



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116768765 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 19

(21) 申请号 202310523011.7

C07C 303/32 (2006.01)

(22) 申请日 2023.05.10

C07K 16/44 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C12N 5/20 (2006.01)

CCTCC NO:C2022335 2022.10.28

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 王玉莲 张丹丹

(74) 专利代理机构 郑州大通专利商标代理有限公司 41111

专利代理师 栗丹

(51) Int. Cl.

C07C 303/22 (2006.01)

C07C 309/51 (2006.01)

C07C 245/20 (2006.01)

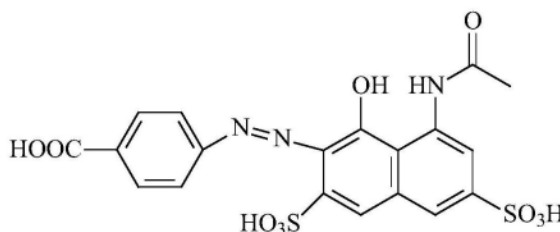
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

一种5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氨基-4-萘酚-2,7-二磺酸的合成方法及应用

(57) 摘要

本发明属于化学合成技术领域,具体涉及一种5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氨基-4-萘酚-2,7-二磺酸的合成方法及其应用。本发明以对氨基苯甲酸和1-氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸为原料,通过重氮化、乙酰化、偶合等步骤合成红2G (R2G) 的羧基化产物5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氨基-4-萘酚-2,7-二磺酸 (R2G-COOH)。本发明合成方法简单,对环境和人体伤害小,原料低廉且易得,反应条件温和,产品纯度高,可以作为半抗原,通过偶联载体蛋白BSA,免疫小鼠后,制备出灵敏度高、特异性强的单克隆抗体,对红2G的IC₅₀达到0.1μg/L,可以用于食品中红2G残留的快速检测,具有较高的实用价值。



1. 一种5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸的合成方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)对重氮氨基苯甲酸的合成:

将对氨基苯甲酸溶于超纯水中,在0~5℃环境下搅拌均匀,加入盐酸,冷却至4℃,在5~10 min内每间隔10 s滴加NaNO₂溶液,反应完全后,停止滴加NaNO₂溶液,温度保持0~5℃继续搅拌2 h,得到A液;

(2)1-乙酰氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸的合成:

将1-氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸和水混合,20℃搅拌10min,再加入乙酰化催化剂,升温至30℃,反应30 min,冷却,用Na₂CO₃将pH值调至9~10,过滤,得到B液;

(3)5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸的合成:

将步骤(1)所得A液于0~5℃、5~10 min内加至步骤(2)所得B液中,将pH值控制在8,0~5℃搅拌1 h,反应完毕后,加入氯化钠,加热至65℃,搅拌30 min至烧瓶底部无晶体,呈现粘稠状态,降温至30℃,抽滤,收集滤饼;

(4)5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸的纯化:

将步骤(3)所得滤饼,用热水溶解,加热至65℃,搅拌30min,冷却至40℃后抽滤,收集滤饼,真空干燥过夜后,得到产物5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,以w/v计,步骤(1)中盐酸浓度为30%,NaNO₂浓度为30%。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)中乙酰化催化剂为乙酸酐。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(3)中A液和B液的摩尔比为(1~1.5):1。

5. 采用权利要求1~4任一项所述的方法制备得到的5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸在制备识别红2G的单克隆抗体中的应用,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸与牛血清白蛋白相偶联得到免疫原;

(2)将5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸与卵清蛋白相偶联得到包被原;

(3)用步骤(1)的免疫原免疫小鼠,经细胞融合和筛选,获得杂交瘤细胞株;

(4)用步骤(3)的杂交瘤细胞株制备单克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,步骤(1)中半抗原5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸与牛血清白蛋白的摩尔比为100:1;步骤(2)中半抗原5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸与卵清蛋白的摩尔比为(25~125):1。

7. 一株分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其特征在于,所述单克隆抗体识别红2G,所述杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株2G6,保藏编号为CCTCC NO:C2022335。

8. 权利要求7所述的杂交瘤细胞株在制备识别红2G的单克隆抗体中的应用。

9. 一种识别红2G的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体是由权利要求7所述的杂交瘤细胞株分泌得到。

10. 采用权利要求1~4任一项所述的方法制备得到的5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸、权利要求7所述的杂交瘤细胞株或权利要求9所述的单克隆抗体在检

测红2G中的应用。

一种5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸的合成方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于化学合成技术及免疫学技术领域,具体涉及一种5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸的合成方法以及该化合物在红2G单克隆抗体制备中的应用。

背景技术

[0002] 红2G又叫做酸性红1、食品红10和8-乙酰氨基-2-苯偶氮基-1-萘酚基-3,6-二磺酸二钠盐,由于其价格低廉、着色力强,常作为一种食品着色剂用于熟肉制品、香肠、果酱、含酒精饮料、蛋和奶产品中。人食用红2G会引起中毒,长期食用甚至会致癌。2007年7月,欧盟27国宣布禁止在食品中使用红2G。随后中国、美国、加拿大、日本等国家也明确禁止在食品中使用红2G。但是,近年来食品中非法添加工业染料的现象屡有发生,各国市售的熟肉制品及调味品、食品包装等均曾检出红2G。

[0003] 红2G目前大部分采用仪器法进行检测,主要有高效液相色谱法(HPLC)、超高液相色谱法(UPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、紫外可见光谱法(UV-Vis)等。但HPLC和UPLC存在复杂的基质中抗干扰性较差、设备昂贵、检测器种类少、缺少通用性检测器等缺点,且样品前处理耗时较长;LC-MS效率高、准确性强,但联用仪器价格昂贵,远不如HPLC那样普及。紫外可见光谱法易受到其他光学活性添加剂和调味品的干扰,易出现假阳性。而酶联免疫法(ELISA)具有灵敏度高、特异性强、操作简单、仪器设备成本较低等优点。

[0004] 目前,国内外关于红2G单克隆抗体的制备及其免疫学检测方法仅有2篇文献报告。申请公布号为CN 102798713 A的发明专利申请,公开了食品红10(红2G)检测试剂盒及其制备方法,公布了食品红10(红2G)人工抗原的制备,将红2G结构上联苯酚的羟基转化为甲磺酯基,在无水乙醇和液氨的作用下合成能够与蛋白质偶联的半抗原,将半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联合成人工抗原,该抗原制备的单克隆抗体对红2G的 IC_{50} 为951.4 μ g/L,该专利制备的单克隆抗体对红2G的灵敏度较低,且半抗原和人工抗原制备过程较为复杂,时间较长,在合成过程中使用二氯甲烷、液氨等挥发性气体对人体造成伤害。申请公布号为CN 114032215 A的发明专利申请,公开了一种分泌红2G单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用,公布了一种红2G人工抗原的合成方法,将重氮化的对氨基苯磺酸与1-氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸直接偶合,使红2G结构上含有羧基,再连接BSA合成人工抗原,用该抗原制备的单克隆抗体对红2G的 IC_{50} 为2 μ g/L。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供了一种红2G羧基化产物5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸(R2G-COOH)的合成方法,合成步骤简单、有效。

[0006] 本发明还提供一种以R2G-COOH为半抗原制备得到完全抗原,通过免疫小鼠、细胞融合及筛选,从而得到灵敏度高、特异性强的单克隆抗体,对红2G的 IC_{50} 达到0.1 μ g/L。

[0007] 本发明通过以下技术方案实现：

[0008] 1、本发明提供一种R2G-COOH的合成方法，具体制备步骤如下：

[0009] (1)对重氮氨基苯甲酸的合成

[0010] 将对氨基苯甲酸溶于超纯水中，在0~5℃环境下搅拌均匀，加入浓度为30%的盐酸，冷却至4℃，在5~10min内每间隔10s滴加NaNO₂溶液，用刚果红试纸和淀粉碘化钾试纸检测均迅速变为蓝色，表明反应完全，此时液体呈黄色，停止滴加NaNO₂溶液，温度保持0~5℃继续搅拌2h，得到的溶液简称A液，于0~5℃保存备用。

[0011] (2)1-乙酰氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸的合成

[0012] 将1-氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸(H酸，灰色粉末)和水混合，20℃搅拌10min，再加入乙酰化催化剂——乙酸酐，升温至30℃，反应30min，变为棕黑色液体，冷却，用Na₂CO₃将pH值调至9~10，过滤，得到1-乙酰氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸，简称为B液，于0~5℃备用。

[0013] (3)R2G-COOH的合成

[0014] 将步骤(1)所得A液于0~5℃、5~10min内加至步骤(2)所得B液中，A液和B液以摩尔比为(1~1.5):1时最优，将pH值控制在8左右，0~5℃搅拌1h，反应完毕后，加入氯化钠，加热至65℃，搅拌30min至烧瓶底部无晶体，呈现粘稠状态，降温至30℃，抽滤，收集滤饼。

[0015] (4)R2G-COOH的纯化

[0016] 将步骤(3)所得滤饼，用热水溶解，加热至65℃，搅拌30min，冷却至40℃后抽滤，收集滤饼，真空干燥过夜后，得到产物R2G-COOH。

[0017] 2、本发明提供R2G-COOH在免疫学领域制备识别红2G的单克隆抗体的应用，通过以下方式进行：

[0018] (1)将R2G-COOH作为半抗原，与载体蛋白偶联合成免疫原和包被原，免疫原的载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)。免疫原的投料比(R2G-COOH:BSA)，即摩尔比为100:1，偶联比为15.5。

[0019] 包被原的载体蛋白为卵清蛋白(OVA)，包被原设置不同投料比(R2G-COOH:OVA)为25:1、50:1、75:1、100:1、125:1，其中50:1为最佳投料比，最佳偶联比为15.4。

[0020] (2)将免疫原以不同剂量小鼠背部皮下注射，首次免疫以免疫剂量为50μg/只和100μg/只两个免疫剂量，将免疫原与弗氏完全佐剂皮下多点注射，间隔3周后加强免疫采用相同免疫剂量与弗氏不完全佐剂乳化后，皮下多点注射，免疫间隔为2周，第一次加强免疫后6~8天进行断尾采血，通过间接竞争ELISA检测小鼠血清效价及特异性，选择效价高、特异性强的小鼠进行细胞融合，研究表明免疫剂量为50μg/只的小鼠血清效价及灵敏度优于100μg/只。

[0021] (3)细胞融合与筛选：

[0022] 采用聚乙二醇(PEG4000)将小鼠免疫脾细胞和SP 2/0骨髓瘤细胞进行融合，采用HAT选择培养基培养杂交瘤细胞，用间接竞争ELISA筛选阳性细胞孔，筛选效价最高、抑制效果最佳的细胞孔进行亚克隆，使用HT选择培养基培养，5天后使用间接竞争ELISA检测，连续亚克隆4次，获得能够分泌红2G特异性抗体的杂交瘤细胞株2G6(保藏编号CCTCCNO: C2022335)。

[0023] (5)单克隆抗体的制备：

[0024] 每只小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡进行预处理，间隔7d后，每只小鼠腹腔注射

0.5mL对数生长期的杂交瘤细胞悬液 1×10^6 cell/mL,间隔7d后,每天观察小鼠腹水产生情况。待小鼠腹部明显膨大时,用酒精棉球对小鼠腹部皮肤消毒后采集腹水。将收集的腹水8000r/min离心10min,去掉表面油层,吸取上清,得到单克隆抗体,加入甘油后混匀并分装,置-20℃保存。

[0025] 本发明相比现有技术具有以下有益效果:

[0026] 1、本发明红2G羧基化产物5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸的合成中使用的对氨基苯甲酸、盐酸、 NaNO_2 、1-氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸、乙酸酐、氯化钠等均为常用原料及试剂,容易得到。

[0027] 2、本发明红2G羧基化产物5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸合成中原料相对安全、毒性作用较小,且对环境污染小。

[0028] 3、本发明红2G羧基化产物5-乙酰氨基-3-对苯甲酸偶氮基-4-萘酚-2,7-二磺酸合成中反应设备、反应条件容易实现,所使用的烧瓶、恒温水浴锅、抽滤瓶、pH计等实验仪器造价低,操作简单。

[0029] 4、本发明合成产物R2G-COOH应用过程中,步骤简单、有效,适用于免疫学分析领域。

[0030] 5、本发明通过不同免疫剂量的筛选,成功免疫小鼠,获得效价高、抑制效果好的小鼠进行细胞融合,筛选出杂交瘤细胞株2G6(保藏编号CCTCC NO:C2022335),该细胞株分泌的单克隆抗体对红2G具有较好的特异性和检测灵敏度(IC_{50} 为0.1 $\mu\text{g/L}$),于免疫学检测方法具有实际应用价值。

[0031] 6、本发明获得的由保藏编号CCTCC NO:C2022335的杂交瘤细胞株2G6分泌的单克隆抗体对红2G的灵敏度为申请公布号为CN114032215 A发明专利申请的20倍,是申请公布号为CN 102798713A发明专利申请的9514倍(见表1)。

[0032] 表1. 本发明与现有技术的对比的积极效果

比较技术	半抗原合成原料	偶联方法	载体蛋白	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)
CN 102798713A	食品红10(红2G)	EDC	BSA/OVA	951.4
CN 114032215A	对氨基苯磺酸、1-氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸	EDC	BSA/OVA	2.0
本发明	对氨基苯甲酸、1-乙酰氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸	EDC	BSA/OVA	0.1

附图说明

[0034] 图1本发明合成的R2G-COOH的紫外扫描图谱(PBS为溶剂)。

[0035] 图2本发明合成的R2G-COOH的红外扫描图谱(KBr)。

[0036] 图3本发明合成的R2G-COOH¹H NMR图谱(氘水)。

[0037] 图4本发明合成的R2G-COOH¹³C NMR谱图(氘水)。

[0038] 图5本发明合成的R2G-COOH质谱图(甲醇为溶剂)。

[0039] 图6本发明合成的R2G-COOH的化学结构式。

[0040] 图7单克隆抗体对红2G药物抑制的标准曲线。

[0041] 保藏信息

[0042] 保藏时间:2022年10月28日;

[0043] 保藏单位名称:中国典型培养物保藏中心;

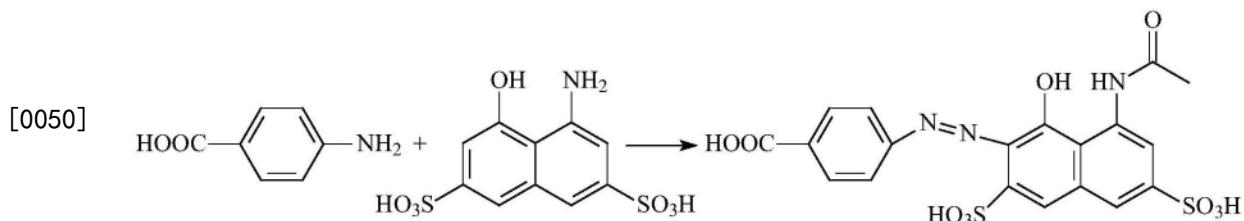
- [0044] 保藏编号:CCTCC NO:C2022335;
 [0045] 保藏单位地址:中国武汉武汉大学;
 [0046] 分类命名:杂交瘤细胞株2G6。

具体实施方式

[0047] 下面通过具体实施方式对本发明进行更加详细的说明,以便于对本发明技术方案的理解,但并不用于对本发明保护范围的限制。

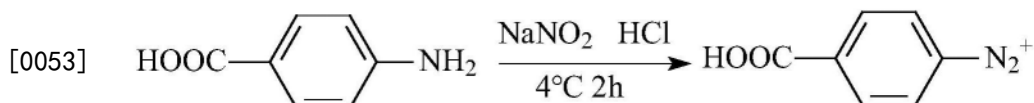
[0048] 实施例1:

[0049] 一种R2G-COOH的化学合成方法,合成路线:



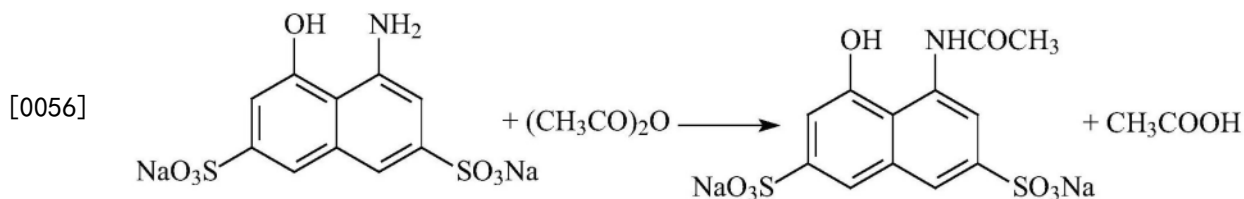
[0051] (1) 反应液A:对重氮氨基苯甲酸的合成

[0052] 在烧杯中加入对氨基苯甲酸(0.889g,6.0mmol),溶于3.5mL超纯水,加入1.8mL30%盐酸,冷却至4℃,在10min内每间隔10s滴加30% NaNO₂,用刚果红试纸和淀粉碘化钾试纸迅速变为蓝色时,停止滴加NaNO₂溶液,搅拌2h,得到的溶液简称为A液,于4℃储存备用。



[0054] (2) 反应液B:H酸乙酰化

[0055] 在烧瓶中加入1.375g 1-氨基-8-萘酚-3,6-二磺酸(H酸,灰色粉末),溶于40mL超纯水中,20℃搅拌10min,再加入4mL乙酸酐,升温至30℃,反应30min,此时变为棕黑色液体,冷却后用Na₂CO₃将pH值调至9,去除产生的乙酸,过滤,得到的溶液简称为B液,于4℃储存备用。



[0057] (3) 偶合:将步骤(1)所得A液于4℃、5min内加至步骤(2)所得B液中,A液和B液摩尔比为1:1,生成深红色的物质,并有泡沫产生,将pH值控制在8左右,4℃下搅拌1h,反应完毕后,加入氯化钠,加热至65℃,搅拌30min至烧瓶底部无晶体,呈现粘稠状态,降温至30℃,抽滤,收集滤饼。

[0058] (4) 纯化:将步骤(3)所得滤饼,加入20mL热水,少量氯化钠,加热至65℃,搅拌30min,40℃吸滤后,真空干燥过夜后,得到产物R2G-COOH约1.06g。

[0059] 本发明制备得到的产物经紫外、红外、核磁共振、质谱检测,结果如下:

[0060] 图1所示为R2G-COOH的紫外扫描图谱(Aglient 8453型),PBS为溶剂,在311nm处出

现的峰可能是由于苯环上的取代基影响,特征峰产生了一定偏移(苯的特征峰在254nm),232nm应归于芳香环的吸收,可见区的最大特征吸收峰在510nm左右,是偶氮基与芳香环整个共轭体系的电子跃迁所引起的,符合该物质特征。

[0061] 图2所示为R2G-COOH的红外扫描图谱(VERTEX70,傅里叶变换红外光谱仪),溴化钾(KBr)压片,从图中可以看出各主要吸收峰与各基团的对应关系为:3439 cm^{-1} 对应为N-H的伸缩振动,1700~1680 cm^{-1} 为苯环对位羧基的振动吸收峰,1603 cm^{-1} 为红2G上乙酰基上C=O的振动吸收,1557~1492 cm^{-1} 对应为苯环的骨架振动,1497 cm^{-1} 对应为-N=N-伸缩振动,1324 cm^{-1} 时应为C-N伸缩振动,1052 cm^{-1} 和986 cm^{-1} 对应为-SO₃-基团中S=O对称与非对称伸缩振动897~688 cm^{-1} 对应为苯环上C-H弯曲振动,符合该物质特征。

[0062] 图3所示为R2G-COOH¹H NMR谱图(德国Bruker Avance III 400MHz),采用氘水做溶剂,活泼氢会发生氘代羟基、羧基、氨基、磺酸基都不出峰;在氢谱中 δ 8.68(s,1H)化学位移最大属于2号;7.61(s,1H)为3或者4其中的一个氢,另外一个和对位取代苯环的氢重合在7.54(d,J=8.3Hz,3H)处;7.77(d,J=8.4Hz,2H)为对位取代苯环6处的氢,5处的氢在7.54(d,J=8.3Hz,3H)处;乙酰基的甲基在2.19(s,3H)处,总共有10个氢,符合该物质特征。

[0063] 图4所示为R2G-COOH¹³C NMR谱图(德国Bruker Avance III 400MHz),采用氘水做溶剂,碳谱总共有十个,其中 δ 179.95、172.94处的为羧基峰7、8号;其余的碳为芳香碳,且大多数为季碳,无法完全进行归属;其中可以明确的是130.55、117.23分别归属于对位取代苯环的碳5和6;乙酰基的甲基碳1在24.84处;剩下的碳的个数总共有12个,可能有部分季碳的化学位移重合,为一个峰;因此碳谱总共包含19个碳,符合该物质特征。

[0064] 图5所示为R2G-COOH质谱图(IT-TOF-MS,Shimadzu),甲醇为溶剂,对合成产物进行正离子Na⁺模式、NH₄⁺模式、H⁺模式下的轰击以及负离子H⁻模式下的轰击,532.0068为R2G-COOH的[M+Na]⁺峰,正离子Na⁺模式下的理论值为532.0091,测定值为532.0068;527.0496为R2G-COOH的[M+NH₄]⁺峰,正离子NH₄⁺模式下的理论值为527.0537,测定值为527.0496;510.0242为R2G-COOH的[M+H]⁺峰,正离子H⁺模式下的理论值为510.0272,测定值为510.0242;507.9921为R2G-COOH的[M+H]⁻峰,负离子H⁻模式下的理论值为508.0126,测定值为507.9921。表明所合成的化合物分子量与理论值相符。

[0065] 综上所述,判定R2G-COOH合成成功。所合成的R2G-COOH的化学结构式如图6所示。

[0066] 实施例2:免疫原及包被原的制备

[0067] (1)免疫原的制备:称取15.3mg(0.03mmol)R2G-COOH,加入1mL(pH 4~6)PBS溶解,加入3.5mg(0.03mmol)N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和5.8mg(0.03mmol)碳二亚胺(EDC),室温搅拌避光反应6h,反应完全后过滤得上清A液。取20mg(0.0003mmol)BSA溶于2mL PBS中(R2G-COOH:BSA=100:1,偶联比为15.5),为B液。将A液缓慢滴加到B液中,低温下搅拌反应过夜,4℃PBS中透析5d,每天更换三次透析液。透析后,8000r/min离心10min,保留上清,即得R2G-COOH-BSA,于-20℃保存备用。

[0068] (2)不同投料比包被原的制备:分别称取7.64mg(0.015mmol)、15.3mg(0.03mmol)、22.90mg(0.045mmol)、30.55mg(0.060mmol)、38.18mg(0.075mmol)R2G-COOH,分别加入1mL(pH=5)PBS溶解,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和碳二亚胺(EDC),室温搅拌避光反应过夜,反应完全后过滤得上清C液。取27mg(0.0006mmol)OVA溶于5mL PBS中,为D液。将C液分别缓慢滴加到D液中,得到投料比R2G-COOH:OVA为25:1、50:1、75:1、100:1、125:1,偶联比分别为

15.7、15.4、15.1、14.9、13.6。

[0069] 实施例3:杂交瘤细胞株的筛选

[0070] (1)小鼠免疫

[0071] 采用6~8周龄SPF级雌性Balb/c小鼠为免疫动物,首次基础免疫采用等量弗氏完全佐剂与免疫原乳化后小鼠的颈背部皮下多点注射。21天后进行加强免疫,加强免疫采用等量弗氏不完全佐剂与免疫原乳化后皮下注射于小鼠颈背部,每次加强免疫的免疫间隔为14d。首免除外,其他几次加强免疫之后,第6~8d对小鼠进行尾静脉采血,血液于4℃静置过夜,8000r/min离心5min后,分离血清,间接竞争ELISA法检测血清抗体效价及特异性,对比不同免疫剂量对血清效价的影响,选择效价高、特异性强的小鼠进行冲击免疫,冲击免疫采用两倍剂量免疫原直接注射于小鼠腹腔。

[0072] 表2.免疫程序

免疫原	组别	动物数(只)	免疫剂量(μg)
R2G-COOH-BSA	A	4	100
	B	4	50

[0074] (2)杂交瘤细胞的制备:三免血清效价检测中,A组2号小鼠效价1:25600,抑制率达到71.2%,采用100 μg 剂量注入小鼠腹腔进行冲击免疫,连续两次冲击免疫后,间隔一天后,按照有限稀释法进行细胞融合。

[0075] 步骤如下:

[0076] a.制备骨髓瘤细胞:从液氮罐中取出冻存的SP2/0骨髓瘤细胞(SP2/0骨髓瘤细胞来自本实验室),复苏后于37℃、5% CO₂培养箱培育,待细胞长满孔底,细胞状态良好时收集细胞,密度调整为1 $\times 10^6$ cell/mL,于Balb/c小鼠颈背部皮下多点注射接种,每只0.5mL。一周后要每天观察是否有肿瘤长出。待肿瘤生长至直径约3cm时,将小鼠乙醚麻醉脱颈处死,用75%酒精浸泡5min。在超净工作台内,固定小鼠,使其背部向上,用眼科剪打开其背部皮肤,小心剪开肿瘤包膜后,用弯头眼科镊将肿瘤组织取出移至玻璃匀浆器中,加入10mL RPMI-1640基础培养基,充分研磨后再加入10mL RPMI-1640基础培养基,混匀,静置2min,吸取上层细胞悬液18mL于50mL离心管,补加10mL RPMI-1640基础培养液至玻璃匀浆器后再转移一次。1200r/min离心5min,弃上清,用15mL RPMI-1640基础培养基重悬细胞。将细胞悬液缓慢滴至装有15mL人淋巴细胞分离液的50mL离心管中,待其呈现液体分层,1700r/min离心10min,用吸管吸走上层红色细胞悬液后,然后将中层白色的骨髓瘤细胞悬液转移至另一支50mL离心管中,用10mL RPMI-1640基础培养基重悬细胞,用血细胞计数板计数后待用。

[0077] b.制备饲养细胞:取一只未免疫的Balb/c小鼠,先将小鼠用乙醚麻醉,脱颈致死,用75%酒精浸泡5min,无菌条件下固定小鼠并将小鼠腹部朝上,取眼科剪剪开整个腹部皮肤和腹膜,暴露脾脏。钝性剥离脾脏转入玻璃匀浆器中,加入5mL RPMI-1640基础培养基,充分研磨后再加入10mL,用40 μm 细胞筛过滤于50mL离心管中。1200r/min离心5min,弃上清后用15mL RPMI-1640基础培养基重悬细胞,挑去结缔组织,1200r/min离心5min,弃上清,将细胞转移至含2% HAT的RPMI-1640完全培养基中。

[0078] c.制备免疫脾细胞:方法与步骤b相同。

[0079] d.细胞融合:将骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按1:5~1:10的比例混合于50mL离心管中,加15mL RPMI-1640基础培养基充分混合,1500r/min离心10min,弃上清,控干水分,轻轻

敲击管底,使细胞松散均匀呈糊状,置于37℃水浴中。1min内边搅拌边滴加0.8mL~1mL预热至37℃的PEG,并轻轻搅拌1min,使PEG与细胞充分接触,然后缓慢加入预热至37℃的RPMI-1640基础培养基,先慢后快,共加入40mL终止融合反应。轻轻混匀细胞后,800r/min离心5min,弃上清,移至含饲养细胞的完全培养基中,轻轻搅拌使细胞分布均匀。将融合细胞悬液按每孔200μL接种于96孔细胞培养板中,置于37℃5% CO₂培养箱中培养。融合当天记为第0d,前3d尽量不要移动细胞,第4d每孔补加100μL 2% HAT完全培养基,观察集落生长情况。第5d每孔吸出100μL上清,再补加100μL 2% HAT完全培养基,继续跟踪观察融合细胞。

[0080] (3)阳性杂交瘤细胞株的筛选及亚克隆:根据细胞的生长情况,当细胞生长到占孔底1/5左右时,检测细胞上清的效价及抑制情况(通常第7~9d)。取细胞培养上清,用间接竞争ELISA方法进行筛选,设置“0”孔和药物孔(首次筛选药物时R2G的浓度设置为50μg/L,之后克隆化时,逐渐降低药物浓度)。与“0”孔OD值相比,药物孔OD值能显著被抑制的孔判定为阳性孔。选择几个较强的阳性孔,利用有限稀释法进行亚克隆,其余的阳性孔转入24孔细胞培养板进行扩大培养,亚克隆当天为第0天,第5天直接进行间接竞争ELISA检测。经过4次亚克隆后,筛选出红2G单克隆抗体细胞株2G6,并于2022年10月28日送至位于湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏编号为CCTCC NO:C2022335,命名为杂交瘤细胞株2G6。

[0081] 实施例5:单克隆抗体的制备及检测

[0082] 每只小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡进行预处理,7d后每只小鼠腹腔注射0.5mL对数生长期的杂交瘤细胞悬液 1×10^6 cell/mL。7d后,每天观察小鼠腹水产生情况。待小鼠腹部明显膨大时收集腹水,8000r/min离心10min,去掉表层脂肪,吸取上清,等体积加入甘油,置-20℃保存,根据北京博奥龙免疫技术有限公司提供的小鼠单克隆抗体快速ELISA亚型检测试剂盒的操作要求,对本发明所得到的单克隆抗体进行亚型鉴定,结果为小鼠IgG1亚型。

[0083] (1)ELISA操作程序

[0084] a. 方阵滴定法:将包被原用碳酸盐缓冲液(CBS)倍比稀释成系列浓度,然后将每种浓度的包被原纵向加入酶标板,各包被一列,每孔100μL,置于4℃湿盒过夜包被。甩出包被液,拍干,每孔加250μL洗涤液,静置30s后,甩出洗涤液,拍干;如此重复洗涤3次。每孔加250μL封闭液,置37℃湿盒封闭1h。甩出封闭液后洗涤3次,拍干。每孔先加入50μL PBS,将血清或抗体倍比稀释成系列浓度,加入酶标板,每孔50μL。同时设阴性和空白对照,37℃湿盒孵育40min。甩出孔内液体,洗涤3次,拍干。将HRP标记羊抗鼠二抗用PBS稀释成工作浓度1:6000,每孔100μL加入酶标板,37℃湿盒孵育40min。甩出孔内液体,洗涤3次,拍干。将底物每孔100μL加入酶标板,37℃湿盒孵育15min。加终止液,每孔50μL。用酶标仪测定OD₄₅₀值。选择OD值2.0左右,与相邻孔OD值差异较显著的孔对应的包被浓度和抗体稀释度为工作浓度。

[0085] b. 间接ELISA:将包被原用CBS稀释成用方阵滴定确定的工作浓度,100μL/孔,置4℃湿盒孵育10~16h(或37℃孵育2~2.5h)。将血清或抗体用PBS稀释到工作浓度,每孔先加入50μL PBS,再加50μL血清或抗体。其余操作步骤与方阵滴定法相同。

[0086] c. 间接竞争ELISA:间接竞争ELISA法与间接ELISA法的程序基本相同,唯一的不同的是在加入血清或抗体时应先加入50μL药物或样品,再加入稀释好的50μL血清或抗体,37℃湿盒孵育40min。

[0087] (2)单克隆抗体灵敏度检测

[0088] 通过方阵滴定法初步确定抗原抗体的工作浓度,以初步确定包被原稀释度。筛选出包被原投料比为50:1,偶联比为15.4,包被浓度为80 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时抗体的 IC_{50} 最低。等差设计一系列抗体浓度梯度进行间接竞争ELISA,选择OD值在2.0左右, IC_{50} 值较低时所对应的抗体稀释度为最佳一抗稀释度。选择包被原浓度80 $\mu\text{g}/\text{L}$ 为最佳包被浓度,一抗稀释度1:54000为最佳一抗稀释度,二抗稀释度为1:6000, IC_{50} 达到0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$,证明该抗体对红2G具有很高的灵敏度,可以应用于免疫分析检测。

[0089] (3)单克隆抗体特异性检测

[0090] 该抗体对红2G的交叉反应率为100%,其中对新红的交叉反应率为27.5%,对酸性品红6B的交叉反应率为23.3%,对苋菜红、酸性红26、酸性红33、H酸的交叉反应率均小于5%,对酸性红37、胭脂红、苏丹红1、对氨基苯甲酸的交叉反应率均小于0.01%。

[0091] 表3.2G6单克隆抗体对酸性红类化合物的交叉反应率

[0092]

药物名称	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{L}$)	交叉反应率 (%)	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{L}$)
红2G	0.14	100	0.05~0.8
新红	0.51	27.5	0.05~0.8
酸性品红6B	0.60	23.3	0.05~0.8
苋菜红	5.46	2.56	0.05~0.8
酸性红26	30.92	0.45	0.39~50
酸性红33	12.23	1.14	0.39~50
H酸	226.99	0.06	7.81~1000
酸性红37	>1000	-	-
胭脂红	>1000	-	-
苏丹红I	>1000	-	-
对氨基苯甲酸	>1000	-	-

[0093] 以上所述之实施例,只是本发明的较佳实施例而已,并非限制本发明的实施范围,故凡依本发明专利范围所述的构造、特征及原理所做的等效变化或修饰,均应包括于本发明申请专利范围内。

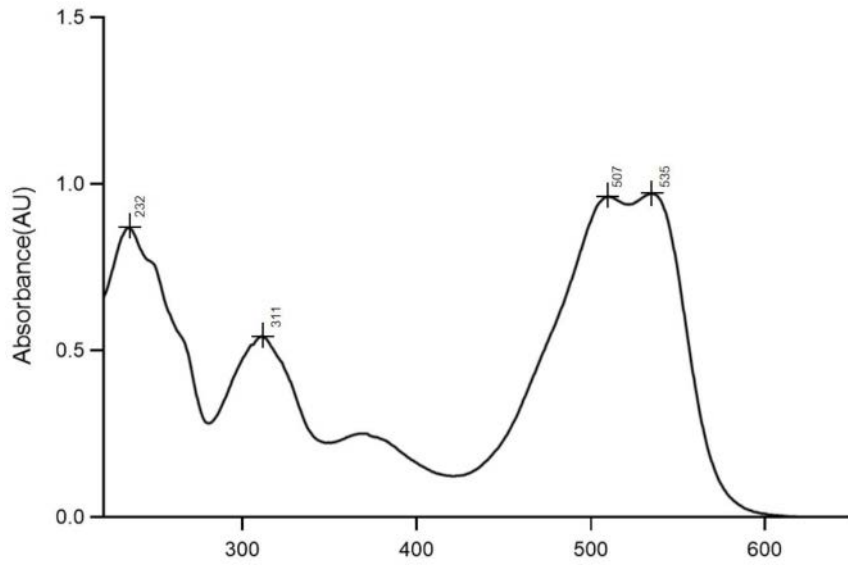


图1

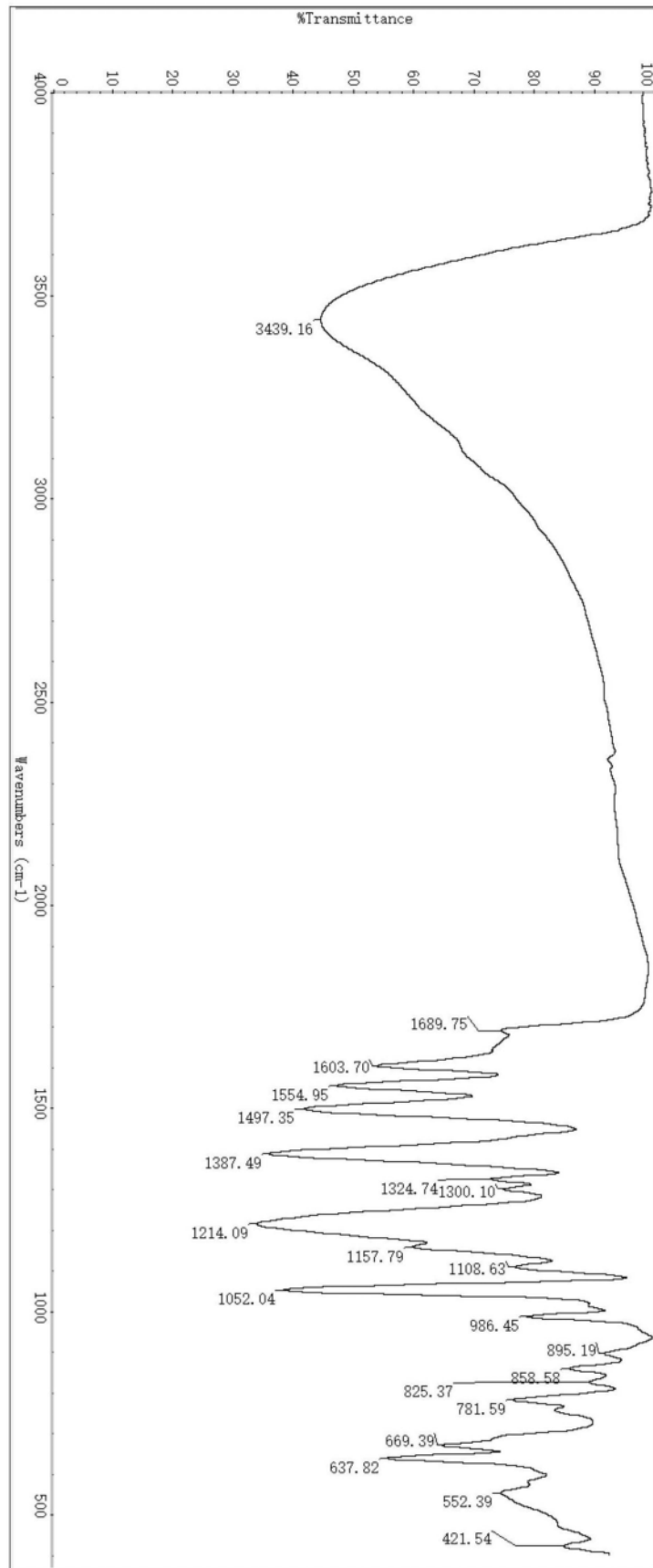


图2

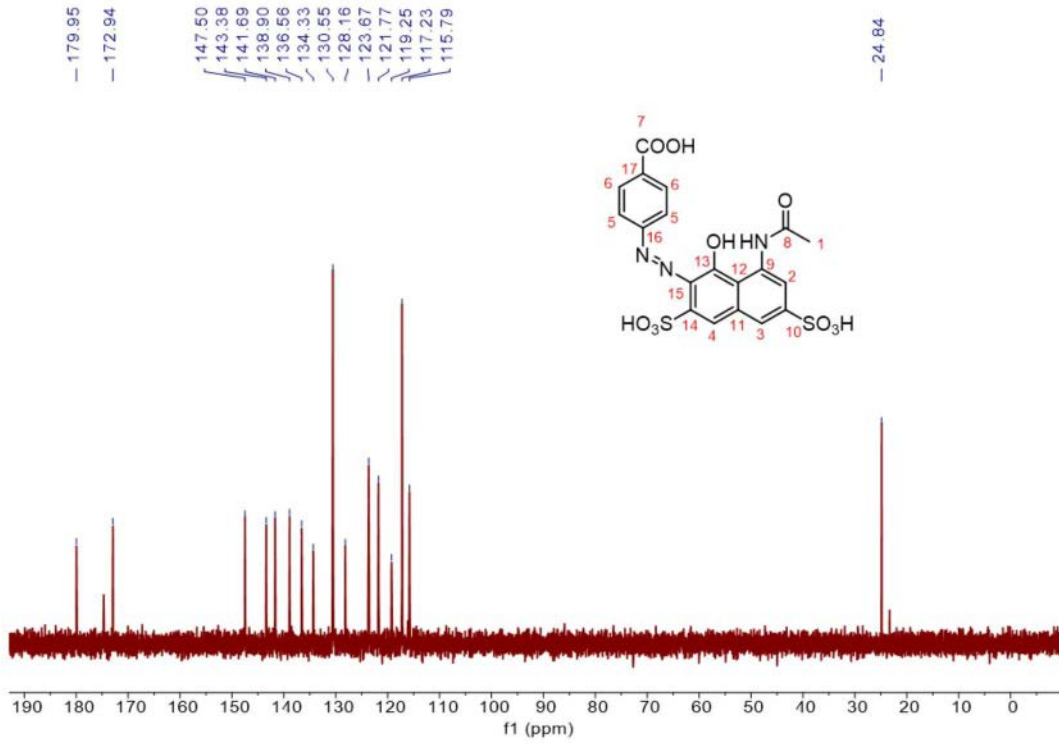


图3

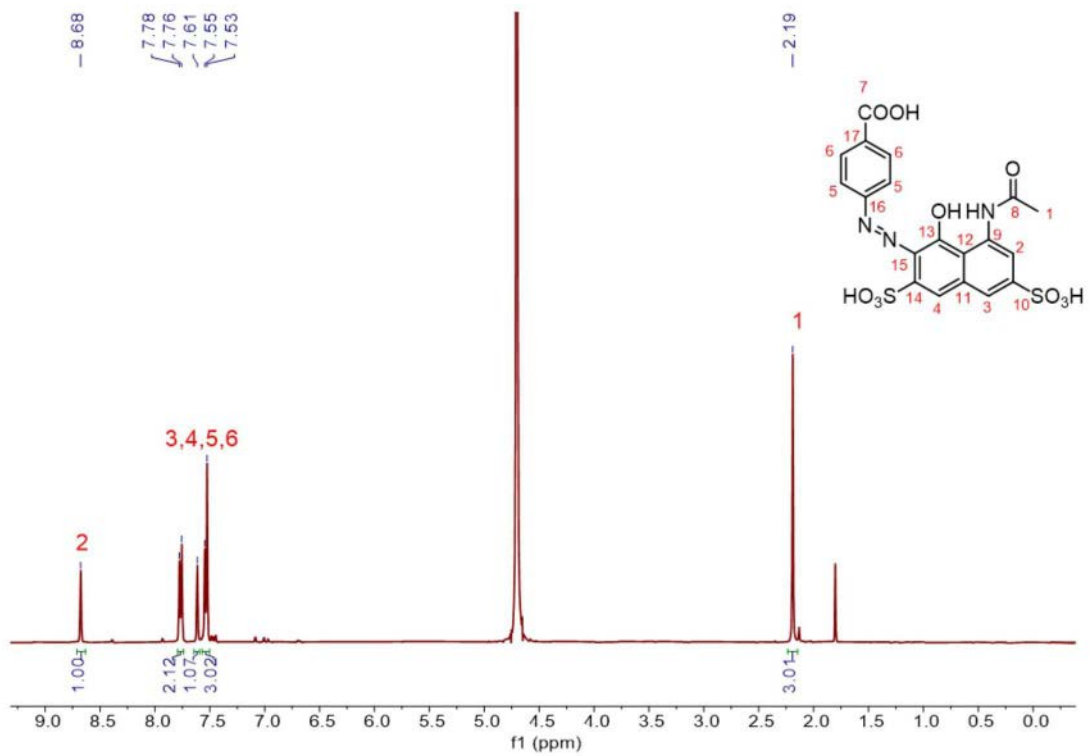


图4

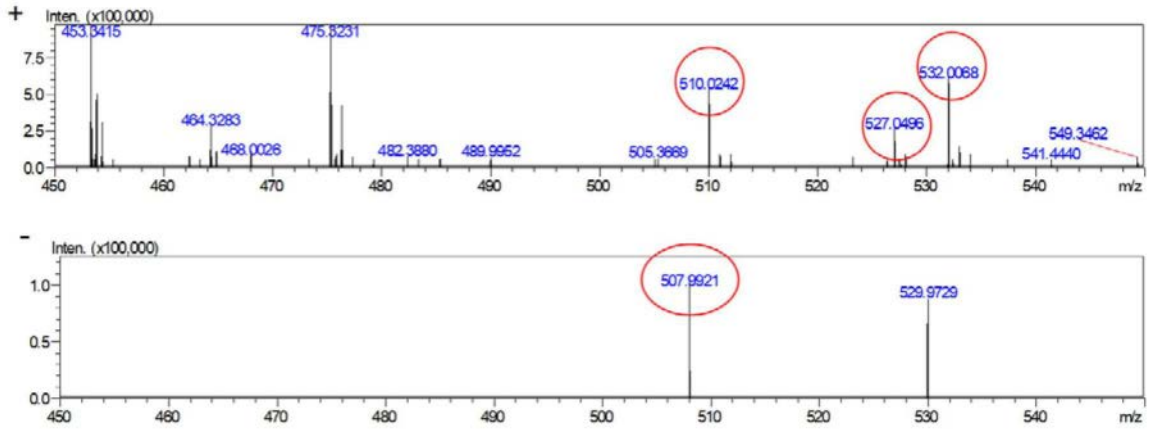


图5

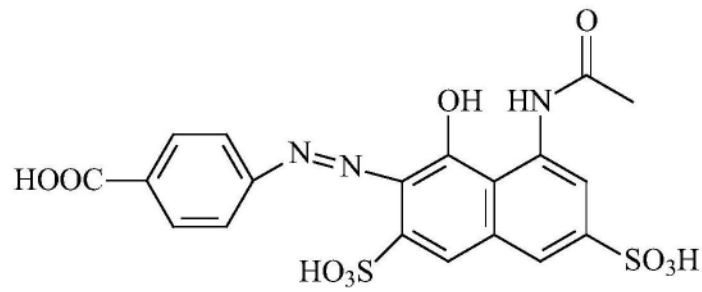


图6

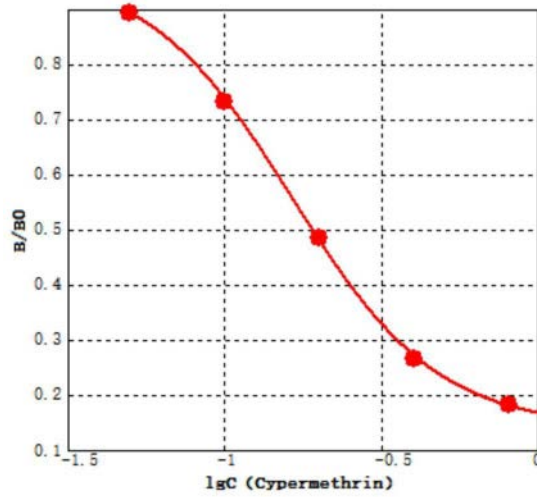


图7