



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110551219 A

(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201910659912.2

(22)申请日 2019.07.22

(71)申请人 浙江大学

地址 310000 浙江省杭州市西湖区浙大路  
38号

(72)发明人 翁炳焕 李兰娟 沈筱芸 许亚丽  
盛国平 应燕玲

(74)专利代理机构 浙江永鼎律师事务所 33233  
代理人 郭小丽

(51)Int.Cl.

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:步骤S1:备置纯度 $\geq 95\%$ 的半抗原D-Phe,并备置纯度 $\geq 95\%$ 的筛选原L-Tyr及L-Try;步骤S2:免疫原制备;步骤S3:动物免疫;步骤S4:细胞融合和筛选;步骤S41:初筛;步骤S42:复筛;步骤S43:竞争ELISA检测;步骤S44:阳性克隆的扩大培养和冻存;步骤S5:亚克隆;步骤S6:抗体生产。本发明用一种大分子物质与苯丙氨酸偶联,使之有抗原性,免疫小鼠,与鼠骨髓瘤细胞(sp2/0)融合,制备杂交瘤细胞,筛选和制备苯丙氨酸的单克隆抗体,可靠性好,用于试纸条的加工品质高,通过采集新生儿尿液以试纸法来筛查苯丙酮尿症。

1. 一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

步骤S1: 备置纯度 $\geq 95\%$ 的半抗原D-Phe,并备置纯度 $\geq 95\%$ 的筛选原L-Tyr及 L-Try;

步骤S2:免疫原制备,将半抗原和筛选原分别与OVA and BSA偶联,制成D-Phe-OVA、D-Phe-BSA、L-Tyr -OVA、L-Tyr- BSA、L-Try -BSA和L-Try- OVA;

步骤S3:动物免疫,分别设置A组和B组,其中A组5只Balb/c小鼠,用D-Phe-OVA免疫,然后用D-Phe-BSA检测;B组5只Balb/c小鼠,用D-Phe-BSA免疫,然后用D-Phe-OVA检测,免疫7天后,用间接ELISA和竞争ELISA方法检测免疫动物血清,确定免疫应答水平;

步骤S4:细胞融合和筛选,将步骤S3符合免疫应答水平要求的动物免疫细胞与鼠骨髓瘤细胞sp2/0进行细胞融合;

步骤S41:初筛,用间接ELISA方法筛选融合细胞培养上清液,挑选出能产生抗苯丙氨酸抗体的阳性克隆;

步骤S42:复筛,对初筛得到的能产生抗苯丙氨酸抗体的所有阳性克隆,进行复筛确认;

步骤S43: 竞争ELISA检测,将经复筛确认的能产生抗苯丙氨酸抗体的所有阳性克隆进行竞争ELISA检测;

步骤S44:阳性克隆的扩大培养和冻存,将上述阳性克隆细胞转到24孔板扩大培养,每个扩大培养的克隆收集2ml以上的上清液,用于间接ELISA和竞争ELISA检测,冻存能产生抗苯丙氨酸特异性抗体的阳性克隆细胞;

步骤S5:亚克隆,采用有限稀释法对上述阳性克隆进行亚克隆,以获得单克隆细胞,用间接ELISA和竞争ELISA方法进行亚克隆筛选,每个阳性克隆选择至少2个稳定的子克隆进行扩增和低温保存;

步骤S6:抗体生产,分别对亚克隆筛选的单克隆细胞进行抗体生产,采用ProteinA/G亲和层析方法纯化抗体,用透析方法将纯化抗体保存在磷酸盐缓冲液中。

2. 根据权利要求1所述的苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法,其特征在于:步骤S2中偶联的具体操作方法如下:

1.5mg半抗原和筛选原分别与2mgOVA and BSA溶于1.8mlpbs缓冲液中,缓慢滴加1%戊二醛20ul,再加0.15mol/LNaCl至蛋白终浓度为0.1mg/ml,置振荡器中轻微振荡2.5到3小时,然后添加0.05-0.1mg甘氨酸,轻微振荡20-30min即可。

3. 根据权利要求1所述的苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法,其特征在于:步骤S3中动物免疫的具体操作方法如下:

免疫前采血,然后第一次免疫,剂量和途径为50 $\mu$ g/只,皮下免疫,佐剂为弗氏完全佐剂,第二次免疫为首次免疫后第14天,25 $\mu$ g/只,皮下免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,首次免疫后第21天,采血检测一次,第28天第三次免疫,25 $\mu$ g/只,皮下免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,第35天采血检测,第50 $\pm$ 7天,最后一次免疫,25 $\mu$ g/只,静脉免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂。

4. 根据权利要求3所述的苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法,其特征在于:步骤S4细胞融合的动物细胞,其免疫应答水平OD值 $> 1.0$ ,效价达到1:8000。

5. 根据权利要求1所述的苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法,其特征在于:步骤S6中抗体质量的控制方法具体为:采用SDS-PAGE,间接ELISA和竞争ELISA进行,抗体浓度采用NanoDrop2000测定,抗体亲和力采用SPR Biacore测定。

## 一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗体的制备方法,特别涉及一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法。

### 背景技术

[0002] 苯丙酮尿症(PKU)是一种常见的氨基酸代谢病,是由于苯丙氨酸(PA)代谢途径中的酶缺陷,使得苯丙氨酸不能转变成为酪氨酸,导致苯丙氨酸及其酮酸蓄积,并从尿中大量排出。本病在遗传性氨基酸代谢缺陷疾病中比较常见,其遗传方式为常染色体隐性遗传。临床表现不均一,主要临床特征为智力低下、精神神经症状、湿疹、皮肤抓痕征及色素脱失和鼠气味等、脑电图异常。如果能得到早期诊断和早期治疗,则前述临床表现可不发生,智力正常,脑电图异常也可得到恢复。

[0003] 目前诊断新生儿苯丙酮尿症的检查为普筛项目,每个新生儿均要检测血液中的苯丙氨酸,新生儿期苯丙酮尿症筛查的方法目前为:新生儿喂奶3日后,采集足跟末梢血,吸收再生厚滤纸上,晾干后邮寄到筛查中心,采用Guthrie细菌生长抑制试验半定量测定,其原理是苯丙氨酸能促进已被抑制的枯草杆菌重新生长,以生长圈的范围测定血中苯病氨酸的含量,亦可在苯丙氨酸脱氢酶的作用下进行比色定量测定,其假阳性率较低。当苯丙氨酸含量 $>0.24\text{mmol/L}$  ( $4\text{mg/dl}$ )即两倍于正常参考值时,应复查或采静脉血定量测定苯丙氨酸和酪氨酸。正常人苯丙氨酸浓度为 $0.06\sim 0.18\text{mmol/L}$  ( $1\sim 3\text{mg/dl}$ )而患儿血浆苯丙氨酸可高达 $1.2\text{mmol/L}$  ( $20\text{mg/dl}$ )以上,且血中酪氨酸正常或稍低。

[0004] 上述检测方法存在较大的缺点:需要采集新生儿足跟血,会造成新生儿疼痛与不安,进而导致新生儿的亲人极度的不安和心疼。为此需要拟开发一种通过试纸来无痛筛查苯丙酮尿症的,需要获得苯丙氨酸抗体。苯丙氨酸为小分子,不能作为抗原直接刺激机体产生抗体。本发明提供一种苯丙氨酸抗体的制备方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决现有技术的苯丙氨酸为小分子,不能作为抗原直接刺激机体产生抗体的不足,提供一种苯丙氨酸抗体的制备方法。

[0006] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法,所述方法包括如下步骤:

步骤S1: 备置纯度 $\geq 95\%$ 的半抗原D-Phe,并备置纯度 $\geq 95\%$ 的筛选原L-Tyr及 L-Try;

步骤S2:免疫原制备,将半抗原和筛选原分别与OVA and BSA偶联,制成D-Phe-OVA、D-Phe-BSA、L-Tyr -OVA、L-Tyr- BSA、L-Try -BSA和L-Try- OVA;

步骤S3:动物免疫,分别设置A组和B组,其中A组5只Balb/c小鼠,用D-Phe-OVA免疫,然后用D-Phe-BSA检测;B组5只Balb/c小鼠,用D-Phe-BSA免疫,然后用D-Phe-OVA检测,免疫7天后,用间接ELISA和竞争ELISA方法检测免疫动物血清,确定免疫应答水平;

步骤S4:细胞融合和筛选,将步骤S3符合免疫应答水平要求的动物免疫细胞与鼠骨髓

瘤细胞sp2/0进行细胞融合；

步骤S41:初筛,用间接ELISA方法筛选融合细胞培养上清液,挑选出能产生抗苯丙氨酸抗体的阳性克隆；

步骤S42:复筛,对初筛得到的能产生抗苯丙氨酸抗体的所有阳性克隆,进行复筛确认；

步骤S43:竞争ELISA检测,将经复筛确认的能产生抗苯丙氨酸抗体的所有阳性克隆进行竞争ELISA检测；

步骤S44:阳性克隆的扩大培养和冻存,将上述阳性克隆细胞转到24孔板扩大培养,每个扩大培养的克隆收集2ml以上的上清液,用于间接ELISA和竞争ELISA检测,冻存能产生抗苯丙氨酸特异性抗体的阳性克隆细胞；

步骤S5:亚克隆,采用有限稀释法对上述阳性克隆进行亚克隆,以获得单克隆细胞,用间接ELISA和竞争ELISA方法进行亚克隆筛选,每个阳性克隆选择至少2个稳定的子克隆进行扩增和低温保存；

步骤S6:抗体生产,分别对亚克隆筛选的单克隆细胞进行抗体生产,采用ProteinA/G亲和层析方法纯化抗体,用透析方法将纯化抗体保存在磷酸盐缓冲液中。

[0007] 本发明的抗体用于试纸的制备：

样品垫的制备,将硝酸纤维素膜切成25\*30cm,用样品垫处理液浸泡30分钟上,取出烘干,切成相应宽度的2.5\*30cm样品垫条备用；

胶体金结合垫的制备:用氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备胶体金液冷却备用,调整pH值至一定值,加入一定量步骤S6制备的抗体,搅拌30分钟,加入一定量的BSA,搅拌10分钟,离心去上清,加入适量的复溶液复溶至适量体积,振荡均匀,喷涂在硝酸纤维素膜上,37℃干燥4小时以上,沿着喷胶体金复溶液的方向,在保证每条胶体金的完整的情况下,裁成1\*30cm胶体金结合垫备用；

吸水材料的制备:将吸水板裁成3.3\*30cm条形备用；

金膜组合,将吸水材料、胶体金结合垫、样品垫按照顺序层叠粘在PVC板上,形成成型板；

分切:将上述成型板根据需要切成2.5-6mm的条；

装袋和封口:将上述条装入铝泊袋中封口备用；

外包:将袋装产品装入外包装盒。

[0008] 优选的,步骤S2中偶联的具体操作方法如下：

1.5mg半抗原和筛选原分别与2mgOVA和BSA溶于1.8mlpbs缓冲液中,缓慢滴加1%戊二醛20ul,再加0.15mol/LNaCl至蛋白终浓度为0.1mg/ml,置振荡器中轻微振荡2.5到3小时,然后添加0.05-0.1mg甘氨酸,轻微振荡20-30min即可。

[0009] 优选的,步骤S3中动物免疫的具体操作方法如下：

免疫前采血,然后第一次免疫,剂量和途径为50μg/只,皮下免疫,佐剂为弗氏完全佐剂,第二次免疫为首次免疫后第14天,25μg/只,皮下免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,首次免疫后第21天,采血检测一次,第28天第三次免疫,25μg/只,皮下免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,第35天采血检测,第50±7天,最后一次免疫,25μg/只,静脉免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂。

[0010] 优选的,步骤S4细胞融合的动物细胞,其免疫应答水平OD值>1.0,效价达到1:

8000。

[0011] 优选的,步骤S6中抗体质量的控制方法具体为:采用SDS-PAGE,间接ELISA和竞争ELISA进行,抗体浓度采用NanoDrop2000测定,抗体亲和力采用SPR Biacore测定。

[0012] 优选的,步骤S8中调节pH值7.5-8.4,抗体的添加量为每1.0ml胶体金溶液添加5-8  $\mu$ L 0.1mg/mL的抗体,BSA溶液的浓度为1%,添加量为0.1-0.3ml。

[0013] 本发明的有益效果是:本发明用一种大分子物质与苯丙氨酸偶联,使之有抗原性,免疫小鼠,与鼠骨髓瘤细胞(sp2/0)融合,制备杂交瘤细胞,筛选和制备苯丙氨酸的单克隆抗体,可靠性好,用于试纸条的加工品质高,通过采集新生儿尿液以试纸法来筛查苯丙酮尿症。最大的优点是无创、简便、标本易得。可避免需采集新生儿足跟血的现有检测方法所致的创伤。避免造成新生儿的疼痛与不安,以及新生儿亲人的极度不安和心疼。

## 具体实施方式

[0014] 下面通过具体实施例,对本发明的技术方案作进一步的具体说明。

[0015] 一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法,所述方法包括如下步骤:

步骤S1: 备置纯度 $\geq 95\%$ 的半抗原D-Phe,并备置纯度 $\geq 95\%$ 的筛选原L-Tyr及 L-Try;

步骤S2:免疫原制备,将半抗原和筛选原分别与OVA and BSA偶联,制成D-Phe-OVA、D-Phe-BSA、L-Tyr-OVA、L-Tyr-BSA和L-Try-OVA;

步骤S3:动物免疫,分别设置A组和B组,其中A组5只Balb/c小鼠,用D-Phe-OVA免疫,然后用D-Phe-BSA检测;B组5只Balb/c小鼠,用D-Phe-BSA免疫,然后用D-Phe-OVA检测,免疫7天后,用间接ELISA和竞争ELISA方法检测免疫动物血清,确定免疫应答水平;

步骤S4:细胞融合和筛选,将步骤S3符合免疫应答水平要求的动物免疫细胞与鼠骨髓瘤细胞sp2/0进行细胞融合;

步骤S41:初筛,用间接ELISA方法筛选融合细胞培养上清液,挑选出能产生抗苯丙氨酸抗体的阳性克隆;

步骤S42:复筛,对初筛得到的能产生抗苯丙氨酸抗体的所有阳性克隆,进行复筛确认;

步骤S43: 竞争ELISA检测,将经复筛确认的能产生抗苯丙氨酸抗体的所有阳性克隆进行竞争ELISA检测;

步骤S44:阳性克隆的扩大培养和冻存,将上述阳性克隆细胞转到24孔板扩大培养,每个扩大培养的克隆收集2ml以上的上清液,用于间接ELISA和竞争ELISA检测,冻存能产生抗苯丙氨酸特异性抗体的阳性克隆细胞;

步骤S5:亚克隆,采用有限稀释法对上述阳性克隆进行亚克隆,以获得单克隆细胞,用间接ELISA和竞争ELISA方法进行亚克隆筛选,每个阳性克隆选择至少2个稳定的子克隆进行扩增和低温保存;

步骤S6:抗体生产,分别对亚克隆筛选的单克隆细胞进行抗体生产,采用ProteinA/G亲和层析方法纯化抗体,用透析方法将纯化抗体保存在磷酸盐缓冲液中;

具体到本发明中,步骤S2中偶联的具体操作方法如下:

1.5mg半抗原和筛选原分别与2mgOVA and BSA溶于1.8mlpbs缓冲液中,缓慢滴加1%戊二醛20 $\mu$ l,再加0.15mol/LNaCl至蛋白终浓度为0.1mg/ml,置振荡器中轻微振荡2.5到3小时,然后添加0.05-0.1mg甘氨酸,轻微振荡20-30min即可。

[0016] 另外,具体的说,步骤S3中动物免疫的具体操作方法如下:

免疫前采血,然后第一次免疫,剂量和途径为50 $\mu$ g/只,皮下免疫,佐剂为弗氏完全佐剂,第二次免疫为首次免疫后第14天,25 $\mu$ g/只,皮下免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,首次免疫后第21天,采血检测一次,第28天第三次免疫,25 $\mu$ g/只,皮下免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,第35天采血检测,第50 $\pm$ 7天,最后一次免疫,25 $\mu$ g/只,静脉免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,步骤S4细胞融合的动物细胞,其免疫应答水平OD值 $>1.0$ ,效价达到1:8000,步骤S6中抗体质量的控制方法具体为:采用SDS-PAGE,间接ELISA和竞争ELISA进行,抗体浓度采用NanoDrop2000测定,抗体亲和力采用SPR Biacore测定,步骤S8中调节pH值7.5-8.4,抗体的添加量为每1.0ml胶体金溶液添加5-8 $\mu$ L 0.1mg/mL的抗体,BSA溶液的浓度为1%,添加量为0.1-0.3ml。

[0017] 本发明的苯丙氨酸单克隆抗体,用于加工试纸,步骤如下:

步骤S7:样品垫的制备,将硝酸纤维素膜切成25\*30cm,用样品垫处理液浸泡30分钟上,取出烘干,切成相应宽度的2.5\*30cm样品垫条备用;

步骤S8:胶体金结合垫的制备:用氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备胶体金液冷却备用,调整pH值至一定值,加入一定量步骤S6制备的抗体,搅拌30分钟,加入一定量的BSA,搅拌10分钟,离心去上清,加入适量的复溶液复溶至适量体积,振荡均匀,喷涂在硝酸纤维素膜上,37 $^{\circ}$ C干燥4小时以上,沿着喷胶体金复溶液的方向,在保证每条胶体金的完整的情况下,裁成1\*30cm胶体金结合垫备用;步骤S8中调节pH值7.5-8.4,抗体的添加量为每1.0ml胶体金溶液添加5-8 $\mu$ L 0.1mg/mL的抗体,BSA溶液的浓度为1%,添加量为0.1-0.3ml;

步骤S9:吸水材料的制备:将吸水板裁成3.3\*30cm条形备用;

步骤S10:金膜组合,将吸水材料、胶体金结合垫、样品垫按照顺序层叠粘在PVC板上,形成成型板;

步骤S11:分切:将上述成型板根据需要切成2.5-6mm的条;

步骤S12:装袋和封口:将上述条装入铝泊袋中封口备用;

步骤S13:外包:将袋装产品装入外包装盒。

[0018] 本发明实施例制备得到的试纸储存于4-15 $^{\circ}$ C避光干燥,严禁冷冻,有效期为18个月,其用于测试的样本要求及测试方法如下:

采用一次性洁净容器收集新生儿的新鲜尿样,以早晨5:00至6:00之间的晨尿为最优测试尿样。尿样如果呈现浑浊状,先离心、过滤或者待其沉淀后取上清液检测。当采集的尿样不能及时检测时,尿液样本放于2-5 $^{\circ}$ C冷藏保藏36小时,最长不得超过48h,如果需要长期保藏,则需冷冻于-15 $^{\circ}$ C,同时避免反复的冷冻和解冻。

[0019] 在进行尿样检测前,将尿液样本恢复至室温(20-25 $^{\circ}$ C),25 $^{\circ}$ C最优。测试及结果判定的具体步骤如下:

1.取出本发明实施例的试纸条,并在0.5h内使用;

2.将试纸条的下端插入尿液样本中,尿液液面务必要低于试纸条的标记线;至少8s后取出,放于干净平整的台面上;

3.等待色带的出现,检测结果应在4-5分钟时判读,超出8分钟判读无效;

阳性(+):出现两条色带,一条位于测试区,一条位于质控区,表明系苯丙酮尿症患者。

[0020] 阴性(-):仅质控区出现一条色带,测试区无色带,排除苯丙酮尿症。

[0021] 无效：质控区未出现色带，表明试纸条不正确使用或者已经变质损坏。

[0022] 遵照前述测试方法，经实验验证，测试有效率高达99%。

[0023] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案，并非对本发明作任何形式上的限制，在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。

专利名称(译)	一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110551219A</a>	公开(公告)日	2019-12-10
申请号	CN201910659912.2	申请日	2019-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	翁炳焕 李兰娟 许亚丽 盛国平		
发明人	翁炳焕 李兰娟 沈筱芸 许亚丽 盛国平 应燕玲		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/531 G01N33/577 G01N2800/04		
代理人(译)	郭小丽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种苯丙氨酸单克隆抗体的制备方法，包括如下步骤：步骤S1:备置纯度≥95%的半抗原D-Phe，并备置纯度≥95%的筛选原L-Tyr及L-Try；步骤S2：免疫原制备；步骤S3：动物免疫；步骤S4：细胞融合和筛选；步骤S41：初筛；步骤S42：复筛；步骤S43：竞争ELISA检测；步骤S44:阳性克隆的扩大培养和冻存；步骤S5：亚克隆；步骤S6：抗体生产。本发明用一种大分子物质与苯丙氨酸偶联，使之有抗原性，免疫小鼠，与鼠骨髓瘤细胞（sp2/0）融合，制备杂交瘤细胞，筛选和制备苯丙氨酸的单克隆抗体，可靠性好，用于试纸条的加工品质高，通过采集新生儿尿液以试纸法来筛查苯丙酮尿症。