

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810201463.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月25日

[11] 公开号 CN 101393218A

[22] 申请日 2008.10.21

[21] 申请号 200810201463.9

[71] 申请人 华东师范大学

地址 200241 上海市东川路500号

[72] 发明人 钱旻 王群 李恺 韩红辉

顾虹洁 汪磊 杜冰

[74] 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司

代理人 程宗德

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

[54] 发明名称

一种单克隆抗体的制备及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一种单克隆抗体的制备及其用途，具体说涉及一种适用于同时检测苏丹红 I 和对位红残留的单克隆抗体的制备及其用途，属于免疫化学分析技术领域。本发明以苏丹红衍生物与牛血清白蛋白交联的复合物作为免疫抗原，将免疫抗原免疫 Balb/C 小鼠，将小鼠的致敏脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合制备杂交瘤细胞，经间接 ELISA 筛选和有限稀释法获得单克隆杂交瘤细胞株，将杂交瘤细胞株注射于小鼠腹腔生产单克隆抗体。本发明提供一种基于上述方法制备的抗原及其单克隆抗体特性适用于定性和定量检测苏丹红 I 和对位红及其含量的酶联免疫测定 (ELISA) 方法。

1. 一种单克隆抗体的制备方法，其特征在于以苏丹红衍生物与牛血清白蛋白交联的复合物作为免疫抗原，将免疫抗原免疫 Balb/C 小鼠，将小鼠的致敏脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合制备杂交瘤细胞，经间接 ELISA 筛选和有限稀释法获得单克隆杂交瘤细胞株，将杂交瘤细胞株注射于小鼠腹腔生产单克隆抗体，其中，间接 ELISA 筛选中使用的包被抗原是指苏丹红衍生物与卵清白蛋白交联的复合物，苏丹红衍生物为羧基苏丹红。

2. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体的制备方法，其特征在于免疫抗原是由羧基苏丹红分别与 N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 和 N,N-二环己基碳二亚胺 DCC 反应，再与牛血清蛋白偶联的复合物。

3. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体的制备方法，其特征在于包被抗原是由羧基苏丹红分别与 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 反应，再与卵清白蛋白偶联的复合物。

4. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体的制备方法，其特征在于杂交瘤细胞株 SU-211-10，保藏在 CCTCC，保藏编号为 CCTCC NO: C200813。

5. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体采用间接竞争 ELISA 检测法检测苏丹红 I 残留的应用。

6. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体采用间接竞争 ELISA 检测法检测对位红残留的应用。

7. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体采用间接竞争 ELISA 检测法同时检测苏丹红 I 和对位红残留的应用。

一种单克隆抗体的制备及其用途

技术领域

本发明涉及一种单克隆抗体的制备及其用途,具体说涉及一种适用于同时检测苏丹红 I 和对位红残留的单克隆抗体的制备及其用途,属于免疫化学分析技术领域。

背景技术

苏丹红 (Sudan) 为亲脂性偶氮化合物,是一种红色的工业合成染色剂,属于化工染料,主要用于石油、机油和其他的一些工业溶剂中,目的是使其增色,也用于鞋、地板、彩色蜡、焰火礼花等的增色增光。由于苏丹红化学结构中含有偶氮基团,人体摄入后,在还原酶的作用下体内会生成相应的胺类物质,从而对人体具有致癌性。

虽然我国以及绝大多数国家都早已明令禁止苏丹红作为添加剂用于食品中,但其能够使食物色泽更鲜亮持久,提高食品的价值,而被少数生产厂家违规当作了食用色素,苏丹红引起的食品安全问题在各大媒体报纸上也是时有报道。2004年6月14日,英国食品标准管理局就此前在超市一批新食品中发现含有潜在致癌物的苏丹红 I 号色素,向消费者和贸易机构发出了警示,禁用产品目录中的苏丹红 I 号。2005年2月,英国食品标准署下令将亨氏、联合利华等 30 家企业生产的可能含有苏丹红 I 号的 400 余种食品召回,引发了全球的“苏丹红”风暴。我国自 2005 年 3 月开始,也相继在辣椒调味品、鸡蛋、鸭蛋、番茄酱等食品中发现苏丹红(孙文汇等,苏丹红与食品安全,动物医学进展,2008,29(4):103-105)。不仅是食品,2007年2月6日,国家质检总局对外发布了最新的唇膏、口红产品的质量专项抽查结报告,发现 3 种苏丹红首现国产唇膏的结果使得苏丹红的阴影蔓延到了化妆品领域。因此,苏丹红已经成为人类健康的一个潜在危险,对它的认识、研究和检测是非常必要,而且刻不容缓的(王继臣和杨继远,苏丹红的毒性及检测,商丘职业技术学院学报,2008,7(2):97-99)。

目前,对苏丹红的检测方法主要是高效液相色谱分析法。将含有苏丹红成分的待测物经乙腈提取后,以波长可变的紫外可见光度检测器检测,可以定性定量地对食品中的苏丹红含量进行测定。2005年3月29日,国家质量监督检验检疫总局和国家标准委联合发布《食品中苏丹红染料的检测方法—高效液相色谱法》(国家标准(GB/T 19681-2005)),用于我国的各食品用品中苏丹红的检测。另外,还有薄层色谱-紫外可见分光光度法(庞艳玲和王怀友,薄层色谱-紫外可见分光光度法测定食品中的苏丹红 I 号,分析实验室,2008,27(1):60-62)。

色谱分析法确实能准确地定量分析出食品中的苏丹红残留，且灵敏度较高，但是其仪器成本高，实验样品处理步骤繁琐，费时费力，不利于大批量的样品检测。酶联免疫吸附分析法（ELISA）具有样品操作便捷、成本低廉、反应快速、灵敏度高、特异性强等特点，能更好地运用于苏丹红和对位红添加剂量的快速检测。

发明内容

本发明的目的在于提供一种可以单独或者同时定性和定量检测苏丹红 I 和对位红及其含量的单克隆抗体的制备方法。

本发明的另一目的在于提供该单克隆抗体在作为检测苏丹红 I 和对位红残留的用途。

本发明利用苏丹红 I 和对位红在结构上的部分相似性，采用苏丹红衍生物即羧基苏丹红作为半抗原与常规蛋白载体偶联得到相应的免疫抗原和包被抗原，制备出可以同时识别苏丹红 I 和对位红的单克隆抗体，并建立定性和定量检测苏丹红 I 和对位红及其含量的酶联免疫间接竞争测定法。

首先，本发明提供一种苏丹红衍生物与常规蛋白载体偶联得到的免疫抗原和包被抗原（即检测抗原）：

免疫抗原：由羧基苏丹红分别与 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）和 N,N-二环己基碳二亚胺（DCC）反应，再与牛血清蛋白（BSA）偶联的复合物。

包被抗原（即检测抗原）：由羧基苏丹红分别与 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）和 N,N-二环己基碳二亚胺（DCC）反应，再与卵清白蛋白（OVA）偶联的复合物。

蛋白载体除了与 BSA、OVA 偶联外，还可以与人血清的蛋白（HAS）和钥孔血蓝蛋白（KLH）等偶联。

本发明用到的一株杂交瘤细胞株 SU-211-10，保藏在 CCTCC，保藏编号为 CCTCC NO: C200813，是骨髓瘤细胞 SP2/0 与产生抗羧基苏丹红抗体的 Balb/C 小鼠 B 淋巴细胞融合后筛选获得的细胞株，所述的 B 淋巴细胞来自于上述羧基苏丹红-BSA 免疫的 Balb/C 小鼠。

本发明所述的单克隆抗体是由上述杂交瘤细胞株 SU-211-10（CCTCC NO: C200813）产生的，对苏丹红 I 和对位红具有特异性结合的特点，属于 IgG1 类抗体，最高抗体效价达到 6.4×10^5 。所述的单克隆抗体是将杂交瘤细胞株 SU-211-10（CCTCC NO: C200813）接种 Balb/C 小鼠腹腔后，从产生的腹水中纯化获得的免疫球蛋白。

本发明的提供一种基于上述方法制备的抗原及其单克隆抗体特性适用于定性和定量检测苏丹红 I 和对位红及其含量的酶联免疫测定（ELISA）方法。

本发明所述的一种检测苏丹红 I 和对位红及其含量的方法，优先为间接竞争

ELISA 方法, 样品中的苏丹红 I 和对位红可以与包被抗原 (羧基苏丹红-OVA) 对有限量的抗体发生竞争性结合, 根据其吸光度的数值可以从标准曲线上推算出样品中苏丹红 I 和对位红的含量。该方法的灵敏度可以达到: 苏丹红 I 的 IC_{50} 值为 0.8 μ g/L、对位红的 IC_{50} 值为 4.0 μ g/L。

附图说明

- 图 1 是羧基苏丹红-BSA 抗原紫外吸收光谱;
- 图 2 是羧基苏丹红-OVA 抗原紫外吸收光谱;
- 图 3 是单抗腹水与苏丹红 I 标准品竞争 ELISA 曲线, 腹水稀释 50000 倍;
- 图 4 是单抗腹水与对位红标准品竞争 ELISA 曲线, 腹水稀释 100000 倍;

具体实施方式

本发明人对苏丹红 I 和对位红的结构进行了分析, 拟利用苏丹红衍生物即羧基苏丹红在结构上与苏丹红 I 和对位红存在的部分相似性, 以此作为半抗原与常规蛋白载体 BSA 偶联得到相应的免疫抗原 (羧基苏丹红-BSA), 免疫 Balb/C 小鼠, 将其脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 获得了能分泌抗羧基苏丹红抗体的杂交瘤细胞株 SU-211-10 (CCTCC NO: C200813), 再将该细胞株接种 Balb/C 小鼠腹腔后, 从产生的腹水中经辛酸-饱和硫酸铵方法纯化获得免疫球蛋白 IgG1。用羧基苏丹红偶联蛋白载体 OVA 获得的羧基苏丹红-OVA 作为包被抗原, 包被于聚乙烯酶标板, 用一定量的上述单克隆抗体与苏丹红 I 或对位红进行间接竞争 ELISA 反应。实验结果显示, 间接竞争 ELISA 反应在检测苏丹红 I 或对位红时其灵敏度分别为: 间接竞争 ELISA 反应在检测苏丹红 I 或对位红时其 IC_{50} 值分别为苏丹红 I 号 0.8 μ g/L、对位红 4.0 μ g/L。与苏丹红 II、III、IV 号的交叉反应率为 1.24%~2.12%, 与其他同类食品添加剂的交叉反应率均小于 0.2%。

下面结合具体实施例对本发明内容作进一步说明, 但不以任何形式限制本发明。

材料:

(1) 试剂: 羧基苏丹红购于广州创伟生物科技有限公司; N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白 (OVA)、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、聚乙二醇 PEG4000、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 购于美国 SIGMA 公司; HAT (次黄嘌呤、氨甲喋呤、胸腺嘧啶核苷)、新生小牛血清为美国 GIBCO 公司产品; RPMI-1640 干粉剂为美国 Invitrogen 公司产品; 邻苯二胺 (OPD, 购自上海华美公司); 二甲基亚砜为美国 Amersham-Pharmacia 公司产品; 胰蛋白酶为 Difco 进口分装产品。N, N-二甲基甲酰胺 (DMF)、二环己基碳二亚胺 (DCC) 和其他常规试剂均为国产分析纯。

(2) 实验器材和设备: 96 孔细胞培养板 (NUNC, USA), 酶标板 (COSTAR,

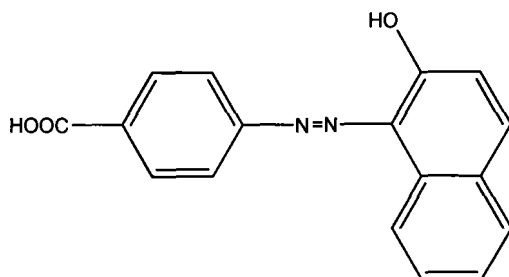
USA), 二氧化碳培养箱 (SANYO, JAPAN), 光学显微镜 (OLYMPUS BH-2, JAPAN)、倒置相差显微镜 (OLYMPUS, JAPAN)、酶标仪 (PowerWave XS, 美国 Bio-Tek 公司,) -30℃和-80℃冰箱 (SANYO, JAPAN)、高速离心机 (日本 HITACHI 20PR-52D)、恒温振荡器 (太仓市医疗械厂, TH2-95 型)、台式离心机 (上海市离心机械研究所, TL5.0 型)、超净工作台 (上海上净净化设备有限公司) 等。

(3) 实验动物: Balb/C 小鼠, 4~6 周龄雌性, 由中国科学院上海实验动物中心提供。

(4) 其他: 细胞培养和 ELISA 实验和试剂配制按照常规实验方法进行, 主要参考材料为:《当代免疫学技术与应用》(巴德年, 1998, 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社)、《现代免疫学实验技术(第2版)》(沈关心、周汝麟主编, 2002, 湖北科学技术出版社) 等。

实施例 1: 抗原的合成

羧基苏丹红分子结构式如下:



100-mL 烧杯中加入 140mg 羧基苏丹红溶于 3mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 边搅拌边加入 103.2mg 二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 75mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 室温搅拌过夜。次日离心除去沉淀, 取上清液备用。另取 100-mL 烧杯, 加入 5mL 0.1mol/L PBS (pH 7.2)、340mg BSA, 置于磁力搅拌器上搅拌, 加入 0.5mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 至 BSA 溶解, 然后边搅拌边缓慢滴加入上述上清液, 将烧杯口密封, 4℃下搅拌反应 4h。离心后除去沉淀, 将上清液装入透析膜于 4℃下用生理盐水透析 3 天, 每天换液 2 次, 以去除未反应的 DMF、DCC、NHS 和羧基苏丹红小分子化合物。最后得到羧基苏丹红-BSA 抗原溶液, 小瓶分装, 冻干后保存于-20℃冰箱中, 供免疫用。

将上述牛血清白蛋白 (BSA) 换成卵清白蛋白(OVA)即得到羧基苏丹红-OVA 偶联物。

抗原鉴定: (1) 肉眼观察: 羧基苏丹红-BSA 抗原、羧基苏丹红-OVA 抗原外观为红色; (2) 利用紫外吸收光谱扫描鉴定抗原为我们所需要的抗原。

实施例 2: 单克隆抗体的制备

(1) 动物免疫

将 10 只雌性 Balb/C 小鼠分化 2 组，免疫组为 5 只，阴性对照组为 5 只。

羧基苏丹红 I-BSA 免疫抗原用生理盐水稀释，每次小鼠的免疫剂量为 50ug/只。免疫程序采用 2 次基础免疫以及 3 次加强免疫，每次免疫间隔时间为 15 天。第一次基础免疫用福氏完全佐剂乳化抗原进行免疫，采用小鼠颈背部皮下多点注射；第二次基础免疫和以后两次加强免疫用福氏不完全佐剂乳化抗原，采用小鼠颈背部皮下多点注射或腹腔内注射；最后一次加强免疫用不加佐剂的抗原，采用小鼠尾静脉或腹腔内注射。每次加强免疫后第 5 天，小鼠尾部静脉采血，分离得血清，采用抗原包被的间接 ELISA 法检测血清的抗体效价。制备单克隆抗体的小鼠是选择最后一次免疫后，取抗体效价最高的 Balb/C 小鼠。

(2) 细胞融合以及杂交瘤细胞的筛选

饲养细胞的制备：在细胞融合当天，取 Balb/C 小鼠颈椎脱臼法处死，70%酒精浸泡后，用眼科剪刀剪开小鼠腹部皮肤，在腹腔内注射 10ml 的 1640 培养液，反复抽吸数次后，吸回所有的液体，放入离心管内，3000rpm 离心 10min，细胞沉淀用 HAT-1640 完全培养液悬浮，混匀后加入 96 孔培养板 100ul/孔。

脾脏细胞的获得：免疫小鼠以颈椎脱臼法处死，70%酒精浸泡后，将小鼠放于纸上，右侧卧左侧向上，用镊子提取小鼠的腹壁，用眼科剪刀围绕脾脏外面作一个“U”形切口，用镊子提起脾脏，剪断脾血管和结缔组织，分离脾脏放入培养皿中，加少量冷 Gey 液，用镊子轻轻刮挤脾脏，让脾细胞释放出来（或用组织研磨器研磨成脾细胞悬液），取上清液于试管中，调整细胞浓度为 10^7 /ml（每只脾脏约加 3~5ml Gey 液），4℃冰箱备用。

融合细胞的制备：小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 提前复苏，在实验当天细胞处于对数生长期。将 SP2/0 细胞与上述获得的免疫小鼠脾脏细胞以细胞数 1:5 的比例在 50ml 离心管中混匀，1000rpm 离心 10min，弃上清液，将离心管置于 37℃水浴锅中保温，边摇晃边缓慢滴加 37℃预热的 50%PEG-1640 培养液 1ml，在 1min 内完成，继续摇晃 30sec，静置 1min。然后边摇晃边缓慢滴加 37℃预热的 1640 基础培养液 10ml，在 5min 左右加完。轻轻混匀，最后缓慢加入 30ml 的 1640 基础培养液，1000rpm 离心 10min，弃上清液，于 37℃水浴锅中保温 5min。加入 HAT-1640 完全培养液悬浮细胞，接种入上述加有饲养细胞的 96 孔细胞培养板 100ul/孔，然后放置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。

杂交瘤细胞的筛选：按照上述方法制备好饲养细胞，加入 96 孔培养板 100ul/孔。取出融合细胞培养板，将存活下来的杂交瘤细胞从培养孔中轻轻吹打并吸出，计数后用 1640 完全培养液稀释至 5、10、50 个细胞/ml，分别接种入上述加有饲养细胞的 96 孔细胞培养板 100ul/孔，使培养孔中的杂交瘤细胞数平均每孔分别为：0.5、1、5 个细胞/孔，然后放置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。每天观察细胞

的生长情况，待细胞长满培养孔的 1/2 时，取上清液进行间接 ELISA 方法测定，检测是否产生抗体及其效价和特异性。从抗体阳性的培养孔中，选择抗体效价高、特异性强、且细胞状态良好的细胞孔，继续进行再克隆，获得单克隆抗体分泌细胞株，大量培养后，分装小管冻存于液氮中。

(3) 腹水诱生和抗体纯化

腹水的诱生：取 Balb/C 小鼠数只，在接种杂交瘤细胞前 10 天左右，每只小鼠腹腔内注射 0.5ml 灭菌液体石蜡油。同时将单克隆抗体分泌细胞株置于细胞培养瓶中培养至对数期，1000rpm 离心 10min，取沉淀用 1640 基础培养基重悬，调整细胞数为 1×10^6 个细胞/ml，在上述小鼠腹腔内接种 0.5ml 的杂交瘤细胞，待小鼠腹部明显肿大后，用酒精棉球消毒腹部皮肤，用 5ml 注射器抽取腹水，将腹水 4℃、1000rpm 离心 10min，取上清，分装后 -30℃ 保存备用。

抗体的纯化：取 10ml 上述制备的腹水，加入 20ml 0.06mol/L 醋酸缓冲液，用 1mol/L NaOH 调 pH 至 4.8，室温下边搅拌边逐滴加入 330ul 辛酸，继续搅拌 30min，然后 4℃ 下静置 2h。然后溶液 4℃ 下，1000rpm 离心 30min，弃沉淀，在上清液中加入 3ml 0.1M PBS (pH7.4)，混匀后，用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.2。在 4℃ 下，在溶液中边搅拌边缓慢加入饱和硫酸铵 27ml，使硫酸铵的最终饱和度为 45%，继续搅拌 30min，然后 4℃ 静置 1h 以上。8000rpm 离心 30min，弃上清，沉淀重悬于 3ml 0.01M, PBS (pH7.4) 中，然后置于 0.01M PBS 中透析，4℃ 透析 2 天，其间换水 4 次以上。透析过的溶液，8000rpm 离心 30min，除去不溶性沉渣，分装小管 1ml/管后 -80℃ 冻存备用。

实施例 3：单克隆抗体的鉴定——间接 ELISA 方法

(1) 最佳抗原包被浓度和抗体最适稀释倍数（工作浓度）的确定

采用间接 ELISA 检测方法的棋盘滴定试验进行，以吸光度值 (OD) 约为 1.0 左右的点为参照点，综合考虑抗原浓度和抗体稀释倍数等因素，最后确定最佳抗原包被浓度和抗体最适稀释倍数（即工作浓度）。

间接 ELISA 检测方法的操作程序：取 96 孔酶标板，每孔加入用包被缓冲液稀释的包被浓度的包被抗原羧基苏丹红-OVA 100ul，4℃ 包被过夜后，用洗涤液 0.05%PBST 洗板 3 次，每孔加入封阻液 300ul，37℃ 封阻 1h，取出洗板 3 次，每孔加入稀释的苏丹红腹水 100ul，37℃ 反应 1h，洗板 5 次后，加入二抗（兔抗鼠酶标抗体，1:5000 稀释），37℃ 反应 1h。洗板 5 次后，每孔加入底物显色液 100ul，37℃ 避光显色 20min。最后加入终止液 50ul 终止反应，用酶标仪测 OD 值 (490nm)。

操作步骤：在 96 孔酶标板上的第一列包被 $8 \mu\text{g}$ /孔的包被原，第二至第六列依次包被 4、2、1、0.5、0.25 μg /孔的包被原，4℃ 过夜。次日，用洗涤液 0.05%PBST 洗涤 3 次，5%脱脂乳封闭液 37℃ 封闭 1h，洗涤 2 次，拍干。在酶标板的第一行

至第八行依次加入 100 μ l 稀释倍数为 1,000、2,000、4,000、8,000、16,000、32,000、64,000、128,000 的苏丹红腹水溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗涤 5 次, 拍干。各孔加入 100 μ l 兔抗鼠酶标二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗涤 5 次, 拍干。各孔加入 100 μ l 底物显色液, 避光显色 15min, 加入 50 μ l 终止液, 用酶标仪在 490nm 波长处测定光密度值。结果见表 1。

表 1 最佳抗原包被浓度和抗体最适工作浓度的滴定结果

OD ₄₉₀ 值 腹水稀释倍数	包被抗原量 (μ g/孔)					
	8	4	2	1	0.5	0.25
1,000	1.838	1.706	1.688	1.65	1.443	1.195
2,000	1.75	1.642	1.566	1.497	1.354	1.135
4,000	1.672	1.562	1.491	1.4	1.265	1.07
8,000	1.549	1.464	1.389	1.308	1.179	0.993
16,000	1.453	1.312	1.266	1.19	1.079	0.959
32,000	1.258	1.15	1.137	1.092	0.992	0.894
64,000	1.09	1.067	1.018	0.98	0.924	0.869
128,000	0.989	0.955	0.946	0.925	0.882	0.856

结果说明: OD 值在 1.0 左右的抗原包被量为 4 μ g/孔、2 μ g/孔; 苏丹红腹水最适稀释倍数范围在 32,000~128,000 倍。

(2) HRP 标记兔抗鼠酶标二抗最佳稀释倍数 (工作浓度) 的确定

以实施例 3 的步骤 (1) 确定的抗原包被浓度和苏丹红腹水浓度为参照, 并以商品 HRP 标记兔抗鼠抗体推荐的工作浓度为参照, 设计稀释倍数为 2, 500、5, 000、10, 000 三个水平进行试验。操作步骤: 在 96 孔酶标板上从第 1 列到第 6 列包被抗原, 包被量依次间隔为 4 μ g/孔、2 μ g/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日洗板 3 次, 用 5% 脱脂乳封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h, 洗涤 2 次, 拍干。在酶标板的第一行至第八行依次加入 100 μ l 稀释倍数为 40, 000、60, 000、80, 000、100, 000 的苏丹红腹水溶液 (每个稀释度设两个复孔), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗涤 5 次, 拍干。按设计表加入不同稀释倍数的 HRP 标记兔抗鼠酶标二抗, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗涤 5 次, 拍干。各孔加入 100 μ l 底物显色液, 避光显色 15min, 加入 50 μ l 终止液, 用酶标仪在 490nm 波长处测定光密度值。结果见表 2。

表 2 HRP 标记兔抗鼠羊酶标二抗最佳工作浓度试验测定结果

OD ₄₉₀ 平均值	HRP 标记兔抗鼠酶标二抗稀释倍数					
	2500		5000		10000	
	包被抗原量 (μ g/孔)					
腹水稀释倍数	4	2	4	2	4	2
40,000	1.749	1.714	1.376	1.303	0.981	0.978

60,000	1.575	1.569	1.197	1.189	0.921	0.907
80,000	1.371	1.369	1.134	1.103	0.860	0.847
100,000	1.156	1.149	1.016	0.997	0.791	0.779

结果说明: OD 值在 1.0 左右的最佳 HRP 标记兔抗鼠抗酶标二抗稀释倍数为 5000 倍; 最佳包被浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{孔}$, 苏丹红腹水最佳稀释倍数为 60,000~100,000 倍。

实施例 4: 苏丹红 I 和对位红间接竞争 ELISA 检测方法的建立

从酶标二抗的最适工作浓度、包被原的包被浓度、抗体的工作浓度及工作量、竞争反应时间等方面确定了 ELISA 最佳反应条件, 建立了苏丹红 I 和对位红间接竞争 ELISA 方法。

(1) 苏丹红 I 竞争 ELISA 检测方法

苏丹红 I 标准品间接竞争 ELISA 的程序: 与间接 ELISA 程序大部分相同, 不同之处是在封阻并且洗板 3 次后, 将苏丹红腹水原液稀释 50,000 倍, 苏丹红 I 标准品稀释到 $0\mu\text{g}/\text{L}$, $0.01\mu\text{g}/\text{L}$, $0.03\mu\text{g}/\text{L}$, $0.1\mu\text{g}/\text{L}$, $0.3\mu\text{g}/\text{L}$, $0.9\mu\text{g}/\text{L}$ 六个浓度梯度。在一个孔中加入 50ul 苏丹红腹水稀释液和 50ul 苏丹红 I 标准品稀释液, 37°C 温育 1h。0.05% PBST 洗 5 遍后, 加入二抗 (兔抗鼠酶标抗体, 1: 5000 稀释), 37°C 温育 1h。0.05% PBST 洗 5 遍, 加底物显色液, 充分显色后, 加入终止液 $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ 50ul/孔, 酶标仪 490nm 波长读数。

表 3 苏丹红 I 标准品的酶标孔光密度值测定结果

苏丹红 I 标准品竞争 ELISA						
稀释浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	0	0.01	0.03	0.1	0.3	0.9
	0.424	0.402	0.417	0.377	0.269	0.235
	0.404	0.397	0.348	0.398	0.300	0.201
	0.411	0.370	0.363	0.329	0.275	0.186
OD 平均值	0.413	0.390	0.376	0.353	0.281	0.207

(2) 对位红竞争 ELISA 检测方法

对位红标准品间接竞争 ELISA 的程序: 与苏丹红 I 间接竞争 ELISA 程序类似, 不同之处是将苏丹红腹水原液稀释 100,000 倍, 对位红标准品稀释到 $0\mu\text{g}/\text{L}$, $0.1\mu\text{g}/\text{L}$, $0.3\mu\text{g}/\text{L}$, $0.9\mu\text{g}/\text{L}$, $2.7\mu\text{g}/\text{L}$, $8.1\mu\text{g}/\text{L}$ 六个浓度梯度。在一个孔中加入 50ul 苏丹红腹水稀释液和 50ul 对位红标准品稀释液, 其余步骤均一致。

表 4 对位红标准品的酶标孔光密度值测定结果

对位红标准品竞争 ELISA						
稀释浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	0	0.1	0.3	0.9	2.7	8.1
	0.429	0.420	0.413	0.382	0.258	0.200

	0.447	0.443	0.423	0.365	0.262	0.203
OD 平均值	0.438	0.432	0.418	0.374	0.260	0.202

(3) 单抗腹水的特异性鉴定

选择苏丹红 II、III、IV 号和四种常用添加剂（克伦特罗、孔雀石绿、结晶紫、胭脂红），进行交叉反应试验。计算 IC₅₀ 值和交叉反应率。结果见表 5。

IC₅₀ 值为各标准品最大信号值降低 50% 所对应的待测物浓度。

交叉反应率 (CR%) = 苏丹红 I 的 IC₅₀ 值 / 测试物质的 IC₅₀ 值 × 100%。

表 5 单抗腹水与不同待测物的 IC₅₀ 值和交叉反应率

	IC ₅₀ 值 (ug/L)	交叉反应率 (CR%)
苏丹红 I 号	0.8	100
苏丹红 II 号	38.7	2.07
苏丹红 III 号	64.5	1.24
苏丹红 IV 号	37.8	2.12
克伦特罗	>500	< 0.2
孔雀石绿	>500	< 0.2
结晶紫	>500	< 0.2
胭脂红	>500	< 0.2

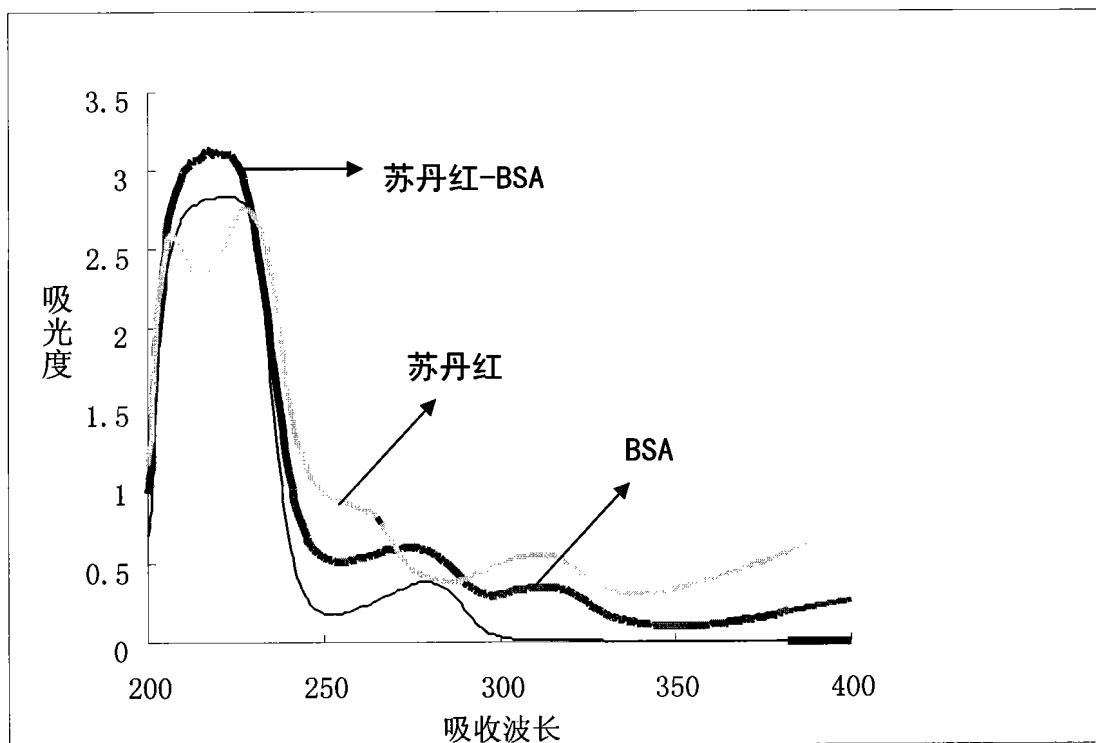


图 1

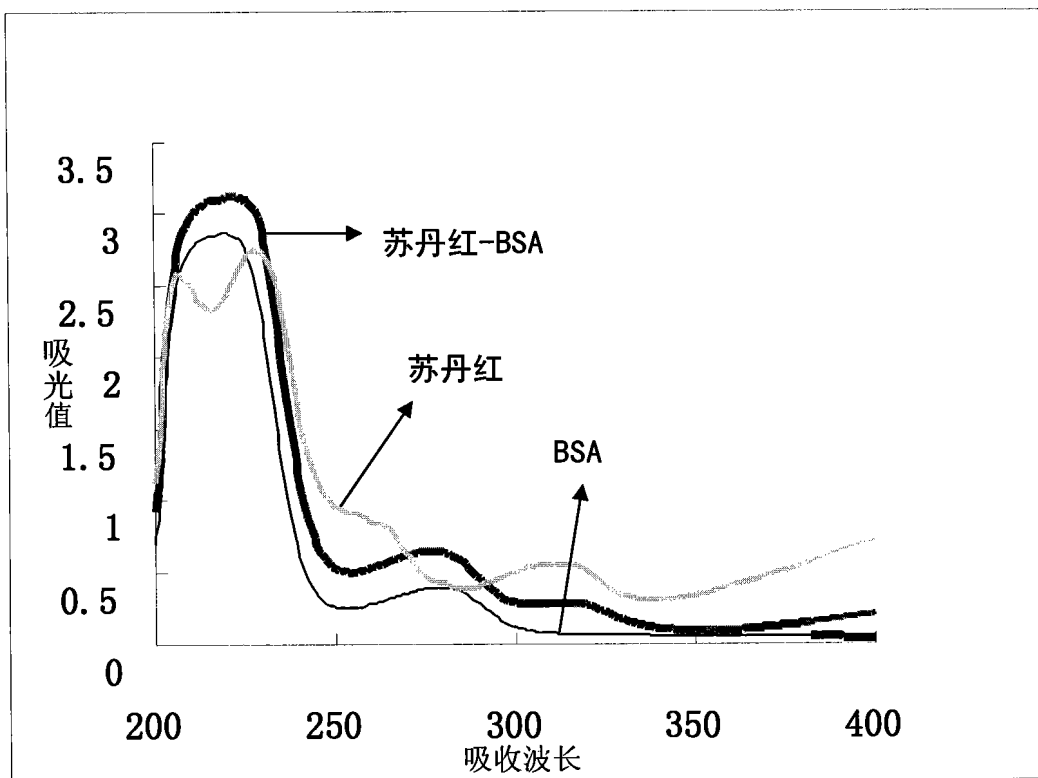


图 2

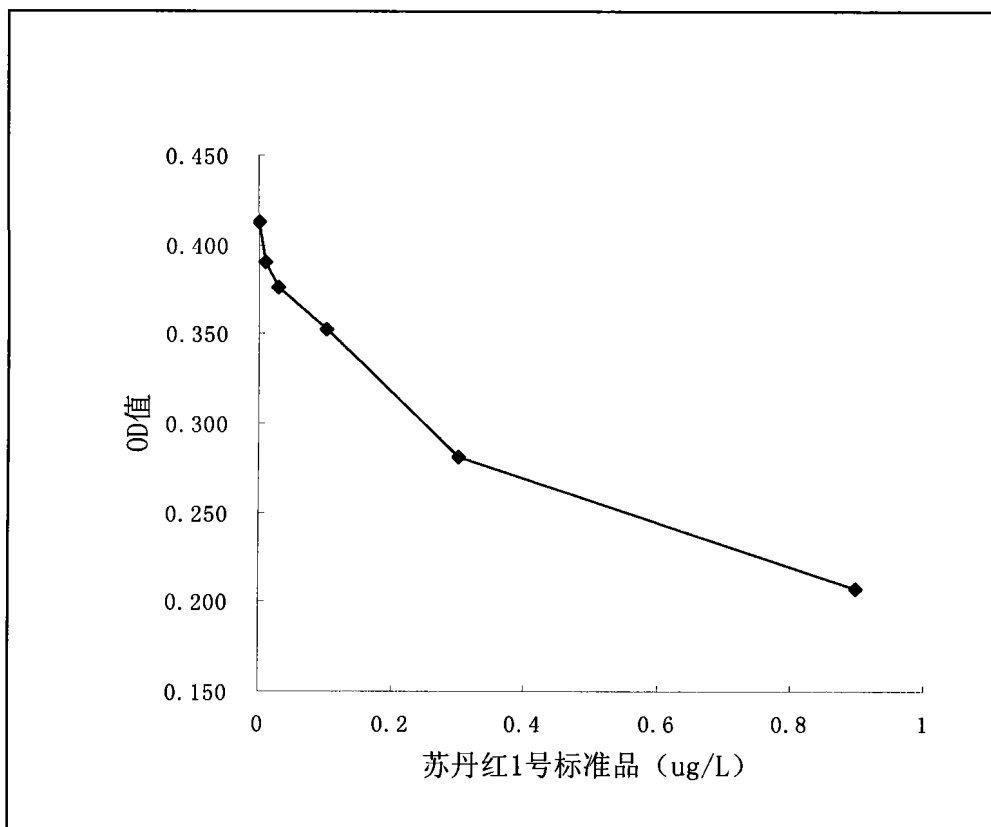


图 3

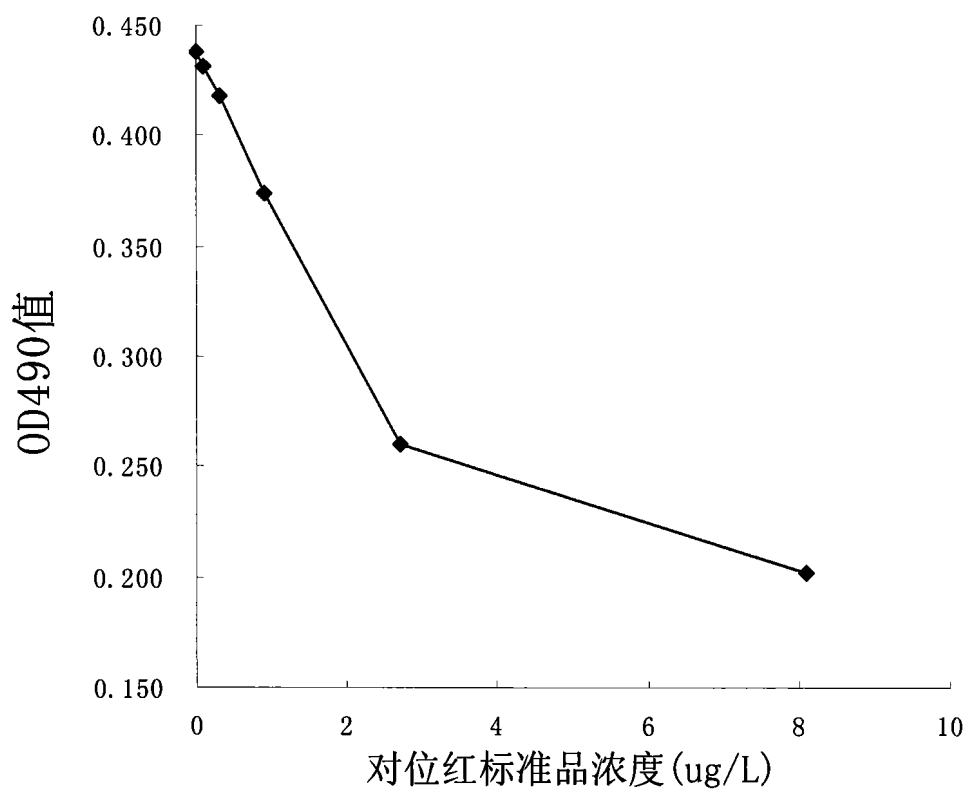


图 4

专利名称(译)	一种单克隆抗体的制备及其用途		
公开(公告)号	CN101393218A	公开(公告)日	2009-03-25
申请号	CN200810201463.9	申请日	2008-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
[标]发明人	钱旻 王群 李恺 韩红辉 顾虹洁 汪磊 杜冰		
发明人	钱旻 王群 李恺 韩红辉 顾虹洁 汪磊 杜冰		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种单克隆抗体的制备及其用途，具体说涉及一种适用于同时检测苏丹红I和对位红残留的单克隆抗体的制备及其用途，属于免疫化学分析技术领域。本发明以苏丹红衍生物与牛血清白蛋白交联的复合物作为免疫抗原，将免疫抗原免疫Balb/C小鼠，将小鼠的致敏脾脏细胞与骨髓瘤细胞SP2/0融合制备杂交瘤细胞，经间接ELISA筛选和有限稀释法获得单克隆杂交瘤细胞株，将杂交瘤细胞株注射于小鼠腹腔生产单克隆抗体。本发明的提供一种基于上述方法制备的抗原及其单克隆抗体特性适用于定性和定量检测苏丹红I和对位红及其含量的酶联免疫测定(ELISA)方法。

