



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105838681 A

(43)申请公布日 2016.08.10

(21)申请号 201610363971.1

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2016.05.30

G01N 33/577(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/53(2006.01)

CGMCC No.12018 2016.01.20

C12R 1/91(2006.01)

(71)申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号江南大学食品学院

(72)发明人 刘丽强 王忠兴 胥传来 匡华

徐丽广 马伟 吴晓玲 宋珊珊

胡拥明

(74)专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 张仕婷

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

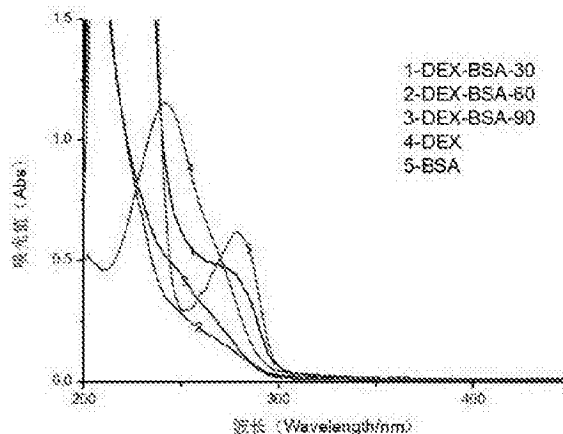
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3及其应用

(57)摘要

一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3及其应用,属于食品安全免疫检测技术领域。本发明抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3,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.12018。抗地塞米松特异性单克隆抗体,它由所述抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3分泌产生。所述杂交瘤细胞株C3可以分泌产生对地塞米松具有较好的特异性和较高灵敏度的单克隆抗体,对地塞米松的50%抑制浓度IC₅₀为0.05μg/L,可以用于食品安全中地塞米松残留的特异性检测。



1. 一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3,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,保藏编号为CGMCC No.12018。
2. 抗地塞米松特异性单克隆抗体,其特征在于:它由所述保藏编号为CGMCC No.12018的抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3分泌产生。
3. 权利要求2所述抗地塞米松特异性单克隆抗体的应用,其特征在于:其在食品安全中地塞米松残留检测中的应用。

一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3及其应用,属于食品安全免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 地塞米松(DEX)是人工合成的临床上常用的糖皮质激素类药物之一,具有抗炎、抗过敏和抗休克的作用,还可以用于畜牧养殖业,提高饲料转化率,从而增加动物体重。由于不合理的使用该类药物可在动物体内残留,长期食用该类药物残留的食品,会造成药物在体内蓄积,当其浓度达到一定量时,就会对人体产生多种急性或慢性中毒。地塞米松是激素类药物,能扰乱体内激素分泌,降低机体免疫力,造成肌肉萎缩无力,骨质疏松和生长迟缓等直接危害,而且还会出现发热,软弱无力,精神沉郁,食欲不振,血糖和血压下降等症状。

[0003] 因此,世界各国严格禁止将地塞米松作为生长激素使用,同时普遍限制此药用于动物源性食品,并提出了严格的限量要求。欧盟动物源性食品最高残留限量规定,地塞米松的最高残留限量为肌肉0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肝脏2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肾脏0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、牛奶0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国农业部235号公告规定,地塞米松的最高残留限量为牛、猪、马肌肉0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肝脏2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肾脏0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、牛奶0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 目前地塞米松检测多采用高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱与质谱联用法(LC-MS)、气质联用法(GC-MS)等。上述检测方法可进行定量分析并具有较高的检测限,但是通常需要昂贵的仪器和复杂的操作,前处理及检测时间长,严重制约了这些检测方法的推广,无法达到现场大批量快速检测的要求。而免疫分析方法具有低成本、高通量、高灵敏、对技术人员相对要求低等特点,因此适用于大量样品的快速筛查。本发明的目的在于提供一种对地塞米松具有较高亲和力和检测灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株的制备方法,为间接竞争 ELISA 试剂盒以及胶体金试纸条的研发推广奠定基础。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株,由该细胞株制备的抗体对地塞米松具有较好特异性和检测灵敏度,可以用来建立地塞米松的免疫学检测方法。

[0006] 本发明的技术方案,一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3,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,保藏编号为CGMCC No.12018。

[0007] 抗地塞米松特异性单克隆抗体,它由所述保藏编号为CGMCC No.12018的抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3分泌产生。

[0008] 所述抗地塞米松特异性单克隆抗体的应用,其在食品安全中地塞米松残留检测中的应用。

[0009] 所述抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3的制备步骤为:

(1)半抗原的制备:称取地塞米松(DEX)和丁二酸酐(SA)于圆底烧瓶中,加入无水吡啶溶解混合,60℃下加热搅拌6h,将反应物转入盐酸水溶液中,有白色沉淀析出,离心除去过量的反应物,去离子水洗涤数次,离心,干燥箱干燥后保存;

(2)免疫原的制备与鉴定:衍生后的半抗原通过碳化二亚胺法(EDC法)与蛋白载体的氨基相连,反应结束后,通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原,完全抗原通过紫外吸收扫描方法鉴定;

(3)小鼠的免疫:将免疫原与福氏佐剂乳化完全后,通过皮下多点注射免疫BALB/c小鼠。首次免疫采用福氏完全佐剂,加强免疫使用福氏不完全佐剂,冲刺免疫时免疫剂量为前一次免疫剂量的一半,与生理盐水混合均匀后直接进行腹腔注射;各次免疫间隔为三周。第三次免疫后,间隔一周采血检测血清效价和抑制;

(4)细胞融合与细胞株建立:通过聚乙二醇(PEG 4000)法,使小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合,通过HAT培养基培养,利用间接ELISA检测阳性细胞孔,并进一步利用间接竞争ELISA法测定阳性细胞孔的抑制效果,通过有限稀释法对有最好抑制的阳性细胞孔进行三次亚克隆,最终筛选获得抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3;

(5)杂交瘤细胞株性质的鉴定:采用小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用酶标二抗套装测定;IC₅₀值、交叉反应率和亲和力的测定通过ELISA法。

[0010] 本发明的有益效果:本发明获得的抗地塞米松单克隆抗体杂交瘤细胞株,其分泌的抗地塞米松特异性单克隆抗体对地塞米松有较好的检测灵敏度和亲和力;本发明还提供了一种新的合成地塞米松免疫原的方法,半抗原的合成步骤更加简化,有效,为今后人们的研究提供了合成免疫原的思路与方法。

[0011] 生物材料样品保藏:单克隆细胞株C3,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: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.12018,保藏日期2016年1月20日。

附图说明

[0012] 图1 免疫原的紫外吸收光谱表征。

[0013] 图2 抗地塞米松特异性单克隆抗体对地塞米松的标准抑制曲线。

具体实施方式

[0014] 本发明下面的实施例仅作为本发明内容的进一步说明,不能作为本发明的限定内容或范围。下面通过实施例对本发明作进一步说明。

[0015] 本发明通过将地塞米松完全抗原免疫小鼠,通过细胞融合,HAT选择性培养基培养,通过间接ELISA和间接竞争ELISA筛选细胞上清,最终得到了对地塞米松有较好亲和力和灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0016] 实施例1抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3的制备

(1)完全抗原的合成:

a、半抗原的合成:称取0.32g地塞米松(DEX)和0.24g 丁二酸酐(SA)于50mL圆底烧瓶中,加入5mL无水吡啶,混合物在60℃下加热搅拌6h,将反应物转入体积浓度为10%的HCl的冰水溶液(4℃)中,有白色沉淀析出,离心除去吡啶及过量的SA,去离子水洗涤数次,离心,

干燥箱干燥后保存,得到半抗原;

b、完全抗原的合成:取5mg上述半抗原,再加入3.0 mg EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和2.0 mg NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),使用DMF(N,N-二甲基甲酰胺)溶解,室温搅拌,活化6h;另取10mg牛血清白蛋白(BSA)溶解于2mL、0.05M、pH9.6的碳酸盐缓冲溶液(CB)中;将上述活化液逐滴加入BSA溶液中,室温搅拌反应过夜后,取出免疫原PBS透析3天,-20℃分装保存。

[0017] (2)动物免疫:选择健康的6~8周龄的BALB/c小鼠进行免疫。取地塞米松完全抗原(1mg/mL)与等量福氏佐剂乳化均匀后,通过皮下多点注射免疫BALB/c小鼠,每只100 μ L。首次免疫采用福氏完全佐剂,加强免疫使用福氏不完全佐剂,冲刺免疫时免疫剂量为前一次免疫剂量的一半,与生理盐水混合均匀后直接进行腹腔注射;各次免疫间隔为三周。第三次免疫后,间隔一周采血检测血清效价和抑制;选择抑制最好的小鼠,在五免后18天冲刺免疫,准备融合。

[0018] (3)细胞融合:在冲刺免疫三天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量为4000)方法进行细胞融合,具体步骤如下:

c、无菌取小鼠脾脏,研磨并通过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,并进行细胞计数;

d、收集SP2/0细胞,悬浮于RPMI-1640基础培养液中,进行细胞计数;

e、将脾细胞和SP2/0细胞按照2-10:1的计数比例混合,离心后用PEG融合,时间1min,之后按照从慢到快,加入RPMI-1640基础培养液,离心后悬浮于含20%胎牛血清、2%的50 \times HAT的RPMI-1640筛选培养液中,加到96孔细胞培养板,置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。

[0019] (4)细胞筛选与细胞株建立:在细胞融合的第三天对融合细胞进行RPMI-1640筛选培养液半换液,第5天进行用含20%胎牛血清、1%的100 \times HT的RPMI-1640过渡培养液进行全换液,在第7天取细胞上清进行筛选。筛选分两步:第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔,第二步选用地塞米松为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选择对地塞米松有较好抑制的细胞孔,采用有限稀释法进行亚克隆,用同样的方法进行检测。重复三次,获得抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3。

[0020] (5)抗地塞米松特异性单克隆抗体的制备与鉴定:取8-10周龄BALB/c小鼠,每只小鼠腹腔注射石蜡油1mL;7天后每只小鼠腹腔注射1 \times 10⁶杂交瘤细胞C3,从第七天开始收集腹水,将腹水通过辛酸-饱和硫酸铵法纯化,获得的单抗置于-20℃保存。

[0021] 使用小鼠单抗亚型鉴定试剂盒对腹水纯化获得的单克隆抗体进行免疫球蛋白亚型鉴定,其亚型为IgG2b型,具体如表1所示。

[0022] 表1 地塞米松单克隆抗体的亚型鉴定

二抗亚类	OD值
IgA	0.109
IgG1	0.026
IgG2a	0.143
IgG2b	1.68
IgG3	0.12
IgM	0.166

使用间接竞争ELISA法,测定单克隆抗体对地塞米松的IC₅₀为0.05 μ g/L,可用于地塞

米松的特异性快速检测,具体如表2所示。

[0023] 表2. 抗地塞米松特异性单克隆抗体对氢化可的松(Hds),氟氢可的松(Fds),泼尼松龙(Pre),己烯雌酚(Des),己烷雌酚(Hes)以及孕酮(P)的IC₅₀和交叉反应率。

	IC ₅₀	交叉反应率
DEX	0.05	100.00%
Hds	>25	<0.2%
Fds	>25	<0.2%
Pre	>25	<0.2%
Des	>25	<0.2%
Hes	>25	<0.2%
P	>25	<0.2%

[0024] (6)抗体应用:将抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3通过体内腹水制备的单克隆抗体应用于地塞米松ELISA添加回收试验,具体步骤如下:

6.1用碳酸盐缓冲液(CBS)稀释好的0.1μg/mL的地塞米松包被作为包被原包被96孔酶标板,每孔100μL,37℃包被2h后,用PBST洗液洗板三次,每次每孔200μL,每次3 min,拍干;

6.2用含0.2%明胶的CBS进行封闭,每孔200μL,37℃封闭2h,用PBST洗液洗板三次,每次每孔200μL,每次3 min,拍干;

6.3用磷酸盐缓冲液(PBS)分别配置0,0.01,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1μg/L的地塞米松标准溶液。将标准溶液以及待检测样品提取液,分别加入到已经封闭好的酶标板中,每孔50μL,每个样品重复3个孔,再每孔加入50μL 1:16000稀释的抗地塞米松单克隆抗体,37℃反应0.5h后,洗板拍干;

6.4每孔加入100μL 用含0.1% 明胶的PBS 1:3000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG二抗,37℃反应0.5h后,洗板拍干;

6.5每孔加入100μL TMB显色液,37℃显色15min后,每孔加入50μL 2M H₂SO₄终止液,450 nm测吸光值;

6.6添加回收及样品前处理:称取1 g鸡肉样本添加三个不同剂量的地塞米松标准品,分别为0.2ng、0.5ng及1ng。均质后,加入50μL葡萄糖酸酶-芳基磺酸酯酶,混匀后,加入10mL的乙腈超声提取20min。向溶液中加入0.13g的NaCl,震荡均匀。8000rpm离心10min后提取1mL有机相氮气吹干,加入正己烷1mL,震荡1min后再加入标准品稀释液2mL,8000rpm离心5min后,取下层液用于检测。滤液用含0.01% 明胶的PBS稀释4倍后,作为ELISA样品提取液,采用间接竞争ELISA进行添加回收试验,其回收率分别为101%,95%,95%。

[0025] 溶液的配置:

碳酸盐缓冲液(CBS):称取Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃ 2.93g,分别溶于少量双蒸水后混合,加双蒸水至约800mL混匀,调pH值至9.6,加双蒸水定容至1000mL,4℃贮存备用;

磷酸盐缓冲液(PBS):8.00g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH₂PO₄,3.62g Na₂HPO₄·12 H₂O,溶于800mL纯水中,用NaOH或HCl调pH到7.2~7.4,定容至1000mL;

PBST:含0.05% Tween20的PBS;

TMB显色液:A液:Na₂HPO₄·12H₂O 18.43g,柠檬酸 9.33g,纯水定容至1000mL;B液:60mg TMB 溶于100mL乙二醇中。A、B液按体积比1:5混合即为TMB显色液,现用现混。

[0026] 综上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并非用来限定本发明的实施范围。即凡依本发明申请专利范围的内容所作的等效变化与修饰,都应为本发明的技术范畴。

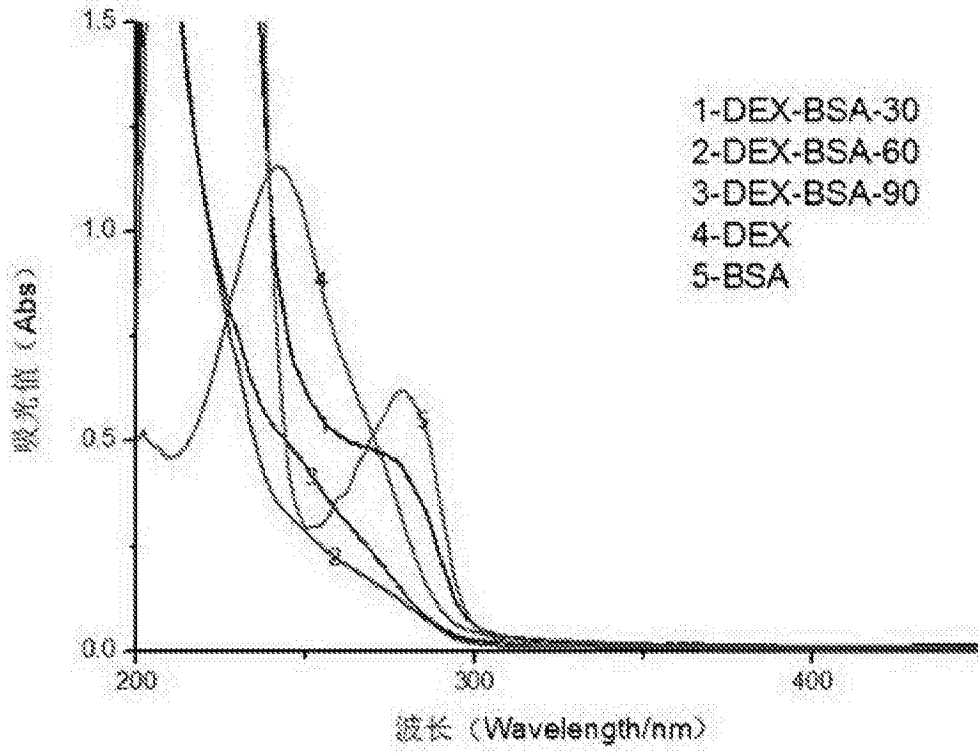


图1

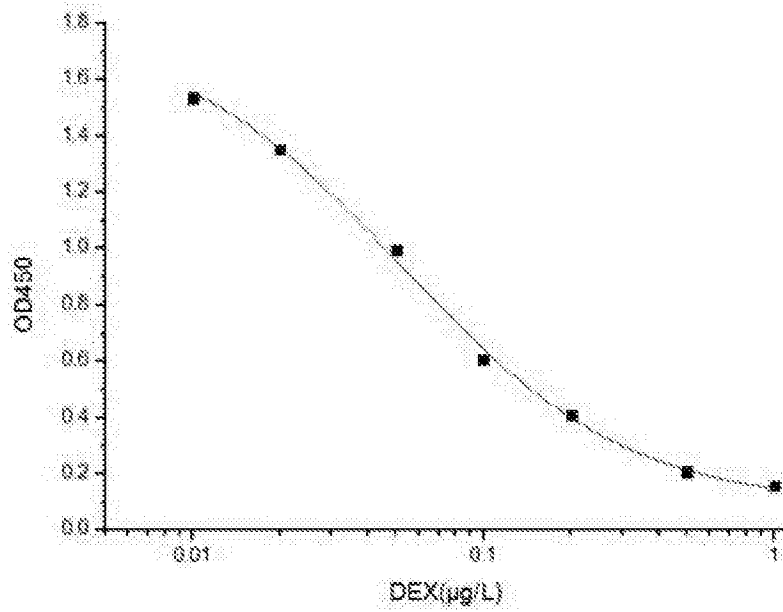


图2

专利名称(译)	一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3及其应用		
公开(公告)号	CN105838681A	公开(公告)日	2016-08-10
申请号	CN201610363971.1	申请日	2016-05-30
[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 王忠兴 胥传来 匡华 徐丽广 马伟 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明		
发明人	刘丽强 王忠兴 胥传来 匡华 徐丽广 马伟 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/53 C12R1/91		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/5308 G01N33/577 G01N2430/00		
其他公开文献	CN105838681B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一株抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3及其应用，属于食品安全免疫检测技术领域。本发明抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3，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.12018。抗地塞米松特异性单克隆抗体，它由所述抗地塞米松特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株C3分泌产生。所述杂交瘤细胞株C3可以分泌产生对地塞米松具有较好的特异性和较高灵敏度的单克隆抗体，对地塞米松的50%抑制浓度IC50为0.05μg/L，可以用于食品安全中地塞米松残留的特异性检测。

