



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110272876 A

(43)申请公布日 2019.09.24

(21)申请号 201910299968.1

C07K 1/30(2006.01)

(22)申请日 2019.04.15

C07K 1/22(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/577(2006.01)

CGMCC No.17402 2019.03.12

G01N 33/53(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

(71)申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 周勇 程金平 黄焱茜 张佳琪

廖浩祥 付双 张哲 胡雪 梁珊

(74)专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司

公司 31236

代理人 庄文莉

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 1/36(2006.01)

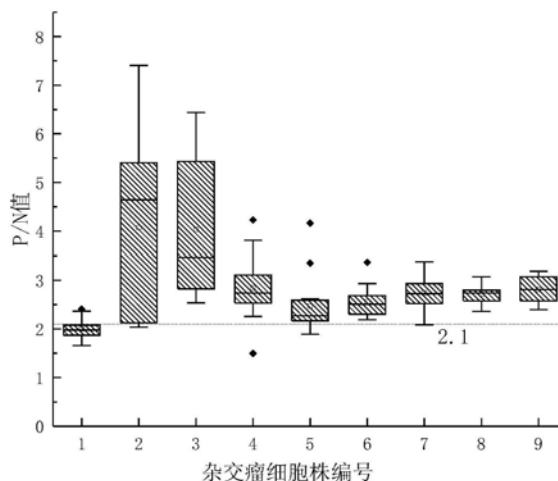
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株及其构建方法

(57)摘要

本发明提供一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株及其构建方法;所述构建方法包括人工抗原的合成、小鼠免疫、杂交瘤细胞的筛选及建株、单克隆抗体的制备纯化及效价测定。所述人工抗原的合成包括免疫抗原、检测抗原的合成,所述杂交瘤细胞的筛选及建株包括SP2/0细胞的收集、脾细胞的收集、细胞融合、融合板的检测等步骤。本发明的制备方法简单,免疫效果好;能获得稳定分泌抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的杂交瘤细胞株,为水环境中邻苯二甲酸二乙酯的免疫学快速检测方法的建立提供研究基础。



1. 一种分泌抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的杂交瘤细胞株,所述杂交瘤细胞株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.17402。

2. 一种根据权利要求1所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的杂交瘤细胞株的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、以邻苯二甲酸单乙酯为半抗原偶联物,利用混合酸酐法偶联制备邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫抗原,利用碳二亚胺法制备邻苯二甲酸单乙酯-OVA包被抗原;

S2、采用所述邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫抗原对小鼠进行皮下免疫,收集血清样品;采用所述邻苯二甲酸单乙酯-OVA作为ELISA检测的包被抗原,对获得的血清样品进行ELISA免疫血清效价检测,筛选出血清效价较高的免疫小鼠;

S3、利用聚乙二醇诱导细胞融合法,以PEG1450为媒介,将小鼠SP2/0细胞和步骤S2得到的免疫小鼠的脾细胞进行融合,融合后进行ELISA检测,筛选阳性杂交瘤细胞;

S4、对所述阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,并对细胞培养上清液进行ELISA检测;取阳性亚克隆杂交瘤细胞进行建株保存,得到所述抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株。

3. 根据权利要求2所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建方法,其特征在于,步骤S1中,利用混合酸酐法偶联制备邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫抗原的步骤包括:将邻苯二甲酸单乙酯用DMSO溶解成30mg/mL的储存液,取体积比为 $(0.5 \times 10^3 - 2 \times 10^3)$: $(50 - 130)$: $(5 - 20)$ 的MEP、乙胺和苯甲酸异丁酯,搅拌反应1-4h,得到A液;取BSA加PBS缓冲液溶解,控制浓度为1.5-30mg/mL,得到B液;再将A液缓慢滴加到B液中,在室温下搅拌反应5-8h;最后置于0.01-0.05mol/L PBS缓冲液透析纯化48-96h,换液多次,-20℃保存,得到所述邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫原。

4. 根据权利要求2所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建方法,其特征在于,步骤S1中,利用碳二亚胺法偶联制备邻苯二甲酸单乙酯-OVA包被抗原的步骤包括:取邻苯二甲酸单乙酯用DMF溶解为10mg/mL,取用量比为 $(0.5 - 2)$ mL: $(4 - 6)$ mg: $(9 - 15)$ mg的MEP、N-羟基琥珀酰亚胺和EDC,在室温下搅拌反应1-3h,得到A液;取OVA加PBS缓冲液溶解,控制浓度为5-20mg/mL,得到B液;再将A液缓慢滴加到B液中,在室温下搅拌反应5-18h;最后置于0.01-0.05mol/L PBS缓冲液透析纯化48-96h,换液多次,-20℃保存,得到所述邻苯二甲酸单乙酯-OVA包被抗原。

5. 根据权利要求2所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建方法,其特征在于,步骤S2中,所述免疫包括先进行三次间隔免疫,再进行一次加强免疫。

6. 一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体,其特征在于,所述抗体由权利要求1所述的杂交瘤细胞株分泌而得。

7. 一种根据权利要求6所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将小鼠腹腔接种所述杂交瘤细胞,采集腹水,离心收集上清液;将所述上清液进行纯化,即得。

8. 根据权利要求7所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述纯化的步骤包括:将所述上清液用辛酸-硫酸铵法粗纯化和亲和层析法进一步纯化。

9. 一种根据权利要求2所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体在制备水环境中邻苯二甲酸二乙酯的免疫检测试剂盒中的应用。

10. 一种水环境中邻苯二甲酸二乙酯的免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包含权利要求2所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体。

11. 一种水环境中邻苯二甲酸二乙酯的胶体金酶联免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述试纸条包含权利要求2所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体。

抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株及其构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药工程技术领域,具体地,涉及一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株及其构建方法。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸二乙酯化合物属于邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs),是一种环境内分泌干扰物,常用于工业生产橡胶、树脂、或者在塑料中作为增塑剂,PAEs作为增塑剂与塑料基质之间形成非共价键的氢键和范德华力,由于这两种作用力强度较弱,因此当塑料制品被废弃到环境中时,PAEs将不断从塑料制品转移到环境介质中,最终通过食物链食物网富集到高级生物体内,有研究表明PAEs会对生物体的器官、生殖系统和血液系统造成较大的损害。

[0003] 对环境中邻苯二甲酸二乙酯等PAEs小分子污染物的检测方法报道较多的有质谱法(MS)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱(HPLC)、GC-MS、HPLC-MS、超声萃取等方法。这些常规的检测方法虽然能够完成对PAEs的定性或定量检测,且能达到较低的检测下限,但存在一定的弊端,对实验设备要求高,现场实现难度较大,样品前处理程序繁琐,耗时长。酶联免疫吸附实验克服了上述操作的缺点,利用ELISA方法构建的胶体金免疫试纸条对样品的检测具有快速简便,灵敏度高,可以现场实时检测而且大规模生产后胶体金试纸条的费用低廉,可重复性强。因此选择ELISA方法对环境中的PAEs进行定性定量检测是目前为止相对快速和高效的选择。

[0004] 然而,目前利用ELISA方法对PAEs进行检测,尚未见有公开报道的特异性针对邻苯二甲酸二乙酯的检测方法的建立,已有的研究所制备的单克隆抗体并非特异性针对邻苯二甲酸二乙酯的抗体,存在不能特异性识别邻苯二甲酸二乙酯的缺点。

[0005] 文献《邻苯二甲酸二甲酯人工抗原包被的酶联免疫分析法的建立》中提到了其制备邻苯二甲酸二甲酯单克隆抗体用于酶联免疫分析方法的建立,但该文献采用叠氮法,且获得的偶联比效果一般。

发明内容

[0006] 针对现有检测技术的不足,本发明的目的是提供一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株及其构建方法。本发明提供一种构建高效稳定的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株的方法;为邻苯二甲酸二乙酯的ELISA检测方法建立及胶体金免疫层析(GICA)试纸条的研制提供了稳定高效的单克隆抗体源,为水环境中的邻苯二甲酸二乙酯进行免疫学快速检测的实际应用提供研究基础。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0008] 第一方面,本发明提供一种分泌抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的杂交瘤细胞株,所述杂交瘤细胞株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.17402。

[0009] 第二方面,本发明提供一种所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的杂交瘤细胞株的构建方法,包括如下步骤:

[0010] S1、以邻苯二甲酸单乙酯为半抗原偶联物,利用混合酸酐法偶联制备邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫抗原,利用碳二亚胺法制备邻苯二甲酸单乙酯-OVA包被抗原;

[0011] S2、采用所述邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫抗原对小鼠进行皮下免疫,收集血清样品;采用所述邻苯二甲酸单乙酯-OVA作为ELISA检测的包被抗原,对获得的血清样品进行ELISA免疫血清效价检测,筛选出血清效价较高的免疫小鼠;

[0012] S3、利用聚乙二醇诱导细胞融合法,以PEG1450为媒介,将小鼠SP2/0细胞和步骤S2得到的免疫小鼠的脾细胞进行融合,融合后进行ELISA检测,筛选阳性杂交瘤细胞;

[0013] S4、对所述阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,并对细胞培养上清液进行ELISA检测;取阳性亚克隆杂交瘤细胞进行建株保存,得到所述抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0014] 由于邻苯二甲酸二乙酯本身不具有末端活性基团连接臂,无法与蛋白偶联,制备人工抗原,而人工抗原是制备杂交瘤细胞株的关键,本发明发现特定选择邻苯二甲酸单乙酯能制得合适的人工抗原,从而得到杂交瘤细胞株。

[0015] 优选地,步骤S1中,利用混合酸酐法偶联制备邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫抗原的步骤包括:将邻苯二甲酸单乙酯用DMSO溶解成30mg/mL的储存液,取体积比为 $(0.5 \times 10^3 - 2 \times 10^3) : (50 - 130) : (5 - 20)$ 的MEP、乙胺和苯甲酸异丁酯,搅拌反应1-4h,得到A液;取BSA加PBS缓冲液溶解,控制浓度为1.5-30mg/mL,得到B液;再将A液缓慢滴加到B液中,在室温下搅拌反应5-8h;最后置于0.01-0.05mol/L PBS缓冲液透析纯化48-96h,换液多次,-20℃保存,得到所述邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫原。

[0016] 更优选地,步骤S1中,利用混合酸酐法偶联制备邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫抗原的步骤包括:将邻苯二甲酸单乙酯用DMSO溶解成30mg/mL的储存液,取MEP 0.5-2mL加乙胺50-130μL,苯甲酸异丁酯5-20μL,搅拌反应1-4h,得到A液;取60-75mgBSA,加PBS缓冲液2500-4000μL溶解,得到B液;再将A液缓慢滴加到B液中,在室温下搅拌反应5-8h;最后置于0.01-0.05mol/L PBS缓冲液透析纯化48-96h,换液3次,-20℃保存,得到免疫原邻苯二甲酸单乙酯-BSA。

[0017] 优选地,步骤S1中,利用碳二亚胺法偶联制备邻苯二甲酸单乙酯-OVA包被抗原的步骤包括:取邻苯二甲酸单乙酯用DMF溶解为10mg/mL,取用量比为 $(0.5 - 2) \text{ mL} : (4 - 6) \text{ mg} : (9 - 15) \text{ mg}$ 的MEP、N-羟基琥珀酰亚胺和EDC,在室温下搅拌反应1-3h,得到A液;取OVA加PBS缓冲液溶解,控制浓度为5-20mg/mL,得到B液;再将A液缓慢滴加到B液中,在室温下搅拌反应5-18h;最后置于0.01-0.05mol/L PBS缓冲液透析纯化48-96h,换液多次,-20℃保存,得到所述邻苯二甲酸单乙酯-OVA包被抗原。

[0018] 更优选地,步骤S1中,利用碳二亚胺法偶联制备邻苯二甲酸单乙酯-OVA包被抗原的步骤包括:取邻苯二甲酸单乙酯用DMF溶解为10mg/mL,取0.5-2mLMEP加N-羟基琥珀酰亚胺4-6mg,EDC 9-15mg,在室温下搅拌反应1-3h,得到A液;取50-80mg OVA,加PBS缓冲液4-10mL溶解,得到B液;再将A液缓慢滴加到B液中,在室温下搅拌反应5-18h。最后置于0.01-0.05mol/L PBS缓冲液透析纯化48-96h,换液3次,-20℃保存,得到包被原邻苯二甲酸单乙酯-OVA。

[0019] 优选地,步骤S2中,所述免疫包括先进行三次间隔免疫,再进行一次加强免疫。

[0020] 第三方面,本发明提供一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体,所述抗体由所述的杂交瘤细胞株分泌而得。

[0021] 第四方面,本发明提供一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:将小鼠腹腔接种所述杂交瘤细胞,采集腹水,离心收集上清液;将所述上清液进行纯化,即得。

[0022] 优选地,所述纯化的步骤包括:将所述上清液用辛酸-硫酸铵法粗纯化和亲和层析法进一步纯化。

[0023] 第五方面,本发明提供一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体在制备水环境中邻苯二甲酸二乙酯的免疫检测试剂盒中的应用。

[0024] 第六方面,本发明提供一种水环境中邻苯二甲酸二乙酯的免疫检测试剂盒,所述试剂盒包含所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体。

[0025] 第七方面,本发明提供一种水环境中邻苯二甲酸二乙酯的胶体金酶联免疫层析试纸条,所述试纸条包含所述的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体。

[0026] 本发明的抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株,已经于2019年3月12日递交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.17402。

[0027] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0028] 1、本发明成功的获取到目标杂交瘤细胞株,能高效稳定的分泌抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体,该抗体具有效价高、特异性强等特点。

[0029] 2、本发明的成功为后续针对水环境中的盐度、各种离子等会干扰免疫检测方法建立的更严格的筛选提供实验基础,为水环境中邻苯二甲酸二乙酯的免疫学快速检测相关研究提供研究基础。

[0030] 3、本发明的成功为制备水环境中邻苯二甲酸二乙酯的免疫检测试剂盒中提供了很好的抗体源。

[0031] 4、本发明的成功为制备邻苯二甲酸二乙酯的胶体金酶联免疫层析试纸条提供了很好的抗体源头。

[0032] 5、本发明利用混合酸酐法制备邻苯二甲酸单乙酯-BSA免疫抗原,与背景技术文献中的叠氮法完全不同,且获得了偶联比效果较好的免疫抗原。此外,该文献经过6次免疫反应才获得一定效果的针对邻苯二甲酸二甲酯的抗体血清,而本发明仅需要4次免疫反应即可。该文献中所用方法经过4次亚克隆后仅获得一株阳性率达100%的杂交瘤细胞株,而本发明经过三次亚克隆后可获得9株阳性率达到100%的杂交瘤细胞株。

附图说明

[0033] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0034] 图1为实施例1中人工抗原的偶联质谱检测图谱;

[0035] 图2为实施例1中免疫小鼠血清效价评价;

[0036] 图3为实施例1中对实验小鼠获得的免疫血清进行针对邻苯二甲酸二乙酯的间接

竞争ELISA实验的抑制效果示意图；

[0037] 图4为实施例1中杂交瘤细胞株上清液效价评价；

[0038] 图5为实施例1中对杂交瘤细胞株上清液进行针对邻苯二甲酸二乙酯的间接竞争ELISA实验的抑制效果示意图；

[0039] 图6为实施例1中纯化后的腹水上清液效价评价；

[0040] 图7为实施例1中对纯化后的腹水上清液进行针对邻苯二甲酸二乙酯的间接竞争ELISA实验的抑制效果示意图。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变化和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0042] 实施例1

[0043] 本实施例涉及一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建方法,所述方法包括如下步骤:

[0044] 第一步,人工抗原制备

[0045] 将邻苯二甲酸单乙酯用DMSO溶解成30mg/ml。

[0046] 取邻苯二甲酸单乙酯1mL加乙胺100 μ L,苯甲酸异丁酯10 μ L,搅拌反应2h,得到A液;取75mg BSA,加PBS缓冲液4mL溶解,得到B液;再将A液缓慢滴加到B液中,在室温下搅拌反应6h;最后置于0.01mol/L PBS缓冲液透析纯化72h,换液3次,-20 $^{\circ}$ C保存,得到免疫原邻苯二甲酸单乙酯-BSA。

[0047] 用碳二亚胺法制备包被抗原:取邻苯二甲酸单乙酯20mg,加DMF 2mL溶解,加N-羟基琥珀酰亚胺5.5mg,EDC 10mg,在室温下搅拌反应1h,得到A液;取60mg OVA,加0.2mol/L PBS缓冲液5mL溶解,得到B液;再将A液缓慢滴加到B液中,在室温下搅拌反应10h。最后置于0.01mol/L PBS缓冲液透析纯化72h,换液3次,-20 $^{\circ}$ C保存,得到包被原邻苯二甲酸单乙酯-OVA。用质谱仪检测免疫抗原,检测图谱如图1所示,偶联比计算结果如表1所示。

[0048] 表1人工抗原的偶联比

[0049]	偶联体 邻苯二甲酸单乙 酯-BSA	偶联比 12.836
--------	-------------------------	---------------

[0050] 第二步,小鼠免疫

[0051] (1) 小鼠免疫及血清制备

[0052] 第一次免疫:第一天,每组取邻苯二甲酸单乙酯-BSA用PBS稀释至1.0mg/mL,取2000 μ L邻苯二甲酸单乙酯-BSA与2000 μ L福氏完全佐剂混合,乳化,每只小鼠注射200 μ g免疫抗原。第二次免疫:第十五天,每组取邻苯二甲酸单乙酯-BSA用PBS稀释至1.0mg/mL,取2000 μ L邻苯二甲酸单乙酯-BSA与2000 μ L福氏不完全佐剂混合,乳化,每只小鼠注射200 μ g

免疫抗原。第三次免疫：第三十天，每组取邻苯二甲酸单乙酯-BSA用PBS稀释至1.0mg/mL，取2000μL邻苯二甲酸单乙酯-BSA与2000μL福氏不完全佐剂混合，乳化，每只小鼠注射200μg免疫抗原。第一次采血：第三十七天，对小鼠眼眶静脉采血，收集血清-20℃保存备用。加强免疫：第四十三天，每组取邻苯二甲酸单乙酯-BSA用PBS稀释至1.0mg/mL，取2000μL邻苯二甲酸单乙酯-BSA与2000μL福氏不完全佐剂混合，乳化，每只小鼠注射200μg免疫抗原。第五十天，对小鼠眼眶静脉采血，收集血清，-20℃保存备用。

[0053] (2) 将所获得的血清样品进行ELISA免疫血清效价检测

[0054] 在酶标板上每孔包被100μL经稀释的包被抗原邻苯二甲酸单乙酯-OVA，4℃过夜；弃去包被液，每孔加入200μL封闭液，37℃封闭1.5小时；弃去封闭液，每孔100μL步骤(1)获得的血清样本以1:5000稀释度稀释后加入酶标板，37℃放置1小时；蒸馏水冲洗酶标板10次，拍干；酶标样抗鼠抗体用封闭液稀释至1:3000，每孔100μL加入酶标板，37℃放置30min；用蒸馏水冲洗酶标板10次，拍干；每孔100μL加入酶标板，37℃放置15min；每孔加入2M H₂SO₄ 50μL；酶标仪读数，计算P/N值如图2。对免疫小鼠血清效价测定结果进行横向评价如图2所示，由图2可知，在P/N值为2.1的阳性标准参考下，本申请获得的免疫小鼠血清效价最高可以达到1:5000。

[0055] 对实验小鼠获得的免疫血清进行针对邻苯二甲酸二乙酯的间接竞争ELISA实验(属于通用方法)，实验步骤如下：

[0056] 包板：用磷酸盐缓冲液将抗原稀释1000倍，混匀以每孔100μL的量加到酶标板中于37℃孵育2h，孵育后洗板拍干；

[0057] 封闭：以每孔150μL的量加入封闭液封闭，于37℃孵育2h，孵育后弃掉上清液后拍干备用；

[0058] 加邻苯二甲酸二乙酯标准品及抗体：邻苯二甲酸二乙酯标准品稀释一定倍数，免疫血清稀释相应浓度，每孔各加入50μL后于37℃孵育30min；

[0059] 洗涤：将酶标板洗涤3-5次后拍干；

[0060] 加酶标二抗：以每孔100μL的量加入酶标二抗，并于37℃孵育30min；洗涤；将酶标板洗涤3-5次后拍干；

[0061] 显色：以每孔100μL的量，加入TMB底物显色液，置于37℃孵育15min；

[0062] 终止：加入终止液终止整个反应；

[0063] 读数：在450nm波长下测定样品的OD值。

[0064] 抑制效果如图3所示，由图3可知，本申请获得的免疫小鼠血清对于邻苯二甲酸二乙酯有明显的抑制效果，最高抑制率可以达到90%。

[0065] 第三步，杂交瘤细胞的筛选及建株

[0066] (1) SP2/0细胞的收集

[0067] 用弯头吸管吹下SP2/0细胞，收集于50ml离心管中，1200rpm离心5min。弃上清，用20ml DMEM培养基将细胞重悬，记数取 3×10^7 细胞，1200rpm离心5min。弃上清，用20ml DMEM培养基将细胞重悬，置孵箱中备用。

[0068] (2) 脾细胞的收集

[0069] 将上面第二步的第(1)步中最后得到的免疫小鼠眼眶静脉采血，处死后放入75%乙醇中消毒5min。取出血清效价较高的免疫小鼠的脾脏放入筛网中。研磨，用15ml DMEM培

培养基冲洗筛网收集脾细胞,1200rpm离心5min。弃上清,用10ml DMEM培养基将细胞重悬。

[0070] (3) 细胞融合

[0071] 将收集的脾细胞与SP2/0细胞混匀,1200rpm离心5min。弃上清,加入1ml预热的PEG1450,37℃水浴反应1min,加入终止液25ml DMEM培养基,1200rpm离心5min。弃上清,加100ml预热的HAT培养基,将细胞重悬,混匀,加入预先接种饲养细胞的96孔板,每孔100μL,孵箱中培养(37℃,5%CO₂)。

[0072] (4) 融合板的检测

[0073] 融合后第八天,弃上清,每孔加200μL新鲜HT培养基,孵箱中培养(37℃,5%CO₂)。两天后,取100μL上清液转入包被好的96孔酶标板,ELISA检测上清液。阳性的孔,进行换液复检。取120个融合后的细胞加入10ml HT培养基中,接种于预先接种饲养细胞的96孔板中,每孔100μL,置孵箱中培养(37℃,5%CO₂)。亚克隆生长到孔的大约1/6的1天后,吸出孔板中的上清100μL转入酶标板中。

[0074] 选取三轮亚克隆后的9株阳性率均达到100%的杂交瘤细胞株进行24孔扩大培养后转T75方瓶培养、建株、冻存。对9株细胞株进行细胞上清液效价检测,其上清液稀释度为1:10000,其P/N值如图4所示。从图4中可以看出除一号杂交瘤细胞株外,其余杂交瘤细胞株的P/N值均大于阳性标准,即杂交瘤细胞株效价最高可以达到1:10000

[0075] 对细胞株上清液进行针对邻苯二甲酸二乙酯的ELISA实验,实验步骤如下(属于通用方法):

[0076] 包板:用磷酸盐缓冲液将抗原稀释1000倍,混匀以每孔100μL的量加到酶标板中于37℃孵育2h,孵育后洗板拍干;

[0077] 封闭:以每孔150μL的量加入封闭液封闭,于37℃孵育2h,孵育后弃掉上清液后拍干备用;

[0078] 加邻苯二甲酸二乙酯标准品及抗体:邻苯二甲酸二乙酯标准品稀释一定浓度,细胞株上清液稀释一定倍数,每孔各加入50μL后于37℃孵育30min;

[0079] 洗涤:将酶标板洗涤3-5次后拍干;加酶标二抗:以每孔100μL的量加入酶标二抗,并于37℃孵育30min;

[0080] 洗涤:将酶标板洗涤3-5次后拍干;

[0081] 显色:以每孔100μL的量,加入TMB底物显色液,置于37℃孵育15min;

[0082] 终止:加入终止液终止整个反应;

[0083] 读数:在450nm波长下测定样品的OD值。

[0084] 竞争抑制效果如图5所示,由图5可知,本申请获得的细胞株上清液对于邻苯二甲酸二乙酯有显著的抑制效果。同时,将杂交瘤细胞株扩大培养后获得的细胞株上清液对于邻苯二甲酸二乙酯的抑制率最高达到86.5%。

[0085] 实施例2

[0086] 本实施例涉及一种单克隆抗体的制备纯化及效价测定。

[0087] (1) 腹水制备

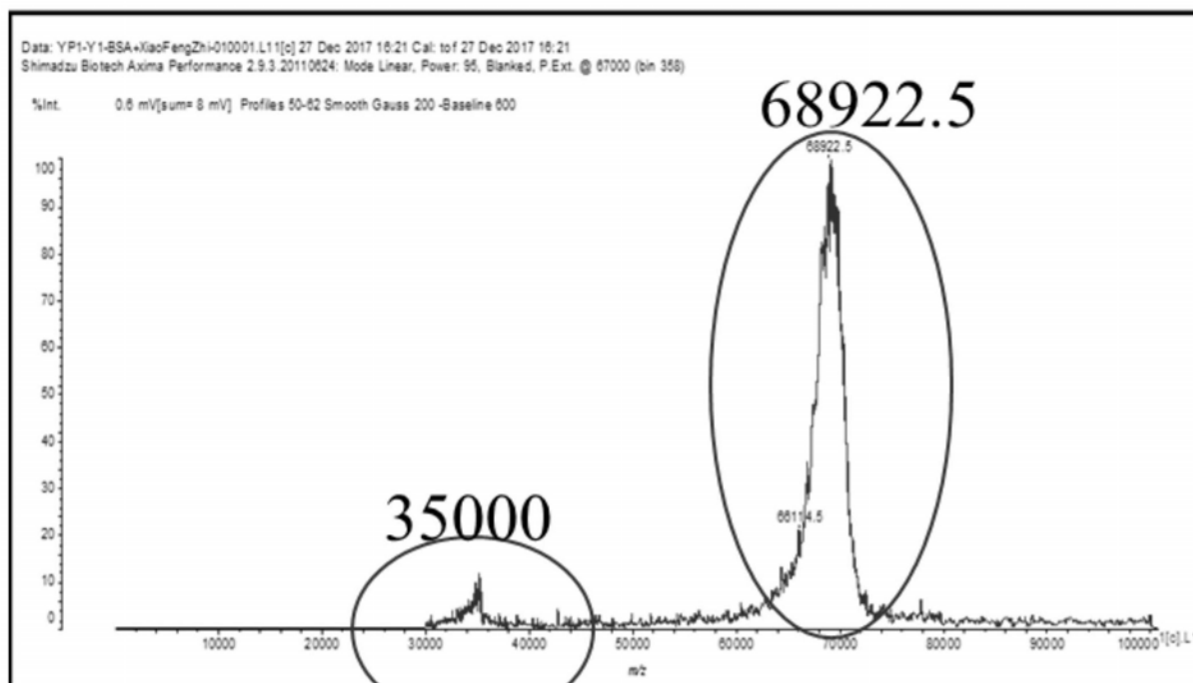
[0088] 取12周龄的BALB/c小鼠腹腔注射福氏不完全佐剂,0.2-0.3ml/只。3天后(注射福氏不完全佐剂)腹腔接种用PBS或无血清培养基稀释的实施例1制得的杂交瘤细胞,每只小鼠 $1-3 \times 10^6 / 0.3\text{ml}$ 。5天后,如腹部明显膨大,即可用无菌注射器采集腹水。腹水离心

(2000rpm离心5min),吸去最上层的脂肪组织,除去细胞成分和其他的沉淀物,收集上清,将上清加入50%甘油冻存于-20℃冰箱备用。

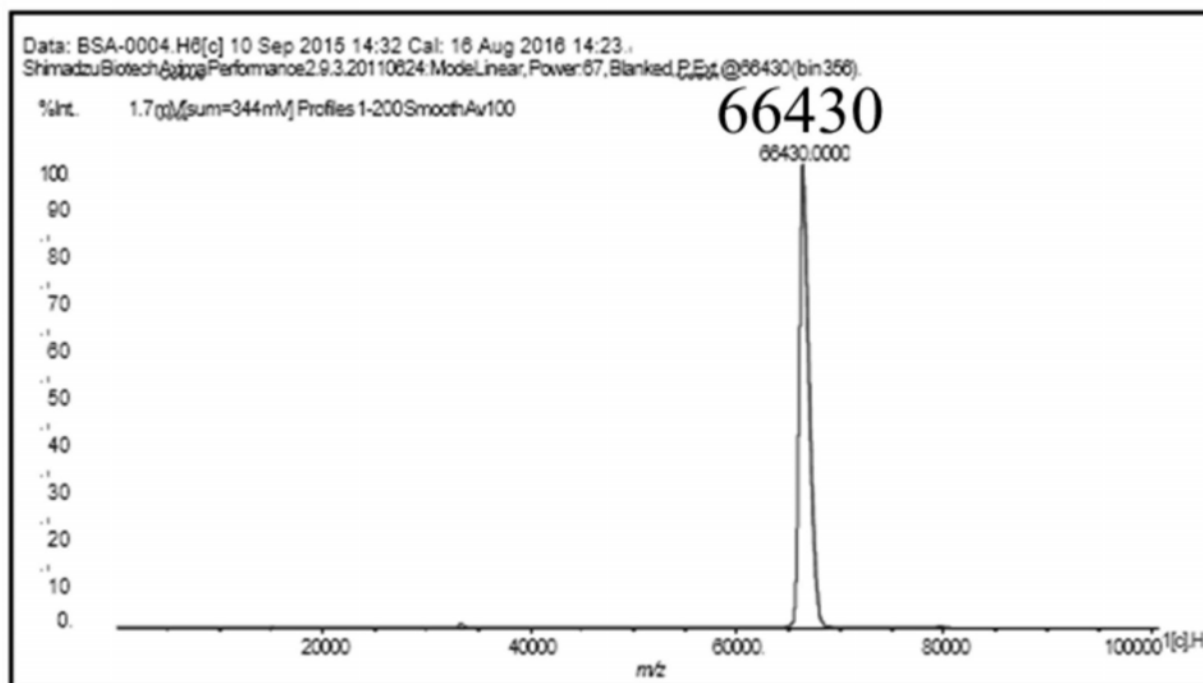
[0089] (2) 腹水纯化

[0090] 采集到的腹水,用辛酸-硫酸铵法粗纯化,亲和层析法进一步纯化,纯化产物用PD-10 柱交换缓冲液,用20%乙醇保存柱子,留下一小部分测定效价及特异性针对邻苯二甲酸二乙酯的间接竞争ELISA实验如图6和图7所示,可见纯化后的腹水效价最高可以达到1:30000,且免疫抑制效果大都在40%以上。

[0091] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变化或修改,这并不影响本发明的实质内容。在不冲突的情况下,本申请的实施例和实施例中的特征可以任意相互组合。



邻苯二甲酸单乙酯-BSA质谱图



BSA质谱图

图1

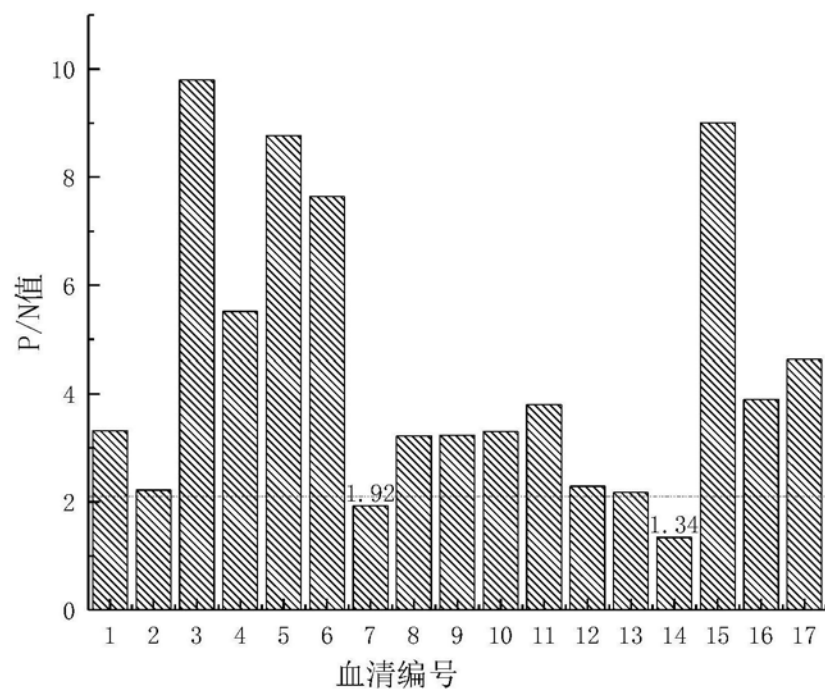


图2

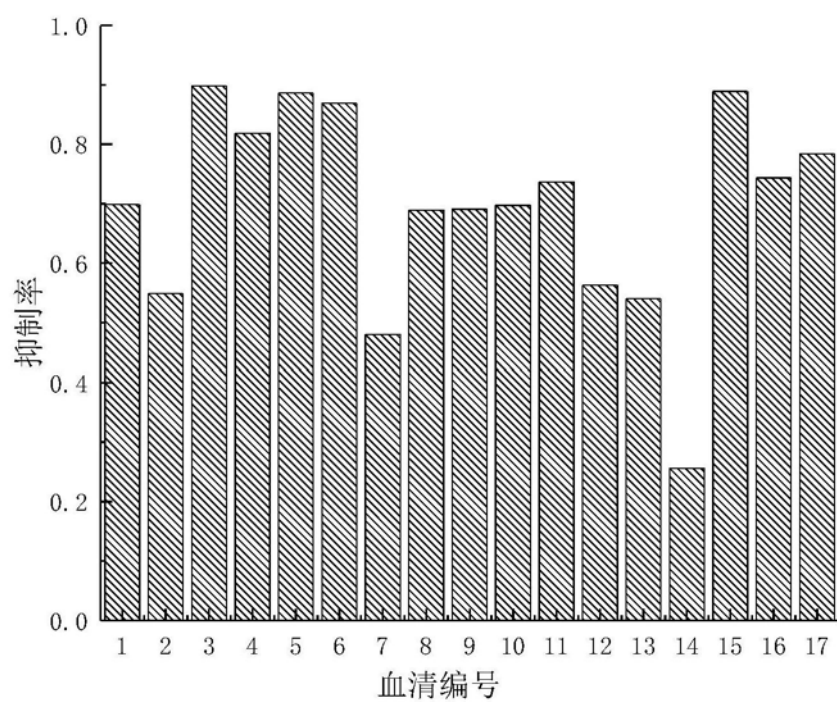


图3

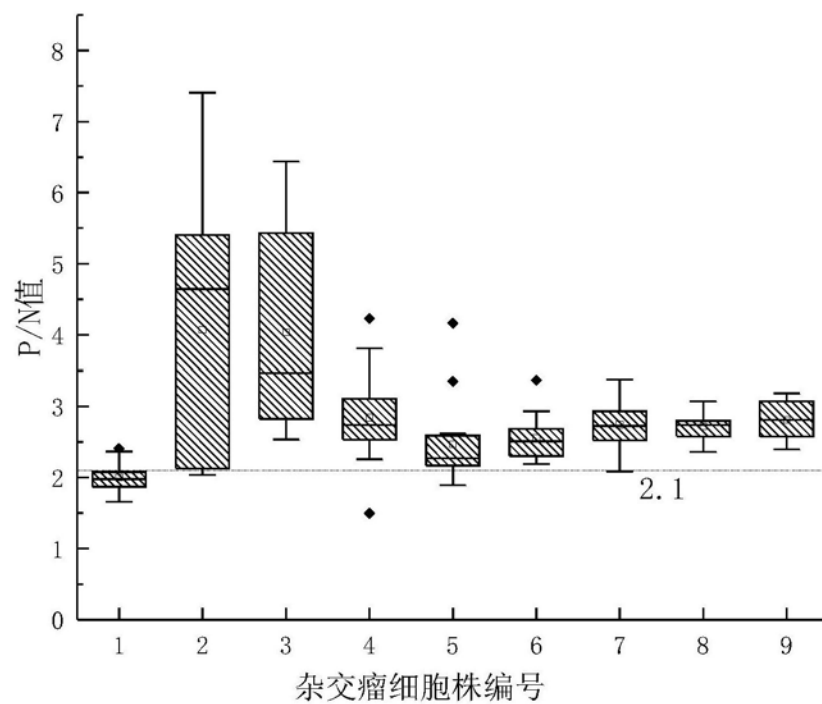


图4

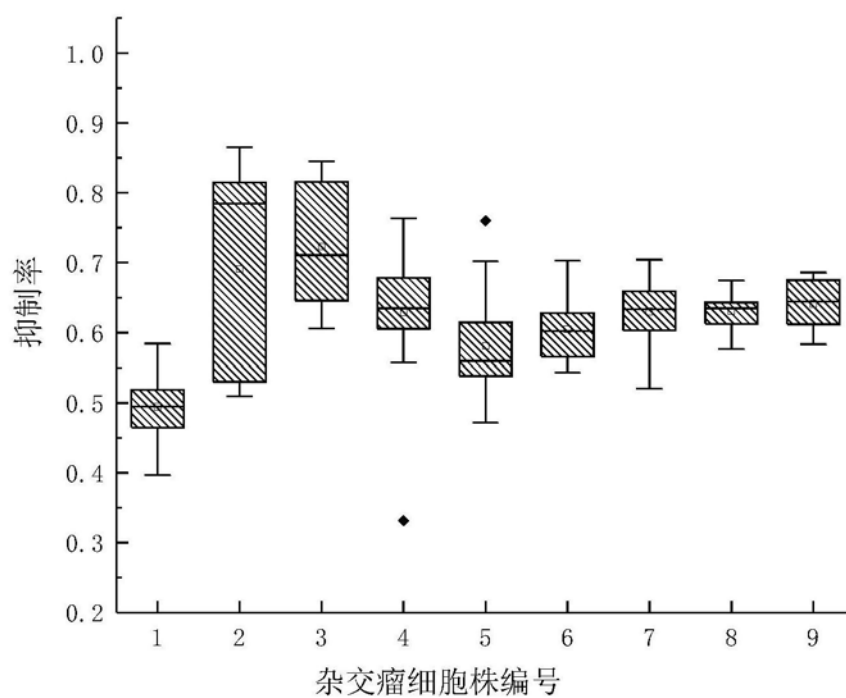


图5

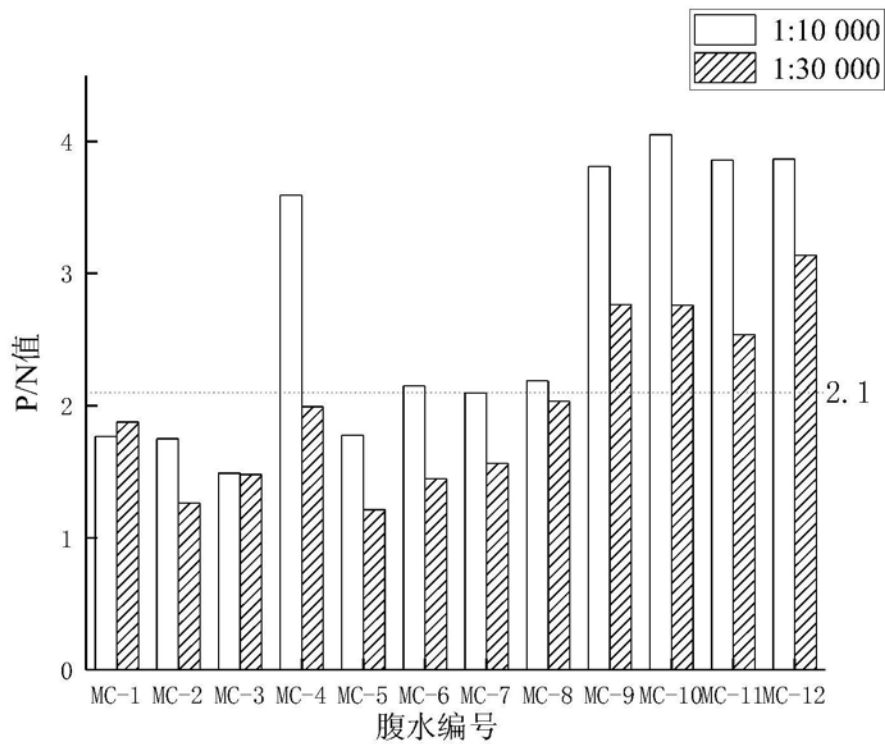


图6

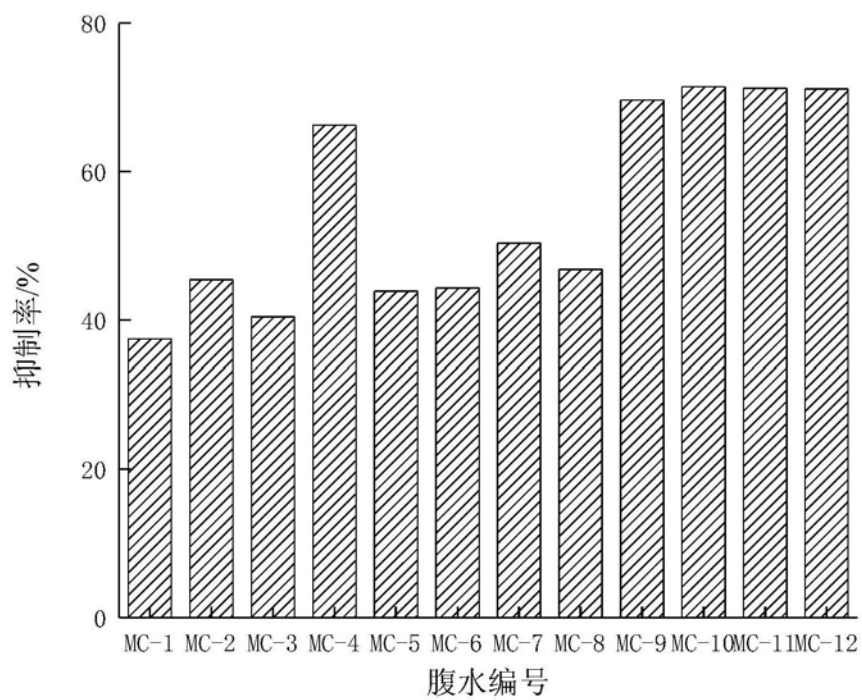


图7

专利名称(译)	抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株及其构建方法		
公开(公告)号	CN110272876A	公开(公告)日	2019-09-24
申请号	CN201910299968.1	申请日	2019-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	周勇 程金平 张佳琪 付双 张哲 胡雪 梁珊		
发明人	周勇 程金平 黄烯茜 张佳琪 廖浩祥 付双 张哲 胡雪 梁珊		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 C07K1/36 C07K1/30 C07K1/22 G01N33/577 G01N33/53 C12R1/91		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/52 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体杂交瘤细胞株及其构建方法；所述构建方法包括人工抗原的合成、小鼠免疫、杂交瘤细胞的筛选及建株、单克隆抗体的制备纯化及效价测定。所述人工抗原的合成包括免疫抗原、检测抗原的合成，所述杂交瘤细胞的筛选及建株包括SP2/0细胞的收集、脾细胞的收集、细胞融合、融合板的检测等步骤。本发明的制备方法简单，免疫效果好；能获得稳定分泌抗邻苯二甲酸二乙酯单克隆抗体的杂交瘤细胞株，为水环境中邻苯二甲酸二乙酯的免疫学快速检测方法的建立提供研究基础。

