



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104829711 B

(45)授权公告日 2018.04.03

(21)申请号 201510161178.9

(22)申请日 2015.04.07

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104829711 A

(43)申请公布日 2015.08.12

(66)本国优先权数据  
201410138378.8 2014.04.08 CN

(73)专利权人 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 王慕昶 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)

*G12N 5/20*(2006.01)

*G01N 33/577*(2006.01)

*G01N 33/535*(2006.01)

*G01N 33/569*(2006.01)

*C12R 1/91*(2006.01)

(56)对比文件

US 5425946 A,1995.06.20,

US 5425946 A,1995.06.20,

CN 1852733 A,2006.10.25,

CN 1351503 A,2002.05.29,

CN 1457879 A,2003.11.26,

审查员 贾麒

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. 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 1D 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 1DNo.15和16所示。

2. 产生权利要求1所述单克隆抗体的杂交瘤细胞。

3. 权利要求1所述单克隆抗体在制备脑膜炎球菌检测试剂盒中的应用。

4. 含有权利要求1所述单克隆抗体的药物。

5. 含有权利要求1所述单克隆抗体的检测试剂盒。

6. 如权利要求5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Ba1b/c小鼠每次注射量为100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$ 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℃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	438.6	标品浓度 (ug/ml)	1.56	3.12	6.25	12.5	25
(2.193)		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 1D 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 1D 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 1D 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 1D 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

1D 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 <sub>450</sub> ±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10μg/mL,在酶标板的每孔加100μL,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200μL 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100μL/孔,37℃孵育1.5小时,经洗板后再加入6B7-HRP(0.5ug/ml)100μL/,37℃孵育1小时,经洗涤拍干后加入显色剂A、B各50μL/孔进行显色,37℃温育10min,加入终止液50μL/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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O,吐温-20100μL,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 <sub>450</sub> ±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10μg/mL,在酶标板的每孔加100μL,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200μL 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100μL/孔,37℃孵育1.5小时,经洗板后再加入5B3-HRP(0.5ug/ml)100μL/,37℃孵育1小时,经洗涤拍干后加入显色剂A、B各50μL/孔进行显色,37℃温育10min,加入终止液50μL/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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O,吐温-20100μL,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 <sub>450</sub> ±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10μg/mL,在酶标板的每孔加100μL,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200μL 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100μL/孔,37℃孵育1.5小时,经洗板后再加入4H8-HRP(0.5ug/ml)100μL/,37℃孵育1小时,经洗涤拍干后加入显色剂A、B各50μL/孔进行显色,37℃温育10min,加入终止液50μL/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-20100 $\mu\text{L}$ ,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5ELISA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 <sub>450</sub> ±SD	2.028±0.009	1.538±0.089	0.971±0.050	0.614±0.005	0.388±0.054	0.237±0.014	0.143±0.012	0.089±0.009	0.035±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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在酶标板的每孔加100 $\mu\text{L}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{L}$  3%的小牛血清白蛋白(BSA),放入37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5小时,经洗板后再加入3A2-HRP(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时,经洗涤拍干后加入显色剂A、B各50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 进行显色,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育10min,加入终止液50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,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-20100 $\mu\text{L}$ ,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6ELISA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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )检测结果(OD <sub>450</sub> ±SD)
A	0.056±0.001
C	0.064±0.008
W	0.049±0.004
Y	<b>2.237±0.145</b>

[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 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

[0002]

<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

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

<210> 6  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Clone2H4 重链可变区  
 <400> 6

Val Lys Leu Gln Glu 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 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met  
 65 70 75 80  
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ser Arg Gly Ser Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

[0003]

<210> 7  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> clone5B3 轻链可变区  
 <400> 7

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





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

[0006] <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 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

```

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

```

<210> 16

<211> 115

<212> PRT

[0007] <213> Clone3A2 重链可变区

<400> 16

```

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

```

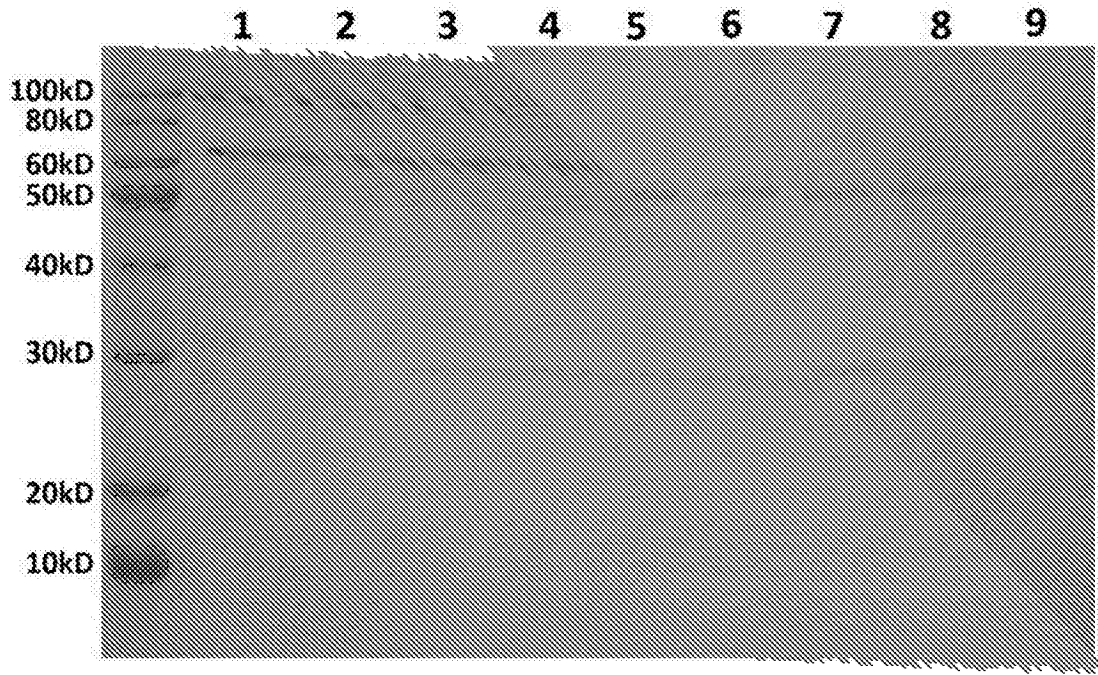


图1

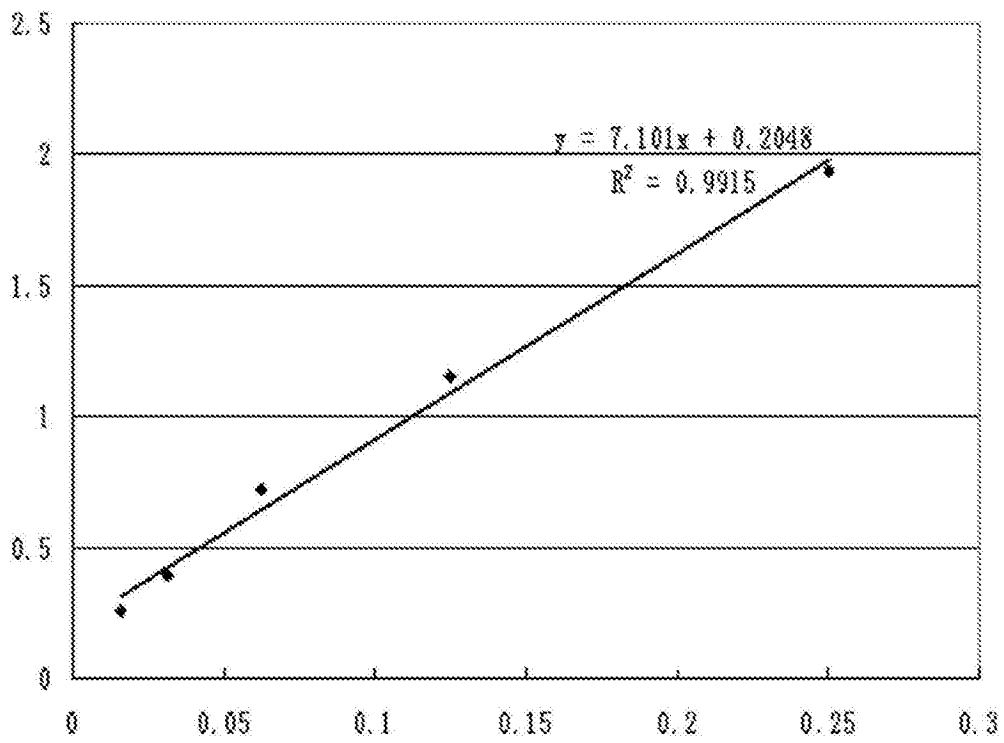


图2

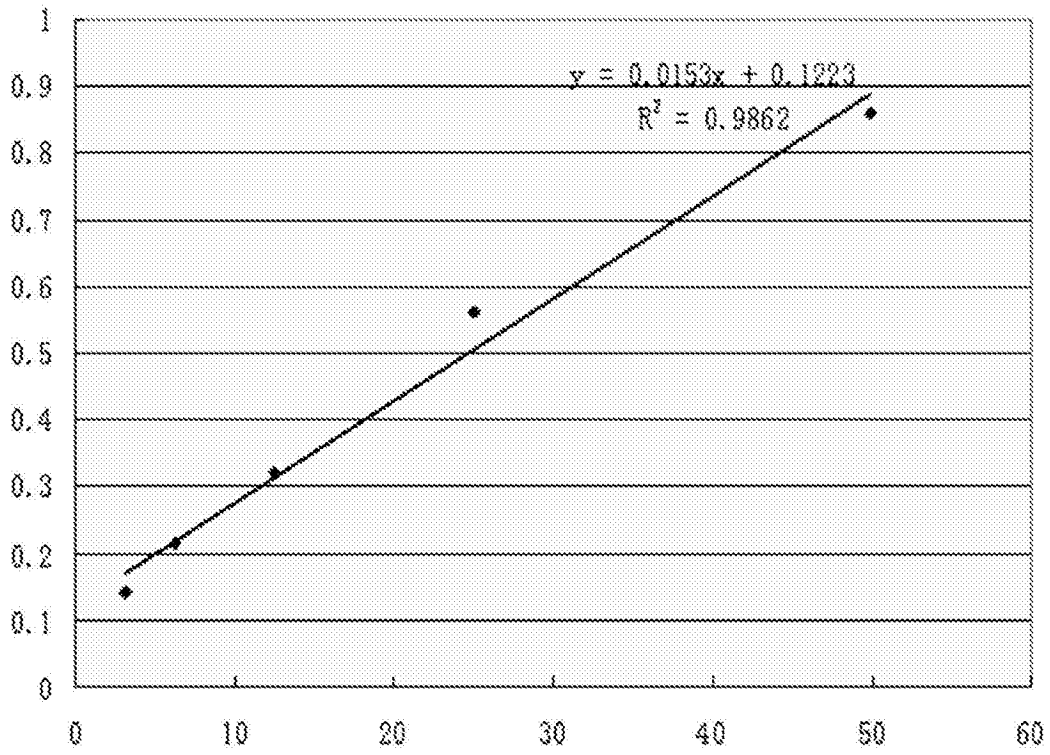


图3

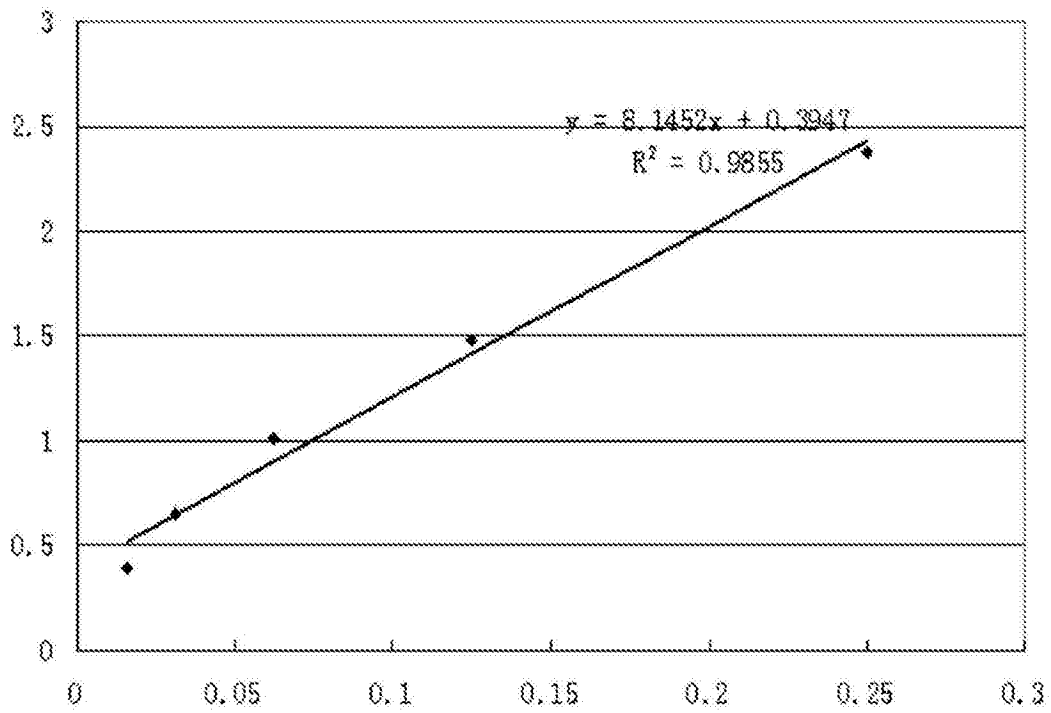


图4

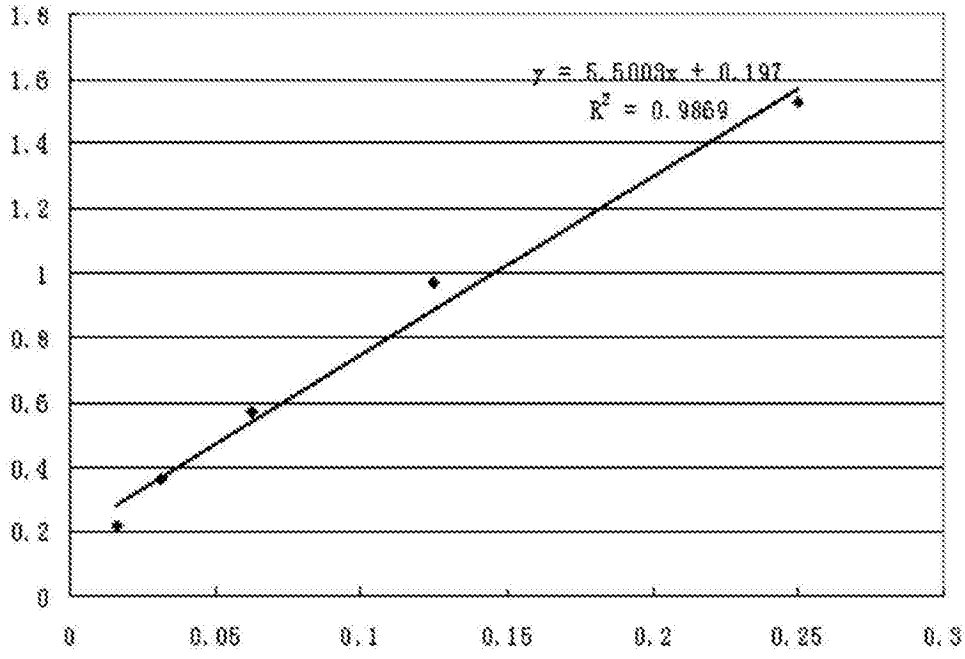


图5

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	<a href="#">CN104829711B</a>	公开(公告)日	2018-04-03
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 王慕昉 张翠娟 张小刚 陈兴 张萍萍		
发明人	孙乐 李茂华 王慕昉 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		
审查员(译)	贾麒		
优先权	201410138378.8 2014-04-08 CN		
其他公开文献	CN104829711A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**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)						
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	