



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104829711 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201510161178. 9

G01N 33/569(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 04. 07

C12R 1/91(2006. 01)

(66) 本国优先权数据

201410138378. 8 2014. 04. 08 CN

(71) 申请人 北京天成新脉生物技术有限公司

地址 101111 北京市经济技术开发区科创
14 街 99 号 18-2-201

(72) 发明人 孙乐 李茂华 王慕旻 张翠娟

张小刚 陈兴 张萍萍

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

C07K 16/12(2006. 01)

C12N 5/20(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表7页 附图3页

(54) 发明名称

脑膜炎球菌荚膜多糖单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了脑膜炎球菌荚膜多糖单克隆抗体及其应用,分别提供了针对脑膜炎球菌 A、C、Y 和 W135 群多糖特异性的小鼠单克隆抗体,通过免疫小鼠和制备杂交瘤细胞获得。本发明提供的各型流脑多糖特异的单克隆抗体与其它型荚膜多糖无明显交叉反应,用于检测 A、C、Y 和 W135 群脑膜炎球菌具有高特异性、高敏感性的优点,可以准确检测样品中各型脑膜炎球菌或荚膜多糖的含量,在临床检测和疫苗生产过程中有广泛的应用前景。

1. 一种单克隆抗体,其特征在于,分别以 4 种脑膜炎球菌荚膜多糖为免疫原,免疫动物制备获得;

其中,4 种脑膜炎球菌荚膜多糖的血清型分别为 A、C、Y 和 W135 ;所述单克隆抗体分别特异性地识别 A、C、Y 或 W135 脑膜炎球菌病原体。

2. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体,其特征在于,

特异识别脑膜炎球菌 A 血清型多糖的单克隆抗体为 Clone6B7 和 Clone 6B12 ;所述单克隆抗体 Clone6B7 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 1 和 2 所示 ;所述单克隆抗体 Clone6B12 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 3 和 4 所示 ;

特异识别脑膜炎球菌 C 血清型多糖的单克隆抗体为 Clone2H4 和 Clone 5B3 ;所述单克隆抗体 Clone2H4 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 5 和 6 所示 ;所述单克隆抗体 Clone 5B3 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 7 和 8 所示 ;

特异识别脑膜炎球菌 W135 血清型多糖单克隆抗体为 Clone5F1 和 Clone4H8 ;所述单克隆抗体 Clone5F1 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 9 和 10 所示 ;所述单克隆抗体 Clone4H8 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 11 和 12 所示 ;

特异识别流脑膜炎球菌 Y 血清型多糖的单克隆抗体为 Clone7C6 和 Clone3A2 ;所述单克隆抗体 Clone7C6 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 13 和 14 所示 ;所述单克隆抗体 Clone3A2 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 15 和 16 所示。

3. 产生权利要求 1-2 任一项所述单克隆抗体的杂交瘤细胞。

4. 权利要求 1-2 任一项所述单克隆抗体在制备脑膜炎球菌检测试剂盒中的应用。

5. 含有权利要求 1-2 任一项所述单克隆抗体的药物。

6. 含有权利要求 1-2 任一项所述单克隆抗体的检测试剂盒。

7. 如权利要求 6 所述的检测试剂盒,其为 ELISA 检测试剂盒,其以特异性地识别脑膜炎球菌 A 血清型多糖的一种单克隆抗体为包被抗体,以酶标记的异性地识别脑膜炎球菌 A 血清型多糖的另一种单克隆抗体作为检测抗体,所述单克隆抗体为 Clone6B7 或 Clone 6B12。

8. 如权利要求 6 所述的检测试剂盒,其为 ELISA 检测试剂盒,其以特异性地识别脑膜炎球菌 C 血清型多糖的一种单克隆抗体为包被抗体,以酶标记的异性地识别脑膜炎球菌 C 血清型多糖的另一种单克隆抗体作为检测抗体,所述单克隆抗体为 Clone2H4 和 Clone 5B3。

9. 如权利要求 6 所述的检测试剂盒,其为 ELISA 检测试剂盒,其以特异性地识别脑膜炎球菌 W135 血清型多糖的一种单克隆抗体为包被抗体,以酶标记的异性地识别脑膜炎球菌 W135 血清型多糖的另一种单克隆抗体作为检测抗体,所述单克隆抗体为 Clone5F1 和 Clone4H8。

10. 如权利要求 6 所述的检测试剂盒,其为 ELISA 检测试剂盒,其以特异性地识别脑膜炎球菌 Y 血清型多糖的一种单克隆抗体为包被抗体,以酶标记的异性地识别脑膜炎球菌 Y 血清型多糖的另一种单克隆抗体作为检测抗体,所述单克隆抗体为 Clone7C6 和 Clone3A2。

脑膜炎球菌荚膜多糖单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及杂交瘤细胞系及其产生的单克隆抗体与应用,特别是涉及针对脑膜炎双球菌 A、C、W135、Y 血清型的四种荚膜多糖的单克隆抗体和分泌该抗体的杂交瘤细胞系以及含有该抗体的试剂盒的应用。

背景技术

[0002] 流行性脑脊髓膜炎(流脑)已发现 100 余年,至今仍在不少国家流行,也是我国冬、春季比较常见的急性呼吸道传染病。该病是由脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)引起的脑膜炎。据统计,每年的 2~4 月,“流脑”的发病率占全年的 60% 左右。病人主要是 15 岁以下的少年儿童,特别是 6 个月至 2 岁的婴幼儿容易感染。其特点是起病急、病情重、变化多、传播快、流行广、来势凶猛、病死率高、危害性大,所以必须切实做好预防工作。

[0003] 脑膜炎双球菌属奈瑟氏菌属,革兰氏染色阴性,肾形,多成对排列,或四个相联。根据本菌的荚膜多糖抗原的不同,通过血凝试验将本菌分为 A、B、C、D、X(1916)、Y(1889)、Z、W135(319)、29E(1892)、H、I、K 和 L13 个血清群。以 A、B、C 群为多见。脑膜炎双球菌细菌素(meningocin)又可将 A 群分为 4 型,C 群分为 6 型;B 群分为 11 型,其中 B 群 2 型致病力最强。根据其脂多糖(CPS)将脑膜双球菌分为 8 个 LPS 免疫型,与致病关系尚不清楚。

[0004] 近 20 年来欧美一些国家的流行菌群已由 A 群转变为 B 群和 C 群;我国的流行菌群主要是 A 群,B 群仅占少数。但带菌者以 B、C 群为主,今后是否会成为主要流行菌群,有待于密切观察。

[0005] 脑膜炎双球菌是不断变迁的,在脑膜炎球菌的 13 个血清群中,A 群 B 群 C 群 Y 群和 W135 群引起的病例可达 95%,无论是成人或儿童,对 W135 群流脑普遍易感。四价多糖疫苗针对的是包括奈瑟脑膜炎球菌 A、C、W135、Y 的 4 个血清群,具有保护率高(85%~95%)、反应率低(无全身反应和发热反应)及免疫有效期长(约 2~3 年)的三大优点。

[0006] 目前在国内外尚未见到快速有效特异检测脑膜炎球菌荚膜多糖的 ELISA 试剂盒的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供脑膜炎球菌 A、C、Y、W135 群荚膜多糖(血清型)的单克隆抗体、产生该抗体的杂交瘤细胞系以及单克隆抗体的应用。

[0008] 本发明提供一种单克隆抗体,分别以 4 种脑膜炎球菌荚膜多糖为免疫原,免疫动物制备获得;

[0009] 其中,4 种脑膜炎球菌荚膜多糖的血清型分别为 A、C、Y 和 W135;所述单克隆抗体特异性地识别 A、C、Y 和 W135 脑膜炎球菌病原体。

[0010] 所述载体蛋白为白喉毒素 CRM197 蛋白或破伤风类毒素 TT 蛋白。

[0011] 本发明制备单克隆抗体过程中,免疫使用的动物为小鼠。

[0012] 本发明提供了 8 种单克隆抗体,分别是脑膜炎球菌 A、C、Y、W135 群多糖的单克隆抗体。

[0013] 具体地说是分别以脑膜炎球菌结合疫苗中的 A、C、Y、W135 荚膜多糖为免疫原免疫小鼠,采用杂交瘤技术经过细胞融合并筛选得到能持续、稳定分泌 A、C、Y 或 W135 群脑膜炎球菌多糖的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,由各细胞株分泌得到 8 种单克隆抗体。

[0014] 本发明提供的单克隆抗体能特异识别脑膜炎球菌 A 血清型多糖的单克隆抗体为 Clone6B7 和 Clone 6B12 ;特异识别脑膜炎球菌 C 血清型多糖的单克隆抗体为 Clone2H4 和 Clone 5B3 ;特异识别脑膜炎球菌 W135 血清型多糖单克隆抗体为 Clone5F1 和 Clone4H8 ;特异识别脑膜炎球菌 Y 血清型多糖的单克隆抗体为 Clone7C6 和 Clone3A2 ;

[0015] 所述单克隆抗体 Clone6B7 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 1 和 2 所示 ;

[0016] 所述单克隆抗体 Clone6B12 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 3 和 4 所示 ;

[0017] 所述单克隆抗体 Clone2H4 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 5 和 6 所示 ;

[0018] 所述单克隆抗体 Clone 5B3 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 7 和 8 所示 ;

[0019] 所述单克隆抗体 Clone5F1 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 9 和 10 所示 ;

[0020] 所述单克隆抗体 Clone4H8 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 11 和 12 所示 ;

[0021] 所述单克隆抗体 Clone7C6 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 13 和 14 所示 ;

[0022] 所述单克隆抗体 Clone3A2 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 15 和 16 所示。

[0023] 本发明提供了能稳定分泌上述单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0024] 本发明针对每种血清型各自获得的单克隆抗体具有良好的特异性,实验表明,每种血清型的单克隆抗体与其它 3 种血清型的脑膜炎球菌荚膜多糖抗原没有显著的交叉反应,间接 ELISA 表明这些抗体具有较高的效价,因此可用于 A、C、Y、W135 群脑膜炎球菌荚膜多糖的检测。可以采用双抗夹心法,分别利用两个单克隆抗体对各型荚膜多糖进行检测。

[0025] 本发明提供了上述 8 种单克隆抗体中任一种单克隆抗体在制备脑膜炎球菌检测试剂盒中的应用。

[0026] 本发明提供了上述 8 种单克隆抗体中任一种单克隆抗体在制备脑膜炎球菌荚膜多糖 A、C、Y 或 W135 抗体检测试剂盒中的应用。

[0027] 含有上述任一种或多种单克隆抗体的药物属于本发明的保护范围。

[0028] 本发明提供了上述 8 种单克隆抗体任一种或多种单克隆抗体在制备脑膜炎球菌预防性药物中的应用。

[0029] 本发明提供了含有上述任一种或多种单克隆抗体的检测试剂盒。

[0030] 本发明提供一种用于脑膜炎荚膜多糖检测的试剂盒。

[0031] 本发明提供的检测试剂盒,其为 ELISA 检测试剂盒,其以特异性地识别脑膜炎球菌 A 血清型多糖的一种单克隆抗体为包被抗体,以酶标记的异性地识别脑膜炎球菌 A 血清型多糖的另一种单克隆抗体作为检测抗体,所述单克隆抗体为 Clone6B7 或 Clone 6B12。

[0032] 本发明提供的检测试剂盒,其为 ELISA 检测试剂盒,其以特异性地识别脑膜炎球菌 C 血清型多糖的一种单克隆抗体为包被抗体,以酶标记的异性地识别脑膜炎球菌 C 血清型多糖的另一种单克隆抗体作为检测抗体,所述单克隆抗体为 Clone2H4 和 Clone 5B3。

[0033] 本发明提供的检测试剂盒,其为 ELISA 检测试剂盒,其以特异性地识别脑膜炎球菌 W135 血清型多糖的一种单克隆抗体为包被抗体,以酶标记的异性地识别脑膜炎球菌 W135 血清型多糖的另一种单克隆抗体作为检测抗体,所述单克隆抗体为 Clone5F1 和 Clone4H8。

[0034] 本发明提供的检测试剂盒,其为 ELISA 检测试剂盒,其以特异性地识别脑膜炎球菌 Y 血清型多糖的一种单克隆抗体为包被抗体,以酶标记的异性地识别脑膜炎球菌 Y 血清型多糖的另一种单克隆抗体作为检测抗体,所述单克隆抗体为 Clone7C6 和 Clone3A2。

[0035] 本发明提供了上述单克隆抗体在制备检测 4 种脑膜炎球菌荚膜多糖试剂盒中的应用,所述 4 种脑膜炎球菌荚膜多糖的血清型分别为 A、C、Y 和 W135。

[0036] 本发明提供的各型荚膜多糖特异的单克隆抗体分别与其它 ACYW135 群脑膜炎球菌型荚膜多糖无明显交叉反应,用于检测 A、C、Y、W135 群脑膜炎球菌荚膜多糖具有高特异性、高敏感性的优点,可以准确检测样品中各型多糖组分的水平,广泛应用于临床检测和疫苗厂家生产疫苗过程中的质检。

附图说明

[0037] 图 1 是抗体的 SDS-PAGE 电泳图,其中 M 是蛋白分子量标准 (kDa),本发明获得的 8 种单克隆抗体,泳道 1-9 分别为 BSA6B7、6B12、2H4、5B3、5F1、4H8、7C6、3A2 单抗。

[0038] 图 2 所示的是脑膜炎球菌 A 多糖 ELISA 法灵敏度实验的拟合曲线。

[0039] 图 3 所示的是脑膜炎球菌 C 多糖 ELISA 法灵敏度实验的拟合曲线。

[0040] 图 4 所示的是脑膜炎球菌 W135 多糖 ELISA 法灵敏度实验的拟合曲线。

[0041] 图 5 所示的是脑膜炎球菌 Y 多糖 ELISA 法灵敏度实验的拟合曲线。

[0042] 具体实施方法

[0043] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0044] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0045] 实施例 1、杂交瘤细胞系的建立

[0046] 一、实验材料

[0047] 1、免疫原:分别以 A、C、Y、W135 群脑膜炎球菌的荚膜多糖为免疫原(购自天津康希诺生物技术有限公司)。

[0048] 2、培养基:DMEM 培养基购于 Hyclone 公司;HAT、HT 选择培养基、降植烷购于 sigma 公司。

[0049] 3、实验动物:Balb/c 小鼠,8-12 周龄,雌性,SPF 级动物培养。

[0050] 4、其他材料：弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购于 Sigma 公司；PEG4000 购于 Fluka 公司；HRP- 山羊抗小鼠 IgG 抗体购于 JacksonImmune 公司；其余试剂均为国产分析纯产品。

[0051] 二、杂交瘤细胞系的建立

[0052] 1、动物免疫

[0053] 1) 基础免疫：将免疫原与弗氏完全佐剂等体积混合并充分乳化，分点皮下注射，每只 Balb/c 小鼠每次注射量为 100 μ g。

[0054] 2) 加强免疫：加强免疫采用抗原与弗氏不完全佐剂的乳化液。在进行细胞融合前 3 天，经腹腔注射含 150 μ g 抗原的生理盐水溶液。

[0055] 2、杂交瘤细胞的制备

[0056] 按常规方法收集小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞按 10:1 的比例以 500g/L 的 PEG4000 进行融合。用 HAT 培养液选择培养，融合后 10 ~ 15 天，取上清采用间接 ELISA 法筛选分泌抗每种多糖型和载体蛋白的杂交瘤细胞株。对所得阳性克隆株采用有限稀释法进行亚克隆。间接 ELISA 法的操作步骤如下：用 200 μ l 的各型多糖和多糖载体蛋白分别包板，用免疫小鼠血清 1:2000 作为阳性对照，无克隆生长的培养基上清和正常小鼠血清作为阴性对照，每孔加 1:2000HRP- 山羊抗小鼠 IgG 100 μ l，最后测定 450nm OD 值。凡 OD450 值大于阴性对照 2 倍以上者，即可初步判定为阳性克隆。

[0057] 3、杂交瘤细胞系的建立

[0058] 重复步骤 2，进行 2 次细胞融合，经过 4 次亚克隆和间接 ELISA 筛选，得到 8 株分别针对各型多糖的，稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

[0059] 4、应用上述杂交瘤细胞系所得单抗的效价检测

[0060] 1) 细胞培养液上清效价测定：间接 ELISA 法检测上述杂交瘤细胞培养上清效价为：1:50000-1:100000。

[0061] 2) 小鼠腹水效价测定：间接 ELISA 法检测上述杂交瘤细胞制备的腹水效价为：1:500000-1:1000000。

[0062] 5、杂交瘤细胞系的传代培养

[0063] 将上述杂交瘤细胞系在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中继续进行培养、传代，培养到 10 代后，杂交瘤细胞系仍然能够生长良好、稳定传代，培养液上清效价仍然可以达到 1:10000 以上。

[0064] 以上结果表明，所得杂交瘤细胞系分别能够稳定传代，可以持续、稳定分泌抗 A、C、Y、W135 群脑膜炎球菌荚膜多糖和载体蛋白的单克隆抗体。

[0065] 实施例 2 抗 ACYW135 群脑膜炎球菌荚膜多糖和载体蛋白的单克隆抗体的制备

[0066] 一、抗体制备

[0067] 以下抗体制备是分别针对能够分泌抗 A、C、Y、W135 的单克隆抗体的杂交瘤细胞进行抗体制备的。

[0068] 选择成年 BALB/c 小鼠，腹腔接种降植烷，每只小鼠 0.5ml。7-10 天后腹腔接种第 16 代杂交瘤细胞（分别接种能够分泌抗 A、C、Y、W135 的单克隆抗体的杂交瘤细胞），每只小鼠 1×10^6 - 2×10^6 个。间隔 5 天后，待腹部明显膨大，以手触摸时，皮肤有紧张感，即可用 9 号针头采集腹水。

[0069] 将腹水离心 (13000r/min 30 分钟), 除去细胞成分和其他的沉淀物, 收集上清。用 Protein G ~ Sepharose CL-4B 进行纯化, 上柱液为 20mM 的 PBS 缓冲液, 柱层析洗脱液为: pH2. 7, 20mM 的甘氨酸缓冲液, 得到分别抗 ACYW135 群脑膜炎球菌荚膜多糖和抗载体蛋白的单克隆抗体。

[0070] 二抗体的鉴定

[0071] 1、抗体纯度鉴定:

[0072] SDS-PAGE 电泳鉴定, 纯度在 95% 以上。(图 1)

[0073] 2、抗体浊度检测:

[0074] 将一定比例的抗原, 抗体和乳胶颗粒结合物混在一起, 37°C 反应 5 - 30 分钟后用 HITACHI 7180 生化分析仪分析。(表 1)

[0075]

A 群单抗		单抗浓度						
(mg/ml)	(ug/ml)							
6B7 (2.193)	438.6	标品浓度 (ug/ml)	1.56	3.12	6.25	12.5	25	
		浊度值	1.66	7.85	24.67	94.37	250.11	
C 群单抗								
2H4 (2.67)	297	标品浓度 (ug/ml)	2.5	5	7.5	10		
		浊度值	5.95	25.67	51.54	78.17		
Y 群单抗								
7c6 (2.26)	753.3	标品浓度 (ug/ml)	2.5	5	7.5	10	12.5	
		浊度值	4.57	11.69	18.81	29.25	33.17	
W 群单抗								
5F1	3 倍稀释	标品浓度 (ug/ml)	4.33	8.66	14.4	21.7		
		浊度值	13.32	17.2	23.6	23.78		

[0076] 3、特异识别脑膜炎球菌 A 多糖的单克隆抗体 Clone6B7 和 Clone 6B12 ;特异识别脑膜炎球菌 C 多糖的单克隆抗体 Clone2H4 和 Clone 5B3 ;特异识别流脑膜炎球菌 W135 多糖单克隆抗体 Clone5F1 和 Clone4H8 ;特异识别流脑膜炎球菌 Y 多糖的单克隆抗 Clone7C6 和 Clone3A2 的可变区序列测定

[0077] 将获得的 8 株单克隆细胞分别提取 mRNA, 反转录为 cDNA, 使用可变区通用引物进行高保真 PCR 扩增, 将 PCR 产物片段插入到 T 载体内进行 DNA 序列测定, 并将获得的序列翻译成蛋白质的氨基酸序列。将获得的序列进行比对后未显示有相同序列, 说明所获得的序列为特异的序列。

[0078] 单克隆抗体 Clone6B7 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 1 和 2 所示;

[0079] 所述单克隆抗体 Clone6B12 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 3 和 4 所示;

[0080] 所述单克隆抗体 Clone2H4 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 5 和 6 所示;

[0081] 所述单克隆抗体 Clone 5B3 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 7 和 8 所示；

[0082] 所述单克隆抗体 Clone5F1 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 9 和 10 所示；

[0083] 所述单克隆抗体 Clone4H8 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 11 和 12 所示；

[0084] 所述单克隆抗体 Clone7C6 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 13 和 14 所示；

[0085] 所述单克隆抗体 Clone3A2 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID No. 15 和 16 所示。

[0086] 实施例 3 应用纯化抗体制备 ACYW135 群脑膜炎球菌荚膜多糖检测试剂

[0087] 一、脑膜炎球菌 A 多糖 ELISA 双抗体夹心法识别脑膜炎球菌 A 多糖的单克隆抗体 Clone6B7 和 Clone 6B12。

[0088] 应用 clone 6B7 和 Clone6B12 抗体做配对实验,确定以 clone 6B12 为包被抗体,用 HRP 标记 Clone 6B7 作为检测抗体,确定了 ELISA 检测方法,试剂盒检测灵敏度可达 0.008ng/mL(图 3)。采用改良过碘酸钠法标记抗体。

[0089] 表 2ELISA 法检测脑膜炎球菌多糖 A 的检测结果

[0090]

试验组	1	2	3	4	5	6	7	8	9
脑膜炎球菌 A 多糖浓度 ng/ml	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.01562	0.007813	阴性对照	空白对照
OD ₄₅₀ ±SD	1.69±0.009	1.36±0.089	1.069±0.050	0.834±0.005	0.669±0.054	0.523±0.014	0.426±0.012	0.089±0.009	0.035±0.003

[0091] 检测方法:包被抗体 clone 6B12 用 pH 9.60.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 10 μg/mL,在酶标板的每孔加 100 μL,4℃下包被过夜,倾去包被液,用 PBST 洗涤 2 次,拍干,然后在每孔中加入 200 μL 3%的小牛血清白蛋白(BSA),放入 37℃恒温箱中封闭 2 小时后,用 PBS 洗涤 1 次,加入 10%的蔗糖水溶液,室温保护 1 小时,拍干后经干燥后装铝箔袋抽真空后 4℃保存。用辣根过氧化物酶标记 clone 6B7 的抗体,得 6B7-HRP 并保存。向酶标板中分别加入脑膜炎球菌 A 多糖梯度稀释液 100 μL/孔,37℃孵育 1.5 小时,经洗板后再加入 6B7-HRP(0.5ug/ml)100 μL/,37℃孵育 1 小时,经洗涤拍干后加入显色剂 A、B 各 50 μL/孔进行显色,37℃温育 10min,加入终止液 50 μL/孔,用酶标仪 450nm 波长进行读数。

[0092] 其中显色剂 A 液配方为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g,10.3g 柠檬酸,35.8g Na₂HPO₄·12H₂O,吐温-20100 μL, pH5 ;B 液配方为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺(TMB)700mg(40mL DMSO 溶解),10.3g 柠檬酸,pH2.4。试剂盒特异性试验:用上述建立的方法进行多糖其它型的样品检测,结果表明,该试剂检测脑膜炎球菌多糖 A 信号良好,而与其它型多糖无交叉。结果见表 2

[0093] 二、脑膜炎球菌 C 多糖 ELISA 双抗体夹心法识别脑膜炎球菌 C 多糖的单克隆抗体 Clone2H4 和 Clone 5B3

[0094] 应用 clone 2H4 和 Clone5B3 抗体做配对实验,确定以 clone 2H4 为包被抗体,用

HRP 标记 Clone 5B3 作为检测抗体,确定了 ELISA 检测方法,试剂盒检测灵敏度可达 6ng/mL(图 4)。采用改良过碘酸钠法标记抗体。

[0095] 表 3ELISA 法检测脑膜炎球菌多糖 C 的检测结果

[0096]

试验组	1	2	3	4	5	6	7	8	9
脑膜炎球菌 C 多糖浓度 ng/ml	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	阴性对照	空白对照
OD ₄₅₀ ±SD	2.08±0.009	1.4±0.089	0.883±0.050	0.572±0.005	0.337±0.054	0.191±0.014	0.148±0.012	0.089±0.009	0.035±0.003

[0097] 检测方法:包被抗体 clone 2H4 用 pH 9.60.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 10 μg/mL,在酶标板的每孔加 100 μL,4℃下包被过夜,倾去包被液,用 PBST 洗涤 2 次,拍干,然后在每孔中加入 200 μL 3%的小牛血清白蛋白(BSA),放入 37℃恒温箱中封闭 2 小时后,用 PBS 洗涤 1 次,加入 10%的蔗糖水溶液,室温保护 1 小时,拍干后经干燥后装铝箔袋抽真空后 4℃保存。用辣根过氧化物酶标记 clone 5B3 的抗体,得 5B3-HRP 并保存。向酶标板中分别加入脑膜炎球菌 C 多糖梯度稀释液 100 μL/孔,37℃孵育 1.5 小时,经洗板后再加入 5B3-HRP(0.5ug/ml)100 μL/,37℃孵育 1 小时,经洗涤拍干后加入显色剂 A、B 各 50 μL/孔进行显色,37℃温育 10min,加入终止液 50 μL/孔,用酶标仪 450nm 波长进行读数。

[0098] 其中显色剂 A 液配方为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g,10.3g 柠檬酸,35.8g Na₂HPO₄·12H₂O,吐温-20100 μL, pH5;B 液配方为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺(TMB)700mg(40mL DMSO 溶解),10.3g 柠檬酸,pH2.4。试剂盒特异性试验:用上述建立的方法进行多糖其它型的样品检测,结果表明,该试剂检测脑膜炎球菌多糖 C 信号良好,而与其它型多糖无交叉。

[0099] 三、脑膜炎球菌 W135 多糖 ELISA 双抗体夹心法识别脑膜炎球菌 W135 多糖的单克隆抗体 Clone5F1 和 Clone 4H8

[0100] 应用 clone 5F1 和 Clone4H8 抗体做配对实验,确定以 clone 5F1 为包被抗体,用 HRP 标记 Clone 4H8 作为检测抗体,确定了 ELISA 检测方法,试剂盒检测灵敏度可达 0.008ng/mL(图 5)。采用改良过碘酸钠法标记抗体。

[0101] 表 4ELISA 法检测脑膜炎球菌多糖 W135 的检测结果

[0102]

试验组	1	2	3	4	5	6	7	8	9
脑膜炎球菌 W135 多糖浓度 ng/ml	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.01562	0.007813	阴性对照	空白对照
OD ₄₅₀ ±SD	2.103±0.009	2.09±0.089	1.581±0.050	1.064±0.005	0.754±0.054	0.399±0.014	0.216±0.012	0.089±0.009	0.035±0.003

[0103] 检测方法:包被抗体 clone 5F1 用 pH 9.60.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 10 μg/mL,在酶标板的每孔加 100 μL,4℃下包被过夜,倾去包被液,用 PBST 洗涤 2 次,拍干,然后在每孔中加入 200 μL 3%的小牛血清白蛋白(BSA),放入 37℃恒温箱中封闭 2 小时后,用 PBS 洗涤 1 次,加入 10%的蔗糖水溶液,室温保护 1 小时,拍干后经干燥后装铝箔袋抽真空后 4℃保存。用辣根过氧化物酶标记 clone 4H8 的抗体,得 4H8-HRP 并保存。向酶标板中分别加入脑膜炎球菌 W135 多糖梯度稀释液 100 μL/孔,37℃孵育 1.5 小时,经洗板后再加

入 4H8-HRP (0.5ug/ml) 100 μ L/, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 经洗涤拍干后加入显色剂 A、B 各 50 μ L/ 孔进行显色, 37 $^{\circ}$ C 温育 10min, 加入终止液 50 μ L/ 孔, 用酶标仪 450nm 波长进行读数。

[0104] 其中显色剂 A 液配方为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 吐温 -20 100 μ L, pH5 ;B 液配方为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺 (TMB) 700mg (40mL DMSO 溶解), 10.3g 柠檬酸, pH2.4。试剂盒特异性试验 :用上述建立的方法进行多糖其它型的样品检测, 结果表明, 该试剂检测脑膜炎球菌多糖 W135 信号良好, 而与其它型多糖无交叉。

[0105] 四、脑膜炎球菌 Y 多糖 ELISA 双抗体夹心法识别脑膜炎球菌 Y 多糖的单克隆抗体 Clone7C6 和 Clone 3A2

[0106] 应用 clone 7C6 和 Clone3A2 抗体做配对实验, 确定以 clone 7C6 为包被抗体, 用 HRP 标记 Clone 3A2 作为检测抗体, 确定了 ELISA 检测方法, 试剂盒检测灵敏度可达 0.008ng/mL (图 5)。采用改良过碘酸钠法标记抗体。

[0107] 表 5 ELISA 法检测脑膜炎球菌多糖 Y 的检测结果

[0108]

试验组	1	2	3	4	5	6	7	8	9
脑膜炎球菌 Y 多糖浓度 ng/ml	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.01562	0.007813	阴性对照	空白对照
OD ₄₅₀ \pm SD	2.028 \pm 0.009	1.538 \pm 0.089	0.971 \pm 0.050	0.614 \pm 0.005	0.388 \pm 0.054	0.237 \pm 0.014	0.143 \pm 0.012	0.089 \pm 0.009	0.035 \pm 0.003

[0109] 检测方法 :包被抗体 clone 7C6 用 pH 9.60.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 10 μ g/mL, 在酶标板的每孔加 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜, 倾去包被液, 用 PBST 洗涤 2 次, 拍干, 然后在每孔中加入 200 μ L 3% 的小牛血清白蛋白 (BSA), 放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中封闭 2 小时后, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 10% 的蔗糖水溶液, 室温保护 1 小时, 拍干后经干燥后装铝箔袋抽真空后 4 $^{\circ}$ C 保存。用辣根过氧化物酶标记 clone 3A2 的抗体, 得 3A2-HRP 并保存。向酶标板中分别加入脑膜炎球菌 Y 多糖梯度稀释液 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 小时, 经洗板后再加入 3A2-HRP (0.5ug/ml) 100 μ L/, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 经洗涤拍干后加入显色剂 A、B 各 50 μ L/ 孔进行显色, 37 $^{\circ}$ C 温育 10min, 加入终止液 50 μ L/ 孔, 用酶标仪 450nm 波长进行读数。

[0110] 其中显色剂 A 液配方为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 吐温 -20 100 μ L, pH5 ;B 液配方为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺 (TMB) 700mg (40mL DMSO 溶解), 10.3g 柠檬酸, pH2.4。试剂盒特异性试验 :用上述建立的方法进行多糖其它型的样品检测, 结果表明, 该试剂检测脑膜炎球菌多糖 Y 信号良好, 而与其它型多糖无交叉。

[0111] 表 6 ELISA 法检测 ACYW135 群脑膜炎球菌多糖 Y 型试剂特异性评价结果

[0112]

检测样品名称	样品（糖浓度为 1 μ g/ml）检测结果 (OD450 \pm SD)
A	0.056 \pm 0.001
C	0.064 \pm 0.008
W	0.049 \pm 0.004
Y	2.237\pm0.145

[0113] 表 7 单克隆抗体的特异性检测

[0114]

克隆	6B7	6B12	2H4	5B3	5F1	4H8	7C6	3A2
A 多糖	3.489	3.409	0.079	0.048	0.043	0.046	0.12	0.065
C 多糖	0.074	0.106	3.203	>3	0.049	0.091	0.086	0.184
W135 多糖	0.143	0.159	0.062	0.155	2.921	2.943	0.073	0.078
Y 多糖	0.051	0.072	0.059	0.051	0.051	0.164	3.237	3.059

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Clone 6B12 轻链可变区
 <400> 3
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Pro Ser Trp Arg Ser Asn
 100 105 110

<210> 4
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Clone 6B12 重链可变区
 <400> 4
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 20 25 30
 Ile Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Gly Met Ile Phe Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Clone2H4 轻链可变区
 <400> 5
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Tyr Val Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Glu Ser Val Tyr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

[0003]

100 105 110

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> clone5B3 重链可变区
 <400> 8
 Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Lys Gly Ser Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Clone5F1 轻链可变区
 <400> 9
 His Ser Ala Asp Pro Val Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Asn Asn Gly Ile
 20 25 30
 Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Pro Lys Pro Gly Gln Ser His His Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Pro Met Ser Asn Leu Ala Ser Arg Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Arg Ser Asn Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Leu
 65 70 75 80
 Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Gln Leu
 85 90 95
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Clone5F1 重链可变区
 <400> 10
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
 1 5 10 15

[0005]

Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly
 20 25 30
 Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Val Leu Glu Trp Leu Gly
 35 40 45
 Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
 50 55 60
 Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 65 70 75 80
 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser
 85 90 95
 Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 11
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Clone4H8 轻链可变区
 <400> 11

Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys
 1 5 10 15
 Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg
 35 40 45
 Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe
 50 55 60
 Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Cys Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro
 85 90 95
 Ser Trp Arg Ser Asn
 100

<210> 12
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Clone4H8 重链可变区
 <400> 12

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg
 20 25 30
 Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Leu Lys
 35 40 45
 Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe
 50 55 60
 Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Ser
 85 90 95

[0006]

Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 13
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Clone7C6 轻链可变区
 <400> 13

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Phe Met Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Tyr Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Gly Phe Ser Gly Arg Gly Ser Trp Thr Glu Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 His Met Glu Gly Glu Ile Leu Gln Cys Ile Ser Val Ser Lys Val Arg
 85 90 95
 Arg Phe Leu Val His Val Arg Arg Gly Asp Gln Ala Gly Asp Leu
 100 105 110

<210> 14
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Clone7C6 重链可变区
 <400> 14

Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Ser Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile Ala
 35 40 45
 Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
 50 55 60
 Gly Lys Ala Gln Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Arg Gly Gly Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Clone3A2 轻链可变区
 <400> 15

[0007]

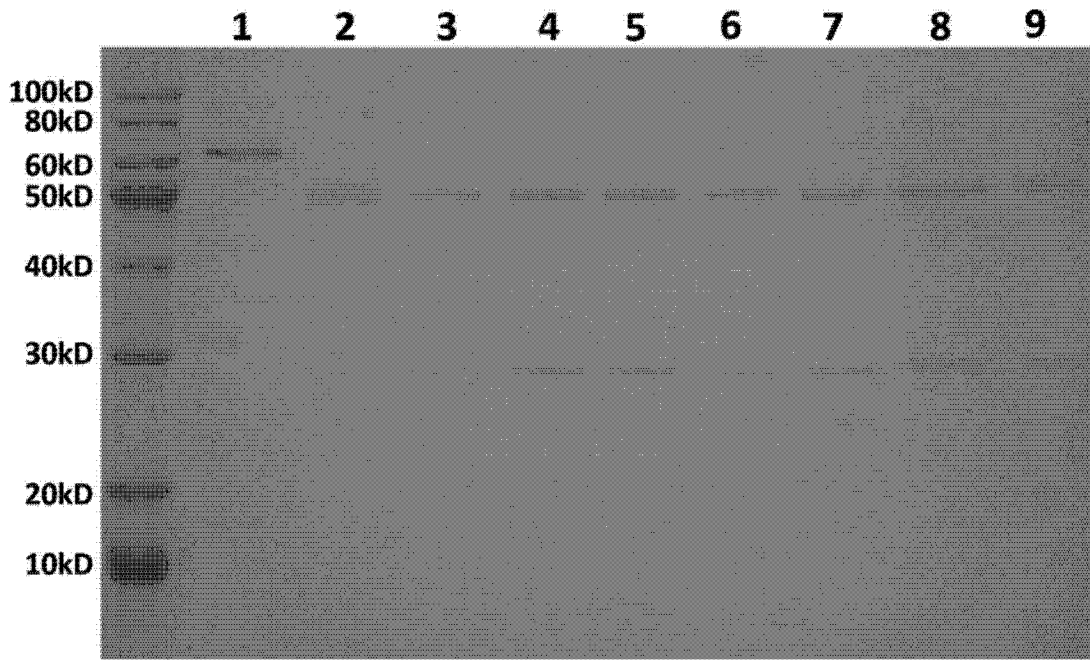


图 1

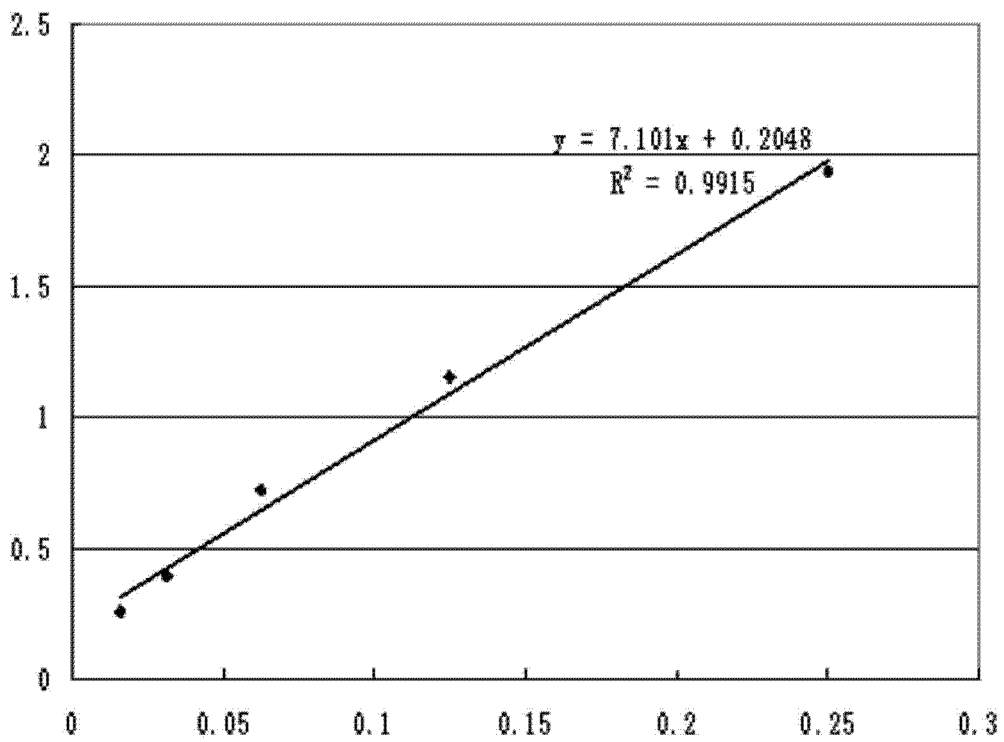


图 2

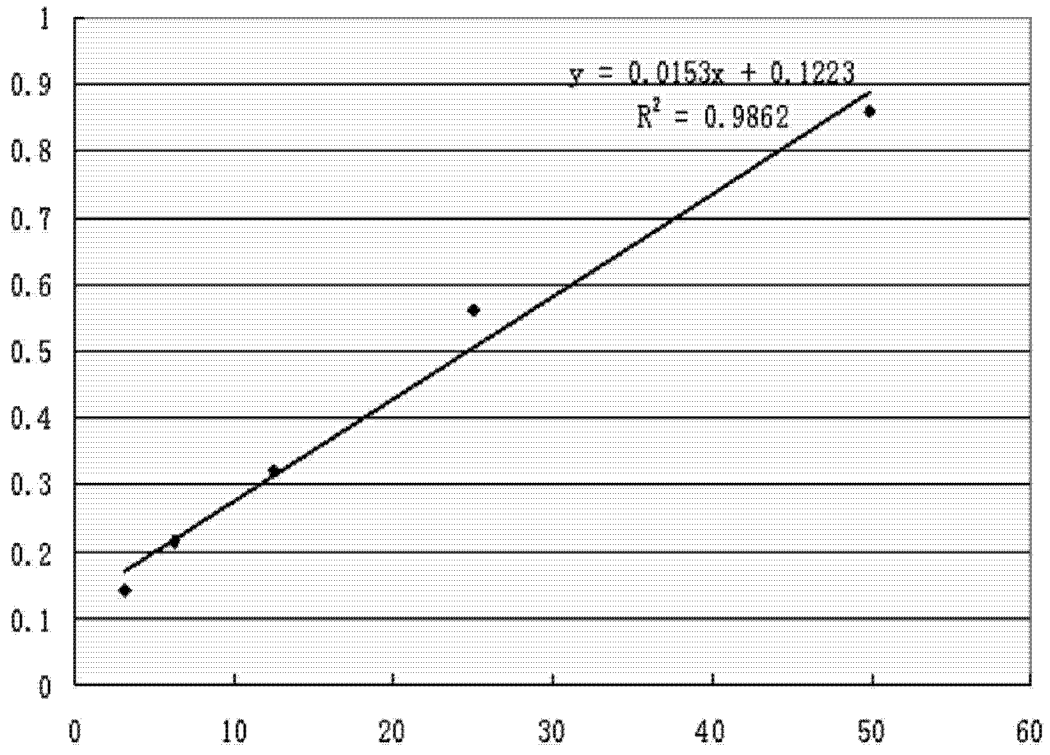


图 3

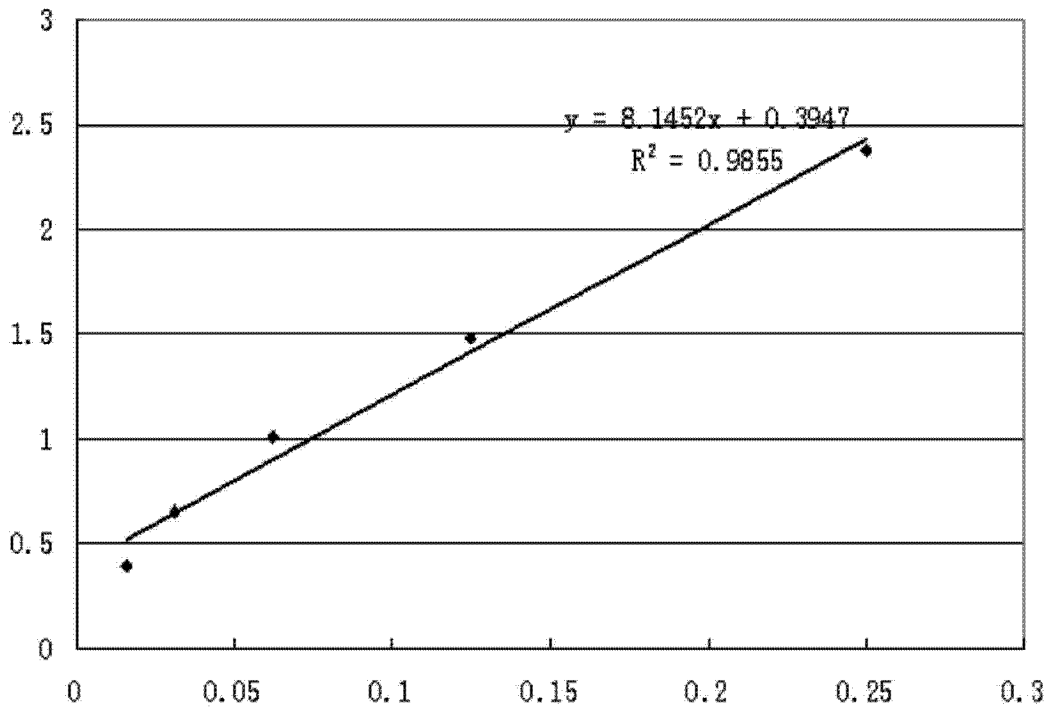


图 4

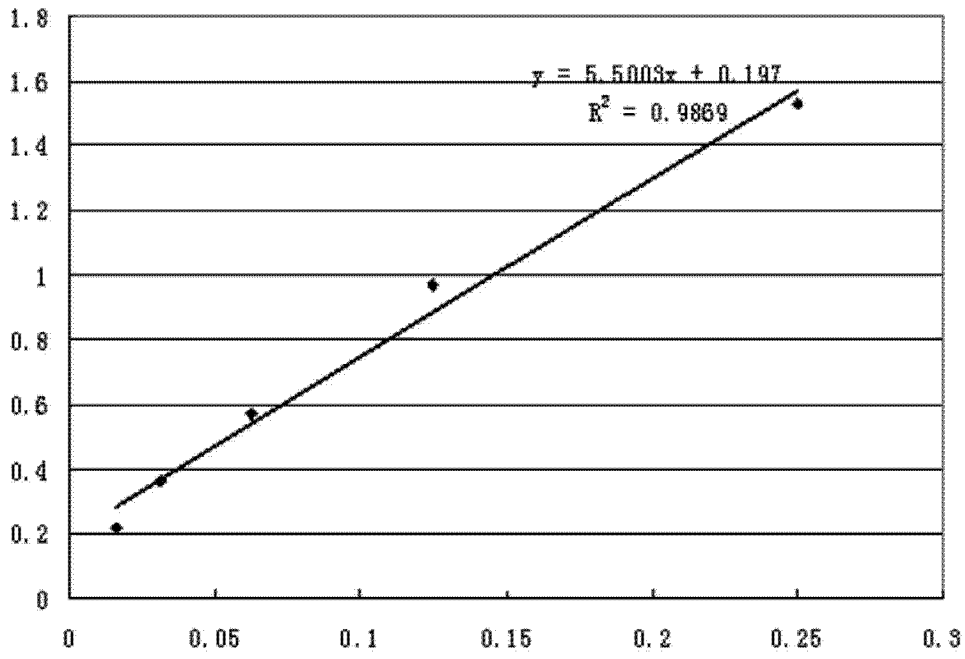


图 5

专利名称(译)	脑膜炎球菌荚膜多糖单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN104829711A	公开(公告)日	2015-08-12
申请号	CN201510161178.9	申请日	2015-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京天成新脉生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京天成新脉生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京天成新脉生物技术有限公司		
[标]发明人	孙乐 李茂华 王慕旸 张翠娟 张小刚 陈兴 张萍萍		
发明人	孙乐 李茂华 王慕旸 张翠娟 张小刚 陈兴 张萍萍		
IPC分类号	C07K16/12 C12N5/20 G01N33/577 G01N33/535 G01N33/569 C12R1/91		
代理人(译)	王文君		
优先权	201410138378.8 2014-04-08 CN		
其他公开文献	CN104829711B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了脑膜炎球菌荚膜多糖单克隆抗体及其应用，分别提供了针对脑膜炎球菌A、C、Y和W135群多糖特异性的小鼠单克隆抗体，通过免疫小鼠和制备杂交瘤细胞获得。本发明提供的各型流脑多糖特异的单克隆抗体与其它型荚膜多糖无明显交叉反应，用于检测A、C、Y和W135群脑膜炎球菌具有高特异性、高敏感性的优点，可以准确检测样品中各型脑膜炎球菌或荚膜多糖的含量，在临床检测和疫苗生产过程中有广泛的应用前景。

A 群单抗		单抗浓度						
(mg/ml)	(ug/ml)	标品浓度 (ug/ml)	1.56	3.12	6.25	12.5	25	
6B7 (2.193)	438.6	浊度值	1.66	7.85	24.67	94.37	250.11	
C 群单抗								
2H4 (2.67)	297	标品浓度 (ug/ml)	2.5	5	7.5	10		
		浊度值	5.95	25.67	51.54	78.17		
Y 群单抗								
7c6 (2.26)	753.3	标品浓度 (ug/ml)	2.5	5	7.5	10	12.5	
		浊度值	4.57	11.69	18.81	29.25	33.17	
W 群单抗								
5F1	3 倍稀释	标品浓度 (ug/ml)	4.33	8.66	14.4	21.7		
		浊度值	13.32	17.2	23.6	23.78		