

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/531

G01N 33/532

G01N 33/53

C07K 16/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510038434.1

[43] 公开日 2005 年 10 月 5 日

[11] 公开号 CN 1677107A

[22] 申请日 2005. 3. 14

[21] 申请号 200510038434.1

[71] 申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市玄武区孝陵卫钟
灵街 50 号

[72] 发明人 刘铁铮 王 冉 魏瑞成 张岳梅

[74] 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司

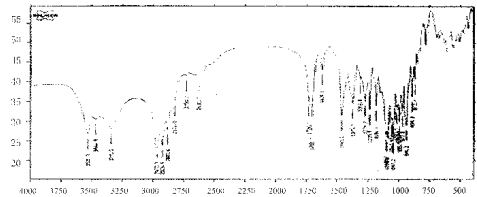
代理人 孙忠浩

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 3 页

[54] 发明名称 一种用于检测聚醚类抗生素残留的
免疫抗体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体及其应用, 免疫抗体是以莫能菌素钠盐为半抗原, 首先对半抗原进行改造, 改造后的半抗原再与蛋白质偶联制备成人工免疫原, 并通过免疫新西兰大白兔制备成多克隆抗体或通过小鼠免疫、细胞融合、筛选及克隆化培养等过程制备单克隆抗体。 并将获得的单克隆抗体或多克隆抗体用于对动物源性食品样品进行聚醚类抗生素残留检测。 本发明的优点在于: 以改造后的莫能菌素钠盐与蛋白质进行偶联后免疫动物, 所制备的抗体对聚醚类抗生素药物具有特异性, 可用于动物源性食品中聚醚类抗生素残留的筛选检测, 利用本发明涉及的免疫抗体进行聚醚类抗生素免疫检测, 具有快速、简便的特点。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体，其特征在于，以莫能菌素钠盐为半抗原，首先对半抗原进行改造，改造后的半抗原再与蛋白质偶联制备成免疫原，并通过免疫新西兰大白兔制备成多克隆抗体或通过小鼠免疫、细胞融合、筛选及克隆化培养制备成单克隆抗体。

2、根据权利要求1所述的一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体，其特征在于：所述的对半抗原进行改造是通过盐酸浸泡法或阳离子交换法进行改造，获得莫能菌素酸。

3、根据权利要求1所述的一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体，其特征在于：所述的对半抗原进行改造是通过丁二酸酐衍生法进行改造，获得莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物。

4、根据权利要求1或2所述的一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体，其特征在于：所述的与蛋白质偶联制备成人工免疫原是采用水溶性碳二亚胺法实现的，具体步骤是：先称取浓度为0.25mmol的莫能菌素酸160mg±10mg溶于2mL50% (v/v) 吡啶与水的混合物中；再称取碳化二亚胺160mg±10mg溶于2mL水中，缓慢加入到莫能菌素酸溶液中，边加边搅拌2h，称取浓度为0.005mmol的牛血清蛋白340mg±10mg或225mg±10mg的卵清蛋白溶于8mL水中，将此溶液缓慢滴加至上述混合液中，并保持pH为6.0±0.5，滴加结束后将混合液于室温暗处放置24h；将反应完成的溶液置于透析袋内透析4天，透析液为PBS液，透析后真空冷冻干燥保存，制备成免疫原，其中采用牛血清蛋白制备的免疫原为人工免疫原，采用卵清蛋白制备的免疫原为包被抗原。

5、根据权利要求1或2或3所述的一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体，其特征在于：所述的与蛋白质偶联制备成人工免疫原是采用氯甲酸异丁酯法实现的，具体步骤是：先称取浓度为0.16mmol的莫能菌

素酸 $104\text{mg} \pm 10\text{ mg}$ ，溶于 20mL 无水二甲基甲酰胺中，冷却至 4°C ，加入等摩尔三正丁胺 66ul 和氯甲酸异丁酯 52ul ，于 4°C 放置 30min ；称取浓度为 0.005mmol 的牛血清蛋白 $272\text{mg} \pm 10\text{ mg}$ 或 180mg 卵清蛋白溶于 100mL 无水二甲基甲酰胺与蒸馏水比例为 $1:1$ 的混合液中；混合液的 $\text{pH}=8.5$ ，将此溶液缓慢滴加至莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物中，磁力搅拌器搅拌 4h ， 4°C 过夜，透析 5 天，分装真空干燥冷冻保存，制备成免疫原，其中采用牛血清蛋白制备的免疫原为人工免疫原，采用卵清蛋白制备的免疫原为包被抗原；

或者称取浓度为 0.25mmol 的莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物 $192.5\text{mg} \pm 10\text{ mg}$ 溶于 2.5mL 二氧六环中， 10°C 持续搅拌，加入等摩尔的三丁胺 47ul 和氯甲酸异丁酯 35ul ， 10°C 持续搅拌 50min ，形成混合酸酐液；称取浓度为 0.005mmol 的牛血清蛋白 $340\text{mg} \pm 10\text{ mg}$ 或 $225\text{mg} \pm 10\text{ mg}$ 的卵清蛋白溶于 $22\text{mL} 0.1\text{M}$ 碳酸盐缓冲液中，缓慢加入 22mL 二氧六环，保持在 4°C ，将混合酸酐液缓慢滴加入持续搅拌的蛋白质溶液中，反应 5h ， 4°C 透析 4 次，真空冷冻干燥保存，制备成免疫原，其中采用牛血清蛋白制备的免疫原为人工免疫原，采用卵清蛋白制备的免疫原为包被抗原。

6、根据权利要求 1 所述免疫抗体在检测中的应用，其特征在于，其特征在于，获得的单克隆抗体或多克隆抗体用于对动物源性食品的样品进行聚醚类抗生素残留的检测，样品为固体质或液体质。

7、根据权利要求 6 所述免疫抗体在检测中的应用，其特征在于：所述的聚醚类抗生素残留是指：莫能菌素或拉沙洛菌素或尼日利亚菌素或马杜拉酶素残留。

8、根据权利要求 6 或 7 所述免疫抗体在检测中的应用，其特征在于：获得的单克隆抗体或多克隆抗体用于常规的间接竞争性 ELISA 检测，或通过金、酶、荧光标记抗体后用于直接 ELISA 检测。

一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体及其应用

技术领域:

本发明涉及一种聚醚类抗生素免疫检测的免疫抗体及其应用,属于酶联免疫分析技术领域。

背景技术:

聚醚类抗生素由于其特殊的物理化学特性及其作用机理,此类药物在生产中应用比较广泛。目前,已普遍应用于家禽、家兔等的抗球虫,成为世界上使用最早销量最大的抗球虫药物;除此以外,还作为饲料添加剂应用到养牛业和养猪业,提高牛和猪的生产性能,促进个体生长。但此类药物的不合理使用将会导致畜禽体内组织及畜产品如肉、蛋、奶中的药物残留,对人类健康造成威胁,有研究表明:莫能菌素能导致和加重心血管疾病或造成心血管功能紊乱。聚醚类抗生素对不同动物体的毒性作用不同,主要对动物的生长及繁殖性能产生明显危害,对人类主要导致肌肉和心脏病变。随着近年来人们对食品中抗生素残留关注程度越来越高,聚醚类抗生素使用带来的残留问题日益引起人们的重视。

但就目前的形势而言,我国畜禽产品的人均占有量远远低于世界发达国家,全面禁止这类药物的使用是不现实的,为了达到高产、高效的目标,兽药在畜禽养殖中的作用在短期内是无法取代的。鉴于此,为保障人民的身体健康,有效控制生产中兽药的合理使用和对其残留量进行监控,开发一种快速、可靠、灵敏,适于兽药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。目前莫能菌素残留分析方法主要是通过提取、净化后,再配以柱后衍生和高效液相色谱或液质联用,这种检测方法费用昂贵、样品前处理过程复杂、对仪器设备要求较高、而且需要消耗大量的有机溶剂,从而造成对环境的二次污染。

免疫分析是一种快速、灵敏、操作简单、费用低的一种检测方法。聚醚类抗生素是一类具有通用结构的小分子化合物,需要通过与大分子蛋白类物质偶联后用于免疫动物,刺激动物免疫系统来产生针对聚醚类抗生素通用结构的抗体。由于聚醚类抗生素本身不具备直接同蛋白类大分子物质

偶联的位点，因此，需要对其进行改造。

发明内容：

本发明的目的在于：针对聚醚类抗生素残留免疫检测中抗体对特定物质的特异性较强，建立一种适用于检测一类聚醚类抗生素残留的免疫分析方法，提供一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体及其应用。

本发明的目的是这样实现的：一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体，其特征在于，以莫能菌素钠盐为半抗原，首先对半抗原进行改造，改造后的半抗原再与蛋白质偶联制备成免疫原，并通过免疫新西兰大白兔制备成多克隆抗体或通过小鼠免疫、细胞融合、筛选及克隆化培养制备成单克隆抗体。

所述的对半抗原进行改造可以通过盐酸浸泡法或阳离子交换法进行改造，获得莫能菌素酸。

所述的对半抗原进行改造也可以通过丁二酸酐衍生法进行改造，获得莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物。

所述的与蛋白质偶联制备成免疫原是采用水溶性碳二亚胺法实现的，具体步骤是：先称取浓度为 0.25mmol 的莫能菌素酸 160mg±10 mg 溶于 2mL50% (v/v) 吡啶与水的混合物中；再称取碳化二亚胺 160mg±10 mg 溶于 2mL 水中，缓慢加入到莫能菌素酸溶液中，边加边搅拌 2h，称取浓度为 0.005mmol 的牛血清蛋白 340mg±10 mg 或 225mg±10 mg 的卵清蛋白溶于 8mL 水中，将此溶液缓慢滴加至上述混合液中，并保持 pH 为 6.0±0.5 左右，滴加结束后将混合液于室温暗处放置 24h；将反应完成的溶液置于透析袋内透析 4 天，透析液为 PBS 液，透析后真空冷冻干燥保存，制备成免疫原，其中采用牛血清蛋白制备的免疫原为免疫原，采用卵清蛋白制备的免疫原为包被抗原。

所述的与蛋白质偶联制备成免疫原是采用氯甲酸异丁酯法实现的，具体步骤是：先称取浓度为 0.16mmol 的莫能菌素酸 104mg±10 mg，溶于 20mL 无水二甲基甲酰胺中，冷却至 4℃，加入等摩尔三正丁胺 66ul 和氯甲酸异丁酯 52ul，于 4℃放置 30min；称取浓度为 0.005mmol 的牛血清蛋白 272mg±10 mg 或 180mg 卵清蛋白溶于 100mL 无水二甲基甲酰胺与蒸馏水比例为

1: 1 的混合液中；混合液的 pH=8.5，将此溶液缓慢滴加至莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物中，磁力搅拌器搅拌 4h，4℃过夜，透析 5 天，分装真空干燥冷冻保存，制备成免疫原；或者称取浓度为 0.25mmol 的莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物 192.5mg±10 mg 溶于 2.5mL 二氧六环中，10℃持续搅拌，加入等摩尔的三丁胺 47ul 和氯甲酸异丁酯 35ul，10℃持续搅拌 50min，形成混合酸酐液；称取浓度为 0.005mmol 的牛血清蛋白 340mg±10 mg 或 225mg±10 mg 的卵清蛋白溶于 22mL 0.1M 碳酸盐缓冲液中，缓慢加入 22mL 二氧六环，保持在 4℃，将混合酸酐液缓慢滴加入持续搅拌的蛋白质溶液中，反应 5h，4℃透析 4 次，真空冷冻干燥保存，制备成免疫原，其中采用牛血清蛋白制备的免疫原为人工免疫原，采用卵清蛋白制备的免疫原为包被抗原。

本发明涉及的一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体在检测中的应用，其特征在于，获得的单克隆抗体或多克隆抗体用于对动物源性食品样品进行聚醚类抗生素残留的检测，样品为固体质或液体质。

被测对象中的聚醚类抗生素残留是指：莫能菌素或拉沙洛菌素或尼日利亚菌素或马杜拉酶素残留。

本发明获得的单克隆抗体或多克隆抗体可用于常规的间接竞争性 ELISA 检测，或通过金、酶、荧光标记抗体后用于直接 ELISA 检测。

本发明的优点在于：以改造后的莫能菌素钠盐与蛋白质进行偶联后免疫动物，所制备的抗体对聚醚类抗生素药物有特异性，可用于动物源性食品如肉、蛋、奶中聚醚类抗生素残留的筛选检测，利用本发明涉及的免疫抗体对动物源性食品进行聚醚类抗生素免疫检测，具有快速、简便的特点。

附图说明

图 1 是莫能菌素钠盐的红外光谱图；

图 2 是采用盐酸浸泡法改造的莫能菌素半抗原的红外光谱图；

图 3 是采用阳离子交换法改造的莫能菌素半抗原的红外光谱图。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

实施例一、半抗原改造

采用盐酸浸泡法对半抗原进行改造是这样实现的：称取 500mg 的莫能菌素钠盐，溶于 1mL 双蒸水中，加入 5mL 浓度为 6 摩尔的盐酸 (HCl)，浸泡 45~50min，充分接触后，用乙醚萃取，将萃取液于真空干燥箱中除去乙醚，析出晶体。制备成莫能菌素酸。析出晶体采用薄层层析及红外光谱鉴定，图 2 是采用盐酸浸泡法改造的莫能菌素半抗原的红外光谱图。

采用阳离子交换法对半抗原进行改造是这样实现的：称取 16.308g 阳离子交换树脂用蒸馏水搅拌洗涤 3 次后加入层析柱中，调节流速为 1.5mL/min；加入 200mL 浓度为 2 摩尔的盐酸处理层析柱，再加入 80mL 浓度为 2mol 的氢氧化钠抽吸，最后加入双蒸水 200mL 再抽吸；重复此操作一次；完成后加入浓度为 4 摩尔盐酸浸泡 1h（缓慢流出使其与交换树脂充分接触）；用双蒸水冲洗直至流出液体为中性 (PH=7.0)，关闭旋塞待用；称量 4.5g 莫能菌素钠盐溶于 30mL 二氯甲烷中；将此溶液过交换柱；在洗脱过程中可补加溶剂二氯甲烷；按每管 3mL 量接收洗脱液；分别取 2 μ l 洗脱液进行薄层层析检测（展开剂为 9:1 的二氯甲烷与甲醇），混合 R_f （斑点相对迁移率）相同的收集管并置于真空干燥箱中 40 $^{\circ}$ C 干燥析出白色晶体物质，制备成莫能菌素酸。析出晶体采用薄层层析及红外光谱鉴定，图 3 是采用盐酸浸泡法改造的莫能菌素半抗原的红外光谱图。

图 1 是莫能菌素钠盐的红外光谱图，图 2 是利用盐酸浸泡法改造的莫能菌素半抗原的红外光谱图，图 3 是利用阳离子交换法改造的莫能菌素半抗原的红外光谱图。与莫能菌素钠盐的红外图谱相比较，采用 5mL 的浓度为 6 摩尔的盐酸 (HCl) 浸泡 50min 与阳离子交换法制备的晶体具相同的红外光谱图谱：在波长 1709.7 cm^{-1} 与 3531.3 cm^{-1} 具有强的羰基及羧基吸收峰，在 2882.6~2972.9 cm^{-1} 及 800~1500 cm^{-1} 有明显的杂环特征吸收峰与原粉钠盐相符，但波长 1564.8 cm^{-1} 处未见钠盐强吸收峰，可说明钠盐已经被置换成为羧酸。

采用丁二酸酐衍生法对半抗原进行改造是这样实现的：称量 500mg 莫能菌素钠盐，将其溶于 5mL 吡啶中，边搅拌边加入 721.5mg 琥珀酸酐并置于 25 $^{\circ}$ C 真空干燥箱中反应 2 天，反应进程通过薄层层析进行监测；加入

几滴水终止反应；抽真空除去吡啶，析出透明或白色晶体；将析出物溶于20mL 二氯甲烷中；用0.02当量的HCl洗涤上述溶液4次（5mL/次），双蒸水洗涤3次（3mL/次）；无水Na₂SO₄干燥一天，过滤；滤液经真空干燥箱中40℃干燥析出晶体；通过薄层层析进行鉴定及检测纯度；以硅胶（200-300目）作吸附剂，二氯甲烷-甲醇作洗脱剂进行梯度洗脱分离提纯（重复3次），干燥后析出晶体，晶体通过薄层层析鉴定通过该方法制备成莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物。

实施例二、氯甲酸异丁酯法制备人工免疫原或包被抗原

1、人工免疫原或包被抗原可以这样制备：称取192.5mg（0.25mmol）莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物溶于2.5mL 二氧六环中，10℃持续搅拌；加入等摩尔的三丁胺47μl和氯甲酸异丁酯35μl，10℃持续搅拌50min，形成混合酸酐液；称取340mg（0.005mmol）牛血清蛋白（BSA）溶于22mL 0.1摩尔的碳酸盐缓冲液中，缓慢加入22mL 二氧六环，保持在4℃；将混合酸酐液缓慢滴加入持续搅拌的蛋白质溶液中，反应5h；4℃透析4次，分装真空干燥冷冻保存，制备成人工免疫原。

称取225mg 卵清蛋白（OVA）替换前面所述的牛血清蛋白（BSA），将卵清蛋白（OVA）溶于22mL 0.1摩尔的碳酸盐缓冲液中，缓慢加入22mL 二氧六环，保持在4℃；将混合酸酐液缓慢滴加入持续搅拌的蛋白质溶液中，反应5h；4℃透析4次，分装真空干燥冷冻保存，制备成包被抗原。

2、人工免疫原和包被抗原也可以这样制备：称取104mg（0.16mmol）莫能菌素酸，溶于20mL 无水二甲基甲酰胺（DMF）中，冷却至4℃；加入等摩尔三正丁胺66μl和氯甲酸异丁酯52μl，于4℃放置30min；称取272mg（0.005mmol）牛血清蛋白（BSA）溶于100mL 无水二甲基甲酰胺（DMF）与蒸馏水配比为1:1的混合液中，混合液的pH=8.5；将此溶液缓慢滴加至莫能菌素钠-琥珀酸酐衍生物中，磁力搅拌器搅拌4h，4℃过夜，透析5天，分装真空干燥冷冻保存，制备成人工免疫原。

称取180mg 卵清蛋白（OVA）替换前面所述的牛血清蛋白（BSA），将卵清蛋白（OVA）溶于100mL 无水二甲基甲酰胺（DMF）与蒸馏水配比为1:1的混合液中，混合液的pH=8.5；将此溶液缓慢滴加至莫能菌素钠-琥珀酸酐

衍生物中，磁力搅拌器搅拌 4h，4℃过夜，透析 5 天，分装真空干燥冷冻保存，制备成包被抗原。

实施例三、水溶性碳二亚胺法制备免疫原和包被抗原

人工免疫原和包被抗原还可以这样制备：称量 160mg (0.25mmol) 莫能菌素酸溶于 2mL50% (v/v) 吡啶与水的混合物中；称量碳化二亚胺 (EDC) 160mg 溶于 2mL 水中，逐滴加入到莫能菌素酸中，边加边搅拌 2h；称取 340mg (0.005mmol) 牛血清蛋白 (BSA) 溶于 8mL 水中，将此溶液缓慢滴加至上述混合液中，并保持 pH 为 6.0 左右，滴加结束后将混合液于室温暗处放置 24h；将反应完成的溶液置于透析袋内透析 4 天，透析液为 PBS 液，透析后真空冷冻干燥保存，制备成人工免疫原。

称取 225mg 卵清蛋白 (OVA) 替换前面所述的牛血清蛋白 (BSA)，将卵清蛋白 (OVA) 溶于 8mL 水中，再将此溶液缓慢滴加至上述混合液中，并保持 pH 为 6.0 左右，滴加结束后将混合液于室温暗处放置 24h；将反应完成的溶液置于透析袋内透析 4 天，透析液为 PBS 液，透析后真空冷冻干燥保存，制备成包被抗原。

实施例四、多克隆抗体制备。

多克隆抗体的制备方法为：以人工合成的免疫原，免疫新西兰大白兔，背部皮下及腿肌多点注射，当效价达最佳时，心脏采血，先用硫酸铵分步沉淀法初步纯化后，再经 Sephadex G-200 进一步纯化得高质量广谱性抗体。

在本实施例中，根据实施例 2 或实施例 3 方法制备的 Mon-HS-BSA 和 Mon-BSA 两种免疫原各免疫 3 只新西兰大白兔，具体免疫方案如表 1。

完成表 1 中免疫程序后，利用方阵滴定法将两种抗血清分别用 Mon-HS-OVA 包被抗原进行检测，确定最佳的抗原-抗体组合及其最佳工作浓度，结果见表 2。并利用建立的抗原抗体最佳工作条件来分析不同种类的聚醚类抗生素对该抗原-抗体结合反应的抑制作用。以莫能菌素为对象，建立回归方程，计算其 I_{10} 、和 I_{50} 。选取包括莫能菌素、拉沙洛菌素、盐霉素、甲基盐霉素、马杜拉霉素和尼日利亚菌素，将药剂抑制率对药剂浓度进行回归分析，得出回归方程，并计算各药剂对抗体反应的 I 值，结

果见表 3。

表 1 制备聚醚类抗生素多克隆抗抗体动物免疫方案

免疫次数	时间间隔	免疫部位	免疫剂量	血清采集
1	1 周（距采集阴性血清）	背部皮下、腿肌	1mg/只，免疫原加等体积弗氏完全佐剂	——
2	3 周	同上	1mg/只，免疫原加等体积弗氏不完全佐剂	——
3	2 周	同上	同上	耳静脉采血测效价
4	2 周	背部皮下、腿肌、耳静脉	同上	耳静脉采血测效价
5	1 周	耳静脉	0.5mg/只，免疫原加等量生理盐水	耳静脉采血测效价
——	3 天	——	——	心脏采血制备抗血清

由表 2 可以看出，用 EDC 法合成的免疫原免疫动物的效果与氯甲酸异丁酯法相比较差。由氯甲酸异丁酯法抗原得到的抗体中，以 0799 号兔子分泌抗体效价最高，为 1:12800，在本文后面的研究中以该抗体为研究对象。利用 0799 号兔子产生的抗体进行方阵滴定，所得结果为抗原、抗体最佳工作浓度均为 1:2000。

表 2 抗体效价测定结果

包被原	氯甲酸异丁酯法制备 Mon-HS-BSA		EDC 法制备 Mon-BSA	
	0799	0791	0569	0515
氯甲酸异丁酯法制备 Mon-HS-OVA	12800	6400	200	400
EDC 法制备 Mon-OVA	800	400	3200	6400

以莫能菌素为研究对象，建立的回归方程为 $I=0.6599+0.2301gC$ ， $r=0.9702$ ， $I_{50}=0.2017 \text{ ug/ml}$ ， $I_{10}=0.003678\text{ug/ml}$ 。多种聚醚类抗生素对抗体的 I_{50} 经计算示于表 3。

表3 不同抗生素对抗体的抑制能力

抗生素种类	I ₅₀ (ug/ml)
莫能菌素	0.20
拉沙洛菌素	0.45
尼日利亚菌素	0.28
马杜拉霉素	2.60
盐霉素	90.00
甲基盐霉素	95.00

从表3可以看出，抗体对抗原先导物莫能菌素有较强的亲和力，I₅₀为0.2017ug/ml。

实施例五、单克隆抗体制备

单克隆抗体的制备方法为：以人工合成的免疫原，免疫BALB/C小鼠，每只小鼠取100ug免疫原，与等体积氟氏完全佐剂混合乳化均匀，背部皮下、腿肌和腹腔膜内多点注射。3周后，加强免疫，剂量不变，佐剂改为氟氏不完全佐剂。加强免疫三次后，采血测效价，待血清效价不再上升时，用两倍剂量的抗原不加佐剂免疫小鼠，三天后取脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞按5~10:1的比例混合于50ml离心管进行融合，融合后的细胞经培养后待孔内的杂交细胞数量达到300个以上时，取细胞培养上清液用于酶联免疫检测，每次检测均为复孔检测，在每次检测后的第二天重复检测，以确证结果。将强阳性孔内的细胞用有限稀释法进行克隆培养，并跟踪记录，经过3次以上的克隆培养和检测，均为阳性的孔内的细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株经过扩大培养后用来制备腹水。提前一周用0.5ml石蜡油注射小鼠腹腔，将10⁶个杂交瘤细胞悬浮在1ml无血清培养基中，注入小鼠腹腔内。10天后，小鼠腹部明显膨大，收集腹水。用正辛酸—硫酸铵沉淀法来纯化单克隆抗体。

在本实施例中，取Balb/C小鼠4只，每只小鼠100ug免疫原，与等体积氟氏完全佐剂混合乳化均匀，背部皮下、腿肌和腹腔膜内多点注射。3个周后，加强免疫，剂量不变，佐剂改为氟氏不完全佐剂。加强免疫5

次后，断尾采血，6只小鼠中有3只血清中抗体滴度达到1:6400，有2只达到1:25600，有1只达到1:51200并不再上升，此时选取效价最高的3号小鼠取脾细胞做融合。

在无菌操作条件下，将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞按5~10:1的比例混合于50ml离心管，加入30ml无血清IPMI1640培养基，1200r/min离心10min弃上清，将细胞团轻轻振松，置于37℃水浴中。把1ml 50% PEG-4000缓缓加入细胞中，在1min内滴完，同时轻轻搅动底部沉淀，静置1min。沿管壁缓慢加入无血清培养液终止融合过程。前30秒缓慢匀速加入1ml，后30秒加入2ml，然后快速加入27ml无血清培养液，1200r/min离心10min，弃上清。用30ml HAT培养基悬浮细胞，将悬浮液移入预先培养有饲养细胞的96孔细胞培养板内，放置在5%CO₂、37℃细胞培养箱内培养。并同时把未加融合剂的骨髓瘤细胞和脾细胞混合培养以作为阴性对照。融合3天后，背景开始变得清晰，非融合细胞破碎死亡，融合的细胞形成小的细胞群落。融合7天后，细胞克隆高度纯化。用ELISA方法初步检测结果显示阳性反应的孔占83%，吸光值大于1的强阳性孔占5.8%。将强阳性孔内的细胞经过4次克隆，得到1株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞为3M3。将杂交瘤细胞经过扩大培养，一部分细胞冻存于液氮罐中，一部分细胞用来制备腹水。

选取6只经产Balb/C小鼠，提前一周用0.5ml石蜡油注射到小鼠腹腔，将大约106个杂交瘤细胞悬浮在1ml无血清IPMI1640培养基中，注入小鼠腹腔内。10天后，待小鼠腹部明显膨大时收集腹水。用正辛酸—硫酸铵沉淀法来纯化腹水。用核酸蛋白紫外扫描仪测定IgG的A_{278nm}/A_{251nm}值，并测定A_{278nm}的值，根据所得数据初步判断是否为IgG球蛋白。

腹水抗体经纯化后，在紫外蛋白分析仪上测得抗体的A_{278nm}/A_{251nm}的值约为2.6。根据哺乳动物IgG的A_{278nm}/A_{251nm}约为2.5-3.0，而其它蛋白质的这个比值为1-1.5的特点，可以初步判定纯化后得到的蛋白

为 IgG 蛋白。

根据方阵滴定的原则，在抗原稀释 2000 倍，浓度为 25ug/ml，抗体稀释约 4000 倍时，吸光值为 1，可以确定抗体最佳工作浓度为 4000 倍。

在本实施例中使用的无血清 IPMI1640 培养基由北京夏斯生物技术有限公司经销。

实施例六、固相间接竞争性 ELISA 检测步骤

1、包被：在 96 微孔板内每孔加入 100ul 包被液(包被抗原用碳酸盐缓冲液溶解)，4℃过夜或 37℃温育 2 小时；

2、封闭：取出 96 微孔板，弃去包被液，用 PBST(含 0.05%Tween-20 的磷酸盐缓冲液，下同)洗涤三次，甩干，并在每孔中加入 200ul 封闭液(1%OVA)，37℃温育 1 小时；

3、加样：取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，将样品去除悬浮杂质后，与等体积抗体混合液混合，按表 4 所示注入 96 微孔板内，每孔 100ul，同时，酶标板 61-66 孔加入 50ul 的抗体和 50ul 的 PBS，H 行各孔加入 100ul 的 PBS，37℃温育 2 小时；

4、加酶标 SPA(葡萄球菌 A 蛋白)：取出酶标板，用 PBST 洗涤，甩干，于每孔中加入 100ul 酶标 SPA 稀释液，37℃温育 45 分钟。

5、加底物液：取出酶标板，PBST 洗涤三次，甩干。加入现配的底物液，37℃温育 15 分钟。

6、终止反应：每孔中加入 50ul 2M 硫酸溶液终止反应。

7、读数，加硫酸后立即用吸水纸吸干酶标板底部，将酶标板置于酶标仪上，在 450nm 波长下，以 H 行作为空白调零，测定各孔的 OD 值。

8、设定对照孔 G1-G6 的 OD 值的平均值为 B_{x0} ，同一样品的重复孔的 OD 值平均值为 B_{yp} (yp 代表不同的样品)。每组数据都以三次重复的平均值为准。各样品测定对应的抑制率为 $I=100\%[(B_{x0}-B_{yp}) / B_{x0}]$ 。

9、结果判断，根据样品 OD 值计算抑制率，若抑制率 > 20%，表明样

品中可能聚醚类抗生素残留，需进一步进行仪器确认。

实施时，所述的抗体可以采用单克隆抗体也可以采用多克隆抗体，所述的样品可以采用固体质或液体质。在本实施例中，所述的抗体为多克隆抗体，所述的样品为液体质。

实施案例七、固相直接检测步骤

1、包被：在 96 微孔板内每孔加入 100ul 包被抗原稀释液，4℃过夜或 37℃温育 2 小时；

2、封闭：取出 96 微孔板，弃去包被液，用 PBST 洗涤三次，甩干，并在每孔中加入 200ul 封闭液，37℃温育 1 小时；

3、加样：取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，将样品用甲醇与水以 5:95 混合液提取，提取液浓缩净化处理后与等体积辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体混合液混合，按表 4 所示注入 96 微孔板内，每孔 100ul，同时，61-66 孔加入 50ul 的酶标记抗体和 50ul 的 PBS，H 行各孔加入 100ul 的 PBS，37℃温育 2 小时。具体实施时，也可以采用金标记抗体或荧光标记抗体替代所述的酶标记抗体。

4、加底物液：取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干。于每孔中加入现配的底物液，37℃温育 15 分钟。

5、终止反应：每孔中加入 50ul 20Mol 硫酸溶液终止反应。

6、读数，加硫酸后立即用吸水纸吸干酶标板底部，将酶标板置于酶标仪上，在 450nm 波长下，以 H 行各孔为空白调零，测定各孔的 OD 值。

7、设定对照孔 61-66 的 OD 值的平均值为 B_{x0} ，同一样品的重复孔的 OD 值平均值为 B_{yp} (yp 代表不同的样品)。每组数据都以三次重复的平均值为准。各样品测定对应的抑制率为 $I=100\%[(B_{x0}-B_{yp})/B_{x0}]$ 。

8、结果判断，根据样品 OD 值计算抑制率，若抑制率 > 20%，表明样品中可能有聚醚类抗生素残留，需进一步进行仪器确认。

实施时，所述的抗体可以采用单克隆抗体也可以采用多克隆抗体，所

述的样品可以采用固体质或液体质。在本实施例中，所述的抗体为单克隆抗体，所述的样品为固体质。

表 4 酶标板中的加样实验模型

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10	样品 11	样品 12
B	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10	样品 11	样品 12
C	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10	样品 11	样品 12
D	样品 13	样品 14	样品 15	样品 16	样品 17	样品 18	样品 19	样品 20	样品 21	样品 22	样品 23	样品 24
E	样品 13	样品 14	样品 15	样品 16	样品 17	样品 18	样品 19	样品 20	样品 21	样品 22	样品 23	样品 24
F	样品 13	样品 14	样品 15	样品 16	样品 17	样品 18	样品 19	样品 20	样品 21	样品 22	样品 23	样品 24
G	对照	对照	对照	对照	对照	对照						
H	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白

实施例八、免疫试剂盒检测

聚醚类抗生素酶联免疫检测试剂盒采用竞争性酶免疫测定技术测定聚醚类抗生素的含量。试剂盒中将抗莫能菌素抗体包被于微孔壁上，酶结合物中含有标记了辣根过氧化物酶的莫能菌素，反应过程中与标准品、质控血清及待测标本中无标记的莫能菌素共同竞争包被于微孔壁上的抗莫能菌素特异抗体的有限结合位点。反应后冲洗掉未结合物，加酶的底物进行反应，然后用酶标仪测定结合上有酶活性的抗原复合物来测定食品中莫能菌素残留。

免疫检测试剂盒包括 1. 微孔反应板：96 孔（8 孔×12 条），用抗-

莫能菌素多克隆抗体包被微孔反应板；2. 酶合物：含莫能菌素与辣根过氧化物酶的结合物；3. 标准品：五个梯度莫能菌素浓度；4. 质控血清；5. 显色液：A 含过氧化氢和稳定剂；B：含色素基质和稳定剂；6. 洗液：一瓶，10 倍浓缩洗液 20ml，使用前用蒸馏水稀释 10 倍；7. 终止液：含 1 当量的 H_2SO_4 溶液；8. 说明书一份。

检测时，按照说明书逐步进行，分别计算出各标准品质控后样品的 B/B_0 % (B =不同浓度标准品的 OD 值， B_0 为 0 浓度标准品的 OD 值，即酶标板本底的 OD 值)，以标准品浓度 (ng/ml) 为横坐标， B/B_0 为纵坐标，在对数坐标纸上绘制标准曲线，通过外标法得出待测样品的浓度。

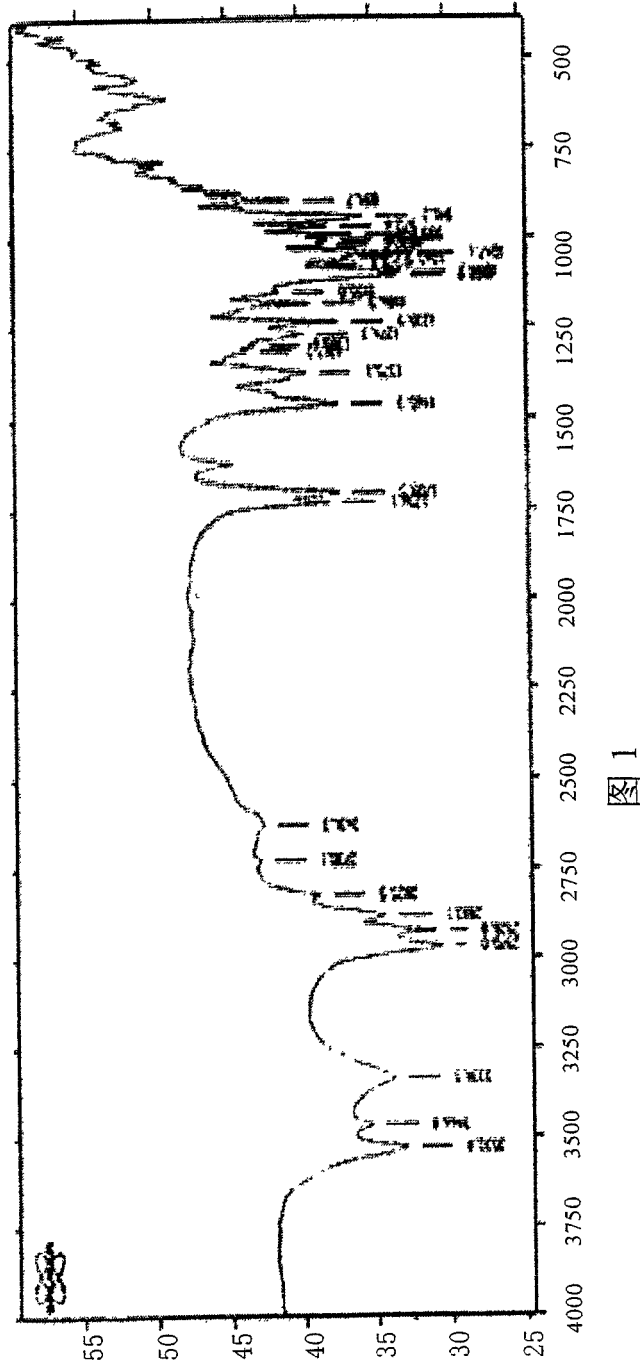


图 1

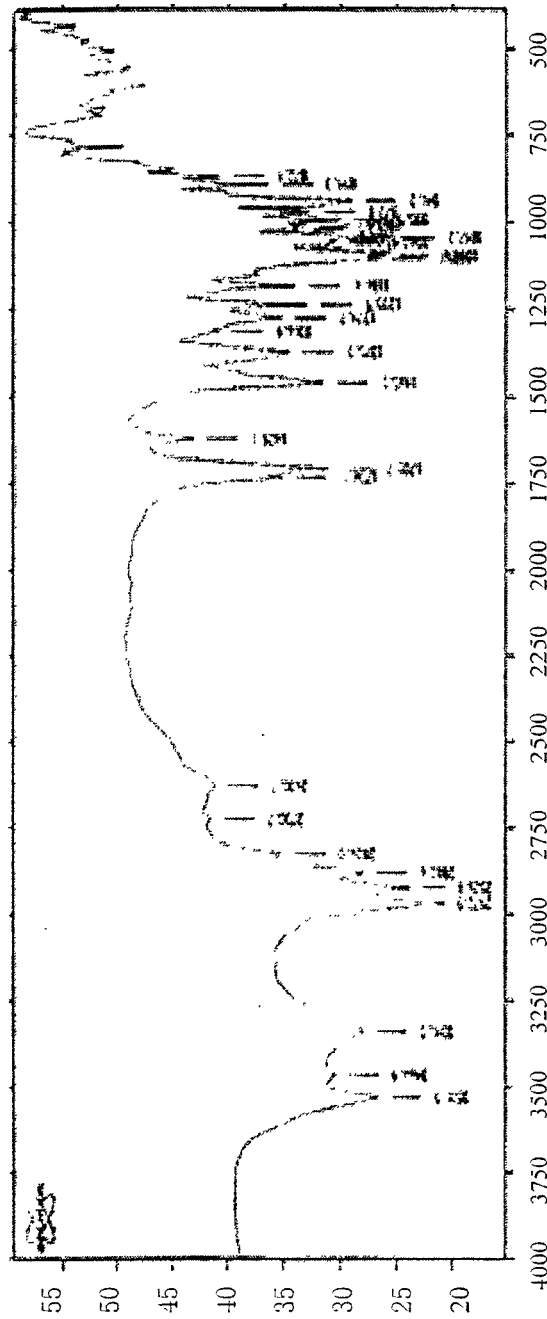


图 2

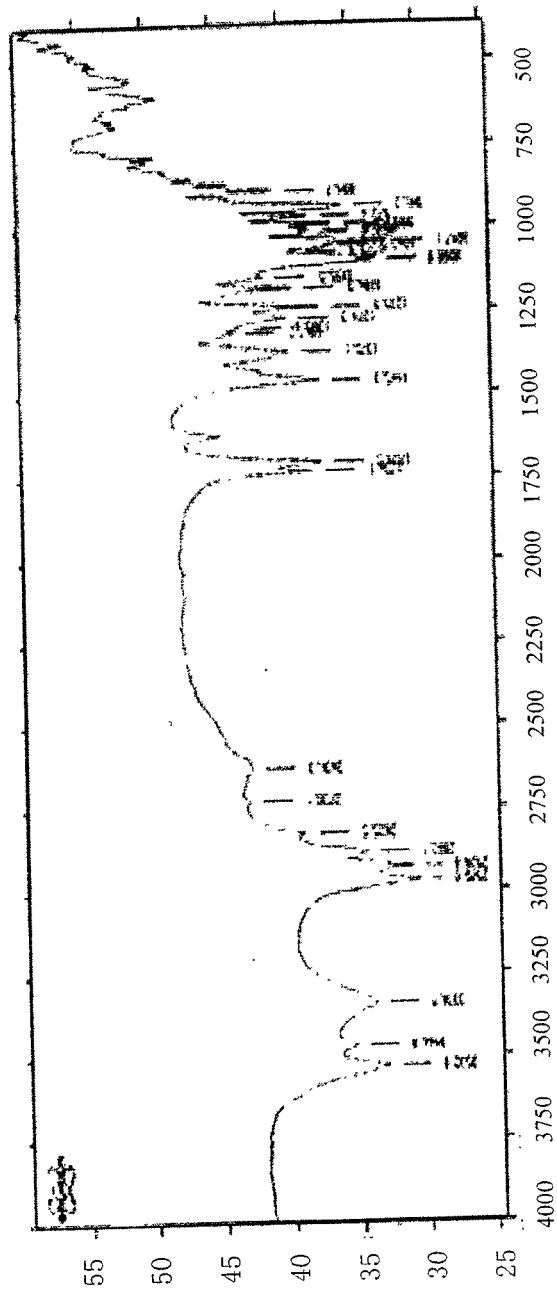


图 3

专利名称(译)	一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体及其应用		
公开(公告)号	CN1677107A	公开(公告)日	2005-10-05
申请号	CN200510038434.1	申请日	2005-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	刘铁铮 王冉 魏瑞成 张岳梅		
发明人	刘铁铮 王冉 魏瑞成 张岳梅		
IPC分类号	C07K16/00 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/532		
代理人(译)	孙忠浩		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测聚醚类抗生素残留的免疫抗体及其应用，免疫抗体是以免疫抗体以莫能菌素钠盐为半抗原，首先对半抗原进行改造，改造后的半抗原再与蛋白质偶联制备成人工免疫原，并通过免疫新西兰大白兔制备成多克隆抗体或通过小鼠免疫、细胞融合、筛选及克隆化培养等过程制备单克隆抗体。并将获得的单克隆抗体或多克隆抗体用于对动物源性食品的样品进行聚醚类抗生素残留检测。本发明的优点在于：以改造后的莫能菌素钠盐与蛋白质进行偶联后免疫动物，所制备的抗体对聚醚类抗生素药物具有特异性，可用于动物源性食品中聚醚类抗生素残留的筛选检测，利用本发明涉及的免疫抗体进行聚醚类抗生素免疫检测，具有快速、简便的特点。

