



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106754736 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611118785.8 *C07K 16/44*(2006.01)
(22)申请日 2016.12.08 *G01N 33/532*(2006.01)
(83)生物保藏信息 *G01N 33/535*(2006.01)
CCTCC NO:C2016182 2016.10.26 *G01N 33/543*(2006.01)
(71)申请人 河北省科学院生物研究所 *G01N 33/577*(2006.01)
地址 050051 河北省石家庄市友谊南大街 *G01N 33/94*(2006.01)
46号2号楼509
申请人 石家庄科品生物技术有限公司
(72)发明人 李春生 刘静静 李玉静 吴萌
程华 邸禄芹 张小兵 李亚璞
陈英珠
(74)专利代理机构 河北东尚律师事务所 13124
代理人 李国聪
(51)Int.Cl.
C12N 5/20(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种抗福莫特罗单克隆抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种抗福莫特罗单克隆抗体及其应用,属于免疫学技术领域和兽药残留分析技术领域。所述抗单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2016182的杂交瘤细胞株分泌产生,该抗体效价为1:512000,亚型为IgG₁,亲和力常数K_a=7.24×10⁸L/mol,对福莫特罗抑制率IC₅₀为1.1 μg/L,对其它福莫特罗相似物无交叉反应。所述的单克隆抗体可用于制备检测福莫特罗的酶联免疫试剂盒和胶体金试层析试纸条,以达到快速且灵敏地检测动物组织、尿液及饲料中的福莫特罗的目的。

1. 一种抗福莫特罗单克隆抗体,其特征在于,该单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO: C2016182的杂交瘤细胞株Formoterol-3E6产生。

2. 根据权利要求1所述的抗福莫特罗单克隆抗体,其特征在于,该抗体效价为1: 512000,亚型为IgG₁,亲和力常数 $K_a = 7.24 \times 10^8 \text{L/mol}$,对福莫特罗抑制率 IC_{50} 为1.1 $\mu\text{g/L}$,与福莫特罗的交叉反应率为100.00%,与苯乙醇胺A、沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、妥布特罗、莱克多巴胺、西马特罗无交叉反应。

3. 一种产生如权利要求1或2所述的抗福莫特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株Formoterol-3E6,其特征在于,其保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号CCTCC NO: C2016182,保藏日期为2016年10月26日。

4. 一种制备如权利要求1或2所述的福莫特罗单克隆抗体的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 制备福莫特罗抗原工作液:

(a) 活化对氨基苯甲酸的制备:称取6mg亚硝酸钠,溶在0.35mL蒸馏水中,然后称取10mg对氨基苯甲酸,溶入1.1mL 1mol/L的盐酸中,冰浴搅拌,将上述亚硝酸钠溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应1h,得到活化对氨基苯甲酸;

(b) 带有羧基的福莫特罗活性中间体的制备:称取福莫特罗30mg溶在5mL、0.05mol/L冰冷的硼砂缓冲溶液中,所述硼砂缓冲溶液pH=9并且含0.15mol/L的氯化钠,冰浴搅拌,将此溶液逐滴加入到活化对氨基苯甲酸溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应3h,得到带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液;

(c) 免疫原的合成:在步骤(b)所得的带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h;称取BSA 200mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4 $^{\circ}\text{C}$ 透析72h,然后改用蒸馏水4 $^{\circ}\text{C}$ 透析48h,每天换液2次,透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,标记为Formoterol-BSA;

(d) 检测原的合成:在步骤(b)所得的带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h;称取OVA 150mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4 $^{\circ}\text{C}$ 透析72h,然后改用蒸馏水4 $^{\circ}\text{C}$ 透析48h,每天换液2次,透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,标记为Formoterol-OVA;

(2) 制备福莫特罗单克隆抗体:

(a) 动物免疫:选择载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原,免疫6-8周龄的雌性Balb/c小鼠,间隔2周免疫1次,3次免疫后断尾取血测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠准备融合;

(b) 细胞融合:取步骤(a)选定的小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/O细胞进行融合,间接ELISA法测定上清液选取阳性高的孔,通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至建立产生单一抗福莫特罗的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(c) 单克隆抗体的大量制备:选取个体较大的雌性Balb/c小鼠,采用体内诱生腹水法,

大量制备腹水,并通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,分成小管,-20℃保存,获得福莫特罗单克隆抗体。

5. 权利要求1或2所述的抗福莫特罗单克隆抗体在用于配制检测生物样品中的福莫特罗的非诊断目的检测产品中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述非诊断目的检测产品为酶联免疫试剂盒或胶体金层析试纸条。

7. 一种检测福莫特罗的酶联免疫试剂盒,其特征在于,该试剂盒中含有如权利要求1或2所述的抗福莫特罗的单克隆抗体。

8. 一种检测福莫特罗的胶体金层析试纸条,其特征在于,该试纸条中含有如权利要求1或2所述的抗福莫特罗的单克隆抗体。

一种抗福莫特罗单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗福莫特罗单克隆抗体、产生该单克隆抗体的杂交瘤细胞株,以及该抗体在检测福莫特罗上的应用,属于免疫学技术领域和兽药残留分析技术领域。

背景技术

[0002] 福莫特罗 (Formoterol) 是由日本山之内制药株式会社中央研究所开发的第三代 β_2 -肾上腺素受体激动剂平喘药物,具有支气管扩张作用,还有抗过敏和抑制水肿的作用,可用于治疗慢性支气管哮喘、夜间哮喘、运动性哮喘、慢性阻塞性肺病以及儿童非哮喘性呼吸道疾病。近年来,随着我国对食品安全监管力度的加强,对违禁使用兽药的监管力度逐渐加大,滥用违禁兽药的现象有所控制,但是出现了使用生物活性相似的替代品代替重点监管兽药的新现象。新型“瘦肉精”福莫特罗与克伦特罗等三种常用“瘦肉精”物质具有同样的促进生长、增加瘦肉率的作用,2002年农业部1519号条例规定食品动物禁止使用 β 激动剂类药物作为饲料添加剂。福莫特罗检测手段滞后,尤其是快速检测产品缺乏,国家及各省市正在加紧建立新型“瘦肉精”物质的确证方法,同时也急需适合批量、快速筛选的检测产品,满足政府和企业的需要。

[0003] 目前有关福莫特罗残留的检测技术主要有高效液相色谱法 (HPLC)、液相色谱-质谱联用法 (LC-MS)、液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 及免疫分析技术,前三种方法灵敏、准确,但操作繁琐,对实验设备和技术要求较高,不适合大批量样品的快速检测。免疫分析方法包括酶联免疫吸附法 (ELISA) 和胶体金免疫层析法 (GICA),具有灵敏度高、特异性好、成本低、操作方便等特点,适于大批量样品筛选。因此,抗福莫特罗单克隆抗体的制备对于动物性食品免疫快速检测方法的建立以及保障人类健康具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术缺陷,提供一种抗福莫特罗单克隆抗体,所述单克隆抗体对福莫特罗有特异性,所述抗单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO: C2016182的杂交瘤细胞株Formoterol-3E6产生。进一步的,本发明将该单克隆抗体应用于检测福莫特罗。

[0005] 本发明所述技术问题是由以下技术方案实现的。

[0006] 一种抗福莫特罗单克隆抗体,该单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO:C2016182的杂交瘤细胞株产生。该杂交瘤细胞株被命名为杂交瘤细胞株Formoterol-3E6,于2016年10月26日送交中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 保藏,保藏号为CCTCC NO:C2016182。

[0007] 上述抗福莫特罗单克隆抗体效价为1:512000,亚型为IgG₁,亲和力常数 $K_a=7.24 \times 10^8 \text{L/mol}$,对福莫特罗抑制率 IC_{50} 为1.1 $\mu\text{g/L}$,与福莫特罗的交叉反应率为100.00%,与其它几种相似物(苯乙醇胺A、沙丁胺醇、妥布特罗、盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、西马特罗)无交叉反应;

[0008] 上述福莫特罗单克隆抗体在用于配制检测生物样品中的福莫特罗的非诊断目的

检测产品中的应用。

[0009] 上述应用,所述非诊断目的检测产品为酶联免疫试剂盒或胶体金层析试纸条。

[0010] 进一步的,一种检测福莫特罗的酶联免疫试剂盒,该试剂盒中含有所述的抗福莫特罗的单克隆抗体。

[0011] 一种检测福莫特罗的胶体金层析试纸条,该试纸条中含有所述的抗福莫特罗的单克隆抗体。

[0012] 一种制备上述福莫特罗单克隆抗体的方法,包括如下步骤:

[0013] (1) 制备福莫特罗抗原工作液:

[0014] (a) 活化对氨基苯甲酸的制备:称取6mg亚硝酸钠,溶在0.35mL蒸馏水中,然后称取10mg对氨基苯甲酸,溶入1.1mL 1mol/L的盐酸中,冰浴搅拌,将上述亚硝酸钠溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应1h,得到活化对氨基苯甲酸;

[0015] (b) 带有羧基的福莫特罗活性中间体的制备:称取福莫特罗30mg溶在5mL、0.05mol/L冰冷的硼砂缓冲溶液中(pH=9,含0.15mol/L的氯化钠),冰浴搅拌,将此溶液逐滴加入到活化对氨基苯甲酸溶液中,4℃避光反应3h,得到带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液;

[0016] (c) 免疫原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h。称取BSA 200mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4℃透析72h,然后改用蒸馏水4℃透析48h,每天换液2次。透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20℃保存。标记为Formoterol-BSA;

[0017] (d) 检测原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h。称取OVA 150mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4℃透析72h,然后改用蒸馏水4℃透析48h,每天换液2次。透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20℃保存。标记为Formoterol-OVA。

[0018] (2) 制备福莫特罗单克隆抗体:

[0019] (a) 动物免疫:选择载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原,免疫6-8周龄的雌性Balb/c小鼠,间隔2周免疫1次,3次免疫后断尾取血测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0020] (b) 细胞融合:取步骤(a)选定的小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,间接ELISA法测定上清液选取阳性高的孔,通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至建立产生单一抗福莫特罗的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0021] (c) 单克隆抗体的大量制备:选取个体较大的雌性Balb/c小鼠,采用体内诱生腹水法,大量制备腹水,并通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,分成小管,-20℃保存,获得福莫特罗单克隆抗体。

[0022] 一种鉴定上述福莫特罗单克隆抗体特性的方法,包括如下步骤:

[0023] (a) 效价测定

[0024] 以1:40000稀释包被原包被检测板,将纯化后的单克隆抗体进行1:2000,1:4000,1:8000,……1:1024000稀释,加入到酶标板孔内,反应后加入HRP标记的羊抗鼠二抗,最后用TMB显色,结果显示纯化后的福莫特罗单克隆抗体浓度为1mg/mL时的效价达1:512000。

[0025] (b) 亚型测定

[0026] 采用购自Sigma公司的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒进行亚型测定,结果显示福莫特罗单克隆抗体亚型为IgG1。

[0027] (c) 亲和力测定

[0028] 采用非竞争酶联免疫法测定福莫特罗单克隆抗体的亲和常数,结果显示亲和常数 $K_a=7.24 \times 10^8 \text{L/mol}$ 。

[0029] (d) 抑制率测定

[0030] 采用间接竞争ELISA测定抑制率,以吸光度百分比 $B/B_0\%$ (B代表不同浓度标准液的A450, B_0 代表零浓度标准液的A450)为纵坐标,以不同浓度标准液的对数[Lg(formoterol)]为横坐标,绘制抗体的抑制曲线。结果显示该抗体对福莫特罗抑制率 IC_{50} 为1.1 $\mu\text{g/L}$ 。

[0031] (f) 特异性测定

[0032] 用竞争ELISA法测定该抗体与福莫特罗及其类似物(苯乙醇胺A、沙丁胺醇、妥布特罗、盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、西马特罗)的交叉反应率,结果该抗体与福莫特罗CR(%)为100%,与其类似物CR(%)均小于0.1%。

[0033] 本发明提供的单克隆抗体可应用于检测样品中福莫特罗,主要是将其应用于制备福莫特罗检测的酶联免疫试剂盒和胶体金试条纸。本发明提供的抗福莫特罗单克隆抗体的质量具有很强的可控性和可重复性,并通过对所测抗体特性的初步分析及鉴定,为特异、灵敏的免疫测定方法的进一步建立和应用提供了实验依据。

附图说明

[0034] 图1本发明所述福莫特罗单克隆抗体效价测定图

[0035] 图2本发明所述福莫特罗单克隆抗体亚型测定图

[0036] 图3本发明所述福莫特罗单克隆抗体亲和力测定图

[0037] 图4本发明所述福莫特罗单克隆抗体抑制率测定图

[0038] 本发明所述的抗福莫特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株Formoterol-3E6,已于2016年10月26日送交中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC,地址:武汉大学,中国典型培养物保藏中心,邮编:430072)保藏,保藏编号CCTCC NO:C2016182。

具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明,所列举的实施例不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

[0040] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0041] 实施例一 本发明所述福莫特罗抗原的制备

[0042] (1) 活化对氨基苯甲酸的制备:称取6mg亚硝酸钠,溶在0.35mL蒸馏水中,然后称取10mg对氨基苯甲酸,溶入1.1mL 1mol/L的盐酸中,冰浴搅拌,将上述亚硝酸钠溶液逐滴加入

到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应1h,得到活化对氨基苯甲酸;

[0043] (2) 带有羧基的福莫特罗活性中间体的制备:称取福莫特罗30mg溶在5mL、0.05mol/L冰冷的硼砂缓冲溶液中(pH=9,含0.15mol/L的氯化钠),冰浴搅拌,将此溶液逐滴加入到活化对氨基苯甲酸溶液中,4℃避光反应3h,得到带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液;

[0044] (3) 免疫原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h。称取BSA 200mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4℃透析72h,然后改用蒸馏水4℃透析48h,每天换液2次。透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20℃保存。标记为Formoterol-BSA;

[0045] (4) 检测原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h。称取OVA 150mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4℃透析72h,然后改用蒸馏水4℃透析48h,每天换液2次。透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20℃保存。标记为Formoterol-OVA。

[0046] 实施例二 本发明所述福莫特罗单克隆抗体的制备

[0047] (1) 动物免疫:载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原免疫6-8周龄的雌性Ba1b/c小鼠,间隔2周免疫1次,免疫流程见表1,三免后断尾取血测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0048] 表1免疫流程图

免疫时间	免疫次数	免疫部位	免疫剂量	备注
0	第一次免疫	尾静脉注射	10μg/只	
[0049] 2周	第二次免疫	尾静脉注射	10μg/只	
4周	第三次免疫	尾静脉注射	10μg/只	测定效价、抑制率
6周	加强免疫	尾静脉注射	10μg/只	

[0050] (2) 细胞融合:融合小鼠摘眼球放血,将血清作为阳性对照,脱颈处死后无菌条件下取出脾脏,制备脾细胞,与SP2/0细胞按5:1的比例通过PEG融合,将融合后的细胞悬液加入已铺有饲养细胞的96孔板,放入37℃、5%CO₂的培养箱中培养;

[0051] (3) 阳性杂交瘤细胞株的筛选:融合后的细胞,次日检查有无污染,融合后第10天换用HT培养基。换液后2-3d用间接ELISA和间接竞争ELISA进行阳性孔筛选,尽量挑选出强阳性、抑制率高、单个克隆、细胞状态好的孔,通过有限稀释法进行亚克隆,同时进行扩大培养、冻存,直至建立单一分泌抗体的单克隆细胞株。

[0052] (4) 单克隆抗体的大量制备:采用小鼠体内诱生腹水的方法,取健康的Ba1b/c雌性小鼠,每只小鼠体内注射石蜡油0.5mL,7d后调整克隆化阳性杂交瘤细胞10⁶/mL,每只小鼠腹腔注射1mL,7-9天取腹水,离心弃脂肪,经辛酸-硫酸铵纯化,冻干后-20℃保存,获得福莫

特罗单克隆抗体。

[0053] 实施例三 本发明所述福莫特罗单克隆抗体特性鉴定

[0054] (1) 效价测定

[0055] 采用间接ELISA法,具体步骤如下:包被:用碳酸盐缓冲液稀释包被原至浓度为2 μ g/mL,96孔酶标板100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜;洗涤:包被板恢复至室温,倾去包被液,每孔加洗液300 μ L,每次静置1 min,洗涤3次,最后一次拍干;封闭:每孔加200 μ L含10%小牛血清的洗液,37 $^{\circ}$ C 1h;倾去封闭液,洗涤3次,拍干;加一抗:用洗液将单抗以1:2000倍开始倍比稀释,每孔加入100 μ L,并设置空白对照孔(PBS)和阴性对照(阴性血清),37 $^{\circ}$ C放置45min;倾去一抗,洗涤3次,拍干;加酶标二抗:每孔加入100 μ L的1:10000倍稀释的HRP酶标记的山羊抗鼠IgG,37 $^{\circ}$ C放置30min;倾去二抗,洗涤3次,拍干;显色:每孔加底物显色液100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光反应15min;终止:每孔加入50 μ L终止液,终止反应;检测:测定波长为450nm处的吸光度值(A450nm)。

[0056] 结果判定:(A样品孔-A空白对照)/(A阴性对照-A空白对照) \geq 2.1,且阴性对照的A450nm小于0.2时,此时抗体的稀释倍数即为抗体效价。结果见图1,抗福莫特罗单克隆抗体3E6浓度为1mg/ml时的效价达1:512000。

[0057] (2) 亚型测定

[0058] 采用购自Sigma公司的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒进行亚型测定。杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体与不同亚类的二抗显色有明显差异,其中与IgG1二抗的A450nm值最高,与IgM的二抗显色微弱,而与IgG2a、IgG2b、IgG3和IgA二抗几乎不显色,该细胞分泌的抗体类型以IgG1为主。结果见图2所示,福莫特罗单克隆抗体亚型为IgG1。

[0059] (3) 亲和力测定

[0060] 采用非竞争ELISA法测定亲和常数(Ka)。具体步骤如下:包被:用碳酸盐缓冲液稀释包被原至浓度为1、0.5、0.1、0.05 μ g/mL,96孔酶标板100 μ L/孔分别包被,4 $^{\circ}$ C过夜;倾去包被液,洗涤3次,拍干;封闭:每孔加200 μ L含10%小牛血清的洗液,37 $^{\circ}$ C 1h;倾去封闭液,洗涤3次,拍干;加单抗:用洗液将单抗以100 μ g/mL开始倍比稀释,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C保温保湿45min;倾去一抗,洗涤3次,拍干;加酶标二抗:每孔加入100 μ L的1:10000倍稀释的HRP酶标记的山羊抗鼠IgG,37 $^{\circ}$ C放置30min;倾去二抗,洗涤3次,拍干;显色:每孔加底物显色液100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光反应15min;终止:每孔加入50 μ L终止液,终止反应;检测:测定波长为450nm处的吸光度值(A450nm)。按下列公式计算Ka

[0061]
$$K_a = (n-1) / 2(n \cdot Ab' - Ab)$$

[0062] 式中:Ab为抗原浓度为Ag时,产生半数吸光度值的抗体浓度;Ab'为抗原浓度为Ag'时,产生半数吸光度值的抗体浓度;n为Ag和Ag'之间的稀释倍数采用非竞争酶联免疫法测定福莫特罗单克隆抗体的亲和常数,结果如图3所示,亲和常数Ka=7.24 \times 10⁸L/mol。

[0063] (4) 抑制率测定

[0064] 采用间接竞争ELISA法,具体步骤如下:包被:用碳酸盐缓冲液稀释包被原至浓度为2 μ g/mL,96孔酶标板100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜;倾去包被液,洗涤3次,拍干;封闭:每孔加200 μ L含10%小牛血清的洗液,37 $^{\circ}$ C 1h;倾去封闭液,洗涤3次,拍干;加单抗和标准品:将标准品母液用PBS稀释成8.1、2.7、0.9、0.3、0.1、0 μ g/L,每孔加入50 μ L,再加入一定稀释倍数的单抗,每孔50 μ L,同时设置空白对照孔(PBS)和阴性对照(50 μ L单抗+50 μ L洗液),37 $^{\circ}$ C 保温保湿

45min;倾去一抗,洗涤3次,拍干;加酶标二抗:每孔加入100uL的1:10000稀释的HRP酶标记的山羊抗鼠IgG,37℃放置30min;倾去二抗,洗涤3次,拍干;显色:每孔加底物显色液100μL,37℃避光反应15min;终止:每孔加入50μL终止液,终止反应;检测:测定波长为450nm处的吸光度值(A450nm)。

[0065] 以吸光度百分比B/B0% (B代表不同浓度标准液的A450,B0代表零浓度标准液的A450)为纵坐标,以不同浓度标准液的对数 [Lg (formoterol)]为横坐标,绘制抗体的抑制曲线。结果见图4,该抗体对福莫特罗抑制率IC₅₀为1.1μg/L。

[0066] (5) 特异性测定

[0067] 用竞争ELISA法测定该抗体与福莫特罗及其类似物(苯乙醇胺A、沙丁胺醇、妥布特罗、盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、西马特罗)的交叉反应率,结果见表2,该抗体与福莫特罗CR(%)为100%,与其类似物CR(%)均小于0.01%。

[0068] 表2抗福莫特罗单克隆抗体与类似物交叉反应结果

	交叉反应物	IC ₅₀ /μg/L	交叉反应率 (%)
	福莫特罗	1.1	100
	西马特罗	>1.0×10 ⁴	<0.01
[0069]	盐酸克伦特罗	>1.0×10 ⁴	<0.01
	沙丁胺醇	>1.0×10 ⁴	<0.01
	苯乙醇胺 A	>1.0×10 ⁵	<0.001
	莱克多巴胺	>1.0×10 ⁴	<0.01
	妥布特罗	>1.0×10 ⁵	<0.001

[0070] 实施例四 本发明所述福莫特罗单克隆抗体的应用

[0071] 本实施例是本发明福莫特罗单克隆抗体在建立检测福莫特罗残留的酶联免疫检测试剂盒或胶体金层析试纸条方法后的应用举例,可以用于动物组织、尿液和饲料中福莫特罗的检测。

[0072] (1) 样品前处理

[0073] (a) 尿样:取尿样室温5000rpm离心5min,取上清100μL用样品稀释液稀释4倍,取上清进行检测;

[0074] (b) (肉类、肾脏、肝脏等)组织:称取肉样组织2.0g±0.05g,加入5mL乙酸乙酯,振荡1min,5000rpm离心10min;移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中,水相再用5mL乙酸乙酯重复萃取,合并有机相氮气吹干;加入1mL复溶工作液溶解,取50μL用于分析;

[0075] (c) 饲料:称取饲料2.0g±0.05g,加入5mL乙酸乙酯,振荡1min,5000rpm离心10min;移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中,水相再用5mL乙酸乙酯重复萃取,合并有机相氮气吹干;加入1mL复溶工作液溶解,取50μL用于分析。

[0076] (2) 该抗体应用于酶联免疫检测试剂盒方法检测

[0077] 本发明中试剂盒的检测原理是间接竞争ELISA方法。

[0078] 检测:将福莫特罗包被原包被于微孔板上,按需要取出板条,放置在酶标板上;按需要的量将福莫特罗单克隆抗体工作液和酶标记抗抗体工作液按5:1比例混合;向孔内依次加入标准品或待测样品50μL、福莫特罗单克隆抗体工作液和酶标记抗抗体工作液的混合液50μL,轻轻振荡混匀,25℃避光孵育30min;将孔内液体甩干,用洗涤工作液(用去离子水

将20×浓缩洗涤液20倍稀释) 250μL/孔,洗涤4次,拍干;将显色液A和显色液B按1:1比例混合,100μL/孔加入显色,25℃避光孵育15min;加终止液50μL终止反应,酶标仪450nm下采用双波长450nm/630nm测定,根据标准曲线进行定量或定性。

[0079] 结果判定:(a) 定量分析:分别计算标准品和待测样品的平均吸光度值,标准品或样品的吸光度值(B)除以0标准品的吸光度值再乘以100%,即为百分吸光度值,百分吸光度值 $= (B/B_0) \times 100\%$ 。以百分吸光度值为纵坐标,标准浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线。将待测样本的百分吸光度值代入标准曲线,即可求出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为样本的实际含量。(b) 定性分析:用待测样本的平均吸光度值和标准品的吸光度值相比较,即可得出待测样本的浓度范围,测试范围为0.1μg/ml-8.1μg/ml。

[0080] (3) 该抗体应用于胶体金层析试纸条方法检测

[0081] 反应原理采用竞争法对福莫特罗进行半定量检测,样品中存在的福莫特罗在沿试纸条上移过程中先与金颗粒标记的抗体结合,固定在NC膜上的包被原与福莫特罗同时竞争结合金标抗体,T位置(检测线)的显色强弱与样品中残留福莫特罗的含量成反比,若样品中无福莫特罗残留,则金标抗体全部与包被原反应,试纸条的T线显色。

[0082] 检测:取出福莫特罗胶体金层析试纸条,将样品端插入待测样品液中,插入深度不超过标记线,约10-20秒钟取出检测试纸条,水平放置,3-5分钟观察判定检测结果,10分钟以后结果无效。

[0083] 结果判定:包被膜上对应的质控区C位置(质控线)显示一条棕红色线,检测区T位置不显示棕红色线,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有福莫特罗;在包被膜上T、C位置显示有两条棕红色线,表示结果为阴性,说明在待测样品中不含福莫特罗;当质控区C不显示出棕红色条带,则无论检测区T显示出棕红色条带与否该试纸均判为无效。

[0084] 上述实施例只为说明本发明的技术构思和优点,本发明也可以具有其它的形式变化,如本领域技术人员所熟知,上述实施例仅仅起到对上述发明保护范围内的示范作用,对本领域普通技术人员来说,在本发明所限定的保护范围内还有很多常规变形和其它实施例,这些变形和实施例都将在本发明待批的保护范围之内。

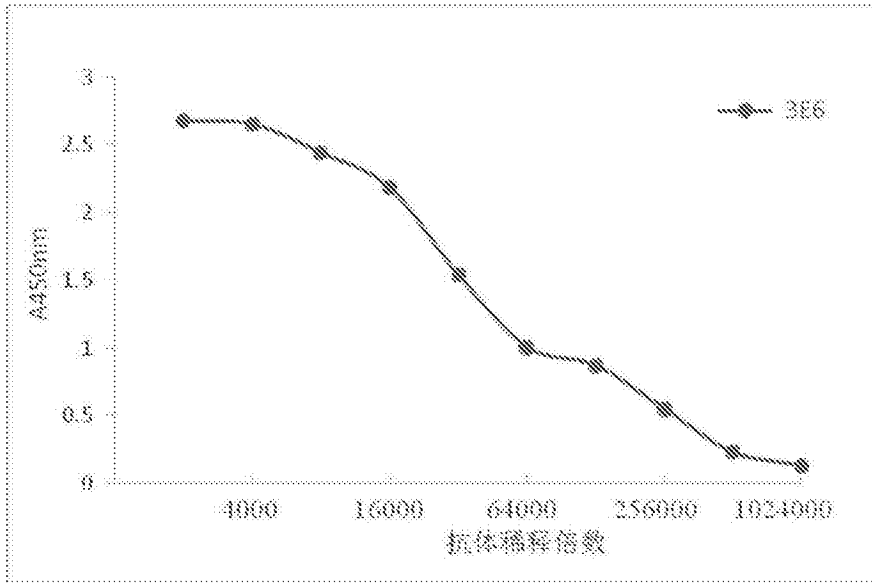


图1

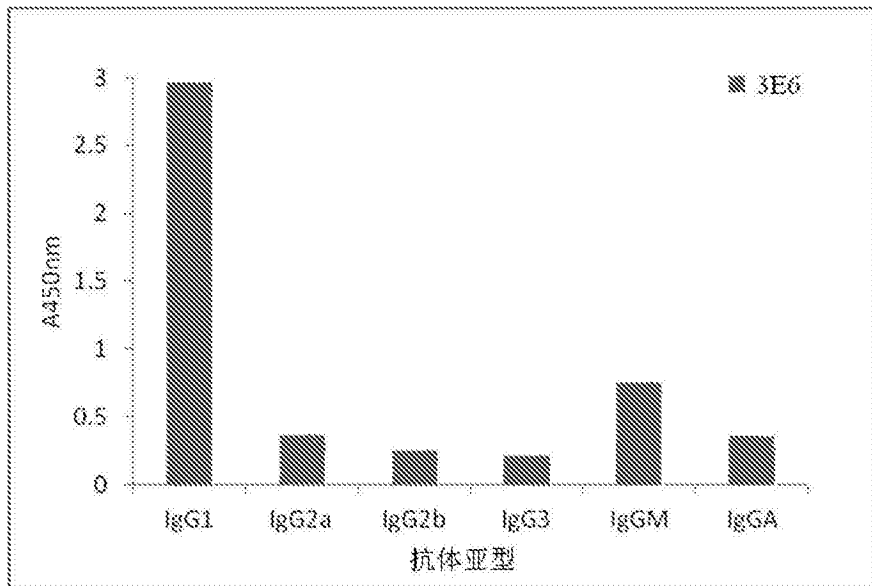


图2

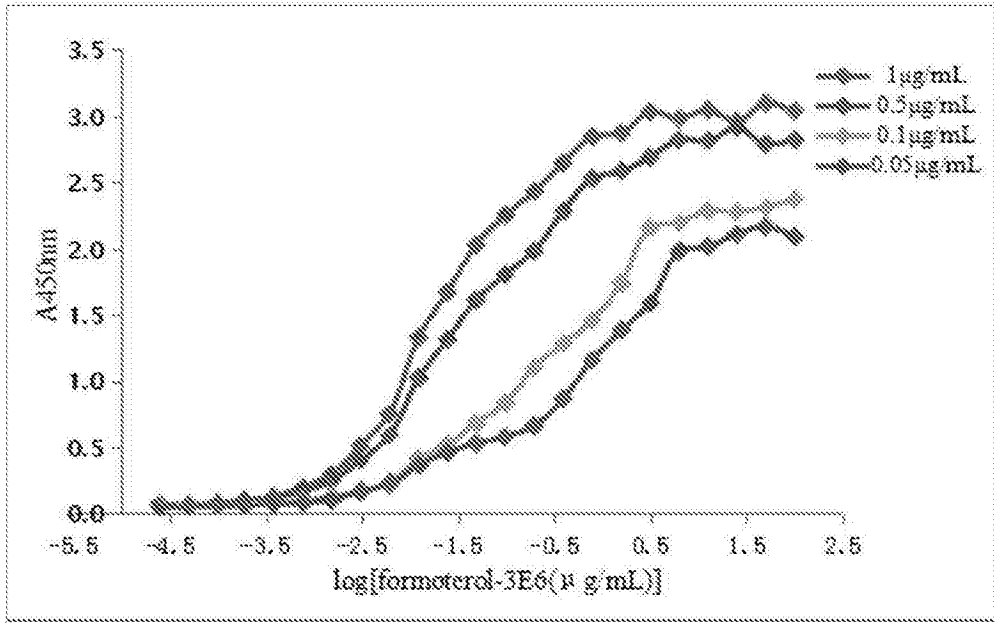


图3

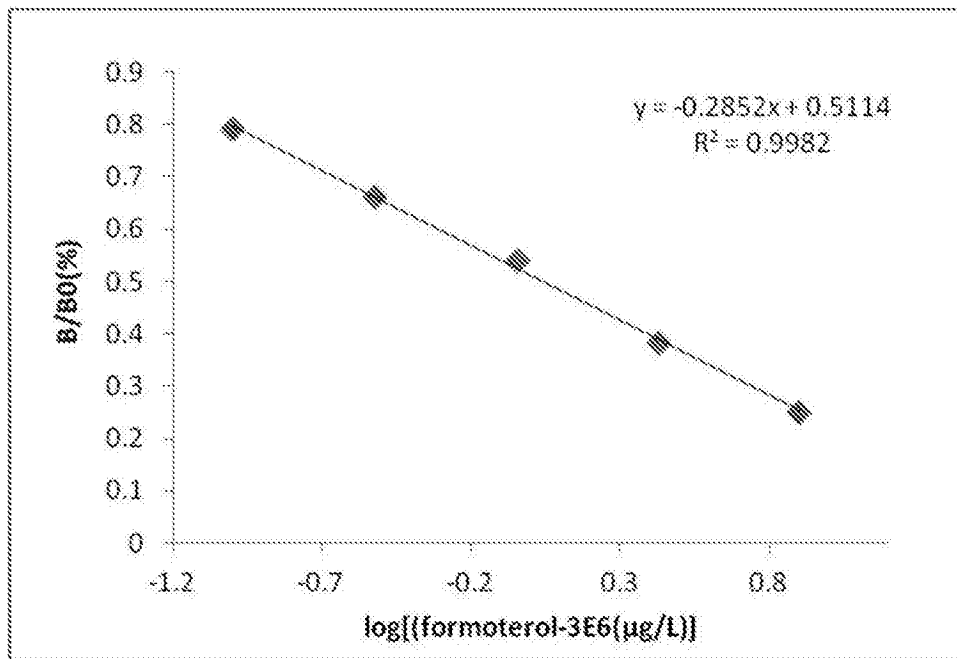


图4

专利名称(译)	一种抗福莫特罗单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN106754736A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611118785.8	申请日	2016-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所 石家庄科品生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所 石家庄科品生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所 石家庄科品生物技术有限公司		
[标]发明人	李春生 刘静静 李玉静 吴萌 程华 邱禄芹 张小兵 李亚璞 陈英珠		
发明人	李春生 刘静静 李玉静 吴萌 程华 邱禄芹 张小兵 李亚璞 陈英珠		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/94		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/33 C07K2317/35 C07K2317/92 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/9433		
代理人(译)	李国聪		
其他公开文献	CN106754736B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种抗福莫特罗单克隆抗体及其应用，属于免疫学技术领域和兽药残留分析技术领域。所述抗单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2016182的杂交瘤细胞株分泌产生，该抗体效价为1:512000，亚型为IgG1，亲和力常数 $K_a = 7.24 \times 10^8 \text{L/mol}$ ，对福莫特罗抑制率 IC_{50} 为1.1 $\mu\text{g/L}$ ，对其它福莫特罗相似物无交叉反应。所述的单克隆抗体可用于制备检测福莫特罗的酶联免疫试剂盒和胶体金试层析试纸条，以达到快速且灵敏地检测动物组织、尿液及饲料中的福莫特罗的目的。

免疫时间	免疫次数	免疫部位	免疫剂量	备注
0	第一次免疫	尾静脉注射	10 μ g/只	
2周	第二次免疫	尾静脉注射	10 μ g/只	
4周	第三次免疫	尾静脉注射	10 μ g/只	测定效价、抑制率
6周	加强免疫	尾静脉注射	10 μ g/只	