



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109576228 A

(43)申请公布日 2019.04.05

(21)申请号 201811433945.7

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2018.11.28

C12R 1/91(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC No.16685 2018.10.29

(71)申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信
息产业基地高新四街8号

申请人 山东省食品药品检验研究院

(72)发明人 吴小胜 王骏 万宇平 胡明燕

王琳琛 王兆芹 王喜平 申梁

何方洋 赵正苗

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

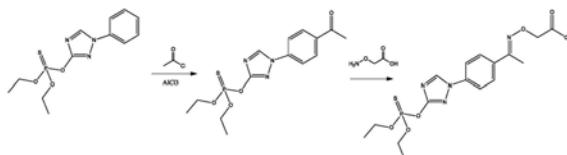
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种分泌抗三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种分泌抗三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用。所述杂交瘤细胞株命名为G-1-3,保藏编号为CGMCC No.16685。本发明利用自行设计的三唑磷人工抗原免疫小鼠,利用免疫的小鼠脾细胞制备获得杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株分泌的抗三唑磷单克隆抗体,效价高,特异性强,可用于对三唑磷进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。



1. 一种分泌抗三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其特征在于,命名为G-1-3,保藏编号为CGMCC No.16685。
2. 如权利要求1所述的杂交瘤细胞株在制备检测三唑磷的免疫试剂盒中的应用。
3. 如权利要求1所述的杂交瘤细胞株在制备检测三唑磷的免疫试纸条中的应用。
4. 如权利要求1所述的杂交瘤细胞株在制备检测三唑磷的化学发光免疫检测试剂盒、免疫磁珠分离富集试剂盒、磁颗粒化学发光试剂盒、时间分辨荧光免疫层析试纸条、荧光微球免疫层析试纸条、免疫亲和柱等其他免疫检测产品中的应用。
5. 一种抗三唑磷单克隆抗体,其特征在于,由权利要求1所述的杂交瘤细胞株或其传代细胞株分泌产生。
6. 如权利要求5所述抗三唑磷单克隆抗体在检测三唑磷中的应用。
7. 一种三唑磷的检测试剂盒,其特征在于,含有如权利要求5所述的抗三唑磷单克隆抗体。

一种分泌抗三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种分泌抗三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用,其特别适于蔬菜样本中三唑磷残留量的检测。

背景技术

[0002] 三唑磷,又名三唑硫磷,英文通用名Triazophos,化学名称0,0-二乙基-0-(1-苯基-1,2,4-三唑-3-基)硫代磷酸酯。纯品为浅棕黄色液体,20℃时在水中的溶解度为30~40mg/L,可溶于大多数有机溶剂;对光稳定,在酸、碱介质中水解,140℃分解。三唑磷具有强烈的触杀和胃毒作用,杀虫效果好,杀卵作用明显,渗透性较强,无内吸作用,是一种中等毒、广谱有机磷杀虫剂、杀螨剂,兼有一定的杀线虫作用,已在我国水稻、棉花、蔬菜和苹果等作物上登记,主要用于防治粮食、棉花、果树、蔬菜等主要农作物上的许多重要害虫。由于三唑磷的应用效果好,相对甲胺磷等高毒农药其毒性低,因此,在农作物上应用较广泛。

[0003] 然而,三唑磷的大量使用也给一些食用农产品及环境带来了残留问题。三唑磷属有机磷农药,中等毒性,对神经、肝、肾、心、肺及生殖系统等多脏器均有明显的毒副作用,其中毒主要机理是抑制胆碱酯酶的活性。欧盟规定三唑磷最大残留限量(maximum residue limit,MRL)为不得检出的农药品种;日本“肯定列表制度”中规定,除了小麦、大麦、黑麦、玉米、荞麦、其他粮谷、棉籽和棉籽油设定了最大残留限量,其余适用“一律标准”,即0.01mg/kg;我国国家标准《GB 2763-2005食品中农药最大残留限量》中限定三唑磷的MRL为稻谷0.05mg/kg,棉籽0.1mg/kg,没有制定蔬菜中三唑磷的最大残留限量标准。因此,建立三唑磷残留的快速检测技术,加强监测、科学使用三唑磷,对于保障人类健康与食品安全,降低环境污染,减少对农副产品出口产生的影响等具有重要意义。

[0004] 我国标准体系中提供的测定蔬菜中三唑磷的方法均是多残留检测方法,有国家标准(GB/T 19648-2006、GB/T 5009.218-2008、GB/T 20769-2008、GB/T 23204-2008、GB/T 23205-2008、GB/T 23376-2009)、行业标准(NY/T 1379-2007、NY/T 761-2008、SN/T 1950-2007、SN/T 0148-2011)和地方标准(DB34/T 1076-2009),涉及到的检测方法有液相色谱法、气相色谱法和色谱-质谱联用法。仪器方法具有灵敏度高、结果准确等优点,但是资金和人员等投入成本较高。本发明制备出一种分泌三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并将其应用于免疫产品,测定蔬菜中三唑磷药物的残留量,具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低,非常容易推广等优点。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一株对三唑磷具有特异性亲和力的单克隆抗体杂交瘤细胞株的制备方法。

[0006] 本发明提供一株三唑磷单克隆抗体杂交瘤细胞株,由该细胞株制备的抗体对三唑磷具有较好的亲和力和检测灵敏度,可以用来建立三唑磷总量的免疫学检测方法,包括酶联免疫试剂盒、胶体金检测试纸条、免疫亲和柱等。

[0007] 本发明的技术方案：一株三唑磷单克隆抗体杂交瘤细胞株，其命名为G-1-3，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.16685。

[0008] 三唑磷单克隆抗体，它由所述保藏编号为CGMCC No.16685的三唑磷单克隆抗体杂交瘤细胞株G-1-3所分泌产生。

[0009] 所述的三唑磷单克隆抗体的应用，用于食品安全中三唑磷含量的检测。

[0010] 本发明提供的细胞株G-1-3的制备步骤为：

[0011] (1) 人工抗原的制备与鉴定：三唑磷和乙酰氯反应，得到三唑磷半抗原，半抗原与蛋白质偶联，制备出人工抗原，即免疫原、包被原；

[0012] (2) 单克隆抗体的制备：通过免疫小鼠，得到单克隆抗体；

[0013] (3) 细胞株G-1-3的制备：通过细胞融合和克隆化，得到三唑磷单克隆抗体杂交瘤细胞株G-1-3。

[0014] (4) 细胞株G-1-3的应用：应用于免疫试剂盒。

[0015] (5) 细胞株G-1-3的应用：应用于免疫试纸条。

[0016] (6) 细胞株G-1-3的应用：应用于化学发光免疫检测试剂盒、免疫磁珠分离富集试剂盒、磁颗粒化学发光试剂盒、时间分辨荧光免疫层析试纸条、荧光微球免疫层析试纸条、免疫亲和柱等其他免疫检测产品。

附图说明

[0017] 图1：三唑磷半抗原合成路线图

[0018] 图2：试剂盒标准曲线图

具体实施方式

[0019] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明，而不用来限制本发明的范围。

[0020] 实施例1试剂盒组分的制备

[0021] 1、三唑磷半抗原的制备

[0022] 100mL三口烧瓶中加入10mL二氯甲烷和0.5g三唑磷，降温至-5℃，搅拌下加入1.01当量的乙酰氯，控温加入2当量的三氯化铝，控温5℃反应6小时后，加稀盐酸和冰水，乙酸乙酯萃取，水洗，无水硫酸镁干燥有机相，减压蒸干溶剂，石油醚-乙酸乙酯体系重结晶得乙酰化物。

[0023] 100mL三口烧瓶中加入上步乙酰化物，10mL吡啶溶解，加1.2当量的羧甲基羟胺，65℃反应5小时，乙酸乙酯萃取，水洗，无水硫酸镁干燥有机相，减压蒸馏，得半抗原，两步收率58%。

[0024] 2、抗原的制备

[0025] 免疫原制备——三唑磷半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0026] 取8.5mg半抗原，溶解于1mL DMF中，取30mg EDC和NHS用0.2mL水充分溶解后，加入(1)中，室温下搅拌24h，即可得到反应液(1)。称取BSA50mg，使之充分溶解在3.8mL PB(PH 9.0)中，将反应液(1)逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中，并于室温下搅拌24h。用0.01mol/L PBS 4℃透析3d每天换3次透析液，以除去未反应的小分子物质。分装，于-20℃保存备用。

[0027] 包被原制备——三唑磷半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到免疫原。

[0028] 取8.5mg半抗原,溶解于1mL DMF中,取30mg EDC和NHS用0.2mL水充分溶解后,加入(1)中,室温下搅拌24h,即可得到反应液(1)。称取OVA 50mg,使之充分溶解在3.8mL PB(PH 9.0)中,将反应液(1)逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h。用0.01mol/L PBS 4℃透析3d每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质。分装,于-20℃保存备用。

[0029] 3、三唑磷单克隆抗体的制备

[0030] 动物免疫:将上述步骤得到的免疫原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0031] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按8:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到分泌三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0032] 生物材料样品保藏:一株三唑磷单克隆抗体杂交瘤细胞株G-1-3,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.16685。保藏日期为2018年10月29日。

[0033] 细胞冻存和复苏:将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0034] 单克隆抗体的生产与纯化:将Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5ml/只,7天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,-20℃保存。

[0035] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0036] 以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体。

[0037] 5、酶标记抗抗体的制备

[0038] 将羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗体的摩尔浓度比为4:1,由于辣根过氧化物酶在强氧化作用下产生许多与抗体结合的位点,这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚合物。为了解决这个问题,我们将传统的方法进行了改良,即:

[0039] (1)省去了氨基的封闭过程,因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少;

[0040] (2)降低辣根过氧化物酶与抗体的摩尔浓度比率至2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶活性的损失减少。

[0041] 6、酶标板的制备

[0042] 用包被缓冲液将包被原稀释成20μg/ml,每孔加入100μl,37℃避光孵育2h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入200μl封闭液,37℃避光孵育2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0043] 实施例2检测三唑磷的酶联免疫试剂盒的组建

[0044] 组建检测三唑磷的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0045] (1)包被三唑磷偶联抗原的酶标板;

[0046] (2) 三唑磷标准品溶液6瓶,浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、3 $\mu\text{g/L}$ 、9 $\mu\text{g/L}$ 、27 $\mu\text{g/L}$ 、81 $\mu\text{g/L}$;

[0047] (3) 三唑磷单克隆抗体工作液;

[0048] (4) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0049] (5) 底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺;

[0050] (6) 终止液为2mol/L硫酸;

[0051] (7) 洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0052] (8) 复溶液为pH值为7.0、0.02mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0053] 实施例3蔬菜样品中三唑磷的检测

[0054] 1、样品前处理

[0055] 用均质器均质样本;称取 $2.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质物至10ml聚苯乙烯离心管中,分别加入2ml 0.1M氢氧化钠溶液,10ml乙酸乙酯,用振荡器振荡5min,充分混合;3000g以上,室温(20-25 $^{\circ}\text{C}$ /68-77 $^{\circ}\text{F}$)离心5min;移取1ml上层有机相至10ml洁净干燥玻璃试管中;于50-60 $^{\circ}\text{C}$ (122-140 $^{\circ}\text{F}$)水浴流下氮气吹干;加入1ml复溶工作液,涡动1min。取200 μl 加入到1800 μl 复溶工作液中,充分混合;取50 μl 用于分析。

[0056] 2、用试剂盒检测

[0057] 加标准品/样本50 μl 到对应的微孔中,再加入抗体工作液50 μl /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 μl /孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干。加入酶标二抗100 μl /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 μl /孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干。加入底物液A液50 μl /孔,再加入底物液B液50 μl /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ (77 $^{\circ}\text{F}$)避光环境中反应15min。加入终止液50 μl /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处,测定每孔OD值。

[0058] 3、检测结果分析

[0059] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以三唑磷标准品浓度($\mu\text{g/L}$)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中三唑磷的实际浓度。

[0060] 实施例4三唑磷技术参数的确定试验

[0061] 1、试剂盒灵敏度和检测限

[0062] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为1~81 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} (50%抑制浓度)浮动范围为4~6 $\mu\text{g/L}$;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对蔬菜的检测限均为50 $\mu\text{g/kg}$ 。

[0063] 2、样本精密度和准确度试验

[0064] 以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%)=实际测定值/理论值×100%,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差RSD%=SD/X×100%,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0065] 按100μg/kg、200μg/kg两个浓度的三唑磷分别对白菜样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0066] 表1白菜精密度及准确度试验

[0067]

三唑磷	添加浓度(μg/kg)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
白菜	100	81.9	9.2	9.5
	200	75.4	9.6	9.7

[0068] 以100μg/kg、200μg/kg两个浓度的三唑磷分别对白菜进行添加,平均回收率在75.4%~81.9%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0069] 3、试剂盒稳定性试验

[0070] 试剂盒保存条件为2~8℃,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、三唑磷添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37℃保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8℃至少保存12个月以上。

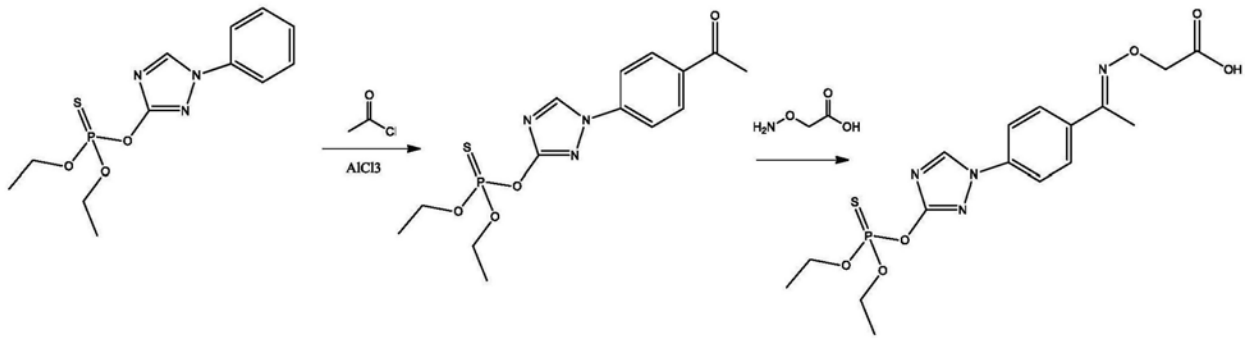


图1

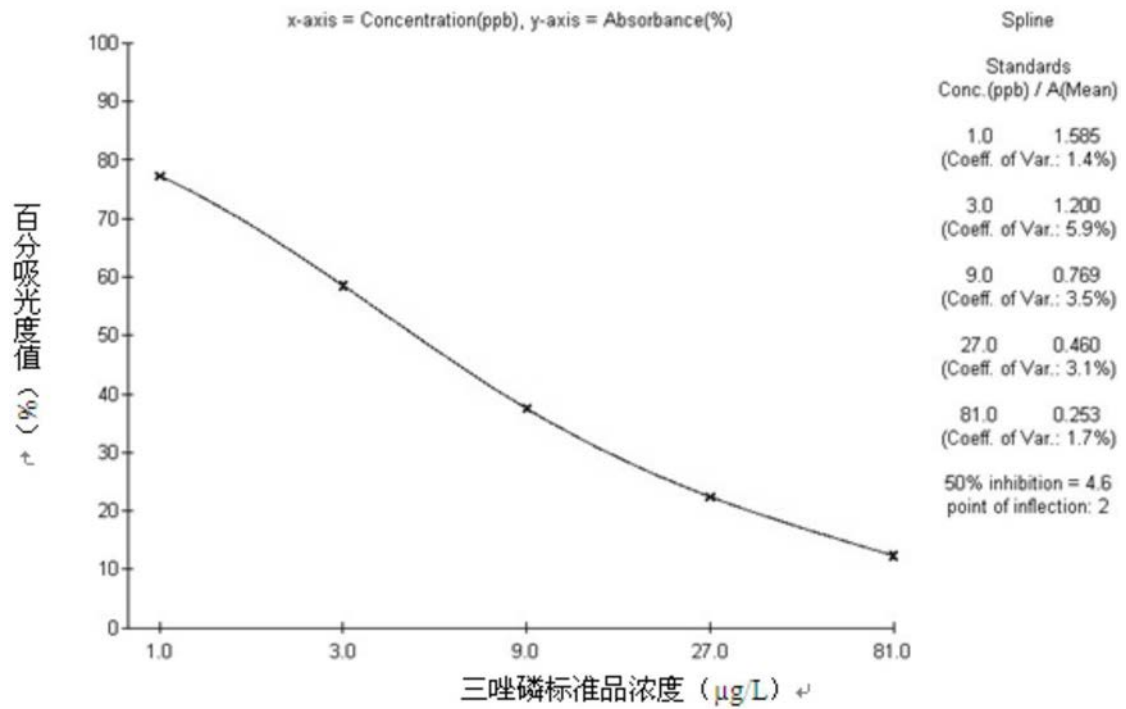


图2

专利名称(译)	一种分泌抗三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用		
公开(公告)号	CN109576228A	公开(公告)日	2019-04-05
申请号	CN201811433945.7	申请日	2018-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司 山东省食品药品检验所		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司 山东省食品药品检验研究院		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司 山东省食品药品检验研究院		
[标]发明人	吴小胜 王骏 万宇平 胡明燕 王琳琛 王兆芹 王喜平 申梁 何方洋 赵正苗		
发明人	吴小胜 王骏 万宇平 胡明燕 王琳琛 王兆芹 王喜平 申梁 何方洋 赵正苗		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/531 C12R1/91		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/531 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种分泌抗三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用。所述杂交瘤细胞株命名为G-1-3，保藏编号为CGMCC No. 16685。本发明利用自行设计的三唑磷人工抗原免疫小鼠，利用免疫的小鼠脾细胞制备获得杂交瘤细胞株，该杂交瘤细胞株分泌的抗三唑磷单克隆抗体，效价高，特异性强，可用于对三唑磷进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。

