



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110343695 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201910429213.9

(22)申请日 2019.05.22

(83)生物保藏信息

CGMCC No.17681 2019.05.08

CGMCC No.17682 2019.05.08

(71)申请人 青岛汉德森生物科技有限公司

地址 266000 山东省青岛市城阳区流亭街
道裕亭路16号

(72)发明人 崔晓凤

(74)专利代理机构 青岛高晓专利事务所(普通
合伙) 37104

代理人 顾云义

(51)Int.Cl.

C12N 15/06(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/08(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

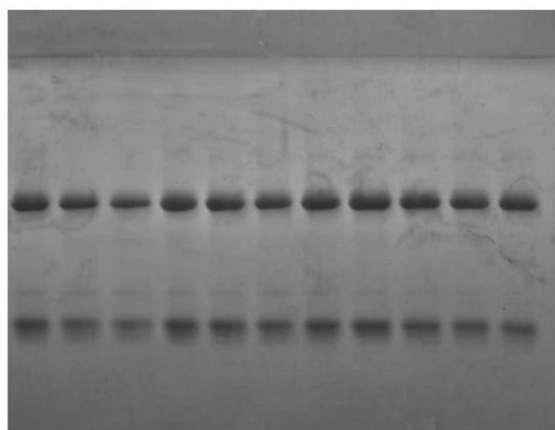
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

杂交瘤细胞株及其制备方法和基于杂交瘤
细胞株的乙肝表面抗原单克隆抗体及检测试剂
盒

(57)摘要

一种杂交瘤细胞株,所述杂交瘤细胞株能够分泌与乙肝表面抗原特异性结合的乙肝表面抗原单克隆抗体,所述杂交瘤细胞株保藏号为CGMCC No.17681、CGMCC No.17682。杂交瘤细胞株制备方法,包括如下步骤:免疫、测定血清效价、融合、细胞株筛选。上述杂交瘤细胞株或其传代细胞株分泌产生的乙肝表面抗原单克隆抗体及制备方法,其制备方法包括如下步骤:腹水生产;腹水过滤;腹水稀释;测OD后上样;平衡;洗脱并接样;吸光值上扬后换管接样;加入NaN₃;跑电泳、测活性;进行胶体金筛选。本发明提供的杂交瘤细胞株的制备方法获得的乙肝表面抗原单克隆抗体,产量高、稳定性好,成本低,胶体金检测应用中可提高检测灵敏度,快速准确检测大量临床样本。



1. 一种杂交瘤细胞株制备方法,包括如下步骤:免疫、测定血清效价、融合、细胞株筛选;

所述免疫步骤包括如下步骤:

(1) 取6-8周Ba1b/c健康小鼠若干只;

(2) 初次免疫,取抗原与弗氏完全佐剂体积比为1:1混合后乳化,形成油包水状态,对小鼠进行皮下多点注射;

(3) 二次免疫,于第14天,取抗原与弗氏不完全佐剂体积比为1:1混合后乳化,形成油包水状态,对小鼠进行皮下多点注射;

(4) 第三次免疫,于第28天,取抗原与弗氏不完全佐剂体积比为1:1混合后乳化,形成油包水状态,对小鼠进行皮下多点注射;

(5) 第四次免疫,于第42天,取抗原与弗氏不完全佐剂体积比为1:1混合后乳化,形成油包水状态,对小鼠进行皮下多点注射;

所述测定血清效价步骤具体包括如下步骤:

(1) 提前将预包被好的酶标板取出置于室温下至少半小时;

(2) 分别对免疫小鼠进行眼眶采血;

(3) 待血液完全凝固后,3000r/min离心5min,取上清液;

(4) 将上清液用PBS进行倍比稀释;

(5) 加样:在已恢复室温的酶标板的微孔条中,分别加入稀释后上清100 μ l,以PBS作为空白对照,正常鼠血清对阴性对照,置37 $^{\circ}$ C温育30min;

(6) 洗板:用洗板机吸去孔内液体,将洗液注满每孔,反复3次,最后在吸水纸上拍干;

(7) 加酶:每孔加入酶标记物100 μ l,用封板膜覆盖,置37 $^{\circ}$ C孵育30min;

(8) 洗板:用洗板机吸去孔内液体,将洗液注满每孔,反复3次,最后在吸水纸上拍干;

(9) 显色:每孔加入TMB底物100 μ l,用封板膜覆盖,置37 $^{\circ}$ C避光孵育15分钟;

(10) 终止:每孔加终止液50 μ l,震荡使孔内液体混合均匀,立即测试结果;

(11) 读数:用酶标仪双波长读取各孔的吸光度值;

所述细胞株筛选包括如下步骤:

(1) 杂交瘤细胞出现后,吸取上清液,检测活性;

(2) 根据(1)中上清液活性检测结果选取合适的孔进行第一次亚克隆;

(3) 待第一次亚克隆细胞团长至明显可见时,吸取(2)中上清液,检测活性;

(4) 根据(2)中上清液活性检测结果选取合适的孔进行第二次亚克隆,同时扩至24孔板进行增殖;

(5) 待第二次亚克隆细胞团长至明显可见时,吸取(4)中上清液,检测活性;

(6) 根据(5)中上清液活性检测结果选取合适的孔扩至24孔板进行增殖;

(7) 待(6)中24孔板细胞长至汇合率为80%后,吸取上清液,检测活性;

(8) 根据(7)中上清液活性检测结果选取合适的孔扩至25cm细胞培养瓶进行增殖、冻存保种。

2. 根据权利要求1所述的杂交瘤细胞株制备方法所制备出的杂交瘤细胞株,其特征在于:包括生物保藏编号为CGMCC No.17681、CGMCC No.17682的杂交瘤细胞株2株。

3. 根据权利要求2所述的杂交瘤细胞株制备方法所制备出的杂交瘤细胞株分泌产生的

乙肝表面抗原单克隆抗体,其特征在于:所述单克隆抗体的类型为IgA、IgG。

4. 根据权利要求3所述的杂交瘤细胞株制备方法所制备出的杂交瘤细胞株分泌产生的乙肝表面抗原单克隆抗体的制备方法,其特征在于:该制备方法包括如下步骤:

- (1) 将保存的杂交瘤细胞株注射入小鼠腹腔进行腹水生产;
- (2) 将腹水用滤纸、玻璃纤维与无纺布各两层进行过滤;
- (3) 过滤后腹水用A液体积比为1:1稀释,A液由20mM PB和0.3M NaCl组成,A液的pH=7.5;
- (4) 稀释后腹水混匀测OD后上样,上样速度为5ml/min;
- (5) 上样后用A液平衡完全,平衡速度5ml/min;
- (6) A液平衡后,用B液洗脱并接样,洗脱速度10ml/min,B液为0.1M甘氨酸,B液的pH=4;
- (7) 接样过程中,吸光值上扬后换管接样,直至OD<0.2;
- (8) 接样后立即用2M Tris调pH=7.5,加入NaN₃至NaN₃的终浓度为万分之一;
- (9) B液洗脱并平衡完全后,用A液平衡完全;
- (10) 将得到的腹水分别跑电泳、测活性;
- (11) 纯度符合要求后,进行胶体金筛选。

5. 根据权利要求3所述的杂交瘤细胞株制备方法所制备出的杂交瘤细胞株分泌产生的乙肝表面抗原单克隆抗体所制备的试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括用上述乙肝表面抗原单克隆抗体所制成的金标垫,所述金标垫的制备方法包括如下步骤:

- (1) 包被抗原;
- (2) 烧40nm的胶体金溶液;
- (3) 将乙肝表面抗原单克隆抗体稀释至1mg/ml,标记金溶液;
- (4) 抗体条件:确定K值,固定乙肝表面抗原单克隆抗体的用量,连续增加K值;用微量进样器将碳酸钾溶液加入到红溶液中,混匀,五只为一组;然后再加入相同的乙肝表面抗原单克隆抗体量,混匀;然后每管滴入三滴2M NaCl溶液,混匀观察有无聚沉现象,直至出现溶液颜色不再变化,此时的碳酸钾的体积为我们所要的K值;
- (5) 确定Ab值,固定K值,不断改变乙肝表面抗原单克隆抗体的用量;先用微量进样器加入碳酸钾溶液至红溶液中,混匀;然后再加入不同体积的乙肝表面抗原单克隆抗体,混匀;然后每管滴入三滴2MNaCl溶液,混匀观察有无聚沉现象,直至出现溶液颜色不再变化,此时所需乙肝表面抗原单克隆抗体最小用量为Ab值;
- (6) 配置离心小样进行离心:向离心管中加入碳酸钾溶液,混匀;随后加入乙肝表面抗原单克隆抗体,混匀;再次向离心管中分别加入400μl稳定剂和200μl的终止剂混匀;先以5000r/min离心20min,静置10min;用移液管移取底部沉淀于离心管中;将离心后的上清液再以8000r/min离心20min,静置10min;用移液管移取底部沉淀于离心管中,此时离心后的上清液即为小样;
- (7) 测小样的OD值,将小样稀释至OD=20,配置金标垫小样溶液;
- (8) 做金标垫小样:用移液枪移取配制好的金标垫小样溶液,涂到空白金标垫上直至整个金标垫涂抹均匀。

杂交瘤细胞株及其制备方法和基于杂交瘤细胞株的乙肝表面抗原单克隆抗体及检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明生物工程领域,特别涉及杂交瘤细胞株制备方法及其基于杂交瘤细胞株的乙肝表面抗原单克隆抗体及检测试剂盒。

背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒属于一种发病率很高的肝炎疾病,目前,乙型肝炎病毒感染已经成为世界范围内高度重视的公共健康问题。为了更加有效地对乙肝感染进行控制,必须对乙肝病毒进行快速、准确、有效的诊断。

[0003] 乙肝表面抗原(HBsAg)是乙肝病毒的外壳蛋白,是血清中首先出现HBV感染的标志物,HBsAg本身不具有传染性,但它的出现常伴随乙肝病毒的存在,所以它是已感染乙肝病毒的主要标志。它可存在于患者的血液、唾液、乳汁、汗液、泪水、鼻咽分泌物、精液及阴道分泌物中。目前检测乙肝表面抗原(HBsAg)的常用的检测方法有酶联免疫法、胶体金法。

[0004] 胶体金检测法的优点是操作简便、快速,缺点是检测的灵敏度较低,酶联免疫检测法的优点是检测的灵敏度较高,缺点是步骤繁琐、费时。临床上可应用胶体金检测法对患者进行快速筛查,以缩短初筛的时间,提高检查的效率,适用于大规模的乙肝病毒携带筛查,而酶联免疫检测法则可用于对少数胶体金法检测结果呈阳性的患者进行二次筛查,以提高检测的准确率。

[0005] 单克隆抗体技术是将B淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合产生既可以分泌抗体又可以无限增殖的杂交瘤细胞的一项技术。利用单克隆抗体技术可以获得针对特定单一抗原表位的抗体,相比较传统的制备技术具有成本低、产量高、用时短、抗体特异性强等优点。

[0006] 优良的筛选和克隆化方法具备快速简便、特异性好、成本低和节省人力等优点,可以较快的筛选出目的抗体。单克隆抗体具有无可比拟的优越性,它具有特异性高、效价高、纯度高、理化性状均一、重复性强、成本低并可大量生产等优点。

发明内容

[0007] 针对上述现有技术中存在的问题,本发明提供一种杂交瘤细胞株及其制备方法和该杂交瘤细胞株分泌的乙肝表面抗原单克隆抗体,该杂交瘤细胞株分泌的乙肝表面抗原单克隆抗体特异性好、效价高、纯度高、稳定性好,用于乙肝表面抗原的检测,可以有效提高胶体金检测的灵敏度,使胶体金检测方法更好的适合于临床大量样本的检测,提高检测结果的准确度。

[0008] 本发明的上述技术目的是通过以下技术方案得以实现的:

[0009] 一种杂交瘤细胞株,所述杂交瘤细胞株能够分泌与乙肝表面抗原特异性结合的乙肝表面抗原单克隆抗体,所述杂交瘤细胞株的保藏号为CGMCC No.17681、CGMCC No.17682。

[0010] 本发明另一发明目的在于提供一种上述杂交瘤细胞株的制备方法,包括如下步骤:免疫、测定血清效价、融合、细胞株筛选。

[0011] 所述免疫步骤包括如下步骤:

[0012] (1) 取6-8周Ba1b/c健康小鼠3只;

[0013] (2) 初次免疫,取抗原与弗氏完全佐剂体积比为1:1混合后乳化,形成油包水状态,对小鼠进行皮下多点注射;

[0014] (3) 二次免疫,于第14天,取抗原与弗氏不完全佐剂体积比为 1:1混合后乳化,形成油包水状态,对小鼠进行皮下多点注射;

[0015] (4) 第三次免疫,于第28天,取抗原与弗氏不完全佐剂体积比 为1:1混合后乳化,形成油包水状态,对小鼠进行皮下多点注射。

[0016] (5) 第四次免疫,于第42天,取抗原与弗氏不完全佐剂体积比 为1:1混合后乳化,形成油包水状态,对小鼠进行皮下多点注射。

[0017] 所述测定血清效价步骤具体包括如下步骤:

[0018] (1) 提前将预包被好的酶标板取出置于室温下至少半小时;

[0019] (2) 分别对免疫小鼠进行眼眶采血;

[0020] (3) 待血液完全凝固后,3000r/min离心5min,取上清液;

[0021] (4) 将上清液用PBS进行倍比稀释;

[0022] (5) 加样:在已恢复室温的酶标板的微孔条中,分别加入稀释 后上清100 μ l,以PBS作为空白对照,正常鼠血清对阴性对照,置37 $^{\circ}$ C 温育30min;

[0023] (6) 洗板:用洗板机吸去孔内液体,将洗液注满每孔,反复3 次,最后在吸水纸上拍干;

[0024] (7) 加酶:每孔加入酶标记物100 μ l,用封板膜覆盖,置37 $^{\circ}$ C孵 育30min;

[0025] (8) 洗板:用洗板机吸去孔内液体,将洗液注满每孔,反复3 次,最后在吸水纸上拍干;

[0026] (9) 显色:每孔加入TMB底物100 μ l,用封板膜覆盖,置37 $^{\circ}$ C避 光孵育15分钟;

[0027] (10) 终止:每孔加终止液50 μ l,震荡使孔内液体混合均匀,立 即测试结果;

[0028] (11) 读数:用酶标仪双波长读取各孔的吸光度值。

[0029] 所述细胞株筛选包括如下步骤:

[0030] (1) 杂交瘤细胞出现后,吸取上清液,检测活性;

[0031] (2) 根据(1)中上清液活性检测结果选取合适的孔进行第一次 亚克隆;

[0032] (3) 待第一次亚克隆细胞团长至明显可见时,吸取(2)中上清 液,检测活性;

[0033] (4) 根据(2)中上清液活性检测结果选取合适的孔进行第二次 亚克隆,同时扩至24孔板进行增殖;

[0034] (5) 待第二次亚克隆细胞团长至明显可见时,吸取(4)中上清 液,检测活性;

[0035] (6) 根据(5)中上清液活性检测结果选取合适的孔扩至24孔板 进行增殖;

[0036] (7) 待(6)中24孔板细胞长至汇合率为80%后,吸取上清液, 检测活性;

[0037] (8) 根据(7)中上清液活性检测结果选取合适的孔扩至25cm 细胞培养瓶进行增殖、冻存保种。

[0038] 本发明另一目的在于提供一种乙肝表面抗原单克隆抗体及制备 方法,该乙肝表

面抗原单克隆抗体由上述杂交瘤细胞株或其传代细胞 株分泌产生。

[0039] 该乙肝表面抗原单克隆抗体制备方法包括如下步骤：

[0040] (1) 将保存的杂交瘤细胞株注射入小鼠腹腔进行腹水生产；

[0041] (2) 将腹水用滤纸、玻璃纤维与无纺布各两层进行过滤；

[0042] (3) 过滤后腹水用A液体积比为1:1稀释,A液由20mM PB和0.3M NaCl组成,A液的pH=7.5；

[0043] (4) 稀释后腹水混匀测OD后上样,上样速度为5ml/min；

[0044] (5) 上样后用A液平衡完全,平衡速度5ml/min；

[0045] (6) A液平衡后,用B液洗脱并接样,洗脱速度10ml/min,B液 为0.1M甘氨酸,B液的pH=4；

[0046] (7) 接样过程中,吸光值上扬后换管接样,直至OD<0.2；

[0047] (8) 接样后立即用2M Tris调pH=7.5,加入NaN₃至NaN₃的终浓 度为万分之一；

[0048] (9) B液洗脱并平衡完全后,用A液平衡完全；

[0049] (10) 将得到的腹水分别跑电泳、测活性；

[0050] (11) 纯度符合要求后,进行胶体金筛选。

[0051] 本发明还有一发明目的在于提供一种试剂盒,该试剂盒包括用上 述乙肝表面抗原单克隆抗体所制成的金标垫。

[0052] 所述金标垫的制备方法包括如下步骤：

[0053] (1) 包被抗原；

[0054] (2) 烧40nm的胶体金溶液；

[0055] (3) 将乙肝表面抗原单克隆抗体稀释至1mg/ml,标记金溶液；

[0056] (4) 抗体条件:确定K值,固定乙肝表面抗原单克隆抗体的用 量,连续增加K值;用微量进样器将碳酸钾溶液加入到红溶液中,混 匀,五只为一组;然后再加入相同的乙肝表面抗原单克隆抗体量,混 匀;然后每管滴入三滴2M NaCl溶液,混匀观察有无聚沉现象,直至 出现溶液颜色不再变化,此时的碳酸钾的体积为我们所要的K值；

[0057] (5) 确定Ab值,固定K值,不断改变乙肝表面抗原单克隆抗体 的用量;先用微量进样器加入碳酸钾溶液至红溶液中,混匀;然后再 加入不同体积的乙肝表面抗原单克隆抗体,混匀;然后每管滴入三滴 2MNaCl溶液,混匀观察有无聚沉现象,直至出现溶液颜色不再 变化,此时所需乙肝表面抗原单克隆抗体最小用量为Ab值；

[0058] (6) 配置离心小样进行离心:向离心管中加入碳酸钾溶液,混 匀;随后加入乙肝表面抗原单克隆抗体,混匀;再次向离心管中分别 加入400μl稳定剂和200μl的终止剂混匀;先以5000r/min离心20min, 静置10min;用移液管移取底部沉淀于离心管中;将离心后的上清液 再以8000r/min离心20min,静置10min;用移液管移取底部沉淀于离 心管中,此时离心后的上清液即为小样；

[0059] (7) 测小样的OD值,将小样稀释至OD=20,配置金标垫小样溶 液；

[0060] (8) 做金标垫小样:用移液枪移取配制好的金标垫小样溶液, 涂到空白金标垫上直至整个金标垫涂抹均匀。

[0061] 用本发明提供的试剂盒检测,如果血浆/血清样本中有乙肝表面 抗原,则试验线会出现紫红色条带。如果血浆/血清样本中无乙肝表 面抗原,则试验线不会出现紫红色条

带。

[0062] 本发明具有以下有益效果：用本发明提供的试剂盒能够定性检测 乙肝表面抗原，方法简便。本发明提供的杂交瘤细胞株的制备方法获得的乙肝表面抗原单克隆抗体，产量高、稳定性好，生产成本低，在 胶体金检测应用上可以有效提高检测的灵敏度，方便快速准确检测大 量临床样本。

附图说明

[0063] 图1为11株乙肝表面抗原单克隆抗体纯化后电泳图。

具体实施方式

[0064] 为了便于理解，下面结合附图通过实施例对本发明作进一步详细 说明。

[0065] 如无特别说明，以下所涉及的试剂均购自北京索莱宝科技有限公司。

[0066] 实施例1

[0067] 该实施例用于说明杂交瘤细胞株的制备方法，其具体步骤如下：

[0068] 1,免疫：

[0069] (1) 取6-8周Balb/c健康小鼠3只。

[0070] (2) 初次免疫，取乙肝表面抗原与弗氏完全佐剂体积比为1:1 混合后乳化，形成油包水状态，对小鼠进行皮下多点注射。

[0071] (3) 二次免疫，在第14天，取乙肝表面抗原与弗氏不完全佐剂 体积比为1:1混合后乳化，形成油包水状态，对小鼠进行皮下多点注 射。

[0072] (4) 第三、四次免疫，于第28天、42天，取乙肝表面抗原与弗 氏不完全佐剂体积比为1:1混合后乳化，形成油包水状态，对小鼠进 行皮下多点注射。

[0073] 2,测定血清效价：

[0074] (1) 提前将预包被好的酶标板从冰箱中取出至室温至少半小时。

[0075] (2) 分别对免疫小鼠进行眼眶采血。

[0076] (3) 待血液完全凝固后，3000r/min离心5min，取上清液。

[0077] (4) 将上清液分别用PBS按1:5000、1:10000、1:20000、1:40000……体积倍比稀 释。

[0078] (5) 加样：在已恢复室温的酶标板的微孔条中，分别加入稀释 后上清100 μ l，以PBS作为空白对照，正常鼠血清为阴性对照，置37℃ 温育30分钟。

[0079] (6) 洗板：用洗板机吸去孔内液体，将洗液注满每孔(约300 μ l/孔)，反复3次，最后在吸水纸上拍干。

[0080] (7) 加酶：每孔加入酶标记物100 μ l，用封板膜覆盖，置37℃ 孵育30分钟。

[0081] (8) 洗板：用洗板机吸去孔内液体，将洗液注满每孔(约300 μ l/孔)，反复3次，最后在吸水纸上拍干。

[0082] (9) 显色：每孔加入TMB底物100 μ l，用封板膜覆盖，置37℃避 光孵育15分钟。

[0083] (10) 终止：每孔加终止液50 μ l，轻轻震荡使孔内液体混合均 匀，立即测试结果。

[0084] (11) 读数：用酶标仪双波长读取各孔的吸光度值。

[0085] 3,融合：

[0086] 根据免疫小鼠血清效价检测结果选取效价符合要求的小鼠进行融合。

[0087] 4, 细胞株筛选:

[0088] (1) 细胞融合后大多数杂交瘤细胞在10-20天内出现, 但也有在1个月左右才能出现的。杂交瘤细胞出现后, 吸取上清液, 检测活性。

[0089] (2) 根据上清液活性检测结果选取合适的孔进行第一次亚克隆。

[0090] (3) 待第一次亚克隆细胞团长至明显可见时, 吸取上清液, 检测活性。

[0091] (4) 根据上清液活性检测结果选取合适的孔进行第二次亚克隆, 同时扩至24孔板进行增殖。

[0092] (5) 待第二次亚克隆细胞团长至明显可见时, 吸取上清液, 检测活性。

[0093] (6) 根据上清液活性检测结果选取合适的孔扩至24孔板进行增殖。

[0094] (7) 待24孔板细胞长至汇合率为80%后, 吸取上清液, 检测活性。

[0095] (8) 根据上清液活性检测结果选取合适的孔扩至25cm²细胞培养瓶进行增殖、冻存保种。

[0096] 细胞株筛选过程中, 合适的孔的条件为上清液的OD_{450/630}大于1。

[0097] 在本实施例中, 共筛选到11株杂交瘤细胞株。

[0098] 实施例2

[0099] 参照图1, 结合该实施例, 对乙肝表面抗原单克隆抗体的制备方法, 进行具体说明: 其具体步骤如下:

[0100] (1) 将保存的杂交瘤细胞株腹腔注射入小鼠进行腹水生产。

[0101] (2) 将腹水用滤纸、玻璃纤维与无纺布各两层进行过滤。

[0102] (3) 过滤后腹水用A液 (20mM PB+0.3M NaCl pH=7.5 M=mol/L) 体积比为1:1稀释。

[0103] (4) 稀释后腹水混匀测OD后上样, 上样速度为5ml/min (根据柱子的截面积确定)。

[0104] (5) 上样后用A液平衡完全, 平衡速度5ml/min。

[0105] (6) A液平衡后, 用B液 (0.1M甘氨酸pH=4 M=mol/L) 洗脱并接样, 洗脱速度10ml/min。

[0106] (7) 接样过程中, 吸光值上扬后换管接样, 直至OD<0.2。

[0107] (8) 接样后立即用2M Tris (M=mol/L) 调pH=7.5, 加入NaN₃ 至NaN₃的终浓度为万分之一。

[0108] (9) B液洗脱并平衡完全后, 用A液平衡完全。

[0109] (10) 将得到的腹水分别跑电泳、测活性。

[0110] (11) 纯度符合要求后, 进行胶体金筛选。

[0111] 11株杂交瘤细胞株分泌的乙肝表面抗原单克隆抗体纯化后电泳图如图1所示。从图1可知, 纯化后的乙肝表面抗原单克隆抗体纯度符合要求。

[0112] 实施例3

[0113] 该实施例用于说明金标垫的制备方法, 其具体步骤如下:

[0114] (1) 包被乙肝表面抗原单克隆抗体1。

[0115] (2) 烧40nm的胶体金溶液。

[0116] (3) 将乙肝表面抗原单克隆抗体2稀释至1mg/ml, 标记金溶液。

[0117] (4) 抗体条件:确定K值,固定乙肝表面抗原单克隆抗体的用量(一般过量),连续增加K值(例如碳酸钾的用量为3,5,7,9,11 微升)。用微量进样器将碳酸钾溶液加入到红溶液中,混匀,五只为一组。然后再加入相同的乙肝表面抗原单克隆抗体量,混匀。然后每管滴入三滴2M NaCl ($M=\text{mol/L}$) 溶液,混匀观察有无聚沉现象,直至出现溶液颜色不再变化,此时的碳酸钾的体积为我们所要的K值。

[0118] (5) 确定Ab值,固定K值,不断改变乙肝表面抗原单克隆抗体的用量(乙肝表面抗原单克隆抗体量要连续)。先用微量进样器加入碳酸钾溶液至红溶液中,混匀。然后再加入不同体积的乙肝表面抗原单克隆抗体(例如:5,7,9,11,13微升),混匀。然后每管滴入三滴2M NaCl ($M=\text{mol/L}$) 溶液,混匀观察有无聚沉现象,直至出现溶液颜色不再变化,此时所需乙肝表面抗原单克隆抗体最小用量为Ab值。

[0119] (6) 配置离心小样进行离心:向离心管中加入碳酸钾溶液,混匀;随后加入乙肝表面抗原单克隆抗体,混匀;再次向离心管中分别加入400 μl 稳定剂(R06和R06')和200 μl 的R307终止剂混匀;先以5000r/min离心20min,静置10min。用移液管移取底部沉淀于离心管中。将离心后的上清液再以8000r/min离心20min,静置10min(沉淀由侧壁降到底部)。用移液管移取底部沉淀于离心管中,此时离心后的上清液即为小样。

[0120] (7) 测小样的OD值,将小样稀释至OD=20,配置金标垫小样溶液。

[0121] (8) 做金标垫小样:将空白金标垫裁剪成5*10cm的规格。用移液枪移取配制好的金标垫小样溶液,涂到空白金标垫上,戴手套的指肚不断朝金标垫的一个方向涂抹溶液,直至整个金标垫涂抹均匀。

[0122] (9) 检测结果:

[0123] 检测方法:

[0124] a、直接将检测溶液滴至金标垫加样处,约2-3滴。

[0125] b、将金标垫平放1min,等待红色条带出现

[0126] c、3-8分钟内观察结果,将红色条带与比色卡进行比对,记录显色程度10分钟后判读无效。

[0127] 将11株杂交瘤细胞株分泌的乙肝表面抗原单克隆抗体均制成金标垫,依次编号为1-11号,参照上述检测方法进行检测,检测结果见表1。

[0128]	编号	1号	2号	3号	4号	5号	6号	7号	8号	9号	10号	11号
	显色级别											
	检测溶液											
	PBS	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无
	乙肝表面抗原 (Xng/ml)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性

[0129] 表1

[0130] 从表1可知,本发明能够定性检测血液中乙肝表面抗原,方法简便。

[0131] 实施例4

[0132] 根据表1,将2号抗乙肝表面抗原(HBsAg)单克隆抗体杂交瘤细胞对应的杂交瘤细胞株进行保藏。该杂交瘤细胞株于2019年05月08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,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏号为CGMCC No.17681、CGMCC No.17682。

[0133] 实施例5

[0134] 一种试剂盒,包括按照实施例3方法制备的2号金标垫。

[0135] 血液中乙肝表面抗原检测

[0136] 1、取乙肝表面抗原浓度分别为0、10ng/ml、100ng/ml、1000ng/ml的血液样品滴至金标垫加样处,约2-3滴。

[0137] 2、将金标垫平放1min,等待红色条出现。

[0138] 3、3-8分钟内观察结果,10分钟后判读无效。

[0139] 表2

[0140]

乙肝表面抗原浓度 (ng/ml)	0	10	100	1000
显色级别	阳性	阳性	阳性	无

[0141] 从表2可知,本发明能够定性检测血液中乙肝表面抗原,方法简便。

[0142] 上述实施例只是对本发明技术方案的举例说明或解释,而不应理解为对本发明技术方案的限制,显然,本领域的技术人员可对本发明进行各种修改和变型,倘若这些修改和变型不脱离本发明的精神和范围,则属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内。

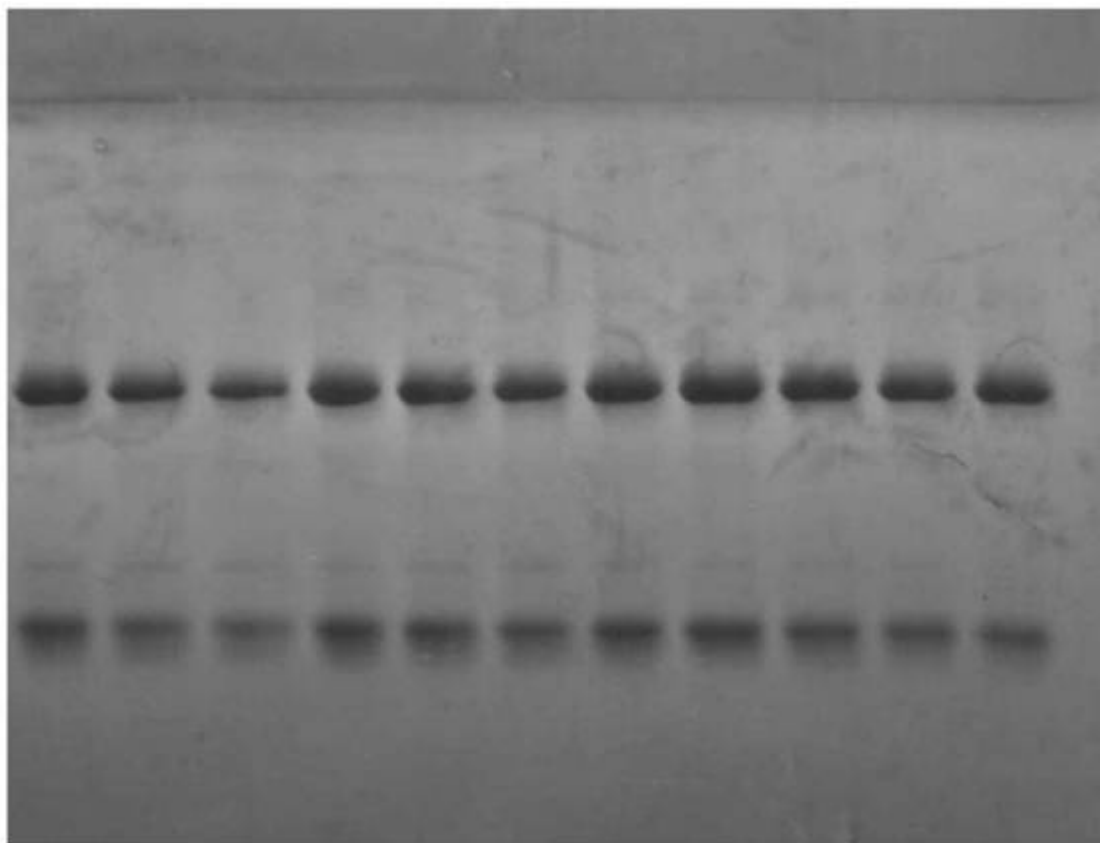


图1

专利名称(译)	杂交瘤细胞株及其制备方法和基于杂交瘤细胞株的乙肝表面抗原单克隆抗体及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110343695A	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201910429213.9	申请日	2019-05-22
[标]发明人	崔晓凤		
发明人	崔晓凤		
IPC分类号	C12N15/06 C12N5/20 C07K16/08 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/31		
CPC分类号	C07K16/082 C12N5/163 G01N21/31 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56983 G01N33/577 G01N2333/02 G01N2469/10		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种杂交瘤细胞株，所述杂交瘤细胞株能够分泌与乙肝表面抗原特异性结合的乙肝表面抗原单克隆抗体，所述杂交瘤细胞株保藏号为CGMCC No.17681、CGMCC No.17682。杂交瘤细胞株制备方法，包括如下步骤：免疫、测定血清效价、融合、细胞株筛选。上述杂交瘤细胞株或其传代细胞株分泌产生的乙肝表面抗原单克隆抗体及制备方法，其制备方法包括如下步骤：腹水生产；腹水过滤；腹水稀释；测OD后上样；平衡；洗脱并接样；吸光值上扬后换管接样；加入NaN₃；跑电泳、测活性；进行胶体金筛选。本发明提供的杂交瘤细胞株的制备方法获得的乙肝表面抗原单克隆抗体，产量高、稳定性好，成本低，胶体金检测应用中可提高检测灵敏度，快速准确检测大量临床样本。

