



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117700556 B

(45) 授权公告日 2024.04.12

(21) 申请号 202410160012.4

C12N 5/20 (2006.01)

(22) 申请日 2024.02.05

C12N 15/13 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/574 (2006.01)

申请公布号 CN 117700556 A

G01N 33/577 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.03.15

(56) 对比文件

(73) 专利权人 苏州百道医疗科技有限公司

CN 104755498 A, 2015.07.01

地址 215028 江苏省苏州市自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区兴浦路333号苏州纳米城II区纳米健康产业园1栋205室

CN 105814079 A, 2016.07.27

CN 107011439 A, 2017.08.04

CN 110294805 A, 2019.10.01

CN 112794911 A, 2021.05.14

专利权人 中南大学湘雅医院  
湘雅常德医院

唐欣月等. 靶向叶酸受体  $\alpha$  的抗体偶联物治疗卵巢癌研究进展. 《现代妇产科进展》. 2022, 第31卷(第7期), 第545-547页.

(72) 发明人 彭劲武 肖目张 康繁华 刘杨  
张东旭

徐晓竹等. 靶向叶酸受体  $\alpha$  抗体药物的临床研究进展. 《中国生物制品学杂志》. 2020, 第33卷(第11期), 第1321-1325页.

(74) 专利代理机构 北京上璟知识产权代理事务所(普通合伙) 16213

审查员 田晓蓉

专利代理师 韩国胜

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

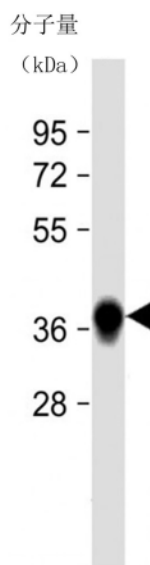
权利要求书1页 说明书7页  
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种抗FR  $\alpha$  小鼠单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种抗FR  $\alpha$  小鼠单克隆抗体及其应用, 包括重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No. 4所示; 所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No. 5所示。相比市售的抗FR  $\alpha$  单克隆抗体, 本发明提供的抗FR  $\alpha$  小鼠单克隆抗体, 与FR  $\alpha$  蛋白具有高亲和力, 可高特异性和高灵敏度地识别和检测肿瘤细胞上FR  $\alpha$  蛋白的表达, 可应用于免疫组织化学、间接ELISA、免疫印记、抗体芯片制备等检测与筛查领域, 有利于获得更准确的检测和评估结果, 并降低检测成本和背景信号的干扰。



1. 一种抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体,其特征在于,包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.4所示;所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.5所示。

2. 编码基因,其特征在于,用于编码权利要求1所述的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的编码基因,其特征在于,其包括:如SEQ ID No.2所示的DNA序列,以用于编码所述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的重链可变区,以及如SEQ ID No.3所示的DNA序列,以用于编码所述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的轻链可变区。

4. 一种核酸分子,其特征在于,其含有权利要求2或3所述的编码基因。

5. 一种表达载体或重组质粒,其特征在于,其含有权利要求4所述的核酸分子。

6. 一种抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的制备方法,其特征在于,其采用权利要求5所述的表达载体或重组质粒对细胞进行转染,转染后继续培养细胞,收集细胞上清液并纯化,得到所述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体。

7. 权利要求1所述的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体、权利要求2或3所述编码基因、权利要求4所述的核酸分子、权利要求5所述的表达载体或重组质粒在制备FR $\alpha$ 检测试剂盒中的应用。

8. 一种FR $\alpha$ 检测试剂盒,其特征在于,其包括权利要求1所述的一种抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体和免疫组织化学检测试剂。

9. 根据权利要求8所述的FR $\alpha$ 检测试剂盒,其特征在于,其包括:抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体、HRP酶标二抗、EDTA修复液、过氧化氢酶封闭液、DAB浓缩液、DAB缓冲液、苏木素和返蓝液。

## 一种抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学技术领域,尤其涉及一种抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体及其应用,特别是在免疫组织化学检测方面的应用。

### 背景技术

[0002] 叶酸受体 $\alpha$ (Folate receptor alpha,FR $\alpha$ )是一种分子量大小约为38kDa的糖蛋白,是高亲和力FRs家族成员之一。FR $\alpha$ 在正常细胞中几乎不表达,只有肺、肾和脉络丛上皮细胞有一定比例的表达,在实体瘤中有广泛高表达,比如间皮瘤,三阴性乳腺癌,卵巢癌,非小细胞肺癌。叶酸受体 $\alpha$ (FR $\alpha$ )参与调控肿瘤细胞的增殖和转移,且在某些癌症的恶性组织中过表达,使FR $\alpha$ 对靶点药物治疗的预后有着重要的指导意义。因此筛选一株高灵敏度、强特异性的抗FR $\alpha$ 抗体,对识别和检测肿瘤细胞FR $\alpha$ 蛋白的表达具有非常重要的作用。

### 发明内容

[0003] (一)要解决的技术问题

[0004] 鉴于现有技术的上述缺点、不足,本发明提供一种应用广泛,并能准确识别FR $\alpha$ 表达的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体,经过多种不同组织的免疫组织化学检测发现,该抗体可以很好的检测到肿瘤细胞上FR $\alpha$ 蛋白的表达,可应用于免疫组织化学(IHC)、间接ELISA、免疫印记(Western blotting)、抗体芯片制备等检测与筛查领域。本发明还涉及编码该抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的核苷酸序列、重组质粒或表达载体、制备方法及抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体在FR $\alpha$ 蛋白检测方法或装置中的应用等。

[0005] (二)技术方案

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用的主要技术方案包括:

[0007] 第一方面,本发明提供一种抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体,其包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.4所示;所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.5所示。

[0008] 该抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体(FR $\alpha$ 鼠源抗体)可用于免疫组织化学检测,能高特异性和高灵敏度地识别和检测肿瘤细胞或免疫细胞上FR $\alpha$ 蛋白的表达。

[0009] 所述抗FR $\alpha$ 单克隆抗体由哺乳动物细胞重组表达获得。具体地,本发明提供的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体是通过鼠杂交瘤融合筛选,293细胞真核表达产生。在制备所述抗FR $\alpha$ 单克隆抗体时,免疫BALB/c小鼠用的抗原为合成多肽,所述合成多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,其由人工化学合成得到。免疫后,经细胞融合、克隆筛选,获得可高效分泌单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞系,并使用分子克隆技术获得编码所述抗体的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列的核苷酸序列,将核苷酸序列构建在真核表达载体上,通过转染试剂转染到293细胞系,收集细胞上清,经Protein G柱亲和层析纯化细胞上清,获得鼠单克隆抗体。免疫组织化学检测显示该抗体能特异性识别FR $\alpha$ 蛋白。

[0010] 所述抗FR $\alpha$ 单克隆抗体能够识别重组FR $\alpha$ 抗原蛋白和肿瘤细胞和免疫细胞上的FR $\alpha$

分子;所述抗FR $\alpha$ 单克隆抗体还可以应用在免疫组化病理诊断剂中。

[0011] 第二方面,本发明提供编码基因,用于编码上述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体。

[0012] 优选地,所述编码基因包括如SEQ ID No.2所示的DNA序列,用于编码所述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的重链可变区;以及如SEQ ID No.3所示的DNA序列用于编码所述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的轻链可变区。

[0013] 第三方面,本发明涉及一种核酸分子,其包括用于编码所述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的编码基因。

[0014] 第四方面,本发明保护一种表达载体或重组质粒,其包括上述的核酸分子。

[0015] 第五方面,本发明提供一种抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的制备方法,采用上述表达载体或重组质粒转染细胞,培养转染后的细胞,收集细胞上清液并纯化,得到所述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体。

[0016] 更优选地,所述制备方法包括如下步骤:

[0017] (1) 免疫动物:先对FR $\alpha$ 蛋白分子序列进行分析,依据FR $\alpha$ 的结构、抗原性、组成氨基酸的亲疏水性以及二级结构,选择和使用合适的多肽序列作为免疫原,经由KLH或OVA偶联后作为免疫原,免疫小鼠;所述多肽为SEQ ID No.1所示的人工合成多肽;

[0018] (2) 制备杂交瘤细胞系:取免疫小鼠淋巴细胞经细胞融合、克隆筛选,获得可高效分泌抗体的阳性杂交瘤稳定细胞系,从杂交瘤细胞系中分离出总RNA;

[0019] (3) 获得抗体序列:将总RNA逆转录成cDNA,利用特异性的引物,通过PCR扩增技术获得抗体重链可变区和抗体轻链可变区的核苷酸序列;

[0020] (4) 抗体表达和纯化:将所述核苷酸序列克隆至表达载体中,使用转染方法瞬时转染培养的细胞,培养后收集上清,使用Protein G纯化上清液,得到纯度>95%的抗体。

[0021] 第六方面,所述的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体、编码基因、核酸分子、表达载体或重组质粒在制备FR $\alpha$ 蛋白分子检测装置中的应用。所述检测装置包括但不限于试剂盒、抗体芯片等。

[0022] 第七方面,本发明还提供一种FR $\alpha$ 检测试剂盒,其包括上述的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体和免疫组织化学检测试剂。

[0023] 优选地,所述FR $\alpha$ 检测试剂盒包括:抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体、HRP酶标二抗、EDTA修复液、过氧化氢酶封闭液、DAB浓缩液、DAB缓冲液、苏木素和返蓝液。

[0024] 在进行免疫组织化检测时,检测步骤包括脱蜡、抗原修复、内源性过氧化物酶失活、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB显色、复染、脱水、封片和镜检等。

[0025] (三) 有益效果

[0026] 本发明提供的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体单克隆抗体,与FR $\alpha$ 蛋白分子的结合具有高特异性和高灵敏度,能够特异性地识别和检测细胞上FR $\alpha$ 蛋白的表达,在检测FR $\alpha$ 蛋白时呈阳性高表达,因此该抗体可应用于免疫组织化学(IHC)、间接ELISA、免疫印记(Western blotting)、抗体芯片制备、流式细胞术等检测与筛查领域,有利于获得准确的评估和检测结果。本发明的436I6G8克隆的FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体单克隆抗体由于其特异性好,阳性信号强等特点,在IHC染色中评分更容易,对于检测区分癌症更准确。

## 附图说明

[0027] 图1为本发明制备的436I6G8抗FR $\alpha$ 单克隆抗体和市售抗体在卵巢癌、乳腺癌组织的免疫组化检测结果图,436I6G8抗FR $\alpha$ 单克隆抗体使用浓度为0.5 $\mu$ g/mL;a为436I6G8克隆的FR $\alpha$ 抗体在卵巢癌组织的免疫组化检测结果图,b为市售抗体在卵巢癌组织的免疫组化检测结果图,c为436I6G8克隆的FR $\alpha$ 抗体在乳腺癌组织的免疫组化检测结果图,d为市售抗体在乳腺癌组织的免疫组化检测结果图。

[0028] 图2为本发明的436I6G8抗FR $\alpha$ 单克隆抗体和市售抗体在8个梯度浓度下效价检测的统计图。

[0029] 图3为本发明的436I6G8抗FR $\alpha$ 单克隆抗体作为一抗的免疫印记(Western blotting)检测结果验证其对FR $\alpha$ 蛋白的识别能力。

## 具体实施方式

[0030] 为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合实施例和附图对本发明作进一步地说明。可以理解的是,此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本发明,而非对本发明的限定。

[0031] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。人体组织样本是经过福尔马林固定、石蜡包埋的人体组织样本,均进行了病理证实,并有患者知情同意书。

[0032] 实施例1

[0033] 本实施例为抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的制备和筛选,步骤包括:

[0034] (1) 抗原制备

[0035] 具体序列如下所示的SEQ ID NO:1。

[0036] SEQ ID No. 1:RIAWARTELLNV。

[0037] 上述多肽序列是通过FR $\alpha$ 分子序列进行分析,依据FR $\alpha$ 蛋白分子的结构、抗原性、组成氨基酸的亲疏水性以及二级结构后选择出来的。人工合成SEQ ID NO:1所示序列的多肽,并将合成的多肽作为免疫小鼠用的抗原。免疫时,将SEQ ID NO:1所示序列的多肽经由KLH偶联后作为免疫原免疫小鼠。

[0038] (2) 免疫

[0039] 将SEQ ID NO:1的多肽序列(FR $\alpha$ 抗原)分别与完全弗氏佐剂(1:1)混合并乳化,采用皮下注射方法分别免疫多只BALB/c小鼠,间隔两周后将含有上述序列(SEQ ID NO:1所示的多肽)的FR $\alpha$ 抗原与不完全弗氏佐剂(1:1)乳化进行第二次和第三次免疫。三次免疫后取血以ELISA法梯度稀释测定血清效价;选取与SEQ ID NO:1抗原免疫抗体效价最高的小鼠进行下一步的细胞融合。

[0040] (3) 细胞融合

[0041] 提前准备鼠来源的sp2/0骨髓瘤细胞,使融合时该sp2/0骨髓瘤细胞

[0042] 处于对数生长期。取已免疫小鼠脾脏,制成淋巴细胞单细胞悬液;鼠脾淋巴细胞与所述骨髓瘤细胞混合,滴加50%PEG1500,加入DMEM培养基,离心弃上清后加入HAT培养基轻柔悬浮混匀,定容至800mL后分装于96孔板中,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中进行培养。融

合6-9天后观察96孔板中融合细胞状态,换液用HT继续置于37°C、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养。

[0043] (4) 筛选和克隆

[0044] 融合7-10天后使用FR $\alpha$ 抗原 (SEQ ID NO:1) 进行ELISA测试来筛选克隆细胞。标记好相应细胞株号,对阳性孔细胞进行有限稀释,直至ELISA测定96孔板全板结果为阳性。挑选出阳性值高的单克隆稳定株,得到分泌特异单克隆抗体的杂交瘤细胞株,记录为436I6G8。

[0045] (5) 将筛选好的杂交瘤细胞株进行抗体测序

[0046] 依据试剂TriZol说明书,从436I6G8杂交瘤细胞中分离出总RNA,依据TIANScript第一链cDNA合成试剂盒说明书,将总RNA逆转录成cDNA,利用特异性引物(重链可变区引物, VH-F :GAGGTSCAGCTGCAGCAGYCWGG, VH-R TARCCCTTGACCAGGCATCC;轻链可变区引物:VK-F GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA, VK-R: GGCACCTCCAGATGYTAAGTCTCA)扩增获得抗体重链可变区和抗体轻链可变区的核苷酸序列,然后将抗体重链可变区和抗体轻链可变区的核苷酸序列克隆至真核表达载体 (InvivoGen, pFUSE-CHIg-mG1, pFUSE2-CLIg-mK) 中,准备进行细胞转染。

[0047] (6) 细胞转染与筛选

[0048] 提前准备好待转染用的293细胞,离心换新鲜的培养基后分别放入24孔板中,按所需要的数量每孔1.5ml,密度为3\*10<sup>6</sup>个/ml。

[0049] 将所述真核表达载体与PEI按比例1:6混合后加入到准备好的293细胞中,置于37°C、5%CO<sub>2</sub>的摇床中培养。培养3-5天后将转染的细胞上清与对应抗原进行ELISA检测来筛选阳性孔,再将阳性孔的细胞上清继续进行免疫组织化学法检测,如果免疫组织化学法检测阳性则确认测出的抗体序列正确。

[0050] (7) 细胞上清单抗的制备与纯化

[0051] 将确认阳性的表达载体进行大量的细胞转染,继续培养3-5天后,收取细胞悬液,离心后取上清,利用亲和层析法进行纯化。纯化后的单抗浓度测定、分装、于4-8°C冰箱中保存。

[0052] 最终,436I6G8抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的重链可变区核苷酸序列由SEQ ID No.2所示的DNA序列所编码,抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的轻链可变区核苷酸序列由SEQ ID No.3所示的DNA序列所编码。

[0053] SEQ ID No.2-3具体序列如下:

[0054] SEQ ID No.2:

[0055] GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGTAGAACTTGTGAGGTCAGGGGCCTCAGTCAAAGTGTCTGCAC  
ACCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACTTTATTAAGTGGGTGAAACAGAGGCCTGAGCAGGGCCTGGAGTGGATT  
GGATGGATTGATCCTGAGAATGGTGATACTGAATATGCCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACA  
CATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTATGCTGA  
ACGGGTTGTTTACTGGGGCCAAGGGACACTGATCACTGTCTCTGCA。

[0056] SEQ ID No.3:

[0057] GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGCTTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTG  
CAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATACTAATGGAAAAACCTATTTGAGTTGGTTGTTACAGCGGCCCGCCAGTCT

CCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAA  
CAGATTTTACACTGAAAATCGGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGGTACACATTT  
TCCTCACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA。

[0058] 将获得的碱基序列翻译成氨基酸序列,分析,获得436I6G8抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列为SEQ ID No.4所示,所述抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体的轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID No.5所示。

[0059] SEQ ID No.4-5具体序列如下:

[0060] SEQ ID No.4:

[0061] EVQLQQSGVELVRSGASVKVSCTPSGFNIDYFINWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT EYAPKFQGKA  
TMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCYAERVVYWGQGLITVSA。

[0062] SEQ ID No.5:

[0063] DVVMTQTPLTSLTIGQPASISCKSSQLLYTNGKTYLSWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFT  
GSGSGTDFTLKIGRVEAEDLG VYYCMQGT HFPHTFGGGTKLEIK。

[0064] 实施例2

[0065] 本实施例为抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体作为一抗的免疫组化检测,方法如下:

[0066] (1) 样本切片准备:将经福尔马林固定石蜡包埋后的卵巢癌、乳腺癌组织切片于60℃恒温箱中烤片1-2h,保存备用;

[0067] (2) 切片脱蜡:石蜡切片先置于新鲜二甲苯中进行脱蜡,浸泡2次,每次10 min;

[0068] (3) 切片水化:依次经过无水乙醇,无水乙醇,95%乙醇,85%乙醇,70%乙醇浸泡5分钟进行水化,后纯化水冲洗2次,每次3 min;

[0069] (4) 抗原修复:推荐使用高温热修复法修复3min(如果使用自动修复仪可设置98℃高温修复20 min),切片自然冷却至室温后用免疫组化笔将待测组织圈起来,纯化水冲洗2次,每次3 min;

[0070] (5) 内源性过氧化物酶灭活:滴适量内源性过氧化物酶阻断剂完全覆盖组织,室温孵育10 min后,纯化水冲洗2次,每次3 min,PBST冲洗一次;

[0071] (6) 一抗孵育:加入100 $\mu$ L的0.5 $\mu$ g/mL 436I6G8抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体完全覆盖组织,置于37℃恒温箱中孵育1h,PBST冲洗3次,每次5min;

[0072] (7) 二抗孵育:依照所用二抗染色系统DAB染色液试剂盒的说明书进行二抗孵育,孵育完毕后PBST冲洗片3次,每次5min,纯化水冲洗1次;

[0073] (8) DAB显色:依照所用DAB染色液试剂盒说明书进行配制DAB显色液,滴适量配制好的DAB显色液至完全覆盖组织,待颜色无加深终止染色,纯化水冲洗3次;

[0074] (9) 苏木素复染:依照苏木素厂家说明书操作步骤及建议对切片进行复染,PBST或自来水冲洗返蓝;

[0075] (10) 脱水透明:依次浸泡70%,85%,95%,100%,100%梯度酒精,每次3 min;2次二甲苯透明,每次5 min;

[0076] (11) 封片:用中性树胶对样品进行封片。

[0077] 由图1结果可见,FR $\alpha$ 蛋白在卵巢癌、乳腺癌组织中呈特异性细胞膜染色。本发明的436I6G8克隆的FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体由于其特异性好,阳性信号强等特点,在IHC染色中评分更容易,对于检测区分癌症更准确。

[0078] 实施例3

[0079] 本实施例为对436I6G8抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体亲和力的测定,测定方法如下:

[0080] (1) 从4 $^{\circ}$ C中取出标记好的FR $\alpha$ 的多肽,恢复至室温。稀释至浓度1 $\mu$ g/ml,按100 $\mu$ L/孔加到96孔酶标板上4 $^{\circ}$ C孵育过夜,随后用2% BSA进行4 $^{\circ}$ C封闭过夜;

[0081] (2) 将436I6G8克隆的FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体稀释成初始浓度为0.5 $\mu$ g/mL,并依次进行2倍梯度稀释,共设8个浓度梯度进行对比;

[0082] (3) 将稀释好的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体按照100 $\mu$ L/孔添加至有多肽的96孔酶标板上,盖上封板膜,37 $^{\circ}$ C恒温孵育1h,使反应达到平衡;

[0083] (4) 反应结束后取出酶标板,弃掉液体,纯化水冲洗5次,拍干水分;

[0084] (5) 按照二抗使用说明书稀释HRP标记羊抗鼠IgG,以100 $\mu$ L/孔加入酶标板中,37 $^{\circ}$ C恒温孵育1h,使反应达到平衡;

[0085] (6) 反应结束后取出酶标板,弃掉液体,纯化水冲洗5次,拍干水分;

[0086] (7) 按100 $\mu$ L/孔加入TMB显色液,室温反应6分钟;

[0087] (8) 反应结束后,按50 $\mu$ L/孔加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止显色;

[0088] (9) 在酶标仪上于450nm读取OD值,整理数据,分析结果如下图2所示。

[0089] 结果显示,在8个浓度梯度试验中,本发明的436I6G8克隆的抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体对FR $\alpha$ 蛋白分子的亲和力强、灵敏度高,可在较低抗体浓度条件下仍可以达到较高OD值,可以节约实验和检测成本。

[0090] 实施例4

[0091] 本实施例为抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体436I6G8作为一抗的免疫印记(Western blotting)检测,方法如下:

[0092] (1) 选择HeLa细胞裂解液的PVDF膜进行活化,甲醇活化1min,用纯水洗膜2次后再用TBST洗涤3次;封闭:将膜置于5%BSA配置成的封闭液中,室温混摇2h;

[0093] (2) 一抗孵育:将436I6G8抗体稀释成0.5 $\mu$ g/mL浓度,将封闭好的膜放入对应的已稀释抗体中,置4 $^{\circ}$ C混摇孵育过夜;

[0094] (3) 取出膜放入TBST液中洗涤3次(2 $\times$ 5min+1 $\times$ 10min);

[0095] (4) 二抗孵育:将HRP-抗鼠IgG用FG液以1:5000稀释,混匀后加入膜条,室温混摇1h;

[0096] (5) 取出膜条放在TBST液中洗涤4次(3 $\times$ 5min+1 $\times$ 8min);

[0097] (6) 底物:将用纯水5倍稀释的等量鲁米诺/增强试剂和过氧化氢溶液,于同一容器内混匀,加入膜条,孵育2min;

[0098] (7) 曝光:把底片放在暗盒中,根据荧光强度分别对X光胶片作不同时间段的曝光;然后按照1min显影,清洗,1min定影的顺序进行操作,最后清洗并晾干;结果如图3所示。其中,HeLa表示人宫颈癌组织裂解液;条带大小:38kDa。

[0099] 由图3结果可见,在泳道中,436I6G8抗FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体能够特异性的识别HeLa细胞裂解液中的FR $\alpha$ 蛋白,分子量在38kDa左右,说明本发明的436I6G8克隆的FR $\alpha$ 小鼠单克隆抗体能够高特异性的识别FR $\alpha$ 蛋白。

[0100] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依



然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

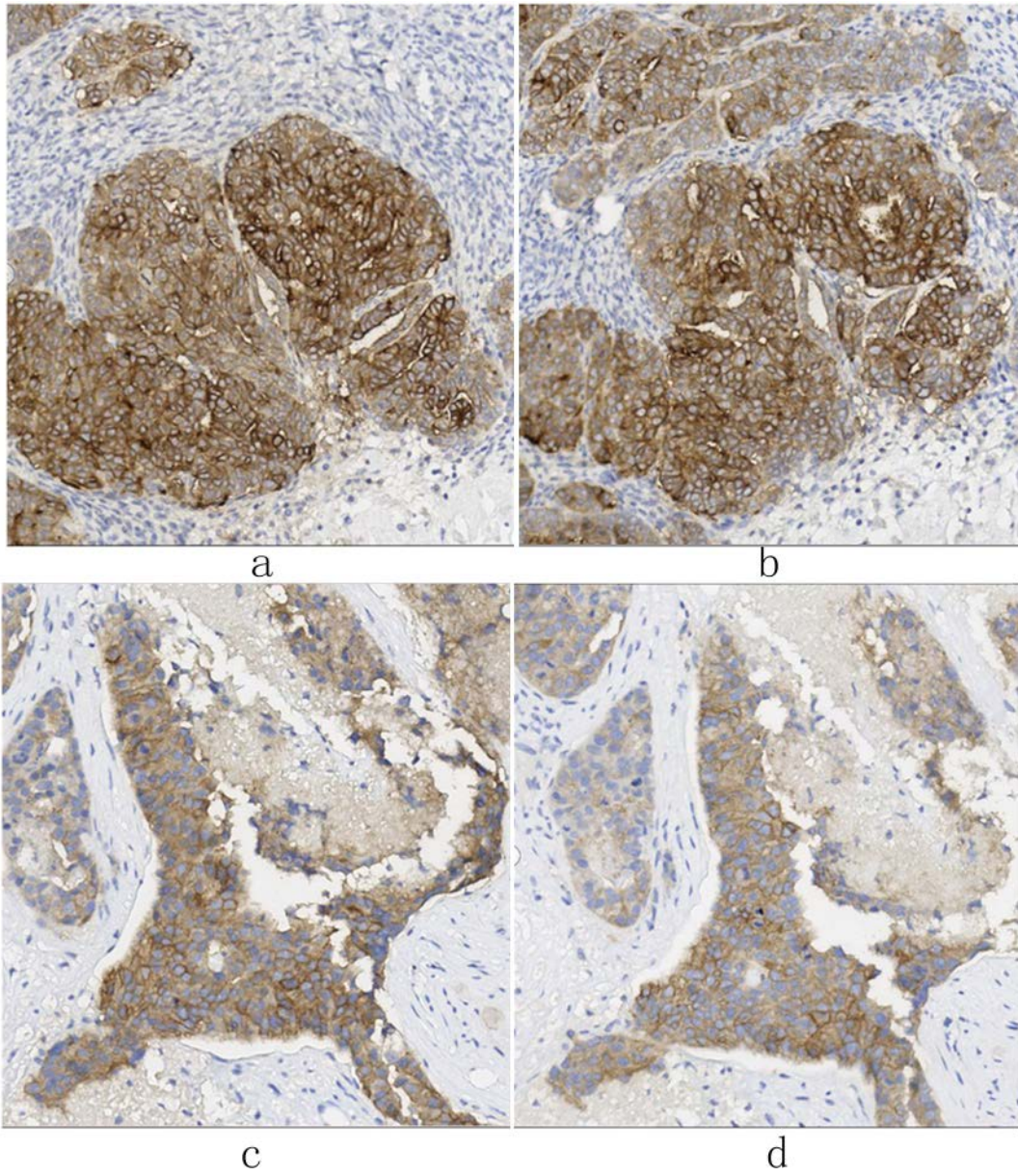


图 1

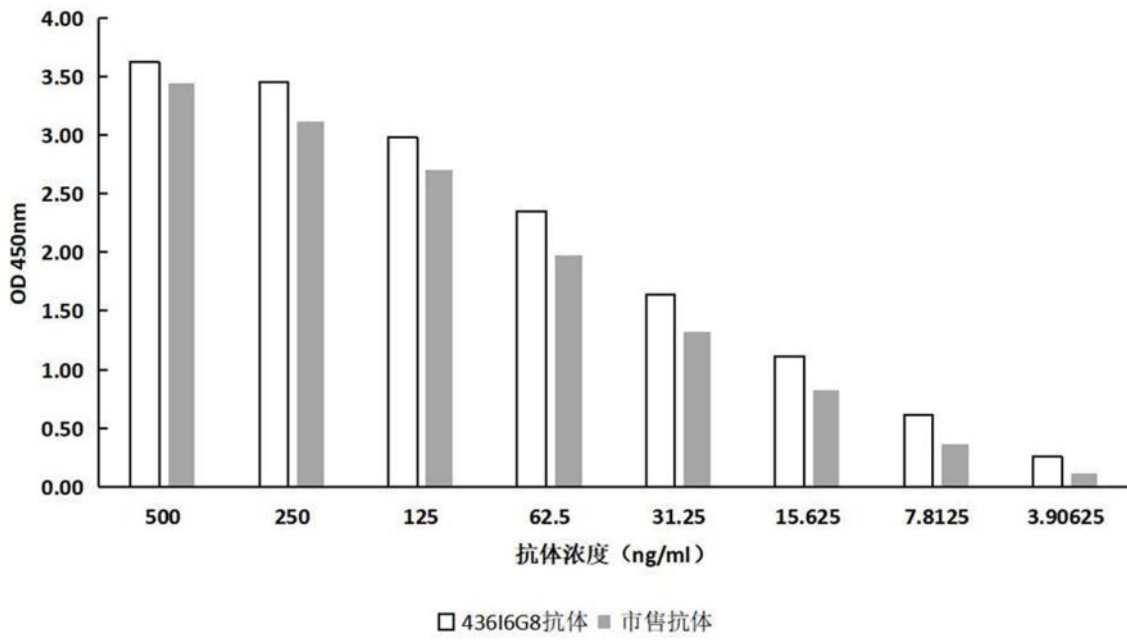


图 2

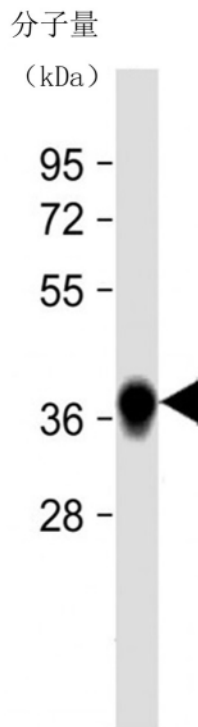


图 3