



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111157735 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201811320776.6

(22)申请日 2018.11.07

(71)申请人 广州万孚生物技术股份有限公司

地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城
荔枝山路8号

(72)发明人 康业 王羽 吴培钿 何小维
黄幼珍

(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 黄菲 万志香

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

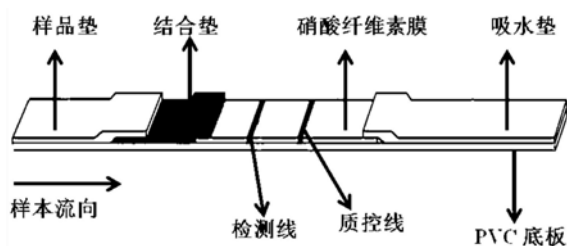
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54)发明名称

凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体及其制备方法
和应用

(57)摘要

本发明涉及一种凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:(1)获取非凝集性卡他莫拉菌,进行常规的培养,得菌液,将所述菌液在冰浴中超声破碎,收集上清液,得耐受原;(2)获取凝集性卡他莫拉菌,进行常规的培养,得菌液,将所述菌液在冰浴中超声破碎,收集上清液,得免疫原;(3)耐受阶段:采用所述耐受原对小鼠进行初次免疫,并在 $10\pm 2\text{min}$ 、 $24\pm 1\text{h}$ 、 $48\pm 1\text{h}$ 分别腹腔注射环磷酰胺(Cy),测定效价;(4)免疫阶段:小鼠耐受后,采用所述免疫原和免疫佐剂继续免疫小鼠,测定效价,再进行杂交瘤细胞融合,即得凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。该抗体纯度高、亲和力强、特异性高。



1. 一种凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 获取非凝集性卡他莫拉菌,进行培养,得菌液,将所述菌液在冰浴中超声破碎,收集上清液,得耐受原;

(2) 获取凝集性卡他莫拉菌,进行培养,得菌液,将所述菌液在冰浴中超声破碎,收集上清液,得免疫原;

(3) 耐受阶段:采用所述耐受原对小鼠进行初次免疫,并腹腔注射环磷酰胺,测定效价;

(4) 免疫阶段:小鼠耐受后,采用含有所述免疫原的免疫制剂继续免疫小鼠,免疫成功后,测定效价,再进行杂交瘤细胞融合,即得凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述非凝集性卡他莫拉菌为MC ATCC8176。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述凝集性卡他莫拉菌为MC ATCC25238。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述超声破碎的工艺参数包括:超声破碎仪的功率为 $400 \pm 10\text{W}$,破碎时间为 5 ± 2 秒,间隔时间为 5 ± 2 秒。

5. 根据权利要求1-3任一项所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述超声破碎的工艺参数包括:超声破碎仪的功率为 $400 \pm 10\text{W}$,破碎时间为 5 ± 2 秒,间隔时间为 5 ± 2 秒。

6. 根据权利要求1-3任一项所述的制备方法,其特征在于,所述腹腔注射环磷酰胺的时间段为所述初次免疫后的 $10 \pm 2\text{min}$ 、 $24 \pm 1\text{h}$ 和 $48 \pm 1\text{h}$;

所述环磷酰胺的注射剂量为 $0.1-0.3\text{mL}$,所述环磷酰胺的浓度为 $5-15\text{mg/mL}$ 。

7. 一种权利要求1-6任一项所述的制备方法制得的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

8. 一种检测凝集性卡他莫拉菌的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括有权利要求8所述的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括有检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条,所述试纸条包被有所述凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

10. 一种检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 取权利要求7所述的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体,将其与胶体金混合,制得免疫金溶胶,再将所述免疫金溶胶均匀地涂布在玻璃纤维之上,制备结合垫;

(2) 另取权利要求7所述的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体,将其包被在硝酸纤维素膜上,作为T线,并将羊抗鼠二抗质包被在硝酸纤维素膜上,作为C线,制备包被膜;

(3) 将所述结合垫、包被膜与样品垫和吸水垫、PVC底板组装,得检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条。

凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,特别是涉及凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*, MC)为革兰阴性双球菌,1896年首次发现,当时被成为卡他微球菌,原属奈瑟菌属,后改称卡他布兰汉菌。一直以来,大家都认为MC是人类上呼吸道的正常寄居菌种,直到20世纪80年代初,它作为病原体的作用越来越明显。这种生物体的特定临床情况如中耳炎和慢性肺病的患者频率越来越高,并被认为是几种感染的致病因子,包括鼻窦炎,结膜炎和喉炎。此外,还报告了散发性脑膜炎,心内膜炎和败血症的病例。卡他莫拉菌的感染部位主要是粘膜而不是全身,粘膜表面的粘附是许多细菌致病性的重要机制,通常通过菌毛或菌毛介导。细菌粘附是由细菌引起的凝集素介导的,包含两种形式的血细胞凝集和自身凝集。通过透射电子显微镜已经证明,卡他莫拉菌通过周缘分布的菌毛附着于咽上皮细胞。用抗霉素免疫血清或胰蛋白酶处理孵育显著降低了这种依从性。另一方面,临床分离株和它们的血凝集滴度之间也存在显着的相关性。因此,建立一种快速,准确和实用的方法来检测凝集性的卡他莫拉菌尤为重要。

[0003] 目前,卡他莫拉菌感染的检测方法主要有血清学检测法、病原体培养检测法和核酸检测法,但都存在检测时间长、操作步骤复杂、成本较高等缺陷,因此制备特异性高、针对性强的单克隆抗体,以便快速、简便且准确的检测卡他莫拉菌具有重要意义。由于Osikowicz和Beggs开发了用于定性检测人绒毛膜促性腺激素(HCG)的胶体金免疫层析法(Osikowicz等,1990),使用胶体金作为示踪剂的分析已广泛应用于诊断性疾病。它是基于特异性抗原-抗体免疫反应的非常有用和敏感的工具。便于快速检测,比其他方法更实惠(Hou et al,2015),无需任何设备和复杂程序,肉眼即可看到结果。

发明内容

[0004] 基于此,本发明提供一种凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体的制备方法,得到了纯度高、亲和力强、特异性高的抗凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体,将其用于胶体金混合制备检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析测试纸条后,能够充分发挥免疫反应的特异性、快速性以及胶体金颗粒作为示踪物的直观性等优点,实现凝集性卡他莫拉菌简便、快速、特异、灵敏的检测。

[0005] 具体技术方案为:

[0006] 一种凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 获取非凝集性卡他莫拉菌,进行培养,得菌液,将所述菌液在冰浴中超声破碎,收集上清液,得耐受原;

[0008] (2) 获取凝集性卡他莫拉菌,进行培养,得菌液,将所述菌液在冰浴中超声破碎,收集上清液,得免疫原;

[0009] (3) 耐受阶段: 采用所述耐受原对小鼠进行初次免疫, 并腹腔注射环磷酰胺, 测定效价;

[0010] (4) 免疫阶段: 小鼠耐受后, 采用含有所述免疫原的免疫制剂继续免疫小鼠, 免疫成功后, 测定效价, 再进行杂交瘤细胞融合, 即得凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

[0011] 在其中一个实施例中, 所述非凝集性卡他莫拉菌为 MC ATCC8176。

[0012] 在其中一个实施例中, 所述凝集性卡他莫拉菌为 MC ATCC25238。

[0013] 在其中一个实施例中, 步骤 (1) 中, 所述超声破碎的工艺参数包括: 超声破碎仪的功率为 $400 \pm 10\text{W}$, 破碎时间为 5 ± 2 秒, 间隔时间为 5 ± 2 秒。

[0014] 在其中一个实施例中, 步骤 (2) 中, 所述超声破碎的工艺参数包括: 超声破碎仪的功率为 $400 \pm 10\text{W}$, 破碎时间为 5 ± 2 秒, 间隔时间为 5 ± 2 秒。

[0015] 在其中一个实施例中, 所述腹腔注射环磷酰胺的时间段为所述初次免疫后的 $10 \pm 2\text{min}$ 、 $24 \pm 1\text{h}$ 和 $48 \pm 1\text{h}$ 。

[0016] 在其中一个实施例中, 所述环磷酰胺的注射剂量为 $0.1\text{--}0.3\text{mL}$, 所述环磷酰胺的浓度为 $5\text{--}15\text{mg/mL}$ 。

[0017] 本发明还提供一种上述制备方法制得的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

[0018] 本发明还提供一种检测凝集性卡他莫拉菌的试剂盒。

[0019] 具体技术方案为:

[0020] 一种检测凝集性卡他莫拉菌的试剂盒, 所述试剂盒包括有上述凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

[0021] 在其中一个实施例中, 所述试剂盒包括有检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条, 所述试纸条包被有所述凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

[0022] 本发明还提供一种检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条的制备方法。

[0023] 具体技术方案为:

[0024] 一种检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条的制备方法, 包括以下步骤:

[0025] (1) 取上述凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体, 将其与胶体金混合, 制得免疫金溶胶, 再将所述免疫金溶胶均匀地涂布在玻璃纤维之上, 制备结合垫;

[0026] (2) 另取上述的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体, 将其包被在硝酸纤维素膜上, 作为 T 线, 并将羊抗鼠二抗质包被在硝酸纤维素膜上, 作为 C 线, 制备包被膜;

[0027] (3) 将所述结合垫、包被膜与样品垫和吸水垫、PVC 底板组装, 得检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条。

[0028] 在其中一个实施例中, 所述免疫金溶胶的制备方法包括以下步骤:

[0029] 将氯金酸水溶液加热至沸腾, 搅拌下加入柠檬酸三钠水溶液, 煮沸, 待溶液稳定呈红色后, 停止加热, 冷却至室温, 调节溶液的 pH 至 $7.0\text{--}9.0$, 得胶体金溶液;

[0030] 向所述胶体金溶液中加入所述凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体, 室温放置 $2\text{--}4\text{min}$, 再加入牛血清白蛋白, 离心分离, 将所得沉淀用含牛血清白蛋白的缓冲液悬浮, 洗涤, 得免疫金溶胶。

[0031] 与现有技术相比, 本发明具有以下有益效果:

[0032] 本发明通过消减免疫法, 并直接以超声破碎后的非凝集性 MC 全菌裂解液作为耐受

原,以超声破碎后的凝集性MC全菌裂解液作为免疫原,制备了特异性高、纯度高、亲和力好的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

[0033] 将本发明制备得到的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体与胶体金混合制备的胶体金免疫层析试纸能够很快检测出凝集性卡他莫拉菌,具有良好的灵敏性、特异性、稳定性、可重复性等优点。即使病原在浓度很低的情况下也能被检出,提高检测的灵敏度和检出率,可严防漏检和误检,相比于现有检测凝集性卡他莫拉菌的方法,本发明的胶体金免疫层析试纸能够实现凝集性卡他莫拉菌更简便、快速、特异、灵敏的检测,具有显著的经济和社会效益。

附图说明

- [0034] 图1为免疫耐受情况示意图;
- [0035] 图2为消减免疫效果示意图;
- [0036] 图3为小鼠腹水效价示意图;
- [0037] 图4为四株细胞腹水纯化后的抗体效价示意图;
- [0038] 图5为抗体亚类鉴定结果示意图;
- [0039] 图6为抗体纯度测定结果示意图;
- [0040] 图7为检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条的示意图;
- [0041] 图8为试剂条灵敏度检测结果示意图;
- [0042] 图9为试剂条特异性检测结果示意图;
- [0043] 图10为试剂条加速破坏稳定性检测结果示意图。

具体实施方式

[0044] 以下结合具体实施例对本发明的凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体及其制备方法和应用作进一步详细的说明。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方式。相反地,提供这些实施方式的目的是使对本发明公开内容理解更加透彻全面。

[0045] 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。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0046] 实施例1

[0047] 1、材料与方法

[0048] 1.1 试验材料与仪器

[0049] 1.1.1 材料

[0050] 具体实施方式中所用的菌株如下:

[0051] M.catarrhalis (ATCC25238、ATCC8176)、肺炎链球菌S.pneumoniae (ATCC25238)、肺炎支原体M.Pneumonia (ATCC15531)、流感嗜血杆菌H.influenzae (ATCC9007)、嗜肺军团菌L.pneumophila (ATCC33152)

[0052] 1.1.2 实验动物

[0053] 雌性Balb/c小鼠:6-8周龄。

[0054] 1.1.3主要试剂及耗材

[0055] RPM1640、胎牛血清 (FBS)、HAT、HT、青链霉素溶液和聚乙二醇 (PEG, Mv4000) 均购自美国Gibco公司; SP2/0骨髓瘤细胞; 完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂, 牛血清白蛋白 (BSA), 吐温-20, 环磷酸胺均购自美国Sigma公司; 小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用酶标二抗套装由洛阳佰奥通实验材料中心提供; 硝酸纤维素膜为美国Millipore公司产品; 氯金酸购自天津化工厂; 柠檬酸三钠购自广州试剂厂; 鼠IgG及羊抗鼠IgG; 96孔酶标板, 深圳金灿华; 酶标仪, hermo scientific MK3; Gel DocTMXR+型凝胶成像系统, 购自美国伯乐公司; 倒置显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司产品; ECFG21高效细胞电融合仪为日本NEPA GENE产品; Milli-Q Advantage A10超纯水仪为美国Millipore公司产品; 高速冷冻离心机为日本HITACH产品; 接触式喷膜机为美国ImageTechnology Inc公司产品; 超声仪购自上海新芝生物技术研究所以, 其余试剂均为国产分析纯。

[0056] 1.2方法

[0057] 1.2.1凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体的制备

[0058] 1.2.1.1耐受原的制备

[0059] 将非凝集性卡他莫拉菌ATCC8176复苏并扩大培养, 收集细菌, 然后用0.15mol/L的PBS (pH7.4) 洗3次 (5000r/min×10min, 4℃), 然后加0.15mol/L的PBS (pH7.4) 混合均匀, 收集菌液 (菌液浓度108CFU/mL), 在冰浴中超声破碎5分钟, (超声破碎仪的功率设置为400W, 破碎5秒, 间隔5秒), 待菌液变澄清, 离心 (12000r/min×30min, 4℃), 收集上清, 得非凝集性MC全菌裂解液, 即耐受原, 用微量分光光度计测量蛋白浓度, 4℃保存备用。

[0060] 1.2.1.2免疫原的制备

[0061] 将凝集性卡他莫拉菌ATCC25238复苏并扩大培养, 收集细菌, 然后用0.15mol/L的PBS (pH7.4) 洗3次 (5000r/min×10min, 4℃), 然后加0.15mol/L的PBS (pH7.4) 混合均匀, 收集菌液 (菌液浓度108CFU/mL), 在冰浴中超声破碎5分钟, (超声破碎仪的功率设置为400W, 破碎5秒, 间隔5秒), 待菌液变澄清, 离心 (12000r/min×30min, 4℃), 收集上清, 得凝集性MC全菌裂解液, 即免疫原, 用微量分光光度计测量蛋白浓度, 4℃保存备用。

[0062] 1.2.1.3耐受阶段

[0063] 选取6-8周龄的雌性Balb/c小鼠12只, 随机分为3组, 分别为: 消减实验组、非凝集性对照组和未消减对照组。

[0064] 分别对消减实验组的4只小鼠注射0.5ml蛋白浓度为1mg/ml [500ug (0.5mL)] 的非凝集性MC全菌裂解液 (耐受原), 进行初次免疫, 并在其后10min、24h、48h分别腹腔注射环磷酸胺 (Cy) 2mg (0.2mL) / 只。

[0065] 非凝集性对照组的4只小鼠, 仅采用非凝集性MC全菌裂解液500ug (0.5mL) 进行初次免疫, 不采用Cy消减。

[0066] 未消减对照组的4只小鼠, 不采用非凝集性MC全菌裂解液进行初次免疫, 不采用Cy消减, 而是采用凝集性MC全菌裂解液作为抗原进行常规免疫。

[0067] 在消减实验组的小鼠末次注射Cy的3天后、非凝集性对照组的小鼠初次免疫3天后, 对小鼠尾静脉取血, 分离血清, 用间接ELISA法检测血清中针对非凝集MC抗原的抗体效价, 结果见图1, 由图1可知, 消减实验组的小鼠血清效价在 1×10^2 时, OD₄₅₀都小于0.2; 非凝集性对照组的小鼠血清效价在 10^5 以上。可见, 消减实验组的小鼠获得了对非凝集性MC的耐

受,可以进行下一步免疫实验。

[0068] 1.2.1.4免疫阶段

[0069] 在末次注射Cy的7天后,采用免疫原(凝集性MC全菌裂解液)和免疫佐剂,对消减实验组的4只小鼠进行免疫,初次免疫时,每只小鼠接种100 μ g由免疫原和免疫佐剂混合而成的抗原;14d后,每只小鼠接种50 μ g由免疫原和免疫佐剂混合而成的抗原,进行第二次免疫;21天后,每只小鼠接种50 μ g由免疫原和免疫佐剂混合而成的抗原,进行第三次免疫;29天后,每只小鼠接种50 μ g由免疫原和免疫佐剂混合而成的抗原,进行第四次免疫;在细胞融合的前三天,每只小鼠腹腔注射50 μ g免疫原进行加强免疫。具体的免疫物质(抗原)及免疫周期如表1所示。

[0070] 表1

[0071]

免疫周期	天数(d)	免疫物质	免疫剂量 (ug/只)	免疫方式
一免	0	免疫原+弗氏完全佐剂	100	背部皮下多点注射
二免	14	免疫原+弗氏不完全佐剂	50	背部皮下多点注射
三免	21	免疫原+弗氏不完全佐剂	50	背部皮下多点注射
四免	29	免疫原+弗氏不完全佐剂	50	背部皮下多点注射
加强免疫	35	免疫原	50	腹腔注射

[0072]

[0073] 加强免疫后,尾静脉取血,测定抗体效价,效价符合要求,准备下一步融合实验。

[0074] 1.2.1.5消减免疫效果

[0075] 分别包被非凝集性卡他莫拉菌和凝集性卡他莫拉菌,以未消减对照组(常规免疫)的小鼠血清为对照,ELISA分别测定其效价。ELISA结果见图2。

[0076] 由图2可知:未消减对照组的小鼠得到的凝集性卡他莫拉菌抗血清,与非凝集性卡他莫拉菌作为抗原包被的反应效价,基本等同于与凝集性卡他莫拉菌作为抗原包被的反应效价,小鼠血清效价基本上都达到了 10^5 ,交叉非常严重;消减免疫法得到的凝集性卡他莫拉菌抗血清,与凝集性卡他莫拉菌作为抗原包被的反应,小鼠血清效价也达到了 10^5 ;而消减免疫法得到的凝集性卡他莫拉菌抗血清,与非凝集性卡他莫拉菌作为抗原包被的反应,小鼠血清效价却只有 10^2 ,即消减免疫使小鼠免疫系统对凝集性卡他莫拉菌和非凝集性卡他莫拉菌全菌抗原的共有抗原决定簇的免疫应答被抑制,而凝集性卡他莫拉菌抗原中目的抗原的免疫应答则相对加强。

[0077] 1.2.1.6脾细胞与骨髓瘤细胞的融合

[0078] 融合前一周,采用常规的细胞复苏方法,复苏冻存的骨髓瘤细胞(SP2/0)细胞,然后挑选状态好的SP2/0细胞,融合前一天换液。取免疫效价符合要求的小鼠的脾脏细胞,置

于无菌筛网上。用注射器芯研磨脾脏,边研磨边滴加1640不完全培养基。研磨至只剩白色的脾脏膜。收集脾细胞至50mL离心管,1200rpm离心5min,弃上清,收集,重悬。SP2/0与脾细胞离心后分别用10mL不完全培养基重悬,稀释计数。最适宜比为1:1到1:4,按比例将两种细胞混合。离心1200rpm 5min,弃上清。用ECF Buffer重悬混匀,再1200r/min低速离心5min,去上清。重复ECF Buffer洗涤一遍。最后用6.4mL ECF Buffer重悬,备用。

[0079] 接通电融合仪电源,按“Ω”键,测电阻,电阻值应大于2KΩ。加入6.4ml ECF Buffer重悬的细胞混合液。注意应缓慢滴加,以免产生气泡影响电阻。按“Ω”键,确认电阻值在0.8K~2KΩ之间。无误后再按“Start”键,等待电融合提示完成。电击结束后将细胞混合液转移至12.8mL修复液中,修复破坏细胞膜。37℃(培养箱)静置10min。注意转移时吸头须伸到液面以下,再缓慢打出,800rpm离心5min。弃上清。用完全培养基(含20%胎牛血清、1%HAT和适宜比例饲养细胞)重悬细胞,转移至96孔板,于37℃细胞培养箱中进行培养。

[0080] 1.2.1.7细胞融合及阳性克隆的筛选

[0081] 共进行5次细胞融合实验,采用间接ELISA法进行克隆筛选,筛选共得到5-6E4、5-5G8、2-20H8D12、2-20H8C7四株能分泌抗凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并对细胞株进行亚克隆后保存。

[0082] 1.2.2检测

[0083] 1.2.2.1间接ELISA检测

[0084] 采用MC菌液作为抗原,将抗原用包被液稀释,加入96孔酶标板,每孔加入100μL,4℃包被过夜,PBST洗涤孔板1次;然后用3%吐温PBS封闭4℃包被过夜;PBST洗涤孔板1次后。将每只免疫小鼠的血清(或是融合培养后待检测的细胞上清及筛选的阳性克隆细胞)分别稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍,加入反应孔中,以未免疫的小鼠血清作为阴性对照,放入37℃恒温箱内反应1h,采用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠作为二抗进行检测,加入TMB显色底物反应后,酶标仪读取各反应孔OD₄₅₀。

[0085] 1.2.2.2腹水及纯化后抗体效价的测定

[0086] 采用小鼠体内诱生法制备单克隆抗体腹水,间接ELISA法进行鉴定,经微量分光光度计测量纯化后蛋白浓度。腹水和纯化后的抗体分别用1%吐温PBST稀释到 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍。在ELISA检测仪上,于450nm(若以ABTS显色,则410nm)处,以空白对照孔调零后测各孔值,若OD大于规定的阴性对照OD值的2.1倍,即为阳性。融合小鼠的眼球血清稀释1000倍作为阳性对照,未经免疫的小鼠血清稀释1000倍作为阴性对照,稀释液作空白对照。

[0087] 小鼠腹水效价测定结果如图3所示,5-6E4、5-5G8、2-20H8D12、2-20H8C7腹水的效价均能达到 10^6 。

[0088] 四株细胞腹水纯化后的抗体效价的测定结果如图4所示,5-6E4、5-5G8、2-20H8D12、2-20H8C7抗体的效价基本达到了 10^6 。

[0089] 1.2.2.3抗体亚类的鉴定

[0090] 将MC菌液(菌液浓度 10^8 CFU/mL),加入96孔酶标板中进行抗原的包被,按照Sigma公司的单克隆抗体亚类鉴定试剂盒对制备的单克隆抗体进行亚类分析。

[0091] 如图5所示,使用小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用酶(HRP)标抗体套装鉴定抗凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体5-5G8、2-20H8C7、2-20H8D12和5-6E4亚类均为IgG2A。

[0092] 1.2.2.4抗体纯度的测定

[0093] 在每个上样孔加入大约8ug抗体蛋白,使用SDS-PAGE凝胶电泳法结合美国伯乐公司的Gel Doc™XR+型凝胶成像系统,检测抗体的纯度,结果如图6所示,4株抗体均可见两条明显的主带,抗体重链大约为55kD,轻链约为25kD。经分析测得,单克隆抗体5-5G8、2-20H8C7、2-20H8D12和5-6E4的纯度分别为81.5%、95.9%、84.7%和74.2%。

[0094] 相对于市面上已有的,根据MC表面蛋白Usp A1肽段分析,以重组蛋白Usp A1-His作为免疫原,进行普通免疫得到的多克隆抗体,上述卡他莫拉单克隆抗体特异性高、纯度高、亲和力好。

[0095] 1.2.3检测卡凝集性他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条的制备

[0096] 步骤1制备结合垫

[0097] 取100ml 0.01%氯金酸水溶液加热至沸腾,边搅动边加入1%柠檬酸三钠水溶液,继续加热煮沸15min,待溶液逐渐稳定成红色后,停止加热冷却至室温,用蒸馏水恢复至原体积。用0.1mol/L的HCL调节金溶液的pH至8.0,得胶体金溶液。

[0098] 取20ug MC单克隆抗体加入至上述1mL胶体金溶液中,放置室温反应2-4min,再加入浓度为0.2%的BSA,饱和游离的胶体金。10000r/min离心30min,去除上清液未结合的蛋白质。轻吸上清液,沉淀用含BSA的缓冲液悬浮,洗涤2-4次,除去未结合的蛋白质,配制成工作浓度保存,得免疫金溶胶。

[0099] 将上述免疫金溶胶均匀地涂布在玻璃纤维上,涂布密度为25cm²/mL,制备结合垫。

[0100] 步骤2制备包被膜

[0101] 另取上述MC单克隆抗体,将其包被在硝酸纤维素膜上,作为T线(检测线),将羊抗鼠二抗质包被在硝酸纤维素膜上,作为C线(质控线),放于30℃,湿度<30%的干燥房,干燥24h。

[0102] 步骤3制备试纸条

[0103] 将上述结合垫、包被膜和样品垫、吸水垫、PVC底板组装,如图7所示,裁切成3mm宽的试纸条,即得检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条。

[0104] 1.2.4检测与评价

[0105] 1.2.4.1检测方法与判定标准

[0106] 将待检样品溶于生理盐水,取80μL滴在样品垫上进行层析,检测时间在5-10min。若检测线(T线)和质控线(C线)均显色,则检测结果判定为阳性;若T线不显色,C线显色,则检测结果判定为阴性;若均不显色,或只T线显色,则说明试纸已失效,结果无效。

[0107] 1.2.4.2试纸条的性能评价

[0108] 灵敏度检测将胶体金标记的免疫层析试纸分别检测 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 CFU/mL标准品,观察阳性结果的最低检测菌浓度。如图8所示:当样品从 1×10^9 CFU/mL稀释至 1×10^6 CFU/mL时,在测试和质控区域观察到两条清晰的红线,而 1×10^5 CFU/mL粘膜炎莫拉氏菌产生很弱的红色测试线 and 低密度样品在对照区域仅产生一条红线。结果表明,在MC的连续稀释液中,试纸条的检出限为 1×10^5 CFU/mL。

[0109] 特异性检测用试纸条分别检测卡他莫拉菌*M. catarrhalis* (ATCC8176、ATCC25238)、肺炎链球菌*S. pneumoniae* (ATCC25238)、肺炎支原体*M. Pneumonia* (ATCC15531)、流感嗜血杆菌*H. influenzae* (ATCC9007)、嗜肺军团菌*L. pneumophila* (ATCC33152)等呼吸道常见病原菌稀释液(用1×PBS将菌体浓度稀释至 1×10^8 CFU/mL),鉴

定试纸条的特异性。如图9所示：只有含有凝集M.catarrhalis的样品在测试和对照区域显示两条红线，而其他样品显示单一红色对照线，表明免疫层析胶体金测试条具有高特异性。

[0110] 加速破坏稳定性检测将同一批次的试纸条置于37℃储存一个月，每7d用阳性样本进行检测。每个样品检测3次以观察稳定性和重复性。图10的结果表明，37℃储存一个月的试纸条，其稳定性和重复性基本无差别。

[0111] 稳定性和重复性检测将3个不同批次的试纸条置于4℃和25℃分别储存6个月，每30d用阳性样本和阴性样本进行检测，且每个样本检测3次，以观察稳定性和重复性。结果为：将试纸条在4℃和25℃储存6个月后，其特异性和灵敏性与新制备的试纸条相比无差别，且平行实验结果稳定。

[0112] 上述检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条可以结合上述凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体与胶体金免疫层析试纸条的优势，具有良好的灵敏性、特异性、稳定性、可重复性等优点，实现凝集性卡他莫拉菌更简便、快速、特异、灵敏的检测，具有显著的经济和社会效益。

[0113] 1.2.5检测凝集性卡他莫拉菌的试剂盒

[0114] 上述检测凝集性卡他莫拉菌的试剂盒包括有上述凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

[0115] 具体的，上述试剂盒包括有上述检测凝集性卡他莫拉菌的胶体金免疫层析试纸条，该试纸条包被有凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。

[0116] 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。

[0117] 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本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，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

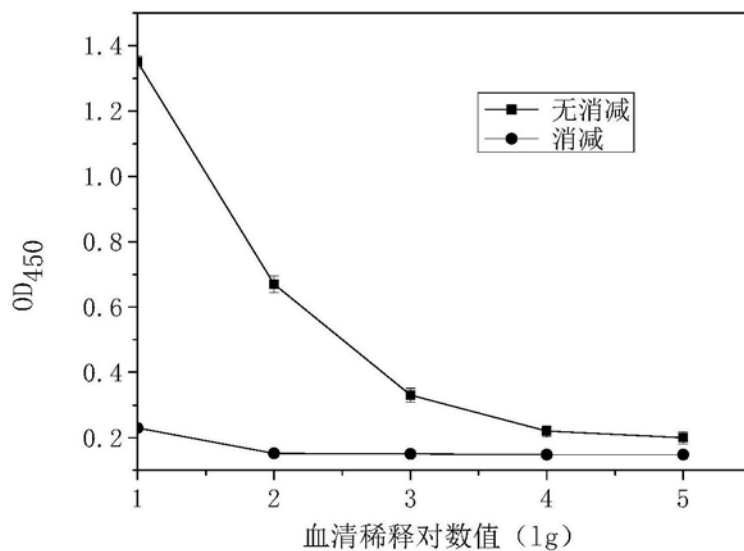


图1

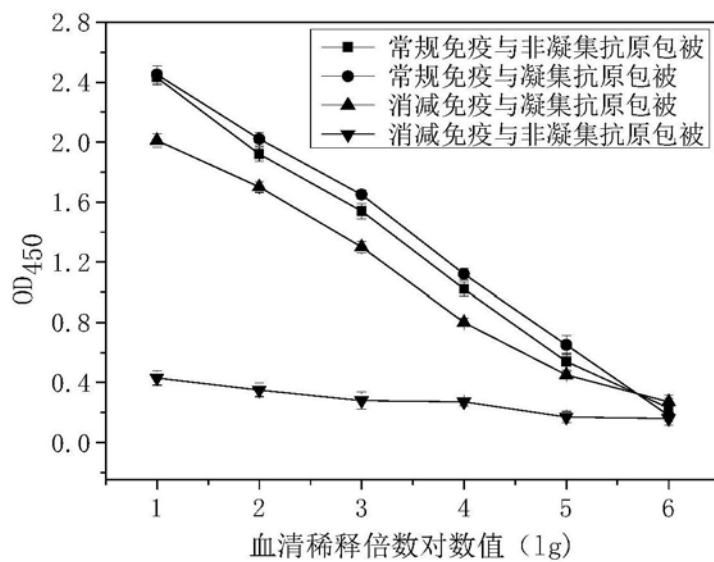


图2

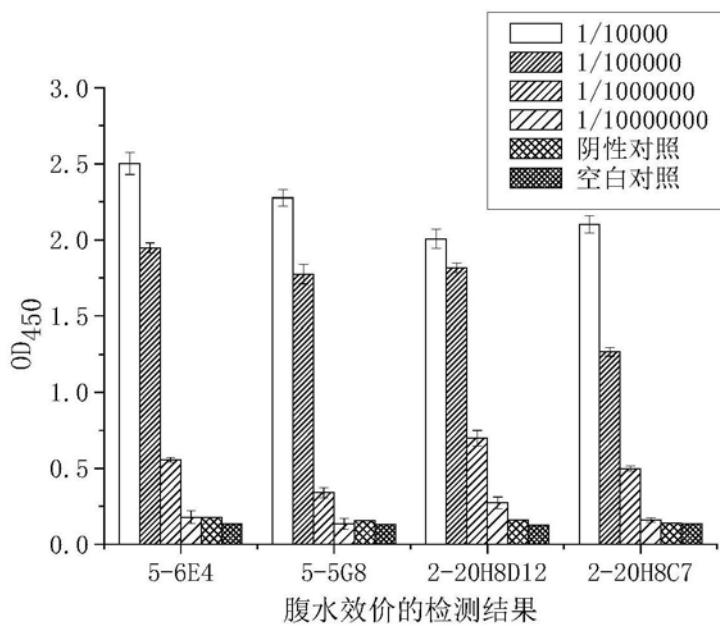


图3

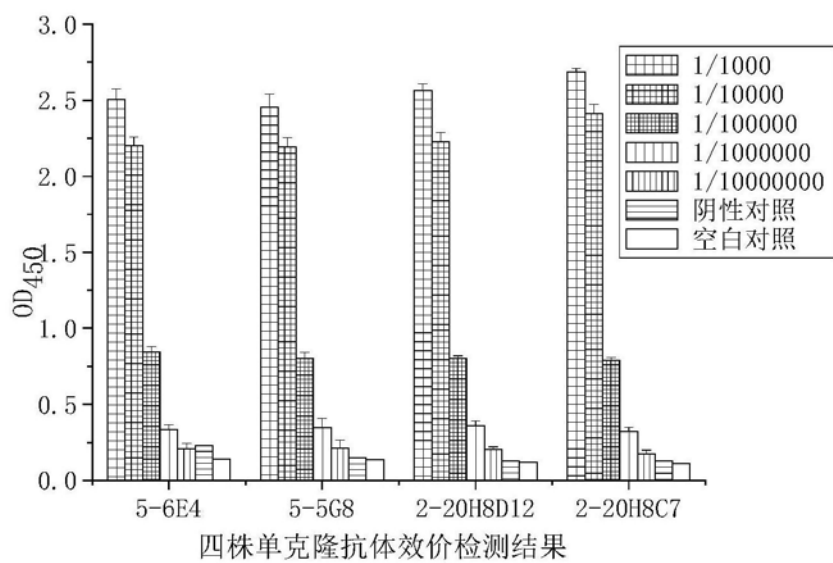


图4

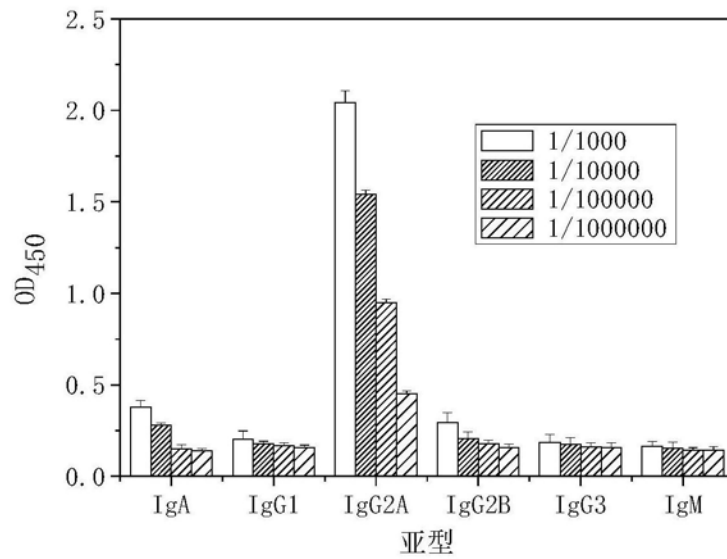
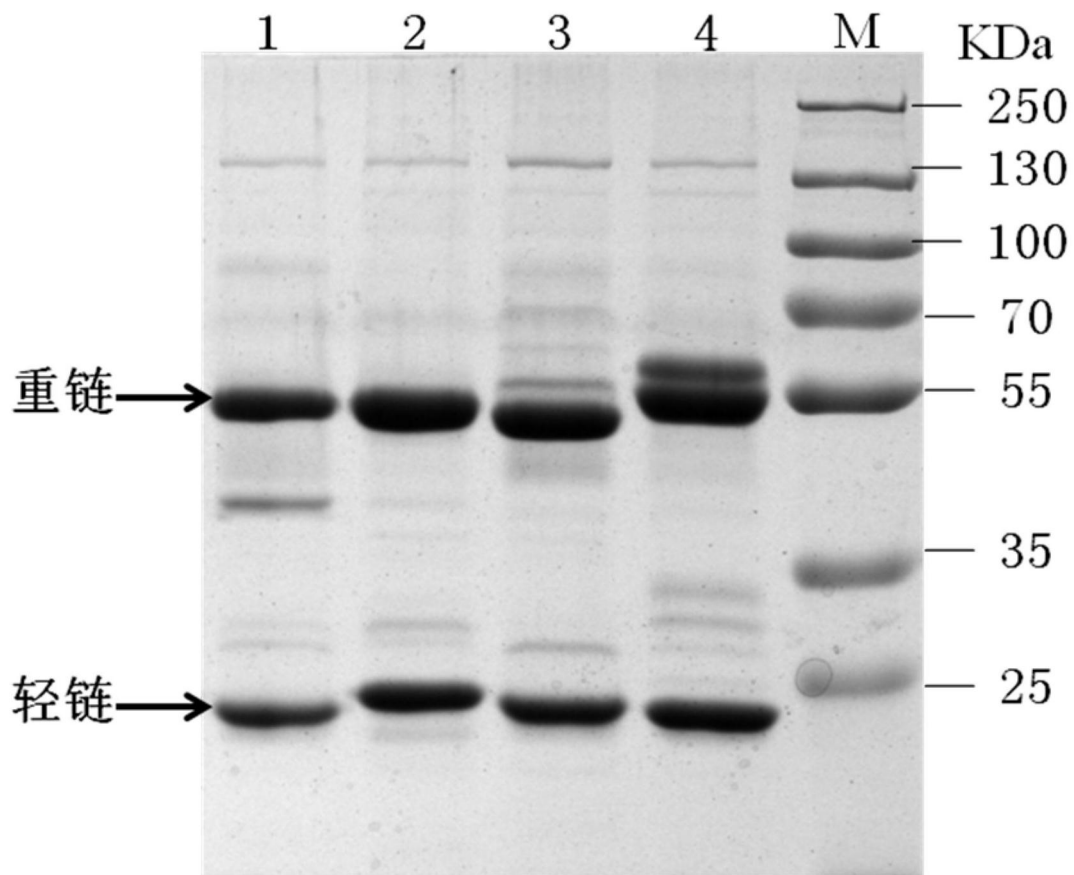


图5



1 : 5-5G8 ; 2 : 2-20H8C7 ; 3 : 2-20H8D12 ; 4 : 5-6E4;

M : 蛋白分子量 Marker

图6

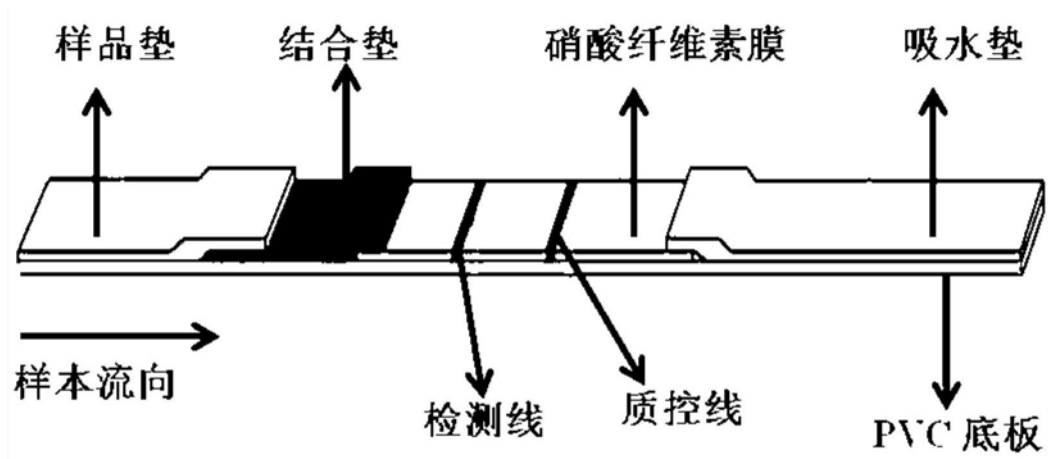
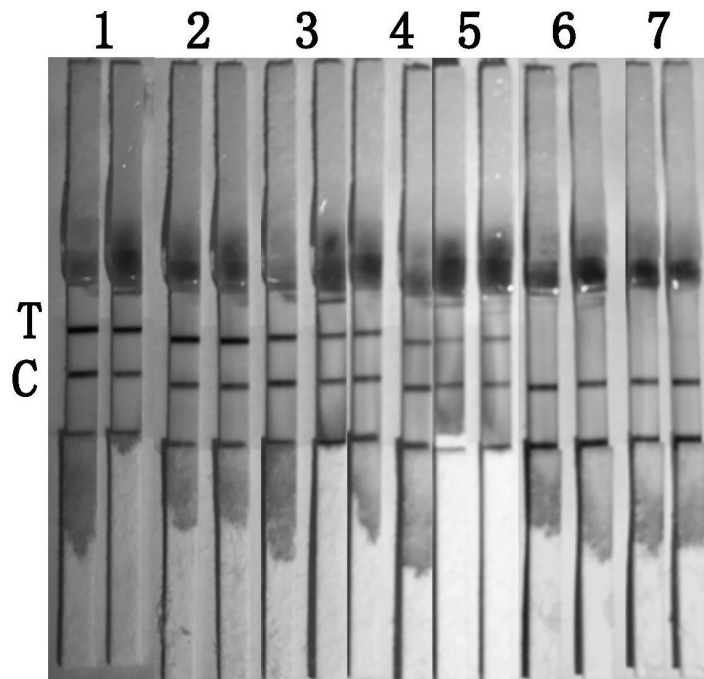
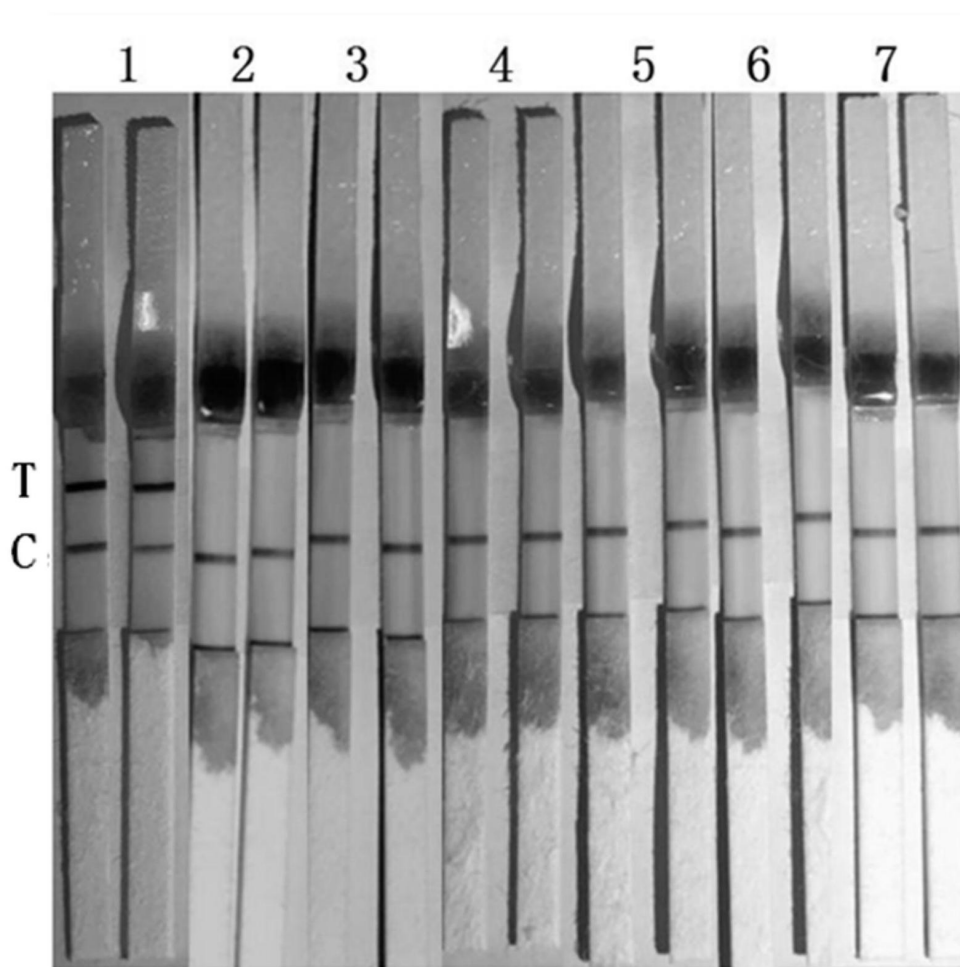


图7



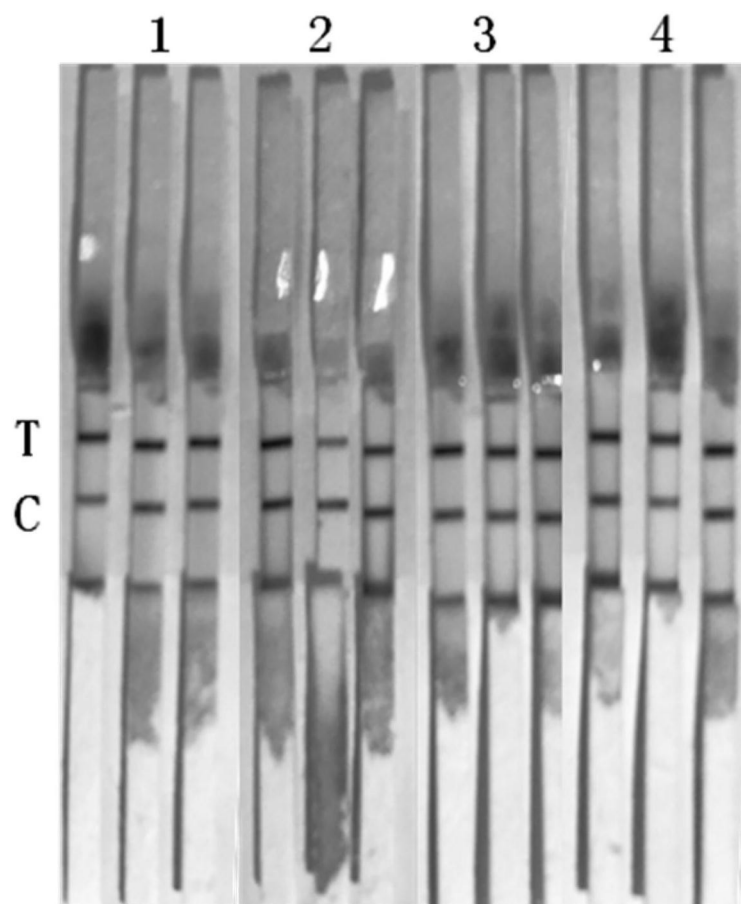
T: 检测线; C: 质控线; 1: 1×10^9 CFU/mL; 2: 1×10^8 CFU/mL; 3: 1×10^7 CFU/mL;
4: 1×10^6 CFU/mL; 5: 1×10^5 CFU/mL; 6: 1×10^4 CFU/mL; 7: 1×10^3 CFU/mL

图8



T: 检测线; C: 质控线; 1: *M.catarrhalis*(ATCC25238); 2: *M.catarrhalis*(ATCC8176);
3: *S.pneumoniae*; 4: *M.Pneumonia*; 5: *H.influenzae*; 6: *L.pneumophila*; 7:阴性
对照

图9



T: 检测线; C: 质控线; 1: 7d; 2: 14d; 3: 21d; 4: 28d;

图10

专利名称(译)	凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN111157735A	公开(公告)日	2020-05-15
申请号	CN201811320776.6	申请日	2018-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
[标]发明人	王羽 吴培钿 何小维 黄幼珍		
发明人	康业 王羽 吴培钿 何小维 黄幼珍		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	黄菲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：(1)获取非凝集性卡他莫拉菌，进行常规的培养，得菌液，将所述菌液在冰浴中超声破碎，收集上清液，得耐受原；(2)获取凝集性卡他莫拉菌，进行常规的培养，得菌液，将所述菌液在冰浴中超声破碎，收集上清液，得免疫原；(3)耐受阶段：采用所述耐受原对小鼠进行初次免疫，并在10±2min、24±1h、48±1h分别腹腔注射环磷酰胺(Cy)，测定效价；(4)免疫阶段：小鼠耐受后，采用所述免疫原和免疫佐剂继续免疫小鼠，测定效价，再进行杂交瘤细胞融合，即得凝集性卡他莫拉菌单克隆抗体。该抗体纯度高、亲和力强、特异性高。

