



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106282124 A

(43)申请公布日 2017.01.04

(21)申请号 201610707096.4

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2016.08.24

G01N 33/531(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC No.12026 2016.01.20

(71)申请人 江南大学

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72)发明人 刘丽强 彭娟 胥传来 匡华

徐丽广 宋珊珊 吴晓玲 胡拥明

(74)专利代理机构 无锡盛阳专利商标事务所

(普通合伙) 32227

代理人 顾吉云

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种单克隆细胞株C4及其产生的群选性单克隆抗体和应用

(57)摘要

本发明提供了一种单克隆细胞株C4,其能够产生同时识别21种喹诺酮类抗生素的群选性单克隆抗体,能够用于建立喹诺酮类抗生素的免疫检测技术。一种单克隆细胞株C4,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.12026。

1. 一种单克隆细胞株C4,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. 12026。

2. 一种喹诺酮类抗生素群选择性单克隆抗体,其由保藏号为 CGMCC No.12026的单克隆细胞株C4产生。

3. 根据权利要求1所述的一种喹诺酮类抗生素群选择性单克隆抗体,其特征在于:所述喹诺酮类抗生素包括诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、氟甲喹、那氟沙星、依诺沙星、洛美沙星、左氧氟沙星、培氟沙星、萘啶酸、达氟沙星、吡啶酸、西诺沙星、呋喃酸、马波沙星、帕珠沙星、司氟沙星、加替沙星、奥比沙星和氟罗沙星。

4. 如权利要求2或3所述的一种喹诺酮类抗生素群选择性单克隆抗体在检测喹诺酮类抗生素总量中的应用。

5. 如权利要求2或3所述的一种喹诺酮类抗生素群选择性单克隆抗体在制备检测喹诺酮类抗生素的免疫工具中的应用。

## 一种单克隆细胞株C4及其产生的群选性单克隆抗体和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种单克隆细胞株C4及其产生的群选性单克隆抗体和应用,属于免疫化学技术领域。

### 背景技术

[0002] 喹诺酮类是一类人工合成的以4-喹诺酮为基本结构的抗菌药,其通过作用于细菌的脱氧核糖核酸(DNA),阻碍DNA回旋酶,造成细菌DNA的不可逆破坏而达到抗菌效果。然而,许多喹诺酮类抗生素已经被证实对人类和动物有一定程度的毒性影响,特别是萘啶酸已经被证实有致癌和致突变作用,影响光敏性以及繁殖系统有干扰作用。另外,因喹诺酮类抗生素的滥用而造成的抗生素残留问题也日益威胁着环境,及人类健康。

[0003] 目前,针对喹诺酮类抗生素的分析方法有仪器分析方法和免疫分析法。其中最广泛的包括高效液相色谱分析方法(HPLC)、气质联用(GC-MS)、液质联用(LC-MS)等。然而这些方法需要昂贵的仪器、专业的操作人员和复杂的样品前处理,不适用于食品中喹诺酮类抗生素的日常快速检测。随着检测喹诺酮类抗生素的免疫检测技术的发展,不仅可以解决上述问题,并且具有高通量和低成本的优势,适于现场的批量检测。建立喹诺酮类抗生素的免疫检测技术,首先要获得喹诺酮类抗生素的群选性单克隆抗体。

### 发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明提供了一种单克隆细胞株C4,其能够产生同时识别21种喹诺酮类抗生素的群选性单克隆抗体,能够用于建立喹诺酮类抗生素的免疫检测技术。

[0005] 一种单克隆细胞株C4,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. 12026。

[0006] 一种喹诺酮类抗生素群选性单克隆抗体,其由保藏号为CGMCC No.12026的单克隆细胞株C4产生。

[0007] 其进一步特征在于:所述喹诺酮类抗生素包括诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、氟甲喹、那氟沙星、依诺沙星、洛美沙星、左氧氟沙星、培氟沙星、萘啶酸、达氟沙星、吡啶酸、西诺沙星、呋喃酸、马波沙星、帕珠沙星、司氟沙星、加替沙星、奥比沙星和氟罗沙星。

[0008] 本发明还提供了上述喹诺酮类抗生素群选性单克隆抗体在检测喹诺酮类抗生素总量中的应用。

[0009] 以及,上述喹诺酮类抗生素群选性单克隆抗体在制备检测喹诺酮类抗生素的免疫工具中的应用。

[0010] 本发明的有益效果:由单克隆细胞株C4产生的群选性单克隆抗体可以同时识别21种喹诺酮类抗生素,包括诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、氟甲喹、那氟沙星、依诺沙星、洛美沙星、左氧氟沙星、培氟沙星、萘啶酸、达氟沙星、吡啶酸、西诺沙星、呋喃酸、马波沙星、帕珠沙星、司氟沙星、加替沙星、奥比沙星和氟罗沙星;且灵敏度好,半数抑制浓

度(IC 50)在 0.1-50ng/mL 之间;为研制食品中喹诺酮类多残检测的免疫工具提供了原料,例如免疫层析试纸条。

#### [0011] 生物保藏说明

用于保藏的杂交瘤细胞株的分类名为:单克隆细胞株C4;

保藏单位全称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;

保藏单位简称:CGMCC;

保藏单位地址: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;

保藏日期:2016年1月20日

保藏编号:CGMCCNo. 12026。

#### 具体实施方式

[0012] 本发明提供了单克隆细胞株C4号及其分泌的抗喹诺酮类抗生素的群选性单克隆抗体。下面结合具体实施方式对本发明做进一步的说明,实施例如无特殊说明均为常规方法。

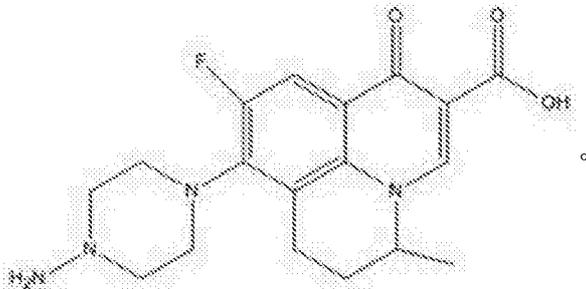
#### [0013] 实施例1 单克隆细胞株C4 号的制备

##### 1、动物免疫和血清筛选

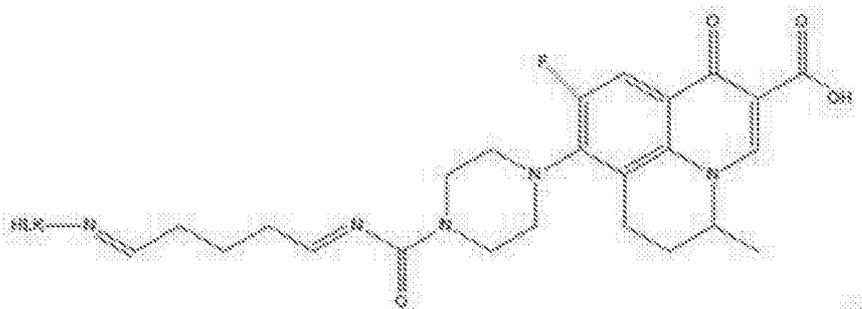
选择半抗原 1(H1)和血蓝蛋白(KLH)的偶联物(H1-KLH)作为免疫原。

[0014] 首免采用完全佐剂和免疫原1:1体积混合,以皮下免疫方式免疫BALB/c小鼠,免疫间隔时间4周,五免后 7-10d,采用间接竞争酶联免疫法测定血清的效价和抑制,选择效价高并抑制好的小鼠进行融合。

[0015] 其中,半抗原1为那氟沙星衍生物,半抗原 1的结构为:



[0016] 免疫原的结构为:



#### [0017] 2、细胞融合

融合前7至10天,用含10%胎牛血清的RPMI-1640 培养基在5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养瘤细胞。融合前3天,对选出的小鼠进行腹腔冲刺免疫,融合当天,摘眼球取血,采用颈椎脱臼法处死小鼠后,立即放入 75% 酒精中消毒,浸泡 5 min 左右,采用无菌操作取出 BALB/c 小

鼠的脾脏,用注射器的胶头适度用力地在筛网上研磨脾脏,脾细胞漏出筛网得到悬液,收集,离心(1200rpm,6 min),用 RPMI-1640 培养基洗涤脾细胞三次,最后一次离心后,将脾细胞稀释到一定体积后,计数,备用。

[0018] 第三步,融合,将脾细胞和 SP2/0 瘤细胞按照质量比 5-10:1 比例进行混合,离心(1200 rpm,6 min),弃上清。融合过程大概约 7 min。第 1 min 内,将 1 mL 的 PEG 1500 由慢到快滴加到细胞中;第 2 min,用手握住管底,静置。第 3 min 和第 4 min,在 1 min 内滴加 1 mL 的 RPMI-1640 培养基;第 5 min 和第 6 min,在 1 min 内滴加 2 mL 的 RPMI-1640 培养基。第 7 min,在 1 min 内滴加 3-4 mL 的 RPMI-1640 培养基。然后用 RPMI-1640 培养基将体积增加到 15 mL。在 37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中,静置 5 min。离心(800 rpm,6 min),弃上清,在棉球上轻轻地弹散细胞,然后用 HAT 培养基重悬细胞,按照 200μL/孔注入到 96 孔细胞板。最后,置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

[0019] 3、筛选和亚克隆

融合按第1天计,第4天进行HAT培养基半换液,第6天进行HAT培养基全换液;并且每天观察 96 孔细胞板中杂交瘤细胞的生长情况。第 8 天进行融合后细胞上清的第一次检测。

[0020] 在抗体筛选过程中,用五种代表性的标准品沙拉沙星,氟甲喹,环丙沙星,诺氟沙星,恩诺沙星筛选细胞上清。筛选细胞上清的方法仍然是间接竞争酶联免疫法,先将细胞上清稀释3倍,测定效价。然后再测每个阳性孔的抑制。因为空白值大小,对抗体灵敏度的影响很大,所以,在测定细胞上清抑制时,往往需要对细胞上清进行多个不同倍数的稀释。最后根据检测结果,选择阳性强,抑制好并且生长状态良好的细胞通过有限稀释法进行亚克隆。第一次亚克隆以后,第 6 天就可以取细胞上清进行测定。按照和融合后细胞检测一样的方法和原理,筛选亚克隆后细胞上清的效价和抑制。经过第二、三次亚克隆以后,根据阳性率 98% 并且整块板的抑制效果相近,选出细胞扩培和冻存。

[0021] 实施例2 群选择性单克隆抗体的制备、纯化

#### 1、群选择性单克隆抗体的制备

选择健康的 BALB/c 小鼠,按照 0.6 mL/只小鼠的量注射无菌石蜡油。10 天后,每只小鼠腹腔注射 $1 \times 10^6$ 杂交瘤细胞。第6天后,每天观察小鼠的状态,如果小鼠的腹部明显增大,用手触摸有紧绷感,并且不愿活动时,可以收集腹水;然后离心(6000 rpm,12 min),除去红细胞等杂质,分装,-20℃冻存。

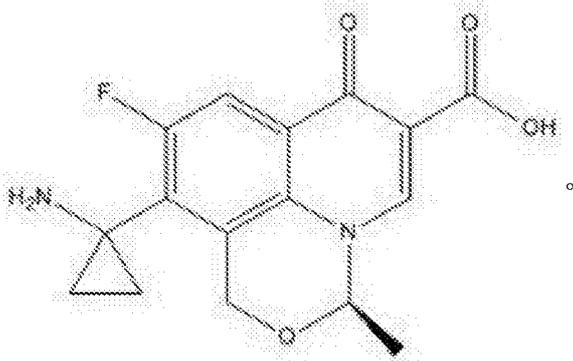
[0022] 2、群选择性单克隆抗体纯化

采用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水。在pH=4条件下,正辛酸可以沉淀腹水中除 IgG 免疫球蛋白外的其他杂蛋白,然后离心,弃沉淀;再用饱和的硫酸铵溶液沉淀 IgG 型的单克隆抗体,离心,弃上清,用 0.01M PBS 溶液(pH 7.0)溶解后,透析脱盐,最终得到纯化后的群选择性单克隆抗体。

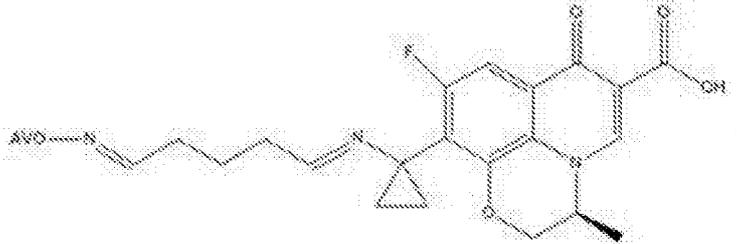
[0023] 实施例3 灵敏度的测定

抗体灵敏度采用半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)来表示。纯化的腹水通过间接竞争酶联免疫法(ic-ELISA)来测定单克隆抗体对 21种喹诺酮类抗生素浓度在 0-200 ng/mL 之间的抑制效果。选择半抗原 2(H2)和鸡卵清蛋白(OVA)的偶联物(H2-OVA)作为包被原,其中,半抗原2为帕珠沙星。

[0024] 半抗原 2的结构为:



[0025] 包被原的结构为：



[0026] 偶联物(H1-KLH)以及偶联物(H2-OVA)均可通过戊二醛法得到。

[0027] 本发明在那氟沙星的哌嗪环上引入酰胺基形成那氟沙星衍生物,作为半抗原1(H1),再通过戊二醛法和血蓝蛋白偶联用作免疫原,充分暴露喹诺酮类共有的母核结构,从而得到识别多种喹诺酮类的群选性抗体;将帕珠沙星,即半抗原2(H2),通过戊二醛法和鸡卵清蛋白偶联,形成异源包被,从而提高方法的灵敏度。

[0028] 包被原 H2-OVA浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,抗体的蛋白浓度为 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,测定结果用 origin 8.5 软件进行四参数回归拟合,根据拟合的回归方程,计算抗体对各种喹诺酮类抗生素的 IC<sub>50</sub>,检测结果见表 1。

[0029] 表1:

喹诺酮类抗生素名称	半数抑制浓度 (ng/ml)
诺氟沙星	1
氧氟沙星	1
恩诺沙星	1
环丙沙星	1
氟甲喹	0.5
那氟沙星	0.5
依诺沙星	0.1
洛美沙星	0.5
左氧氟沙星	1
培氟沙星	0.8
萘啶酸	1
达氟沙星	1.8
吡啶酸	1.2
西诺沙星	2.4
恶喹酸	0.2
马波沙星	2
帕珠沙星	0.8
司氟沙星	20
加替沙星	50
奥比沙星	1
氟罗沙星	4

专利名称(译)	一种单克隆细胞株C4及其产生的群选性单克隆抗体和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106282124A</a>	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201610707096.4	申请日	2016-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	刘丽强 彭娟 胥传来 匡华 徐丽广 宋珊珊 吴晓玲 胡拥明		
发明人	刘丽强 彭娟 胥传来 匡华 徐丽广 宋珊珊 吴晓玲 胡拥明		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/531 G01N33/577 G01N2430/00		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种单克隆细胞株C4，其能够产生同时识别21种喹诺酮类抗生素的群选性单克隆抗体，能够用于建立喹诺酮类抗生素的免疫检测技术。一种单克隆细胞株C4，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.12026。

喹诺酮类抗生素名称	半数抑制浓度 (ng/ml)
诺氟沙星	1
氧氟沙星	1
恩诺沙星	1
环丙沙星	1
氟甲喹	0.5
那氟沙星	0.5
依诺沙星	0.1
洛美沙星	0.5
左氧氟沙星	1
培氟沙星	0.8
萘啶酸	1
达氟沙星	1.8
吡啶酸	1.2
西诺沙星	2.4
恶喹酸	0.2
马波沙星	2
帕珠沙星	0.8
司氟沙星	20
加替沙星	50
奥比沙星	1
氟罗沙星	4