



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106967689 B

(45)授权公告日 2020.06.19

(21)申请号 201710233456.6

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2017.04.11

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106967689 A

CN 103336125 A,2013.10.02,
CN 104418950 A,2015.03.18,
KR 20050024757 A,2005.03.11,
CN 101389654 A,2009.03.18,
US 2017088620 A1,2017.03.30,
CN 104558116 A,2015.04.29,
CN 104808001 A,2015.07.29,

(43)申请公布日 2017.07.21

(83)生物保藏信息
CCTCC NO.C201750 2017.03.29
CCTCC NO.C201751 2017.03.29

Elena Veselkin et al.A Secreted Form of the Asialoglycoprotein Receptor,sH2a, as a Novel Potential Noninvasive Marker for Liver Fibrosis.《PLoS ONE》.2011,第6卷(第11期),

(73)专利权人 江苏为真生物医药技术股份有限公司

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区
星湖街218号纳米科技园C4栋201室

Ron Benyair et al.Constant serum levels of secreted asialoglycoprotein receptor sH2a and decrease with cirrhosis.《World J Gastroenterol》.2011,第17卷(第48期),

(72)发明人 王弢 周小进 曹丽娟 杜帅

(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

李军等.人去唾液酸糖蛋白受体单克隆抗体制备及其初步应用.《第二军医大学学报》.2013,第34卷(第10期),

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/576(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)
G01N 33/532(2006.01)

审查员 梁韶

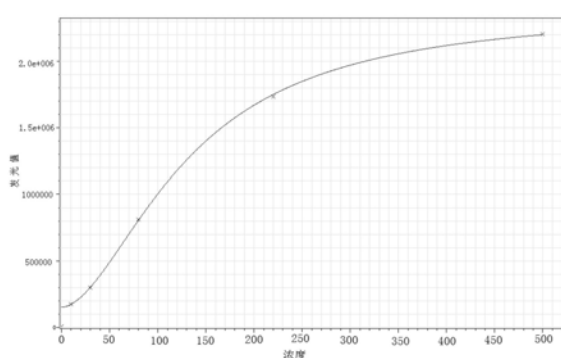
权利要求书1页 说明书11页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞及其单克隆抗体和应用

(57)摘要

本发明公开了一种sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞及其单克隆抗体和应用,其中杂交瘤细胞系包括5A9B8和1F2D2,于(2017年3月29日)保藏于(武汉大学中国典型培养物保藏中心),保藏号分别为CCTCC NO.C201751和CCTCC NO.C201750,该杂交瘤细胞能够分泌sH2a单克隆抗体,能与sH2a重组蛋白特异结合,且效价高,亲和力好,能够用于特异检测sH2a,并用于肝损伤、肝炎、肝纤维化等肝病的辅助诊断。



CN 106967689 B

1. 分泌抗sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞,其特征在於:保藏号为CCTCC NO.C201751的杂交瘤细胞或保藏号为CCTCC NO.C201750的杂交瘤细胞。

2. sH2a单克隆抗体,其特征在於:由权利要求1所述保藏号为CCTCC NO.C201751的杂交瘤细胞或CCTCC NO.C201750的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体。

3. 权利要求2所述sH2a单克隆抗体的应用,其特征在於:所述sH2a单克隆抗体用于制备sH2a检测试剂盒。

4. sH2a检测试剂盒,其特征在於,包含:固相载体、生物素标记的sH2a第一单克隆抗体、酶标记的sH2a第二单克隆抗体、发光底物,所述sH2a第一单克隆抗体和sH2a第二单克隆抗体为所述保藏号为CCTCC NO.C201751的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体或藏号为CCTCC NO.C201750的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体其中一种。

5. 根据权利要求4所述的sH2a检测试剂盒,其特征在於,所述sH2a单克隆抗体,与其免疫结合的抗原选自含有sH2a蛋白或sH2a重组蛋白的被测液,所述被测液为全血、血浆、血清、尿液、唾液、眼泪、胃液或粪便。

6. 根据权利要求5所述的sH2a检测试剂盒,其特征在於,所述的sH2a重组蛋白为sH2a原核细胞重组蛋白或sH2a真核细胞重组蛋白,

编码sH2a原核细胞重组蛋白的核酸序列由如下引物扩增获得:

上游引物序列如SEQ ID No.1:

5' - GGATCCGCACAGCTGCAAGCCGAGCTGCG -3'

下游引物序列如SEQ ID No.2:

5' - GAATTCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGCA -3' ;

编码sH2a真核细胞重组蛋白的核酸序列由如下引物扩增获得:

上游引物序列如SEQ ID No.3:

5' -AGCTTCGAATTCATGGCTGATATCGGATCCTCCCAAAG-3'

下游引物序列如SEQ ID No.4:

5' -GCCCGCGGTACCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGCATTCC-3' 。

7. 根据权利要求4所述的sH2a检测试剂盒,其特征在於:所述固相载体为偶联有链霉亲和素的磁性微粒,所述酶标记的sH2a第二单克隆抗体为碱性磷酸酶标记的抗sH2a单克隆抗体,所述的发光底物为金刚烷衍生物。

8. 根据权利要求7所述的sH2a检测试剂盒,其特征在於,偶联有链霉亲和素的磁性微粒的悬液:生物素标记抗体试剂:碱性磷酸酶标记抗体试剂:金刚烷衍生物发光底物液体积比为3:6:3:20。

9. 根据权利要求7所述的sH2a检测试剂盒,其特征在於:还包括sH2a校准品及质控品,所述sH2a校准品是sH2a真核细胞重组蛋白标准品或sH2a原核细胞重组蛋白标准品,所述sH2a质控品是sH2a真核细胞重组蛋白或原核细胞重组蛋白;所述磁性微粒粒径为0.1-1微米,表面带有氨基或羧基活性基团的超顺磁二氧化硅磁珠。

10. 权利要求2所述的sH2a单克隆抗体在制备检测肝损伤、肝炎或肝纤维化疾病的试剂盒中的用途。

sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞及其单克隆抗体和应用

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白检测技术领域,特别涉及sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞,还涉及由该细胞产生的单克隆抗体和单克隆抗体的应用。

背景技术

[0002] 人唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)仅在肝细胞中表达且负责脱唾液酸糖蛋白从血浆中清除。ASGPR由两个相关的氨基酸序列亚基H1(46KD)和H2(50KD)组成,H2a和H2b为ASGPR的H2亚基两个可变剪接体。H2a和H2b仅在紧邻跨膜片段的外胞质结构域中额外五肽结构上有区别,研究显示,sH2a在紧邻五肽处裂解为35KD的片段,包括完整的胞外域,为分泌性的,组成受体的可溶形式(sH2a),申请号200480013005.2的专利公开sH2a用作肝病诊断的标记物,申请号201310062296.5的专利公开了一种sH2a定量检测试剂盒,申请号201410042011.6的专利公开一种血清sH2a含量的时间分辨免疫荧光分析法及检测试剂盒,但这些现有技术或多或少都存在一些问题,例如使用的抗体不够高效,效价不高,检测的方法和配套的试剂盒灵敏度、特异性等方面还存在着不足。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发其中一个明的目的在于提供适用于sH2a检测的单克隆抗体杂交瘤细胞,本发明提供的单克隆抗体杂交瘤细胞能够分泌效价高特异性好sH2a单克隆抗体,本发明提供的sH2a单克隆抗体效价高,特异性好。本发明的sH2a单克隆抗体特别适于应用于血清sH2a含量的磁微粒化学发光法检测试剂盒,该试剂盒使用本发明提供的两种sH2a单克隆抗体,并且结合磁微粒法化学发光法,具有线性范围宽、稳定性好、灵敏度高、特异性强、准确度高、检测时间短等优点。

[0004] 为实现上述技术方案,提供如下技术方案:

[0005] 1.分泌抗sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞,保藏号为CCTCC NO.C201751的杂交瘤细胞或保藏号为CCTCC NO.C201750的杂交瘤细胞。

[0006] 2.sH2a单克隆抗体,由所述保藏号为CCTCC NO.C201751的杂交瘤细胞或CCTCC NO.C201750的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体。

[0007] 3.所述sH2a单克隆抗体的应用,所述sH2a单克隆抗体用于制备sH2a检测试剂盒。

[0008] 4.sH2a检测试剂盒,包含:固相载体、生物素标记的sH2a第一单克隆抗体、酶标记的sH2a第二单克隆抗体、发光底物。

[0009] 本发明试剂盒相比酶联免疫法和时间分辨免疫荧光法具有以下优势:

[0010] a.将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,提供了一种液相的反应体系,使反应更充分和迅速,反应时间大大缩短,能快速、高通量检测大批样品。

[0011] b.采用化学发光底物液,具有更高的检测灵敏度,而且线性范围更宽。

[0012] c.使用高特异性的单克隆抗体,使免疫反应的亲和力更高,而且单抗的生产批间差异相对较小,更容易保证产品的批间稳定。

[0013] d. 主要试剂以工作液的形式提供, 检验方法方便易行, 减少人为操作误差, 具有的更高的准确度和灵敏度, 达到了较佳的性能参数。

[0014] 本发明提供了一种用于定量检测sH2a的试剂盒, 包括: 偶联有链霉亲和素的磁性微粒; 生物素标记的sH2a第一单克隆抗体; 酶标记的sH2a第二单克隆抗体; sH2a校准品和/或sH2a质控品、金刚烷衍生物发光底物。

[0015] 在一种实施方式中, 上述试剂盒中, 所述sH2a第一单克隆抗体和所述sH2a第二单克隆抗体不同, 两者之一是单克隆抗体5A9B8或者单克隆抗体1F2D2, 其中单克隆抗体5A9B8是保藏号为CCTCC NO.C201751的杂交瘤细胞分泌的人sH2a特异性单克隆抗体; 单克隆抗体1F2D2是保藏号为CCTCC NO.C201750的杂交瘤细胞分泌的人sH2a特异性单克隆抗体。

[0016] 在一种优选的实施方式中, 上述试剂盒中的所述sH2a第一单克隆抗体与所述sH2a第二单克隆抗体不同, 生物素标记sH2a第一单克隆抗体为抗1F2D2单抗, 碱性磷酸酶标记的sH2a第二单克隆抗体为抗5A9B8单抗。经测定, 单克隆抗体5A9B8和单克隆抗体1F2D2的效价均达 $1:10^8$ 以上。此外, 也可用生物素标记抗5A9B8单抗, 碱性磷酸酶标记抗1F2D2单抗, 效价试验效果验证差异不大。

[0017] 在一种优选的实施方式中, 与sH2a单克隆抗体免疫结合的抗原选自含有sH2a蛋白或sH2a重组蛋白的被测液, 被测液为全血、血浆、血清、尿液、唾液、眼泪、体液、胃液或粪便。

[0018] 在一种优选的实施方式中, sH2a重组蛋白为sH2a原核细胞重组蛋白或sH2a真核细胞重组蛋白,

[0019] 编码sH2a原核细胞重组蛋白的核酸引物序列:

[0020] 上游引物序列如SEQ ID No.1:5' -GGATCCGCACAGCTGCAAGCCGAGCTGCG-3'

[0021] 下游引物序列如SEQ ID No.2:5' -GAATTCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGCA-3' ;

[0022] 编码sH2a真核细胞重组蛋白的核酸引物序列:

[0023] 上游引物序列如SEQ ID No.3:

[0024] 5' -AGCTTCGAATTCATGGCTGATATCGGATCCTCCCAAAG-3'

[0025] 下游引物序列如SEQ ID No.4:

[0026] 5' -GCCCCGGTACCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGCATTCC-3' 。

[0027] 在一种实施方式中, 上述试剂盒中的sH2a校准品和sH2a质控品是真核细胞表达的重组sH2a蛋白或原核细胞表达的重组sH2a蛋白。比如sH2a校准品或sH2a质控品可以为通过将重组质粒转染到真核细胞, 培养后收集阳性细胞上清, 分离出真核表达的sH2a蛋白; 也可以通过基因工程的手段及大肠杆菌表达系统获得的原核sH2a蛋白,

[0028] 编码sH2a原核细胞重组蛋白的核酸序列由如下引物扩增获得:

[0029] 上游引物序列如SEQ No.1:5' -GGATCCGCACAGCTGCAAGCCGAGCTGCG-3'

[0030] 下游引物序列如SEQ No.2:5' -GAATTCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGCA-3' ;

[0031] 编码sH2a真核细胞重组蛋白的核酸序列由如下引物扩增获得:

[0032] 上游引物序列如SEQ No.3:

[0033] 5' -AGCTTCGAATTCATGGCTGATATCGGATCCTCCCAAAG-3'

[0034] 下游引物序列如SEQ No.4:

[0035] 5' -GCCCCGGTACCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGCATTCC-3' 。

[0036] sH2a校准品可用于制作标准曲线, 从而使得sH2a检测量化。

[0037] 在一种优选的实施方式中,偶联有链霉亲和素的磁性微粒的悬液:生物素标记抗体试剂:碱性磷酸酶标记抗体试剂:金刚烷衍生物发光底物液体积比为3:6:3:20。

[0038] 在一种优选的实施方式中,上述试剂盒中的固相载体为表面带有氨基或羧基活性基团的超顺磁二氧化硅磁珠。磁性微粒呈磁珠悬液形式,即链霉亲和素磁珠悬液作为磁分离试剂。

[0039] 在一种优选的实施方式中,所述磁性微粒是表面带有活性基团、以二氧化硅为内核的聚合物。所述活性基团可以是氨基、羧基、IDA(亚氨基二乙酸)、环氧基等,优选氨基或羧基。

[0040] 在一种优选的实施方式中,磁性微粒的粒径通常是0.1-1微米,表面带有氨基或羧基活性基团的超顺磁二氧化硅磁珠。磁性微粒的平均粒径可以为0.2-5微米,优选0.2-3微米、更优选0.5-1微米。如果平均粒径小于0.1微米,则价格过高,并可能造成上述免疫复合物的分离困难,可能影响sH2a含量的测定精确性;另一方面,如果平均粒径大于1微米,则不利于检测体系形成接近均相的反应体系,进而可能影响到sH2a含量的测定精确性。

[0041] 本发明的试剂盒中的sH2a检测体系采用酶催化的底物化学发光法,从而通过进行光电信号检测而确定样品中的sH2a含量。

[0042] 在一种实施方式中,上述试剂盒中的酶优选是过氧化物酶、碱性磷酸酶,更优选的是碱性磷酸酶。

[0043] 碱性磷酸酶的作用底物为能发生化学发光的(金刚烷)-1,2-二氧乙烷及其衍生物,可以选自下组:3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐(AMPPD)、CSPD、3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷(CDP-Star)、ADP-Star。优选是AMPPD。

[0044] 本发明将化学发光和磁性微粒结合起来,提供了一种接近均相的反应体系,可以定量检测出sH2a含量。与现有技术相比,本发明的试剂盒具有操作过程简单、反应时间短、检测限低、灵敏度高等诸多优点,在临床检验中可以根据sH2a的含量进行肝损伤、肝炎、肝纤维化等肝病的辅助诊断。

[0045] 在本发明中,术语“磁性微粒”、“磁微粒”、“磁珠”和“磁性颗粒”表示相同的意义,都是指用于将亲和素、生物素、抗原/抗体、酶、核酸/寡核苷酸、小分子药物等固定在其表面的具有超顺磁性的胶态复合材料,可均匀分散于一定基液中,在磁场中富集。

附图说明

[0046] 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:

[0047] 图1为sH2a基因片段PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图,其中M为DNA分子量标准,1为阴性对照,2和3为PCR扩增产物。

[0048] 图2为IPTG诱导的pET30a-sH2a转化BL21(DE3)细菌裂解上清的SDS-PAGE图,1为蛋白Marker,2为未诱导的细菌裂解液,3、4、5为1mM IPTG诱导表达的细菌裂解上清。

[0049] 图3为真核细胞表达蛋白的SDS电泳图,1为蛋白Marker,2和3分别为空载体转染细胞上清和裂解液,4和5分别为表达载体转染细胞上清和裂解液。

[0050] 图4为sH2a原核重组蛋白的western blotting图,其中1为纯化后的sH2a原核重组

蛋白,2为未诱导表达的阴性对照。

[0051] 图5为本发明血清sH2a含量的磁微粒化学发光法的sH2a标准曲线图。

[0052] 图6为以肝硬化患者血清组和正常人血清组测定结果绘制的ROC曲线图。

[0053] 生物材料保藏

[0054] 本发明中杂交瘤细胞株5A9B8和杂交瘤细胞株1F2D2送中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号分别为CCTCC NO.C201751和CCTCC NO.C201750,地址位于中国武汉武汉大学,保藏日期均为2017年3月29日,分类命名为杂交瘤细胞株5A9B8和杂交瘤细胞株1F2D2。

具体实施方式

[0055] 下面将结合附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件进行。

[0056] 材料和试剂:

[0057] 磁性微粒,为磁微粒悬液,浓度为1mg/mL,磁微粒含羧基活性基团,每毫克(mg)磁微粒羧基含量不低于0.05毫摩尔(mmol)。购自河南惠尔纳米科技(生物)有限公司,型号:HRCZ-04N200。

[0058] 活化辣根过氧化物酶(HRP)标记试剂盒,购自北京泰天河生物科技有限公司,型号:MD010A。

[0059] 碱性磷酸酶购自日本Dojindo公司型号:LK12。

[0060] 2-吗啉乙磺酸一水合物(MES):购自上海芃硕生物科技有限公司,货号:PM105074-500g。

[0061] 碳二亚胺(EDC):购自北京华迈科生物技术有限责任公司,货号:E046101。

[0062] 吐温-20:购自生工生物工程(上海)股份有限公司,货号:T0777-500ml。

[0063] Proclin 300:购自闪晶生物公司,型号:ZB116。

[0064] 磁力架,购自Corning公司。

[0065] 化学发光型免疫分析仪,安图生物,型号:LUM0。

[0066] 全自动磁微粒化学发光仪,江苏泽成生物技术有限公司,型号:CIA600。

[0067] 其他化学试剂均为分析纯,均购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

[0068] 实施例1、sH2a重组蛋白的表达、纯化及鉴定

[0069] 1.原核蛋白表达

[0070] 以肝癌组织cDNA为模板,以上游引物5'-GGATCCGCACAGCTGCAAGCCGAGCTGCG-3'(SEQ ID No.1)和下游引物5'-GAATTCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGCA-3'(SEQ ID No.2)为引物,PCR扩增sH2a基因片段(图1),切胶回收纯化后,连接至克隆载体pCR2.1并进行测序鉴定,再将序列鉴定正确的sH2a基因片段克隆至原核表达载体pET30a(+)中,酶切位点为BamH I和EcoR I,获得重组质粒pET30a-sH2a。将重组质粒pET30a-sH2a转化大肠杆菌BL21(DE3),挑取转化成功的克隆,37℃培养至OD600nm值约0.6,加入1mM IPTG继续培养3h诱导目的蛋白表达。诱导结束后,超声裂解菌体,取裂解上清进行SDS-PAGE,同时设立未经IPTG诱导的pET30a空载体转化的裂解上清为对照,结果显示,目的蛋白大小为35KD(图2),与sH2a原核重组蛋白理论值相符。用HIS蛋白纯化柱纯化,获得sH2a原核重组蛋白。

[0071] 2.真核蛋白表达

[0072] 以重组质粒pET30a-sH2a为模板,以上游引物

[0073] 5'-AGCTTCGAATTCATGGCTGATATCGGATCCTCCCAAAG-3' (SEQ ID No.3) 和下游引物 5'-GCCCCGGTACCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGCATTCC-3' (SEQ ID No.4) 为引物,PCR扩增sH2a基因片段,连接至真核表达载体pEGFP-N1并进行测序鉴定,酶切位点为EcoRI和KpnI,获得重组质粒pEGFP-N1-sH2a。将重组质粒pEGFP-N1-sH2a用Lip2000脂质体瞬时转染293T细胞,72h后收取细胞上清和细胞沉淀,细胞裂解液裂解细胞,取细胞表达上清和细胞裂解上清进行SDS-PAGE,同时设立pEGFP-N1空载体转染的细胞上清和裂解上清为对照,结果显示,目的蛋白大小为35KD(图3),与sH2a重组蛋白理论值相符。用HIS蛋白纯化柱纯化,获得sH2a重组蛋白。

[0074] 3. sH2a蛋白活性鉴定

[0075] 用western blotting方法对sH2a原核重组蛋白的活性进行鉴定。将重组蛋白进行SDS-PAGE,利用转印仪将目的条带转印到NC膜上,用含有1%BSA的磷酸盐缓冲液于4℃封闭过夜,再用含0.5%Tween20的磷酸盐缓冲液洗膜,再加入鼠抗人sH2a抗体于37℃振荡温育2小时,洗膜后再加入抗鼠IgG酶标二抗振荡温育1小时,最后洗膜、ECL显色,结果显示,在目的蛋白相应位置处有明显的特异性条带(图4),而在对照相应位置处无条带,证明所得sH2a重组蛋白具有良好的生物学活性。

[0076] 实施例2、抗sH2a单克隆抗体的制备

[0077] 1、抗原免疫小鼠

[0078] 取6周龄BALB/c雌性小鼠2只,按照以下步骤进行免疫:

[0079] 首次免疫:将sH2a原核重组蛋白溶液与弗式完全佐剂按体积比1:1混合,充分乳化后,于小鼠背部皮下分两点注射0.1ml (sH2a重组蛋白30μg/只);

[0080] 第二次免疫:间隔14天后,将sH2a重组蛋白溶液与弗式不完全佐剂按体积比1:1混合,充分乳化后,于小鼠两侧腹股沟部皮下分点共注射0.1ml (sH2a重组蛋白50μg/只);

[0081] 第三次免疫:间隔14天后,将sH2a重组蛋白溶液与弗式不完全佐剂按体积比1:1混合,充分乳化后,于小鼠两侧肩背部及腹部皮下分点共注射0.1ml (sH2a重组蛋白50μg/只);

[0082] 末次免疫:间隔10天后,尾静脉采血ELISA检测血清效价,达到1:10000(表1)后加强免疫(吸光度值明显大于空白),于小鼠腹腔注入sH2a重组蛋白溶液0.1ml (sH2a重组蛋白50μg/只)。

[0083] 表1鼠抗血清效价测定

效价 组别	空白	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:160000	1:320000	1:640000
[0084] 1号鼠	0.059	3.332	3.049	2.533	1.638	0.944	0.511	0.333
1号鼠	0.062	3.228	3.018	2.419	1.635	0.921	0.469	0.296
2号鼠	0.056	3.216	2.776	2.226	1.499	0.889	0.445	0.238
2号鼠	0.058	3.191	2.754	2.184	1.456	0.863	0.443	0.216

[0085] 2、单克隆抗体的制备

[0086] 末次免疫3天后采血,取脾脏进行细胞融合,利用HAT选择培养基在96孔细胞培养板上选择杂交瘤细胞,并利用间接ELISA方法鉴定产生抗sH2a抗体的细胞。结果获得9株分

泌特异性sH2a抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为2B6C6、4C3E3、5E2G8、1C8F2、4A6B7、3F10B1、3D2C2、1F2D2和5A9B8。利用细胞发酵装置培养获得的杂交瘤细胞株,收集细胞培养上清,用Protein A-Sepharose亲和层析柱从细胞培养上清中分离纯化抗sH2a单抗。

[0087] 3、抗体效价鉴定

[0088] 采用间接法检测单克隆抗体的效价。将sH2a原核重组蛋白包被于固相微孔板,浓度为5ug/ml,每孔100u1,以2%BSA的磷酸盐缓冲液封闭2h,将纯化的单克隆抗体(浓度调整到1mg/ml)以磷酸盐缓冲液先稀释到10000倍,再继续倍比稀释14个浓度,同时以不加抗体的稀释液为空白对照,每孔100u1加入微孔板,37℃反应1h,再加入羊抗鼠酶标二抗(1:5000稀释),37℃反应1h后,检测吸光度值(波长450nm)。吸光度值越大,抗体效价越高。结果显示,2B6C6、5E2G8、3F10B1、1F2D2和5A9B8的效价达到 10^6 以上(表2),可以用于抗体的配对,其中1F2D2和5A9B8可达到 10^8 。

[0089] 表2单克隆抗体效价测定(间接ELISA法)

抗体 稀释比例	抗体								
	2B6C6	4C3E3	5E2G8	1C8F2	1F2D2	4A6B7	3F10B1	5A9B8	3D2C2
[0090] 1:10000	3.221	3.338	3.226	2.865	3.228	2.558	3.213	3.332	2.826
1:20000	2.986	3.215	2.985	2.336	2.872	2.169	3.065	3.017	2.331
1:40000	3.122	2.866	2.866	1.829	3.129	1.338	2.958	3.162	1.732
1:80000	2.659	2.229	3.118	1.013	2.866	0.776	2.936	2.965	1.215
1:160000	2.533	1.853	2.853	0.622	2.681	0.429	2.561	2.821	0.812
1:320000	2.117	1.226	2.336	0.339	2.226	0.215	2.339	2.556	0.553
1:640000	1.844	0.811	2.019	0.156	2.316	0.113	1.881	2.339	0.365
1:1280000	1.228	0.553	1.336	0.102	2.125	0.098	1.336	2.228	0.244
1: 2560000	0.826	0.361	0.869	0.095	1.823	0.068	0.823	2.186	0.158
1: 5120000	0.553	0.165	0.583	0.082	1.022	0.055	0.621	1.622	0.104
[0091] 1: 10240000	0.332	0.115	0.352	0.093	0.761	0.077	0.449	1.087	0.072
1: 20480000	0.265	0.093	0.229	0.068	0.432	0.103	0.318	0.726	0.065
1: 40960000	0.182	0.065	0.186	0.073	0.328	0.086	0.223	0.449	0.063
1: 81920000	0.112	0.058	0.115	0.065	0.273	0.095	0.165	0.321	0.066
1: 163840000	0.103	0.069	0.106	0.082	0.189	0.063	0.105	0.268	0.059
空白	0.068	0.065	0.054	0.076	0.065	0.069	0.073	0.063	0.058

[0092] 将杂交瘤细胞株5A9B8和杂交瘤细胞株1F2D2送中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号分别为CCTCC NO.C201751和CCTCC NO.C201750,地址位于中国武汉武汉大学,保藏日期均为2017年3月29日。

[0093] 实施例3、抗sH2a单克隆抗体的配对筛选

[0094] 1. 抗体配对筛选

[0095] 采用双抗夹心法进行两两配对实验。将上述效价较高的5株抗sH2a单抗分别包被在固相微孔板中,抗体浓度为5ug/ml,100u1/孔,以2%BSA的磷酸盐缓冲液封闭2h,将sH2a

原核重组蛋白稀释到500ng/ml,并继续倍比稀释6个浓度,以稀释液为空白对照,37℃反应1h,加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的除自身以外的其余4株抗sH2a单抗 (1:10000),检测检测吸光度值 (波长450nm)。结果显示,抗sH2a单抗1F2D2和5A9B8配对可以检测到蛋白有明显的浓度梯度,可以用于建立反应体系 (表3)。

[0096] 表3 sH2a配对单抗的筛选 (双抗夹心法)

标准曲线 ng/ml	HRP 标记抗体									
	5E2G8	1F2D2	3F10B1	5A9B8	1F2D2	3F10B1	5A9B8	3F10B1	5A9B8	5A9B8
0	0.059	0.065	0.068	0.103	0.095	0.085	0.093	0.102	0.093	0.085
7.8125	0.063	0.063	0.073	0.112	0.108	0.076	0.108	0.116	0.103	0.105
15.625	0.068	0.069	0.075	0.123	0.113	0.089	0.116	0.118	0.185	0.103
31.25	0.076	0.075	0.086	0.133	0.116	0.094	0.115	0.115	0.332	0.109
62.5	0.103	0.082	0.085	0.136	0.115	0.096	0.125	0.123	0.516	0.119
125	0.082	0.096	0.095	0.128	0.122	0.089	0.122	0.125	0.821	0.126
250	0.079	0.106	0.106	0.142	0.116	0.102	0.132	0.119	1.328	0.125
500	0.086	0.228	0.115	0.148	0.123	0.112	0.128	0.128	2.322	0.129
包被抗体	2B6C6			5E2G8			1F2D2		3F10B1	

[0099] 实施例4、血清sH2a含量的磁微粒化学发光法检测试剂盒的构建

[0100] 1、磁微粒试剂 (链霉亲和素磁珠悬液) 制备

[0101] 链霉亲和素磁珠悬液制备包括如下步骤:

[0102] a. 取50mg (1mg/mL) 粒径为0.3 μ m带有羧基 (或氨基) 的二氧化硅磁珠,磁分离去上清,用0.05mol/L、pH4.5的MES缓冲液清洗3次;

[0103] b. 用5mL的0.1mol/L、pH4.5的MES缓冲液重悬磁微粒,浓度为10mg/mL;

[0104] c. 加入5-7.5mg链霉亲和素,室温搅拌30min;

[0105] d. 加入20-30 μ L新鲜配制的10mg/mL的EDC水溶液,4℃下搅拌过夜;

[0106] e. 磁分离,去上清,用0.01mol/L PBS洗涤3次;

[0107] f. 用含2%BSA的0.01mol/L PBS (pH=7.4) 室温封闭2-3小时;

[0108] g. 用含0.5%BSA的0.01mol/L PBS (pH=7.4) 清洗3次;

[0109] h. 用含2%BSA的0.01mol/L PBS (pH=7.4) 配制成1mg/mL的磁珠悬液,用时轻轻摇匀即得,于4℃冰箱保存。

[0110] 2、生物素标记的sH2a第一单克隆抗体制备

[0111] 生物素标记sH2a第一单克隆抗体为抗1F2D2单抗。

[0112] 生物素标记的sH2a第一单克隆抗体制备包括如下步骤:

[0113] a. 取2mg的1F2D2单克隆抗体,用0.1mol/L、pH9.6碳酸盐缓冲液在2~8℃下搅拌透析6-8小时,中间换一次液;

[0114] b. 按照抗体分子与生物素分子比为1:20的比例在透析后的抗体溶液中加入生物素溶液,并加入DMSO至终浓度为10%,混匀;

[0115] c. 缓慢振荡,37℃避光反应2h;

[0116] d. 加入60-80 μ L的3mol/L乙醇胺溶液,室温避光反应30min;

[0117] f. 用0.01mol/L PBS溶液在2~8℃下搅拌透析,5-6小时换一次液,共换液3~4次;

[0118] g. 向透析后的抗体溶液加入等体积甘油,混匀、分装,使生物素标记的抗1F2D2单

抗终浓度为0.5mg/mL, -20℃保存。

[0119] 3、碱性磷酸酶标记的sH2a第二单克隆抗体制备

[0120] 碱性磷酸酶标记的sH2a第二单克隆抗体为抗5A9B8单抗。

[0121] 碱性磷酸酶标记的sH2a第二单克隆抗体制备包括如下步骤:

[0122] a. 取2.5mg碱性磷酸酶(50IU/mg), 加入200uL含1.25%戊二醛的100mM的PB (pH6.8), 混匀, 室温反应过夜;

[0123] b. 4℃条件下, 电磁搅动, 用50mMPBS (pH7.2) 透析12小时, 换液4次;

[0124] c. 将1.5mg单克隆抗体以50KD的超滤管置换碳酸盐缓冲液 (PH9.6), 超滤后体积为100ul;

[0125] d. 将活化的碱性磷酸酶加入上述抗体溶液中, 混匀, 4℃条件下反应24小时;

[0126] e. 加入10uL 200mM的赖氨酸溶液, 混匀, 室温下反应2小时;

[0127] f. 将上述溶液装入透析袋, 4℃条件下以50mM PBS (pH7.2) 透析12小时, 换液4次;

[0128] g. 将透析后的溶液10,000rpm离心30min, 收集上清, 以体积比1:10加入0.5%BSA, 制备得到碱性磷酸酶标记的抗5A9B8单抗, 抗5A9B8单抗浓度为0.5mg/ml, -20℃保存。

[0129] 4、sH2a校准品和质控品制备

[0130] sH2a校准品制备包括如下步骤:

[0131] a. 将sH2a真核细胞重组蛋白以10mM PBS倍比稀释5个浓度梯度, 采用BCA蛋白定量试剂盒(碧云天)检测sH2a真核细胞重组蛋白浓度为2mg/ml;

[0132] b. 用校准品稀释液将sH2a重组蛋白稀释至各工作浓度点, 分别为0、10ng/ml、30ng/ml、80ng/ml、200ng/ml、500ng/ml, 储存于2-8℃。

[0133] sH2a质控品制备包括如下步骤:

[0134] (1) 将sH2a真核细胞重组蛋白用校准品稀释液配制成100ng/ml的质控品工作浓度, 储存于2-8℃。

[0135] 此外, sH2a校准品和质控品还可选自sH2a原核重组蛋白, 且与真核细胞重组蛋白效果近似。

[0136] 5、校准品稀释液的配制

[0137] 根据配置量, 称取NaCl 8.0g, KCl 0.2g, KH₂PO₄ 0.27g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, BSA10g, 加入0.2ml Proclin3, 蒸馏水定容至1L, 用0.25um水性滤膜, 真空抽滤。

[0138] 6、洗涤浓缩液的配制

[0139] 洗涤浓缩液配制如下:

[0140] a. 试剂称量: 3.425M氯化钠、0.0675M氯化钾、0.05M磷酸二氢钠、0.2M十二水合磷酸氢二钠、3.75%吐温-20, 加入蒸馏水并定容至1L;

[0141] b. 定容后的洗涤液用0.45um水性滤膜, 真空抽滤, 并高压灭菌。

[0142] 7、发光底物液的配制

[0143] 根据配制量, 称取三羟基甲烷 (Tris) 24.23g, 十二烷基磺酸钠 (SDS) 2.0g, 3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠 (AMPPD) 0.1g, 吐温-20 0.5ml, 调pH至9.3±0.2, 加蒸馏水至1L, 过滤。

[0144] 8、试剂盒组分

[0145] 组分如表4所示。

[0146] 表4试剂盒组分

编号	组分	规格 (50人份)
1	链霉亲和素磁珠悬液	1.5ml
2	生物素标记抗体试剂	3ml
3	校准品	0.5ml
4	质控品	0.5ml
5	碱性磷酸酶标记抗体试剂	1.5ml
6	样本稀释液	2ml
7	洗涤浓缩液	25ml
8	碱性磷酸酶发光底物液	10ml
9	说明书	1份

[0148] 9、sH2a试剂盒检测步骤

[0149] 以实施例1-4中所得的试剂、必要的辅助试剂为基础,可组合成试剂盒。按下述步骤绘制sH2a标准曲线并检测样本:

[0150] (1) 将待检试剂盒在室温(18~25℃)下平衡30分钟;

[0151] (2) 配制洗液:用蒸馏水将洗涤浓缩液按1:25稀释(1mL洗液加24mL蒸馏水)。若浓缩洗液有结晶,可将浓缩洗液置于室温或37℃,待结晶溶解后再进行稀释;

[0152] (3) 在反应管中加入25μL待测样本(或校准品及质控品),然后加入50μL生物素标记的sH2a抗体、50μL碱性磷酸酶标记的sH2a抗体,混匀,37℃条件下温育20min;加入20μL链霉亲和素磁珠悬液试剂,混匀,37℃条件下温育15min;

[0153] (4) 洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入300μL的洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清;此步骤重复3-4次;

[0154] (5) 反应管中加入100μL碱性磷酸酶发光底物液,震荡,使磁微粒充分混悬,1min内测定各管的光强度。并拟合出标准曲线,进行样本值的计算,标准曲线见图5。

[0155] 实施例5、血清sH2a检测试剂盒的应用

[0156] 1. 试剂盒性能指标

[0157] 分析灵敏度:对20次零校准品的测定,取其2倍的标准偏差加上平均值在标准曲线上所对应的浓度,即为分析灵敏度,结果 $\leq 1\text{ng/ml}$ (表5);

[0158] 表5试剂盒灵敏度分析

[0159]

批次	1	2	3
	发光值	发光值	发光值
1	19876	32095	20187
2	22003	31987	18765
3	20118	22981	16553
4	18225	28716	25449
5	19674	25004	23885
6	39852	19582	32208
7	21336	52295	51227
8	32933	31521	53392
9	19829	22445	18764
10	51093	26118	28653
11	29872	18762	19851
12	19563	22653	29864
13	31095	21187	32295
14	20826	32297	33928
15	30923	33764	43876
16	30981	52186	45921
17	51069	55215	32965
18	21539	32197	33876
19	22593	33205	34592
20	52839	32198	21876
M	28811.95	31320.4	30906.35
SD	11466.98	10649.28	10897.52
M+2SD	51745.91	52618.95	52701.4
检测限 (ng/mL)	0.16ng/ml	0.17ng/ml	0.17ng/ml

[0160] 精密度:同一批号试剂盒检测高低2个浓度水平(高浓度200ng/ml,低浓度30ng/ml)的样本各10次,批内变异CV%≤10.0%;3个批号试剂盒检测同一样本各10次,批间变异CV%≤15.0%(表6);

[0161] 表6试剂盒精密度

[0162]

检测批次	原始浓度 (ng/ml)	检测浓度 (ng/ml)										CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	30	32.16	31.59	31.62	30.58	29.32	32.18	35.12	32.87	31.45	29.76	5.18%
	200	212.54	223.76	208.59	217.33	195.43	197.65	185.49	217.62	215.44	208.52	5.72%
2	30	29.87	32.19	30.53	28.76	29.84	32.19	31.86	29.73	27.69	32.14	5.20%
	200	208.76	206.52	189.27	192.56	196.37	216.52	208.69	211.51	196.32	186.55	5.13%
3	30	28.27	29.38	32.55	32.68	29.87	29.76	33.86	32.95	28.65	29.33	6.66%

[0163]

	200	215.79	213.64	201.53	187.65	185.44	192.38	195.65	205.64	203.49	206.44	5.14%
--	-----	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------

[0164] 线性系数:r≥0.990;

[0165] 线性范围:0-500ng/ml(表7);

[0166] 表7试剂盒线性范围

[0167]

标准品 (ng/ml)	1	2	3
0	9539	13321	12865
10	594117	395438	396752
30	985447	686437	726328
80	1857896	1258732	1285432
200	2530025	2131548	2454906

500	3595034	3284029	3317655
相关系数R	0.996	0.998	0.995

[0168] 特异性:分别检测了甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA)、糖类抗原15-3 (CA15-3) 在高浓度下的交叉反应,结果均<1ng/ml,基本没有干扰(表8)。

[0169] 表8试剂盒特异性

[0170]	潜在交叉反应物	检测结果	干扰性
	甲胎蛋白 (AFP) 200ng/ml	0.36ng/ml	<0.1%
	癌胚抗原 (CEA) 150ng/ml	0.29ng/ml	<0.1%
	糖类抗原15-3 (CA15-3) 5000U/ml	0.16ng/ml	<0.1%

[0171] 2. 临床应用

[0172] 从浙江省第一人民医院收集正常人和肝硬化患者的血清样品各100例,使用本发明血清sH2a含量的磁微粒化学发光法及其检测试剂盒,分别检测肝硬化患者和正常人血清中的sH2a含量。结果显示,正常人血清中的sH2a平均含量约为47ng/ml,肝硬化患者血清中的sH2a含量约为123ng/ml,显著高于正常人血清中的sH2a含量。对肝硬化患者血清组和正常人血清组测定结果进行分析,绘制ROC曲线,显示用于区分肝硬化患者与正常人的截断点 (cut-off point) 值为87ng/ml,ROC曲线下面积为0.939,诊断灵敏度为85%,特异性为95%,(图6) 检测样本的反应时间仅需30min左右。而申请号201410042011.6的专利公开一种血清sH2a含量的时间分辨免疫荧光分析法及检测试剂盒的抗体效价为1:16000,ROC曲线下面积为0.845,诊断灵敏度为75%,特异性为95.7%,检测样本的反应时间需2.5h,可见,本发明试剂盒在抗体效价和诊断灵敏度、检测时间方面具有明显优势。

[0173] 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。

- [0001] <110> 江苏为真生物医药技术股份有限公司
- [0002] <120> sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞及其单克隆抗体和应用
- [0003] <160> 4
- [0004] <210> 1
- [0005] <211> 29
- [0006] <212> DNA
- [0007] <213> 人工序列
- [0008] <220>
- [0009] <223> 扩增sH2a基因片段的上游引物
- [0010] <400> 1
- [0011] ggatccgcac agctgcaagc cgagctgcg 29
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 28
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <220>
- [0017] <223> 扩增sH2a基因片段的下游引物
- [0018] <400> 2
- [0019] gaattctcag gccacctcgc cgggtggca 28
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 38
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列
- [0024] <220>
- [0025] <223> 扩增sH2a基因片段的上游引物
- [0026] <400> 3
- [0027] agcttcgaat tcatggctga tateggatcc tcccaaag 38
- [0028] <210> 4
- [0029] <211> 38
- [0030] <212> DNA
- [0031] <213> 人工序列
- [0032] <220>
- [0033] <223> 扩增sH2a基因片段的下游引物
- [0034] <400> 4
- [0035] gcccgcggta cctcaggcca cctcgccggt ggcattcc 38

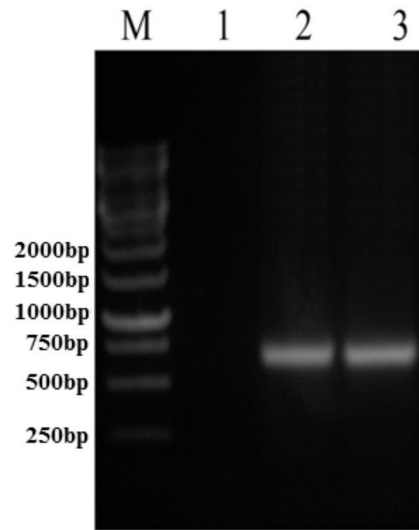


图1

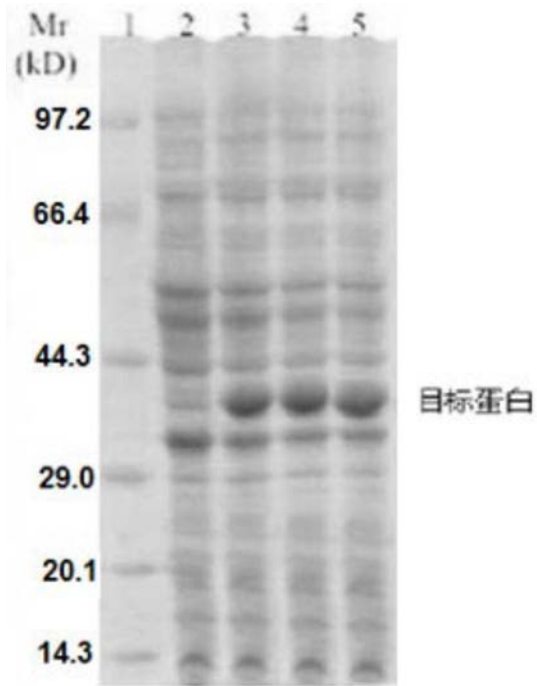


图2

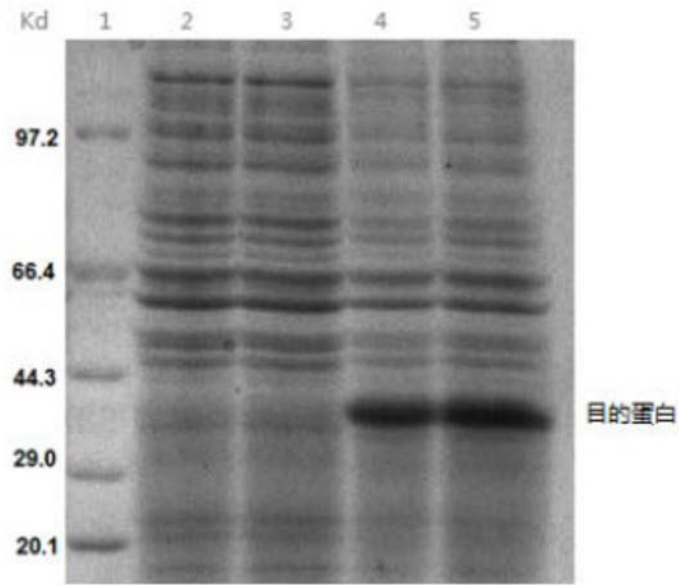


图3

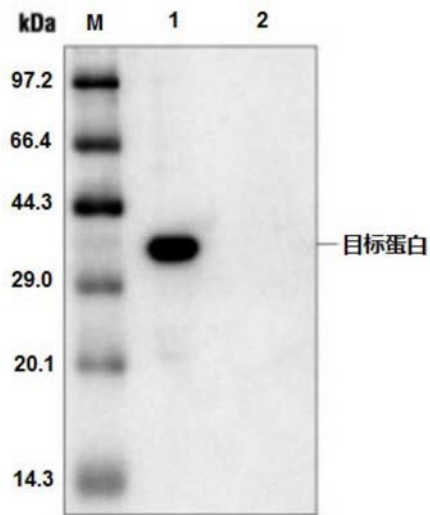


图4

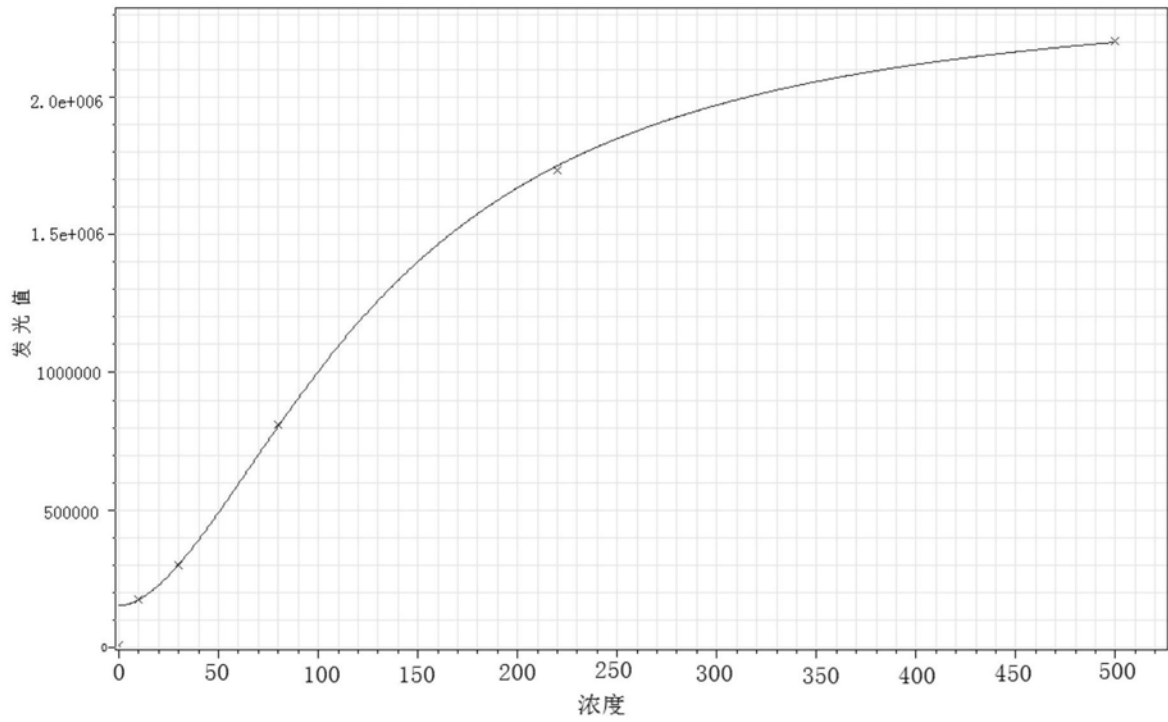


图5

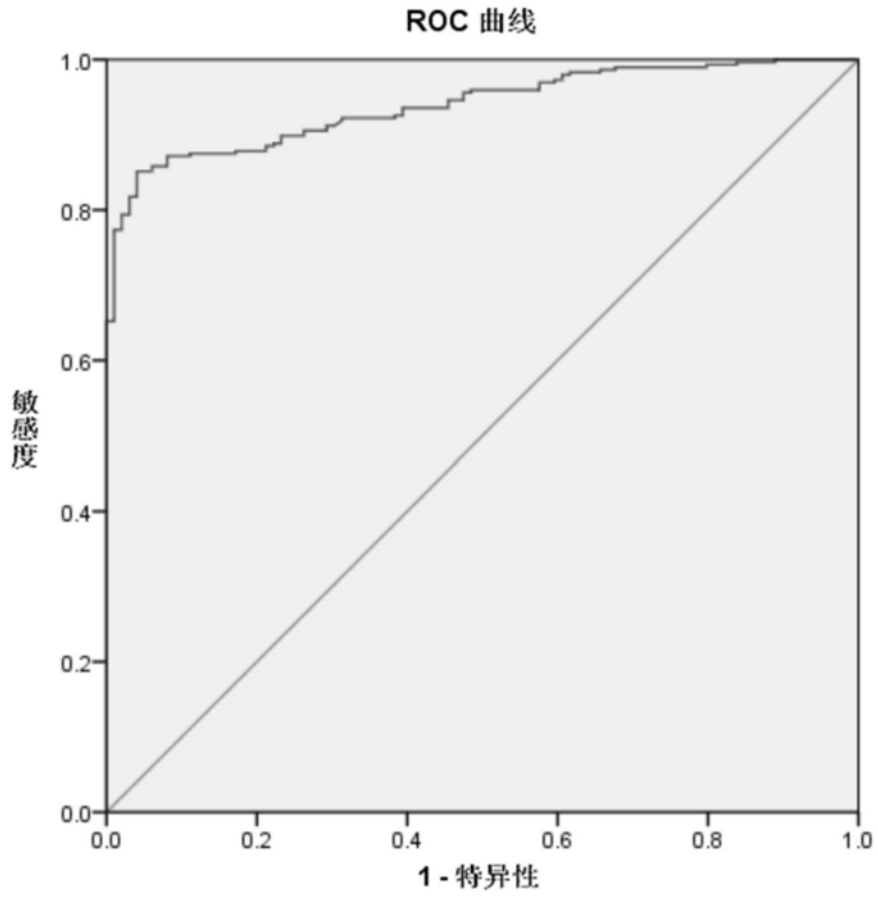


图6

专利名称(译)	sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞及其单克隆抗体和应用		
公开(公告)号	CN106967689B	公开(公告)日	2020-06-19
申请号	CN201710233456.6	申请日	2017-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	江苏为真生物医药技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏为真生物医药技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏为真生物医药技术股份有限公司		
[标]发明人	王弢 周小进 曹丽娟 杜帅		
发明人	王弢 周小进 曹丽娟 杜帅		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/28 G01N33/577 G01N33/576 G01N33/535 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/2851 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/576 G01N33/577 G01N2800/085		
其他公开文献	CN106967689A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种sH2a单克隆抗体杂交瘤细胞及其单克隆抗体和应用，其中杂交瘤细胞系包括5A9B8和1F2D2，于(2017年3月29日)保藏于(武汉大学中国典型培养物保藏中心)，保藏号分别为CCTCC NO.C201751和CCTCC NO.C201750，该杂交瘤细胞能够分泌sH2a单克隆抗体，能与sH2a重组蛋白特异结合，且效价高，亲和力好，能够用于特异检测sH2a，并用于肝损伤、肝炎、肝纤维化等肝病的辅助诊断。

