



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104004717 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201410214953. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 05. 21

C12N 5/20(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C07K 16/14(2006. 01)

CGMCC No. 7210 2013. 01. 23

G01N 33/577(2006. 01)

C12R 1/91(2006. 01)

(71) 申请人 无锡杰圣杰康生物科技有限公司

地址 214122 江苏省无锡市锦溪路 99 号

申请人 江南大学

(72) 发明人 匡华 胥传来 张勋 徐丽广

马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲

(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

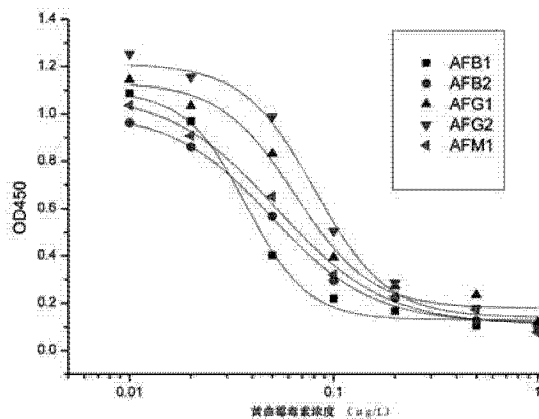
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一株抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用

(57) 摘要

一株抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用,属于食品安全免疫检测领域。本发明所述细胞株 1G6,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 CGMCCNo. 7210。黄曲霉毒素完全抗原与等量 QuickAntibody 免疫佐剂™混合均匀后,通过腿部肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠。第一次免疫用 B1-KLH,第二次免疫用 M1-KLH,最后一次用 M1 完全抗原(不含佐剂)冲击免疫。将免疫小鼠的脾细胞通过 PEG 方法与小鼠骨髓瘤细胞融合,经过间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 筛选和三次亚克隆,得到该株杂交瘤细胞株 1G6。此细胞株分泌的单克隆抗体,对黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 和 M1 具有较好的亲和力和检测灵敏度,可用于食品安全中黄曲霉毒素总量免疫检测。



1. 一株抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体杂交瘤细胞株 1G6, 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. 7210。
2. 权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株 1G6 分泌的抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体, 其特征在于: 它由所述的杂交瘤细胞株 1G6 所分泌产生。
3. 权利要求 2 所述的抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体的应用, 其特征在于在黄曲霉毒素分析检测中的应用, 对黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 和 M1 具有较好的亲和力和检测灵敏度, 用于食品安全中黄曲霉毒素总量免疫检测。

一株抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用

技术领域

[0001] 本发明一株抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用,涉及杂交瘤细胞株 1G6 及其产生的抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体,属于食品安全免疫检测领域。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素 (Atoxins, AFT) 由常见的黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*A. parasiticus*) 侵染农产品、食品、饲料等产生的一类结构相似的有毒的次生代谢产物。目前已经分离出来的黄曲霉毒素有 B1、B2、G1、G2、M1、M2、B2a、G2a 等多种,其中以 B1、B2、G1、G2 和 M1 危害最大。

[0003] 黄曲霉毒素对人及动物肝脏组织有很强的破坏作用,可导致肝癌,还具有致畸、致基因突变等危害,对人类和动物健康有极大的危害,世界卫生组织已经将其列为 A 类致癌物,因此世界各国均对食品和饲料中的黄曲霉毒素有很严格的限量。

[0004] 目前检测 AFT 的方法主要有仪器方法和免疫检测方法。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。在目前黄曲霉毒素通用型免疫检测方法中,其中的关键原料单克隆抗体对常见的 5 种黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2 和 M1) 的灵敏与交叉相差很大,难以得到准确客观的结果。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种对常见的 5 种黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2 和 M1) 均具有较好亲和力和检测灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株及其分泌产生的单克隆抗体,及该单抗在食品安全快速检测中的应用。

[0006] 本发明所提供一种抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体杂交瘤细胞株,由该细胞株制备的抗体对黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 和 M1 具有较好的亲和力和检测灵敏度,可以用来建立黄曲霉毒素总量的免疫学检测方法,或黄曲霉毒素通用免疫亲和柱的制备。

[0007] 本发明的技术方案:一株抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体杂交瘤细胞株 1G6,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. 7210。

[0008] 抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体,它由所述的杂交瘤细胞株 1G6 所分泌产生。

[0009] 所述的抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体在黄曲霉毒素分析检测中的应用,对黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 和 M1 具有较好的亲和力和检测灵敏度,用于食品安全中黄曲霉毒素总量免疫检测。

[0010] 本发明提供的 1G6 细胞株的制备步骤为:

(1) 免疫原的制备与鉴定:黄曲霉毒素 (B1 与 M1) 与羧甲基羟胺胍化反应后,通过活化酯法与蛋白载体相连,通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原,并通过紫外吸收扫描方法鉴定;

(2)小鼠的免疫:将抗原与 QuickAntibody 免疫佐剂™ 混合均匀后,通过腿部肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠。免疫过程总共三次:第一次用 B1 完全抗原免疫,第二次用 M1 完全抗原免疫,最后一次用 M1 完全抗原(不含佐剂)冲击免疫;通过间接 ELISA 检测血清效价和抑制;

(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 选择性培养基培养,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 1G6;

(4)杂交瘤细胞株性质的鉴定:抗体亚型的鉴定采用小鼠单克隆抗体免疫胶体金亚型试剂盒方法,IC₅₀ 值、交叉反应率和亲和力的测定通过 ELISA 法。

[0011] 本发明的有益效果:(1)本发明获得的抗黄曲霉单克隆抗体细胞株,不仅对黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 有较好的检测灵敏度和亲和力,对 M1 同样有较好的灵敏度(IC₅₀ 值分别为为 0.037,0.050,0.065,0.081,0.053 μg/L;亲和力亲和常数分别为为 8.04×10⁹ L/mol、4.34×10⁹ L/mol、3.78×10⁹ L/mol、2.68×10⁹ L/mol、3.94×10⁹ L/mol);(2)一种新的制备通用型抗体的思路,在于用两种或更多结构相似的半抗原的完全抗原,连续间隔免疫,使动物体产生的抗体在亲和力成熟过程中,能够进化出和多种结构类似物的共有结构特异性结合,得到很好的通用型单克隆抗体细胞株。

[0012] 生物材料样品保藏:一株抗黄曲霉毒素通用型单克隆抗体细胞株 10 号(1G6),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,简称 CGMCC,地址: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,登记编号为 CGMCC No. 7210,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期为 2013 年 1 月 23 日。

附图说明

[0013] 图 1. 1G6 单克隆抗体的亚型鉴定

图 2. 1G6 单克隆抗体对 AFB1、B2、G1、G2 和 M1 的标准曲线。

具体实施方式

[0014] 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。

[0015] 本发明通过将 B1 和 M1 完全抗原免疫小鼠,通过细胞融合,HAT 选择性培养基培养,通过间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 筛选细胞上清,最终得到了对 B1、B2、G1、G2 和 M1 均有较好亲和力和灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0016] 实施例 1:杂交瘤细胞株 1G6 的制备

1、完全抗原的合成

取 1 mg AFB1(或 AFM1)溶于 2 mL 甲醇-水-吡啶(4:1:1,V/V/V)混合液中,加入 4 mg 羧甲基羟胺盐酸盐,85℃回流 3 h,室温放置反应 16~24 h。旋转蒸发,除去有机溶剂,加入 1 mL DMF,使其溶解,再加入 0.45 mg EDC 和 0.3 mg NHS,避光混匀,室温搅拌反应 4 h;另取 5 mg KLH 溶解于 1 mL、0.1 M、pH 8.0 的 PBS 溶液中;将上述活化后的黄曲霉毒素溶液慢速逐滴加入 KLH 溶液中,室温搅拌反应过夜后,4℃透析三天,-20℃分装保存。

[0017] 2、动物免疫

选择健康的 6 ~ 8 周龄的 BALB/c 小鼠进行免疫。取黄曲毒素完全抗原 (1 mg/mL) 与等量 QuickAntibody 免疫佐剂™ 混合均匀后, 通过腿部肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠, 每只 50 μ L。第一次免疫用 B1-KLH 免疫; 第二次免疫用 M1-KLH 免疫, 免疫间隔为 21 天; 二免后 10 天采血, 使用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 方法测定小鼠血清效价和抑制, 选择抑制最好的小鼠, 在二免后 15 天冲击免疫 (第三次免疫), 不使用佐剂, 腹腔注射。

[0018] 3、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: (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; (2) 收集 SP2/0 细胞, 悬浮于 RPMI-1640 基础培养液中, 进行细胞计数; (3) 将脾细胞和 SP2/0 细胞按照 1 : 10 的比例混合, 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 \times HAT 的 RPMI-1640 筛选培养液中, 加到 96 孔细胞培养板, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的培养箱中培养。

[0019] 4、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 \times 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。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 B1、B2、G1、G2 和 M1 为标准品, 用间接竞争 ELISA 对阳性细胞进行抑制效果测定。选择对 5 种标准品均有较好抑制的细胞孔, 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, 获得细胞株 1G6。

[0020] 5、单克隆抗体的制备与鉴定

取 8-10 周龄 BALB/c 小鼠, 每只小鼠腹腔注射石蜡油 1 mL; 7 天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 杂交瘤细胞 1G6, 从第七天开始收集腹水, 将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化, 获得的单抗置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0021] 使用小鼠单抗亚型鉴定试剂盒对腹水纯化获得的单克隆抗体进行免疫球蛋白亚型鉴定, 其亚型为 IgG1 型, 轻链类型为 κ 型。

[0022] 使用间接竞争 ELISA 和间接 ELISA, 测定单克隆抗体对 B1、B2、G1、G2 和 M1 的 IC₅₀ 分别为: 0.037, 0.050, 0.065, 0.081, 0.053 μ g/L (OTA、ZEN 和 FB 的 IC₅₀ 均大于 100 μ g/L), 亲和常数分别为 8.04×10^9 L/mol、 4.34×10^9 L/mol、 3.78×10^9 L/mol、 2.68×10^9 L/mol、 3.94×10^9 L/mol, 说明对 5 种黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2 和 M1) 均有很好的灵敏度和亲和力, 可用于黄曲霉毒素总量免疫分析检测和亲和柱的制备。

[0023] 6、抗体应用

将杂交瘤细胞株 1G6 通过体内腹水制备的单克隆抗体应用于黄曲霉毒素的 ELISA 添加回收试验, 具体步骤如下:

(1) 用碳酸盐缓冲液 (CBS) 稀释好的 1.5 μ g/mL AFB1-BSA 作为包被原包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 包被 2 h 后, 用 PBST 洗液洗板三次, 每次每孔 250 μ L, 每次 3 min, 拍干。

[0024] (2) 用含 0.01% 明胶的 CBS 进行封闭, 每孔 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 用 PBST 洗液洗板三次, 每次每孔 250 μ L, 每次 3 min, 拍干。

[0025] (3) 用含 30% 甲醇的磷酸盐缓冲液 (PBS) 分别配置 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2,

0.5, 1 μ g/L 的黄曲霉毒素 B1 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 : 16000 稀释的抗黄曲霉毒素单克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 反应半小时后, 洗板拍干。

[0026] (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。

[0027] (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。

[0028] (6) 添加回收及样品前处理: 称取 5 g 粉碎的花生样品置入 100mL 三角瓶中, 分别添加 1 ng、5 ng 及 10 ng AFB1。向样品中加入 25 mL 80% 甲醇 PBS 溶液 (w/v) 震荡均匀后, 超声提取 15 min, 净置后上清用 0.45 μ m 滤膜过滤, 滤液用含 0.01% 明胶的 PBS 稀释 4 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 72%, 85%, 93%。

[0029] 表 1. 1G6 单克隆抗体对 AFB1、B2、G1、G2 和 M1 的 IC₅₀ 和交叉反应率

	IC ₅₀	交叉反应率
AFB1	0.037	100.00%
AFB2	0.05	71.03%
AFG1	0.065	56.92%
AFG2	0.081	45.68%
AFM1	0.053	69.81%

溶液的配制:

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;

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;

PBST: 含 0.05% 吐温 20 的 PBS;

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。

[0030] 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。

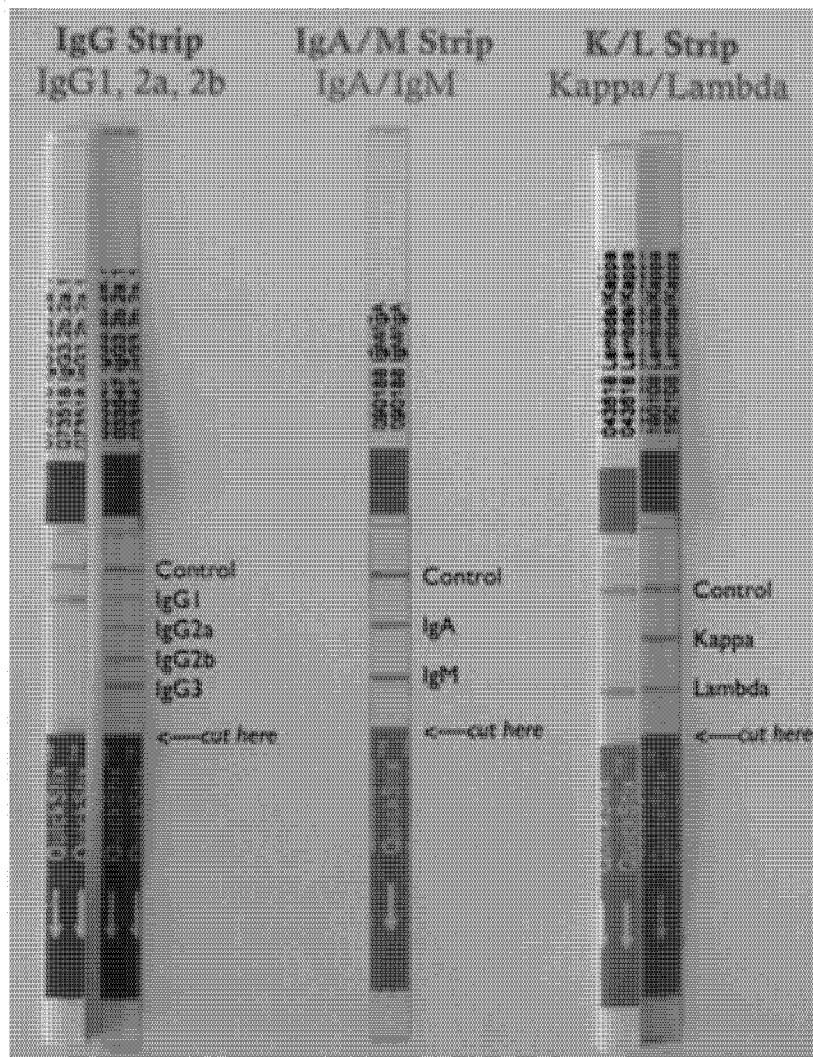


图 1

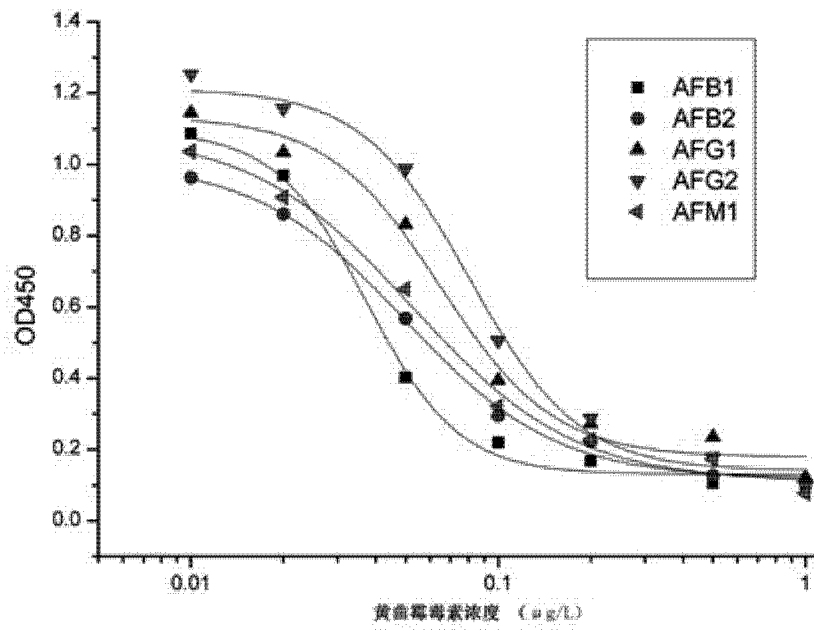


图 2