



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102304183 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 04

(21) 申请号 201010552980. 8

(22) 申请日 2010. 11. 22

(71) 申请人 天津市一瑞生物工程有限公司

地址 300457 天津市经济技术开发区第四大街 80 号天大科技园 C8-3 层

(72) 发明人 苑庆华 何永胜

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

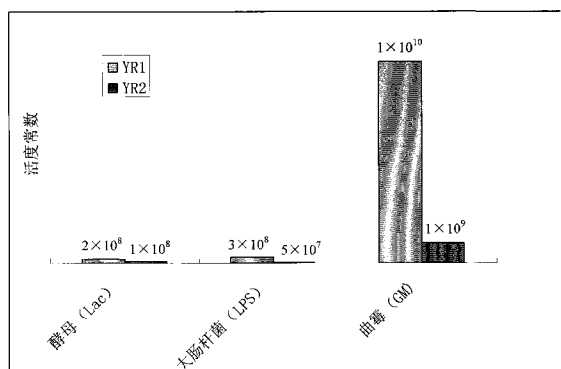
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种曲霉半乳甘露聚糖单克隆抗体的制备及其产品

(57) 摘要

一种曲霉半乳甘露聚糖单克隆抗体的制备及其产品, 本发明以烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 为出发菌株, 采用乙醇分级沉淀、离子交换柱层析和分子筛层析相结合的复合分离纯化技术, 分离出曲霉半乳甘露聚糖蛋白。用半乳甘露聚糖蛋白免疫小鼠, 末次免疫 10 天后, 取小鼠脾脏细胞, 阴性对照小鼠脾脏, 制备饲养细胞。按照 1 : 5 比例, 和 Sp2/0 骨髓瘤细胞在 PEG 的作用下细胞融合。试验获得 2 株阳性亚克隆 YR1、YR2, 且血清型检测均为 IgM 型, 对曲霉半乳甘露聚糖活度常数为 1×10^{10} 、 1×10^9 , 对酵母来源乳糖的活度常数为 2×10^8 、 1×10^8 , 对大肠杆菌来源脂多糖活度常数为 3×10^8 、 5×10^7 。用一株为捕获抗体, 另一株为酶标抗体, 用夹心酶联免疫原理, 制备曲霉半乳甘露聚糖检测试剂盒, 灵敏度达到 0. 1ng/ml。



1. 一种半乳甘露聚糖单克隆抗体制备,其是首先利用乙醇沉淀、离子交换层析、分子筛层析等方法从烟曲霉的发酵物中提取半乳甘露聚糖抗原,接着免疫小鼠,制备单克隆抗体 YR1 和 YR2,为 IgM 免疫球蛋白,活度常数分别为 1×10^{10} 、 1×10^9 。使用 YR2 为酶标抗体, YR1 为捕获抗体,可以制备成试剂盒,用来检测血清中的侵袭性曲霉,作为临床诊断的参考之一。

2. 如权利要求 1 所述的烟曲霉来源为中国医学科学院皮肤病研究所。

3. 如权利要求 1 所述的半乳甘露聚糖纯化的步骤为为乙醇沉淀,透析,离子交换层析,分子筛层析。

4. 如权利要求 3 所述的所用无水乙醇浓度为 50%,4℃静置过夜。

5. 如权利要求 3 所述的半乳甘露聚糖纯化的第二步为离子交换层析,采用 DEAE-52 凝胶,缓冲溶液为双蒸水,洗脱液为 0.1M NaCl 溶液,洗脱时间为 30 分钟左右。

6. 如权利要求 3 所述的半乳甘露聚糖的第三步为分子筛层析,采用 TSK G2000 蛋白柱,示差折光检测器, PBS 缓冲溶液,收集 49min 左右出的峰。

7. 如权利要求 1 所述的制备的半乳甘露聚糖单克隆抗体 YR1 和 YR2,对酵母来源的乳糖,大肠杆菌的脂多糖均不发生特异性反应,而对半乳甘露聚糖抗原具有良好的特异性,其活度常数分别为 1×10^{10} 、 1×10^9 。

8. 如权利要求 1 所述的使用 YR1 和 YR2 来制备曲霉半乳甘露聚糖检测试剂盒,应用于临床诊断领域,并采用阈值质控法。

一种曲霉半乳甘露聚糖单克隆抗体的制备及其产品

[0001] 所属领域：生物医药范畴，更确切说是一种曲霉半乳甘露聚糖的单克隆抗体制备的方法及相关应用于临床诊断曲霉感染的产品。

[0002] 背景技术：经初步检索，未查到以烟曲霉中的半乳甘露聚糖蛋白等天然抗原来免疫小鼠，制备单克隆抗体专利。

[0003] 发明内容：本发明是以烟曲霉为出发菌株，将发酵液经过乙醇沉淀、透析、离子交换柱层析和分子筛层析相结合的复合纯化技术，分离得到层析纯的半乳甘露聚糖蛋白。接着以该蛋白为免疫原，免疫 Balb/c 雌性小鼠，通过有限稀释法获得亚克隆细胞株。然后将这 2 株细胞株培养后，注入小鼠腹腔内（提前一周注射降植烷）。10-15 天，取小鼠腹水，通过离子交换柱层析和分子筛层析结合的复合纯化技术来纯化单克隆抗体。其中，所有阳性细胞株的筛选都是选用直接酶联免疫方法。得到的单克隆抗体可以用来诊断临床的曲霉感染。先参照说明书附图将本发明内叙述如下：

[0004] 一、曲霉菌株的来源：

[0005] 烟曲霉购买自中国医学科学院皮肤病研究所，

[0006] 二、曲霉菌的培养

[0007] 2.1 曲霉培养基配方

[0008] 沙氏培养基：

[0009] 蛋白胨 10g

[0010] 葡萄糖 40g

[0011] 琼脂（固体，液体不加） 15g

[0012] 氯霉素 0.1g

[0013] 调节 pH 6.0 左右，115℃ 灭菌 15min。

[0014] 2.2 曲霉培养条件

[0015] 37℃，100rpm，培养 9 天

[0016] 三、半乳甘露聚糖抗原的提纯

[0017] 半乳甘露聚糖蛋白抗原的纯化主要包括以下几个步骤，见说明书附图 1：

[0018] 1、乙醇沉淀

[0019] 收集烟曲霉发酵液，使用旋转蒸发仪进行初步浓缩。接着向浓缩液中按照 1：1 的比例加入无水乙醇，4℃ 静置过夜。离心分离后，收集沉淀物。

[0020] 2、透析

[0021] 将沉淀物置于透析袋（截留分子量 5 000-8000KD）内，对水透析，过夜。

[0022] 3、离子交换柱层析

[0023] 对上述透析液进行 DEAE-Saphedex 柱层析，紫外检测器，检测波长 260nm，进行洗脱，即：(1) 第一次洗脱使用无离子水，直至无紫外吸收峰出现；(2) 第二次洗脱使用 0.1M NaCl 溶液洗脱至没有紫外峰为止。

[0024] 4、分子筛层析

[0025] 收集 0.1M NaCl 溶液的洗脱峰，浓缩后，进行 TSK G2000 柱层析，采用示差折光检

测器,洗脱液为 PBS(0.1M, Ph7.0) 收集 49min 左右) 出的峰,进行冷冻干燥。

[0026] 5、SDS-PAGE

[0027] 将纯化的半乳甘露聚糖抗原进行 10% SDS-PAGE,结果显示该抗原分子量大小约为 45KD(见说明书附图 2)。

[0028] 四、单克隆抗体的制备与纯化

[0029] 1、使用动物为 Balb/c 小鼠 6 周大小,雌性,驯化一周后开始免疫。

[0030] 2、免疫浓度为 100 μ g 蛋白/只老鼠,注射体积为 1ml,混合等量的弗氏佐剂/不完全弗氏佐剂/生理盐水,并充分乳化。

[0031] 3、初次免疫混合等量的弗氏佐剂,二次和三次免疫混合等量的不完全弗氏佐剂,末次免疫混合等量的生理盐水。

[0032] 4、阳性克隆筛选采用直接酶联免疫反应法检测,酶标抗体选用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠的 IgG。

[0033] 5、末次免疫后,引颈杀死小鼠,取其脾脏细胞;另取阴性对照健康小鼠,同样取脾脏细胞,制备成饲养细胞,杂交瘤细胞选用 sp2/0 骨髓瘤细胞。

[0034] 6、在无菌条件下,将脾脏细胞:骨髓瘤细胞=5:1 比例混合于不完全培养基中,使用 PEG1450 作为融合剂,按照一般细胞融合细胞制备方法进行细胞融合。

[0035] 7、融合后,转移至预先加有完全培养基和饲养细胞的 96 孔板中。

[0036] 8、采用 HAT 培养基法初步筛选融合细胞。接着使用直接酶联免疫反应法来筛选阳性融合细胞,分别使用抗原、对照抗原(酵母来源的乳糖、大肠杆菌来源的脂多糖)进行排除筛选。

[0037] 9、单克隆细胞的制备采用有限稀释法,每次稀释后,进行阳性细胞的筛选。

[0038] 10、将经过三次稀释后的单克隆细胞,进行亚型鉴定,结果显示两株细胞皆为 IgM 型的,分别命名为 YR1 和 YR2。

[0039] 11、接着按照常规方法进行腹水制备。

[0040] 12、收集腹水,按照常规 IgM 抗体纯化方法纯化单克隆抗体。

[0041] 五、单克隆抗体的性能

[0042] 使用 10 μ g 的抗原包被微孔,将单克隆抗体按照二倍梯度稀释法来测定。结果如附图 3 所示。YR1 和 YR2 对半乳甘露聚糖的活度常数分别为 1×10^{10} 、 1×10^9 ,而对酵母来源的乳糖(Lac)、大肠杆菌来源的脂多糖(LPS)的活度常数分别为 2×10^8 和 1×10^8 、 3×10^8 和 5×10^7 。具有良好的特异性。

[0043] 六、酶联免疫反应法试剂盒的组成

[0044] 1、YR2 作为辣根过氧化物酶标记的酶标抗体,YR1 作为捕获抗体,采用四甲基联苯胺(TMB)作为底物;

[0045] 2、质控方法:阈值法,即每个试剂盒中装有阳性对照、阴性对照和阈值对照品,每个对照品均应控制在一定范围内(参见曲霉半乳甘露聚糖检测试剂盒标准)。

附图说明:

[0046] 图 1 是曲霉半乳甘露聚糖提取流程图;

[0047] 图 2 是纯化的半乳甘露聚糖抗原的 10% SDS-PAGE 图图;

[0048] 图 3 是单克隆抗体 YR1、YR2 对曲霉（半乳甘露聚糖）、酿酒酵母（乳糖）、大肠杆菌（脂多糖）的活度常数图。

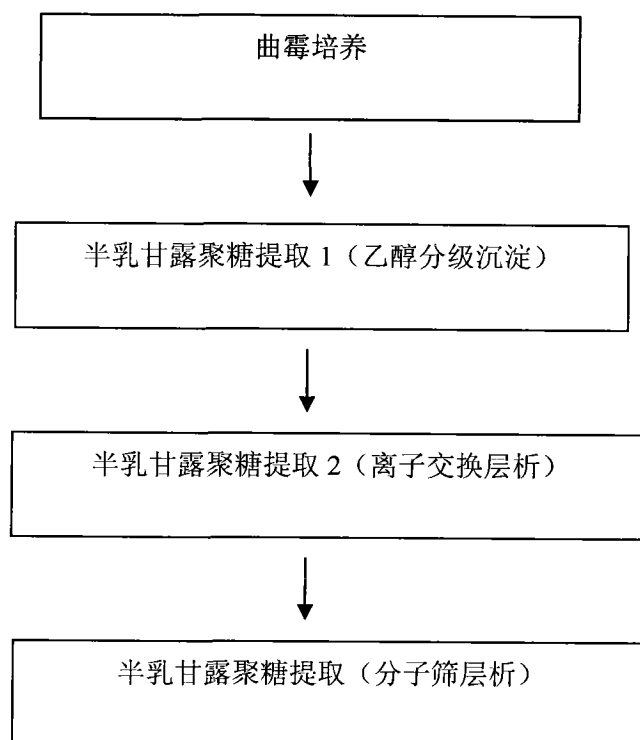


图 1

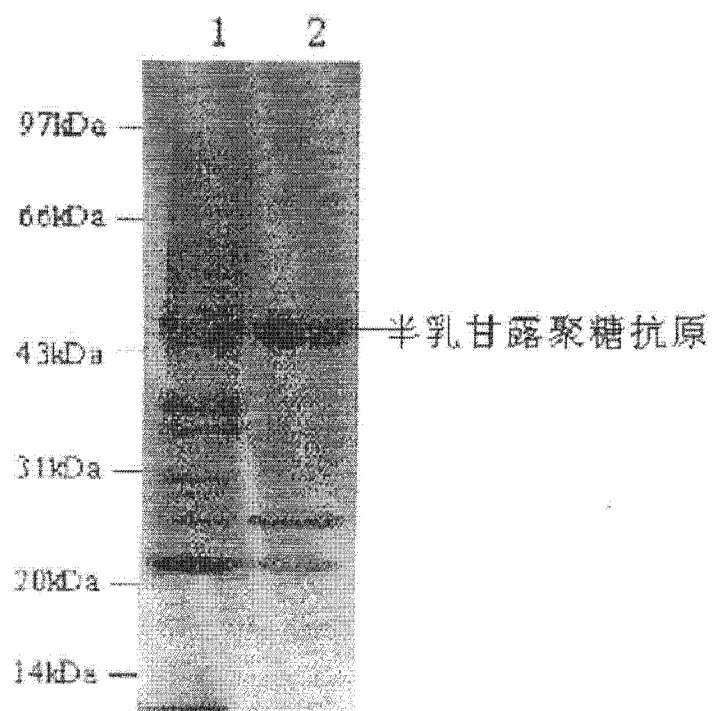


图 2

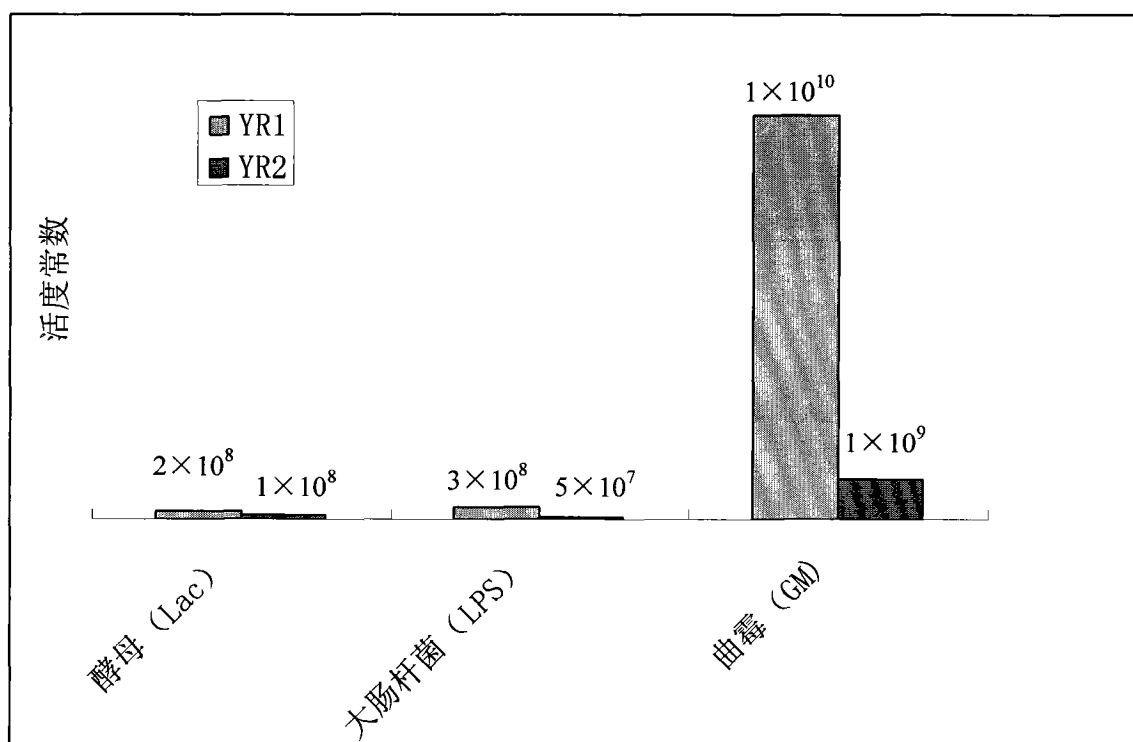


图 3

专利名称(译)	一种曲霉半乳甘露聚糖单克隆抗体的制备及其产品		
公开(公告)号	CN102304183A	公开(公告)日	2012-01-04
申请号	CN201010552980.8	申请日	2010-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	天津市一瑞生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津市一瑞生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津市一瑞生物工程有限公司		
[标]发明人	苑庆华 何永胜		
发明人	苑庆华 何永胜		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种曲霉半乳甘露聚糖单克隆抗体的制备及其产品，本发明以烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 为出发菌株，采用乙醇分级沉淀、离子交换柱层析和分子筛层析相结合的复合分离纯化技术，分离出曲霉半乳甘露聚糖蛋白。用半乳甘露聚糖蛋白免疫小鼠，末次免疫10天后，取小鼠脾脏细胞，阴性对照小鼠脾脏，制备饲养细胞。按照1:5比例，和Sp2/0骨髓瘤细胞在PEG的作用下细胞融合。试验获得2株阳性亚克隆YR1、YR2，且血清型检测均为IgM型，对曲霉半乳甘露聚糖活度常数为 1×10^{10} 、 1×10^9 ，对酵母来源乳糖的活度常数为 2×10^8 、 1×10^8 ，对大肠杆菌来源脂多糖活度常数为 3×10^8 、 5×10^7 。用一株为捕获抗体，另一株为酶标抗体，用夹心酶联免疫原理，制备曲霉半乳甘露聚糖检测试剂盒，灵敏度达到0.1ng/ml。

