



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110563840 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910273817.9

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2019.04.07

G01N 33/535(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC NO.17086 2019.01.09

(71)申请人 北京利德曼生化股份有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区兴海  
路5号

(72)发明人 王淑红 熊宁

(74)专利代理机构 北京思元知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11598

代理人 余光军

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

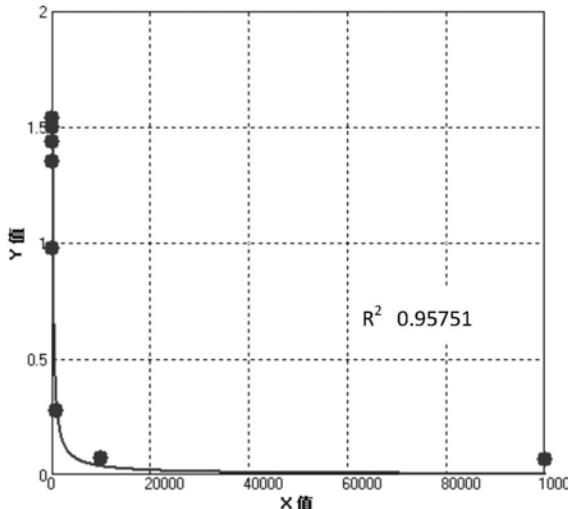
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

抗甘胆酸单克隆抗体及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种抗甘胆酸单克隆抗体及其制备方法。本发明通过将高浓度的胆酸和甘氨酸小分子添加至酶标抗体中,若抗体可与小分子结合使抗体的结合位点被占据,从而不再与酶标抗体结合,ELISA试验结果为阴性,排除仅能识别胆酸和甘氨酸的抗体,同时减少阳性细胞株的克隆筛选及腹水制备、纯化等工作,大大提高获得仅识别甘胆酸的单抗细胞株几率。本发明方法在减轻工作量的前提下有效扩大了筛选范围,使获得所需单抗细胞株的几率得到提高。通过所建立的筛选方法本发明获得了1株能够特异性识别甘胆酸的单克隆抗体,解决了多抗批间差异大,重复性差,且成本较高的问题。同时也降低了与其他物质的交叉反应,可用于甘胆酸的ELISA和化学发光法的竞争检测。



1. 一种制备抗甘胆酸单克隆抗体的方法,其特征在于,包括以下步骤:选取常规免疫获得的抗甘胆酸血清效价高的小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合,获得融合细胞,培养获得的融合细胞,得到细胞培养上清液;用牛血清白蛋白偶联的甘胆酸抗原包被酶标板,将获得的细胞培养上清液加入酶标板中,使用含有高浓度胆酸与甘氨酸小分子的酶标二抗进行间接ELISA法检测,筛选阳性细胞孔进行后续克隆、腹水制备和单克隆抗体的纯化。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的含有高浓度胆酸与甘氨酸小分子的酶标二抗中,胆酸与甘氨酸小分子的浓度均为0.1mg/ml。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的间接ELISA法检测的步骤包括:

1) 包被酶标板:用0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液将牛血清白蛋白偶联的甘胆酸抗原稀释至2.0μg/ml,100μl/孔加至酶标板中,4℃过夜包被酶标板,用0.15M pH7.4含0.05%Tween-20磷酸盐缓冲液(PBST)洗板1次;

2) 加细胞培养上清液:按照每个细胞孔100μl,加到酶标板中,37℃温育60min,PBST洗板2次;

3) 加含有高浓度胆酸与甘氨酸小分子的酶标二抗:加入含有终浓度均为0.1mg/ml的胆酸与甘氨酸小分子的羊抗鼠-HRP,100μl/孔,37℃温育30min,PBST洗板3次;

4) 加底物显色:加入100μl/孔H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB底物显色液,避光显色5~10min,加50μl/孔2M浓硫酸终止反应,酶标仪测定450nm的吸光值。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的羊抗鼠-HRP是按照1:5000稀释。

5. 一株能够稳定分泌抗甘胆酸单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其特征在于,所述的杂交瘤细胞株通过权利要求1-4任一项所述的方法制备得到,所述的杂交瘤细胞株命名为CG-1H1,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其菌种保藏编号为:CGMCC NO.17086。

6. 抗甘胆酸单克隆抗体,其特征在于,所述的单克隆抗体由权利要求5所述的杂交瘤细胞株分泌产生。

7. 权利要求5所述的杂交瘤细胞株在制备检测甘胆酸试剂中应用。

8. 权利要求6所述的抗甘胆酸单克隆抗体在制备检测甘胆酸试剂中应用。

## 抗甘胆酸单克隆抗体及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种单克隆抗体及其制备方法,特别涉及一种抗甘胆酸单克隆抗体及其制备方法,本发明属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 甘胆酸 (Cholyglycine, CG) 是胆酸与甘氨酸结合而成的结合型胆酸,是主要胆 酸之一,在血清中主要以蛋白结合形式存在,分子量为465.6。CG正常代谢途径为 肠--肝循 环,主要在肝细胞内合成,即胆固醇经过及其复杂的酶促反应,转变成初 级胆汁酸,其中有胆酸 (CA) 和鹅去氧胆酸 (CD-CA) ,经毛细胆管、胆管排入 胆囊,随同胆汁进入十二指肠、小肠,参与脂肪的消化吸收。

[0003] 正常情况下,95%的胆酸在回肠末端重吸收,经门静脉输送至肝脏由肝细胞摄 取再利用。血清中因CG主要以蛋白结合形式存在,溢入体循环的总量小于1%,故正常成人血 清CG浓度稳定在低水平。但当肝细胞受损时,肝细胞摄取CG能力 下降,致使血中CG含量增 高;胆汁郁滞时,肝脏排泄胆酸发生障碍而返流入血循 环中,亦可使血中CG含量增高。因此,测定血清甘胆酸 (SCG) 是评价肝细胞功 能及其肝胆系物质循环功能的敏感指标之一, 主要分以下4种情况:1.对判断急性 肝炎,慢性活动性肝炎,原发性肝炎,肝硬化及慢性迁 延性肝炎患者血CG均明显 高于正常人且呈递性增高;且检测CG对其治疗和复发均有很 好的价值;2.对肝结 石、梗阻性肝病、胆囊排泄功能障碍引起血清CG显著升高;3.甘胆酸是妊娠晚期 血清中最主要的胆汁酸组分,检测妊娠期胆内胆汁淤积症 (ICP) 的唯一指标;4. 检 测肠道功能的唯一指标。

[0004] 甘胆酸免疫检测试剂盒开发的难点在于寻找合适的抗体,目前甘胆酸的检测常 用多抗。多抗制备需要免疫动物,动物个体差异及时间上的差异都能导致每个批号 的血清 不完全一样,存在批间差异大的问题。

[0005] 单克隆抗体是由单一B细胞克隆产生的高度均一、仅针对特定抗原表位的抗体, 使用单克隆抗体检测甘胆酸能够克服上述问题,然而,CG单抗的初期研究显示采 用传统免 疫与一般的筛选方法获得与胆酸无交叉反应的CG单抗的工作量较大,概 率较低。传统单抗 制备方法首先获得尽可能多的识别CG结构的所有单抗细胞株, 再分别制备纯化的CG单抗, 进行胆酸和甘胆酸小分子的竞争抑制试验,然后依据 竞争抑制率确定合适的单克隆抗体 细胞株。这种方法工作量大,为了提高筛选CG 单抗的几率,降低工作量,本发明建立了一种 与传统方法不同的CG单抗制备的检 测方法:通过1次细胞融合实验,利用不同载体的CG偶 联抗原包被酶标板,然后 按照常规的间接ELISA加入细胞培养上清,然后加入含有高浓度 的胆酸和甘氨酸小 分子 (0.1mg/ml) 的酶标抗体混合液做竞争抑制试验,筛选阳性细胞株, 即可获得 与胆酸和甘氨酸无交叉反应的细胞株。本发明的关键技术点在于将高浓度的胆 酸和 甘氨酸小分子添加至酶标抗体中做竞争抑制试验,省去了单独加液的麻烦,同时可以排 除掉识别胆酸或甘氨酸小分子结构的抗体分泌细胞,从而大大提高获得特异性 识别 甘胆酸的单抗细胞株的几率。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的之一在于提供一种制备抗甘胆酸单克隆抗体的方法。

[0007] 本发明的目的之二在于提供一株由上述方法制备得到的特异性识别甘胆酸的 单抗细胞株及其在检测甘胆酸中的应用。

[0008] 为了达到上述目的,本发明采用了以下技术手段:

[0009] 本发明的一种制备抗甘胆酸单克隆抗体的方法,包括以下步骤:选取常规免疫 获得的抗甘胆酸血清效价高的小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合,获得融合 细胞,培养获得的融合细胞,得到细胞培养上清液;用牛血清白蛋白偶联的甘胆酸 抗原包被酶标板,将获得的细胞培养上清液加入酶标板中,使用含有高浓度胆酸与 甘氨酸小分子的酶标二抗进行间接ELISA法检测,筛选阳性细胞孔进行后续克隆、腹水制备和单克隆抗体的纯化。

[0010] 其中,所述的含有高浓度胆酸与甘氨酸小分子的酶标二抗中,胆酸与甘氨酸的 浓度均为0.1mg/ml。

[0011] 其中,所述的间接ELISA法检测的步骤包括:

[0012] 1) 包被酶标板:用0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液将牛血清白蛋白偶联的甘胆酸抗 原稀释至2.0μg/ml,100μl/孔加至酶标板中,4℃过夜包被酶标板,用0.15M pH7.4含 0.05% Tween-20磷酸盐缓冲液(PBST)洗板1次;

[0013] 2) 加细胞培养上清液:按照每个细胞孔100μl,加到酶标板中,37℃温育60min, PBST洗板2次;

[0014] 3) 加含有高浓度胆酸与甘氨酸小分子的酶标二抗:加入含有终浓度均为 0.1mg/ ml的胆酸与甘氨酸小分子的羊抗鼠-HRP,100μl/孔,37℃温育30min,PBST 洗板3次;

[0015] 4) 加底物显色:加入100μl/孔H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB底物显色液,避光显色5~10min,加50 μl/孔2M浓硫酸终止反应,酶标仪测定450nm的吸光值。

[0016] 其中,优选的,所述的羊抗鼠-HRP是按照1:5000稀释。

[0017] 进一步的,本发明还提供了一株能够稳定分泌抗甘胆酸单克隆抗体的杂交瘤细 胞株,所述的杂交瘤细胞株通过以上任一项所述的方法制备得到,所述的杂交瘤细 胞株命名为CG-1H1,分类命名为甘胆酸单克隆抗体杂交瘤细胞株,保藏在中国微 生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址在北京市朝阳区北辰西路1号院中 科院微生物研究所,其菌种保藏编号为:CGMCC NO.17086,保藏日期为2019年1 月9日。

[0018] 由所述的杂交瘤细胞株分泌产生的抗甘胆酸单克隆抗体也在本发明的保护范 围之内。

[0019] 更进一步的,本发明还提供了所述的杂交瘤细胞株以及所述的抗甘胆酸单克隆 抗体在制备检测甘胆酸试剂中应用。

[0020] 相较于现有技术,本发明的有益效果是:

[0021] 1、本发明建立了一种比现有制备的CG单抗更简单操作的方法,通过将高浓度 的胆酸和甘氨酸小分子添加至酶标抗体中,若抗体可与小分子结合使抗体的结合位 点被占 据,从而不再与酶标抗体结合,ELISA试验结果为阴性;排除仅能识别胆酸 和甘氨酸小分子 结构的抗体,同时减少阳性细胞株的克隆筛选及腹水制备、纯化等 工作,从而大大提高获 得仅识别甘胆酸的单抗细胞株几率。本发明提供的方法与现 有方法的具体优势可见表1,

由表1可知,本发明方法在减轻工作量的前提下有效 扩大了筛选范围,使获得所需单抗细胞株的几率得到提高。

[0022] 表1本发明方法与现有方法的比较

	比 较 内 容	现 有 方 法	本 发明方 法	本 发明方 法的优 点
[0023]	克隆化细胞数量	尽可能多, 按 20 株计算 (据可操作性)	2-4 株	大大减少工作量 提高了筛选几率
	腹水制备与纯化	20 株细胞	2-4 株	大大减少工作量

[0024] 2、本发明是通过所建立的新的筛选方法获得了1株能够特异性识别甘胆酸的 单克隆抗体,解决了多抗批间差异大,重复性差,且成本较高的问题。同时也降低 了与其他物质的交叉反应,可用于甘胆酸的ELISA和化学发光的竞争检测。

### 附图说明

[0025] 图1为利用竞争ELISA检测单克隆抗体1H1对不同浓度甘胆酸的抑制曲线图。

### 具体实施方式

[0026] 下面通过实验并结合实施例对本发明做进一步说明,应该理解的是,这些实施 例仅用于例证的目的,决不限制本发明的保护范围。

[0027] 实施例1甘胆酸单克隆抗体的制备

[0028] 1、实验材料

[0029] 1) SP 2/0购自上海生化所细胞中心并由本公司研发部保存;

[0030] 2) Balb/c小鼠购自上海维通利华实验动物中心。

[0031] 3) 胎牛血清:杭州四季青公司产品;

[0032] 4) DMEM、HAT和HT:均为Invitrogen公司产品;

[0033] 5) 50%PEG<sub>1450</sub>溶液:为Sigma公司产品;

[0034] 6) 其他药品均为分析纯等级。

[0035] 2、实验方法

[0036] 2.1 Balb/c小鼠的免疫

[0037] 选取4-6只6-8周龄雌性Balb/c小鼠用合成的偶联抗原CG-KLH进行免疫。共 进行3-5次免疫,首次免疫用抗原与弗氏完全佐剂乳化后免疫,其余常规免疫用抗 原与弗氏不完全佐剂乳化后免疫。首次免疫与第二次免疫时间间隔最好在21~28d (优选28d),其余免疫之间间隔14-21d (优选14d),第3次免疫7天后利用尾静 脉采血检测实验鼠效价,达到融合要求后(一般为1:1W)用不加佐剂的抗原进行一 次冲击免疫;3~5d后进行细胞融合实验。具体的免疫方案见表2:

[0038] 表2融合小鼠免疫程序与方法

	免 疫 次 数	免 疫 时 间	免 疫 剂 量	佐 剂	免 疫 途 径
[0039]	1 免	第 1 天	50μg/只	弗氏完全佐剂	背部皮下多点

	2 免	第 28 天	25 $\mu$ g/只	弗氏不完全佐剂	背部+腹部皮下多点
[0040]	3 免	第 42 天	50 $\mu$ g/只	弗氏不完全佐剂	背部+腹部皮下多点
	冲击免疫	第 57 天	100 $\mu$ g/只	不加佐剂	腹腔

[0041] 注:免疫原:免疫原+佐剂,按照1:1的比例进行混合。

[0042] 2.2小鼠血清抗体效价检测

[0043] 采用间接ELISA对免疫小鼠血清效价进行测定,用0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液 将牛血清白蛋白偶联的甘胆酸抗原(CG-BSA)稀释到2.0 $\mu$ g/ml,每孔100 $\mu$ l加到酶 标板中,4℃ 冰箱放置过夜,使抗原吸附到酶标板中,用Tween-20磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤酶标板1次,洗掉未与酶标板结合的抗原,完成抗原包被;将采集的 小鼠血清从1/500开始,用PBST做3 倍比梯度稀释并设立1孔稀释液对照,100 $\mu$ l/ 孔,37℃温育30分钟;用PBST洗板2次,用PBST 将羊抗小鼠-HRP稀释至说明 书提供的工作浓度,100 $\mu$ l/孔,37℃温育30分钟;用PBST洗板3 次,加入过氧化 氢脲-四甲基联苯胺底物(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB)作为底物的显色液反应5~10min,用2M 浓 硫酸终止反应后,测量450nm下的吸光值。将OD值为阴性对照2倍以上时抗体的 最高稀 释倍数定为该抗体的效价。血清效价达到1:1W以上即可选取效价较高的小 鼠进行细胞融 合实验。

[0044] 2.3细胞融合与筛选

[0045] 1)骨髓瘤细胞的准备:在细胞融合前7天复苏骨髓瘤细胞SP2/0,保证细胞在融 合时正处于对数生长期,活力最好。

[0046] 2)饲养细胞的制备:在融合前一天,取6-8周龄的Balb/c小鼠断颈处死,无菌 操作取腹腔巨噬细胞作为饲养细胞铺6块96孔培养板,100 $\mu$ l/孔。

[0047] 3)细胞融合:冲击免疫后3天进行融合。取免疫小鼠的脾脏通过碾磨过滤获得 脾 细胞,并收集体外培养骨髓瘤细胞SP2/0。用无血清培养基洗涤细胞2~3次,将脾 细胞与瘤 细胞按5~10:1的比例混合离心,去上清,在手心中轻磕以充分敲散混合细 胞;将离心管放 置提前准备好的37℃的水浴瓶中,向混合细胞中缓慢滴加0.8ml 50% 的PEG<sub>1450</sub>,边加边轻 轻搅拌,1min内加完,将混合细胞轻轻吸入吸管,再缓缓滴入 离心管中,待细胞全部滴完后,用15ml无血清培养基终止PEG的作用。800rpm离心 后弃上清,用适量含HAT培养基重悬 细胞,将融合细胞按100 $\mu$ l/孔加入已铺饲养细 胞的96孔细胞板中,置于37℃,5%CO<sub>2</sub>浓 度的二氧化碳培养箱中进行培养。第6~7 天,用含1×HT培养基进行全量换液。

[0048] 4)阳性细胞株筛选:本发明用间接ELISA筛选与CG具有特异性结合的杂交瘤 细胞 株。间接ELISA具体步骤为:

[0049] ①包被酶标板:用0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液将CG-BSA抗原稀释至2.0 $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ l/孔加至酶标板中,4℃过夜包被酶标板,用0.15M pH7.4含0.05% Tween-20磷酸 盐缓冲 液(PBST)洗板1次;

[0050] ②加细胞培养上清样品:每个细胞孔100 $\mu$ l,加到酶标板中,37℃温育60min, PBST 洗板2次;

[0051] ③加含有高浓度胆酸与甘氨酸小分子的酶标二抗:加入含有终浓度均为 0.1mg/ ml的胆酸与甘氨酸小分子的羊抗鼠-HRP(按照1:5000稀释),100 $\mu$ l/孔,37℃ 温育30min, PBST洗板3次;

[0052] ④加底物显色:加入100 $\mu$ l/孔H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB底物显色液,避光显色5~10min,加50 $\mu$ l/孔2M浓硫酸终止反应,酶标仪测定450nm的吸光值。

[0053] 5) 克隆化与保存:选择吸光值高的阳性细胞株,采用常规的有限稀释法进行克隆,共进行3~4次克隆,最后一次克隆后培养孔阳性率需达到100%,挑取单克隆孔,共获得2株杂交瘤细胞,将单克隆的杂交瘤细胞进行扩大培养,平皿中细胞长至80%~90%汇合度时吹散细胞离心冻存2~3支细胞,1ml/支;采用的冻存方法为常规梯度降温法,细胞分别冻存在-80℃冰箱或液氮中。

[0054] 2.4单克隆抗体制备和检测

[0055] 2.4.1单克隆抗体制备

[0056] 用常规培养液培养上述的杂交瘤细胞,生产单克隆抗体。培养基为含5%~10%胎牛血清的DMEM或RPMI-1640完全培养液,CO<sub>2</sub>浓度为5%,培养至培养基由红色变为黄色,取培养上清,通过离心去除细胞与细胞碎片,用0.45 $\mu$ m或0.22 $\mu$ m孔径的微孔滤膜过滤离心后上清,滤液即为抗甘胆酸的单克隆抗体。也可以采用同系小鼠体内诱生法大量生产单克隆抗体,将一定杂交瘤细胞注入小鼠腹腔中,在注射前1周,腹腔注射0.5ml石蜡油致敏小鼠。这样杂交瘤细胞就在小鼠腹腔中繁殖,大量分泌抗甘胆酸的抗体,6~10d后多次收集腹水,离心除去固体成分,其上清液即含有抗甘胆酸的单克隆抗体。通过辛酸-硫酸铵沉淀法、Protein G亲和层析法或免疫球蛋白的其他纯化方法进一步纯化抗甘胆酸的单克隆抗体。

[0057] 将筛选获得的一株杂交瘤细胞株命名为CG-1H1,分类命名为CG-1H1,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址在北京市朝阳区北辰西路1号院中科院微生物研究所,其菌种保藏编号为:CGMCC NO.17086,保藏日期为2019年1月9日。

[0058] 2.4.2单克隆抗体检测

[0059] 1) 利用间接ELISA检测抗体效价,筛选包被2.0 $\mu$ g/ml抗原CG-BSA时抗体的饱和浓度,具体步骤参照2.3中的4),不同的是在第②步骤中样品不是细胞培养上清,而是初始浓度为10 $\mu$ g/ml的1H1单抗稀释液,3倍比纵向梯度稀释,即分别为10000 ng/ml,3333.3ng/ml,1111.1ng/ml,370.4ng/ml,123.5ng/ml,41.2ng/ml,13.7ng/ml,0ng/ml;第③步骤中样品是单纯的羊抗鼠-HRP;依照结果选择终浓度为370ng/ml的抗体稀释倍数进行下一步的竞争ELISA。

[0060] 2) 利用竞争ELISA检测抗体对甘胆酸的抑制率,具体步骤为:

[0061] ①包被2.0 $\mu$ g/ml抗原CG-BSA酶标板,100 $\mu$ l/孔,4℃过夜包被;

[0062] ②PBST洗板2次,首先加入提前配制好的不同梯度的小分子溶液50 $\mu$ l(初始终浓度为100 $\mu$ g/ml的甘胆酸小分子,10倍比纵向梯度稀释,即分别为100000ng/ml,10000ng/ml,1000ng/ml,100ng/ml,10ng/ml,1.0ng/ml,0.1ng/ml,0ng/ml)然后加入终浓度为370ng/ml的1H1抗体稀释液50 $\mu$ l,37℃温育60min,PBST洗板2次;

[0063] ③加入常规酶标二抗:加入1:5000稀释的羊抗鼠-HRP,100 $\mu$ l/孔,37℃温育30min,PBST洗板3次;

[0064] ④加底物显色:加入100 $\mu$ l/孔H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB底物显色液,避光显色5~10min,加50 $\mu$ l/孔2M浓硫酸终止反应,酶标仪测定450nm的吸光值。结果如表3和图1所示:

[0065] 表3竞争ELISA检测抗体对甘胆酸的抑制率

甘胆酸浓度	吸光值	抑制率
100000 ng/ml	0.063	95.79%
10000 ng/ml	0.069	95.38 %
1000 ng/ml	0.275	81.61 %
[0066]	100 ng/ml	34.85 %
	10 ng/ml	4.01 %
	1.0 ng/ml	-2.88 %
	0.1 ng/ml	9.83 %
	0 ng/ml	0.00 %

[0067] 注:甘胆酸小分子浓度为1μg/ml时,抗体对其的抑制率=(1-(0.275/1.495))\*100%

[0068] 对比例1

[0069] 1、1H1单抗和多抗的发光检测实验对比结果

[0070] 采用化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)对本发明制备的1H1单抗(mAb-1H1)和传统制备的抗甘胆酸多抗(pAb)检测甘胆酸时的相对光单位(relative light unit, RLU)进行检测,检测结果如表4所示;质控品检测结果如表5:

[0071] 表4采用CLIA检测CG的相对光单位(RLU)

甘胆酸浓度 (μg/ml)	mAb-1H1		pAb		
	发光值	抑制率	发光值	抑制率	
[0072]	0	1029057	0.00%	946420	0.00 %
	0.3	717566	30.27%	641042	32.27%
	1.5	313111	69.57%	377309	60.13%
	7.5	61667	94.01%	169256	82.12%
	25	14358	98.60%	83952	91.13%
	50	4808	99.53%	57156	93.96%

[0073] 表5质控品检测

质控品范围	mAb-1H1 检测值	pAb 检测值
Q1 (2.12~3.18)	2.404	2.45
Q2 (8.18~12.26)	9.172	9.6

[0075] 2、交叉反应检测:

[0076] 采用化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)对本发明制备的1H1单抗(mAb-1H1)和传统制备的抗甘胆酸多抗(pAb)的交叉反应性进行检测,结果如下表6所示:

[0077] 表6交叉反应性分析

	交叉反应药物 (50μg/ml)	检测值	
		mAb-1H1	pAb
[0078]	牛黄胆酸钠	0.072	1.38
	胆汁酸盐	0.064	0.11
	脱氧胆酸钠	0.074	0.35
	胆酸钠	0.055	1.63

[0079] 总结：

[0080] 1、采用本发明方法可以提高获得CG抗体的几率，该方法可以应用到其他类似 小分子单抗的研发工作中。

[0081] 2、本发明制备的单抗CG-1H1具有较好的应用潜力，建立竞争ELISA法在检 测100000ng/ml, 10000ng/ml, 1000ng/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml, 0.1ng/ml, 0ng/ml等梯 度稀释的CG校准品时线性好，且交叉反应极低。可以应用到ELISA 法、化学发光法等免疫 检测方法中，检测血清或溶液中CG的含量。

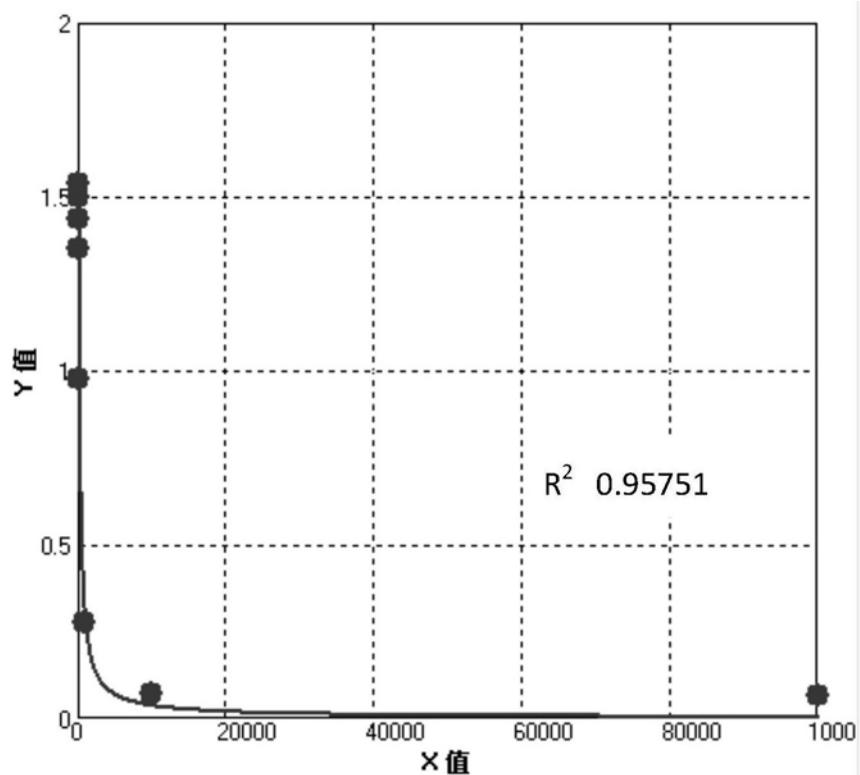


图1

专利名称(译)	抗甘胆酸单克隆抗体及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110563840A</a>	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910273817.9	申请日	2019-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
[标]发明人	王淑红 熊宁		
发明人	王淑红 熊宁		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/20 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/535		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/581		
代理人(译)	余光军		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

**摘要(译)**

本发明公开了一种抗甘胆酸单克隆抗体及其制备方法。本发明通过将高浓度的胆酸和甘氨酸小分子添加至酶标抗体中，若抗体可与小分子结合使抗体的结合位点被占据，从而不再与酶标抗体结合，ELISA试验结果为阴性，排除仅能识别胆酸和甘氨酸的抗体，同时减少阳性细胞株的克隆筛选及腹水制备、纯化等工作，大大提高获得仅识别甘胆酸的单抗细胞株几率。本发明方法在减轻工作量的前提下有效扩大了筛选范围，使获得所需单抗细胞株的几率得到提高。通过所建立的筛选方法本发明获得了1株能够特异性识别甘胆酸的单克隆抗体，解决了多抗批间差异大，重复性差，且成本较高的问题。同时也降低了与其他物质的交叉反应，可用于甘胆酸的ELISA和化学发光法的竞争检测。

