



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102702345 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201210144757. 9

克隆抗体的制备及鉴定. 《食品与生物技术学报》. 2011, 第 30 卷 (第 1 期), 156 - 160.

(22) 申请日 2012. 05. 10

审查员 刘婷

(73) 专利权人 中国人民解放军第二军医大学  
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号第二军医大学科研部

(72) 发明人 唐古生 丁自更 康蔡俊 陈英豪  
秦阳华 赵卫国

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219  
代理人 钱春新

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101597267 A, 2009. 12. 09, 全文.

CN 101429243 A, 2009. 05. 13, 全文.

李康, 桑丽雅, 卜令杰, 陈育旺. 三聚氰胺单

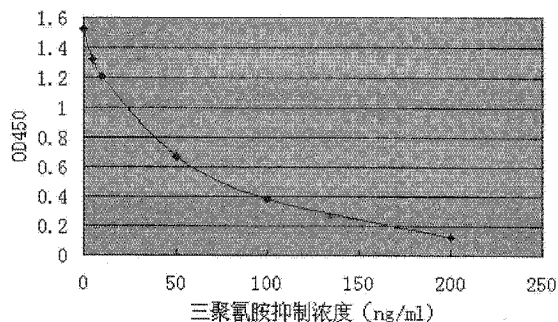
权利要求书3页 说明书19页 附图1页

(54) 发明名称

一种三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法

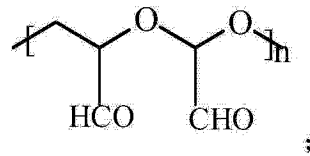
(57) 摘要

本发明涉及一种三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法。三聚氰胺和载体蛋白通过 PAD 作为桥梁试剂进行偶联, 偶联产物免疫动物, 制备可以用于检测三聚氰胺的单克隆抗体。本发明提供的人工制备三聚氰胺抗原及相关抗体可用于三聚氰胺免疫检测试剂的研制开发, 来满足低成本、快捷、操作简便的检测要求。



1. 一种三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的该三聚氰胺抗原是 PAD- 载体蛋白复合体与三聚氰胺用还原剂还原反应后得到的;所述的载体蛋白是牛血清白蛋白;

所述的 PAD 为醛基葡聚糖,其结构式如下:



所述的 PAD- 载体蛋白复合体与三聚氰胺的质量投料比为 :10:1。

2. 根据权利要求 1 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的还原剂是三氢硼氰化钠或钠硼氢中的一种或两种。

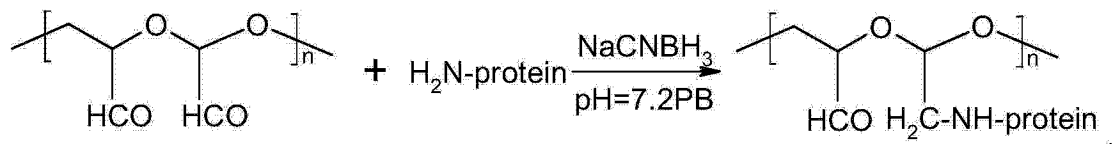
3. 根据权利要求 1 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的 PAD- 载体蛋白复合体是 PAD 连接载体蛋白后,再用还原剂还原后得到的;

所述的 PAD 与载体蛋白的质量投料比为 :1:5 ~ 5:1。

4. 根据权利要求 3 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的 PAD 与载体蛋白的质量投料比为 1:2 ~ 2:1。

5. 根据权利要求 3 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的还原剂是三氢硼氰化钠或钠硼氢中的一种或两种。

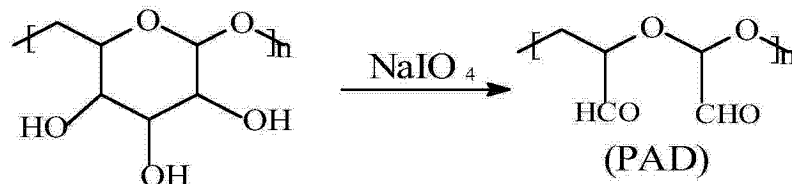
6. 根据权利要求 3 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的 PAD 连接载体蛋白是 PAD 上的醛基同载体蛋白上的氨基连接,生成 Schiff 氏碱,再用还原剂还原后生成 PAD- 载体蛋白复合体,其中  $n=100 \sim 500$ ,具体反应如下:



7. 根据权利要求 6 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的 PAD 是通过葡聚糖与高碘酸盐反应得到的;

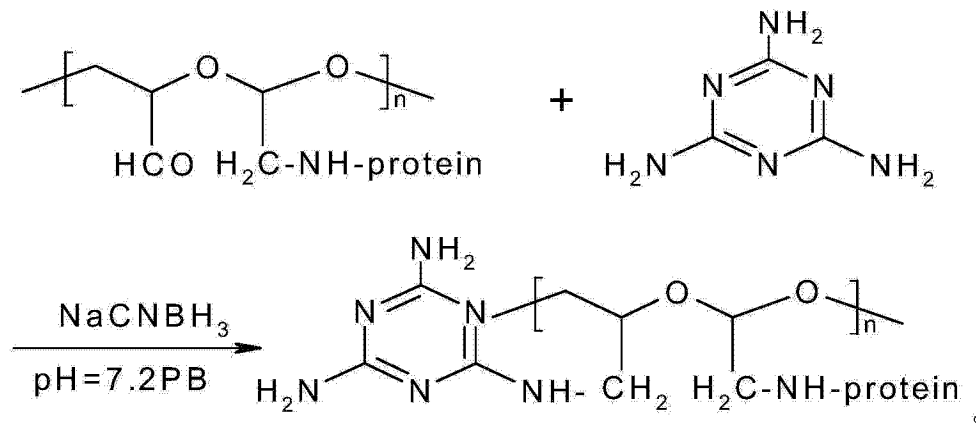
所述的葡聚糖原料分子量为 2 ~ 10W。

8. 根据权利要求 6 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的 PAD 是通过葡聚糖与高碘酸钠反应得到的,其中  $n=100 \sim 500$ ,具体反应如下:



9. 根据权利要求 1、2、3 或 6 任一项所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的该三聚氰胺抗原是反应所得的复合体经透析分离后得到纯品的。

10. 根据权利要求 1、2、3 或 6 任一项所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的该三聚氰胺抗原是通过以下反应得到的,其中  $n=100 \sim 500$  :



11. 根据权利要求 1、2、3 或 6 任一项所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的该三聚氰胺抗原的制备方法包括如下步骤:

- (1) PAD 与载体蛋白反应,生成一种醛基糖-载体蛋白的复合物;
- (2) 利用 PAD-载体蛋白复合物上的醛基,与三聚氰胺反应,生成三聚氰胺抗原。

12. 根据权利要求 11 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的步骤(2)的具体操作如下:

将三聚氰胺溶于 20% 的乙醇溶液,同 PAD-载体蛋白复合体溶液混合,搅拌溶解,三氢硼氰化钠或钠硼氢还原,透析分离,得到三聚氰胺小分子抗原。

13. 根据权利要求 1、2、3 或 6 任一项所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的该三聚氰胺抗原相关抗体的制备方法包括如下步骤:

- (1) 小鼠免疫;
- (2) 细胞融合;
- (3) 杂交瘤细胞、阳性孔的筛选及其克隆;
- (4) 单克隆抗体腹水制备及纯化。

14. 根据权利要求 13 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的该三聚氰胺抗原相关抗体的制备方法中的步骤(1)是采用常规方法免疫小鼠,操作如下:

用三聚氰胺-PAD-载体蛋白偶联产物作为免疫原免疫小鼠,取三聚氰胺-PAD-载体蛋白与弗氏完全佐剂混合,小鼠腹腔注射;定期进行加强免疫,前几次加强免疫时取三聚氰胺-PAD-载体蛋白与弗氏不完全佐剂,小鼠腹腔注射三聚氰胺-PAD-载体蛋白抗原,最后一次免疫采用尾静脉注射,不加佐剂,若干天后取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞进行细胞融合。

15. 根据权利要求 13 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的该三聚氰胺抗原相关抗体的制备方法中的步骤(2)是依照常规方法进行细胞融合,操作如下:

无菌环境下取免疫后小鼠的脾脏细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞在 PEG3000 作为融合剂的情况下进行细胞融合。

16. 根据权利要求 13 所述的三聚氰胺抗原,其特征在于,所述的该三聚氰胺抗原相关抗体的制备方法中的步骤(3)是包括如下三个步骤:

①阳性杂交瘤细胞的筛选:采用间接 ELISA 方法来筛选阳性杂交瘤细胞,检测出阳性孔的细胞要及时进行亚克隆;检测出阴性孔的细胞,并对细胞上清再检测一次;

②阳性杂交瘤细胞的克隆:利用有限稀释法对细胞进行亚克隆,对阳性较强、生长旺盛的融合细胞进行连续稀释并混匀,直至统计上每孔只含有 1 个细胞,然后铺制到细胞培养

板内；

③阳性杂交瘤克隆株的冻存与复苏

A、阳性杂交瘤克隆株的冻存

将杂交瘤细胞移至离心管内，离心，弃上清液，加入冻存液，混匀后移至细胞冻存管内，然后将冻存管放入塞有棉花的小盒内，置于 4℃，若干时间后取出放入 - 20℃ 冰箱内，再取出放入 - 80℃ 冰箱内，最后取出放入液氮罐中冻存；

B、阳性杂交瘤克隆株的复苏

于液氮罐内冻存的杂交瘤细胞冻存管取出，马上置于 37 ~ 40℃ 的水浴中，待细胞冻存物全部溶化后，离心，将上清弃掉，打散细胞团，向冻存管中加入含培养液，混匀，吸出转移到细胞培养瓶中，置培养箱中培养。若干时间后，对细胞进行换液，再继续培养；

所述的杂交瘤细胞株保藏于液氮中。

17. 根据权利要求 13 所述的三聚氰胺抗原，其特征在于，所述的该三聚氰胺抗原相关抗体的制备方法中的步骤(4) 是包括如下二个步骤：

①体内诱生腹水

取小鼠，腹腔注射石蜡油后备用，收集处于对数生长期的阳性杂交瘤细胞，注射预处理的小鼠腹腔内；

注射后每天对小鼠的姿势、活力、进食、饮水、呼吸及机体状况进行观察，发现小鼠食欲明显减退、腹腔明显胀大、不愿走动等状况后，立即抽取小鼠腹水，离心，弃去脂肪层和细胞层，收集中间澄清层，小量分装，- 20℃ 冻存储备用；

②腹水中单抗纯化：采用辛酸硫酸铵沉淀法。

18. 根据权利要求 1、2、3 或 6 任一项所述的三聚氰胺抗原，其特征在于，所述的该三聚氰胺抗原及其抗体用于制备三聚氰胺免疫检测试剂。

19. 根据权利要求 1、2、3 或 6 任一项所述的三聚氰胺抗原，其特征在于，所述的该三聚氰胺抗原及其抗体的组合物用于制备三聚氰胺免疫检测试剂。

## 一种三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药、试剂等技术领域,具体地说是涉及一种抗原、相关抗体及其制备方法,更具体地说是涉及一种三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法,再具体地说是涉及一种含有多醛葡聚糖连接载体蛋白的三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法。

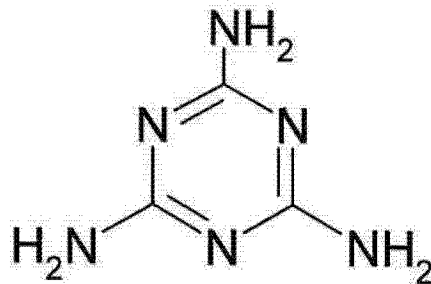
### 背景技术

[0002] (一) 三聚氰胺概述

[0003] 1、理化性质

[0004] 三聚氰胺 (melamine) 简称三胺、蛋白精,学名三氨三嗪,别名密胺、氰尿酸胺、三聚酰胺,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物, IUPAC 命名为“1,3,5-三嗪-2,4,6-三氨基”,

CAS :08-78-1,分子量 126. 12,分子式见左:



[0005] 三聚氰胺是一种低毒、无味的纯白色单斜棱晶体,形似蛋白粉,其分子式为:  $C_3H_6N_6$ 、 $C_3N_3(NH_2)_3$ , 分子量为 126. 12, 相对密度为  $1570\text{kg}/\text{m}^3$  ( $16^\circ\text{C}$ ), 堆积密度为  $700 \sim 90\text{kg}/\text{m}^3$ 。LD<sub>50</sub> (半数致死量):  $3000\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (大鼠口服)。在常压下,  $354^\circ\text{C}$  分解, 快速加热后温度为  $300^\circ\text{C}$  时升华。能溶于热水、甲醛、甲醇、吡啶、乙酸、热乙二醇、甘油等; 微溶于冷水; 极微溶于热乙醇; 不溶于四氯化碳、乙醚、苯。在一般情况下三聚氰胺较稳定, 但在高温下可能会分解, 释放出氰化物。

[0006] 乙酸、草酸、盐酸、硫酸和硝酸可与三聚氰胺的水溶液发生反应生成三聚氰胺盐 (王延吉. 有机化工原料 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 727-728.)。三聚氰胺在中性或微碱性环境中, 能够和甲醛发生缩合反应, 生成羟甲基三聚氰胺; 在微酸性环境中 (pH 值  $5.5 \sim 6.5$ ) 能够和羟甲基的衍生物发生缩聚反应, 形成的产物为树脂; 三聚氰胺在强酸或强碱溶液中会发生水解反应, 分子中的氨基逐步被羟基取代, 生成的产物分别是三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸。三聚氰胺与醛类反应, 产生加成化合物, 其中三聚氰胺与甲醛的反应是最重要的反应。

[0007] 三聚氰胺的溶解性随溶液的 pH 和温度的变化而变化。在弱酸性条件下, 三聚氰胺的溶解度大于中性和碱性条件下的溶解度; 而在碱性条件下溶解度略大于中性条件下的溶解度。在 pH 值一定的条件下, 三聚氰胺的溶解度随温度的升高而增大。在强酸和强碱性条件下, 其溶解度随酸性和碱性的增加而明显增大 (徐佩, 黄龙峰, 李瑞忠. 不同 pH 的三聚氰胺水溶液溶解性能研究; 安徽化工, 2008, 34(6): 23-24.)。

[0008] 2、三聚氰胺的用途

[0009] (1) 正常用途

[0010] 三聚氰胺是一种用途广泛的有机化工产品,作为生产三聚氰胺甲醛树脂(简称:MF)的原料是其最主要的用途,而三聚氰胺甲醛树脂的硬度比脲醛树脂大,同时具有不易燃、耐水、耐热、耐电弧、耐老化、耐化学腐蚀的优点。另外还可用作装饰面板、涂料、模塑粉、纸张等甲醛清洁剂等,广泛应用于诸多行业。

#### [0011] (2) 非法用途

[0012] 2007年3月,美国发生宠物毒粮风波,许多猫狗食用含有中国进口蛋白粉的宠物食品后非正常死亡,三聚氰胺就是罪魁祸首。因为发生该事件后,美国食品药品监督管理局对进口的宠物食品(小麦蛋白粉和大米蛋白粉)进行了检测,结果检出三聚氰胺。同时,中国国家质检总局在调查中也肯定了这一结果,三聚氰胺是导致猫、狗中毒死亡的原因。2008年9月,中国又爆发了婴幼儿奶粉受非法添加三聚氰胺污染事件,随后国家质检总局在全国紧急开展了婴幼儿奶粉三聚氰胺含量专项检查,结果发现有多家的奶粉生产企业,其产品中有含量不同的三聚氰胺。我们在日常生活中能经常接触到三聚氰胺,比如在市场上买到的密胺碗、碟等就是三聚氰胺甲醛树脂制作的。因为塑料、涂料和各种纺织品所含的三聚氰胺可缓慢溶出,经加热析出得更快,所以在受检者体内可以查出痕量的三聚氰胺,但从饮用的奶品中摄入三聚氰胺则是非正常的。

[0013] 三聚氰胺添加于奶粉等食品当中是因为检测蛋白质含量的“凯氏定氮法”,奶粉等食品中最重要的营养指标是蛋白质,对蛋白质的测试方法通常采用“凯氏定氮法”,测出总氮量来推算出蛋白质的含量。蛋白质是由氨基酸组成的,平均含氮量为16%,各个品牌的奶粉中蛋白质含量如以18%计算,其含氮量为2.88%,而三聚氰胺的含氮量高达66%,是蛋白质平均含氮量的4倍,奶粉的23倍。从理论上来说,如果将0.1g三聚氰胺添加到100g牛奶中,其蛋白质含量就能上升0.625%,少用真正的蛋白质而添加三聚氰胺就会使食品在检测仪器上显示蛋白质达标,从而达到节省成本的目的。更为重要的是,三聚氰胺是一种白色结晶粉末并且无味,掺杂后不易被发现,因此成为掺假、造假者提高蛋白质检测含量的“首选”目标。另外,三聚氰胺特别是三聚氰胺废料成本很低,给掺假、造假者极大的利益驱动,于是这毫不相干的化工原料就被加入到奶粉及其他食品中,从而造成诸如2007年美国宠物食品污染事件和2008年中国毒奶粉事件等严重的食物安全事故。

#### [0014] 3、三聚氰胺的毒性

[0015] 三聚氰胺本身几乎没有任何的营养价值,并不能真正地替代蛋白质,添加之后,只能在检测中造成蛋白质含量增高的假象,奶粉当中的营养物质含量必然会大大低于正常值。更可怕的是,三聚氰胺有轻微毒性,只是其危害并不被人所熟知。

[0016] 目前认为三聚氰胺的毒性轻微,大鼠口服三聚氰胺的半数致死量为 $> 3$ 克/公斤体重。当实验动物摄入大剂量的三聚氰胺后,虽然实验动物表现出明显的中毒症状,但如果长期摄入就会导致泌尿和生殖系统的损伤,使膀胱、肾部发生结石,严重的可进一步诱发膀胱癌。起初人们对三聚氰胺的危害认识还不够深,在《国际化学品安全手册》和国际化学品安全卡片中也只是提出三聚氰胺只有被长期或反复大量摄入后,会对肾与膀胱有一定的损害作用。直到2007年3月,美国发生的宠物毒粮风波,调查证实了三聚氰胺是导致猫狗食物中毒的原因,这才使人们对三聚氰胺的毒性有了明确的认识。

[0017] 近两年来,国外对三聚氰胺的毒性研究取得了很大进展。研究表明,大鼠在连续吸入浓度较高的三聚氰胺粉尘后,未见中毒症状,如果在连续吸入几个月以上,就会出现体

重增加迟滞、肺内炎性反应以及一定程度的中枢神经系统和肾功能紊乱。从通用的毒性指标——即动物半数致死剂量数据看，三聚氰胺属于低毒甚至微毒的物质。但在特定情况下，三聚氰胺的毒性危害是很大的。它在受热的条件下可释放出氰化物剧毒气体，另外燃烧后的分解产物一氧化碳、二氧化碳、氮氧化物、氰化物危害性也很大。更为重要的是，给动物饲喂大剂量的三聚氰胺可引起动物泌尿系统发生结石，结石的主要成分为三聚氰胺和尿酸，其余为草酸钙。

[0018] 实验动物的中毒症状表现饲料的消耗量减少，体重减轻，结晶尿症，膀胱结石，膀胱上皮细胞增生和存活率降低。小鼠经饲喂致死剂量后表现流泪，呼吸困难，阵发性痉挛，昏迷和前肢瘫痪等症状。饲喂含高剂量三聚氰胺饲料的宠物出现的病理状况也表明致死原因为尿毒症所致，临床症状为食欲不振、嗜睡，严重的患有多尿症、氮质血症和高磷酸盐血症。患病动物表现出的病理变化为肾远曲小管损伤并出现呈条纹状的特异性结晶，还伴有间质纤维化的组织学变化，而近曲小管大多并未受到影响。受害动物的肾组织中均检测出三聚氰胺和三聚氰酸。

[0019] 因为三聚氰酸和三聚氰胺有相类似的结构，更重要的是在化工生产过程中二者常常同时存在，在生产奶粉的过程中如果添加三聚氰胺，实际上也掺入了三聚氰酸这种物质。文献中提及(U. S. Department of Health and Human Services ;NTP Technical Report, TR 245, 1983 ;Memorandum by CFSAN Cancer Assessment Committee dated March 17, 1983)，三聚氰胺在人体的消化过程中，特别是在胃酸的作用下，自身即可能部分转化为三聚氰酸，而与未转化部分形成结晶。三聚氰胺对老鼠的半数致死量为 3248mg/kg。对于兔子半数致死量则超过 1000mg/kg。长期摄取三聚氰胺可能造成生殖能力损害、膀胱或肾结石、膀胱癌等。1983 年的美国针对三聚氰胺进行动物实验研究，发现用三聚氰胺高剂量 (4500ppm or 263mg/kgbw/day) 和持续 (两年) 地喂食雄鼠会造成其膀胱结石，并增加其膀胱、尿道出现恶性肿瘤的风险。Roy L. M. Dobson (Roy L. M. Dobson, Safa Motlagh. Identification and characterization of toxicity of contaminants in Pet Food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs[J]. Toxicol Sci, 2008, 8) 和 Birgit Puschner 等 (Birgit Puschner, Robert H, Poppenga, et al. Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats[J]. Vet Diagn Invest, 2007, 11 (19) :24-616) 均指出当二者同时被机体摄入后，会对机体造成严重影响。因为二者通过分子结构上的化学基团形成化学键而连接起来，反应反复进行，最终形成一个网格结构，如果这种网格结构被混入奶粉中，当人体摄入后，在胃液的作用下，三聚氰胺与三聚氰酸解离开，分别进入血液循环中。因为这两种物质不能被机体转化，所以随血液运送到肾脏，在肾脏的细胞中，两种物质再次相互作用，重新形成不溶于水的大分子的网格结构复合物，当沉积下来后，形成结石，造成肾小管的物理性阻塞，导致尿液无法顺利排除，致使肾脏积水，最终导致肾脏衰竭。

[0020] 由此可知，三聚氰胺导致结石的形成是由一系列化学反应造成的。三聚氰胺在胃的强酸性环境中水解，羟基逐步取代胺基，生成三聚氰酸二酰胺，继而进一步水解，生成三聚氰酸一酰胺，最终生成三聚氰酸。生成的三聚氰酸在肠道内被吸收进入血液，在血液中能够和钙离子结合形成不溶解的三聚氰酸钙。当肾脏过滤血液杂质时，三聚氰酸钙便会在肾脏内聚集，与此同时，三聚氰酸和三聚氰胺形成大的网状结构，最终导致结石的形成。

[0021] 4、人体对三聚氰胺的耐受标准

[0022] 三聚氰胺毒性实验研究表明：三聚氰胺是一种微毒的化学物质，在动物体内代谢速度很快而且不会在体内存留，但如果长期摄入后会对其泌尿系统造成损害，摄入的三聚氰胺量和临床疾病之间有着明显的量效关系。因 2007 年发生的牲畜饲料含三聚氰胺事件，美国食品药品监督管理局（简称：FDA）于 2007 年 5 月 25 日发布风险评估报告，讨论家禽、鱼类内含三聚氰胺对人类健康之影响，指出人体可容忍的每日摄入量（Tolerable Daily Intake, 简称：TDI）为 0.6 毫克 / 每公斤体重 / 每天 (mg/kg bw/day)。举例而言，一个体重 60 公斤的人若每天累积摄取三聚氰胺达 37.8 毫克以上，将会有健康风险。2008 年 10 月 3 日，FDA 进一步把 TDI :0.63 毫克 / 每公斤体重 / 每天除以安全系数 10 下修得到 0.063 毫克 / 每公斤体重 / 每天（应对健康无害的摄取量），并假设一个 60 公斤的成年人若每天摄入 1.5 公斤遭三聚氰胺污染的食物，只要被污染食物中三聚氰胺含量低于 2.5ppm，该人应无立即健康的风险。另外，在上述 2007 年 5 月 25 日发表的文章中，亦认为现有检测方法可检出之最低含量为 50ppb (0.05ppm)。

[0023] （二）三聚氰胺常用检测方法

[0024] 1、高效液相色谱法

[0025] 采用该方法测定三聚氰胺，反相柱是最常用的色谱柱，如 Agilent TC-C<sub>18</sub> 柱、Symmetry C<sub>18</sub> 柱、Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> 柱、Waters xterra 混合柱、ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱、Phenomenex.Luna C8 柱和 Agilent EclipseXDB-C<sub>8</sub> 柱等。其中美国 Waters 公司生产的 Oasis MCX, Anpel 公司生产的 Anpelclean MCX 是比较常用的固相萃取柱，这两个产品净化样品效果好，能够很好地保留碱性化合物，而三聚氰胺恰恰属于碱性化合物，从而将样品中的碱性化合物和杂质进行有效地分离。用 Oasis MCX 固相萃取柱净化样品后，该萃取柱再用 5% 甲醇和 3% 氨水的混合液洗脱，收集此时的洗脱液，此操作对样品的回收率可达到 99.0% 以上。此外，将高效液相色谱仪与质谱仪联用，定性分析结果将更加准确。应用此方法使用较多的仪器是 HP1100 高效液相色谱 - 四极杆质谱联用仪、1100LC-Trap-XCT 液相色谱 - 离子阱质谱系统和 1200SL 型快速高分离液相色谱 -6410 型三重四极杆串联质谱仪。文献报导中提及，在测定三聚氰胺时采用超高效液相色谱 - 串联质谱法，该法与传统的高效液相色谱法相比，其速度、灵敏度和分离度分别是高效液相色谱法的 9 倍、3 倍和 1.7 倍。待检测样品选用 Waters Oasis MCX 柱净化，1% 三氯乙酸 - 二甲基亚砷作为提取液，经超高效液相色谱分离，最后使用电喷雾串联四极杆质谱进行检测（林祥梅，王建峰等. 三聚氰胺的毒性研究 [J]. 毒理学杂志, 2008, 22 (3) :216-217)。该方法的检出限是 10 μ g/kg。

[0026] 2、气相色谱 - 质谱联用法

[0027] 美国 FDA 采用该方法对宠物食品、植物蛋白粉等食品进行检测，可选用甲醇 / 水 / 三乙胺混合液作为提取液。采用该方法时，必须对样品进行衍生化处理。待衍生化处理，可使待测物的分子量增大到 342，这样有利于将待测物与基质进行有效地分离，从而降低背景化学噪音的影响。样品如果不经衍生化处理，由于三聚氰胺的分子量仅为 126.13，小于 150，在该分子量附近常用的色谱柱流失产物中存在很多的碎片离子，会发生严重的干扰情况，该方法的灵敏度高，选择性好，最低检测限为 0.1 μ g/g。

[0028] 3、毛细管电泳法

[0029] 毛细管电泳同高效液相色谱法一样，可以用紫外、离子阱质谱仪、二极管阵列或四极杆质谱仪作为检测器来测定三聚氰胺的含量。Thuy Diep, Thanh Vo 等 Thuy Diep,

Thanh Vo, Markus Himmelsbach, et al. Improved analysis of elamine-formaldehyde resins by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using ion-trap and quadrupole-time-of-flight mass spectrometers [J]. Journal of Chromatography A, 2008 :1-5. 用 Agilent 的毛细管电泳, 分别和离子阱质谱仪, 二极管阵列或串联四极杆质谱仪连接, 测定三聚氰胺甲醛树脂中的三聚氰胺含量。研究表明, 在三聚氰胺的检测中, 区域电泳-质谱法比液相色谱-质谱联用法更简单快捷。毛细管电泳-质谱法因为只限于较高含量的成分分析, 所以要求提高其连接的稳定性。相对于高效液相色谱法来说, 毛细管电泳法具有速度快, 峰形好, 柱效高, 对样品的处理要求低, 样品和缓冲液用量均小的优点。但毛细管电泳法只能实现微量制备, 高效液相色谱法可作常量制备陈义。毛细管电泳技术及应用 [M]. 化学工业出版社, 2000。

#### [0030] 4、近红外线吸收检测法

[0031] Spectra-Quad 在线成分分析仪 (赛默飞世尔科技有限公司) 的使用原理是样品经合适波长的近红外线照射后, 仪器分析样品反射出的光线。该分析仪检测样品时, 由于对光线亮度的要求非常低, 不会加热或损伤到样品, 所以具有无接触, 无损伤, 无危害的优点胡阶明. Spectra-Quad 实现三聚氰胺含量在线检测 [J]. 食品安全导刊, 2008, 17(3) : 56-57.。对于三聚氰胺来说, 其样品含量与样品反射出的光线成反比。在实际应用中, 将 Spectra-Quad 固定在传送装置上, 依靠取样仪, 达到对气动传输产品中三聚氰胺含量的检测目的, 同时数据结果可以输出到某个 PC 机控制器内。在食品加工中应用该分析仪, 完全可以实现对三聚氰胺含量的在线检测的目的, 同时利用该分析仪, 对三聚氰胺的检测灵精度并不会因奶粉中蛋白质的含量变化而受到任何影响。

[0032] 以上所说的检测三聚氰胺的几种方法各有其优点和适用范围, 高效液相色谱-四极杆质谱联用法和气相色谱-质谱联用法在检测样品时, 不但能做到定量, 也能达到定性分析的目的, 准确度高, 误判的可能性小; 高效液相色谱-四极杆质谱联用法不需要衍生化处理, 但基体干扰较为严重, 一般需要建立一整套严格而又繁琐的样品净化程序; 气相色谱-质谱法灵敏度高, 方法稳定, 但需要衍生化处理; 试剂盒法检测灵敏, 操作简单; 毛细管电泳法虽然尚未用于检测食品中的三聚氰胺, 根据其优良的性质, 确实是一种不错的方法; 近红外检测法可用于食品生产中对三聚氰胺的在线检测; 但这些检测方法对仪器以及专业技术人员要求较高, 操作复杂, 检测成本高, 难以满足大批量样品检测的需要, 且难以快速、简便的检测出较低浓度的三聚氰胺。

[0033] 基于抗原抗体特异性反应建立起来的 ELISA 检测方法及相关产品, 具有简单、快速、处理样品数量大、灵敏度较高、特性强和价格低廉等诸多优点, 国内已经有不少企业、高校、事业单位检测部门, 开展三聚氰胺抗原为基础的抗体制备方法, 来满足低成本、快捷、操作简便的检测要求。

#### [0034] (三) 三聚氰胺抗原研究概述

[0035] 三聚氰胺是典型的半抗原, 在免疫反应中只具有反应原性, 没有免疫原性, 需与大分子结合后才有免疫原性。目前已知的制备三聚氰胺抗原的方法, 可分为以下几种类型:

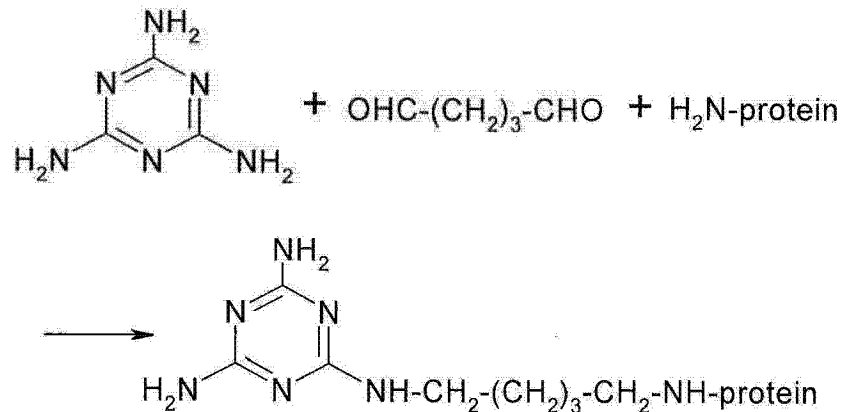
##### [0036] 1、戊二醛-载体蛋白偶联法

[0037] 具体是以同型双功能交联试剂戊二醛的醛基同载体蛋白上的氨基以及三聚氰胺上的氨基偶联, 将三聚氰胺挂在载体蛋白上面。早期的三聚氰胺抗原的合成多用此法, 见

CN101407580, CN101402683, CN101429243 等。

[0038] 此法反应方程式可以简单表示如下：

[0039]



[0040] 以戊二醛水溶液作为连接试剂,戊二醛易聚合,同时水溶液中大部分为环状结构的水合物,该反应因为是个可逆反应,如果不进行还原,产物会随着后面的透析、分离等步骤,重新析出戊二醛,使得所得抗原稳定性差。

[0041] 2、多元酸酐活化偶联法

[0042] 具体是将三聚氰胺上的氨基,与多元酸酐反应成羧基,即羧化后再同载体蛋白赖氨酸上的氨基连接。具体改造的方法因所用同三聚氰胺反应试剂的不同而有不同,如CN101382547、CN101183105中所用的反应试剂为戊二酸酐;CN101539578所用的反应试剂是用琥珀酸酐(丁二酸酐);CN101643454采用羧化原料为马来酸酐;CN101413943所采用的方法是采用三聚氰胺同溴乙酸叔丁酯反应水解后生成对应的羧基,再同载体蛋白连接;CN101413956则是用琥珀醛酸,对三聚氰胺进行羧化。

[0043] 上述文献中都是先合成羧化三聚氰胺,再同载体蛋白上的赖氨酸反应而连接上去,这样羧化三聚氰胺之间以及载体蛋白之间在酰胺化的反应条件下,交叉反应不可避免,难以保证制备所得的抗原纯度及稳定性。

[0044] 人工设计羧化三聚氰胺小分子半抗原,再同载体蛋白连接,文献有CN101643453、CN102168071、CN101955468、CN101705210、CN101717444等。此法与上述多元酸酐活化偶联法类似,交叉反应不可避免,且需经过多步有机合成才能得到改造后的三聚氰胺半抗原,比较复杂,难以保证制备所得的抗原纯度及稳定性且不利于产业化生产。

[0045] 因此,寻找新型、稳定、高纯度、适于工业化生产的三聚氰胺抗原及相关抗体仍然势在必行。

[0046] 但是,经文献检索等,到目前为止,尚未发现有采用连接试剂或桥梁试剂同时连接三聚氰胺和载体蛋白以制备新的三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法等方面的报道。

## 发明内容

[0047] 本发现所需要解决的技术问题是公开了一种稳定性较好的三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法,即稳定性好的抗原、由此稳定性好的抗原得到的特异性较高的抗体,以克服现有技术存在的上述缺陷。

[0048] 也就是说,本发明针对现有技术的不足,通过实验研究和理论探索,目的之一意在

提供一种新的三聚氰胺抗原,即提供一种含有多醛葡聚糖连接载体蛋白的三聚氰胺抗原;

[0049] 本发明的目的之二是提供一种含有多醛葡聚糖连接载体蛋白的三聚氰胺抗原的制备方法;

[0050] 本发明的目的之三是提供一种与新的三聚氰胺抗原相关的抗体,即提供一种含有多醛葡聚糖连接载体蛋白的三聚氰胺抗原相关的抗体;

[0051] 本发明的目的之四是提供一种与新的三聚氰胺抗原相关的抗体的制备方法,即提供一种含有多醛葡聚糖连接载体蛋白的三聚氰胺抗原相关的抗体的制备方法。

[0052] 一、技术构思

[0053] 食品质量安全状况是一个国家经济发展水平和人民生活质量的重要标志。中国政府更是高度重视食品安全,一直把加强食品质量安全摆在重要的位置。近年来,三聚氰胺事件对中国乳制品事业冲击极大,不但造成了大量婴幼儿病患,更是严重影响了中国大多食品企业的声誉。

[0054] 目前,三聚氰胺的检测方法较为复杂和昂贵,且由于最低检测浓度较低,给目前的检测带来了一定的难度,也让不法分子有机可乘。因此,研制一种特异性高的检测三聚氰胺的产品,特别是简便、快速且经济的诊断试剂和 / 或诊断试剂盒,其意义重大,并具有显著的社会效益和经济效益,三聚氰胺抗原、相关抗体的深入研究将为此奠定坚实的理论和应用基础。

[0055] 自主开发研发创新诊断产品如诊断试剂和 / 或诊断试剂盒是中国医疗、食品行业目前的一项紧迫任务,发现全新的诊断产品、改进已有的诊断产品或发现诊断产品的新用途等均是有效的快捷途径,也是中国快捷创新诊断产品研制的优势所在。随着对 ELISA 技术的研究不断趋于完善,也一定会产生更多相关的应用思路和切实可行的方法服务于医疗、食品等行业,同时也为研究检测三聚氰胺提供了一条的新的策略,更有必要进一步加强三聚氰胺抗原、相关抗体的深入研究。

[0056] 小分子上与蛋白连接基团的选择对所产生抗体的特异性的影响小分子为具有多种反应基团如氨基、羧基、醛基等的物质,这些基团既是其区别于与其相近似分子的特异性抗原决定簇之所在,也是其用于与蛋白分子的交联的结合基团。因此,当这些基团与蛋白大分子结合后,再免疫动物所得到的抗体,往往特异性会有所降低,尤其是分子结构上相近似的小分子,如选用每种小分子物质特有基团连接蛋白,则免疫动物后所得抗体的特异性就差,因为其特异的抗原决定簇在刺激动物机体抗体的生成中不起作用,而共同的基团所组成的抗原决定簇却不受影响,激发机体的免疫应答而产生能结合具有此决定簇的所有近似小分子的抗体。因此,选择相关小分子均有基团用于与蛋白分子的交联,得到的抗体具有较好的特异性。此外,在小分子与载体蛋白之间加入一连接空间臂,也能改善所得抗体的特异性。

[0057] 发明人通过现有的三聚氰胺抗原的人工制备方法进行系统的筛选,选择了多醛葡聚糖等高分子物质作为同时连接三聚氰胺和载体蛋白的连接试剂,得到了性能结构稳定、合成重现性好、交叉反应少的三聚氰胺抗原,且获得特异性高的三聚氰胺抗原相关抗体。

[0058] 根据此想法和思路,发明人通过反复的实验研究与分析和理论探索,已成功得到预期的研究结果和应用产品。

[0059] 二、三聚氰胺抗原及其制备方法

### [0060] (一) 三聚氰胺抗原偶联反应连接试剂的选择

[0061] 根据抗原物质的抗原性,可将抗原分为完全抗原与不完全抗原。完全抗原是既有免疫原性又有反应原性的物质,一般分子量较大,免疫原性良好的抗原,其分子量都在 10ku 以上;不完全抗原是只具有反应原性而缺乏免疫原性的物质,也叫半抗原,其分子量都在 1ku 以下。

[0062] 对于机体的免疫系统来说,完全抗原与半抗原都具有异源性这一特性,然而在分子大小与结构、化学组成、分子的空间立体构象等方面有着很大的不同。形象地说,完全抗原的分子结构包括两个部分,一部分是抗原决定簇,另一部分是载体,而人们合成完全抗原就是为了实现一定的目的,采用某种方法将半抗原(抗原决定簇部分)与载体(通常是蛋白质)偶联到一起,从而使其具有诱导机体产生抗体的能力。由此可见,半抗原与载体偶联后不但使其自身的分子量增加,更重要的是利用载体的免疫原性使其能够刺激机体产生抗体。

[0063] 完全抗原的抗原决定簇由 T 细胞决定簇和 B 细胞决定簇两部分组成,在多数情况下 B 细胞决定簇诱导机体产生免疫应答需要 T 细胞决定簇的协助。半抗原、同种载体蛋白偶联的半抗原能引起载体和半抗原的再次反应;载体蛋白仅能引起针对该载体蛋白的再次反应;半抗原、异种载体蛋白偶联的半抗原不能引起载体和半抗原的再次反应(陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京:中国农业出版社,2004:91-94),即半抗原-载体现象。

[0064] 本发明的研究对象三聚氰胺分子量仅为 126.12,为半抗原,如果将其与载体蛋白质偶联到一起,依靠载体上的 T 细胞决定簇就会诱导机体产生特异性免疫应答。

[0065] 半抗原与载体连接时,应选择合适的方法,结合方式的选择应考虑如下因素:

[0066] ①半抗原的溶解度和稳定性

[0067] 在结合反应中应不导致半抗原活性的改变,同时也不能使载体变性至不溶解的程度。

[0068] ②结合键的位置

[0069] 抗体对远离蛋白质联接点的半抗原部分有最好的特异性,故联接时应使联接键远离半抗原的决定簇。

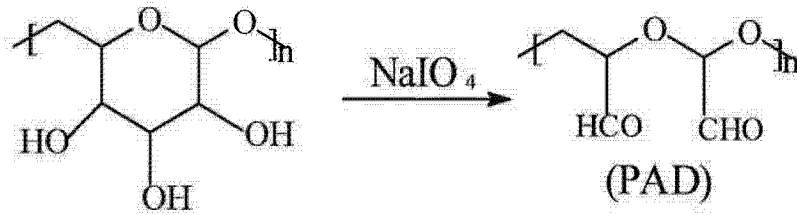
[0070] ③选择适合的偶联试剂

[0071] 不同的半抗原在偶联时,应根据半抗原的化学结构,以及反应方式选择适当的偶联试剂。如小分子肽类有一定的三级结构,在溶液中依靠氨基酸残基来维持其结构的稳定。因此,用双功能的亚氨酸酯不但对氨基酸有选择,而且能代替被取代的每一个  $\epsilon$ -氨基的正电荷。蛋白质与偶联剂接触后,使不同蛋白质分子的功能基团交联并凝聚。广泛交联的蛋白质,其溶解度常降低,而这种溶解度差的蛋白质却是有效的免疫源。

[0072] 本发明所述的三聚氰胺抗原是通过多醛葡聚糖(又称氧化葡聚糖, Polyaldehyde Dextran, 简称:PAD)作为连接试剂连接三聚氰胺和载体蛋白而得。

[0073] 本发明所述的多醛葡聚糖是通过葡聚糖与高碘酸盐反应所得,其中所述葡聚糖原料分子量优选为 2~10W,以钠盐为例,具体反应可用以下反应式表示:

[0074]



[0075] 其中,  $n = 100 \sim 500$ , 生成醛基的密度可以用试剂盒如 Pierce 公司提供的 BCA 试剂盒来进行检测。

[0076] (二) 三聚氰胺抗原载体蛋白的选择

[0077] 常用来作为合成人工完全抗原的载体蛋白是包括牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, 简称:BSA)、卵清蛋白 (Ovalbumin, 简称:OVA)、人血清蛋白 (Human Serum Albumin, 简称:HAS)、钥孔血蓝蛋白 (Keyhole Limpet Hemocyanin, 简称:HLH)、匙孔血蓝蛋白 (Keyhole Limpet Hemocyanin, 简称为:KLH) 或人工合成的多聚赖氨酸 (Poly-L-lysine, 简称:PLL) 等中的一种或多种;优选的与 PAD 连接的载体蛋白是包括匙孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白或卵清蛋白等中的一种或多种;进一步优选 BSA, 因为其物理化学性质稳定, 不易变性, 价廉且易得, 分子内有许多自由基, 赖氨酸含量高, 在不同的 pH 条件和不同的离子强度下都能保持较大的溶解度, 在含有机溶剂 (如吡啶和二甲基甲酰胺) 的状态下也能和半抗原进行交联, 并且交联后仍然能够保持可溶状态 (陈新建. 免疫学技术在植物科学中的应用 [M]. 北京:中国农业大学出版社, 1998)。

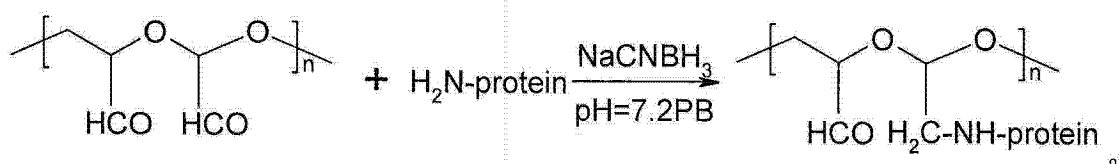
[0078] 基于此, 本发明最优选选用 BSA 来作为合成人工免疫抗原的载体。半抗原载体蛋白复合物免疫动物后, 动物机体至少产生三类抗体:一类是针对半抗原, 一类是针对载体蛋白, 一类是针对半抗原与载体蛋白的连接部位, 这三类抗体中用于免疫检测的有价值的抗体只有针对半抗原决定簇的抗体, 而针对其他决定簇的抗体会影响检测的灵敏度, 也可能会带来检测背景升高的问题。如果将半抗原与不同的载体蛋白偶联制备出免疫抗原和包被原完全可以解决上述出现的问题。

[0079] 载体蛋白 OVA 和 BSA 在结构上有很大差别, 两者之间没有共同的抗原性 (朱剑锋, 邓芳, 陈常庆. 抗 FMOC- 苯丙氨酰氨基己酸的单克隆抗体的制备 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1997, 13(1):34-38), 用 OVA 制备出的包被原来包被酶标板用于检测, 与 BSA 不会发生交叉反应, 较好地排除了针对载体的抗体产生细胞的干扰, 从而可确保实验的特异性。因此, 本发明选用 OVA 作为合成检测抗原的载体。

[0080] 本发明所述的 PAD 连接载体蛋白是通过 PAD 的醛基与载体蛋白上的氨基连接实现的, 具体反应为利用 PAD 上生成的醛基同载体蛋白上的氨基, 生成 Schiff 氏碱, 用还原剂还原后生成 PAD- 载体蛋白复合体;所述的与用于与 PAD 和载体蛋白的还原剂是包括可为三氢硼氰化钠或钠硼氢等中的一种或多种。

[0081] 该还原剂以三氢硼氰化钠为例,  $n = 100 \sim 500$ , 具体反应可用以下反应式表示:

[0082]

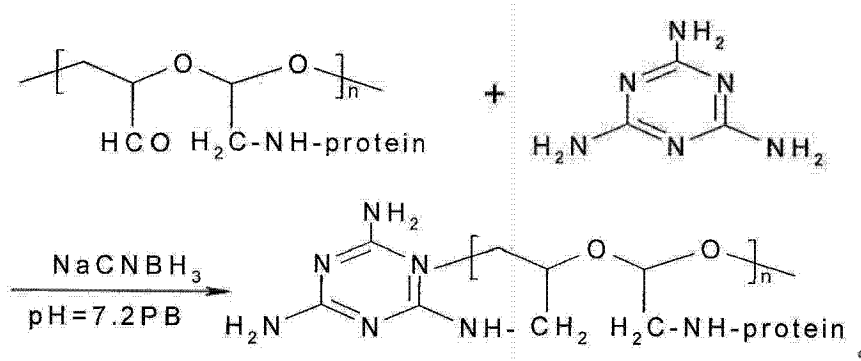


[0083] (三) 三聚氰胺抗原的制备和纯化

[0084] 本发明所述的 PAD 连接三聚氰胺是通过 PAD 连接载体蛋白后所得 PAD- 载体蛋白复合体与三聚氰胺用还原剂还原反应后实现的, 所述的与用于与 PAD- 载体蛋白复合体和三聚氰胺的还原剂是包括三氢硼氰化钠或钠硼氢等中的一种或多种。

[0085] 该还原剂以三氢硼氰化钠为例,  $n = 100 \sim 500$ , 具体还原反应可用以下反应式表示:

[0086]



[0087] 本发明所述的抗原是通过 PAD 连接三聚氰胺和载体蛋白所得的复合体经透析分离得到纯品的。

[0088] 其中 PAD 与载体蛋白的投料比 (质量比) 为 :1 : 5 ~ 5 : 1, 优选为 :1 : 2 ~ 2 : 1。

[0089] 其中 PAD- 载体蛋白复合体与三聚氰胺的投料比 (质量比) 为 :20 : 1 ~ 1 : 1, 优选为 :15 : 1 ~ 2 : 1, 进一步优选为 :10 : 1 ~ 2 : 1。

[0090] 也就是说, 所述的三聚氰胺抗原的制备方法包括如下步骤:

[0091] (1) PAD 与载体蛋白反应, 生成一种醛基糖 - 载体蛋白的复合物;

[0092] 所用的载体蛋白优选包括匙孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白或卵清蛋白等中的一种或多种;

[0093] (2) 利用 PAD- 载体蛋白复合物上的醛基, 与三聚氰胺反应, 生成三聚氰胺抗原。

[0094] 下面举例说明, 具体操作如下: 将三聚氰胺溶于 20% 的乙醇溶液, 同 PAD- 载体蛋白复合体溶液混合, 搅拌溶解, 三氢硼氰化钠或钠硼氢还原, 透析分离, 得到三聚氰胺小分子抗原。

[0095] 三、三聚氰胺抗原相关抗体及其制备

[0096] 本发明所述的三聚氰胺抗原单克隆抗体的制备方法包括四个步骤:

[0097] (一) 小鼠免疫

[0098] 采用常规方法免疫小鼠, 操作如下: 用三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白偶联产物作为免疫原免疫小鼠, 取三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白与弗氏完全佐剂混合, 小鼠腹腔注射; 定期进行加强免疫, 前几次加强免疫时取三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白与弗氏不完全佐剂, 小鼠腹腔注射三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白抗原, 最后一次免疫采用尾静脉注射, 不加佐剂, 若干天后取取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞进行细胞融合。

[0099] (二) 细胞融合

[0100] 依照常规方法进行细胞融合, 即无菌环境下取免疫后小鼠的脾脏细胞与 SP2/0 小

鼠骨髓瘤细胞在 PEG3000 作为融合剂的情况下进行细胞融合。

[0101] (三) 杂交瘤细胞、阳性孔的筛选及其克隆

[0102] 1、阳性杂交瘤细胞的筛选

[0103] 采用间接 ELISA 方法来筛选阳性杂交瘤细胞。检测出阳性孔的细胞要及时进行亚克隆；检测出阴性孔的细胞，并对细胞上清再检测一次。

[0104] 2、阳性杂交瘤细胞的克隆

[0105] 利用有限稀释法对细胞进行亚克隆，对阳性较强、生长旺盛的融合细胞进行连续稀释并混匀，直至统计上每孔只含有 1 个细胞，然后铺制到细胞培养板内。

[0106] 3、阳性杂交瘤克隆株的冻存与复苏

[0107] (1) 阳性杂交瘤克隆株的冻存

[0108] 将杂交瘤细胞移至离心管内，离心，弃上清液，加入冻存液，混匀后移至细胞冻存管内。然后将冻存管放入塞有棉花的小盒内，置于 4℃，若干时间后取出放入 -20℃ 冰箱内，再取出放入 -80℃ 冰箱内，最后取出放入液氮罐中冻存。

[0109] (2) 阳性杂交瘤克隆株的复苏

[0110] 于液氮罐内冻存的杂交瘤细胞冻存管取出，马上置于 37 ~ 40℃ 的水浴中，待细胞冻存物全部溶化后，离心，将上清弃掉。打散细胞团，向冻存管中加入含培养液，混匀，吸出转移到细胞培养瓶中，置培养箱中培养。若干时间后，对细胞进行换液，再继续培养。

[0111] 本发明所述的杂交瘤细胞株保藏于液氮中。

[0112] (四) 单克隆抗体腹水制备及纯化

[0113] 1、体内诱生腹水

[0114] 取小鼠，腹腔注射石蜡油后备用。收集处于对数生长期的阳性杂交瘤细胞，注射预处理的小鼠腹腔内。

[0115] 注射后每天对小鼠的姿势、活力、进食、饮水、呼吸及机体状况进行观察。发现小鼠食欲明显减退、腹腔明显胀大、不愿走动等状况后，立即抽取小鼠腹水，离心，弃去脂肪层和细胞层，收集中间澄清层，小量分装，-20℃ 冻存备用。

[0116] 2、腹水中单抗纯化

[0117] 采用辛酸硫酸铵沉淀法。

[0118] 四、三聚氰胺抗原、相关抗体的效价检测

[0119] 本发明所述的三聚氰胺抗原的检测是通过直接竞争 ELISA 法实现的，具体包括：

[0120] 单克隆抗体最佳包被浓度和三聚氰胺酶结合物最佳稀释度的确定。

[0121] 将三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白标记辣根过氧化物酶，三聚氰胺单克隆抗体包板。采用方阵试验法对抗体和酶标三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白进行一系列浓度稀释，最终确定包被抗体和酶标的最佳浓度。将三聚氰胺单抗用 0.05M CB 缓冲液 (pH = 9.6)，稀释至 5 μg/ml，每孔包被 100 μL，4℃ 过夜。包被完成后，用 PBST (含 2% 吐温 20) 洗板，2% BSA 封闭，晾干备用。

[0122] 配制不同浓度的三聚氰胺标准品，向包被有三聚氰胺单抗的酶标板每空加入 50 μL 标准品和 50 μL 2 μg/ml 的酶标三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白，37℃ 反应 30 分钟，洗涤，TMB 底物 37℃ 反应 20 分钟，终止反应测定 OD<sub>450nm</sub> 值，制得三聚氰胺 ELISA 竞争标准曲线。

[0123] 根据各浓度标准品溶液所得 A<sub>450</sub> 的梯度变化，以抑制率 (B/B<sub>0</sub>) × 100% 为纵坐标

(其中 B 为加入不同浓度的三聚氰胺标准溶液所测 OD 值, B<sub>0</sub> 为 0 μg/mL 三聚氰胺所测 OD 值), 三聚氰胺各标准溶液浓度的对数值 (Log<sub>3</sub>C) 为横坐标, 绘制出三聚氰胺单抗的标准抑制曲线。

#### [0124] 五、技术特长

[0125] 本发明为诊断、检测和研究三聚氰胺提供了一种新的药物和试剂来源和应用剂型, 从而对现有的三聚氰胺检测产品系统特别是药物和试剂进行了改进、改善和提高, 从而拓展了现有三聚氰胺检测产品的应用。

[0126] 本发明首次公开了一种新的合成性能结构稳定、合成重现性好、交叉反应少的三聚氰胺抗原的方法, 并成功制备了单克隆抗体, 为成功用于诊断试剂盒提供物质基础。三聚氰胺和载体蛋白通过 PAD 作为桥梁试剂进行偶联, 偶联产物免疫动物, 制备可以用于检测三聚氰胺的单克隆抗体。本发明提供的人工制备三聚氰胺抗原及相关抗体可用于三聚氰胺免疫检测试剂的研制开发, 来满足低成本、快捷、操作简便的检测要求。即本发明可用于制备三聚氰胺免疫检测试剂。

[0127] 本发明有针对性地研究三聚氰胺抗原, 发现了一种新的三聚氰胺抗原、相应的抗体, 作出了意想不到的成绩; 同时, 本发明也有针对性地研究三聚氰胺抗原, 使用安全, 最大限度地发挥了作用。本发明对三聚氰胺抗原拓展了医药用途, 也为诊断、检测和研究三聚氰胺提供了一种新的药物和试剂来源。

[0128] 本发明安全实用, 效果明显, 其原料来源丰富、价廉, 性质稳定, 其制备工艺简单, 可为科研和生产提供稳定、便利的抗体来源。

[0129] 总之, 本发明积极适应了现代医疗和科研领域的工作需要和人性化服务的需要, 为诊断、检测和研究三聚氰胺提供了新的药物和制剂来源, 对开发利用中国现有三聚氰胺检测方法具有重要价值, 是用于诊断、检测和研究三聚氰胺等方面的安全原料, 对改进和提高现有的医疗水平具有重要价值。

#### 附图说明

[0130] 图 1 : 三聚氰胺竞争曲线。

#### 具体实施方式

[0131] 本发明研究了现有的人工制备三聚氰胺抗原技术, 提供了一种新的三聚氰胺抗原及其制备方法和用途, 便于食品、医疗、试剂等行业的安全使用。

[0132] 为了更好地阐述本发明, 现就 PAD 的制备, 以葡聚糖为例, 具体方法如下:

[0133] 10g 葡聚糖溶于 32ml 水中, 滴加 2.8g 偏高碘酸钠 / 15ml 水溶液, 搅拌至无气泡产生, 透析, 冻干得到冻干固体 8.5g。

[0134] 为了更好地阐述本发明, 现就三聚氰胺抗原的制备, 以三聚氰胺 -PAD-OVA 抗原为例, 具体方法如下:

[0135] (1) 配制溶液 A、B<sub>1</sub>、C、D

[0136] 溶液 A : 取 PAD ( 优选 2W 分子量葡聚糖制得的 PAD ) 溶于 PB ( 优选 pH = 7.2 ) 缓冲液中, 即得;

[0137] 溶液 B<sub>1</sub> : 取 OVA 溶于 PB ( 优选 pH = 7.2 ) 缓冲液中, 即得;

[0138] 溶液 C :取三聚氰胺溶于乙醇溶液 ( 优选 20%乙醇溶液 ) 中,即得 ;

[0139] 溶液 D :取三氢硼氰化钠溶于 PB( 优选 pH = 7.2) 缓冲液中,即得,该溶液现配现用 ;

[0140] (2) 将溶液 A 同溶液 B<sub>1</sub> 混合,在 20 ~ 50℃ ( 优选 40℃ ) 条件下,加入溶液 D,搅拌反应 2 ~ 6 小时 ( 优选 4 小时 ) 后, PB 缓冲液透析,2,4- 二硝基苯肼显色试验检验透析液,透析完全后,待用 ;

[0141] (3) 将溶液 C 同完全透析后所得溶液混合,40℃ 条件下,加入溶液 D,搅拌反应 4 小时后, PB 缓冲液透析, TNBSA 试验检验透析液无游离三聚氰胺小分子存在,得到三聚氰胺 -PAD-OVA 抗原。

[0142] 为了更好地阐述本发明,现就三聚氰胺抗原的制备,以三聚氰胺 -PAD-BSA 抗原为例,具体方法如下 :

[0143] (1) 配制溶液 A、B<sub>2</sub>、C、D

[0144] 溶液 A :取 PAD( 优选 2W 分子量葡聚糖制得的 PAD) 溶于 PB( 优选 pH = 7.2) 缓冲液中,即得 ;

[0145] 溶液 B<sub>2</sub> :取 BSA 溶于 PB( 优选 pH = 7.2) 缓冲液中,即得 ;

[0146] 溶液 C :取三聚氰胺溶于乙醇溶液 ( 优选 20%乙醇溶液 ) 中,即得 ;

[0147] 溶液 D :取三氢硼氰化钠溶于 PB( 优选 pH = 7.2) 缓冲液中,即得,该溶液现配现用 ;

[0148] (2) 将溶液 A 同溶液 B<sub>2</sub> 混合,在 20 ~ 50℃ ( 优选 40℃ ) 条件下,加入溶液 D,搅拌反应 2 ~ 6 小时 ( 优选 4 小时 ) 后, PB 缓冲液透析,2,4- 二硝基苯肼显色试验检验透析液,透析完全后,待用 ;

[0149] (3) 将溶液 C 同完全透析后所得溶液混合,40℃ 条件下,加入溶液 D,搅拌反应 4 小时后, PB 缓冲液透析, TNBSA 试验检验透析液无游离三聚氰胺小分子存在,得到三聚氰胺 -PAD-BSA 抗原。

[0150] 为了更好地阐述本发明,现就三聚氰胺抗原的制备,以三聚氰胺 -PAD-KLH 抗原为例,具体方法如下 :

[0151] (1) 配制溶液 A、B<sub>3</sub>、C、D

[0152] 溶液 A :取 PAD( 优选 2W 分子量葡聚糖制得的 PAD) 溶于 PB( 优选 pH = 7.2) 缓冲液中,即得 ;

[0153] 溶液 B<sub>3</sub> :取 KLH 溶于 PB( 优选 pH = 7.2) 缓冲液中,即得 ;

[0154] 溶液 C :取三聚氰胺溶于乙醇溶液 ( 优选 20%乙醇溶液 ) 中,即得 ;

[0155] 溶液 D :取三氢硼氰化钠溶于 PB( 优选 pH = 7.2) 缓冲液中,即得,该溶液现配现用 ;

[0156] (2) 将溶液 A 同溶液 B<sub>3</sub> 混合,在 20 ~ 50℃ ( 优选 40℃ ) 条件下,加入溶液 D,搅拌反应 2 ~ 6 小时 ( 优选 4 小时 ) 后, PB 缓冲液透析,2,4- 二硝基苯肼显色试验检验透析液,透析完全后,待用 ;

[0157] (3) 将溶液 C 同完全透析后所得溶液混合,40℃ 条件下,加入溶液 D,搅拌反应 4 小时后, PB 缓冲液透析, TNBSA 试验检验透析液无游离三聚氰胺小分子存在,得到三聚氰胺 -PAD-KLH 抗原。

[0158] 为了更好地阐述本发明,现就三聚氰胺抗原相关抗体及其制备方法进行进一步的阐述:

[0159] 本发明所述的三聚氰胺抗原单克隆抗体的制备方法具体包括:

[0160] (一) 小鼠免疫

[0161] 采用常规方法免疫小鼠,具体为:

[0162] 用三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白偶联产物作为免疫原免疫 6 ~ 8 周雄性 BALB/C 小鼠,免疫方法可采用:用三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白偶联物免疫 6 ~ 8 周 BALB/C 雄性小鼠 2 ~ 3 只。取三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化,每只小鼠腹腔注射。每隔两周进行加强免疫,共进行 5 次加强免疫。前 4 次加强免疫时取三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化,每只小鼠腹腔注射 0.1mg 三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白抗原。最后一次免疫采用尾静脉注射,不加佐剂,3 天后取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞进行细胞融合。

[0163] (二) 细胞融合

[0164] 依照常规方法进行细胞融合,即无菌环境下取免疫后小鼠的脾脏细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞在 PEG3000 作为融合剂的情况下进行细胞融合,具体步骤如下:

[0165] (1) 将  $1 \times 10^8$  个上述免疫小鼠脾细胞与  $2 \times 10^7$  个小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50ml 尖底离心管中用无血清 RPMI-1640 培养基 (Gibco) 混匀;

[0166] (2) 以 1000r/min 离心 5min 后,弃掉上清。

[0167] (3) 用手指轻弹离心管底部,打散细胞团,以使细胞均匀松散。

[0168] (4) 左手缓慢的转动离心管,右手使用吸管沿转动的管壁缓慢加入 1ml 50% PEG 3000 溶液 (Sigma);

[0169] (5) 静置,加入 30ml 无血清培养基终止融合;

[0170] (6) 再 1000rpm 离心 5min,弃上清液重悬于 HAT 培养基中;

[0171] (7) 接种于含有饲养细胞的 96 孔培养板中,在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养。

[0172] (三) 杂交瘤细胞、阳性孔的筛选及其克隆

[0173] 1、阳性杂交瘤细胞的筛选

[0174] 采用间接 ELISA 方法来筛选阳性杂交瘤细胞。检测出阳性孔的细胞要及时进行亚克隆;检测出阴性孔的细胞,可隔 1 ~ 2d 后对细胞上清再检测一次。

[0175] (1) 初步筛选具体步骤如下:

[0176] ①包被:细胞融合 7 天后重换用 HAT 培养基,2 周后再换一次,3 周后换 RPMI-1640 完全培养基。用包被液稀释包被抗原三聚氰胺 -PAD- 载体蛋白,使其浓度为  $1 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{L}$ /孔,4°C 包被过夜。

[0177] ②洗涤:用 PBST 洗涤 3 次后,拍干。

[0178] ③封闭:用 2% BSA 封闭液进行封闭,每孔  $100 \mu\text{L}$ ,37°C 温箱中温育 1h 后,同上洗涤 3 次,拍干。

[0179] ④抗体检测:各孔加入  $100 \mu\text{L}$  待检的融合细胞培养上清,同时用 SP2/0 细胞培养液作为阴性对照,37°C 温箱温育 1h,洗涤 3 次拍干;然后每孔加入  $100 \mu\text{L}$  山羊抗小鼠辣根过氧化物酶 (1 : 4000),37°C 温箱温育 1h,洗涤拍干。

[0180] ⑤显色:每孔加入  $100 \mu\text{L}$  TMB 底物溶液进行显色,37°C 温箱避光反应 15min。

[0181] ⑥终止：每孔加入 2mol/L 的  $H_2SO_4$  50  $\mu$  L 以终止反应。

[0182] ⑦判读：用酶标仪测定在 450nm 波长下各孔吸光值，检测孔 OD450 值 / 阴性对照孔 OD450 值  $\geq 2$  为阳性孔。

[0183] (2) 二次筛选

[0184] 对初次筛选到的阳性杂交瘤进行二次筛选，这样不但能除去假阳性杂交瘤而且还可以选择抑制强的杂交瘤细胞进行亚克隆。其操作步骤如下：先将初次筛选到的阳性孔细胞培养上清适当稀释（1 : 200），然后与等体积的三聚氰胺标准品混合，加入到已封闭好的酶标板内，100  $\mu$  L/ 孔，同时做空白对照孔（三聚氰胺零标准品）和阴性对照孔（SP2/0 细胞培养上清），37℃温箱温育 1h；洗涤 3 次后每孔加入 100  $\mu$  L 稀释好的山羊抗小鼠酶标二抗，37℃温箱温育 1h；取出后洗涤 4 次，每孔加入 100  $\mu$  L TMB 底物溶液，37℃温箱避光反应 15min；取出后加入终止液以终止反应，50  $\mu$  L/ 孔；用酶标检测仪测定 OD450 值。对空白对照孔 OD450 值高且竞争抑制后 OD490 值低的细胞孔进行亚克隆。

[0185] 2、阳性杂交瘤细胞的克隆

[0186] 利用有限稀释法对细胞进行亚克隆，对阳性较强、生长旺盛的融合细胞进行连续稀释并混匀，直至统计上每孔只含有 1 个细胞，然后铺制到 96 孔细胞培养板内。具体操作步骤如下：

[0187] (1) 通常在进行细胞亚克隆的前 1d 制备饲养层细胞。

[0188] (2) 用 HT 培养液将待克隆孔中的细胞轻轻吹起，转移至 24 孔细胞培养板内，再对细胞悬液进行 10 倍稀释，对细胞进行计数。

[0189] (3) 继续对细胞悬液进行 10 倍稀释，根据计数结果，按照每孔仅含有一个细胞的标准取 100 个细胞，用 HT 培养液混匀，将此细胞悬液加入到已制备好的饲养层细胞培养板内，每孔 100  $\mu$  L。

[0190] (4) 对上述在 96 孔和 24 孔细胞培养板内没有用完的细胞，按同一孔细胞归一类的原则合并，分别加入已铺有饲养层细胞的 24 孔培养板内，进行扩大培养。

[0191] (5) 将细胞培养板置 37℃ 5% 的  $CO_2$  培养箱中培养。第 4d 进行首次换液，并在倒置显微镜下观察细胞克隆生长状况，注意观察细胞是否受到污染。

[0192] (6) 第 7、9d 时分别对培养细胞进行一次换液。当融合细胞集落生长至长至孔底面积的 1/3 ~ 1/2 视野以上时，就可对融合细胞上清进行抗体检测。当阳性孔较多时，选择孔内只有一个细胞集落的进行亚克隆，同时对细胞进行扩大培养和冻存。如果细胞培养板的全部细胞培养上清经抗体检测都为阳性时，克隆方算成功（通常需 3 次克隆即可）（李岩松．环丙沙星单克隆抗体制备及其在 ELISA 中的应用；长春：吉林大学畜牧兽医学院，2005）。

[0193] 3、阳性杂交瘤克隆株的冻存与复苏

[0194] (1) 阳性杂交瘤克隆株的冻存

[0195] 在细胞培养瓶中扩大培养的阳性杂交瘤细胞，一部分用来制备腹水，一部分可冻存起来。在细胞冻存前 24h，最好对细胞进行换液，这样可使细胞处于对数生长期，冻存此时的细胞存活率很高。

[0196] 将杂交瘤细胞移至离心管内，以 1200r/min 离心 4min，小心弃去上清液，加入现配冻存液（含 DMSO 100  $\mu$  L/mL 与胎牛血清 900  $\mu$  L/mL），混匀后移至细胞冻存管内。然后

将冻存管放入塞有棉花的小盒内,置于 4℃,30min 后取出放入 -20℃ 冰箱内,1h 后取出放入 -80℃ 冰箱内,8h 后取出放入液氮罐中冻存。

[0197] (2) 阳性杂交瘤克隆株的复苏

[0198] 于液氮罐内冻存的杂交瘤细胞冻存管取出,马上置于 37 ~ 40℃ 的水浴中,待细胞冻存物全部溶化后,以 1000r/min 离心 5min,将上清弃掉以除去冻存液中二甲基亚砜保护剂。打散细胞团,向冻存管中加入含 20% 血清的完全培养液,吹打混匀细胞,全部吸出转移到细胞培养瓶中,置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24h 后,对细胞进行换液,再继续培养。

[0199] 本发明所述的杂交瘤细胞株保藏于液氮中。

[0200] (四) 单克隆抗体腹水制备及纯化

[0201] 1、体内诱生腹水

[0202] 取 6 ~ 8 周成年健康 BALB/c 雌性小鼠,每只腹腔注射 0.5mL 的灭菌石蜡油,一周后备用。收集处于对数生长期的阳性杂交瘤细胞,并调整细胞密度为 10<sup>6</sup> 个 /mL,将此阳性杂交瘤细胞注射预处理的小鼠腹腔内,0.5mL/ 只。

[0203] 注射后每天对小鼠的姿势、活力、进食、饮水、呼吸及机体状况进行观察。一般在 7 ~ 10d 后,可发现小鼠食欲明显减退,腹腔明显胀大,不愿走动,此时应立即用灭菌的 12# 针头抽取小鼠腹水,收集腹水于 3000r/min 离心 10min,弃去脂肪层和细胞层,收集中间澄清层,小量分装,-20℃ 冻存储备用。

[0204] 2、腹水中单抗纯化

[0205] 采用辛酸硫酸铵沉淀法,具体为:

[0206] 腹水中加入 2 倍体积的 0.06M 的醋酸缓冲液 (pH = 4.00) 进行稀释,然后以每毫升腹水加入 33 μL 辛酸计量,室温中缓慢滴加辛酸并搅拌,4℃ 混匀 1 小时。12000rpm 离心 30min,收集上清,加入等体积的饱和硫酸铵,混匀,4℃ 静置 2 小时,12000rpm 离心 20min,沉淀用 PBS 溶解,4℃ 环境下用 PBS 溶液透析过夜后即获得纯化抗体。

[0207] 为了更好地阐述本发明,现就三聚氰胺单克隆抗体的制备,以三聚氰胺 -PAD-KLH 抗原为例,具体方法如下:

[0208] (1) 小鼠免疫

[0209] 用三聚氰胺 -PAD-KLH 偶联物免疫 6 ~ 8 周小鼠 2 ~ 3 只;

[0210] 取三聚氰胺 -PAD-KLH 与等体积弗氏完全佐剂混合、充分乳化后,腹腔注射小鼠;

[0211] 定期 (优选每隔两周) 进行加强免疫 4 ~ 8 次 (优选 5 次):前 2 ~ 4 次加强免疫时取三聚氰胺 -PAD-KLH 与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后,腹腔注射小鼠;最后一次免疫采用尾静脉注射,不加佐剂;

[0212] 2 ~ 5 天 (优选 3 天) 后,取脾细胞进行融合;

[0213] (2) 细胞融合

[0214] 将上述免疫小鼠脾细胞与小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞在离心管中用培养基混匀,离心,弃上清液;

[0215] 向管底注入 PEG 3000,静置,加入培养基终止融合;

[0216] 再离心,弃上清液,重悬于培养基中,接种于含有饲养细胞的培养板中培养;

[0217] (3) 杂交瘤细胞、阳性孔的筛选及其克隆

[0218] 3 ~ 10 天 (优选 7 天) 后重换用培养基,1 ~ 2 周 (优选 2 周) 后再换一次,2 ~

3 周（优选 3 周）后换培养基；

[0219] 长至孔底面积的 1/3 ~ 1/2, 用三聚氰胺 -PAD-BSA 作为包被抗原进行间接 ELISA 法筛选阳性克隆孔；共获得 300 多个有反应的阳性孔；

[0220] 有限稀释法克隆, 得 2 株能分泌抗三聚氰胺的特异性抗体的杂交瘤细胞株；

[0221] 进一步扩大培养, 冻存；

[0222] (4) 单克隆抗体腹水制备及纯化

[0223] 取 6 ~ 8 周小鼠, 腹腔注射液体石蜡；

[0224] 1 ~ 2 周（优选 1 周）后腹腔注射杂交瘤细胞；

[0225] 待小鼠腹部明显膨大后, 采集腹水, 离心, 收集上清液, 进行纯化或冻存；

[0226] 在腹水中加入 1 ~ 3 倍（优选 2 倍）体积的醋酸缓冲液（优选 pH = 4.00）进行稀释；

[0227] 室温中缓慢滴加辛酸并搅拌、混匀、离心, 收集上清液；

[0228] 加入硫酸铵, 混匀、静置、离心, 得沉淀, 溶解、透析过夜后即获得纯化抗体。

[0229] 为了更好地阐述本发明, 现就三聚氰胺直接竞争 ELISA 方法的建立, 以三聚氰胺 -PAD-BSA 为例, 具体方法如下：

[0230] 单抗最佳包被浓度和三聚氰胺酶结合物最佳稀释度的确定

[0231] 将三聚氰胺 -PAD-BSA 标记辣根过氧化物酶, 三聚氰胺单抗包板；

[0232] 采用方阵试验法对抗体和酶标三聚氰胺 -PAD-BSA 进行一系列浓度稀释, 最终确定包被抗体、酶标的最佳浓度；

[0233] 将三聚氰胺单抗原用 CB 缓冲液（优选 pH = 9.6）稀释, 每孔包被 50 ~ 150  $\mu$ L, 过夜；

[0234] 包被完成后, 洗板、封闭、晾干, 备用；

[0235] 配制系列三聚氰胺标准品系列；向包被有三聚氰胺单抗的酶标板每空加入标准品和酶标三聚氰胺 -PAD-BSA, 反应 10 ~ 50 分钟后, 洗涤；

[0236] TMB 底物反应 10 ~ 30 分钟后, 终止反应测定 OD<sub>450nm</sub> 值；结果显示, 三聚氰胺竞争曲线说明本发明制备的三聚氰胺 BSA 偶联物活性正常, 三聚氰胺单抗特异性良好, 能够满足检测三聚氰胺残留的要求。

[0237] 本发明的实施, 下面将列举实施例进行进一步说明, 均是为了更好地阐述本发明, 并不是用来限制发明的范围。上述提供的一些试验研究内容与数据以及下列实施例中按前述发明内容给出三聚氰胺抗原和相应抗体及一些试验研究内容, 但应该理解本发明并不仅限于此处所列出的研究内容, 还应该理解此处所使用的术语仅用于描述特定的实施例, 而并不是对本发明的限定。下面通过实施例对本发明作详细描述。

[0238] 下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料, 如无特殊说明, 均为自常规生化试剂商店购得。以下实施例中的%, 如无特殊说明, 均为质量百分含量。

[0239] 实施例 1、三聚氰胺抗原的制备

[0240] (1) 配制下列溶液：

[0241] a. 0.25g PAD(2W 分子量葡聚糖制得) 溶于 5ml 0.1M PB(pH = 7.2) 缓冲液中

[0242] b. 0.25g OVA 溶于 2.55ml 0.1M PB(pH = 7.2) 缓冲液中

[0243] c. 50mg 三聚氰胺溶于 1ml 20%乙醇溶液中

[0244] d. 50mg 三氢硼氰化钠溶于 0.5ml 0.1M PB(pH = 7.2) 缓冲液中,该溶液现配现用

[0245] (2) 将 a 溶液同 b 溶液混合,40℃条件下,加入 d 溶液,搅拌反应 4 小时后,0.1M PB 缓冲液透析,2,4-二硝基苯肼显色试验检验透析液,透析完全后,待用。

[0246] (3) 将 c 溶液同完全透析后所得溶液混合,40℃条件下,加入 d 溶液,搅拌反应 4 小时后,0.1M PB 缓冲液透析, TNBSA 试验检验透析液无游离三聚氰胺小分子存在,得到三聚氰胺 -PAD-OVA 抗原。

[0247] (4) 将 b 溶液中的 OVA 换为 BSA,得到三聚氰胺 -PAD-BSA 抗原,同样将 b 溶液中的 OVA 换为 KLH,得到三聚氰胺 -PAD-KLH 抗原。

[0248] 实施例 2、三聚氰胺抗原的制备

[0249] (1) 配制下列溶液:

[0250] a. 0.25g PAD(4W 分子量葡聚糖制得)溶于 5ml 0.1M PB(pH = 7.2) 缓冲液中

[0251] b. 0.25g OVA 溶于 2.55ml 0.1M PB(pH = 7.2) 缓冲液中

[0252] c. 50mg 三聚氰胺溶于 1ml 20%乙醇溶液中

[0253] d. 50mg 三氢硼氰化钠溶于 0.5ml 0.1M PB(pH = 7.2) 缓冲液中,该溶液现配现用

[0254] (2) 将 a 溶液同 b 溶液混合,40℃条件下,加入 d 溶液,搅拌反应 4 小时后,0.1M PB 缓冲液透析,2,4-二硝基苯肼显色试验检验透析液,透析完全后,待用。

[0255] (3) 将 c 溶液同完全透析后所得溶液混合,40℃条件下,加入 d 溶液,搅拌反应 4 小时后,0.1M PB 缓冲液透析, TNBSA 试验检验透析液无游离三聚氰胺小分子存在,得到三聚氰胺 -PAD-OVA 抗原。

[0256] (4) 将 b 溶液中的 OVA 换为 BSA,得到三聚氰胺 -PAD-BSA 抗原,同样将 b 溶液中的 OVA 换为 KLH,得到三聚氰胺 -PAD-KLH 抗原。

[0257] 实施例 3、三聚氰胺单克隆抗体制备

[0258] (1) 小鼠免疫

[0259] 用三聚氰胺 -PAD-KLH 偶联物免疫 6 ~ 8 周 BALB/C 雄性小鼠 2 ~ 3 只。取 0.7ml 浓度为 1mg/ml 的三聚氰胺 -PAD-KLH 与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化,每只小鼠腹腔注射 0.2mg。每隔两周进行加强免疫,共进行 5 次加强免疫。前 4 次加强免疫时取三聚氰胺 -PAD-KLH 与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化,每只小鼠腹腔注射 0.1mg 抗原。最后一次免疫采用尾静脉注射,不加佐剂,3 天后取脾细胞进行融合。

[0260] (2) 细胞融合

[0261] 将  $1 \times 10^8$  个上述免疫小鼠脾细胞与  $2 \times 10^7$  个小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50ml 尖底离心管中用无血清 RPMI-1640 培养基 (Gibco) 混匀,1000rpm 离心 5min,弃上清液,向管底注入 1ml50% PEG 3000 (Sigma),静置,加入 30ml 无血清培养基终止融合。再 1000rpm 离心 5min,弃上清液重悬于 HAT 培养基中,接种于含有饲养细胞的 96 孔培养板中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养。

[0262] (3) 杂交瘤细胞、阳性孔的筛选及其克隆

[0263] 7 天后重换用 HAT 培养基,2 周后再换一次,3 周后换 RPMI-1640 完全培养基。长至孔底面积的 1/3 ~ 1/2,用三聚氰胺 -PAD-BSA 作为包被抗原进行间接 ELISA 法筛选阳性克隆孔。共获得 300 多个有反应的阳性孔,有限稀释法克隆,得 2 株能分泌抗三聚氰胺的特异

性抗体的杂交瘤细胞株,一步扩大培养,冻存。

[0264] (4) 单克隆抗体腹水制备及纯化

[0265] 取 6 ~ 8 周 BALB/C 小鼠,腹腔注射液体石蜡 0.5ml/只,一周后腹腔注射杂交瘤细胞  $2 \times 10^6$  个,10 天左右小鼠腹部明显膨大。采集腹水,3500rpm 离心 5min,收集上清,进行纯化或冻存。

[0266] 在腹水中加入 2 倍体积的 0.06M 的醋酸缓冲液 (pH = 4.00) 进行稀释,然后以每毫升腹水加入 33  $\mu$ L 辛酸计量,室温中缓慢滴加辛酸并搅拌,4 $^{\circ}$ C 混匀 1 小时。12000rpm 离心 30min,收集上清,加入等体积的饱和硫酸铵,混匀,4 $^{\circ}$ C 静置 2 小时,12000rpm 离心 20min,沉淀用 PBS 溶解,4 $^{\circ}$ C 环境下用 PBS 溶液透析过夜后即获得纯化抗体。

[0267] 实施例 4、三聚氰胺直接竞争 ELISA 方法的建立

[0268] 单抗最佳包被浓度和三聚氰胺酶结合物最佳稀释度的确定

[0269] 将三聚氰胺 -PAD-BSA 标记辣根过氧化物酶,三聚氰胺单抗包板。采用方阵试验法对抗体和酶标三聚氰胺 -PAD-BSA 进行一系列浓度稀释,最终确定包被抗体 5  $\mu$ g/ml,酶标 2  $\mu$ g/ml 为最佳浓度。将三聚氰胺单抗原用 0.05M CB 缓冲液 (pH = 9.6),稀释至 5  $\mu$ g/ml,每孔包被 100  $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C 过夜。包被完成后,用 PBST (含 2%吐温 20) 洗板,2% BSA 封闭,晾干备用。

[0270] 配制 1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml 的三聚氰胺标准品,向包被有三聚氰胺单抗的酶标板每孔加入 50  $\mu$ L 标准品和 50  $\mu$ L 2  $\mu$ g/ml 的酶标三聚氰胺 -PAD-BSA,37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟,洗涤, TMB 底物 37 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟,终止反应测定 OD 450nm 值,检测结果见图 1。

[0271] 图 1 的结果显示,三聚氰胺竞争曲线说明本发明制备的三聚氰胺 BSA 偶联物活性正常,三聚氰胺单抗特异性良好,能够满足检测三聚氰胺残留的要求。

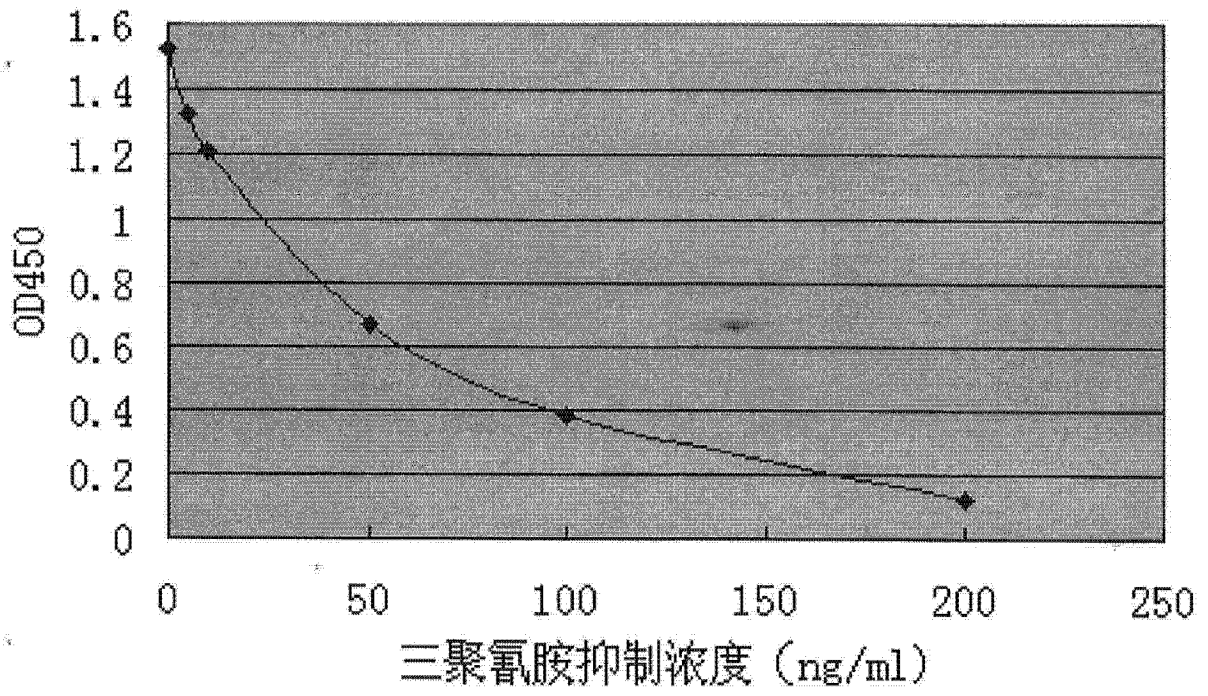


图 1

专利名称(译)	一种三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102702345B</a>	公开(公告)日	2014-07-30
申请号	CN201210144757.9	申请日	2012-05-10
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	唐古生 丁自更 康蔡俊 陈英豪 秦阳华 赵卫国		
发明人	唐古生 丁自更 康蔡俊 陈英豪 秦阳华 赵卫国		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
审查员(译)	刘婷		
其他公开文献	CN102702345A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种三聚氰胺抗原、相关抗体及其制备方法。三聚氰胺和载体蛋白通过PAD作为桥梁试剂进行偶联，偶联产物免疫动物，制备可以用于检测三聚氰胺的单克隆抗体。本发明提供的人工制备三聚氰胺抗原及相关抗体可用于三聚氰胺免疫检测试剂的研制开发，来满足低成本、快捷、操作简便的检测要求。

