



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107365749 A

(43)申请公布日 2017. 11. 21

(21)申请号 201710816445.0

(22)申请日 2017.09.12

(83)生物保藏信息

CGMCC No.14304 2017.06.15

(71)申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 万宇平 袁媛 吴小胜 杨昌松

南铁贵 何方洋 洪小栩 李行

(51) Int. Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/14(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

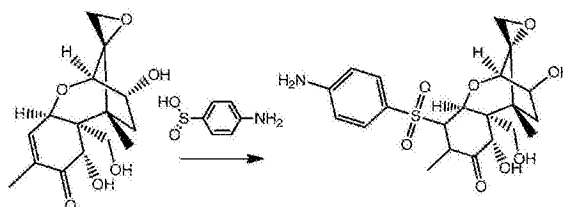
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤
细胞株及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株F-3-4,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.14304。此细胞株分泌的抗呕吐毒素单克隆抗体灵敏度高、特异性好、抗干扰性好,对呕吐毒素的50%抑制浓度 IC_{50} 为 $22.1 \mu g/L$,对中药中可能存在的真菌毒素、农药、重金属、炮制过程中使用的辅料及污染菌等均具有较好的抗干扰性,为中药中呕吐毒素的免疫检测提供了条件,具有实际应用价值。



1. 一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其特征在于:命名为呕吐毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株F-3-4,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.14304,保藏日期为2017年06月15日。

2. 一种抗呕吐毒素单克隆抗体,其特征在于:它是由权利要求1所述保藏编号为CGMCC No.14304的呕吐毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株F-3-4分泌产生的。

3. 权利要求2所述抗呕吐毒素单克隆抗体的应用,其特征在于:用于中药中呕吐毒素的分析检测。

一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用。

背景技术

[0002] 中药材从生产、采收、加工、运输、贮藏等过程均有可能因自身性质与外界因素的影响而污染真菌,进而发生霉变并污染真菌毒素。霉变不仅会影响中药材的质量,使药材失去原有的药用价值,造成巨大的经济损失,而且在霉变过程中,产生的多种真菌毒素会对患者的肝、肾、神经和造血系统等造成严重的损害,甚至可能诱发癌症。同时,随着当今中医药保健养生观念的普及,越来越多“药食同源”的大宗中药材被用于人们日常饮食和保健当中,市场的需求量大,若这些中药材受到真菌毒素的污染,则势必会危害更多的人群的健康,加重个人和医疗系统的经济负担,更有可能进一步影响社会的和谐和稳定。

[0003] 呕吐毒素(vomintoxin),又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol,DON),属单端孢霉烯族化合物,主要由禾谷镰刀菌(*F.graminearum*)和黄色镰刀菌(*F.culmorum*)产生,这类真菌大多在低温、潮湿环境下,在谷物庄稼中慢慢生长。呕吐毒素常常与其他真菌毒素同存,从谷物和饲料中分离出来的呕吐毒素的最高浓度已达92mg/kg。1998年,国际癌症研究机构(IARC)公布的评价报告中,呕吐毒素被列为三类致癌物。由于呕吐毒素的危害严重,引起了各国的普遍重视。

[0004] 呕吐毒素的分析测定方法现阶段基本应用于食品领域,通常采用薄层色谱法、酶联免疫吸附法和高效液相色谱法等检测方法。关于中药中呕吐毒素检测的报道较少,仅查阅到毛丹等建立了酸枣仁、淡豆豉、薏苡仁、补骨脂等4种中药中呕吐毒素的高效液相色谱-串联三重四极杆质谱(LC-MS-MS)测定方法[《LC-MS-MS法测定4种中药中的呕吐毒素》,中国药师,2014,17(4):578-581],该方法检测准确、检测限低,但需要复杂的样品前处理过程、专门的仪器以及专业的人员培训,在实际应用中受到了很大的限制。

[0005] 免疫分析法可以弥补以上所有缺点,免疫分析法是一种利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质的分析方法,建立小分子化合物的免疫分析方法的关键是能够制造出对小分子化合物具有高亲和力和高特异性的抗体。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,该细胞株制备的单克隆抗体对DON具有较好的特异性和较高的检测灵敏度,对中药中可能存在的真菌毒素、农药、重金属、炮制过程中使用的辅料及污染菌等均具有较好的抗干扰性,为建立中药中DON的免疫学检测方法奠定基础。

[0007] 本发明的技术方案,一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为呕吐毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株F-3-4,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.14304,保藏日期为2017年06月15日。

[0008] 抗呕吐毒素单克隆抗体,其是由保藏编号为CGMCC No.14304的呕吐毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株F-3-4分泌产生的,所述抗呕吐毒素单克隆抗体应用于中药中呕吐毒素的分析检测。

[0009] 本发明提供F-3-4细胞株的基本制备过程:

[0010] (1) DON半抗原合成及鉴定:取呕吐毒素50mg,加5mL乙醇溶解;取对-氨基苯亚磺酸29.17mg,加水2mL溶解,加到呕吐毒素乙醇溶液中,加3mL 1mol/L稀盐酸,室温搅拌24h;停止反应,用氢氧化钠调节pH到7,加水10mL,加乙酸乙酯15mL震荡萃取,静置分层,除去水相,有机相浓缩蒸干,上硅胶小柱,二氯甲烷/甲醇(10/1,V/V)洗脱分离,得到磺胺化呕吐毒素60mg,即为DON半抗原,收率78.95%,核磁共振氢谱鉴定结果;

[0011] (2) 完全抗原合成:将DON半抗原分别与牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)偶联得到免疫抗原(DON-BSA)和包被抗原(DON-OVA);

[0012] (3) 动物免疫:取健康的6~8周雌性Balb/c小鼠10只(分为A与B两组,每组5只),初次免疫用弗氏完全佐剂乳化后颈背部皮下多点注射,每只小鼠免疫剂量为200 μ g DON-BSA;之后加强免疫每两周颈背部皮下多点注射一次,乳化用弗氏不完全佐剂;最后一次免疫使用生理盐水代替弗氏不完全佐剂,采用腹腔注射,注射剂量和前面几次相同;通过间接ELISA检测血清效价;

[0013] (4) 细胞融合与细胞株筛选:加强免疫后第三天,通过聚乙二醇(PEG4000)法将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合,通过完全培养液培养,利用间接ELISA法检测分泌DON的细胞株,利用间接竞争ELISA法测定该细胞株的抑制效果,筛选最好抑制的阳性细胞株进行三次亚克隆,最终获得杂交瘤细胞株F-3-4;

[0014] (5) 抗体制备纯化及特性鉴定:将液体石蜡注射6~8周Balb/c小鼠,500 μ L/只;10天后每只小鼠0.5mL杂交瘤细胞CGMCC No.14304注射到腹腔,从第七天开始收集腹水,将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化,SDS-PAGE凝胶电泳法分析纯化效果,获得的单克隆抗体进行效价、亚型、交叉反应性测定,置于-20 $^{\circ}$ C保存;

[0015] (6) 抗体的应用:将杂交瘤细胞株F-3-4分泌的抗呕吐毒素单克隆抗体用于制备呕吐毒素酶联免疫试剂盒,以用于中药中呕吐毒素的分析检测。

[0016] 本发明的有益效果在于:

[0017] (1) 本发明提供的杂交瘤细胞株F-3-4可以用于制备高效价抗呕吐毒素单克隆抗体,抗呕吐毒素小鼠腹水抗体ELISA法测得的效价 \geq 20000。

[0018] (2) 本发明提供的抗呕吐毒素单克隆抗体灵敏度高、特异性好、抗干扰性好,对呕吐毒素的50%抑制浓度IC₅₀为22.1 μ g/L,对中药中可能存在的真菌毒素、农药、重金属、炮制过程中使用的辅料及污染菌等均具有较好的抗干扰性。

[0019] (3) 本发明提供的抗呕吐毒素单克隆抗体可应用于测定中药中呕吐毒素含量。

[0020] 生物材料样品保藏:一株分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,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: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2017年06月15日,保藏编号为CGMCC No.14304。

附图说明

- [0021] 图1呕吐毒素半抗原合成路线图
[0022] 图2呕吐毒素竞争ELISA标准曲线图
[0023] 图3呕吐毒素竞争ELISA Logit/Log标准曲线图

具体实施方式

[0024] 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做进一步说明。

[0025] 实施例1:杂交瘤细胞株F-3-4的筛选

[0026] 1.半抗原合成及鉴定

[0027] DON半抗原的合成路线如附图1所示。

[0028] 取呕吐毒素50mg,加5mL乙醇溶解;取对-氨基苯亚磺酸29.17mg,加水2mL溶解,加到呕吐毒素乙醇溶液中,加3mL 1mol/L稀盐酸,室温搅拌24h;停止反应,用氢氧化钠调节pH到7,加水10mL,加乙酸乙酯15mL震荡萃取,静置分层,除去水相,有机相浓缩蒸干,上硅胶小柱,二氯甲烷/甲醇(10/1,V/V)洗脱分离,得到磺胺化呕吐毒素60mg,即为DON半抗原,收率78.95%。

[0029] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定,¹H-NMR(CDC1₃,300MHz) δ:7.50(2H,d,ArH),6.69(2H,d,ArH),6.27(2H,s,NH₂),3.93(1H,s,CH),3.61(1H,ddd,CH),3.58(1H,s,OH),3.56(1H,s,CH),3.25(1H,d,CH),2.34(2H,s,CH),2.4(1H,s,CH),1.71(1H,s,CH),1.46(2H,s,CH₂),1.11(3H,s,CH₃)。图谱中,化学位移δ=6.27的为间隔臂上芳胺氢的共振吸收峰,δ=7.5、6.69的为间隔臂上苯环氢吸收峰,这些吸收峰的存在证明间隔臂偶联成功,DON半抗原结构正确。

[0030] 2.完全抗原合成

[0031] 免疫抗原合成——DON半抗原与BSA偶联

[0032] 取DON半抗原17mg,加1mL乙醇溶解,加0.2mL 1mol/L稀盐酸,0~5℃搅拌10min,取8.4mg亚硝酸钠,加1mL水溶解,加入半抗原溶液中,0~5℃搅拌1h,得到半抗原活化液A;取BSA 50mg,加0.1mol/L碳酸盐缓冲液溶解,0~5℃搅拌10min,滴加全部的A液,继续搅拌2h,0.02mol/L磷酸盐缓冲液透析纯化3天,每天换液3次,分装,-20℃保存,备用。

[0033] 包被抗原合成——DON半抗原与OVA偶联

[0034] 取DON半抗原10mg,加1mL乙醇溶解,加0.2mL 1mol/L稀盐酸,0~5℃搅拌10min,取4mg亚硝酸钠,加1mL水溶解,加入半抗原溶液中,0~5℃搅拌1h,得到半抗原活化液A;取OVA 50mg,加0.1mol/L碳酸盐缓冲液溶解,0~5℃搅拌10min,滴加全部的A液,继续搅拌2h,0.02mol/L磷酸盐缓冲液透析纯化3天,每天换液3次,分装,-20℃保存,备用。

[0035] 3.动物免疫

[0036] 取健康的6~8周雌性Balb/c小鼠10只(分为A与B两组,每组5只),初次免疫用弗氏完全佐剂乳化后颈背部皮下多点注射,每只小鼠免疫剂量为200μg DON-BSA;之后加强免疫每两周颈背部皮下多点注射一次,乳化用弗氏不完全佐剂;最后一次免疫使用生理盐水代替弗氏不完全佐剂,采用腹腔注射,注射剂量和前面几次相同。具体免疫步骤见表1。

[0037] 表1小鼠免疫程序

[0038]

免疫次数	时间/d	免疫剂量($\mu\text{g}/\text{只}$)	免疫方法	佐剂
初免	0	200	颈背部皮下多点注射	弗氏完全佐剂
二免	15	200	同上	弗氏不完全佐剂
三免	30	200	同上	同上
四免	44	200	同上	同上
加强	58 (融合前三天)	200	腹腔注射	不加佐剂

[0039] 第三次、四次、加强免疫后7d,对小鼠断尾取血,ELISA方法测定小鼠血清效价,具体步骤如下:

[0040] (1) 用0.05mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液将包被抗原(DON-OVA)做1:1000稀释,每孔100 μL 包被酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2h,甩掉包被液,以PBST洗涤1次,拍干;

[0041] (2) 每孔加入150 μL 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2h后倾去封闭液,拍干;

[0042] (3) 每孔加入50 μL 以PBS倍比稀释的抗血清,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min后倾去反应液,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0043] (4) 加PBS稀释的酶标二抗(1:1000) 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0044] (5) 每孔加入底物显色液A液和B液各50 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应15min,每孔加入50 μL 2mol/L的 H_2SO_4 溶液终止反应;

[0045] (6) 酶标仪测定波长在450nm的OD值,以样品孔 OD_{450} 接近于1的稀释倍数作为阳性血清的效价。

[0046] 4. 细胞融合

[0047] (1) 饲养细胞制备:断颈处死8~10周龄Balb/c小鼠,浸泡在75%酒精中5min,随即放入超净工作台内,腹部朝上放于平皿内或固定于解剖板上。用眼科镊子夹起小鼠腹部皮肤,用剪刀剪一小口,注意切勿剪破腹膜,以免腹腔液外流和污染。然后用剪刀向上下两侧做钝性分离,充分暴露腹膜。用酒精棉球擦拭腹膜消毒。用注射器吸取5mL RPMI-1640基础培养液,注入小鼠腹腔,轻轻抽回注射器,晃动小鼠腿部和尾部几次。用原注射器抽回腹腔内液体,注入离心管。如此反复操作3~4次。1000r/min离心10min,弃上清。用20~50mL完全培养液重悬细胞,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 滴加到培养板,置培养箱备用。

[0048] (2) 脾细胞制备:加强免疫后3d,取免疫Balb/c小鼠,眼眶采血后脱臼处死,在75%酒精中消毒后取脾脏,去除结缔组织,制备脾细胞悬液,转移到50mL离心管中,加RPMI-1640至30mL,1500~2000r/min离心5min,弃上清,加RPMI-1640至30mL,计数待用。

[0049] (3) 骨髓瘤细胞制备:取3瓶生长状态良好的(活细胞数>95%)骨髓瘤细胞,将之完全吹下,转移到50mL离心管中,加RPMI-1640至30mL,1500~2000r/min离心5min,弃上清,加RPMI-1640至30mL,计数待用。

[0050] (4) 细胞混合:脾细胞:骨髓瘤细胞=8:1,混合,1500~2000r/min离心5min。

[0051] (5) 细胞融合:将混合好的细胞离心,倒干上清,把沉淀细胞块弹成糊状,置37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,在1min内加入1mL融合剂,融合剂为聚乙二醇(PEG) 4000,作用2min,并轻轻搅拌细胞,在随后4min内加入20mL无血清的PEG营养液,1000r/min离心10min,弃上清。用20~50mL完全培养液重悬细胞,铺种于含饲养细胞的96孔细胞培养板,每孔100 μL ,置培养箱中。

[0052] 5. 细胞株筛选

[0053] 待细胞长至孔底的1/2~1/3时,即可进行抗体检测。采用ELISA方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选,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DON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DON标准品具有较好抑制的孔,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抗呕吐毒素单克隆抗体的细胞株F-3-4。该细胞株已于2017年06月15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:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏编号为CGMCC No.14304。

[0054] 实施例2:抗呕吐毒素单克隆抗体的制备纯化和特性鉴定

[0055] 1. 腹水制备

[0056] 将液体石蜡注射6~8周Balb/c小鼠,500 μ L/只。10天后将处于对数生长期的杂交瘤细胞CGMCC No.14304用RPMI-1640基础培养基收集,用血球计数板和显微镜计数,细胞浓度在 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个/mL范围内。每只小鼠0.5mL杂交瘤细胞CGMCC No.14304注射到腹腔。注意观察在一周后小鼠腹部膨大,用无菌注射器于小鼠腹腔采集腹水,每隔一到两天采集一次,这样多次反复采集直到小鼠自然死亡。4 $^{\circ}$ C下5000r/min离心5min,收集上清,并去掉腹水上层漂浮的脂肪和蛋白质膜。

[0057] 2. 抗体纯化

[0058] 单克隆抗体采用辛酸-硫酸铵方法纯化,具体步骤如下:

[0059] (1) 将腹水从-20 $^{\circ}$ C冰箱拿出室温解冻。腹水用双层滤纸过滤,初步除去脂肪片、细胞碎片及其他杂质。12000r/min离心15min,取上清,弃沉淀。精确量腹水体积;

[0060] (2) 1份体积的腹水与3份体积的醋酸盐缓冲液磁力搅拌混匀,用2mol/L HCl调pH至4.5~4.8;

[0061] (3) 磁力搅拌下缓慢加入正辛酸,1mL腹水加33 μ L正辛酸,加完后室温磁力搅拌30min,后置4 $^{\circ}$ C静置2h;

[0062] (4) 12000r/min离心5min,取上清,双层滤纸过滤,收集滤液;

[0063] (5) 量取滤液体积,加入1/10体积的0.1mol/L pH7.4的PBS,用2mol/L NaOH(记录NaOH体积)调pH至7.4;

[0064] (6) 将上清冰浴预冷,加硫酸铵固体至0.277g/mL,边加边搅拌,并于30min内加完,置4 $^{\circ}$ C过夜;

[0065] (7) 12000r/min离心15min,弃上清。用一定体积的0.01mol/L PBS溶解沉淀。用PB透析两天后换0.01mol/L PBS透析两天,收集透析液,12000r/min离心15min,取上清,置-20 $^{\circ}$ C保存;

[0066] (8) 纯化的抗体用SDS-PAGE凝胶电泳法分析纯化效果。

[0067] 3. 抗体效价测定

[0068] 采用间接ELISA方法测定抗体效价,步骤参考实施例1中3.动物免疫的血清效价测定。结果显示,抗呕吐毒素单克隆抗体的效价 ≥ 20000 。

[0069] 4. 抗体亚型鉴定

[0070] 用市售SIGMA亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株F-3-4分泌的抗呕吐毒素单克隆抗体的亚型为IgG₁型。

[0071] 5. 抗体交叉反应性测定

[0072] 采用间接竞争ELISA方法测定,具体步骤为:

[0073] (1) 用0.05mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液将包被抗原(DON-OVA)做1:1000稀释,每孔100 μ L包被酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育2h,甩掉包被液,以PBST洗涤1次,拍干;

[0074] (2) 每孔加入150 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C反应2h后倾去封闭液,拍干;

[0075] (3) 每孔先加入50 μ L系列稀释的呕吐毒素标准工作液(浓度分别为0、7.5、25、75、250 μ g/L),然后加入50 μ L以PBS做1:20000稀释的单克隆抗体,25 $^{\circ}$ C反应30min后倾去反应液,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0076] (4) 加PBS稀释的酶标二抗(1:1000)100 μ L/孔,25 $^{\circ}$ C反应30min,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0077] (5) 每孔加入底物显色液A液和B液各50 μ L,25 $^{\circ}$ C避光反应15min,每孔加入50 μ L2mol/L的H₂SO₄溶液终止反应;

[0078] (6) 酶标仪测定波长在450nm的OD值。

[0079] 以呕吐毒素浓度的对数值为横坐标,以百分吸光度值(各浓度标准品OD值与不加标准品孔OD值的百分比)为纵坐标绘制标准曲线。同时分别将以下干扰物质用标准品缓冲液稀释至表格所列的添加值用于分析,根据药物显色对应的OD值,结合标准曲线分析出的回收值算出交叉反应率(交叉反应率=回收值/添加值 \times 100%),结果见表2。

[0080] 表2对中药中常见的其他物质的抗干扰性数据

[0081]

A. 真菌毒素、农药、重金属干扰实验					
0 标准品 OD 值	物质名称	药物 OD 值	添加值/(μ g/L)	回收值/(μ g/L)	交叉反应率/%
1.952	赭曲霉毒素 A	1.916	500	0.0	<1
	黄曲霉毒素 B1	1.915	500	0.0	<1
	玉米赤霉烯酮	1.891	500	0.0	<1
	T-2 毒素	1.901	500	0.0	<1
	伏马毒素	1.779	500	2.7	<1
	展青霉素	1.939	500	0.0	<1
	桔青霉素	1.799	500	2.4	<1
	DDT	1.945	500	0.0	<1
	六六六	1.807	500	2.2	<1
	氯丹(顺、反)	1.774	500	2.7	<1
	六氧苯	1.771	500	2.8	<1

[0082]

	铅 (Pb)	1.871	500	1.2	<1	
	汞 (Hg)	1.824	500	2.0	<1	
	镉 (Cd)	1.751	500	3.1	<1	
	砷 (As)	1.891	500	0.0	<1	
B. 炮制辅料干扰实验						
0 标准品 OD 值	辅料名称	药物 OD 值	添加值/%	回收值/($\mu\text{g/L}$)	交叉反应率/%	
1.952	明矾	1.831	10	<0.05	<1	
	黄酒	1.885	10	<0.05	<1	
	白米醋	1.883	10	<0.05	<1	
	盐水	1.840	10	<0.05	<1	
	蜂蜜	1.949	10	<0.05	<1	
	生姜水	1.898	10	<0.05	<1	
	滑石粉	1.874	10	<0.05	<1	
	砂子	1.826	10	<0.05	<1	
	土	1.759	10	<0.05	<1	
C. 细菌干扰实验						
0 标准品 OD 值	菌株名称	菌株编号	药物 OD 值	添加值/CFU	回收值/($\mu\text{g/L}$)	交叉反应率/%
1.952	单增李斯特菌	CMCC(B)54002	1.898	10^8	<0.05	<1
	副溶血性弧菌	ATCC 17802	1.885	10^8	<0.05	<1
	小肠结肠炎耶尔森菌	ATCC23715	1.825	10^8	<0.05	<1
	福氏志贺氏菌	CMCC(B)51572	1.783	10^8	<0.05	<1
	大肠埃希氏菌	ATCC 25922	1.818	10^8	<0.05	<1
	大肠埃希氏菌 O157:H7	NCTC 12900	1.934	10^8	<0.05	<1
	表皮葡萄球菌	CMCC(B)26069	1.774	10^8	<0.05	<1
	肠炎沙门氏菌	CICC21490	1.859	10^8	<0.05	<1
	沙门氏菌	ATCC50001	1.788	10^8	<0.05	<1
	猪霍乱沙门氏菌	101859	1.923	10^8	<0.05	<1
	鸭沙门氏菌	CICC21498	1.846	10^8	<0.05	<1
	鼠伤寒沙门	ATCC 14028	1.915	10^8	<0.05	<1

[0083]

氏菌						
金黄色葡萄球菌	CICC10477	1.837	10^8	<0.05	<1	
金黄色葡萄球菌	ATCC6538	1.849	10^8	<0.05	<1	
金黄色葡萄球菌	野生菌株	1.894	10^8	<0.05	<1	
阪崎肠杆菌	野生菌株	1.765	10^8	<0.05	<1	
屎肠球菌	野生菌株	1.886	10^8	<0.05	<1	
溶血性葡萄球菌	野生菌株	1.950	10^8	<0.05	<1	
潘氏变形杆菌	野生菌株	1.904	10^8	<0.05	<1	
粘氏沙雷	野生菌株	1.860	10^8	<0.05	<1	
肺炎克雷伯	野生菌株	1.876	10^8	<0.05	<1	
微黄球菌	野生菌株	1.838	10^8	<0.05	<1	
郝氏埃希氏菌	野生菌株	1.813	10^8	<0.05	<1	
奇异变形杆菌	野生菌株	1.935	10^8	<0.05	<1	

[0084] 由表2可知,中药中可能存在的真菌毒素、农药、重金属、炮制过程中使用的辅料及污染菌对抗呕吐毒素单克隆抗体的性质没有干扰。

[0085] 实施例3:抗呕吐毒素单克隆抗体的应用

[0086] 将杂交瘤细胞株F-3-4分泌的抗呕吐毒素单克隆抗体用于制备呕吐毒素酶联免疫试剂盒,以用于中药中呕吐毒素的分析检测。

[0087] 1.酶联免疫试剂盒的组成

[0088] (1) 包被DON-OVA偶联物的酶标板;

[0089] (2) 酶标抗呕吐毒素单克隆抗体:实施例2中所述的抗呕吐毒素单克隆抗体与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联制备获得;

[0090] (3) 呕吐毒素标准品:标准品溶液浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $7.5\mu\text{g/L}$ 、 $25\mu\text{g/L}$ 、 $75\mu\text{g/L}$ 、 $250\mu\text{g/L}$;

[0091] (4) 底物显色液:由A液和B液组成,A液为2%过氧化脲的水溶液,B液为1%四甲基联苯胺的水溶液;

[0092] (5) 终止液:2mol/L硫酸溶液。

[0093] 2.试剂盒组分的制备

[0094] (1) 包被DON-OVA偶联物的酶标板的制备

[0095] 用包被缓冲液将DON-OVA偶联物稀释至最佳工作浓度,包被96孔聚苯乙烯酶标板,每孔 $100\mu\text{L}$, 37°C 孵育2h,甩掉包被液,用PBST洗涤1次,每次30s,拍干,然后再每孔加入 $150\mu\text{L}$ 封闭液, 37°C 孵育2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0096] 包被缓冲液:pH9.6、0.05mol/L的碳酸盐缓冲液;

[0097] 封闭液：每1L封闭液按照如下方法配制：将5mL马血清、1g叠氮化钠、30g酪蛋白混合，用磷酸盐缓冲液溶解并定容至1000mL；其中，磷酸盐缓冲液的浓度为0.02mol/L，pH值为7.2。

[0098] (2) 酶标抗呕吐毒素单克隆抗体的制备

[0099] 将抗呕吐毒素单克隆抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗体的摩尔浓度比为4:1，由于辣根过氧化物酶在强氧化作用下产生许多与抗体结合的位点，这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁，降低了酶标记物的酶活性，使制备的偶联物中混有许多聚合物。为了解决这个问题，我们将传统的方法进行了改良，即：

[0100] (1) 省去了氨基的封闭过程，因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少；

[0101] (2) 降低了辣根过氧化物酶：抗体的摩尔浓度比率至2:1，改良后的方法比传统的方法简便，对酶活性的损失减少。

[0102] 3. 试剂盒检测方法

[0103] (1) 样品前处理

[0104] 称取5.0g±0.05g粉碎的中药样本至50mL聚苯乙烯离心管中，加入25mL去离子水，用振荡器剧烈振荡5min，3000g以上室温(20-25℃/68-77°F)离心5min；将样本萃取液用去离子水按照1:3的体积比稀释后，取50μL用于分析。

[0105] (2) 用试剂盒检测

[0106] 向板孔中加入DON标准品溶液/样本液50μL/孔，酶标抗呕吐毒素单克隆抗体50μL/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15min，倒出孔内液体，每孔加入去离子水250μL，30s后倒出孔内液体，如此重复操作共洗板5次，用吸水纸拍干；每孔加入底物显色液A液和B液各50μL，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应5min；每孔加入终止液50μL，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于450nm处，测定每孔的吸光度值。

[0107] (3) 结果计算

[0108] 计算百分吸光度值：用所获得的标准品溶液或样本液吸光度值与空白溶液吸光度值的比值进行计算，见下式：

$$[0109] \quad W = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

[0110] 式中：W——百分吸光度值，%；

[0111] A——标准品溶液或样本液的平均吸光度值；

[0112] A₀——空白溶液(浓度为0μg/L的标准品溶液)的平均吸光度值。

[0113] 绘制标准曲线：以计算的百分吸光度值(%)为纵坐标，标准品溶液浓度的对数值(log10)为横坐标绘制标准曲线。

[0114] 样本结果计算：将样本液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度后，样本中呕吐毒素的含量按下式计算：

$$[0115] \quad X = C \times n$$

$$[0116] \quad X = C \times n$$

[0117] 式中：X——样本中呕吐毒素的含量，μg/kg；

[0118] C——从标准曲线上查得的样本中呕吐毒素的浓度，μg/L；

[0119] n——样本稀释倍数。

[0120] 也可以用各种酶标仪的数据处理软件进行计算。

[0121] 注:计算结果扣除空白值,所得结果保留一位小数。

[0122] 4. 检测效果评价

[0123] (1) 线性关系

[0124] 标准溶液浓度分别为0、7.5、25、75、250 $\mu\text{g/L}$,测定的OD值见表3。以百分吸光度值(W,%)为纵坐标,标准溶液浓度的对数值(\log_{10})为横坐标绘制标准曲线(见附图2)。以 $\log_{10}W$ 为纵坐标,标准溶液浓度的对数值为横坐标,将附图2转换后可知,在7.5 $\mu\text{g/L}$ ~250 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内, $\log_{10}W$ 与呕吐毒素浓度对数呈现良好的线性关系(见附图3),得回归方程 $Y = -2.789X + 3.689, R^2 = 0.9989$ 。

[0125] 表3标准溶液的OD值测定结果

[0126]

标准溶液浓度 ($\mu\text{g/L}$)	OD 值				OD 值 平均值	OD 值 标准偏差	OD 值 CV%
	1	2	3	4			
0	1.936	1.950	1.972	1.949	1.952	0.015	0.8
7.5	1.528	1.443	1.471	1.545	1.497	0.048	3.2
25	0.916	0.907	0.895	0.920	0.910	0.011	1.2
75	0.344	0.361	—	—	0.352	0.012	3.4
250	0.090	0.088	—	—	0.089	0.001	1.1

[0127] (2) 样本检测限

[0128] 采用不同来源的空白麦芽、桃仁、酸枣仁、胖大海、僵蚕、蜈蚣、薏苡仁、全蝎、水蛭、莲子、使君子、陈皮、远志、决明子、大枣、槟榔、地龙、柏子仁样品各20份进行测定,检测限以测定平均值加3倍标准偏差确定。结果表明,18种基质的检测限均 $<150\mu\text{g/kg}$,因此确定试剂盒对中药样品的检测限为 $150\mu\text{g/kg}$ 。

[0129] (3) 准确度(回收率)与精密度(重复性)

[0130] 以不含DON的麦芽、桃仁、酸枣仁、胖大海、僵蚕、蜈蚣、薏苡仁、全蝎、水蛭、莲子、使君子、陈皮、远志、决明子、大枣、槟榔、地龙、柏子仁为空白样品基质,进行三个浓度水平($150\mu\text{g/kg}$ 、 $300\mu\text{g/kg}$ 、 $600\mu\text{g/kg}$)的添加回收试验,分别用三批次试剂盒测定,计算样品添加回收率和批内、批间变异系数。结果表明,18种基质的添加回收率均在70%~110%,批内、批间变异系数均 $<15\%$ 。

[0131] (4) 试剂盒保存期

[0132] 试剂盒保存条件为2-8 $^{\circ}\text{C}$,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、DON添加回收率均在正常范围内。考虑到运输和使用过程中会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置8天进行加速老化实验,结果该试剂盒的各项指标完全符合要求;考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置8天,结果该试剂盒的各项指标也完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 至少保存12个月以上。

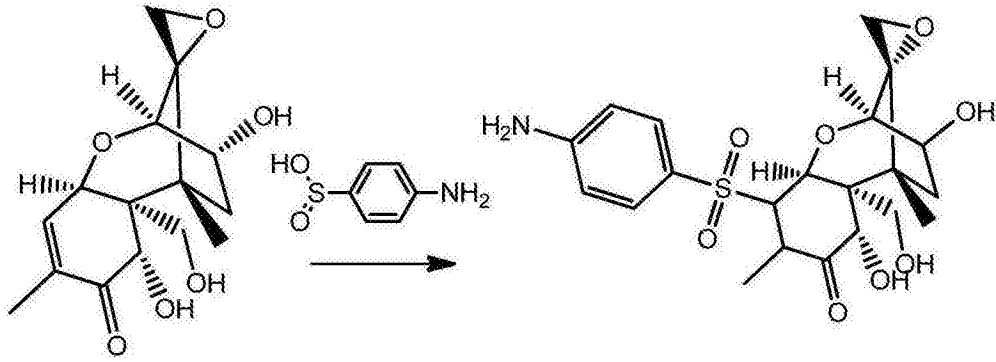


图1

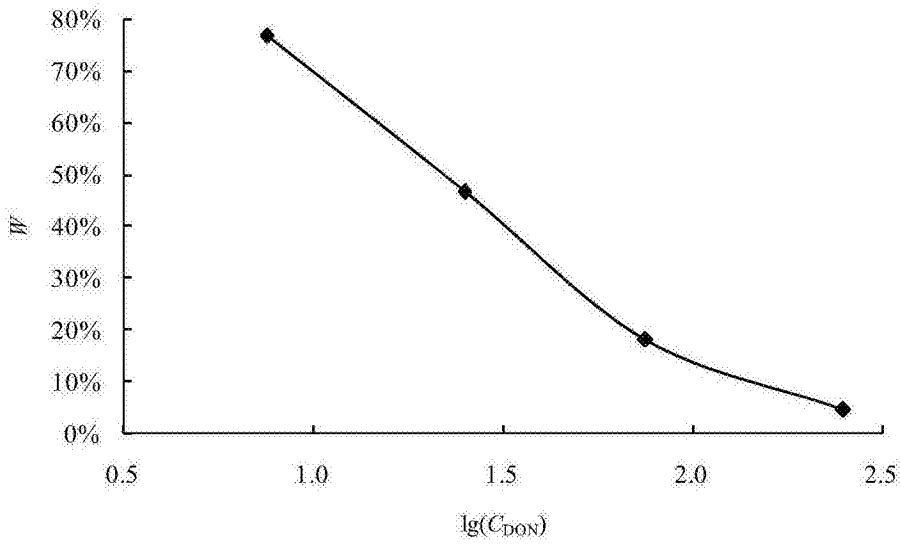


图2

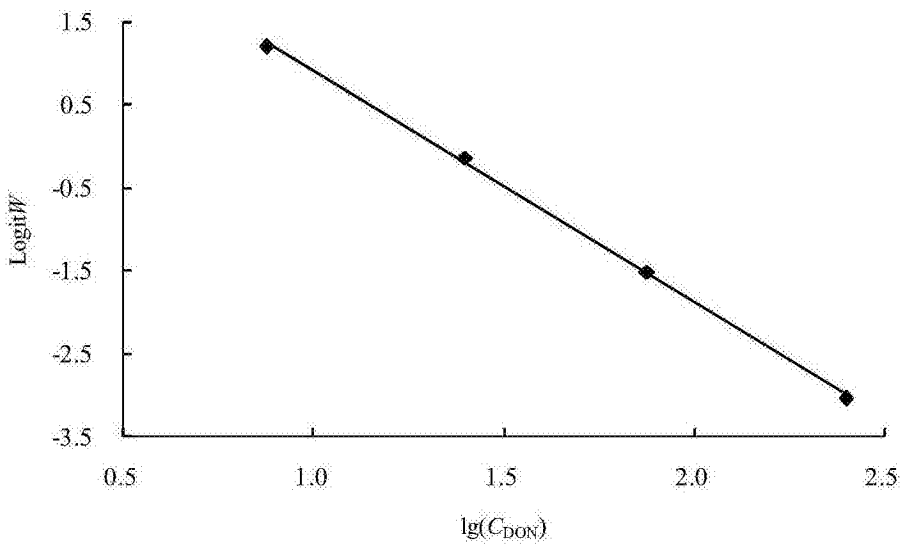


图3

专利名称(译)	一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用		
公开(公告)号	CN107365749A	公开(公告)日	2017-11-21
申请号	CN201710816445.0	申请日	2017-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	万宇平 袁媛 吴小胜 杨昌松 南铁贵 何方洋 洪小栩 李行		
发明人	万宇平 袁媛 吴小胜 杨昌松 南铁贵 何方洋 洪小栩 李行		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/14 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/14 G01N33/5308 G01N33/577		
其他公开文献	CN107365749B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种分泌抗呕吐毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株F-3-4，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.14304。此细胞株分泌的抗呕吐毒素单克隆抗体灵敏度高、特异性好、抗干扰性好，对呕吐毒素的50%抑制浓度IC50为22.1μg/L，对中药中可能存在的真菌毒素、农药、重金属、炮制过程中使用的辅料及污染菌等均具有较好的抗干扰性，为中药中呕吐毒素的免疫检测提供了条件，具有实际应用价值。

