



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103864929 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201310710647. 9

(22) 申请日 2013. 12. 20

(71) 申请人 长沙安迪生物科技有限公司

地址 410205 湖南省长沙市高新开发区麓谷  
麓景路 8 号

(72) 发明人 周坚 王黎丽

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

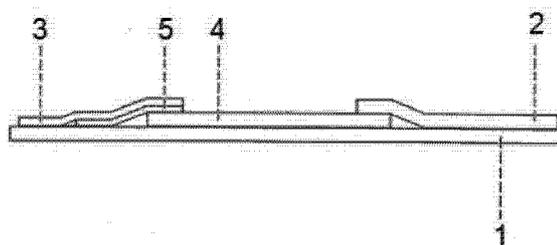
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法和  
 $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,提供一种  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法和  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条及其制备方法,技术方案为:将  $\beta$ -酪蛋白作为抗原免疫 BALB/c 小鼠,取免疫效果最佳的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合,以  $\beta$ -酪蛋白、 $\alpha$ s1-酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白作为检测抗原,通过酶联免疫吸附试验检测杂交瘤细胞的上清进行筛选,保留阳性孔,用有限稀释法进行克隆化,得到能稳定分泌抗  $\beta$ -酪蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞株后大量制备和纯化所得的单克隆抗体。所述方法所获得的  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体经胶体金标记后可吸附于金标结合垫上,制备成胶体金检测试纸条。本发明对原料乳酪蛋白含量是否达标实现快速特异性检测,分辨率高,缩短检测时间。



1. 一种  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - a. 动物免疫注射:将  $\beta$ -酪蛋白作为抗原免疫 Balb/c 小鼠,进行免疫以及加强免疫;
  - b. 制备杂交瘤细胞:取免疫效果最佳的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合,以  $\beta$ -酪蛋白、 $\alpha$ s1-酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白作为检测抗原,通过酶联免疫吸附试验检测杂交瘤细胞的上清进行筛选,保留阳性孔,经过亚克隆获得能稳定分泌抗  $\beta$ -酪蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞株后;
  - c. 对小鼠腹腔注射杂交瘤细胞,采集腹水以及对腹水纯化获得  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体。
2. 根据权利要求1所述的一种  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤 a 中各次的免疫注射剂量是 50-100  $\mu$ g/只。
3. 根据权利要求1所述的一种  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤 b 中,将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 2-10:1 的比例进行细胞融合。
4. 一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,该试纸条含有衬板和衬板上依次衔接的样品垫、金标结合垫、纤维素膜和吸水垫,其特征在于:所述金标结合垫为吸附  $\beta$ -酪蛋白金标抗体的结合垫,所述纤维素膜上有一条检测带和一条质控带,分别是含  $\beta$ -酪蛋白的检测带和羊抗鼠抗体的质控带。
5. 根据权利要求4所述的一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,其特征在于,所述试纸条是多层结构的窄条薄片,具体结构是:底层是衬板,衬板中部叠置粘贴纤维素膜,衬板一端部上叠置粘贴吸水垫,衬板另一端部上叠置粘贴样品垫,吸水垫内端与样品垫内端各自分别与纤维素膜一端搭接,在样品垫与纤维素膜的搭接处,两者之间夹置粘贴一段金标结合垫。
6. 根据权利要求4或5任意一项所述的一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,其特征在于,所述的衬板为硬质塑胶条或不吸水硬纸条。
7. 根据权利要求4或5任意一项所述的一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,其特征在于,所述的样品垫及结合垫分别为玻璃纤维膜、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜任意一种。
8. 根据权利要求4或5任意一项所述的一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,其特征在于,所述的纤维素膜为硝酸纤维素膜或羧化纤维素膜。
9. 根据权利要求4或5任意一项所述的一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,其特征在于,所述的吸水垫为吸水能力较强的吸水滤纸或滤油纸。
10. 一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - a). 胶体金颗粒的制备;
  - b). 胶体金标记  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体,并将标记后的  $\beta$ -酪蛋白金标抗体吸附于金标结合垫上;
  - c). 将  $\beta$ -酪蛋白和羊抗鼠抗体分别吸附于硝酸纤维素膜检测线和质控线位置上;
  - d). 组装胶体金试纸条,将吸水垫、纤维素膜、金标结合垫和样品垫从上到下依次固定于衬板上,即成  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条。

## 一种 $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法和 $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法和  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 酪蛋白是指乳中一大类蛋白质的总称,占乳蛋白的 76-86%。酪蛋白不是单一的蛋白质,而是由  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\kappa$ - 四种类型构成,它们各自都有相对分子质量和等电点不同的变异体。其中  $\alpha$ -酪蛋白约占 75%, $\beta$ -酪蛋白约占 22%, $\gamma$ -酪蛋白约占 3%, $\kappa$ -酪蛋白只占微量。

[0003] 目前,国内尚未有酪蛋白含量检测方法的国家标准和行业标准。申请号为 200810007526.7 《一种牛乳中酪蛋白含量的检测方法》的中国专利申请公开的一种酪蛋白含量的检测方法是向牛乳中加入酪蛋白沉淀剂,过滤去除牛乳中酪蛋白,通过测定去除酪蛋白前后的蛋白含量之差计算牛乳中酪蛋白含量,该方法操作复杂,不适合现场操作;申请号为 200810146950.X 《一种乳中  $\beta$ -酪蛋白含量的检测方法》的中国专利申请公开了一种利用毛细管电泳检测乳中酪蛋白含量的方法,该方法需要对乳样品进行处理,该方法的最低检出线为 0.15ng,最低检出浓度为 0.005mg/mL,精确度达 90% 以上,该方法需要预处理,且需特殊仪器设备,不适合现场操作;申请号为 200910068653.2 《 $\alpha$ s1-酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白特异性抗体及试剂盒和试纸条》的中国专利申请公开了  $\alpha$ s1-酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白血清抗体及试剂盒和试纸条的制备方法,该方法所针对的酪蛋白特异性较差,检验结果有效性较低。

### 发明内容

[0004] 鉴于上述缺陷,本发明的主要目的是提供一种  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法和  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条及其制备方法,以实现原料乳中是否掺假及酪蛋白含量是否达标的快速检测。

[0005]  $\beta$ -酪蛋白是原料奶中较为稳定的成分,也是乳的特征蛋白,所以其含量是否合格,不仅可以判断乳品蛋白含量和质量,而且可以有效避免用含氮化合物、其他非乳蛋白冒充如蛋白的掺杂使假。

[0006] 为了达到以上目的,本发明提供的该种  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 1. 动物免疫注射:将  $\beta$ -酪蛋白作为抗原免疫 Balb/c 小鼠,进行免疫以及加强免疫;

[0008] 2. 制备杂交瘤细胞:取免疫效果最佳的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合,以  $\beta$ -酪蛋白、 $\alpha$ s1-酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白作为检测抗原,通过酶联免疫吸附试验检测杂交瘤细胞的上清进行筛选,保留阳性孔,经过亚克隆获得能稳定分泌抗  $\beta$ -酪蛋白的单

克隆抗体的杂交瘤细胞株后；

[0009] 3. 对小鼠腹腔注射杂交瘤细胞,采集腹水以及对腹水纯化获得  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体。

[0010] 进一步的,所述步骤 1 中各次的免疫注射剂量是 50-100  $\mu$ g/只；

[0011] 进一步的,所述步骤 2 中,将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 2-10:1 的比例进行细胞融合。

[0012] 本发明还提供一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,该试纸条含有衬板和衬板上依次衔接的样品垫、金标结合垫、纤维素膜和吸水垫,其中:所述金标结合垫为吸附  $\beta$ -酪蛋白金标抗体的结合垫,所述纤维素膜上有一条检测带和一条质控带,分别是含  $\beta$ -酪蛋白的检测带和羊抗鼠抗体的质控带。

[0013] 本发明提供的该种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条是多层结构的窄条薄片,具体结构是:底层是衬板,衬板中部叠置粘贴纤维素膜,衬板一端部上叠置粘贴吸水垫,衬板另一端部上叠置粘贴样品垫,吸水垫内端与样品垫内端各自分别与纤维素膜一端搭接,在样品垫与纤维素膜的搭接处,两者之间夹置粘贴一段金标结合垫。

[0014] 进一步的,所述的衬板为不吸水的韧性材料；

[0015] 更进一步的,上述韧性材料用硬质塑胶条或不吸水硬纸条制成。

[0016] 进一步的,所述的样品垫为玻璃纤维膜、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜任意一种。

[0017] 进一步的,所述的结合垫为玻璃纤维膜、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜任意一种。

[0018] 进一步的,所述的纤维素膜为硝酸纤维素膜或羧化纤维素膜。

[0019] 进一步的,所述的吸水垫为吸水能力较强的吸水滤纸或滤油纸。

[0020] 本发明再提供一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条的制备方法,包括以下步骤：

[0021] 1. 胶体金颗粒的制备；

[0022] 2. 胶体金标记  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体,并将标记后的  $\beta$ -酪蛋白金标抗体吸附于金标结合垫上；

[0023] 3. 将  $\beta$ -酪蛋白和羊抗鼠抗体分别吸附于硝酸纤维素膜检测和质控线位置上；

[0024] 4. 组装胶体金试纸条,将吸水垫、纤维素膜、金标结合垫和样品垫从上到下依次固定于衬板上,即成  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条。

[0025] 本发明所提供的  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,其应用方法包括以下步骤：

[0026] 1、样品处理

[0027] 将原料奶用样品稀释液(pH7.4, 1mmol PBST)进行 10 倍稀释后用于检测。

[0028] 2、利用上述  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条检测样品

[0029] 将试纸条从铝箔袋中取出,放置室温,做好样品编号标记;用一次性滴管吸取样品,滴入加样孔中,每孔 3 滴,加样过程中勿使液体溢出加样孔;5 分钟内观察结果。

[0030] 当检测线和质控线同时出现棕红色条带时,检测结果为阳性,表示被检测样品中  $\beta$ -酪蛋白含量低于正常值；

[0031] 当检测线不出线,只有质控线出线时,检测结果为阴性,表示被检测样品中  $\beta$ -酪蛋白含量等于或高于正常值；

[0032] 当检测线与质控线均不出线时,表示试纸条已失效。

[0033] 所述正常值为样品中  $\beta$ -酪蛋白含量不低于质量浓度 0.5%。

[0034] 本发明具有以下有益成果:

[0035] 本发明是一种基于免疫学竞争法的原理,结合胶体金标记技术和免疫层析法设计的一种快速检测试纸,可快速特异地检测鲜乳中的  $\beta$ -酪蛋白。根据检测卡样品检测线(T)和质控线(C)的有无显色来判断原料奶是否掺假及样品  $\beta$ -酪蛋白含量是否达标。与现有相比,该检测卡具有操作简单、分辨率高、特异性好等优点,尤其是样品无需处理,无需特殊仪器设备,适合现场操作。

#### 附图说明

[0036] 图 1 为实施例 4 中  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条的结构示意图;

[0037] 图 2 为实施例 4 中  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条的显示印迹示意图。

#### 具体实施方式

[0038] 以下结合实施例及附图对本发明的技术方案进一步说明,但不作对其的限定:

[0039] 实施例 1  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的制备

[0040] 动物程序:以  $\beta$ -酪蛋白作为抗原,100  $\mu$ g/只的免疫剂量用等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后腹腔多点注射免疫 2 只 Balb/c 小鼠,每隔 2~3 周再用相同剂量抗原用弗氏不完全佐剂乳化后免疫 2-3 次,融合前三天加强免疫一次。

[0041] 细胞融合与克隆化:取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5:1 比例融合,采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌抗  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0042] 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成  $5 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37°C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0043] 单克隆抗体的制备与纯化:选择 10 周龄的 Balb/c 小鼠,腹腔注射杂交瘤细胞悬液,接种细胞 7-10 天后收集腹水,经辛酸-饱和硫酸胺法和 Protein A 亲和层析法纯化。

[0044] 实施例 2 胶体金标记  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体复合物的制备

[0045] 胶体金颗粒的制备:取 1% 氯金酸溶液 1mL,加 99mL 超纯水成终浓度 0.01% 的氯金酸溶液,加热沸腾后,取 1% 柠檬酸三钠 1.6mL 一次性迅速加入煮沸的氯金酸溶液中,继续加热至溶液由淡黄色转为蓝黑色最终变为亮红色,颜色稳定后继续加热 5 分钟,室温冷却,加水至原体积。

[0046] 金标抗体的制备和纯化:用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  调节胶体金溶液 pH 至 7.0-8.5,均匀搅拌的同时按每毫升金溶液加入  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体 5-20  $\mu$ g,5 分钟内全部加完,避光继续搅拌 30 分钟后,加入 0.1% 的聚乙二醇(PEG MW20000),全部加完后,4°C 高速离心对标记的蛋白质进行纯化和浓缩以除去未参与标记的过量的蛋白质、未完全稳定的胶体金颗粒以及各种可能形成的聚合物。

[0047] 实施例 3  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条的组装

[0048] 将金标抗体适当稀释后用喷金机喷在结合垫,37°C 干燥。 $\beta$ -酪蛋白用 0.01mol/L

pH7.4 的磷酸缓冲液稀释至 1.5-2mg/mL,用喷膜仪喷涂于纤维素膜上,此为检测线;在离检测线上方 5 毫米处喷涂的 2mg/mL 羊抗鼠抗体,此为质控线。37°C 干燥后,将纤维素膜、金标结合垫、样品垫和吸水垫依次组装在衬板上,用自动斩切机切成合适宽度即成  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条。

[0049] 实施例 4  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条的具体结构

[0050] 一种  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条,如图 1 所示,试纸条是多层结构的窄条薄片,片长约 60mm,片宽约 4mm,厚度约 2.5mm。试纸条是多层结构:底层是衬板 1,为聚氯乙烯塑料薄片,厚约 0.5mm,长 60mm,宽 4mm;衬板 1 中部叠置粘贴纤维素膜 4,本实施例采用硝酸纤维素膜,其厚 0.5mm,长 20-25mm,宽 4mm。衬板 1 一端部上叠置粘贴吸水垫 2,衬板 1 另一端部上叠置粘贴样品垫 3,吸水垫 2 内端与样品垫 3 内端各自分别与纤维素膜 4 一端搭接,在样品垫 3 与纤维素膜 4 的搭接处,两者之间夹置粘贴一段金标结合垫 5,金标结合垫 5 是含抗  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体胶体金标记物的玻璃纤维膜。金标结合垫 5 厚 0.5-0.8mm,长 5mm,宽 4mm。样品垫 3 厚 0.5-0.8mm,长 20mm,宽 4mm。吸水垫 2 厚 0.5-0.8mm,长 16-20mm,宽 4mm。金标结合垫 5、样品垫 3 及吸水垫 2 与纤维素膜 4 搭接长度为 1-2mm。本实施例中样品垫 3 材料采用吸水玻璃纤维膜。

[0051] 纤维素膜 4 上有二条间隔开的横向显示印迹带,如图 2 所示,二条显示印迹带中,一条是检测带 6,含  $\beta$ -酪蛋白;另一条是质控带 7,含羊抗鼠抗体。

[0052] 实施例 5  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条应用

[0053] 样品处理:将原料奶用样品稀释液(pH7.4,1mmol PBST)进行 10 倍稀释后用于检测。

[0054] 应用  $\beta$ -酪蛋白胶体金检测试纸条进行检测时,先将待检测的样品液从加样孔中滴入检测卡检测条的样品上,由于虹吸作用,带动待检测的样品液及胶体金膜所含的抗  $\beta$ -酪蛋白单克隆抗体胶体金标记物一起向硝酸纤维膜扩散,5-10 分钟内观察结果。主要反应的结果如下:

[0055] 1、当检测线和质控线同时出线时,检测结果为阳性,表示被检测样品中  $\beta$ -酪蛋白含量低于正常值(0.5wt%)。

[0056] 2、当检测线不出线,只有质控线出线时,检测结果为阴性,表示被检测样品中  $\beta$ -酪蛋白含量等于或高于正常值(0.5wt%)。

[0057] 3、当检测线与质控线均不出线时,表示试纸条已失效。

[0058] 以上已对本发明的技术内容作了详细说明。对本领域一般技术人员而言,在不背离本发明原理的前提下对它所做的任何显而易见的改动,都不会超出本申请所附权利要求的保护范围。

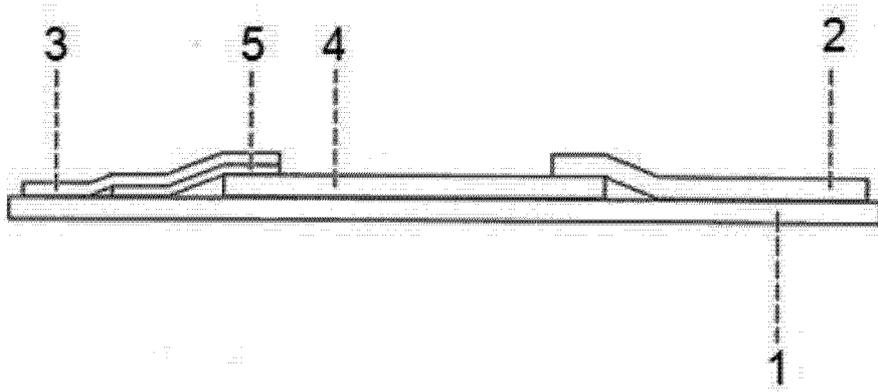


图 1

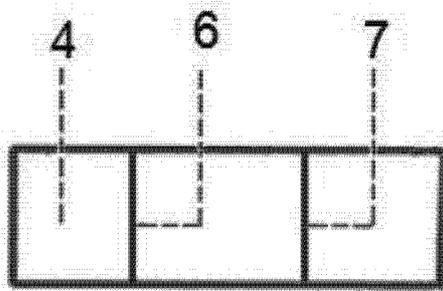


图 2

专利名称(译)	一种β-酪蛋白单克隆抗体的制备方法和β-酪蛋白胶体金检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103864929A</a>	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201310710647.9	申请日	2013-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	长沙安迪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	长沙安迪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	长沙安迪生物科技有限公司		
[标]发明人	周坚 王黎丽		
发明人	周坚 王黎丽		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/68 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，提供一种β-酪蛋白单克隆抗体的制备方法和β-酪蛋白胶体金检测试纸条及其制备方法，技术方案为：将β-酪蛋白作为抗原免疫BALB/c小鼠，取免疫效果最佳的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行融合，以β-酪蛋白、αs1-酪蛋白和κ-酪蛋白作为检测抗原，通过酶联免疫吸附试验检测杂交瘤细胞的上清进行筛选，保留阳性孔，用有限稀释法进行克隆化，得到能稳定分泌抗β-酪蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞株后大量制备和纯化所得的单克隆抗体。所述方法所获得的β-酪蛋白单克隆抗体经胶体金标记后可吸附于金标结合垫上，制备成胶体金检测试纸条。本发明对原料乳酪蛋白含量是否达标实现快速特异性检测，分辨率高，缩短检测时间。

