



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106701688 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201710029162.1

(22)申请日 2017.01.16

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C201703 2016.12.27

(71)申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72)发明人 马良 钟红 张宇昊

(74)专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 赵荣之

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/14(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

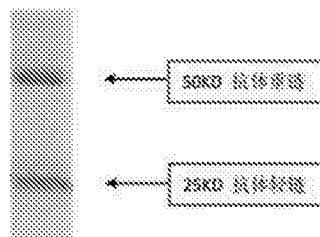
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

杂交瘤细胞株7G11及其抗体

(57)摘要

本发明涉及一种杂交瘤细胞株7G11及其抗体,杂交瘤细胞株7G11于2016年12月27日送中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号为CCTCC NO:C201703,该杂交瘤细胞株7G11能够产生抗细交链格孢菌酮酸的单克隆抗体,能够特异性检测细交链格孢菌酮酸,对细交链格孢菌酮酸检测具有重要意义。



1. 杂交瘤细胞株7G11,其特征在于:所述杂交瘤细胞株7G11的生物保藏编号为CCTCC NO:C201703。

2. 权利要求1所述杂交瘤细胞株7G11的制备方法,其特征在于:将半抗原TA0偶联血蓝蛋白免疫原与弗氏佐剂混合免疫小鼠,然后取效价大于1:10000的免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,融合后培养10天后进行ELISA检测,经筛选亚克隆获得杂交瘤细胞;所述半抗原TA0由羧甲基羟胺半盐酸盐对细交链格孢菌酮酸进行衍生后引入连接臂而得。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:融合中所述脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0数量比为1:20。

4. 由杂交瘤细胞株7G11产生的单克隆抗体,其特征在于:所述杂交瘤细胞株7G11的生物保藏编号为CCTCC NO:C201703。

5. 权利要求4所述单克隆抗体的制备方法,其特征在于:将杂交瘤细胞株7G11制备腹水,然后进行ProteinA纯化,得单克隆抗体。

6. 权利要求4所述单克隆抗体在制备检测细交链格孢菌酮酸的试剂中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:所述单克隆抗体在制备eIisa竞争法检测细交链格孢菌酮酸的试剂中的应用。

8. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:所述单克隆抗体在制备eIisa间接法检测细交链格孢菌酮酸的试剂中的应用。

杂交瘤细胞株7G11及其抗体

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及杂交瘤细胞株7G11,还涉及由该杂交瘤细胞株7G11产生的抗体。

背景技术

[0002] 细交链格孢菌酮酸(Tenuazonic acid,TA)是链格孢霉、稻瘟病菌、高粱点霉等在特定条件下产生的有毒代谢产物之一,是继交链孢酚(AlternarioI,AOH)、交链孢酚单甲醚(AlternarioI monomethyl ether,AME)后发现的一种链格孢霉毒素。TA具有急性毒性、亚急性毒性、潜在致癌性、细胞毒性,导致哺乳类动物头晕、流涎、呕吐继而出现心跳过速、食道和肠胃大面积出血及循环衰竭、死亡。由于TA具有多种生物学特性,且是链格孢霉毒素中毒性最大的一种,有研究报道TA可以协同增强其他真菌毒素,具有巨大的潜在危害,近些年越来越引起各方关注和研究。

[0003] TA人工抗原合成方法及多克隆抗体制备已有部分报道,如江涛等利用碳二亚胺法对TA结构进行修饰,与牛血清蛋白偶联制备人工抗原;马良等采用脲化法对TA进行衍生引入偶联臂,与牛血清蛋白和血蓝蛋白偶联,偶联物免疫BALB/c小鼠制备多克隆抗体;杨星星等利用水合肼和乙醛酸依次对TA进行衍生,合成含氮杂共轭双键偶联臂,与牛血清蛋白进行偶联得到完全抗原,通过免疫新西兰大白兔制备特异性识别TA衍生物的多克隆抗体,并建立ELISA检测方法。

[0004] 多克隆抗体制备时间短、制备成本低,但在特异性方面比单克隆抗体差,不同批次和不同动物的免疫反应之间的有差别。单克隆抗体特异性高,一旦筛选到目标细胞株,理论上就可以生产完全一致的抗体,并且通过连续培养法可以获得大量的性能一致的抗体,产品的批间差异小。目前关于TA单克隆抗体的制备及其产品开发目前处于空白阶段,尚无任何报道。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种杂交瘤细胞株7G11;本发明的目的之二在于提供杂交瘤细胞株7G11的制备方法;本发明的目的之三在于提供由杂交瘤细胞株7G11产生的单克隆抗体;本发明的目的之四在于提供上述单克隆抗体的制备方法;本发明的目的之五在于提供单克隆抗体的应用。

[0006] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 1、杂交瘤细胞株7G11,所述杂交瘤细胞株7G11的生物保藏编号为CCTCC NO:C201703。

[0008] 2、所述杂交瘤细胞株7G11的制备方法,将TAO偶联血蓝蛋白免疫原与弗氏佐剂混合免疫小鼠,然后取效价大于1:10000的免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,融合后培养10天后进行ELISA检测,经筛选亚克隆获得杂交瘤细胞。

[0009] 优选的,融合中所述脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0数量比为1:20。

[0010] 3、由杂交瘤细胞株7G11产生的单克隆抗体,所述杂交瘤细胞株7G11的生物保藏编号为CCTCC NO:C201703。

[0011] 4、所述单克隆抗体的制备方法,将杂交瘤细胞株7G11制备腹水,然后进行ProteinA纯化,得单克隆抗体。

[0012] 5、所述单克隆抗体在制备检测TAO抗原的试剂中的应用。

[0013] 优选的,所述单克隆抗体在制备eIisa竞争法检测细交链格孢菌酮酸的试剂中的应用。

[0014] 优选的,所述单克隆抗体在制备eIisa间接法检测细交链格孢菌酮酸的试剂中的应用。

[0015] 本发明的有益效果在于:杂交瘤细胞株7G11,该杂交瘤细胞株由TAO-KLH免疫原免疫小鼠,然后将免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,用TAO-BSA作为抗原或链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸做竞争抗原筛选检测杂交瘤细胞产生的单克隆抗体,筛选得到抗体效价高、特异性好的杂交瘤细胞;该细胞能够分泌抗TAO-KLH单克隆抗体,能够用于检测TAO抗原,对细交链格孢菌酮酸检测具有重要意义。

附图说明

[0016] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图进行说明:

[0017] 图1为纯化蛋白SDS-PAGE电泳结果图。

[0018] 生物材料保藏

[0019] 本发明中杂交瘤细胞株7G11送中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号为CCTCC NO:C201703,地址位于中国武汉武汉大学,保藏日期为2016年12月27日,分类命名为杂交瘤细胞株7G11。

具体实施方式

[0020] 下面将对本发明的优选实施例进行详细的描述。

[0021] 本发明中使用的试剂和耗材如下:Protein Marker(钟鼎生物),BaIb/c小鼠(购自扬州大学),Acr、Bis、Tris(购自Sigma公司),SDS(购自Amresco公司),TEMED(购自BIO-RAD公司),0.22 μ m无菌滤器和透析袋(购自Millipore公司),高糖DMEM培养基(购自Gibco公司),细胞计数板(购自Improved Neubauer),液体石蜡(钟鼎生物),PEG(购自sigama),96细胞培养板(购自Costar),其它试剂均为国产分析纯。

[0022] 实施例1、动物免疫及免后小鼠血清效价检测

[0023] 选取5只6~8周龄雌性BALB/c小鼠,将半抗原TAO偶联血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH)的TAO-KLH免疫原与弗氏佐剂混合免疫,皮下注射100 μ g,2-3周加强免疫一次(第一次免疫免疫原与弗氏完全佐剂混合,其后加免与弗氏不完全佐剂混合)。其中,半抗原TAO由羧甲基羟胺半盐酸盐对细交链格孢菌酮酸(Tenuonic acid, TA)进行衍生后引入连接臂而得。

[0024] 四免后采血检测,通过间接ELISA方法确定抗血清针对TAO-BSA检测原的效价,检测条件:

[0025] 包被抗原:TAO-BSA检测原、链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸(竞争抗原);包被浓度:5 μ g/mL,100 μ l/孔;包被缓冲液:磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4);二抗:山羊抗鼠-HRP,1/5000,检测结果如表1所示。

[0026] 表1、抗血清与TAO-BSA ELISA结果

[0027]

	稀释倍数	A450nm				
		1#鼠	2#鼠	3#鼠	4#鼠	5#鼠
1	500	3.074	3.236	2.812	2.997	3.131
2	1,500	2.403	3.199	2.797	2.981	3.050
3	4,500	1.370	3.164	2.647	2.827	2.911
4	13,500	1.315	2.045	1.530	2.435	2.078
5	40,500	0.634	1.0655	1.035	2.166	1.678
6	121,500	0.478	1.128	0.552	1.125	1.010
7	空白			0.094		
	Titer:	>1:121,500	>1:121,500	>1:121,500	>1:121,500	>1:121,500

[0028] 起始稀释度:1:500

[0029] 结果显示,5只小鼠ELISA效价均大于1:10000,可以继续安排鼠血清与链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸的竞争ELISA检测,结果如表2所示。

[0030] 表2、抗血清与链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸竞争ELISA结果

[0031]

	稀释倍数	A450nm				
		1#鼠	2#鼠	3#鼠	4#鼠	5#鼠
1	100.0	0.184	0.440	1.349	2.706	0.364
2	33.33	0.188	0.837	1.634	2.718	0.701
3	11.11	0.298	1.490	1.880	2.782	1.211
4	3.703	0.533	2.357	2.110	2.797	1.971
5	1.234	1.014	2.694	2.287	2.827	2.422
6	0.411	1.471	2.898	2.433	2.876	2.627
7	0.137	1.713	2.974	2.537	3.070	2.681
8	阳性对照	2.648	2.916	3.043	3.043	2.813
9	阳性对照	2.638	2.995	3.098	3.098	2.846
10	阴性对照	0.107	0.091	0.051	0.057	0.050

[0033] 注:链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸起始稀释度:100 μ g起始,3倍稀释

[0034] 结果显示,1#、2#、5#小鼠竞争效果明显,最终选择1#小鼠进行细胞融合实验。

[0035] 实施例2、细胞融合

[0036] 1、骨髓瘤细胞制备

[0037] 融合前一周,用含10%FBS DMEM培养基扩大培养SP2/0细胞。到融合时,细胞长满大约6瓶T25细胞培养瓶,在融合当天收集SP2/0细胞到50mL离心管中,1000rpm离心5min。弃上清,然后再加入20mL DMEM基础培养基,吹散细胞然后计数。

[0038] 2、脾细胞制备

[0039] 四次免疫后血清ELISA效价在1:10000以上的小鼠,在融合前3天终免,腹腔注射抗原100 μ g。融合当天用颈椎脱臼法安乐死要融合的小鼠。用75%酒精浸泡5min。无菌取脾脏,把脾脏放入内有10mL DMEM基础培养的培养皿中。取筛网放入另一个平皿中,将脾脏转移到筛网上,用注射器内心研磨脾脏。加入DMEM到筛网上,冲洗筛网,使脾细胞更多的收集到平皿中。将细胞移至10mL离心管中,用不含血清的DMEM洗脾细胞两次,1000rpm离心5min,收集脾细胞计数。

[0040] 3、细胞融合

[0041] 混合骨髓瘤细胞和脾细胞,使骨髓瘤细胞同脾细胞数量比在1:20为宜。把细胞放到50mL离心管中,用DMEM基础培养基稀释,然后1000rpm离心5min,弃上清,摇动离心管使细胞均匀。缓慢加入0.8mL 50%PEG,反应90秒,然后加入20-30mL DMEM培养基终止PEG,把融合的细胞放到37 $^{\circ}$ C水浴锅中反应10分钟,1000rpm离心5min,弃上清然后加入HAT DMEM培养基。把融合的细胞铺到96孔板中,每孔100 μ L,然后将细胞培养板放到CO₂培养箱中培养。融合后4天查看,杂交瘤细胞克隆率在50%以上,有少量的细胞碎片,细胞生长状态良好,融合10天后开始进行ELISA筛选检测。检测条件:包被抗原:TAO-BSA检测原、链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸(竞争抗原);包被浓度:5 μ g/mL,100 μ L/孔;包被缓冲液:磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4);二抗:山羊抗鼠-HRP,1/5000,结果如表3和表4所示。

[0042] 表3、融合后细胞上清与TAO-BSA ELISA结果

[0043] ①号板

[0044]

	A450nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.485	2.736	1.299	0.560	3.109	1.404	0.919	0.751	0.456	0.457	0.561	0.481
B	0.477	0.953	0.562	0.388	3.306	0.774	0.626	0.587	0.340	0.445	0.645	0.334
C	0.553	1.046	0.411	3.006	0.512	0.345	0.461	3.006	0.414	0.410	0.417	0.338
D	0.493	0.691	0.637	3.028	0.511	0.571	0.391	0.498	0.525	0.370	0.344	0.321
E	3.258	3.213	0.614	3.171	0.509	3.134	0.413	0.482	0.423	0.553	0.740	0.575
F	0.490	0.509	0.493	0.397	0.471	2.374	0.595	0.352	0.350	3.093	3.508	0.413
G	0.558	0.602	1.172	0.422	0.667	0.520	0.589	0.663	0.945	3.618	0.423	2.041
H	0.512	0.957	0.959	0.491	0.505	0.968	0.651	1.096	4.000	0.903	0.651	4.000

[0045] ②号板

[0046]

	A450nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.377	0.331	0.560	3.141	3.141	0.500	1.228	0.599	0.363	0.485	1.261	0.271
B	0.299	0.591	0.411	0.320	3.260	0.490	0.577	0.371	0.422	0.489	1.585	0.549
C	0.509	0.437	0.380	0.445	0.274	0.413	0.372	3.122	0.407	0.292	0.980	0.280
D	0.416	0.873	0.447	3.533	0.390	0.412	0.463	0.601	0.537	1.853	1.960	0.307
E	0.398	0.398	0.325	0.476	0.282	0.339	0.235	0.462	0.401	0.843	0.929	0.295
F	0.645	1.371	0.498	0.924	0.792	0.280	0.269	0.368	0.538	0.330	3.906	0.380
G	0.676	0.968	1.536	1.411	0.380	0.262	0.688	0.552	0.577	0.479	1.763	0.595
H	1.173	1.117	0.644	1.577	1.142	0.487	0.520	0.583	0.619	0.746	2.189	0.769

[0047] ③号板

[0048]

	A450nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.371	0.561	0.686	3.000	0.576	0.564	0.570	0.626	0.710	0.703	0.519	3.109
B	0.530	0.382	0.821	1.075	0.419	3.306	0.394	0.555	0.986	0.580	0.449	0.978
C	0.507	0.536	0.460	0.898	1.730	1.084	0.431	0.388	1.011	0.438	0.501	0.719
D	1.605	1.169	0.734	0.890	0.686	0.592	0.864	0.928	0.753	0.544	0.402	0.548
E	1.032	1.614	0.801	0.794	0.616	0.868	0.903	1.112	0.634	0.614	0.395	0.374
F	1.434	1.026	3.362	0.860	0.914	0.911	0.763	0.485	0.885	0.497	3.605	0.340
G	1.753	1.135	1.088	0.513	0.557	1.015	0.535	3.618	0.529	0.698	0.425	0.360
H	2.660	1.699	1.000	1.818	4.000	1.697	0.515	0.590	1.189	0.495	0.505	0.599

[0049]

[0050] ④号板

[0051]

	A450nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.470	0.477	0.697	2.823	2.857	2.857	0.777	0.316	1.126	0.797	0.418	0.392
B	1.264	0.576	0.459	1.260	0.535	0.376	0.434	0.524	3.113	3.055	0.575	3.259
C	0.456	0.841	1.844	1.562	0.508	0.763	0.347	0.357	0.471	0.569	0.444	0.349
D	0.554	0.663	0.564	2.089	0.405	0.381	0.460	0.402	1.310	0.583	0.647	0.315
E	0.455	0.817	1.145	2.934	0.429	0.566	0.329	0.597	0.384	0.982	0.544	0.543
F	0.619	0.455	0.636	0.751	0.638	0.399	0.991	3.003	0.394	0.423	0.541	0.333
G	0.539	1.461	0.603	0.865	0.813	0.422	0.401	0.618	0.319	0.802	0.392	0.393
H	0.842	0.721	1.233	1.455	0.607	0.853	0.491	0.681	0.344	0.306	0.387	0.592

[0052] ⑤号板

[0053]

	A450nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.266	0.255	0.192	0.290	0.239	0.320	0.210	0.222	0.243	0.242	0.187	0.189
B	0.233	0.291	0.232	0.265	0.243	0.301	0.237	0.287	0.361	0.312	0.188	0.231
C	0.230	0.254	0.250	0.383	0.239	0.194	0.253	0.253	0.238	3.458	0.216	0.249
D	0.304	0.204	0.191	0.255	0.245	0.405	0.213	0.294	0.226	0.242	3.629	0.271
E	0.221	0.207	2.632	0.268	0.228	0.225	3.309	0.191	0.228	0.217	0.253	0.224
F	0.192	0.227	0.242	0.446	0.189	0.184	0.196	0.275	0.264	0.256	0.220	0.427
G	0.184	0.213	0.168	0.337	0.173	0.263	0.182	0.278	0.228	3.742	0.206	0.228
H	0.281	4.000	0.194	0.214	0.171	0.217	0.173	0.218	0.285	0.182	0.182	0.317

[0054] ⑥号板

[0055]

	A450nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.265	0.204	0.308	0.186	0.253	0.334	0.235	0.175	0.439	0.189	0.294	0.221
B	0.268	0.179	0.241	0.987	0.272	0.291	0.194	0.177	0.235	0.264	0.211	0.173
C	0.289	0.228	0.314	3.332	0.289	0.372	0.177	0.190	3.235	0.245	0.716	0.230
D	0.307	0.252	0.301	0.391	0.225	0.484	0.300	0.230	0.346	0.246	0.238	0.239
E	0.271	0.408	3.308	0.315	0.255	0.511	0.344	0.264	0.258	0.280	0.387	0.326
F	0.380	1.301	0.364	0.328	0.287	0.378	0.186	0.236	0.221	0.238	0.325	0.249
G	0.640	0.295	0.325	0.357	0.282	0.478	0.181	0.312	0.216	0.260	0.337	0.347
H	0.368	0.590	0.388	0.310	0.247	4.000	0.171	0.420	0.150	0.142	1.000	1.300

[0056] 表4、融合后细胞上清与链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸ELISA结果

[0057]

细胞株名称	1A2	1A5	1B5	1C4	1C8	1D4	1E1	1E2	1E4
OD值	3.102	2.0833	1.807	0.248	2.549	0.260	0.235	0.266	0.279
细胞株名称	1E6	1F10	1F11	1G10	1G12	1H9	1H12	2A4	2A4
OD值	0.221	0.258	0.256	0.323	0.222	0.429	3.407	0.181	2.037
细胞株名称	2B5	2C8	2D4	2D11	2F2	2F11	2G11	2H11	3A4
OD值	0.191	0.283	0.251	0.248	0.221	0.219	0.232	0.228	1.499
细胞株名称	3A12	3B6	3F3	3F11	3G8	3H1	3H5	4A4	4A5
OD值	0.863	0.179	3.085	3.152	0.172	0.244	0.233	0.204	0.387
细胞株名称	4A6	4B9	4B10	4D4	4E4	4F8	5C10	5E3	5E7
OD值	0.264	3.527	0.189	1.412	0.252	0.253	0.540	0.662	0.170
细胞株名称	5G10	5H2	6C4	6C9	6E3	6H6	阳性对照	竞争孔	阴性对照
OD值	1.631	1.988	0.175	2.929	0.340	0.252	3.129	0.617	0.101

[0058] 实施例3、融合筛选及亚克隆

[0059] 1、融合筛选

[0060] 在检测的前一天,用PBS包被 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原于ELISA板,过夜,次日吸取细胞上清 $100\mu\text{L}$ /孔进行ELISA检测根据ELISA结果,判断阳性孔(样品孔OD值/阴性孔OD值 ≥ 2.1 则判定为阳性孔。用单道移液器挑检整板检测出的阳性孔,进行第二次确认检测,进一步确认阳性孔,确定后的阳性孔细胞进行亚克隆。

[0061] 2、亚克隆

[0062] 吹打阳性孔中细胞,计数,在离心管中加入N/4mL DMEM培养基,取100 μ I细胞悬液到离心管中,吹匀后留1mL,补加DMEM到4mL,吹匀,留100 μ I(约2滴)在管底。在离心管中加DMEM至5mL,混匀后滴加至96孔板的前三行,每孔一滴管底留1.8~2mI左右,补加DMEM至5mL,吹匀后滴加至96孔板的D、E、F三行,每孔一滴,管底留1.5~1.8m左右,补加DMEM至2.8~3mL左右,吹匀后滴加至96孔板的G、H行,每孔一滴,7-10天后在显微镜下观察,检测有克隆生长的孔,标记出单克隆的孔,尽可能挑取阳性的单克隆细胞进行再次亚克隆,检测至100%阳性后,挑出单克隆孔扩大培养定株。选取10株阳性且有竞争的融合细胞株进行亚克隆,经ELISA筛选后定10株结果如下:

[0063] 包被抗原:TAO-BSA检测原、链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸(竞争抗原);包被浓度:5 μ g/mL,100 μ L/孔;包被缓冲液:磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4);二抗:山羊抗鼠-HRP,1/5000,结果如表5所示。

[0064] 表5、定株后细胞上清Eiisa结果

[0065]

细胞株名称	间接ELISA-OD值	竞争ELISA-OD值
3B3	2.924	0.712
3B4	2.950	0.752
3D12	2.950	1.079
4A1	2.899	0.895
4B9	2.876	0.883
4D5	3.236	0.846
4F4	3.345	0.231
4G1	3.412	1.383
7F11	3.412	0.524
7G11	3.236	0.450

[0066] 根据上述结果,选择7G11细胞株制备腹水,因为该细胞株竞争效果最好,长势最快。杂交瘤细胞株7G11送中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号为CCTCC NO:C201703,地址位于中国武汉武汉大学,保藏日期为2016年12月27日,分类命名为杂交瘤细胞株7G11。

[0067] 实施例4、ProteinA纯化抗体及鉴定

[0068] 将TAO-KLH 7G11腹水,进行ProteinA纯化。取蛋白A琼脂糖介质,填装层析柱,将腹水与PBS按1:1混匀后缓慢上样,待抗体结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需纯化抗体,立即在PBS中进行4 $^{\circ}$ C透析过夜,隔日进行纯度、浓度和效价检测。

[0069] 抗体间接、竞争ELISA效价检测,具体操作如下:

[0070] (1) 根据实验需要设计好包被板,并在板条上做上标记;

[0071] (2) 包被:用PBS包被液将TAO-BSA检测抗原按5 μ g/mL稀释,混匀后加入板条中,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜;

[0072] (3) 包被抗原:TAO-BSA检测抗原;

[0073] (4) 包被浓度:按5 μ g/mL稀释,100 μ L/孔;

[0074] (5) 包被缓冲液:磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4);

[0075] (6) 封闭: 包被好后, 弃去包被液, 洗板3次, 每孔加入200 μ L封闭液 (PBST+1%BSA), 37 $^{\circ}$ C恒温箱1h, 取出酶标板, 弃去内液, 洗板1次;

[0076] (7) 一抗反应:

[0077] 间接ELISA: 纯化抗体按1/500, 2倍稀释, 37 $^{\circ}$ C恒温箱1h;

[0078] 竞争ELISA: 链格孢霉产生的细交链格孢菌酮酸0.1 μ g/mL起始, 2倍稀释, 每孔50 μ L, 同步加入纯化抗体, 纯化抗体按1/1000稀释, 每孔50 μ L, 37 $^{\circ}$ C恒温箱1h;

[0079] (8) 二抗反应

[0080] 取出酶标板, 弃去内液, 洗板3次, 向每孔中加入100 μ L稀释好的酶标二抗, 酶标二抗: 山羊抗鼠-HRP, 1/5000, 37 $^{\circ}$ C恒温箱1小时。

[0081] (9) 显色

[0082] 取出酶标板, 弃去内液, 洗板4次, 每孔先加入100 μ L TMB显色液, 根据颜色的深浅决定显色时间, 一般37 $^{\circ}$ C, 15min。

[0083] (10) 终止反应

[0084] 每孔加入100 μ L 1M HCL溶液, 终止反应, 即刻在酶标仪上450nm读数, 将OD值大于设定的阴性对照OD值的2.1倍的孔对应的稀释度, 定为该样品的效价。

[0085] 结果如表6和表7所示。

[0086] 表6、7G11纯化抗体间接Eiisa结果

	Dilution	A450nm
		7G11 纯化抗体(0.4 mg/mL)
	500	3.092
	1,000	2.842
	2,000	2.445
	4,000	2.296
	8,000	1.784
[0087]	16,000	1.534
	32,000	1.358
	64,000	1.211
	128,000	0.963
	256,000	0.595
	512,000	0.422
	空白	0.195
	Titer:	> 512,000

[0088] 注: 起始稀释度: 1:500; 效价即样品OD/空白OD \geq 2.1的最高稀释度

[0089] 通过检测结果得出, 7G11的抗体效价都在512K左右。

[0090] 表7、7G11纯化抗体竞争Eiisa结果

	TA	A450nm
	(ng/mL)	7G11 纯化抗体(0.4 mg/mL)
[0091] 1	100.000	0.481
2	50.000	0.524
3	25.000	0.681
4	12.500	0.811
5	6.250	1.174
6	3.125	1.452
7	1.563	1.504
8	0.781	1.548
9	0.391	1.628
10	0.195	1.666
11	0.098	1.728
12	0.049	1.767
13	阳性对照	1.823
14	阴性对照	0.073

[0092] 抗体浓度检测结果显示,纯化后抗体浓度为0.4mg/mL;对应抗体体积为4.0mL,然后采用电泳方法检测其纯度,结果如图1所示。结果表明,本发明纯化后的抗体纯度高,可用于检测对应抗原。

[0093] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

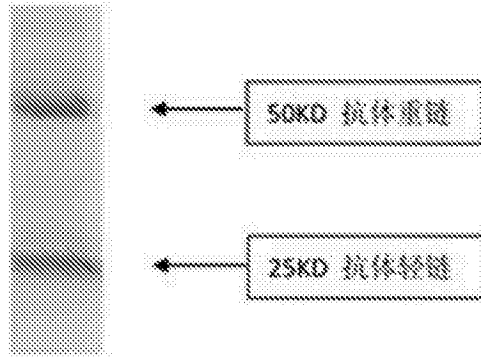


图1

专利名称(译)	杂交瘤细胞株7G11及其抗体		
公开(公告)号	CN106701688A	公开(公告)日	2017-05-24
申请号	CN201710029162.1	申请日	2017-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	西南大学		
申请(专利权)人(译)	西南大学		
当前申请(专利权)人(译)	西南大学		
[标]发明人	马良 钟红 张宇昊		
发明人	马良 钟红 张宇昊		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/14 G01N33/535 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/14 G01N33/535 G01N33/577		
其他公开文献	CN106701688B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种杂交瘤细胞株7G11及其抗体，杂交瘤细胞株7G11于2016年12月27日送中国典型培养物保藏中心保藏，保藏编号为CCTCC NO:C201703，该杂交瘤细胞株7G11能够产生抗细交链格孢菌酮酸的单克隆抗体，能够特异性检测细交链格孢菌酮酸，对细交链格孢菌酮酸检测具有重要意义。

