



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103698523 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201310739604. 3

EP 0380443 A2, 1990. 08. 01,

(22) 申请日 2013. 12. 27

EP 0965840 A1, 1999. 12. 22,

(73) 专利权人 常州千红生化制药股份有限公司
地址 213022 江苏省常州市新北区长江中路
90 号

审查员 王在竹

(72) 发明人 韦利军 薛宇醒 吴海燕 庄丽敏

(74) 专利代理机构 常州市江海阳光知识产权代
理有限公司 32214

代理人 孙晓晖

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0741144 A1, 1996. 11. 06,

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

特异性抗 rHAP 单克隆抗体及其制备方法和
试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种特异性抗 rHAP 单克隆抗体及其制备方法和试剂盒, 该特异性抗 rHAP 单克隆抗体的制备方法具有以下步骤: ①免疫; ②细胞融合; ③阳性克隆的筛选, 选择阳性细胞孔进行细胞克隆, 得到抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株; ④对步骤③得到的抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株进行特异性阳性克隆的筛选, 选择阳性细胞孔进行细胞克隆, 得到特异性抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株。⑤用步骤④得到的特异性抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株制备特异性抗 rHAP 单克隆抗体。本发明的特异性抗 rHAP 单克隆抗体用于制备体内药物浓度检测试剂盒, 进而可以检测出 rHAP 在动物体内的分布情况, 增强了检验的特异性和结果的准确性。

1. 一种特异性抗 rHAP 单克隆抗体的制备方法, 具有以下步骤:

①免疫, 采用的抗原为 rHAP;

②细胞融合, 得到杂交瘤细胞;

③对步骤②得到的杂交瘤细胞进行阳性克隆的筛选, 选择阳性细胞孔进行细胞克隆, 得到抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株;

④对步骤③得到的抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株进行特异性阳性克隆的筛选, 选择阳性细胞孔进行细胞克隆, 得到特异性抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株;

⑤用步骤④得到的特异性抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株制得特异性抗 rHAP 单克隆抗体;

步骤④中所述的特异性阳性克隆的筛选是指分别采用 rHAP 一端的水蛭素片段和 rHAP 另一端的 Annexin V 作为抗原决定簇对抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株进行阳性克隆的筛选, 最后分别得到作为特异性抗 rHAP 单克隆抗体的抗水蛭素片段单克隆抗体和抗 Annexin V 单克隆抗体;

所述 rHAP 一端的水蛭素片段的氨基酸序列为: pkpqshndgdfeeipeeylq;

所述 rHAP 另一端的 Annexin V 的氨基酸序列为: aqvlrgtvt dfpgfderad aetlrkamkg lgtdeesilt lltsrsnaqr qeisaafktl fgrdllddlk seltgkfekl ivalmkpsrl ydayelkhal kgagtnekv l teiiasrtpe elraikqvy eeygssledd vvgdtsgyyq rmlvllqan rdpdagidea qveqdaqalf qagelkwgtd eekfitifgt rsvshlrkvf dkymtisgfq ietidrets gnleqlllav vksirsipay laetlyyamk gagtdhtli rvmvsrseid lfnirkefrk nfatslysmi kgdtsgdykk allllcgedd。

2. 一种权利要求 1 的方法制得的特异性抗 rHAP 单克隆抗体, 该单克隆抗体为作为特异性抗 rHAP 单克隆抗体的抗水蛭素片段单克隆抗体。

3. 一种含有权利要求 1 的方法制得的特异性抗 rHAP 单克隆抗体的用于检测 rHAP 在动物体内分布情况的试剂盒, 该试剂盒包括作为特异性抗 rHAP 单克隆抗体的抗水蛭素片段单克隆抗体、作为特异性抗 rHAP 单克隆抗体的抗 Annexin V 单克隆抗体、SAV-HRP、PBS 缓冲液以及封闭液; 所述抗水蛭素片段单克隆抗体和所述抗 Annexin V 单克隆抗体中的一种为包被抗体, 另一种为检测抗体; 所述检测抗体在应用前需要进行生物素化。

特异性抗 rHAP 单克隆抗体及其制备方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学技术领域,具体涉及一种特异性抗 rHAP 单克隆抗体及其制备方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 与小分子药物在动物体内的药物代谢动力学研究不同的是,大分子药物需要特异性更强的检测方法。

[0003] 双抗体夹心法是检测抗原最常用的方法,主要适于大分子抗原,其原理是将已知抗体包被微量反应板后与待检抗原反应,然后再加酶标抗体和底物,根据显色反应对抗原进行定性和定量。在包被抗体和检测抗体的选择上需要对所检测的抗原进行具体分析。

[0004] 重组人抗血栓蛋白(rHAP)系经工程菌发酵表达的重组 DNA 制品,它是一种以活化血小板为靶点,将分子聚集在血栓部位,并通过其分子中各主要结构域行使发挥比之更高效的抗血栓功能,达到全面、高效抗血栓作用的重组蛋白质药物,同时其靶向性也赋予了该药物较高的安全性。

[0005] 中国专利文献 CN1286262A 公开的人胎盘抗凝蛋白介导的新型抗凝蛋白即为重组人抗血栓蛋白,它是将不同蛋白质结构域连接在一起构建成的融合蛋白,其分子两端分别为 Annexin V 结构域和水蛭素片段结构域。由于 Annexin V 存在于多种动物体内,因此在进行药物代谢动力学研究时,所用的动物体内的 Annexin V 会对进入其体内的 rHAP 检测造成干扰,出现假阳性结果。

[0006] 因此,为了最大程度地降低干扰,同时检测到 rHAP 分子两端的 Annexin V 结构域和水蛭素片段结构域,从而满足药物代谢动力学研究的需要,需要制备出针对 Annexin V 和水蛭素片段抗原决定簇的单克隆抗体。

发明内容

[0007] 本发明的目的之一在于解决上述问题,提供一种用于检测 rHAP 在动物体内分布情况的特异性抗 rHAP 单克隆抗体及其制备方法。

[0008] 本发明的目的之二在于解决上述问题,提供一种用于检测 rHAP 在动物体内分布情况的试剂盒。

[0009] 实现本发明目的之一的技术方案是:一种特异性抗 rHAP 单克隆抗体的制备方法,具有以下步骤:

[0010] ①免疫:分为三次,前两次是将抗原 rHAP 与弗式完全佐剂制成油包水乳剂,在小鼠颈背部皮下多点注射;第三次是将抗原 rHAP 用生理盐水溶解,在小鼠腹腔注射。

[0011] ②细胞融合:包括常规方法进行细胞融合、HAT 选择性培养以及 ELISA 法筛选,得到杂交瘤细胞。

[0012] ③对步骤②得到的杂交瘤细胞进行阳性克隆的筛选,选择阳性细胞孔进行细胞克隆,得到抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0013] ④对步骤③得到的抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株进行特异性阳性克隆的筛选,选择阳性细胞孔进行细胞克隆,得到特异性抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0014] ⑤用步骤④得到的特异性抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株按照常规方法制备腹水、纯化,得到特异性抗 rHAP 单克隆抗体。

[0015] 上述步骤④中所述的特异性阳性克隆的筛选是指分别采用 rHAP 一端的水蛭素片段(其氨基酸序列为:pkpqshndgdfseeipeeylq)和 rHAP 另一端的 Annexin V (其氨基酸序列为:aqvlrgtvt dfpgfderad aetlrkamkg lgtdeesilt lltsrsnaqr qeisaafktl fgrdllddlk seltgkfekl ivalmkpsrl ydayelkhal kgagtnekv l teiasrtpe elraikqvy eeygssledd vvgdtsgyyq rmlvllqan rdpdagidea qveqdaqalf qagelkwtgd eekfitifgt rsvshlrkvf dkymtisgfg ieedidrets gnleqlllav vksirsipay laetlyyamk gagtdhdthli rvmvsrseid lfnirkefrk nfatslysmi kgdtsgdykk alllllgedd)作为抗原决定簇对抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株进行阳性克隆的筛选,最后分别得到作为特异性抗 rHAP 单克隆抗体的抗水蛭素片段单克隆抗体和抗 Annexin V 单克隆抗体。

[0016] 实现本发明目的之二的技术方案是:一种含有上述特异性抗 rHAP 单克隆抗体的试剂盒,包括包被抗体(上述特异性抗 rHAP 单克隆抗体其中一种)、检测抗体(上述特异性抗 rHAP 单克隆抗体另一种)、SAV-HRP、PSB 缓冲液以及封闭液。其中封闭液由 BSA、蔗糖以及 PBS 缓冲液组成。检测抗体在应用前需要进行生物素化。

[0017] 上述试剂盒在加样前需按每 100 μ L 的标准品或待测样品加 10 μ L 浓度为 0.4M 的 EDTA 混匀后再加入 96 孔板中。

[0018] 本发明具有的积极效果:本发明的特异性抗 rHAP 单克隆抗体用于制备体内药物浓度检测试剂盒,进而可以检测出 rHAP 在动物体内的分布情况,增强了检验的特异性,大大减少动物体内 Annexin V 本底的干扰,增强了检验结果的准确性。

具体实施方式

[0019] (实施例 1)

[0020] 本实施例的特异性抗 rHAP 单克隆抗体的制备方法具有以下步骤:

[0021] ①免疫:

[0022] 第一次免疫:取 40 μ g/mouse 纯化好的抗原(即 rHAP,下同),加等量的弗氏完全佐剂,制成油包水乳剂,在小鼠颈背部皮下多点注射。

[0023] 第二次免疫:重复第一次免疫。

[0024] 第三次免疫:取 40 μ g/mouse 纯化好的 rHAP,用生理盐水溶解,在小鼠腹腔注射。

[0025] ②细胞融合:

[0026] a)、SP2/0 细胞的制备:融合前 4~7 天复苏 SP2/0 细胞,并在含有 10% (重量)FBS 的 RPMI-1640 培养基中传代培养至所需数量(本实施例为 2×10^7)。必须保证融合时 SP2/0 的数量级处于对数生长状态。

[0027] b)、冲击免疫:在融合前 3 天取 40 μ g/mouse 纯化好的 rHAP 在小鼠腹腔注射进行冲击免疫。

[0028] c)、制备滋养细胞:在融合前 1 天取小鼠腹腔巨噬细胞制备滋养细胞板。断髓处死小鼠,将小鼠浸泡于 75% (重量)酒精中消毒 3 分钟。将小鼠移入超净台,腹部向上放置,剪

开腹部皮肤,钝性剥离充分暴露腹膜。剪开腹膜,吸取 2 ~ 5mL 无血清培养基注入腹腔冲洗 2 ~ 3 遍,将培养基吸入离心管中。1200rpm 离心 7 分钟,弃上清,将细胞移入适量完全培养基混匀,制备 5 块滋养细胞板。将滋养细胞悬液加入 96 孔板。将 96 孔板放入 37℃ 孵箱,24 小时后使用。

[0029] d)、细胞融合:将 1mL 的 PEG 和 20mL 无血清 RPMI-1640 置于 37℃ 孵箱预热。将处于对数生长期的 SP2/0 细胞收集到 50mL 离心管中,计数,取 2×10^7 个骨髓瘤细胞,1200rpm 离心 6 分钟,弃上清,加入 50mL 无血清 RPMI-1640,洗涤 2 次。将效价已达到要求,已冲击免疫的免疫小鼠摘眼球放血(收集血清留做阳性对照),断髓处死,浸泡于 75% (重量) 酒精中消毒 2 ~ 3 分钟,无菌剪开腹腔,暴露腹膜,取出脾脏,放入平皿中,将脾脏置于 200 目钢网上,加少量 RPMI-1640,研磨,制成单个脾细胞悬液,将脾细胞悬液移入 50mL 离心管中,加 RPMI-1640 至 50mL,1200rpm 离心洗涤 2 遍。骨髓瘤细胞和脾细胞充分混合,加 RPMI-1640,1300rpm 离心 8 分钟,倒尽上清。缓缓加入 1mL 的 37℃ 预热的 PEG,在 60 秒加完,作用 60 秒。向融合体系中加入无血清培养基 20mL 以终止 PEG 的作用,先慢后快,第一个 1mL 加 2 分钟,第二个 1mL 加 1 分钟,其余 18mL 在 3 分钟内加完。1000rpm 离心 6 分钟,弃上清,加入 25mL 的含有 20% (重量) FBS 的 RPMI-1640,轻轻吹打混匀。将细胞加入 5 块已铺有滋养细胞的 96 孔板中,每孔中总计含有 200uL。

[0030] e)、HAT 选择性培养:融合后第 2 天加入 HAT 选择性培养基。每天观察细胞形态,在加入 HAT 后 3 ~ 4 天后,融合的细胞会有克隆形成,此时用负压吸引器吸出 1/2 的培养基,加入新的 HAT 培养基。根据细胞生长状态,在筛选前再换液 1 ~ 2 次,筛选前一天必须换液。

[0031] f)、融合后筛选:一般在融合后 8 ~ 10 天,未融合的骨髓瘤细胞和其他细胞早已全部死亡,融合细胞克隆生长,可在细胞铺满孔底的 1/2 或 2/3 时采用 ELISA 法进行筛选。

[0032] g)、亚克隆:亚克隆前 1 天制备小鼠腹腔巨噬细胞滋养板。取需要亚克隆的细胞轻轻吹打,制成单细胞悬液,加入计数板计数,计算细胞密度。按每板 100 个细胞,取所需的体积,加入适量完全培养基中,充分混匀后加入 96 孔板,每孔总量 200uL。

[0033] ③阳性克隆的筛选(ELISA 法)和细胞克隆:

[0034] a)、包被:用 PBS 缓冲液(参见实施例 3,下同)将 rHAP 稀释至 $2 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{L/孔}$ 加入酶标板,4℃ 过夜,洗板 3 次。

[0035] b)、封闭:封闭液(参见实施例 3,下同), $200 \mu\text{L/孔}$,室温(15℃ ~ 25℃,下同)2 小时,洗板。

[0036] c)、加样:取单克隆孔中的杂交瘤细胞培养上清,加入筛选板, $100 \mu\text{L/孔}$,37℃ 孵育 1 小时,洗板 3 次。

[0037] d)、加酶标抗体:每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 Ig(H+L),37℃ 孵育 30 分钟,洗板 3 次。

[0038] e)、显色反应:每孔加 TMB 底物 $100 \mu\text{L}$,室温避光显色 10 分钟。

[0039] f)、终止反应:每孔加终止液(0.2M 硫酸) $50 \mu\text{L}$ 。

[0040] g)、结果判定:酶标仪测定 OD 值(检测波长:450nm,参考波长:630nm)。

[0041] h)、选择阳性细胞孔进行细胞克隆,扩大后培养、冻存,得到抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0042] ④特异性阳性克隆的筛选(ELISA 法)和细胞克隆:

[0043] a)、包被:用 PBS 缓冲液将 rHAP 一端的水蛭素片段(其氨基酸序列为: pkpqshndgdfeeipeeylq) 稀释至 2 μ g/mL, 100 μ L/ 孔加入酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗板 3 次。

[0044] b)、封闭:封闭液, 200 μ L/ 孔, 室温(15 $^{\circ}$ C~ 25 $^{\circ}$ C, 下同) 2 小时, 洗板。

[0045] c)、加样:取单克隆孔中的抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞培养上清, 加入筛选板, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 洗板 3 次。

[0046] d)、加酶标抗体:每孔加入 100 μ L 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠 Ig(H+L), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 洗板 3 次。

[0047] e)、显色反应:每孔加 TMB 底物 100 μ L, 室温避光显色 10 分钟。

[0048] f)、终止反应:每孔加终止液(0. 2M 硫酸) 50 μ L。

[0049] g)、结果判定:酶标仪测定 OD 值(检测波长:450nm, 参考波长:630nm)。

[0050] h)、选择阳性细胞孔进行细胞克隆, 扩大后培养、冻存, 得到特异性抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0051] ⑤按照常规方法用步骤④得到特异性抗 rHAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株制备小鼠腹水, 收集小鼠腹水, 利用 Protein G 纯化, 制得一种特异性抗 rHAP 单克隆抗体——抗水蛭素片段单克隆抗体。

[0052] (实施例 2)

[0053] 将上述步骤④中的步骤 a) 中的 rHAP 一端的水蛭素片段替换为 rHAP 另一端的 Annexin V, 其余步骤相同, 最终制得另一种特异性抗 rHAP 单克隆抗体——抗 Annexin V 单克隆抗体。

[0054] (实施例 3)

[0055] 本实施例的含有特异性抗 rHAP 单克隆抗体的试剂盒由下述成分组成:

[0056] PBS 缓冲液:由 8g 的氯化钠、2. 9g 的十二水合磷酸氢二钠、0. 2g 的氯化钾、0. 2g 的磷酸二氢钾加蒸馏水至 1000mL 得到, 浓度为 0. 01M。

[0057] 封闭液:由 2. 0g 的 BSA (牛血清白蛋白)和 3. 0g 的蔗糖加入到 100mL 上述 PBS 缓冲液中制成。

[0058] 包被抗体:由 50 μ L 浓度为 4. 4mg/mL 的原液和 170 μ L 的上述 PBS 缓冲液组成, 浓度为 1mg/mL(原液可以采用实施例 1 的特异性抗 rHAP 单克隆抗体, 也可以采用实施例 2 的特异性抗 rHAP 单克隆抗体)。

[0059] 检测抗体:由 50 μ L 浓度为 0. 45mg/mL 的原液和 40 μ L 的上述 PBS 缓冲液组成, 浓度为 0. 25mg/mL (原液可以采用经生物素化的实施例 1 的特异性抗 rHAP 单克隆抗体, 也可以采用经生物素化的实施例 2 的特异性抗 rHAP 单克隆抗体, 但与上述包被抗体不同)。

[0060] SAV-HRP (辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素):由 5 μ L 原液和 55 μ L 上述 PBS 缓冲液组成。

[0061] (应用例 1)

[0062] 本应用例为实施例 3 的试剂盒的使用方法, 具体如下:

[0063] 1、包被:将浓度为 1mg/mL 的包被抗体(抗水蛭素片段单克隆抗体或者抗 Annexin V 单克隆抗体)用 PBS 缓冲液 1000 倍稀释至浓度为 1 μ g/mL, 每孔加 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。

[0064] 2、封闭:洗板 4 次, 每孔加 200 μ L 的封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。

[0065] 3、标准品曲线制备：取 rHAP 样品一支，用 10mL 甘氨酸 - 精氨酸缓冲液溶解后分装得到标准品储备液，将标准品储备液用空白血浆分别稀释至 800、400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56ng/mL，得到系列标准品溶液。

[0066] 4、加样：向 96 孔板中加入每孔 100 μ L 的空白对照、血浆标准系列溶液（800、400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56ng/mL）及待检样本，加样前，需按每 100 μ L 的标准曲线样品或者待测样品加 10 μ L 浓度为 0.4M 的 EDTA 混匀，每个样品设置复孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟，洗涤 4 次，吸水纸上拍干。

[0067] 5、检测抗体：将浓度为 0.25mg/mL 的检测抗体（抗 Annexin V 单克隆抗体或者抗水蛭素片段单克隆抗体，且与包被抗体不同）用 PBS 缓冲液 1000 倍稀释至 0.25 μ g/mL，每孔加 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，洗涤 4 次，吸水纸上拍干。检测抗体在应用前需要进行生物素化。

[0068] 6、SAV-HRP（辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素）：用 PBS 缓冲液将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素原液稀释 12000 倍，每孔加 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟，洗涤 4 次，吸水纸上拍干。

[0069] 7、显色反应：每孔加 TMB 底物 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 10 ~ 15 分钟。

[0070] 8、终止反应：每孔加终止液（0.2M 硫酸）100 μ L，轻轻混匀。

[0071] 9、结果判定：酶标仪读取 OD 值：检测波长 450nm，参考波长 630nm。

[0072] （应用例 2）

[0073] 本应用例为对实施例 3 的试剂盒的测定范围、精密度和准确度、稳定性以及稀释效应的进行检测。

[0074] 1、测定范围。

[0075] 由应用例 1 可以看出：本实施例的试剂盒检测 rHAP 的可靠浓度范围是 3.125 ~ 400ng/mL，在此范围内标准品 rHAP 与吸光度呈浓度依赖关系。

[0076] 对于含量超出标准曲线范围的样品用混合空白猴血浆适当稀释至此浓度范围内即可。

[0077] 2、精密度和准确度的检测。

[0078] 检测方法：分别制备 3.125、6.25、50 以及 400ng/mL 的四个浓度的 QC 样品，每一浓度进行 5 个样本分析，重复 4 个分析批，随行标准曲线，以当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度，采用单因素方差分析法计算分析方法的准确度（RE）和精密度（RSD）。结果见表 1。

[0079] 表 1

[0080]

实验日期	浓度 (ng/mL)			
	400	50	6.25	3.125
D1	453.8	50.1	6.8	4.0
	472.8	49.8	5.8	2.8
	376.7	49.5	6.3	2.7
	380.4	49.6	6.4	3.1
	454.6	48.3	5.8	3.1
D2	502.8	53.0	7.0	3.5
	437.0	51.0	6.7	2.9
	499.9	50.4	6.0	2.5
	403.6	49.0	6.8	3.1

[0081]

	452.9	55.5	6.2	3.2
D3	439.1	52.8	6.6	3.4
	462.5	53.2	6.3	3.8
	430.7	45.4	6.1	3.4
	417.0	50.6	6.9	3.6
	448.9	47.1	7.3	3.4
D4	432.9	53.2	6.8	3.3
	478.6	53.3	6.7	3.4
	495.5	52.4	6.9	3.1
	379.0	51.3	6.4	3.4
	371.1	47.3	6.9	3.4
n	20	20	20	20
均值 (ng/mL)	439.5	50.6	6.5	3.3
标准差 (ng/mL)	41.3	2.5	0.4	0.4
日内 RSD (%)	9.8	4.9	6.2	10.2
日间 RSD (%)	7.2	5.2	7.5	15.4
相对误差 (%)	9.9	1.3	4.5	4.2

[0082] 检测结论：由表 1 可以看出，日内精密度为 4.9 ~ 10.2%、日间精密度为 5.215.4%，结果表明在浓度 3.125 ~ 400ng/mL 范围内测定的日内及日间重现性良好。

[0083] 3、稳定性的检测。

[0084] 检测方法：分别制备 3.125、6.25、50 以及 400ng/mL 的四个浓度的血浆样品，每一浓度进行 5 个样本分析，考察在 -80℃ 放置 1 个月的稳定性。结果见表 2。

[0085] 表 2

[0086]

理论值 (ng/mL)	3.125	6.25	50	400
实测值 (ng/mL)	2.9	6.1	44.5	413.6
	3.0	6.2	46.7	430.3
	3.5	6.8	47.2	411.2
	3.1	5.8	42.4	418.2
	3.5	6.4	49.3	298.7
Mean	3.2	6.3	46.7	395.3
SD	0.3	0.4	2.7	54.0
RSD%	8.8	5.7	5.7	13.7
RE%	2.4	0.2	-6.6	-1.2

[0087] 检测结论,由表 2 可以看出,在 -80°C 的条件下放置 1 个月,相对误差 RE% 小于 7%,结果表明该试剂盒的稳定性极佳。

[0088] 4、稀释效应的检测。

[0089] 检测方法:由于实际样品浓度较高,超出了定量范围,需要进行稀释。分别考察了猴血浆加入 rHAP 稀释 20、50、100 和 200 倍后的准确度。结果见表 3。

[0090] 表 3

[0091]

稀释倍数 (倍)	200	100	50	20
实测浓度 (ng/mL)	50.4	48.1	44.0	50.0
	48.2	47.0	45.6	51.7
	49.5	49.7	48.0	47.3
	50.0	48.5	46.8	51.6
	51.8	56.9	44.2	47.5
means	50.0	50.0	45.7	49.6
sd	1.3	4.0	1.7	2.2
RSD%	2.6	7.9	3.7	4.3
RE%	-0.1	0.1	-8.5	-0.8

[0092] 检测结论:由表 3 可以看出,样品稀释最高的 200 倍后,浓度偏差仍在 9% 之内,结果表明不会对样品的测定造成影响。

[0093] (应用例 3)

[0094] 本应用例为采用实施例 3 的试剂盒检测猴体内 rHAP 浓度,方法如下:

[0095] 1、血浆采集方法:按照猴体重静脉给药,于不同给药时间取血。全部血样均置于 EDTA-K2 抗凝管中,于 4°C ,5000rpm 离心 10min 分离血浆,分装后 -80°C 保存,待测。

[0096] 2、血浆 rHAP 浓度测定:按照应用例 1 的方法检测血浆中的 rHAP 浓度(单位 ng/mL),结果见表 4。

[0097] 表 4

[0098]

时间 (h)	给药剂量 (mg/kg)		
	0.1	0.5	2.5
0	0	0	0
1	83.2	308.6	14104.0
2	47.1	391.1	8510.7
3	32.8	292.5	4854.6
5	20.5	156.2	1430.1
9	10.2	61.4	492.2
12	6.5	44.5	185.4
25	3.5	7.0	32.8

[0099] 由表 4 可以看出:本发明含有特异性抗 rHAP 单克隆抗体试剂盒可以检测出 rHAP 在动物体内的分布情况,增强了检验的特异性,大大减少动物体内 Annexin V 本底的干扰,增强了检验结果的准确性。

专利名称(译)	特异性抗rHAP单克隆抗体及其制备方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN103698523B	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201310739604.3	申请日	2013-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	常州千红生化制药股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	常州千红生化制药股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	常州千红生化制药股份有限公司		
[标]发明人	韦利军 薛宇醒 吴海燕 庄丽敏		
发明人	韦利军 薛宇醒 吴海燕 庄丽敏		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	孙晓晖		
其他公开文献	CN103698523A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种特异性抗rHAP单克隆抗体及其制备方法和试剂盒，该特异性抗rHAP单克隆抗体的制备方法具有以下步骤：①免疫；②细胞融合；③阳性克隆的筛选，选择阳性细胞孔进行细胞克隆，得到抗rHAP单克隆抗体杂交瘤细胞株；④对步骤③得到的抗rHAP单克隆抗体杂交瘤细胞株进行特异性阳性克隆的筛选，选择阳性细胞孔进行细胞克隆，得到特异性抗rHAP单克隆抗体杂交瘤细胞株。⑤用步骤④得到的特异性抗rHAP单克隆抗体杂交瘤细胞株制备特异性抗rHAP单克隆抗体。本发明的特异性抗rHAP单克隆抗体用于制备体内药物浓度检测试剂盒，进而可以检测出rHAP在动物体内的分布情况，增强了检验的特异性和结果的准确性。

实验日期	浓度 (ng/mL)			
	400	50	6.25	3.125
D1	453.8	50.1	6.8	4.0
	472.8	49.8	5.8	2.8
	376.7	49.5	6.3	2.7
	380.4	49.6	6.4	3.1
	454.6	48.3	5.8	3.1
D2	502.8	53.0	7.0	3.5
	437.0	51.0	6.7	2.9
	499.9	50.4	6.0	2.5
	403.6	49.0	6.8	3.1