



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110616195 B

(45) 授权公告日 2021.05.04

(21) 申请号 201910961111.1

(22) 申请日 2019.10.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110616195 A

(43) 申请公布日 2019.12.27

(83) 生物保藏信息  
CGMCC No.17399 2019.03.07

(73) 专利权人 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生物界面与生物检测研究所

(72) 发明人 胥传来 许晓昕 匡华 徐丽广  
孙茂忠 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)  
G01N 33/577 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)  
C07K 14/765 (2006.01)  
C07K 1/34 (2006.01)  
C12R 1/91 (2006.01)

审查员 苏存生

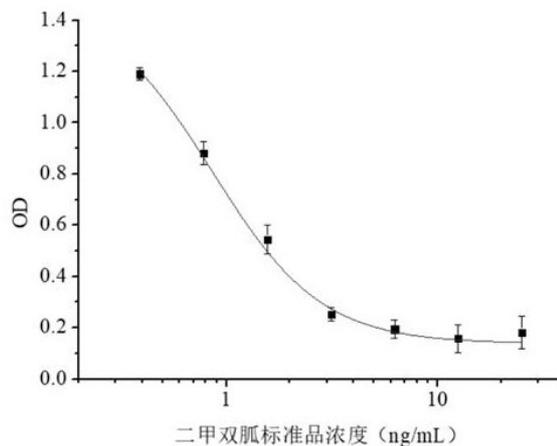
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

## (54) 发明名称

一株二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用

## (57) 摘要

一株二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用,属于食品安全免疫检测领域。本发明制备的二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株Tcf 1A6,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,保藏日期2019年3月7日,保藏编号CGMCC No.17399。本发明将二甲双胍的完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化,通过颈背部皮下多点注射免疫BALB/c小鼠,筛选出二种细胞融合后的杂交细胞;再经过间接竞争酶联免疫法筛选细胞并三次亚克隆,最终得到一株单克隆抗体杂交瘤细胞株Tcf 1A6。本发明提供的细胞株Tcf 1A6分泌的单克隆抗体,对MET具有较好的特异性和检测灵敏度(IC<sub>50</sub>值为1ng/mL),可实现对鸡肉和鸡的肝脏、饲料中MET残留量的检测,为食品中MET残留的免疫检测提供了原料,具有实际应用价值。



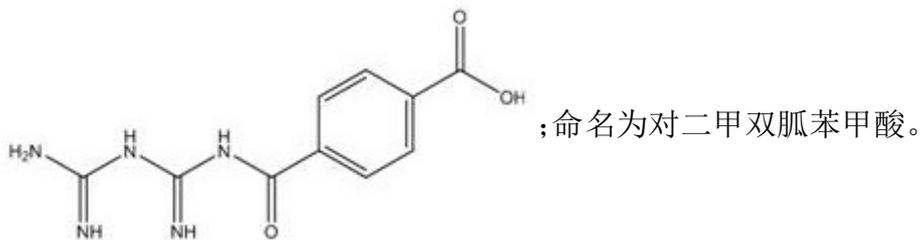
1. 一株二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株Tcf 1A6,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2019年3月7日,保藏编号CGMCC No.17399。

2. 二甲双胍单克隆抗体,其特征在于:它由权利要求1所述保藏编号为CGMCC No.17399的二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株Tcf 1A6分泌产生。

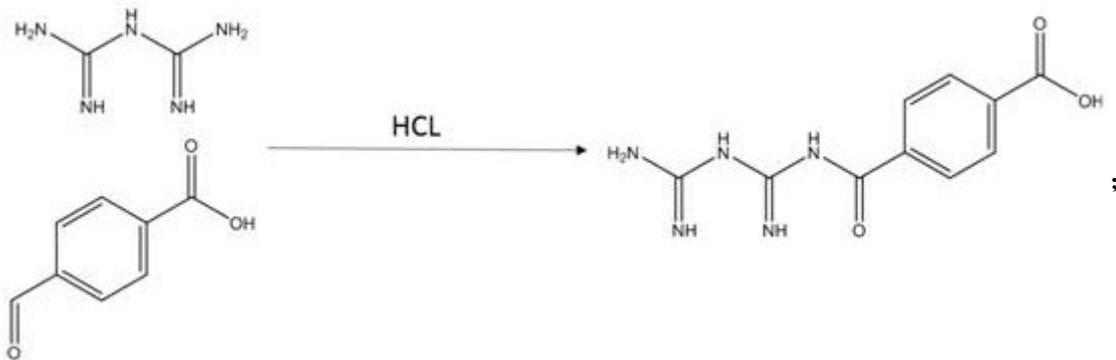
3. 权利要求2所述二甲双胍单克隆抗体的应用,其特征在于:用于食品安全检测中二甲双胍残留的分析检测。

4. 二甲双胍完全抗原4cpMET-BSA的制备方法,其特征是步骤如下:称取1.8mg MET衍生物4cpMET,其中4cpMET与牛血清白蛋白BSA摩尔比为30:1,溶解于300 $\mu$ LN,N-二甲基甲酰胺DMF中,搅拌反应10min,充分溶解后,先后加入N-羟基琥珀酰亚胺NHS 1.3mg和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC 2.1mg,室温活化反应4-6h,作为A液;取6mg BSA,用2mL 0.01M pH=9.0碳酸盐缓冲溶液CB溶解,作为B液;再逐滴将A液缓慢加入到B液中,室温偶联反应过夜;然后用0.01M PBS溶液透析,除去未反应的小分子半抗原,得到完全抗原4cpMET-BSA,并通过紫外吸收扫描方法进行鉴定;

4cpMET结构式为:



5. 根据权利要求4所述二甲双胍完全抗原4cpMET-BSA的制备方法,其特征是所述4cpMET的合成,合成路线如下:



①将化合物对醛基苯甲酸4-CBA 0.65 g于25 mL的圆底烧瓶中,加入纯水10mL、1M HCl溶液3mL于圆底烧瓶中;在磁力搅拌器搅拌下,向体系缓慢滴加DMF直至4-CBA完全溶解;

②加入1g盐酸二甲双胍MET·HCl溶解后,置于60 $^{\circ}$ C水浴锅中磁力搅拌,接好冷凝装置回流过夜,产生白色浑浊;

③将反应液5000rpm离心10min,弃上清,将白色固体置于滤纸上,用纯水过滤洗涤3次,最后置于60 $^{\circ}$ C烘箱烘干,即得到产物半抗原4cpMET。

## 一株二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一株二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株及其应用,属于食品安全免疫检测领域。

### 背景技术

[0002] 二甲双胍(Metformin, MET)是一种降糖药,对单纯饮食控制及体育锻炼治疗无效的Ⅱ型糖尿病,特别是肥胖的Ⅱ型糖尿病有抑制作用。二甲双胍与胰岛素合用,可减少胰岛素用量,防止低血糖发生。其可与磺酰脲类降血糖药合用,具协同作用。二甲双胍可以促进周围组织细胞(肌肉等)对葡萄糖的利用,抑制肝糖原异生作用,因此降低肝糖输出,抑制肠壁细胞摄取葡萄糖,与胰岛素作用不同,即本品无促使脂肪合成的作用,对正常人无明显降血糖作用,因此,一般不引起低血糖。

[0003] 近年来,人们对长期低水平摄入二甲双胍残留所致的各种慢性疾病和诱导病原菌产生耐药性等问题特别关注。二甲双胍可引起糖尿病昏,急性发热。有胃肠道反应。少见恶心、腹痛、腹泻等消化道症状,如在餐时或餐后服用会减少。本品治疗时出现不耐受的最初迹象时不必停药,会自行消失。在过量时,可能蓄积会出现乳酸性酸中毒。长期使用本品可降低人体对维生素B12的吸收。根据药典残留溶剂测定法要求,在食品中残留量不得超过5 $\mu$ g/mL。因此,建立快速有效的检测二甲双胍含量的方法具有重要意义及市场价值。采用高效液相色谱方法检测,检测方法较为繁琐、复杂,检测限过高,为了维护广大消费者的利益,有必要建立一种针对MET的高效、快速的检测方法,而酶联免疫法(ELISA)前处理简单,成本低,可实现大量样品的快速检测,且检测时对样本的纯度要求不高。因此,建立高效的免疫学检测方法很有必要,而建立此方法的一个重要前提即需筛选出针对二甲双胍的高特异性单克隆单体。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一株二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株,由该细胞株制备的抗体对二甲双胍具有较好特异性和检测灵敏度,可以用来建立二甲双胍的免疫学检测方法。

[0005] 本发明的技术方案,一株二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株Tcf 1A6,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,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,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2019年3月7日,保藏编号CGMCC No.17399。

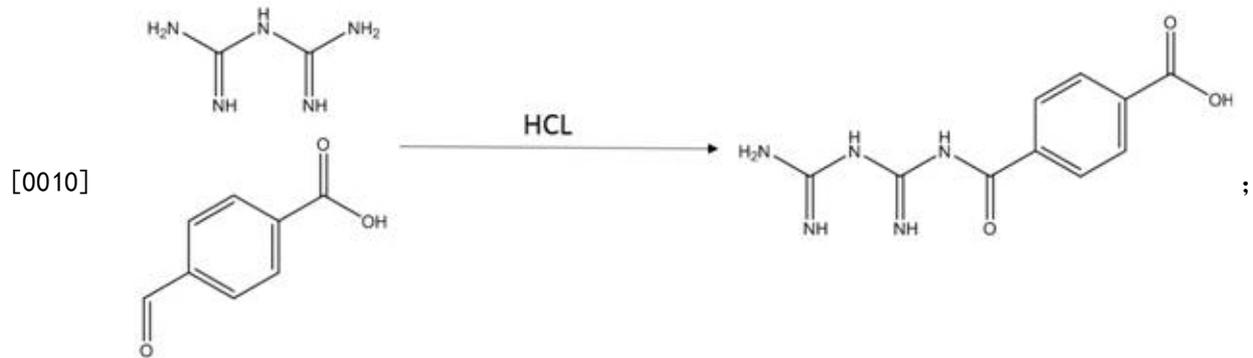
[0006] 二甲双胍单克隆抗体,它由所述保藏编号为CGMCC No.17399的二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株Tcf 1A6分泌产生。

[0007] 所述二甲双胍单克隆抗体的应用,用于食品安全检测中二甲双胍残留的分析检测。

[0008] 本发明提供的二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株Tcf 1A6的制备基本步骤为:由

二甲双胍与对醛基苯甲酸反应得到具有羧基的产物,即半抗原4cpMET,用碳二亚胺法将半抗原4cpMET与载体蛋白偶联,即得到二甲双胍人工抗原;步骤为:

[0009] (1) 半抗原4cpMET的合成,合成路线如下:



[0011] ①将化合物对醛基苯甲酸(4-CBA)0.65 g于25 mL的圆底烧瓶中,加入纯水10mL、1M HCl溶液3mL于圆底烧瓶中;在磁力搅拌器搅拌下,向体系缓慢滴加DMF直至4-CBA完全溶解;

[0012] ②加入1g盐酸二甲双胍(MET·HCl)溶解后,置于60℃水浴锅中磁力搅拌,接好冷凝装置回流过夜,产生白色浑浊;

[0013] ③将反应液5000rpm离心10min,弃上清,将白色固体置于滤纸上,用纯水过滤洗涤3次,最后置于60℃烘箱烘干,即得到产物半抗原4cpMET;

[0014] (2) 完全抗原4cpMET-BSA的制备:称取1.8mg MET衍生物4cpMET(4cpMET与牛血清白蛋白(BSA)摩尔比为30:1),溶解于300μL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌反应10min,充分溶解后,先后加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)1.3mg和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)2.1mg,室温活化反应4-6h,作为A液。取6mg BSA,用2mL 0.01M碳酸盐缓冲溶液(CB, pH=9.0)溶解(称为B液),再逐滴将A液缓慢加入到B液中,室温偶联反应过夜;然后用0.01M PBS溶液透析,除去未反应的小分子半抗原,得到完全抗原4cpMET-BSA,并通过紫外吸收扫描方法进行鉴定;

[0015] (3) 小鼠的免疫:将4cpMET-BSA完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化后,对BALB/c小鼠进行颈背部皮下多点注射免疫(冲刺免疫除外)。首次免疫用完全弗氏佐剂,剂量为100μg/只;多次加强免疫用不完全弗氏佐剂且剂量减半即为50μg/只;冲刺免疫不用佐剂,直接用生理盐水稀释后腹腔注射,剂量再减半即为25μg/只。首次免疫与第二次加强免疫之间间隔一个月,多次加强免疫之间间隔21天,冲刺免疫与最后一次加强免疫之间间隔18-21天。通过间接竞争酶联免疫法(ic-ELISA)观测小鼠免疫效果即检测小鼠血清的效价和抑制;

[0016] (4) 细胞融合与细胞株建立:通过聚乙二醇(PEG4000)法将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞进行融合,采用选择性培养基(HAT培养基)筛选出杂交瘤细胞,并用HT培养基进行细胞培养。融合一周后利用ic-ELISA法检测阳性细胞孔,并进一步利用ic-ELISA法测定阳性细胞孔的抑制效果,通过有限稀释法对抑制较好的阳性细胞孔进行亚克隆,一周后再次检测、挑孔、亚克隆。按上述方法进行三次亚克隆后获得MET的高分泌特异抗体的单克隆杂交瘤细胞株Tcf 1A6;

[0017] (5) 杂交瘤细胞株性质的鉴定:通过ic-ELISA测定灵敏度和特异性。

[0018] 本发明的有益效果:本发明提供的细胞株Tcf 1A6分泌的单克隆抗体,对MET具有

较好的特异性和检测灵敏度( $IC_{50}$ 值为1ng/mL),可实现对鸡肉和鸡的肝脏、饲料中MET残留量的检测,为食品中MET残留的免疫检测提供了原料,具有实际应用价值。

[0019] 生物材料样品保藏:一株二甲双胍单克隆抗体杂交瘤细胞株Tcf 1A6,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,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,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2019年3月7日,保藏编号CGMCC No.17399。

## 附图说明

[0020] 图1是Tcf 1A6单克隆抗体的抑制标准曲线。

## 具体实施方式

[0021] 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。

[0022] 本发明通过将二甲双胍完全抗原免疫小鼠,通过细胞融合,HAT选择性培养基培养,通过ic-ELISA筛选细胞上清,最终得到了针对二甲双胍具有高分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株Tcf 1A6。

[0023] 实施例1 杂交瘤细胞株Tcf 1A6的制备

[0024] (1)完全抗原的合成:称取1.8mg MET衍生物4cpMET(4cpMET与牛血清白蛋白(BSA)摩尔比为30:1),溶解于300 $\mu$ L N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌反应10min,充分溶解后,先后加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)1.3mg和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)2.1mg,室温活化反应4-6h,作为A液。取6mg BSA,用2mL 0.01M碳酸盐缓冲溶液(CB,pH=9.0)溶解(称为B液),再逐滴将A液缓慢加入到B液中,室温偶联反应过夜;然后用0.01M PBS溶液透析,除去未反应的小分子半抗原,得到完全抗原4cpMET-BSA,并通过紫外吸收扫描方法进行鉴定;

[0025] (2)动物免疫:将4cpMET完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化后,对BALB/c小鼠进行颈背部皮下多点注射免疫(冲刺免疫除外)。首次免疫用完全弗氏佐剂,剂量为100 $\mu$ g/只;多次加强免疫用不完全弗氏佐剂且剂量减半即为50 $\mu$ g/只;冲刺免疫不用佐剂,直接用生理盐水稀释后腹腔注射,剂量再减半即为25 $\mu$ g/只。首次免疫与第二次加强免疫之间间隔一个月,多次加强免疫之间间隔21天,冲刺免疫与最后一次加强免疫之间间隔18-21天。通过间接竞争酶联免疫法(ic-ELISA)观测小鼠免疫效果即检测小鼠血清的效价和抑制;

[0026] (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:

[0027] a、小鼠摘眼球取血,颈椎脱臼法处死小鼠后,立即放入75%酒精中消毒,浸泡5min左右,无菌操作取出小鼠的脾脏,用注射器胶头适度研磨并通过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,收集,离心(1200rpm,8min),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,计数,备用;

[0028] b、收集SP<sub>2/0</sub>细胞:融合前7-10天,将SP<sub>2/0</sub>瘤细胞用含10% FBS(胎牛血清)RPMI-1640培养基在5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。融合前要求SP<sub>2/0</sub>瘤细胞数量达到(1-4) $\times 10^7$ ,保证融合前SP<sub>2/0</sub>瘤细胞处于对数生长期。融合时,收集瘤细胞,悬浮于RPMI-1640基础培养液中,进

行细胞计数;

[0029] c、融合过程7min:第1min,将1mL的PEG 4000 由慢到快滴加到细胞中;第2min,静置。第3min 和第4min,在1min内滴加1mL RPMI-1640培养基;第5min 和第6min,在1min内滴加2mL RPMI-1640 培养基;第7min,每10s 滴加1mL 的 RPMI-1640 培养基。然后37℃温浴5 min。离心(800 rpm,10 min),弃上清,细胞轻轻敲散,并向其内加入含20%胎牛血清,2%50×HAT的RPMI-1640选择性培养基(HAT培养基),按照200μL/孔加到96孔细胞板,置于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养;

[0030] (4)细胞筛选与细胞株建立:在细胞融合后的第3天用HAT培养基对融合细胞进行半换液;第5天用含20% 胎牛血清,1%的100×HT的RPMI-1640过渡培养液(HT培养基)进行全换液;第7天取细胞上清进行筛选。筛选分两步:第一步先用ic-ELISA法筛选出阳性细胞孔,第二步选用二甲双胍为标准品,用ic-ELISA法对阳性细胞进行抑制效果测定。选择对二甲双胍标准品有较好抑制的细胞孔,采用有限稀释法进行亚克隆,七天后用同样的方法进行检测。按上述方法进行三次亚克隆,最终获得二甲双胍单克隆抗体细胞株Tcf 1A6;

[0031] (5)单克隆抗体的制备与鉴定:取8-10周龄BALB/c小鼠,每只小鼠腹腔注射无菌石蜡油1mL;7天后每只小鼠腹腔注射1×10<sup>6</sup>二甲双胍杂交瘤细胞,从第七天开始收集腹水,将腹水通过辛酸-饱和硫酸铵法进行抗体纯化。在偏酸条件下,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;再用等量饱和度的硫酸铵溶液沉淀 IgG型的单克隆抗体,离心,弃上清,用0.01 M PBS溶液(pH7.4)溶解后,透析脱盐,最终得到纯化后的单克隆抗体置于-20℃保存;

[0032] 5.1包被:将包被原MET-OVA用0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液从1μg/mL开始3倍比稀释,100μL/孔,37℃反应2h;

[0033] 5.2洗涤:将板内溶液倾去,并用洗涤液洗涤3次,每次3min;

[0034] 5.3封闭:拍干后,加入200μL/孔封闭液,37℃反应2h。洗涤后烘干备用;

[0035] 5.4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,100μL/孔,37℃反应30min;充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗鼠IgG,100μL/孔,37℃反应30min;

[0036] 5.5显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100μL的TMB显色液,37℃避光反应15min;

[0037] 5.6终止和测定:每孔加入50μL终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的OD 450值。

[0038] 用ic-ELISA测定单克隆抗体二甲双胍的IC<sub>50</sub>为:1ng/mL,说明对二甲双胍有很好的灵敏度,可用于二甲双胍免疫分析检测。

[0039] 溶液的配制:

[0040] 碳酸盐缓冲液(CBS):称取Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59 g,NaHCO<sub>3</sub> 2.93 g,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;

[0041] 磷酸盐缓冲液(PBS):8.00g NaCl,0.2g KCl,0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,2.9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O,溶于800mL纯水中,用NaOH或HCl调pH到7.2~7.4,定容至1000mL;

[0042] PBST:含0.05 % 吐温20的PBS;

[0043] TMB显色液:A液:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 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5:1混合即为TMB显色液,现用现混。

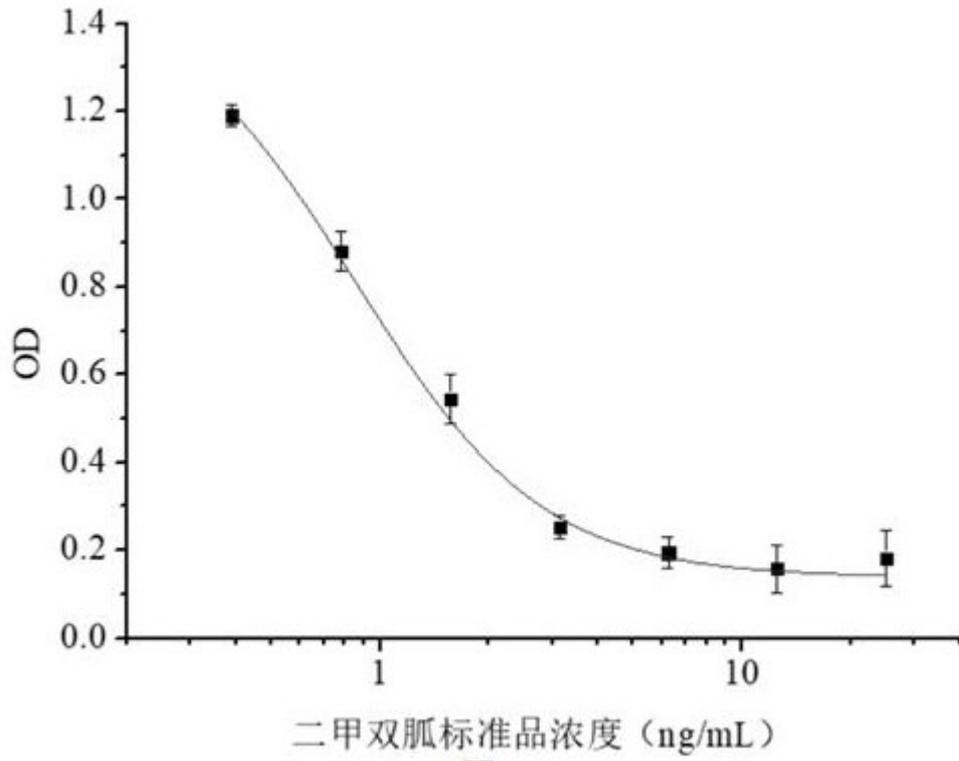


图1