



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109705220 A

(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201910026997.0

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2019.01.11

C07K 16/44(2006.01)

(83)生物保藏信息

C12N 5/20(2006.01)

CGMCC No.17304 2018.05.24

G01N 33/53(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生物界面与生物检测研究所

申请人 无锡迪腾敏生物科技有限公司

(72)发明人 胥传来 王忠兴 匡华 徐丽广

刘丽强 马伟 吴晓玲 宋珊珊  
胡拥明

(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

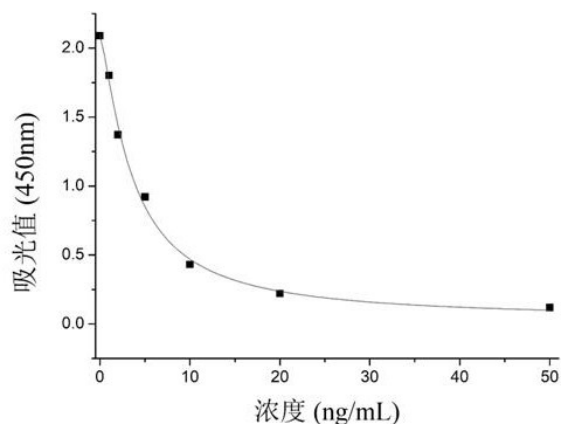
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

(57)摘要

一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用,属于食品安全免疫检测领域。本发明制备的分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株D号,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,保藏编号为CGMCC No.17304。所述杂交瘤细胞株D号可以分泌产生对氯丙嗪具有较好亲和力和较高灵敏度,对氯丙嗪的50%抑制浓度 $IC_{50}$ 为 $17.2 \mu g/L$ ,可用于制备氯丙嗪的免疫检测试剂盒以及胶体金试纸条,为动物源性食品中氯丙嗪的检测提供有力的检测方法及手段。



1. 一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株D号,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CGMCC,地址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,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2018年5月24日,保藏编号CGMCC No.17304。

2. 抗氯丙嗪单克隆抗体,其特征在于:其是由保藏编号CGMCC No.17304杂交瘤细胞株D号分泌产生。

3. 权利要求2所述抗氯丙嗪单克隆抗体的应用,其特征在于:用于食品中氯丙嗪残留的检测。

## 一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用,属于食品安全免疫检测领域。

### 背景技术

[0002] 氯丙嗪(chlorpromazine, CPZ),又称冬眠灵,属于吩噻嗪类药物,为中枢多巴胺受体阻断剂,具有镇静、抗精神病、降低体温及基础代谢等作用。在兽医上此药主要用来镇静和止吐。日粮中添加氯丙嗪能使动物间接起到催肥的作用,在动物运输过程中有些不法商贩常常大剂量使用氯丙嗪,这是因为氯丙嗪能降低动物的维持需要,减少途中失重和死亡率。在屠宰前大剂量使用,可导致大量氯丙嗪残存于动物产品中,氯丙嗪在动物体内的蓄积性残留会对食用者的安全构成潜在威胁,会引起食用者发生白细胞减少和粒细胞缺乏症,及其他的不良反应。因此欧盟、日本和中国等对氯丙嗪在动物性食品中的残留量均有规定。

[0003] 目前检测氯丙嗪残留比较常规的方法有分光光度计法、荧光光谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱联用法和电化学法等,这些方法或仪器昂贵,或样品处理复杂,较难广泛应用于大规模高通量检测中。而免疫分析方法具有低成本、高通量、高灵敏、对技术人员相对要求低等特点,因此适用于大量样品的快速筛查。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用,由该细胞株制备的单克隆抗体对氯丙嗪具有较好的亲和力和灵敏度,可以用来建立氯丙嗪酶联免疫检测方法,或建立胶体金免疫层析试纸条快速检测方法。

[0005] 本发明的技术方案,一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株D号,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CGMCC,地址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,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2018年5月24日,保藏编号CGMCC No.17304。

[0006] 抗氯丙嗪单克隆抗体,其是由保藏编号CGMCC No.17304杂交瘤细胞株D号分泌产生。

[0007] 所述抗氯丙嗪单克隆抗体的应用,用于食品中氯丙嗪残留的检测。

[0008] 分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株D号的制备基本步骤为:

(1) 半抗原的制备:通过乙酰丙嗪马来酸盐和羧甲氧胺半盐酸盐的反应,合成一个带有两个碳链的氯丙嗪半抗原。

[0009] (2) 免疫原的制备与鉴定:以氯丙嗪半抗原为原料,通过活化酯法与蛋白载体的氨基相连,反应结束后,通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原,完全抗原通过紫外吸收扫描方法鉴定;

(3) 小鼠的免疫:选取6-8周龄的BALB/c小鼠进行免疫。将免疫原与福氏佐剂乳化完全

后,通过皮下多点注射免疫小鼠,首次免疫采用福氏完全佐剂,加强免疫使用福氏不完全佐剂,冲刺免疫时免疫剂量为前一次免疫剂量的一半,与生理盐水混合均匀后直接进行腹腔注射;各次免疫间隔为三周。第三次免疫后,间隔一周采血检测血清效价和抑制;

(4) 细胞融合与细胞株建立:通过聚乙二醇(PEG 2000)法,使小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合,通过HAT培养基培养,利用间接ELISA检测阳性细胞孔,并进一步利用间接竞争ELISA法测定阳性细胞孔的抑制效果,通过有限稀释法对有最好抑制的阳性细胞孔进行三次亚克隆,最终筛选获得杂交瘤细胞株D号;

(5) 杂交瘤细胞株性质的鉴定:采用小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用酶标二抗套装测定;IC<sub>50</sub>值、交叉反应率和亲和力的测定通过ELISA法。

[0010] 本发明的有益效果:(1)本发明获得的抗氯丙嗪单克隆抗体,对氯丙嗪有较好的检测灵敏度和亲和力;(2)一种新的合成氯丙嗪免疫原的方法,合成步骤更加简化,有效,为今后人们的研究提供了合成免疫原的思路与方法。

[0011] 生物材料样品保藏:一株抗氯丙嗪单克隆抗体杂交瘤细胞株D号,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CGMCC,地址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,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2018年5月24日,保藏编号CGMCC No.17304。

## 附图说明

[0012] 图1是免疫原的紫外吸收光谱表征。

[0013] 图2是氯丙嗪单克隆抗体的标准抑制曲线。

## 具体实施方式

[0014] 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。

[0015] 本发明通过将氯丙嗪完全抗原免疫小鼠,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,最终得到了对氯丙嗪有较好亲和力和灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0016] 实施例1:抗氯丙嗪单克隆抗体杂交瘤细胞株D号的制备

1、半抗原的合成:乙酰丙嗪马来酸盐(APZ,45 mg,0.01 mmol) 和羧甲氧胺半盐酸盐(CMO,25 mg,0.02 mmol) 溶解于去离子水(5 mL),在转子搅拌的情况下逐滴加入醋酸钠,调整pH为8-9,然后将混合物在40℃回流反应10 h,用0.1 M盐酸调整pH为2-3,然后将15mL乙酸乙酯加入。收集乙酸乙酯层,用旋转蒸发器干燥,得到氯丙嗪半抗原(CPZ-hapen)。

[0017] 2、完全抗原的合成:取2.2mg氯丙嗪半抗原溶于2mL 二甲基甲酰胺中,加入4.5mg EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和3.6mg NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),室温搅拌,活化4h;另取10mg KLH(钥孔血蓝蛋白)溶解于3mL、0.05M、pH9.6的CB溶液(碳酸盐缓冲溶液)中,将上述活化液逐滴加入KLH溶液中,室温搅拌反应过夜后,4℃透析三天,-20℃分装保存。

[0018] 3、动物免疫:选择健康的6-8周龄的BALB/c小鼠进行免疫。取氯丙嗪完全抗原(1mg/mL)与等量福氏佐剂乳化均匀后,通过皮下多点注射免疫BALB/c小鼠,每只100μL。首

次免疫采用福氏完全佐剂,加强免疫使用福氏不完全佐剂,冲刺免疫时免疫剂量为前一次免疫剂量的一半,与生理盐水混合均匀后直接进行腹腔注射;各次免疫间隔为三周。第三次免疫后,间隔一周采血检测血清效价和抑制;选择抑制最好的小鼠,在五免后18天冲刺免疫,准备融合。

[0019] 4、细胞融合:在冲刺免疫三天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量为2000)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2-10:1的计数比例混合,离心后用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×HAT的RPMI-1640筛选培养液中,加到96孔细胞培养板,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

[0020] 5、细胞筛选与细胞株建立:在细胞融合的第3天对融合细胞进行RPMI-1640筛选培养液半换液,第5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7天取细胞上清进行筛选。筛选分两步:第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔,第二步选用氯丙嗪为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选择对氯丙嗪有较好抑制的细胞孔,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,获得抗氯丙嗪单克隆抗体杂交瘤细胞株D号。

[0021] 6、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1mL;7天后每只小鼠腹腔注射 $1 \times 10^6$ 杂交瘤细胞,从第7天开始收集腹水,将腹水通过辛酸-饱和硫酸铵法纯化,获得的单抗置于-20℃保存。

[0022] 使用小鼠单抗亚型鉴定试剂盒对腹水纯化获得的单克隆抗体进行免疫球蛋白亚型鉴定,其亚型为IgG2a型,具体如表1所示。

[0023] 表1 氯丙嗪单克隆抗体的亚型鉴定

抗体亚型亚类	OD 值
IgA	0.126
IgG1	0.291
IgG2a	1.813
IgG2b	0.328
IgG3	0.209
IgM	0.127

使用间接竞争ELISA法,测定单克隆抗体对氯丙嗪的IC<sub>50</sub>为3.61μg/L,并验证了其对他达拉非等的IC<sub>50</sub>及交叉反应率,具体如表2所示。

[0024] 表2氯丙嗪单克隆抗体对氯丙嗪、异丙嗪、奋乃近、氯普噻吨的IC<sub>50</sub>及交叉反应率

	IC <sub>50</sub> (μg/L)	交叉反应率
氯丙嗪	3.61	100%
异丙嗪	18.30	19.73%
奋乃静	19.48	18.53%
氯普噻吨	82.1	4.4%

7、抗体应用:将抗氯丙嗪单克隆抗体杂交瘤细胞株D号通过体内腹水制备的单克隆抗体应用于氯丙嗪ELISA添加回收试验,具体步骤如下:

(1)用碳酸盐缓冲液(CBS)稀释好的0.1μg/mL的氯丙嗪包被作为包被原包被96孔酶标板,每孔100μL,37℃包被2 h后,用PBST洗液洗板三次,每次每孔200μL,每次3 min,拍干;

(2)用含0.2%明胶的CBS进行封闭,每孔200μL,37℃封闭2 h,用PBST洗液洗板三次,每次每孔200μL,每次3min,拍干;

(3)用磷酸盐缓冲液(PBS)分别配置0,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1,2μg/L的氯丙嗪标准溶液。将标准溶液以及待检测样品提取液,分别加入到已经封闭好的酶标板中,每孔50μL,每个样品重复3个孔,再每孔加入50μL 1:16000稀释的抗氯丙嗪单克隆抗体,37℃反应0.5h后,洗板拍干;

(4)每孔加入100μL 用含0.1% 明胶的PBS 1:3000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG二抗,37℃反应0.5h后,洗板拍干;

(5)每孔加入100μL TMB显色液,37℃显色15min后,每孔加入50μL 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液,450nm测吸光值;

(6)添加回收及样品前处理:取新鲜或回温(冷藏保存)的牛奶5g,添加三个不同剂量的氯丙嗪标准品,分别为1ng、5ng、10ng。将其置于50mL离心管中,缓慢滴入50%氢氧化钾溶液1mL,在旋涡混合器上充分振荡,缓慢滴入乙酸乙酯20mL,在旋涡混合器上振荡10min,然后放入离心机中以3000r/min离心5min。移取4mL上清液于另一支离心管中,氮气吹干,加入1mL 含有10%甲醇的PBS 复溶,取50μL 用于检测。采用间接竞争ELISA进行添加回收试验,其回收率分别为98%、92%、105%。

#### [0025] 溶液的配制:

碳酸盐缓冲液(CBS):称取Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59g,NaHCO<sub>3</sub> 2.93g,分别溶于少量双蒸水后混合,加双蒸水至约800mL混匀,调pH值至9.6,加双蒸水定容至1000mL,4℃贮存备用;

磷酸盐缓冲液(PBS):8.00g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,3.62g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O,溶于800mL纯水中,用NaOH或HCl调pH到7.2-7.4,定容至1000mL;

PBST:含0.05% Tween20的PBS;

TMB显色液:A液:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 18.43g,柠檬酸 9.33g,纯水定容至1000mL;B液:60 mg TMB 溶于100mL乙二醇中。A、B液按体积比1:5混合即为TMB显色液,现用现混。

[0026] 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。

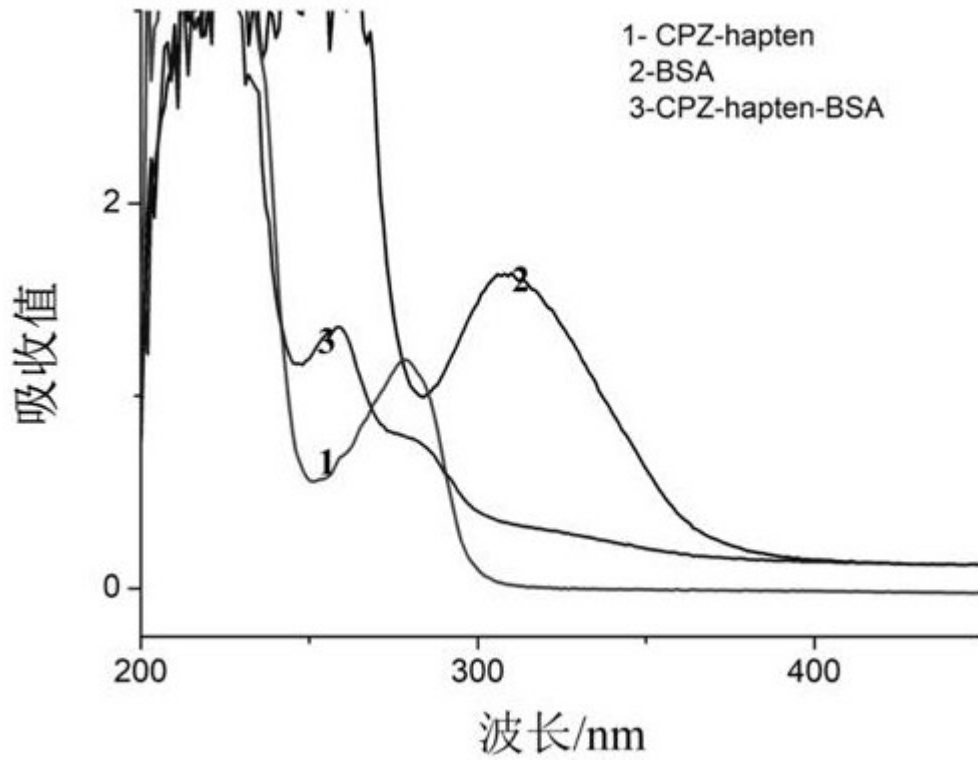


图1

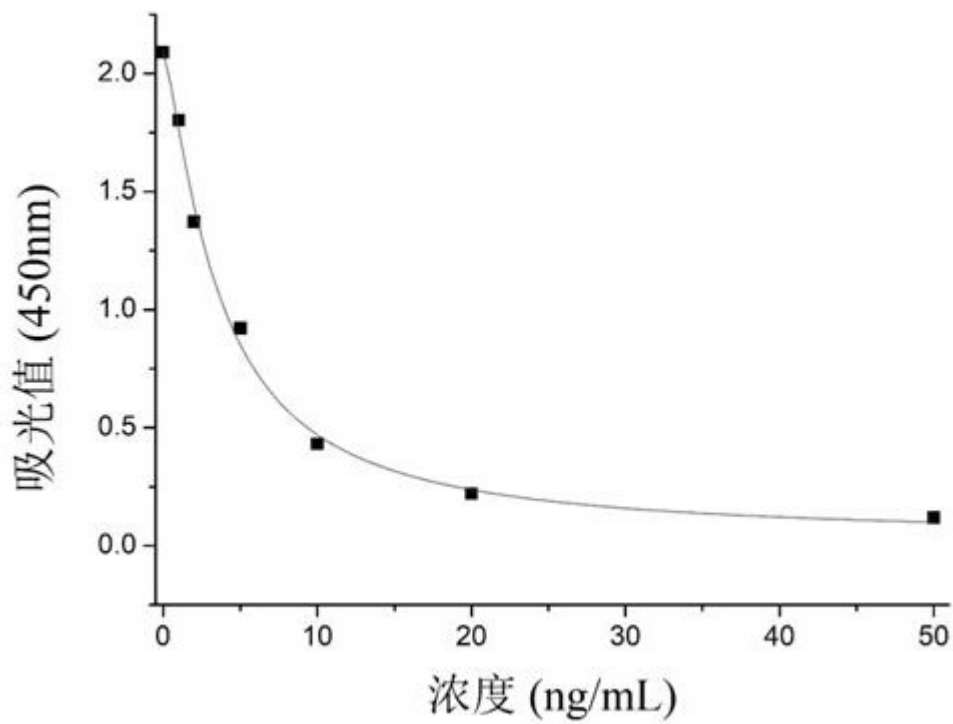


图2

专利名称(译)	一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109705220A</a>	公开(公告)日	2019-05-03
申请号	CN201910026997.0	申请日	2019-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学 无锡迪腾敏生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江南大学 无锡迪腾敏生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学 无锡迪腾敏生物科技有限公司		
[标]发明人	胥传来 王忠兴 匡华 徐丽广 刘丽强 马伟 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明		
发明人	胥传来 王忠兴 匡华 徐丽广 刘丽强 马伟 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明		
IPC分类号	C07K16/44 C12N5/20 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一株分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用，属于食品安全免疫检测领域。本发明制备的分泌抗氯丙嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株D号，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，保藏编号为CGMCC No.17304。所述杂交瘤细胞株D号可以分泌产生对氯丙嗪具有较好亲和力和较高灵敏度，对氯丙嗪的50%抑制浓度IC50为17.2 $\mu$ g/L，可用于制备氯丙嗪的免疫检测试剂盒以及胶体金试纸条，为动物源性食品中氯丙嗪的检测提供有力的检测方法及手段。

