



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110618269 A

(43)申请公布日 2019.12.27

(21)申请号 201910830326.X

(22)申请日 2019.09.04

(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镇国际
信息产业基地高新四街8号

(72)发明人 何方洋 万宇平 贾芳芳 崔海峰
朱亮亮 冯才伟 凡静静 王兆芹

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

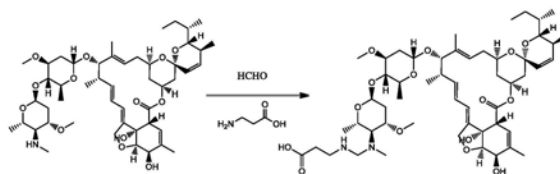
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备及其应用

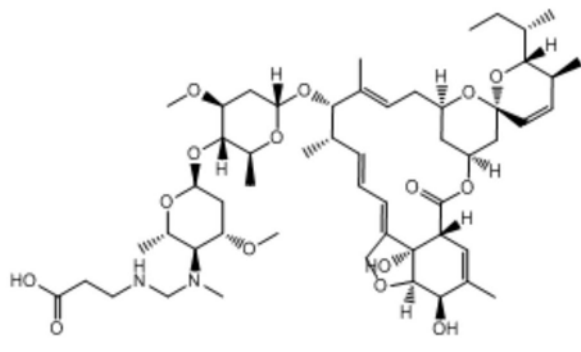
(57)摘要

本发明公开了一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备方法,并将其应用于甲氨基阿维菌素残留检测试纸条和酶联免疫试剂盒。试纸条包括:样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)和底板(7),所述反应膜上具有包被有甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(5)和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线(6),所述结合物释放垫(2)喷涂有甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物。试剂盒包括:包被有包被原的酶标板、甲氨基阿维菌素标准品溶液、甲氨基阿维菌素抗体、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液,所述包被原为甲氨基阿维菌素偶联抗原,所述酶结合物为酶标记的甲氨基阿维菌素抗体。本发明所提供的试纸条和酶联免疫试剂盒具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低等特点,适合大量样本的筛查和现场监控。



1. 一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体,其特征在於所述单克隆抗体由甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述半抗原的制备方法为:取0.886g甲氨基阿维菌素,加乙腈70ml溶解,加0.91g氨基丙酸的水溶液2ml,充分搅拌后,加入37%甲醛0.32ml,三氯乙酸0.77g,加热,60℃反应12h,停止反应,加水80ml,乙酸乙酯100ml,萃取分离,减压蒸干,上硅胶柱,石油醚/乙酸乙酯体积比5:1洗脱分离,得到丙酸甲氨基阿维菌素半抗原0.76g,收率77%。

2. 如权利要求1所述的甲氨基阿维菌素单克隆抗体,其特征在於所述甲氨基阿维菌素半抗原的分子结构式为:



3. 如权利要求1所述的甲氨基阿维菌素单克隆抗体,其特征在於所述单克隆抗体用于制备检测甲氨基阿维菌素的试纸条,所述试纸条包括:样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)和底板(7),其特征在於所述反应膜上具有包被有甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(5)和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线(6),所述结合物释放垫(2)喷涂有甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物。

4. 如权利要求1所述的甲氨基阿维菌素单克隆抗体,其特征在於所述单克隆抗体用于制备检测甲氨基阿维菌素的酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括:包被有包被原的酶标板、甲氨基阿维菌素标准品溶液、甲氨基阿维菌素抗体、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液,所述包被原为甲氨基阿维菌素偶联抗原,所述酶结合物为酶标记的甲氨基阿维菌素抗体。

一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备及其应用,具体涉及一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备方法,其特别适用于蔬菜、水果等农作物中甲氨基阿维菌素残留的检测。

背景技术

[0002] 甲氨基阿维菌素溶于丙酮和甲醇、微溶于水、不溶于己烷,是从发酵产品阿维菌素B1开始合成的一种新型高效半合成抗生素杀虫剂,它具有超高效、低毒、低残留、无公害等生物农药的特点,广泛用于蔬菜、果树、棉花等农作物上的多种害虫的防治。但是该药物具有神经毒性和发育毒性,脂溶性强,在动物体内分布广泛且代谢周期长,容易造成药物残留问题,通过食物链危害人类健康。因此,检测甲氨基阿维菌素残留量是必要的。

[0003] 目前检测甲氨基阿维菌素的方法大都是仪器方法,仪器成本高,检测时间长,操作复杂,不符合基层实验室的高效、便捷的检测要求,因此,本发明制备出一种甲氨基阿维菌素的单克隆抗体,应用于胶体金试纸条、酶联免疫试剂盒等快速检测产品的制备,能够适应基层实验室的检测需求,有利于提高监管手段和监督水平。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备方法,并将其应用于甲氨基阿维菌素残留检测试纸条和酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的甲氨基阿维菌素单克隆抗体是以甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,是由甲氨基阿维菌素单克隆抗体杂交瘤细胞株分泌获得;所述羊抗鼠抗抗体是将鼠源抗体免疫羊得到;所述甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物是由甲氨基阿维菌素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0006] 本发明所提供的检测甲氨基阿维菌素残留的试纸条,包括样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)和底板(7);所述反应膜上具有包被有甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(5)和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线(6),所述结合物释放垫(2)喷涂有甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物。

[0007] 所述样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)依次粘贴在底板(7)上,所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

[0008] 所述底板可为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品吸收垫可为吸滤纸或滤油纸;所述结合物释放垫可为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0009] 本发明所提供的检测甲氨基阿维菌素残留的酶联免疫试剂盒,包括:包被有包被原的酶标板、甲氨基阿维菌素标准品溶液、甲氨基阿维菌素抗体、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液,所述包被原为甲氨基阿维菌素偶联抗原,所述酶结

合物为酶标记的甲氨基阿维菌素抗体。

[0010] 所述甲氨基阿维菌素特异性抗体是以甲氨基阿维菌素偶联抗原作为免疫原制备获得,所述甲氨基阿维菌素特异性抗体可为甲氨基阿维菌素单克隆抗体或甲氨基阿维菌素多克隆抗体,其中优选甲氨基阿维菌素单克隆抗体。

[0011] 所述酶结合物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶;酶结合物是由酶和甲氨基阿维菌素抗体偶联得到的。

[0012] 本发明的甲氨基阿维菌素快速检测试纸条采用高度特异性的抗体抗原反应及竞争抑制免疫层析分析技术,将甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的甲氨基阿维菌素在流动过程中,与结合物释放垫上的甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成药物-抗体-胶体金标记物。样本中的药物与反应膜检测线上的甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物,根据检测线红色条带有无或颜色深浅来判断待测样品液中是否含有甲氨基阿维菌素残留。

[0013] 本试剂盒采用直接竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,样本中残留的甲氨基阿维菌素和酶标板微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗甲氨基阿维菌素的酶结合物,用TMB底物显色,样本吸光度值与其所含残留物甲氨基阿维菌素的含量成负相关,与标准曲线比较,再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样本中甲氨基阿维菌素的残留量。

[0014] 本发明的试纸条和试剂盒具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。用本发明试纸条和试剂盒检测甲氨基阿维菌素残留的方法简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0015] 图1为甲氨基阿维菌素半抗原合成图。

具体实施方式

[0016] 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。

[0017] 实施例1甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备

[0018] 1、甲氨基阿维菌素半抗原的制备

[0019] 取0.886g甲氨基阿维菌素,加乙腈70ml溶解,加0.91g氨基丙酸的水溶液2ml,充分搅拌后,加入37%甲醛0.32ml,三氯乙酸0.77g,加热,60℃反应12h,停止反应,加水80ml,乙酸乙酯100ml,萃取分离,减压蒸干,上硅胶柱,石油醚/乙酸乙酯体积比5:1洗脱分离,得到丙酸甲氨基阿维菌素半抗原0.76g,收率77%。

[0020] 2、免疫原的制备

[0021] 取丙酸甲氨基阿维菌素半抗原产物36mg,加DMF1ml,溶解澄清,加EDC27mg,加NHS19mg,充分混匀后,反应4h,得到半抗原活化液A液;取牛血清白蛋白(BSA)50mg,加0.05M PB溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃反应24h,0.02M PBS透析纯化三天,每天换液3次,得到甲氨基阿维菌素-BSA偶联物,即为免疫原,分装,-20℃保存。

[0022] 3、包被原的制备

[0023] 取丙酸甲氨基阿维菌素半抗原产物22mg,加DMF1ml,溶解澄清,加EDC17mg,加NHS13mg,充分混匀后,反应4h,得到半抗原活化液A液;取卵清白蛋白(OVA) 50mg,加0.05M PB溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃反应24h,0.02M PBS透析纯化三天,每天换液3次,得到甲氨基阿维菌素-OVA偶联物,即为免疫原,分装,-20℃保存。

[0024] 4、甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备

[0025] (1) 动物免疫

[0026] 将步骤2得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0027] (2) 细胞融合和克隆化

[0028] 取免疫Balb/c小鼠脾细胞,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法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0029] (3) 细胞冻存和复苏

[0030] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 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。

[0031] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0032] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0033] 所述细胞培养基为向RPMI1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20%(质量分数),碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2%(质量分数);所述细胞培养基的pH为7.4。

[0034] 5、羊抗鼠抗抗体的制备

[0035] 以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0036] 实施例2甲氨基阿维菌素残留试纸条的制备

[0037] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0038] 1) 制备喷涂有甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0039] 2) 制备具有包被有甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;

[0040] 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和PVC底板组装成试纸条。

[0041] 1、甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0042] (1) 胶体金的制备

[0043] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01%(质量分数),取100ml置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入2.5ml 1%柠檬酸三钠,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。

[0044] (2) 甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0045] 在磁力搅拌下,用0.2mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至7.0,按每毫升胶体金溶

液中加入20~50 μ g的标准向胶体金溶液中加入甲氨基阿维菌素单克隆抗体,继续搅拌混匀30min,加入10%BSA,使其在胶体金溶液中的终浓度为1% (体积分数),静置10min。12000r/min、4℃离心40min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用。

[0046] 复溶缓冲液:含酪蛋白0.02%~0.1% (质量分数)、吐温-80 0.05%~0.2% (质量分数)、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0047] 2、结合物释放垫的制备

[0048] 将结合物释放垫浸泡于含有牛血清白蛋白(牛血清白蛋白在缓冲液中的浓度为0.5%)、pH为7.2、0.5mol/L的磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿1h,37℃烘3h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在结合物释放垫上,每1cm结合物释放垫喷涂0.01ml甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物后,置于37℃环境中(湿度<20%)60min后取出,置于干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

[0049] 3、反应膜的制备

[0050] 将甲氨基阿维菌素半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测线,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线。

[0051] 包被过程:用磷酸缓冲液将甲氨基阿维菌素半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到10mg/ml,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T线),包被量为0.8 μ l/cm;用0.01mol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200 μ g/ml,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C线),包被量为1.0 μ l/cm。将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2h,备用。

[0052] 4、样品吸收垫的制备

[0053] 将样品吸收垫置于含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH7.2、0.1mol/L磷酸盐缓冲液中浸泡2h,37℃烘2h备用。

[0054] 5、试纸条的组装

[0055] 将样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次按顺序粘贴在PVC底板上;结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐;所述反应膜上有检测线和质控线,检测线(T线)和质控线(C线)均为与所述试纸条的长相垂直的条状带;检测线位于靠近结合物释放垫的末端的一侧;质控线位于远离结合物释放垫的末端的一侧;将试纸条用机器切成3mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,4~30℃条件下可保存12个月。

[0056] 实施例3甲氨基阿维菌素残留酶联免疫试剂盒的制备

[0057] 1、酶结合物的制备

[0058] 以山羊作为免疫动物,以甲氨基阿维菌素单克隆抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫,得到甲氨基阿维菌素抗体。将甲氨基阿维菌素抗体与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联得到酶结合物。

[0059] 2、酶标板的制备

[0060] 用包被缓冲液将包被原稀释成20 μ g/mL,每孔加入100 μ l,25℃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200 μ l封闭液,25℃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。

[0061] 3、酶联免疫试剂盒包含下述组分:

[0062] (1) 包被甲氨基阿维菌素偶联抗原的酶标板;

[0063] (2) 甲氨基阿维菌素标准品溶液6瓶;

[0064] (3) 用辣根过氧化物酶标记的甲氨基阿维菌素抗体;

[0065] (4) 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;

[0066] (5) 终止液为2mol/L硫酸;

[0067] (6) 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。

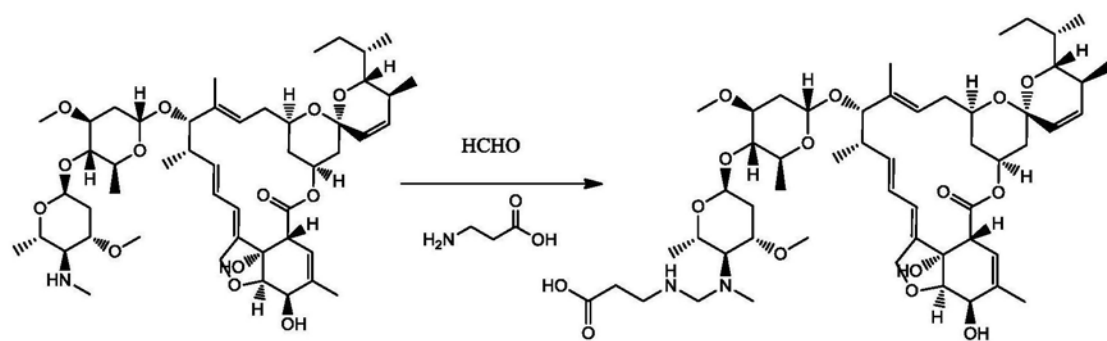


图1

专利名称(译)	一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备及其应用		
公开(公告)号	CN110618269A	公开(公告)日	2019-12-27
申请号	CN201910830326.X	申请日	2019-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 万宇平 贾芳芳 崔海峰 朱亮亮 冯才伟 王兆芹		
发明人	何方洋 万宇平 贾芳芳 崔海峰 朱亮亮 冯才伟 凡静静 王兆芹		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54306 G01N33/558 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种甲氨基阿维菌素单克隆抗体的制备方法，并将其应用于甲氨基阿维菌素残留检测试纸条和酶联免疫试剂盒。试纸条包括：样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)和底板(7)，所述反应膜上具有包被有甲氨基阿维菌素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(5)和包被有羊抗鼠抗体的质控线(6)，所述结合物释放垫(2)喷涂有甲氨基阿维菌素单克隆抗体-胶体金标记物。试剂盒包括：包被有包被原的酶标板、甲氨基阿维菌素标准品溶液、甲氨基阿维菌素抗体、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液，所述包被原为甲氨基阿维菌素偶联抗原，所述酶结合物为酶标记的甲氨基阿维菌素抗体。本发明所提供的试纸条和酶联免疫试剂盒具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低等特点，适合大量样本的筛查和现场监控。

