



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116041506 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 02

(21) 申请号 202310012006.X

C12N 5/20 (2006.01)

(22) 申请日 2023.01.05

G01N 33/543 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

G01N 33/531 (2006.01)

CCTCC NO:C2022391 2022.12.21

G01N 33/577 (2006.01)

CCTCC NO:C2022392 2022.12.21

(71) 申请人 深圳上泰生物工程有限公司

地址 518000 广东省深圳市光明区凤凰街
道凤凰社区观光路招商局光明科技园
A1A2栋A1栋901

(72) 发明人 吴向东 张宁 周亮 陈小茹

(74) 专利代理机构 广东普润知识产权代理有限
公司 44804

专利代理师 寇闯

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

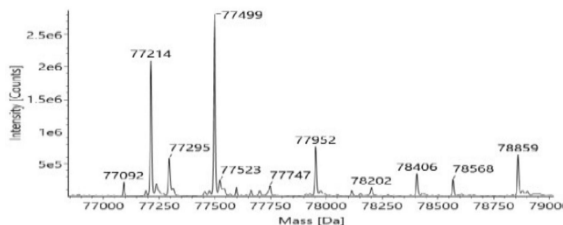
权利要求书2页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对及检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开一种糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对及检测试剂盒。包括抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2分别与CDT抗原的不同表位结合,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2不与TRF结合。利用该抗体制备的检测试剂盒可直接测试血液或体液样本中天然的CDT,无需将CDT与其他血清蛋白和非CDT的转铁蛋白异构体分离,无需对样本进行预处理。



1. 一种糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对,其特征在于,包括抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2分别与CDT抗原的不同表位结合,且所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2均不与TRF结合,其中所述抗CDT单克隆抗体M1是由保藏编号为CCTCC NO:C2022391的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1产生的,所述抗CDT单克隆抗体M2是由保藏编号为CCTCCNO:C2022392的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2产生的。

2. 如权利要求1所述的糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对,其特征在于,所述CDT抗原为天然CDT抗原或使用蛋白质重组技术制备的重组CDT抗原。

3. 如权利要求2所述的糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对,其特征在于,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2的制备方法包括以下步骤:

S1、将如权利要求2所述的重组CDT抗原作为抗原进行动物免疫;

S2、提取S1中动物的细胞并与骨髓瘤融合产生杂交瘤细胞;

S3、用如权利要求2所述的重组CDT抗原通过夹心ELISA选择所述产生所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2的杂交瘤细胞;

S4、用天然CDT抗原通过与所述S3步骤中的夹心ELISA相同的方法确认所述杂交瘤细胞;

S5、用TRF通过与所述S3步骤中的夹心ELISA相同的方法反向筛选所述杂交瘤细胞,得到产生所述抗CDT单克隆抗体M1的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和产生所述抗CDT单克隆抗体M2的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2。

4. 一种高特异性、高亲和力的糖缺失性转铁蛋白的检测试剂盒,其特征在于,包括试剂R1、试剂R2、校准品和质控品,所述试剂R1包括如权利要求1-3任一所述的抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物和如权利要求1-3任一所述的抗CDT单克隆抗体M2的胶乳微球偶联物。

5. 如权利要求4所述的检测试剂盒,其特征在于,所述校准品和质控品含有如权利要求1-3任一所述的CDT抗原。

6. 如权利要求4所述的检测试剂盒,其特征在于,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2的胶乳微球偶联物的制备方法包括以下步骤:

S1、致敏:将乳胶溶液置于离心管中,加入敏化缓冲液,再加入所述抗CDT单克隆抗体M1或抗CDT单克隆抗体M2,混合均匀,置于37℃反应1小时;

S2、封闭:加入封闭缓冲液,超声2分钟后,37℃封闭1小时,封闭完成后,离心以去除上清液中未反应的部分;

S3、加入1mL致敏缓冲液并超声处理乳胶,用致敏缓冲液调节抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物700nm处的吸光度为0.8Abs。

7. 如权利要求6所述的检测试剂盒,其特征在于,所述敏化缓冲液为pH6.1的20mM MES,所述致敏缓冲液为pH 7.5的10mM PBS,所述封闭缓冲液包括pH 7.5的10mM PBS、10%的牛血清白蛋白和0.095%w/w的叠氮钠。

8. 如权利要求6所述的检测试剂盒,其特征在于,所述S1步骤中加入抗CDT单克隆抗体M1或抗CDT单克隆抗体M2后溶液的浓度为0.03~0.09mg/mL。

9. 一种杂交瘤细胞对,其特征在于,所述杂交瘤细胞对分别用于产生如权利要求1-3任一所述的单克隆抗体对,所述杂交瘤细胞对为产生所述抗CDT单克隆抗体M1的保藏编号为

CCTCC NO:C2022391的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和产生所述抗CDT单克隆抗体M2的保藏编号为CCTCCNO:C2022392的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2。

糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对及检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体涉及糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对及检测试剂盒。

背景技术

[0002] 人转铁蛋白(Human Transferrin,TRF)是一种分子量约为80kDa的与铁结合的血浆单链糖蛋白,可将铁通过血液循环输送到制造红细胞的骨髓以及肝脏和脾脏中。在结构上,它是一条由679个氨基酸组成的多肽链,有两个铁结合位点和两个连接到Asn432和Asn630的N连接寡糖链,两个糖链位点分别可结合2支、3支或4支的糖链,每支糖链末端为一个带有负电荷的唾液酸分子。糖缺失转铁蛋白(Carbohydrate-deficient Transferrin CDT)是转铁蛋白的异构体,临床上将无唾液酸转铁蛋白、单唾液酸转铁蛋白和双唾液酸转铁蛋白亚型并称为CDT。

[0003] 酒精滥用是CDT水平升高的最常见原因,CDT是唯一获得美国食品和药物管理局批准用于识别重度酒精使用的标志物。慢性酒精滥用者中,乙醇及其副产物乙醛抑制负责添加碳水化合物侧链的酶并诱导唾液酸酶的产生,该酶将末端唾液酸残基从侧链上切割下来。因此,在长期大量饮酒的患者中,每个转铁蛋白分子中碳水化合物成分的数量减少,从而提高了CDT的水平。

[0004] CDT升高还有许多其他原因,比如a)胆管因疾病阻塞或损坏的患者,例如胆汁淤积性肝病、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、胆结石或肝癌/胰腺癌患者,血液中CDT水平升高;b)转铁蛋白变体,该变体可由氨基酸取代而产生,目前已报道至少38种由于氨基酸取代而导致的遗传转铁蛋白变体,有三种表型:TRFC、TRFB和TRFD,其中TRFC为血液中转铁蛋白的正常形式,TRFB和TRFD为两种变体,TRFD在白种人中非常罕见,患病率不到万分之一,但已被证明会导致CDT水平升高,TRFD在非洲人中更为常见;c)先天性糖基化障碍综合症(Congenital disorders of glycosylation,CDG),它是一组非常罕见的综合症,是一种将侧链添加到蛋白质的酶的遗传缺陷,在受影响的儿童中,存在严重的智力迟钝以及其他身体异常,并且CDT水平在50-100%的范围内,在杂合子或疾病携带者中,CDT水平通常在10-25%的范围内;d)在某些生理或病理条件下,例如怀孕、类风湿性关节炎、恶性肿瘤和酗酒等,聚糖结构会发生特征性变化,血液中CDT水平升高。

[0005] 目前CDT的检测方法中,由于缺乏与CDT特异性结合的CDT抗体,因此需要将CDT与其他血清蛋白和非CDT的转铁蛋白异构体分离。利用CDT和非CDT的转铁蛋白异构体的不同电荷和等电点,可以通过阴离子交换色谱法、等电聚焦(IEF)电泳法或毛细管电泳和毛细管区带电泳将CDT和非CDT异构体分离出来。自1993年以来开发的许多商业CDT测试产品也都需要在免疫测定法定量检测CDT之前在阴离子交换微柱上分离CDT和非CDT异构体,这些产品包括CDTect-RIA、CDT-EIA(瑞典乌普萨拉的Pharmacia&Upjohn)、%CDT-TIA(挪威奥斯陆的Axis-Shield)、%CDTri-TIA(Bio-Rad Laboratories,CA,USA)和Tinaquant-%CDT/转铁蛋白(Roche Diagnostic GmbH,Germany),而近年来开发的基于免疫亲和液相色谱法和

电喷雾质谱法的快速测定CDT的方法,材料和仪器昂贵,不能常规应用。

发明内容

[0006] 本发明提供高特异性、高亲和力的糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对及检测试剂盒,解决现有的CDT检测方法中缺乏与CDT特异性结合的CDT抗体、检测之前需要将CDT与其他血清蛋白和非CDT的转铁蛋白异构体分离的问题。

[0007] 本发明提供糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对,包括抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2分别与CDT抗原的不同表位结合,且所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2均不与TRF结合,其中所述抗CDT单克隆抗体M1是由保藏编号为CCTCC NO:C2022391的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1产生的,所述抗CDT单克隆抗体M2是由保藏编号为CCTCC NO:C2022392的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2产生的,所述抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2均于2022年12月21日保藏,保藏单位:中国典型培养物保藏中心;请求保藏人为深圳上泰生物工程有限公司,保藏地址为中国武汉。

[0008] 进一步地,所述CDT抗原为天然CDT抗原或使用蛋白质重组技术制备的重组CDT抗原。

[0009] 进一步地,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2的制备方法包括以下步骤:

[0010] S1、将如上述的重组CDT抗原作为抗原进行动物免疫;

[0011] S2、提取S1中动物的细胞并与骨髓瘤融合产生杂交瘤细胞;

[0012] S3、用如上述的重组CDT抗原通过夹心ELISA选择所述产生所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2的杂交瘤细胞;

[0013] S4、用天然CDT抗原通过与所述S3步骤中的夹心ELISA相同的方法确认所述杂交瘤细胞;

[0014] S5、用TRF通过与所述S3步骤中的夹心ELISA相同的方法反向筛选所述杂交瘤细胞,得到产生所述抗CDT单克隆抗体M1的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和产生所述抗CDT单克隆抗体M2的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2。

[0015] 本发明还提供一种高特异性、高亲和力的糖缺失性转铁蛋白的检测试剂盒,包括试剂R1、试剂R2、校准品和质控品,所述试剂R1包括如上述的抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物和如上述的抗CDT单克隆抗体M2的胶乳微球偶联物。

[0016] 进一步地,所述校准品和质控品含有如上述的CDT抗原。

[0017] 进一步地,所述抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物和抗CDT单克隆抗体M2的胶乳微球偶联物的制备方法包括以下步骤:

[0018] S1、致敏:将乳胶溶液置于离心管中,加入敏化缓冲液,再加入所述抗CDT单克隆抗体M1或抗CDT单克隆抗体M2,混合均匀,置于37℃反应1小时;

[0019] S2、封闭:加入封闭缓冲液,超声2分钟后,37℃封闭1小时,封闭完成后,离心以去除上清液中未反应的部分;

[0020] S3、加入1mL致敏缓冲液并超声处理乳胶,用致敏缓冲液调节抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物700nm处的吸光度为0.8Abs。

[0021] 进一步地,所述敏化缓冲液为pH6.1的20mM MES,所述致敏缓冲液为pH 7.5的10mM PBS,所述封闭缓冲液包括pH 7.5的10mM PBS、10%的牛血清白蛋白和0.095%w/w的叠氮钠。

[0022] 进一步地,所述S1步骤中加入抗CDT单克隆抗体M1或抗CDT单克隆抗体M2后溶液的浓度为0.03~0.09mg/mL。

[0023] 本发明还提供一种杂交瘤细胞对,所述杂交瘤细胞对分别用于产生如上述的单克隆抗体对,所述杂交瘤细胞对为产生所述抗CDT单克隆抗体M1的保藏编号为CCTCC NO:C2022391的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和产生所述抗CDT单克隆抗体M2的保藏编号为CCTCC NO:C2022392的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2,所述抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2均于2022年12月21日保藏,请求保藏人为深圳上泰生物工程有限公司。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0025] (1) 本发明的抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2是能识别天然CDT结构的抗体,是能分别识别不同的CDT表位的两个单克隆抗体对,利用该抗体制备的检测试剂盒可直接测试血液或体液样本中天然的CDT,无需将CDT与其他血清蛋白和非CDT的转铁蛋白异构体分离,无需对样本进行预处理。

[0026] (2) CDT与TRF蛋白的区别仅在于缺失糖基化位点,由于抗原识别表位空间较小,用常规方法无法同时制备两种识别不同表位的CDT单克隆抗体,因此,用于CDT特异性检测的试剂盒只能选择竞争法,本发明克服了上述不足,成功制备了能够结合CDT蛋白的两种不同表位的单克隆抗体,用本发明抗体制备的胶乳免疫比浊法试剂盒,用双抗夹心法检测即可,夹心法在抗体识别抗原反应中,抗体结合抗原的不同表位比识别单一表位更牢固,且随着抗原浓度增加,抗原抗体复合物能形成更大的网状颗粒,表现在光信号变化更大,比竞争法的检测灵敏度更高。

[0027] (3) 利用蛋白质重组技术制备CDT抗原,并使用该CDT抗原作为抗原进行动物免疫,之后细胞融合获得产生抗体的杂交瘤细胞,通过夹心ELISA筛选产生CDT抗体的杂交瘤细胞,并用天然CDT确认和用TRF进行反向筛选,得到产生抗CDT单克隆抗体M1的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和产生抗CDT单克隆抗体M2的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2。而现有技术中,通常将等电点为5.4的TRF与神经氨酸酶共同温育而人工制备等电点为5.7的CDT,这种将蛋白质变性处理,蛋白质构象的确认往往不完整,本发明的CDT抗原的制备则克服了上述的问题,且通过天然CDT确认和用TRF进行反向筛选,保证了本发明制备的抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2对天然CDT的特异性。

[0028] (4) 该检测试剂盒基于透射或散射的胶乳增强免疫比浊法,可提高测定的准确性,扩大测定范围;配套使用通用的自动化分析设备,如全自动生化分析仪或特定蛋白分析仪等,能够降低经济成本。

[0029] (5) 利用本发明的CDT检测试剂盒可直接检测样本中CDT的浓度,并同时计算CDT:TRF比率,提高了CDT在TRF增加的患者中的诊断特异性。

附图说明

[0030] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对本发明实施例的描述中所

需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

- [0031] 图1为重组人血清转铁蛋白 (TRF) 完整质谱 (Intact Mass);
- [0032] 图2为重组糖基缺失转铁蛋白 (CDT) 完整质谱 (Intact Mass);
- [0033] 图3为重组TRF和重组CDT的凝胶电泳;
- [0034] 图4为不同浓度的单克隆抗体的吸光度检测结果图。

具体实施方式

[0035] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例及附图,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。以下结合具体实施例对本发明作具体的介绍。

[0036] 本发明实施例提供糖缺失性转铁蛋白的单克隆抗体对,包括可配对使用的抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2分别与CDT抗原的不同表位结合,且所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2均不与TRF结合,其中所述抗CDT单克隆抗体M1是由保藏编号为CCTCC NO:C2022391的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1产生的,所述抗CDT单克隆抗体M2是由保藏编号为CCTCC NO:C2022392的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2产生的,所述抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2均于2022年12月21日保藏,请求保藏人为深圳上泰生物工程有限公司。

[0037] 具体地,所述CDT抗原为天然CDT抗原或使用蛋白质重组技术制备的重组CDT抗原。

[0038] 具体地,所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2的制备方法包括以下步骤:

[0039] S1、将如上述的重组CDT抗原作为抗原进行动物免疫;

[0040] S2、提取S1中动物的细胞并与骨髓瘤融合产生杂交瘤细胞;

[0041] S3、用如上述的重组CDT抗原通过夹心ELISA选择所述产生所述抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2的杂交瘤细胞;

[0042] S4、用天然CDT抗原通过与所述S3步骤中的夹心ELISA相同的方法确认所述杂交瘤细胞;

[0043] S5、用TRF通过与所述S3步骤中的夹心ELISA相同的方法反向筛选所述杂交瘤细胞,得到产生所述抗CDT单克隆抗体M1的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和产生所述抗CDT单克隆抗体M2的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2。

[0044] 本发明实施例还提供一种高特异性、高亲和力的糖缺失性转铁蛋白的检测试剂盒,包括试剂R1、试剂R2、校准品和质控品,所述试剂R1包括如上述的抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物和如上述的抗CDT单克隆抗体M2的胶乳微球偶联物。

[0045] 具体地,所述校准品和质控品含有如上述的CDT抗原。

[0046] 具体地,所述抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物和抗CDT单克隆抗体M2的胶乳微球偶联物的制备方法包括以下步骤:

[0047] S1、致敏:将乳胶溶液置于离心管中,加入敏化缓冲液,再加入所述抗CDT单克隆抗

体M1或抗CDT单克隆抗体M2,混合均匀,置于37℃反应1小时;

[0048] S2、封闭:加入封闭缓冲液,超声2分钟后,37℃封闭1小时,封闭完成后,离心以去除上清液中未反应的部分;

[0049] S3、加入1mL致敏缓冲液并超声处理乳胶,用致敏缓冲液调节抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物700nm处的吸光度为0.8Abs。

[0050] 具体地,所述敏化缓冲液为pH6.1的20mM MES,所述致敏缓冲液为pH 7.5的10mM PBS,所述封闭缓冲液包括pH 7.5的10mM PBS、10%的牛血清白蛋白和0.095%w/w的叠氮钠。

[0051] 具体地,所述S1步骤中加入抗CDT单克隆抗体M1或抗CDT单克隆抗体M2后溶液的浓度为0.03~0.09mg/mL。

[0052] 本发明实施例还提供一种杂交瘤细胞对,所述杂交瘤细胞对分别用于产生如上述的单克隆抗体对,所述杂交瘤细胞对为产生所述抗CDT单克隆抗体M1的保藏编号为CCTCC NO:C2022391的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和产生所述抗CDT单克隆抗体M2的保藏编号为CCTCC NO:C2022392的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2,所述抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1和抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2均于2022年12月21日保藏,请求保藏人为深圳上泰生物工程有限公司。

[0053] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到,未详细描述的技术均按照本领域人员熟知的标准方法进行。本申请中提及的细胞株、试剂及载体等均有商品供应或以别的途径能为公众所得,它们仅作为举例,对本发明不是唯一的,可分别用其它适合的工具或生物材料来替代。

[0054] 实施例1免疫原的制备、鉴定以及应用

[0055] 免疫原的制备

[0056] 人血清转铁蛋白的编码序列由来自人肝cDNA库的全长cDNA克隆的限制性片段组装而成。选择了最新的人类转铁蛋白基因表达的TRF,其序列为SEQ ID NO.1,如下所示:

[0057] MGWSCIILFLVATATGVHSPDKTVRWCAVSEHEATKCQSFRDHMKS
VIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANEADA VTL DAGLVYDAYLAPNNLKP
VVAEFYGSKEDPQTFYYAVAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGW
NIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGCGCST
LNQYFGYSGAFKCLKNGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNT
RKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARSMGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKE

FQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREGTCQ
EAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVKGIECVSAETTEDCIAKIMN
GEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENYNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVK
[0058] KSASDLTWDNLKGKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGC
APGSKKDSSLCKLCMGSGLNLCEPNNKEGYGYTGAFRCLVEKGDVAFVK
HQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYELLCLDGTRKPVVEEYANCHLARAPN
HAVVTRKDKEACVHKILRQQQHLFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDT
VCLAKLHDRNTYEKYLGEYVKA VGNLRKCSTSSLLEACTFRRPHHHHHH*

[0059] 使用基因合成的分子生物学方法,合成高水平的重组人血清转铁蛋白(TRF),通过电泳分析判断TRF分子大小和纯度(图1,与天然血清中分离的TRF的一致),具有完整糖基化位点和完整功能。

[0060] 再利用蛋白质重组技术,将参与阴离子结合、盐效应、受体相互作用和金属结合调节的单个氨基酸残基替换成同位素取代的氨基酸,其中432和630位的天冬酰胺残基突变为天冬氨酸(图2),获得没有糖基化位点的去糖基-TRF(deglyco-TRF),即CDT抗原。

[0061] 免疫原的鉴定

[0062] 通过等电聚焦凝胶电泳验证CDT抗原的结构和等电点与天然CDT的一致性(图3)。

[0063] 通过ELISA夹心法检测CDT抗原的特异性和准确性,具体用本发明的抗CDT单克隆抗体M1(anti-deglyco-TRF M1)包被,用本发明的CDT抗原或天然CDT夹心,用本发明的抗CDT单克隆抗体M2(anti-deglyco-TRF M2)检测。

[0064] 免疫原的应用

[0065] CDT抗原还作为CDT检测试剂盒中的配套校准品和质控品的主要原料使用。用含有本发明的CDT抗原或天然CDT蛋白配制校准品,与分别用具有不同表位的两种单克隆抗体M1和M2致敏的两种胶乳微球混合以引起凝集,通过仪器的透射或散射光信号测量凝集的浊度变化。

[0066] 实施例2抗体的制备

[0067] 将实施例1获得的CDT抗原作为抗原,并对5周龄的BALB/c小鼠进行皮下免疫。提取的脾细胞与小鼠骨髓瘤融合产生杂交瘤细胞。通过夹心ELISA选择产生CDT抗体的杂交瘤细胞,并用天然CDT确认。并用TRF进行反向筛选,确认抗CDT单克隆抗体对天然CDT的特异性。

[0068] 动物免疫

[0069] 浓度为0.5mg/mL的CDT抗原溶液与相同体积的佐剂混合并乳化,皮下免疫5周龄BALB/c小鼠。每隔两星期加强一次免疫,共免疫3次。每次免疫前取血样检测血液中的抗体活性。最后一次免疫的14天后,注射100 μ L的抗原乳液到小鼠的腹腔,3天后取出脾脏进行融合。

[0070] 细胞融合

[0071] 将小鼠脾细胞、骨髓瘤细胞(P3 \times 63Ag8.653)和聚乙二醇4000混合于HAT选择性培养基中融合2分钟,分装于96孔培养板中,二氧化碳培养箱中37 $^{\circ}$ C培养,制备杂交瘤细胞。

[0072] 杂交瘤细胞的筛选和确认

[0073] 通过夹心ELISA法检测筛选上述制备的杂交瘤细胞中能够产生抗体的杂交瘤细

胞,具体步骤包括:

[0074] a.将10 μ g/mL的抗小鼠抗体的PBS溶液加入96孔微孔板中,每孔200 μ L,并在4 $^{\circ}$ C下反应过夜;

[0075] b.用PBS溶液洗涤一次微孔板,再用含0.5% BSA的PBS溶液封闭;

[0076] c.将杂交瘤细胞的培养上清液100 μ L加入微孔板中,室温下反应1小时;

[0077] d.再用含0.05% Tween的PBS洗涤溶液洗涤;

[0078] e.加CDT抗原或TRF在室温下反应1小时并如上述步骤洗涤;

[0079] f.加入100 μ L碱性磷酸酶(HRP酶)标记的抗转铁蛋白多克隆抗体(通过购买获得),使其在室温下反应1小时;

[0080] h.再次洗涤后,加入底物开始显色;

[0081] i.用酶标仪测量490nm处的吸光度。

[0082] 选择具有针对CDT抗原但不针对TRF的抗体活性的杂交瘤细胞。

[0083] 用人血清天然CDT通过相同的夹心ELISA确认产生的CDT单克隆抗体的杂交瘤细胞,获得杂交瘤细胞,杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体能够与人血清中天然CDT特异性结合,因此目标抗体可被筛选出来。

[0084] 实施例3配对抗体的筛选

[0085] 筛选出单克隆抗体后,从中取出两种单克隆抗体,一种作为捕获抗体,另一种作为标记抗体(HRP酶标记),将捕获抗体包被在抗原板上,先加入抗原(CDT抗原或天然CDT),孵育后洗去未结合的抗原,再加入标记抗体,孵育后洗去未结合的标记抗体,最后加入显色液显色。如果可以显色,说明标记抗体与抗原特异性结合,该捕获抗体与标记抗体为一对配对抗体。如果不能显色,说明标记抗体不能与抗原结合,从而被洗脱,该捕获抗体与标记抗体不是配对抗体。获得的抗CDT单克隆抗体M1和抗CDT单克隆抗体M2为天然CDT的匹配抗体,其中抗CDT单克隆抗体M1是由保藏编号为CCTCC NO:C2022391的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M1产生的,抗CDT单克隆抗体M2是由保藏编号为CCTCC NO:C2022392的抗人脱糖转铁蛋白的杂交瘤细胞株TRF M2产生的,与对照测试的天然CDT浓度有良好的相关性。

[0086] 实施例4CDT免疫比浊法检测试剂盒的制备和使用

[0087] CDT免疫比浊法检测试剂盒的制备

[0088] CDT胶乳免疫比浊法检测试剂盒包括:R1试剂、R2试剂、校准品和质控品。R1试剂为含促凝剂的缓冲液,R2试剂主要含抗CDT单克隆抗体M1胶乳微球偶联物和抗CDT单克隆抗体M2胶乳微球偶联物的混合悬液,校准品和质控品是将不同浓度的实施例1制备的CDT抗原溶解在特定的缓冲液中而制得。

[0089] 抗CDT单克隆抗体M1/M2胶乳微球偶联物的制备(单抗浓度优化):将100 μ L的10%粒径为0.13 μ m的乳胶溶液置于1.5mL离心管中,加入825 μ L pH6.1的20mM MES,再加入一定量的10mg/mL抗CDT M1单克隆抗体,使溶液中的抗体浓度为0.02mg/mL、0.03mg/mL、0.05mg/mL、0.06mg/mL、0.07mg/mL、0.08mg/mL和0.09mg/mL,混合均匀,置于37 $^{\circ}$ C反应1小时。致敏后,加入100 μ L封闭缓冲液(pH 7.5的10mM PBS、10%的牛血清白蛋白和0.095%w/w的叠氮钠),超声2分钟后,37 $^{\circ}$ C封闭1小时。封闭完成后,离心以去除上清液中未反应的部分。加入1mL pH 7.5的10mM PBS并超声处理乳胶。用pH 7.5的10mM PBS调节抗CDT单克隆抗体M1的胶乳微球偶联物700nm处的吸光度为0.8Abs。

[0090] 通过相同的步骤用抗CDT单克隆抗体M2致敏制备抗CDT单克隆抗体M2胶乳微球偶联物。

[0091] CDT免疫比浊法检测试剂盒的使用

[0092] 使用日立自动分析仪Model 7180进行测量。让150 μ L R1试剂分别与各浓度的校准品5 μ L反应0-5分钟后,再加入50 μ LR2试剂,记录加入R2试剂后30秒的吸光度A1,反应1-5分钟后,记录吸光度A2,吸光度A2与A1的差值为反应度,以校准品浓度为横坐标,反应度为纵坐标做校准曲线。再按上述步骤测试样本,测试样本的吸光度带入校准曲线方程中,可计算出样本的浓度。上述吸光度的测量波长均为570nm,测光点为19-34。

[0093] 将含有上述步骤制备的由不同浓度的抗CDT M1单克隆抗体制备的R2试剂检测不同浓度的CDT抗原,结果如图4。如图4所示,反应液中的抗体浓度为0.02mg/mL时灵敏度不充分,但在0.03mg/mL~0.09mg/mL时确认到CDT依赖性吸光度增加,表明这一范围是抗体的使用范围。

[0094] 检测原理可以是免疫透射比浊法或散射比浊法,检验仪器可适用但不限于生化分析和特定蛋白分析仪。

[0095] 按上述方法分别测试CDT的浓度和TRF的浓度,可计算CDT:TRF的比率。

[0096] 实施例5CDT免疫比浊法检测试剂盒的性能测试

[0097] a. 空白限

[0098] 用5 μ l生理盐水作为CDT浓度为0的检测样本,按上述步骤重复测定20次,测试空白限结果如表1。

测试次数	测试浓度 (mg/dL)
1	0
2	0.1
3	-0.3
4	-0.2
5	0.1
6	0
7	0.2
8	-0.2
9	0.1
10	-0.2
11	0.2
12	-0.3
13	-0.1
14	0
15	0
16	-0.4
17	-0.1
18	-0.3
19	0.1

20	0
ave	-0.065
SD	0.1785
ave+2SD	0.292

[0100] CDT试剂的ave+2SD值为0.292,表明试剂具有良好的空白限。

[0101] b. 重复性

[0102] 4个不同CDT浓度的血清样本,每个样本重复测试10次,测试重复性结果如表2。

[0103]

测试次数	样本1 (mg/dL)	样本2 (mg/dL)	样本3 (mg/dL)	样本4 (mg/dL)
1	1.2	4.9	17.3	25.6
2	1.3	4.9	17.2	25.7
3	1.3	4.6	17.1	25.4
4	1.3	4.9	17.4	25.3
5	1.3	4.8	17.6	25.5
6	1.3	4.8	17.8	25.8
7	1.2	4.7	17.7	24.9
8	1.3	4.7	17.2	24.8
9	1.4	4.9	17.8	25.6
10	1.3	4.7	17.9	25.4
ave	1.29	4.79	17.5	25.4
SD	0.0568	0.1101	0.2944	0.3266
CV	4.40%	2.30%	1.68%	1.29%

[0104] 测试不同浓度的血清样本,测试重复性的变异系数均小于5%,说明CDT检测试剂盒具有良好的重复性。

[0105] c. 线性范围

[0106] 用纯化的天然CDT溶解在阴性血清中,分别配制低浓度和高浓度的CDT,再用高低浓度CDT互相混合成4个不同浓度,一共有6个不同浓度的CDT样本,分别使用检测试剂盒检测,每个浓度测试3次,分别求出检测结果的均值。以稀释浓度为自变量,以检测结果均值为因变量求出线性回归方程。结果如表3。

[0107]

理论浓度 mg/dL	重复3次 (mg/dL)			均值	回归值	绝对偏差	相对偏差
1.2	1.3	1.4	1.4	1.4	0.5	0.9	/
25.0	24.6	24.5	24.4	24.5	24.5	/	0.03%
48.7	47.9	47.6	47.6	47.7	48.5	/	-1.60%
72.5	71.3	71.6	71.5	71.5	72.5	/	-1.37%
96.2	96.3	96.4	96.6	96.4	96.4	/	-0.01%
120.0	121.2	121.5	121.3	121.3	120.4	/	0.76%
k	1.0094	b	-0.7017	r	0.9998		

CDT检测试剂盒线性在1.2-120mg/dL范围内,相关系数为0.9998,绝对偏差小于1.2mg/dL,相对偏差在±5%以内,表明线性良好。

[0108] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

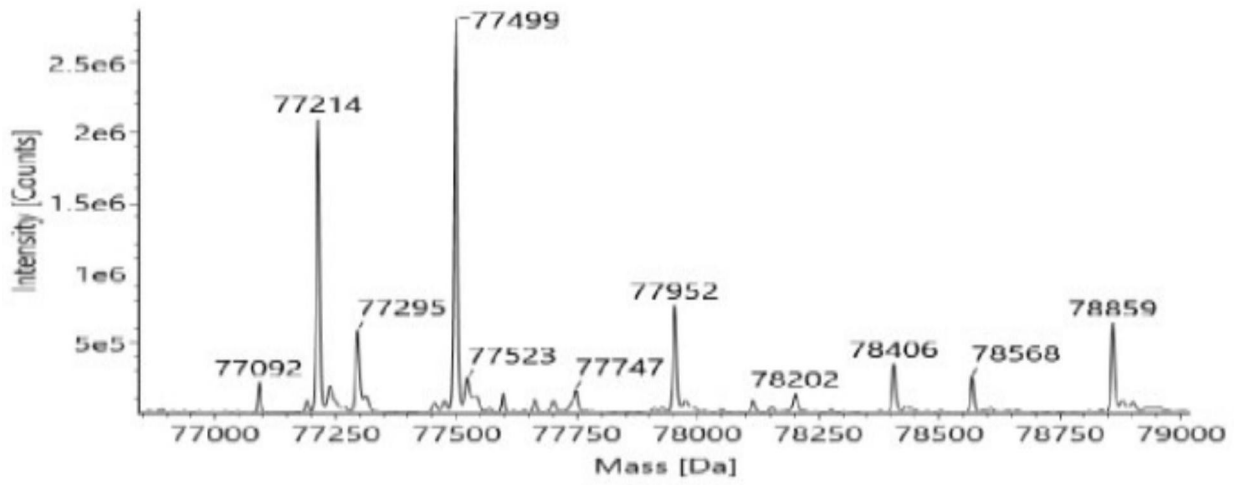


图1

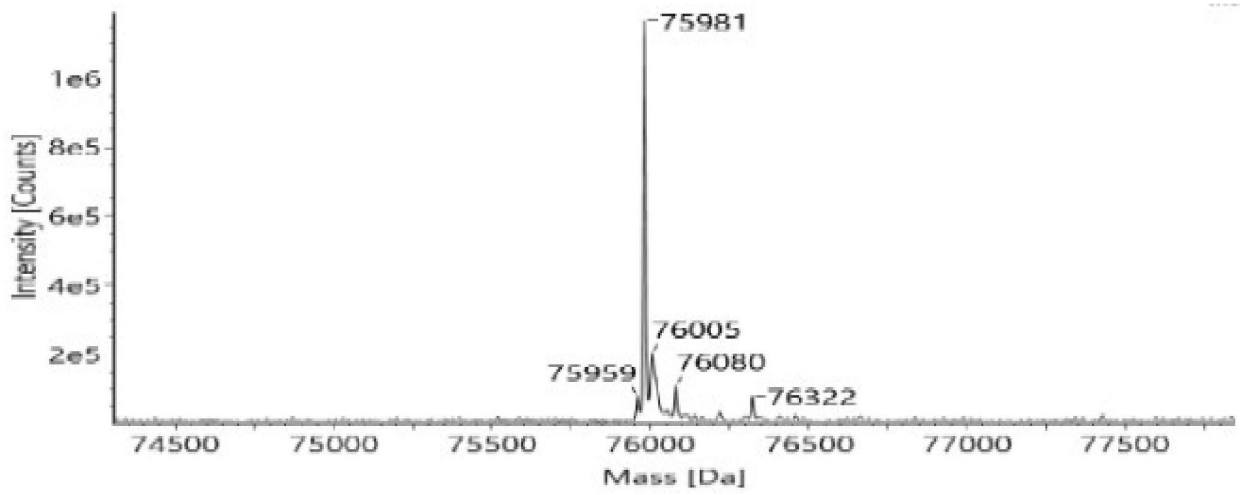


图2

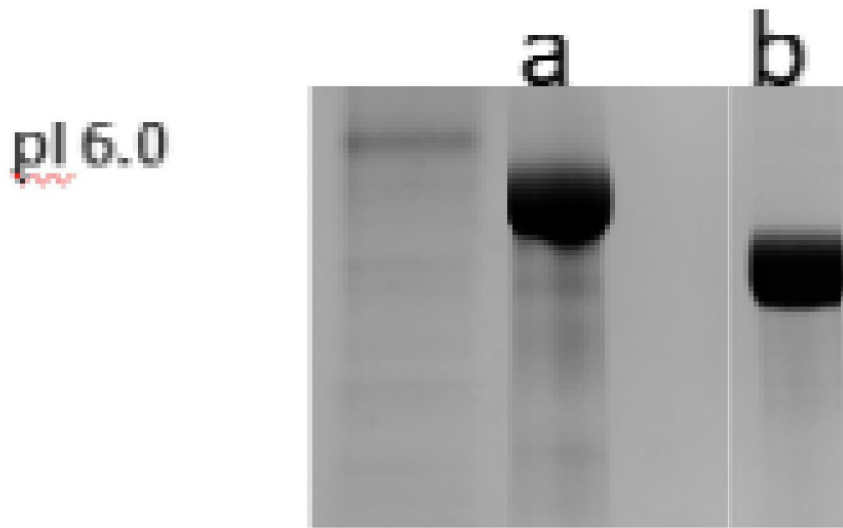


图3

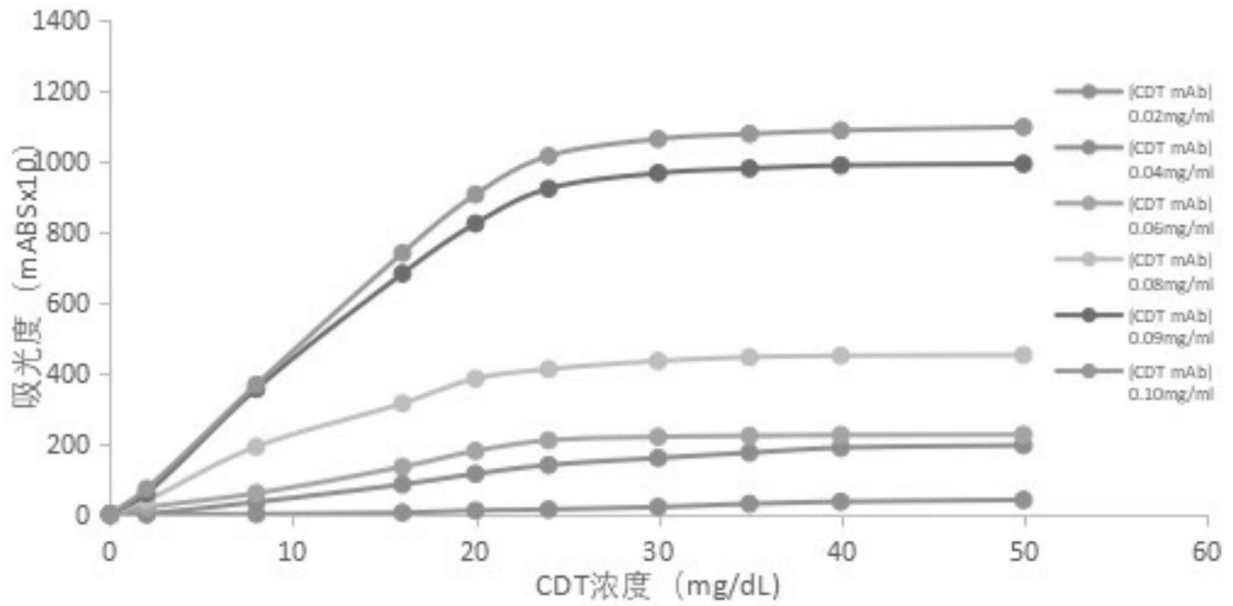


图4