

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510089868.4

[51] Int. Cl.
C12N 5/18 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年2月15日

[11] 公开号 CN 1733910A

[22] 申请日 2005.8.9

[21] 申请号 200510089868.4

[71] 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区东北
农业大学动物医学院

[72] 发明人 李 术 徐世文 熊永忠

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限
责任公司
代理人 孙皓晨

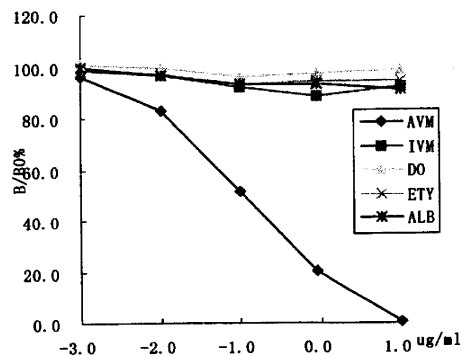
权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 4 页

[54] 发明名称

抗阿维菌素单克隆抗体、分泌它的杂交瘤细胞系及制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种新的抗阿维菌素单克隆抗体、分泌它的杂交瘤细胞系及制备方法。本发明首先合成人工抗原 AVM - BSA，再用其免疫 BALB/c 小鼠，五次免疫后，取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合，以 PEG1450 为融合剂，筛选出阳性融合细胞，用有限稀释法经过 5 次亚克隆，得到特异性分泌 AVM 抗体的杂交瘤细胞系 2F2，该杂交瘤细胞系的微生物保藏号是：CGMCC No. 1413。用上述杂交瘤细胞注射 BALB/c 小鼠腹腔，收集腹水，离心，收集上清液，纯化、鉴定即得本发明抗阿维菌素单克隆抗体。本发明单克隆抗体与伊维菌素、多拉菌素、红霉素、白霉素的交叉反应率均小于 0.01%，说明本方面所获得的 AVM 的单克隆抗体是特异针对 AVM 的抗体，可应用于阿维菌素残留的检测。



1.一株分泌抗阿维菌素单克隆抗体的杂交瘤细胞系，命名为 2F₂，该杂交瘤细胞系的微生物保藏号是：CGMCC No.1413，保藏地点：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

2.一种制备权利要求 1 的杂交瘤细胞系的方法，包括以下步骤：按现有技术方法合成抗原 AVM-BSA；用合成抗原 AVM-BSA 免疫 BALB/c 小鼠，五次免疫后取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合，筛选出阳性融合细胞；将所筛选出的阳性融合细胞经过 5 次亚克隆，得到稳定的杂交瘤细胞系。

3.按照权利要求 2 的方法，其特征是五次免疫后第 3 天取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 10:1 的比例进行细胞融合。

4.按照权利要求 2 的方法，其特征是细胞融合时以 PEG1450 为细胞融合剂。

5.一种单克隆抗体，其特征是由权利要求 1 的杂交瘤细胞系所分泌的抗阿维菌素单克隆抗体。

6.一种制备权利要求 5 的抗阿维菌素单克隆抗体的方法，包括以下步骤：用权利要求 1 的杂交瘤细胞注射 BALB/c 小鼠腹腔，收集腹水，离心，收集上清液，纯化、鉴定即得。

7.权利要求 1 所述杂交瘤细胞系的应用，将其应用于检测阿维菌素残留量。

8.权利要求 5 所述的抗阿维菌素单克隆抗体的应用，将其应用于检测阿维菌素残留量。

抗阿维菌素单克隆抗体、分泌它的杂交瘤细胞系及制备方法

5 技术领域

本发明涉及一种单克隆抗体，尤其涉及一种抗阿维菌素单克隆抗体、分泌它的杂交瘤细胞系及制备方法，属于免疫学领域。

背景技术

10 阿维菌素 (avermectin,AVM) 是目前兽医临床上使用最多的抗体内外寄生虫药物，也是农业生产上广泛使用的一种农业杀虫剂。自 1970 年美国默沙东实验室 (Merk Sharp and research laboratorise) 的科学家在对来自日本北里研究所的土壤放线菌样品的筛选中首次发现以来，AVMs 在世界范围内被大规模推广使用 (Egerton J.E,et al, 1979)。作为一种抗寄生虫药，AVMs 的化学结构
15 新颖、作用机制独特，由于其特异的驱虫作用和较高的安全性，被视为目前最为优秀的、应用最为广泛的高效低毒兽用抗寄生虫药。在美国和加拿大等国家，伊维菌素 (Ivermectin,IVM) 主要用于防治人和动物的寄生虫病，而 AVM 主要用于农作物的害虫防治。在我国，1993 原北京农业大学微生物工程工业试验基地首次成功研制 AVM，动物医学院药理与毒理教研室和寄生虫教研室
20 对 AVM 的研究表明，AVM 对食品动物、宠物和实验动物的多种体内外寄生虫都有优良的驱虫、杀虫效果。

阿维菌素是由放线菌 (*Streptomyces avermitilis*) 产生的一个十六元大环内酯类抗生素，其上连接有三个主要基团：六氢化苯丙咪喃 (C-2 到 C-8)，二糖基 (C-13) 和螺酮缩醇系统 (C-17 到 C-28) (Mckellar Q A, 1996)。天然
25 AVM 有 8 种主要成分 A1a、A1b、A2a、A2b、B1a、B1b、B2a、B2b，但均不具备其他大环内酯类抗生素的抗菌作用。该类化合物主要是通过触杀和胃毒作用来发挥对害虫毒杀效果。其中 B 组分的药效较 A 组分要强，而 B₁ 组分药效比 B₂ 组分略强。AVMs 是一类脂溶性药物，可溶于许多有机溶剂中，如氯仿、甲醇、丙酮、乙醇、乙酰乙酯、环己烷、二氯甲烷、二甲基亚砷等。

AVMs 在水中的溶解度极低 (0.006-0.009mg/L) (Fisher M H, Mrozik H,1989), 在常温、避光、密封或 pH5-9 的环境下表现稳定。此外, 该类环合物对光敏感, 如用紫外线照射, 则可导致其结构中的 8、9 和 10、11 之间的双键的异构化, 从而失去药物活性。

5 AVMs 为高效、广谱抗寄生虫药物, 在世界上应用越来越广泛, 对动物体内寄生虫 (线虫) 和体外寄生虫 (节肢动物) 有良好的预防和治疗作用。Campbell 和 Mckellar 等研究了本类药物的抗虫谱, 包括牛羊的多种线虫如哥伦比亚结节虫、辐射结节虫及其幼虫、毛圆线虫、血柔属线虫、牛副丝虫、马属动物各类圆虫、副蛔虫、蛲虫、血柔线虫, 猪的食道口线虫、肺丝虫、
10 旋毛虫及其移行蚴、包囊蚴、肾虫、犬的蛔虫、蛲虫、心丝虫、钩虫及各种动物的体外寄生虫如螨虫、蜱、虱、蝇及蝇类蚴等 (Mckellar Q A, Benchaoui H A. 1996. Avermectins and milbermycins [J]. Vet Pharmacol. Ther. 19(3):331~351)。

AVMs 在农业中也应用广泛, 据不完全统计, 该药对柑桔、棉花、茶、蔬菜、药用植物和园林花草上的 10 个目 25 个科的 84 种害虫有不同程度的防治效果, 特别是对防治难而又危害严重的农作物害虫如螨类、小菜蛾、斑潜蝇、棉铃虫具有显著的防治效果, 而且与环境相容性好, 与目前常用农药没有交互抗性, 该药在农业上的应用已越来越受到重视。

由于 AVM 的广谱、高效和使用安全等诸多优点, 使得其在畜牧生产及农业生产中得以广泛使用, 但在极大的促进了农业和畜牧的发展的同时对人类的健康和生态环境也产生影响。AVM 作为农药, 直接喷洒在人类食用的各种作物、蔬菜和果树上, 残余的农药将危及人体健康, 喷洒的农药随大气或直接进入土壤、水中, 对生态环境造成影响; AVM 作为兽药, 有多种给药途径, 但不论通过何种途径, 大部分药物通过粪便以原型排除, 其余的通过尿液和
25 乳汁排出, 排到环境中的药物仍具有药物活性, 对周围的环境造成影响, 环境中的 AVM 对土壤微生物、蚯蚓及水生生物鱼、藻类、蚤类等非靶动物都产生影响, 且进入到环境中的药物可在生物体内富集, 在整个生态系统中, 药物通过不断的生物富集与食物链的传递而逐渐浓缩, 人类处于生物链的最高位, 受害最为严重, 国内外已有关于化学物质在生物体内富集而对人类健康

造成危害的报道，现在国内对兽药的残留问题也十分重视。

5 目前对 AVMs 类药物的残留检测的方法仍主要停留在化学检测手段上。国内李俊锁等建立了牛组织中 AVM 残留测定的间接竞争酶联免疫吸附测定法 (ELISA) (李俊锁, 钱传范. 1997. 牛组织中阿维菌素残留的 ELISA 研究 [J]. 畜牧兽医学报. 28(1):77~83)。检测限达 0.1-0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 适用于大批量样品中 AVM 残留的筛选性分析, 同时, 为了探讨高选择性的净化方法, 李俊锁等将免疫色谱法 (immuno-chromatography, IC) 引入 AVMs 残留分析研究 (李俊锁. 1995. 环境中 Avermectins 残留的分离与检测研究 -ELISA, IAC-HPLC-UV[D]. 北京: 中国农业大学. 10~12), 设计一种新的 AVMs 分析
10 方法, 其工作的意义在于将免疫分析的高选择性与 HPLC 的快速分离与检测有机结合。这种方法首先将抗 AVMs 抗体固定在一惰性填料上, 制成免疫色谱柱, 利用抗 AVMs 抗体选择性地捕获和浓缩样品中的 AVMs, 再用 HPLC-UV 进行测定。虽然检测方法较以往简便, 但是其建立的免疫检测方法中所使用的抗体仍为多克隆抗体, 多克隆抗体的均一性、特异性远不如单克
15 隆抗体, 并且多克隆抗体不具备有象单克隆抗体那样有无限量供应的特点, 所以该免疫检测方法的应用前景大打折扣。所以制备一种特异性强、灵敏度高的抗阿维菌素单克隆抗体, 对于提高阿维菌素残留的检测水平具有重要的现实意义。

20 发明内容

本发明所要解决的技术问题之一是克服现有技术的不足, 提供一株能稳定分泌特异性强、灵敏度高的抗 AVM 单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

本发明所要解决的技术问题是通过以下技术途径来实现的:

一株能稳定分泌特异性强、灵敏度高的抗 AVM 单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 命名为 2F₂, 该杂交瘤细胞系的微生物保藏号是: CGMCC No.1413, 保藏地点: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心; 保藏地址: 北京市海淀区中关村北一条 13 号, 中国科学院微生物研究所; 保藏日期: 2005 年 7 月
25 12 日。

本发明所要解决的技术问题之二是提供一种制备上述杂交瘤细胞系的方法。

一种制备上述稳定分泌特异性强、灵敏度高的抗 AVM 单克隆抗体的杂交瘤细胞系的方法，包括以下步骤：

- 5 按现有技术方法合成人工抗原 AVM-BSA，用合成的人工抗原 AVM-BSA 免疫 BALB/c 小鼠，五次免疫后第三天，取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 10:1 的数量比例进行细胞融合，以 PEG1450 为融合剂，筛选出阳性融合细胞，用有限稀释法经过 5 次亚克隆，得到特异性分泌 AVM 抗体的杂交瘤细胞系。

10 人工抗原 AVM-BSA 的合成方法可选用技术中的任意一种，也可参考实施例所述的制备方法。

本发明所要解决的技术问题之三是提供一种由上述杂交瘤细胞系分泌的抗阿维菌素单克隆抗体。

本发明所要解决的技术问题之四是提供一种制备上述抗阿维菌素单克隆抗体的方法。

- 15 本发明所要解决的技术问题之四是通过以下技术途径来实现的：

用体内诱生腹水法制备单克隆抗体，即用本发明的杂交瘤细胞注射 BALB/c 小鼠腹腔，收集腹水，离心，收集上清液，纯化、鉴定即得。

20 经抗体亚类试剂盒测定，ELISA 检测，染色体计数和 SDS-PAGE 电泳检测，本发明单克隆抗体的免疫球蛋白亚类均为 IgM，上清滴度为 1:800，腹水滴度达 1:6400，分子量为 925KD，染色体数目介于 89-96 之间，稳定性良好。

绘制了本发明单克隆抗体 2F₂ 的标准曲线，绘制曲线在 10~10 000ng 之间线性关系良好，检测限为 10ng，IC₅₀=101ng/ml。

25 交叉反应率是指抗体与结构不同的决定簇发生结合的能力，交叉反应率小，可证明抗体的特异性高，在实际应用中，高特异性的抗体可提高检测方法的灵敏度，从而也就决定一株单克隆抗体真正价值。本发明单克隆抗体与伊维菌素、多拉菌素、红霉素、白霉素的交叉反应率均小于 0.01%。说明本实验所获得的 AVM 的单克隆抗体是特异针对 AVM 的抗体，具有真正的实际应用价值。

AVM 是小分子物质（分子量 873.1），只有反应原性而无免疫原性，因而

必须与大分子物质联结，制成完全抗原，才能刺激动物机体产生反应。AVM结构中不含与载体蛋白直接连接所需要的羧基或氨基。所以本发明中所用到的免疫原（AVM-BSA）和包被原（AVM-OVA）采用 N-羟基琥珀酰亚胺酯法（NHS ester procedure）合成，在 C₄'-OH 上用琥珀酸酐构建间隔分子和活性基团-COCH₂CH₂COOH。从免疫学角度出发，在 C₄'-OH 上酰化制成的半抗原与载体蛋白连接形成免疫原有若干优点。其一，突出了 AVM 的特征结构---大环内酯。根据 Springer 等（1981）用计算机模拟构出的 AVMB1a 的优势构想，大环内酯部分为较刚性的、“粗糙”的近平面结构，而弯曲的双糖链恰似一个“勺柄”。因此，C₄'-OH 端与载体蛋白连接后能最大程度地突出并保持 AVM 最特征结构部分。其二，突出了 AVM 免疫活性最强的非糖部分。免疫理论认为结构上具有相当复杂性的化合物才适于制备高特异性和亲和性的抗体。AVM 的非糖部分（包括大环内酯和双螺酮缩醇系统）共含有 12 个手性碳，且有多个羟基、双链、醚链和内酯结构，免疫活性应该较强，而且，亲酯性的非糖部分对诱导高选择性的抗体有利。其三，根据 AVMs 的构效关系研究成果，AVMs 的非糖部分对保持 AVMs 的抗虫活性最重要。

本发明采用 NHS 法将带有羧基的半抗原与载体蛋白偶联（主要是通过载体蛋白的赖氨酸残基），该法偶联率高，对蛋白质的变性作用最小，各结合物的 UV 吸收光谱呈现载体蛋白与半抗原的吸收特性（吸收峰为 $\lambda=245\text{nm}$ 和 $\lambda=280\text{nm}$ ），根据 UV 吸收的加合性，确认半抗原与载体发生偶联。

制备抗体过程中采用的免疫程序，包括长程免疫，短程免疫和体内免疫。其方法各有优缺点，本发明采用长程免疫，即首免采用 20 μg 抗原与等量弗氏完全佐剂混合后，颈背部皮下多点注射和腹腔注射联合使用，两周后再用 20 μg 抗原与等量弗氏不完全佐剂作第二次免疫，三免四免于前一次免疫后三周同法进行，融合前 3 天腹腔注射 40 μg 抗原以加强免疫。从血清效价、融合的结果来看，本发明免疫程序比较可靠。

半抗原-载体蛋白复合物免疫动物时，动物至少产生两类抗体，一类针对载体蛋白，一类针对半抗原。因而必须建立高度特异的筛选方法，以筛选出产生针对半抗原的细胞。本发明采用 BSA、OVA 为载体蛋白。以 AVM-BSA 为免疫原、AVM-OVA 为包被原，经 ELISA 方法可行性分析，证明 BSA、OVA

之间无共同成分，因而本发明筛选方法是确实可行的。

早期的细胞融合技术，用仙台病毒诱导融合，但其融合不稳定，而且仙台病毒在实验室不易保存。从八十年代开始出现电融合诱导杂交瘤的报道。目前应用最多的融合剂为聚乙二醇（PEG）。PEG 具有细胞毒性，分子量越大
5 毒性越强，用于融合的分子量一般是 1000-4000。因此融合过程中 PEG 的浓度，作用时间及 PEG 溶液的 pH 值都会影响效果。本发明选择 PEG1450 作为融合剂，作用浓度为 50%，作用时间 120 秒，取得了很高的融合效果。

制备杂交瘤细胞的关键步骤是细胞融合。在具有良好质量的 PEG 外，其决定因素是 SP2/0 细胞的活性及生长状态。本发明采用了活力大于 90%的
10 SP2/0 细胞，该细胞胞浆丰富折光性好，边缘整齐，取得了很好的融合效果。

附图说明

- 图 1 为 AVM 图谱；
图 2 为 BSA 图谱；
15 图 3 为 OVA 图谱；
图 4 为 AVM-BSA 图谱；
图 5 为 AVM-OVA 图谱；
图 6 为 SP2/0 细胞染色体；
图 7 为 2F₂ 细胞染色体；
20 图 8 为本发明单克隆抗体的抗体亚类 ELISA 板鉴定结果；
图 9 为本发明单克隆抗体的分子量测定结果，其中，1.纯化腹水；2.未纯化腹水；3.Protein Marker 116KD；
图 10 为 5 种药物对本发明单抗 2F₂ 的抑制曲线。

25 具体实施方式

以下通过实施例来进一步描述本发明，应该理解的是，这些实施例仅用于例证的目的，决不限制本发明的范围。

[实施例]

材料和仪器

主要试剂及购买来源

聚乙二醇 (PEG)	SIGMA
弗氏完全佐剂 (FCA)	北京欣经科生物公司
弗氏不完全佐剂 (FICA)	北京欣经科生物公司
二甲基亚砷 (DMSO)	哈尔滨伊事达生物工程有限公司
HRP 标记羊抗鼠 IgG	北京中杉金桥生物技术有限公司
HAT 和 HT	GIBCO
DMEM	GIBCO
胎牛血清	天津
液体石蜡油	北京试剂公司
牛血清白蛋白	华美生物工程公司
卵清白蛋白	华美生物工程公司
IgG 抗体亚类试剂盒	Southern Biotech
PEG(1450)	SIGMA
AVM	中国农大微生物工厂提供
IVM	中国农大微生物工厂提供
BSA	SIGMA
OVA	SIGMA
叔丁基二甲基氯硅烷 (t-BuMe ₂ SiCl ₂ ,AR)	SIGMA
对甲基苯磺酸	北京化工厂
琥珀酸酐	上海试剂一厂
三乙胺 (AR)	北京化工厂
N-羟基琥珀酰酯亚胺 (NHS)	Merck-Schuchardt
咪唑 (AR)	中国军事医学科学院防化研究所
硅胶 GF254 (200-400 目)	青岛海洋化工厂

动物和细胞及购买来源

BALB/C 小鼠 (8-12 周龄)	哈尔滨兽医研究所
SP2/0 细胞	哈尔滨兽医研究所
昆明鼠	哈尔滨兽医研究所

主要仪器及购买来源

离心机	LDZ5-2 北京医用离心机厂
分析天平	沈阳龙腾电子有限公司
可调微量起加样器系列	Finnpipette Digital 公司
318 型酶标监测仪	上海科学仪器三厂
倒置显微镜	XDS-1B

超静工作台	上海博迅实业有限公司
CO2 恒温培养箱	上海一恒科技有限公司
高压灭菌器	YXQ-SQ46-280S 上海博迅实业有限公司
恒温水浴箱	DHW-420 北京国华医疗器械厂
冻存管	NUNC 公司
细胞培养板 (96 及 24 孔)	NUNC 公司
聚乙烯酶联反应板	NUNC 公司
色谱柱 C18	日本岛津公司
高效液相色谱	美国 Spectra-Physics 公司
紫外分光光度仪 (751GW)	上海分析仪器厂

溶液

细胞培养用溶液

L-谷氨酰胺溶液 (0.2mol/l): 2.9g 谷氨酰胺溶于 100ml 的三蒸水, 过滤除菌分装小瓶, -20°C 冻存。

- 5 双抗溶液: 取青霉素 G100 万单位和链霉素 (硫酸盐) 1g 溶于 200ml 三蒸水中, 分装小瓶, -20°C 冻存。

基础细胞培养液为 DMEM 培养液原液: 具体配制方法按说明 (参见《细胞克隆》一书) 操作, 负压过滤 4°C 保存。

不完全培养液为基础培养液补加 1% L-G 溶液, 1% 双抗溶液。

- 10 完全培养液为含 10% 胎牛血清的不完全培养液。

HAT 培养液为含 1% HAT 储备液的完全培养液。

HT 培养液为含 1% HT 储备液的完全培养液。

细胞冻存液含 10% DMSO 完全培养液。

ELISA 溶液及其配制方法为:

- 15 包被缓冲液 (0.05M, pH9.6): 含无水 Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.93g, 加蒸馏水定容至 1000ml。

封闭液: 明胶 1.00g, 用 PBST 定容至 100ml。

洗涤液 (0.01M, pH7.4): 称取 NaCl 8.00g、 KCl 0.20g、 KH_2PO_4 0.20g、 $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.90g、Tween-20 0.5ml, 加蒸馏水至 1000ml。

- 20 稀释液: 明胶 1.00g, 用洗涤液加至 100ml。

终止液 (2M H_2SO_4): 蒸馏水 177.8ml 加浓硫酸 (98%) 22.2ml。

底物缓冲液 (pH5.0): $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.68g、柠檬酸 0.933g, 加蒸馏水

至 100ml。

OPD 底物使用液 (测 490nm 的 OD 值): 底物缓冲液 100ml 中加入 OPD40mg、3% H_2O_2 150 μ g。

染色体分析用溶液

5 秋水仙素溶液: 称取秋水仙素 10mg, 用无菌生理盐水定容至 100ml。

0.075MKCL 溶液: 称取 KCL0.56g, 用蒸馏水定容至 100ml。

甲醇固定液: 为甲醇:冰醋酸=3:1 (v/v)

10%Giemsa 染液 (储备液): 称取 Giemsa 粉 0.5g 溶于 33ml 甘油中 (先在研钵内加入少量甘油与 Giemsa 粉混合, 研磨至无颗粒, 再倒入剩余甘油),
10 55-60 $^{\circ}$ C 保温 2h, 再加入 33ml 甲醇混合, 保存于棕色瓶内。

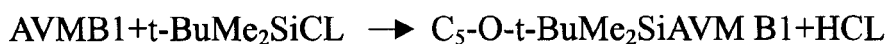
Giemsa 工作液: 取 10%Giemsa 1ml, 加 1/15M、pH6.8、PBS9ml, 混匀。

1 半抗原的合成

半抗原 4"-O-(单)琥珀酰 AVM 合成路线设计参考 Mrozik (Mrozik H *et al.* 1982. Avermectin acyl derivatives with antihelmintic activity [J]. Med. Chem. 25(3):658~663) 和 Danishefsky (Danishefsky S J. 1989. The total synthesis of avermectin A_{1a} [J]. Am. Chem. Soc. 111 (6):2980~2987) 等报道合成 AVM 衍生物的方法。

先以叔丁基二甲基氯硅烷 (t-BuMe₂SiCL) 保护 AVM 分子中的 C₅-OH, 然后将 C₄-OH 琥珀酰化, 最后脱去保护基, 获得半抗原 4"-O-succinoyl (琥珀酰) AVM。
20

保护 C₅-OH: 以叔丁基二甲基氯硅烷 (t-BuMe₂SiCL) 保护 AVM 分子中的 C₅-OH, 其化学反应式如下:



具体的操作步骤为: 将 1.00g AVMB₁ 置 25ml 圆底烧瓶中, 并放入一个磁力棒, 以 6ml DMF 使 AVMB₁ 溶解, 其溶液为浅黄色。然后加入 0.47g 咪唑, 此时溶液变为深黄色, 混匀, 以电磁搅拌器边搅拌边将含 0.52g t-BuMe₂SiCL 的 2ml DMF 溶液逐滴加入待混匀后, 在 30 $^{\circ}$ C 的水浴中反应 2h。在反应液中加入 100ml 乙酸乙酯, 混匀, 以 50ml 蒸馏水洗涤 3 次, 分离乙酸乙酯层, 以无水 MgSO₄ 干燥, 减压浓缩后得浅黄色粘稠物。以 1ml CH₂Cl₂ 使粘稠物
25

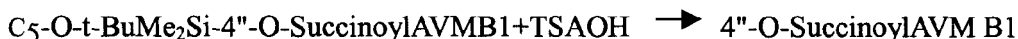
溶解，再经硅胶柱（100-200目，35g，柱体积 35: 2.0 cmid）层析纯化后，以 CH₂CL₂: THF（95: 5, V/V）洗脱，在 GF₂₅₄ 硅胶板上，该组分经减压蒸馏后，真空避光干燥 24h，获得白色粉末，即为 C₅-O-t-BuMe₂SiAVM B₁。用正离子快原子轰击质谱进行分子量的鉴定。

- 5 琥珀酰化：以琥珀酸酐对 C₅-O- t-BuMe₂SiAVM B₁ 进行琥珀酰化，其反应式如下：



- 具体的操作步骤为：将 0.5g C₅-O- t-BuMe₂SiAVM B₁ 置 50ml 圆底烧瓶中，并加入一个磁力棒，以 12ml CH₂CL₂ 使之溶解，溶液为浅黄色。然后依次加入 0.28g DMAP、0.6ml 三乙胺和 0.92g 琥珀酸酐，在电磁搅拌器搅拌条件下进行水浴回流，约 2-3h 此时溶液由浅黄色变为棕色，继之以黑色。减压蒸馏，再除去 CH₂CL₂ 后，向黑色残留物中加入 100ml 乙醚，过滤除去不溶物后，转入 250ml 分液漏斗。该乙醚溶液以 100ml 3.6% HCL 洗 2 次，再以 100ml 水洗 2 次后，以无水 MgSO₄ 干燥，减压浓缩后获得前黄色粘稠物，以 CH₂CL₂ 使黄色粘稠物溶解，用 GF₂₅₄ 硅胶板（20×20，厚度 1.5-2mm），以 CH₂CL₂: THF: CH₃OH（95: 5: 5, V/V）作为展开剂，将洗脱液展开，然后在 UV 光检测下，收集 R_f 值为 0.06 的区带，以 CH₂CL₂: CH₃OH（1: 1, V/V）液淋洗取下的区带，减压蒸馏，真空避光干燥 24h，可得黄白色粉末。用正离子快原子轰击质谱（positive ions-fast atom bombardment mass, P-FABMS）对其进行分子量的鉴定。

脱保护基：以甲基苯磺酸（TSAOH）脱去 C₅-O- t-BuMe₂Si-4''-O-succinoylAVM B₁ C₅ 位上的保护基，获得半抗原 4''-O-SuccinoylAVM B₁，其反应式如下：



- 25 具体的操作步骤为：将 0.3g C₅-O- t-BuMe₂Si-4''-O-SuccinoylAVM B₁ 置 50ml 圆底烧瓶中，并加入一个磁力棒，以 17ml CH₃OH 使其溶解，以电磁搅拌器边搅拌边将含有 0.26g TSAOH 的 10ml CH₃OH 逐滴加入，在继续搅拌 30min 后，加入 80ml ETOAC，并将此溶液转入 250ml 分液漏斗，以 40ml 2% NaHCO₃ 洗涤 1 次，再以 80ml 蒸馏水洗 2 次后，以无水 MgSO₄ 干燥，减

压浓缩。以 CH_2Cl_2 使黄色粘稠物溶解后，用 GF_{254} 硅胶板（ 20×20 ，厚度 1.5-2mm）以 CH_2Cl_2 : THF: CH_3OH (95: 5: 5, V/V) 作为展开剂，将洗脱液展开，然后在 UV 光检测下，收集 Rf 值为 0.20 区带，以 ETOAC 淋洗，减压蒸馏，真空避光干燥 24h，获得黄白色粉末，用 N-FABMS 对其进行分子

5 量鉴定。

2 人工抗原合成、纯化及鉴定

采用 N-羟基琥珀酰亚胺酯法（NHS ester procedure）合成 4"-O-SuccinoylAVM B1（半抗原）与载体蛋白（BSA）结合物即人工抗原，经

10 透析纯化后，以 UV 分析法对结合物进行鉴定。

人工抗原的合成：取 12mg (0.012mmol) 4"-O-SuccinoylAVM 置 5ml 圆底烧瓶中，加 0.4ml DMF 使溶解，再依次加入 2.7mg NHS 和 5.12mg DCC，于室温下避光搅拌 12h。边搅拌边将上述反应液逐滴加入含 30mg BSA 的 6ml 硼酸盐缓冲液-10%DMF (V/V) 中。继续搅拌 1h 后，将反应液再转至 4℃ 下搅拌

15 12h，然后进行抗原的纯化。

纯化：将反应液转入透析袋中（截止分子量 10 000dalton），然后将装有反应液的透析袋置于 2L PBS (0.01mol/L, pH7.2) 溶液中，于 4℃ 下搅拌、透析 2d，其间需置换 PBS (0.01mol/L, pH7.2) 3 次。

鉴定：将 BSA、4"-O-SuccinoylAVM 及其结合物溶于 PBS-4-10%DMF

20 (V/V)，在 $\lambda=244-312\text{nm}$ ， $\Delta\lambda=4\text{nm}$ 条件下进行手动扫描（结果见图 1-5）。选择适当的波长，用标准蛋白直接计算出结合物中的载体蛋白的浓度及半抗原与载体蛋白的结合比。

在紫外光谱中载体蛋白最大吸收峰 $\lambda=280\text{nm}$ ，半抗原在 $\lambda=270-300\text{nm}$ 范围内几乎无 UV 吸收。据此用标准蛋白质直接计算出结合物或抗原溶液中载体蛋白的浓度：AVM-BSA 3.56mg/ml, AVM-OVA 3.375 mg/ml。选择 $\lambda=259\text{nm}$

25 计算半抗原、载体蛋白及其结合物在此波长处的摩尔吸收系数。经计算，AVM 与 BSA 和 OVA 的结合比分别为 27:1 和 16:1。

合成 OVA-AVM 人工抗原的制备方法同上。

3 AVM 抗血清的制备

3.1 动物免疫

取 0.1mgAVM-BSA 偶联物(以载体蛋白浓度计), 加等量弗氏佐剂, 制成乳化剂, 免疫 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 5 只, 免疫方案见表 1:

5 表 1 BALB/c 小鼠的免疫方案

免疫时间	抗原	免疫剂量 ($\mu\text{g}/\text{each}$)	免疫途径
一免 ^{*1}	AVM-BSA ^{*2}	20	颈背部皮下、多点注射 0.1ml, 腹腔注射 0.1ml
二免 ^{*1}	AVM-BSA ^{*2}	20	
三免 ^{*1}	AVM-BSA ^{*2}	20	
四免 ^{*1}	AVM-BSA ^{*2}	20	
五免	AVM-BSA	40	腹腔内注射

注: *1 一免至二免的间隔时间为二周: 二免至五免的间隔时间为三周

*2 一免在抗原中加等量 FCA, 二免至四免抗原中加等量 FICA, 五免抗原加等量生理盐水。

3.2 检测方法的建立

10 采用间接 ELISA 方法, 按方阵法确定包被抗原、抗体的最适工作浓度, 具体方法如下:

将 AVM-OVA 用包被缓冲液稀释作系列稀释, 使其终浓度分别为 6.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.375 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.6875 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。每孔加 100 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗涤 3 次, 每次 3min。每孔加封闭液 300 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 1h, 洗涤同上。将阳性血清作 1:100、
15 1:200、1:400、1:800、1:1600 稀释后顺序加入, 每孔 100 μl , 每块板同时设空白对照, 阴性对照和阳性对照各 2 孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 1.5h, 洗涤同上。用稀释液将酶标二抗稀释到适当的工作浓度, 每孔 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 1.5h, 洗涤同上。每孔加新鲜配制的底物使用液 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 15min。每孔加终止液 50 μl 。
20 测定 OD 值, 以空白孔调零, 待测孔 OD 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍, 即为阳性。

判定标准: 阳性血清 OD 值 (P) 在 1.0 左右, 同时与阴性血清 OD 值 (N) 差距最大的抗原包被浓度、抗体稀释度为最佳工作浓度。

试验结果: 根据方阵法确定 ELISA 方法的最佳包被抗原浓度 6.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 阳性血清的最佳稀释度为 1:200, (见表 2)。

25

表2 用方阵法确定包被抗原和阳性血清的最佳工作浓度

血清 稀释度	OD 值							
	6.750 μ g/ml		3.375 μ g/ml		1.688 μ g/ml		0.844 μ g/ml	
	+	-	+	-	+	-	+	-
1:100	1.153	0.288	0.957	0.265	0.918	0.232	0.990	0.201
1:200	1.003	0.185	0.923	0.192	0.878	0.186	0.834	0.172
1:400	0.954	0.148	0.868	0.172	0.830	0.167	0.766	0.134
1:800	0.908	0.135	0.852	0.134	0.771	0.132	0.639	0.103
1:1600	0.885	0.095	0.764	0.094	0.633	0.102	0.483	0.085
1:3200	0.848	0.092	0.691	0.083	0.558	0.095	0.377	0.072
1:6400	0.712	0.086	0.545	0.074	0.386	0.082	0.259	0.061

注：+为阳性血清；-为阴性血清

5 3.3 血清效价的测定

四免后第10天，小鼠尾部采血，室温静置1h，4℃过夜，1000rpm离心5min，收集血清4℃保存。用间接非竞争ELISA法测定血清效价。当OD值大于或等于阴性对照孔的2.1倍时（即 $P/N \geq 2.1$ ），此时血清的稀释倍数为血清的效价。结果：小鼠血清效价可达1:64000（见表3）。

10

表3 血清效价测定结果

血清 稀释度	OD 值			
	1	2	3	4
1:2000	0.758	0.768	0.749	0.091
1:4000	0.670	0.681	0.675	0.086
1:8000	0.604	0.643	0.623	0.078
1:16000	0.482	0.460	0.490	0.075
1:32000	0.360	0.387	0.382	0.071
1:64000	0.254	0.264	0.234	0.071
1:128000	0.163	0.189	0.178	0.068

注：1-3为阳性鼠血清；4为阴性对照鼠血清

3.4 AVM对抗体的抑制反应

在系列稀释的AVM抗血清中加入5 μ l、1mg/ml的AVM的标准品，37℃1.5h，用间接ELISA测OD值，并与同稀释度的抗血清的OD值比较，OD值降低，表明AVM对AVM抗体有明显的抑制反应（见表4）。从而证实免疫抗原的偶联反应是成功的。

15

表4 AVM对AVM抗体的抑制反应

血清稀释度	阳性血清		阴性血清
	未加AVM	加入AVM	
1:800	0.747	0.338	0.105
1:1600	0.649	0.215	0.099
1:3200	0.524	0.142	0.094
1:6400	0.369	0.133	0.083
1:12800	0.261	0.105	0.078

3.5 筛选方法的可行性分析

5 分别以AVM-OVA、BSA、OVA包被酶联反应板，在同一稀释度下，血清对AVM-OVA、BSA呈阳性反应($P/N \geq 1$)，而对OVA则呈阴性反应，说明BSA、OVA无共同成分，即用AVM-BSA作免疫原免疫小鼠，而用AVM-OVA作为包被原建立筛选方法是可行的(见表5)。

表5 筛选方法的可行性分析结果

稀释度	AVM-OVA		BSA	OVA
	阳性血清	阴性血清	阳性血清	阳性血清
1:2000	0.758	0.121	0.927	0.213
1:4000	0.670	0.086	0.844	0.154
1:8000	0.604	0.078	0.822	0.134
1:16000	0.482	0.075	0.691	0.111
1:32000	0.360	0.071	0.556	0.099
1:64000	0.254	0.071	0.415	0.093

4 杂交瘤细胞的制备

10 4.1 骨髓瘤细胞系的选择

SP2/0细胞本身不合成免疫球蛋白，用它进行细胞融合所获得的杂交瘤只分泌均一的、完全来自脾细胞的抗体分子，是目前较理想的可供融合的骨髓瘤细胞，具有容易培养、融合率高等特点。

4.2 骨髓瘤细胞的复苏

15 将冷冻的骨髓瘤SP2/0细胞从液氮罐内取出，立即放入37~40℃水浴中，待全部内容物溶化后1000rpm离心5min，弃上清液。将沉淀细胞移入细胞培养瓶中，加DMEM完全培养液置CO₂培养箱培养。复苏的骨髓瘤细胞活力有所下降，死亡细胞较多，应注意适时换液(因复苏后培养液内尚有二甲基亚

甬，复苏后第二天应换液)和细心观察。如活细胞数较少，可加入饲养细胞，将有助于细胞的生长。

4.3 骨髓瘤细胞的培养

骨髓瘤细胞 (SP2/0) 培养在 10% 的胎牛血清的完全培养液中，如细胞数
5 低于 $10^4/\text{ml}$ 时，细胞生长缓慢。一般在 $10^4\sim 10^5/\text{ml}$ 时成对数生长，此时细胞混圆、透亮、大小均一、排列整齐、呈半致密分布。当细胞密度超过 $10^6/\text{ml}$ 以上时，细胞便停止分裂，表现皱缩、发暗、细胞浆中出现颗粒。当细胞处于对数生长的中期时，可按 1:2-1:4 的比例稀释传代。一般每 2 天进行 1 次传代或扩大培养，然后选取处于生长旺盛，形态良好的对数生长期细胞供融合
10 用。

4.4 饲养层细胞悬液的制备

于融合前一天将 BALB/c 小鼠 (8-12 周) 颈椎脱臼处死，浸泡于 75% 酒精 5min，移入超净工作台。用镊子提起小鼠腹部皮肤，剪一小口，撕开皮肤，充分暴露腹膜。用注射器吸取不完全 DMEM 培养液 10ml 注入小鼠腹腔，酒精棉轻轻按摩腹膜 1min 后将液体抽出，移入 50ml 离心管，1 000rpm 离心
15 10min，弃去上清，以 HAT 培养液重新悬浮，于显微镜下计数，调节浓度为 2×10^5 个/ml 分种于 96 孔细胞培养板，每孔 0.1ml。

4.5 SP2/0 细胞悬液的制备

融合前 24h 将 SP2/0 细胞扩大培养。融合当天，选择处于对数生长期的细
20 胞，用移液管将细胞吹下，收集于 50ml 离心管中，1 000rpm 离心 10min，然后用 DMEM 营养液重新悬浮，显微镜下计数并计算细胞成活率，大于 90% 者，用于融合。

4.6 免疫脾细胞悬液的制备

将免疫鼠于五免后第三天摘除眼球放血，并分离阳性血清作对照。颈椎
25 脱臼处死小鼠，置于 75% 酒精中浸泡 5min 后移入超净台，打开腹腔，无菌取出小鼠脾脏，放入盛有 10ml DMEM 营养液的平皿中漂洗，并细心剥离脾脏周围的脂肪和结缔组织。将脾脏移入另一盛有 30ml DMEM 培养液的平皿中，用注射器吸取 DMEM 培养液，从脾脏一端进针，反复冲洗脾脏，至泛白为止。将脾脏细胞悬液移至 50ml 离心管中，1 000rpm 离心 10min，弃去上清液，以

10ml DMEM 液悬浮，显微镜下计数。

4.7 融合方法

5 分别吸取含 6×10^7 个脾细胞和 6×10^6 个 SP2/0 细胞的细胞悬液，合并置于 50ml 离心管中，1 000rpm 离心 10min，弃去上清液。用手指轻弹管底，使沉淀松散成糊状。左手匀速转动离心管，右手持 1ml 移液管将已预热至 37℃ 浓度为 50% 的 PEG1450 1ml 沿转动的管壁缓慢滴入，并控制时间在 1min（最好 45s）内，静置 1min 后于 5min 内加入 25ml DMEM 营养液，终止反应，加入速度为：第 1min 内加 1ml，第 2min 内加 4ml，剩下的 20ml 在 3min 内加完。加液时应轻轻匀速转动离心管，此时操作应轻柔。800rpm 离心 5min，弃去上清液，加入 20ml HAT 培养液，轻轻吹吸使沉淀细胞悬浮。此时操作应轻柔，切勿用力吹打。将细胞加入已铺有饲养层细胞的 96 孔细胞培养板中，0.1ml/孔，置 37℃、饱和湿度、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。每天观察并记录细胞生长情况。融合后第 3 天每孔用 HAT 培养液半量换液，融合后第 7、10 天改用 HT 培养液半量换液，后改用完全培养液换液培养。

15 4.8 观察细胞的生长情况

根据所使用的骨髓瘤细胞等条件的不同，融合后细胞生长的情况也会有些差别。用倒置显微镜观察，一次成功地融合实验其生长情况大致如下：

融合当天（第 1 天）：可见瘤细胞透亮，形态多样，相互之间有粘连、重叠、并可见到巨细胞或哑铃状的细胞。

20 融合后第 2-3 天：瘤细胞数锐减，有大量的破碎细胞，残留的瘤细胞折光性差，或呈暗黑、皱缩；可见少数形态良好，透明的细胞，但不能判定他们是残留的瘤细胞还是早期的融合细胞。

融合后第 4-5 天：瘤细胞几乎全部消失，在巨噬细胞周围聚集许多大小不等的细胞碎片，可见形似骨髓瘤细胞，浑圆透亮，呈葡萄状分布的融合细胞小集落克隆，细胞数多少不等，而且细胞数增加很快。

融合后第 6-7 天：细胞克隆继续长大，如检测方法敏感，这时即可取部分克隆的培养上清液检测相应的特异性抗体。

融合后第 8-9 天：细胞克隆继续长大，大者可达 1/3-1/2 培养孔的面积，此时即可对所有有克隆生长孔的培养上清进行检测。

5 杂交瘤细胞的筛选

采用间接 ELISA (J. Eryl Liddell, et. al, 1991) 方法检测杂交瘤细胞上清液。方法如下:

用包被液将包被用抗原 OVA-AVM 稀释至 1: 2000~1: 64000, 向微孔中
5 每孔加 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 然后弃去孔内的液体。用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次
90s (简称洗涤, 下同), 拍干。用封闭液向微孔中每孔加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 湿盒 1h,
洗涤拍干。将待测培养上清液顺序加入, 每孔 100 μ l; 每块板同时设空白对照、
阴性对照和阳性对照各 2 孔。37 $^{\circ}$ C 水浴 1.5h; 然后洗涤、拍干。用稀释液将
10 酶标第二抗体稀释到适当的工作浓度, 每孔加 100 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴 1.5h; 然后
洗涤、拍干。各孔加新鲜配置的底物使用液 100 μ l; 37 $^{\circ}$ C 水浴 15min。每孔加
终止液 50 μ l 终止反应。

判定标准: 阴性对照孔 (适当稀释 SP2/0 和阴性血清) 应无色或接近无色,
阳性对照孔 (免疫小鼠血清) 应明显显色。测定 OD 值, 以空白孔调零, 若
待测孔 OD 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍, 即为阳性。

15 待融合后的细胞克隆长至孔底面积的 1/4-1/3 时, 即可用间接 ELISA 法对
所有有克隆生长孔的培养上清进行抗体检测。选择阳性值较高、克隆数目较
少的细胞克隆化, 并扩大培养。阴性孔 2-4 天后再检测一次, 如仍为阴性则弃
去, 若为阳性, 处理方法同前。

采用有限稀释法进行细胞克隆, 具体步骤如下:

20 克隆化的前一天制备饲养细胞, 方法如前述。悬浮待克隆化的阳性孔中
的细胞, 吸出悬浮液至已含有 1ml HT 培养液 (或细胞生长培养液) 的无菌试
管中。取 0.1ml 细胞悬液计数。以 HT 培养液 (或细胞生长培养液) 稀释细胞
至 100 个/ml。分种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 0.1ml。培养板置 37 $^{\circ}$ C、饱和
湿度、含 5%CO₂ 的培养箱培养 7-10 天, 中间换液一次。换液前置倒置显微镜
25 下观察记录单一克隆生长孔。克隆细胞长至孔底面积的 1/4-1/3 时, 对其上清
液进行检测。取强阳性 (OD 值大于 0.8) 克隆扩大培养, 冻存, 同时按上法
继续克隆至阳性率达 100%。将强阳性单克隆细胞扩大培养至 10ml 培养瓶,
一部分准备冻存; 一部分继续培养, 以用于生产腹水, 大量制备单克隆抗体。

试验结果: 融合率为 88% (253/288), 第一次检测阳性率为 3.16% (8/253)。

选择阳性较强，克隆数目较少的孔进行克隆，经过 5 次亚克隆，得到 2 株稳定分泌抗 AVM 单克隆抗体的杂交瘤细胞株，命名为 2H₁₀、2F₂。克隆化结果见表 6。

表 6 杂交瘤细胞克隆化结果

克隆轮数	克隆阳性率	
	2H ₁₀	2F ₂
1	68% (38/56) *	55% (26/47) *
2	85% (39/46)	100% (34/34)
3	100% (32/32)	89% (51/57)
4	100% (26/26)	100% (47/47)
5		100% (59/59)

5 注：*阳性克隆生长的总孔数/克隆生长的总孔数

6 细胞的冻存与复苏

6.1 细胞的冻存

冻存前，观察细胞状态。当细胞处于对数生长期、活力大于 90%时方可冻存。方法如下将预备冻存的细胞从瓶壁上吹下，移入离心管中，1000rpm 离心 5min。弃去上清液，视沉淀细胞多少（10⁶-10⁷ 个/瓶）用 3-4ml 细胞冻存液悬浮，分装于冻存管中。将做好标记的冻存管放入-20℃冰箱中 1.5h 后，移入-70℃冰箱中过夜，然后移入液氮罐中。

6.2 细胞的复苏

自液氮罐中取出预备复苏的细胞，迅速投入 37℃水浴中，待冻存管内容物全部融化后，1000rpm 离心 5min。弃上清液，用少量生长培养液悬浮细胞，转移至 5ml 细胞瓶。细胞瓶置 37℃、饱和湿度、含 5%CO₂ 的培养箱培养过夜后换液，继续培养备用。

7 单克隆抗体的制备与纯化

7.1 单克隆抗体的制备

20 采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体，具体步骤如下：

选择 8-12 周 BALB/c 雌性小鼠 10 只，每只腹腔内注射无菌液体石蜡油 0.5ml。10-14 天后，接种本发明杂交瘤细胞。将培养的杂交瘤细胞捶打下来，

1000rpm 离心 5min, 弃去上清液, 用无血清培养液将其混匀, 并将细胞数调至 $1-2 \times 10^6$ 个/ml, 每只小鼠腹腔注射 0.5ml。植入细胞后第 7 天起, 每天观察小鼠腹部, 待小鼠腹部明显膨大, 用 9# 针头穿刺腹腔, 收集腹水, 5000rpm 离心 10min, 收集上清液, 分装, -20°C 保存备用。

5 7.2 单克隆抗体的提纯

采用聚乙二醇沉淀法纯化腹水中的单克隆抗体, 具体步骤如下:

将腹水用等量 PBS 稀释, 然后在磁力搅拌下, 逐滴加入 30% 的 PEG 溶液, 使 PEG 的终浓度为 6%。静置 30min, 2000g 离心 20min。沉淀用 PBS 溶解至原体积, 如上再沉淀一次。取收集液装入透析袋中, 对 PBS 透析 72h (以上步骤均在 4°C 进行)。用 PBS 作空白对照, 紫外分光光度计测 $\text{OD}_{280\text{nm}}$, $\text{OD}_{260\text{nm}}$, 计算蛋白含量。计算公式为:

$$\text{蛋白质浓度 (mg/ml)} = 1.45 \times \text{OD}_{280\text{nm}} - 0.74 \times \text{OD}_{260\text{nm}}$$

8 本发明杂交瘤细胞株及单克隆抗体特异性的鉴定

8.1 杂交瘤细胞染色体分析

15 取处于对数生长期的杂交瘤细胞, 按 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 在培养液中加入秋水仙素, 置培养箱中继续培养 4-6h, 然后将细胞吹打下来, 移入离心管。1000rpm 离心 10min, 弃去上清液。

低渗处理: 加入 37°C 的 0.075MKCL 5ml, 置 37°C 温箱中 20min。

20 预固定: 向细胞悬液中加入新鲜配置的醋酸: 甲醇 (1:3) 固定液 1ml, 用吸管吹打均匀, 使细胞表面轻微固定, 以防细胞粘连成团。

固定: 1 000rpm 离心 10min, 弃去上清液, 加入固定液 5ml, 将细胞悬浮并混匀, 室温静置 20-30min, 然后 1 000rpm 离心 10min, 弃去上清液; 重复操作揖次; 其后加 5ml 固定液, 将细胞悬浮并混匀, 封上管口, 静置 4°C 过夜。

25 制片: 取出离心管, 1 000rpm 离心 5min, 轻轻吸去上清液, 根据细胞压积多少而留下 0.5-1ml 固定液, 将细胞悬浮并混匀后, 吸取细胞悬液 1-2 滴, 滴在刚从冰水中取出的载玻片上, 用口吹散, 并在火焰上通过数次, 是细胞平铺于载玻片上, 自然干燥。

染色: 用新鲜配制的 10%Giemsa 染液染色 10-20min, 然后用自来水洗去染液, 自然干燥。

镜检：于镜下选择染色体分散良好，无重叠，无失散的细胞进行观察分析。计数 100 个中期核细胞，记录其染色体数目，已知小鼠脾细胞的染色体数目为 40 条，而 SP2/0 骨髓瘤细胞的染色体数目为 62-68 条。本实验获得的杂交瘤细胞经分析其染色体数目为 89-96（见图 6 和图 7）。

5 8.2 单克隆抗体免疫球蛋白类及亚类的鉴定

采用 SBAClonotyping™System/HRP (Cat.No 5300-05) 抗体亚类试剂盒 (Southern Biotech 产品) 测定，具体步骤如下：

用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 稀释捕获抗体至 5-10 μ g/ml，加入 96 孔板中，每孔 100 μ l，用保鲜膜密封，放置 4 $^{\circ}$ C 饱和湿度过夜包被处理。弃去 ELISA 板中液体，加入 300 μ l/孔体积的洗涤液 (含 0.05% Tween20 的 PBS 缓冲液)，弃去，反复洗涤 3 次，在吸水纸上拍干，加入封闭液，每孔 200 μ l，室温下封闭 2h。弃去液体洗涤 3 次，拍干。加入杂交瘤细胞培养液上清，每孔 100 μ l，用保鲜膜封好，4 $^{\circ}$ C 过夜 (同一种杂交瘤细胞培养上清液加 8 个孔)。洗涤操作同上，用封闭液稀释 HRP 标记的羊抗鼠抗体亚类二抗 (主要有抗鼠 IgM、IgG、IgG2b、IgG2a、IgG3、IgA、IgG、 κ 链、 λ 链)，各稀释为 1:500 倍，在同一杂交瘤细胞培养上清的 8 个孔中各加入一孔，4 $^{\circ}$ C 过夜，弃去液体洗涤 5 次。配制底物溶液：在 50ml 双蒸水中加入 525mg 柠檬酸，搅动使其溶解，用 3mol/LNaOH 调整 pH 值到 4，此溶液为柠檬酸底物缓冲液。取柠檬酸底物缓冲液 10ml，加入 0.2mlABTS 储存液，再加入 30% H_2O_2 混匀，在 96 孔 ELISA 板中各孔加入 0.1ml，室温显色 10min 或 20min，在酶标仪上 405nm 处读取 OD 值，并拍照记录。

结果：两株单抗均为 IgM，抗体均为 κ 链抗体 (见图 8)。

8.3 单克隆抗体分子量的测定

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定腹水中单克隆抗体 2F₂ 的分子量，具体步骤如下：

按仪器说明装好电泳槽和凝胶板。加入 12% 分离胶至一定高度后，沿玻璃板边加入约 4mm 高的蒸馏水层，室温静置 30min。用干净滤纸吸干水层，加入 4.5% 浓缩胶，并插入样品梳，室温静置 30min 后，轻轻取出样品梳，加入电极缓冲液，冲洗样品孔。将样品以 2 \times 稀释液稀释后，100 $^{\circ}$ C 煮沸 3min，

冷却至室温后，加入样品孔，每孔 20 μ l。Mark 同样处理。从接通电源开始，电泳至溴酚兰指示剂移至离底线约 1cm 时停止。取出凝胶后，置于平皿中用蒸馏水冲洗 2-3 次，加入考马斯亮蓝染色液，染色 15min，倾去染液，用蒸馏水漂洗数次。往平皿中加入考马斯亮蓝脱色液，室温反复脱色 1h。换液至蛋白带清晰可见为止。

据分子量与迁移率的线性关系，求出单克隆抗体 2F₂ 的轻链分子量为 22.5KDa，重链分子量为 70KDa，单克隆抗体 2F₂ 分子量为 925KDa（见图 9），与文献报道相似。

8.4 杂交瘤细胞稳定性的测定

10 分别于冻存后第 15 天、30 天、45 天、60 天复苏杂交瘤细胞，培养后取上清液，间接 ELISA 法测效价，结果见表 7。从表中可看出效价在测定时间内稳定，杂交瘤细胞稳定性良好。

表 7 杂交瘤细胞培养上清稳定性测定结果

天数	效价		测定前		测定后	
	2H ₁₀	2F ₂	2H ₁₀	2F ₂	2H ₁₀	2F ₂
15	1:800	1:800	1.021	0.997	1.003	0.998
30	1:800	1:800	1.006	1.012	0.995	1.001
45	1:800	1:800	0.997	1.001	0.987	0.998
60	1:800	1:800	1.003	0.991	1.001	0.998

8.5 单克隆抗体效价的测定

15 采用已建立的间接 ELISA 方法测定细胞培养上清及纯化腹水中单克隆抗体的效价。

判定标准：以阳性细胞上清（腹水）OD 值/SP2/0 上清（SP2/0 腹水）OD 值 \geq 2 的最高稀释倍数为上清（腹水）的效价。

20 经紫外吸收法测定单克隆抗体的蛋白浓度为 2H₁₀ 1.865mg/ml，2F₂ 2.727mg/ml，腹水效价为 2H₁₀ 1:6400、2F₂ 1:6400。

8.6 单克隆抗体与四种大环内酯类药物的交叉反应

25 采用间接竞争 ELISA 方法检测单抗与其他药物的交叉反应性。按照 3.2 的方法进行包被和洗涤，再在试验组加入工作浓度的纯化腹水和系列稀释的 AVM 进行抑制试验反应，质控组只加腹水，其他操作与 3.2 同。质控组没加竞争物，其 OD 值代表 100% 的活性 (B₀)，AVM 的抑制率 (B/B₀%) 可用下

式表达:

$$B/B_0\% = OD_{490} \text{ 试验组} / OD_{490} \text{ 质控组} \times 100\%$$

再以 AVM 浓度对数值为横坐标, $B/B_0\%$ 为纵坐标作标准曲线, 求出回归方程和 IC_{50} 值。同样方法测定 AVM 的衍生物 IVM、DOR 及其与其结构相似的药物红霉素(erythromycin)、白霉素(albomycin)对单抗的 IC_{50} 值。其交叉反应率可用下式计算:

$$\text{交叉反应率} = IC_{50} \text{ AVM} / IC_{50} \text{ 试验组药物} \times 100\%$$

单抗的特异性用单抗与其他药物的交叉反应率来评价。5 种药物对单抗 2F₂ 的抑制曲线见图 10。

10 4 种与 AVM 结构类似的药物与 AVM 的交叉反应 (2H₁₀) 见表 8。

表 8 5 种药物与 AVM 的交叉反应

药物	IC_{50} (ng/ml)	交叉反应率 (%)
阿维菌素	101	100
伊维菌素	$>10^4$	< 0.01
多拉菌素	$>10^4$	< 0.01
红霉素	$>10^4$	< 0.01
白霉素	$>10^4$	< 0.01

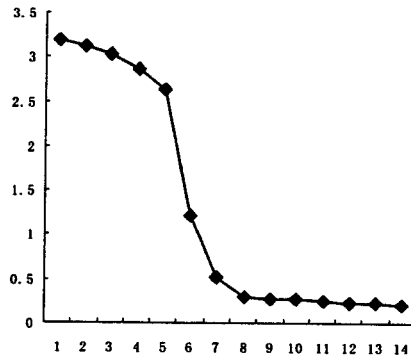


图 1

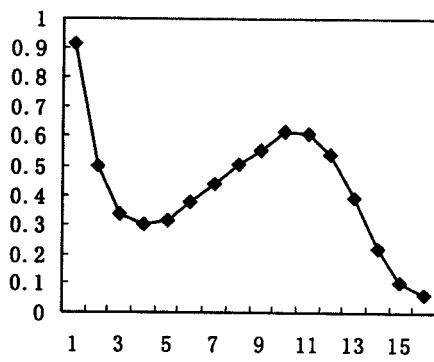


图 2

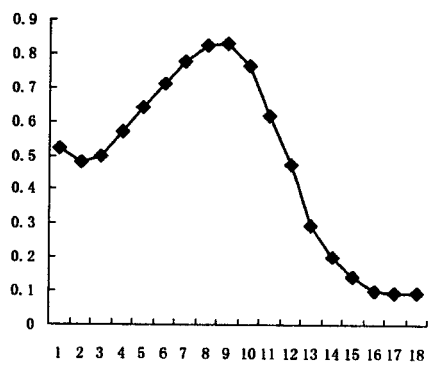


图 3

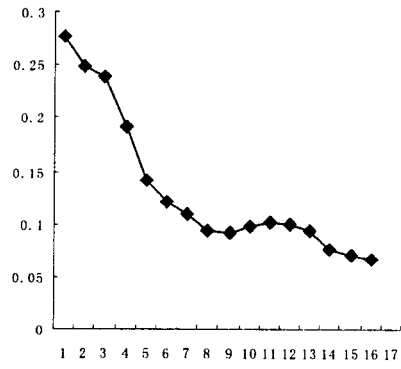


图 4

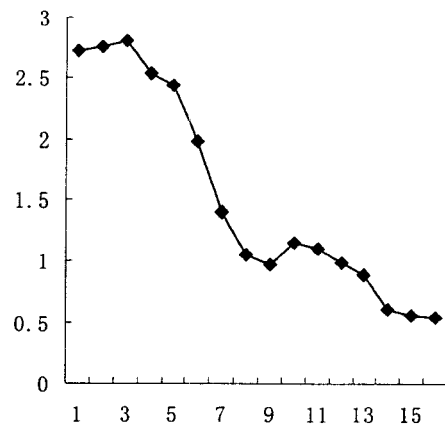


图 5

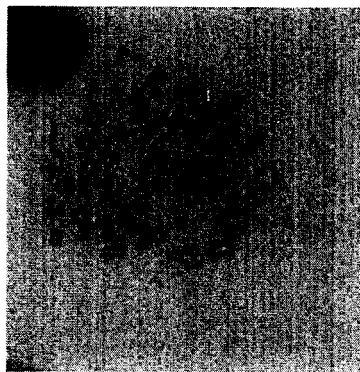


图 6

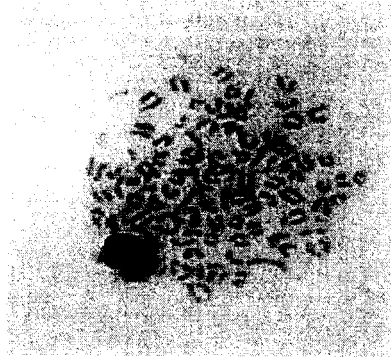


图 7

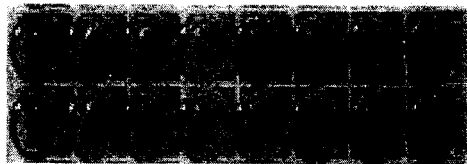


图 8

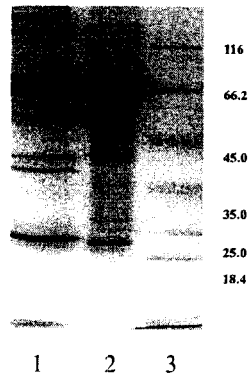


图 9

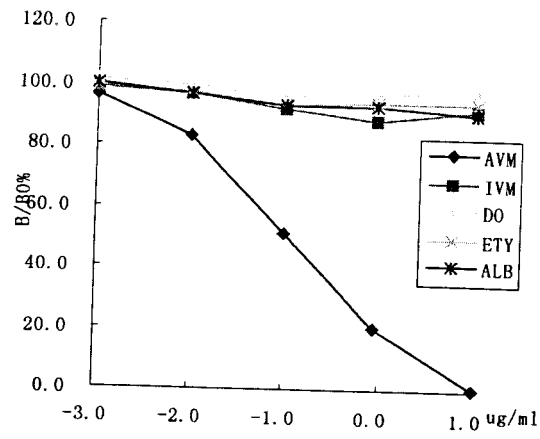


图 10

专利名称(译)	抗阿维菌素单克隆抗体、分泌它的杂交瘤细胞系及制备方法		
公开(公告)号	CN1733910A	公开(公告)日	2006-02-15
申请号	CN200510089868.4	申请日	2005-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	李术 徐世文 熊永忠		
发明人	李术 徐世文 熊永忠		
IPC分类号	C12N5/18 C07K16/00 C12P21/08 G01N33/53		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN1322118C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新的抗阿维菌素单克隆抗体、分泌它的杂交瘤细胞系及制备方法。本发明首先合成人工抗原AVM - BSA，再用其免疫BALB/c小鼠，五次免疫后，取小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行细胞融合，以PEG1450为融合剂，筛选出阳性融合细胞，用有限稀释法经过5次亚克隆，得到特异性分泌AVM抗体的杂交瘤细胞系2F2，该杂交瘤细胞系的微生物保藏号是：CGMCC No.1413。用上述杂交瘤细胞注射BALB/c小鼠腹腔，收集腹水，离心，收集上清液，纯化、鉴定即得本发明抗阿维菌素单克隆抗体。本发明单克隆抗体与伊维菌素、多拉菌素、红霉素、白霉素的交叉反应率均小于0.01%，说明本方面所获得的AVM的单克隆抗体是特异针对AVM的抗体，可应用于阿维菌素残留的检测。

