



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110408600 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201811506878.7

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2018.12.10

C12R 1/91(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC 16388 2018.09.25

(71)申请人 浙江工商大学

地址 310012 浙江省杭州市西湖区教工路
149号

(72)发明人 金仁耀 郭建军

(74)专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33283

代理人 向庆宁 何碧珩

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

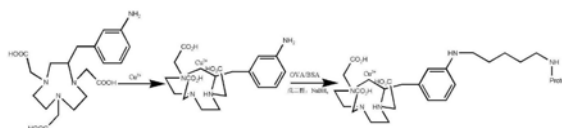
权利要求书2页 说明书16页 附图2页

(54)发明名称

一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

(57)摘要

本发明提供了一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用;该杂交瘤细胞株能够分泌抗重金属铜离子单克隆抗体,本发明还提供了杂交瘤细胞株的制备方法,和抗重金属铜离子单克隆抗体的制备方法;本发明制备得到的单克隆抗体特异性较强,对铜离子具有较好地灵敏度,IC₂₀值为0.14ng·mL⁻¹,能够用于快速检测重金属铜离子。该抗铜离子单克隆抗体可以用于环境样品中铜离子的残留检测。



1. 一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.16388。

2. 抗重金属铜离子单克隆抗体,其特征在于,它由保藏编号为CGMCC No.16388的杂交瘤细胞株分泌产生。

3. 杂交瘤细胞株CGMCC No.16388或者其分泌的抗重金属铜离子单克隆抗体在铜离子免疫检测中的应用。

4. 一种分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法,其特征在于,该方法用于制备权利要求1所述的杂交瘤细胞株,包括以下步骤:

(1) 铜离子人工抗原的合成:

称取5-8mg 2-S-(3-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸,溶解于2mL $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液,制得螯合剂溶液,此溶液为A液;

称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中,制得浓度为 $7.5 \times 10^{-2}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸铜溶液,此溶液为B液;

将150~200 μL 的B液加入到A液中,室温下避光反应3~5h,此反应液为C液;

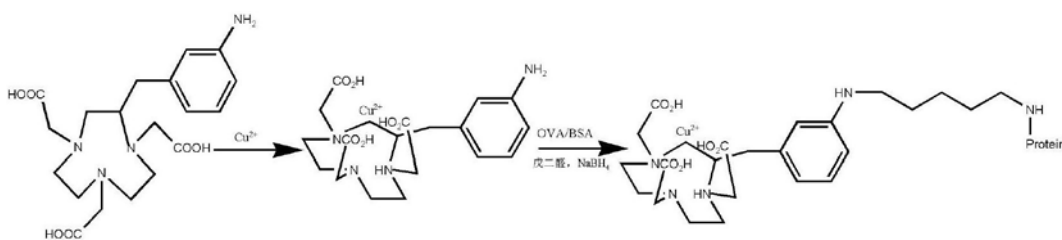
向C液中加入500~800 μL , $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛溶液,室温避光反应过夜,此反应液为D液;

称取20~30mg牛血清白蛋白BSA或鸡卵清蛋白OVA溶解于3mL HEPES,室温下磁力搅拌混匀,此反应液为E液;

将D液加入到E液中,室温下避光反应24h,后加入150~200 μL 硼氢化钠溶液,室温下避光反应1h;

反应液先用8KD的透析袋透析3~5次,再用30KD的超滤离心管 $7000 \sim 9000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心洗涤3~5次,用5~10mL的 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的HEPES溶液复溶,后分装, -20°C 低温保存,制得重金属铜人工抗原Cu-L₂-BSA或者Cu-L₂-OVA,L₂表示2-S-(3-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸;

合成路线为:



(2) 小鼠的免疫:

选择BALB/C小鼠进行免疫,将制备的重金属铜人工抗原Cu-L₂-BSA与等体积弗氏完全佐剂混合乳化后,通过腹部和腋下多点注射,后每间隔一定时间进行加强免疫,3次加强免疫后采血测定效价,当效价不再明显升高时进行最后末免,末免3天后进行细胞融合;

(3) 细胞融合与细胞株筛选:

通过聚乙二醇法将小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按照5~10:1的比例进行融合,加入培养基培养,间接ELISA筛选抗体阳性孔,对抑制效果好的杂交瘤细胞用有限稀释法进

行3~4次克隆,筛选后获得杂交瘤细胞株6F9。

5. 抗重金属铜离子单克隆抗体的制备方法,其特征在于,该方法用于制备权利要求2所述的单克隆抗体,包括以下步骤:

在BALB/C小鼠腹腔注射降植烷0.3ml/只,7~10天后同法注射筛选到的6F9单克隆细胞株细胞,待小鼠腹腔明显胀大后无菌操作抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水McAb;

腹水纯化后,得到纯化单克隆抗体。

一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学检测技术领域,具体涉及一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用。

背景技术

[0002] 重金属污染主要指铜、镉、汞、镍、铬、砷、锌、铜等污染物对环境的污染。重金属分布广泛、难以降解,可通过大气、水、食物链进入人体,与体内蛋白质及各种酶发生作用,使它们失去活性,并在某些器官中富集,如果超过人体所能耐受的限度,会造成人体急性或慢性中毒,具有致癌、致畸及致突变作用,对人体具有很大的危害。因此,加强重金属在环境、农产品和食品中残留检测成为保障重金属安全的重要手段,而新形势下检测新技术的研究和开发显得尤为迫切。

[0003] 传统的重金属检测方法主要采用原子吸收光谱分析(Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)、电感耦合等离子发射光谱(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES)、阳极溶出伏安法(Anodic Stripping Voltammetry, ASV)、色谱法和各种联用检测方法。这些方法虽然能对各种环境样品中的重金属离子进行有效分析,但大多需要大型仪器,分析方法成本高,样品需要经过消解,分析时间长,不适于重金属的现场快速检测,难以适应环境及市场产品的现场抽查、生产企业自查及产品进出口快速通关的要求。

[0004] 免疫学检测技术具有检测速度快、分析容量大、费用低廉、仪器简单易携、使用人员技术要求不高,容易普及和推广、灵敏度高和选择性强等优点,尤其适合现场筛选和大量样品的快速分析,已成为21世纪最具竞争性和挑战性的检测分析技术。

[0005] 重金属离子免疫学检测的关键在于抗重金属特异性抗体的制备,而特异性抗体制备的关键又在于优质重金属免疫原的合成,因此,如何制备优质重金属人工抗原,如何制备抗重金属特异性抗体,建立更快速、更经济的免疫分析法检测重金属离子成为需要解决的问题。

发明内容

[0006] 为克服现有技术的缺陷,本发明提供一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用。

[0007] 一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株,已经保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.16388。

[0008] 抗重金属铜离子单克隆抗体,它由保藏编号为CGMCC No.16388的杂交瘤细胞株分泌产生。

[0009] 杂交瘤细胞株CGMCC No.16388或者其分泌的单克隆抗体在铜离子免疫检测中的应用。

[0010] 本发明采用以下技术方案：

[0011] 一种分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，该方法用于制备以上所述的杂交瘤细胞株，包括以下步骤：

[0012] (1) 杂环类双功能螯合剂铜离子人工抗原的合成及鉴定：

[0013] 称取5~8mg 2-S-(3-氨基苯)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简称为o-NH₂-Bn-NOTA)，溶解于2mL 0.01mol·L⁻¹、pH7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液，制得螯合剂溶液，此溶液为A液；

[0014] 称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中，制得浓度为7.5×10⁻²mol·L⁻¹的硝酸铜溶液，此溶液为B液；

[0015] 将150~200μL的B液加入到A液中，室温下避光反应3~5h，此反应液为C液；

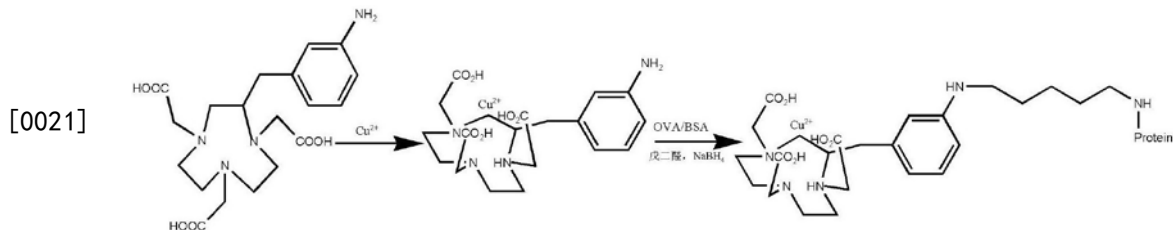
[0016] 向C液中逐滴加入500~800μL，20mmol·L⁻¹的戊二醛溶液，室温避光反应过夜，此反应液为D液；

[0017] 称取20~30mg牛血清白蛋白BSA或鸡卵清蛋白OVA溶解于3mL HEPES，室温下磁力搅拌混匀，此反应液为E液；

[0018] 将D液逐滴加入到E液中，室温下避光反应24h，后逐滴加入150~200μL硼氢化钠溶液(20mg溶解于200μL超纯水中)，室温下避光反应1h；

[0019] 反应液先用8KD的透析袋透析3~5次，再用30KD的超滤离心管7000~9000r·min⁻¹离心洗涤3~5次，每次15~20min，用5~10mL的0.01M，pH7.4的HEPES溶液复溶，后分装，-20℃低温保存，制得重金属铜人工抗原Cu-L₂-BSA或者Cu-L₂-OVA，L₂表示2-S-(3-氨基苯)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸

[0020] 合成路线为：



[0022] 采取紫外扫描和SDS-PAGE鉴定其偶联效果，采用ICP-MS法和Bradford法分别测定重金属离子和蛋白浓度，计算人工抗原的偶联结合比。

[0023] (2) 小鼠的免疫：

[0024] 选择健康的6~8周龄的雌性BALB/C小鼠进行免疫。将制备的重金属铜人工抗原Cu-L₂-BSA与等体积弗氏完全佐剂采用注射器加压充分混合乳化后，通过腹部和腋下多点注射。后每间隔21d(天)进行加强免疫，3次加强免疫后采血测定效价，效价采用间接ELISA方法测定。当效价不再明显升高时进行最后末免，末免3d后进行细胞融合。免疫过程中第一次免疫使用弗氏完全佐剂，加强免疫采用弗氏不完全佐剂，末免不使用佐剂，直接免疫原注射免疫。

[0025] (3) 细胞融合与细胞株筛选：

[0026] 通过聚乙二醇法将小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按照5~10:1的比例进行融合，HAT选择性培养基培养，间接ELISA检测阳性孔，并对阳性孔进一步利用间接竞争ELISA测定阳性细胞孔的抑制效果，随后对抑制效果好的阳性孔进行有限稀释法进行3~4

次克隆,最后用间接竞争ELISA法验证后筛选获得杂交瘤细胞株6F9。

[0027] 抗重金属铜离子单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0028] 在BALB/C小鼠腹腔注射降植烷0.3ml/只,7~10d(天)后同法注射筛选到的6F9单克隆细胞株细胞,待小鼠腹腔明显胀大后无菌操作抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水McAb;

[0029] 腹水纯化后,得到纯化单克隆抗体。

[0030] 进一步地,将杂环类双功能螯合剂L₂分别替换成2-S-(2-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为o-NH₂-Bn-NOTA)或者2-S-(4-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为p-NH₂-Bn-NOTA)或者2-S-[4-(3-氨基丙基)-苯]-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸,采用以上相同的制备方法可以制得不同的铜离子人工抗原、杂交瘤细胞株、抗重金属铜离子单克隆抗体。

[0031] 进一步地,将牛血清白蛋白BSA替换为钥孔血蓝蛋白KLH或者其他载体蛋白,采用以上相同的制备方法,可以制备不同的铜离子人工抗原、杂交瘤细胞株、单克隆抗体。

[0032] 本发明的有益效果是:

[0033] (1) 本发明采用杂环类双功能螯合剂m-NH₂-Bn-NOTA制备铜离子人工抗原,该螯合剂在结构上能更好的结合重金属离子,同时在空间结构上能更好地将重金属铜离子的结构展现出来,制备得到的铜离子人工抗原具有较强的特异性。

[0034] (2) 本发明制备得到的杂交瘤细胞株6F9能够分泌重金属铜离子单克隆抗体,该单克隆抗体特异性较强,对铜离子螯合剂复合物具有较好地灵敏度,IC₂₀值为0.14ng·mL⁻¹,能够用于快速检测重金属铜离子。该抗铜离子单克隆抗体可以用于环境样品中铜离子的残留检测。

附图说明

[0035] 图1为实施例1、2中铜离子人工抗原合成示意图(其中,Protein代表牛血清白蛋白BSA或者鸡卵清蛋白OVA)。

[0036] 图2为实施例3、4中铜离子人工抗原合成示意图(其中,Protein代表牛血清白蛋白BSA或者鸡卵清蛋白OVA)。

[0037] 图3为实施例5、6中铜离子人工抗原合成示意图(其中,Protein代表牛血清白蛋白BSA或者鸡卵清蛋白OVA)。

[0038] 图4为实施例7、8中铜离子人工抗原合成示意图(其中,Protein代表牛血清白蛋白BSA或者鸡卵清蛋白OVA)。

具体实施方式

[0039] 以下对本发明的技术方案做进一步详细说明,应当指出的是,具体实施方式只是对本发明的详细说明,不应视为对本发明的限定。

[0040] 本发明所用的杂环类双功能螯合剂用L表示,实施例中杂环类双功能螯合剂分别为:2-S-(2-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为o-NH₂-Bn-NOTA)用L₁表示,2-S-(3-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为m-NH₂-Bn-NOTA)用L₂表示,2-S-(4-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为p-NH₂-Bn-NOTA)用L₃表示,2-S-

[4-(3-氨基丙基)-苯]-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简称为p-CH₂CH₂CH₂NH₂-Bn-NOTA)用L₄表示,这些螯合剂均由商业途径购买得到。

[0041] 1. 杂环类双功能螯合剂铜离子人工抗原的制备和鉴定

[0042] 实施例1

[0043] (1) 铜离子人工抗原的合成:

[0044] 称取6mg L₁,溶解于2mL 0.01mol·L⁻¹、pH 7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液,制得L₁螯合剂溶液,此溶液为A液;

[0045] 称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中,制得浓度为7.5×10⁻²mol·L⁻¹的硝酸铜溶液,此溶液为B液;

[0046] 将180μL的B液加入到A液中,室温下避光反应3~5h,此反应液为C液;

[0047] 向C液中逐滴加入700μL,20mmol·L⁻¹的戊二醛水溶液,室温避光反应过夜,此反应液为D液;

[0048] 称取20mg牛血清白蛋白BSA溶解于3mL HEPES,室温下磁力搅拌混匀,此反应液为E液;

[0049] 将D液逐滴加入到E液中,室温下避光反应24h,后逐滴加入150~200μL硼氢化钠溶液(20mg硼氢化钠溶解于200μL超纯水中),室温下避光反应1h;

[0050] 反应液先用8KD的透析袋透析3~5次,再用30KD的超滤离心管7000~9000r·min⁻¹离心洗涤3~5次,每次15~20min,用5~10mL的0.01mol·L⁻¹、pH 7.4的HEPES溶液复溶,后分装,-20℃低温保存,制得重金属铜人工抗原Cu-L₁-BSA,L₁表示2-S-(2-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简称为o-NH₂-Bn-NOTA)。

[0051] (2) 铜离子人工抗原的鉴定:

[0052] 采取紫外扫描和SDS-PAGE鉴定其偶联效果,采用ICP-MS法和Bradford法分别测定重金属离子和蛋白浓度,计算人工抗原的偶联结合比。

[0053] 紫外扫描方案:BSA、Cu-L₁-BSA和Cu-L₁配制成浓度为1~5mg·mL⁻¹范围内的溶液,测定200~400nm波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0054] 紫外扫描图谱中,Cu-L₁-BSA溶液与BSA溶液相比,Cu-L₁-BSA溶液的最大吸收波长有变化,说明偶联成功。

[0055] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量10μL每孔,浓缩胶电压75V,分离胶电压100V,考马斯亮蓝染色1h,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0056] 经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0057] 通过测定重金属含量和偶联物蛋白浓度计算结合比为24:1。结合比为24:1,则表示一个蛋白分子上结合24个重金属离子。

[0058] 实施例2

[0059] (1) 铜离子人工抗原的合成:

[0060] 称取7mg L₁,溶解于2mL0.01mol·L⁻¹、pH 7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液,制得L₁螯合剂溶液,此溶液为A液;

[0061] 称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中,制得浓度为 $7.5 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸铜溶液,此溶液为B液;

[0062] 将195 μL 的B液加入到A液中,室温下避光反应3~5h,此反应液为C液;

[0063] 向C液中逐滴加入720 μL , $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛溶液,室温避光反应过夜,此反应液为D液;

[0064] 称取20mg鸡卵清蛋白OVA溶解于3mL HEPES,室温下磁力搅拌混匀,此反应液为E液;

[0065] 将D液逐滴加入到E液中,室温下避光反应24h,后逐滴加入150~200 μL 硼氢化钠溶液(20mg硼氢化钠溶解于200 μL 超纯水中),室温下避光反应1h;

[0066] 反应液先用8KD的透析袋透析3~5次,再用30KD的超滤离心管7000~9000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心洗涤3~5次,每次15~20min,用5~10mL的 $0.01 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 7.4的HEPES溶液复溶,后分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存,制得重金属铜人工抗原Cu-L₁-OVA,L₁表示2-S-(2-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为o-NH₂-Bn-NOTA)。

[0067] (2)人工抗原的鉴定:

[0068] 采取紫外扫描和SDS-PAGE鉴定其偶联效果,采用ICP-MS法和Bradford法分别测定重金属离子和蛋白浓度,计算人工抗原的偶联结合比。

[0069] 紫外扫描方案:OVA、Cu-L₁-OVA和Cu-L₁配制成浓度为1~5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内的溶液,测定200~400nm波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0070] 紫外扫描图谱中,Cu-L₁-OVA溶液与OVA溶液相比,最大吸收波长有变化,说明偶联成功。

[0071] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量10 μL 每孔,浓缩胶电压75V,分离胶电压100V,考马斯亮蓝染色1h,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0072] 经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0073] 通过测定重金属含量和偶联物蛋白浓度计算结合比为21:1。结合比为21:1,则表示一个蛋白分子上结合21个重金属离子。

[0074] 实施例3

[0075] 本实施例选用的杂环类双功能螯合剂为L₂,替换实施例1中的L₁;按照与实施例1相同的步骤制得铜离子人工抗原Cu-L₂-BSA,铜离子人工抗原合成路线如图2所示,具体合成步骤如下。

[0076] (1)铜离子人工抗原的合成:

[0077] 称取6mg L₂,溶解于2mL $0.01 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液,制得L₂螯合剂溶液,此溶液为A液;

[0078] 称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中,制得浓度为 $7.5 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸铜溶液,此溶液为B液;

[0079] 将180 μL 的B液加入到A液中,室温下避光反应3~5h,此反应液为C液;

[0080] 向C液中逐滴加入700 μL , $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛溶液,室温避光反应过夜,此反应液

为D液；

[0081] 称取20mg牛血清白蛋白BSA溶解于3mL HEPES,室温下磁力搅拌混匀,此反应液为E液；

[0082] 将D液逐滴加入到E液中,室温下避光反应24h,后逐滴加入150~200 μ L硼氢化钠溶液(20mg硼氢化钠溶解于200 μ L超纯水中),室温下避光反应1h；

[0083] 反应液先用8KD的透析袋透析3~5次,再用30KD的超滤离心管7000~9000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心洗涤3~5次,每次15~20min,用5~10mL的0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH7.4的HEPES溶液复溶,后分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存,制得重金属铜人工抗原Cu-L₂-BSA,L₂表示2-S-(3-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为m-NH₂-Bn-NOTA)。

[0084] (2)人工抗原的鉴定：

[0085] 采取紫外扫描和SDS-PAGE鉴定其偶联效果,采用ICP-MS法和Bradford法分别测定重金属离子和蛋白浓度,计算人工抗原的偶联结合比。

[0086] 紫外扫描方案:BSA、Cu-L₂-BSA和Cu-L₂配制成浓度为1~5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内的溶液,测定200~400nm波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0087] 紫外扫描图谱中,Cu-L₂-BSA溶液与BSA溶液相比,最大吸收波长有变化,说明偶联成功。

[0088] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量10 μ L每孔,浓缩胶电压75V,分离胶电压100V,考马斯亮蓝染色1h,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0089] 经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0090] 通过测定重金属含量和偶联物蛋白浓度计算结合比为46:1,偶联效率较高。结合比越高,说明一个蛋白分子上偶联重金属离子的数量越多,偶联效率也越高,结合比为46:1,则表示一个蛋白分子上结合46个重金属离子。

[0091] 实施例4

[0092] 本实施例选用的杂环类双功能螯合剂为L₂,替换实施例2中的L₁;按照与实施例2相同的步骤制得铜离子人工抗原Cu-L₂-OVA,铜离子人工抗原合成路线如图2所示,具体合成步骤如下。

[0093] (1)铜离子人工抗原的合成：

[0094] 称取7mg L₂,溶解于2mL 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液,制得L₂螯合剂溶液,此溶液为A液；

[0095] 称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中,制得浓度为7.5 $\times 10^{-2}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸铜溶液,此溶液为B液；

[0096] 将195 μ L的B液加入到A液中,室温下避光反应3~5h,此反应液为C液；

[0097] 向C液中逐滴加入720 μ L,20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛溶液,室温避光反应过夜,此反应液为D液；

[0098] 称取20mg鸡卵清蛋白OVA溶解于3mL HEPES,室温下磁力搅拌混匀,此反应液为E液；

[0099] 将D液逐滴加入到E液中,室温下避光反应24h,后逐滴加入150~200 μ L硼氢化钠溶液(20mg硼氢化钠溶解于200 μ L超纯水中),室温下避光反应1h;

[0100] 反应液先用8KD的透析袋透析3~5次,再用30KD的超滤离心管7000~9000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心洗涤3~5次,每次15~20min,用5~10mL的0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH7.4的HEPES溶液复溶,后分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存,制得重金属铜人工抗原Cu-L₂-OVA,L₂表示2-S-(3-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为m-NH₂-Bn-NOTA)。

[0101] (2)人工抗原的鉴定:

[0102] 采取紫外扫描和SDS-PAGE鉴定其偶联效果,采用ICP-MS法和Bradford法分别测定重金属离子和蛋白浓度,计算人工抗原的偶联结合比。

[0103] 紫外扫描方案:OVA、Cu-L₂-OVA和Cu-L₂配制成浓度为1~5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,测定200~400nm波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0104] 紫外扫描图谱中,Cu-L₂-OVA溶液与OVA溶液相比,最大吸收波长有变化,说明偶联成功。

[0105] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量10 μ L每孔,浓缩胶电压75V,分离胶电压100V,考马斯亮蓝染色1h,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0106] 经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0107] 通过测定重金属含量和偶联物蛋白浓度计算结合比为40:1,结合比为40:1则表示一个蛋白分子上结合40个重金属离子。

[0108] 实施例5

[0109] 本实施例选用的杂环类双功能螯合剂为L₃,替换实施例1中的L₁;按照与实施例1相同的步骤制得铜离子人工抗原Cu-L₃-BSA,铜离子人工抗原合成路线如图3所示,具体合成步骤如下。

[0110] (1)铜离子人工抗原的合成:

[0111] 称取6mg L₃,溶解于2mL 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液,制得L₃螯合剂溶液,此溶液为A液;

[0112] 称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中,制得浓度为7.5 $\times 10^{-2}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸铜溶液,此溶液为B液;

[0113] 将180 μ L的B液加入到A液中,室温下避光反应3~5h,此反应液为C液;

[0114] 向C液中逐滴加入700 μ L,20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛溶液,室温避光反应过夜,此反应液为D液;

[0115] 称取20mg牛血清白蛋白BSA溶解于3mL HEPES,室温下磁力搅拌混匀,此反应液为E液;

[0116] 将D液逐滴加入到E液中,室温下避光反应24h,后逐滴加入150~200 μ L硼氢化钠溶液(20mg硼氢化钠溶解于200 μ L超纯水中),室温下避光反应1h;

[0117] 反应液先用8KD的透析袋透析3~5次,再用30KD的超滤离心管7000~9000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心洗涤3~5次,每次15~20min,用5~10mL的0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH7.4的HEPES溶液复溶,后分

装, -20°C 低温保存, 制得重金属铜人工抗原 $\text{Cu-L}_3\text{-BSA}$, L_3 表示 2-S-(4-氨基苯)-1,4,7 三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸 (简称为 p-NH₂-Bn-NOTA)。

[0118] (2) 人工抗原的鉴定:

[0119] 采取紫外扫描和 SDS-PAGE 鉴定其偶联效果, 采用 ICP-MS 法和 Bradford 法分别测定重金属离子和蛋白浓度, 计算人工抗原的偶联结合比。

[0120] 紫外扫描方案: BSA、 $\text{Cu-L}_3\text{-BSA}$ 和 Cu-L_3 配制成浓度为 $1\sim 5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内的溶液, 测定 $200\sim 400\text{nm}$ 波长范围内的吸光度, 并建立紫外扫描图谱, 通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0121] 紫外扫描图谱中, $\text{Cu-L}_3\text{-BSA}$ 溶液与 BSA 溶液相比, 最大吸收波长有变化, 说明偶联成功。

[0122] SDS-PAGE 电泳方案: 选择体积分数为 5% 浓缩胶, 选择体积分数为 10% 分离胶, 上样量 $10\mu\text{L}$ 每孔, 浓缩胶电压 75V, 分离胶电压 100V, 考马斯亮蓝染色 1h, 脱色 4 次, 凝胶成像仪拍照分析。

[0123] 经 SDS-PAGE 显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象, 偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大, 说明偶联成功。

[0124] 通过测定重金属含量和偶联物蛋白浓度计算结合比为 39:1, 结合比为 39:1, 则表示一个蛋白分子上结合 39 个重金属离子。

[0125] 实施例 6

[0126] 本实施例选用的杂环类双功能螯合剂为 L_3 , 替换实施例 1 中的 L_1 ; 按照与实施例 2 相同的步骤制得铜离子人工抗原 $\text{Cu-L}_3\text{-OVA}$, 铜离子人工抗原合成路线如图 3 所示, 具体合成步骤如下。

[0127] (1) 铜离子人工抗原的合成:

[0128] 称取 7mg L_3 , 溶解于 $2\text{mL } 0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 HEPES 溶液, 制得 L_3 螯合剂溶液, 此溶液为 A 液;

[0129] 称取 70.33mg 硝酸铜溶解于 5mL 超纯水中, 制得浓度为 $7.5\times 10^{-2}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸铜溶液, 此溶液为 B 液;

[0130] 将 $195\mu\text{L}$ 的 B 液加入到 A 液中, 室温下避光反应 3~5h, 此反应液为 C 液;

[0131] 向 C 液中逐滴加入 $720\mu\text{L}$, $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的戊二醛溶液, 室温避光反应过夜, 此反应液为 D 液;

[0132] 称取 20mg 鸡卵清蛋白 OVA 溶解于 3mL HEPES, 室温下磁力搅拌混匀, 此反应液为 E 液;

[0133] 将 D 液逐滴加入到 E 液中, 室温下避光反应 24h, 后逐滴加入 $150\sim 200\mu\text{L}$ 硼氢化钠溶液 (20mg 硼氢化钠溶解于 $200\mu\text{L}$ 超纯水中), 室温下避光反应 1h;

[0134] 反应液先用 8KD 的透析袋透析 3~5 次, 再用 30KD 的超滤离心管 $7000\sim 9000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心洗涤 3~5 次, 每次 15~20min, 用 $5\sim 10\text{mL}$ 的 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 的 HEPES 溶液复溶, 后分装, -20°C 低温保存, 制得重金属铜人工抗原 $\text{Cu-L}_3\text{-OVA}$, L_3 表示 2-S-(4-氨基苯)-1,4,7 三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸 (简称为 p-NH₂-Bn-NOTA)。

[0135] (2) 人工抗原的鉴定:

[0136] 采取紫外扫描和 SDS-PAGE 鉴定其偶联效果, 采用 ICP-MS 法和 Bradford 法分别测定

重金属离子和蛋白浓度,计算人工抗原的偶联结合比。

[0137] 紫外扫描方案:OVA、Cu-L₃-OVA和Cu-L₃配制成浓度为1~5mg·mL⁻¹范围内的溶液,测定200~400nm波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0138] 紫外扫描图谱中,Cu-L₃-OVA溶液与OVA溶液相比,最大吸收波长有变化,说明偶联成功。

[0139] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量10μL每孔,浓缩胶电压75V,分离胶电压100V,考马斯亮蓝染色1h,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0140] 经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0141] 通过测定重金属含量和偶联物蛋白浓度计算结合比为36:1,结合比为36:1,则表示一个蛋白分子上结合36个重金属离子。

[0142] 实施例7

[0143] 本实施例选用的杂环类双功能螯合剂为L₄,替换实施例1中的L₁;按照与实施例1相同的步骤制得铜离子人工抗原Cu-L₄-BSA,铜离子人工抗原合成路线如图4所示,具体合成步骤如下。

[0144] (1) 铜离子人工抗原的合成:

[0145] 称取6mg L₄,溶解于2mL 0.01mol·L⁻¹、pH7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液,制得L₄螯合剂溶液,此溶液为A液;

[0146] 称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中,制得浓度为7.5×10⁻²mol·L⁻¹的硝酸铜溶液,此溶液为B液;

[0147] 将180μL的B液加入到A液中,室温下避光反应3~5h,此反应液为C液;

[0148] 向C液中逐滴加入700μL,20mmol·L⁻¹的戊二醛溶液,室温避光反应过夜,此反应液为D液;

[0149] 称取20mg牛血清白蛋白BSA溶解于3mL HEPES,室温下磁力搅拌混匀,此反应液为E液;

[0150] 将D液逐滴加入到E液中,室温下避光反应24h,后逐滴加入150~200μL硼氢化钠溶液(20mg溶解于200μL超纯水中),室温下避光反应1h;

[0151] 反应液先用8KD的透析袋透析3~5次,再用30KD的超滤离心管7000~9000r·min⁻¹离心洗涤3~5次,每次15~20min,用5~10mL的0.01mol·L⁻¹,pH7.4的HEPES溶液复溶,后分装,-20℃低温保存,制得重金属铜人工抗原Cu-L₄-BSA,L₄表示2-S-[4-(3-氨基丙基)-苯]-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简写为p-CH₂CH₂CH₂NH₂-Bn-NOTA)。

[0152] (2) 人工抗原的鉴定:

[0153] 采取紫外扫描和SDS-PAGE鉴定其偶联效果,采用ICP-MS法和Bradford法分别测定重金属离子和蛋白浓度,计算人工抗原的偶联结合比。

[0154] 紫外扫描方案:BSA、Cu-L₄-BSA和Cu-L₄配制成浓度为1~5mg·mL⁻¹范围内的溶液,测定200~400nm波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0155] 紫外扫描图谱中,Cu-L₄-BSA溶液与BSA溶液相比,最大吸收波长有变化,说明偶联成功。

[0156] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量10μL每孔,浓缩胶电压75V,分离胶电压100V,考马斯亮蓝染色1h,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0157] 经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0158] 通过测定重金属含量和偶联物蛋白浓度计算结合比为42:1,结合比为42:1,则表示一个蛋白分子上结合42个重金属离子。

[0159] 实施例8

[0160] 本实施例选用的杂环类双功能螯合剂为L₄,替换实施例1中的L₁;按照与实施例2相同的步骤制得铜离子人工抗原Cu-L₄-OVA,铜离子人工抗原合成路线如图4所示,具体合成步骤如下。

[0161] (1) 铜离子人工抗原的合成:

[0162] 称取7mg L₄,溶解于2mL 0.01mol·L⁻¹、pH 7.4 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES溶液,制得L₄螯合剂溶液,此溶液为A液;

[0163] 称取70.33mg硝酸铜溶解于5mL超纯水中,制得浓度为 7.5×10^{-2} mol·L⁻¹的硝酸铜溶液,此溶液为B液;

[0164] 将195μL的B液加入到A液中,室温下避光反应3~5h,此反应液为C液;

[0165] 向C液中逐滴加入720μL,20mmol·L⁻¹的戊二醛溶液,室温避光反应过夜,此反应液为D液;

[0166] 称取20mg鸡卵清蛋白OVA溶解于4mL HEPES,室温下磁力搅拌混匀,此反应液为E液;

[0167] 将D液逐滴加入到E液中,室温下避光反应24h,后逐滴加入150~200μl硼氢化钠溶液(20mg溶解于200μl超纯水中),室温下避光反应1h;

[0168] 反应液先用8KD的透析袋透析3~5次,再用30KD的超滤离心管7000~9000r·min⁻¹离心洗涤3~5次,每次15~20min,用5~10mL的0.01mol·L⁻¹,pH 7.4的HEPES溶液复溶,后分装,-20℃低温保存,制得重金属铜人工抗原Cu-L₄-OVA,L₄表示2-S-[4-(3-氨基丙基)-苯]-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(简称p-CH₂CH₂CH₂NH₂-Bn-NOTA)。

[0169] (2) 人工抗原的鉴定:

[0170] 采取紫外扫描和SDS-PAGE鉴定其偶联效果,采用ICP-MS法和Bradford法分别测定重金属离子和蛋白浓度,计算人工抗原的偶联结合比。

[0171] 紫外扫描方案:OVA、Cu-L₄-OVA和Cu-L₄配制成浓度为1~5mg·mL⁻¹范围内的溶液,测定200~400nm波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0172] 紫外扫描图谱中,Cu-L₄-OVA溶液与OVA溶液相比,最大吸收波长有变化,说明偶联成功。

[0173] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量10μL每孔,浓缩胶电压75V,分离胶电压100V,考马斯亮蓝染色1h,脱色4次,凝胶成像仪

拍照分析。

[0174] 经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0175] 通过测定重金属含量和偶联物蛋白浓度计算结合比为38:1,结合比为38:1,则表示一个蛋白分子上结合38个重金属离子。

[0176] 实施例9

[0177] 抗血清效价的测定:

[0178] 将实施例1、3、5和7制备的人工抗原分别对BALB/C小鼠进行免疫,初次免疫采用弗氏完全佐剂乳化人工抗原,乳化后,注射,计量为250 μg /小鼠,后每间隔21d加强免疫,共加强免疫3次,加强免疫采用不完全佐剂进行乳化,免疫计量为150 μg /小鼠,加强免疫14d后小鼠断尾采血进行多抗血清的效价测定,血清用封闭液倍比稀释后ELISA法测定抗血清效价,以免疫之前的小鼠血清为阴性对照,以阳性血清OD_{450nm}值与阴性血清OD_{450nm}值比值大于2.1所在稀释度为抗血清效价,结果如表1所示。最后进行末免,末免采用人工抗原直接腹腔注射的方式进行,免疫计量为300 μg /小鼠。

[0179] 效价测定采用间接ELISA方法,具体实验步骤如下:

[0180] a. 包被:分别以实施例2或者实施例4或者实施例6或者实施例8中的人工抗原为包被原,pH 9.6,0.05mol $\cdot\text{L}^{-1}$ CBS为包被缓冲液,包被原浓度为10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,包被量为100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 中包被2h,后PBST洗液洗板4次;

[0181] b. 封闭:加入封闭液250 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min后,PBST洗液洗板4次;

[0182] c. 加抗血清:将小鼠采血获得的抗血清10000r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min后,吸取10 μL 加入到2mL封闭液,(起始稀释倍数为200倍),后采用封闭液倍比稀释11个梯度和1个阴性对照,100 μL /孔,每个梯度4个重复,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,后采用PBST洗液洗板4次;

[0183] d. 加酶标二抗:反应结束后PBST洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗10000倍稀释后加入酶标板,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0184] e. 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min;

[0185] f. 终止读数:加入2mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸50 μL /孔,用酶标仪读取OD_{450nm}值。

[0186] 表1实施例1-8中的结合比与抗血清效价测定结果

[0187]

免疫抗原	结合比	检测抗原	结合比	抗血清效价
Cu-L ₁ -BSA实施例1	24:1	Cu-L ₁ -OVA实施例2	21:1	256000
Cu-L ₂ -BSA实施例3	46:1	Cu-L ₂ -OVA实施例4	40:1	650000
Cu-L ₃ -BSA实施例5	39:1	Cu-L ₃ -OVA实施例6	36:1	550000
Cu-L ₄ -BSA实施例7	42:1	Cu-L ₄ -OVA实施例8	38:1	600000

[0188] 由表1的结合比与抗血清效价测定结果表明,抗血清效价高低顺序为:实施例3>实施例7>实施例5>实施例1,结合比高低顺序为:实施例3>实施例7>实施例5>实施例1,其中,实施例3的抗血清效价最高,实施例7的抗血清效价仅低于实施例3。这说明实施例3中制备的铜离子人工抗原Cu-L₂-BSA能更好的把重金属抗原决定簇表现出来,抗原特异性较强,同时实施例3和实施例7所制备的人工抗原其结合比较高,高结合比更容易引发强烈的免疫应答反应,有利于制备抗重金属铜离子单克隆抗体。

[0189] 实施例1、3、5、7采用的具体制备方法、测定方法相同,但是,采用的双功能螯合剂不同,分别为:o-NH₂-Bn-NOTA,m-NH₂-Bn-NOTA,p-NH₂-Bn-NOTA,p-CH₂CH₂CH₂NH₂-Bn-NOTA。这说明螯合剂中-NH₂处于苯环的间位,螯合剂m-NH₂-Bn-NOTA结合重金属离子后,在空间结构上能更好地将重金属铜离子的结构展现出来,而且从实验结果看,间位结构制备的人工抗原的结合比也最高,作为抗原决定簇,更有利于制备亲和力和灵敏度更高、特异性更强的抗重金属单克隆抗体。

[0190] 实施例10

[0191] 杂交瘤细胞株的筛选和单克隆抗体的制备纯化

[0192] (1) 小鼠免疫:

[0193] 选择6~8周龄、体重18~20g BALB/C雌性小鼠。将制备的免疫原(此处免疫原采用的是:铜离子人工抗原Cu-L₂-BSA)与等体积弗氏完全佐剂采用注射器加压充分混合乳化后,通过腹部和腋下多点注射,剂量为50~100μg/只,后每间隔21d进行加强免疫,3次加强免疫后采血测定效价,效价采用间接ELISA方法测定,血清用封闭液倍比稀释后ELISA法测定抗血清效价,以免疫之前的小鼠血清为阴性对照,以阳性血清OD_{450nm}值与阴性血清比值大于2.1所在稀释度为抗血清效价。当效价不再明显升高时进行末免,末免3d后进行细胞融合。免疫过程中第一次免疫使用弗氏完全佐剂,加强免疫采用弗氏不完全佐剂,末免不使用佐剂,直接免疫原注射免疫。

[0194] 效价测定采用间接ELISA方法,具体实验步骤如下:

[0195] a. 包被:以Cu-L₂-OVA为包被原,pH 9.6,0.05mol·L⁻¹CBS为包被缓冲液,包被原浓度为10μg·mL⁻¹,包被量为100μL/孔,37℃中包被2h后,PBST洗液洗板4次;

[0196] b. 封闭:加入封闭液250μL/孔,37℃孵育30min后,PBST洗板4次,每孔加PBST 300μL,后PBST洗液洗板4次;

[0197] c. 加抗血清:将小鼠采血获得的抗血清10000r·min⁻¹离心5min后,吸取10μL加入到2mL封闭液(起始稀释倍数为200倍),后采用封闭液倍比稀释11个梯度和1个阴性对照,100μL/孔,每个梯度4个重复,37℃孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0198] d. 加酶标二抗:反应结束后洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗10000倍稀释后加入酶标板,100μL/孔,37℃孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0199] e. 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液,100μL/孔,37℃孵育15min;

[0200] f. 终止读数:加入2mol·L⁻¹硫酸50μL/孔,用酶标仪读取OD_{450nm}值。

[0201] (2) 细胞融合及培养:

[0202] 在末免3d后,按照常规聚乙二醇(PEG1500)方法进行细胞融合,具体步骤如下:

[0203] a. 末免后的小鼠眼球放血,血清收集后离心吸上清备用,拉颈处死后置于70%酒精中3~5min,无菌条件下取小鼠脾脏,用无菌手术剪剪碎后置入无菌碾钵中碾磨,用RPMI-1640基础培养基吹悬细胞后,过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,并进行细胞计数;

[0204] b. 收集SP2/0细胞(骨髓瘤细胞),要求细胞生长状态佳,细胞活性大于90%,吸去细胞上清后加入新的RPMI-1640基础培养基并将细胞吹打悬浮,后进行细胞计数;

[0205] c. 根据细胞计数结果,将脾细胞与SP2/0细胞按照5~10:1的比例混合后,1800r·min⁻¹离心5min后吸去上清,剩余细胞加入0.5mL PEG在1min内边加边轻轻搅拌混匀,加完后静置1min后由慢到快加入RPMI-1640基础培养基45mL,后1500r·min⁻¹离心5min后去上清,

加入选择性HAT培养基后铺板于96孔细胞培养板,每孔250 μ L,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的培养箱中培养。

[0206] d. 培养3~5d(天)后,用HAT培养基换液1次,第10d换为HT培养基培养。

[0207] (3) 细胞筛选与细胞株建立:

[0208] 待融合细胞生长到覆盖培养孔10%~30%孔底面积时,取上清用间接ELISA筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原为Cu-L₂-OVA交联物,并以OVA、BSA作阴性对照。筛选出的阳性反应孔进一步用竞争ELISA分析抗体的检测灵敏度。

[0209] 根据建立的标准曲线,计算IC₅₀值和IC₂₀值,选取标准曲线斜率范围(横坐标为铜离子标准品浓度的自然对数,纵坐标为抑制率建立的竞争标准曲线)在8~13之间,IC₅₀值低于200ng \cdot ml⁻¹,IC₂₀值低于20ng \cdot ml⁻¹的细胞株进行进一步的克隆和筛选,用有限稀释法连续克隆3~4次,最终获得一株杂交瘤细胞株6F9,其保藏编号为CGMCC No.16388。相对来说,IC₂₀数值较低,IC₅₀数值较低的细胞株的抑制效果较好,有利于制备特性较佳的杂交瘤细胞株。

[0210] 该杂交瘤细胞株6F9已于2018年09月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:中国科学院微生物研究所,北京市朝阳区北辰西路1号院3号,邮编100101)。

[0211] 最终获得的杂交瘤细胞株6F9经扩大培养后,一方面将该细胞株移入细胞冻存管并放入液氮中长期保存,另一方面将该细胞株用于腹水制备、单克隆抗体的纯化和应用。

[0212] (3) 单克隆抗体的制备、纯化和鉴定

[0213] 采用动物体内诱生法制备单克隆抗体。

[0214] 选择6~8周龄健康BALB/C雌性小鼠,在BALB/C小鼠腹腔注射降植烷0.3mL/只,7~10d后同法注射筛选到的6F9单克隆细胞株细胞(0.4mL/只,每mL细胞株数量在 $2.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 之间),5~7d后待小鼠腹腔明显胀大后抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水McAb。

[0215] 腹水采用辛酸-硫酸铵法初步纯化后,过亲和层析柱(填料为TOSOH公司生产的TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F)进一步纯化,用紫外分光光度计分别测定纯化单克隆抗体的紫外260nm和280nm的光密度,用Lowry-kalokar公式计算单克隆抗体浓度为2.43mg \cdot ml⁻¹,其余纯化的单克隆抗体-70 $^{\circ}$ C保存备用。

[0216] 腹水纯化具体步骤如下:

[0217] 1) 将腹水用60mmol \cdot L⁻¹pH 4.0的醋酸盐缓冲溶液按1:4体积比稀释,用0.1mol \cdot L⁻¹NaOH调节pH值至4.5;

[0218] 2) 磁力搅拌下按照33 μ l \cdot ml⁻¹腹水的比例滴加辛酸,后室温下搅拌30min,于4 $^{\circ}$ C静置2h,后10000r \cdot min⁻¹离心30min;

[0219] 3) 上清用定性滤纸过滤后,按照1:10(PBS:过滤后的上清)比率加入0.1mol \cdot L⁻¹PBS,用1mol \cdot L⁻¹NaOH调节pH至7.4,置于4 $^{\circ}$ C 30min;

[0220] 4) 在磁力搅拌下按照0.277g \cdot ml⁻¹(硫酸铵:混合液)比率分批加入硫酸铵,加完后搅拌反应30min,4 $^{\circ}$ C静置3h,12000r \cdot min⁻¹离心30min,弃上清;

[0221] 5) 沉淀用少量0.01mol \cdot L⁻¹PBS溶解后置于透析袋中,用pH 7.4,0.01mol \cdot L⁻¹的PBS透析,中间换液4~6次;

[0222] 6) 初步纯化的单克隆抗体溶液过Protein A (TOYOPEARL AF-rProtein AHC-650F) 亲和层析柱进行纯化,纯化后将抗体进行冷冻干燥后于-70℃保存备用。

[0223] 实施例11

[0224] 单克隆抗体间接竞争ELISA方法的建立

[0225] 单克隆抗体工作浓度测定采用正交试验进行,具体实验步骤如下:

[0226] 1) 包被:以pH 9.6,0.05mol·L⁻¹CBS为包被缓冲液,Cu-L₂-OVA为包被原,包被量按照10μg·mL⁻¹开始倍比稀释,包被体积为100μL/孔,37℃孵育2h后,PBST洗液洗板4次;

[0227] 2) 封闭:加入封闭液250μL/孔,37℃孵育30min后,PBST洗液洗板4次;

[0228] 3) 加样:加入纯化后的单克隆抗体,按照10μg·mL⁻¹开始倍比稀释后加入包被孔中,100μL/孔,37℃反应1h后,PBST洗液洗板4次;

[0229] 4) 加酶标二抗:反应结束后洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗用封闭液10000倍稀释后加入酶标板,100μL/孔,37℃反应1h后,PBST洗液洗板4次;

[0230] 5) 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液,100μL/孔,37℃孵育15min;

[0231] 6) 终止读数:加入2mol·L⁻¹硫酸50μL/孔,酶标仪读取OD_{450nm}值。

[0232] 7) 选取OD_{450nm}值在1.0-1.2区间的抗原抗体浓度组合为工作浓度,选取4个

[0233] 工作浓度组合,其抗原、抗体的浓度组合分别为(0.625μg·mL⁻¹,5μg·mL⁻¹)、

[0234] (1.25μg·mL⁻¹,2.μg·mL⁻¹)、(2.5μg·mL⁻¹,1.25μg·mL⁻¹)和(5μg·mL⁻¹,

[0235] 0.625μg·mL⁻¹),采用间接竞争ELISA法选定的4个工作浓度组合进行灵敏

[0236] 度分析筛选,结果见表2,通过建立的标准曲线斜率、IC₅₀值和标准曲线r值

[0237] 等参数进行综合评价,确定最佳的工作浓度为抗原包被浓度1.25μg·mL⁻¹,

[0238] 抗体浓度为2.5μg·mL⁻¹。

[0239] 表2工作浓度分析结果

工作浓度组合 (μg·mL ⁻¹) (抗原, 抗体)	IC ₅₀ (ng·mL ⁻¹)	IC ₂₀ (ng·mL ⁻¹)	r
0.625, 5	66.3	5.4	0.9889
1.25, 2.5	21.2	0.14	0.9976
2.5, 1.25	53.0	4.6	0.9897
5, 0.625	81.2	7.3	0.9925

[0241] 使用间接ELISA测定纯化单克隆抗体对铜离子螯合剂复合物的分析灵敏度IC₂₀为0.14ng·mL⁻¹,这说明制备得到的抗重金属铜离子单克隆抗体对铜离子有很高的检测灵敏度和很好的特异性,能够用于快速检测重金属铜离子。

[0242] 间接竞争ELISA具体步骤如下:

[0243] a. 包被:以pH 9.6,0.05mol·L⁻¹CBS为包被缓冲液,Cu-L₂-OVA为包被原,包被体积为100μL/孔,包被浓度为前述筛选的最佳工作浓度,37℃孵育2h后,PBST洗液洗板4次;

[0244] b. 封闭:加入封闭液250μL/孔,37℃孵育30min后,PBST洗液洗板4次;

[0245] c. 样品前处理:5mmol·L⁻¹ 2-S-(2-氨基苯)-1,4,7三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸即L₁与不同浓度梯度重金属铜离子标样等体积混匀,37℃孵育1h;

[0246] d. 加样:加入预混好的样品50 μ L/孔,加入两倍最佳工作浓度一抗(即以上实施例10制备的抗铜离子单克隆抗体)50 μ L/孔,震荡混匀后37 $^{\circ}$ C反应1h后,PBST洗液洗板4次;

[0247] e. 加酶标二抗:反应结束后,洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗用封闭液10000倍稀释后加入酶标板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应1h后,PBST洗液洗板4次;

[0248] f. 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育15min;

[0249] g. 终止读数:加入2mol \cdot L⁻¹硫酸50 μ L/孔,酶标仪读取OD_{450nm}值。

[0250] 溶液配制:

[0251] 碳酸盐缓冲液(CBS):称取Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃ 2.93g,加入纯水至990mL,调pH至9.6,再用纯水定容至1000mL,4 $^{\circ}$ C贮存备用。

[0252] 磷酸缓冲液(PBS):8.5g NaCl,2.2g Na₂HPO₄ \cdot 12H₂O,0.2g NaH₂PO₄ \cdot 2H₂O,溶于900mL纯水中,调pH至7.4,定容至1000mL。

[0253] PBST洗液:取500mL 0.01mol \cdot L⁻¹PBS,加入0.25mL吐温20,混匀备用。

[0254] 封闭液:1g脱脂奶粉溶解于50mL pH 7.4,0.01mol \cdot L⁻¹PBS。

[0255] TMB底物缓冲液由A液,B液和C液组成,具体配方和使用体积比如下:

[0256] 显色液A:2.35g柠檬酸,9.2g Na₂HPO₄ \cdot 12H₂O,加纯水定容至490mL,调节pH值5.0~5.4,再用纯水定容至500mL,4 $^{\circ}$ C贮存备用。

[0257] 显色液B:取30%双氧水1.25mL,用纯水定容至50mL,4 $^{\circ}$ C贮存备用。

[0258] 显色液C:取200mg四甲基联苯胺(TMB)溶解于100ml无水乙醇中,溶解后4 $^{\circ}$ C贮存备用。

[0259] TMB底物缓冲液使用前临时配用,配用比率为A液9.5mL,B液42 μ L,C液0.5mL,混匀后使用。

[0260] 羊抗鼠HRP标记酶标二抗购自于Sigma公司。

[0261] 实施例12

[0262] 水样样品中添加回收率的实验

[0263] 对实际样品进行添加回收实验,分别以自来水,湖泊水为实验对象,重金属铜离子的添加浓度分别为10ng \cdot mL⁻¹和50ng \cdot mL⁻¹,样品前处理步骤为:

[0264] 湖泊水样:湖泊水先用定性滤纸过滤后,添加铜离子标准溶液,自来水直接添加铜离子标准溶液,添加后铜离子最终浓度为10ng \cdot mL⁻¹和50ng \cdot mL⁻¹,添加混匀后,分别吸取100 μ L混匀后的自来水、湖泊水样品与5mmol \cdot L⁻¹L₂等体积预混,后每孔加入50 μ L上述预混合后的自来水、湖泊水样品到反应孔中,3个重复孔,再加入50 μ L两倍最佳工作浓度的一抗(即以上实施例10制备的抗铜离子单克隆抗体),混匀后置于37 $^{\circ}$ C孵育。后续实验步骤与上述实施例11中间接竞争ELISA反应步骤一致。自来水、湖泊水样品中添加回收率实验结果见表4。

[0265] 表4水样样品添加回收率结果

铜离子添加 浓度 (ng \cdot mL ⁻¹)	湖泊水平均 回收率(%)	变异系数 (%)	自来水平均 回收率(%)	变异系数 (%)
[0266]				

[0267]	10	103.6%	6.6	98.5%	6.4
	50	95.8%	7.9	102.4%	7.0

[0268] 由添加回收率实验可以得出检测结果的准确度,以上的添加回收率值可以说明采用此方法测得的检测结果准确度较高,而且检测结果变异系数低,说明检测结果稳定性好。这说明制备得到的抗重金属铜离子单克隆抗体能够用于快速、准确地检测重金属铜离子。

[0269] 上述实施例10-12中,将人工抗原Cu-L₂-BSA替换为Cu-L₁-BSA,包被原Cu-L₂-OVA替换为Cu-L₁-OVA,或者将人工抗原Cu-L₂-BSA替换为Cu-L₃-BSA,包被原Cu-L₂-OVA替换为Cu-L₃-OVA,或者将人工抗原Cu-L₂-BSA替换为Cu-L₄-BSA,包被原Cu-L₂-OVA替换为Cu-L₄-OVA,采用以上相同的制备方法可以制得不同的杂交瘤细胞株、抗重金属铜离子单克隆抗体以及使用间接竞争ELISA方法对铜离子进行检测。

[0270] 上述实施例1-12中,将其中的牛血清白蛋白BSA替换成钥孔血蓝蛋白KLH或者其他载体蛋白,采用以上相同的制备方法,也可以制备铜离子人工抗原、杂交瘤细胞株、单克隆抗体以及使用间接ELISA对铜离子进行检测。

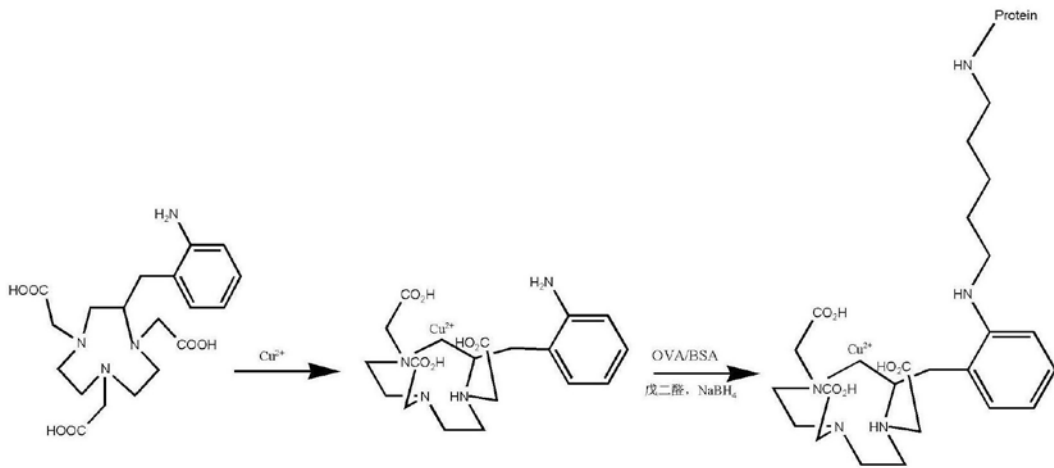


图1

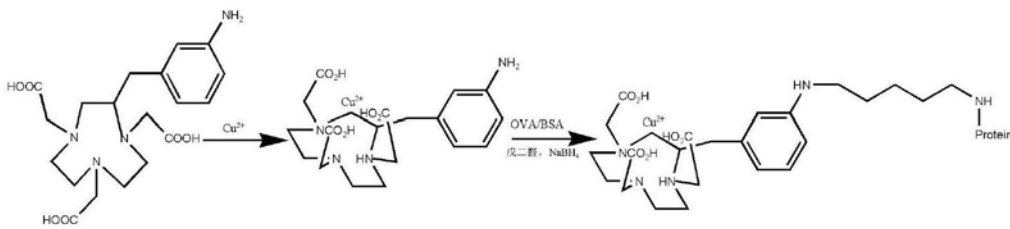


图2

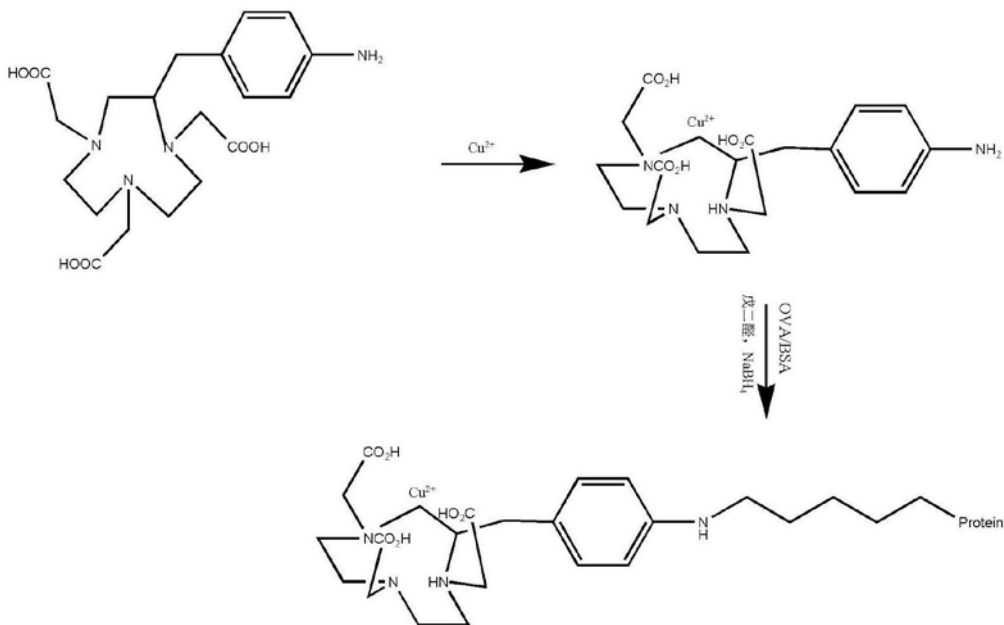


图3

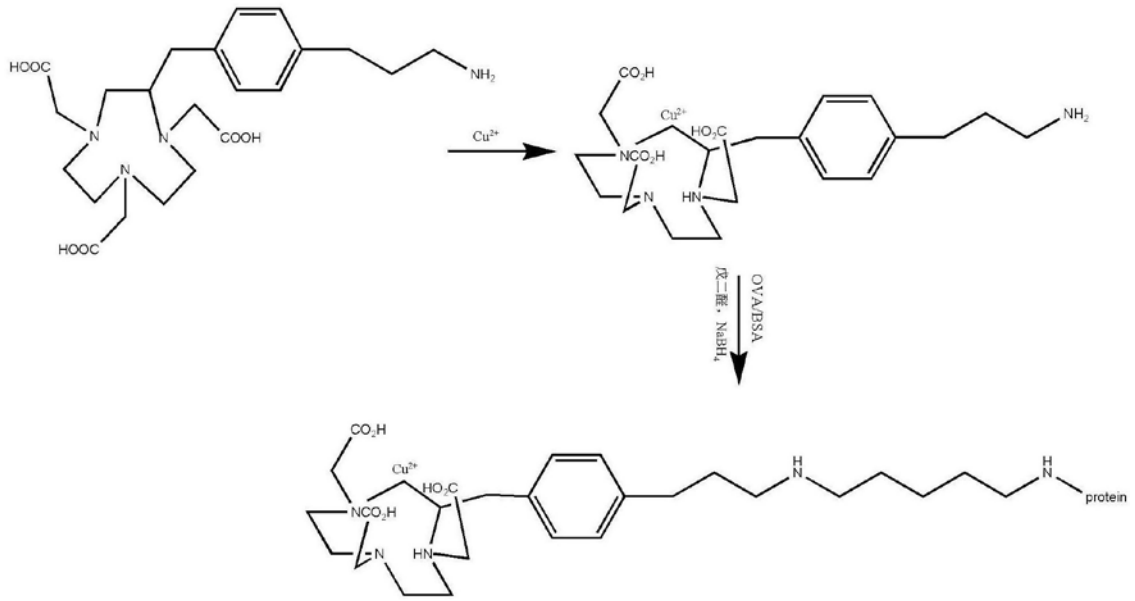


图4

专利名称(译)	一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用		
公开(公告)号	CN110408600A	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201811506878.7	申请日	2018-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
[标]发明人	金仁耀 郭建军		
发明人	金仁耀 郭建军		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/53 C12R1/91		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/35 C07K2317/92 G01N33/5308 G01N33/577		
代理人(译)	向庆宁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一株分泌抗重金属铜离子单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用；该杂交瘤细胞株能够分泌抗重金属铜离子单克隆抗体，本发明还提供了杂交瘤细胞株的制备方法，和抗重金属铜离子单克隆抗体的制备方法；本发明制备得到的单克隆抗体特异性较强，对铜离子具有较好地灵敏度，IC₂₀值为0.14ng·mL⁻¹，能够用于快速检测重金属铜离子。该抗铜离子单克隆抗体可以用于环境样品中铜离子的残留检测。

