



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103399153 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201310315287. 2

G01N 33/577(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 24

G01N 33/531(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

审查员 周露露

CGMCC No. 7954 2013. 07. 12

(73) 专利权人 泰州康正生物技术有限公司

地址 225300 江苏省泰州市药城大道 1 号
G02 栋

(72) 发明人 唐宏 王晓艳 杨利 张浩明
崔迎利

(74) 专利代理机构 南京汇盛专利商标事务所
(普通合伙) 32238

代理人 袁静

(51) Int. Cl.

C12N 5/20(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

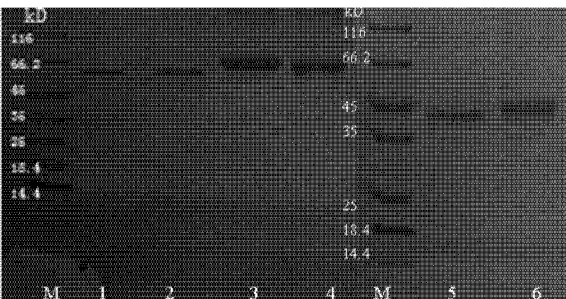
权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一种杂交瘤细胞株、其产生的抗无色孔雀石绿单克隆抗体及应用

(57) 摘要

本发明提供一种杂交瘤细胞株及其产生的抗无色孔雀石绿单克隆抗体,属于免疫化学技术领域。杂交瘤细胞株 2E9 的保藏号为 CGMCC No. 7954。所述杂交瘤细胞株 2E9 分泌的抗无色孔雀石绿单克隆抗体。本发明还提供所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体在制备检测无色孔雀石绿的酶联免疫试剂盒和胶体金试纸条方面的应用。本发明杂交瘤细胞株 2E9,能够高效、稳定分泌抗无色孔雀石绿单克隆抗体,并且该单克隆抗体的效价高、特异性好、敏感性高,与无色孔雀石绿的结构类似物交叉反应率低,可用于制备检测无色孔雀石绿的酶联免疫试剂盒、胶体金试纸条。



1. 一种产生抗无色孔雀石绿单克隆抗体的杂交瘤细胞株 2E9, 其保藏号为 CGMCC No. 7954。
2. 一种由权利要求 1 所述杂交瘤细胞株 2E9 分泌的抗无色孔雀石绿单克隆抗体。
3. 权利要求 2 所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体在制备检测无色孔雀石绿的酶联免疫试剂盒中的应用。
4. 权利要求 2 所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体在制备检测无色孔雀石绿的胶体金试纸条方面的应用。
5. 一种检测无色孔雀石绿的酶联免疫试剂盒, 其特征在于含有权利要求 2 所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体。
6. 用于检测无色孔雀石绿的胶体金试纸条, 其特征在于含有权利要求 2 所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体。

一种杂交瘤细胞株、其产生的抗无色孔雀石绿单克隆抗体 及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学技术领域,具体涉及一种杂交瘤细胞株、抗无色孔雀石绿单克隆抗体。

背景技术

[0002] 无色孔雀石绿(leucomalachite green, LMG)是孔雀石绿(malachite green, MG)在生物体内的主要代谢残留物,对人类有致癌危险。

[0003] 孔雀石绿又称苯胺绿、维多利亚绿和中国绿,是一种带有金属光泽的绿色结晶体,属三苯甲烷类染料。孔雀石绿作为抗真菌剂,抗外生性寄生虫药和消毒剂被广泛使用于鱼药养殖业中。

[0004] 近年来发现孔雀石绿特别是其代谢物在水产体内有明显的蓄积残留现象,残留时间也较长。由于其化学官能团三苯甲烷是一种致癌物质,所以国外一些发达国家,如欧盟、美国已宣布禁止其在经济鱼类(观赏鱼除外)养殖过程中使用。我国在农业行业标准《NY5071-2002 无公害食品鱼药使用准则》中明确规定所有可食组织中禁用孔雀石绿。国内外检测孔雀石绿主要采用色谱技术(HPLC)检测,虽然灵敏、定量准确,但大批量检测时速度慢,成本相对较高。以竞争性酶联免疫法(ELISA)为代表的快速筛选法事免疫学主流技术,快速、成本低、可以大批量检测。但是现有技术中,缺乏效价高、特异性强的抗无色孔雀石绿的单克隆抗体。

[0005] 发明说明

[0006] 本发明的目的是针对现有技术存在的缺点,提供一种产生抗无色孔雀石绿单克隆抗体的杂交瘤细胞株 2E9,该杂交瘤细胞株能够稳定、高效的分泌抗无色孔雀石绿单克隆抗体。

[0007] 本发明的另一目的是提供所述杂交瘤细胞株产生的抗无色孔雀石绿单克隆抗体,该单克隆抗体对无色孔雀石绿的亲和力和灵敏度高,特异性高,效价高,与无色孔雀石绿的结构类似物无交叉反应。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0009] 一种产生抗无色孔雀石绿单克隆抗体的杂交瘤细胞株 2E9,其保藏号为 CGMCC No. 7954。

[0010] 所述杂交瘤细胞株 2E9 分泌的抗无色孔雀石绿单克隆抗体。

[0011] 所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体在制备检测无色孔雀石绿的酶联免疫试剂盒中的应用。

[0012] 所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体在制备检测无色孔雀石绿的胶体金试纸条方面的应用。

[0013] 一种检测无色孔雀石绿的酶联免疫试剂盒,含有所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体。

[0014] 用于检测无色孔雀石绿的胶体金试纸条,含有所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体。

[0015] 本发明将无色孔雀石绿的结构进行了改造,得到了半抗原,再与载体蛋白偶联合成了免疫原和包被原,该方法简单,免疫效果好。通过筛选,得到了杂交瘤细胞株 2E9,能够高效、稳定分泌抗无色孔雀石绿单克隆抗体,并且该单克隆抗体的效价高、特异性好、敏感性高,与无色孔雀石绿的结构类似物无交叉反应。该抗无色孔雀石绿单克隆抗体能够大量生产,可用于制备检测无色孔雀石绿的酶联免疫分析法试剂盒、胶体金试纸条等免疫学检测试剂,达到快速且灵敏地检测水产品,饲料等食品中的无色孔雀石绿药物残留的效果。

附图说明

[0016] 图 1 各合成抗原的 SDS-PAGE 电泳图,其中 M:蛋白分子量标准;1:BSA;2:HSA;3:LMG-BSA;4:LMG-HSA;5:OVA;6:LMG-OVA。

[0017] 图 2 纯化后抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的 SDS-PAGE 电泳图,泳道 M:蛋白质分子量 Markers;泳道 1:抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9'。

[0018] 图 3 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 亚型鉴定图。

[0019] 图 4 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 与无色孔雀石绿标准品反应的标准曲线图。

[0020] 保藏信息:

[0021] 参据的生物材料(株):2E9;

[0022] 分类命名:抗无色孔雀石绿单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0023] 保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所;

[0024] 保藏号为 CGMCC No. 7954,保藏日期为:2013 年 7 月 12 日。

具体实施方式

[0025] 试剂与材料准备:对醛基苯甲酸(中国生物制品研究所);N,N-二甲苯胺(中国生物制品研究所);无水氯化锌(国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);甲醇(国药集团化学试剂有限公司);牛血清白蛋白(BSA)(Amresco,0332);卵清白蛋白(OVA)(Sigma,A5503);人血清白蛋白(HSA)(Sigma,A9511);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)(Sigma,E6383);弗氏完全佐剂(Sigma,F5881);弗氏不完全佐剂(Sigma,F5506);四甲基联苯胺(TMB)(Amresco,0759);HAT(Sigma,H0262)和 HT(Sigma,H0137);氯化钠(Amresco,0241);氯化钾(Amresco,0395);磷酸二氢钾(Sigma,P9791);磷酸氢二钠(Sigma,71639);羊抗鼠 IgG-HRP(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG);Jackson,115-035-044);二甲基亚砜(DMSO)(Appllichem,0231);聚乙二醇 4000(PEG4000)(Sigma,P7306);DMEM 培养基(Gibco,11995);胎牛血清(FBS,Gibco,C2027050)。

[0026] 实验动物与细胞:Balb/c 小鼠(6-8 周龄,雌性),购自扬州大学动物中心;SP2/0(小鼠骨髓瘤细胞)由中科院生物物理研究所感染与免疫研究中心提供。

[0027] 实施例 1 免疫原和包被原的制备

[0028] 1. 免疫原 LMG-BSA 的制备:

[0029] (1) 将 900mg (6mmol) 对醛基苯甲酸,2.4mL (19mmol) N,N-二甲苯胺,2.4g (18mmol) 无水氯化锌加入 120mL 无水乙醇中,加热至 80 度,回流反应 24h。

[0030] (2) 将反应液冷却至室温,加入 60ml 甲醇,并用浓度为 1M 的盐酸调节 pH 至 5,静置 24h,析出晶体。

[0031] (3) 过滤取析出的晶体,在真空条件下采用 KOH 干燥。

[0032] (4) 取步骤(3)干燥后的晶体 6.8mg,溶解于 200 μ l、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲溶液(pH7.4)中,加入 3.5mg EDC,10℃下搅拌反应 30 分钟后,滴加入 4mL、浓度为 5mg/mL 的 BSA 溶液中,4℃下搅拌反应 4h。

[0033] (5) 步骤(4)反应后获得的混合物采用浓度为 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液透析 5 次,每次 1h,取保留液即得无色孔雀石绿与 BSA 的偶联物 LMG-BSA。LMG-BSA 作为后续试验中的免疫原。

[0034] 2. 免疫原 LMG-HSA 和包被原 LMG-OVA 的制备

[0035] 参照免疫原 LMG-BSA 的制备方法,分别制备无色孔雀石绿与 OVA 的偶联物 LMG-OVA 和无色孔雀石绿与 HSA 的偶联物 LMG-HSA,仅将步骤(4)中 BSA 溶液换成 OVA 溶液或 HSA 溶液。LMG-HSA 作为后续试验中的免疫原,LMG-OVA 作为后续试验中的包被原。

[0036] 3. 免疫原和包被原的检测

[0037] 对 BSA, HSA, OVA 蛋白标准品及免疫原 LMG-BSA, LMG-HSA 和包被原 LMG-OVA 进行 SDS-PAGE 检测。结果如图 1 所示,可以看出偶联物的分子量明显高于未偶联载体蛋白的分子量,可见无色孔雀石绿与载体蛋白偶联成功。

[0038] 利用紫外分光光度计测得 LMG-BSA 溶液的蛋白浓度为 10.4mg/mL, LMG-HSA 溶液的蛋白浓度为 12.4mg/mL, LMG-OVA 溶液的蛋白浓度为 3.6mg/mL。

[0039] 实施例 2 杂交瘤细胞株的筛选及抗无色孔雀石绿单克隆抗体的制备

[0040] 一. 动物免疫:

[0041] 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,免疫原是 LMG-BSA 或 LMG-HSA,每次免疫剂量 50 μ g/只小鼠,免疫两次,每次剂量相同。

[0042] 二. 筛选免疫小鼠血清:

[0043] 1. 以上免疫鼠在最后一次免疫后 8 天,用间接 ELISA 法测血清抗体效价,间接竞争 ELISA 方法检测灵敏度。选取血清效价高、灵敏度高的鼠进行加强免疫,免疫三天后取小鼠脾脏进行下一步实验。

[0044] 2. 间接 ELISA 法和间接竞争 ELISA 法:

[0045] 包被缓冲液:0.05mol/L、pH9.6 的碳酸盐缓冲液(Na_2CO_3 - NaHCO_3)。

[0046] 缓冲液 A:0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲液。

[0047] 洗涤液:含 1% (体积浓度)吐温的缓冲液 A。

[0048] BSA 封闭液:含有 1% (质量百分浓度)BSA 的缓冲液 A。

[0049] TMB 显色液:含 0.1% (质量百分浓度)TMB、0.2% (质量百分浓度) H_2O_2 的 0.01M 柠檬酸盐缓冲液(柠檬酸- Na_2HPO_4), pH5.0。

[0050] 终止液:浓度为 2M 的 H_2SO_4 水溶液。

[0051] 采用间接 ELISA 法和棋盘法确定包被原 LMG-OVA 的最佳稀释度:

[0052] (1) 包被:用包被缓冲液将包被原 LMG-OVA (3.6mg/ml)稀释成一系列浓度加入酶标板中,100 μ L/孔,4℃包被过夜;

[0053] (2) 洗涤:洗涤液以 200 μ L/孔的标准,用洗板机洗板 3 次,并在吸水纸上将酶标

板拍干；

[0054] (3) 封闭：每孔加入 200 μ L 的 BSA 封闭液，37℃ 孵育 1h；

[0055] (4) 洗涤同上；

[0056] (5) 一抗：加入系列浓度的抗体，100 μ L/ 孔，37℃ 孵育 1h；

[0057] (6) 洗涤同上；

[0058] (7) 酶标二抗：加入羊抗鼠 IgG-HRP，100 μ L/ 孔，37℃ 孵育 1h，洗涤同上；

[0059] (8) 显色：每孔加入 100 μ L 的 TMB 显色液，20-25℃ 显色 10min；

[0060] (9) 终止反应：加入终止液终止反应，50 μ L/ 孔，并于酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值。

[0061] 判定标准：根据样品 OD₄₅₀/ 阴性对照 OD₄₅₀ $\geq$ 2.1，且样品 OD₄₅₀ 值在 1.0 左右，确定包被原最佳包被稀释度。实验结果表明包被原 LMG-OVA 溶液 (3.6mg/ml) 的最佳稀释度为 16000。在效价检测中，间接 ELISA 法中的包被原 LMG-OVA 溶液 (3.6mg/ml) 取最佳稀释度 1:16000。

[0062] 间接竞争 ELISA 法的步骤如下：

[0063] (1) 包被：用包被缓冲液将包被原 LMG-OVA (3.6mg/ml) 按照最佳包被稀释度稀释，加入酶标板中，100 μ L/ 孔，4℃ 包被过夜；

[0064] (2) 洗涤：用洗板机和洗涤液洗板 3 次，并在吸水纸上将酶标板拍干；

[0065] (3) 封闭：每孔加入 200 μ L BSA 封闭液，37℃ 孵育 1h；

[0066] (4) 洗涤同上；

[0067] (5) 加样：先向相邻两孔酶标板孔内加入稀释液（配方同洗涤液），50 μ L/ 孔，与此两孔相邻的孔内加入适当浓度的无色孔雀石绿标准品进行竞争反应，50 μ L/ 孔，最后往所有孔内加入稀释好的抗体，50 μ L/ 孔，酶标板轻微震荡混匀，37℃ 孵育 1h；

[0068] (6) 洗涤同上；

[0069] (7) 酶标二抗：加入 1:10000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP，100 μ L/ 孔，37℃ 孵育 1h，洗涤同上；

[0070] (8) 显色：每孔加入 100 μ L 的 TMB 显色液，20-25℃ 显色 10min；

[0071] (9) 终止反应：加入终止液终止反应，50 μ L/ 孔，并于酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值。

[0072] 判定标准：首先，从肉眼可以看出，加无色孔雀石绿抑制孔与未加无色孔雀石绿抑制孔颜色的区别，若抑制孔颜色较浅或者无色，说明有针对无色孔雀石绿特异性抗体产生，反之则无特异性抗体产生。其次，根据 OD 值也可以判定，加无色孔雀石绿抑制孔 OD 值小于未加无色孔雀石绿抑制孔 OD 值，说明有针对无色孔雀石绿特异性抗体产生。

[0073] 抗体灵敏度可根据竞争抑制率的大小来判定。

[0074] 竞争抑制率 = $1 - B/B_0$ (B 为加无色孔雀石绿抑制孔的 OD 值，B₀ 为未加无色孔雀石绿抑制孔的 OD 值)。

[0075] 三．制备杂交瘤细胞：

[0076] 取上述免疫 Balb/c 小鼠的脾细胞，以 50% 的聚乙二醇 (PEG) 4000 作融合剂，将免疫鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 5:1 的比例进行细胞融合。采用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法检测融合后存活的细胞培养上清的抗体效价及灵敏度，对阳性克隆进行亚克隆，检测有单克隆生长孔的细胞培养上清，阳性率达到 100%，得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 2E9。

[0077] 四. 采集、纯化和鉴定单克隆抗体

[0078] 1. 采集、纯化单克隆抗体

[0079] 将杂交瘤细胞株 2E9 的冻存管取出,立即于 37℃ 水浴中融化冻存物,之后将融化物移入培养皿内扩大培养,培养基为含 10%FBS 的 DMEM 培养基。其中,冻存管内冻存的是处于对数生长期的能够稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 2E9。

[0080] 用灭菌石蜡免疫 Balb/c 小鼠,7 天后分别对每组小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 2E9,注射剂量为 10^6 个 / 只,8 天后采集腹水,用液相层析法纯化,得到抗无色孔雀石绿单克隆抗体,命名为 2E9'。

[0081] 用液相层析法纯化抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的具体步骤:

[0082] (1) 取 1 倍体积的腹水,加入 4 倍体积的 NaAC-HAc 缓冲液(0.06M、pH4.0);

[0083] (2) 每 mL 腹水加入 35% (v/v) 的辛酸,室温于摇床上振荡 30min,4℃ 静置 3h;

[0084] (3) 高速离心 30min,取上清,用 NaOH 调 pH 至 7.4;

[0085] (4) 向上清中加入等体积的饱和硫酸铵溶液饱和,4℃ 静置 1h,高速离心 10min;

[0086] (5) 弃上清,用 PBS 缓冲液(浓度 0.01M、pH7.4)悬浮沉淀;

[0087] (6) 将步骤(5)悬浮液转入透析袋内透析 12h,取保留液;

[0088] (7) 用 Hitrap Q hp 层析柱对步骤(6)所述保留液做进一步纯化,所用上样缓冲液为 20mM、pH8.6 的 Tris-HCl,洗脱缓冲液为上样缓冲液中添加有终浓度为 1M 的 NaCl,1ml/管收集单抗。

[0089] 2. 将纯化后的抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 进行如下检测

[0090] (1) 采用购自 Pierce 公司的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒(Mouse Monoclonal Antibody Subtype Identification Kit)对本发明所得到的抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 进行亚型鉴定,其亚型鉴定结果表明,抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 为 IgG1 亚型,结果见表 1 和图 3。

[0091] 表 1 抗体亚型鉴定结果

[0092]

抗体亚型	抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' OD ₄₅₀
IgA	0.214
IgG3	0.176
IgM	0.198
IgG1	1.497
IgG2a	0.213
IgG2b	0.985
κ 链	0.237

λ 链	0.245
blank control	0.204
negative	0.201

[0093] (2) 纯度测定

[0094] 纯化后的抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 进行 SDS-PAGE 电泳检测其纯度, 结果如图 2 所示, 从图 2 可以看出抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的纯度为 96%。利用紫外分光光度计测得纯化后单克隆抗体的浓度为 2.3mg/mL, 低温保存。

[0095] (3) 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 效价的测定

[0096] 以 0.5 μ g/mL 的包被原 LMG-OVA 包被 ELISA 板, 将纯化的抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' (2.3mg/mL) 进行 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000 稀释, 以 100 μ L/孔加入包被封闭后的酶标板孔内, 37℃ 反应 60min 后洗板, 加入羊抗鼠 IgG-HRP 反应, 最后用 TMB 显色, 结果见表 2。

[0097] 表 2 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的效价测定结果

[0098]	抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 稀释度	OD ₄₅₀
	1:2000	1.441
	1:4000	1.403
	1:8000	1.214
	1:16000	0.960
	1:32000	0.633
	1:64000	0.457
	1:128000	0.201
	阴性对照	0.056
	空白对照	0.050

[0099] 阳性判定标准: 样品检测孔 OD₄₅₀/ 阴性对照孔 OD₄₅₀ $\geq$ 2.1; 抗体检测结果: 当抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 浓度为 1mg/mL 时, 效价可达 1.28×10^5 。

[0100] (4) 检测抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的特异性:

[0101] 采用实施例 2 中间接竞争 ELISA 法来检测抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的特异性。LMG-OVA 溶液包被的 ELISA 板内, 加入抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9', 同时加入不同浓度的无色孔雀石绿标准品, 加入的无色孔雀石绿浓度分别为 4.05g/mL、1.35ng/mL、0.45ng/mL、0.15ng/mL、0.05ng/mL、0ng/mL, 重复测定 3 次, 结果见表 3。以无色孔雀石绿浓度为横坐标, 以 B/B₀ 值 (B 为加无色孔雀石绿抑制孔的 OD 值, B₀ 为未加无色孔雀石绿抑制孔的 OD 值) 为纵坐标绘制标准曲线, 结果见图 4。根据试验数据计算, 得到抗无色孔雀石绿

单克隆抗体 2E9' 的 IC₅₀ 值为 0.35ng/mL。

[0102] 从图 4 标准曲线的 OD 值和 IC₅₀ 值可以看出,抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 在 LMG 浓度为 0.05ng/mL 时,仍具有很好的抑制效果,这说明本发明中抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 具有很高的特异性和敏感性。

[0103] 表 3 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的抑制效果

[0104]	无色孔雀石绿标准 品浓度 (ng/mL)	OD ₄₅₀		
	0	1.403	1.421	1.421
	0.05	1.170	1.173	1.179
	0.15	0.963	0.965	0.968
	0.45	0.604	0.614	0.603
	1.35	0.339	0.343	0.341
	4.05	0.142	0.139	0.145
	空白	0.050	0.053	0.054

[0105] (5) 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 亲和力的测定

[0106] 根据 Gosling 介绍的 ELISA 方法进行抗体亲和力的测定,其亲和力的大小用亲和

常数 K_a 的大小来表示,公式为: $\frac{V}{\alpha} = K_a(1 - V)$

[0107] 亲和常数的单位为浓度的倒数,即:克分子浓度 (L / mol),其值越高表示抗原抗体结合的紧密程度越高。其检测过程如下:

[0108] 第一步、确定抗原、抗体最佳作用浓度:

[0109] 1、将 LMG-OVA 溶液 (3.6mg/mL) 分别进行 2000,4000,8000,16000,32000,64000 倍稀释后各包被 4 列孔,100 μL / 孔,37℃ 条件下孵育 2h,洗涤、封闭;

[0110] 2、将抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' (2.3mg/mL) 进行 2000,4000,8000,16000,32000,64000 倍稀释,每个稀释度按照 100 μL / 孔依次加入各包被浓度的孔中,但是仅加入各包被浓度中的 2 列,另外 2 列同浓度包被的孔不加,室温温育 1h;

[0111] 3、将同一包被浓度中加入抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的两列孔内的液体,分别移入同一包被浓度中没有加入抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的两列中,室温温育 1h;

[0112] 4、将液体被移走的两列孔洗涤后加酶标二抗,室温作用 1h 后洗板显色,最后测定 OD 值 A₁;

[0113] 5、将移入液体的两列孔,室温温育 1h,洗涤加酶标二抗,再室温作用 1h 后洗板显色,最后测定 OD 值 A₂。

[0114] 6、根据公式 $f = \frac{A_1(c) - A_2(c)}{A_1(c)}$

[0115] 计算 f 值,选取所有 f 值都小于 10% 的抗原,抗体稀释度,根据 OD 值大小确定 LMG-OVA 溶液 (3.6mg/mL) 最佳稀释度为 16000 倍,抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' (2.3mg/mL) 最佳稀释度为 16000 倍。

[0116] 第二步、测定亲和力:

[0117] 1、配制 6 个一系列浓度的无色孔雀石绿标准品;

[0118] 2、在加有最佳稀释度抗体的 EP 管内加入等量系列浓度无色孔雀石绿标准品,共 7 管,最后一管为不加无色孔雀石绿标准品的对照管,室温下过夜;

[0119] 3、将 LMG-OVA 溶液 (3.6mg/mL) 稀释 16000 倍后进行包被,室温下过夜,洗板,封闭;

[0120] 4、将第 2 步的反应产物取 100 μ L 加入以上封闭的板孔内,室温下进行间接竞争 ELISA,最后测定加入无色孔雀石绿孔的 OD 值 A_n ,和不加入无色孔雀石绿孔的 OD 值 A_0 ;

[0121] 5、根据 Scatchard 公式 $\frac{V}{\alpha} = K_a(1 - V)$ 计算其斜率值,

[0122] 其中, α 为游离抗原的浓度(无色孔雀石绿标准品浓度), V 为结合抗体位点与总抗体位点的比值(该比值等于 $(A_0 - A_n)/A_0$),所得亲和力的大小即亲和常数 K_a ,为斜率值的负数。通过计算得到的结果是抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的亲和常数为 7.04×10^8 。

[0123] 实施例 3 药物交叉反应试验

[0124] 按实施例 2 中建立的间接竞争 ELISA 方法进行药物交叉反应试验。抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 分别与孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫进行竞争试验。将这些标准品稀释成不同浓度进行间接竞争 ELISA 实验,绘制抑制曲线,计算竞争物的 IC_{50} 值和交叉反应率,其最高交叉反应率为 1%,说明本发明所制备的抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 只与无色孔雀石绿反应,具有较高的特异性,具体结果见表 4。

[0125] 表 4 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 与其他药物的交叉反应

[0126]

物质名称	交叉反应率
无色孔雀石绿	100%
孔雀石绿	1%
结晶紫	0.3%
无色结晶紫	0.9%

[0127] 实施例 4 含有抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 的酶联免疫试剂盒及应用

[0128] 1. 试剂盒的组成

[0129] (1) 包被缓冲液: 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸盐缓冲液 (Na_2CO_3 - $NaHCO_3$)

[0130] (2) 缓冲液 A: 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲液。

[0131] (3) 洗涤液: 含 1% (体积浓度) 吐温的缓冲液 A。

[0132] (4) BSA 封闭液: 含有 1% (质量百分浓度) BSA 的缓冲液 A。

[0133] (5) TMB 显色液: 含 0.1% (质量百分浓度) TMB、0.2% (质量百分浓度) H_2O_2 的 0.01M

柠檬酸盐缓冲液(柠檬酸- Na_2HPO_4), pH5.0。

[0134] (6) 终止液:浓度为 2M 的 H_2SO_4 水溶液。

[0135] (7) LMG-OVA 溶液:按照实施例 1 方法制备,蛋白浓度为 3.6mg/ml。

[0136] (8) 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9':蛋白浓度为 1mg/mL。

[0137] (9) 羊抗鼠 IgG-HRP (Jackson, 115-035-044)。

[0138] (10) 无色孔雀石绿标准品:无色孔雀石绿浓度分别为 4.05ng/mL、1.35ng/mL、0.45ng/mL、0.15ng/mL、0.05ng/mL、0ng/mL。

[0139] (11) 酶标板。

[0140] 2. 采用含有单克隆抗体 2E9' 的酶联免疫试剂盒检测虾样品

[0141] (1) 标准曲线制作

[0142] (I) 用包被缓冲液将 LMG-OVA 溶液以 16000 倍稀释后加入酶标板中, 100 μL /孔, 4℃包被过夜;

[0143] (II) 洗涤:甩净包被液,用洗板机采用洗涤液洗板 3 次,在吸水纸上拍干;

[0144] (III) 封闭:每孔加入 200 μL 的 BSA 封闭液, 37℃孵育 30min;

[0145] (IV) 洗涤同上;

[0146] (V) 向酶标板中分别加入浓度为 4.05ng/mL、1.35ng/mL、0.45ng/mL、0.15ng/mL、0.05ng/mL、0ng/mL 的无色孔雀石绿标准品, 50 μL /孔。

[0147] (VI) 加入一抗:用缓冲液 A 将抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 稀释 16000 倍后, 加入 50 μL /孔, 37℃孵育 30min;

[0148] (VII) 洗涤同上;

[0149] (VIII) 酶标二抗:羊抗鼠 IgG-HRP 用缓冲液 A 稀释 10000 倍, 加入 100 μL /孔, 37℃孵育 1h, 洗涤同上;

[0150] (IX) 显色:每孔加入 100 μL 的 TMB 显色液, 20-25℃显色 10min;

[0151] (X) 终止反应:加入终止液终止反应, 50 μL /孔, 并于酶标仪上读取 OD_{450} 值。

[0152] (XI) 以无色孔雀石绿浓度为横坐标, 以不同浓度药物的 OD_{450} 与零浓度无色孔雀石绿的 OD_{450} 的比值 (B/B_0) 为纵坐标绘制标曲, 如图 4。

[0153] (2) 样品检测

[0154] 样品前处理:取 10g 虾样本采用均质机均质后, 加入 20ml 浓度为 70% 的甲醇溶液; 强力震荡 3 分钟; 用 whatmanN01 滤纸过滤, 取 25 μL 滤液, 加入 25 μL 样品稀释液 (0.01M、pH7.4 的 PBS) 混匀后, 待检。

[0155] 间接竞争 ELISA 检测:参照标准曲线制作, 仅将步骤 (V) 中的无色孔雀石绿标准品换成处理好的虾样本, 50 μL /孔。计算检测样本的 OD_{450} 与零浓度无色孔雀石绿的 OD_{450} 的比值 (B/B_0), 将 B/B_0 值代入标准曲线中, 从标准曲线上读出样本所对应的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本无色孔雀石绿的实际浓度。

[0156] 通过此方法测得虾样中无色孔雀石绿最低残留为 0.1ppb。

[0157] 实施例 5 抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 在检测无色孔雀石绿残留的胶体金试纸条中的应用

[0158] 本实施例是本发明中的抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 在检测无色孔雀石绿残留的胶体金试纸条中的应用举例, 主要是应用于检测鱼、虾中无色孔雀石绿残留。

[0159] 反应原理采用竞争法对小分子药物无色孔雀石绿进行半定量检测,样品中存在的无色孔雀石绿分子在沿试纸条上移过程中先与金颗粒标记的抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9' 结合,固定在 NC 膜上的包被原 LMG-OVA 与无色孔雀石绿同时竞争结合抗无色孔雀石绿单克隆抗体 2E9', T 线的显色强弱与样品中残留无色孔雀石绿的含量成反比,若样品中无色孔雀石绿残留,则金标抗体全部与包被原反应,试纸条的 T 线显色最深,即 C、T 线均显色深浅一致,此时表示阴性;当 C 线显色,T 线不显色或显色弱于 C 线时则表示为阳性;若 C 线不显色,不管 T 线显色或不显色都表示试纸条失效。

[0160] (1) 具体操作步骤如下:

[0161] 1、样品前处理:同实施例 4 样本前处理

[0162] 2、将试纸条放于干净平整的台面上,用滴管吸取待测样品溶液,滴加 1~2 滴于样品垫上;

[0163] 3、等待紫红色条带的出现,静置反应 5-10 分钟时读取测试结果,10 分钟以后判定无效。

[0164] (2) 试纸条检测限的确定:

[0165] 取试纸条平放于试验台上,分别用含不同浓度的无色孔雀石绿的 PBS 溶液作为待测样品液,滴加于样品垫上,反应后 5-10min 判定结果,来确定试纸条的检测限;对不同样本的检测限与样本处理方法过程中的稀释倍数有关系,用测定值乘以不同的稀释倍数即为各种样品的检测限。

[0166] 通过此方法测得虾样中无色孔雀石绿最低残留为 3ppb。

[0167] 除上述实施例外,本发明还可以有其他实施方式。凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案,均落在本发明要求的保护范围。

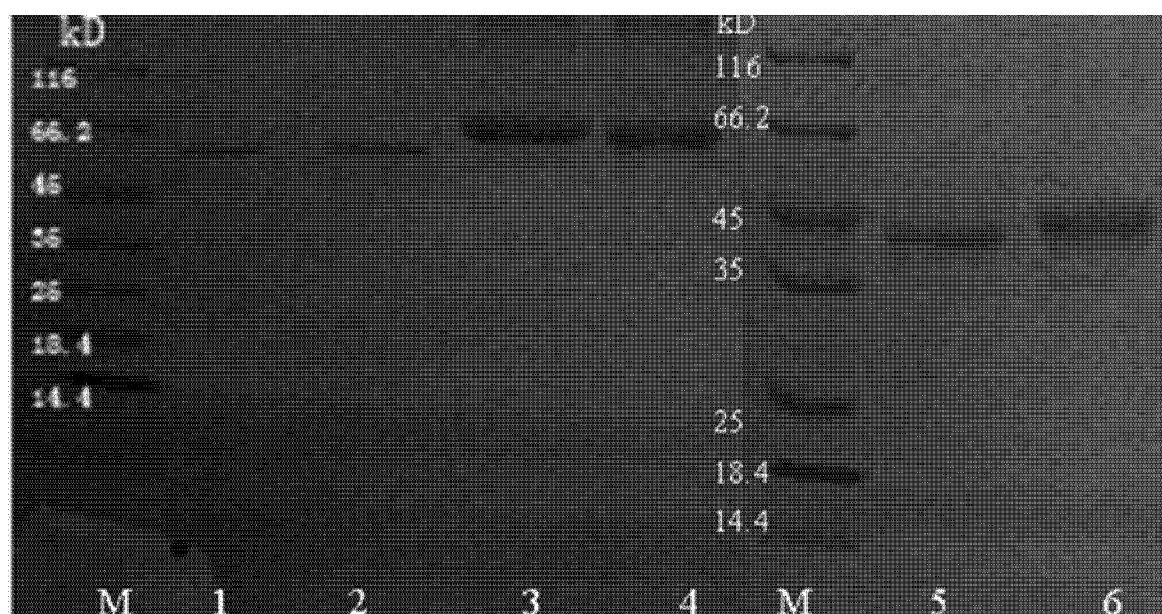


图 1

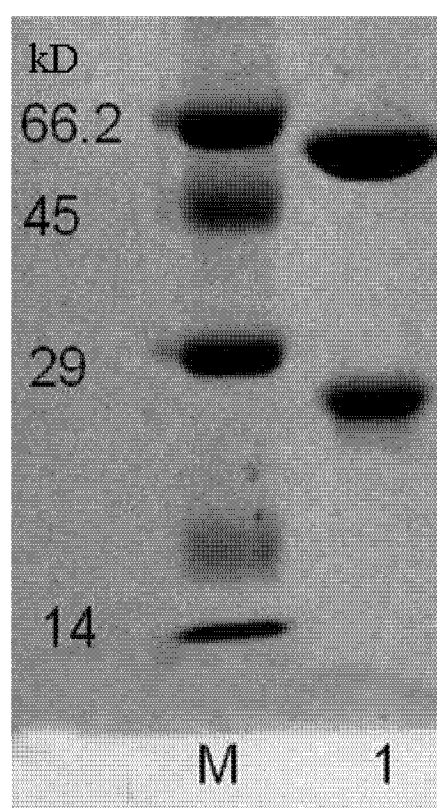


图 2

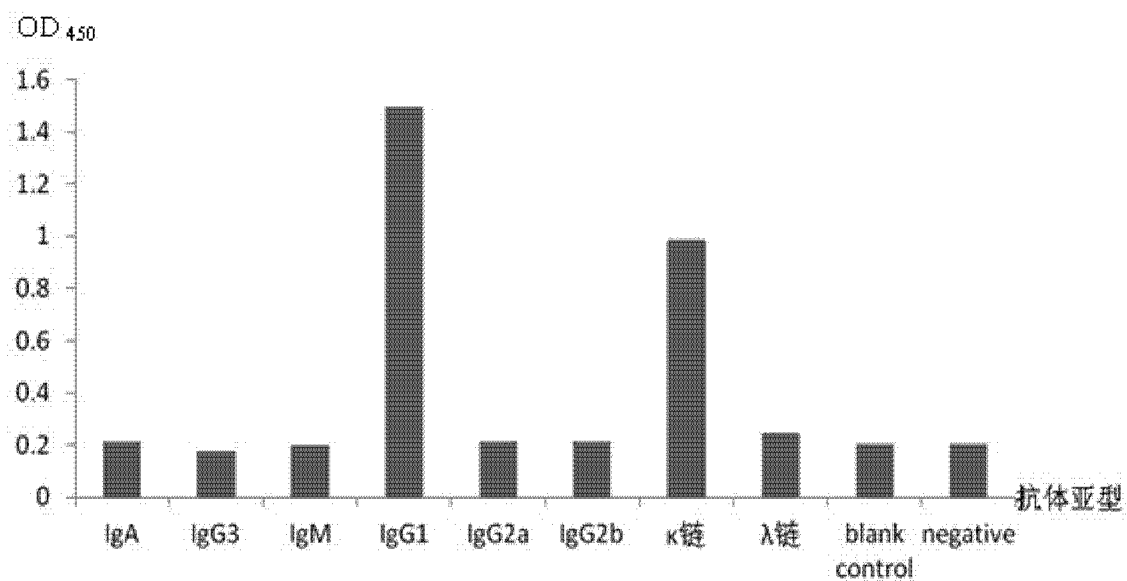


图 3

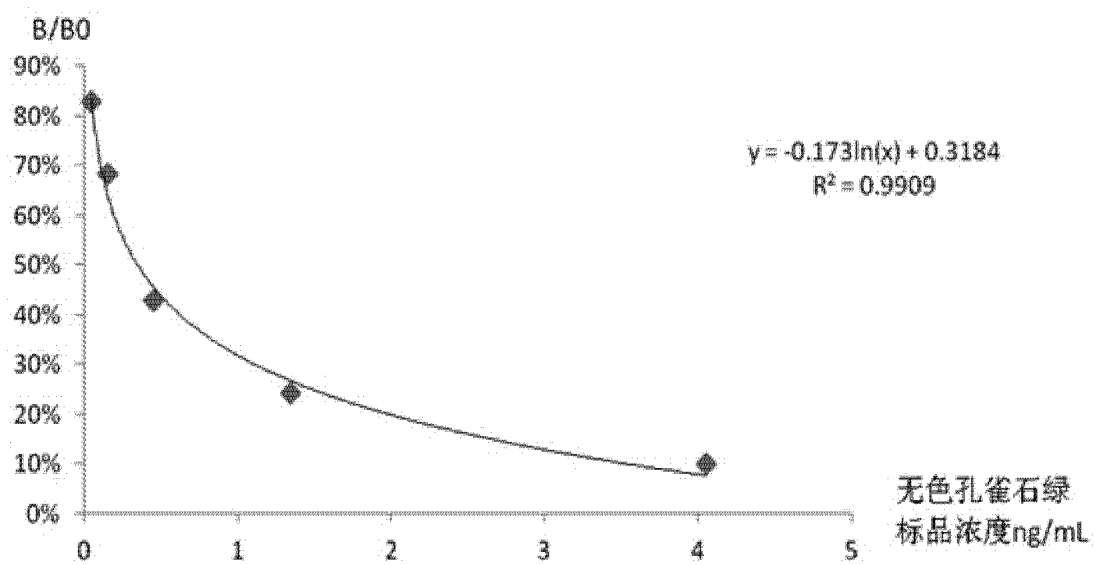


图 4

专利名称(译)	一种杂交瘤细胞株、其产生的抗无色孔雀石绿单克隆抗体及应用		
公开(公告)号	CN103399153B	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201310315287.2	申请日	2013-07-24
[标]发明人	唐宏 王晓艳 杨利 张浩明 崔迎利		
发明人	唐宏 王晓艳 杨利 张浩明 崔迎利		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/00 G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	袁静		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN103399153A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种杂交瘤细胞株及其产生的抗无色孔雀石绿单克隆抗体，属于免疫化学技术领域。杂交瘤细胞株2E9的保藏号为CGMCC No. 7954。所述杂交瘤细胞株2E9分泌的抗无色孔雀石绿单克隆抗体。本发明还提供所述抗无色孔雀石绿单克隆抗体在制备检测无色孔雀石绿的酶联免疫试剂盒和胶体金试纸条方面中的应用。本发明杂交瘤细胞株2E9，能够高效、稳定分泌抗无色孔雀石绿单克隆抗体，并且该单克隆抗体的效价高、特异性好、敏感性高，与无色孔雀石绿的结构类似物交叉反应率低，可用于制备检测无色孔雀石绿的酶联免疫试剂盒、胶体金试纸条。

