

[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 200610114109.3

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月6日

[11] 公开号 CN 1974600A

[22] 申请日 2006.10.27

[21] 申请号 200610114109.3

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路483号

[72] 发明人 曾振灵 杨桂香 黄思秀 陈杖榴
黄显会 贺利民 丁焕中

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 张庆敏

权利要求书1页 说明书13页 附图3页

[54] 发明名称

抗氟甲喹的单克隆抗体、其制备方法及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种抗氟甲喹单克隆抗体，其由小鼠杂交瘤细胞株 2D12CGMCC No. 1830 产生的。其制备方法为采用碳二亚胺法和混合酸酐法将氟甲喹和载体蛋白 BSA、OVA 偶联，合成人工免疫原 FLU - BSA 和包被原 FLU - OVA；用合成的免疫原 FLU - BSA 免疫 Balb/c 小鼠，将免疫脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，用包被原 FLU - OVA 建立间接竞争 ELISA 方法筛选能分泌特异性抗体的细胞株。获得的细胞株的细胞培养上清效价在 1 : 4000 以上， IC_{50} 为 55ng/ml；细胞上清液对恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星的交叉反应率小于或等于 1%。利用细胞株制备的腹水，纯化后效价可以达到 1 : 640,000 以上。本发明的抗体可用于研制氟甲喹的酶联免疫试剂盒。

- 1、一种抗氟甲喹单克隆抗体，其特征在于其由小鼠杂交瘤细胞株2D12 CGMCC No. 1830产生的。
- 2、根据权利要求1所述的单克隆抗体，其特征在于小鼠杂交瘤细胞株2D12细胞上清液对FLU的IC50值为55 ng/mL。
- 3、一种制备权利要求1或2所述的抗氟甲喹单克隆抗体方法，其特征在于包括如下步骤：先将氟甲喹分别和载体牛血清白蛋白、卵清白蛋白偶联制备免疫原和包被原，然后通过小鼠免疫、细胞融合、筛选出杂交瘤细胞株2D12，再进行培养、纯化成单克隆抗体。
- 4、根据权利要求3所述单克隆抗体的制备方法，其特征在于所述的氟甲喹免疫原采用碳二亚胺法制备，用所述免疫原免疫Balb/c小鼠，小鼠血清效价达到1：102,400。
- 5、根据权利要求3或4所述单克隆抗体的制备方法，其特征在于所述的氟甲喹包被原采用混合酸酐法制备。
- 6、根据权利要求3-5中任意一项所述单克隆抗体的制备方法，其特征在于所述小鼠免疫为通过氟甲喹免疫原对Balb/c小鼠进行免疫，取得免疫小鼠血清，再建立间接ELISA和间接竞争ELISA法来测定免疫小鼠的血清效价及抗体的特异性。
- 7、根据权利要求3-6中任意一项所述单克隆抗体的制备方法，其特征在于所述的细胞融合为选取免疫反应强的小鼠，用融合剂将免疫小鼠的脾细胞和SP2/0骨髓瘤细胞融合，得到杂交瘤细胞株。
- 8、权利要求1或2所述抗氟甲喹单克隆抗体在用于制备氟甲喹残留检测的ELISA试剂盒中的应用。
- 9、一种能分泌抗氟甲喹单克隆抗体的细胞株为小鼠杂交瘤细胞株2D12 CGMCC No. 1830。

抗氟甲喹的单克隆抗体、其制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及一种抗氟甲喹的单克隆抗体、其制备方法及其应用，属于免疫化学技术领域。

背景技术

氟甲喹(flumequine, FLU)是一种属于第二代喹诺酮的抗菌药，从20世纪70年代陆续在欧盟和日本等国家广泛用于畜禽和水产养殖中，对各种革兰氏阴性菌感染所致的疾病具有很好的疗效。我国在近几年有不少厂家开发生产氟甲喹，主要用于鲑鱼、鳟鱼、各种虾、鳗鱼以及猪鸡等细菌感染性疾病的防治。

氟甲喹作为用于食品动物中的药物，其在动物可食性组织和产品中的残留毒性备受关注。由于氟甲喹在小鼠的18个月的常规致癌试验中引起肝细胞瘤，JECFA (the Food and Agriculture Organization(FAO)/ World Health Organization(WHO) Joint Expert Committee on Food Additives) 认为其致癌作用并非是由遗传毒性引起，所以在1997年第48次JECFA会议制定了氟甲喹在鳟鱼的MRL(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [WHO, 1997]。然后2002年1月EMEA (the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) 根据其对肠道菌群的作用，制定了微生物学日许量(ADI)为495 $\mu\text{g}/\text{人}$ ，以及氟甲喹在牛、羊、猪、鸡、火鸡以及鱼中的MRL(表1) (Flumequine (Extension to all food producing species), www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/082302en.pdf)。

表1 氟甲喹的MRL(欧盟)

药物活性成分	残留标志物	动物品种	MRLs ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	靶组织	备注
氟甲喹	氟甲喹	牛	200	肌肉	
			300	脂肪	
			500	肝脏	
			1500	肾脏	
			50	牛奶	

		绵羊	200 300 500 1500	肌肉 脂肪 肝脏 肾脏	产奶供人消 费的动物禁 用
		猪	200 300 500 1500	肌肉 脂肪+皮 肝脏 肾脏	
		鸡	400 250 800 1000	肌肉 脂肪+皮 肝脏 肾脏	
		火鸡	400 250 800 1000	肌肉 脂肪+皮 肝脏 肾脏	产蛋鸡禁用
		鲑鱼	600	天然比例的 肌肉和皮肤	

但是1999年Yoshida 报道饲料中4000 mg/kg的氟甲喹饲喂30周可以引起肝脏出现坏死灶 (Yoshida M, Miyajima K, Shiraki K et al. Cancer letter, 1999, 141:99—107); 2001年Takizawa报道氟甲喹具有引发和促进肝脏肿瘤发生的作用 (Takizawa T, Mitsumori K, Takagi H et al. J Toxicol Pathol, 2001, 14:135—143); 2002年Kashida 报道氟甲喹具有引发和促进肝脏肿瘤作用与其引起DNA链断有关 (Kashida Y, Sasaki YF, Ohsawa K, Yokohama N, Takahashi A, Watanabe T, Mitsumori K. Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice. Toxicol Sci. 2002 Oct; 69(2):317-321)。因此在2003年第60次会议上JECFA撤消1999年WHO制定的ADI (WHO TRS 879, 1998) 以及氟甲喹在猪、牛、羊、鸡鱼的MRL (WHO TRS 879, 1998; WHO TRS 900, 2001) (Summary report of the 60th meeting of JECFA (2003))。

鉴于氟甲喹的潜在毒性以及世界各国对氟甲喹在动物性食品中的残留检测的重视, 国外已经有美国的Diffchamb 公司的氟甲喹ELISA 试剂盒 (LOD 为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 和美国ELISA Technologies Inc.的氟甲喹ELISA 试剂盒 (LOD 为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

为了建立氟甲喹ELISA 试剂盒, 需要制备特异强的、可大量生产的抗氟甲喹的抗体。本研究从合成氟甲喹的免疫原及包被原出发, 用单抗制备技术

制备了抗氟甲喹的单克隆抗体，为研制氟甲喹残留检测的ELISA试剂盒打下了基础。

发明内容

本发明的目的是提供一种特异性强、可大量生产抗氟甲喹的单克隆抗体。

本发明的另一目的是提供一种抗氟甲喹残留的单克隆抗体的制备方法。

本发明的再一目的是提供一种抗氟甲喹残留的单克隆抗体在制备氟甲喹残留检测的ELISA试剂盒中的应用。

本发明的还一目的是提供一种分泌特异性抗氟甲喹的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

本发明所述的抗氟甲喹的单克隆抗体，其由小鼠杂交瘤细胞株2D12 CGMCC No. 1830产生的。

所述的小鼠杂交瘤细胞株2D12 CGMCC No. 1830，已于2006年10月11日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC）。

本发明的氟甲喹（flumequine, FLU）属于小分子化合物，分子量为261，其本身不具有免疫原性，只有反应原性，不能直接刺激动物产生抗体，必须与大分子载体蛋白偶联制备成人工抗原，才能诱导机体产生特异性抗体。

本发明所述的抗氟甲喹的单克隆抗体的制备方法，包括如下步骤：先将氟甲喹分别和载体牛血清白蛋白（BSA）、卵清白蛋白（OVA）偶联制备免疫原（FLU-BSA）和包被原（FLU-OVA），然后通过小鼠免疫、细胞融合、筛选出杂交瘤细胞株，再进行培养、纯化单克隆抗体。

其中，本发明所述的氟甲喹免疫原，是采用碳二亚胺法将氟甲喹（FLU）和载体牛血清白蛋白偶联反应生成的。其原理是通过氟喹诺酮类药物的羧基官能团与载体蛋白BSA上的游离氨基之间的缩合反应进行的。用该免疫原免疫Balb/c小鼠，小鼠血清效价能达到1：102,400。

所述的氟甲喹包被原，是用混合酸酐法将氟甲喹（FLU）和卵清蛋白偶联而成的。

本发明通过FLU-BSA免疫原对Balb/c小鼠进行免疫，取得免疫小鼠血清，再建立间接ELISA和间接竞争ELISA法来测定免疫小鼠的血清效价及抗体的

特异性，以确定小鼠是否有特异性抗体产生。

选取免疫反应强的小鼠，利用细胞融合技术，将免疫小鼠的脾细胞和SP2/0骨髓瘤细胞融合，得到杂交瘤细胞株，筛选出分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株2D12 CGMCC No. 1830。

最后将杂交瘤细胞株制备腹水，纯化腹水而得到小鼠抗氟甲喹的特异性的单克隆抗体。

本发明抗氟甲喹残留的单克隆抗体可用于制备氟甲喹残留检测的ELISA试剂盒。

本发明所提供的抗氟甲喹的单克隆抗体制备方法包括用合成的免疫原免疫小鼠，用免疫动物的脾细胞与小鼠杂交瘤细胞融合，用间接竞争ELISA方法筛选分泌抗氟甲喹抗体的细胞株，用该细胞株体内诱导产生腹水，大量制备单克隆抗体。

本发明采用碳二亚胺法和混合酸酐法将氟甲喹（FLU）和载体蛋白BSA、OVA偶联，合成人工免疫原FLU-BSA和包被原FLU-OVA。用人工免疫原免疫Balb/c小鼠，利用细胞融合技术，将免疫小鼠脾细胞和SP2/0骨髓瘤细胞融合，用FLU-OVA作为包被原，建立间接竞争ELISA方法筛选分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株。获得的细胞株的细胞培养上清效价在1：4000以上，IC₅₀为55 ng/ml；细胞上清液对恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星的交叉反应率小于或等于1%。利用细胞株制备的腹水，纯化后效价可以达到1：640,000以上。本发明抗氟甲喹的单克隆抗体特异性强、并能大量生产，可用于研制氟甲喹酶联免疫检测试剂盒，能快速和灵敏地测定动物性食品及水产品中氟甲喹的残留量。

本发明所述细胞株为小鼠杂交瘤细胞株2D12，已于2006年10月11日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC），保藏编号为CGMCC No. 1830。

附图说明

图1为本发明所述BSA的扫描图谱；

图2为本发明所述氟甲喹的扫描图谱；

- 图3为本发明所述FLU-BSA的扫描图；
图4为本发明所述OVA扫描图谱；
图5为本发明所述FLU-OVA扫描图；
图6为本发明所述2D12细胞上清的标准曲线；
图7为本发明所述3E2细胞上清的标准曲线。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例1

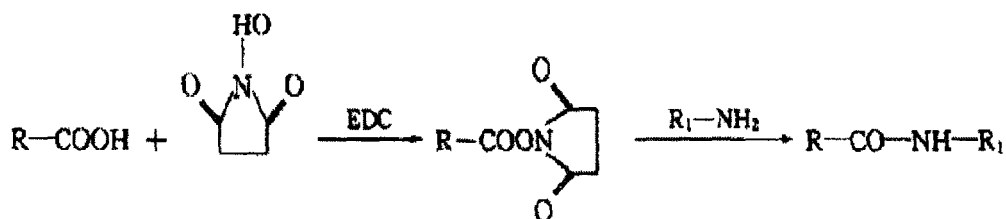
免疫原（FLU-BSA）和包被原（FLU-OVA）的制备

氟甲喹（flumequine, FLU）属于小分子化合物，分子量为261，其本身不具有免疫原性，只有反应原性，不能直接刺激动物产生抗体，必须与大分子载体蛋白偶联制备成人工抗原，才能诱导机体产生特异性抗体。本研究采用碳二亚胺法和混合酸酐法将FLU分别与BSA、OVA相偶联，合成了免疫原与包被原。

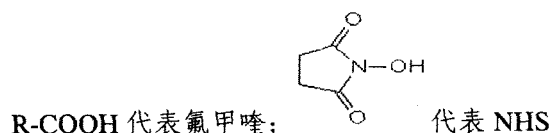
1.1 氟甲喹免疫原的合成与鉴定

本研究采用碳二亚胺法合成氟甲喹人工抗原，其原理是通过氟喹诺酮类药物的羧基官能团与载体蛋白BSA上的游离氨基之间的缩合反应进行的，合成具体步骤如下：

准确称取氟甲喹7.8 mg，先用2 mL二甲基甲酰胺（DMF）溶解，再加入11.6 mg N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）和30.5 mg碳化二亚胺盐酸盐（EDC），于磁力搅拌器上反应24 h，室温避光，命名为反应A液。称取39.6 mg牛血清白蛋白（BSA）溶于5 mL 磷酸盐缓冲液PBS中，制成反应B液。在磁力搅拌器上，将反应液A液缓慢逐滴加入到反应B液中，混合液于室温下避光，搅拌反应4 h。收集反应液转入预处理过的透析袋中，4℃搅拌下，对0.01 mol/L PBS透析3天，每天更换透析液2~3次。收集透析液，分装，-20℃保存。



Flu - BSA 合成原理



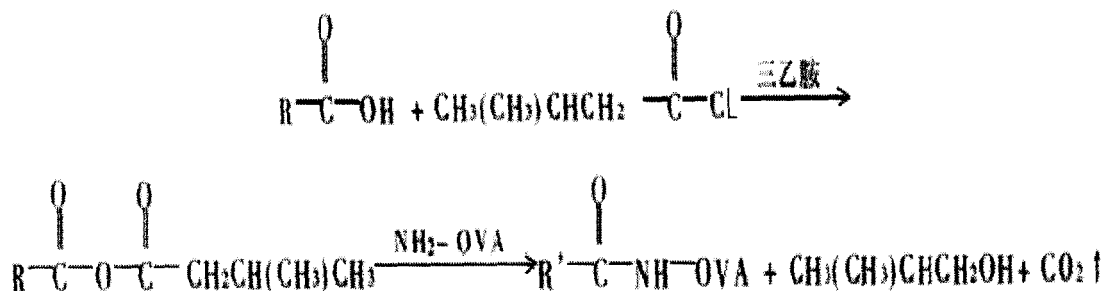
R_1-NH_2 代表载体蛋白 BSA; $R-CO-NH-R_1$ 代表偶联产物

对彻底透析后的氟甲喹免疫原进行紫外扫描分析,得到它们的紫外吸收光谱见图1-图3。经紫外扫描,氟甲喹的最大吸收峰波长为330 nm, BSA的最大吸收峰波长分别为278 nm和280 nm, 而FLU-BSA偶联物的最大吸收峰波长分别出现在312 nm, 可见药物在与BSA偶联后吸收峰发生漂移, 可以间接判断偶联成功。

1.2 氟甲喹包被原的合成与鉴定

采用混合酸酐法合成氟甲喹包被原, 具体合成步骤如下:

准确称取氟甲喹标准品7.8 mg, 用1.5 mL DMF完全溶解, 置于冰乙醇中预冷, 随后加入4.5 μ l三乙胺和6 μ l氯甲酸异丁酯, 室温下反应10 min, 制成反应A液。称取20.25 mg卵清白蛋白(OVA)溶于3mL pH 9.6 碳酸盐缓冲液中, 制成反应B液。在磁力搅拌作用下, 将1.134 mL A液缓慢加入到B液中(每mL B液中加入378 μ l A液), 室温避光, 搅拌反应4 h以上。收集反应液转入透析袋中, 4 $^{\circ}$ C搅拌下, 对pH 9.6 碳酸盐缓冲液透析3天, 每天更换透析液2-3次。收集透析液, 分装, -20 $^{\circ}$ C保存。



注: R-COOH 代表氟甲喹; NH₂-OVA 代表 OVA

Flu - OVA 合成原理

对OVA及彻底透析后的氟甲喹包被原进行紫外扫描分析，其紫外吸收光谱见图4、图5。氟甲喹的最大吸收峰波长为330 nm（图2），OVA的最大吸收峰波长为280 nm（图4），而FLU-OVA的最大吸收峰波长出现在314nm（图5）。可见药物在与蛋白偶联后吸收峰发生漂移，可以间接判断偶联成功。

实施例2

抗氟甲喹的单克隆抗体的制备

2.1 材料

氟甲喹标准品，牛血清白蛋白（BSA），卵清白蛋白（OVA），碳化二亚胺盐酸盐（EDC），N-羟基琥珀酰亚胺（NHS），弗氏完全佐剂（FCA），弗氏不完全佐剂（FICA），邻苯二胺（OPD），HAT和HT（50×浓缩），Sigma公司；二甲基甲酰胺（DMF），氯甲酸异丁酯，三乙胺，磷酸二氢钾，磷酸氢二钠，氯化钠，碳酸氢钠，碳酸钠，广州化学试剂厂；辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠IgG，武汉博士德生物工程有限公司；吐温-20，Amresco公司；聚乙二醇4000（PEG4000），Merck公司；双抗（青链霉素），HYCLONE公司；二甲基亚砷（DMSO），广州展晨生物有限公司；胎牛血清，小牛血清，HYCLONE公司；DMEM高糖培养基，Gibco公司；脱脂奶粉，新西兰进口分装。

Balb/c小鼠（雌性、8~12周龄），昆明鼠，南方医科大学实验动物中心，SP2/0细胞，本实验室保存。

2.2 试验方法

2.2.1 动物免疫

首次免疫时，取FLU-BSA免疫原与等量弗氏完全佐剂乳化，按100 μg/只的剂量腹腔注射，免疫6~8周龄雌性Balb/c小鼠3只，以后每隔3周免疫1次，共免疫5次。

2.2.2 ELISA检测方法的建立

在小鼠第3次免疫后的7~10天，尾部采血，室温静置1 h，然后4℃冰箱放置2 h，3000rpm离心10 min分离血清，4℃保存。建立间接ELISA和间接竞争ELISA法测定血清效价及特异性。

2.2.2.1 间接ELISA方法的建立

采用方阵法确定最适包被原浓度，具体操作步骤如下。

(1)包被：用碳酸盐缓冲溶液将包被原稀释成一系列浓度加入酶标板中，100 μ l/孔，置于37 $^{\circ}$ C水浴中孵育2h包被；

(2)洗涤：甩净包被液，用洗涤液 I（500 mL 0.01mol/L pH 7.4 PBS加入250 μ l 吐温配制成）洗板3~4遍，每次间隔1min，最后用PBS洗板1次，在吸水纸上拍干；

(3)封闭：每孔加入200 μ l 5%脱脂奶粉，37 $^{\circ}$ C孵育2小时后洗涤拍干；

(4)加一抗：加入系列稀释的血清抗体，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C孵育1小时；

(5)洗涤：同(2)；

(6)加酶标二抗：加入HRP-羊抗鼠IgG（1：20000稀释），100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C孵育1小时，洗板同上；

(7)显色：每孔加入100 μ l邻苯二胺（OPD）底物显色液，37 $^{\circ}$ C显色10min；

(8)终止：加入2 mol/L 的 H₂SO₄ 50 μ l/孔，酶标仪读取各孔OD₄₉₀。

判定标准：阳性血清OD₄₉₀在1.0~1.5左右抗原包被浓度和抗体稀释度为最佳工作浓度。阳性血清（P）和阴性血清（N）比值P/N \geq 2.1所对应的阳性血清稀释倍数为血清效价（具体结果见表2）。

2.2.2.2 间接竞争ELISA方法的建立

(1)包被：用最适包被原浓度包被酶标板中，100 μ l/孔，置于37 $^{\circ}$ C水浴中孵育2 h或4 $^{\circ}$ C过夜包被；

(2)洗涤：甩净包被液，用洗涤液 I 洗板3~4遍，每次间隔1 min，最后用PBS洗板1次，在吸水纸上拍干；

(3)封闭：每孔加入200 μ l 5% 脱脂奶粉，37 $^{\circ}$ C孵育2 h后洗涤拍干；

(4)加样：在酶标板的相邻两列先加入抗血清做倍比稀释，50 μ l/孔；然后其中一列每孔加入适当浓度的氟甲喹标准品50 μ l/孔，而另一列加抗体稀释液作为对照，37 $^{\circ}$ C孵育1 h；

(5)洗涤：用洗涤液 I 洗板3~4遍，每次间隔1min，再用PBS洗板1次，在吸水纸上拍干；

(6)加酶标二抗：加入HRP-羊抗鼠IgG（1：20,000稀释），100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C孵育1 h，洗板同上；

(7)显色：每孔加入100 μ l OPD底物显色液，37 $^{\circ}$ C显色10min；

(8)终止：加入2 mol/L H₂SO₄ 50 μ l/孔，酶标仪读取各孔OD₄₉₀。

判定标准：肉眼观察：抑制孔与未抑制孔的颜色变化，若抑制孔颜色颜色变浅，则说明有特异性抗体产生，反之则无；OD值测定：酶标仪读取各孔OD₄₉₀，若抑制孔OD₄₉₀值变小，说明有特异性抗体产生。同时可根据竞争抑制率的大小判断抗体的特异性。

竞争抑制率 = $1 - B/B_0$ （其中B为加入竞争物抑制孔的OD值，B₀为不加竞争物的阳性对照孔的OD值）。（具体结果见表3）

2.2.3 杂交瘤细胞的制备与筛选

选取一只免疫反应强的小鼠，于融合前3天用不加佐剂的抗原冲击免疫，利用细胞融合技术，用50%PEG4000作融合剂，将免疫脾细胞和SP2/0骨髓瘤细胞融合。采用间接ELISA和间接竞争ELISA方法检测杂交瘤细胞上清液中的抗体。阴性对照孔（SP2/0上清和阴性血清）应该接近无色，阳性对照孔（免疫小鼠血清）应明显显色。测定OD值，若杂交瘤细胞上清液检测孔OD值大于或等于阴性对照孔的2.1倍，即为阳性孔；若加入药物的抑制孔颜色变浅，则说明该杂交瘤细胞分泌特异性的抗氟甲喹抗体。采用有限稀释法对阳性杂交瘤进行克隆，经4次亚克隆后，对10株分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株的细胞培养上清，采用已建立的间接ELISA方法测定效价，并用间接竞争ELISA测定氟甲喹对上清OD值的抑制。

2.2.4 单克隆抗体的制备

采用体内诱导产生腹水法大量制备单克隆抗体，具体步骤如下：

- ①选择8~10周的雌性Balb/c小鼠，每只腹腔注射0.5mL弗氏不完全佐剂。
- ②7~10天后，用生理盐水将处于对数生长期的杂交瘤细胞稀释成 5×10^5 个/mL的悬液，每只小鼠注射0.5mL。
- ③8天后，小鼠腹部明显膨大，用针头穿刺腹腔，收集腹水，4 $^{\circ}$ C 5000rpm离心10min，收集上清液，分装，-80 $^{\circ}$ C冻存。

采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水中的单克隆抗体，具体步骤如下：

- ①取腹水2mL，加入0.06mol/L pH 4.0 NaAC-HAC缓冲液4mL，搅拌均匀。
- ②用1 mol/L NaOH 调整pH至4.8。
- ③按每mL腹水加入33 μ L辛酸的量，于磁力搅拌器上，向上述调好pH的腹水中缓慢加入66 μ L正辛酸，搅拌30min。
- ④4 $^{\circ}$ C 6000rpm离心30min，取上清，用0.1 mol/L NaOH 调整pH至7.2。
- ⑤向上清液中缓慢滴加等量饱和(NH₄)₂SO₄(pH 7.2~7.4)溶液，边加边搅拌，此时(NH₄)₂SO₄溶液终浓度为50%，搅拌30min后，静置1h，4 $^{\circ}$ C 6000rpm离心30min。
- ⑥弃上清，用5.5mL 0.01mol/L pH 7.2 PBS溶解沉淀，于磁力搅拌器上，缓慢滴加4.5mL饱和(NH₄)₂SO₄溶液，此时(NH₄)₂SO₄溶液终浓度为45%，搅拌30min后，4 $^{\circ}$ C 6000rpm离心30min。
- ⑦弃上清液，将沉淀溶于适量的0.01mol/L pH 7.2 PBS中。
- ⑧将沉淀悬浮液转入透析袋，用0.01mol/L pH 7.2 PBS透析3天，每天更换透析液2~3次，除去NH₄⁺和SO₄²⁻。

2.3 结果

2.3.1最佳包被原浓度

根据方阵法确定ELISA方法的最佳包被抗原浓度为1 μ g/mL，结果见表2。

表2 酶标仪检测的血清OD₄₉₀

血清稀释度	Flu - OVA浓度 (μ g/mL)			
	8	4	2	1
1 : 4000	2.823	2.655	2.496	1.454
1 : 8000	2.461	2.203	2.080	1.025
1 : 16,000	1.813	1.165	1.074	0.755
1 : 32,000	1.218	0.726	0.561	0.458
1 : 64,000	0.828	0.506	0.496	0.305
1 : 128,000	0.486	0.356	0.265	0.193
1 : 256,000	0.298	0.292	0.255	0.179
1 : 512,000	0.316	0.257	0.254	0.227
阴性1 : 1000	0.191	0.194	0.139	0.122
空白	0.146	0.161	0.181	0.184

2.3.2 免疫小鼠的血清效价及特异性的测定

第4次加强免疫后，小鼠血清效价均能达到1：102,400，见表3（效价孔）。效价孔是指该孔中不含氟甲喹药物，可用于测定血清效价。在间接ELISA中，加入5 μg/mL的氟甲喹标准品作竞争ELISA时，OD值显著降低，说明抗血清是针对氟甲喹的，结果见表3（抑制孔）。

表3 免疫原血清效价及特异性测定（OD值）

血清稀释度	OD	
	效价孔(B0)	抑制孔(B)
1: 6400	2.472	0.349
1: 12800	2.186	0.275
1: 25600	1.857	0.260
1: 51200	1.091	0.195
1: 102400	0.564	0.099
空白	0.095	0.037
阴性1:1000	0.043	0.054

2.3.3 杂交瘤细胞的建立

经过4次克隆，筛选到10株能稳定分泌抗氟甲喹单克隆抗体的杂交瘤细胞株，对其中两株进行分析鉴定，命名为2D12、3E₂。

该小鼠杂交瘤细胞株2D12 CGMCC No. 1830已于2006年10月11日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC）。

2.3.4 细胞上清液效价的测定

将两株细胞的上清作倍比稀释后用间接ELISA检测。结果见表4。判定标准：阳性上清（P）和阴性上清（N）比值 $P/N \geq 2.1$ ，且 $P-N > 0.2$ 所对应的上清稀释倍数为其效价。两株细胞上清效价均达到1：4000，并同时用OVA包被酶标板，结果表明所分泌抗体对OVA无反应，因此可以确定所筛选到的细胞株具有特异性，且针对FLU的。

表4 细胞培养上清效价的测定 (OD值)

细胞培养 上清液稀 释度	2D12		3E ₂		阴性上清对照
	FLU-OVA	OVA	FLU-OVA	OVA	
1 : 256	1.799	0.213	1.862	0.084	0.11
1 : 512	1.373	0.188	1.331	0.062	0.153
1 : 1024	0.925	0.113	0.847	0.05	0.127
1 : 2048	0.507	0.081	0.602	0.084	0.161
1 : 4096	0.415	0.182	0.430	0.05	0.200
1 : 8192	0.302	0.206	0.26	0.065	0.204
1 : 16384	0.204	0.205	0.128	0.187	0.195

注:包被原FLU-OVA浓度为1 μ g/mL, OVA浓度为10 μ g/mL, 酶标二抗稀释倍数为1 : 20000

2.3.5 细胞上清液中单抗特异性的测定

将细胞上清液适当稀释后, 与梯度浓度的氟甲喹标准溶液做间接竞争性ELISA, 重复测定3次, 结果见表5。以抑制率为纵坐标, 药物浓度的对数为横坐标作图, 求两株细胞的培养上清对氟甲喹的IC₅₀。结果见图6、图7。2D12、3E₂细胞上清液对FLU的IC₅₀值分别为55ng/mL、75 ng/mL。

表5 两株细胞培养上清的抑制

标准品浓度 (ng/mL)	2D12		3E ₂			
	OD值	OD值	OD值	OD值	OD值	OD值
0	1.381	1.329	1.405	0.943	0.811	1.016
3.9	1.199	1.092	1.394	0.755	1.006	0.869
7.8	1.042	0.97	1.079	0.669	0.885	0.578
15.6	0.805	0.82	1.058	0.615	0.749	0.617
31.2	0.646	0.649	0.79	0.38	0.483	0.529
62.5	0.664	0.659	0.735	0.426	0.503	0.358
125	0.45	0.398	0.537	0.329	0.369	0.370
250	0.379	0.281	0.427	0.228	0.311	0.302
500	0.320	0.329	0.348	0.214	0.145	0.285
空白	0.068	0.055	0.047	0.09	0.089	0.086
阴性	0.093	0.096	0.092	0.113	0.093	0.143

2.3.6 细胞上清液中单抗交叉反应

将恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星稀释成梯度浓度的标准品，与细胞上清液做间接竞争性ELISA，结果表明细胞上清液对参与测试的5种同类药物的最高交叉反应率为1%。见表6。

表6 细胞上清液与其他喹诺酮类药物的交叉反应

竞争物	交叉反应率	
	2D12	3E ₁₂
氟甲喹	100%	100%
恩诺沙星	0.90%	0.30%
二氟沙星	1%	0.08%
氧氟沙星	0.20%	0.06%
噁喹酸	< 0.1%	< 0.1%
诺氟沙星	0.60%	0.80%

2.3.8 腹水效价的测定

用2D12注射小鼠腹腔制备腹水，用辛酸-硫酸铵法进行纯化，经间接ELISA法检测，腹水效价达到1：640,000以上。

2.4 结论

获得10株分泌抗氟甲喹抗体的杂交瘤细胞株。其中2D12细胞株，细胞培养时得到的抗体效价均在1：4000以上，制备的纯化腹水效价可以达到1：640,000以上，对FLU的IC₅₀值分别为55ng/mL，细胞上清与恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星的交叉反应率低于1%。

虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范畴。

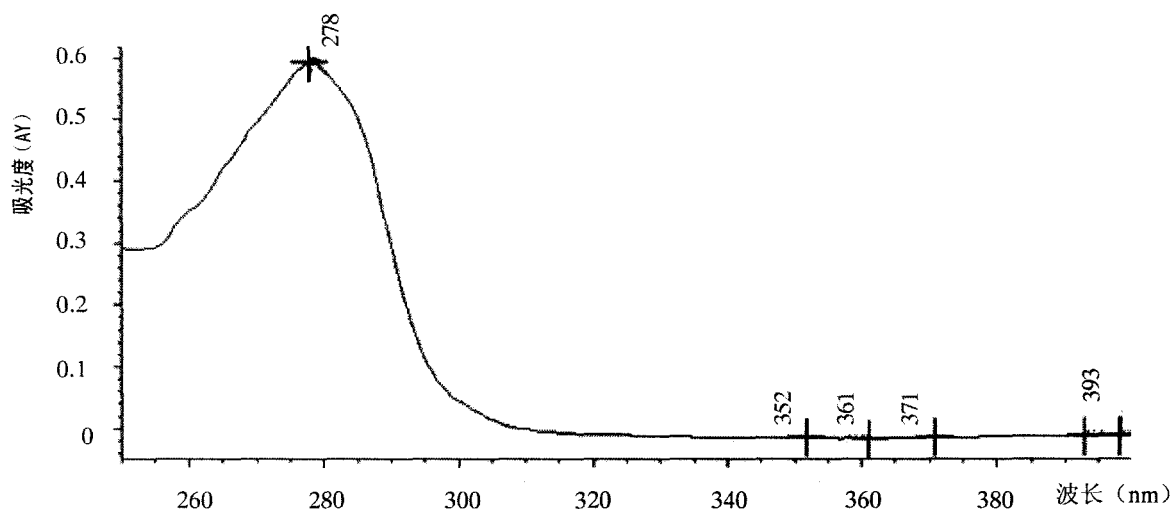


图 1

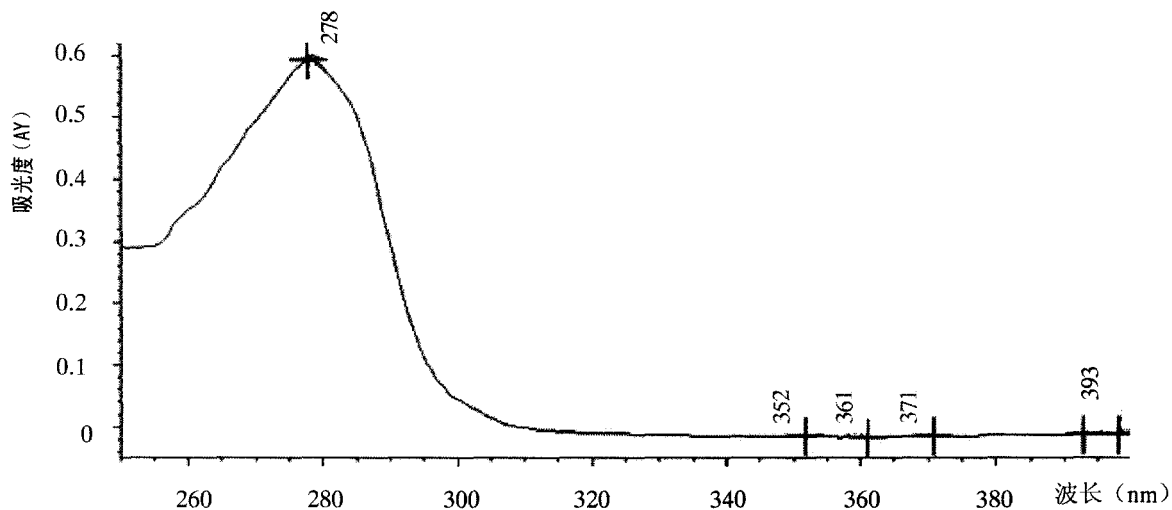


图 2

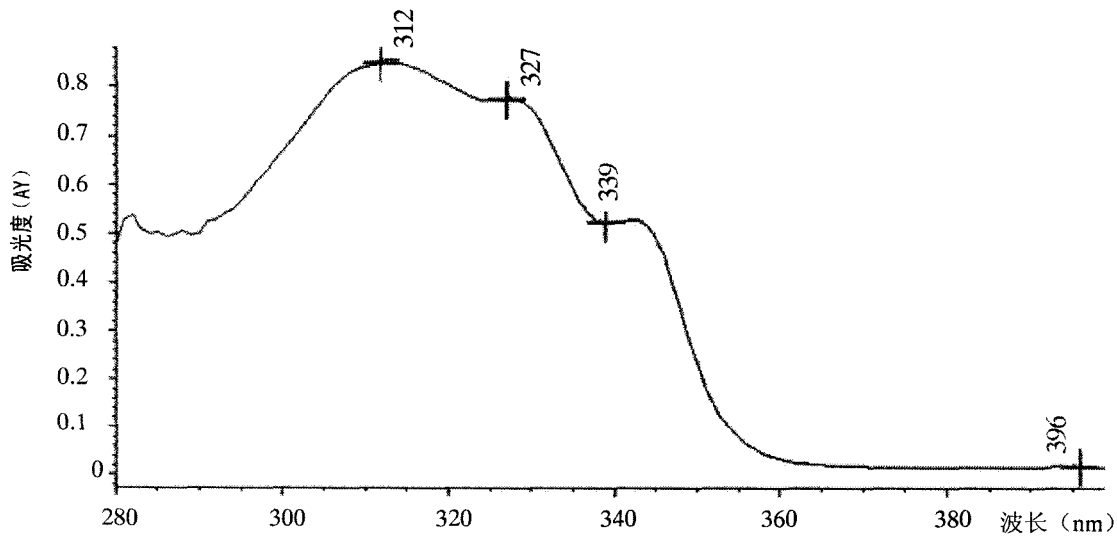


图 3

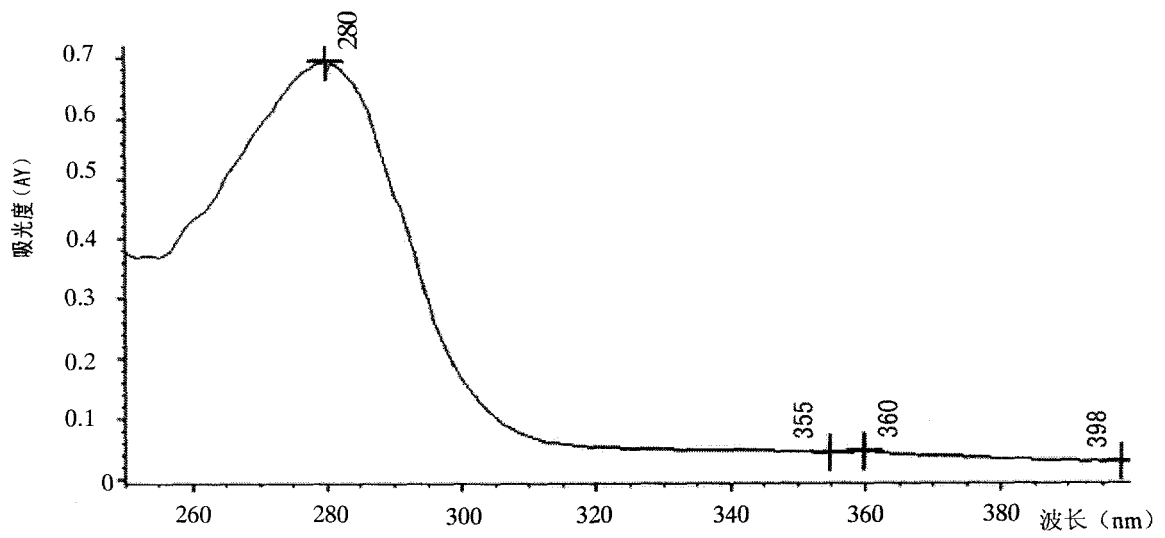


图 4

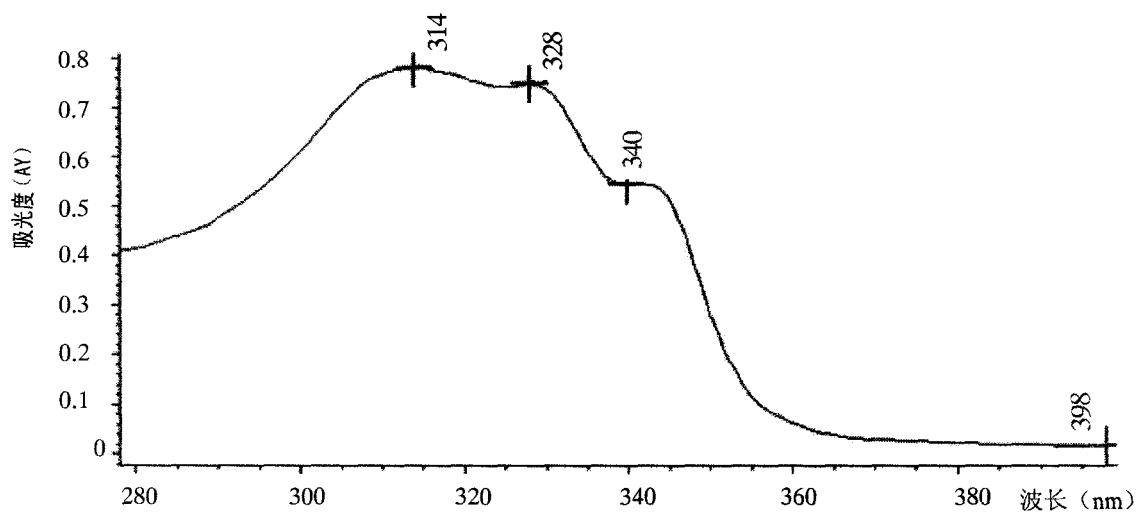


图 5

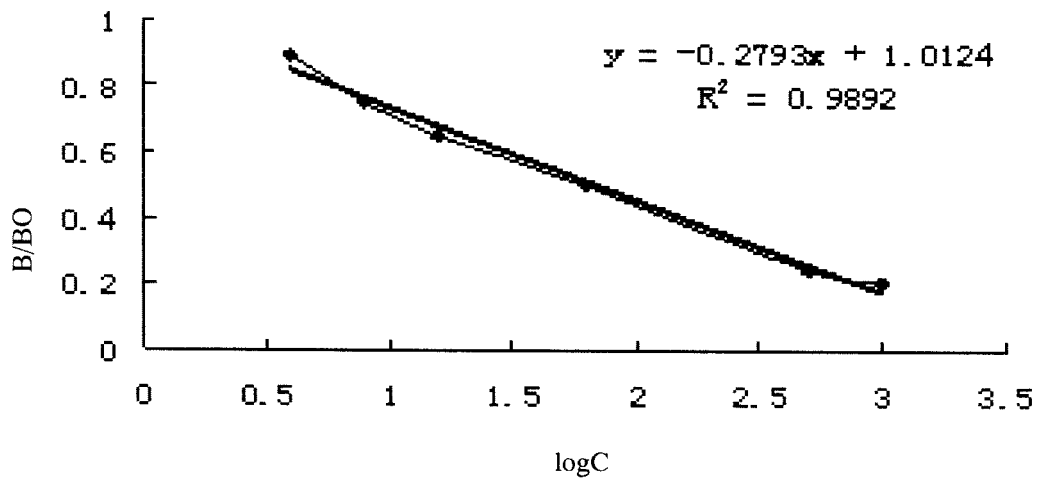


图 6

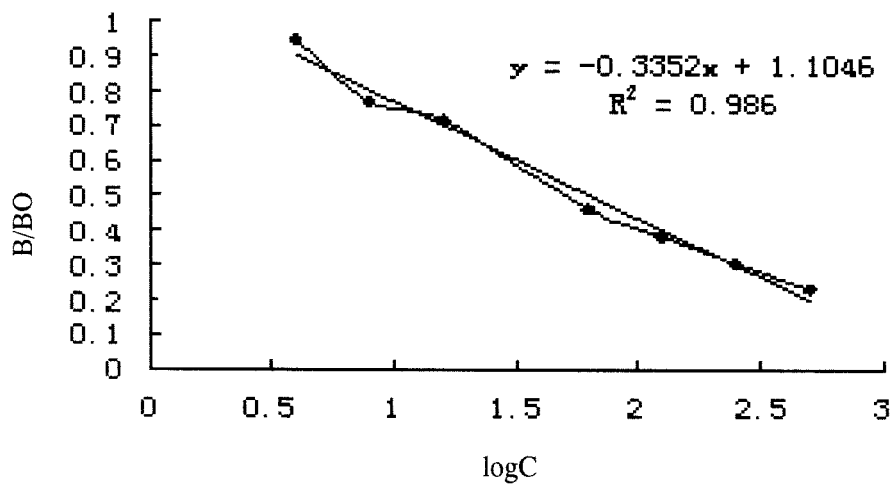


图 7

专利名称(译)	抗氟甲喹的单克隆抗体、其制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN1974600A	公开(公告)日	2007-06-06
申请号	CN200610114109.3	申请日	2006-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	曾振灵 杨桂香 黄思秀 陈杖榴 黄显会 贺利民 丁焕中		
发明人	曾振灵 杨桂香 黄思秀 陈杖榴 黄显会 贺利民 丁焕中		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/18 G01N33/53		
代理人(译)	张庆敏		
其他公开文献	CN1974600B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种抗氟甲喹单克隆抗体，其由小鼠杂交瘤细胞株2D12CGMCC No.1830产生的。其制备方法为采用碳二亚胺法和混合酸酐法将氟甲喹和载体蛋白BSA、OVA偶联，合成人工免疫原FLU - BSA和包被原FLU - OVA；用合成的免疫原FLU - BSA免疫Balb/c小鼠，将免疫脾细胞和SP2/0骨髓瘤细胞融合，用包被原FLU - OVA建立间接竞争ELISA方法筛选能分泌特异性抗体的细胞株。获得的细胞株的细胞培养上清效价在1:4000以上，IC50为55ng/ml；细胞上清液对恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星的交叉反应率小于或等于1%。利用细胞株制备的腹水，纯化后效价可以达到1:640,000以上。本发明的抗体可用于研制氟甲喹的酶联免疫试剂盒。

