



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102690351 A

(43) 申请公布日 2012.09.26

(21) 申请号 201210165773.6

(22) 申请日 2012.05.25

(71) 申请人 杭州傲锐生物医药科技有限公司

地址 311121 浙江省杭州市余杭区文一西路
1500号1号楼209室

(72) 发明人 陈东 张海燕 庞醒华

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

代理人 黎双华 徐关寿

(51) Int. Cl.

C07K 16/40(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页
序列表 5 页

(54) 发明名称

间日疟原虫醛缩酶蛋白单克隆抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种间日疟醛缩酶(alldolase)蛋白单克隆抗体的制备方法,该抗体是针对以alldolase蛋白为靶抗原,选择A、B、C三个优势抗原表位,通过柔性片段连接A、B、C三个优势抗原表位,形成重组子D,并在其上下游分别添加BamHI和XhoI限制性内切酶酶切位点,双酶切后插入载体PET-28a(+)载体中,构建重组蛋白D表达载体,利用大肠杆菌BL21表达重组蛋白D,免疫Balb/c小鼠,取其脾脏细胞与sp2/0骨髓瘤细胞融合,筛选得到10株稳定分泌alldolase蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。本发明所得单克隆抗体能特异性识别间日疟原虫alldolase蛋白,可用于间日疟感染的特异性检测,特异性高,反应灵敏,实验成本低,适合高通量快速检测。

1. 间日疟原虫醛缩酶蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)用柔性片段 GGCAGCGGCAGCGGC 将间日疟原虫醛缩酶蛋白的抗原表位 A、B、C 相连接,得到重组子 D ;其中,

抗原表位 A 的核酸序列为 :GAGGGAATCATTCCAGGAATTAAGTTGAC AAAGGATTGGTTACCATCC CATGCACTGATGATGAGAAGTCCACCCAGGGATTAGATGGTCTAGCTGAGAGGTGTAAAGAATATTACAAAGCTGGT GCAAGTTTTGCAAAATGGAGAGCT ;

抗原表位 B 的核酸序列为 :ATTGGTTTTCTCACAGTGAGAACTTTAAGTA GGACAGTGCCACCATCCT TACCAGGAGTTGTATTCTTATCTGGAGGTCAATCTGAAGAAGAAGCATCTGTCAATTTGAATTCCATCAATGCGTTA GGCCCCACCCCATGGGCGTTGACC ;

抗原表位 C 的核酸序列为 :AACTCCTTGGCGACTTATGGAAAGTACAAGG GAGGTGCAGGCGGAGCCG ATGCAGGAGCATCCCTT ;

重组子 D 的核酸序列为 :GAGGGAATCATTCCAGGAATTAAGTTGAC AAAGGATTGGTTACCATCCCA TGCCTGATGATGAGAAGTCCACCCAGGGATTAGATGGTCTAGCTGAGAGGTGTAAAGAATATTACAAAGCTGGTGC AAGTTTTGCAAAATGGAGAGCTGGCAGCGGCAGCGGCATTGGTTTTCTCACAGTGAGAACTTTAAGTAGGACAGTGC CACCATCCTTACCAGGAGTTGTATTCTTATCTGGAGGTCAATCTGAAGAAGAAGCATCTGTCAATTTGAATTCCATC AATGCGTTAGGCCACACCCATGGGCGTTGACCGCAGCGGCAGCGCAACTCCTTGGCGACTTATGGAAAGTACAA GGGAGGTGCAGGCGGAGCCGATGCAGGAGCATCCCTT ;

(2) 将重组子 D 和载体 PET-28a (+)用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切,将重组子 D 连接到载体 PET-28a (+)上,转化大肠杆菌 BL21,筛选得到重组蛋白 D 表达菌株 ;

(3) 诱导表达重组蛋白 D :重组蛋白 D 的氨基酸序列为 :GluGlyIleIleProGlyIle LysValAspLysGlyLeuValThrIleProCysThrAspAspGluLysSerThrGlnGlyLeuAspGlyLeuAlaGluArg CysLysGluTyrTyrLysAlaGlyAlaArgPheAlaLysTrpArgAlaGlySerGlySerGlyIleGlyPheLeuThrValArgThrLeuSerArgThrValProProSerLeuProGlyValValPheLeuSerGlyGlyGlnSerGluGluGluAlaSerValAsnLeuAsnSerIleAsnAlaLeuGlyProHisProTrpAlaLeuThrGlySerGlySerGlyAsnSerLeuAlaThrTyrGlyLysTyrLysGlyGlyAlaGlyGlyAlaAspAlaGlyAlaSerLeu ;

(4) 将获得的重组蛋白 D 超声破碎并低温离心,溶液上清通过镍琼脂糖亲和层析柱,洗脱得到纯化重组蛋白 D ;

(5)用纯化后重组蛋白 D 免疫 Balb/c 小鼠,多次免疫尾静脉采血测定血清效价后,取小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合,并用 HAT 筛选得到稳定的杂交瘤细胞株 ;

(6)将杂交瘤细胞株注射到液体石蜡预处理的 F1 小鼠腹腔,隔周取腹水,50% 饱和硫酸铵沉淀法和 Protein G 亲和纯化单抗,得到单克隆抗体。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,间日疟原虫醛缩酶蛋白的抗原表位 A 的氨基酸序列为 :GluGlyIleIleProGlyIleLysValAspLysGlyLeuValThrIlePro CysThrAspAspGluLysSerThrGlnGlyLeuAspGlyLeuAlaGluArgCysLysGluTyrTyrLysAlaGlyAlaArgPheAlaLysTrpArgAla。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,间日疟原虫醛缩酶蛋白的抗原表位 B 的氨基酸序列为 :IleGlyPheLeuThrValArgThrLeuSerArgThrValProProSer LeuProGlyValValPheLeuSerGlyGlyGlnSerGluGluGluAlaSerValAsnLeuAsnSerIleAsnAlaLeuGlyProHisProTrpAlaLeuThr。

4. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,间日疟原虫醛缩酶蛋白的抗原表位 C 的氨基酸序列为:AsnSerLeuAlaThrTyrGlyLysTyrLysGlyGlyAlaGlyGlyAlaAspAlaGlyAlaSerLeu。

5. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤 3 中的表达诱导温度为 25℃,诱导转速为 250rpm,诱导的 IPTG 浓度为 0.1mM。

间日疟原虫醛缩酶蛋白单克隆抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和免疫学技术领域,特别是一种间日疟原虫醛缩酶蛋白单克隆抗体的制备方法,所得单克隆抗体可应用于酶联免疫法检测间日疟原虫,也可作为间日疟原虫快速诊断试剂盒的一部分。

背景技术

[0002] 疟疾广泛流行于热带和亚热带发展中国家,是一种由蚊媒传播的严重危害人类健康的寄生虫病。间日疟原虫对人类的危害仅次于恶性疟原虫,据估计全球收到间日疟原虫感染的人口高达 26 亿,每年约有 0.8~3 亿的人口因受到间日疟原虫感染而急性发作,在我国,2000 年后疟疾疫情呈上升趋势,每年估计有 70 万左右疟疾患者,其主要是间日疟患者,尽管 2007 年后疫情得到遏制,但是其流行程度仍然处于上升趋势。

[0003] 采用传统的厚血膜镜检费时费力,检测效率低下,近年来,核酸检测方法在疟疾诊断中得以应用,虽然该方法具有高度的特异性和敏感性,但是技术要求较高,需要技能熟练的操作员,阻碍了该方法的进一步普及。因此,寻求灵敏特异,简便快速的疟疾诊断方法在当前疟疾防治工作中显得尤为重要。开发具有高灵敏度、高特异性的间日疟抗体是建立间日疟体外诊断技术的首要任务。

[0004] 间日疟原虫的宿主只有两个,人和按蚊。通过中间宿主按蚊传播疾病,被感染的人患疟疾。其生活史分为三个时期:红细胞外期、红细胞内期和红细胞期,只有红细胞内期发生在红细胞内,其余两个发生在肝细胞中。

[0005] 疟疾特异性检测(RDTs)是一种可以检测疟疾寄生虫特异性抗原的横向层析方法。RDTs 方法提高了疟疾诊断和实例诊断的准确性,尤其是当镜检不可用或者不可靠的情况下。市场上已经有很多种 RDT 产品可以购买,其中一些是只可以检测恶性疟原虫,而其他的一些可以检测恶性疟原虫同时检测出一种甚至三种以上的人源疟疾。RDTs 检测中主要是以 HRP II 和疟原虫乳酸脱氢酶为靶抗原来检测恶性疟原虫,然而疟原虫 pan-specific 乳酸脱氢酶和醛缩酶通常被当作检测另外三种疟原虫的靶抗原。醛缩酶是疟原虫糖酵解过程中的关键酶。与高等脊椎动物拥有三种醛缩酶(同工酶)不同的是,间日疟原虫和恶性疟原虫拥有同一种醛缩酶,与锥体虫和贾第虫类似。间日疟原虫和恶性疟原虫的醛缩酶都含有 390 个氨基酸,他们的核苷酸和氨基酸序列的相对保守。因此,本申请选用醛缩酶作为靶抗原,分析其序列,选择其优势抗原表位,筛选反应灵敏度高,特异性强的单克隆抗体,以降低以 HRP II 和疟原虫乳酸脱氢酶为靶抗原可能出现的漏检风险。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种间日疟原虫醛缩酶(aldoase)蛋白单克隆抗体的制备方法。由该方法所得的间日疟单克隆抗体反应灵敏度高,特异性强,成本低,可大规模制备作为商品化检测试剂盒的原料。

[0007] 间日疟原虫醛缩酶蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)用柔性片段 GGCAGCGGCAGCGGC 将间日疟原虫醛缩酶蛋白的抗原表位 A、B、C 相连接,得到重组子 D ;其中,

抗原表位 A 的核酸序列为 :GAGGGAATCATTCCAGGAATTAAGTTGAC AAAGGATTGGTTACCATCC CATGCACTGATGATGAGAAGTCCACCCAGGGATTAGATGGTCTAGCTGAGAGGTGTAAAGAATATTACAAAGCTGGT GCAAGTTTTGCAAAATGGAGAGCT ;

抗原表位 B 的核酸序列为 :ATTGGTTTTCTCACAGTGAGAACTTTAAGTA GGACAGTGCCACCATCCT TACCAGGAGTTGTATTCTTATCTGGAGGTCAATCTGAAGAAGAAGCATCTGTCAATTTGAATTCCATCAATGCGTTA GGCCCCACCCCATGGGCGTTGACC ;

抗原表位 C 的核酸序列为 :AACTCCTTGGCGACTTATGGAAAGTACAAGG GAGGTGCAGGCGGAGCCG ATGCAGGAGCATCCCTT ;

重组子 D 的核酸序列为 :GAGGGAATCATTCCAGGAATTAAGTTGAC AAAGGATTGGTTACCATCCCA TGCCTGATGATGAGAAGTCCACCCAGGGATTAGATGGTCTAGCTGAGAGGTGTAAAGAATATTACAAAGCTGGTGC AAGTTTTGCAAAATGGAGAGCTGGCAGCGGCAGCGGCATTGGTTTTCTCACAGTGAGAACTTTAAGTAGGACAGTGC CACCATCCTTACCAGGAGTTGTATTCTTATCTGGAGGTCAATCTGAAGAAGAAGCATCTGTCAATTTGAATTCCATC AATGCGTTAGGCCACACCCATGGGCGTTGACCGCAGCGGCAGCGCAACTCCTTGGCGACTTATGGAAAGTACAA GGGAGGTGCAGGCGGAGCCGATGCAGGAGCATCCCTT ;

(2) 将重组子 D 和载体 PET-28a (+)用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切,将重组子 D 连接到载体 PET-28a (+)上,转化大肠杆菌 BL21,筛选得到重组蛋白 D 表达菌株 ;

(3) 诱导表达重组蛋白 D ;重组蛋白 D 的氨基酸序列为 :GluGlyIleIleProGlyIle LysValAspLysGlyLeuValThrIleProCysThrAspAspGluLysSerThrGlnGlyLeuAspGlyLeuAlaGluArg CysLysGluTyrTyrLysAlaGlyAlaArgPheAlaLysTrpArgAlaGlySerGlySerGlyIleGlyPheLeuThrValArgThrLeuSerArgThrValProProSerLeuProGlyValValPheLeuSerGlyGlyGlnSerGluGluGluAlaSerValAsnLeuAsnSerIleAsnAlaLeuGlyProHisProTrpAlaLeuThrGlySerGlySerGlyAsnSerLeuAlaThrTyrGlyLysTyrLysGlyGlyAlaGlyGlyAlaAspAlaGlyAlaSerLeu ;

(4) 将获得的重组蛋白 D 超声破碎并低温离心,溶液上清通过镍琼脂糖亲和层析柱,洗脱得到纯化重组蛋白 D ;

(5)用纯化后重组蛋白 D 免疫 Balb/c 小鼠,多次免疫尾静脉采血测定血清效价后,取小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合,并用 HAT 筛选得到稳定的杂交瘤细胞株 ;

(6)将杂交瘤细胞株注射到液体石蜡预处理的 F1 小鼠腹腔,隔周取腹水,50% 饱和硫酸铵沉淀法和 Protein G 亲和纯化单抗,得到单克隆抗体。

[0008] 进一步地,间日疟原虫醛缩酶蛋白的抗原表位 A 的氨基酸序列为 :GluGlyIleIleProGlyIleLysValAspLysGlyLeuValThrIleProCysThrAspAspGluLysSerThrGlnGlyLeuAspGlyLeuAlaGluArgCysLysGluTyrTyrLysAlaGlyAlaArgPheAlaLysTrpArgAla。

[0009] 间日疟原虫醛缩酶蛋白的抗原表位 B 的氨基酸序列为 :IleGlyPheLeuThrVal ArgThrLeuSerArgThrValProProSerLeuProGlyValValPheLeuSerGlyGlyGlnSerGluGluGluAlaSerValAsnLeuAsnSerIleAsnAlaLeuGlyProHisProTrpAlaLeuThr。

[0010] 间日疟原虫醛缩酶蛋白的抗原表位 C 的氨基酸序列为 :AsnSerLeuAlaThrTyrGlyLysTyrLysGlyGlyAlaGlyGly AlaAspAlaGlyAlaSerLeu。

[0011] 本发明选择比较温和的培养和诱导条件,步骤 3 中的表达诱导温度优选为 25℃,

诱导转速为 250rpm, 诱导的 IPTG 浓度为 0.1mM。

[0012] 本发明通过选择间日疟原虫醛缩酶(aldolase)蛋白 A、B、C 三个优势抗原表位, 利用基因工程技术, 用柔性片段将三个抗原表位相连接, 得到重组子 D 核苷酸序列。再通过 BamHI 和 XhoI 双酶切连接到表达载体 PET-28a (+) 中, 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 筛选得到重组蛋白 D 表达菌株, 诱导表达重组蛋白 D。采用 aldolase 重组蛋白 D 作为抗原免疫 Balb/c 小鼠, 取小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞 sp2/0 进行融合, 筛选出 10 株能够分泌针对重组蛋白 D 有特异性反应的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 从注射杂交瘤细胞株后的动物腹水中获取单克隆抗体。

[0013] 本发明的间日疟原虫醛缩酶蛋白单克隆抗体可用于各种免疫测定法, 例如免疫测定法为 ELISA 免疫测定法。在一个具体实施例中, 建立了双抗体夹心 ELISA 检测系统。纯化单抗分别通过辣根过氧化物酶(HRP)标记, ELISA 正交配对实验确定最佳组合单抗。本发明确定的最佳单抗组合由 McAb623 和 McAb627 的杂交瘤细胞株产生。所获得的杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体的抗体亚型均为 IgG1。

[0014] 本发明通过 50% 饱和硫酸铵沉淀和 Protein G 亲和层析方法从动物腹水中获得高纯度抗体, 并且实现了抗体的大量制备。

[0015] 本发明的间日疟原虫醛缩酶蛋白单克隆抗体还可用于快速诊断试剂盒或制备相应快速诊断试剂条。

具体实施方式

[0016] 实施例 1 间日疟原虫抗原的制备

1.1 间日疟原虫优势抗原表位的选择

以间日疟原虫 aldolase 蛋白为靶抗原, 分析其氨基酸序列亲水性及抗原性, 选择 A、B、C 三个优势抗原表位。

[0017] 抗原表位 A 的核酸序列为 :GAGGGAATCATTCCAGGAATTAAGTTGAC AAAGGATTGGTTACC ATCCCATGCACTGATGATGAGAAGTCCACCCAGGGATTAGATGGTCTAGCTGAGAGGTGTAAGAATATTACAAAGC TGGTGCAAGGTTTGCAAAATGGAGAGCT ;其氨基酸序列为 :GluGlyIleIleProGlyIleLysValAsp

LysGlyLeuValThrIleProCysThrAspAspGluLysSerThrGlnGlyLeuAspGlyLeuAlaGluArgCysLysGluTyrTyrLysAlaGlyAlaArgPheAlaLysTrpArgAla。

[0018] 抗原表位 B 的核酸序列为 :ATTGGTTTTCTCACAGTGAGAACTTTAAGTA GGACAGTGCCACCA TCCTTACCAGGAGTTGTATTCTTATCTGGAGGTCAATCTGAAGAAGAAGCATCTGTCAATTTGAATTCATCAATGC GTTAGGCCACACCCATGGGCGTTGACC ;其氨基酸序列为 :IleGlyPheLeuThrValArgThrLeuSerArg ThrValProProSerLeuProGlyValValPheLeuSerGlyGlyGlnSerGluGluGluAlaSerValAsnLeuAsnSerIleAsnAlaLeuGlyProHisProTrpAlaLeuThr。

[0019] 抗原表位 C 的核酸序列为 :AACTCCTTGGCGACTTATGGAAAGTACAAG GGAGGTGCAGGCGGA GCCGATGCAGGAGCATCCCTT ;其氨基酸序列为 : AsnSerLeuAlaThrTyrGlyLysTyrLysGlyGlyAla GlyGlyAlaAspAlaGlyAlaSerLeu。

[0020] 1.2 优化并合成编码重组蛋白的核苷酸序列

间日疟原虫 aldolase 优势抗原表位的串联。

[0021] 间日疟原虫醛缩酶蛋白的三个优势抗原表位 A、B、C 分别重复后通过柔性片段

GGCAGCGGCAGCGGC 连接,得到重组蛋白 D 氨基酸序列。

[0022] 柔性片段氨基酸序列为 :GlySerGlySerGly。

[0023] 重组蛋白 D 氨基酸序列为 :GluGlyIleIleProGlyIle LysValAspLysGlyLeuValThrIleProCysThrAspAspGluLysSerThrGlnGlyLeuAspGlyLeuAlaGluArgCysLysGlyTyrTyrLysAlaGlyAlaArgPheAlaLysTrpArgAlaGlySerGlySerGlyIleGlyPheLeuThrValArgThrLeuSerArgThrValProProSerLeuProGlyValValPheLeuSerGlyGlyGlnSerGluGluGluAlaSerValAsnLeuAsnSerIleAsnAlaLeuGlyProHisProTrpAlaLeuThrGlySerGlySerGlyAsnSerLeuAlaThrTyrGlyLysTyrLysGlyGlyAlaGlyGlyAlaAspAlaGlyAlaSerLeu。

[0024] 1.3 合成编码重组蛋白 D 的核苷酸序列

委托南京金思特公司化学合成编码重组蛋白 D 的核苷酸序列,并在其上下游分别添加酶切位点 BamHI (GGATCC) 和 XhoI (CTCGAG) 对应的核苷酸序列。

[0025] 1.4 构建重组蛋白表达载体

用 BamHI 和 XhoI 限制性内切酶(本发明所采用的各种分子生物学用酶均购自 NEB 公司)进行双酶切重组蛋白 D 核苷酸序列和 PET-28a (+) 载体 12 小时之后,酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶回收试剂盒(公司)回收重组蛋白 D 核苷酸片段和 PET-28a (+) 载体。用 T4 连接酶于 4℃ 连接过夜,连接产物转化至大肠杆菌 BL21 中,涂布于含 100ug/ml 硫酸卡那霉素(上海生工生物工程服务有限公司,货号:KB0286)的 LB 平板上,37℃ 过夜培养,挑取单克隆菌落,用含有 100ug/ml 的硫酸卡那霉素的 300mL LB 培养基 37℃ 培养至 OD600nm 达 0.6 左右,用终浓度为 0.1mM 的 IPTG(生工,货号:IB0168)进行诱导表达,诱导条件为:25℃,转速 250rpm,5 小时。诱导之后,将培养液 4℃ 5000rpm 离心 20 分钟收集菌体。

[0026] 1.5 重组蛋白的纯化

将菌体用 50mL 抽提液(50mM Tris,8M Urea,0.5M NaCl,PH8.5)重悬,然后超声破碎,条件为功率 600W,超声 3s,间隔 6s,共 180 次,12000rpm,4℃ 离心保留上清,上清用镍琼脂糖亲和层析纯化,用抽提液平衡柱子,然后用洗脱缓冲液(50mM Tris,8M Urea,0.5M NaCl,300mM 咪唑 pH8.5)洗脱目的蛋白。将洗脱后的重组蛋白用透析缓冲液(50mM Tris,0.85% NaCl,1mM EDTA, pH8.5)透析,每隔 12 小时换一次透析液,换液 3 次后,取出透析后的蛋白液,经聚乙二醇 PEG-20000 进行浓缩,于 -20℃ 保存备用。

[0027] 实施例 2 筛选针对间日疟原虫重组蛋白的杂交瘤细胞株

2.1 用间日疟重组蛋白免疫小鼠

取 6~8 周雌性 BALB/C 小鼠(购自上海斯莱克实验动物有限公司),首次免疫皮下多点注射福氏完全佐剂乳化的重组蛋白,100ug/只,后续免疫每两周对小鼠进行腹腔注射不完全福氏佐剂充分乳化的重组蛋白,100ug/只,第五次免疫后尾静脉采血,测定血清效价。择血清效价较好的小鼠加强免疫,脾脏内注射重组蛋白,50ug/只。

[0028] 2.2 细胞融合

2.2.1 饲养细胞的制备

小鼠摘眼球处死,浸泡于 75% 酒精中消毒 5min,撕开小鼠腹外皮肤,暴露其腹膜,用无菌注射器注入 5~10mL 37℃ 预热的 IMDM 无血清培养基(该过程切记不能刺破肠管,否则细胞可能被肠管中滴虫等污染),轻揉小鼠腹腔,悬浮腹腔细胞,吸出腹腔液。1500rpm 离心

3min,用 15% 胎牛血清 IMDM 的培养液重悬。

[0029] 2.2.2 脾细胞的制备

摘眼球处死经加强免疫的小鼠,无菌分离出脾脏,75% 酒精洗涤,再用无血清 IMDM 培养液淋洗,置于筛网上研碎,将脾脏细胞冲洗入无菌离心管,1500rpm 离心 3min,用无血清 IMDM 培养液重悬,计数,调整细胞浓度至 2×10^8 。

[0030] 2.2.3 细胞融合

将骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1:4 比例混合,在无菌的 50mL 离心管中用无血清 IMDM 培养基洗一次,1500rpm 离心 3min,弃上清,尽量不要有残留液体,轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀松动。置于 37°C 水浴,在 90s 内缓缓加入 37°C 预温的 1mL PEG1500,边加边轻微摇动。加入一定量 37°C 预温的无血清 IMDM 培养基终止 PEG 作用。离心,1500rpm 离心 3min,弃上清。

[0031] 2.3 阳性克隆的筛选

2.3.1 细胞培养

用 15% 胎牛血清 HAT 选择培养基重悬细胞沉淀,加入饲养细胞。将该细胞加到 96 孔板内,每孔 200 μ L,将培养板置于 37°C,5%CO₂ 培养箱中培养。在 15% 胎牛血清 HAT 选择培养基中维持 3 天左右,镜检,观察到瘤细胞基本死亡,杂交瘤细胞形成小集落,此时换用 15% 胎牛血清 HT 培养基,每孔 100 μ L。

[0032] 2.3.2 阳性克隆的筛选和亚克隆

采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测各孔抗体效价。抗原包被与封闭:重组蛋白 D 抗原用包被液(0.05M 碳酸缓冲液 pH9.6)稀释成 1 μ g/mL,50 μ L/孔,37°C 3 小时;配制 BSA(1%M/V)封闭液,甩去孔中包被液,拍干后,加入封闭液,300 μ L/孔,4°C 过夜封闭,此后甩去封闭液,包被完成。对于检测阳性的杂交瘤细胞株,再使用有限稀释法进行亚克隆,经过三次克隆后,共筛选得到 10 株杂交瘤细胞株,细胞上清效价 ELISA 结果如下:

细胞株	F184-8B3.9.1	F183-2B12.4.2	F183-3G9.10.3	F183-9F9.4.1	F183-11F7.2.1.3
保藏号	McAb612	McAb619	McAb620	McAb621	McAb622
细胞株	F184-1B1.4.5	F207-1A9.2.9	F207-1A12.12.1	F207-4G3.4.11.3	F207-9G4.5.7.2.
保藏号	McAb623	McAb626	McAb627	McAb628	McAb630

row	612	619	620	621	622	623	626	627	628	630
A, 1 μ g/mL	0.443	2.318	1.197	0.983	1.412	0.947	1.016	0.818	1.349	1.346
B, 1:3	0.519	1.916	0.819	1.240	1.256	0.967	0.336	0.720	1.359	1.043
C, 1:9	0.394	1.931	0.448	0.904	0.838	0.743	0.424	0.642	0.794	0.451
D, 1:27	0.223	1.067	0.295	0.469	0.449	0.422	0.249	0.488	0.284	0.150
E, 1:81	0.105	0.575	0.094	0.363	0.152	0.123	0.127	0.206	0.146	0.112
F, 1:243	0.059	0.213	0.082	0.148	0.096	0.066	0.052	0.096	0.080	0.104
G, 1:729	0.057	0.085	0.093	0.073	0.058	0.055	0.049	0.074	0.092	0.082
H, PBS	0.042	0.045	0.074	0.044	0.047	0.043	0.047	0.054	0.072	0.109

实施例 3 单克隆抗体的大量制备及纯化

3.1 单克隆抗体的大量制备

选择健康 8~10 周的 F1 小鼠,在接种杂交瘤细胞前约一星期向每只小鼠体内注入 0.5mL 液体石蜡。每个细胞株注射 5 只小鼠,每只小鼠腹腔注射约 1×10^6 杂交瘤细胞,接种后 7~10 天小鼠开始产腹水,在此期间严密观察小鼠健康状态和腹水征象,用注射器将小鼠腹水引入试管中,如此反复几次,在小鼠濒临死亡之前,取尽腹水,处死小鼠。

[0033] 3.2 单克隆抗体的纯化**3.2.1 50% 硫酸铵沉淀**

用 4 倍腹水体积的 PB 溶液稀释,往烧杯中贴壁缓缓加入 5 倍腹水体积的饱和硫酸铵 (pH7.0),控制硫酸铵滴加速度为 3~4mL/min,边加边搅拌,加完后让溶液静置 2 小时,然后将悬浊液于 12000rpm 离心 30min。弃上清,用 0.7 倍原腹水体积的 PB 透析液溶解沉淀。

[0034] 3.2.2 透析离心

将溶解后的抗体溶液装入透析袋中,用 PB 缓冲液 (pH7.4) 透析,其间换液三次,两次换液时间间隔不得少于 5 小时,然后将透析完的溶液于 12000rpm 离心 10min。弃沉淀,将上清用 0.22um 的滤器过滤,所得溶液即为所需单克隆抗体溶液。

[0035] 3.2.3 Protein G 亲和纯化

将透析后的单克隆抗体用 Protein G 亲和纯化,洗脱后收集洗脱峰,即得到纯化后单抗。

[0036] 实施例 4 单克隆抗体的鉴定**4.1 抗体亚类的鉴定**

通过单克隆抗体亚类试剂盒(购自 Pierce 公司,货号 37503),具体操作为:将 TMB 溶液和板条恢复至室温,8 孔条每孔加入 50uL 稀释好的抗体 (1ug/mL),8 孔条每孔加入 50uL HRP 标记羊抗鼠 IgG+IgM+IgA,轻轻敲击板子使其混匀,板子遮盖好室温放置 1 小时,板子拍干,用 1×Wash Buffer 加满各孔,再拍干,可用纸巾吸干剩余液体,同上步骤,洗涤三次。每孔加 75uL TMB 显色底物,5 分钟后加入终止液,吸光度 450nm 读数,吸光度 >0.2 就可以视为是阳性。

[0037] 经鉴定,本实验所得 10 株杂交瘤细胞株分泌的单抗均为 IgG1 型。

[0038] 4.2 单克隆抗体抗原表位的鉴定

将筛选得到的 McAb612、McAb620 等 10 个单克隆抗体分别稀释至 1ug/mL,50uL/孔包被酶标板,4℃ 过夜。用 PBST 洗板三次,用 1%BSA 封闭,4℃ 过夜,用 PBST 洗板三次,待用。将筛选得到的 McAb612、McAb620 等 10 个单克隆抗体稀释至 5ug/mL,稀释重组蛋白 D 抗原稀释至 1ug/mL,取各稀释好单抗 500 uL,稀释抗原 50 uL,加入 EP 管中,混合至于 37℃ 1 小时,混合液 50uL/孔加入酶标板中,同时设 PBS 对照,37℃ 反应 30min,洗涤三次,稀释羊抗醛缩酶 aldolase-PcAb 至 1ug/mL,加入酶标板中,50uL/孔,37℃ 反应 30min,洗板三次,加入 1:5000 稀释的兔抗羊抗体,50uL/孔,37℃ 反应 30min,洗板三次,K-Blue TMB 50uL/孔显色 5min,加入 2M H₂SO₄ 50uL/孔,于酶标仪检测各孔 OD450 值,检测结果如下:

row	612	619	620	621	622	623	626	627	628	630
Ag-McAb612	0.040	0.589	0.575	0.436	0.353	0.634	0.513	0.427	0.388	0.342
Ag-McAb619	0.513	0.112	0.680	1.735	0.575	0.297	0.424	0.261	0.577	0.297
Ag-McAb620	0.436	0.718	0.027	0.695	0.533	0.261	0.216	0.291	0.602	0.446
Ag-McAb621	0.533	2.011	0.715	0.061	0.662	0.332	0.335	0.286	0.385	0.502
Ag-McAb622	0.387	0.604	0.643	0.708	0.039	0.423	0.521	0.275	0.229	0.477
Ag-McAb623	0.427	0.680	0.664	0.533	0.415	0.096	0.294	1.303	1.446	0.356
Ag-McAb626	0.342	0.601	0.643	0.575	0.382	0.295	0.075	0.302	0.496	0.391
Ag-McAb627	0.291	0.711	0.695	0.513	0.445	1.116	0.434	0.054	0.523	0.375
Ag-McAb628	0.424	0.577	0.747	0.436	0.303	1.561	0.436	0.289	0.026	0.424
Ag-McAb630	0.388	0.297	0.313	0.328	0.311	0.345	0.261	0.384	0.275	0.058
PBS	1.155	1.017	1.303	1.116	1.250	1.074	1.352	1.228	1.068	1.226

由上表可知, McAb619 和 McAb621 抗原表位不同, McAb623 与 McAb627、McAb628 抗原表位不同。

[0039] 4.3 HPR 标记单抗的制备

取 4mg 的 HRP 溶于 0.5ml 的双馏水中, 加入新配 0.06 mol/L 的过碘酸钠溶液 0.5 mL (10 mL+128mg 过碘酸钠), 混匀置 4°C 冰箱 30min, 取出后加入 0.16 mol/L (10 mL 水 +0.1 mL 乙二醇) 乙二醇水溶液 0.5mL, 于室温放置 30min。分别加入 7.50mg/ml 的 McAb619、McAb621、McAb623、McAb627、McAb628 抗体溶液 1ml 混匀, 装入透析袋中, 对 0.05mol/L PH9.5 碳酸盐缓冲液透析 6h (或者过夜), 使之结合。加 5 mg/mL NaBH₄ 溶液 0.2mL, 混匀置冰箱 2h。将上述溶液放于 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液中, 置 4°C 冰箱 4h。在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 混匀, 4°C 30min, 离心, 去上清, 沉淀以少许 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液溶解, 装入透析袋, 以同样液体在 4°C 透析除盐过夜。次日取出离心, 取沉淀, 用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液溶解, 即得酶-抗体结合物。

[0040] 4.4 单克隆抗体配对

将用杂交瘤单抗 McAb619、McAb621、McAb623、McAb627、McAb628 稀释至 1 μ g/mL, 50 μ L/孔包被酶标板, 4°C 过夜。用 PBST 洗板三次, 用 1%BSA 封闭, 4°C 过夜。用 PBST 洗板三次, 取间日疟阳性临床血清标本以及间日疟临床阴性标本, 50 μ L/孔, 37°C 反应 1h, 同上洗涤三次, 加入 5 株单抗的 HRP 标记物, 37°C 反应 30min, 洗板三次, K-Blue TMB 50 μ L/孔显色 5min, 加入 2M H₂SO₄ 50 μ L/孔, 于酶标仪检测各孔 OD450 和 OD630 值, 根据酶标结果求 P/N 值 (阳性标本检测均值与阴性标本检测均值比值), 结果如下:

row	McAb619	McAb621	McAb623	McAb627	McAb628
HRP-McAb619	3.5	15.6	4.6	8.6	5.7
HRP-McAb621	21.3	6.8	7.0	3.9	5.7
HRP-McAb623	13.2	9.6	10.6	25.6	17.5
HRP-McAb627	11.5	8.9	29.3	9.5	16.4
HRP-McAb628	7.5	3.2	25.7	7.2	9.8

通过上表可知, McAb623 与 HRP-McAb627 配对检测间日疟为最佳组合。

[0041] 实施例 5 利用间日疟重组蛋白单克隆抗体检测人血清样本

5.1 特异性

用 McAb623 与 HRP-McAb627 配对, 检测人 1000 份阴性血清, 结果是特异性为 99.9%, 假阳性为 0.1%。

[0042] 5.2 灵敏度

用 McAb623 与 HRP-McAb627 配对, 检测阳性血清, 特异性为 100%。

[0043] 因此用这两个抗体, 可以制备成间日疟检测试剂盒。

SEQUENCE LISTING

<110> 杭州傲锐生物医药科技有限公司

<120> 间日疟原虫醛缩酶蛋白单克隆抗体的制备方法

<130>

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 150

<212> DNA

<213> aldolase

<400> 1

gagggaatca ttccaggaat taaagttgac aaaggattgg ttaccatccc atgcactgat 60

gatgagaagt ccaccaggg attagatggt ctagctgaga ggtgtaaaga atattacaaa 120

gctggtgcaa ggtttgcaaa atggagagct 150

<210> 2

<211> 50

<212> PRT

<213> aldolase

<400> 2

Glu Gly Ile Ile Pro Gly Ile Lys Val Asp Lys Gly Leu Val Thr Ile
1 5 10 15

Pro Cys Thr Asp Asp Glu Lys Ser Thr Gln Gly Leu Asp Gly Leu Ala
 20 25 30

Glu Arg Cys Lys Glu Tyr Tyr Lys Ala Gly Ala Arg Phe Ala Lys Trp
 35 40 45

Arg Ala
 50

<210> 3

<211> 150

<212> DNA

<213> aldolase

<400> 3

attggttttc tcacagtgag aactttaagt aggacagtgc caccatcett accaggagtt 60

gtattcttat ctggaggtea atctgaagaa gaagcatctg tcaatttgaa ttccatcaat 120

gcgtaggcc cacacccatg ggcgttgacc 150

<210> 4

<211> 50

<212> PRT

<213> aldolase

<400> 4

Glu Gly Ile Ile Pro Gly Ile Lys Val Asp Lys Gly Leu Val Thr Ile
 1 5 10 15

Pro Cys Thr Asp Asp Glu Lys Ser Thr Gln Gly Leu Asp Gly Leu Ala
 20 25 30

Glu Arg Cys Lys Glu Tyr Tyr Lys Ala Gly Ala Arg Phe Ala Lys Trp
 35 40 45

Arg Ala
 50

<210> 5	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> aldolase	
<400> 5	
aactccttgg cgacttatgg aaagtacaag ggaggtgcag gcggagccga tgcaggagca	60
tccctt	66
<210> 6	
<211> 22	
<212> PRT	
<213> aldolase	
<400> 6	
Asn Ser Leu Ala Thr Tyr Gly Lys Tyr Lys Gly Gly Ala Gly Gly Ala	
1 5 10 15	
Asp Ala Gly Ala Ser Leu	
20	
<210> 7	
<211> 396	
<212> DNA	
<213> 重组序列	
<400> 7	
gagggaatca ttccaggaat taaagttgac aaaggattgg ttaccatccc atgcactgat	60
gatgagaagt ccaccaggg attagatggt ctagctgaga ggtgtaaaga atattacaaa	120
gctggtgcaa ggtttgcaaa atggagagct ggcagcggca gcggcattgg ttttctcaca	180
gtgagaactt taagtaggac agtgccacca tccttaccag gagttgtatt cttatctgga	240

ggatcaatctg aagaagaagc atctgtcaat ttgaattcca tcaatgcggt aggcccacac 300

ccatgggcgt tgaccggcag cggcagcggc aactccttgg cgacttatgg aaagtacaag 360

ggaggtgcag gcggagccga tgcaggagca tccctt 396

<210> 8
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 重组序列

<400> 8

Glu Gly Ile Ile Pro Gly Ile Lys Val Asp Lys Gly Leu Val Thr Ile
 1 5 10 15

Pro Cys Thr Asp Asp Glu Lys Ser Thr Gln Gly Leu Asp Gly Leu Ala
 20 25 30

Glu Arg Cys Lys Glu Tyr Tyr Lys Ala Gly Ala Arg Phe Ala Lys Trp
 35 40 45

Arg Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ile Gly Phe Leu Thr Val Arg Thr Leu
 50 55 60

Ser Arg Thr Val Pro Pro Ser Leu Pro Gly Val Val Phe Leu Ser Gly
 65 70 75 80

Gly Gln Ser Glu Glu Glu Ala Ser Val Asn Leu Asn Ser Ile Asn Ala
 85 90 95

Leu Gly Pro His Pro Trp Ala Leu Thr Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser
 100 105 110

Leu Ala Thr Tyr Gly Lys Tyr Lys Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asp Ala
 115 120 125

Gly Ala Ser Leu
130

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 9
ggcagcggca gcggc

15

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 10

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5