



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106749653 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611116168.4

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2016.12.07

(71)申请人 普菲特益斯生物科技(北京)有限公司

地址 101111 北京市大兴区亦庄经济技术开发区科创六街88号生物医药园E6座

(72)发明人 王琳 闫俊杰 裴世春 刘文婷 高建伟

(74)专利代理机构 深圳市中原力和专利商标事务所(普通合伙) 44289

代理人 王诗捷

(51)Int. Cl.

C07K 16/14(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

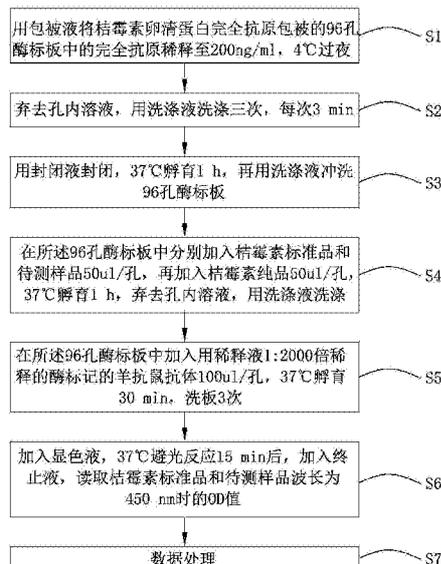
权利要求书3页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

抗桔霉素单抗的制备方法、桔霉素试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开一种抗桔霉素单抗的制备方法、桔霉素ELISA检测试剂盒及其检测方法。抗桔霉素单抗的制备首先合成桔霉素完全抗原,然后以所述桔霉素完全抗原作为免疫抗原对动物进行免疫,再应用杂交瘤细胞技术进行细胞融合和筛选,获得稳定分泌抗桔霉素单抗的杂交瘤细胞株,通过制备腹水和纯化,获得抗桔霉素单抗。本发明提供抗桔霉素单抗的制备方法具有制备条件温和、操作简单、过程可控等优点,提供的桔霉素ELISA检测试剂盒灵敏度为5ng/ml,具有广泛的应用前景。



1. 一种抗桔霉素单抗的制备方法,其特征在于,该制备方法包括:

合成桔霉素完全抗原,其中,所述桔霉素完全抗原根据如下方法制备:桔霉素先与偶联试剂2,2-二氯-5-(2-苯乙基)-4-(三甲基硅)-3-咪唑酮和N-羟基琥珀酰亚胺反应,然后与大分子载体进行偶联,偶联反应后透析直至透析液中蛋白含量测定值与空白透析液相同,去除没有结合的桔霉素,透析物浓缩后得到桔霉素完全抗原;

以所述桔霉素完全抗原作为免疫抗原对动物进行免疫,再应用杂交瘤细胞技术进行细胞融合和筛选,获得稳定分泌抗桔霉素单抗的杂交瘤细胞株,通过制备腹水和纯化,获得抗桔霉素单抗。

2. 根据权利要求1所述的抗桔霉素单抗的制备方法,其特征在于,合成桔霉素完全抗原的具体方法为:

(1) 桔霉素的活化:将13~17mg桔霉素与13~17mg的2,2-二氯-5-(2-苯乙基)-4-三甲基硅-3-咪唑酮以及5~7mg N-羟基琥珀酰亚胺溶于0.2ml的无水四氢呋喃中缓慢滴加10.1mol/L的HCl100 μ l,室温下,摇匀后再离心取上清液,用无水四氢呋喃洗涤;

(2) 桔霉素-载体偶联反应:待四氢呋喃吹干后,将残留物溶于0.5ml二甲基甲酰胺,然后将此溶液滴加于0.5ml 5%的大分子载体溶液中并将溶液pH值调节至8.0,37 $^{\circ}$ C恒温箱中缓慢摇匀60min;

(3) 分离纯化:偶联反应后,置于0.1mol/L NaHCO₃溶液中透析,先透析1小时,再按前3次换液时间间隔为1.5小时,中间三次换液时间间隔为4.5小时,后三次换液时间为18小时的方式进行透析,使透析液中蛋白含量测定值与空白透析液相同,然后去除没有结合的桔霉素,透析物浓缩后得到桔霉素完全抗原,冻干-20 $^{\circ}$ C保存。

3. 根据权利要求2所述的抗桔霉素单抗的制备方法,其特征在于,所述大分子载体为牛血清蛋白、卵清蛋白、匙孔贝血蓝蛋白或牛甲状腺球蛋白。

4. 根据权利要求1所述的抗桔霉素单抗的制备方法,其特征在于,以所述桔霉素完全抗原作为免疫抗原对动物进行免疫,再应用杂交瘤细胞技术进行细胞融合和筛选,获得稳定分泌抗桔霉素单抗的杂交瘤细胞株,通过制备腹水和纯化,获得抗桔霉素单抗,具体包括如下步骤:

步骤一、动物免疫:以所述桔霉素完全抗原作为免疫抗原以及弗氏佐剂对BALB/c小鼠进行多次免疫直至其效价检测达到1:10W;

步骤二、细胞融合:取免疫小鼠的脾脏细胞,以体积比为50%的PEG1450作融合剂,按10:1细胞数量与小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0进行融合,融合后的细胞先用HAT培养基作选择性培养,7天后改用HT培养基培养,14天后改用DMEM培养基培养;

步骤三、阳性杂交瘤细胞株的亚克隆:采用桔霉素完全抗原包被的96孔酶标板检测融合后的细胞,所述96孔酶标板的包被浓度为200ng/ml,融合后的细胞加入量为100 μ l/孔,当检测到阳性细胞再进行亚克隆直到达到100%的阳性率;

步骤四、抗体的制备和纯化

(1) 抗体的制备:提前7~10天,对每只致敏的BALB/c小鼠腹腔注射0.5ml的液体石蜡,然后将步骤三已建的阳性杂交瘤细胞接种至已注射液体石蜡的BALB/c小鼠,7~10天后采集腹水并离心得上清液;

(2) 抗体的纯化:将所述上清液按1:10的比例稀释于PBS溶液中,并以0.5ml/min的速度

逐量从柱上方添加于经PBS平衡的层析柱中,然后用PBS溶液洗杂,再用pH 2.9的甘氨酸缓冲液洗脱,获得纯化的抗桔霉素单抗。

5. 根据权利要求4所述的抗桔霉素单抗的制备方法,其特征在于,步骤一的动物免疫方法具体为:首次免疫,50 μ g/只的免疫抗原加等体积完全弗氏佐剂,皮下注射;2周后,第二次免疫,用50 μ g/只的免疫抗原加等体积不完全弗氏佐剂,皮下注射;2周后,第三次免疫,用25 μ g/只的免疫抗原加等体积不完全福氏佐剂,皮下注射;7-10天后,ELISA检测免疫鼠血清效价,其效价达到1:10W即可准备做细胞融合;细胞融合前3天,再用25 μ g抗原腹腔注射以加强免疫。

6. 一种桔霉素ELISA检测试剂盒,其特征在于,包括采用权利要求1-5任一项所述的抗桔霉素单抗的制备方法制备的抗桔霉素单抗。

7. 根据权利要求6所述的桔霉素ELISA检测试剂盒,其特征在于,还包括桔霉素完全抗原包被的96孔酶标板、桔霉素标准品、酶标记的羊抗鼠抗体、包被液、稀释液、封闭液、显色液及终止液;

其中,

所述桔霉素标准品的浓度分别为0、5、10、20、40和80ng/ml;

所述酶标记的羊抗鼠抗体为用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体;

所述包被液为0.01mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液,用于将96孔酶标板包被的桔霉素完全抗原稀释至200ng/ml;

所述稀释液为0.01mol/L pH7.4的PBS溶液;

所述封闭液为含5%小牛血清的PBS/T20;

所述显色液为TMB单组分显色液;

所述终止液为2mol/L的H₂SO₄。

8. 根据权利要求7所述的桔霉素ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述96孔酶标板包被的桔霉素完全抗原为桔霉素卵清蛋白完全抗原。

9. 根据权利要求7所述的桔霉素ELISA检测试剂盒,其特征在于,还包括洗涤液,所述洗涤液为PBS/T20。

10. 采用权利要求7-9任一项所述的桔霉素ELISA检测试剂盒检测桔霉素含量的方法,其特征在于,包括:

用包被液将桔霉素完全抗原包被的96孔酶标板中的桔霉素完全抗原稀释至200ng/ml,4 $^{\circ}$ C过夜;

弃去孔内溶液,用洗涤液洗涤三次,每次3min,

用封闭液封闭,37 $^{\circ}$ C孵育1h,再用洗涤液冲洗96孔酶标板;

在所述96孔酶标板中分别加入桔霉素标准品和待测样品50 μ l/孔,再加入桔霉素纯品50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,弃去孔内溶液,用洗涤液洗涤;

在所述96孔酶标板中加入用稀释液1:2000倍稀释的酶标记的羊抗鼠抗体100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min,洗板3次;

加入显色液,37 $^{\circ}$ C避光反应15min后,加入终止液,读取桔霉素标准品和待测样品波长为450nm时的吸光度OD值;

数据处理:无桔霉素抑制时的OD_{450nm}的数值为B₀,其他桔霉素标准品浓度对应的OD_{450nm}

数值作为B,以相对吸光度 B/B_0 值为纵坐标,以每孔所述添加桔霉素标准品的浓度值为横坐标,绘制标准曲线,计算出待测样品 OD_{450nm} 的数值B与 B_0 的比值,根据标准曲线查出相应的浓度,即为待测样品的桔霉素浓度。

抗桔霉素单抗的制备方法、桔霉素试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及属于生物检测技术领域,尤其涉及抗桔霉素单抗的制备方法、桔霉素ELISA检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 桔霉素(CITRININ,CIT),也称为桔青霉素,是一种真菌产生的有毒次级代谢产物,分子式是 $C_{13}H_{14}O_5$,化学结构是(3R,4S)-4,6-二氢-8-羟基-3,4,5-三甲基-6-氧-3H-2-苯吡-7-羧酸,相对分子量为250.3Da。桔霉素是由青霉、曲霉、红曲霉等丝状真菌产生的毒素,具有严重肝肾毒性以及致畸、致癌和致突变作用。近年来的调查研究发现,许多食品和农产品中都可检测到桔霉素,主要原因是与玉米、大米、面包、奶酪、苹果、梨等农产品或食品的霉变有关。因此,桔霉素引起的食品安全问题越来越受到人们的关注。

[0003] 红曲霉菌在我国的应用源远流长,用红曲菌发酵可生产多种中国传统食品,如红曲酒、红腐乳、红曲米等。桔霉素是真菌的次级代谢产物,常伴随在红曲色素中产生,在大部分红曲发酵产品中,桔霉素含量最高达欧盟标准的几十到几百倍。出于食品安全的考虑,桔霉素已被欧洲各国列为必检毒素之一。

[0004] 目前,检测桔霉素(CIT)的方法有胶体金试纸条检测法、酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)、紫外分光光度法、高效毛细管电泳法和高效液相色谱法等。这些方法都涉及到桔霉素抗原和桔霉素抗体两大核心免疫试剂。由于桔霉素(CIT)属于小分子物质(分子量为250Da),只具有抗原性,而无免疫原性。因此,必需将桔霉素(CIT)与载体蛋白偶联后制成完全抗原再通过免疫动物来制备抗体。

[0005] ELISA法采用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶连接,然后通过酶与底物产生颜色反应,用于定量测定。ELISA法由于具有比较高的检测灵敏度、特异性,对样品要求较低,处理简单,适合于对批量样品进行检测以及推广应用,具有广大的实用价值空间,近年来被广泛应用于各种真菌毒素的临床检测当中。

[0006] 目前国内尚无商品化的桔霉素ELISA检测试剂盒,仅有能用于定性检测的桔霉素检测试纸(CN1603823A),其主要原因是无法制备高亲和力和高特异性的抗桔霉素抗体,因此通过制备高亲和力和高特异性的抗桔霉素抗体来制备桔霉素ELISA检测试剂盒具有重要的意义。

发明内容

[0007] 本发明提供的桔霉素单抗的制备方法具有制备条件温和、操作简单和过程可控的优点,提供的桔霉素ELISA检测试剂盒具有特异性高、灵敏度高和稳定性能好的优点。

[0008] 一种抗桔霉素单抗的制备方法,该制备方法包括:

[0009] 合成桔霉素完全抗原,其中,所述桔霉素完全抗原根据如下方法制备:桔霉素先与偶联试剂2,2-二氯-5-(2-苯乙基)-4-(三甲基硅)-3-咪唑酮和N-羟基琥珀酰亚胺反应,然后与大分子载体进行偶联,偶联反应后透析直至透析液中蛋白含量测定值与空白透析液相

同,去除没有结合的桔霉素,透析物浓缩后得到桔霉素完全抗原;以所述桔霉素完全抗原作为免疫抗原对动物进行免疫,再应用杂交瘤细胞技术进行细胞融合和筛选,获得稳定分泌抗桔霉素单抗的杂交瘤细胞株,通过制备腹水和纯化,获得抗桔霉素单抗。

[0010] 在本发明提供的抗桔霉素单抗的制备方法一较佳实施例中,合成桔霉素完全抗原的具体方法为:

[0011] (1) 桔霉素的活化:将13~17mg桔霉素与13~17mg的2,2-二氯-5-2-苯乙基-4-三甲基硅-3-咪唑酮以及5~7mg N-羟基琥珀酰亚胺溶于0.2ml的无水四氢呋喃中缓慢滴加10.1mol/L的HCl100 μ l,室温下,摇匀后再离心取上清液,用无水四氢呋喃洗涤;

[0012] (2) 桔霉素-载体偶联反应:待四氢呋喃吹干后,将残留物溶于0.5ml二甲基甲酰胺,然后将此溶液滴加于0.5ml 5%的大分子载体溶液中并将溶液pH值调节至8.0,37 $^{\circ}$ C恒温箱中缓慢摇匀60min;

[0013] (3) 分离纯化:偶联反应后,置于0.1mol/L NaHCO₃溶液中透析,先透析1小时,再按前3次换液时间间隔为1.5小时,中间三次换液时间间隔为4.5小时,后三次换液时间为18小时的方式进行透析,使透析液中蛋白含量测定值与空白透析液相同,然后去除没有结合的桔霉素,透析物浓缩后得到桔霉素完全抗原,冻干-20 $^{\circ}$ C保存。

[0014] 在本发明提供的抗桔霉素单抗的制备方法一较佳实施例中,所述大分子载体为牛血清蛋白、卵清蛋白、匙孔贝血蓝蛋白或牛甲状腺球蛋白。

[0015] 在本发明提供的抗桔霉素单抗的制备方法一较佳实施例中,以所述桔霉素完全抗原作为免疫抗原对动物进行免疫,再应用杂交瘤细胞技术进行细胞融合和筛选,获得稳定分泌抗桔霉素单抗的杂交瘤细胞株,通过制备腹水和纯化,获得抗桔霉素单抗,具体包括如下步骤:

[0016] 步骤一、动物免疫:以所述桔霉素完全抗原作为免疫抗原以及弗氏佐剂对BALB/c小鼠进行多次免疫直至其效价检测达到1:10W;

[0017] 步骤二、细胞融合:取免疫小鼠的脾脏细胞,以体积比为50%的PEG1450作融合剂,按10:1细胞数量与小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0进行融合,融合后的细胞先用HAT培养基作选择性培养,7d后改用HT培养基培养,14天后改用DMEM培养基培养;

[0018] 步骤三、阳性杂交瘤细胞株的亚克隆:采用桔霉素完全抗原包被的96孔酶标板检测融合后的细胞,所述96孔酶标板的包被浓度为200ng/ml,融合后的细胞加入量为100 μ l/孔,当检测到阳性细胞再进行亚克隆直到达到100%的阳性率;

[0019] 步骤四、抗体的制备和纯化

[0020] (1) 抗体的制备:提前7-10天,对每只致敏的BALB/c小鼠腹腔注射0.5ml的液体石蜡,然后将步骤三已建的阳性杂交瘤细胞接种至已注射液体石蜡的BALB/c小鼠,7~10天后采集腹水并离心得上清液;

[0021] (2) 抗体的纯化:将所述上清液按1:10的比例稀释于PBS溶液中,并以0.5ml/min的速度逐量从柱上方添加于经PBS平衡的层析柱中,然后用PBS溶液洗杂,再用pH 2.9的甘氨酸缓冲液洗脱,获得纯化的抗桔霉素单抗。

[0022] 在本发明提供的抗桔霉素单抗的制备方法一较佳实施例中,步骤一的动物免疫方法具体为:首次免疫,50 μ g/只的免疫抗原加等体积完全弗氏佐剂,皮下注射;2周后,第二次免疫,用50 μ g/只的免疫抗原加等体积不完全弗氏佐剂,皮下注射;2周后,第三次免疫,用25

$\mu\text{g}/\text{只}$ 的免疫抗原加等体积不完全福氏佐剂,皮下注射;7-10天后,ELISA检测免疫鼠血清效价,其效价达到1:10W即可准备做细胞融合;细胞融合前3天,再用 $25\mu\text{g}$ 抗原腹腔注射以加强免疫。

[0023] 本发明同时提供一种桔霉素ELISA检测试剂盒,包括采用上文所述的抗桔霉素单抗的制备方法制备的抗桔霉素单抗。

[0024] 在本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒一较佳实施例中,还包括桔霉素完全抗原包被的96孔酶标板、桔霉素标准品、酶标记的羊抗鼠抗体、包被液、稀释液、封闭液、显色液及终止液;

[0025] 其中,

[0026] 所述桔霉素标准品的浓度分别为0、5、10、20、40和 $80\text{ng}/\text{ml}$;

[0027] 所述酶标记的羊抗鼠抗体为用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体;

[0028] 所述包被液为 $0.01\text{mol}/\text{L}$ pH9.6的碳酸盐缓冲液,用于将96孔酶标板包被的抗原稀释至 $200\text{ng}/\text{ml}$;

[0029] 所述稀释液为 $0.01\text{mol}/\text{L}$ pH7.4的PBS溶液;

[0030] 所述封闭液为含5%小牛血清的PBS/T20;

[0031] 所述显色液为TMB单组分显色液;

[0032] 所述终止液为 $2\text{mol}/\text{L}$ 的 H_2SO_4 。

[0033] 在本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒一较佳实施例中,所述96孔酶标板包被的桔霉素完全抗原为桔霉素卵清蛋白完全抗原。

[0034] 在本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒一较佳实施例中,还包括洗涤液,所述洗涤液为PBS/T20。

[0035] 本发明同时提供一种采用上文所述桔霉素ELISA检测试剂盒检测桔霉素含量的方法,包括

[0036] 用包被液将桔霉素完全抗原包被的96孔酶标板中的桔霉素完全抗原稀释至 $200\text{ng}/\text{ml}$, 4°C 过夜;

[0037] 弃去孔内溶液,用洗涤液洗涤三次,每次3min,

[0038] 用封闭液封闭, 37°C 孵育1h,再用洗涤液冲洗96孔酶标板;

[0039] 在所述96孔酶标板中分别加入桔霉素标准品和待测样品 $50\mu\text{l}/\text{孔}$,再加入桔霉素纯品 $50\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C 孵育1h,弃去孔内溶液,用洗涤液洗涤;

[0040] 在所述96孔酶标板中加入用稀释液1:2000倍稀释的酶标记的羊抗鼠抗体 $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C 孵育30min,洗板3次;

[0041] 加入显色液, 37°C 避光反应15min后,加入终止液,读取桔霉素标准品和待测样品波长为 450nm 时的OD值;

[0042] 数据处理:无桔霉素抑制时的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 的数值为 B_0 ,其他桔霉素标准品浓度对应的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 数值作为B,以 B/B_0 为纵坐标,以每孔所述添加桔霉素标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算出待测样品 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 的数值B与 B_0 的比值,根据标准曲线查出相应的浓度,即为待测样品的桔霉素浓度。

[0043] 相较于现有技术,本发明提供的桔霉素单抗的制备方法、桔霉素ELISA检测试剂盒及其检测方法,具有以下有益效果:

[0044] 一、本发明提供的桔霉素单抗的制备方法采用具有聚合作用的2,2-二氯-5-(2-苯乙基)-4-(三甲基硅)-3-呋喃酮作为偶联试剂,可以使交联物结构紧凑,且该物质对桔霉素的羧基等官能团具有保护作用;同时该方法不会在桔霉素和大分子载体间形成间隔臂,排除了桥抗体的产生,保持了抗体的特异性,且该方法具有制备条件温和、操作简单、过程可控等优点;

[0045] 二、本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒具有样本处理简单、检测结果稳定、准确度高、灵敏度高、检测费用低和样本覆盖面广等优点。

附图说明

[0046] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图,其中:

[0047] 图1为本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒检测桔霉素含量的方法步骤流程图;

[0048] 图2为本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒的标准曲线1;

[0049] 图3为本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒的标准曲线2。

具体实施方式

[0050] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0051] 本发明提供一种抗桔霉素单抗的制备方法,所述抗桔霉素单抗采用2,2-二氯-5-(2-苯乙基)-4-(三甲基硅)-3-呋喃酮(DPTF)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)作为偶联剂,牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、匙孔贝血蓝蛋白(KLH)或牛甲状腺球蛋白(BTG)作为大分子载体制备人工完全抗原,再应用杂交瘤细胞技术进行细胞融合和筛选,获得稳定分泌抗桔霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,通过制备腹水和纯化,获得抗桔霉素的单体隆抗体。本发明同时提供一种应用上述方法制备的抗桔霉素的单体隆抗体的桔霉素ELISA检测试剂盒,该ELISA检测试剂盒的灵敏度达到5ng/ml。

[0052] 主要试剂和耗材

[0053] 试剂桔霉素购自ACROSS公司;

[0054] 2,2-二氯-5-(2-苯乙基)-4-(三甲基硅)-3-呋喃酮、N-羟基琥珀酰亚胺、无水四氢呋喃、二甲基甲酰胺、牛血清蛋白(Bovine serum albumin,BSA)、卵清蛋白(OVA)、匙孔贝血蓝蛋白(KLH)、牛甲状腺球蛋白(BTG)购自SIGMA公司;

[0055] 动物6周龄,雌性,BALB/c小鼠,购自协和医科大学实验动物中心;

[0056] SP2/0骨髓瘤细胞购自中国医学科学院基础医学研究所;

[0057] HiTrap Protein G亲和层析柱购自GE;

[0058] 弗氏佐剂、50%聚乙二醇(PEG)1450溶液、HAT、HT以及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗小鼠IgG、四甲基联苯胺(TMB)均为Sigma产品;

[0059] DMEM培养基为Gibco产品;

[0060] 新生牛血清购于杭州四季清生物工程有限公司。

[0061] 实施例一、桔霉素-牛血清白蛋白(CIT-BSA)完全抗原的制备

[0062] (1) 桔霉素的活化:13.2mg桔霉素(分子式 $C_{13}H_{13}O_5$,分子量250.3Da)与14.1mg的2,2-二氯-5-(2-苯乙基)-4-(三甲基硅)-3-咪唑酮(分子式 $C_{15}H_{18}SiCl_2O_2$,分子量335)以及5.8mg的N-羟基琥珀酰亚胺(分子式 $C_4H_5NO_3$,分子量115)溶于0.2ml的无水四氢咪唑中缓慢滴加0.1mol/L的HCl100 μ l,30 $^{\circ}$ C,以150r/min的摇匀速度摇匀60min,再以4000r/min的离心速度离心15min,取上清液于试管中,用无水四氢咪唑洗涤2~3次,合并上清液于试管中并进行干燥,干燥方式为:在25 $^{\circ}$ C的温度下,用风速为0.5m³/s的氮气进行吹干。

[0063] (2) 桔霉素-载体偶联反应:待四氢咪唑吹干后,将残留物溶于0.5ml二甲基甲酰胺中后,然后将此溶液以点滴加入的方式滴加到0.5ml 5%的BSA溶液中并调节pH值至8.0,在37 $^{\circ}$ C恒温箱中缓慢摇匀60min。

[0064] (3) 分离纯化:偶联反应后,用0.1mol/L NaHCO₃溶液进行透析,先透析1小时,再按前3次换液时间间隔为1.5小时,中间三次换液时间间隔为4.5小时,后三次换液时间为18小时的方式进行透析,使透析液中蛋白含量测定值与空白透析液相同,去除没有结合的桔霉素,透析物浓缩后即通过偶联反应制得的桔霉素-牛血清白蛋白(CIT-BSA)完全抗原,冻干-20 $^{\circ}$ C保存。

[0065] 实施例二、桔霉素-卵清蛋白(CIT-OVA)完全抗原的制备

[0066] 桔霉素卵清蛋白(CIT-OVA)完全抗原的制备与实施例一制备桔霉素-牛血清白蛋白(CIT-BSA)完全抗原的方法基本相同,其区别在于在桔霉素-载体偶联反应步骤中,加入的不是牛血清白蛋白(BSA)溶液,而是加入的卵清蛋白(OVA)溶液。

[0067] 实施例三、桔霉素-匙孔贝血蓝蛋白(CIT-KLH)完全抗原的制备

[0068] 桔霉素-匙孔贝血蓝蛋白(CIT-KLH)完全抗原的制备与实施例一制备桔霉素-牛血清白蛋白(CIT-BSA)完全抗原的方法基本相同,其区别在于在桔霉素-载体偶联反应步骤中,加入的不是牛血清白蛋白(BSA)溶液,而是加入的匙孔贝血蓝蛋白(KLH)溶液。

[0069] 实施例四、桔霉素-牛甲状腺球蛋白(CIT-BTG)完全抗原的制备

[0070] 桔霉素-牛甲状腺球蛋白(CIT-BTG)完全抗原的制备与实施例一制备桔霉素-牛血清白蛋白(CIT-BSA)完全抗原的方法基本相同,其区别在于在桔霉素-载体偶联反应步骤中,加入的不是牛血清白蛋白(BSA)溶液,而是加入的牛甲状腺球蛋白(BTG)溶液。

[0071] 实施例五、抗桔霉素单抗的制备

[0072] 步骤一、动物免疫

[0073] 选用6周龄、雌性BALB/c小鼠,利用实施例一制备的桔霉素-牛血清白蛋白(CIT-BSA)完全抗原作为免疫抗原以及弗氏佐剂对小鼠进行免疫,直至其效价检测达到1:10W左右。

[0074] 具体地,首次免疫,50 μ g/只的免疫抗原加等体积完全弗氏佐剂,采用皮下注射;2周后,第二次免疫,用50 μ g/只的免疫抗原加等体积不完全弗氏佐剂,皮下注射,测得其效价为1:30000;2周后,第三次免疫,用25 μ g/只的免疫抗原加等体积不完全福氏佐剂,皮下注射,测得其效价为1:100000;7-10天后,ELISA检测免疫鼠血清效价,效价达到1:10W即可准备做细胞融合。如果效价比较低,则2周后继续进行第四次免疫,免疫剂量及方式同第三次

免疫一致,直至效价检测达到1:10W左右。细胞融合前3天,再用25 μ g抗原腹腔注射以加强免疫。

[0075] 步骤二、细胞融合

[0076] 取步骤一免疫小鼠的脾脏细胞,以50% (体积) PEG1450作融合剂,按10:1细胞数量与小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0进行常规融合,具体的,脾脏细胞数为 1×10^8 个,小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0数量为 1×10^7 个;融合后的细胞先用HAT培养基作选择性培养,7d后改用HT培养基培养,14d后改用DMEM培养基培养。

[0077] 步骤三、阳性杂交瘤细胞株的亚克隆

[0078] 用实施例二制备的桔霉素卵清蛋白(CIT-OVA)完全抗原包被96孔酶标板。所述步骤所得的桔霉素卵清蛋白(CIT-OVA)完全抗原的包被浓度为200ng/ml;向96孔酶标板的孔中加入按步骤二融合后的细胞100 μ l/孔进行检测,当检测到阳性细胞再进行亚克隆,经多次亚克隆到100%的阳性率,得到17株阳性杂交瘤细胞株,所产生的抗体可以与包被抗原酶反应呈阳性。

[0079] 步骤四、抗体的制备和纯化

[0080] (1) 抗体的制备:提前7-10天,对每只致敏的BALB/c小鼠腹腔注射0.5ml的液体石蜡,然后将步骤三已建的17株杂交瘤细胞接种至已注射液体石蜡的BALB/c小鼠,接种的杂交瘤细胞数为 1×10^6 ,7~10d后采集腹水并离心得上清;

[0081] (2) 抗体的纯化:将所述上清按1:10的比例稀释于0.01mol/L pH7.4的PBS溶液中,并以0.5ml/min的速度逐量从柱上方添加于经PBS平衡的层析柱中,然后用PBS溶液洗杂,再用pH 2.9的甘氨酸缓冲液洗脱;所述层析柱为HiTrap Protein G亲和层析柱;

[0082] (3) ELISA检测方法检测抗体:

[0083] 得到纯化抗体后,采用ELISA检测方法检测抗体效价,17株抗体的效价在1:6W~1:20W之间,通过竞争法ELISA法检测17株抗体,其中只有5株有反应梯度,有一株达到了最灵敏度5ng/ml,完全可以超越国内试剂盒的标准。

[0084] 实施例六、桔霉素ELISA检测试剂盒

[0085] 所述桔霉素ELISA检测试剂盒包括桔霉素完全抗原包被的96孔酶标板、抗桔霉素单抗、桔霉素标准品、酶标记的羊抗鼠抗体、包被液、洗涤液、封闭液、稀释液、显色液及终止液;

[0086] 其中,

[0087] 96孔酶标板包被的桔霉素完全抗原可为桔霉素-牛血清白蛋白(CIT-BSA)完全抗原、桔霉素卵清蛋白(CIT-OVA)完全抗原、桔霉素-匙孔贝血蓝蛋白(CIT-KLH)完全抗原或桔霉素-牛甲状腺球蛋白(CIT-BTG)完全抗原,本试剂盒选用的是桔霉素卵清蛋白(CIT-OVA)完全抗原;

[0088] 所述抗桔霉素单抗为实施例五制备的抗桔霉素单抗;

[0089] 所述桔霉素标准品的浓度分别为0、5、10、20、40和80ng/ml;

[0090] 所述酶标记的羊抗鼠抗体为用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠抗体;

[0091] 所述包被液为0.01mol/L pH9.6碳酸盐缓冲液,用于将96孔酶标板包被的抗原稀释至200ng/ml;

[0092] 所述洗涤液为PBS/T20;

[0093] 所述封闭液为含5%小牛血清的PBS/T20;

[0094] 所述稀释液为0.01mol/L pH7.4的PBS溶液;

[0095] 所述显色液为TMB单组分显色液;

[0096] 所述终止液为2mol/L的H₂SO₄。

[0097] 请参阅图1,为本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒检测桔霉素含量的方法步骤流程图。

[0098] 实施例七、桔霉素ELISA检测试剂盒检测桔霉素含量的方法

[0099] 步骤S1、用包被液将桔霉素卵清蛋白(C1T-OVA)完全抗原包被的96孔酶标板中的完全抗原稀释至200ng/ml,4℃过夜;

[0100] 步骤S2、弃去孔内溶液,用洗涤液洗涤三次,每次3min,

[0101] 步骤S3、用封闭液封闭,37℃孵育1h,再用洗涤液冲洗96孔酶标板;

[0102] 步骤S4、在所述96孔酶标板中分别加入桔霉素标准品和待测样品50μl/孔,再加入桔霉素纯品50u1/孔,37℃孵育1h,弃去孔内溶液,用洗涤液洗涤,所述桔霉素标准品的浓度分别为0、5、10、20、40和80ng/ml;

[0103] 步骤S5、在所述96孔酶标板中加入用稀释液1:2000倍稀释的酶标记的羊抗鼠抗体100μl/孔,37℃孵育30min,洗板3次;

[0104] 步骤S6、加入显色液,37℃避光反应15min后,加入终止液,读取桔霉素标准品和待测样品波长为450nm时的吸光度(OD)值;

[0105] 步骤S7、数据处理:无桔霉素抑制(桔霉素浓度=0)时的OD_{450nm}的数值为B₀,其他桔霉素标准品浓度对应的OD_{450nm}数值作为B,以相对吸光度值B/B₀为纵坐标,以每孔所述添加桔霉素标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算出待测样品OD_{450nm}的数值B与B₀的比值,根据标准曲线查出相应的浓度,即为待测样品的桔霉素浓度。

[0106] 实施例八、桔霉素ELISA检测试剂盒的准确性评价

[0107] 1) 标准曲线的建立

[0108]

标准品浓度 (ng/ml)	OD 值	OD 值平均值	y1	y2
0	2.025	1.9875	100	-
	1.95			
5	1.712	1.706	85.8	1.80
	1.7			
10	1.35	1.36	68.4	0.77
	1.37			
20	0.95	0.9425	47.4	-0.11
	0.935			
40	0.55	0.535	26.9	-1.0

		0.52			
[0109]	80	0.25	0.24	12.1	-2.0
		0.23			

[0110] 其中,标准品浓度为0ng/ml时,其对应的OD平均值为 B_0 ,其它标准品浓度对应的OD平均值为 B ,通过以下公式计算相对吸光度值 y_1 的数值, $y_1 = B/B_0$;以 y_1 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标绘制标准曲线1,具体详见图2。

[0111] 根据标准品的浓度与OD值的关系通过Logit-log直线回归作出标准曲线2;

[0112] y_2 的计算方法如下:

[0113] 命 $p = B/B_0$, $y_2 = \ln(p/1-p)$ 。

[0114] 以 y_2 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标绘制标准曲线2,具体详见图3。

[0115] 根据标准曲线1和标准曲线2可得:相关系数 $R^2 = 0.9993$; $IC_{50} = 18.4$;抑制率 = 85.9%。

[0116] 2) 将已知含量样品用本发明实施例6中制备的桔霉素ELISA检测试剂盒按实施例7的检测方法进行检测,计算回收率(回收率 = 添加量/检测量 $\times 100\%$),结果如下表所示:

[0117]

样本添加序号	样品添加浓度 (ng/ml)	测得的浓度 (ng/ml)	回收率 (%)
1	0/腐乳样本 1	0	--
2	10/腐乳样本 1	8.2	82%
3	30/腐乳样本 1	33.5	112%
4	70/腐乳样本 1	65.0	92.85%
5	0/腐乳样本 2	0.0	--
6	30/腐乳样本 2	36.2	120%

[0118] 本发明提供的桔霉素单抗的制备方法、桔霉素ELISA检测试剂盒及其检测方法,具有以下有益效果:

[0119] 一、本发明提供的桔霉素单抗的制备方法采用具有聚合作用的2,2-二氯-5-2-苯乙基-4-三甲基硅-3-咪喃酮作为偶联试剂,可以使交联物结构紧凑,且该物质对桔霉素的羧基等官能团具有保护作用;同时该方法不会在桔霉素和大分子载体间形成间隔臂,排除了桥抗体的产生,保持了抗体的特异性,且该方法具有制备条件温和、操作简单、过程可控等优点;

[0120] 二、本发明提供的桔霉素ELISA检测试剂盒具有样本处理简单、检测结果稳定、准确度高、灵敏度高、检测费用低和样本覆盖面广等优点。

[0121] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

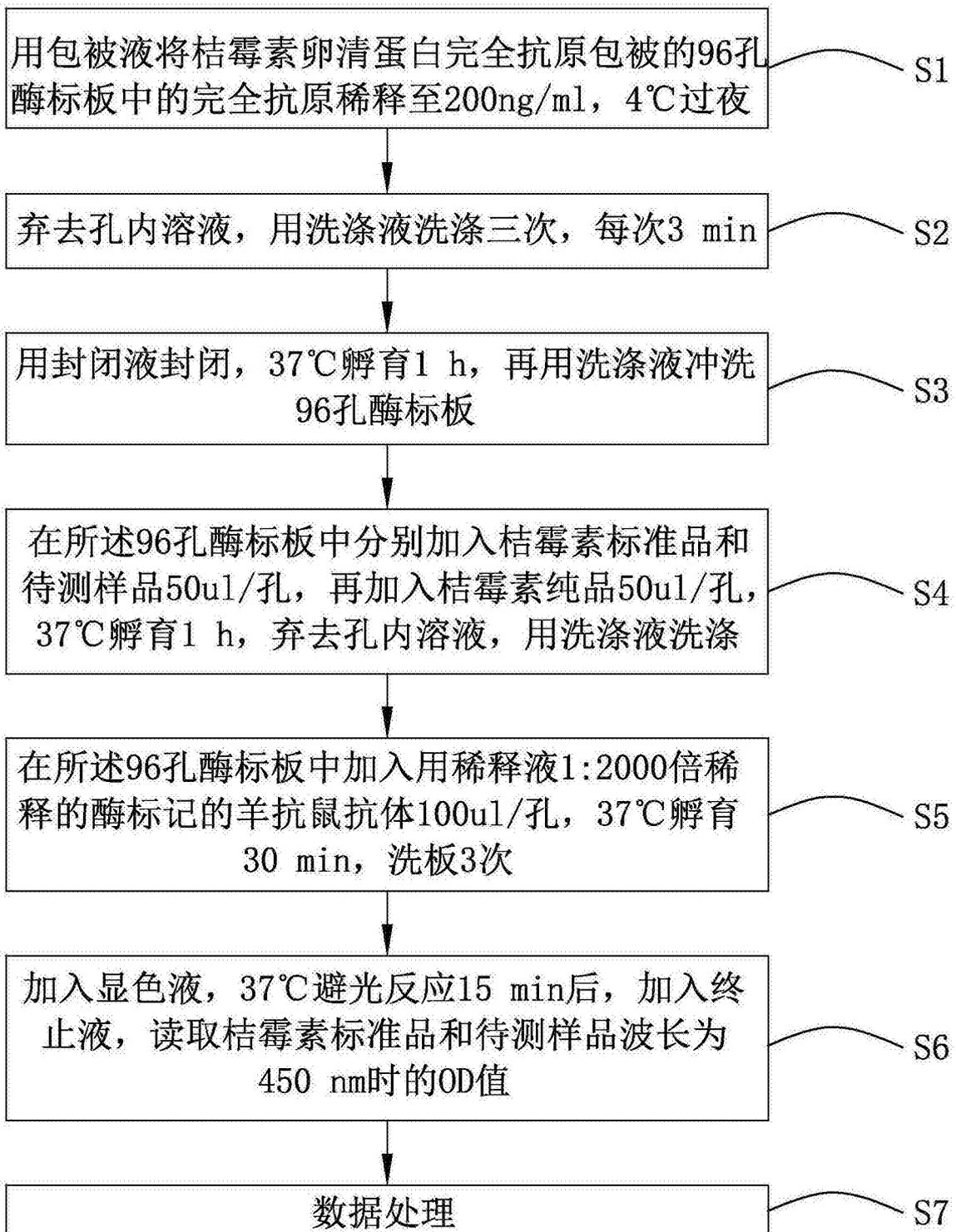


图1

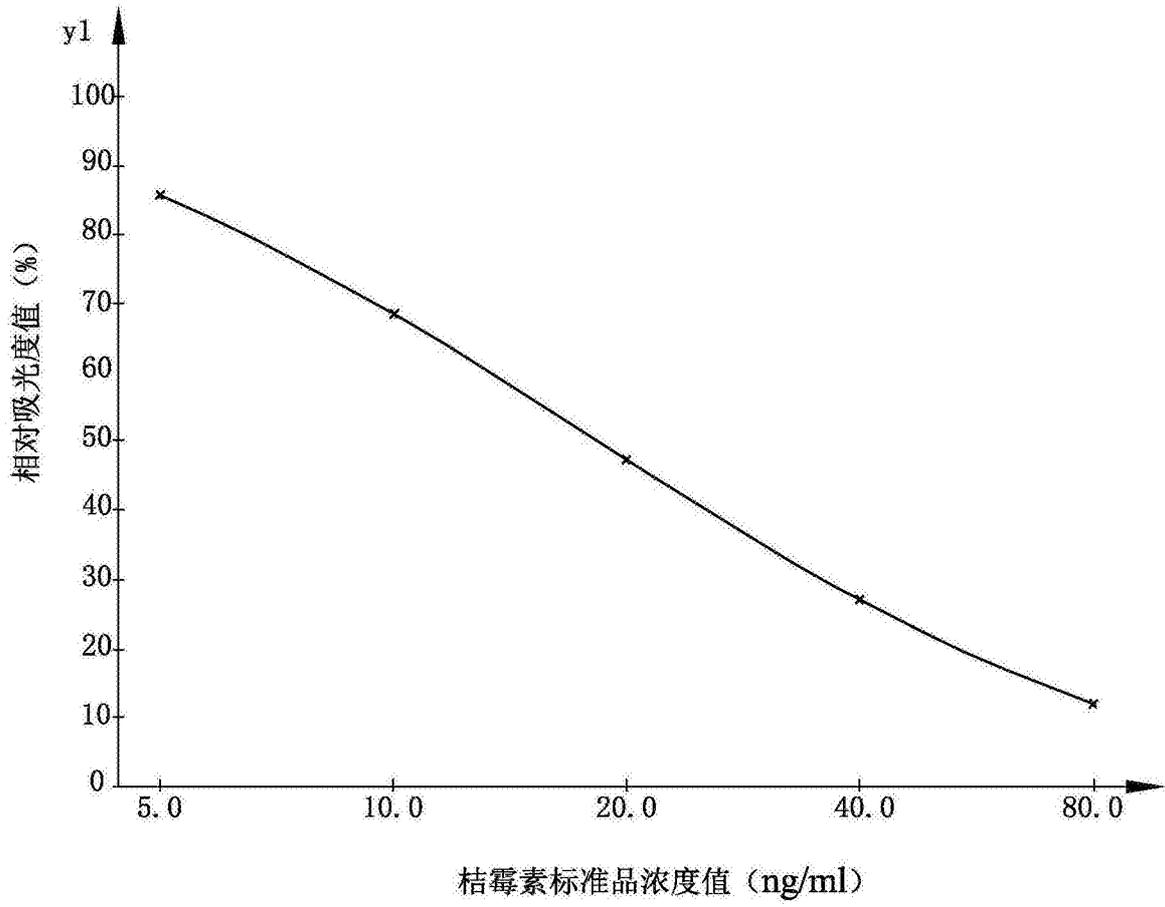


图2

logit-log直线

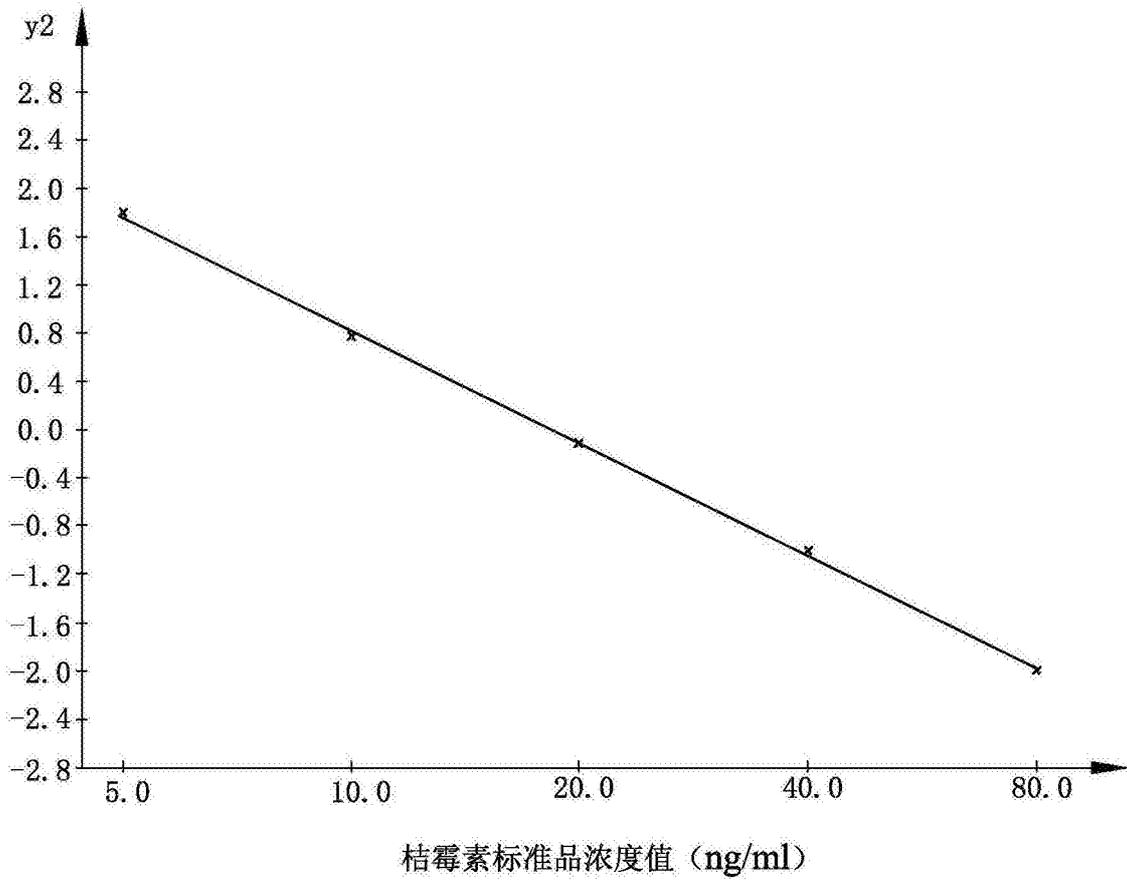


图3

专利名称(译)	抗桔霉素单抗的制备方法、桔霉素试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN106749653A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611116168.4	申请日	2016-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	普菲特益斯生物科技北京有限公司		
申请(专利权)人(译)	普菲特益斯生物科技(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	普菲特益斯生物科技(北京)有限公司		
[标]发明人	王琳 闫俊杰 裴世春 刘文婷 高建伟		
发明人	王琳 闫俊杰 裴世春 刘文婷 高建伟		
IPC分类号	C07K16/14 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/14 G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种抗桔霉素单抗的制备方法、桔霉素ELISA检测试剂盒及其检测方法。抗桔霉素单抗的制备首先合成桔霉素完全抗原，然后以所述桔霉素完全抗原作为免疫抗原对动物进行免疫，再应用杂交瘤细胞技术进行细胞融合和筛选，获得稳定分泌抗桔霉素单抗的杂交瘤细胞株，通过制备腹水和纯化，获得抗桔霉素单抗。本发明提供抗桔霉素单抗的制备方法具有制备条件温和、操作简单、过程可控等优点，提供的桔霉素ELISA检测试剂盒灵敏度为5ng/ml，具有广泛的应用前景。

