(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104404001 A
(43)申请公布日 2015.03.11

(21)申请号 201410641771.9

(22)申请日 2014.11.13

(83)生物保藏信息
CGMCC No9718 2014.10.10

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72)发明人 李翀 范祖森 乐加昌 杜颖
徐倩 杨昭 何璐云 朱虹

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 王旭

(51)Int.Cl.
C12N 5/20(2006.01)
C07K 16/44(2006.01)
C12R 1/91(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种抗 2- 溴苯丙酮的单克隆抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种抗 2- 溴苯丙酮的单克隆抗体及其应用，具体地，本发明所提供杂交瘤细胞株 MabBP1，其产生的抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体及所述抗体在检测 2- 溴苯丙酮中的用途。

CN 104404001 A

1. 一种杂交瘤细胞株，其特征在于：所述杂交瘤细胞产生抗2-溴苯丙酮的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的杂交瘤细胞株，其名称为抗2-溴苯丙酮单克隆抗体MabBP1杂交瘤细胞株，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CGMCC No.9718。

3. 一种抗2-溴苯丙酮的单克隆抗体，其由权利要求1或2所述的杂交瘤细胞株分泌。

4. 权利要求3所述的抗2-溴苯丙酮的单克隆抗体在2-溴苯丙酮检测中的应用。

5. 产生抗2-溴苯丙酮的单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，包括如下步骤：

1) 用偶联BSA的2-溴苯丙酮(2-溴苯丙酮-BSA)免疫BALB/c小鼠4次；

2)3天后进行细胞融合，采用ELISA方法筛选融合细胞：即，采用间接ELISA法筛选出抗2-溴苯丙酮而不抗载体蛋白BSA的阳性孔；

3) 用有限稀释法进行克隆，最终获得所述杂交瘤细胞株。

6. 制备权利要求3所述的抗2-溴苯丙酮的单克隆抗体方法，包括如下步骤：

1) 将权利要求1或2所述的杂交瘤细胞株注射预先用降植烷处理过的BALB/c小鼠；

2) 收集含有抗2-溴苯丙酮单克隆抗体的小鼠腹水，纯化。

一种抗 2- 溴苯丙酮的单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，具体涉及产生的抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体的杂交瘤细胞株，及所产生的抗体。

背景技术

[0002] 甲基苯丙胺，俗称“冰毒”，是中枢神经系统也是周围神经系统的强烈的兴奋剂。它在功能上类似于苯异丙胺，但是更有效力，滥用者会处于强烈兴奋状态，表现为 ：不吃不睡、活动过度、情感冲动、偏执狂、妄想、幻觉和暴力倾向。使用过量会产生急性中毒，表现为不安、话多、易激惹、烦躁、偏执性幻觉，有的会产生自杀或杀人倾向。可出现心血管病症状，肠胃功能障碍，严重的可产生惊厥、脑出血、昏迷致死。长期滥用可造成慢性中毒、体重下降、夜间磨牙 ；同时，也会发生其他滥用感染合并症，包括肝炎、败血症和性病、艾滋病等。

[0003] 全球性的毒品泛滥已成为危害人民健康和影响社会稳定的重要因素之一。国内外都在寻找一种简易、快速、准确的检验方法，以便对毒品生产场所进行大范围简便、有效筛查（尤其边境地区），达到防止毒品在百姓家庭大量生产的目的。目前毒品检测主要是以金标法进行尿液检测为主，但是这些方法都只是针对吸食毒品本身进行的检测，无法针对生产毒品的原料进行简单，有效的筛查。2- 溴苯丙酮 (2-Bromopropiophenone，简称 BP)，是生产冰毒的核心原料，我们制备了特异性识别 BP 的单克隆抗体，可用于对生产冰毒的核心原料 (2- 溴苯丙酮) 进行检测，该方法特异性强，灵敏度高。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题是提供杂交瘤细胞株 MabBP1，其产生的抗 BP 单克隆抗体及其应用。

[0005] 本发明的第一个方面提供了能够产生抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0006] 在一个优选的实施方案中，所述杂交瘤细胞是抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体 MabBP1 杂交瘤细胞株，该细胞株已于 2014 年 10 月 10 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 (CGMCC，中国，北京)，保藏编号为 CGMCC No.9718。 保藏单位地址 ：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。

[0007] 本发明的第二个方面提供了抗 BP 的通用单克隆抗体，其可以特异识别 2- 溴苯丙酮。

[0008] 在一个优选的实施方案中，所述单克隆抗体由上述保藏编号为 CGMCC No.9718 的抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体 MabBP1 杂交瘤细胞株分泌产生。

[0009] 本发明的第三个方面提供了抗 BP 单克隆抗体在 BP 检测中的应用。

[0010] 在一个优选的实施方案中，所述单克隆抗体为本发明第二个方面所述的单克隆抗体。

[0011] 在一个更优选的实施方案中，所述单克隆抗体由上述保藏编号为 CGMCC No.9718 的抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体 MabBP1 杂交瘤细胞株分泌产生。

[0012]　本发明的第四个方面提供获得能够产生抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体的杂交瘤细胞株的方法，其采用细胞融合杂交瘤技术，包括以下步骤：将 BALB/c 小鼠经偶联 BSA 的 BP(BP-BSA) 免疫 4 次，3 天后进行细胞融合，采用 ELISA 方法筛选融合细胞：即，采用间接 ELISA 法筛选出抗 BP 而不抗载体蛋白 BSA 的阳性孔，再用有限稀释法进行克隆，最终筛选获得能够产生抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0013]　本发明的第五个方面提供抗 BP 通用单克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：将获得的能够产生抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体的杂交瘤细胞株注射于预先用降植烷处理过的 BALB/c 小鼠，收集含有抗 BP 单克隆抗体的小鼠腹水，纯化后即得抗 BP 单克隆抗体。

[0014]　在一个优选的实施方案中，所述能够产生抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体的杂交瘤细胞株为上述保藏编号为 CGMCC No.9718 的抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体 MabBP1 杂交瘤细胞株。

[0015]　本发明的有益效果在于：

[0016]　(1) 本发明提供的杂交瘤细胞株 MabBP1 可以用于制备高效价 BP 抗体，酶联免疫吸附分析 (ELISA) 测得的效价可达 1.6×10^6，即抗体稀释 1.6×10^6 倍后，检测的结果仍为阳性。

[0017]　(2) 本发明提供的抗 BP 单克隆抗体灵敏度高，对 BP 最低检测浓度是 10ug/ml。

[0018]　(3) 本发明提供的抗 BP 单克隆抗体可用于检测 BP，实际应用价值大。

附图说明

[0019]　图 1 为抗 2- 溴苯丙酮单克隆抗体检测 1ul 的 1000ug/ml、100ug/ml 和 10ug/ml 的 2- 溴苯丙酮稀释液和 BSA（牛血清白蛋白）、OVA（卵清蛋白）的点杂交结果。

具体实施方式

[0020]　实施例 1：杂交瘤细胞株 MabBP1 的制备

[0021]　1) 偶联 BSA 的 BP(BP-BSA) 制备

[0022]　将 100mg BSA(购自 Sigma 公司，货号 A2058) 与 50mg 的 BP(购自成都麦卡希化工有限公司，货号 M019767) 混合，溶于 10ml PBS(PH7.4)，4 度过夜，放于透析袋（购自 Viskase 公司，货号 MD25-14) 透析 2 小时即得 BP-BSA。

[0023]　2) 偶联 OVA 的 BP(BP-OVA) 制备

[0024]　将 100mg OVA(购自 Sigma 公司，货号 S7951) 与 50mg 的 BP(购自成都麦卡希化工有限公司，货号 M019767) 混合，溶于 10ml PBS(PH7.4)，4 度过夜，放于透析袋（购自 Viskase 公司，货号 MD25-14) 透析 2 小时即得 BP-OVA。

[0025]　3) 动物免疫

[0026]　从北京维通利华实验动物技术有限公司购买 6 周龄 BALB/c 小鼠 5 只，免疫 BP-BSA：第一次免疫将 BP-BSA 与等量弗氏完全佐剂（购自 Sigma 公司，货号 F5881) 乳化后，于小鼠腹腔注射。第二次免疫于 2 周后进行，采用弗氏不完全佐剂（购自 Sigma 公司，货号 F5506) 与等量 BP-BSA 乳化，于小鼠腹腔注射。第三次免疫与第二次免疫间隔 2 周，免疫方式与其相同，第四次免疫于第三次免疫 2 周后进行，采用纯 BP-BSA 腹腔注射。4 次免疫剂量相同，均为每次 500ug/ml。

[0027]　4) 细胞融合

[0028] 最后一次加强免疫的3天后，用50％聚乙二醇PEG（购自Sigma公司，货号P7777）作融合剂，按常规方法进行细胞融合。具体步骤：无菌条件处死免疫BP-BSA的小鼠，分离脾细胞，与骨髓瘤细胞SP2/0（购自中国医学科学院基础医学研究所）按10:1的比例混合，经RPMI-1640基础培养液（购自Sigma公司，货号R8758）洗涤混合细胞，用50％PEG进行融合，RPM1-1640基础培养液重悬，将细胞加到96孔细胞培养板内，100ul/孔，置37℃二氧化碳培养箱培养，所述的RPM1-1640基础培养液含有20％胎牛血清（购自Sigma公司，货号F9665），2％生长因子和1％次黄嘌呤－氨基蝶呤－胸腺嘧啶核苷即HAT（购自Sigma公司，货号H0262）。

[0029] 5）细胞株的筛选及克隆

[0030] 细胞融合后第14天后，出现明显的细胞集落，即可进行抗体检测。第一步采用间接ELISA法筛选出抗BP-BSA的阳性孔，第二步筛选出BP-OVA的阳性孔，然后用有限稀释法进行克隆，克隆后12天左右采用同样的两步法进行检测，最终获得杂交瘤细胞株MabBP1。

[0031] 实施例2：抗体应用－点杂交

[0032] 将保藏号为CGMCC No.9718的抗2-溴苯丙酮单克隆抗体MabBP1杂交瘤细胞株分泌的抗BP单克隆抗体用于点杂交，步骤如下：

[0033] 1）样品准备：将BP配制成1000ug/ml、100ug/ml和10ug/ml的稀释液，另外取BSA、OVA作对照。

[0034] 2）点样：用微量移液器分别吸取1ul的1000ug/ml、100ug/ml和10ug/ml的BP稀释液和BSA、OVA，从左到右依次滴在硝酸纤维素膜上，晾干。

[0035] 3）封闭：用PBST（含0.1％ Tween-20的PBS）洗3遍，每次5min。将洗好的硝酸纤维素膜用0.2％的明胶室温封闭4h。

[0036] 4）一抗反应：用PBST洗3遍，每次5min。将抗BP单克隆抗体与明 胶按照1:2000进行稀释，将硝酸纤维素膜与稀释好的抗体稀释液共同孵育，室温2h。之后用PBST洗3遍，每次5min。

[0037] 5）二抗反应：将辣根过氧化物酶标记的抗小鼠IgG抗体（购自Sigma公司，货号A168）与明胶按照1:5000进行稀释，将硝酸纤维素膜与稀释好的二抗共同孵育，室温2h。之后用PBST洗3遍，每次5min。

[0038] 6）曝光、显影、定影：将膜取出，用滤纸吸干。配2ml鲁米诺A/B液（购自Sigma公司，货号A8511）。将A/B液均匀的滴在硝酸纤维素膜上，1min后用滤纸吸干，放至铺好保鲜膜的显色夹中曝光，再用显影液显影、定影液定影。显影液和定影液均购自广州市天生印刷器材有限公司，货号KY-2000D。

[0039] 根据图1可以看出：(1)抗2-溴苯丙酮单克隆抗体能够识别2-溴苯丙酮，而对BSA和OVA没有识别，表明抗2-溴苯丙酮单克隆抗体具有良好的特异性。(2)在1ul的1000ug/ml、100ug/ml和10ug/ml的浓度范围内，抗2-溴苯丙酮单克隆抗体能很好的检测出10ug/ml的浓度，表明抗2-溴苯丙酮单克隆抗体具有良好的特异性。因此，利用抗2-溴苯丙酮单克隆抗体检测微量的2-溴苯丙酮，具有实际的应用价值。

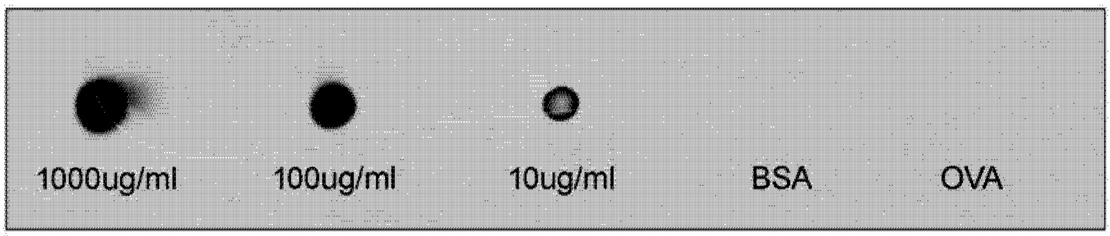

图 1