



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1974600 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200610114109.3

(22) 申请日 2006.10.27

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 1830 2006.10.11

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483 号

(72) 发明人 曾振灵 杨桂香 黄思秀 陈杖榴  
黄显会 贺利民 丁焕中

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限  
公司 11002

代理人 张庆敏

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C12N 5/18(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1844927 A, 2006.10.11, 全文.

CN 1645134 A, 2005.07.27, 全文.

CN 1598586 A, 2005.03.23, 全文.

李海. 抗恩诺沙星单克隆抗体的研究及初步  
英语. 2005, 摘要, 第 19-29 页.

李岩松. 环丙沙星单克隆抗体制备及其在  
ELISA 中的应用. 2005,

审查员 于群

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

抗氟甲喹的单克隆抗体、其制备方法及其应  
用

(57) 摘要

本发明提供了一种抗氟甲喹单克隆抗体,其  
由小鼠杂交瘤细胞株 2D12CGMCC No. 1830 产生  
的。其制备方法为采用碳二亚胺法和混合酸酐法  
将氟甲喹和载体蛋白 BSA、OVA 偶联,合成人工免  
疫原 FLU-BSA 和包被原 FLU-OVA ;用合成的免疫原  
FLU-BSA 免疫 Ba1b/c 小鼠,将免疫脾细胞和 SP2/0  
骨髓瘤细胞融合,用包被原 FLU-OVA 建立间接竞  
争 ELISA 方法筛选能分泌特异性抗体的细胞株。  
获得的细胞株的细胞培养上清效价在 1 : 4000 以  
上, IC<sub>50</sub> 为 55ng/ml ;细胞上清液对恩诺沙星、二氟  
沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星的交叉反应率  
小于或等于 1%。利用细胞株制备的腹水,纯化后  
效价可以达到 1 : 640,000 以上。本发明的抗体  
可用于研制氟甲喹的酶联免疫试剂盒。

1. 一种抗氟甲喹单克隆抗体,其特征在于其由保藏编号为 CGMCC No. 1830 的小鼠杂交瘤细胞株产生的。
2. 权利要求 1 所述抗氟甲喹单克隆抗体在用于制备氟甲喹残留检测的 ELISA 试剂盒中的应用。
3. 一种能分泌抗氟甲喹单克隆抗体的细胞株,为保藏编号为 CGMCC No. 1830 的小鼠杂交瘤细胞株。

## 抗氟甲喹的单克隆抗体、其制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗氟甲喹的单克隆抗体、其制备方法及其应用,属于免疫化学技术领域。

### 背景技术

[0002] 氟甲喹(flumequine, FLU) 是一种属于第二代喹诺酮的抗菌药,从 20 世纪 70 年代陆续在欧盟和日本等国家广泛用于畜禽和水产养殖中,对各种革兰氏阴性菌感染所致的疾病具有很好的疗效。我国在近几年有不少厂家开发生产氟甲喹,主要用于鲑鱼、鳟鱼、各种虾、鳊鱼以及猪鸡等细菌感染性疾病的防治。

[0003] 氟甲喹作为用于食品动物中的药物,其在动物可食性组织和产品中的残留毒性备受关注。由于氟甲喹在小鼠的 18 个月的常规致癌试验中引起肝细胞瘤, JECFA(the Food and Agriculture Organization(FAO)/World Health Organization(WHO) Joint Expert Committee on Food Additives) 认为其致癌作用并非是由遗传毒性引起,所以在 1997 年第 48 次 JECFA 会议制定了氟甲喹在鳟鱼的 MRL(500  $\mu$ g/kg) [WHO, 1997]。然后 2002 年 1 月 EMEA(the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) 根据其对肠道菌群的作用,制定了微生物学日许量(ADI) 为 495  $\mu$ g/人,以及氟甲喹在牛、羊、猪、鸡、火鸡以及鱼中的 MRL(表 1) (Flumequine(Extension to all food producing species), www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/082302en.pdf)。

[0004] 表 1 氟甲喹的 MRL(欧盟)

[0005]

药物活性成分	残留标志物	动物品种	MRLs( $\mu$ g/kg)	靶组织	备注
氟甲喹	氟甲喹	牛	200	肌肉	
			300	脂肪	
			500	肝脏	
			1500	肾脏	
			50	牛奶	
		绵羊	200	肌肉	产奶供人消费的动物禁用
		300	脂肪		
		500	肝脏		
		1500	肾脏		
		猪	200	肌肉	
		300	脂肪+皮		
		500	肝脏		
		1500	肾脏		

药物活性成分	残留标志物	动物品种	MRLs ( $\mu$ g/kg)	靶组织	备注
		鸡	400 250 800 1000	肌肉 脂肪 + 皮 肝脏 肾脏	
		火鸡	400 250 800 1000	肌肉 脂肪 + 皮 肝脏 肾脏	产蛋鸡禁用
		鲑鱼	600	天然比例的 肌肉和皮肤	

[0006] 但是 1999 年 Yoshida 报道饲料中 4000mg/kg 的氟甲喹饲喂 30 周可以引起肝脏出现坏死灶 (Yoshida M, Miyajima K, Shiraki K et al. Cancer letter, 1999, 141: 99-107); 2001 年 Takizawa 报道氟甲喹具有引发和促进肝脏肿瘤发生的作用 (Takizawa T, Mitsumori K, Takagi H et al. J Toxicol Pathol, 2001, 14: 135-143); 2002 年 Kashida 报道氟甲喹具有引发和促进肝脏肿瘤作用与其引起 DNA 链断有关 (Kashida Y, Sasaki YF, Ohsawa K, Yokohama N, Takahashi A, Watanabe T, Mitsumori K. Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice. Toxicol Sci. 2002 Oct; 69(2): 317-321)。因此在 2003 年第 60 次会议上 JECFA 撤消 1999 年 WHO 制定的 ADI (WHO TRS 879, 1998) 以及氟甲喹在猪、牛、羊、鸡鱼的 MRL (WHO TRS 879, 1998; WHOTRS 900, 2001) (Summary report of the 60th meeting of JECFA (2003))。

[0007] 鉴于氟甲喹的潜在毒性以及世界各国对氟甲喹在动物性食品中的残留检测的重视, 国外已经有美国的 Diffchamb 公司的氟甲喹 ELISA 试剂盒 (LOD 为  $0.1 \mu$ g/kg) 和美国 ELISA Technologies Inc. 的氟甲喹 ELISA 试剂盒 (LOD 为  $0.1 \mu$ g/kg)。

[0008] 为了建立氟甲喹 ELISA 试剂盒, 需要制备特异强的、可大量生产的抗氟甲喹的抗体。本研究从合成氟甲喹的免疫原及包被原出发, 用单抗制备技术制备了抗氟甲喹的单克隆抗体, 为研制氟甲喹残留检测的 ELISA 试剂盒打下了基础。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种特异性强、可大量生产抗氟甲喹的单克隆抗体。

[0010] 本发明的另一目的是提供一种抗氟甲喹残留的单克隆抗体的制备方法。

[0011] 本发明的再一目的是提供一种抗氟甲喹残留的单克隆抗体在制备氟甲喹残留检测的 ELISA 试剂盒中的应用。

[0012] 本发明的还一目的是提供一种分泌特异性抗氟甲喹的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0013] 本发明所述的抗氟甲喹的单克隆抗体, 其由小鼠杂交瘤细胞株 2D12CGMCC No. 1830 产生的。

[0014] 所述的小鼠杂交瘤细胞株 2D12CGMCC No. 1830, 已于 2006 年 10 月 11 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)。

[0015] 本发明的氟甲喹 (flumequine, FLU) 属于小分子化合物, 分子量为 261, 其本身不具有免疫原性, 只有反应原性, 不能直接刺激动物产生抗体, 必须与大分子载体蛋白偶联制备成人工抗原, 才能诱导机体产生特异性抗体。

[0016] 本发明所述的抗氟甲喹的单克隆抗体的制备方法, 包括如下步骤: 先将氟甲喹分别和载体牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白 (OVA) 偶联制备免疫原 (FLU-BSA) 和包被原 (FLU-OVA), 然后通过小鼠免疫、细胞融合、筛选出杂交瘤细胞株, 再进行培养、纯化单克隆抗体。

[0017] 其中, 本发明所述的氟甲喹免疫原, 是采用碳二亚胺法将氟甲喹 (FLU) 和载体牛血清白蛋白偶联反应生成的。其原理是通过氟喹诺酮类药物的羧基官能团与载体蛋白 BSA 上的游离氨基之间的缩合反应进行的。用该免疫原免疫 Ba1b/c 小鼠, 小鼠血清效价能达到 1 : 102, 400。

[0018] 所述的氟甲喹包被原, 是用混合酸酐法将氟甲喹 (FLU) 和卵清蛋白偶联而成的。

[0019] 本发明通过 FLU-BSA 免疫原对 Ba1b/c 小鼠进行免疫, 取得免疫小鼠血清, 再建立间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法来测定免疫小鼠的血清效价及抗体的特异性, 以确定小鼠是否有特异性抗体产生。

[0020] 选取免疫反应强的小鼠, 利用细胞融合技术, 将免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 得到杂交瘤细胞株, 筛选出分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株 2D12CGMCC No. 1830。

[0021] 最后将杂交瘤细胞株制备腹水, 纯化腹水而得到小鼠抗氟甲喹的特异性的单克隆抗体。

[0022] 本发明抗氟甲喹残留的单克隆抗体可用于制备氟甲喹残留检测的 ELISA 试剂盒。

[0023] 本发明所提供的抗氟甲喹的单克隆抗体制备方法包括用合成的免疫原免疫小鼠, 用免疫动物的脾细胞与小鼠杂交瘤细胞融合, 用间接竞争 ELISA 方法筛选分泌抗氟甲喹抗体的细胞株, 用该细胞株体内诱导产生腹水, 大量制备单克隆抗体。

[0024] 本发明采用碳二亚胺法和混合酸酐法将氟甲喹 (FLU) 和载体蛋白 BSA、OVA 偶联, 合成人工免疫原 FLU-BSA 和包被原 FLU-OVA。用人工免疫原免疫 Ba1b/c 小鼠, 利用细胞融合技术, 将免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 用 FLU-OVA 作为包被原, 建立间接竞争 ELISA 方法筛选分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株。获得的细胞株的细胞培养上清效价在 1 : 4000 以上, IC<sub>50</sub> 为 55ng/ml; 细胞上清液对恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星的交叉反应率小于或等于 1%。利用细胞株制备的腹水, 纯化后效价可以达到 1 : 640, 000 以上。本发明抗氟甲喹的单克隆抗体特异性强、并能大量生产, 可用于研制氟甲喹酶联免疫检测试剂盒, 能快速和灵敏地测定动物性食品及水产品中氟甲喹的残留量。

[0025] 本发明所述细胞株为小鼠杂交瘤细胞株 2D12, 已于 2006 年 10 月 11 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC), 保藏编号为 CGMCC No. 1830。

#### 附图说明

[0026] 图 1 为本发明所述 BSA 的扫描图谱;

- [0027] 图 2 为本发明所述氟甲喹的扫描图谱；  
 [0028] 图 3 为本发明所述 FLU-BSA 的扫描图谱；  
 [0029] 图 4 为本发明所述 OVA 扫描图谱；  
 [0030] 图 5 为本发明所述 FLU-OVA 扫描图谱；  
 [0031] 图 6 为本发明所述 2D12 细胞上清的标准曲线；  
 [0032] 图 7 为本发明所述 3E2 细胞上清的标准曲线。

### 具体实施方式

[0033] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0034] 实施例 1

[0035] 免疫原 (FLU-BSA) 和包被原 (FLU-OVA) 的制备

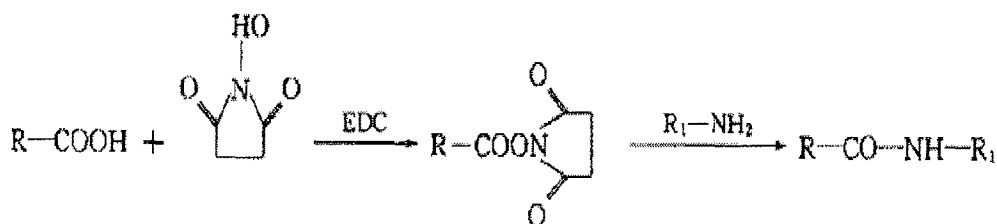
[0036] 氟甲喹 (flumequine, FLU) 属于小分子化合物,分子量为 261,其本身不具有免疫原性,只有反应原性,不能直接刺激动物产生抗体,必须与大分子载体蛋白偶联制备成人工抗原,才能诱导机体产生特异性抗体。本研究采用碳二亚胺法和混合酸酐法将 FLU 分别与 BSA、OVA 相偶联,合成了免疫原与包被原。

[0037] 1.1 氟甲喹免疫原的合成与鉴定

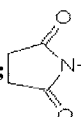
[0038] 本研究采用碳二亚胺法合成氟甲喹人工抗原,其原理是通过氟喹诺酮类药物的羧基官能团与载体蛋白 BSA 上的游离氨基之间的缩合反应进行的,合成具体步骤如下:

[0039] 准确称取氟甲喹 7.8mg,先用 2mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解,再加入 11.6mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 30.5mg 碳化二亚胺盐酸盐 (EDC),于磁力搅拌器上反应 24h,室温避光,命名为反应 A 液。称取 39.6mg 牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 5mL 磷酸盐缓冲液 PBS 中,制成反应 B 液。在磁力搅拌器上,将反应液 A 液缓慢逐滴加入到反应 B 液中,混合液于室温下避光,搅拌反应 4h。收集反应液转入预处理过的透析袋中,4℃ 搅拌下,对 0.01mol/L PBS 透析 3 天,每天更换透析液 2~3 次。收集透析液,分装,-20℃ 保存。

[0040]



[0041] Flu-BSA 合成原理

[0042] R-COOH 代表氟甲喹;  代表 NHS

[0043] R<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub> 代表载体蛋白 BSA;R-CO-NH-R<sub>1</sub> 代表偶联产物

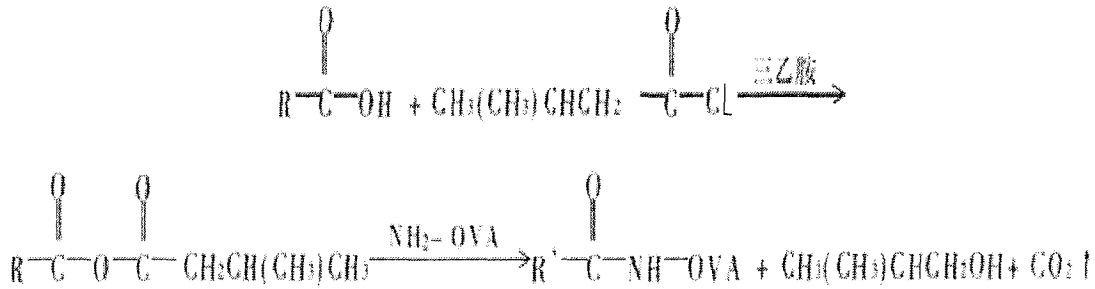
[0044] 对彻底透析后的氟甲喹免疫原进行紫外扫描分析,得到它们的紫外吸收光谱见图 1-图 3。经紫外扫描,氟甲喹的最大吸收峰波长为 330nm,BSA 的最大吸收峰波长分别为 278nm 和 280nm,而 FLU-BSA 偶联物的最大吸收峰波长分别出现在 312nm,可见药物在与 BSA 偶联后吸收峰发生漂移,可以间接判断偶联成功。

[0045] 1.2 氟甲喹包被原的合成与鉴定

[0046] 采用混合酸酐法合成氟甲喹包被原,具体合成步骤如下:

[0047] 准确称取氟甲喹标准品 7.8mg,用 1.5mL DMF 完全溶解,置于冰乙醇中预冷,随后加入 4.5  $\mu$ l 三乙胺和 6  $\mu$ l 氯甲酸异丁酯,室温下反应 10min,制成反应 A 液。称取 20.25mg 卵清白蛋白 (OVA) 溶于 3mL pH9.6 碳酸盐缓冲液中,制成反应 B 液。在磁力搅拌作用下,将 1.134mLA 液缓慢加入到 B 液中 (每 mL B 液中加入 378  $\mu$ l A 液),室温避光,搅拌反应 4h 以上。收集反应液转入透析袋中,4 $^{\circ}$ C 搅拌下,对 pH9.6 碳酸盐缓冲液透析 3 天,每天更换透析液 2-3 次。收集透析液,分装,-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0048]



[0049] 注:R-COOH 代表氟甲喹;NH<sub>2</sub>-OVA 代表 OVA

[0050] Flu-OVA 合成原理

[0051] 对 OVA 及彻底透析后的氟甲喹包被原进行紫外扫描分析,其紫外吸收光谱见图 4、图 5。氟甲喹的最大吸收峰波长为 330nm (图 2),OVA 的最大吸收峰波长为 280nm (图 4),而 FLU-OVA 的最大吸收峰波长出现在 314nm (图 5)。可见药物在与蛋白偶联后吸收峰发生漂移,可以间接判断偶联成功。

[0052] 实施例 2

[0053] 抗氟甲喹的单克隆抗体的制备

[0054] 2.1 材料

[0055] 氟甲喹标准品,牛血清白蛋白 (BSA),卵清白蛋白 (OVA),碳化二亚胺盐酸盐 (EDC), N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),弗氏完全佐剂 (FCA),弗氏不完全佐剂 (FICA),邻苯二胺 (OPD),HAT 和 HT (50 $\times$  浓缩),Sigma 公司;二甲基甲酰胺 (DMF),氯甲酸异丁酯,三乙胺,磷酸二氢钾,磷酸氢二钠,氯化钠,碳酸氢钠,碳酸钠,广州化学试剂厂;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG,武汉博士德生物工程有限公司;吐温-20,Amresco 公司;聚乙二醇 4000 (PEG4000),Merck 公司;双抗 (青链霉素),HYCLONE 公司;二甲基亚砷 (DMSO),广州展晨生物有限公司;胎牛血清,小牛血清,HYCLONE 公司;DMEM 高糖培养基,Gibco 公司;脱脂奶粉,新西兰进口分装。

[0056] Balb/c 小鼠 (雌性,8~12 周龄),昆明鼠,南方医科大学实验动物中心,SP2/0 细胞,本实验室保存。

[0057] 2.2 试验方法

[0058] 2.2.1 动物免疫

[0059] 首次免疫时,取 FLU-BSA 免疫原与等量弗氏完全佐剂乳化,按 100  $\mu$ g/ 只的剂量腹腔注射,免疫 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠 3 只,以后每隔 3 周免疫 1 次,共免疫 5 次。

[0060] 2.2.2 ELISA 检测方法的建立

[0061] 在小鼠第 3 次免疫后的 7~10 天,尾部采血,室温静置 1h,然后 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 2h,

3000rpm 离心 10min 分离血清,4℃保存。建立间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法测定血清效价及特异性。

[0062] 2.2.2.1 间接 ELISA 方法的建立

[0063] 采用方阵法确定最适包被原浓度,具体操作步骤如下。

[0064] (1) 包被:用碳酸盐缓冲溶液将包被原稀释成一系列浓度加入酶标板中,100 μl/孔,置于 37℃水浴中孵育 2h 包被;

[0065] (2) 洗涤:甩净包被液,用洗涤液 I(500mL 0.01mol/L pH 7.4PBS 加入 250 μl 吐温配制成)洗板 3~4 遍,每次间隔 1min,最后用 PBS 洗板 1 次,在吸水纸上拍干;

[0066] (3) 封闭:每孔加入 200 μl 5%脱脂奶粉,37℃孵育 2 小时后洗涤拍干;

[0067] (4) 加一抗:加入系列稀释的血清抗体,100 μl/孔,37℃孵育 1 小时;

[0068] (5) 洗涤:同(2);

[0069] (6) 加酶标二抗:加入 HRP-羊抗鼠 IgG(1:20000 稀释),100 μl/孔,37℃孵育 1 小时,洗板同上;

[0070] (7) 显色:每孔加入 100 μl 邻苯二胺(OPD)底物显色液,37℃显色 10min;

[0071] (8) 终止:加入 2mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>50 μl/孔,酶标仪读取各孔 OD<sub>490</sub>。

[0072] 判定标准:阳性血清 OD<sub>490</sub> 在 1.0~1.5 左右抗原包被浓度和抗体稀释度为最佳工作浓度。阳性血清(P)和阴性血清(N)比值 P/N ≥ 2.1 所对应的阳性血清稀释倍数为血清效价(具体结果见表 2)。

[0073] 2.2.2.2 间接竞争 ELISA 方法的建立

[0074] (1) 包被:用最适包被原浓度包被酶标板中,100 μl/孔,置于 37℃水浴中孵育 2h 或 4℃过夜包被;

[0075] (2) 洗涤:甩净包被液,用洗涤液 I 洗板 3~4 遍,每次间隔 1min,最后用 PBS 洗板 1 次,在吸水纸上拍干;

[0076] (3) 封闭:每孔加入 200 μl 5%脱脂奶粉,37℃孵育 2h 后洗涤拍干;

[0077] (4) 加样:在酶标板的相邻两列先加入抗血清做倍比稀释,50 μl/孔;然后其中一列每孔加入适当浓度的氟甲喹标准品 50 μl/孔,而另一列加抗体稀释液作为对照,37℃孵育 1h;

[0078] (5) 洗涤:用洗涤液 I 洗板 3~4 遍,每次间隔 1min,再用 PBS 洗板 1 次,在吸水纸上拍干;

[0079] (6) 加酶标二抗:加入 HRP-羊抗鼠 IgG(1:20,000 稀释),100 μl/孔,37℃孵育 1h,洗板同上;

[0080] (7) 显色:每孔加入 100 μl OPD 底物显色液,37℃显色 10min;

[0081] (8) 终止:加入 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>50 μl/孔,酶标仪读取各孔 OD<sub>490</sub>。

[0082] 判定标准:肉眼观察:抑制孔与未抑制孔的颜色变化,若抑制孔颜色颜色变浅,则说明有特异性抗体产生,反之则无;OD 值测定:酶标仪读取各孔 OD<sub>490</sub>,若抑制孔 OD<sub>490</sub> 值变小,说明有特异性抗体产生。同时可根据竞争抑制率的大小判断抗体的特异性。

[0083] 竞争抑制率 = 1-B/B<sub>0</sub>(其中 B 为加入竞争物抑制孔的 OD 值, B<sub>0</sub> 为不加竞争物的阳性对照孔的 OD 值)。(具体结果见表 3)

[0084] 2.2.3 杂交瘤细胞的制备与筛选

[0085] 选取一只免疫反应强的小鼠,于融合前 3 天用不加佐剂的抗原冲击免疫,利用细胞融合技术,用 50% PEG4000 作融合剂,将免疫脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合。采用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 方法检测杂交瘤细胞上清液中的抗体。阴性对照孔 (SP2/0 上清和阴性血清) 应该接近无色,阳性对照孔 (免疫小鼠血清) 应明显显色。测定 OD 值,若杂交瘤细胞上清液检测孔 OD 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍,即为阳性孔;若加入药物的抑制孔颜色变浅,则说明该杂交瘤细胞分泌特异性的抗氟甲喹抗体。采用有限稀释法对阳性杂交瘤进行克隆,经 4 次亚克隆后,对 10 株分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株的细胞培养上清,采用已建立的间接 ELISA 方法测定效价,并用间接竞争 ELISA 测定氟甲喹对上清 OD 值的抑制。

#### [0086] 2.2.4 单克隆抗体的制备

[0087] 采用体内诱导产生腹水法大量制备单克隆抗体,具体步骤如下:

[0088] ①选择 8~10 周的雌性 Balb/c 小鼠,每只腹腔注射 0.5mL 弗氏不完全佐剂。

[0089] ②7~10 天后,用生理盐水将处于对数生长期的杂交瘤细胞稀释成  $5 \times 10^5$  个/mL 的悬液,每只小鼠注射 0.5mL。

[0090] ③8 天后,小鼠腹部明显膨大,用针头穿刺腹腔,收集腹水,4℃ 5000rpm 离心 10min,收集上清液,分装,-80℃冻存。

[0091] 采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水中的单克隆抗体,具体步骤如下:

[0092] ①取腹水 2mL,加入 0.06mol/L pH 4.0NaAC-HAC 缓冲液 4mL,搅拌均匀。

[0093] ②用 1mol/L NaOH 调整 pH 至 4.8。

[0094] ③按每 mL 腹水加入 33  $\mu$ L 辛酸的量,于磁力搅拌器上,向上述调好 pH 的腹水中缓慢加入 66  $\mu$ L 正辛酸,搅拌 30min。

[0095] ④4℃ 6000rpm 离心 30min,取上清,用 0.1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.2。

[0096] ⑤向上清液中缓慢滴加等量饱和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (pH 7.2~7.4) 溶液,边加边搅拌,此时  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液终浓度为 50%,搅拌 30min 后,静置 1h,4℃ 6000rpm 离心 30min。

[0097] ⑥弃上清,用 5.5mL 0.01mol/L pH 7.2PBS 溶解沉淀,于磁力搅拌器上,缓慢滴加 4.5mL 饱和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液,此时  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液终浓度为 45%,搅拌 30min 后,4℃ 6000rpm 离心 30min。

[0098] ⑦弃上清液,将沉淀溶于适量的 0.01mol/L pH7.2PBS 中。

[0099] ⑧将沉淀悬浮液转入透析袋,用 0.01mol/L pH7.2PBS 透析 3 天,每天更换透析液 2~3 次,除去  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{SO}_4^{2-}$ 。

#### [0100] 2.3 结果

##### [0101] 2.3.1 最佳包被原浓度

[0102] 根据方阵法确定 ELISA 方法的最佳包被抗原浓度为 1  $\mu$ g/mL,结果见表 2。

[0103] 表 2 酶标仪检测的血清 OD<sub>490</sub>

血清稀释度	Flu - OVA浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	8	4	2	1
1 : 4000	2.823	2.655	2.496	1.454
1 : 8000	2.461	2.203	2.080	1.025
1 : 16,000	1.813	1.165	1.074	0.755
[0104] 1 : 32,000	1.218	0.726	0.561	0.458
1 : 64,000	0.828	0.506	0.496	0.305
1 : 128,000	0.486	0.356	0.265	0.193
1 : 256,000	0.298	0.292	0.255	0.179
1 : 512,000	0.316	0.257	0.254	0.227
阴性1 : 1000	0.191	0.194	0.139	0.122
空白	0.146	0.161	0.181	0.184

[0105] 2.3.2 免疫小鼠的血清效价及特异性的测定

[0106] 第4次加强免疫后,小鼠血清效价均能达到1 : 102,400,见表3(效价孔)。效价孔是指该孔中不含氟甲喹药物,可用于测定血清效价。在间接ELISA中,加入 $5\mu\text{g/mL}$ 的氟甲喹标准品作竞争ELISA时,OD值显著降低,说明抗血清是针对氟甲喹的,结果见表3(抑制孔)。

[0107] 表3 免疫原血清效价及特异性测定(OD值)

[0108]

血清稀释度	OD	
	效价孔(B0)	抑制孔(B)
1: 6400	2.472	0.349
1: 12800	2.186	0.275
1: 25600	1.857	0.260
1: 51200	1.091	0.195
1: 102400	0.564	0.099
空白	0.095	0.037
阴性1:1000	0.043	0.054

[0109] 2.3.3 杂交瘤细胞的建立

[0110] 经过4次克隆,筛选到10株能稳定分泌抗氟甲喹单克隆抗体的杂交瘤细胞株,对其中两株进行分析鉴定,命名为2D12、3E<sub>2</sub>。

[0111] 该小鼠杂交瘤细胞株2D12CGMCC No. 1830已于2006年10月11日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)。

[0112] 2.3.4 细胞上清液效价的测定

[0113] 将两株细胞的上清作倍比稀释后用间接ELISA检测。结果见表4。判定标准:阳性

上清 (P) 和阴性上清 (N) 比值  $P/N \geq 2.1$ , 且  $P-N > 0.2$  所对应的上清稀释倍数为其效价。两株细胞上清效价均达到 1 : 4000, 并同时用 OVA 包被酶标板, 结果表明所分泌抗体对 OVA 无反应, 因此可以确定所筛选到的细胞株具有特异性, 且针对 FLU 的。

[0114] 表 4 细胞培养上清效价的测定 (OD 值)

[0115]

细胞培养 上清液稀 释度	2D12		3E <sub>2</sub>		阴性上清对照
	FLU-OVA	OVA	FLU-OVA	OVA	
1 : 256	1.799	0.213	1.862	0.084	0.11
1 : 512	1.373	0.188	1.331	0.062	0.153
1 : 1024	0.925	0.113	0.847	0.05	0.127
1 : 2048	0.507	0.081	0.602	0.084	0.161
1 : 4096	0.415	0.182	0.430	0.05	0.200
1 : 8192	0.302	0.206	0.26	0.065	0.204
1 : 16384	0.204	0.205	0.128	0.187	0.195

[0116] 注:包被原 FLU-OVA 浓度为  $1 \mu\text{g/mL}$ , OVA 浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$ , 酶标二抗稀释倍数为 1 : 20000

[0117] 2.3.5 细胞上清液中单抗特异性的测定

[0118] 将细胞上清液适当稀释后, 与梯度浓度的氟甲喹标准溶液做间接竞争性 ELISA, 重复测定 3 次, 结果见表 5。以抑制率为纵坐标, 药物浓度的对数为横坐标作图, 求两株细胞的培养上清对氟甲喹的 IC<sub>50</sub>。结果见图 6、图 7。2D12、3E<sub>2</sub> 细胞上清液对 FLU 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 55ng/mL、75ng/mL。

[0119] 表 5 两株细胞培养上清的抑制

[0120]

标准品浓度 (ng/mL)	2D12			3E <sub>2</sub>		
		OD值		OD值		
0	1.381	1.329	1.405	0.943	0.811	1.016
3.9	1.199	1.092	1.394	0.755	1.006	0.869
7.8	1.042	0.97	1.079	0.669	0.885	0.578
15.6	0.805	0.82	1.058	0.615	0.749	0.617
31.2	0.646	0.649	0.79	0.38	0.483	0.529
62.5	0.664	0.659	0.735	0.426	0.503	0.358
125	0.45	0.398	0.537	0.329	0.369	0.370
250	0.379	0.281	0.427	0.228	0.311	0.302
500	0.320	0.329	0.348	0.214	0.145	0.285
空白	0.068	0.055	0.047	0.09	0.089	0.086
阴性	0.093	0.096	0.092	0.113	0.093	0.143

[0121] 2.3.6 细胞上清液中单抗交叉反应

[0122] 将恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星稀释成梯度浓度的标准品，与细胞上清液做间接竞争性 ELISA，结果表明细胞上清液对参与测试的 5 种同类药物的最高交叉反应率为 1%。见表 6。

[0123] 表 6 细胞上清液与其他喹诺酮类药物的交叉反应

[0124]

竞争物	交叉反应率	
	2D12	3E <sub>12</sub>
氟甲喹	100%	100%
恩诺沙星	0.90%	0.30%
二氟沙星	1%	0.08%
氧氟沙星	0.20%	0.06%
噁喹酸	<0.1%	<0.1%
诺氟沙星	0.60%	0.80%

[0125] 2.3.8 腹水效价的测定

[0126] 用 2D12 注射小鼠腹控制备腹水，用辛酸 - 硫酸铵法进行纯化，经间接 ELISA 法检测，腹水效价达到 1 : 640,000 以上。

[0127] 2.4 结论

[0128] 获得 10 株分泌抗氟甲喹抗体的杂交瘤细胞株。其中 2D12 细胞株，细胞培养时得到的抗体效价均在 1 : 4000 以上，制备的纯化腹水效价可以达到 1 : 640,000 以上，对 FLU 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 55ng/mL，细胞上清与恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星

的交叉反应率低于 1%。

[0129] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

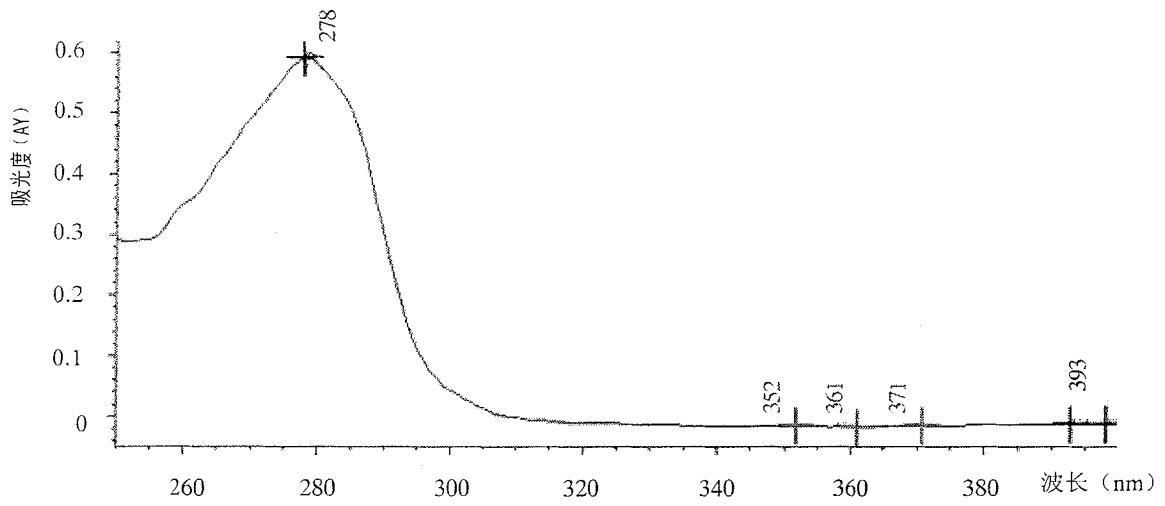


图 1

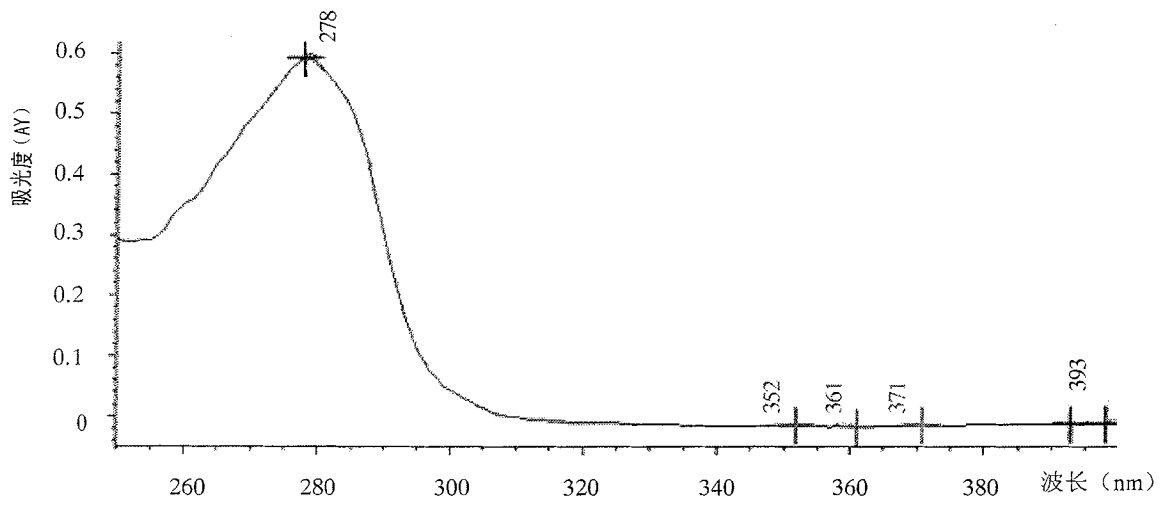


图 2

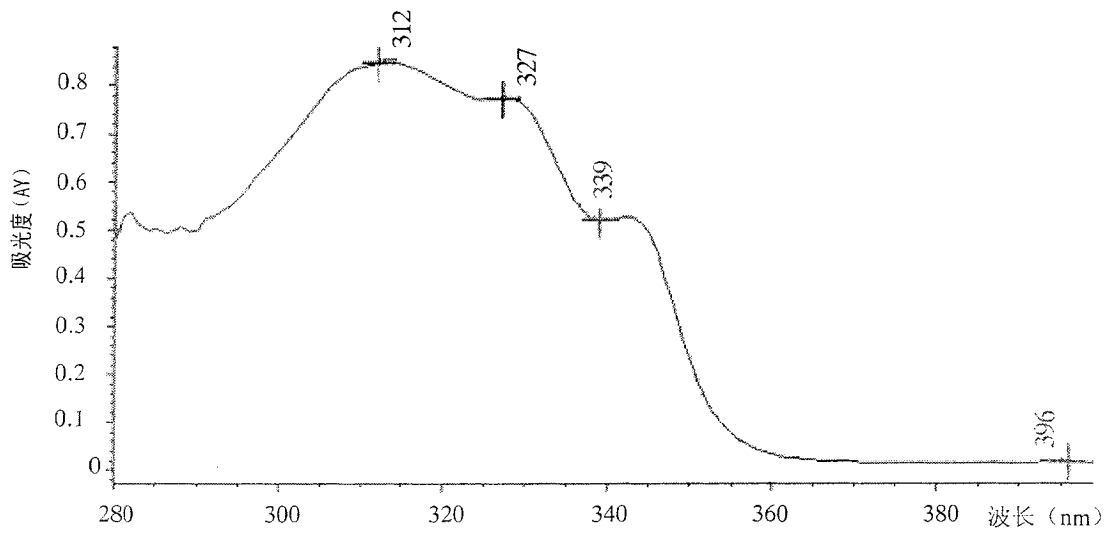


图 3

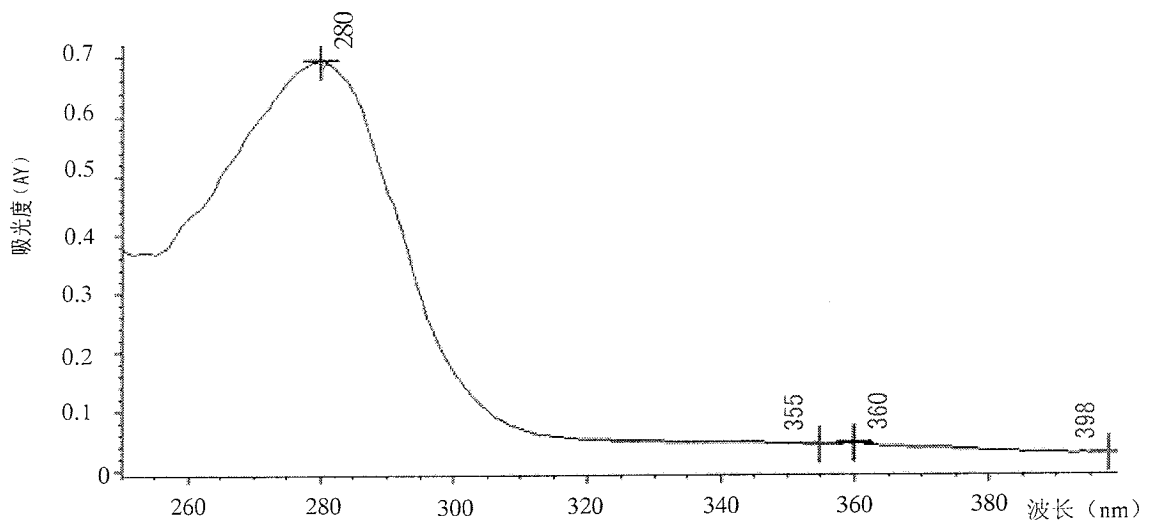


图 4

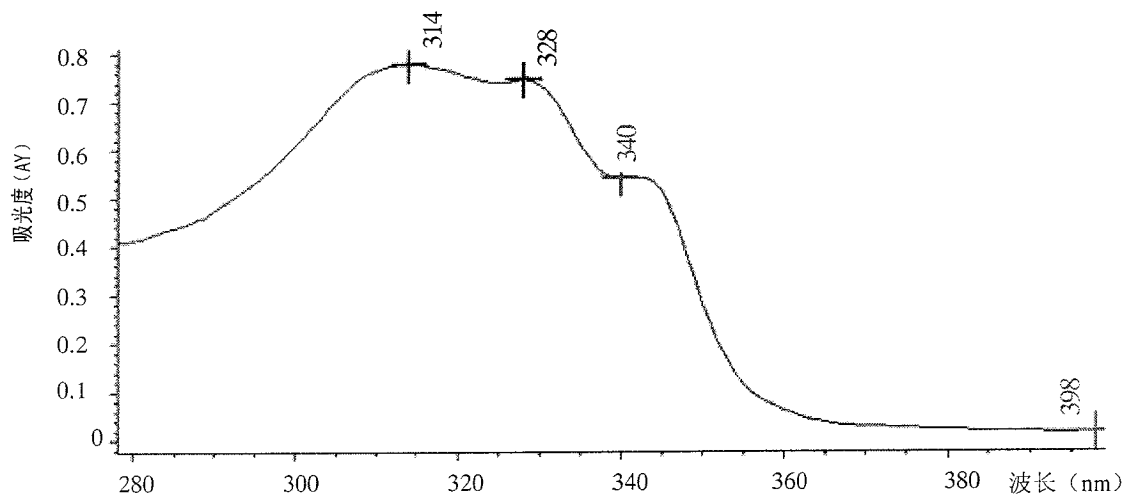


图 5

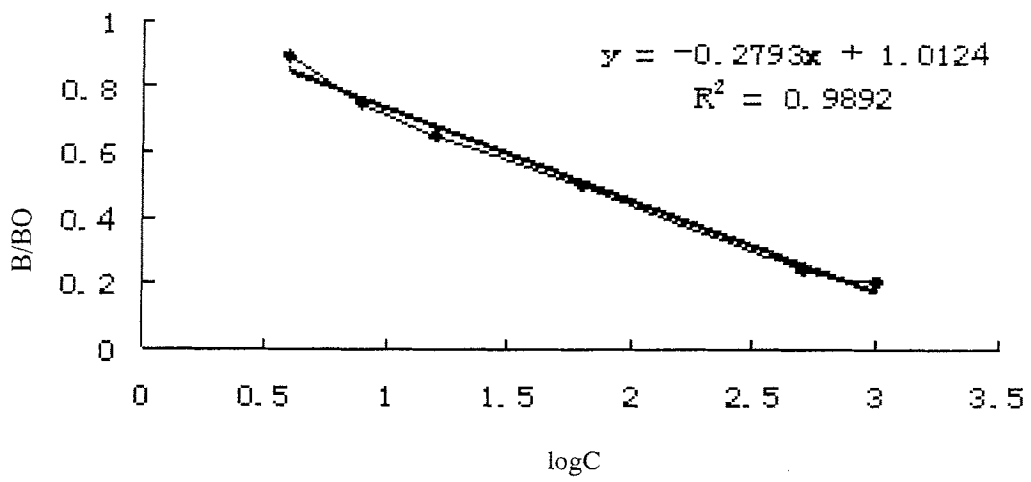


图 6

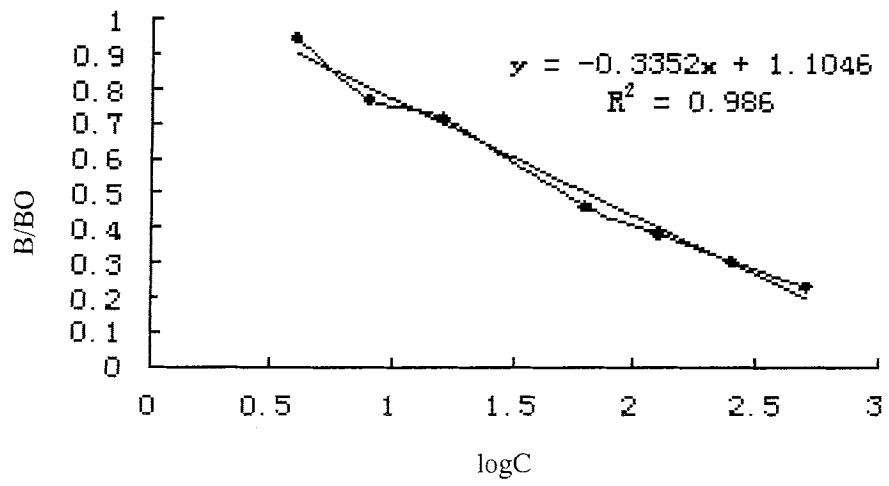


图 7

专利名称(译)	抗氟甲喹的单克隆抗体、其制备方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1974600B</a>	公开(公告)日	2010-05-12
申请号	CN200610114109.3	申请日	2006-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	曾振灵 杨桂香 黄思秀 陈杖榴 黄显会 贺利民 丁焕中		
发明人	曾振灵 杨桂香 黄思秀 陈杖榴 黄显会 贺利民 丁焕中		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/18 G01N33/53		
代理人(译)	张庆敏		
审查员(译)	于群		
其他公开文献	CN1974600A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种抗氟甲喹单克隆抗体，其由小鼠杂交瘤细胞株2D12CGMCC No.1830产生的。其制备方法为采用碳二亚胺法和混合酸酐法将氟甲喹和载体蛋白BSA、OVA偶联，合成人工免疫原FLU-BSA和包被原FLU-OVA；用合成的免疫原FLU-BSA免疫Balb/c小鼠，将免疫脾细胞和SP2/0骨髓瘤细胞融合，用包被原FLU-OVA建立间接竞争ELISA方法筛选能分泌特异性抗体的细胞株。获得的细胞株的细胞培养上清效价在1:4000以上，IC50为55ng/ml；细胞上清液对恩诺沙星、二氟沙星、氧氟沙星、噁喹酸和诺氟沙星的交叉反应率小于或等于1%。利用细胞株制备的腹水，纯化后效价可以达到1:640,000以上。本发明的抗体可用于研制氟甲喹的酶联免疫试剂盒。

