



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106706895 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201710103379.2

(22)申请日 2017.02.24

(71)申请人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市高新技术开发区科学大道100号

(72)发明人 王爱萍 牛艳 张改平 周景明
祁艳华 陈玉梅 刘燕凯 刘红亮
赵军

(74)专利代理机构 河南科技通律师事务所

41123

代理人 张晓辉 韩松

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

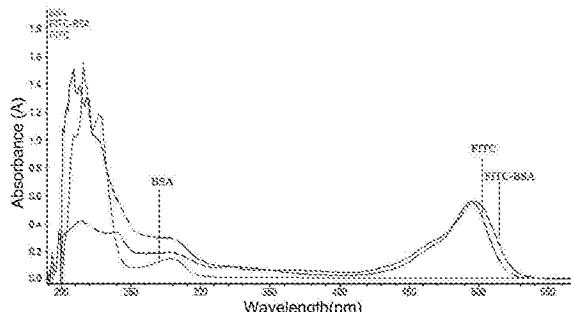
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种抗FITC荧光单克隆抗体及其免疫层析试纸

(57)摘要

本发明涉及一种抗FITC荧光单克隆抗体及其免疫层析试纸,以半抗原FITC与BSA的偶联物FITC-BSA作为人工完全抗原免疫BALB/c小鼠,并筛选出能稳定分泌抗FITC单克隆抗体的杂交瘤细胞株,进而采用体内诱发腹水的方法制备出具有高亲和力和高特异性的抗FITC荧光的单克隆抗体,上述抗FITC单克隆抗体可用于免疫层析检测,能够准确、敏感、快速并且特异地检测出由FITC荧光探针标记的蛋白质或核酸分子,从而实现对靶标蛋白或核酸分子的定性和半定量的检测。



1. 一种抗FITC荧光单克隆抗体,其特征在于:所述单克隆抗体只与FITC特异性结合,其敏感性IC₅₀不大于1.37ng/mI,其亲和力不小于 1.72×10^{10} L/moI。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体,其特征在于:所述单克隆抗体为IgG型,轻链型为Kappa型,亚型为IgG1。

3. 权利要求1或2所述单克隆抗体在检测FITC荧光探针标记的蛋白质或核酸分子中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:通过分子标记技术,能够实现快速、准确、特异性地检测FITC标记物的目的。

5. 一种免疫层析试纸条,由以下步骤制成:

(1) 单抗的胶体金标记

以0.2moI/L K₂CO₃调节胶体金溶液pH至9.0,取待标记的权利要求1所述抗FITC荧光单克隆抗体IgG对20mmoI/L硼酸钠溶液4℃过夜透析,进行胶体金标记;

(2) 检测膜的制备

将硝酸纤维素检测膜切成 $2.5 \times 30\text{cm}^2$ 的长条,置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定;用PBS缓冲液将FITC-OVA人工抗原和兔抗鼠IgG稀释至1mg/mL,经0.22μm滤膜过滤后,用Biojet Quanti 3000以1μL/cm分别将FITC-OVA人工抗原溶液和兔抗鼠IgG溶液喷点于检测膜中央,形成检测线和质控线印迹,检测线与质控线相距0.5cm;将检测膜置42℃干燥箱30min或室温自然干燥后,于4℃干燥密闭保存。

6. 根据权利要求5所述的免疫层析试纸条,其特征在于:所述硼酸钠溶液的pH 8.0,所述PBS缓冲液的pH 7.2。

一种抗FITC荧光单克隆抗体及其免疫层析试纸

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种抗FITC荧光单克隆抗体及其免疫层析试纸。

背景技术

[0002] 异硫氰酸荧光素(FITC)常被用作荧光探针来标记蛋白或核酸分子,因此可以通过免疫学检测方法利用抗FITC的单克隆抗体来检测由FITC标记的蛋白质和核酸分子(即FITC-抗FITC系统)。而FITC作为一种小分子半抗原,不具有免疫原性,因此FITC只能与大分子载体蛋白偶联后才能诱导动物产生免疫应答,再利用杂交瘤技术获得既能无限增殖又能分泌抗FITC单抗的杂交瘤细胞株,最后通过体内诱生腹水的方法获得大量的抗FITC单克隆抗体。

[0003] 由于FITC性质稳定并且1个抗FITC抗体上可同时结合3~4个FITC分子,因而FITC-抗FITC系统可有效地提高抗原抗体反应的敏感性,所以抗FITC单克隆抗体在免疫检测、核酸杂交、免疫斑点技术以及免疫组化等方面均有较广阔的应用前景。

[0004] 此外,免疫层析技术可定性和半定量的检测多种生物大分子或小分子物质。由于该技术具有特异、灵敏、简便、快速、成本低廉等特点,而被广泛应用于疾病诊断、食品安全监测、抗体评价、微生物污染、违禁物添加及药物残留的检测以及环境监测等多个领域。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种抗FITC荧光单克隆抗体,以及一种以该单克隆抗体为核心的免疫层析试纸,该试纸能够快速、特异地对FITC荧光探针标记的蛋白或核酸分子进行检测。

[0006] 为实现上述目的,本发明通过以下技术方案实现:

研制一种抗FITC荧光单克隆抗体,包括:

人工完全抗原的合成,动物免疫,细胞融合,阳性杂交瘤细胞的亚克隆,单克隆抗体的大量制备和纯化,以及单克隆抗体的鉴定。

[0007] 具体步骤为:以半抗原FITC与BSA(牛血清白蛋白)的偶联物FITC-BSA作为人工完全抗原免疫BALB/c小鼠,再(通过杂交瘤技术)筛选出能够稳定分泌抗FITC单克隆抗体的杂交瘤细胞株,最后通过体内诱生腹水的方法大量制备抗FITC单克隆抗体。

[0008] 所述BALB/c小鼠的免疫步骤为:将合成的偶联物FITC-BSA分别加入弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂乳化制成弗氏完全佐剂免疫原和弗氏不完全佐剂免疫原,通过背部皮下多点注射的方法,用弗氏完全佐剂免疫原免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠,共3只,50 μ g/只;在首次免疫14天和28天后分别用弗氏不完全佐剂免疫原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫;最后一次加强免疫后3~30周,细胞融合前3~4天,通过尾静脉注射的方法,用不含佐剂的偶联物FITC-BSA对BALB/c小鼠进行超强免疫,免疫剂量是100 μ g/只。

[0009] 所述单克隆抗体的制备步骤为:采用聚乙二醇诱导进行细胞融合10天后,以半抗

原FITC与OVA(鸡卵清白蛋白)的偶联物FITC-OVA作为包被原,通过间接ELISA法对融合成功的孔进行阳性筛选,然后再对阳性孔进行亚克隆以获得分泌抗FITC单克隆抗体的杂交瘤细胞株,再通过体内诱生腹水的方法大量制备抗FITC单克隆抗体,最后对获得的单抗进行免疫学鉴定。

[0010] 所述单克隆抗体只与FITC特异性结合,其亚型为IgG1,Kappa型,敏感性IC50不大于1.37ng/mI,亲和力不小于 1.72×10^{10} L/moI。

[0011] 上述单克隆抗体在免疫层析试纸检测中的应用,采用上述抗FITC荧光单克隆抗体在免疫层析法中能够快速、特异性地识别FITC荧光探针标记的蛋白质或核酸分子。

[0012] 本发明的积极有益效果在于:

(1) FITC常被用作分子探针来标记蛋白质或核酸分子,而本发明既利用其荧光探针的功能,又利用其半抗原的特性,将其与分子量较大的载体蛋白偶联从而制备出具有较强的免疫原性的人工完全抗原,为下一步获得高亲和力和强特异性的抗FITC单克隆抗体奠定了基础。

[0013] (2) 本发明采用杂交瘤技术建立了能稳定分泌抗FITC荧光单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并且通过体内诱生腹水的方法制备出大量抗FITC荧光单克隆抗体,本发明制备出的单抗不仅与FITC荧光探针具有高亲和力,而且只与FITC荧光探针特异性结合,因此该抗体在免疫检测中具有广泛的研究和商业使用价值,此外,利用所述抗FITC荧光单克隆抗体研发出的免疫层析试纸为快速、特异性地检测各种由FITC探针标记的蛋白或核酸分子提供了技术和物质支撑。

[0014] (3) 利用本发明研制出的免疫层析试纸来检测FITC荧光探针标记的蛋白或核酸分子的方法具有诸多的优点,如灵敏度高,特异性强,不需要昂贵的仪器设备和专业的操作人员,可以实现现场实时检测等。

附图说明

[0015] 图1 人工完全抗原FITC-BSA紫外扫描鉴定结果。

[0016] 图2 人工完全抗原FITC-OVA紫外扫描鉴定结果。

[0017] 图3 人工完全抗原SDS-PAGE鉴定结果。

[0018] 图4 2A7单克隆抗体SDS-PAGE鉴定结果。

[0019] 图5 2A7单克隆抗体亲和力鉴定结果。

[0020] 图6 2A7单克隆抗体特异性鉴定结果。

具体实施方式

[0021] 以下结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步说明,但本发明的保护范围不限于此。以下各实施例中所用原料及试剂,如无特别说明,则均为市售;所涉及的检测方法或试验方法,如无特别说明,则均为常规方法。

[0022] 实施例1

抗FITC荧光单克隆抗体的制备,包括以下步骤:

(1) 实验所用BALB/c小鼠购自郑州大学医学院动物实验中心,主要试剂见表1。

[0023] 表1 实施例1主要试剂

试剂	来源
FITC、BSA、OVA	Sigma 公司
DMSO	天津博科泰微化学试剂有限公司
弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、选择培养基 HAT、 IT、PEG-1500、RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清	Gibco 公司
单抗鼠胸标二抗	Abbkine 公司
聚乙二醇(PEG1500)	Roche 公司
蛋白浓度测定试剂盒	Solarbio 公司
单抗亚型测定试剂盒	北京义翘神州生物技术有限公司
实验用超纯水	本实验室提供

[0024] (2) 人工完全抗原FITC-BSA和FITC-OVA的制备及鉴定：

利用异硫氰酸荧光素易于和蛋白质结合的特性采用直接标记法,将FITC分别与载体蛋白BSA和OVA偶联,从而制备出免疫抗原FITC-BSA和检测抗原FITC-OVA。

[0025] 人工完全抗原的鉴定:用PBS缓冲液分别将人工抗原FITC-BSA和FITC-OVA稀释到1mg/ml,然后分别通过紫外吸收光谱法、SDS-PAGE法以及动物免疫对人工完全抗原进行鉴定。

[0026] (3) 动物免疫：

将合成的FITC-BSA分别加入弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂乳化制成弗氏完全佐剂免疫原和弗氏不完全佐剂免疫原(其中FITC-BSA与弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂体积比均为1:1)。通过背部皮下多点注射的方法,用FITC-BSA弗氏完全佐剂免疫原免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠3只,50 μ g/只;在首次免疫14天和28天后分别用FITC-BSA弗氏不完全佐剂免疫原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫;最后一次加强免疫后3~30周,细胞融合前3~4天,通过尾静脉注射的方法,用不含佐剂的FITC-BSA对BALB/c小鼠进行超强免疫,免疫剂量是100 μ g /只。

[0027] (4) 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选：

对小鼠进行超强免疫后第3天,采用聚乙二醇的方法,将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量10:1的比例进行细胞融合,融合后的细胞用HAT选择培养基进行筛选,分装在铺有饲养细胞的96孔细胞培养板,置37℃、5% CO₂培养箱内培养,10天后,以FITC-OVA作为包被原,通过间接ELISA法对长有杂交瘤细胞的孔进行阳性筛选,再通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,直到获得能稳定分泌抗FITC单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0028] (5) 单抗腹水的制备：

选择经产的雌性BALB/c小鼠,腹腔内注射500 μ l灭菌石蜡,一周后,再次腹腔内注射获得的单克隆杂交瘤细胞,注射量为2×10⁵个细胞,再过一周后,待小鼠腹部膨大后抽取腹水,离心后取上清,用辛酸硫酸铵法对腹水进行纯化。

[0029] (6) 单抗腹水的鉴定：

效价和敏感性测定：分别通过间接ELISA法和间接竞争ELISA法对纯化后的单抗腹水的效价和敏感性进行测定；

亚型鉴定：用亚型鉴定试剂盒对单抗的亚型进行鉴定；

亲和力测定：用CBS液将FITC-OVA稀释成浓度2 μ g/mL和1 μ g/mL的包被液分别包板，通过间接ELISA法测定单抗腹水效价，以单抗浓度为横坐标，OD450值为纵坐标，绘出相应的2条间接ELISA反应曲线，以每条曲线上部平坦段的OD450值作为100%，在曲线上算出50%OD450值时对应的抗体浓度，按照公式 $K_{aff} = (n-1) / 2 (n [Ab'] t - [Ab] t)$ 计算单抗的亲和常数，其中 $n = [Ag] t / [Ag'] t$, $[Ag] t$ 、 $[Ag'] t$ 为2个不同的包被原浓度， $[Ab] t$ 、 $[Ab'] t$ 为各包被原浓度下50% OD450值对应的抗体浓度。

[0030] 特异性测定：分别选择 FITC、空白载体蛋白 (BSA 和 OVA) 及荧光素 Rhodamine B 作为竞争标品，通过间接竞争ELISA法测定所获得的单抗对各竞争标品的敏感性。

[0031] 稳定性鉴定：将所建立的单克隆杂交瘤细胞株连续培养3个月并反复液氮冻存复苏，从而鉴定杂交瘤细胞的稳定性。

[0032] 实施例2

免疫层析试纸条的制备，包括以下步骤：

(1) 单抗的胶体金标记

以0.2moI/L K₂CO₃调节胶体金溶液pH至9.0，取待标记抗FITC单克隆抗体IgG对20mmoI/L硼酸钠溶液(pH 8.0)4℃过夜透析，进行胶体金标记；

(2) 检测膜的制备

将硝酸纤维素检测膜切成2.5×30cm²的长条，置于XYZ 3000喷点仪平台上，并以压条固定；用PBS(pH 7.2)将FITC-OVA人工抗原和兔抗鼠IgG稀释至1mg/mL，经0.22 μ m滤膜过滤后，用Bio jet Quanti 3000以1 μ L/cm分别将FITC-OVA人工抗原溶液和兔抗鼠IgG溶液喷点于检测膜中央，形成检测线和质控线印迹，检测线与质控线相距0.5cm；置42℃干燥箱30min或室温自然干燥；将检测膜置塑料袋，加干燥剂4℃密闭保存备用。

[0033] (3) FITC标准样品的制备

称取10 mg FITC标准品溶解在10 mL PBS(pH7.2)中，配制1 mg/mL FITC标准品母液，将上述FITC标准品母液用PBS缓冲液倍比稀释为不同浓度的FITC标准样品，PBS作为阴性标准品。

[0034] (4) 试纸产品的测试

将FITC检测试纸样品端分别浸入不同浓度的FITC标准样品中10~20s，取出试纸水平放置5~10 min观察结果。试纸显现两条红棕色条带(检测线和质控线)，且检测线显色强度与阴性标准品无明显差别为阴性结果；试纸仅显现一条红棕色条带(质控线)为FITC强阳性；试纸未显现任何条带表明试纸失效。

[0035] 实施例3

对实施例1相关过程进行检测，结果和分析如下：

(1) 人工完全抗原FITC-BSA和FITC-OVA的鉴定结果

两种人工完全抗原的紫外吸收光谱鉴定结果(图1和图2)显示，相对于空白载体蛋白(BSA/OVA)和FITC两者最大的紫外吸收峰而言，人工抗原FITC-BSA和FITC-OVA的最大紫外

吸收峰均发生了偏移,由此可以初步证明FITC-BSA和FITC-OVA偶联成功。

[0036] 人工抗原的SDS-PAGE鉴定结果(图3)显示, FITC-BSA条带相对于BSA条带(66KD)有拖尾现象产生,同样的, FITC-OVA条带相对于OVA条带(43KD)出现明显的拖尾现象,由此证明人工抗原FITC-BSA和FITC-OVA偶联成功。

[0037] 根据公式 $F/P = 3.1 \times A495 / (A280 - 0.31 \times A495)$ 计算出人工抗原FITC与BSA和OVA的结合比率分别是14:1 和13:1。

[0038] (2) 多抗血清效价和敏感性测定结果

最后一次加强免疫后一周,分别对3只小鼠进行剪尾采血,然后通过间接ELISA法和间接竞争ELISA法分别对3只小鼠多抗血清的效价和敏感性进行测定。其中3号鼠的免疫效果最好,效价是1:51200,半数抑制IC50为4.30 ng/mL,因此,选择3号鼠进行融合。

[0039] (3) 细胞融合及筛选结果

细胞融合后,通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行多次亚克隆,获得能稳定分泌抗FITC荧光探针单克隆抗体的杂交瘤细胞株(本例试验所得细胞株命名为2A7杂交瘤细胞株)。

[0040] (4) 单抗腹水制备及鉴定结果

用2A7杂交瘤细胞株通过体内诱生腹水的方法大量制备2A7单克隆抗体,腹水纯化后结果如图4所示,从图中可以看出纯化后的腹水分别在约54KD和25KD处有两条明显的条带,分别代表单克隆抗体的重链和轻链,而且没有其他的杂带,说明纯化效果很好。然后再对获得的2A7单克隆抗体进行免疫学鉴定。间接ELISA测定结果显示2A7单克隆抗体的效价是 2.048×10^{-6} ;根据间接竞争ELISA测定结果计算出2A7单克隆抗体的IC50是1.37ng/mL;亚型鉴定结果显示2A7单克隆抗体属于IgG1,Kappa型;根据亲和力测定结果(图5)计算出2A7单克隆抗体的亲和力是 1.72×10^{10} L/mol;特异性鉴定结果(图6)也表明了2A7单克隆抗体只与FITC特异性结合;将所建立的2A7杂交瘤细胞株连续培养3个月后,仍能稳定分泌抗FITC单克隆抗体,又将2A7杂交瘤细胞株在液氮中反复多次冻融后,测得其细胞培养上清的效价是1:2048,IC50是1.26ng/mL,结果表明获得的2A7杂交瘤细胞株能稳定分泌抗FITC荧光探针单克隆抗体。

[0041] (5) FITC试纸产品的测试结果

FITC试纸产品的测试结果表明,研制出的免疫层析试纸条对FITC荧光探针的检测限度为1.9 ng/mL。

[0042] 上面结合实施例对本发明作了详细的说明,但是,所属技术领域的技术人员能够理解,在不脱离本发明宗旨的前提下,还可以对上述实施例中的各个具体参数进行变更,形成多个具体的实施例,均为本发明的常见变化范围,在此不再一一详述。

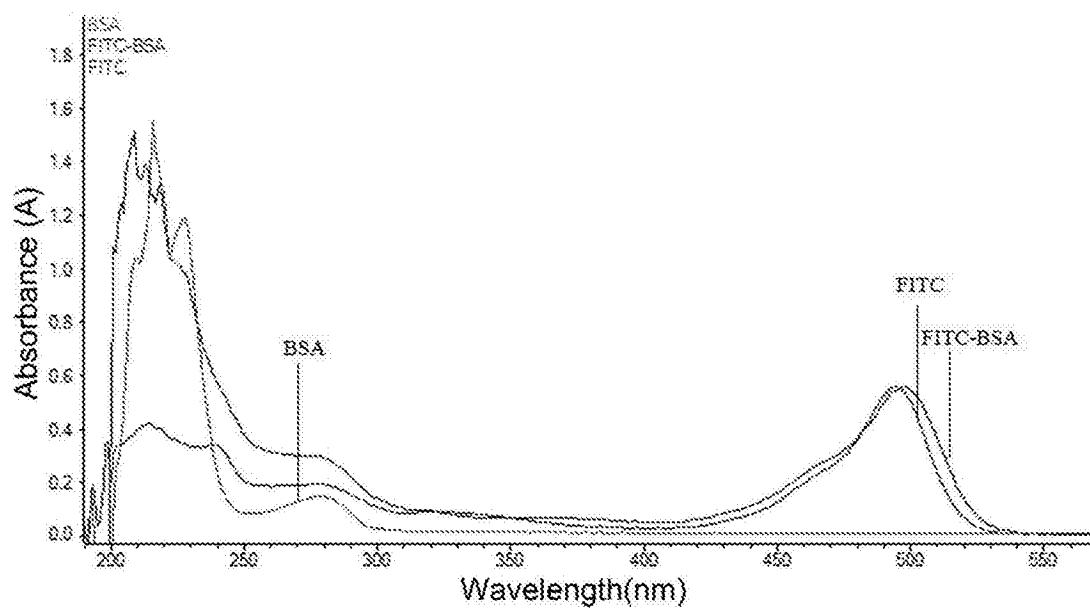


图1

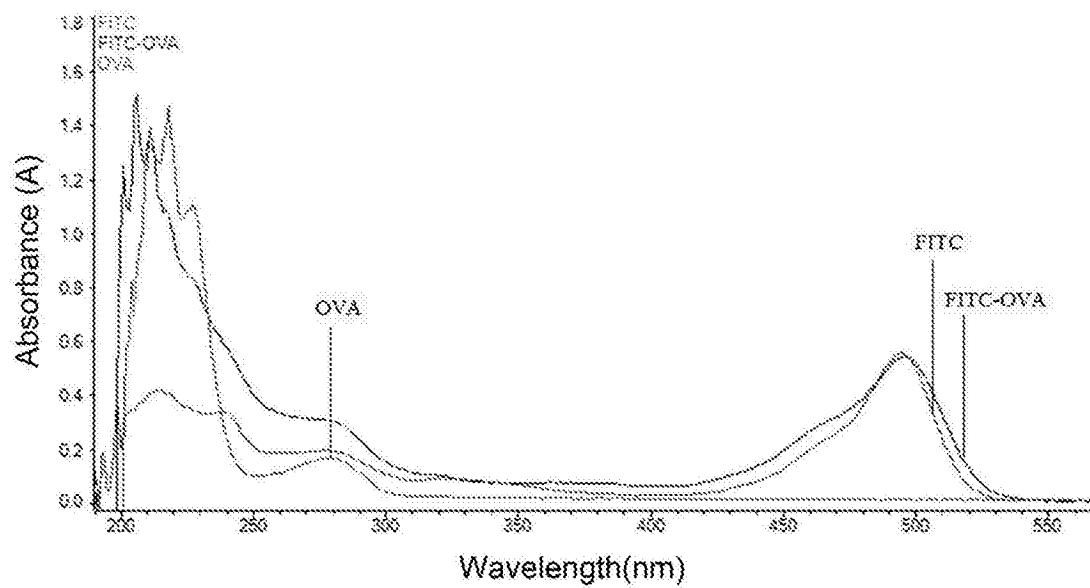


图2

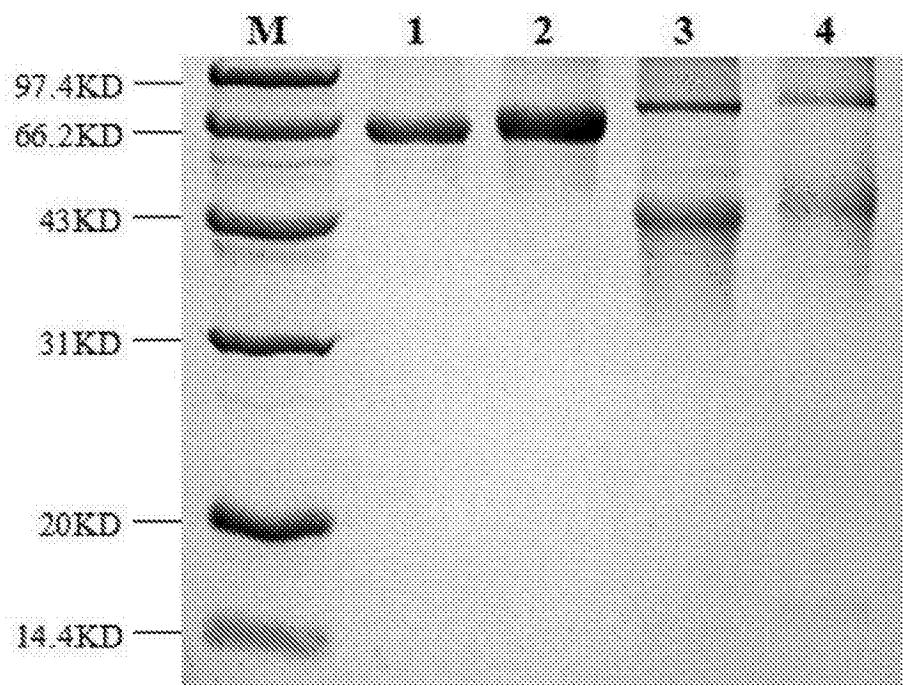


图3

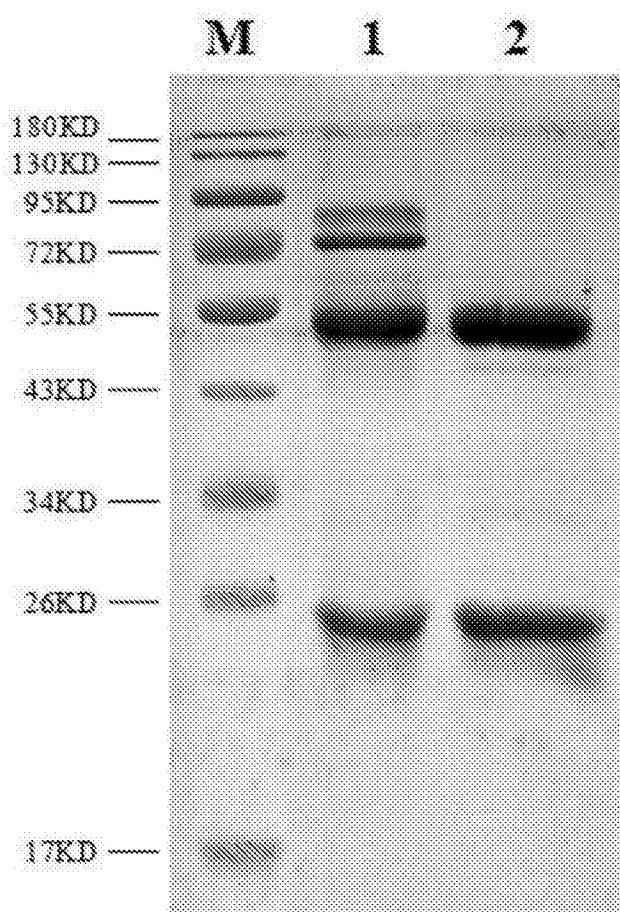


图4

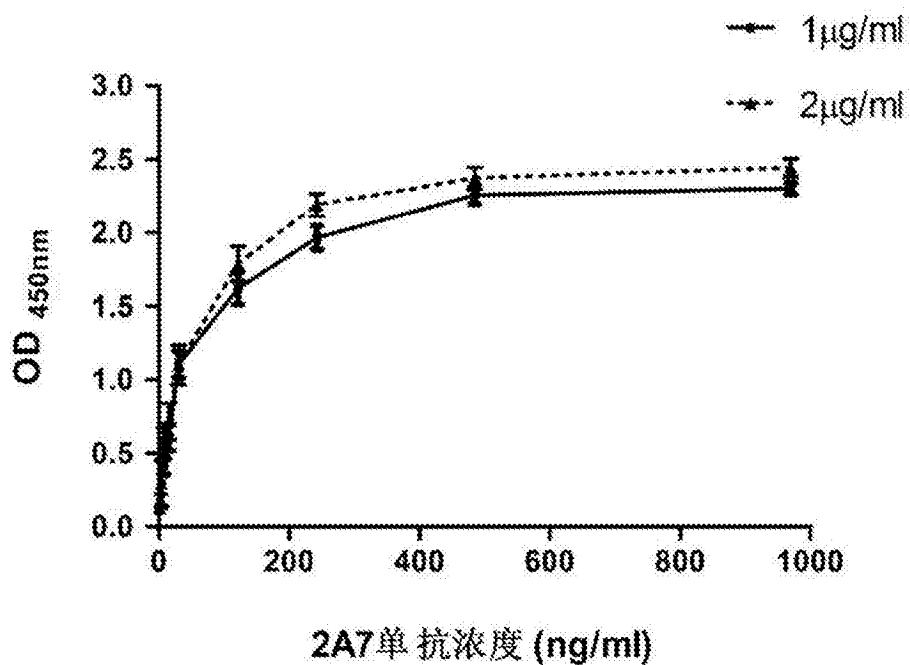


图5

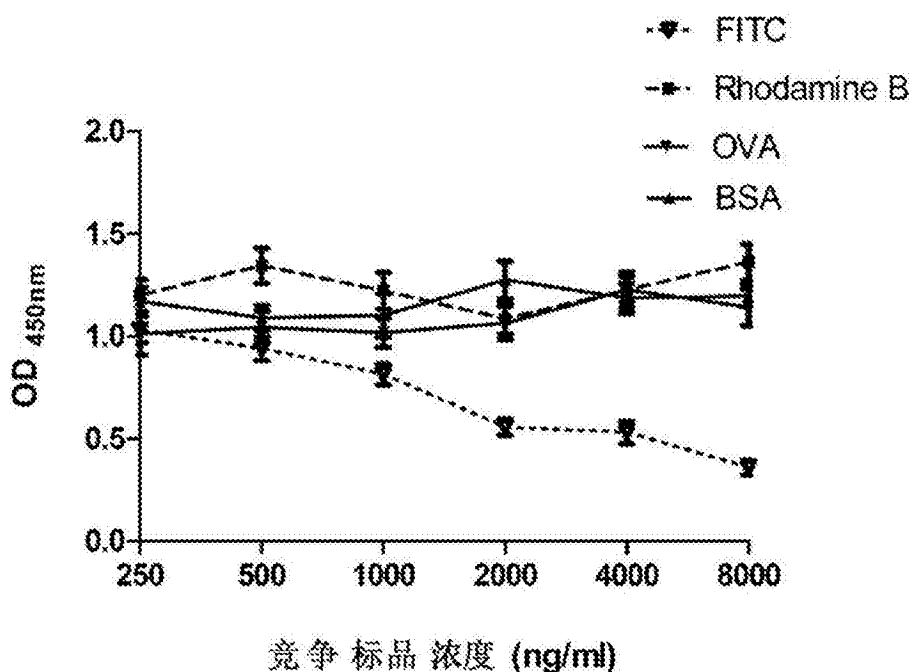


图6

专利名称(译)	一种抗FITC荧光单克隆抗体及其免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN106706895A	公开(公告)日	2017-05-24
申请号	CN201710103379.2	申请日	2017-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学		
申请(专利权)人(译)	郑州大学		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学		
[标]发明人	王爱萍 牛艳 张改平 周景明 祁艳华 陈玉梅 刘燕凯 刘红亮 赵军		
发明人	王爱萍 牛艳 张改平 周景明 祁艳华 陈玉梅 刘燕凯 刘红亮 赵军		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	张晓辉 韩松		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种抗FITC荧光单克隆抗体及其免疫层析试纸，以半抗原FITC与BSA的偶联物FITC-BSA作为人工完全抗原免疫BALB/c小鼠，并筛选出能稳定分泌抗FITC单克隆抗体的杂交瘤细胞株，进而采用体内诱生腹水的方法制备出具有高亲和力和高特异性的抗FITC荧光的单克隆抗体，上述抗FITC单克隆抗体可用于免疫层析检测，能够准确、敏感、快速并且特异地检测出由FITC荧光探针标记的蛋白质或核酸分子，从而实现对靶标蛋白或核酸分子的定性和半定量的检测。

