洗涤3次,最后每支离心管中分别加1mL 0.1mol/L洗脱液(甲醇-水-氨水=90:9.8:0.2),置于摇床室温摇动孵育15min,1000r/min离心3min,将洗脱上清液一一对应收集至干净的1.5mL离心管中,50℃氮气吹干,用1mL流动相复溶,过滤膜后进入LC-MS/MS中检测分析。

[0100] 实施例6:本发明检测猪肉、猪尿或猪肝中沙丁胺醇、盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的LC-MS/MS方法的条件优化试验

[0101] 上样、淋洗、洗脱等条件可能对抗原-抗体复合物的结合及解离产生较大的影响。在上样步骤中,理想状态是希望目标物能够充分完全的与层析胶中抗体结合;而在淋洗时,应尽可能的除去非特异性吸附,以确保样品基质的纯净;最后在洗脱过程中,通过改变环境的pH能够使目标物全部解离下来。总之,条件的优化的目的是为了提提高萃取效果,提高检测的灵敏度。

[0102] 1、上样和淋洗条件的筛选

[0103] 在本研究中,分别对三种不同的上样液(纯水;0.01mol mL⁻¹PBS;0.01mol mL⁻¹PBS+10%甲醇水溶液)和淋洗液(纯水;0.01mol mL⁻¹PBS+水;0.01mol mL⁻¹PBS+10%甲醇水)进行了实验筛选,结果如图2a-b所示,在上样条件中,PBS和纯水体系对三种目标物的回收率影响不大,但在体系中加入些许的有机试剂,三种物质的回收率受到了较大的影响,这可能是有机试剂对抗体产生一定的破坏作用,使得胶上抗体一部分失活,无法完全捕捉目标物;而淋洗液对萃取效果影响不大,回收率均在90%左右。最终,本发明选择PBS溶液作为上样

液, PBS-纯水作为淋洗体系。

[0104] 2、洗脱液的选择

[0105] 洗脱条件对于三种目标物的回收率影响最大。抗原抗体之间的结合是静电力、范德华力和氢键相互作用的结果, 为了打破抗原抗体复合物之间的作用力, 洗脱液必须是极酸或极碱的溶液, 对pH的要求十分苛刻。本研究中, 考察了八种洗脱液[0.1%甲酸水(pH 2.0); 0.1%甲酸水(pH 2.6); 2% HAC(pH 2.0); 60%, 80%, 100%甲醇水溶液; 1%氨水甲醇(pH 10.5), 甲醇-水-氨水(90-9.8-0.2, pH 10.5)]的萃取效果, 结果如图2c所示, 甲醇/水体系并不能充分破坏抗原与抗体之间的偶联键。而在酸性条件下, 克伦特罗的回收率不高, 原因是其结构与沙丁胺和莱克多巴胺有些许不同。沙丁胺醇、莱克多巴胺都含有酚羟基和仲胺, 酚羟基显弱酸性, 仲胺显弱碱性, 两者可中和, 故沙丁胺醇和莱克多巴胺是呈中性的; 而克伦特罗只含有碱性基团苯胺和仲胺, 故呈碱性。由于沙丁胺醇单抗针对的是仲胺抗原决定簇, 当洗脱液为酸性时, 可能会先与克伦特罗的苯胺发生酸碱中和反应, 降低了洗脱液的酸度, 则不能打破克伦特罗与抗体之间的共价键, 导致克伦特罗回收率普遍偏低甚至没有。因此只有碱性溶液, 才能将三种目标物很好地洗脱下来。最终选择甲醇-水-氨水(90:9.8:0.2)作为最优洗脱液。

[0106] 3、免疫亲和时间的优化

[0107] 与以往传统的免疫亲和过程不同, 本次研究中, 抗原与抗体的反应是在一个封闭的体系中进行的。因此, 本发明可以对免疫亲和时间进行控制, 优化出最佳的结合时间。结果如图2d所示, 当时间达到45min时, 三种目标物与抗体均达到最大程度的结合。因此, 我们最终选定45min为最佳的免疫亲和时间。

[0108] 实施例7: 本发明混合免疫亲和层析柱中(Sal-IAC+Rac-IAC)最大吸附容量的测定

[0109] 最大吸附容量是考察免疫亲和柱性能的一项重要指标; 如果目标物含量过大, 超过免疫亲和柱最大吸附量, 则过量的目标物将无法负载在柱子上, 只能与杂质一起流出, 在计算萃取回收率时, 使得结果不准确。在最佳的优化条件下, 确定沙丁胺醇、盐酸克伦特罗和莱克多巴胺各自的最大吸附容量, 才不会影响后续实际样品加标回收实验。本发明通过将1mL浓度分别为0.2, 2, 10, 25, 50, 100ng mL⁻¹的沙丁胺醇、克伦特罗、莱克多巴胺混合标准溶液加入到免疫亲和“柱”(离心管中加Sal-IAC+Rac-IAC混合免疫亲和层析胶)中, 交联反应, 然后洗涤、洗脱, 最后收集洗脱液, 经处理后上机定量测定各浓度点上对应的三种物质的含量, 计算回收率, 以此可确定三种目标物在该免疫亲和“柱”中的最大柱容量。

[0110] 如图3所示, 50μL的Sal-IAC+Rac-IAC混合免疫亲和层析胶上, 能吸附沙丁胺醇33ng, 克伦特罗34ng, 莱克多巴胺29ng。由于传统的免疫亲和柱是将层析胶装入空的SPE柱中, 在开放体系下使样品溶液缓慢流过层析胶; 而本研究中, 免疫亲和过程是在封闭体系中进行的, 这样确保了抗原抗体之间的反应能够充分完全。通常免疫亲和柱的柱体积约为1mL, 为了更形象地说明本研究体系的合理性, 本发明将50μL的层析胶换算成1mL, 则三种物质的最大吸附容量分别为660ng、680ng、580ng, 与传统IAC柱的最大吸附容量是相近的。

[0111] 实施例8: 实际样品加标回收率

[0112] 实际样品加标回收实验是对免疫亲和色谱法准确度和精密度的考察。本发明对实施例5三种空白实际样品进行检测, 之后在空白样品溶液中加入不同体积的β-受体激动剂混合标准溶液, 使其浓度范围在0.2-20ng mL⁻¹, 通过LC-MS/MS做出标准曲线, 结果如表2所

示。三种目标物在三种不同基质样品的环境中,检出限均明显低于国标规定的 0.5ng g^{-1} ,并且 $r^2 > 0.9946$,表明本发明的方法的灵敏度很高。

[0113] 表2

样品	分析物	线性方程	相关系数	线性范围(ng mL^{-1})	LOD (ng mL^{-1})	批内 CV (%)	批间 CV (%)
猪肉	沙丁胺醇	$y = 3.13\text{e}5 x + 4834$	0.9953	0.2-20	0.03	0.19	0.25
	莱克多巴胺	$y = 2.06\text{e}5 x + 7599$	0.9946	0.2-20	0.04	0.12	0.30
	克伦特罗	$y = 3.17\text{e}5 x + 5410$	0.9946	0.2-20	0.05	0.26	0.27
猪肝	沙丁胺醇	$y = 2.47\text{e}5 x + 18293$	0.9991	0.2-20	0.04	0.23	0.46
	莱克多巴胺	$y = 2.08\text{e}5 x + 724$	0.9992	0.2-20	0.04	0.13	0.38
	克伦特罗	$y = 6.16\text{e}5 x + 6989$	0.9967	0.2-20	0.06	0.30	0.31
猪尿	沙丁胺醇	$y = 3.19\text{e}5 x + 5006$	0.9990	0.2-20	0.02	0.27	0.4
	莱克多巴胺	$y = 2.59\text{e}5 x + 9826$	0.9951	0.2-20	0.05	0.16	0.25
	克伦特罗	$y = 5.07\text{e}5 x + 17479$	0.9963	0.2-20	0.03	0.22	0.21

[0115] 进行样品加标回收实验,在空白猪样中加入不同体积的瘦肉精混合标准溶液,按照本发明方法检测,计算回收率。结果如表3-5所示。

[0116] 本发明对每种目标物在每个样品中高中低三种加标浓度的回收率平均化,通过平均回收率可清楚地看出,在猪肉基质中,沙丁胺醇、克伦特罗和莱克多巴胺三种目标物的平均回收率均在70%以上;而在猪肝和猪尿样品中,沙丁胺醇和克伦特罗的平均回收率分别为80%和90%左右,但莱克多巴胺在这两种基质中,平均回收率都不是很高,为64%左右,这可能是由于莱克多巴胺单克隆抗体与半抗原莱克多巴胺之间的免疫亲和力太强,pH 10.5的碱性洗脱液不能彻底地打破其抗原抗体复合物,并且猪肝猪尿的基质比猪肉更为复杂,故导致莱克多巴胺的加标回收率较低。三种加标样品的相对标准偏差低于4.1%,表明

本发明所制备的混合免疫亲和层析胶可以有效的去除样品的基质效应,能够准确有效的应用到实际中。

[0117] 表3猪肉加标回收率 (n=3)

本发明检测方法				国标 SPE 方法			
目标物	加标量 (ng g ⁻¹)	回收率 ±SD (%)	平均回收率 ±SD (%)	目标物	加标量 (ng g ⁻¹)	回收率 ±SD (%)	平均回收率 ±SD (%)
沙丁胺醇	1	79.1±3.5	72.2±11.4	沙丁胺醇	1	31.0±1.2	45.9±14.6
	5	59.0±1.9			5	46.6±2.5	
	20	78.4±2.4			20	60.2±3.1	
克伦特罗	1	73.5±3.3	76.2±14.0	克伦特罗	1	29.3±2.2	30.4±12.2
	5	63.7±1.7			5	43.2±1.9	
	20	91.3±0.9			20	18.8±1.3	
莱克多巴胺	1	73.5±2.1	74.3±7.4	莱克多巴胺	1	33.4±1.5	47.1±16.5
	5	82.1±1.5			5	42.6±2.9	
	20	67.3±2.7			20	65.4±3.4	

[0119] 表4猪肝加标回收率 (n=3)

本发明检测方法				国标 SPE 方法			
目标物	加标量 (ng g ⁻¹)	回收率 ±SD (%)	平均回收率 ±SD (%)	目标物	加标量 (ng g ⁻¹)	回收率 ±SD (%)	平均回收率 ±SD (%)
[0120] 沙丁胺醇	1	88.2±2.7	82.4±7.5	沙丁胺醇	1	72.0±2.4	65.7±6.1
	5	73.9±3.5			5	59.9±1.6	
	20	85.0±2.5			20	65.3±1.8	
克伦特罗	1	83.9±3.9	80.0±7.7	克伦特罗	1	56.2±1.5	62.8±10.4
	5	70.7±2.8			5	57.4±2.3	
	20	84.1±2.6			20	74.8±2.8	
莱克多巴胺	1	84.1±1.9	64.1±19.0	莱克多巴胺	1	16.7±0.3	27.1±11.0
	5	46.1±1.3			5	26.1±0.8	
	20	62.2±2.0			20	38.6±1.4	

[0121] 表5猪尿加标回收率 (n=3)

本发明检测方法				国标 SPE 方法			
目标物	加标量 (ng g ⁻¹)	回收率 ±SD (%)(n=3)	平均回收率 ±SD (%)	目标物	加标量 (ng g ⁻¹)	回收率 ±SD (%)(n=3)	平均回收率 ±SD (%)
[0122] 沙丁胺醇	1	87.3±3.2	92.0±6.7	沙丁胺醇	1	42.6±1.7	49.3±6.1
	5	89.0±3.6			5	54.6±2.2	
	20	99.6±4.1			20	50.8±2.0	
克伦特罗	1	86.5±3.5	90.4±3.7	克伦特罗	1	62.1±3.1	51.8±9.2
	5	90.9±3.9			5	44.2±1.3	
	20	93.8±4.3			20	49.2±2.8	
莱克多巴胺	1	55.8±2.3	64.8±7.9	莱克多巴胺	1	31.6±1.2	47.0±16.2
	5	70.7±2.9			5	44.2±2.1	
[0123] 胺	20	67.8±2.5		胺	20	65.1±2.8	

[0124] 实施例9:本发明检测猪肉、猪尿或猪肝中沙丁胺醇、盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的LC-MS/MS方法与国标SPE的对比

[0125] 国标SPE:采用MCX固相萃取小柱(60mg/3mL,Waters Oasis)。具体操作为,依次加入3mL甲醇和3mL纯水活化小柱,之后将实施例5中处理好的样品溶液加入柱中,待样品溶液流干,先后加入3mL纯水和3mL甲醇淋洗小柱,最后加入3mL 5%氨水甲醇洗脱,收集洗脱液,50℃氮气吹干,用1mL流动相复溶,过滤膜后进入LC-MS/MS中定量检测,计算回收率。

[0126] 为验证本发明检测方法的优越性,将其与国标规定使用的SPE净化方法做了对比实验,结果如表3-5所示,对三种基质加标后经SPE处理,沙丁胺醇平均回收率不高于65%,克伦特罗的平均回收率小于62%,莱克多巴胺的平均回收率在47%以下。通过表中数据对比,可清楚地看出,本发明检测方法,在不同基质中,加标回收率均高于SPE。而SPE处理的样品回收率较低,但还能成为国标指导方法,这是由于国标在通过液质联用色谱仪定量检测时,加入了同位素内标物,采用内标法对目标物进行定量。但是,同位素内标物价格是十分昂贵的,这无疑大大增加了检测成本。而本发明检测方法中的单克隆抗体是可以源源不断生产的,相比之下,本发明免疫亲和色谱法的优势又进一步体现了出来。

[0127] 为了更直观地展现本发明检测方法的优越性,将本发明检测方法的净化处理后(LC-MS/MS检测前的步骤)的猪肉、猪肝样品溶液做了荧光色谱图对比,因为克伦特罗无荧光性质,故只在样品中加入沙丁胺醇和莱克多巴胺,通过HPLC-FLD进行单组份定性分析,之所以分开检测两种目标物,是因为沙丁胺醇和莱克多巴胺的最优激发波长和发射波长并不相同,流动相及其比例也不一样,本发明的目的是对本发明检测方法前处理(LC-MS/MS检测前的步骤)和SPE前处理(LC-MS/MS检测前的步骤)进行对比,因而其他条件都应该相同且最优。实验中,沙丁胺醇和莱克多巴胺的加标浓度均为100ng g⁻¹。

[0128] 图4-5是沙丁胺醇的加标回收荧光色谱图,图4a、c分别是经本发明检测方法前处理的空白猪肉和猪肝,样品加标后,同样采用本发明检测方法的前处理净化,净化效果如图4b、d所示,沙丁胺醇约在4.8分钟出峰,荧光色谱图上很少杂峰甚至没有;虽然在7min处有鬼峰出现,但这可能是在处理猪肉猪肝时所用的有机溶剂造成的杂峰,并不影响对沙丁胺醇的定性分析;而图5e、g分别是经SPE前处理的空白猪肉和猪肝,可以看到,空白样品中杂峰多而乱,阴性样品都能在4.8分钟处检出疑似沙丁胺醇的色谱峰,可见SPE方法并不能有效地清除样品中的基质效应,这对沙丁胺醇残留的定性或定量分析都造成了巨大的影响;图5f、h则是经SPE处理的猪肉、猪肝的荧光色谱图,从图中可以看出,沙丁胺醇的色谱峰峰面积很大,但其实是因为样品基质中有杂质并未被净化洗去,与沙丁胺醇在同一时间段出峰,因此积分出来的峰面积是不准确的,是无法进行定量测定的。

[0129] 同样,图6-7是莱克多巴胺的加标回收色谱图,结论与沙丁胺醇大致相同。由于检测莱克多巴胺的流动相是乙腈水,沙丁胺醇的流动相是甲醇水,乙腈的极性大于甲醇,洗脱能力更强,故样品处理过程中的有机溶剂并未在色谱图中出现。图6a、b、c、d是经本发明检测方法前处理的样品色谱图,本发明检测方法前处理基本上消除了样品基质,莱克多巴胺峰型丝毫不受干扰;但图7e、f、g、h是经SPE前处理的样品色谱图,同样在莱克多巴胺出峰时间约7.4分钟处受到杂质的影响,甚至都无法进行定性分析。通过两种方法的荧光色谱图对比,可进一步证明,本发明检测方法前处理基质净化效果远远优于SPE。因此,无论是定量检测,或是定性确认,本发明检测方法的净化样品基质的能力都远高于SPE净化手段,由此可

证明本发明的免疫亲和色谱法,可以应用于实际样品的净化处理中。

[0130] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

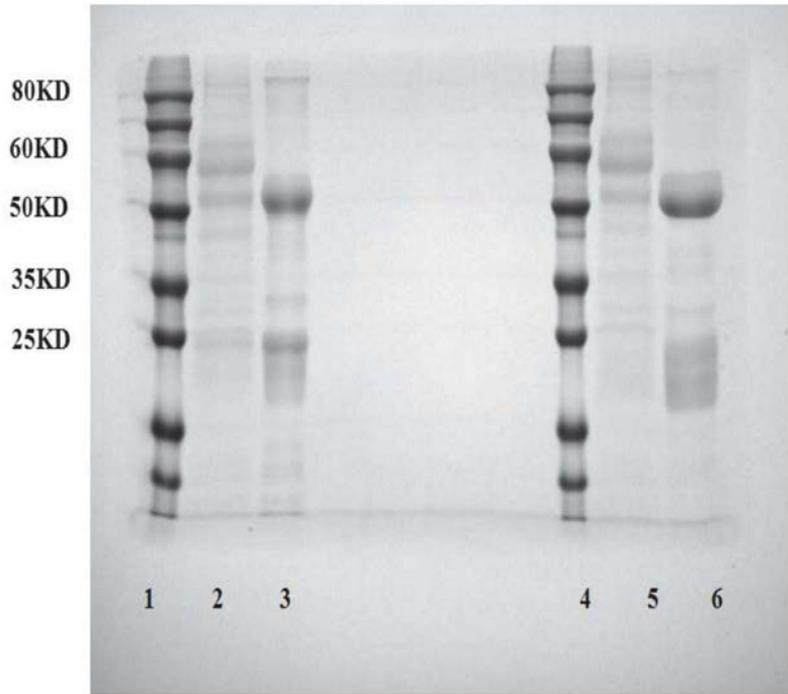


图1

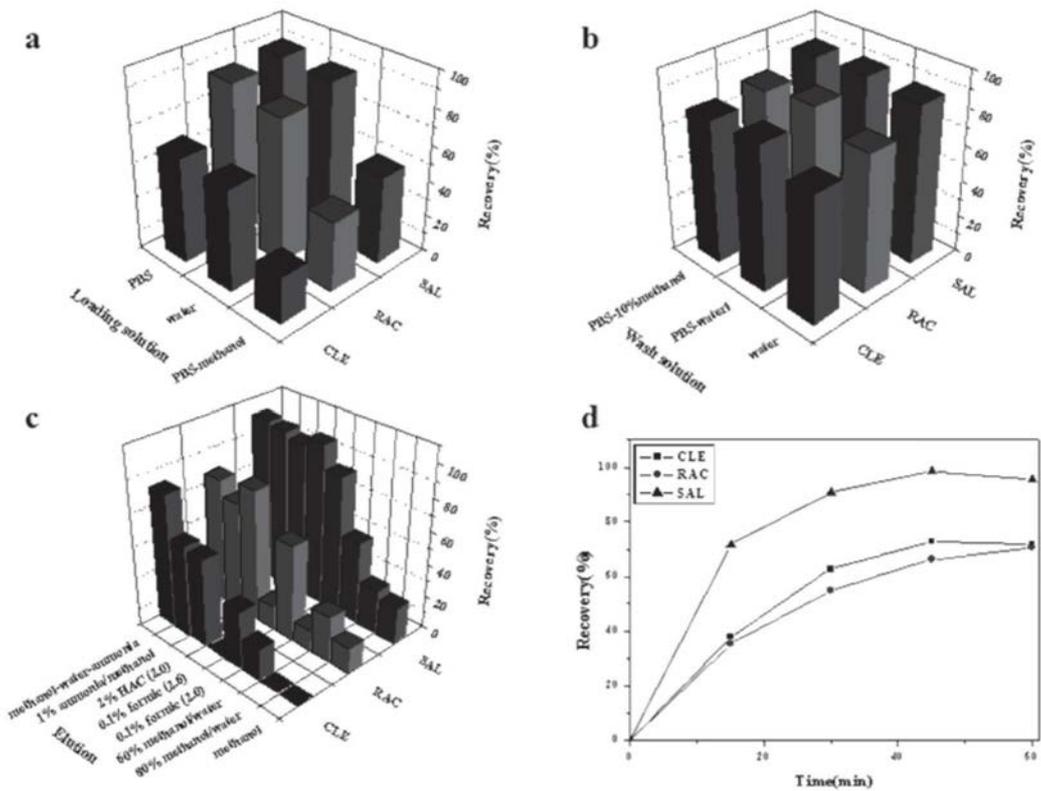


图2

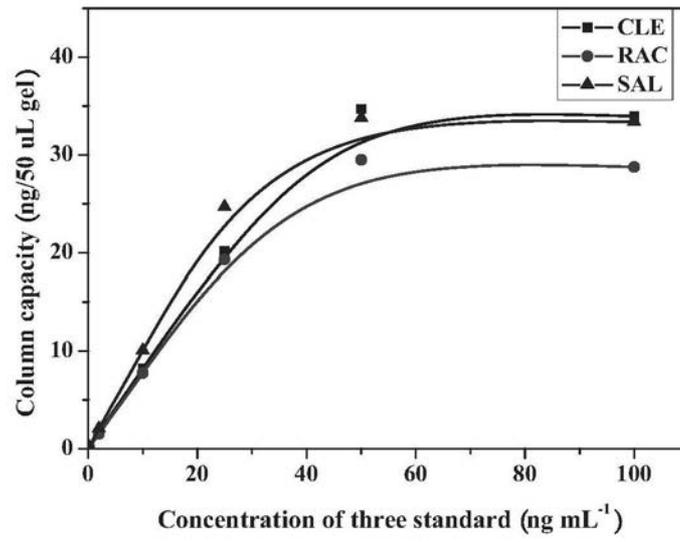


图3

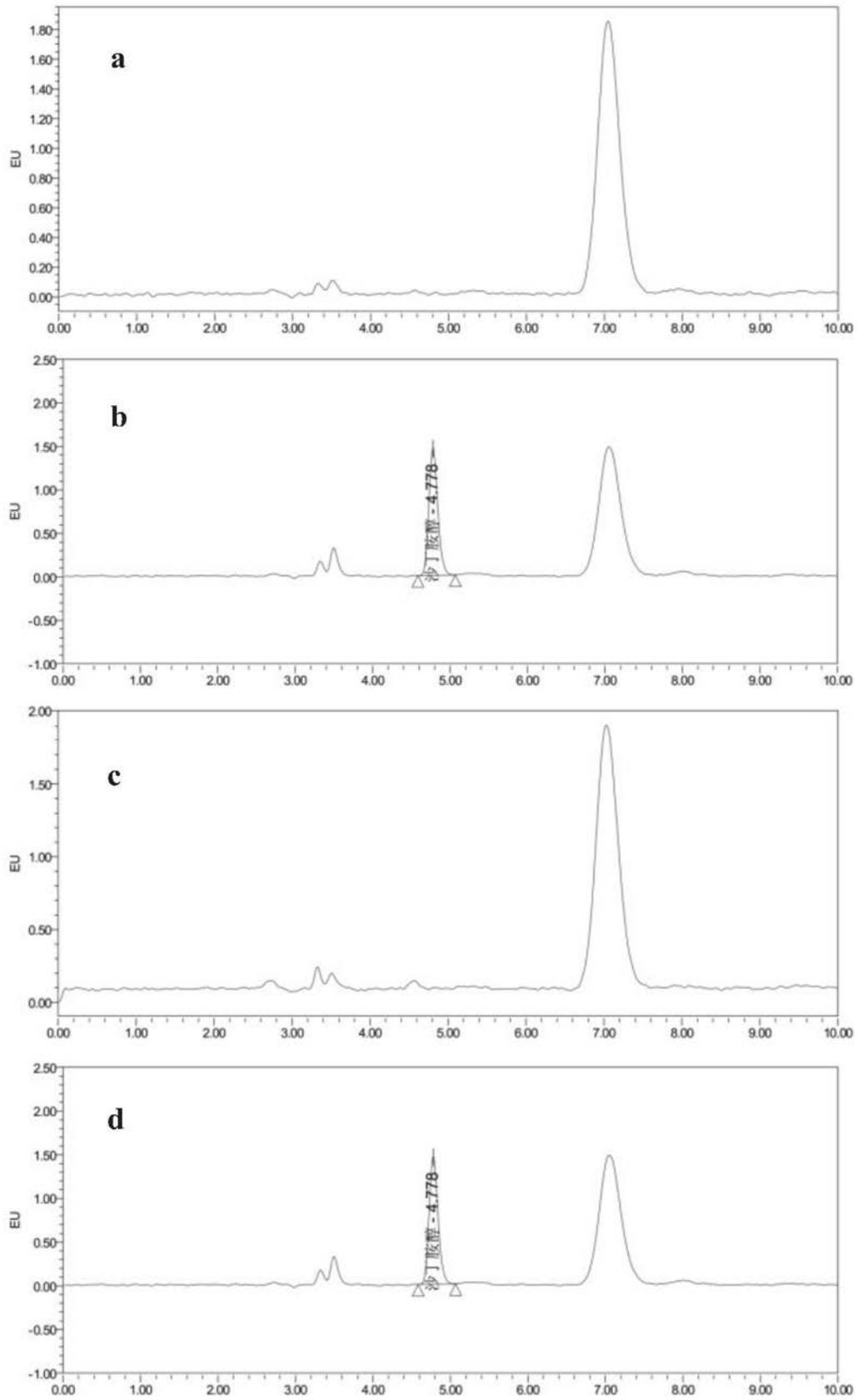


图4

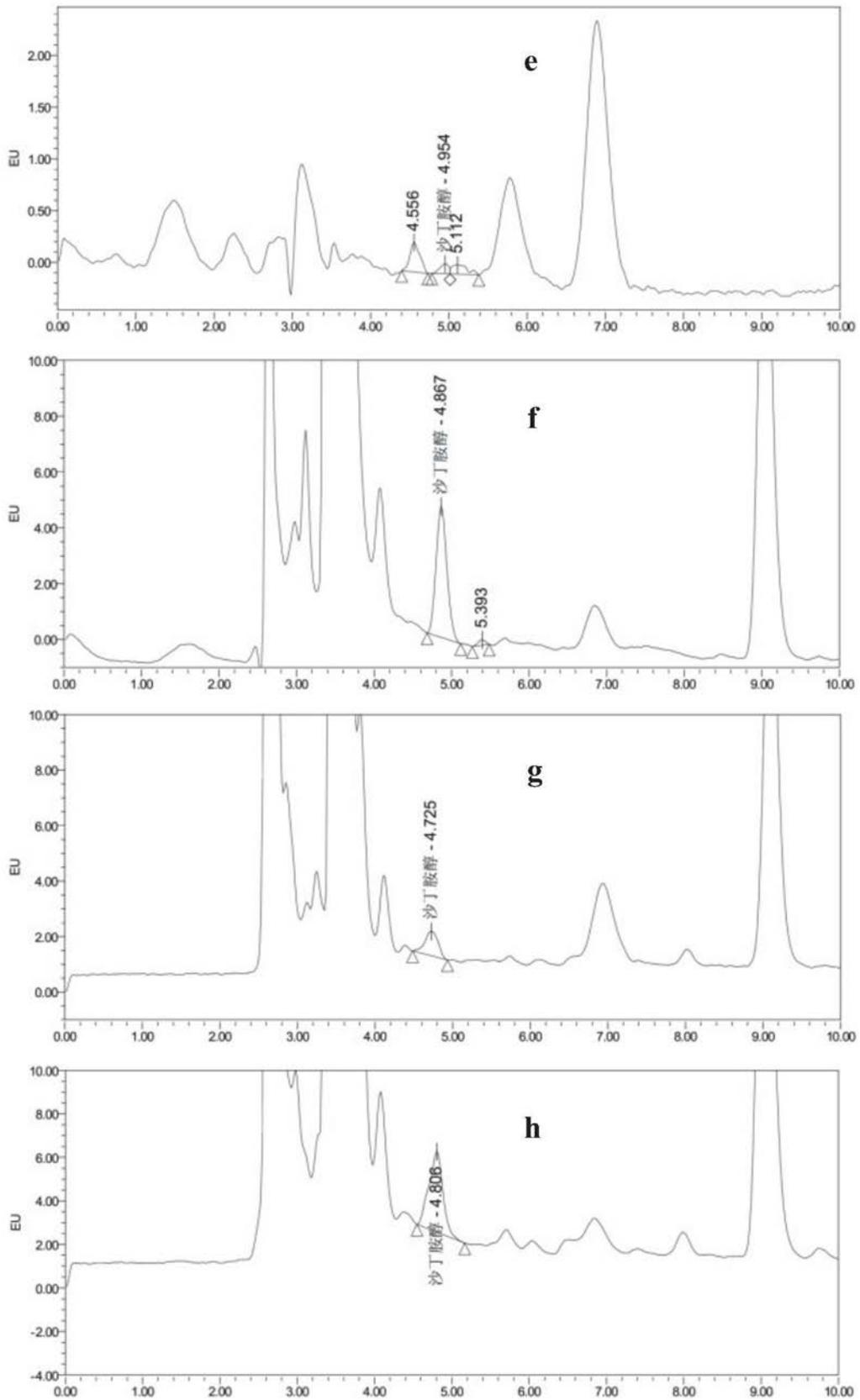


图5

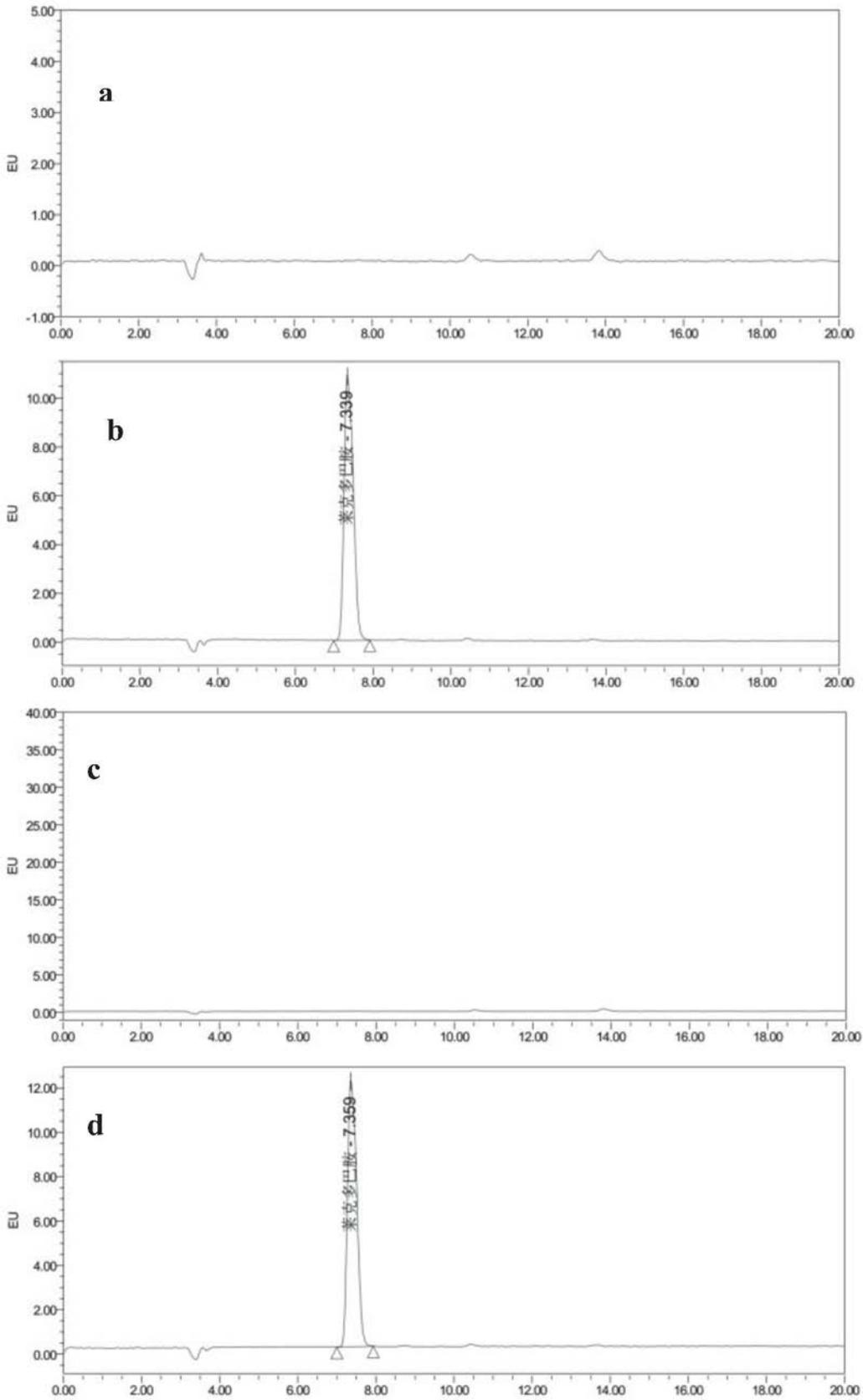


图6

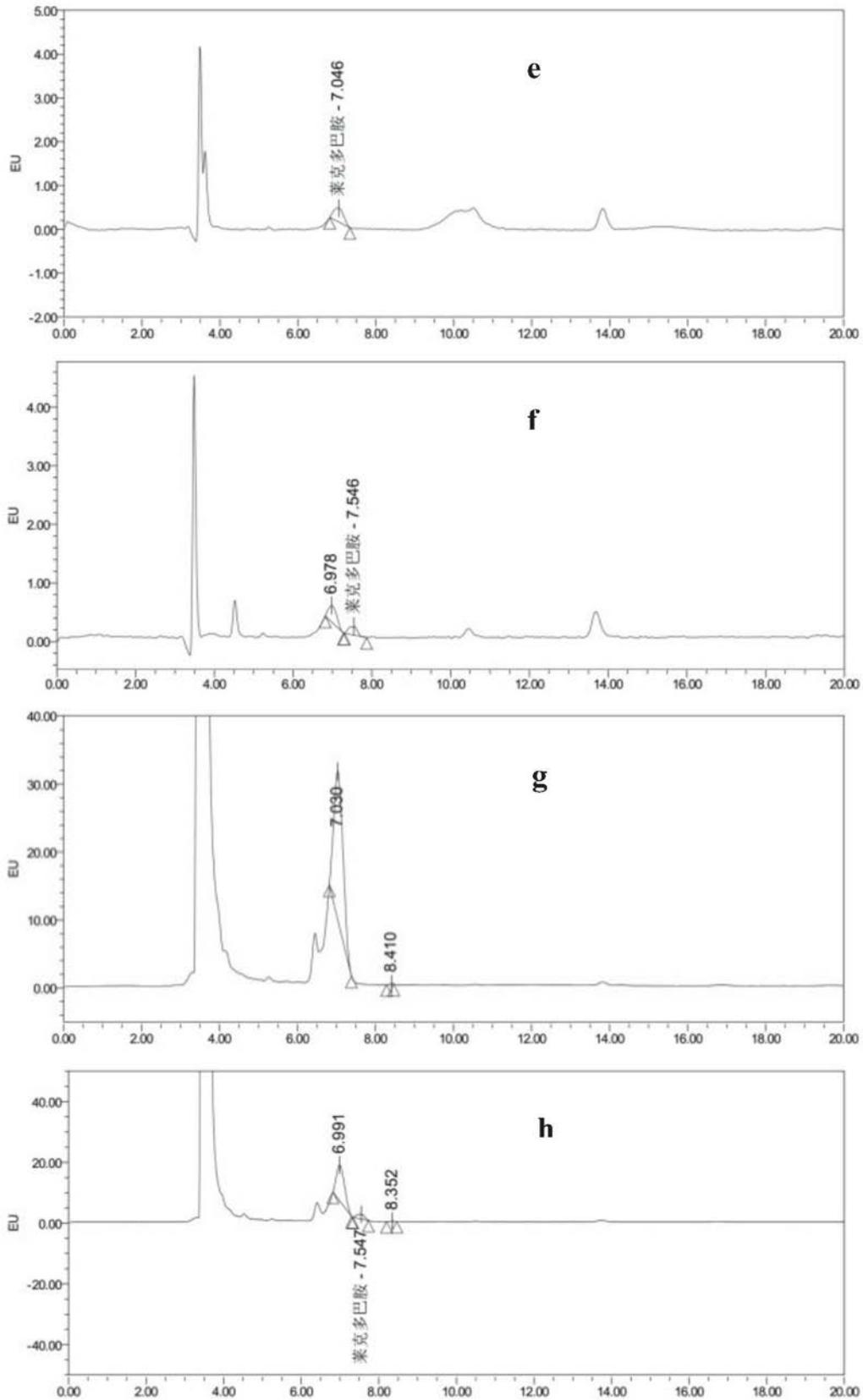


图7