(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110272502 B
(45)授权公告日 2021.09.14

(21)申请号 201910629767.3

(22)申请日 2019.07.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110272502 A

(43)申请公布日 2019.09.24

(73)专利权人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司
地址 518116 广东省深圳市龙岗区宝龙街道宝龙二路亚辉龙生物科技厂区1栋

(72)发明人 王刚 谭晖 钱纯亘 胡鹞辉

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224
代理人 林青中

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C12N 5/20(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

审查员 杜润超

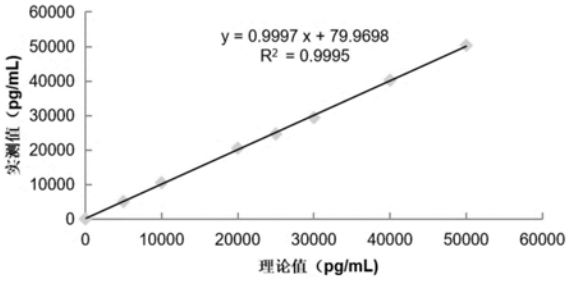
权利要求书1页 说明书12页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

免疫原、分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞及制备方法、单克隆抗体及应用

(57)摘要

本发明涉及一种免疫原、分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞及制备方法、单克隆抗体及应用。该免疫原包括第一多肽及与所述第一多肽连接的第二多肽，所述第一多肽包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽，所述第二多肽包括氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽。由上述免疫原制备得到的抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体的特异性高，灵敏度好。



CN 110272502 B

1.一种免疫原,其特征在于,所述免疫原由依次连接的两个第一多肽、载体蛋白及两个第二多肽组成,所述第一多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,所述第二多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

2.根据权利要求1所述的免疫原,其特征在于,所述载体蛋白选自血蓝蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵白蛋白、兔血清白蛋白及纤维蛋白原中的一种。

免疫原、分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞及制备方法、单克隆抗体及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，特别是涉及一种免疫原、分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞及制备方法、单克隆抗体及应用。

背景技术

[0002] 心肌肌钙蛋白(cardiac troponin，cTn)由三种不同亚基组成：心肌肌钙蛋白T(cTnT)、心肌肌钙蛋白I(cTn I)和肌钙蛋白C(TnC)。其中，心肌肌钙蛋白I(cTn I)的组织特异性高，是心肌损伤的高敏感性标志物。

[0003] 在临床上检测心肌肌钙蛋白I的含量的方法主要有免疫层析法、ELISA法、化学发光法。这些检测方法主要依赖于抗心肌肌钙蛋白I抗体与检测样本中的心肌肌钙蛋白I的特异性结合能力。因此，抗心肌肌钙蛋白I抗体与心肌肌钙蛋白I的结合的特异性和灵敏度对于检测心肌肌钙蛋白I的含量十分重要。

[0004] 但是，目前市场上特异性较好、灵敏度较高的抗心肌肌钙蛋白I抗体还较少，不能满足市场的需求。

发明内容

[0005] 基于此，有必要提供一种免疫原，由该免疫原制备得到的抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体的特异性较好、灵敏度较高。

[0006] 此外，还提供一种分泌特异性较好、灵敏度较高的抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体的杂交瘤细胞、单克隆抗体及其制备方法和应用。

[0007] 一种免疫原，包括第一多肽及与所述第一多肽连接的第二多肽，所述第一多肽包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列，所述第二多肽包括氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的氨基酸序列。

[0008] 而上述免疫原包括第一多肽及与所述第一多肽连接的第二多肽。第一多肽针对人心肌肌钙蛋白I氨基酸序列的104～120位的17个氨基酸设计，第二多肽针对人心肌肌钙蛋白I氨基酸序列的196～210位的15个氨基酸。采用上述免疫原制备的单克隆抗体能够特异性地与人心肌肌钙蛋白I结合，针对的抗原表位明确，获得特异性单抗的筛选过程相对简单，且该单克隆抗体与心肌肌钙蛋白I的亲和力强、特异性和灵敏度较高。

[0009] 在其中一个实施例中，所述第一多肽包括多个依次连接的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽；及/或

[0010] 所述第二多肽包括多个依次连接的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽。

[0011] 在其中一个实施例中，所述第一多肽与所述第二多肽由载体蛋白偶联；

[0012] 在其中一个实施例中，所述载体蛋白选自血蓝蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵白蛋白、兔血清白蛋白及纤维蛋白原中的一种。

[0013] 一种分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞的制备方法，包括如下步骤：

[0014] 用上述免疫原免疫动物，得到免疫后的动物的脾细胞；

[0015] 将所述脾细胞与骨髓瘤细胞融合，然后筛选得到阳性融合细胞；及

[0016] 对所述阳性融合细胞进行亚克隆，得到所述分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0017] 一种分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞，由上述的分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞的制备方法制得。

[0018] 一种抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体，由上述分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞分泌。

[0019] 上述免疫原、上述分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞、或上述抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体在制备心肌肌钙蛋白I检测试剂、制备心肌肌钙蛋白I检测试纸或制备心肌肌钙蛋白I检测试剂盒中的应用。

[0020] 一种心肌肌钙蛋白I检测试剂，包括上述抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体。

[0021] 在其中一个实施例中，还包括抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体。

[0022] 一种心肌肌钙蛋白I检测试剂盒，包括上述心肌肌钙蛋白I检测试剂。

附图说明

[0023] 图1为实施例3的制备的多克隆抗体的SDS-PAGE电泳图；

[0024] 图2为实施例6的组合1抗体对与对比试剂盒临床样本的线性关系图；

[0025] 图3为实施例6的组合2抗体对与对比试剂盒临床样本的线性关系图；

[0026] 图4为实施例8的cTn I的标准曲线；

[0027] 图5为实施例7的制备的超敏肌钙蛋白化学发光试剂盒与理论值的线性关系图；

[0028] 图6为实施例8中对比试剂盒与理论值的线性关系图。

具体实施方式

[0029] 为了便于理解本发明，下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的部分实施例。但是，本发明可以以许多不同的形式来实现，并不限于本文所描述的实施例。相反地，提供这些实施例的目的是使本发明公开内容更加透彻全面。

[0030] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不是旨在于限制本发明。

[0031] 本文中“cTnI”指心肌肌钙蛋白I。

[0032] 本发明一实施方式提供了一种免疫原，使用该免疫原制备的杂交瘤细胞分泌的抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体特异性较好、灵敏度较高，能够应用于制备心肌肌钙蛋白I检测试剂、制备心肌肌钙蛋白I检测试纸或制备心肌肌钙蛋白I检测试剂盒中。

[0033] 具体地，该免疫原包括第一多肽及与第一多肽连接的第二多肽。第一多肽包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽，第二多肽包括氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽。SEQ ID No.1所示的氨基酸序列为：VDKVDEERYDIEAKVTK。SEQ ID No.2所示的氨基酸序列为：DALSGMEGRKKKFES。

[0034] 在其中一个实施例中，第一多肽包括多个依次连接的氨基酸序列如SEQ ID No.1

所示的多肽。多个氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽依次通过肽键连接。进一步地，第一多肽包括两个～四个依次连接的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽。更进一步，第一多肽包括两个依次连接的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽。将氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽记作aa1。若第一多肽为两个氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽依次连接而成，则记作aa1-aa1；若第一多肽为三个氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽依次连接而成，则记作aa1-aa1-aa1；其中，“-”表示肽键。若第一多肽为其他更多数量的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽依次连接而成，则依次类推即可。

[0035] 在其中一个实施例中，第二多肽包括多个依次连接的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽。多个氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽依次通过肽键连接。进一步地，第二多肽包括两个～四个依次连接的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽。更进一步，第二多肽包括两个依次连接的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽。将氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽记作aa2。若第二多肽为两个氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽依次连接而成，则记作aa2-aa2；若第二多肽为三个氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽依次连接而成，则记作aa2-aa2-aa2；其中，“-”表示肽键。若第二多肽为其他更多数量的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽依次连接而成，则依次类推即可。

[0036] 在其中一个实施例中，第一多肽与第二多肽通过蛋白偶联技术连接。具体地，第一多肽与第二多肽由载体蛋白偶联。进一步地，载体蛋白选自血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白、鸡卵白蛋白(OVA)、兔血清白蛋白及纤维蛋白原中的一种。优选地，载体蛋白选自血蓝蛋白及牛血清白蛋白中的一种。

[0037] 在其中一个实施例中，免疫原的结构为aa1-aa1-KLH-aa2-aa2。与结构为aa1-KLH-aa2的免疫原相比，结构为aa1-aa1-KLH-aa2-aa2的免疫原的第一多肽包括两个氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的多肽，第二多肽包括两个氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的多肽。通过增加免疫原的序列长度，能够加强免疫应答，助于特异性单克隆抗体的产生。在另一个实施例中，免疫原的结构包aa1-aa1-aa1-KLH-aa2-aa2-aa2。

[0038] 上述免疫原包括第一多肽及第二多肽。第一多肽针对人心肌肌钙蛋白I表面的104位～120位的氨基酸序列设计，第二多肽针对人心肌肌钙蛋白I表面的196位～210位氨基酸序列设计。

[0039] 本发明一实施方式还提供了一种分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞的制备方法，该制备方法步骤S110～步骤S150。

[0040] 步骤S110、用免疫原免疫动物，得到免疫后的动物的脾细胞。

[0041] 具体地，免疫原为上述任一实施例中的免疫原。进一步地，免疫动物为小鼠。

[0042] 在其中一个实施例中，将免疫原与弗式完全佐剂混合后分次免疫小鼠。其中，首次免疫的免疫原的剂量为50μg～100μg，第二次到末次的免疫的免疫原的剂量为25μg～50μg，免疫的间隔时间为10～14天。

[0043] 步骤S130、将脾细胞与骨髓瘤细胞融合，然后筛选得到阳性融合细胞。

[0044] 具体地，将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行细胞融合，然后经过选择性培养和ELISA间接法筛选，得到阳性融合细胞。

[0045] 步骤150、阳性融合细胞进行亚克隆，得到分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0046] 具体地，采用有限稀释法进行亚克隆，得到能够稳定分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0047] 在其中一个实施例中，按照上述分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞的制备方法制备得到8株杂交瘤细胞。其中两株杂交瘤细胞分泌的抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体记分别为cTnI-2和cTnI-5。

[0048] cTnI-2和cTnI-5对心肌肌钙蛋白I有高亲和力、高特异性。可广泛应用于心肌肌钙蛋白I检测领域，如用于制备心肌肌钙蛋白I的检测试剂、制备心肌肌钙蛋白I的检测试纸或制备心肌肌钙蛋白I的检测试剂盒。在应用中，cTnI-2和cTnI-5可以作为捕获抗体，也可以作为检测抗体。具体是捕获抗体还是检测抗体，可以根据实际需求进行设置。

[0049] 获得抗心肌肌钙蛋白I的抗体传统免疫方法是用心肌肌钙蛋白I的全长序列或者部分序列作为免疫原免疫小鼠，并利用杂交瘤技术获得大量的针对不同抗原表位的单克隆抗体。单克隆抗体在应用时，往往是将单克隆抗体与其他单克隆抗体进行配对，以抗体对的形式来检测待测物。但是，通过传统的方式获得的单克隆抗体针对心肌肌钙蛋白I的表位往往不明确，很有可能同一批获得的不同单克隆抗体针对同一个抗原表位或相近的抗原表位，这些针对同一个抗原表位或相近的抗原表位的单克隆抗体在用间接法初筛时都是阳性，会增加后期配对筛选的工作量，而且往往是不可控制的无用功。

[0050] 而上述分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞的制备方法，采用上述任一实施例的免疫原作为免疫原免疫动物，得到的杂交瘤细胞能够稳定分泌抗心肌肌钙蛋白I的单克隆抗体，且该单克隆抗体对心肌肌钙蛋白I的亲和力高、特异性高，并且制备得到的单克隆抗体的所针对心肌肌钙蛋白I表位明确，能够减少后续抗体配对的筛选工作，提高配对筛选效率。

[0051] 本发明一实施方式还提供了一种心肌肌钙蛋白I检测试剂盒。该心肌肌钙蛋白I检测试剂盒包括心肌肌钙蛋白I检测试剂及其他检测试剂。

[0052] 具体地，心肌肌钙蛋白I检测试剂包括上述分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体。进一步地，心肌肌钙蛋白I检测试剂包括cTnI-2及cTnI-5中的至少一种。

[0053] 在其中一个实施例中，心肌肌钙蛋白I检测试剂包括cTnI-2或cTnI-5。

[0054] 在其中一个实施例中，心肌肌钙蛋白I检测试剂包括cTnI-2和cTnI-5。cTnI-2和cTnI-5均作为捕获抗体。

[0055] 在其中一个实施例中，心肌肌钙蛋白I检测试剂还包括抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体。抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体由人的重组抗原免疫动物而获得。抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体能够与心肌肌钙蛋白I的不同表位特异性结合，亲和力强。进一步地，免疫动物为兔。

[0056] 具体地，抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体作为检测抗体，cTnI-2和cTnI-5中的至少一种作为捕获抗体。进一步地，抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体为兔源多克隆抗体。

[0057] 当然，可以理解的是，在其他一些实施例中，其他动物来源的多克隆抗体也同样可以。

[0058] 其他检测试剂可以根据实际需要设置。例如，心肌肌钙蛋白I标准品、缓冲液等。

[0059] 上述心肌肌钙蛋白I检测试剂盒包括抗心肌肌钙蛋白I多克隆抗体和由上述免疫

原制备得到的单克隆抗体。采用上述免疫原制备的单克隆抗体能够特异性地与人心肌肌钙蛋白I结合，与心肌肌钙蛋白I的亲和力强、特异性和灵敏度较高。上述免疫原制备的单克隆抗体与多克隆抗体的配对，使得上述心肌肌钙蛋白I检测试剂盒的检测灵敏度能够达到1.0pg/mL。

[0060] 本发明一实施方式还提供了一种抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体的制备方法，该制备方法包括步骤S210～步骤230。

[0061] 步骤S210、用免疫原免疫动物，得到免疫后的动物。

[0062] 具体地，免疫原为人的重组抗心肌肌钙蛋白I抗原，即人重组抗原cTnI。在其中一个实施例中，人重组抗原cTnI为海肽生物科技(上海)有限公司的重组抗原。

[0063] 在其中一个实施例中，用人重组抗原cTnI多次免疫兔，得到免疫后的兔。

[0064] 具体地，每次免疫时人重组抗原cTnI的剂量为为250μg～500μg，免疫的间隔时间为14天～21天。优选地，每次免疫时人重组抗原cTnI的剂量为400μg～500μg。当然，免疫的部位包括但不限于背部皮下、腹部皮下、腋窝皮下、四肢皮下。

[0065] 步骤S230、从免疫后的动物中提取并纯化抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体。

[0066] 具体地，从免疫后的兔的血清中分离和纯化抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体。

[0067] 上述抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体的制备方法采用人重组抗原cTnI作为免疫原获得抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体，该多克隆抗体能够识别心肌肌钙蛋白I的多个抗原表位，对心肌肌钙蛋白I的特异性高、亲和力强，能够应用于心肌肌钙蛋白I检测领域。例如，能够用于制备心肌肌钙蛋白I检测试剂、制备心肌肌钙蛋白I检测试纸、制备心肌肌钙蛋白I检测试剂盒等。

[0068] 具体实施例

[0069] 以下结合具体实施例进行详细说明。以下实施例如未特殊说明，则不包括除不可避免的杂质外的其他组分。实施例中采用药物和仪器如非特别说明，均为本领域常规选择。实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规条件，例如文献、书本中所述的条件或者生产厂家推荐的方法实现。

[0070] 实施例1

[0071] 由上海生工生物工程有限公司公司合成第一多肽(aa1-aa1)及第二多肽(aa2-aa2)，aa1代表的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的多肽，aa2代表氨基酸序列SEQ ID NO.2所示的多肽。“-”表示通过肽键连接。

[0072] 实施例2

[0073] (1)将实施案例1所得的第一多肽及第二多肽分别与KLH、OVA载体蛋白偶联，形成偶联蛋白aa1-aa1-KLH-aa2-aa2和偶联蛋白aa1-aa1-OVA-aa2-aa2。偶联蛋白aa1-aa1-KLH-aa2-aa2作为免疫原免疫动物。偶联蛋白aa1-aa1-OVA-aa2-aa2用于筛选阳性融合细胞。

[0074] (2)动物免疫：用偶联蛋白aa1-aa1-KLH-aa2-aa2作为免疫原免疫小鼠四次，得到免疫后的小鼠，其中每次免疫间隔14天。具体地，首次免疫时，将偶联蛋白aa1-aa1-KLH-aa2-aa2与弗式完全佐剂等量混合充分乳化后注射3只Balb/c小鼠，每只小鼠100μg。间隔14天后进行第二次免疫：将偶联蛋白aa1-aa1-KLH-aa2-aa2与弗式不完全佐剂等量混合充分乳化后注射Balb/c小鼠，每只小鼠50μg。第三次和第四次免疫的佐剂和抗原量都一样，间隔时间也都为14天。

[0075] (3)细胞融合:融合前3天,小鼠腹腔注射50μg的偶联蛋白aa1-aa1-KLH-aa2-aa2,融合当天,取出注射抗原小鼠的脾细胞和预先培养好的Sp2/0骨髓瘤细胞(该细胞购买于武汉大学的中国典型培养物保藏中心)在PEG的作用下进行融合,得到融合细胞

[0076] (4)选择性培养和筛选:使用HAT培养基在96孔细胞培养板上培养融合细胞,7天后取融合细胞的上清进行ELISA检测。其中,酶标板的包被抗原为aa1-aa1-OVA-aa2-aa2。挑取OD450>1.5孔内细胞作为阳性融合细胞。

[0077] (5)细胞克隆:对步骤(4)得到的阳性细胞融合细胞采用有限稀释法进行亚克隆,克隆4次,得到8株分泌强阳性的抗人cTnI的单克隆体的杂交瘤细胞,并分别编号1～8。编号1～8的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体分别对应记作cTnI-1～cTnI-8。其中编号2的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体记作cTnI-2。编号5的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体记作cTnI-5。

[0078] (6)腹水制备:10周龄的BALB/c小鼠,注射石蜡7天后,将步骤(5)得到的8株杂交瘤细胞扩大培养后分别注入随机分组的8组小鼠的腹部,每株杂交瘤细胞对应一组小鼠。7天后从各组小鼠的腹部采集富含单克隆抗体的腹水。

[0079] (7)纯化鉴定:采用Protein A亲和层析法,用1×PBS平衡柱子,将步骤(6)得到的各组腹水分别过柱后,再用1×PBS清洗柱子,最后用0.1M甘氨酸洗脱柱子。收集洗脱液,经SDS-PAGE鉴定纯化的单克隆抗体,纯度为98%以上。

[0080] 实施例3

[0081] 用人重组抗原cTnI免疫兔子制备多克隆抗体

[0082] (1)动物免疫:将人重组抗原cTnI(购买于海肽生物科技(上海)有限公司)与弗式完全佐剂等量混合充分乳化后注射2只新西兰大白兔,每只兔的人重组抗原cTnI注射量均为500μg。该人重组抗原的氨基酸序列如SEQ ID No.3所示,SEQ ID No.3具体为:

[0083] MADGSSDAAREPRPAPAPIRRRSSNYRAYATEPHAKKKSKISASRKLQLKTLLLQIAKQELEREAEERRGEKGRALSTRCQPLELAGLGFAELQDLCRQLHARVDKVDEERYDIEAKVTKNITEIADLTQKIFDLRGKFKRPTLRRVRISADAMMQALLGARAKESLDLRAHLKQVKKEDTEKENREVGDWRKNIDALSGMEGRKKKFES。

[0084] 隔14天后,进行加强免疫:将人重组抗原cTnI与弗式不完全佐剂等量混合充分乳化后进行免疫注射,每只兔的人重组抗原cTnI注射量均250μg。进行三次加强免疫,每次加强免疫的人重组抗原cTnI与弗式不完全佐剂均为250μg。每次加强免疫之前,采耳动脉血1ml检测抗体效价,至效价不再升高时取静脉血,以便分离纯化抗心肌肌钙蛋白I的多克隆抗体。

[0085] (2)纯化:采用Protein A亲和层析法分离纯化步骤(1)产生的多克隆抗体。将步骤(1)得到的静脉血离心,得到血清,然后用1×PBS平衡柱子后,将离心后的血清过柱,再用1×PBS清洗柱子,最后用0.1M甘氨酸洗脱柱子。收集洗脱液,经SDS-PAGE电泳呈现2条明显的条带(图1所示)。图1中,M为marker,1～7为洗脱收集液。

[0086] 实施例4

[0087] 纯化后的8株抗人cTnI多肽的单抗效价检测,具体步骤为:

[0088] (1)检测抗原aa1-aa1-OVA-aa2-aa2包被在酶标板上,包被液为pH9.6的碳酸缓冲液,将检测抗原加入到包被缓冲液中,包被浓度为1μg/mL。每孔加入100μL,4℃过夜。洗板3次后,用20%的牛血清加80%1×PBS在37℃封闭2h,每孔加入150μL的封闭液。拍干液体后,置于4℃待用。

[0089] (2)将实施例1制备得到8株抗体(cTnI-1～cTnI-8)分别稀释成表1中的梯度,加100μL待测样本,37℃反应1h。洗板3次后,每孔加入100μL羊抗鼠IgG-HRP,稀释比例为1:10000,37℃反应30min。洗板3次后,加入100μL的TMB,37℃反应10min后加终止液读取OD值,检测结果见表1。

[0090] 表1

[0091]

抗体稀释比例	抗体名称							
	cTnI-1	cTnI-2	cTnI-3	cTnI-4	cTnI-5	cTnI-6	cTnI-7	cTnI-8
1000	3.448	3.436	3.338	3.348	3.416	3.358	3.329	3.436
10000	3.301	3.319	3.227	3.291	3.329	3.237	3.201	3.329
100000	3.066	3.127	2.91	3.016	3.107	2.91	2.966	3.097
1000000	1.473	2.088	1.456	1.546	2.124	1.516	1.468	2.098
10000000	0.875	1.036	0.742	0.986	1.109	0.872	0.798	1.036
1×PBS	0.023	0.017	0.068	0.074	0.064	0.052	0.031	0.049

[0092] 由表1可以看出,cTnI-2、cTnI-4、cTnI-5及cTnI-8的腹水效价较高。

[0093] 实施例5

[0094] 鼠源单克隆抗体和兔源多克隆抗体的配对ELISA检测

[0095] 1)、用HRP标记实施例3纯化后的兔源多克隆抗体,HRP标记多克隆抗体的步骤为:

[0096] (1)将纯化的多克隆抗体在50mM CB缓冲液(pH9.6)中透析过夜,4℃。

[0097] (2)用4℃的水现配浓度相同的的$NaIO_3$和HRP溶液,

[0098] (3)氧化反应:先吸HRP置于有搅拌转子的棕色小瓶中,再缓慢加入相同体积的的$NaIO_3$溶液,搅拌反应30min。

[0099] (4)加入稀释的乙二醇终止氧化反应,搅拌反应30min。

[0100] (5)HRP标记抗体将氧化的HRP加入到透析抗体的透析袋里面,上下混匀,边透析边反应3h,4℃。

[0101] (6)还原反应:取出透析袋中HRP标记的抗体,4℃的水配成与步骤2中相同浓度的$NaBH_4$溶液。加入一定量的$NaBH_4$溶液,混匀,4℃静置1h,

[0102] (7)沉析:加入NBS和饱和硫酸铵,混匀,4℃静置30min。离心后弃上清,先加100μL(80%1×PBS+20%牛血清)复溶,再加100μL甘油保存HRP标记的抗体。

[0103] 2)、将cTnI-2、cTnI-4、cTnI-5及cTnI-8分别包被在酶标板的不同孔上,具体方法见实施例4中步骤(1)。

[0104] 3)、用临床检测结果为超敏肌钙蛋白阳性的样本(呈梯度阳性的3个样本,即高值样本、中值样本和低值样本),检测cTnI-2、cTnI-4、cTnI-5及cTnI-8与步骤1)制备的HRP标记的兔源多克隆抗体的配对效果:

[0105] 将50μL高值样本、50μL中值样本及50μL低值样本分别加到包被有cTnI-2的不同酶标孔中;50μL高值样本、50μL中值样本及50μL低值样本分别加到包被有cTnI-4的不同酶标孔中,50μL高值样本、50μL中值样本及50μL低值样本分别加到包被有cTnI-5的不同酶标孔中、50μL高值样本、50μL中值样本及50μL低值样本分别加到包被有cTnI-8的不同酶标孔中,然后每个酶标孔中加入50μL的HRP标记的兔源多克隆抗体,进行抗体夹心一步法反应并检测。检测结果见表2。表2中,高值样本为心肌肌钙蛋白I浓度为40000pg/mL的样本;中值样本为心肌肌钙蛋白I浓度为10000pg/mL的样本;低值样本为心肌肌钙蛋白I浓度为50pg/mL的

样本。

[0106] 表2

[0107]

包被抗体	OD 值		OD 值	包被抗体
cTnI-2	3.214	高值样本	3.348	cTnI-5
	2.014	中值样本	1.965	
	1.01	低值样本	0.968	
	0.078	1×PBS	0.024	
cTnI-4	2.135	高值样本	1.968	cTnI-8
	1.023	中值样本	0.972	
	0.568	低值样本	0.854	
	0.123	1×PBS	0.256	

[0108] 由表2可知，cTnI-2和cTnI-5与实施例3制备的兔抗cTnI多克隆抗体的配对效果好。

[0109] 实施例6

[0110] (1)选取10例检测结果为阳性的临床样本(由雅培公司超敏肌钙蛋白酶联免疫试剂盒测定)分别编号为:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10;3例检测结果为阴性的临床样本(由雅培公司超敏肌钙蛋白酶联免疫试剂盒测定)分别编号为11、12、13。

[0111] (2)将cTnI-2作为捕获抗体、实施例3得到的兔抗cTnI多克隆抗体作为检测抗体的组合命名为组合1;将cTnI-5作为捕获抗体、兔抗cTnI多克隆抗体作为检测抗体的组合命名为组合2，分别用组合1和组合2检测上述的13例临床样本。当然，cTnI-2和cTnI-5被包被在酶标板上，兔抗cTnI多克隆抗体用HRP标记，具体的操作与实施例5对应的部分相同。

[0112] 实施例6的检测结果见图2～图3及表3。

[0113] 表3

[0114]

血清检测值（ng/mL）			
编号	组合 1	组合 2	雅培公司试剂盒（ng/mL）
1	50	65	70
2	57	55	50
3	51	41	45
4	42	30	38
5	30	28	24
6	20	17	13
7	1.5	1.2	1
8	0.6	0.6	0.5
9	0.4	0.19	0.17
10	0.25	0.07	0.08
11	0.0008	0.001	0.0009

[0115]

12	0.0004	0.0008	0.0005
13	0.056	0.023	0.0002

[0116] 根据数据显示，组合2，即cTnI-5与兔抗cTnI多克隆抗体配对，与雅培公司超敏肌钙蛋白酶联免疫试剂盒的检测相关性较好。

[0117] 实施例7

[0118] 超敏肌钙蛋白化学发光试剂盒的制备

[0119] (1)cTnI-5包被纳米磁珠的制备：取50mg羧基化的磁微粒(粒径为2μm)悬浮液，磁分离，留沉淀，然后使用20mM，pH5.5MES缓冲液重悬，加入1mL新鲜制备的10mg/mL的EDC水溶液，活化磁珠表面羧基，加入4mg相应的单克隆抗体，室温下混悬6h，磁分离，去上清，用含2％BSA的100mMpH8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL，得到被好的磁颗粒，按5mL/瓶分装，4℃保存备用。

[0120] (2)吖啶酯标记的兔抗cTnI多克隆抗体的制备:取50μL25mg/mL的兔抗体cTn I多克隆抗体,加入150μL0.1MpH9.0的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入1.5μL5mg/mL的吖啶酯混匀,室温下避光反应,1.5h后取出,用5mL GE Desalting预装柱脱盐处理,先使用TBS平衡层析柱,然后加入反应后的吖啶酯溶液,收集蛋白峰样品保存,按5mL/瓶分装,4℃保存备用。

[0121] 实施例8

[0122] 实施例7制备的超敏肌钙蛋白化学发光试剂盒的性能评价

[0123] (1)标准曲线的制备:

[0124] 用缓冲液(40mMTris-Cl,0.5%BSA,1%NaCl,pH8.0)将cTnI标准品(购于海肽生物科技(上海)有限公司)配制成浓度为0pg/mL、10pg/mL、5000pg/mL、10000pg/mL、50000pg/mL的溶液。分别取0pg/mL、10pg/mL、5000pg/mL、10000pg/mL、50000pg/mL的溶液做为检测样本,以实施例7的步骤(1)包被好抗体的磁颗粒、实施例7的步骤(2)制备好的吖啶酯标记的兔抗cTnI多克隆抗体进行化学发光检测,绘制得到标准曲线。绘制标准曲线如图4所示。

[0125] (2)超敏肌钙蛋白化学发光免疫检测方法:

[0126] 本研究以化学发光测定仪为检测工具,实施例7制备的超敏肌钙蛋白化学发光试剂盒的cTnI-5抗体包被的磁性颗粒和标记吖啶酯的兔抗cTnI多克隆抗体为检测试剂,方法学模式为双抗夹心法。即仪器依次加入检测样品、cTnI-5抗体包被的磁性颗粒、标记吖啶酯的兔抗cTnI多克隆抗体,反应10min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,依次加入化学发光预激发液、化学发光激发液进行发光反应,最后记录发光强度,从标准曲线计算出检测样品中cTnI的浓度。

[0127] (3)灵敏度的检测:

[0128] 参照美国临床实验室标准化委员会标准(CLSIEP17-A)文件推荐实验方案,计算超敏肌钙蛋白检测试剂盒的灵敏度,结果见表4。表4中,实验组为实施例7制备的超敏肌钙蛋白化学发光试剂盒,对比组为由雅培公司超敏肌钙蛋白酶联免疫试剂盒。

[0129] 表4

[0130]

测试次数	实验组（pg/mL)	对比组(pg/mL)
1	0.481	0.546
2	0.478	0.613
3	0.354	0.681

[0131]

4	0.658	0.779
5	0.677	0.684
6	0.449	0.356
7	0.414	0.743
8	0.728	0.692
9	0.523	0.885
10	0.368	0.362
11	0.811	0.598
12	0.455	0.608
13	0.867	0.963
14	0.561	0.513
15	0.613	0.883
16	0.691	0.765
17	0.226	0.337
18	0.86	0.749
19	0.614	0.353
20	0.667	0.931
M	0.57	0.65
SD	0.17	0.19
M+2SD	0.92	1.03

[0132] 灵敏度为测试结果的均值加上两倍的标准差,即M+2SD;从上表可以看出,本公司试剂盒的灵敏度达到了0.92pg/mL,优于对比试剂盒的1.03pg/mL。

[0133] (7)线性的检测:

[0134] 采用超敏肌钙蛋白检测试剂盒,对浓度为0pg/mL、5000pg/mL、10000pg/mL、20000pg/mL、25000pg/mL、30000pg/mL、40000pg/mL和50000pg/mL的cTnI抗原做线性分析,计算线性相关系数,r^2=0.9995,另外,该试剂盒对超敏肌钙蛋白检测的线性范围为0～50000pg/mL。线性检测结果见下表5。表5中,实验组为实施例7制备的超敏肌钙蛋白化学发光试剂盒,对比组为由雅培公司超敏肌钙蛋白酶联免疫试剂盒。

[0135] 表5

[0136]

样本号	实验组（pg/mL）			目标值	对比组(pg/mL)		
	测定 1	测定 2	均值	(pg/mL)	测定 1	测定 2	均值
1	1.09	1.24	1.165	0	22.568	15.649	19.1085
2	5063.78	4986.56	5025.17	5000	4803.38	5008.03	4905.705
3	9986.56	11009.3	10497.93	10000	11523.32	11364.69	11444.005
4	18965..27	20498.51	20498.51	20000	20156.37	19782.31	19969.34
5	24187.02	25112.14	24649.58	25000	25314.16	24681.38	24997.77
6	28764.13	29961.42	29362.775	30000	30523.77	30398.55	30461.16
7	40032.45	40398.21	40215.33	40000	40256.75	39821.82	40039.285
8	49683.81	50983.42	50333.615	50000	53125.43	49823.82	51474.625

[0137] 从表5可以看出，实施例7制备的超敏肌钙蛋白化学发光试剂盒对cTnI样本的检测值与理论值之间具有良好的线性关系，r^2为0.9995(图5)，优于对比试剂盒的r^2的0.9987(图6)。线性样本检测的结果说明本发明的超敏肌钙蛋白化学发光试剂盒的线性等同于或者优于市售的酶联免疫发光试剂盒。

[0138] (8)精密度测定：

[0139] 取浓度为100pg/mL及2000pg/mL两个cTnI样品，每个样本每个浓度各做3个平行，用三批试剂盒进行检测，计算试剂盒批内及批间差，结果表明该试剂盒批内及批间差均小于5％。

[0140] (9)干扰性实验：

[0141] 取混合血清分别添加干扰物，干扰物包括：结合胆红素、游离胆红素、血红蛋白、抗坏血酸和甘油酯中的一种或多种，血清和干扰物添加质量比按照1:20进行，分别测定混合血清及添加了各种干扰物后混合血清的测值，计算二者之间的偏差，以±10％为可接受范围。结果表明，干扰性均达到NCCLS文件标准，可用于临床实验室超敏肌钙蛋白状况的准确评估。

[0142] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载的范围。

[0143] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

[0001] 序列表

[0002] <110> 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

[0003] <120> 免疫原、分泌抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞及制备方法、单克隆抗体及应用

[0004] <160> 2

[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0006] <210> 1

[0007] <211> 17

[0008] <212> PRT

[0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0010] <400> 1

[0011] Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr

[0012] 1 5 10 15

[0013] Lys

[0014] <210> 2

[0015] <211> 15

[0016] <212> PRT

[0017] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0018] <400> 2

[0019] Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Lys Phe Glu Ser

[0020] 1 5 10 15

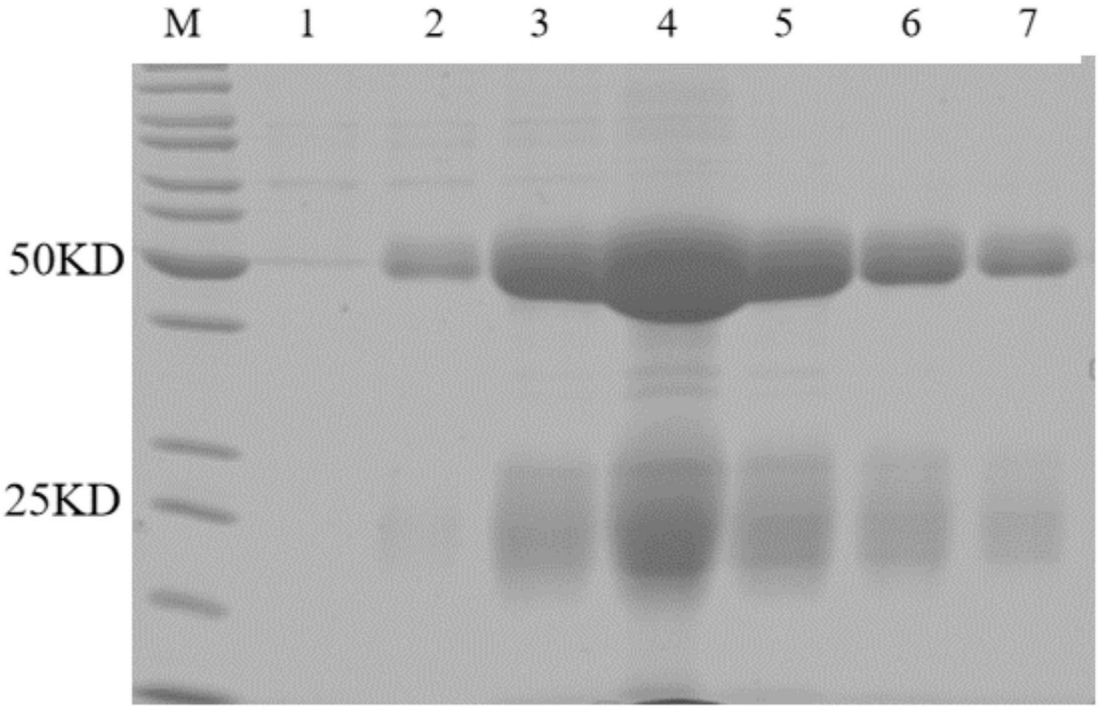

M
1
2
3
4
5
6
7
50KD
25KD

图1

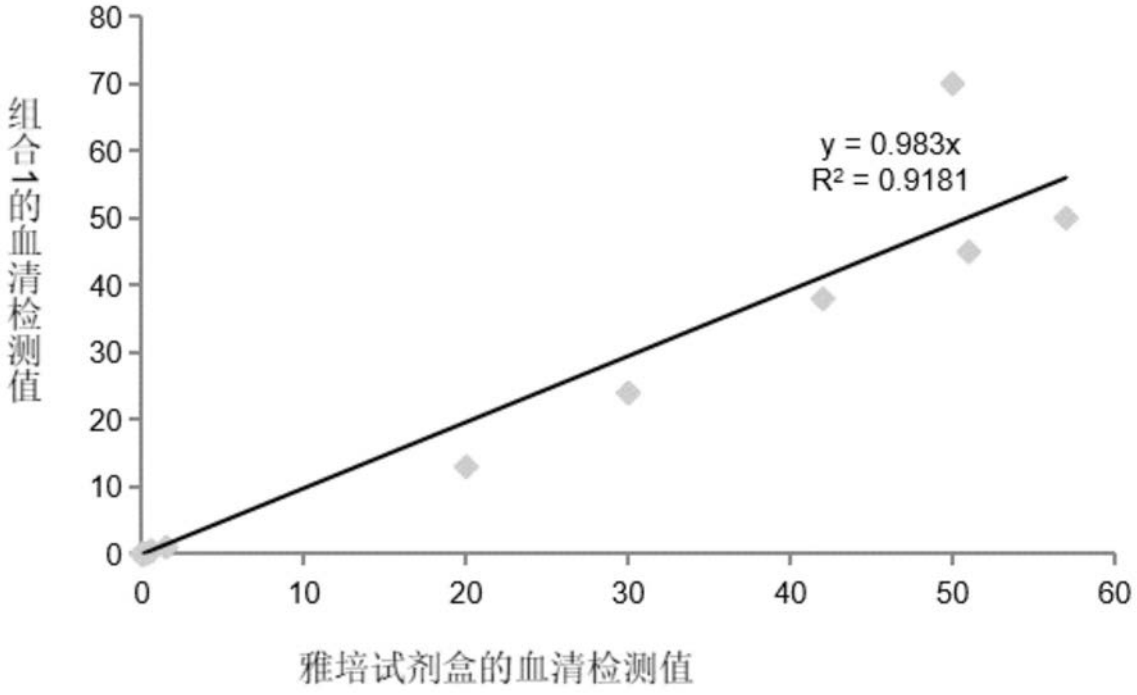

组合1的血清检测值
雅培试剂盒的血清检测值
y = 0.983x
R² = 0.9181
0
10
20
30
40
50
60
70
80

图2

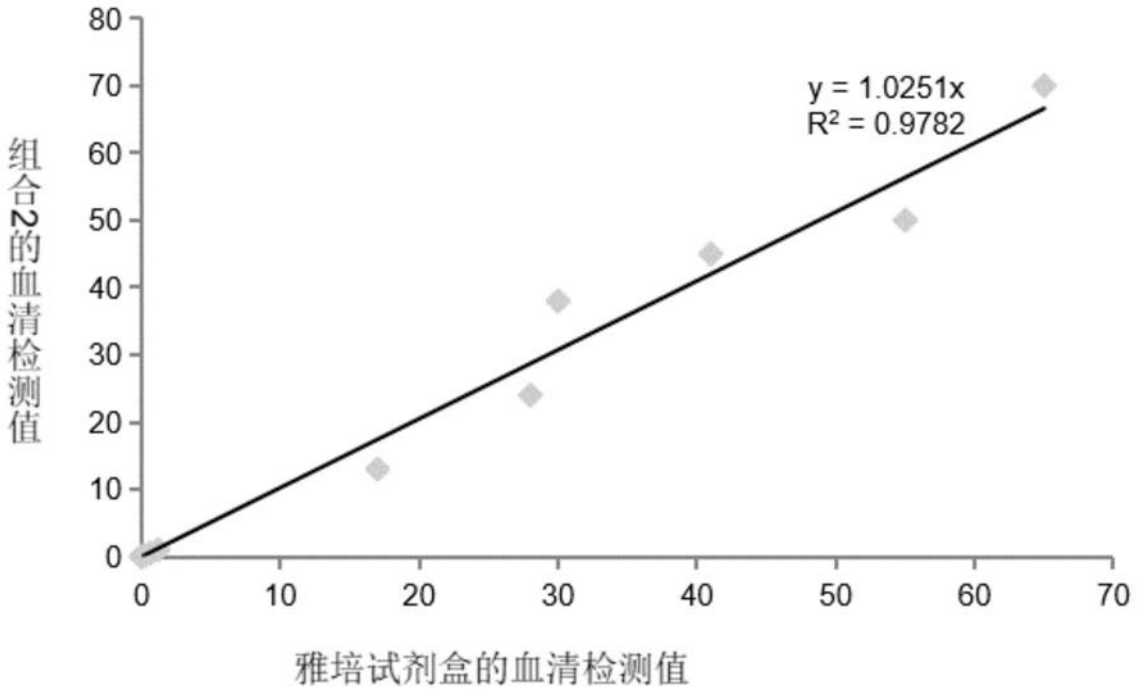

y = 1.0251x
R² = 0.9782
组合2的血清检测值
雅培试剂盒的血清检测值
0
10
20
30
40
50
60
70
80

图3

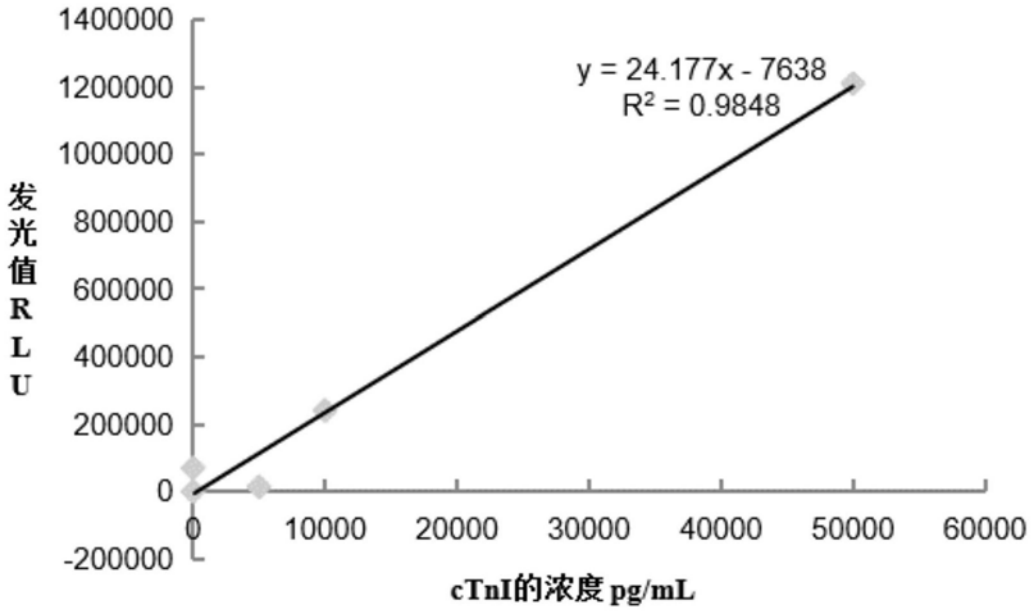

y = 24.177x - 7638
R² = 0.9848
发光值RLU
cTnI的浓度 pg/mL
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-200000
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000

图4

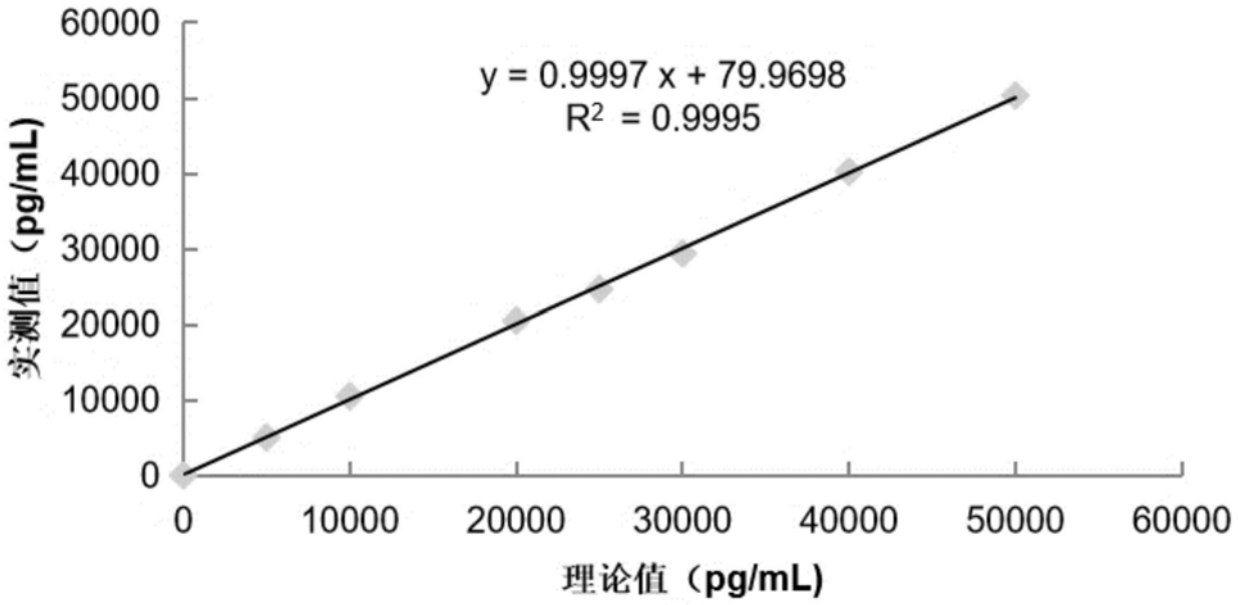

y = 0.9997 x + 79.9698
R² = 0.9995
实测值（pg/mL）
理论值（pg/mL）
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000

图5

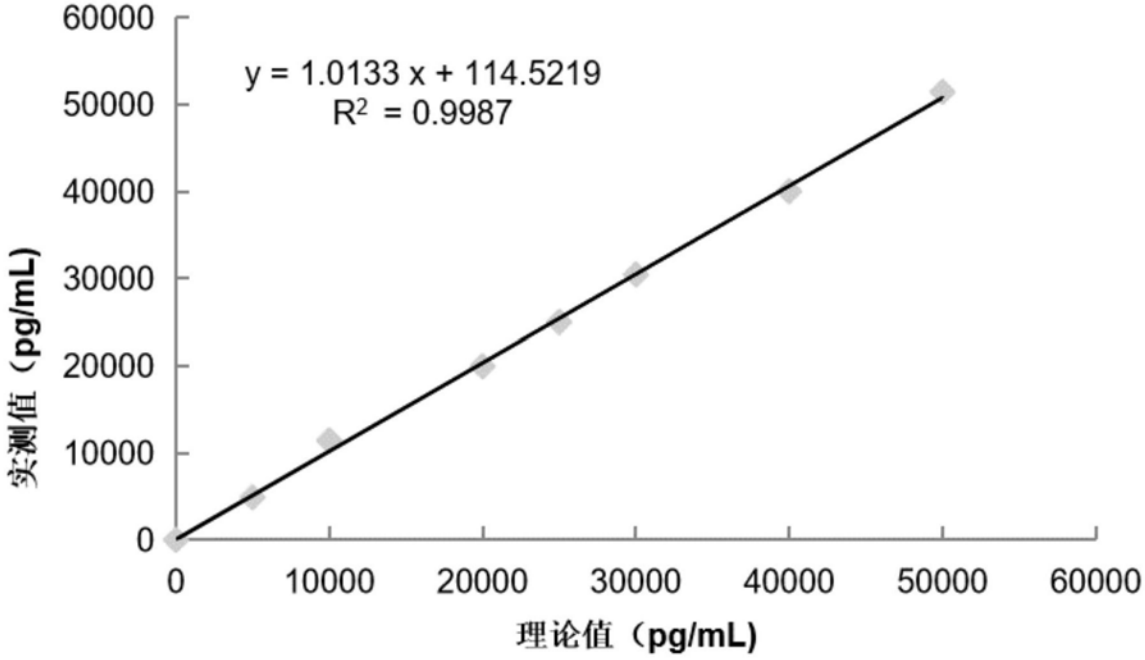

y = 1.0133 x + 114.5219
R² = 0.9987
实测值（pg/mL）
理论值（pg/mL）
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000

图6