



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107121552 A

(43)申请公布日 2017.09.01

(21)申请号 201710260804.9 *G01N 33/535*(2006.01)
(22)申请日 2017.04.20 *G01N 21/78*(2006.01)
(83)生物保藏信息 *G01N 21/31*(2006.01)
CGMCC No.13090 2016.10.31 *C07K 16/44*(2006.01)
(71)申请人 江南大学
地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号江南大学食品学院
(72)发明人 匡华 郭玲玲 胥传来 徐丽广
马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲
(74)专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104
代理人 时旭丹 张仕婷
(51)Int.Cl.
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

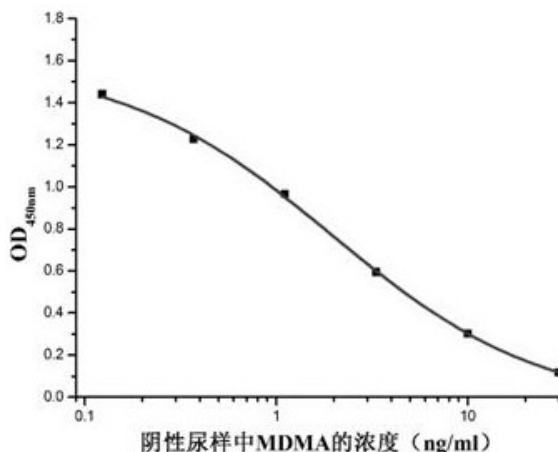
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一株分泌3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺单抗的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3及其应用

(57)摘要

一株分泌3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺单抗的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3及其应用,属于免疫检测技术领域。本发明一株能特异性分泌3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺(MDMA)单克隆抗体的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3,已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,保藏编号为CGMCC No.13090。本发明在小鼠血清筛选和细胞株筛选的过程中均采用尿样基质,已得到可以耐受尿样基质,且特异性识别3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺(MDMA)的单克隆抗体,用于尿样中MDMA的检测,可以满足目前市场上对尿液中MDMA免疫检测产品的需求。



1. 一株能特异性分泌3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3,已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,保藏编号为CGMCC No.13090。

2. 3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺单克隆抗体,其特征在于:它由所述保藏编号为CGMCC No.13090的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3分泌产生。

3. 权利要求2所述3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺单克隆抗体的应用,其特征在于:其在小鼠血清筛选和细胞株筛选中均采用尿样基质,已得到可以耐受尿样基质,且特异性识别3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺的单克隆抗体,用于尿样中3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺的检测。

一株分泌3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺单抗的杂交瘤细胞株 ZY-2G5-3及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株分泌3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺单抗的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3及其应用,涉及摇头丸单克隆抗体的制备方法,以及尿样中3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺(MDMA)的间接竞争酶联免疫检测方法的测定,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 摇头丸是新型人工合成毒品的一种,一般以MDMA(3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺)、MDA(4,5-亚甲基二氧基苯丙胺)、AM(苯丙胺)及MAM(甲基苯丙胺)为主要有效成分。摇头丸同阿片类毒品一样,具有很强的精神依赖性,不论用何种方法脱毒,半年内复吸率仍高达95%以上。

[0003] 在毒品的检测中,国内外主要采用免疫层析法,酶联免疫吸附法(ELISA),PCR,放射性免疫等方法对尿液、血液、组织以及毛发等样本进行检测。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于制备一种能够特异性分泌MDMA单克隆抗体的细胞株,建立检测MDMA的免疫学检测方法。

[0005] 本发明的技术方案:一株能特异性分泌3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺(MDMA)单克隆抗体的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3,已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,保藏编号为CGMCC No.13090。

提供的MDMA杂交瘤细胞株ZY-2G5-3的制备方法,采用MDMA与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物MDMA-BSA作为免疫原,与弗氏佐剂混合均匀后,通过皮下注射免疫BALB/c小鼠;用MDMA与鸡蛋清白蛋白(OVA)的偶联物MDMA-OVA作为包被抗原,运用间接竞争酶联免疫检测法(ic-ELISA)对小鼠血清和细胞上清进行筛选。将免疫小鼠的脾细胞通过PEG方法与小鼠骨髓瘤细胞融合,经过间接ELISA和间接竞争ELISA筛选和三次亚克隆,得到一株能特异性分泌MDMA抗体的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3。基本步骤为:

(1) 动物免疫与效价测定:采用MDMA与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物MDMA-BSA作为免疫原,采用小剂量短周期方案免疫健康BALB/c小鼠,首次免疫用100 μ g 偶联抗原与等量弗氏完全佐剂混匀后进行皮下注射,间隔3周后,再用100 μ g 偶联抗原与等量弗氏不完全佐剂加强免疫,此后每隔3周用半量偶联抗原加强免疫一次;冲刺免疫剂量减半,与等体积的生理盐水混合后采用腹腔免疫。用MDMA与鸡蛋清白蛋白(OVA)的偶联物MDMA-OVA作为包被抗原,通过间接竞争ELISA检测血清效价和抑制;

其具体ELISA 程序如下:

1) 包被:将包被抗原用0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液梯度稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育2h。

[0006] 2) 洗涤:将板内溶液倾去,每孔注入200 μ L PBST溶液,置于摇床上振荡3min,甩干,洗涤3次。以下洗涤方法相同。

[0007] 3) 封闭: 拍干后, 加入200 μ L /孔封闭液, 37 $^{\circ}$ C孵育2h。洗涤后烘干备用。

[0008] 4) 加样: 酶标板上半部分加入阴性尿样, 50 μ L/孔(上半部分称为0标), 下半部分加入不同浓度的用阴性尿样稀释的MDMA标准品, 将抗血清从1:1000开始梯度稀释, 50 μ L/孔(下半部分称为加标), 上下部分对应加入不同稀释梯度包被抗原的孔中, 37 $^{\circ}$ C孵育30min; 充分洗涤后, 加入1:3000稀释的鼠二抗, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C孵育30min, 洗涤后拍干。

[0009] 5) 显色: 将酶标板取出, 充分洗涤后, 每孔加入100 μ L的显色液(TMB与底物液体积比例1:5), 37 $^{\circ}$ C避光反应15min。

[0010] 6) 终止和测定: 取出酶标板, 每孔加入50 μ L终止液(2mol/L的硫酸)终止反应, 然后用酶标仪测定各孔的吸光值OD₄₅₀。

[0011] 7) 结果判读: 以OD₄₅₀值大于或等于阴性血清对照孔的2.1倍(即P/N \geq 2.1)所对应的血清最高稀释倍数即为血清的ELISA效价。上下部分对照, 加标OD₄₅₀值为0标一半的即是所加的标准品浓度。

[0012] (2) 细胞融合与筛选: 在冲击免疫三天后, 按照常规PEG(聚乙二醇, 分子量为1450)方法进行细胞融合, 具体步骤如下:

a、无菌取小鼠脾脏, 研磨并通过200目细胞筛网得到脾细胞悬液, 并进行细胞计数;

b、收集SP2/0细胞, 悬浮于RPMI-1640基础培养液中, 进行细胞计数;

c、将脾细胞和SP2/0细胞按照10:1(数量比)的比例混合, 离心后用50% PEG融合, 时间1min, 之后按照从慢到快, 加入RPMI-1640基础培养液, 离心后悬浮于含20% 胎牛血清、2%的50 \times HAT的RPMI-1640筛选培养液中, 加到96孔细胞培养板, 置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养。在细胞融合的第三天对融合细胞进行RPMI-1640筛选培养液半换液, 第6天进行用含20%胎牛血清、1%的100 \times HT的RPMI-1640过渡培养液进行全换液, 在第9天取细胞上清进行筛选。

[0013] 筛选分两步: 第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔, 第二步选用含MDMA的尿样标准品, 用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选出对MDMA具有较好抑制的孔, 采用有限稀释法进行亚克隆, 用同样的方法进行检测。重复三次, 即可得到能稳定分泌MDMA单克隆抗体的细胞株。

[0014] (3) 单克隆抗体的制备与鉴定: 取8-10周龄BALB/c小鼠, 每只小鼠腹腔注射石蜡油1 mL; 7天后每只小鼠腹腔注射1 \times 10⁶杂交瘤细胞, 从第七天开始收集腹水, 将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化, 获得的单抗置于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0015] 生物材料样品保藏: 一株能特异性分泌3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3, 分类命名为单克隆细胞株, 已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, 地址为: 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, 保藏日期2016年10月31日, 保藏编号为CGMCC No.13090。

[0016] 本发明的有益效果: 本发明获得了能够分泌MDMA单克隆抗体且耐受尿样基质的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3, 其在小鼠血清筛选和细胞株筛选中均采用尿样基质, 已得到可以耐受尿样基质, 且特异性识别3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺的单克隆抗体, 用于尿样中3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺的检测, 可以满足目前市场上对尿液中MDMA免疫检测产品的需求。

附图说明

[0017] 图1该单克隆抗体在尿样基质中的标准曲线。

具体实施方式

[0018] 本发明下面的实施例仅作为本发明内容的进一步说明,不能作为本发明的限定内容或范围。下面通过实施例对本发明作进一步说明。

[0019] 本发明通过将完全抗原免疫小鼠,通过细胞融合,HAT选择性培养基培养,通过间接ELISA和间接竞争ELISA筛选细胞上清,采用阴性尿样作为基质,最终得到了具有较好灵敏度且耐受尿样的MDMA单克隆抗体。

[0020] 实施例1 MDMA单克隆抗体的制备

1、动物免疫:采用MDMA与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物MDMA-BSA作为免疫原,选择健康的6~8周龄的BALB/c小鼠进行免疫。取免疫原与等体积弗氏完全佐剂混合均匀后,通过皮下注射免疫BALB/c小鼠,每只100 μ g;每间隔21天,采用免疫原与等体积弗氏不完全佐剂进行加强免疫,三免后7~10天采血,使用间接竞争ELISA方法测定小鼠血清效价和抑制,选择抑制最好的小鼠,在四免后21天冲击免疫,不使用佐剂,腹腔注射。用MDMA与鸡蛋清白蛋白(OVA)的偶联物MDMA-OVA作为包被抗原,通过间接竞争ELISA检测血清效价和抑制;

其具体ELISA 程序如下:

1) 包被:将包被抗原用0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液梯度稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0021] 2) 洗涤:将板内溶液倾去,每孔注入200 μ L PBST溶液,置于摇床上振荡3min,甩干,洗洗涤3次。以下洗涤方法相同。

[0022] 3) 封闭:拍干后,加入200 μ L /孔封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育2h。洗涤后烘干备用。

[0023] 4) 加样:酶标板上半部分加入阴性尿样,50 μ L/孔(上半部分称为0标),下半部分加入不同浓度的用阴性尿样稀释的MDMA标准品,将抗血清从1:1000开始梯度稀释,50 μ L/孔(下半部分称为加标),上下部分对应加入不同稀释梯度包被抗原的孔中,37 $^{\circ}$ C孵育30min;充分洗涤后,加入1:3000稀释的鼠二抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min,洗涤后拍干。

[0024] 5) 显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100 μ L的显色液(TMB与底物液体积比例1:5),37 $^{\circ}$ C避光反应15min。

[0025] 6) 终止和测定:取出酶标板,每孔加入50 μ L终止液(2mol/L的硫酸)终止反应,然后用酶标仪测定各孔的吸光值OD₄₅₀。

[0026] 7) 结果判读:以OD₄₅₀值大于或等于阴性血清对照孔的2.1倍(即P/N \geq 2.1)所对应的血清最高稀释倍数即为血清的ELISA效价。上下部分对照,加标OD₄₅₀值为0标一半的即是所加的标准品浓度。

[0027] 2、细胞融合:在冲击免疫三天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量为1450)方法进行细胞融合,具体步骤如下:

(1) 无菌取小鼠脾脏,研磨并通过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,并进行细胞计数;

(2) 收集SP2/0细胞,悬浮于RPMI-1640基础培养液中,进行细胞计数;

(3) 将脾细胞和SP2/0细胞按照10:1(数量比)的比例混合,离心后用50% PEG融合,时间1 min,之后按照从慢到快,加入RPMI-1640基础培养液,离心后悬浮于含20% 胎牛血清、2%的50 \times HAT的RPMI-1640筛选培养液中,加到96孔细胞培养板,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养。

[0028] 3、细胞筛选与细胞株建立：在细胞融合的第三天对融合细胞进行RPMI-1640筛选培养液半换液，第6天进行用含20% 胎牛血清、1%的100×HT的RPMI-1640过渡培养液进行全换液，在第9天取细胞上清进行筛选。

[0029] 筛选分两步：第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔，第二步选用含MDMA的尿样为标准品，用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选出对MDMA具有较好抑制的孔，采用有限稀释法进行亚克隆，用同样的方法进行检测。重复三次，即可得到能稳定分泌MDMA单克隆抗体的细胞株。

[0030] 4、单克隆抗体的制备与鉴定：取8-10周龄BALB/c小鼠，每只小鼠腹腔注射石蜡油1 mL；7天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 杂交瘤细胞，从第七天开始收集腹水，将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化，获得的单抗置于-20℃保存。

[0031] 使用间接竞争ELISA和间接ELISA，测定单克隆抗体对MDMA的半数抑制率 IC_{50} 为1.96ng/mL；可以用于尿样中MDMA的检测。

[0032] 该单克隆抗体在尿样基质中的标准曲线如图1所示。

[0033] 综上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并非用来限定本发明的实施范围。即凡依本发明专利申请范围的内容所作的等效变化与修饰，都应为本发明的技术范畴。

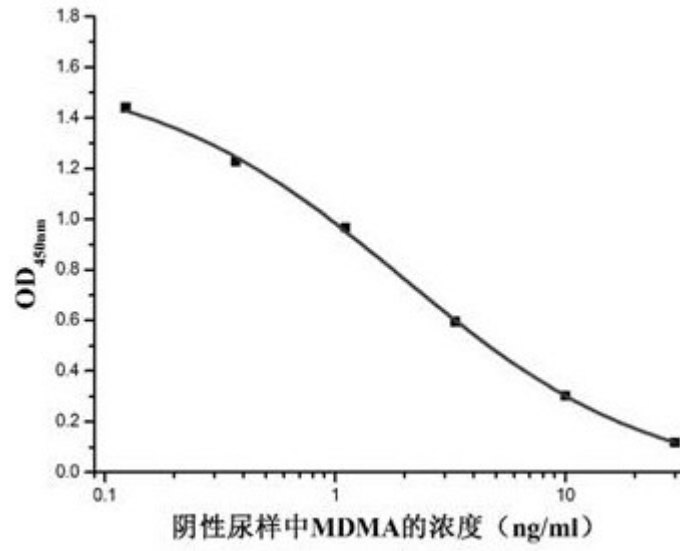


图1

专利名称(译)	一株分泌3,4 - 亚甲基二氧甲基苯丙胺单抗的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3及其应用		
公开(公告)号	CN107121552A	公开(公告)日	2017-09-01
申请号	CN201710260804.9	申请日	2017-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	匡华 郭玲玲 胥传来 徐丽广 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
发明人	匡华 郭玲玲 胥传来 徐丽广 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/78 G01N21/31 C07K16/44		
CPC分类号	C07K16/44 G01N21/31 G01N21/78 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
其他公开文献	CN107121552B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一株分泌3,4 - 亚甲基二氧甲基苯丙胺单抗的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3及其应用,属于免疫检测技术领域。本发明一株能特异性分泌3,4 - 亚甲基二氧甲基苯丙胺 (MDMA) 单克隆抗体的杂交瘤细胞株ZY-2G5-3,已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,保藏编号为CGMCC No.13090。本发明在小鼠血清筛选和细胞株筛选的过程中均采用尿样基质,已得到可以耐受尿样基质,且特异性识别3,4 - 亚甲基二氧甲基苯丙胺 (MDMA) 的单克隆抗体,用于尿样中MDMA的检测,可以满足目前市场上对尿液中MDMA免疫检测产品的需求。

