

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510060994.7

[51] Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年5月20日

[11] 授权公告号 CN 100488983C

[22] 申请日 2005.10.8

[21] 申请号 200510060994.7

[73] 专利权人 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所

地址 200232 上海市徐汇区石龙路 345 弄 3 号

共同专利权人 上海大学  
中华人民共和国上海出入境检验检疫局

[72] 发明人 王 权 陈 沁 龚朋飞 郭德华  
李 健 顾惠明 陈永军 陈燕军

[56] 参考文献

农药及其代谢物的酶免疫分析技术. 李治祥, 黄士忠. 农业环境保护, 第 17 卷第 6 期. 1998

孔雀石绿单克隆抗体的制备及其检测试剂盒的初步研制. 龚朋飞, 第 11.20 页. 2005

审查员 于 群

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司  
代理人 冯子玲

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称

无色孔雀石绿完全抗原与单克隆抗体制备技术

[57] 摘要

本发明公开了一种无色孔雀石绿完全抗原与单克隆抗体制备技术, 涉及无色孔雀石绿在生物体内的快速检测。由于无色孔雀石绿无与蛋白偶联的基团, 无法用竞争性酶联免疫法 (ELISA) 批量检测, 为了快速检测孔雀石绿在水产品体内残留, 本发明先合成硝基无色孔雀石绿并还原, 纯化, 获氨基无色孔雀石绿, 再与兔白蛋白偶联成无色孔雀石绿完全抗原; 用其免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞与 SP2/0 进行了细胞的融合, 采用二步法进行阳性克隆的筛选, 经过多次的亚克隆, 获得稳定分泌抗无色孔雀石绿的单克隆抗体。

1、无色孔雀石绿完全抗原制备方法，其特征在于下述步骤：

A、以 N、N 二甲基苯胺为原料，按 1:3~4 摩尔量比加入对硝基甲醛，合成硝基无色孔雀石绿；

B、硝基无色孔雀石绿按摩尔量比加入 10 倍量的 2M HCl、5~8 倍的金属粉末，还原为氨基无色孔雀石绿；

C、将氨基无色孔雀石绿溶液滴加于碱溶液中，析出沉淀，沉淀物为纯化的氨基无色孔雀石绿；

D、按每 100mg 纯化的氨基无色孔雀石绿溶解于 6ml 0.3mol/L HCl 的比例，将纯化的氨基无色孔雀石绿搅拌溶解，然后在冰浴搅拌条件下缓慢加入 1%NaNO<sub>2</sub>，使氨基无色孔雀石绿重氮化，取淀粉—碘化钾溶液滴于白色干燥波片，滴加一滴上述重氮化溶液，混合后 30 秒内呈现蓝黑色，即为完成氨基无色孔雀石绿的重氮化；

E、上述重氮化的氨基无色孔雀石绿继续反应 20 分钟，称取 4 倍于氨基无色孔雀石绿重量的兔白蛋白，溶于碳酸盐缓冲液成 2%蛋白溶液，在冰浴搅拌条件下缓慢加入重氮化的氨基无色孔雀石绿溶液，边加边用 0.01mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5~8.0，获氨基无色孔雀石绿与兔白蛋白的偶联物 NLMG—RSA，置 4℃冰箱中过夜后，于 4℃条件下用 0.1mol/L pH7.2 的 PBS 透析三天，每天换透析液三次，分装、冻干后，-20° C 保存。

## 无色孔雀石绿完全抗原与单克隆抗体制备技术

### 技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及水产品检测技术，具体涉及无色孔雀石绿在生物体内的快速检测。

### 背景技术

无色孔雀石绿 (Leucomalachite green, LMG) 是孔雀石绿 (malachite green, MG) 在生物体内主要代谢残留物，对人类有致癌危险。

孔雀石绿又称为苯胺绿、维多利亚绿或中国绿，是一种具有金属光泽的绿色晶体，溶于水、乙醇和甲醇，水溶液的颜色为蓝绿色（最大吸收波长为 618nm），最早在 1913 年有人发现孔雀石绿等染料可使某些组织着色，可破坏病原菌而不引起宿主损害，从而使这些染料用作防腐剂、杀锥虫药和其它医疗作用。自磺胺类药物和其它抗菌素的出现，孔雀石绿作为抗菌素在畜牧业中的应用已日渐衰退。然而在水产养殖中由于价格低廉和抗菌、抗真菌效果好，广泛用于进行水体消毒和防止鱼水霉病。

近年来发现孔雀石绿特别是其代谢物在水产品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。我国农业部发布的《无公害食品 中华绒螯蟹》(NY5064-2001) 和农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》文件（农牧发[2002]1 号）中明确规定所有可食组织中禁用孔雀石绿。

《2000 年度中国出口动物源性食品中有毒有害物质残留监控计划》首次将鳗鱼中孔雀石绿项目的监控列入年度计划，并延续至今。试验证实孔雀石绿在动物体内 8 小时后 50% 转变为无色孔雀石绿，24 小时后 84% 转变成无色孔雀石绿，而长期滞留在组织中。国内外检测 MG 主要采用以色谱技术 (HPLC) 检测技术，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是免疫学主流技术，快速、成本低、可以大批量检测以蛋白类检测物为目标的产品，而无色孔雀石绿无与蛋白偶联的基团，不能形成完全抗原用于制备特异性抗体，无法用竞争性酶联免疫法 (ELISA) 批量检测，国内外无该技术报道。为了建立快速检测孔雀石绿在水产品体内残留的技术，无色孔雀石绿完全抗原及单克隆抗体成功地制备成为关键。

### 发明内容

由于无色孔雀石绿无与蛋白偶联的基团，因而本发明先合成硝基无色孔雀石绿并还原、纯化，获氨基无色孔雀石绿。并与蛋白偶联成完全抗原，免疫 BALB/C 小鼠，制备单克隆抗

体。

1、无色孔雀石绿完全抗原的制备过程包括下述步骤：

A、以 N、N 二甲基苯胺为原料，按 1:3~4 摩尔量比加入对硝基甲醛，合成硝基无色孔雀石绿；

B、硝基孔雀石绿按摩尔量比加入 10 倍量的稀 HCl、5~8 倍的金属粉末，还原为氨基无色孔雀石绿；

C、将氨基无色孔雀石绿溶液滴加于碱溶液中，析出沉淀，沉淀物为纯化的氨基无色孔雀石绿；

D、按每 100mg 纯化的氨基无色孔雀石绿溶解于 6ml 0.3mol/L HCl 的比例，将纯化的氨基孔雀石绿搅拌溶解，然后在冰浴搅拌条件下缓慢加入 1%NaNO<sub>2</sub>，使氨基孔雀石绿重氮化，取淀粉-碘化钾溶液滴于白色干燥波片，滴加一滴上述重氮化溶液，混合后 30 秒内呈现蓝黑色，即为完成氨基孔雀石绿的重氮化；

E、上述重氮化的氨基无色孔雀石绿继续反应 20 分钟，称取 4 倍于氨基无色孔雀石绿重量的兔白蛋白 (RSA)，溶于碳酸盐缓冲液成 2%蛋白溶液，在冰浴搅拌条件下缓慢加入重氮化的氨基无色孔雀石绿溶液，边加边用 0.01mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5~8.0，获氨基无色孔雀石绿与兔白蛋白的偶联物 (NLMG—RSA)，置 4° C 冰箱中过夜后，于 4° C 条件下用 0.1mol/L pH7.2 的 PBS 透析三天，每天换透析液三次，分装、冻干后，-20° C 保存。

2、无色孔雀石绿单克隆抗体的制备过程包括下述步骤：

A、NLMG—RSA 免疫小鼠；

B、免疫小鼠脾细胞与 SP20 骨髓瘤细胞以 2~5: 1 混合，1 分钟内加入 50%PEG 融合，90 秒之内加入 30~40ml 的 1640 培养液，静置 10 分钟，离心，细胞用含 HAT 和小鼠腹腔巨噬细胞的含血清 1640 培养液重悬后加入 96 孔培养板孔，置 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37°C 培养，5 天后用含 HAT 的 1640 完全培养液换液培养，10 天后用含 HT 的 1640 完全培养液换液培养，以后改为 1640 完全培养液培养。

C、NLMG—OVA 包被酶标板，筛选阳性克隆的杂交瘤细胞；

D、阳性克隆的杂交瘤细胞移植降植烷处理的 BALB/C 鼠制备单克隆抗体。

所述氨基孔雀石绿与兔白蛋白的偶联物 (NLMG—RSA) 被取样后，用紫外分光光度计检测其纯度，在 190~600nm 的波长下分别对氨基无色孔雀石绿、载体蛋白以及经过透析的偶联物进行扫描，以制定氨基孔雀石绿与载体的偶联比。

上述用 NLMG—RSA 免疫小鼠的具体操作为：选择 3 月龄，30 g 左右的 BALB/c 小鼠，首免用 NLMG-RSA 溶于 0.1mol/L PH7.4 PBS，与等体积的完全福氏佐剂混匀，150 μg NLMG-RSA/鼠，足垫皮内注射 0.1mL，2 周后，用 NLMG-RSA 加等体积的不完全福氏佐剂混匀，

250  $\mu$ g NLMG-RSA/鼠皮下注射，再过2周同量肌肉注射，第四次尾静脉注射。

上述步骤C筛选阳性克隆的杂交瘤细胞采用的是二步筛选法：首先标记单个克隆或二个克隆（细胞克隆相互分开）的细胞培养孔，包被NLMG—OVA以筛选所有标记孔；2天后，将疑似阳性克隆（P/N>2.1）用NLMG—OVA、OVA、进行第二次筛选，对检测出特异性抗体阳性孔的细胞，及时转种并进行克隆化。

上述步骤D制备单克隆抗体的具体操作是：取7周的BALB/c小鼠，用降植烷0.5 ml/只，7天后腹腔接种用无血清培养基或生理盐水稀释的处于对数生长期的杂交瘤细胞，每只小鼠注射细胞数为 $5 \times 10^6$ 个，间隔4天后，每天观察小鼠腹水产生情况，待小鼠腹部膨大，精神变差，濒死不动时，采集腹水，离心，取上清，测定效价，分装， $-70^\circ\text{C}$ 冻存备用，用硫酸铵沉淀法加DEAE纤维素柱脱盐纯化。

#### 附图说明

图1为硝基隐性孔雀石绿薄层和还原产物薄层层析图：

图中A为硝基隐性孔雀石绿薄层层析图：1、对硝基苯甲醛；2、合成产物；3、N，N-二甲基苯胺（合成）。B为硝基隐性孔雀石绿的还原薄层层析图：4、硝基隐性孔雀石绿；5、氨基隐性孔雀石绿（还原）。

图2为产物红外光谱图：

图中A为硝基隐性孔雀石绿红外光谱图，出现了硝基特征峰1342；B为氨基隐性孔雀石绿红外光谱图，出现了氨基的氢特征峰3353.3和3433.1。

图3为氨基隐性孔雀石绿、兔白蛋白及偶联物紫外扫描图：

图中A为氨基隐性孔雀石绿紫外扫描图；图中B为兔白蛋白紫外扫描图；图中C为氨基隐性孔雀石绿-兔白蛋白偶联物紫外扫描图。

图4为无色孔雀石绿的标准抑制曲线，图中的纵坐标为抑制率=OD（加入LMG）/OD（未加入LMG）横坐标为LMG溶液浓度的对数。

#### 具体实施方式

以下提供较为详细的技术操作过程：

（1）硝基无色孔雀石绿合成：对硝基甲醛10克，N、N-二甲基苯胺30ml 搅拌加热回流，获硝基无色孔雀石绿24.0克。

（2）硝基无色孔雀石绿还原：硝基无色孔雀石绿1克加入20ml 2M HCl再加锌粉末1克获氨基无色孔雀石绿0.80克。

（3）氨基无色孔雀石绿纯化：将氨基无色孔雀石绿溶液滴加于碱溶液析出氨基孔雀石绿沉淀。

（4）氨基无色孔雀石绿重氮化：称取50mg氨基无色孔雀石绿溶于3 ml 0.3mol/L HCl，

不断搅拌溶解,在冰浴中条件下,缓慢加入1%  $\text{NaNO}_2$ ,边加边搅拌。同时检测 $\text{NaNO}_2$ 反应是否过量。检测方法是:取一滴淀粉-碘化钾溶液于白色干燥玻璃上,然后取一滴重氮化溶液,加入并与之混合,30秒内混合液变蓝黑色表明已经重氮化。

(5) 氨基无色孔雀石绿与蛋白偶联:上述溶液继续在 $4^\circ\text{C}$ 以下反应20分钟,称取兔白蛋白200mg溶于10 ml的0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液,在冰浴中条件下,一边搅拌一边慢慢加入重氮化溶液。用0.01mol/L NaOH调pH值至7.5~8.0,然后放 $4^\circ\text{C}$ 冰箱中反应,过夜。偶联混合液装入透析袋中,于 $4^\circ\text{C}$ 下,用0.1 mol/L PBS(pH 7.2)透析3天,每天换三次透析液。取样用紫外分光光度计检测其纯度,并将偶联物小瓶分装,冷冻干燥,储存于 $-20^\circ\text{C}$ 备用。在190到600nm的波长下分别对氨基无色孔雀石绿、载体蛋白以及经过透析的偶联物进行扫描,来计算氨基无色孔雀石绿与载体蛋白偶联比。

(6) 动物免疫:选择3月龄,30 g左右的BALB/c小鼠4只。首免用NLMG-RSA溶于0.1mol/L pH7.4 PBS,与完全福氏佐剂混匀,150  $\mu\text{g}$  NLMG-RSA/鼠,足垫皮内注射0.1mL。2周后,用NLMG-RSA加不完全福氏佐剂混匀,250  $\mu\text{g}$  NLMG-RSA/鼠皮下注射,再过2周,同上肌肉注射,第四次300  $\mu\text{g}$  NLMG-RSA/鼠尾静脉注射。

单抗制备过程:

无菌取 BALB/c 鼠脾细胞与 SP20 骨髓瘤细胞,以 2~5:1 混合,1 分钟内加入 50% PEG 融合,90 秒内加入 30ml 1640 培养液静置 10 分钟,离心,离心沉淀物加入含 HAT 和小鼠腹腔巨噬细胞的有血清 1640 培养液,96 孔培养,NLMG—OVA 包被酶标板 筛选阳性克隆,移植降植烷处理的 BALB/c 鼠制备抗体、鉴定。

采用二步筛选法:首先标记单个克隆或二个克隆(细胞克隆相互分开)的细胞培养孔,先用NLMG—OVA包被96孔酶标板以筛选所有标记孔;2天后,将疑似阳性克隆(P/N>2.1)用NLMG—OVA、OVA、进行第二次筛选。对检测出特异性抗体阳性孔的细胞,应及时转种并进行亚克隆。

(7) 腹水的制备与纯化

取7周的BALB/c小鼠,用降植烷0.5 ml/只。7天后腹腔接种用无血清培养基或生理盐水稀释的处于对数生长期的杂交瘤细胞。每只小鼠注射细胞数为 $5 \times 10^6$ 个。间隔4天后,每天观察小鼠腹水产生情况。待小鼠腹部膨大,精神变差,濒死不动时,用16号针头无菌采集腹水。将腹水离心,上清液即为无色孔雀石绿单克隆抗体,ELISA测定效价为1:20000,分装, $-70^\circ\text{C}$ 冻存备用。

硫酸铵沉淀法加DEAE纤维素柱将上述无色孔雀石绿单克隆抗体脱盐纯化。

为验证本发明效果的可靠性,进行以下鉴定:

1、化学产物经红外扫描分析见图2:

在红外扫描图中比较合成物硝基无色孔雀石绿（图 2.A）和氨基无色孔雀石绿（NLMG）（图 2.B）与无色孔雀石绿（LMG），发现硝基无色孔雀石绿出现了硝基特征峰 1342 和氨基无色孔雀石绿（NLMG）出现氨基的氧特征峰 3353.3 和 3433.1，三者的其它峰是一致的，说明合成的物质与目标半抗原相符。

#### 2、偶联物鉴定：

所得的偶联物进行紫外扫描分析见图 2，A 和 B 分别是偶联前的半抗原和载体，C 是偶联后经过纯化的偶联物，偶联特征峰发生漂移，说明偶联成功。

#### 3、单抗针对药物决定簇的鉴定：

部分强阳性孔上清 1:6 稀释 用 NLMG—OVA、OVA 分别包被酶标板进行 ELISA 再筛选，其中有一孔 NLMG—OVA 偶联物的 OD 值是载体的 20 倍左右，说明该克隆的产生的抗体是针对药物决定簇的，特异性较强。该克隆命名为 5E9。

表 1：用 NLMG—OVA、OVA 分别包被酶标板对部分强阳性克隆分泌抗体进行 ELISA 筛选的结果

克隆名		5E9	4C12	6B11	3B8
包被物					
OM	OD	1.791	0.236	0.241	0.319
O	450	0.084	0.060	0.077	0.229
OM	OD	大于 3.0	0.493	0.491	0.639
O	490	0.122	0.074	0.117	0.470

#### 4、单克隆抗体特异性鉴定：

用系列稀释的孔雀石绿、无色孔雀绿、硝基孔雀石绿、结晶紫、副品红、甲基兰、氯霉素，做间接竞争 ELISA：包被抗原(NLMG—OVA)，100 $\mu$ l/孔，4 $^{\circ}$ C作用过夜；洗板 3 次，加入 200 $\mu$ l 含 1%明胶封闭，37 $^{\circ}$ C 2h，洗板 3 次；加入 50 $\mu$ l 药物稀释液和 50 $\mu$ l 单克隆抗体稀释液(1:16000)，37 $^{\circ}$ C 2h，洗板 3 次，加入 1:1000 稀释的 HRP 标记羊抗兔抗体，37 $^{\circ}$ C 2h，加底物反应，15min 后终止反应，检测 OD490。分别作抑制曲线，根据拟合曲线计算半数抑制率，然后计算药物的交叉反应率（交叉反应性=产生 50%抑制时 LMG 的浓度/产生 50%抑制时的其它药物的浓度），见表 2。5E9 细胞株产生的抗体除了孔雀石绿和其代谢物无色孔雀石绿外，对几种结构和用途相似的药物基本无交叉反应性。合成原药 NLMG 抑制效果最明显，其 IC<sub>50</sub>达到 6.4 ng/ml；LMG 和 MG 的 IC<sub>50</sub>分别为 25.7 和 70.3 ng/ml。可见此抗体在很大程度上能同时进行 MG 及其代谢物 LMG 的检测。

表 2: 与 8 种结构或作用类似药的交叉性

药物	交叉反应 (%)
无色孔雀绿	100
孔雀石绿	36.56
副品红	< 0.02
结晶紫	< 0.06
甲基兰	< 0.02
氯霉素	< 0.02
己烯雌酚	< 0.02
四环素	< 0.02

5. 5E9 单克隆抗体实用性的鉴定, 即运用该抗体探索建立检测 LMG 竞争 ELISA, 并进行相关参数计算

以 NLMG-OVA 1ug/ml 100μl/孔包被酶标板, 将 LMG 作  $1 \times 10^3$  至  $1 \times 10^{-4}$  作倍比为 10 的稀释, 具体方法同上, 根据以下公式计算抑制率和标准差、定量限。结果及相关参数见表 3,

表 3: 竞争 ELISA 结果及相关参数

LMG 标准液浓度 (ug/ml)	10	1	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	0
LMG 浓度对数	1	0	-1	-2	-3	-4	-5	
OD 均值 (B)	0.0825	0.216	0.49	0.7595	0.917	0.9965	1.068	1.288
抑制率 (B/B <sub>0</sub> )	0.0641	0.1677	0.3804	0.5897	0.712	0.7737	0.8292	1
标准差 (SD)	0.006	0	0.0099	0.0007	0.0113	0.0007	0.0453	0.0523
变异系数 (CV%)	7.7139	0	2.0203	0.0931	1.2338	0.071	4.2373	4.0626

抑制率=OD (加入 LMG) /OD (未加入 LMG)

标准差 (SD) =  $[\sum (X - X_i)^2 / (n-1)]^{1/2}$ ;

检测下限 (LOD) 为 (B-3SD) 相对应的无色孔雀石绿浓度的值;

定量限 (LOQ) 为 (B-10SD) 相对应的无色孔雀石绿浓度的值。

从图 4 可看到 0.0016—1 μg/ml 范围内 (B/B<sub>0</sub>) 与 LMG 浓度的对数值呈一元二次曲线关系, 回归曲线方程为  $Y = -0.0139X^2 - 0.1928X + 0.2282$ , 相关系数为  $r = 0.9848$ ; 半数抑制浓度为 25.7 ng/ml; 用 B<sub>0</sub>-3SD 外推法经计算灵敏度为 0.0023 μg/ml。定量检测 LMG 的范围为: 0.955-10000 ng/ml。试验结果表明该 5E9 单克隆抗体能用于建立检测 LMG 竞争 ELISA。

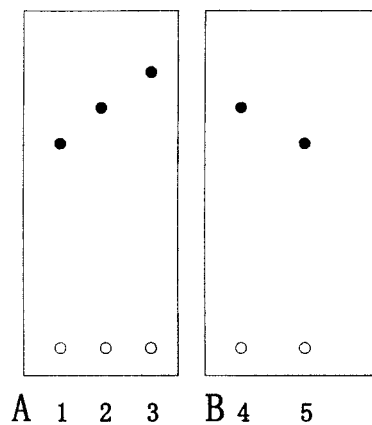


图 1

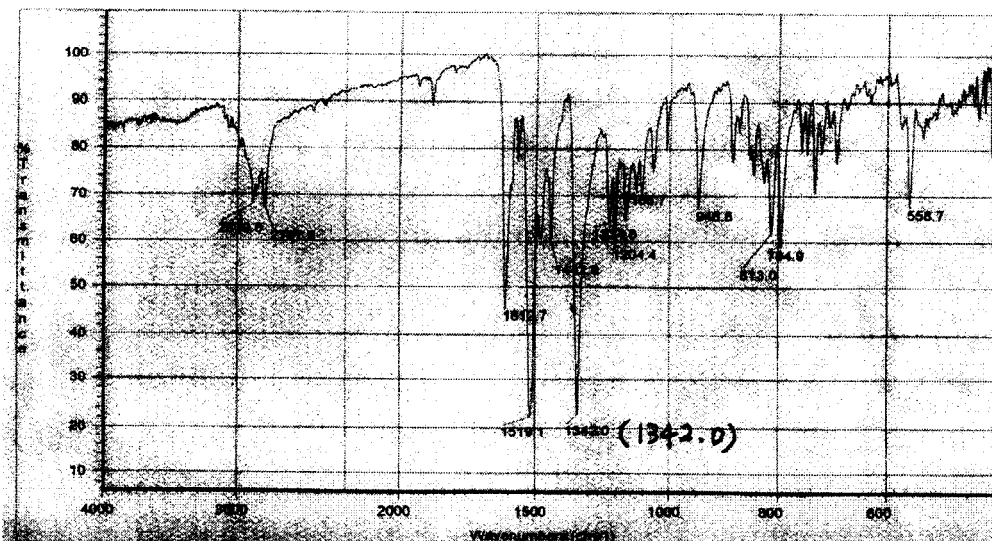


图 2

A

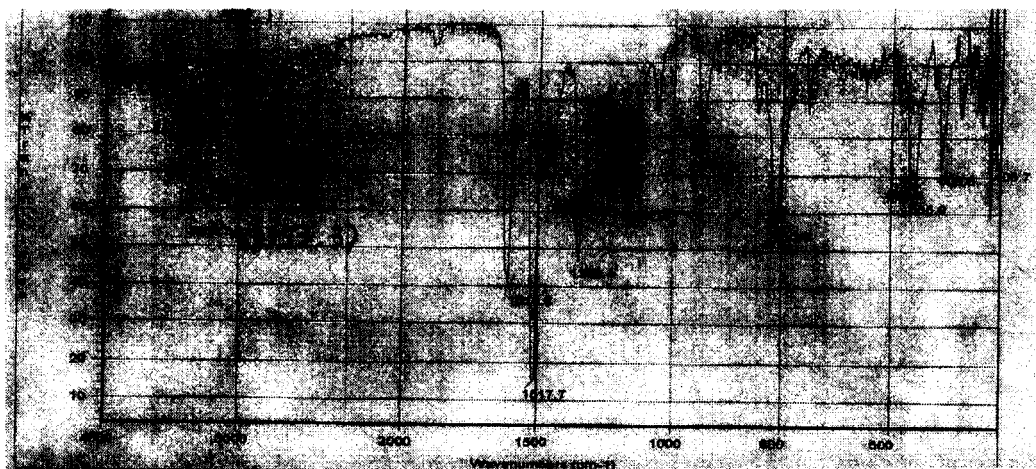


图 2

B

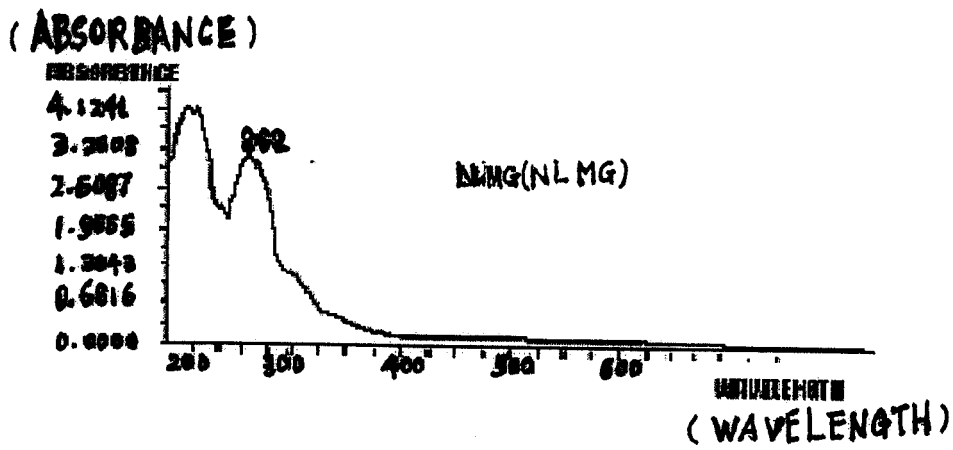


图3 A

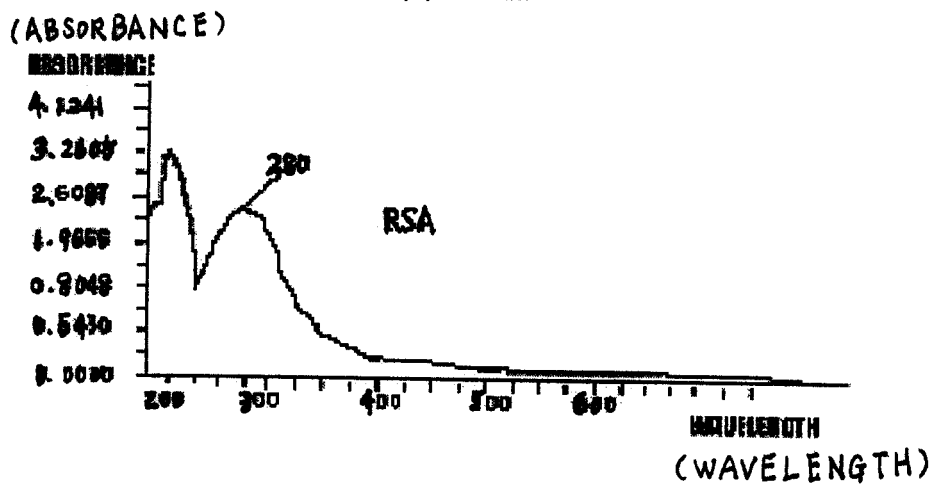


图3 B

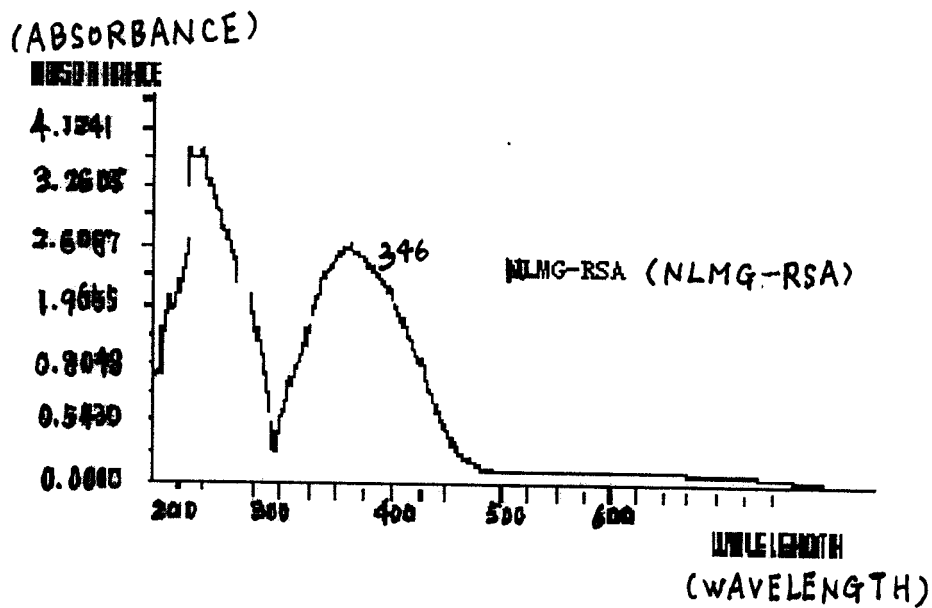


图3 C

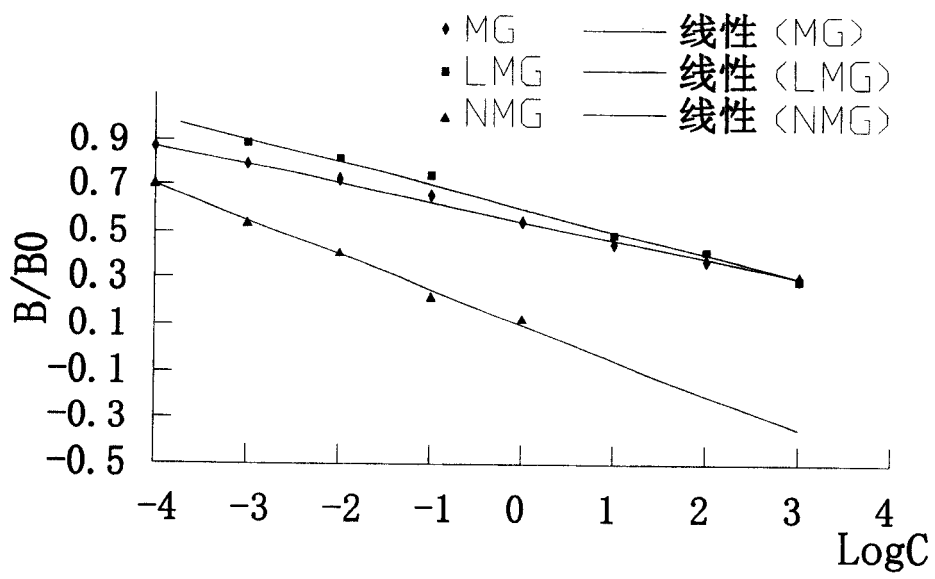


图 4

专利名称(译)	无色孔雀石绿完全抗原与单克隆抗体制备技术		
公开(公告)号	<a href="#">CN100488983C</a>	公开(公告)日	2009-05-20
申请号	CN200510060994.7	申请日	2005-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所 上海大学 中华人民共和国上海出入境检验检疫局		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所 上海大学 中华人民共和国上海出入境检验检疫局		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所 上海大学 中华人民共和国上海出入境检验检疫局		
[标]发明人	王权 陈沁 龚鹏飞 郭德华 李健 顾惠明 陈永军 陈燕军		
发明人	王权 陈沁 龚鹏飞 郭德华 李健 顾惠明 陈永军 陈燕军		
IPC分类号	C07K16/00 C07K16/18 C12N5/18 G01N33/577 G01N33/531		
审查员(译)	于群		
其他公开文献	CN1944461A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种无色孔雀石绿完全抗原与单克隆抗体制备技术，涉及无色孔雀石绿在生物体内的快速检测。由于无色孔雀石绿无与蛋白偶联的基团，无法用竞争性酶联免疫法(ELISA)批量检测，为了快速检测孔雀石绿在水产品体内残留，本发明先合成硝基无色孔雀石绿并还原，纯化，获氨基无色孔雀石绿，再与兔白蛋白偶联成无色孔雀石绿完全抗原；用其免疫的BALB/c小鼠的脾细胞与SP2/0进行了细胞的融合，采用二步法进行阳性克隆的筛选，经过多次的亚克隆，获得稳定分泌抗无色孔雀石绿的单克隆抗体。

