



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101149377 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 23

(21) 申请号 200710031109. 1

(22) 申请日 2007. 10. 29

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C200730 2007. 10. 18

CCTCC NO:C200731 2007. 10. 18

(73) 专利权人 南方医科大学珠江医院

地址 510282 广东省广州市工业大道中 253 号

(72) 发明人 车小燕 郝卫 潘玉先 王艳芳

(74) 专利代理机构 广州市天河庐阳专利事务所

44244

代理人 胡济元

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

C12N 5/12(2006. 01)

(56) 对比文件

车小燕等. 抗烟曲霉单克隆抗体鉴定和初步应用. 《中国免疫学杂志》. 2002, 第 18 卷 (第 3

期), 175-177.

郝卫等. 一种快捷、定量检测烟曲霉 GM 抗原双 mAb 夹心 ELISA 的方法. 《细胞与分子免疫学杂志》. 2003, 第 19 卷 (第 3 期), 279-281.

钟晓祝等. 抗烟曲霉单克隆抗体用于侵袭性烟曲霉感染病原学检测的实验研究. 《中华医院感染学杂志》. 2006, 第 16 卷 (第 12 期), 1340-1342.

审查员 李谦

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于检测曲霉的抗体

(57) 摘要

本发明提供了用于检测曲霉的捕获抗体和检测抗体,这两种抗体分别是由杂交瘤细胞 CCTCC NO. C200731 和 CCTCC NO. C200730 产生的单克隆抗体,能特异性结合曲霉属真菌细胞壁分子量为 25 ~ 100kDa 的糖蛋白,与常见的其他真菌,如马尔尼菲氏青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌等的反应均为阴性。本发明所述的抗体可制备成常用的检测曲霉的免疫试剂。

1. 由杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200731 产生的单克隆抗体和由杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200730 产生的单克隆抗体在配对制备检测曲霉的试剂、试剂盒或试纸中的应用,其特征为该应用的具体方式是,杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200731 产生的单克隆抗体用于检测曲霉的捕获抗体,杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200730 产生的单克隆抗体用于检测曲霉的检测抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於所述的试剂盒是双抗夹心 ELISA 试剂盒,该试剂盒由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、酶结合物、阳性对照、阴性对照、浓缩洗液、显色液和终止液组成,所述的捕获抗体是杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200731 产生的单克隆抗体,酶结合物是将杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200730 产生的单克隆抗体用酶标记制得的,其中所述的酶是氧化酶或碱性磷酸酶。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在於所述的酶是辣根过氧化物酶。

4. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於所述的试纸是胶体金快速免疫层析检测试纸,该试纸由样品垫 (1),聚酯纤维素垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3) 和吸水垫 (4) 依次部分重叠组成,聚酯纤维素膜 (2) 上喷涂有一层胶体金 - 单抗 9D47A1 复合物;硝酸纤维素膜 (3) 上分布有检测带 (5) 和质控带 (6),其中检测带 (5) 是在硝酸纤维素膜 (3) 上喷涂杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200730 产生的单克隆抗体形成,质控带 (6) 是在硝酸纤维素膜 (3) 上喷涂羊抗小鼠 IgG1 抗体形成;其中所述的胶体金 - 单抗 9D47A1 复合物由杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200731 产生的单克隆抗体包被在胶体金颗粒上制得。

用于检测曲霉的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学领域,具体涉及一种新的用于检测曲霉的抗体。

背景技术

[0002] 曲霉是自然界中最常见的腐生菌,有 100 多种,其中至少 10 种曲霉是条件致病菌,常污染粮食食品、环境并能感染免疫抑制人群,严重威胁人类健康。由曲霉引发的侵袭性曲霉病 (Invasive Aspergillosis, IA) 由于缺乏早期有效的诊治手段,死亡率很高,达 95%。IA 主要由烟曲霉、黄曲霉引起,少部分由土曲霉、黑曲霉、构巢曲霉引起,其中,烟曲霉是主要的致病菌,约占曲霉类真菌所致人类感染的 80%~90%。

[0003] 在食品检测方面,国内外现行的检测食品中曲霉污染的方法是检测曲霉毒素,主要包括薄层层析法、高效液相色谱法、免疫学分析法等。其中薄层层析法不需要特殊的仪器设备,一般实验室都可以进行,但是对实验人员和环境的污染危害较大,不适合现场快速检测,而且操作繁琐、易受其它组分干扰,因其灵敏度差,无法满足当今日益严格的真菌毒素限量标准。这种方法在发展中国家和我国应用仍较多,而在发达国家逐渐被高效液相色谱法以及免疫学分析法代替。高效液相色谱法,其灵敏度高,准确度好,但仪器昂贵,要求样品纯化程度高,样品前处理过程繁琐,耗时长,要求有专业人员操作,因需要价格昂贵的仪器,检测成本高,在我国难以推广应用,从而影响了我国粮油食品中真菌毒素的有效监测。而且上述方法每次仅能检测一种曲霉毒素,不适合对粮食食品中有害曲霉污染的大规模筛查,从而进一步切断污染环节。因此,目前缺乏快速、特异、广谱检测粮油食品中各种有害曲霉的方法。

[0004] 在临床诊断方面检测曲霉的方法主要是应用 ELISA 夹心法对循环抗原半乳甘露聚糖 (galactomannan, GM) 的检测,GM 是研究学者在感染动物模型和侵袭性烟曲霉病者血清中发现的烟曲霉抗原,也是一种已被鉴定的烟曲霉来源的多糖抗原,这是一种能够早期检测 IA 抗原血症的有效标志。法国巴斯德 Sanofi 诊断中心用大鼠抗 GM 的单抗 EB-A2 作为捕捉抗体和检测抗体,建立双抗体夹心 ELISA 一步法,即 Platelia Aspergillus,检测血液和尿标本,是目前唯一的一种用于早期诊断 IA 的商品化试剂盒。虽然这种试剂盒对抗原检测非常敏感,但大量研究发现在检测可疑曲霉病人的血清以及尿标本时,以及使用过青霉素类抗生素,如哌拉西林-三唑巴坦的病人血清有很高的假阳性率,高达 74%。另外,假阳性的问题同样也存在于儿科人群中,高达 83%,这可能是由于 EB-A2 识别曲霉 GM 的 β (1, 5)-呋喃半乳糖苷侧链残基的同时,但也识别位于其他真菌(如青霉属)细胞壁多糖、新生儿肠道中的双歧杆菌属脂胞壁酸质及其他微生物和食品的交叉表位有关。因此,这种试剂盒的推广应用受到限制。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供新的抗体。

[0006] 本发明的再一目的在于提供所述抗体的应用。

[0007] 本发明新的单克隆抗体是：

[0008] 一种用于检测曲霉的捕获抗体，该抗体是由杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200731 产生的单克隆抗体。

[0009] 一种用于检测曲霉的检测抗体，该抗体是由杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200730 产生的单克隆抗体。所述的检测抗体可以标记酶、生物素或发光物质等能产生可检测信号差异的化学试剂。

[0010] 本发明所述的捕获抗体和检测抗体都是用烟曲霉菌丝体抗原免疫小鼠获得，并用细胞融合技术获得两株分别产生这两种抗体的杂交瘤细胞系 9D47A1 和杂交瘤细胞系 7E11A1，这两株杂交瘤细胞均为 IgG1 阳性。

[0011] 杂交瘤细胞系 9D47A1 和杂交瘤细胞系 7E11A1 于 2007 年 10 月 18 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，保藏号分别为 C200731 和 C200730。

[0012] 为了方便表述，上述由杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200731 产生单克隆抗体命名为单抗 9D47A1，由杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200730 产生单克隆抗体命名为单抗 7E11A1。

[0013] 本发明所述单抗 9D47A1 和单抗 7E11A1 能特异性结合曲霉细胞壁分子量为 25 ~ 100kDa 且与 ConA 结合的糖蛋白，和临床及环境中各种曲霉反应为阳性，如烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、杂色曲霉、棒曲霉、亮白曲霉、聚多曲霉、黄柄曲霉、焦曲霉、赭曲霉、米曲霉等曲霉；但与其他常见真菌的反应均为阴性，如马尔尼菲氏青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌等。

[0014] 本发明所述的两个单抗配对用于检测曲霉，主要是结合双抗体夹心方法的检测，如双抗体夹心 ELISA 方法、胶体金免疫层析或免疫化学发光方法的检测，其中单抗 9D47A1 作为捕获抗体，单抗 7E11A1 单独或者结合各种能发出可检测信号的物质作为检测抗体。基于上述原理，本发明所述的单抗用于制备成可产业化的检测曲霉的试剂，这些试剂可以是试剂盒的形式，也可以是试纸的形式。所述的试剂盒可以是双抗体夹心 ELISA 试剂盒、免疫化学发光试剂盒等，所述的试纸可以是胶体金快速免疫层析检测试纸等。

[0015] 本发明所述的检测曲霉的双抗体夹心 ELISA 试剂盒，该试剂盒由以下试剂组成：包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、酶结合物、阳性对照、阴性对照、浓缩洗液、显色液、终止液，其特征在于捕获抗体为单抗 9D47A1，酶结合物是将单抗 7E11A1 用酶标记制备得到，所述的酶是氧化酶或碱性磷酸酶，如辣根过氧化物酶标记。

[0016] 本发明所述的检测曲霉的胶体金快速免疫层析检测试纸，该试纸由样品垫，聚酯纤维素垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次部分重叠组成，其特征为聚酯纤维素膜上喷涂有一层胶体金 - 单抗 9D47A1 复合物；硝酸纤维素膜上分布有检测带和质控带，其中检测带是在硝酸纤维素膜上喷涂单抗 7E11A1 形成，质控带是在硝酸纤维素膜上喷涂羊抗小鼠 IgG1 抗体形成；其中所述的胶体金 - 单抗 9D47A1 复合物由纯化的 9D47A1 包被在由氯金酸制成的胶体金颗粒上制得，其颗粒大小为 18 ~ 20nm，呈深红色。

[0017] 本发明所述的免疫化学发光试剂盒，该试剂盒的组成与双抗体夹心 ELISA 试剂盒相似，只是其中的单抗 7E11A1 标记的是荧光素等化学发光物质。

[0018] 本发明所说的检测曲霉的试纸 / 试剂盒操作简单，快速，特异性高，与其它真菌无交叉反应，既可用于粮食或食品的质量控制中曲霉的检测，又可用于环境中如空气、木头、衣物等曲霉污染的检测，还可以为 IA 病人的早期诊断提供依据。本发明试纸 / 试剂盒与现

有检测曲霉的技术相比有以下优点：

[0019] 1、用于食品质量控制，与现有检测曲霉毒素技术相比，可利用本发明酶联免疫技术试剂盒或者胶体金试纸条技术，对可疑受到曲霉的污染样本进行大规模的初步筛查，可简易、快速、准确地检测出样本中曲霉抗原；

[0020] 2、用于环境曲霉污染监控，可利用本发明酶联免疫技术试剂盒或者胶体金试纸条技术，对可疑受到曲霉的污染木头、衣物等进行大规模的初步筛查，可简易、快速、准确地检测出样本中曲霉抗原；

[0021] 3、与目前用于诊断 IA 的早期诊断试剂盒相比，具有相似的灵敏度，但特异性更高，与青霉菌、念珠菌等其他真菌无假阳性反应，成本低，适合国内基层单位使用。

附图说明

[0022] 图 1 是本发明单抗 9D47A1 和单抗 7E11A1 对经 ConA 结合柱纯化的曲霉细胞壁糖蛋白进行免疫印迹的结果，其结合条带的分子量为 25-100kDa；其中条带 1 是 Marker，条带 2 是单抗 7E11A1，条带 5 是单抗 9D47A1，条带 3,4 为无关单抗。

[0023] 图 2 是本发明胶体金快速免疫层析试纸的结构示意图，其中 1 是样品垫，2 是聚酯纤维素垫、3 是硝酸纤维素膜、4 是吸水垫、5 是检测带、6 是质控带。

[0024] 图 3 是本发明检测曲霉的胶体金快速免疫层析试纸对 19 种真菌的检测结果，其中 1 是土曲霉，2 是黄柄曲霉，3 是黄曲霉，4 是构巢曲霉，5 是黑曲霉 (ATCC 10864)，6 是黑曲霉，7 是焦曲霉，8 是杂色曲霉，9 是棒曲霉，10 是亮白曲霉，11 是聚多曲霉，12 是赭曲霉，13 是米曲霉，14 是烟曲霉，15 是白色念珠菌，16 是热带念珠菌，17 是光滑念珠菌，18 是近平滑念珠菌，19 是克柔念珠菌，20 是马尔尼菲氏青霉菌。

具体实施方式

[0025] 例 1 本发明单克隆抗体的制备和鉴定

[0026] 1、单抗 9D47A1 和单抗 7E11A1 的制备

[0027] 1) 烟曲霉菌丝体抗原制备：

[0028] 烟曲霉菌株在沙氏平板上 37℃ 生长数天至形成单菌落。将典型的单菌落收获，加至含有 50ml RPMI-1640 的 500ml 锥形瓶中，37℃ 摇菌 3-7 天，过滤分离菌丝体及过滤液。将收集的菌丝体重悬于 PBS 中，超声裂解，离心后收集上清，并储存于 -80℃ 备用。

[0029] 2) 免疫小鼠

[0030] 取 4-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠，第一次采用弗氏完全佐剂与等体积烟曲霉菌丝体抗原混匀乳化，皮下注射 100 μg/ 只小鼠，以后每 10 天以弗氏不完全佐剂与 50 μg 抗原等体积乳化，腹腔和皮下多点注射，小鼠免疫 4 次后，于融合前 3 天静脉加强 100 μg/ 只抗原。

[0031] 3) 免疫血清效价测定

[0032] 采用间接 ELISA 法测定免疫血清效价。配制 10 μg/ml 烟曲霉菌丝体抗原的 50mM pH9.6 碳酸盐缓冲液，包被聚苯乙烯微 96 孔板，100 μl/ 孔，4℃ 过夜。次日，含 0.25% 酪蛋白 (Sigma) 的封闭液 300 μl/ 孔 4℃ 过夜，甩干包被板条，真空干燥 12 ~ 24h，用铝箔袋真空包装 4℃ 保存，用于鼠免疫血清效价测定。于第三次免疫后 10 天眼眶采血，鼠免疫血清用含 1% BSA 10mM PBS 以 10³ ~ 10⁶ 倍稀释，加入 96 孔板，100 μl/ 孔 37℃ 30min，10mM

PBS 含 0.1% Tween-20 洗涤液洗板四次后,加入 1 : 1000 倍稀释辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(Sigma, INC.),100 μ l/ 孔 37 $^{\circ}$ C 30min,同上洗板后,加入含有 0.05% (W/V) TMB 和 0.06% (W/V) 双氧 pH5.0 柠檬酸缓冲液,100 μ l/ 孔,室温避光 10min,加 100 μ l/ 孔 1M H₂SO₂ 终止反应,测 450nm 吸收值,以免疫前小鼠血清作为阴性对照,以测定值与对照值得比 ≥ 2.1 为阳性来判断免疫血清的效价。

[0033] 4) 杂交瘤制备

[0034] 选择血清抗体效价达 1×10^5 的小鼠,于融合前 3 天尾静脉注射 100 μ g 烟曲霉菌丝体抗原。无菌取小鼠脾脏,制成脾细胞悬液与对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞株 NS-1 按 10 : 1 的比例混合,用 45% 聚乙二醇 (PEG, MW4000, Sigma) 作用下进行融合。按下述步骤将聚乙二醇溶液加入细胞。在 37 $^{\circ}$ C 水浴中,在 1-2min 内缓慢加入 1.0ml PEG,边加边轻轻摇匀,分别于 1min、2min、3min、4min、5min 内加 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 无血清 RPMI-1640 培养基终止融合,最后加入 10ml 含 15% FBS 的二合一培养基,室温 1000rpm 离心 5min,弃上清,用 36ml 含 15% 胎牛血清的培养基轻轻悬起细胞。将此细胞悬液加入 6 块 96 孔培养板上,在二氧化碳培养箱中温度为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中。一天以后,于每孔加入 100 μ l 含次黄嘌呤、氨基喋呤 - 胸腺嘧啶脱氧核苷 (HAT, Sigma) 筛选培养基。以后每 3 天用此筛选培养基给培养物换液一次,直到克隆细胞形成。

[0035] 4) 筛选分泌曲霉抗原单克隆抗体的杂交瘤细胞

[0036] 间接 ELISA 法筛选细胞培养上清,选择强阳性克隆杂交瘤细胞进行亚克隆化,并用有限稀释法连续克隆化 2-3 次,得到 2 株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。将克隆化后阳性率达 100% 的细胞扩增培养后液氮冻存。

[0037] 小鼠体内接种阳性杂交瘤细胞,制备腹水,并采用辛酸 - 硫酸铵沉淀法纯化腹水中的抗体。

[0038] 2、本发明单克隆抗体的特异性鉴定

[0039] (1) 实验材料:烟曲霉株(购自北京大学医学真菌研究中心)

[0040] (2) 抗原制备:

[0041] 烟曲霉菌株在沙氏平板上 37 $^{\circ}$ C 生长数天至形成单菌落。将典型的单菌落收获,加至含有 50ml RPMI-1640 的 500ml 锥形瓶中,37 $^{\circ}$ C 摇菌 3-7 天,过滤分离菌丝体及过滤液。将收集的菌丝体重悬于 PBS 中,超声裂解,离心后收集上清,并储存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

[0042] (3) 抗体亚类鉴定

[0043] Ig 亚类鉴定采用间接 ELISA,包被烟曲霉菌丝体抗原,封闭后与杂交瘤细胞培养上清孵育,再分别与为 1 : 1000 倍稀释 HRP 标记的兔抗小鼠不同亚类特异性免疫球蛋白,这些抗体包括兔抗小鼠 IgG1(Sigma, Inc),兔抗小鼠 IgG2a(Sigma, Inc),兔抗小鼠 IgG2b(Sigma, Inc),兔抗小鼠 IgG3(Sigma, Inc),兔抗小鼠 IgM(Sigma, Inc)。检测结果两株杂交瘤细胞株均为 IgG1 阳性

[0044] (4) 间接 ELISA 法进行单克隆抗体特异性分析:

[0045] 用烟曲霉菌丝体抗原包被微孔板,按照常规的间接 ELISA 法进行检测。在包被的微孔板中加入本专利发明的杂交瘤细胞培养上清液,37 $^{\circ}$ C 再孵育 1h,加入 1 : 1000 稀释辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(Sigma, Inc),100 μ l/ 孔 37 $^{\circ}$ C 30min,加 TMB 显色液室温避光 10min,加 1M H₂SO₂ 终止反应,测 450nm 吸收值 (A₄₅₀)。表 1 结果显示本专利发明的单

克隆抗体与曲霉抗原产生很强的特异性的免疫反应。

[0046] 表 1 :曲霉单克隆抗体与曲霉抗原反应间接 ELISA 结果

[0047]

A ₄₅₀	曲霉单克隆抗体		无关抗体
	9D47A1	7E11A1	
	1.842	1.934	0.082

[0048] (5) 间接免疫荧光法鉴定本发明单克隆抗体的特异性

[0049] 1) 实验材料 :烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉和土曲霉,白色念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、马尔尼菲氏青霉菌。

[0050] 2) 实验方法 :

[0051] 曲霉菌株在沙氏平板上 37°C 生长数天至形成单菌落,收集典型的单菌落,用预冷的 1 × PBS 收集、洗细胞二遍并调整浓度为 1×10^6 个细胞 /ml,然后将细胞滴于无菌干燥的玻片上,干燥后,制备成涂片,充分干燥,用预冷固定液(丙酮:甲醇体积比为 3 : 7)固定 20min,吹干,将单克隆抗体调整浓度为 10 μg/ml,加至不同曲霉菌株的荧光涂片孔中,同时设阴性和阳性对照血清,置 37°C 水浴 60min 后,取出将抗原片放于染色缸中用 0.01mM pH7.2 PBS 清洗 3 次,吹干,加入荧光标记羊抗小鼠 IgG 抗体,37°C 水浴 30min 后,同上方法洗涤 5 次,吹干后,0.25%伊文氏蓝对照染色,荧光显微镜下观察荧光图像,以荧光的强度和染色形态进行结果判定,检测抗体强度以 (+ ~ +++) 计为阳性,抗体强度 (±) 和 (-) 计为阴性。

[0052] 3) 实验结果 :

[0053] 结果如表 2 所示,本发明单抗特异性结合烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉和土曲霉,且有很强的结合能力,而与其它真菌不结合。

[0054] 表 2 间接免疫荧光检测抗曲霉抗原的单克隆抗体对 4 株不同曲霉的特异性

[0055]

本发明单克隆抗体	单抗 7E11A1	单抗 9D47A1
抗体亚类	IgG1	IgG1

免疫荧光试验 (IFA)	烟曲霉	孢子	+	+
		菌丝	++++	++++
	黄曲霉	孢子	++	+
		菌丝	+++	+++
	黑曲霉	孢子	++	+
		菌丝	++++	++
	土曲霉	孢子	+++	+++
		菌丝	++++	++++
	白色念珠菌		-	-
	克柔念珠菌		-	-
	光滑念珠菌		-	-
	热带念珠菌		-	-
近平滑念珠菌		-	-	
马尔尼菲氏青霉菌		-	-	

[0056] (6) 免疫印迹法分析本发明单抗的特异性

[0057] 烟曲霉菌株(购自北京大学医学真菌研究中心)在沙氏平板上37℃生长数天至形成单菌落,收集典型的单菌落,加至含有50ml RPMI-1640的500ml锥形瓶中,37℃摇菌3-7天,过滤,将滤液经ConA结合柱纯化其中的糖蛋白。经8% SDS-PAGE电泳分离的蛋白条带转印至硝酸纤维素膜上,封闭液封闭后,纤维素膜于7E11A1-HRP中37℃孵育1h,用含有0.5% (v/v) Tween-20的洗液清洗数次,DAB (Amresco Inc, Solon, OH) 显色。本发明中的2种单克隆抗体结合糖蛋白分子量条带位于25-100kDa处(图1),说明这2组单抗识别抗原为经ConA结合柱纯化的分子量为25-100kDa的糖蛋白。

[0058] (7)、本发明单克隆抗体识别位点的分析

[0059] 1) 抗原制备:烟曲霉菌株在沙氏平板上37℃生长数天至形成单菌落,收集典型的单菌落,加至含有50ml RPMI-1640的500ml锥形瓶中,37℃摇菌3-7天,过滤分离菌丝体及过滤液。将收集的菌丝体重悬于PBS中,超声裂解,离心后收集上清,并储存于-80℃备用。

[0060] 2) 方法和结果:用50mM pH9.6碳酸盐缓冲液稀释上述抗原至30 μg/ml,包被聚苯乙烯微96孔板,0.1ml/孔,4℃过夜。次日,含0.25%酪蛋白(Sigma)的封闭液0.3ml/

孔,4℃过夜后,先加单抗 10 μg/ml 50 μl/孔及后加系列稀释 HRP 标记单抗 1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1600、1 : 2000 50 μl/孔,37℃,孵育 1h;PBST 洗涤五次后加 TMB (Amresco Inc) 100 μl/孔,10min 后,1M H₂SO₄ 终止反应,测定 450nm 吸收值。以单抗对同一 HRP 标记的单抗抑制率为 100%,以已知无关单抗对标记单抗的抑制为阴性对照,计算各单抗间的抑制率。即抑制率为 (1- 测定值 A450/ 阴性对照值 A450) × 100。抑制率 > 75% 为相关, > 50% 为不完全相关, < 50% 为不相关, < 25% 为完全不相关。结果发现,两株单抗之间的抑制率均为 0,说明 2 株单抗识别 2 个完全不同的抗原位点。

[0061] 3、双抗体夹心 ELISA 法单克隆抗体最佳配对的筛选和 ELISA 参数的优化

[0062] 将腹水纯化的 2 株单克隆抗体用于进行一组矩阵格式实验以选出最适合于建立夹心 ELISA 法中用作捕获和标记的单克隆抗体对。简单地说,用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化的 2 株杂交瘤细胞(编号为 9D47A1、7E11A1) 衍生而来的腹水包被 96 孔板,以前述制备的烟曲霉 CA 抗原作为抗原筛选抗体对。辣根过氧化物酶标记 2 株单克隆抗体,采用矩阵格式,也就是上述 2 株单克隆抗体将每株进行包被作为捕获或混合包被作为捕获,分别与每一株酶标记单克隆抗体进行配对,以快速筛选夹心 ELISA 中捕获和标记的单克隆抗体对。初步实验显示单克隆抗体 9D47A1 作为捕获抗体,与酶标记 7E11A1 单克隆抗体配对时,可产生较强的信号。而在此基础上,分别组合上述 2 株单克隆抗体进行捕获的抗体和标记的抗体的配对,以信号强度和特异性而言,用 9D47A1 作为捕获的单克隆抗体,用 7E11A1 抗体作为标记的单克隆抗体,产生最强的信号。

[0063] 例 2 本发明检测曲霉的双抗体夹心 ELISA 试剂盒

[0064] 1、检测曲霉的双抗体夹心 ELISA 试剂盒由以下试剂组成:

[0065] 包被单抗 9D47A1 的微孔反应板

[0066] 样品处理液:4% 乙二胺四乙酸 (PH 7.0),即称取乙二胺四乙酸 40g,溶于 1L 蒸馏水中,NaOH 调 PH 值至 7.0,保存于 4℃;

[0067] 酶结合物:辣根过氧化物酶标记的单抗 7E11A1;

[0068] 浓缩洗液:含有 2% Tween-20 的 20×PBS,即 1L 溶液中含有 4.56g NaH₂PO₄, 58.02gNa₂HPO₄·12H₂O,175.3g NaCl,15 磅 20min 高压灭菌后,加入 20ml Tween-20 搅匀,使用时 20 倍稀释;

[0069] 阳性对照:烟曲霉培养过滤液 1 : 1000 稀释,

[0070] 阴性对照:含 0.1% Tween-20 的 10mM PH7.4 PBS,即 1L 溶液中含有 4.56g NaH₂PO₄, 58.02gNa₂HPO₄·12H₂O,175.3g NaCl,15 磅 20min 高压灭菌,20 倍稀释后加入 0.1% Tween-20;

[0071] 显色液:由显色液 A 和 B 组成,使用时取二者等量混匀使用。其中显色液 A、B 的组成成分如下:

[0072] 显色液 A:

[0073] 将 0.89g 柠檬酸和 0.16g EDTA 二钠溶于 1000ml 水中,115℃ 30min 后,降至 90℃ 后加 TMB 0.25g,摇匀于 4℃ 闭光保存;

[0074] 显色液 B:

[0075] 将 9.33g 柠檬酸和 14.6g EDTA 二钠溶于 1000ml 水中,115℃ 30min 后,降至 90℃ 后加 0.75% 过氧化氢尿素 12.8ml,摇匀于 4℃ 闭光保存;

[0076] 终止液 :1M H₂SO₄ ;

[0077] 其中,

[0078] 包被单抗 9D47A1 的微孔反应板的制备方法是 :将本发明单抗 9D47A1 用 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释至 10 μ g/ml,用 0.1ml/孔包被聚苯乙烯 96 微孔板,于 4℃ 过夜。拍干后,每孔加入 0.3ml 的 0.25% 酪蛋白 (Sigma) 的封闭液,于 4℃ 过夜以封闭非特异性结合位点。甩干板条,真空干燥 12 ~ 24h,用铝膜袋真空包装 4℃ 保存备用 ;

[0079] 酶结合物的制备方法是 :辣根过氧化物酶标记抗体制备采用改良过碘酸钠法,将 5mg 辣根过氧化物酶搅拌溶解于 1ml 蒸馏水中,加入 0.2ml 新配 0.1M 过碘酸钠 30min,置 1mM pH4.4 醋酸钠缓冲液中,4℃ 透析过夜,次日加入 20 μ l 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液后加预先在 0.01M 碳酸盐缓冲液中 pH 9.5 透析平衡的 10mg 抗体,在室温避光轻轻搅拌 2 ~ 3h,加入 0.1ml 新配 4mg/ml 硼氢化钠,4℃ 避光过夜,冰浴上避光搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵 (硫酸铵用前先用氨水调 pH 至 7.0-7.2),置 4℃ 6h。10000g,4℃ 离心 30min,弃上清,沉淀溶于适量 10mM 磷酸盐缓冲液,用同样的液体,4℃ 透析过夜,换液三次。收集结合物加入 2% BSAPBS50% 甘油保护剂,最后用磷酸盐缓冲液稀释 1000 倍,即可。

[0080] 2、使用方法 :

[0081] 样品处理液处理各种待测的样品后,加 100 μ l 于 9D47A1 包被的聚苯乙烯 96 孔微量测试板中,每份样品设复孔,同时设阴对照和阳性对照,37℃ 温育 1h,浓缩洗涤液 20 倍稀释后洗涤板条,洗板四次后,加入酶结合物,100 μ l/孔,37℃ 30min,同上洗板八次后,加显色液 (显色液 A 和 B 等量混合,现用现配),100 μ l/孔,室温避光 10min 后,加入终止液,100 μ l/孔,终止反应。

[0082] 3、结果判定 :

[0083] 以空白孔调零,于 450nm 波长测定 A 值。

[0084] CUT OFF 值 = 0.15+ 阴性对照平均值

[0085] 如待测标本 A450 值 ≥ CUT OFF 值,则判为阳性,反之,如待测标本 A450 值 < CUT OFF 值,则判为阴性。

[0086] 当阳性对照 A450 值低于 1.0 或阴性对照 A450 值高于 0.3,检测结果无效。

[0087] 4、检测曲霉的双抗体夹心 ELISA 试剂盒对各种曲霉及其他常见真菌的特异性和灵敏度分析

[0088] 将临床分离曲霉及其它常见真菌 (马尔尼菲氏青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌) 在沙氏平板上 37℃ 生长数天至形成单菌落,环境分离株曲霉于 28℃ 培养 7 天后,收集单菌落并转接至 RPMI-1640 中生长至浓度为 2×10⁶ 个细胞 /ml 时,收集培养液上清。样品稀释液稀释样本后,按照本实施例第 2 点的方法检测上述各种真菌培养液上清。结果如表 3 所示,本发明试剂盒对 19 株环境和临床分离曲霉株都有特异性反应,而与常见的其他真菌,如马尔尼菲氏青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌无交叉反应。本发明试剂盒的检测下限为 1 : 1000 ~ 1 : 10000 的稀释倍数,因不同种类的霉菌而有所不同。

[0089] 表 3 本发明试剂盒对各种曲霉及其他常见真菌的特异性

[0090]

曲霉种类	培养物稀释倍数	结果	
		阳性	阴性
烟曲霉 - 临床	1 : 10000	+	0
黄曲霉 - 临床	1 : 10000	+	0
构巢曲霉 - 临床	1 : 1000	+	0
土曲霉 - 临床	1 : 10000	+	0
黑曲霉 - 临床	1 : 1000	+	0
烟曲霉 - 环境	1 : 10000	+	0
黄曲霉 - 环境	1 : 10000	+	0
构巢曲霉 - 环境	1 : 1000	+	0
土曲霉 - 环境	1 : 1000	+	0
黑曲霉 - 环境	1 : 100000	+	0
黑曲霉 ATCC10864	1 : 1000	+	0
米曲霉 - 环境	1 : 10000	+	0
亮白曲霉 - 环境	1 : 1000	+	0
棒曲霉 - 环境	1 : 1000	+	0
杂色曲霉 - 环境	1 : 1000	+	0
黄柄曲霉 - 环境	1 : 10000	+	0
聚多曲霉 - 环境	1 : 1000	+	0
焦曲霉 - 环境	1 : 1000	+	0
赭曲霉 - 环境	1 : 10000	+	0
马尔尼菲氏青霉菌	培养原液	0	-
白色念珠菌	培养原液	0	-
克柔念珠菌	培养原液	0	-

光滑念珠菌	培养原液	0	-
热带念珠菌	培养原液	0	-
近平滑念珠菌	培养原液	0	-

[0091] 5、本发明试剂盒的可重复性分析

[0092] 按照第 4 点的实验方法进行重复实验,10 次重复实验的变异系数分别为 1.85% (1 : 500),4.12% (1 : 1000),和 2.27% (1 : 5000)。以 20 天为一个周期,每天检测一次样本,变异系数分别为 :7.96% (1 : 500),10.46% (1 : 1000),和 8.03% (1 : 5000)。

[0093] 例 3 检测曲霉的胶体金快速免疫层析试纸

[0094] 1、本发明所述的检测曲霉的胶体金快速免疫层析试纸构成如图 2 所示,该试纸由样品垫 1,聚酯纤维素垫 2、硝酸纤维素膜 3 和吸水垫 4 依次部分重叠组成,其中聚酯纤维素膜 2 上喷涂有一层胶体金-单抗 9D47A1 复合物,其颗粒大小为 18 ~ 20nm,呈深红色;硝酸纤维素膜 3 上分布有检测带 5 和质控带 6,其中检测带 5 是在硝酸纤维素膜 3 上喷涂单抗 7E11A1 形成、质控带 6 是在硝酸纤维素膜 3 上喷涂羊抗小鼠 IgG1 抗体形成。

[0095] 本发明试纸的制备方法是:将浓度为 1-1.5mg/ml 的烟曲霉单克隆抗体 7E11A1 和羊抗小鼠 IgG1 以 0.8-1.5 μ l/cm 的喷布量喷附在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线和质控线,室温干燥后用 1%牛血清白蛋白封闭,烘干后贴附于涂有双面胶的底板上,右侧与吸水垫重叠 1-2mm 聚酯纤维素膜上喷附 540nm 下吸光度为 0.5-0.8 的浓度的胶体金-单抗 9D47A1 复合物,并粘贴在底板上,与硝酸纤维素垫的左端重叠 1-2mm;底板左端贴附样品垫,其右侧与聚酯纤维素垫重叠 1-2mm 将贴有硝酸纤维垫、吸水垫、样品垫、聚酯纤维素垫的底板切成 4-6mm 的长条。

[0096] 上述胶体金-单抗 9D47A1 的制备方法是:采用常规的胶体金-单克隆抗体复合物的制备方法:取 0.1 克氯金酸钠并溶于 1000ml 的去离子水中,加热煮至 60 $^{\circ}$ C,放入 50ml 新配的 1%柠檬酸钠溶液,其中含柠檬酸 0.2%,含单宁酸 0.2%,然后加热到 95 $^{\circ}$ C 5min,呈现深红色,所形成的胶体金颗粒直径为 18-20nm,将纯化的单克隆抗体经 36000 转/min 离心 30min,取其上清经 0.2 μ m 滤膜过滤,将其浓度调至 0.6mg/ml. 待混合液凉至 15-30 $^{\circ}$ C 时,每 100ml 上述溶液中加入 1ml1%浓度的聚乙烯醇 PEG 以阻止非特异性凝集,以 12000 转/min 离心 30min,去除上清液,再以 12000 转/min 离心 1h,去除未吸附的蛋白质,将包被的胶体金稀释到在 540nm 波长下吸光度为 0.5-0.8 的浓度,用 0.2 μ m 滤膜过滤除菌,即纯化的胶体金-单抗 9D47A1 复合物。4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0097] 2、本发明试纸对 19 种曲霉培养液进行检测。

[0098] 取 1 : 100 稀释的曲霉培养液 0.5ml (曲霉来源和培养和例 2 相同),离心片刻,垂直插入试纸条,插入深度不超过样品垫,在样本中停留约 1-2min,使样本充分上行后,水平放置 5-15min 判读结果。

[0099] 结果判断:

[0100] 阴性:试纸条检测带 5 不显色,仅质控带 6 显色,出现 1 条红线;

[0101] 阳性:若试纸条检测带和质控带均显色,出现 2 条红线;

[0102] 无效:若试纸条检测带和质控带均不显色,无红线出现,则测试无效,表示试纸条

已经失效。

[0103] 结果如图 3 所示,本发明胶体金快速免疫层析试纸能检测到各种曲霉,但其他真菌均呈阴性反应。

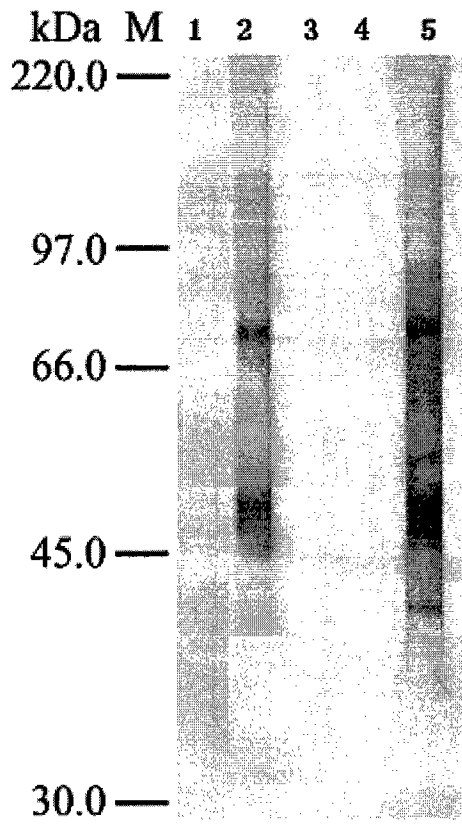


图 1

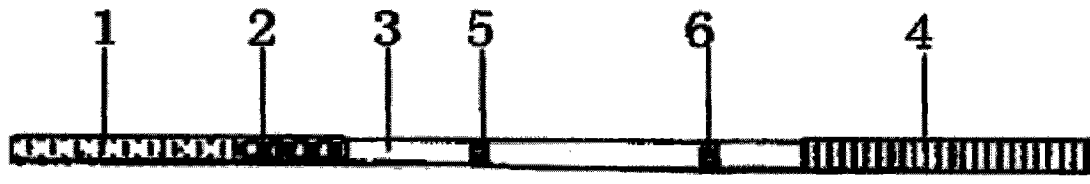


图 2

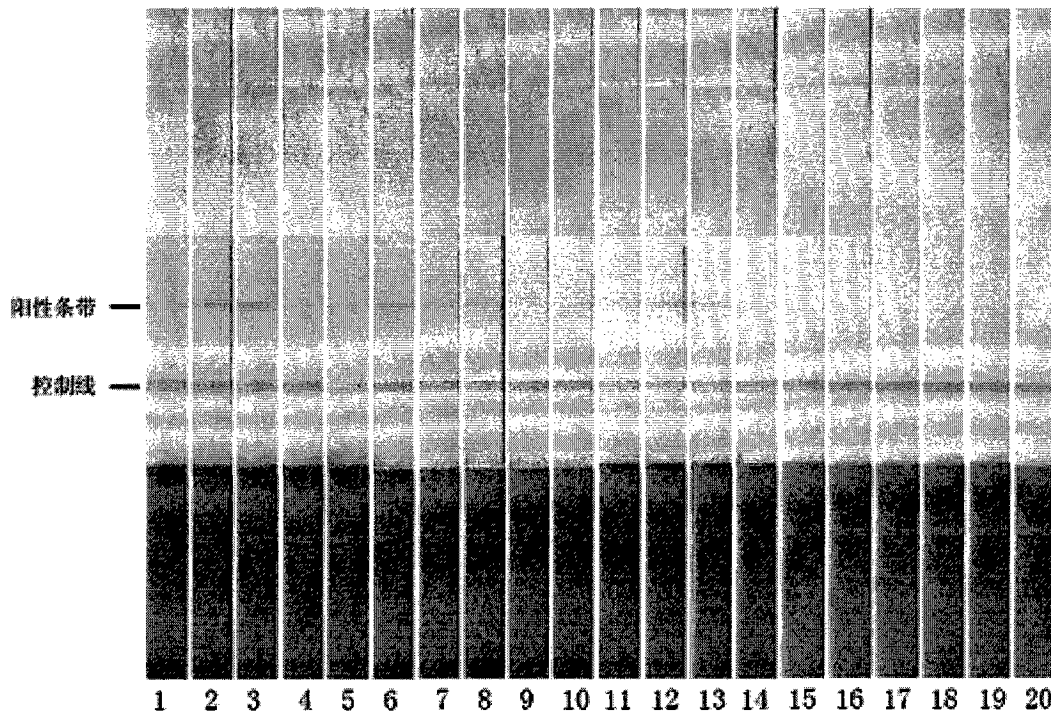


图 3

专利名称(译)	用于检测曲霉的抗体		
公开(公告)号	CN101149377B	公开(公告)日	2012-05-23
申请号	CN200710031109.1	申请日	2007-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
[标]发明人	车小燕 郝卫 潘玉先 王艳芳		
发明人	车小燕 郝卫 潘玉先 王艳芳		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543 C12N5/12		
审查员(译)	李谦		
其他公开文献	CN101149377A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于检测曲霉的捕获抗体和检测抗体，这两种抗体分别是由杂交瘤细胞CCTCC NO.C200731和CCTCC NO.C200730产生的单克隆抗体，能特异性结合曲霉属真菌细胞壁分子量为25~100kDa的糖蛋白，与常见的其他真菌，如马尔尼菲氏青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌等的反应均为阴性。本发明所述的抗体可制备成常用的检测曲霉的免疫试剂。

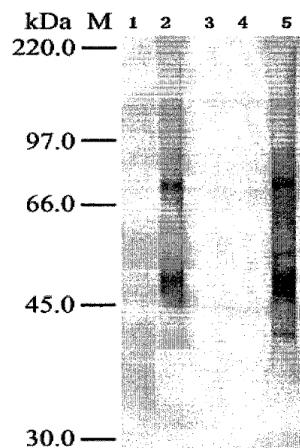


图 1