



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104004718 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201410260782.2

C12R 1/91(2006.01)

(22)申请日 2014.06.13

(56)对比文件

(83)生物保藏信息

CN 103424478 A, 2013.12.04, 全文.

CGMCC No.9302 2014.05.28

张小辉等.林可霉素人工抗原的合成与鉴定.《西北农业学报》.2012,第21卷(第8期),第1-6页.

(73)专利权人 无锡迪腾敏生物科技有限公司

地址 214125 江苏省无锡市锦溪路99号

(72)发明人 胥传来 曹珊珊 匡华 徐丽广

马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲

审查员 邢维玲

(74)专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

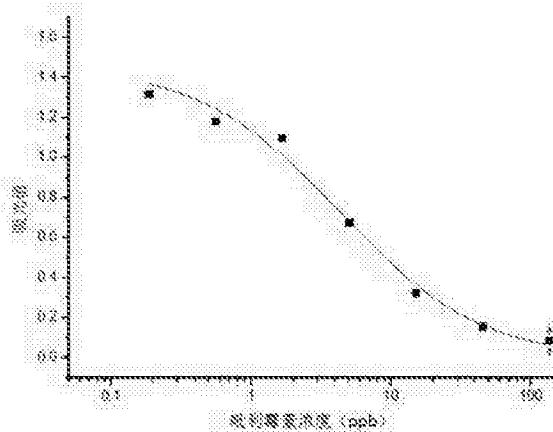
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一株抗吡利霉素通用单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用

(57)摘要

一株抗吡利霉素通用单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用,属于食品安全免疫学检测技术领域。本发明细胞株,分类命名为单克隆细胞株B号,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.9302。本发明用高碘酸钠法将吡利霉素的邻二醇结构氧化为醛基后与蛋白的氨基偶联,得到的完全抗原免疫小鼠,取免疫小鼠的脾细胞,通过PEG方法与小鼠骨髓瘤细胞融合,经间接ELISA筛选和三次亚克隆筛选出阳性杂交瘤细胞株;扩大培养诱导得到吡利霉素的单克隆抗体。本发明单克隆细胞株B号制备方法简便,完全抗原和包被抗原合成方便快捷,获得的细胞株分泌的抗体有较好的灵敏度(IC50值为5ng/mL),满足剂量依赖性的要求,为间接竞争ELISA试剂盒的研发推广奠定了基础。



1. 一株抗吡利霉素通用单克隆抗体杂交瘤细胞株,其分类命名为单克隆细胞株B号,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.9302。

2. 权利要求1所述菌株单克隆细胞株B号分泌产生的抗吡利霉素单克隆抗体,其特征在于:其由抗吡利霉素通用单克隆抗体杂交瘤细胞株单克隆细胞株B号所分泌产生。

3. 权利要求2所述抗吡利霉素单克隆抗体的应用,其特征在于:将抗吡利霉素单克隆抗体进行纯化,建立间接竞争ELISA,采用CDI法将吡利霉素和蛋白偶联合成包被抗原,应用于吡利霉素的检测。

一株抗吡利霉素通用单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株抗吡利霉素通用单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用,具体涉及单克隆细胞株B号及其产生的抗吡利霉素通用单克隆抗体,属于食品安全免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 吡利霉素是最新研制的半合成林可胺类抗生素,是林可霉素衍生物,该药常用作奶牛乳房注入剂使用,体外及临床试验结果表明该药对金黄色葡萄球菌、无乳球菌、停乳链球菌、乳房链球菌等所致的临床及亚临床型乳腺炎效果明显。吡利霉素食物蓄积后对胃肠道有毒性,造成恶心、呕吐、食欲不振腹泻;过敏反应:可出现药物性皮炎;可发生碱性磷酸酶、血清转氨酶轻度升高及黄疸、肾功能异常。美国和欧盟规定吡利霉素在上市牛奶中的最高残留限量100 μ g/L。

[0003] 目前检测吡利霉素的方法主要有仪器方法与免疫分析方法。仪器检测方法虽然检测准确,但仪器昂贵,操作复杂,样品前处理繁琐。免疫分析方法相对于仪器检测方法,具有低成本、高通量、高灵敏、对技术人员要求低等特点,因此适用于大量样品的快速筛查。配合仪器,可广泛应用于检验检疫、商检执法等部门,是非常具有推广价值的食品安全快速筛查方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种对吡利霉素具有较好检测灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株的制备方法,及其分泌的单克隆抗体在吡利霉素检测中的应用。

[0005] 本发明的技术方案,一株抗吡利霉素通用单克隆抗体杂交瘤细胞株,其分类命名为单克隆细胞株B号,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.9302。

[0006] 本发明提供的单克隆细胞株B号的制备,基本步骤为:

[0007] (1)免疫原的制备与鉴定:吡利霉素通过高碘酸钠法与蛋白载体相连,通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原,并通过SDS-PAGE鉴定;

[0008] (2)小鼠的免疫:将抗原与QuickAntibody免疫佐剂TM混合均匀后,通过腿部肌肉注射免疫BALB/c小鼠。通过间接ELISA检测血清效价和抑制;

[0009] (3)细胞融合与细胞株建立:通过聚乙二醇(PEG4000)法将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合,通过HAT培养基培养,利用间接ELISA检测阳性细胞孔,并进一步利用间接竞争ELISA法测定阳性细胞孔的抑制效果,通过有限稀释法对有最好抑制的阳性细胞孔进行三次亚克隆,最终筛选获得杂交瘤细胞株单克隆细胞株B号;

[0010] (4)单克隆细胞株B号性质的鉴定:抗体亚型的鉴定采用小鼠单克隆抗体亚型检测试剂盒方法,测IC₅₀值。

[0011] 所述菌株单克隆细胞株B号分泌产生的抗吡利霉素单克隆抗体,其由抗吡利霉素

通用单克隆抗体杂交瘤细胞株单克隆细胞株B号所分泌产生。将抗吡利霉素单克隆抗体进行纯化,建立间接竞争ELISA,采用CDI法将吡利霉素和蛋白偶联合成包被抗原,并应用于吡利霉素的检测。

[0012] 本发明的有益效果:本发明获得抗吡利霉素单克隆抗体细胞株的制备方法简便,完全抗原和包被抗原合成方便快捷,获得的细胞株分泌的抗体有较好的灵敏度(IC_{50} 值为5ng/mL)。单克隆抗体不仅能应用于吡利霉素的酶标记抗体、荧光标记抗体、胶体金标记抗体等;而且在后续的竞争实验中,满足剂量依赖性的要求,为间接竞争 ELISA 试剂盒的研发推广奠定了基础。

[0013] 生物材料样品保藏:上述小鼠单克隆抗体杂交瘤细胞株单克隆细胞株B号,已于2014年5月 28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,地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3 号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.9302。

附图说明

[0014] 图1、SDS-PAGE检测纯化后抗体纯度。1:蛋白marker;2:小鼠单克隆抗体。

[0015] 图 2、抗原抗体竞争反应对数曲线。

具体实施方式

[0016] 本发明下面的实施例仅作为本发明内容的进一步说明,不能作为本发明的限定内容或范围。下面通过实施例对本发明作进一步说明。

[0017] 骨髓瘤细胞SP2/0种子来源于北京康为世纪生物科技有限公司。6 周龄的 BALB/c 纯系雌性小鼠购自北京维通利华实验动物中心。胎牛血清(上海洛神, Lot 20090525),细胞融合用 PEG 4000(sigma),50×HAT 储液(sigma, H0262, 093K8931),50×HT(sigma H0317, Lot 064K8927),1640 培养基(Gibco, Lot)DMSO(Amresco 0231),石蜡油(国药试剂公司)。BSA (Sigma, A7638),OVA(Sigma, A5378)。

[0018] 实施例1 单克隆细胞株B号的获得及其产生的抗吡利霉素的单克隆抗体的鉴定

[0019] 一、单克隆细胞株B号的获得

[0020] 1、吡利霉素完全抗原PIR-KLH的制备:取2mg PIR溶于水中,加入5.2 mg的高碘酸钠,室温活化40min。另取7mg KLH溶解于2.5 mL、0.01M、pH9.6的CBS溶液中,将上述活化后的吡利霉素溶液慢速逐滴加入KLH溶液中,室温搅拌反应4h,4℃透析三天,-20℃分装保存。

[0021] 2、吡利霉素包被抗原PIR-OVA的制备:取6mg PIR溶于DMF中,取10mg CDI溶于DMF中,将两溶液混合于37℃活化50min。取15mg OVA溶于3 mL、0.01 M、pH 9.6的CBS溶液中,将活化液滴加入蛋白液中,反应过夜,4℃透析三天,-20℃分装保存。

[0022] 3、动物免疫:选择健康的6~8周龄的BALB/c小鼠进行免疫。取吡利霉素完全抗原(1mg/mL)与等量QuickAntibody免疫佐剂TM混合均匀后,通过腿部肌肉注射免疫BALB/c小鼠,每只50μL,间隔时间为21天。在第四次加强免疫后的第10天,对小鼠进行尾部静脉取血,用间接ELISA法测定效价,其中,包被PIR-OVA的浓度为1μg/mL。选择抑制最好的小鼠进行一次冲击免疫,进行腹腔注射,3天后取脾细胞进行细胞融合。

[0023] 4、细胞融合:在冲击免疫三天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量为4000)方法进

行细胞融合,具体步骤如下:

[0024] (1)无菌取小鼠脾脏,研磨并通过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,并进行细胞计数;

[0025] (2)收集SP2/0细胞,悬浮于RPMI-1640基础培养液中,进行细胞计数;

[0026] (3)将脾细胞和SP2/0细胞按照数量比1:10混合,离心后用50% PEG融合,时间1 min,之后按照从慢到快,加入RPMI-1640基础培养液,离心后悬浮于含20% 胎牛血清、2%的50×HAT的RPMI-1640筛选培养液中,加到96孔细胞培养板,置于37 °C、5%CO₂的培养箱中培养。

[0027] 5、细胞筛选与细胞株建立:在细胞融合的第三天对融合细胞进行RPMI-1640筛选培养液半换液,第6天进行用含20% 胎牛血清、1%的100×HT的RPMI-1640过渡培养液进行全换液,在第9天取细胞上清进行筛选。

[0028] 筛选分两步:第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔,第二步选用PIR为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。采用有限稀释法进行亚克隆,用同样的方法进行检测。重复三次,获得单克隆细胞株B号。

[0029] 实施例2 单克隆抗体的制备与鉴定

[0030] 1、获取抗体腹水和纯化:选取10周龄 BALB/c小鼠,接种细胞前 7~14 天,预先腹腔注射液体石蜡 1mL/只。用生理盐水调整单克隆细胞株B号浓度至 2.0×10^6 个 / mL,腹腔接种单克隆细胞株B号,将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化,获得的单抗置于-20°C保存。

[0031] 2、抗体亚型鉴定:

[0032] 采用单克隆抗体亚型检测试剂盒(Southern Biotech Cat No. 530005)对步骤 1获得的抗体进行免疫球蛋白亚型的鉴定,具体方法为:用 PIR-OVA 以 1μg/mL 包被在 96孔酶联板(每孔 0.1mL),4°C过夜,弃包被液,洗涤 3 次,按 0.2mL/ 孔的量加入封闭液(含 1%BSA 的PBS),37°C孵育 1 h后,弃封闭液,洗涤 3 次,用 PBS 以 1:4000 比例稀释吡利霉素单克隆抗体,按 0.1mL/ 孔的量加入到酶联板内,37°C孵育 1 h后洗涤 3 次,加入用 PBS 以 1:5000稀释的辣根过氧化物酶标记的各类抗体(小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA 及 IgM)37°C孵育半小时后洗涤 3 次,按 0.1mL/孔的量加入辣根过氧化物酶底物反应液(1mg/mL TMB),37°C反应 10 min,出现蓝色即为阳性结果,最后按 0.05mL/孔的量加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。

[0033] 结果表明单克隆细胞株B号 分泌的抗体为IgG1 亚类。

[0034] SDS-PAGE检测纯化后抗体纯度如图1所示。

[0035] 实施例3 用单克隆细胞株B号分泌的抗体建立间接竞争ELISA方法的应用

[0036] 将单克隆细胞株B号通过体内腹水制备的单克隆抗体应用于吡利霉素ELISA添加回收试验,具体步骤如下:

[0037] (1)用碳酸盐缓冲液(CBS)稀释好的1μg/mL PIR-OVA作为包被原包被96孔酶标板,每孔100μL,37°C包被2 h后,用PBST洗液洗板三次,每次每孔250μL,每次3 min,拍干;

[0038] (2)用含0.01%明胶的CBS进行封闭,每孔200μL,37°C封闭2 h,用PBST洗液洗板三次,每次每孔250μL,每次3 min,拍干;

[0039] (3)用含30%甲醇的磷酸盐缓冲液(PBS)分别配置0,0.625,1.25,2.5,5,10,20,40μg/L的吡利霉素标准溶液。将标准溶液以及待检测样品提取液,分别加入到已经封闭好的酶

标板中,每孔50 μ L,每个样品重复3个孔,再每孔加入50 μ L 1:4000稀释的抗吡利霉素单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 反应半小时后,洗板拍干;

[0040] (4)每孔加入100 μ L 用含0.01% 明胶的PBS 1:3000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG二抗,37 $^{\circ}$ C反应半小时后,洗板拍干;

[0041] (5)每孔加入100 μ L TMB显色液,37 $^{\circ}$ C显色15 min后,每孔加入50 μ L 2M H₂SO₄终止液,450 nm测吸光值;

[0042] (6)添加回收及样品前处理:称取0.5 g奶粉样品置入15mL聚四氟乙烯离心管中,分别添加 150ng、300 ng及600 ng PIR。加提取液(1000mL 0.2M磷酸氢二钠和625mL 0.1M柠檬酸混合)10mL,振荡5min,5000r/min 离心10min,取上清3mL加NaOH 330 μ L调pH至7左右后待测。用样品稀释液(0.01M PBS)稀释3倍后,作为ELISA样品提取液,采用间接竞争ELISA进行添加回收试验,其回收率分别为90%,82%,71%。

[0043] 溶液的配制:

[0044] 碳酸盐缓冲液(CBS):称取Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃ 2.93g,分别溶于少量双蒸水后混合,加双蒸水至约800mL混匀,调pH值至9.6,加双蒸水定容至1000mL,4 $^{\circ}$ C贮存备用;

[0045] 磷酸盐缓冲液(PBS):8.00 g NaCl,0.2 g KCl,0.2 g KH₂PO₄,2.9 g Na₂HPO₄ • 12 H₂O,溶于800 mL纯水中,用NaOH或HCl调pH到7.2~7.4,定容至1000 mL;

[0046] PBST:含0.05% 吐温- 20的PBS;

[0047] TMB显色液:A液:Na₂HPO₄ • 12H₂O 18.43g,柠檬酸 9.33g,纯水定容至1000 mL;B液:60 mg TMB 溶于100 mL乙二醇中。A、B液按1:5混合即为TMB显色液,现用现混。

[0048] 综上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并非用来限定本发明的实施范围。即凡依本发明申请专利范围的内容所作的等效变化与修饰,都应为本发明的技术范畴。

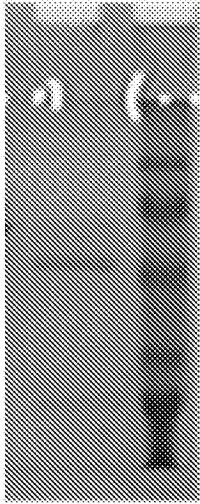


图1

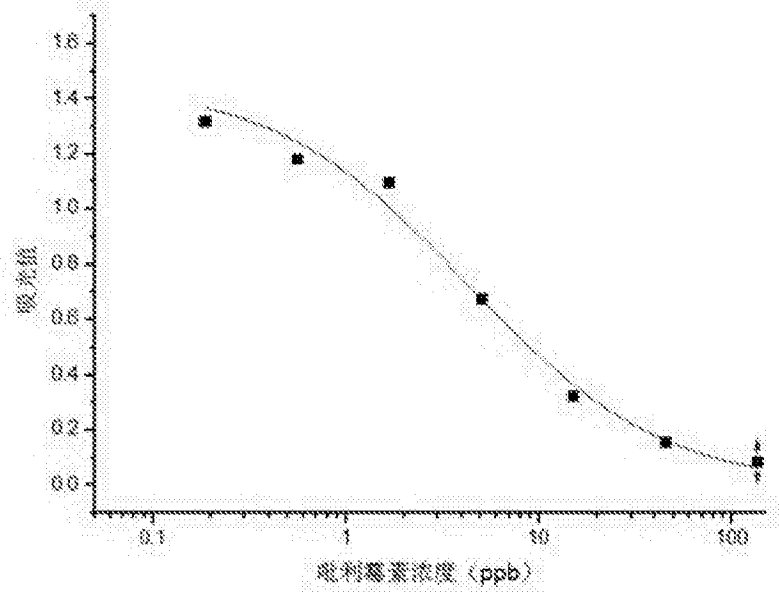


图2