



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106916790 A

(43)申请公布日 2017.07.04

(21)申请号 201710033126.2

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.01.18

G01N 33/543(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/577(2006.01)

CGMCC No.10872 2015.05.19

(71)申请人 国家粮食局科学研究院

地址 100037 北京市西城区百万庄大街11号

(72)发明人 李爱科 韩飞 陈曦 王薇薇  
王丽 王永伟

(74)专利代理机构 北京正理专利代理有限公司  
11257

代理人 张文祎 赵晓丹

(51)Int. Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

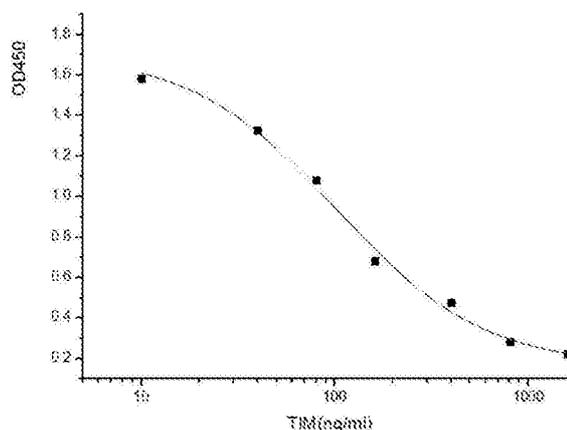
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

抗游离棉酚通用单克隆抗体及其应用

(57)摘要

本发明公开了抗游离棉酚通用单克隆抗体及其应用,属于免疫学检测分析技术领域。本发明提供了抗游离棉酚通用单克隆抗体的杂交瘤细胞株2D4,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.10872。本发明还提供了由上述杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体。本发明抗游离棉酚通用单克隆抗体,对游离棉酚具有较好的特异性,检测灵敏度IC<sub>50</sub>值为100ng/mL,可以用于棉籽及其制品中游离棉酚的特异性检测。



1. 抗游离棉酚通用单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其特征在於:其生物保藏编号为CGMCC No.10872。

2. 抗游离棉酚通用单克隆抗体,其特征在於:由权利要求1所述的杂交瘤细胞所分泌产生。

3. 权利要求1所述的杂交瘤细胞株或权利要求2所述的单克隆抗体在检测棉籽及其制品中的游离棉酚中的应用。

4. 权利要求1所述的杂交瘤细胞株或权利要求2所述的单克隆抗体在制备用于检测棉籽及其制品中游离棉酚的药剂或试剂盒中的应用。

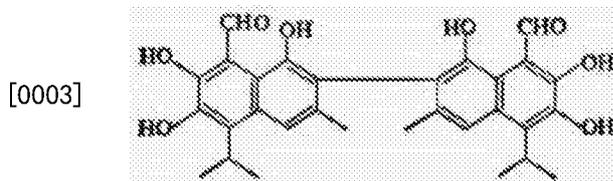
## 抗游离棉酚通用单克隆抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测分析技术领域,更具体地,涉及杂交瘤细胞株2D4及其产生的抗游离棉酚通用单克隆抗体和应用。

### 背景技术

[0002] 棉酚(gossypol)是存在于锦葵科植物属色素腺产生的多酚萜衍生物,存在于叶和种子中。棉酚的结构为1,1' 6,6' 7,7' -六羟基-3,3' -二甲基-5,5' -二异丙基-2,2' -联萘-8,8' -二醛。棉酚按其存在形式可分为游离棉酚和结合棉酚两类。游离棉酚中的活性基团(醛基和羟基)可与蛋白质结合,破坏酶活,降低蛋白质消化率,导致动物生长迟缓、中毒及死亡。



[0004] 棉籽榨油后棉酚部分转化为游离棉酚残留在棉籽饼粕中,平均含量为700-1920mg/kg。棉粕蛋白含量高,营养价值接近豆粕,在蛋白质原料紧缺的形势下,棉籽饼粕作为优质蛋白质原料在中国畜禽生产中应用日渐广泛,但棉籽饼粕中含有游离棉酚,如果在日粮中使用不当,容易造成动物棉酚中毒,同时人类如果食用含棉酚畜产品也存在安全风险。因此,欧盟、中国、美国等国家和地区制定了饲料、饲料原料和人类食品中棉酚含量限量标准。其中,中国现行饲料卫生标准(GB13078-2001)对于饲料中游离棉酚允许量规定为棉籽饼粕原料 $\leq 1200\text{mg/kg}$ 。棉酚是棉籽中重要内源毒素质量参数,建立快速、高效、简便的游离棉酚检测方法能够为收购过程中质量定标提供保障。

[0005] 目前检测棉籽饼粕及棉籽油中游离棉酚的方法主要包括高效液相色谱法、高效毛细管电泳法、高效液相质谱联用法、分光光度法(苯胺法)、免疫化学分析法等。但是,高效液相色谱法、高效毛细管电泳法、高效液相质谱联用法等运用仪器的方法虽然灵敏度较高、操作简单,但对仪器设备要求高、检测费用高,很难推广使用;分光光度法虽然普遍,但该方法存在灵敏度低、毒性大、操作费时等缺点。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,适用于大量样品的快速筛查。因此,提供对游离棉酚具有较高亲和力和检测灵敏度的单克隆抗体,对于检测棉籽饼粕及棉籽油中游离棉酚具有非常重要的意义。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供抗游离棉酚通用单克隆抗体杂交瘤细胞株;

[0007] 本发明的另一个目的是提供有上述杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体,该抗体对游离棉酚具有较好的亲和力和检测灵敏度,可以用来建立测定棉籽及其制品中游离棉酚总量的免疫学检测方法。

[0008] 为达到上述目的,本发明采用下述技术方案:

[0009] 本发明抗游离棉酚通用单克隆抗体的杂交瘤细胞株2D4已于2015年5月19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),保藏编号为CGMCC No.10872,分类命名为单克隆细胞株。

[0010] 本发明抗游离棉酚通用单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No.10872的小鼠单克隆抗体杂交瘤细胞株2D4所分泌。

[0011] 上述抗游离棉酚通用单克隆抗体的杂交瘤细胞株和其所分泌的单克隆抗体均属于本发明的保护范围。

[0012] 本发明所述杂交瘤细胞株或单克隆抗体可应用于检测棉籽及其制品中的游离棉酚。

[0013] 进一步,本发明所述杂交瘤细胞株或单克隆抗体可用于制备用于检测棉籽及其制品中游离棉酚的药剂或试剂盒中。

[0014] 本发明提供的抗游离棉酚通用单克隆抗体的杂交瘤细胞株2D4的制备基本步骤为:

[0015] (1) 免疫原的制备与鉴定:取醋酸棉酚溶于甲醇中,与BSA(牛血清白蛋白)溶液混合,之后加入氰基硼氢化钠( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ),室温下避光搅拌。之后用PBS溶液透析,分装保存;

[0016] (2) 小鼠的免疫:将抗原与等量弗式佐剂混合均匀后,通过颈背部多点注射免疫BALB/c小鼠。免疫过程总共六次:首次每只100 $\mu\text{L}$ ,间隔21天,之后二免到五免每只50 $\mu\text{L}$ ,最后一次为腹腔冲刺免疫,每只25 $\mu\text{L}$ ;

[0017] (3) 细胞融合与细胞株建立: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2D4;

[0018] (4) 杂交瘤细胞株性质的鉴定:采用小鼠单抗1g类/亚类鉴定用酶标二抗套装测定;通过ELISA法测定 $\text{IC}_{50}$ 值。

[0019] 其中,在步骤(1)中,醋酸棉酚的醛基与蛋白上的氨基发生缩合反应后,形成席夫碱,但由于碳氮双键不稳定,故又通过加入氰基硼氢化钠来还原碳氮双键为单键,使偶联产物可以稳定存在。

[0020] 本发明的有益效果如下:

[0021] (1) 本发明中所使用的氰基硼氢化钠还原了蛋白与小分子之间的碳氮双键,使免疫原更加稳定,更有利于免疫原的保存;

[0022] (2) 本发明获得的抗游离棉酚单克隆抗体细胞株,对游离棉酚有较好的检测灵敏度和亲和力( $\text{IC}_{50}$ 值为100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ );

[0023] (3) 本发明的细胞株应用产生的免疫分析方法对仪器设备要求低,操作简单,便于快速检测及推广使用。

## 附图说明

[0024] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的说明。

[0025] 图1为完全抗原紫外吸收光谱表征图;其中,GOS-BSA30、GOS-BSA60、GOS-BSA90分别表示小分子与蛋白投料比例为30:1、60:1、90:1;

[0026] 图2为细胞株2D4所产单克隆抗体对游离棉酚的标准抑制曲线。

## 具体实施方式

[0027] 为了更清楚地说明本发明,下面结合优选实施例和附图对本发明做进一步的说明。附图中相似的部件以相同的附图标记进行表示。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

[0028] 实施例1杂交瘤细胞株2D4的制备

[0029] 1、完全抗原的合成

[0030] 取醋酸棉酚(5mg)溶于2ml的甲醇中,与15ml的BSA(牛血清白蛋白)溶液(用PBS稀释50mg BSA)混合,之后加入60mg氰基硼氢化钠( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ),室温下避光搅拌12小时。之后在4℃用PBS溶液透析48小时,-20℃分装保存。

[0031] 因醋酸棉酚的醛基与蛋白上的氨基发生缩合反应后,形成席夫碱,但由于碳氮双键不稳定,故又通过加入氰基硼氢化钠来还原碳氮双键为单键,使偶联产物可以稳定存在。通过在4℃用PBS溶液透析48小时分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原,并通过紫外吸收扫描方法鉴定完全抗原是否偶联成功,如图1所示,BSA的特征峰在280nm处,小分子蛋白反应后,偶联物的紫外图在小分子特征峰240nm处有明显的凸起,且其同时具有BSA的特征峰,故判断偶联成功。

[0032] 2、动物免疫

[0033] 选择健康的6~8周龄的Balb/C小鼠进行免疫。取醋酸棉酚完全抗原(1mg/mL)与等量弗氏佐剂乳化均匀后,通过皮下多点注射免疫BALB/c小鼠,每只100 $\mu\text{L}$ 。首次免疫采用弗氏完全佐剂,加强免疫使用弗氏不完全佐剂,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21天。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21天冲刺免疫,不使用佐剂,腹腔注射,准备融合。

[0034] 3、细胞融合

[0035] 在冲击免疫三天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量为4000)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RPM1-1640基础培养液中,进行细胞计数;(3)将脾细胞和SP2/0细胞按照1:10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RPM1-1640基础培养液,离心后悬浮于含20%胎牛血清,2%的50 $\times$ HAT的RPM1-1640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。4、细胞筛选与细胞株建立

[0036] 在细胞融合的第三天对融合细胞进行RPM1-1640筛选培养液半换液,第5天进行用含20%胎牛血清,1%的100 $\times$ HT的RPM1-1640过渡培养液进行全换液,在第7天取细胞上清进行筛选。

[0037] 筛选分两步:第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔,第二步选用棉酚为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。间接竞争ELISA法的具体操作如下:

[0038] (1) 包板:用包被缓冲液(CBS)将包被抗原稀释1000倍加入酶标板,每孔100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C孵育2h;

[0039] (2) 洗板:用洗涤液(PBST)洗涤酶标板3次,每次3min,吸水纸拍干;

[0040] (3) 封闭:每孔加入200 $\mu$ l含0.2%明胶的PBS,37 $^{\circ}$ C孵育2h;

[0041] (4) 洗板:同(2);

[0042] (5) 加入棉酚标准溶液和细胞上清;每孔加入浓度为100 $\mu$ g/ml的棉酚标准溶液,平行设置阳性对照,阴性对照;

[0043] (6) 洗板:同(2);

[0044] (7) 加酶标二抗:每孔加入100 $\mu$ l经1:3000倍PBST稀释的辣根过氧化物酶-羊抗小鼠IgG,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h;

[0045] (8) 洗板:同(2);

[0046] (9) 显色:每孔加入100 $\mu$ l TMB显色液,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h;

[0047] (10) 终止:每孔加入50 $\mu$ l 2mol/L的硫酸溶液;

[0048] (11) 吸光度测定:用酶标仪测定450nm波长处的各孔吸光值;

[0049] 实验结果中出现的阳性孔一部分会对游离棉酚有较好的抑制,另一部分对游离棉酚没有抑制或抑制效果较差,选择对棉酚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,获得细胞株2D4.5、单克隆抗体的制备与鉴定

[0050] 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。

[0051] 使用小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用酶标二抗套装测定单克隆抗体的亚型,从表1中可以看出:其亚型为IgG2a型。

[0052] 表1杂交瘤细胞株2D4单克隆抗体的亚型鉴定

	二抗亚类	OD 值
	IgA	0.1
	IgG1	0.162
[0053]	IgG2a	1.806
	IgG2b	0.158
	IgG3	0.132
	IgM	0.126

[0054] 通过间接竞争ELISA,绘出单克隆抗体对游离棉酚标准抑制曲线(如图2),通过标准曲线,可计算出该单抗对游离棉酚的IC50为100 $\mu$ g/kg,其中,间接竞争ELISA方法灵敏度为0.03 $\mu$ g/kg,能够满足棉籽及其制品中游离棉酚的测定。

[0055] 标准曲线绘制过程如下:

[0056] (1) 包板:用包被缓冲液(CBS)将包被抗原稀释1000倍加入酶标板,每孔100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C孵育2h;

- [0057] (2) 洗板:用洗涤液(PBST)洗涤酶标板3次,每次3min,吸水纸拍干;
- [0058] (3) 封闭:每孔加入200 $\mu$ l含0.2%明胶的PBS,37 $^{\circ}$ C孵育2h;
- [0059] (4) 洗板:同(2);
- [0060] (5) 加入棉酚标准溶液和抗体;用含30%甲醇的磷酸盐缓冲液(PBS)分别配置0,0.01,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1 $\mu$ g/mL的游离棉酚标准溶液。将标准溶液分别加入到已经封闭好的酶标板中,每孔50 $\mu$ L,每个浓度的标准溶液重复3个孔,再每孔加入50 $\mu$ L 1:16000稀释的抗游离棉酚单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C孵育半小时;
- [0061] (6) 洗板:同(2);
- [0062] (7) 加酶标二抗:每孔加入100 $\mu$ l经1:3000倍PBST稀释的辣根过氧化物酶-羊抗小鼠IgG,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h;
- [0063] (8) 洗板:同(2);
- [0064] (9) 显色:每孔加入100 $\mu$ l TMB显色液,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h;
- [0065] (10) 终止:每孔加入50 $\mu$ l 2mol/L的硫酸溶液;
- [0066] (11) 吸光度测定:用酶标仪测定450nm波长处的各孔吸光值;
- [0067] (12) 标准曲线绘制:用origin 8.5绘制标准抑制曲线。
- [0068] 实施例2抗游离棉酚特异性单克隆抗体应用
- [0069] 1、溶液的配置:
- [0070] 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 $^{\circ}$ C贮存备用;
- [0071] 磷酸盐缓冲液(PBS):8.00g NaCl,0.2g KCl,0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,2.9gNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<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;
- [0072] PBST:含0.05%吐温20的PBS;
- [0073] 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:60mg TMB溶于100mL乙二醇中。A、B液按1:5混合即为TMB显色液,现用现混;
- [0074] 异丙醇-正己烷混合溶剂:6:4(V/V);
- [0075] 溶剂A:量取约500mL异丙醇、正己烷混合溶剂,2mL 3-氨基-1-丙醇,8mL冰乙酸和50mL水于1000mL的容量瓶中,再用异丙醇-正己烷混合溶剂定容至刻度。
- [0076] 2、将杂交瘤细胞株2D4通过体内腹水制备的单克隆抗体应用于游离棉酚ELISA添加回收试验:
- [0077] (1) 用碳酸盐缓冲液(CBS)稀释好的1.5 $\mu$ g/mL LAFB1-BSA作为包被原包被96孔酶标板,每孔100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C包被2h后,用PBST洗液洗板三次,每次每孔250 $\mu$ L,每次3min,拍干;
- [0078] (2) 用含0.01%明胶的CBS进行封闭,每孔200 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C封闭2h,用PBST洗液洗板三次,每次每孔250 $\mu$ L,每次3min,拍干;
- [0079] (3) 用含30%甲醇的磷酸盐缓冲液(PBS)分别配置0,0.01,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1 $\mu$ g/L的游离棉酚B1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50 $\mu$ L,每个样品重复3个孔,再每孔加入50 $\mu$ L 1:16000稀释的抗游离棉酚单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C反应半小时后,洗板拍干;
- [0080] (4) 每孔加入100 $\mu$ L用含0.01%明胶的PBS 1:3000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG二抗,37 $^{\circ}$ C反应半小时后,洗板拍干。每孔加入100 $\mu$ L TMB显色液,37 $^{\circ}$ C显色15min后,每孔加入

50 $\mu$ L 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液,450nm测吸光值;

[0081] (5) 添加回收及样品前处理:称取5g粉碎的棉籽样品置入250mL具塞三角瓶中,分别添加10ng、50ng和100ng游离棉酚,加入20粒玻璃珠,用移液管准确加入50mL溶剂A,塞紧瓶塞,放入振荡器内振荡1h(每分钟120次左右)。用干燥的定墩滤纸过滤,过滤时在漏斗上加盖一表玻璃以减少溶剂挥发,弃去最初几滴滤液,收集滤液于100mL具塞三角烧瓶中。滤液用含0.01%明胶的PBS稀释4倍后,作为ELISA样品提取液,采用间接竞争ELISA进行添加回收试验,其回收率分别为72%,85%,93%。

[0082] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定,对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动,这里无法对所有的实施方式予以穷举,凡是属于本发明的技术方案所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

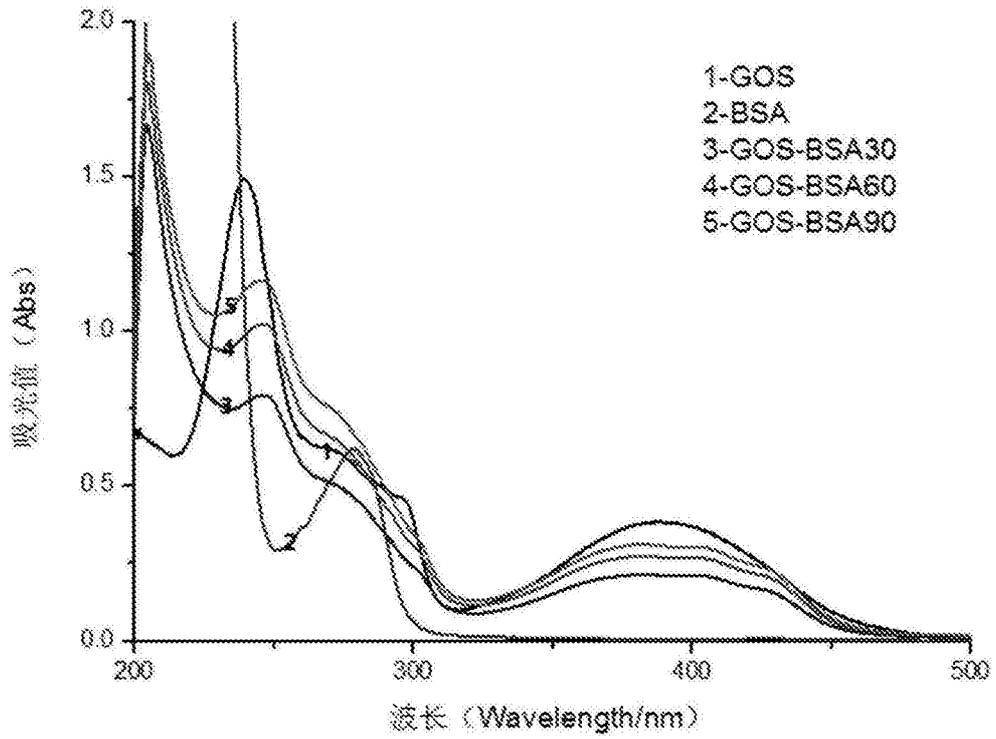


图1

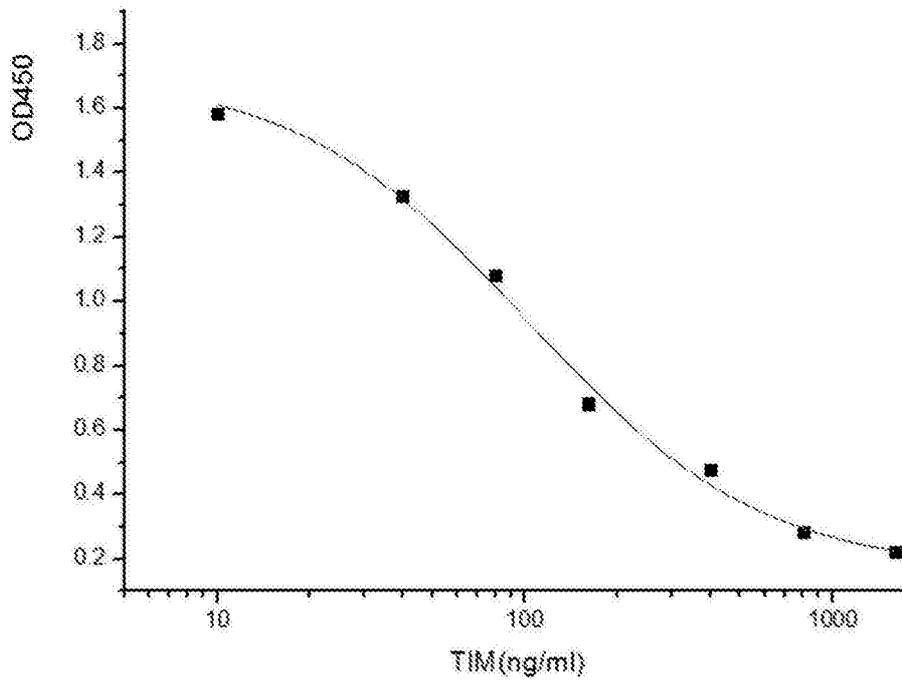


图2

专利名称(译)	抗游离棉酚通用单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106916790A</a>	公开(公告)日	2017-07-04
申请号	CN201710033126.2	申请日	2017-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	国家粮食局科学研究院		
申请(专利权)人(译)	国家粮食局科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	国家粮食局科学研究院		
[标]发明人	李爱科 韩飞 陈曦 王薇薇 王丽 王永伟		
发明人	李爱科 韩飞 陈曦 王薇薇 王丽 王永伟		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
代理人(译)	赵晓丹		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了抗游离棉酚通用单克隆抗体及其应用，属于免疫学检测分析技术领域。本发明提供了抗游离棉酚通用单克隆抗体的杂交瘤细胞株2D4，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.10872。本发明还提供了由上述杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体。本发明抗游离棉酚通用单克隆抗体，对游离棉酚具有较好的特异性，检测灵敏度IC50值为100ng/mL，可以用于棉籽及其制品中游离棉酚的特异性检测。

