



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106701686 B

(45)授权公告日 2020.01.31

(21)申请号 201610700184.1

(22)申请日 2016.08.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106701686 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(83)生物保藏信息

CGMCC No.12031 2016.01.20

(73)专利权人 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 徐丽广 陈燕妮 胥传来 匡华

刘丽强 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)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 102115780 A,2011.07.06,

EP 1056469 A1,2000.12.06,

Naoki Nagakura等.Anti-ampicillin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to various β -lactams.

《Journal of Antimicrobial Chemotherapy》.1991,第28卷(第3期),第357-368页.

安瑜等.液相色谱串联质谱法检测液态乳及原料乳中舒巴坦.《农产品加工》.2016,(第12(2016)期),第52-54页.

审查员 王琳

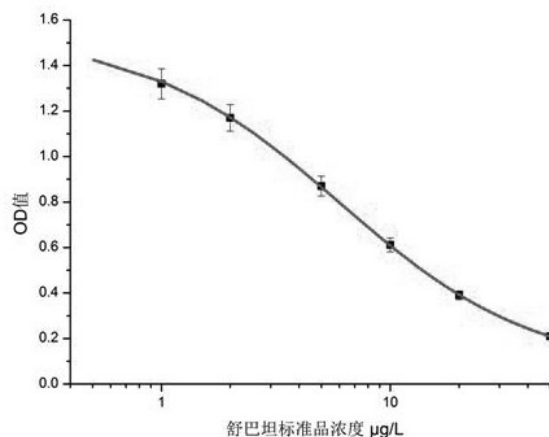
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种杂交瘤细胞株1A5、分泌的抗舒巴坦单克隆抗体及应用

(57)摘要

本发明提供了一株杂交瘤细胞株1A5,其分泌的抗舒巴坦单克隆抗体具有较好的检测灵敏度以及特异性。一株杂交瘤细胞株1A5,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.12031。



1. 一株杂交瘤细胞株1A5,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.12031。
2. 如权利要求1所述的杂交瘤细胞株1A5分泌的抗舒巴坦单克隆抗体。
3. 如权利要求1所述的杂交瘤细胞株1A5分泌的抗舒巴坦单克隆抗体在制备检测舒巴坦的免疫工具中的应用。

一种杂交瘤细胞株1A5、分泌的抗舒巴坦单克隆抗体及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学技术领域,具体涉及一种杂交瘤细胞株1A5、分泌的抗舒巴坦单克隆抗体及应用。

背景技术

[0002] 舒巴坦(SBT),又称青霉烷砜酸,为人工合成的不可逆的竞争性 β -内酰胺酶抑制剂,对革兰氏阳性及阴性菌所产生的 β -内酰胺酶均有抑制作用。舒巴坦本身的抗菌活性略弱,单用时仅对淋球菌和不动杆菌属有杀菌作用;但与青霉素类或头孢菌素类药物联用时,一般可以出现明显的协同作用,极大地提高了两者的抗菌活性,也扩大了抗菌谱。临床数据表明,过量使用舒巴坦可引起人转氨酶、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶升高,并可能引起皮疹,药热等过敏反应。一些违法分子在含有 β -内酰胺酶的食品中添加舒巴坦,使该酶失去活性,导致 β -内酰胺酶不能被检测出,为食品安全埋下了隐患,严重威胁消费者的身体健康,降低了消费者对食品安全尤其是乳品安全的信任度。

[0003] 目前,食品中舒巴坦残留的检测方法主要有:分光光度法、毛细管电泳法、气-质联用方法、液-质联用法、高效液相方法。其中,分光光度法的检测线差;毛细管电泳检测基质范围有限;气-质联用方法中,样品前处理需要进行衍生化反应,操作复杂,回收率低;液-质联用法灵敏度高,抗干扰能力强,但设备昂贵,前处理过程复杂。比较而言,酶联免疫法(ELISA)是一种极为高效、敏感、快速的检测方法,检测时对样本的纯度要求不高而且操作简便,适用于大量样本的现场快速检测。而获得具有较好的检测灵敏度以及特异性的抗舒巴坦单克隆抗体是舒巴坦的免疫检测技术得以实施应用的前提。

发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明提供了一株杂交瘤细胞株1A5,其分泌的抗舒巴坦单克隆抗体具有较好的检测灵敏度以及特异性。

[0005] 一株杂交瘤细胞株1A5,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.12031。

[0006] 本发明还提供了上述杂交瘤细胞株1A5分泌的抗舒巴坦单克隆抗体。

[0007] 本发明还提供了上述杂交瘤细胞株1A5分泌的抗舒巴坦单克隆抗体在检测舒巴坦中的应用。

[0008] 以及,上述杂交瘤细胞株1A5分泌的抗舒巴坦单克隆抗体在制备检测舒巴坦的免疫工具中的应用。

[0009] 本发明的上述杂交瘤细胞株1A5分泌的抗舒巴坦单克隆抗体的IC₅₀值为6.04 μ g/L,检测灵敏度高;与克拉维酸、他唑巴坦和氨苄西林交叉反应率低,特异性好。

附图说明

[0010] 图1为单克隆抗体1A5的抑制标准曲线。

[0011] 图2为免疫原与包被原的电泳检测图,图中泳道1:BSA,泳道2:SBT-OVA,泳道3:SBT-BSA。

[0012] 生物保藏说明

[0013] 用于保藏的杂交瘤细胞株的分类名为:单克隆细胞株YH3;其中,说明书中的“杂交瘤细胞株1A5”为实验室命名,而“单克隆细胞株YH3”为保藏时采用的分类命名;

[0014] 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;

[0015] 保藏单位简称:CGMCC;

[0016] 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;

[0017] 保藏日期:2016年1月20日;

[0018] 保藏编号:CGMCC No.12031。

具体实施方式

[0019] 实施例1

[0020] 1、免疫原的合成

[0021] 称取舒巴坦原药20.88mg(0.089mmol),溶解于3mL 无水DMF中;加入33μL(0.13mmol)三正丁胺在冰浴条件下搅拌10min;加入17.4μL(0.13mmol)氯甲酸乙丁酯,冰浴条件下活化40min;将活化好的液体加入到BSA溶液(100mg BSA,溶于PH 9.6的CBS缓冲溶液)中,冰浴条件下反应4h;反应混液用0.01M PBS 缓冲液透析三天,去除未反应的小分子。舒巴坦的包被原合成过程与免疫原合成过程类似,只用将载体蛋白BSA换成OVA。免疫原与包被原通过电泳来鉴定偶联结果,见图2,表明免疫原与包被原均偶联成功。

[0022] 2、动物免疫

[0023] 选择健康的6~8周龄的BALB/c小鼠进行免疫。取舒巴坦完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化后,通过背部皮下注射免疫BALB/c小鼠;第一次免疫用完全弗氏佐剂,免疫剂量为100μg/只;之后都用不完全弗氏佐剂,免疫剂量为50μg/只;首免与加强免之间间隔一个月,加强免之间间隔21天;三免后7天采血,使用间接竞争ELISA方法测定小鼠血清效价和抑制,选择效价高抑制好的小鼠,在四免后18天冲击免疫,不使用佐剂,腹腔注射,免疫剂量为20μg/只。

[0024] 3、细胞融合

[0025] 在冲击免疫三天后,按照PEG(聚乙二醇,分子量为1500)方法进行细胞融合,具体步骤如下:(1)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;(2)收集SP2/0细胞,悬浮于RPMI-1640基础培养液中,进行细胞计数;(3)将脾细胞和SP2/0细胞按照1:10 的比例混合,离心后用50% PEG融合,时间1 min,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×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。

[0026] 4、细胞筛选与细胞株建立在细胞融合的第3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×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。

[0027] 筛选分两步:第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔,第二步选用舒巴坦为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选择对舒巴坦标准品均有较好抑制的

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,其平均结果如表1所示,获得抑制效果较好的细胞株1A5。

[0028] 表1:

	细胞筛选阶段	细胞孔号	SBT 浓度 (ng/mL)	抑制率 (%)
	融合后	2D8	10	55.9
[0029]	一次克隆	1H9	5	44.2
	二次克隆	8G3	5	46.5
	三次克隆	1A5	5	48.1

[0030] 5、单克隆抗体的制备与鉴定

[0031] 取8-10周龄BALB/c小鼠,每只小鼠腹腔注射石蜡油1 mL;7天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 杂交瘤细胞,从第七天开始收集腹水,将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化,获得的单抗置于 -20°C 保存。

[0032] 采用间接竞争ELISA绘制标准曲线,标准曲线如图1所示,其 IC_{50} 为:6.04 $\mu\text{g/L}$,说明对舒巴坦有很好的灵敏度,可用于舒巴坦免疫分析检测。

[0033] 6、抗体的效价测定

[0034] 步骤5中制备的单克隆抗体的效价的测定:

[0035] (1)包被:将包被原SBT-OVA用0.05M、pH9.6的碳酸盐缓冲液从3 $\mu\text{g/mL}$ 开始倍比稀释,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2h;

[0036] (2)洗涤:将板内溶液倾去,甩干,并用洗涤液洗涤3次,每次3min;

[0037] (3)封闭:拍干后,加入200 μL /孔封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2h。洗涤后烘干备用;

[0038] (4)加样:将抗体从1:1000开始倍比稀释,并加入到各稀释度的包被孔中,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1h;充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗鼠IgG,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1h;

[0039] (5)显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100 μL 的TMB显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应15min;

[0040] (6)终止和测定:每孔加入50 μL 终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的 OD_{450} 值;

[0041] (7)结果判读:以 OD_{450} 值大于或等于阴性对照孔的2.1倍(即 $\text{P/N} \geq 2.1$)所对应的血清最高稀释倍数即为抗体的ELISA效价,抗体的效价为:在包被抗原浓度为3 mg/mL 的时候是8000:1。

[0042] 7、抗体的添加回收实验

[0043] 步骤5中制备的单克隆抗体应用于舒巴坦的ELISA添加回收试验。

[0044] 采样的牛奶经舒巴坦检测呈阴性,吸取1 mL 牛奶于15 mL 离心管中,向牛奶中分别添加20 ng 、50 ng 、100 ng 舒巴坦,用0.01M PBS稀释牛奶 20倍,采用间接ELISA 进行添加回收试验,其回收率分别为99.8%,103.2%,107.6%。

[0045] 8、药物交叉反应实验

[0046] 步骤5中制备的单克隆抗体与舒巴坦的结构类似物克拉维酸、他唑巴坦和氨苄西林进行竞争实验,其结果如表2所示。

[0047] 表2:

	类似物	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 (%)
[0048]	克拉维酸	60.98	9.9
	他唑巴坦	70.29	8.59
	氨苄西林	> 200	<5

[0049] 该单克隆抗体与其他类似药物反应的交叉率在10%以下,具有很好的特异性,因此,本发明制备的抗舒巴坦单克隆抗体能够用于舒巴坦的免疫检测。

[0050] 溶液的配制:

[0051] 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。

[0052] 磷酸盐缓冲液(PBS):8.00 g NaCl,0.2 g KCl,0.2 g KH₂PO₄,2.9 g Na₂HPO₄•12 H₂O,溶于800 mL纯水中,用NaOH或HCl调pH到7.2~7.4,定容至1000 mL;

[0053] PBST:含0.05% 吐温 20的PBS;

[0054] TMB显色液:A液:Na₂HPO₄•12H₂O 18.43g,柠檬酸 9.33g,纯水定容至1000 mL;B液:60 mg TMB 溶于100 mL乙二醇中。A、B液按1:5混合即为TMB显色液,现用现混。

[0055] 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。

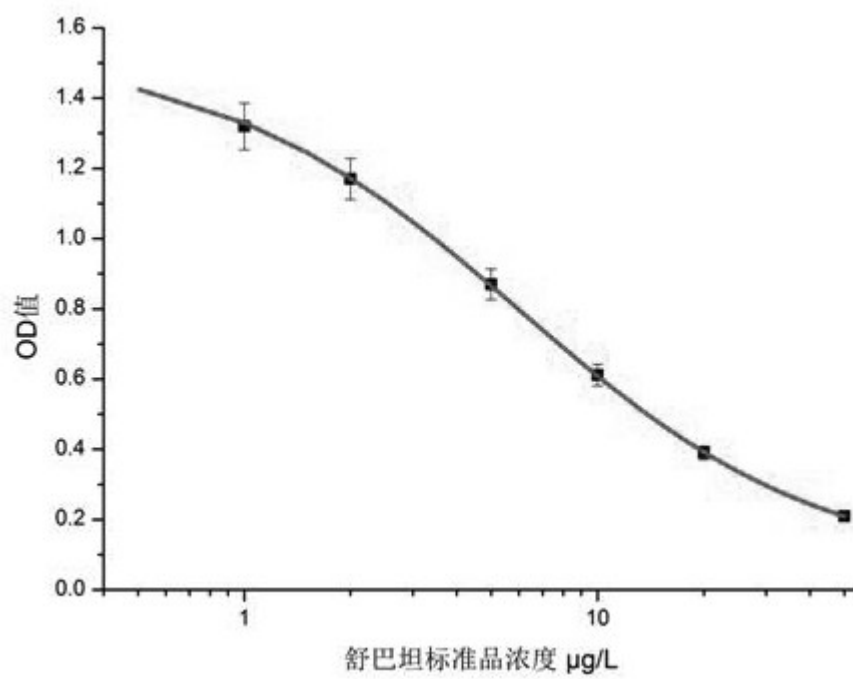


图1

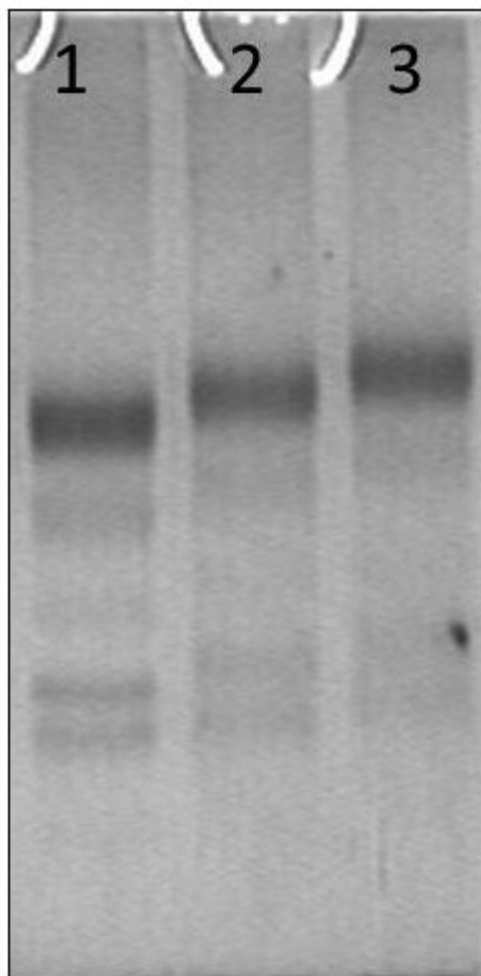


图2

专利名称(译)	一种杂交瘤细胞株1A5、分泌的抗舒巴坦单克隆抗体及应用		
公开(公告)号	CN106701686B	公开(公告)日	2020-01-31
申请号	CN201610700184.1	申请日	2016-08-23
[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	徐丽广 陈燕妮 胥传来 匡华 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲 胡拥明		
发明人	徐丽广 陈燕妮 胥传来 匡华 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲 胡拥明		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/531		
审查员(译)	王琳		
其他公开文献	CN106701686A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一株杂交瘤细胞株1A5，其分泌的抗舒巴坦单克隆抗体具有较好的检测灵敏度以及特异性。一株杂交瘤细胞株1A5，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. 12031。

