



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107099507 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201710285155.8

(22)申请日 2017.04.27

(83)生物保藏信息

CGMCC No.13092 2016.10.31

(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 匡华 蒋薇 胥传来 徐丽广

马伟 刘丽强 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)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

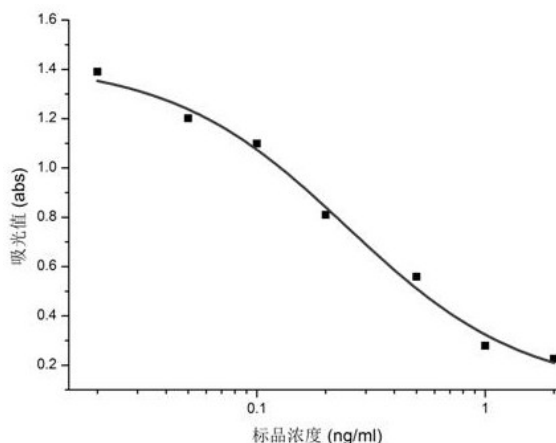
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6及其应用

(57)摘要

本发明公开了一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6及其应用,属于食品安全免疫检测领域。本发明一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6,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.13092。此细胞株分泌的单克隆抗体,对苯乙醇胺A具有较好的特异性和检测灵敏度(IC_{50} 值为0.24ng/mL),可以用于食品中苯乙醇胺A的残留检测。



1. 一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6, 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.13092。

2. 抗苯乙醇胺A单克隆抗体, 其特征在于: 它由所述保藏编号为CGMCC No. 13092的抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6分泌产生。

3. 权利要求2所述抗苯乙醇胺A单克隆抗体的应用, 其特征在于: 用于食品安全检测中苯乙醇胺A的残留检测。

一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6及其应用

技术领域

[0001] 本发明一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6及其应用,属于食品安全免疫学检测领域,涉及杂交瘤细胞株K-6及其产生的抗苯乙醇胺A单克隆抗体。

背景技术

[0002] β -肾上腺受体兴奋剂是一类能够促进瘦肉生长的饲料添加剂,能够显著提高猪、牛、羊等牲畜的瘦肉生长率,从而使体重也得以增加。且这类药物性质稳定、不易破坏,能通过进食摄取危害人体健康,严重的甚至有可能导致死亡。苯乙醇胺A具有典型的苯乙醇胺结构,由于同 β -肾上腺受体兴奋剂结构类似,因而被认为是一种新型“瘦肉精”。用其饲喂动物同样具有促进骨骼生长,减少脂肪蓄积,增加瘦肉率等作用。由于苯乙醇胺A(简称PEA)的检测手段滞后,替代克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等瘦肉精被广泛应用,造成苯乙醇胺A在可食性动物体内蓄积性残留,人食用后可引起头晕、心跳加快、肌肉震颤、心悸、呼吸困难等症状,严重可引起中毒,甚至死亡,严重威胁人类的健康。我国农业部的第1519号公告将苯乙醇胺A列为禁止在饲料和动物饮水中使用的物质。

[0003] 目前检测苯乙醇胺A的方法主要是液相色谱法(HPLC),液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS),酶联免疫吸附法,免疫亲和色谱柱和电化学传感器等方法,但是这些方法存在操作繁琐,耗时,费用比较贵等缺点,不能实现大量样品的快速检测,因此建立一种快速简便的检测方法具有重要意义。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。然而得到高特异性和高灵敏度的单克隆单体是免疫学检测的前提,其中人工抗原的合成是其中重要的一步。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种对苯乙醇胺A具有较好特异性和检测灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株的制备方法。

[0005] 本发明提供一种抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株,由该细胞株制备的抗体对苯乙醇胺A具有较好特异性和检测灵敏度,可以用来建立苯乙醇胺A的免疫学检测方法。

[0006] 本发明提供一种对苯乙醇胺A具有较好特异性和检测灵敏度的单克隆抗体的制备方法。

[0007] 本发明的技术方案:一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6,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.13092。

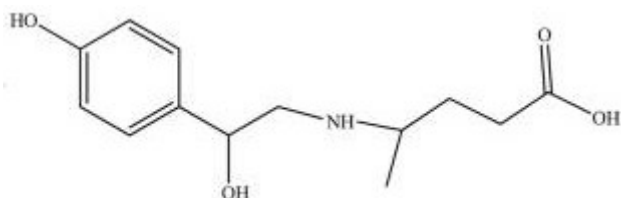
[0008] 抗苯乙醇胺A单克隆抗体,它由所述保藏编号为CGMCC No. 13092的抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6分泌产生。

[0009] 所述抗苯乙醇胺A单克隆抗体的应用,用于食品安全检测中苯乙醇胺A的残留检测。

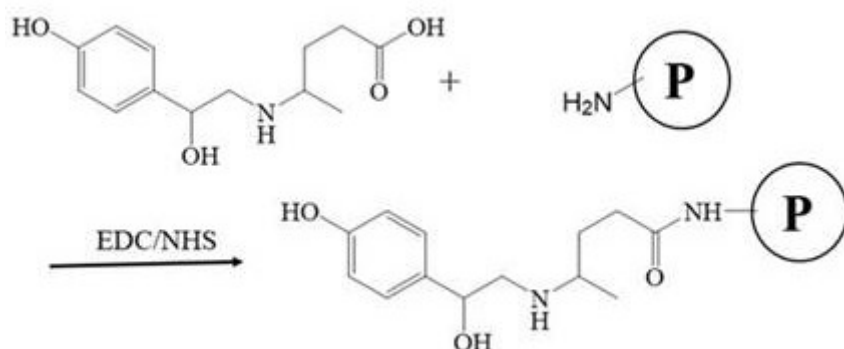
[0010] 本发明提供的细胞株K-6的制备基本步骤为:

1) 免疫原的合成: 采用兰尼镍还原法制备苯乙醇胺A的氨基衍生物制备含氨基半抗原, 采用重氮化法合成苯乙醇胺A人工抗原。称取4mg苯乙醇胺A于小玻璃瓶中, 加入200 μ L的1 M HCl溶液, 再加入1 mL超纯水至完全溶解, 4℃预冷30 min; 在溶液中加入18 μ L的30% NaNO₂溶液, 冰水浴反应1 h, 得到活化液; 用CB缓冲液稀释牛血清蛋白 (BSA) 12 mg; 将适量活化液滴加入载体蛋白BSA中, 边滴加活化液, 边调节pH至9.0, 直至反应液颜色变深黄色停止滴加活化液, 冰水浴反应4~6小时;

2) 包被原的合成: 利用章鱼胺, 发生还原胺化反应, 水解后引入活性羧基制备含羧基半抗原 (RCT), RCT半抗原结构式为:



称取10mg RCT半抗原于棕色小瓶中, 加入800 μ L的无水DMF和1mL的pH 4.7、0.1 M MES缓冲溶液溶解; 将22.6mg EDC和13.6mg NHS固体加入到半抗原反应瓶中, 搅拌6~8 h, 得到活化液; 称取牛血清蛋白BSA溶解于CB溶液中, 将活化液加入到蛋白质溶液中, 用1 M NaOH溶液调节pH至9.0, 室温反应过夜, 整个过程避光进行。通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原, 并通过紫外吸收扫描方法鉴定; 包被原偶联式RCT-BSA如下式所示:



3) 小鼠的免疫: 苯乙醇胺A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, 之后都用不完全弗氏佐剂。首免与加强免之间间隔一个月, 加强免之间间隔21天。最后一次用苯乙醇胺A完全抗原 (不含佐剂) 冲击免疫; 通过间接ELISA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 (PEG1500) 法将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, 最终筛选获得杂交瘤细胞株K-6;

5) 杂交瘤细胞株K-6性质的鉴定: 通过ELISA法测定灵敏度和特异性。

[0011] 本发明的优点在于: (1) 本发明获得的抗苯乙醇胺A单克隆抗体细胞株K-6, 对苯乙醇胺A有较好的检测灵敏度和特异性 (IC₅₀值为0.24ng/mL); (2) 一种新的半抗原合成的思路, 在用异原包被进行检测, 得到灵敏度很好的单克隆抗体细胞株。

[0012] 生物材料样品保藏: 一株单克隆细胞株K-6, 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,地址为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.13092,保藏日期2016年10月31日。

附图说明

[0013] 图1. 苯乙醇胺A免疫原合成紫外鉴定图。

[0014] 图2. 细胞株K-6分泌的单克隆抗体的抑制标准曲线。

具体实施方式

[0015] 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。

[0016] 本发明通过将苯乙醇胺A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,最终得到了对苯乙醇胺A有较好特异性和灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0017] 实施例 1: 杂交瘤细胞株K-6的制备

1、完全抗原的合成

称取4 mg苯乙醇胺A于小玻璃瓶中,加入200 μ L的1 M HCl溶液,再加入1 mL超纯水至完全溶解,4℃预冷30 min;在溶液中加入18 μ L的质量百分浓度30% NaNO₂溶液,冰水浴反应1 h,得到活化液;用CB缓冲液稀释牛血清蛋白(BSA) 12 mg;将适量活化液滴加入载体蛋白BSA中,边滴加活化液,边调节pH至9.0,直至反应液颜色变深黄色停止滴加活化液,冰水浴反应4~6小时后,通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子,并通过紫外吸收扫描方法鉴定。

[0018] 2、动物免疫

选择健康的6~8周龄的BALB/C小鼠进行免疫。取苯乙醇胺A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,之后都用不完全弗氏佐剂。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。

[0019] 3、细胞融合

在冲击免疫3天后,按照常规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细胞按照计数比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。

[0020] 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。筛选分两步:第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔,第二步选用苯乙醇胺A为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选择对苯乙醇胺A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,获得细胞株K-6。

[0021] 5、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1 mL;7天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 杂交瘤细胞,从第7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。

[0022] 使用间接竞争ELISA,测定单克隆抗体苯乙醇胺A的 IC_{50} 为:0.24ng/mL,说明对苯乙醇胺A有很好的灵敏度,可用于苯乙醇胺A免疫分析检测。

[0023] 6、抗体应用

将杂交瘤细胞株K-6通过体内腹水制备的单克隆抗体应用于苯乙醇胺A的ELISA添加回收试验,具体步骤如下:

(1)包被:将包被原RGT-BSA用0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液从 $2\mu\text{g/mL}$ 开始倍比稀释, $100\mu\text{L}$ /孔, 37°C 反应2h;

(2)洗涤:将板内溶液倾去,甩干,并用洗涤液洗涤3次,每次3min;

(3)封闭:拍干后,加入 $200\mu\text{L}$ /孔封闭液, 37°C 反应2h。洗涤后烘干备用;

(4)加样:将抗血清从1:1000开始倍比稀释,并加入到各稀释度的包被孔中, $100\mu\text{L}$ /孔, 37°C 反应30 min;充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗鼠IgG, $100\mu\text{L}$ /孔, 37°C 反应1 min;

(5)显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入 $100\mu\text{L}$ 的TMB显色液, 37°C 避光反应15min;

(6)终止和测定:每孔加入 $50\mu\text{L}$ 终止液 $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ 以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的 OD_{450} 值。

[0024] (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血清的ELISA效价。

[0025] 溶液的配制:

碳酸盐缓冲液(CBS):称取 Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 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°C 贮存备用;

磷酸盐缓冲液(PBS):8.00 g NaCl ,0.2 g KCl ,0.2 g KH_2PO_4 ,2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,溶于800 mL纯水中,用 NaOH 或 HCl 调pH到7.2~7.4,定容至1000 mL;

PBST:含0.05% 吐温 20的PBS;

TMB显色液:A液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 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。

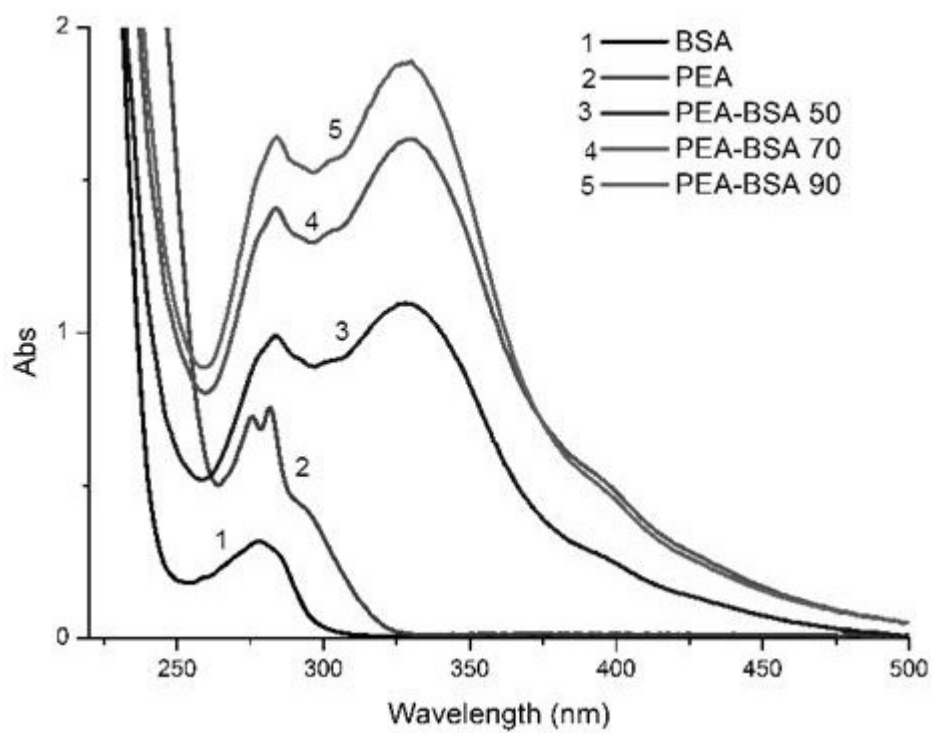


图1

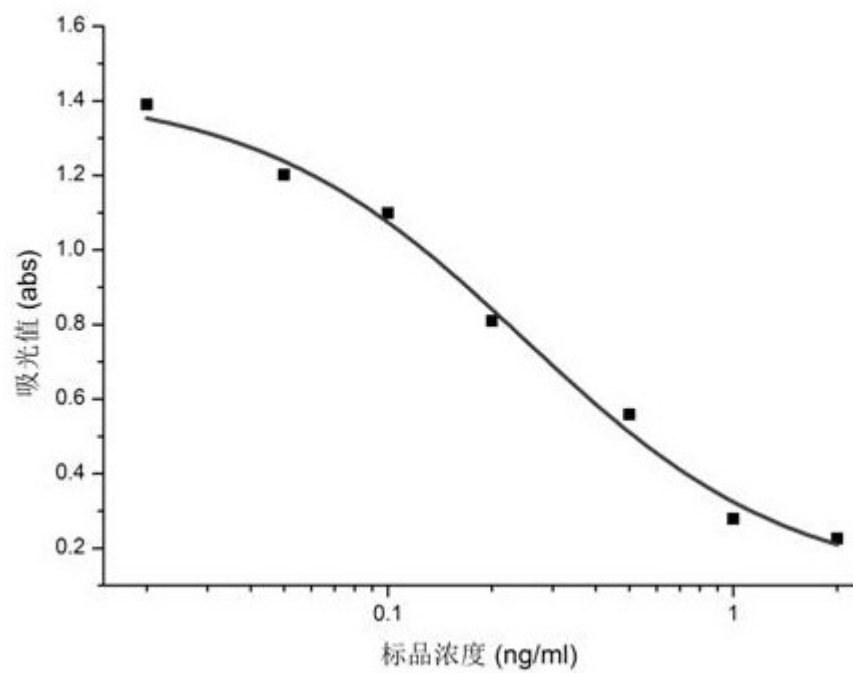


图2

专利名称(译)	一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6及其应用		
公开(公告)号	CN107099507A	公开(公告)日	2017-08-29
申请号	CN201710285155.8	申请日	2017-04-27
[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	匡华 蒋薇 胥传来 徐丽广 马伟 刘丽强 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明		
发明人	匡华 蒋薇 胥传来 徐丽广 马伟 刘丽强 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 C07K14/765 C07K1/107 G01N33/577 G01N33/531 C12R1/91		
CPC分类号	C07K16/44 C07K14/765 C07K19/00 G01N33/531 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6及其应用，属于食品安全免疫检测领域。本发明一株抗苯乙醇胺A单克隆抗体杂交瘤细胞株K-6，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.13092。此细胞株分泌的单克隆抗体，对苯乙醇胺A具有较好的特异性和检测灵敏度（IC₅₀值为0.24ng/mL），可以用于食品中苯乙醇胺A的残留检测。

