



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106636010 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201710024593.9

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2017.01.13

G01N 33/53(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO: C201654 2016.03.29

(71)申请人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二
路2号

(72)发明人 李培武 唐晓倩 张奇 张文
姜俊

(74)专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102

代理人 乔宇

(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
序列表2页

(54)发明名称

杂交瘤细胞株Jnw1D2及其产生的抗甲萘威
单克隆抗体

(57)摘要

本发明涉及杂交瘤细胞株Jnw1D2及其产生的抗甲萘威单克隆抗体。本发明提供的杂交瘤细胞株Jnw1D2保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:C201654。其可以用于制备高效价抗甲萘威单克隆抗体,抗甲萘威鼠腹水抗体酶联免疫吸附分析(ELISA)法测得效价可达 1.6×10^4 。本发明提供的抗甲萘威单克隆抗体灵敏度高、特异性好,对甲萘威的50%抑制浓度IC50为0.668ng/mL。与克百威、涕灭威、灭多威等无交叉反应,可应用于甲萘威含量测定。

1. 杂交瘤细胞株Jnw1D2,其特征在於:它保藏於中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:C201654。

2. 抗甲萘威单克隆抗体,它由保藏编号为CCTCC NO:C201654的杂交瘤细胞株Jnw1D2分泌产生,所述抗体的重链可变区编码基因序列如SEQ ID NO.1所示,轻链可变区编码基因序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 权利要求1所述的抗甲萘威单克隆抗体在甲萘威含量测定中的应用。

4. 权利要求2所述的抗甲萘威单克隆抗体的制备方法,其特征在於:将权利要求1所述的杂交瘤细胞株Jnw1D2注射到预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠的腹部,收集该小鼠的腹水,纯化即得抗甲萘威单克隆抗体。

杂交瘤细胞株Jnw1D2及其产生的抗甲萘威单克隆抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及杂交瘤细胞株Jnw1D2及其产生的抗甲萘威单克隆抗体。

背景技术

[0002] 甲萘威是一种氨基甲酸酯类光谱杀虫剂,对于害虫具有触杀、胃毒作用,在我国农业生产中广泛使用,在世界范围内农产品及食品的农药残留检测中检出率最高的农药之一。甲萘威对哺乳动物具有中等毒性,对小鼠的半致死剂量(LD50)为300mg/kg。欧盟化学品审查委员会已提出禁止使用甲萘威,认为其属于第三类致癌物质。主要残留在谷物、水果和蔬菜中,对消费者健康具有潜在的威胁。因此,加强对甲萘威的检测是保障农产品及食品安全的一个重要环节。

[0003] 我国甲萘威在谷物中限量为0.5-1mg/kg,蔬菜中为1mg/kg,茶叶中为1mg/kg。目前用于甲萘威的检测方法主要采用基于色谱原理的紫外-高效液相色谱法、二极管矩阵-高效液相色谱法、荧光-高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)、质谱-高效液相色谱法等,这些方法灵敏度高、检测结果可靠。但是前处理和分析步骤复杂,需要专业的仪器,对操作人员专业性要求较高,检测成本高,耗时长。不适合现场大批量样品筛查检测。免疫分析方法克服了以上缺点,具有操作简单、成本低廉、不需专业仪器设备,适合现场筛查的特点。已经广泛应用于农产品检测领域。免疫分析以抗原抗体特异性结合反应为基础,通过标记物对抗体或抗原进行标记,将微量目标物信号放大,从而实现定量检测,抗体的灵敏度和特异性决定了所建立的免疫技术检测结果的准确度。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题是提供杂交瘤细胞株Jnw1D2及其产生的抗甲萘威单克隆抗体。

[0005] 本发明提供了杂交瘤细胞株Jnw1D2,该杂交瘤细胞株已于2016年3月29日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址是,中国,武汉,武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:C201654。其具有序列表中SEQ ID NO.1所示的抗甲萘威单克隆抗体重链可变区编码基因序列和序列表中SEQ ID NO.2所示的抗甲萘威单克隆抗体轻链可变区编码基因序列。

[0006] 本发明进一步提供了抗甲萘威单克隆抗体,它由保藏编号为CCTCC NO:C201654的杂交瘤细胞株Jnw1D2分泌产生。其重链可变区具有序列表中SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列;轻链可变区具有序列表中SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列。该抗甲萘威单克隆抗体可以识别甲萘威,对甲萘威的50%抑制浓度IC50为0.668ng/mL。

[0007] 上述抗甲萘威单克隆抗体在甲萘威含量测定中的应用。

[0008] 杂交瘤细胞株Jnw1D2的具体筛选步骤如下:将BALB/c小鼠经甲萘威完全抗原CNH-BSA免疫4-6次后,用2倍于前一次免疫剂量的完全抗原CNH-BSA做最后一次加强免疫,3天后进行细胞融合,待细胞融合后2-3周,用微量移液器将单个细胞集落移至96孔细胞培养板采用液体放大培养,进行第一次克隆,然后采用ELISA方法分两步筛选融合细胞:第一步采用

间接ELISA法筛选出抗甲萘威而不抗载体蛋白BSA的阳性孔,第二步采用间接竞争ELISA法对第一步筛选出的阳性孔培养液进行检测,用甲萘威标准品作为竞争原,选择吸光值和抑制率均较高的孔,采用有限稀释法进行亚克隆,亚克隆后采用同样的两步筛选法进行检测,如此重复亚克隆4-5次后,最终筛选获得杂交瘤细胞株Jnw1D2。

[0009] 本发明提供的抗甲萘威单克隆抗体的制备方法,步骤如下:将上述获得的杂交瘤细胞株Jnw1D2注射到预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠的腹部,收集该小鼠的腹水,纯化即得抗甲萘威单克隆抗体。

[0010] 按上述方案,所述的纯化方法为辛酸-硫酸铵法,具体步骤为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,4℃,12000r/min离心15min以上,吸取上清,将所得腹水上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为30-35μL,室温混合30-60min,4℃静置2h以上。12000r/min,4℃离心30min以上,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4,冰浴中缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h以上,然后12000r/min,4℃离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10体积的摩尔浓度为0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用0.01mol/L PBS透析两天将透析袋中蛋白溶液取出,离心,收集上清,弃沉淀,放入-70℃预冻后放入冻干机中冻干。收集冻干粉,即为纯化好的抗甲萘威单克隆抗体;

所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容到100mL所得;所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得;所述的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液为8g氯化钠,2.9g十二水磷酸氢二钠,0.2g氯化钾,0.2g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得。

[0011] 本发明的有益效果:

(1) 本发明提供的杂交瘤细胞株Jnw1D2可以用于制备高效价甲萘威单克隆抗体,通过酶联免疫吸附法(ELISA)测得抗体的效价可达 1.6×10^4 。

[0012] (2) 本发明提供的抗甲萘威单克隆抗体灵敏度高、特异性好,对甲萘威的50%抑制浓度 IC_{50} 为0.668ng/kg,与克百威、涕灭威、灭多威等无交叉反应。

[0013] (3) 本发明提供的甲萘威单克隆抗体可应用于甲萘威含量的测定。

具体实施方式

[0014] 实施例1:杂交瘤细胞株Jnw1D2的筛选

1. 动物免疫

购买6周龄BALB/c小鼠6只,用6-(1-萘氧基甲酰胺)-己酸(CNH)偶联牛血清白蛋白(BSA),获得甲萘威完全抗原CNH-BSA,免疫小鼠。第一次免疫将甲萘威完全抗原与等体积的弗氏完全佐剂乳化后,于小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于3周后进行,采用弗氏不完全佐剂与等体积的甲萘威完全抗原乳化,于小鼠颈背部皮下多点注射。第三次与第四次免疫分别与上一次免疫间隔两周,免疫方式与第二次相同。四次免疫剂量相同,仅为100μg/只。第三次免疫后第7天,小鼠尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA法监测小鼠血清效价,并用间接竞争ELISA法测定小鼠血清灵敏度,选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行加强免疫,免疫剂量为之前量的2倍。

[0015] 2. 细胞融合

于加强免疫3天后,采用50% (重量百分数)的聚乙二醇即PEG (分子量为1450)作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤:无菌条件下脱颈处死待融合小鼠,分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞SP2/0以5:1的个数比混合,用RPMI-1640基础培养液洗混合细胞,1200rpm,离心5min。弃去上清,控干,加入1mL PEG,融合1分钟,缓慢加入RPMI-1640基础培养液,离心,弃上清,沉淀即为融合细胞,用20mL含1% HAT的完全培养基重悬,将悬起的细胞加入到80mL半固体培养基中,混匀后加到6孔细胞培养板上,2mL/孔,置于37℃二氧化碳培养箱培养。

所述的含1% HAT的细胞完全培养基含有20% (体积百分数)胎牛血清,75% (体积百分数) RPMI-1640基础培养液,1% (重量百分数) L-谷氨酰胺,1% (体积百分数) HEPES,1% (体积百分数) 双抗 (10000单位每毫升青霉素和10000微克每毫升链霉素),2% (体积百分数) 生长因子 (HFCs) 和1% (重量百分数) 次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT和甲基纤维素购于sigma-Aldrich公司。

[0016] 细胞株的筛选及克隆

5. 待细胞融合后2-3周,细胞集落长至肉眼可见时,用微量移液器将克隆从培养基中挑出,转移至96孔细胞培养板采用HAT液体培养,待细胞长至2/3孔底时,吸取培养上清进行检测。采用两步筛选法,第一步采用间接ELISA方法,筛选出抗甲萘威而不抗载体蛋白BSA的阳性孔;第二步采用间接竞争ELISA法对第一步筛选出的阳性孔进行检测,用甲萘威作为竞争原,选择吸光值和灵敏度均较高的孔 (吸光值较高指竞争原为0的孔即阳性对照孔的最终测定值较高,灵敏度较高指抑制率为50%时的竞争原浓度亦IC50值较小),采用有限稀释法进行亚克隆,亚克隆后采用同样的两步法进行检测,如此重复亚克隆4-5次后,获得杂交瘤细胞株Jnw1D2,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:C201654。

[0017] 实施例2:抗甲萘威单克隆抗体杂交瘤细胞株Jnw1D2抗体可变区序列测定。

(1) 提取总RNA:采用天根公司的总RNA提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株Jnw1D2的总RNA;

(2) 合成cDNA:以步骤1获得的总RNA为模板,oLigo (dT) 15为引物,按照SuperScript™-2II反转录酶说明书进行反转录,合成cDNA第一链;引物oLigo (dT) 15由Invitrogen购得;

(3) PCR法克隆可变区基因:根据GENEBANK中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以cDNA为模板扩增抗体轻、重链可变区基因。PCR程序为:94℃ 30s、58℃ 45s、72℃ 1min,扩增30个循环,最后72℃延伸10min。PCR产物经过1% (重量百分数)的琼脂糖凝胶电泳分离后,用试剂盒纯化回收DNA片段,连接在载体pMD18-T中,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,挑取阳性克隆,送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序。其中引物的序列分别为:重链可变区引物为5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC-3' (21mer)和轻链可变区引物为5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC-3' (21mer)和5'-CAG GGG CCA GTG GAT AGA CAG ATG G-3' (21mer)。

[0018] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长339bp,序列如SEQ ID NO:1所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由113个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:3所示。轻链可变区编码基因序列长315bp,序列如SEQ ID NO:2所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由105个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:4所示。

[0019] 实施例3:抗甲萘威单克隆抗体的制备纯化、亚型和特性鉴定

将实施例1获得的抗甲萘威单克隆抗体杂交瘤细胞株Jnw1D2注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠,收集该小鼠的腹水,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,具体操作为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,4℃,12000r/min离心15min以上,吸取上清,将所得腹水上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为30-35 μL,室温混合30-60min,4℃静置2h以上。12000r/min,4℃离心30min以上,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1moI/L和pH为7.4的磷酸盐缓冲液,用2moI/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4,冰浴中缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h以上,然后12000r/min,4℃离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10体积的摩尔浓度为0.01moI/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用0.01moI/LPBS透析两天,再改用PB透析两天,将透析袋中蛋白溶液取出,离心,收集上清,弃沉淀,放入-70℃预冻后放入冻干机中冻干。收集冻干粉,即为纯化好的抗甲萘威单克隆抗体;

所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容到100mL所得;所述的0.01moI/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得;所述的0.1moI/L的磷酸盐缓冲液为8g氯化钠,2.9g十二水磷酸氢二钠,0.2g氯化钾,0.2g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得。

[0020] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株Jnw1D2分泌的抗甲萘威单克隆抗体的亚型为IgG2b。

[0021] 用常规非竞争酶联免疫吸附法(ELISA)测得小鼠腹水纯化得到的抗体效价可达到 1.6×10^4 ,即抗体稀释 1.6×10^4 倍时溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争ELISA测定其对甲萘威的灵敏度为0.668ng/mL。与克百威、涕灭威、灭多威等无交叉反应。

[0022] 实施例4:抗体应用

将杂交瘤细胞株Jnw1D2分泌的抗甲萘威单克隆抗体用于甲萘威添加回收试验,具体包括以下步骤:

(1) 以0.5μg/mL人工抗原CNH-OVA包被酶标板,每孔100μL,4℃过夜,0.01moI/L pH7.4PBST洗涤扣干;

(2) 5%脱脂奶粉封闭,每孔200μL,37℃ 2h,洗涤扣干;

(3) 用样品空白基质溶液分别配制500,166.6,55.6,18.5,6.2,2.0,0.68,0.22,0.07,0ng/mL的甲萘威标准溶液(含10%甲醇),依次加入50μL甲萘威基质加标溶液及50μL抗体工作液,37℃孵育30min,洗涤扣干;

(4) 每孔加入1:5000羊抗鼠IgG-HRP 100μL,37℃孵育30min,洗涤扣干;

(5) 底物显色反应:加底物显色液100μL/孔(显色液配方:1mg/mL四甲基联苯胺0.5mL,柠檬酸缓冲液9.5mL,1%H₂O₂ 32μL,现配现用),37℃孵育8min,2moI/LH₂SO₄终止反应,450nm处测吸光值;

(6) 绘制标准曲线,计算甲萘威对抗原抗体结合反应的抑制率在50%时的浓度。

(7) 添加回收试验:将空白样品粉碎均匀,-4℃冰箱保存,待用。称取25.0g备用样品,分别添加1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL甲萘威标准品,-4℃冰箱过夜,加入80mL70%甲醇溶液,匀浆机高速匀浆2min,双层滤纸过滤,制得样品基质溶液。采用间接竞争ELISA方法进行检

测,测定样品添加回收率依次为106.3%,85%,71.2%。

<110>	中国农业科学院油料作物研究所	
<120>	杂交瘤细胞株Jnw1D2及其产生的抗甲萘威单克隆抗体	
<160>	4	
<210>	1	
<211>	339bp	
<212>	DNA	
<213>	小鼠	
<400>	1	
	cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggegc cctcacagag	50
	cctgtccatc acttgcaactg tctctgggct ttcattaacc agctatggtg	100
	tacactgggt tcgtcagcc ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta	150
	at ttgggggtg gtggaaacac aaattataat tcggetetca tgtccagact	200
	gagcatcagc aaagacaact ccaggagcca agttttctta agaatgaaca	250
	gtctgcaaat tgatgacaca gccatgtact attgtgccag aggcaggatg	300
	gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctctgta	339
<210>	1	
<211>	315bp	
<212>	DNA	
<213>	小鼠	
<400>	2	
	gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga	50
	aagagtcact atcacttgca aggcgagtca ggacattagt agctatttag	100
	gctggttaca gcagaaacca gggaaatctc ctaagaccet gatctatcgt	150
	gcaaacacat tggtagaagg ggtcccatcc agattcagtg gcagtggatc	200
	tggggaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat gaagatatgg	250
	gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgtacac gttcggaggg	300
	gggaccaagc tggaa	315
<210>	1	
<211>	113	
<212>	PRT	
<213>	小鼠	
<400>	3	
	Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile	
	1 5 10 15 20	
	Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala	
	25 30 35 40	
	Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
	45 50 55 60	
	Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Arg Ser Gln Val Phe Leu	

	65	70	75	80
Arg Met Asn Ser	Leu Gln Ile Asp Asp	Thr Ala Met Tyr Tyr	Cys Ala Arg Gly Arg	Met
81	85	90	95	100
Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr Ser Val	Thr Val Ser Ser		
	105	110	113	
<210>	1			
<211>	105			
<212>	PRT			
<213>	小鼠			
<400>	4			
Asp Ile Lys Met	Thr Gln Ser Pro Ser	Ser Met Tyr Ala Ser	Leu Gly Glu Arg Val	Thr
1	5	10	15	20
Ile Thr Cys Lys	Ala Ser Gln Asp Ile	Ser Ser Tyr Leu Gly	Thr Leu Gln Gln Lys	Pro
	25	30	35	40
Gly Lys Ser Pro	Lys Thr Leu Ile Tyr	Arg Ala Asn Thr Leu	Val Glu Gly Val Pro	Ser
	45	50	55	60
Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Glu	Asp Tyr Ser Leu Thr	Ile Ser Ser Leu Glu	Thr
	65	70	75	80
Glu Asp Met Gly	Ile Tyr Tyr Cys Leu	Gln Tyr Asp Glu Phe	Pro Tyr Thr Phe Gly	Gly
	85	90	95	100
Gly Thr Lys Leu	Glu			
	105			

专利名称(译)	杂交瘤细胞株Jnw1D2及其产生的抗甲萘威单克隆抗体		
公开(公告)号	CN106636010A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201710024593.9	申请日	2017-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	李培武 唐晓倩 张奇 张文 姜俊		
发明人	李培武 唐晓倩 张奇 张文 姜俊		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/44		
代理人(译)	乔宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及杂交瘤细胞株Jnw1D2及其产生的抗甲萘威单克隆抗体。本发明提供的杂交瘤细胞株Jnw1D2保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO:C201654。其可以用于制备高效价抗甲萘威单克隆抗体，抗甲萘威鼠腹水抗体酶联免疫吸附分析(ELISA)法测得效价可达 1.6×10^4 。本发明提供的抗甲萘威单克隆抗体灵敏度高、特异性好，对甲萘威的50%抑制浓度IC₅₀为0.668ng/mL。与克百威、涕灭威、灭多威等无交叉反应，可应用于甲萘威含量测定。