



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109912713 A

(43)申请公布日 2019.06.21

(21)申请号 201910015712.3

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.01.08

G01N 33/68(2006.01)

(83)生物保藏信息

C12N 1/21(2006.01)

CGMCC NO.17085 2018.12.29

(71)申请人 美康生物科技股份有限公司

地址 315104 浙江省宁波市鄞州区下应街
道启明南路299号

(72)发明人 邹炳德 邹继华 武强 张莉
贾江花 何进军 章玉胜

(74)专利代理机构 宁波市鄞州甬致专利代理事
务所(普通合伙) 33228

代理人 沈春红

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

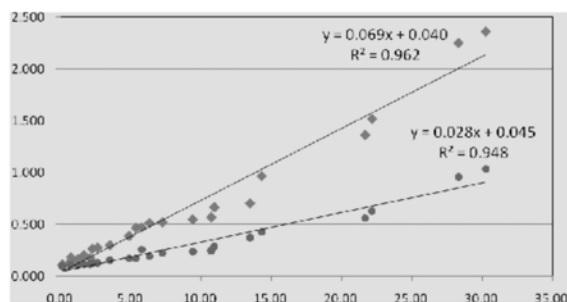
权利要求书4页 说明书11页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的
制备方法及获得的菌株

(57)摘要

一种用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法及获得的菌株,制备步骤包括:(1)设计cTnI蛋白-NH₂端41~56aa和80~95aa序列短肽作为免疫半抗原;(2)肽段与载体蛋白偶联;(3)免疫小鼠;(4)细胞融合;(5)腹水制备及单抗纯化,从小鼠体内抽取腹水后再通过粗纯和精纯化方法步骤,即获得纯度大于95%的单克隆抗体。本发明以目标肽段作为免疫原、主动避开各种干扰因素的影响,提高cTnI抗体所配制测定试剂的检测准确度,从而更高效地制备出用于配制检测特异性优良的cTnI测定试剂所需的抗体原料。



1. 一种用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:制备步骤包括:

(1) 设计cTnI蛋白-NH₂端41~56aa和80~95aa序列短肽作为免疫半抗原;

P41~56aa肽段:

1.1) 肽段-NH₂端半胱氨酸(C)修饰:CXX ISASRKLQLKTLTLLQI,XX作为肽段与载体蛋白之间的偶联臂,X为F,G,W,Y,K中的一种氨基酸;

1.2) 肽段-COOH端半胱氨酸(C)修饰:ISASRKLQLKTLTLLQI XXC,XX作为肽段与载体蛋白之间的偶联臂,X为F,G,W,Y,K中的一种氨基酸;

P80~95aa肽段:

1.3) 肽段-NH₂端半胱氨酸(C)修饰:CXX CQPLELAGLGFAELQD,XX作为肽段与载体蛋白之间的偶联臂,X为F,G,W,Y,K中的一种氨基酸;

1.4) 肽段-COOH端半胱氨酸(C)修饰:CQPLELAGLGFAELQD XXC,XX作为肽段与载体蛋白之间的偶联臂,X为F,G,W,Y,K其中一种氨基酸;

(2) 肽段与载体蛋白偶联

2.1) 载体蛋白活化:琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺)环己烷-1-羧酸酯作为偶联剂,将SMCC和载体蛋白分别用缓冲液I溶解,然后进行混合进行反应,最后将反应液再透析至缓冲液I中得到活化载体蛋白;

2.2) 肽段偶联:将肽段用缓冲液II溶解得到肽段溶解液,将肽段溶解液与活化载体蛋白混合反应,最后将反应液透析至缓冲液II;

(3) 免疫小鼠

选用6~8周龄的Balb/c小鼠为免疫对象,分别将偶联P41~56aa和P80~95aa肽段的载体蛋白作为免疫原与福氏(不)完全佐剂按1:1(v/v体积比)比例混合乳化,以适量的免疫剂量按免疫途径进行免疫;

(4) 细胞融合

取Balb/c小鼠的腹腔巨噬细胞和脾细胞作为滋养层细胞铺于96孔培养板中;选择经免疫后血清效价有意义的免疫小鼠,取冲击免疫后三天的Balb/c鼠脾脏B细胞与sp2/0骨髓瘤细胞按一定细胞数目比例混合,洗涤离心后,保留细胞沉淀,并在37℃水浴中,逐滴加入适量体积的50%PEG,离心后用HAT培养基重悬,获得杂交瘤细胞;经HAT培养基选择筛选培养后,采用间接ELISA法检测细胞培养上清液,筛选能够分泌目标抗体的阳性细胞株,进行3~5次亚克隆后获得稳定生长的阳性单克隆细胞株;

(5) 腹水制备及单抗纯化

采用体内诱生法制备小鼠腹水:先用致敏剂预刺激Balb/c小鼠,间隔一定时间后,再向小鼠腹腔中注射步骤(4)得到的杂交瘤细胞,7~10天后即采集腹水;从小鼠体内抽取腹水后再通过粗纯和精纯化方法步骤,即获得纯度大于95%的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:步骤(1)采用PyMol软件及PDB数据库等工具进行cTnI蛋白序列分析,设计cTnI蛋白-NH₂端41~56aa和80~95aa序列短肽作为免疫半抗原;多肽合成具体由外包合成服务公司进行。

3. 根据权利要求1所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征

在于:2.1)中所用的载体蛋白为牛血清白蛋白、血蓝蛋白、卵清蛋白、牛甲状腺球蛋白和牛免疫球蛋白G中的一种;2.1)中所用缓冲液I为磷酸盐、硼酸盐、HEPES、MOPS缓冲液中的一种,使用浓度为10mM~1000mM,且pH范围在6.0~9.0之间;2.1)中所用SMCC在缓冲液I中的浓度为1.0mg/ml~20mg/ml;2.1)中所用载体蛋白在缓冲液I中的浓度为0.1mg/ml~10mg/ml;2.1)中所用载体蛋白与SMCC反应摩尔比例为1:1~1:100;2.1)中的反应温度为4℃~37℃,反应时间为0.5h~24h。

4.根据权利要求1所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:2.2)所用的缓冲液II为磷酸盐、硼酸盐、HEPES、MOPS缓冲液中的一种;缓冲液II的使用浓度为10mM~1000mM,且pH范围在6.0~9.0之间;2.2)中所述的肽段在缓冲液II中的浓度为1.0mg/ml~10mg/ml;2.2)中所述的活化载体蛋白与肽段的反应摩尔比例为1:1~1:100;2.2)中所述的混合反应温度为4℃~37℃,反应时间为0.5h~24h。

5.根据权利要求1所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:步骤(3)具体的免疫过程,需要的条件为:

(3.1)首免,佐剂类型为弗氏完全佐剂,免疫剂量为10μg~200μg/只鼠/次免疫,免疫途径为皮下多点注射、尾静脉注射、足垫注射和腹腔注射中的一种或几种;

(3.2)第一次加强免疫,佐剂类型为弗氏不完全佐剂,免疫剂量同首免,免疫间隔时间为21天,免疫途径同首免;

(3.3)第二次加强免疫,佐剂类型为弗氏不完全佐剂,免疫剂量同首免,免疫间隔时间为14天,免疫途径同首免;

(3.4)第三次加强免疫,佐剂类型为弗氏不完全佐剂,免疫剂量同首免,免疫间隔时间为14天,免疫途径同首免;

(3.5)冲击免疫,无佐剂,免疫剂量同首免,免疫间隔时间为10天,免疫途径为尾静脉注射和腹腔注射中的一种或两种并用。

6.根据权利要求1所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:步骤(4)所用的脾脏B细胞与sp2/0骨髓瘤细胞融合混合的细胞数目比例为1:1~10:1;步骤(4)中细胞融合所用50%PEG的体积量为0.1ml~2.0ml之间;上述细胞融合所用PEG类型为PEG600,PEG800,PEG1000,PEG1500,PEG2000,PEG4000和PEG6000中的一种或几种混合。

7.根据权利要求1所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:步骤(5)所用致敏剂是液体石蜡、降植烷和不完全弗氏佐剂中的一种或几种混合;步骤(5)的间隔时间为5~30天;上述注射的杂交瘤细胞数量为 $0.5 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$;步骤(5)所用的单抗粗纯化方法是高速冷冻离心、超滤、硫酸铵沉淀、辛酸沉淀中的一种或几种并用;步骤(5)所用的单抗精纯化方法是阴离子交换层析、Protein A,Protein G和免疫亲和层析中的一种或几种并用。

8.根据权利要求1所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:制备方法还包括步骤(6)单抗性能验证:

6.1)单抗的辣根过氧化物酶标记:

采用Wilson开发的过碘酸钠法将纯化得到的各株单抗分别进行HRP标记;

6.2)配对抗体筛选

验证针对P41~56aa和P80~95aa肽段表位的单抗夹心cTnI天然抗原的配对性能;采用酶联免疫法以“棋盘交叉”方式在96孔板上进行单抗配对,具体方案步骤如下:

(a) 包被一抗:用包被液将不同株单抗稀释,按一列一株、每孔加100 μ l的方式包被于96孔板,37 $^{\circ}$ C孵育2h或4 $^{\circ}$ C过夜;

(b) 封闭:弃去96孔板中液体,用缓冲液III洗涤板,连续洗三次,并置于无纤毛纸巾上拍干,最后每孔加入200 μ l封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

(c) 夹心抗原:弃去96孔板中液体,用缓冲液III洗涤板,连续洗三次,并置于无纤毛纸巾上拍干,每孔加入100 μ l的cTnI天然抗原,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

(d) 加酶标二抗:弃去96孔板中液体,用缓冲液III洗涤板,连续洗三次,并置于无纤毛纸巾上拍干,按一行一株方式每孔加入100 μ l的HRP标记单抗,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

(e) 显色:弃去96孔板中液体,用缓冲液III洗涤板,连续洗五次,并置于无纤毛纸巾上拍干;将TMB加入板中,每孔100 μ l,避光静置5~10min后,再每孔加入50 μ l 2M H₂SO₄,终止酶反应;最后用酶标仪读数,测定每孔的光吸收值;根据每孔的OD值强弱判定两株单抗夹心抗原的配对性能。

9. 根据权利要求8所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:(a)中所述的包被液为磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、硼酸盐、HEPES、MOPS缓冲液中的一种,包被液的浓度为10mM~1000mM,且pH范围在4.0~10.0之间;所述的所用单抗稀释,稀释后的抗体浓度为1.0 μ g/ml~10 μ g/ml;

(b)中所述的封闭液为5%脱脂奶粉、2%BSA、1%酪蛋白和1%牛血清中的一种;

(c)中所述的天然抗原的浓度为0.1ng/ml~100ng/ml;

(d)中所述的HRP标记单抗的浓度为1 μ g/ml~10 μ g/ml;

所述的缓冲液III为PBS,Tris-HCl,PBST,TBST缓冲液中的一种,使用浓度为10mM~1000mM,且pH范围在4.0~10.0之间。

10. 根据权利要求8所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:还包括6.3) 配对抗体夹心法检测临床样本:将通过夹心抗原配对筛选到的抗体,采用ELISA夹心法进行检测临床样本性能评价,并与已商品化的对照试剂进行样本测值比对,判定两者测值一致性程度。

11. 根据权利要求10所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:配对抗体夹心法检测临床样本的试验设计如下:

抗体 组合	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	包被单抗 1+ 标记单抗 1			包被单抗 2+ 标记单抗 2			包被单抗 3+ 标记单抗 3			包被单抗 4+ 标记单抗 4		
A	S1	S9	S17	S1	S9	S17	S1	S9	S17	S1	S9	S17
B	S2	S10	S18	S2	S10	S18	S2	S10	S18	S2	S10	S18
C	S3	S11	S19	S3	S11	S19	S3	S11	S19	S3	S11	S19
D	S4	S12	S20	S4	S12	S20	S4	S12	S20	S4	S12	S20
E	S5	S13	S21	S5	S13	S21	S5	S13	S21	S5	S13	S21
F	S6	S14	S22	S6	S14	S22	S6	S14	S22	S6	S14	S22
G	S7	S15	S23	S7	S15	S23	S7	S15	S23	S7	S15	S23
H	S8	S16	S24	S8	S16	S24	S8	S16	S24	S8	S16	S24

12. 根据权利要求11所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,其特征在于:将双抗夹心24份cTnI临床样本的ELISA反应信号OD值,与对照试剂测定的cTnI样本测值进行比对,通过比较两组数据以最小二乘法拟合的线性 R^2 大小,判定cTnI单抗配对组合与对照试剂测试临床样本的一致性,从而评价所制备抗体的性能优劣。

13. 根据权利要求12所述的用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法获得的菌株,其特征在于:该菌株为FL12细胞株,已于2018年12月27日寄出,经查询于2018年12月29日《中国普通微生物菌种保藏管理中心》已签收。

用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法及获得的菌株

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法及获得的菌株，具体是制备针对特定肽段表位的肌钙蛋白I单克隆抗体，并进行单抗筛选，得到能用于配制肌钙蛋白I测定试剂(免疫法)的抗体原料。

背景技术：

[0002] 据世界卫生组织统计，目前冠心病是世界十大死因中排名第一的疾病，全球每年约有1700万人死于冠心病，被称为“人类健康的第一杀手”。急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是造成冠心病人死亡的主要原因。AMI典型病例可以根据病史、症状及心电图的特殊改变进行诊断，但大量的临床实践发现，约有25%的AMI病人发病早期并无典型的临床症状，约50%的AMI病人缺乏心电图的特异改变，在此情况下，检测血液中的心肌损伤标志物具有重要价值。目前，临床意义明确的心肌损伤标志物主要有肌红蛋白(MYO)、脂肪酸结合蛋白(FABP)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白T(cTnT)和肌钙蛋白I(cTnI)。由于在稳定性、特异性及灵敏度等方面的综合优势，cTnI已获得美国心脏协会(AHA)、美国心脏病学会(ACC)和欧洲心脏病学会(ESC)等众多权威组织的认可，逐渐成为AMI诊断的“金标准”。

[0003] 肌钙蛋白(Tn)是骨骼肌和心肌收缩的调节蛋白，由三个结构不同的亚基通过非共价键结合组成，即肌钙蛋白C(TnC)、肌钙蛋白I(TnI)和肌钙蛋白T(TnT)。TnI和TnT又各有2种亚型，一种是在骨骼肌组织中表达的骨骼肌TnI(sTnI)和骨骼肌TnT(sTnT)，另一种在心肌组织中表达的心肌型TnI(cTnI)和心肌型TnT(cTnT)。临床研究表明心肌肌钙蛋白I以不同的复合形式存在，如cTnI-cTnC、cTnI-cTnT以及cTnT-cTnI-TnC等二元或三元复合物(如图1所示)。人cTnI蛋白含有210个氨基酸，相对分子量约为24KD。通过NCBI数据库检索人cTnI蛋白氨基酸序列如下所示：MADGSSDAAREPRPAPAPIRRRSSNYRAYATEPHAKKKSKISASRKLQLKTTLLQIAKQELEREAEERRGEKGRALSTRCPLELAGLGFAELQDLRCQLHARVDKVD EERYDIEAKVTKNITEIADLTQKIFDLRGKFKRPTLRRVRISADAMMQUALLGARAKESLDLRAHLKQVKKEDTEKENREVGDW RKNIDALSGMEGRKKKFES(具体氨基酸序列见序列表7)。

[0004] cTnI蛋白的分子形态复杂多样，临床样本中的多种因素会对检测结果产生影响，包括TnI不同亚型干扰、cTnI与cTnC/cTnT蛋白形成复合物、cTnI蛋白降解、临床样本存在肝素干扰、cTnI蛋白磷酸化程度不同以及样本中自身抗体含量的个体差异性等因素(如图2所示)。制备针对合适抗原表位的抗体更有利于避开上述因素的干扰，以提高检测试剂的准确性，因此制备针对人cTnI特定肽段表位的单抗具有很大的临床应用价值。根据国际临床化学联合会(IFCC)统计不同厂家商品化cTnI试剂所用的抗体，针对的抗原表位主要分布在22~40aa, 41~56aa和80~95aa三个肽段序列区域(从-NH₂端起计数，如图3所示)。目前cTnI单抗制备的主流方法是选择全长cTnI抗原作为免疫原进行小鼠免疫，获得抗体后再进行表位鉴定以筛选针对目标表位的抗体，该方法的优点是采用全长抗原作为免疫原制备获得高

亲和力抗体的概率更高,但存在靶向性不强、获得目标表位抗体概率低的缺点。

发明内容:

[0005] 本发明针对现有技术的上述不足,提供一种以目标肽段作为免疫原、主动避开各种干扰因素的影响,提高cTnI抗体所配制测定试剂的检测准确度,从而更高效地制备出用于配制检测特异性优良的cTnI测定试剂所需的抗体原料,即提供一种用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:一种用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法,制备步骤包括:

[0007] (1) 设计cTnI蛋白-NH₂端41~56aa和80~95aa序列短肽作为免疫半抗原;

[0008] P41~56aa肽段:

[0009] 1.1) 肽段-NH₂端半胱氨酸(C)修饰:CXX ISASRKLQLKTLLLQI (具体氨基酸序列见序列表3),XX作为肽段与载体蛋白之间的偶联臂,X为F,G,W,Y,K中的一种氨基酸;

[0010] 1.2) 肽段-COOH端半胱氨酸(C)修饰:ISASRKLQLKTLLLQI XXC (具体氨基酸序列见序列表4),XX作为肽段与载体蛋白之间的偶联臂,X为F,G,W,Y,K中的一种氨基酸;

[0011] P80~95aa肽段:

[0012] 1.3) 肽段-NH₂端半胱氨酸(C)修饰:CXX CQPLELAGLGFAELQD (具体氨基酸序列见序列表5),XX作为肽段与载体蛋白之间的偶联臂,X为F,G,W,Y,K中的一种氨基酸;

[0013] 1.4) 肽段-COOH端半胱氨酸(C)修饰:CQPLELAGLGFAELQD XXC (具体氨基酸序列见序列表6),XX作为肽段与载体蛋白之间的偶联臂,X为F,G,W,Y,K其中一种氨基酸。

[0014] (2) 肽段与载体蛋白偶联

[0015] 2.1) 载体蛋白活化:琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)作为偶联剂,将SMCC和载体蛋白分别用缓冲液I溶解至一定质量浓度,再按一定摩尔比例混合,在适当温度下反应一定时间,最后将反应液再透析至缓冲液I中得到活化载体蛋白;

[0016] 2.2) 肽段偶联:将肽段用缓冲液II溶解得到肽段溶解液,将肽段溶解液与活化载体蛋白混合反应,最后将反应液透析至缓冲液II;

[0017] (3) 免疫小鼠

[0018] 选用6~8周龄的Balb/c小鼠为免疫对象,分别将偶联P41~56aa和P80~95aa肽段的载体蛋白作为免疫原与福氏(不)完全佐剂(即福氏完全佐剂或者是福氏不完全佐剂)按1:1(v/v体积比)比例混合乳化,以适量的免疫剂量按免疫途径进行免疫;

[0019] (4) 细胞融合

[0020] 取Balb/c小鼠的腹腔巨噬细胞和脾细胞作为滋养层细胞铺于96孔培养板中;选择经免疫后血清效价有意义的免疫小鼠,取冲击免疫后三天的Balb/c鼠脾脏B细胞与sp2/0骨髓瘤细胞按一定细胞数目比例混合,洗涤离心后,保留细胞沉淀,并在37℃水浴中,逐滴加入适量体积的50%PEG(聚乙二醇),离心后用HAT培养基重悬,获得杂交瘤细胞;经HAT培养基选择筛选培养后,采用间接ELISA法检测细胞培养上清液,筛选能够分泌目标抗体的阳性细胞株,进行3~5次亚克隆后获得稳定生长的阳性单克隆细胞株;

[0021] (5) 腹水制备及单抗纯化

[0022] 采用体内诱生法制备小鼠腹水:先用致敏剂预刺激Balb/c小鼠,间隔一定时间后,

再向小鼠腹腔中注射步骤(4)得到的杂交瘤细胞,7~10天后即可采集腹水;从小鼠体内抽取腹水后再通过粗纯和精纯化方法步骤,即获得纯度大于95%的单克隆抗体。

[0023] 本发明上述步骤(1)采用PyMol软件及PDB数据库等工具进行cTnI蛋白序列分析,包括免疫原性预测,亲疏水性,带电荷量及空间结构修饰等理化性质,并且参考常用的商品化cTnI抗体所针对抗原表位的氨基酸序列,设计cTnI蛋白-NH₂端41~56aa和80~95aa序列短肽作为免疫半抗原;多肽合成具体由外包合成服务公司进行(如上海吉尔生物公司合成);本发明上述步骤(1)cTnI蛋白-NH₂端41~56aa和80~95aa序列短肽的肽段-NH₂端半胱氨酸(C)修饰和肽段-COOH端半胱氨酸(C)修饰可以选择其中一端修饰,或者两端同时修饰;即41~56aa和80~95aa序列短肽各自的-NH₂端和-COOH端选择其中一端修饰、或者41~56aa和80~95aa序列短肽各自的-NH₂端和-COOH端两端同时进行修饰。

[0024] 上述2.1)中所用的载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)、血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白(OVA)、牛甲状腺球蛋白(BTG)和牛免疫球蛋白G(Bovine IgG)中的一种。

[0025] 上述2.1)中所用缓冲液I为磷酸盐、硼酸盐、HEPES、MOPS缓冲液中的一种,使用浓度为10mM~1000mM,且pH范围在6.0~9.0之间。

[0026] 上述2.1)中所用SMCC在缓冲液I中的浓度为1.0mg/ml~20mg/ml。

[0027] 上述2.1)中所用载体蛋白在缓冲液I中的浓度为0.1mg/ml~10mg/ml。

[0028] 上述2.1)中所用载体蛋白与SMCC反应摩尔比例为1:1~1:100。

[0029] 上述2.1)中的反应温度为4℃~37℃,反应时间为0.5h~24h。

[0030] 上述2.2)所用的缓冲液II为磷酸盐(磷酸缓冲盐溶液,PBS缓冲液)、硼酸盐、HEPES、MOPS缓冲液中的一种;缓冲液II的使用浓度为10mM~1000mM(mmol/L),且pH范围在6.0~9.0之间。

[0031] 上述2.2)中所述的肽段在缓冲液II中的浓度为1.0mg/ml~10mg/ml(此处的肽段为本发明上述的两段,各自在缓冲液II中的浓度均是1.0mg/ml~10mg/ml)。

[0032] 上述2.2)中所述的肽段溶解液与活化载体蛋白混合,其中活化载体蛋白与肽段的反应摩尔比例为1:1~1:100(此处的肽段为本发明上述的两段,活化载体蛋白与肽段的反应摩尔比例为1:1~1:100是指的活化载体蛋白分别与两段肽段的摩尔数之比均为1:1~1:100)。

[0033] 上述2.2)中所述的混合反应,其中反应温度为4℃~37℃、反应时间为0.5h~24h。载体蛋白经SMCC分子活化后带有马来酰亚胺基团,能与肽段的巯基发生特异性交联反应。

[0034] 上述步骤(3)具体的免疫过程,需要的条件为下表1所示:

[0035] 表1 具体免疫方案如下:

[0036]

免疫次数	佐剂类型	间隔时间	免疫剂量 μg/只	免疫途径
首免	弗氏完全佐剂	—	X	Y

[0037]

第一次加强免疫	弗氏不完全佐剂	21 天	X	Y
第二次加强免疫	弗氏不完全佐剂	14 天	X	Y
第三次加强免疫	弗氏不完全佐剂	14 天	X	Y
冲击免疫	无佐剂	10 天	X	Y

[0038] 上述所用免疫剂量X为10 μ g $\sim$ 200 μ g/只鼠/次免疫;上述所用免疫途径Y为皮下多点注射、尾静脉注射、足垫注射和腹腔注射中的一种或几种。

[0039] 上述步骤(4)所用的脾脏B细胞与sp2/0骨髓瘤细胞融合混合的细胞数目比例为1:1 $\sim$ 10:1。

[0040] 上述步骤(4)中细胞融合所用PEG的体积量为0.1ml $\sim$ 2.0ml之间;上述细胞融合所用PEG类型为PEG600,PEG800,PEG1000,PEG1500,PEG2000,PEG4000和PEG6000中的一种或几种混合;所述的50%PEG为w/v,比如取50gPEG加水定容至100ml。

[0041] 上述步骤(5)所用致敏剂是液体石蜡、降植烷和不完全弗氏佐剂中的一种或几种混合。

[0042] 上述步骤(5)的间隔一定时间为:间隔5 $\sim$ 30天;上述步骤(5)注射的杂交瘤细胞数量为0.5 $\times$ 10⁶ $\sim$ 3.0 $\times$ 10⁶。

[0043] 上述步骤(5)所用的单抗粗纯化方法是高速冷冻离心、超滤、硫酸铵沉淀、辛酸沉淀中的一种或几种并用。

[0044] 上述步骤(5)所述的精纯化方法是阴离子交换层析、Protein A,Protein G和免疫亲和层析中的一种或几种并用。

[0045] 本发明上述的制备方法,还包括步骤(6):单抗性能验证

[0046] 6.1) 单抗的辣根过氧化物酶(HRP)标记:

[0047] 采用Wilson开发的过碘酸钠法将纯化得到的各株单抗分别进行HRP标记;

[0048] 6.2) 配对抗体筛选

[0049] 验证针对P41 $\sim$ 56aa和P80 $\sim$ 95aa肽段表位的单抗夹心cTnI天然抗原的配对性能;采用酶联免疫(ELISA)法以“棋盘交叉”方式在96孔板上进行单抗配对,具体方案步骤如下:

[0050] (a) 包被一抗:用包被液将不同株单抗稀释,按一行一株、每孔加100 μ l的方式包被于96孔板,37 $^{\circ}$ C孵育2h或4 $^{\circ}$ C过夜;

[0051] (b) 封闭:弃去96孔板中液体,用缓冲液III洗涤板,连续洗三次,并置于无纤毛纸巾上拍干,最后每孔加入200 μ l封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0052] (c) 夹心抗原:弃去96孔板中液体,用缓冲液III洗涤板,连续洗三次,并置于无纤毛纸巾上拍干,每孔加入100 μ l的cTnI夹心抗原(天然抗原),37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0053] (d) 加酶标二抗:弃去96孔板中液体,用缓冲液III洗涤板,连续洗三次,并置于无纤毛纸巾上拍干,按一行一株方式每孔加入100 μ l的HRP标记单抗(酶标二抗),37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0054] (e) 显色:弃去96孔板中液体,用缓冲液III洗涤板,连续洗五次,并置于无纤毛纸巾上拍干;将TMB加入板中,每孔100 μ l,避光静置5 $\sim$ 10min后,再每孔加入50 μ l 2M H₂SO₄,终止酶反应;最后用酶标仪读数(波长450nm),测定每孔的光吸收值(OD值);根据每孔的OD值强弱判定两株单抗夹心抗原的配对性能。

[0055] 上述(a)所述的包被液为磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、硼酸盐、HEPES、MOPS缓冲液中的一种,使用浓度为10mM~1000mM,且pH范围在4.0~10.0之间;

[0056] 上述(a)中所述的单抗稀释至单抗的浓度为1.0μg/ml~10μg/ml;

[0057] 上述(b)中所述的封闭液为5%脱脂奶粉、2%BSA、1%酪蛋白和1%牛血清中的一种(均为质量百分比浓度)。

[0058] 上述(c)所述的夹心抗原浓度为0.1ng/ml~100ng/ml;

[0059] 上述(d)所述的酶标二抗浓度即一定浓度的HRP标记单抗的浓度为1μg/ml~10μg/ml;

[0060] 上述所述的缓冲液III(b、c、d和e)为PBS,Tris-Hcl,PBST,TBST缓冲液中的一种,使用浓度为10mM~1000mM,且pH范围在4.0~10.0之间;

[0061] 还包括步骤6.3)配对抗体夹心法检测临床样本:

[0062] 将通过夹心抗原配对筛选到的抗体,采用ELISA夹心法进行检测临床样本性能评价,并与已商品化的对照试剂进行样本测值比对,判定两者测值一致性程度。具体试验设计如下表2:

[0063] 表2

[0064]

抗体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
组合	包被单抗 1+			包被单抗 2+			包被单抗 3+			包被单抗 4+		
	标记单抗 1			标记单抗 2			标记单抗 3			标记单抗 4		

[0065]

A	S1	S9	S17	S1	S9	S17	S1	S9	S17	S1	S9	S17
B	S2	S10	S18	S2	S10	S18	S2	S10	S18	S2	S10	S18
C	S3	S11	S19	S3	S11	S19	S3	S11	S19	S3	S11	S19
D	S4	S12	S20	S4	S12	S20	S4	S12	S20	S4	S12	S20
E	S5	S13	S21	S5	S13	S21	S5	S13	S21	S5	S13	S21
F	S6	S14	S22	S6	S14	S22	S6	S14	S22	S6	S14	S22
G	S7	S15	S23	S7	S15	S23	S7	S15	S23	S7	S15	S23
H	S8	S16	S24	S8	S16	S24	S8	S16	S24	S8	S16	S24

[0066] 注:S1-S24表示cTnI临床样本,同时用西门子超敏肌钙蛋白I测定试剂盒(直接化学发光免疫分析法)测值。

[0067] 将双抗夹心24份cTnI临床样本的ELISA反应信号OD值,与对照试剂测定的cTnI样本测值进行比对,通过比较两组数据以最小二乘法拟合的线性 R^2 大小,判定cTnI单抗配对组合与对照试剂测试临床样本的一致性,从而评价所制备抗体的性能优劣。

[0068] 一种由上述用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法获得的一株菌株

为FL12细胞株,已于2018年12月27日寄出,经查询于2018年12月29日经《中国普通微生物菌种保藏管理中心》(CGMCC)已签收。

[0069] 本发明的优点和有益效果:

[0070] 1.本发明通过设计合成cTnI蛋白的寡肽片段并偶联载体蛋白进行小鼠免疫,靶向制备针对特定肽段表位的抗体,主动避开可能存在干扰因素的区段表位,从而更高效地制备出用于配制检测特异性优良的cTnI测定试剂所需的抗体原料。

[0071] 2.本发明的目的是制备针对人cTnI蛋白-NH₂端41~56aa和80~95aa肽段表位的单克隆抗体,提供一种cTnI肽段半抗原的设计方法。

[0072] 3.本发明的两个肽段的选取不同于现有是通过基因工程重组表达方式制备的方案,现有的基因工程重组表达为多个肽段串联与融合蛋白共表达,最终表达出的肽段形态和完整程度随机性较大;而本发明的肽段是先通过化学合成方式制备,再与载体蛋白偶联,获得的肽段形态和完整性更加直观可控,且还可通过控制肽段与载体蛋白的偶联比例,从而优化肽段免疫动物的免疫原性;另外,本发明的肽段设计不只是氨基酸序列的选取,还有肽段末端的修饰,也更利于提升肽段的免疫原性。此外,本发明的载体蛋白包括五种,有特定的肽段修饰方式以及偶联位置,获得的抗体可用于配制检测特异性优良的cTnI测定试剂所需的抗体原料。

附图说明

[0073] 图1肌钙蛋白(Tn)复合物晶体结构图(引自PDB:1J1D)。

[0074] 图2影响临床cTnI检测的因素。

[0075] 图3常用的cTnI抗体针对的表位氨基酸区域(表位信息引自IFCC网站)。

[0076] 图4 E03-FL12和E13-FL12单抗配对检测样本与对照试剂盒测值相关性,◆标示E03-FL12配对;●标示E13-FL12配对。

具体实施方式

[0077] 下面将结合具体实例进一步阐述本发明,但不对本发明要求保护的技术方案产生限制。

[0078] 实例1:P41~56aa和P80~95aa肽段设计修饰

[0079] P41~56aa:CGG ISASRKLQLKTLQLI(具体氨基酸序列见序列表1)

[0080] P80~95aa:CGG CQPLELAGLGFAELQD(具体氨基酸序列见序列表2)

[0081] 实例2:肽段与载体蛋白偶联

[0082] 1)将SMCC和KLH蛋白分别用10mM PBS(pH7.2)缓冲液溶解至10mg/ml和5mg/ml,按SMCC与KLH蛋白10:1摩尔比例混合,在室温下反应1h,最后将反应液透析至10mM PBS(pH7.2)缓冲液中;

[0083] 2)将修饰后的P41~56aa和P80~95aa肽段分别用10mM PBS(pH7.2)缓冲液分别溶解至10mg/ml,将肽段溶解液与活化载体蛋白按肽段与活化载体蛋白摩尔比例20:1混合,在室温下反应1h,最后将反应液透析至10mM PBS(pH7.2)缓冲液中;

[0084] 3)透析完毕,样液用0.22μm膜过滤,分别得到(P41-56aa)-KLH和(P80-95aa)-KLH偶联蛋白,分装后-20℃保存。

[0085] 实例3:肽段偶联载体蛋白免疫小鼠

[0086] 选用6~8周龄的Balb/c小鼠为免疫对象,分别将(P41-56aa)-KLH和(P80-95aa)-KLH偶联蛋白作为免疫原与福氏(不)完全佐剂按1:1(v/v)比例混合乳化,按如下表3免疫方案进行免疫,每条肽段偶联蛋白免疫5只小鼠。

[0087] 表3

[0088]

免疫次数	佐剂类型	间隔时间	免疫剂量 μg/只	免疫途径
------	------	------	--------------	------

[0089]

首免	弗氏完全佐剂	——	100	皮下多点注射
第一次加强免疫	弗氏不完全佐剂	21 天	50	皮下多点注射
第二次加强免疫	弗氏不完全佐剂	14 天	50	皮下多点注射
第三次加强免疫	弗氏不完全佐剂	14 天	50	皮下多点注射
冲击免疫	无佐剂	10 天	100	腹腔注射

[0090] 经过第三次加强免疫后,以小鼠眼眶采血方式采得P41~56aa和P80~95aa肽段组的小鼠抗血清,在96孔酶标板中分别包被(P41~56aa)-BSA和(P80~95aa)-BSA偶联蛋白,采用间接ELISA法检测免疫小鼠的抗血清效价滴度,具体结果如下表4-5所示。根据阴性对照组的平均OD值及其标准差(SD),计算ELISA抗原抗体发生阳性反应的临界OD值,算得P41~56aa和P80~95aa肽段两组的临界OD值分别为0.181和0.175,即当检测OD值大于0.181和0.175时表明此时抗原抗体发生了有效(阳性)反应,由此可见,P41~56aa肽段的免疫鼠最高效价滴度超过650000,P80~95aa肽段的免疫鼠最高效价滴度超过210000,说明(P41~56aa)-KLH和(P80~95aa)-KLH偶联蛋白对Balb/c鼠具有良好的免疫原性。在此基础上,分别选择P41~56aa和P80~95aa肽段两组中的高效价小鼠进行后续的杂交瘤细胞融合。

[0091] 表4 (P40~56)-KLH偶联蛋白免疫小鼠抗血清效价滴度

[0092]

鼠抗血清 稀释倍数	P40~56 肽段免疫鼠编号					阴性 对照
	1#	2#	3#	4#	5#	
300	2.377	1.990	2.468	2.014	2.413	0.173
900	1.958	1.650	2.358	1.444	2.215	0.169
2700	1.417	0.913	2.132	0.812	1.661	0.167
8100	0.836	0.387	1.468	0.362	1.037	0.147
24300	0.383	0.215	0.957	0.172	0.584	0.147
72900	0.184	0.117	1.196	0.106	0.266	0.148
218700	0.108	0.097	0.415	0.096	0.131	0.153
656100	0.064	0.136	0.200	0.079	0.124	0.166

[0093] 注：阴性对照组为未进行免疫的小鼠血清；效价阳性判定临界OD值定义为阴性对照组 (OD平均值+2×SD)

[0094] 表5 (P80~95)-KLH偶联蛋白免疫小鼠抗血清效价滴度

[0095]

鼠血清 稀释倍数	P80~95 肽段免疫鼠编号					阴性 对照
	1#	2#	3#	4#	5#	
300	2.209	2.314	2.419	2.530	2.249	0.170
900	1.856	1.962	2.247	2.762	2.274	0.171
2700	1.021	1.483	1.966	2.085	1.982	0.167
8100	0.443	0.746	1.904	1.593	1.492	0.170
24300	0.174	0.330	1.095	1.063	1.155	0.170
72900	0.082	0.119	0.493	0.351	0.529	0.170
218700	0.064	0.082	0.223	0.189	0.251	0.160
656100	0.106	0.064	0.065	0.066	0.066	0.168

[0096] 注：阴性对照组为未进行免疫的小鼠血清；效价阳性判定临界OD值定义为阴性对照组 (OD平均值+2×SD)

[0097] 实例4：P40~56aa和P80~95aa肽段表位单抗配对筛选

[0098] 经杂交瘤细胞融合、细胞株亚克隆筛选、小鼠腹水制备、单抗纯化等步骤，获得针对P40~56aa肽段表位的单抗株是F124, F154, F156, FL85, FL12, 共5株；获得针对P80~95aa肽段表位的单抗株是E03, E13, E23, E85, 共4株。采用ELISA夹心cTnI天然抗原法验证P41~56aa和P80~95aa肽段表位单抗之间的配对性能。以“棋盘交叉”方式在96孔板上进行排列配对，具体方案步骤如下：

[0099] a. 包被一抗: 用20mM PBS7.4缓冲液将F124, F154, F156, FL85, FL12, E03, E13, E23, E85单抗分别稀释至1 μ g/ml, 按一行一株、每孔100 μ l的方式包被于96孔板, 37 $^{\circ}$ C孵育2h;

[0100] b. 封闭: 弃去96孔板中液体, 用20mM pH7.4的PBST缓冲液洗涤板, 连续洗3次, 置于无纤毛纸巾上拍干, 再每孔加200 μ l 5%脱脂奶粉, 37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0101] c. 夹心抗原: 弃去96孔板中液体, 用PBST缓冲液洗涤板, 连续洗3次, 置于无纤毛纸巾上拍干, 每孔加100 μ l 10ng/ml的cTnI天然抗原, 37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0102] d. 加酶标二抗: 弃去96孔板中液体, 用PBST缓冲液洗涤板, 连续洗3次, 并置于无纤毛纸巾上拍干, 按一行一株方式每孔加入100 μ l 1 μ g/ml的HRP标记的F124, F154, F156, FL85, FL12, E03, E13, E23, E85单抗, 37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0103] e. 显色: 弃去96孔板中液体, 用PBST缓冲液洗涤板, 连续洗5次, 并置于无纤毛纸巾上拍干。将TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 加入板中, 每孔100 μ l, 避光静置5~10min后, 再每孔加入50 μ l 2M H₂SO₄ (2mol/L), 终止酶反应。最后用酶标仪读数 (波长450nm), 测定每孔的光吸收值 (OD值)。从数据结果 (如下表6所示) 可见, P41~56aa与P80~95aa肽段表位单抗之间具有较强的配对性能, 尤以E03-FL12和E13-FL12单抗配对性能最佳。

[0104] 其中上述的FL12细胞株, 已于2018年12月27日寄出, 经查询于2018年12月29日中国普通微生物菌种保藏管理中心已签收。

[0105] 表6 P41~56aa和P80~95aa肽段表位单抗配对

[0106]

			包被抗体								
			F124	F154	F156	FL85	FL12	E03	E13	E23	E85
标 记 抗 体	F124- HRP	Ag	0.227	0.213	0.180	0.143	0.169	2.078	2.144	0.693	2.060
		0	0.163	0.195	0.130	0.094	0.145	0.226	0.206	0.108	0.132
	F154- HRP	Ag	0.383	0.353	0.156	0.210	0.124	1.949	1.687	0.962	0.545
		0	0.172	0.170	0.098	0.106	0.091	0.155	0.127	0.086	0.131
	F156- HRP	Ag	0.286	0.270	0.294	0.137	0.190	1.456	2.055	0.660	0.679
		0	0.122	0.190	0.135	0.097	0.106	0.184	0.123	0.122	0.169
	FL85- HRP	Ag	0.234	0.339	0.154	0.122	0.130	2.178	2.367	1.197	0.597
		0	0.163	0.101	0.161	0.188	0.221	0.219	0.222	0.163	0.183
	FL12- HRP	Ag	0.267	0.224	0.202	0.234	0.400	3.171	3.292	1.298	1.125
		0	0.192	0.158	0.139	0.153	0.232	0.166	0.122	0.139	0.170
	E03- HRP	Ag	2.488	2.055	2.387	1.492	3.643	0.124	0.135	0.197	0.173
		0	0.162	0.230	0.153	0.274	0.269	0.158	0.190	0.123	0.109
	E13- HRP	Ag	2.291	2.086	2.419	0.968	3.517	0.203	0.221	0.196	0.148
		0	0.178	0.188	0.178	0.122	0.182	0.124	0.176	0.157	0.172
	E23- HRP	Ag	0.358	0.321	0.233	0.153	0.416	0.221	0.300	0.317	0.169
		0	0.136	0.152	0.096	0.109	0.122	0.257	0.229	0.190	0.125
	E85- HRP	Ag	1.667	1.289	2.164	1.529	1.642	0.278	0.243	0.198	0.231
		0	0.189	0.186	0.133	0.133	0.170	0.212	0.169	0.191	0.146

[0107] 注：每组单抗配对均设置空白对照组“0”，表示夹心抗原浓度为0ng/ml。

[0108] 实例4：E03-FL12和E13-FL12单抗配对夹心检测cTnI临床样本

[0109] 将夹心抗原配对性能最佳的E03-FL12和E13-FL12单抗组合，进一步采用ELISA双抗体夹心法进行临床样本检测性能评价，并与商品化的对照试剂进行样本测值比对。具体检测结果如下表所示，将表中E03-FL12和E13-FL12单抗配对的检测OD数据分别与对照试剂盒的样本测值以最小二乘法进行线性拟合，如图4所示，可见拟合直线 R^2 均在0.95左右，说明E03-FL12和E13-FL12配对抗体与临床应用的商业化试剂盒测试样本的一致性较好。因此本发明制备的E03-FL12和E13-FL12抗体对检测临床样本的特异性良好，可为后续产业化配制cTnI检测试剂盒提供抗体原料基础。

[0110] 表7 E03-FL12和E13-FL12单抗配对夹心检测cTnI临床样本

[0111]

临床样本 编号	对照试剂盒 样本测值	E03-FL12 单抗配对 检测样本反应 OD 值	E13-FL12 单抗配对 检测样本反应 OD 值
1	0.11	0.102	0.100
2	0.12	0.115	0.095
3	0.69	0.141	0.106
4	0.72	0.185	0.110
5	1.23	0.167	0.106
6	1.64	0.202	0.116
7	2.08	0.175	0.117
8	2.25	0.266	0.128
9	2.63	0.276	0.131
10	3.50	0.300	0.157
11	4.86	0.389	0.171
12	5.35	0.468	0.173
13	5.76	0.472	0.258
14	6.30	0.514	0.191
15	7.24	0.522	0.227
16	9.39	0.548	0.238
17	10.71	0.569	0.249
18	10.93	0.665	0.286

[0112]

19	13.47	0.704	0.373
20	14.29	0.966	0.428
21	21.66	1.362	0.558
22	22.14	1.517	0.630
23	28.30	2.250	0.958
24	30.23	2.360	1.032

[0113] 注:对照试剂盒为西门子超敏肌钙蛋白I测定试剂盒(直接化学发光免疫分析法)

SEQUENCE LISTING

<110> 美康生物科技股份有限公司

<120> 用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法及获得的菌株

<130> 2019

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

Cys Gly Gly Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu Lys Thr Leu Leu

1 5 10 15

Leu Gln Ile

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 2

Cys Gly Gly Cys Gln Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu

1 5 10 15

Leu Gln Asp

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) .. (3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 3

Cys Xaa Xaa Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu Lys Thr Leu Leu

1 5 10 15

Leu Gln Ile

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (17) .. (18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 4

Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile

1 5 10 15

Xaa Xaa Cys

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) .. (3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 5

Cys Xaa Xaa Cys Gln Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu

1 5 10 15

Leu Gln Asp

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (17) .. (18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 6

Cys Gln Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp

1 5 10 15

Xaa Xaa Cys

<210> 7

<211> 210

<212> PRT

<213> cTnI

<400> 7

Met Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala	Pro	Ile	Arg	Arg	Arg	Ser	Ser	Asn	Tyr	Arg	Ala	Tyr	Ala	Thr	Glu	
			20						25						30	
Pro	His	Ala	Lys	Lys	Lys	Ser	Lys	Ile	Ser	Ala	Ser	Arg	Lys	Leu	Gln	
			35						40						45	
Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Ala	Lys	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Glu	
			50						55						60	
Ala	Glu	Glu	Arg	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Arg	Ala	Leu	Ser	Thr	Arg	Cys	
65						70						75			80	
Gln	Pro	Leu	Glu	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Phe	Ala	Glu	Leu	Gln	Asp	Leu	
			85						90						95	
Cys	Arg	Gln	Leu	His	Ala	Arg	Val	Asp	Lys	Val	Asp	Glu	Glu	Arg	Tyr	
			100						105						110	
Asp	Ile	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	
			115						120						125	
Thr	Gln	Lys	Ile	Phe	Asp	Leu	Arg	Gly	Lys	Phe	Lys	Arg	Pro	Thr	Leu	
130						135						140				
Arg	Arg	Val	Arg	Ile	Ser	Ala	Asp	Ala	Met	Met	Gln	Ala	Leu	Leu	Gly	
145						150						155			160	
Ala	Arg	Ala	Lys	Glu	Ser	Leu	Asp	Leu	Arg	Ala	His	Leu	Lys	Gln	Val	
			165						170						175	
Lys	Lys	Glu	Asp	Thr	Glu	Lys	Glu	Asn	Arg	Glu	Val	Gly	Asp	Trp	Arg	
			180						185						190	
Lys	Asn	Ile	Asp	Ala	Leu	Ser	Gly	Met	Glu	Gly	Arg	Lys	Lys	Lys	Phe	
			195						200						205	
Glu	Ser															
210																



图1

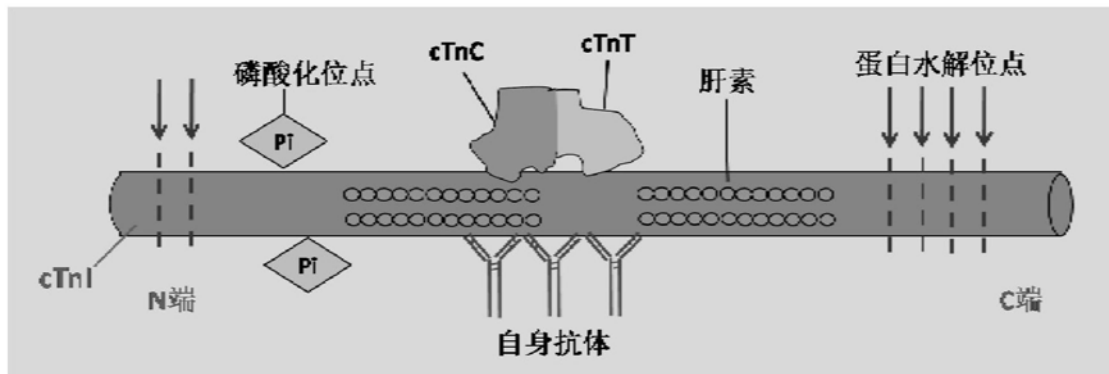


图2

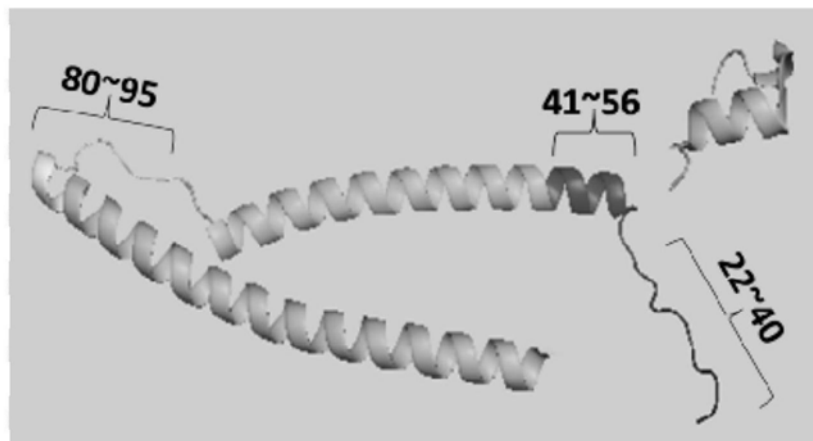


图3

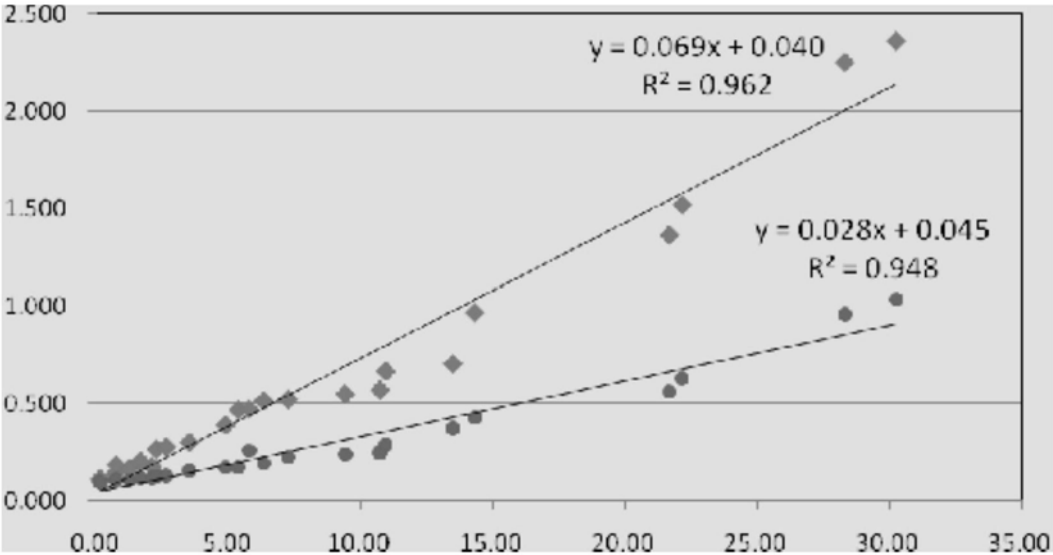


图4

专利名称(译)	用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法及获得的菌株		
公开(公告)号	CN109912713A	公开(公告)日	2019-06-21
申请号	CN201910015712.3	申请日	2019-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	美康生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	美康生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	美康生物科技股份有限公司		
[标]发明人	邹炳德 邹继华 武强 张莉 贾江花 何进军 章玉胜		
发明人	邹炳德 邹继华 武强 张莉 贾江花 何进军 章玉胜		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/68 C12N1/21		
代理人(译)	沉春库雷尼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于免疫诊断试剂配制的肌钙蛋白I抗体的制备方法及获得的菌株，制备步骤包括：(1)设计cTnI蛋白-NH2端41~56aa和80~95aa序列短肽作为免疫半抗原；(2)肽段与载体蛋白偶联；(3)免疫小鼠；(4)细胞融合；(5)腹水制备及单抗纯化，从小鼠体内抽取腹水后再通过粗纯和精纯化方法步骤，即获得纯度大于95%的单克隆抗体。本发明以目标肽段作为免疫原、主动避开各种干扰因素的影响，提高cTnI抗体所配制测定试剂的检测准确度，从而更高效地制备出用于配制检测特异性优良的cTnI测定试剂所需的抗体原料。

