



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108700576 B

(45) 授权公告日 2021.07.02

(21) 申请号 201780003988.9
 (22) 申请日 2017.01.20
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108700576 A
 (43) 申请公布日 2018.10.23
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.05.11
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2017/071969 2017.01.20
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/133039 ZH 2018.07.26
 (73) 专利权人 深圳市新产业生物医学工程股份
 有限公司
 地址 518122 广东省深圳市坪山区坑梓街
 道金沙社区金辉道16号

(72) 发明人 饶微 张燊
 (74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
 责任公司 11240
 代理人 韩建伟 金田蕴
 (51) Int.Cl.
 G01N 33/541 (2006.01)
 G01N 33/549 (2006.01)
 G01N 33/563 (2006.01)
 G01N 33/533 (2006.01)
 G01N 33/534 (2006.01)
 G01N 33/535 (2006.01)
 G01N 33/543 (2006.01)
 审查员 刘莉丹

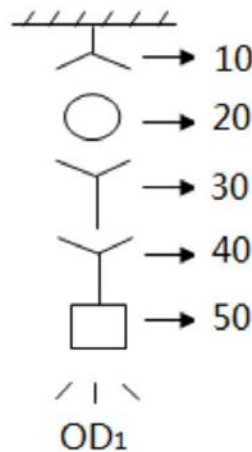
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54) 发明名称

制备抗体对的方法、试剂盒及试剂盒的应用和制备抗体对的系统

(57) 摘要

一种制备抗体对的方法、试剂盒及试剂盒的应用和制备抗体对的系统。其中,该方法包括:采用已有抗体的抗原结合片段作为捕获抗体,抗可结晶段抗体作为标记抗体,直接从细胞培养物上清中筛选可与已有抗体配对的目标抗体。应用该方法可直接筛选细胞培养物上清获取配对抗体,不需要对备筛抗体进行大量制备、纯化以及标记等工艺,极大的降低了工作量。



1. 一种制备抗体对的方法,其特征在于,包括:采用已有抗体的抗原结合片段作为捕获抗体,抗可结晶段抗体作为标记抗体,直接从细胞培养物上清中筛选可与所述已有抗体配对的目标抗体;所述已有抗体的抗原结合片段为Fab' 或F(ab)₂,所述标记抗体为抗Fc抗体;所述方法进一步包括:根据所述细胞培养物上清中的总抗体含量或细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度对筛选到的抗体进行优选;所述细胞培养物上清为杂交瘤细胞培养物上清;所述标记抗体标记有示踪标记物,所述示踪标记物直接或间接标记所述标记抗体;所述优选步骤包括:

- a) 检测细胞培养物上清中抗体与所述已有抗体的夹心信号,将所得信号记为OD₁;
- b) 检测所述细胞培养物上清中的总抗体含量,将所得信号记为OD₂;
- c) 检测所述细胞培养物上清中的待筛抗体与目的抗原的结合强度,将所得信号记为OD₃;以及
- d) 根据OD₁/OD₂和OD₁/OD₃的比值,对所述步骤a) 筛选到的抗体进行评价或优选。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述已有抗体的抗原结合片段为F(ab)₂。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述示踪标记物选自酶标记物、荧光染料、化学发光染料、异鲁米诺及衍生物和放射性标记物中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤d) 包括:

1) 若细胞培养物为单个细胞株,则OD₁/OD₂越高的抗体与所述已有抗体的配对效果越好;

2) 若细胞培养物为多个细胞株,则选取OD₁/OD₃较高的细胞培养物分离成单个细胞继续培养得到新的细胞培养物,将所述新的细胞培养物按所述步骤1) 进一步优选。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述步骤d) 具体包括:

将所述细胞培养物按单集落孔和多集落孔分成两组;

单集落孔的一组按照OD₁/OD₂由高到低排序,选择前面的N株细胞,其中所述N为1-20;

多集落孔的一组按照OD₁/OD₃由高到低排序,选择前面的M孔细胞分别进行亚克隆,然后按照所述步骤a) 和所述步骤b) 的方法对亚克隆的细胞进行检测,选取OD₁/OD₂较高的N株细胞,其中所述M为1-40。

6. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述步骤b) 具体包括:使用特异性结合抗体保守区的抗体或免疫球蛋白结合蛋白检测细胞培养物上清中的总抗体含量。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述特异性结合抗体保守区的抗体选自羊抗鼠IgM、羊抗鼠IgA、羊抗鼠IgD、羊抗鼠IgG1、羊抗鼠IgG2a、羊抗鼠IgG2b、羊抗鼠IgG3、兔抗鼠IgM、兔抗鼠IgA、兔抗鼠IgD、兔抗鼠IgG1、兔抗鼠IgG2a、兔抗鼠IgG2b和兔抗鼠IgG3中两株或多株的混合物,所述免疫球蛋白结合蛋白为葡萄球菌A蛋白和/或链球菌G蛋白。

8. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述步骤c) 具体包括:将目的抗原包被在固相上,借助第二抗体检测所述细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度。

9. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述已有抗体为抗胃泌素-17抗体、抗叶酸结合蛋白抗体、抗甲状腺过氧化物酶抗体、甲状腺球蛋白抗体、胰岛素抗体、铁蛋白抗体、血清甲胎蛋白抗体、癌胚抗体、前列腺特异性抗体、黄体生成素抗体、催乳素抗体、人绒毛促性腺激素抗体、神经元特异性烯醇化酶抗体、糖类抗原125抗体、糖类抗原153抗体、糖类抗原199抗体、细胞角蛋白十九片段抗体、糖类抗原724抗体、糖类抗原242抗体、生长激素抗体、

肌红蛋白抗体、糖类抗原50抗体、C反应蛋白抗体、促肾上腺皮质激素抗体、肌酸激酶同工酶抗体、Sangtec-100蛋白质抗体、层粘连蛋白抗体、IV型胶原抗体、脑自然肽N端前体蛋白抗体、肌钙蛋白抗体、血清甲状旁腺素抗体、血清降钙素抗体、降钙素原抗体、前列腺酸性磷酸酶抗体、骨钙素抗体、妊娠相关蛋白A抗体、胃蛋白酶原I抗体、胃蛋白酶原II抗体、胰岛素样生长因子抗体或D-二聚体抗体中的任意一种。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法, 其特征在于, 还包括将含有筛选到的抗体的细胞培养物进行扩大培养及目标抗体的大量制备与纯化。

制备抗体对的方法、试剂盒及试剂盒的应用和制备抗体对的系统

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体而言,涉及一种制备抗体对的方法、试剂盒及试剂盒的应用和制备抗体对的系统。

背景技术

[0002] 双抗体夹心法是一种使用两株抗体结合同一抗原对抗原进行定量检测的技术,由于其具有灵敏度高、抗干扰能力强等诸多优势,被广泛应用于ELISA、CLIA、RIA等免疫检测分析。

[0003] 双抗体夹心法在应用过程中,一方面,抗体结合抗原后形成的空间位阻将阻碍大多数其它抗体继续与抗原结合,能成功配对的抗体对结合角度以及所识别的抗原决定簇之间的距离都有严苛要求;另一方面,各个检测体系由于采取的固相及标记物不同,对抗体对的要求也不同,例如可用于ELISA的抗体对并不都能用于CLIA,这便对抗体对提出了更多的要求。

[0004] 配对抗体或抗体对是指能同时结合到抗原上的两株相同或不同的抗体。目前制备配对抗体的通用方法如下:1)通过杂交瘤技术、ADLib、或噬菌体抗体文库等方法制备一批针对目的抗原的单克隆抗体;2)通过腹水或细胞大规模培养等方式大量获取以上抗体;3)将所有抗体两两组合(也可自身组合),一株固定在酶标板、磁珠等固相介质作为捕获抗体,另一株标记显色化合物(碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或鲁米诺等物质)作为标记抗体;4)夹心检测目的抗原,根据信号强弱判定是否配对成功。

[0005] 此方法又被称为常规意义上的鸟枪法,具有非常多的限制性因素。首先,由于人力的限制,通过步骤1)获取的抗体通常只有数十株,大大限制了可供选择的范围;第二,从步骤1)中获取的高灵敏度抗体存在较大可能找不到与之配对的抗体而被弃用;第三,配对筛选过程的抗体大批量制备、抗体纯化和标记耗时费力,且标记过程也可能对抗体本身性质造成一定影响而干扰判断。

[0006] 现有的关于配对抗体制备方法改进的内容非常少,可供参考的有中国专利CN103884842A,其改进包括:1)使用生物素和显色化合物分别标记待筛抗体,随后包被亲和素通过夹心法ELISA进行配对检测;2)通过归一法(即将检测信号除以所用抗体分子对的作用浓度)来消除抗体用量对检测的干扰;3)根据同一分子所组成抗体对的检测信号不强于该抗体分子与另一抗体分子所组成抗体对的检测信号这一原则进行筛选。又如欧洲专利W02004025248A2,其通过比较复合物亲和力大于抗体交叉性来筛选配对抗体。以上方法均需要先行制备好抗体,作用仅在于提升配对准确率。

发明内容

[0007] 本发明旨在提供一种制备抗体对的方法、试剂盒及试剂盒的应用和制备抗体对的系统,以解决现有技术中制备抗体时需要制备大量抗体、纯化以及标记等工艺,

工作量过大的技术问题。

[0008] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种制备抗体对的方法。该方法包括:采用已有抗体的抗原结合片段作为捕获抗体,抗可结晶段抗体作为标记抗体,直接从细胞培养物上清中筛选可与已有抗体配对的目标抗体。

[0009] 进一步的,抗体的抗原结合片段为Fab' 或F(ab)₂,优选为F(ab)₂;标记抗体为抗Fc抗体。

[0010] 进一步的,该方法还包括:根据细胞培养物上清中的总抗体含量或细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度对筛选到的抗体进行优选。

[0011] 进一步的,细胞培养物上清为杂交瘤细胞培养物上清。进一步的,标记抗体标记有示踪标记物,示踪标记物直接或间接标记标记抗体;优选的,示踪标记物选自酶标记物、荧光染料、化学发光染料、异鲁米诺及衍生物和放射性标记中的至少一种,所述异鲁米诺及衍生物优选为ABEI。

[0012] 进一步的,优选步骤包括:a)检测细胞培养物上清中抗体与所述已有抗体的夹心信号,将所得信号记为OD₁;b)检测细胞培养物上清中的总抗体含量,将所得信号记为OD₂;c)检测细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度,将所得信号记为OD₃;以及d)根据OD₁/OD₂或OD₁/OD₃的比值,对步骤a)筛选到的抗体进行评价或优选。

[0013] 进一步的,步骤d)包括:1)若细胞培养物为单个细胞株,则OD₁/OD₂越高的抗体与已有抗体的配对效果越好;2)若细胞培养物为多个细胞株,则选取OD₁/OD₃较高的细胞培养物分离成单个细胞继续培养得到新的细胞培养物,将新的细胞培养物按步骤1)进一步优选。

[0014] 进一步的,步骤d)具体包括:将细胞培养物按单集落孔和多集落孔分成两组;单集落孔的一组按照OD₁/OD₂由高到低排序,选择前面的N株细胞,其中N为1-20;多集落孔的一组按照OD₁/OD₃由高到低排序,选择前面的M孔细胞分别进行亚克隆,然后按照步骤a)和步骤b)的方法对亚克隆的细胞进行检测,选取OD₁/OD₂较高的N株细胞,其中M为1-40。

[0015] 进一步的,步骤b)具体包括:使用特异性结合抗体保守区的抗体或免疫球蛋白结合蛋白检测细胞培养物上清中的总抗体含量;优选的,特异性结合抗体保守区的抗体选自羊抗鼠IgM、羊抗鼠IgA、羊抗鼠IgD、羊抗鼠IgG1、羊抗鼠IgG2a、羊抗鼠IgG2b、羊抗鼠IgG3、兔抗鼠IgM、兔抗鼠IgA、兔抗鼠IgD、兔抗鼠IgG1、兔抗鼠IgG2a、兔抗鼠IgG2b和兔抗鼠IgG3中两株或多株的混合物,免疫球蛋白结合蛋白为葡萄球菌A蛋白和/或链球菌G蛋白。

[0016] 进一步的,步骤c)具体包括:将目的抗原包被在固相上,借助第二抗体检测细胞培养物上清中待测抗体与目的抗原的结合强度。

[0017] 进一步的,已有抗体为抗胃泌素-17抗体、抗叶酸结合蛋白抗体、抗甲状腺过氧化物酶抗体、甲状腺球蛋白抗体、胰岛素抗体、铁蛋白抗体、血清甲胎蛋白抗体、癌胚抗体、前列腺特异性抗体、黄体生成素抗体、催乳素抗体、人绒毛促性腺激素抗体、神经元特异性烯醇化酶抗体、糖类抗原125抗体、糖类抗原153抗体、糖类抗原199抗体、细胞角蛋白十九片段抗体、糖类抗原724抗体、糖类抗原242抗体、生长激素抗体、肌红蛋白抗体、糖类抗原50抗体、C反应蛋白抗体、促肾上腺皮质激素抗体、肌酸激酶同工酶抗体、Sangtec-100蛋白质抗体、层粘连蛋白抗体、IV型胶原抗体、脑自然肽N端前体蛋白抗体、肌钙蛋白抗体、血清甲状旁腺素抗体、血清降钙素抗体、降钙素原抗体、前列腺酸性磷酸酶抗体、骨钙素抗体、妊娠相关蛋白A抗体、胃蛋白酶原I抗体、胃蛋白酶原II抗体、胰岛素样生长因子抗体或D-二聚体抗

体中的任意一种。进一步的,该方法还包括将含有筛选到的抗体的细胞培养物进行扩大培养及目标抗体的大量制备与纯化。

[0018] 根据本发明的另一个方面,提供一种制备抗体对的试剂盒。该试剂盒包括:捕获抗体,已有抗体的抗原结合片段固定在固相介质上形成;以及标记抗体,抗可结晶段抗体。

[0019] 进一步的,抗体的抗原结合片段为Fab' 或F(ab)₂,优选为F(ab)₂;标记抗体为抗Fc抗体。进一步的,标记抗体标记有示踪标记物,示踪标记物直接或间接标记标记抗体;优选的,示踪标记物选自酶标记物、荧光染料、化学发光染料、异鲁米诺及衍生物和放射性标记中的至少一种。

[0020] 进一步的,该试剂盒还包括:特异性结合抗体保守区的抗体或免疫球蛋白结合蛋白;优选的,特异性结合抗体保守区的抗体选自:羊抗鼠IgM、羊抗鼠IgA、羊抗鼠IgD、羊抗鼠IgG1、羊抗鼠IgG2a、羊抗鼠IgG2b、羊抗鼠IgG3、兔抗鼠IgM、兔抗鼠IgA、兔抗鼠IgD、兔抗鼠IgG1、兔抗鼠IgG2a、兔抗鼠IgG2b和兔抗鼠IgG3中两株或多株的混合物,免疫球蛋白结合蛋白为葡萄球菌A蛋白和/或链球菌G蛋白。

[0021] 进一步的,该试剂盒还包括:直接或间接连接在固相介质上的目的抗原。

[0022] 进一步的,固相为酶标板、磁珠或胶体金。

[0023] 进一步的,已有抗体为抗胃泌素-17抗体、抗叶酸结合蛋白抗体、抗甲状腺过氧化物酶抗体、甲状腺球蛋白抗体、胰岛素抗体、铁蛋白抗体、血清甲胎蛋白抗体、癌胚抗体、前列腺特异性抗体、黄体生成素抗体、催乳素抗体、人绒毛促性腺激素抗体、神经元特异性烯醇化酶抗体、糖类抗原125抗体、糖类抗原153抗体、糖类抗原199抗体、细胞角蛋白十九片段抗体、糖类抗原724抗体、糖类抗原242抗体、生长激素抗体、肌红蛋白抗体、糖类抗原50抗体、C反应蛋白抗体、促肾上腺皮质激素抗体、肌酸激酶同工酶抗体、Sangtec-100蛋白质抗体、层粘连蛋白抗体、IV型胶原抗体、脑自然肽N端前体蛋白抗体、肌钙蛋白抗体、血清甲状旁腺素抗体、血清降钙素抗体、降钙素原抗体、前列腺酸性磷酸酶抗体、骨钙素抗体、妊娠相关蛋白A抗体、胃蛋白酶原I抗体、胃蛋白酶原II抗体、胰岛素样生长因子抗体或D-二聚体抗体中的任意一种。进一步的,该试剂盒还包括用于细胞培养物扩大培养、目标抗体的大量制备与纯化的试剂。

[0024] 根据本发明的再一个方面,提供一种上述试剂盒在制备抗体对中的应用。

[0025] 进一步的,试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪。

[0026] 根据本发明的又一个方面,提供一种制备抗体对的系统。该系统包括上述任一种试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。

[0027] 应用本发明的技术方案,采用已有抗体的抗原结合片段作为捕获抗体,抗可结晶段抗体作为标记抗体,可以直接从细胞培养物上清中筛选可与已有抗体配对的目标抗体,不需要对备筛抗体进行大量制备、纯化以及标记等工艺,极大的降低了工作量。

附图说明

[0028] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0029] 图1示出了根据本发明一实施方式的通过夹心法从细胞培养物上清中筛选可与捕获抗体配对的抗体的示意图;

[0030] 图2示出了根据本发明一实施方式的采用双抗体夹心法定量检测细胞培养物上清中的总抗体含量的示意图;以及

[0031] 图3示出了根据本发明一实施方式的采用间接法检测细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度的示意图。

具体实施方式

[0032] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0033] 众所周知,使用杂交瘤法制备单克隆抗体过程中,进行一次细胞融合可得到数千至上万的细胞集落。本发明发明人发现,在现有关于配对抗体制备方法中,可供选择的抗体仅限于已制备完成的抗体,并且需要对所有备筛选抗体进行大量制备、纯化及标记。针对此,发明人提出:如果能直接从细胞培养物上清中筛选配对抗体,将显著增加成功率。

[0034] 基于上述构思及技术问题,本发明旨在提供一种方法可以直接以细胞培养物上清进行配对筛选,随着可供筛选的抗体的增多,建立一个可靠的、实时的评价体系进行优选。

[0035] 本发明中涉及的缩写及术语解释如下:

[0036] 固相载体:在检测体系中用于固定抗体或抗原的介质,如酶标板、磁球、胶体金和醋酸纤维薄膜等。

[0037] Fab:抗体的抗原结合片段(Fragment of antigen binding),相当于Y型结构的两个臂,包含完整的可变区及CH1结构域。Fab' 仅含一臂为单价,F(ab)₂含有完整的两个臂为双价。

[0038] Fc:可结晶段(Fragment crystallizable),相当于抗体保守区的CH2和CH3结构域。

[0039] ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay),指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性和定量检测方法。

[0040] CLIA:化学发光免疫分析(Chemiluminescence Immunoassay),是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。

[0041] RIA:放射免疫分析法(Radioimmunoassay),以放射性同位素为示踪物,并将其标记在抗原上,以特异性抗体为结合物的分析方法。

[0042] ADLib:自主多样化文库(Autonomously persifying Library),一种基于人工诱导抗体基因高频转化形成抗体文库的抗体制备技术。

[0043] SPA:葡萄球菌A蛋白(Staphylococcal protein A),可以人类及多种哺乳动物IgG的Fc段结合。

[0044] SPG:蛋白G,从G型链球菌分离而得的细胞壁蛋白。能与多种动物的IgG的Fc区发生结合,但不能与IgA和IgM结合。

[0045] Tris:三羟甲基氨基甲烷,弱碱性,可加入HCL调节pH。

[0046] RPMI-1640:RPMI是Roswell Park Memorial Institute的缩写,RPMI是该研究所研发的一类细胞培养基,1640是培养基代号。

- [0047] CBS:碳酸盐缓冲液,使用适当比例的碳酸钠和碳酸氢钠配制。
- [0048] 配对抗体/抗体对:能同时结合到抗原上的两株相同或不同抗体。
- [0049] 捕获抗体:固定到酶标板、磁珠、胶体金等固相介质上,可以捕获溶液中的抗原的抗体。
- [0050] 标记抗体:在抗体上标记显色化合物如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和鲁米诺等,借此对抗体的结合性质进行检测。
- [0051] 第二抗体:即通常所说的二抗,可以特异性与第一抗体结合。当第一抗体处于复杂环境(如细胞培养物上清)中不利于标记时,可引入第二抗体标记显色化合物以便检测。
- [0052] 夹心法:使用一个抗体对联合检测抗原的方法,或者是使用一个抗原对联合检测抗体的方法。
- [0053] 间接法:将抗原固定到固相载体,使用第二抗体进行检测的方法。
- [0054] 亚克隆:通过有限稀释法将细胞离散成单个的细胞进行培养,借此提纯细胞株。
- [0055] 噬菌体抗体文库技术:通过PCR扩取抗体可变区全套基因,并借助噬菌体表面展示技术表达筛选目的抗体的抗体制备技术。
- [0056] 筛选配对抗体只能基于夹心法检测,如已有一株抗体A以及与之特异性结合的抗原X,需筛选另一株可与A配对结合抗原X的抗体B,则一般将A和B分别作为捕获抗体和标记抗体,如果能夹心检测抗原,则配对成功。本发明希望能直接从细胞培养物上清中筛选与A配对的抗体,即目标抗体B潜在于细胞培养物上清中,然而,存在以下两个问题:①由于该液中含有大量的杂蛋白,无论将细胞培养物作为捕获抗体还是标记抗体,其配对的效率都会极其低;②使用A作为捕获抗体,捕获抗原后再加入含抗体B的细胞培养物上清,继续引入标记好的标记抗体来结合抗体B,由于抗体A和抗体B的高度同源性(除非两种抗体选自不同物种,但这种情况相当少见),标记抗体亦可能与抗体A结合而造成假阳性。
- [0057] 本发明的发明构思如下:采用抗体A的抗原结合片段作为捕获抗体,捕获抗原X后加入含抗体B的细胞培养物上清,随后使用抗可结晶段作为标记的标记抗体。标记抗体仅与抗体的Fc段结合,故其仅与B结合而避免了假阳性。因此,采用已有抗体的抗原结合片段(例如:Fab段)为捕获抗体,抗可结晶段(例如:Fc段)抗体为标记抗体,直接从细胞培养物上清中筛选可与已有抗体配对的抗体。随后根据细胞培养物上清中的总抗体含量或者细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度对上步筛选到的抗体进行评估及优选。
- [0058] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种制备抗体对的方法。该方法包括:采用已有抗体的抗原结合片段作为捕获抗体,抗可结晶段抗体作为标记抗体,直接从细胞培养物上清中筛选可与已有抗体配对的目标抗体。
- [0059] 其中,“已有抗体”是指已经制备出的、待筛选与其配对的抗体,而非特指现有技术中的抗体。
- [0060] 应用本发明的技术方案,采用已有抗体的抗原结合片段作为捕获抗体,抗可结晶段抗体作为标记抗体,可以直接从细胞培养物上清中筛选可与已有抗体配对的目标抗体,不需要对备筛抗体进行大量制备、纯化以及标记等工艺,极大的降低了工作量。
- [0061] 在本发明中筛选抗体对所用的夹心法可为酶联免疫吸附夹心法、化学发光免疫分析夹心法或其它夹心检测法。
- [0062] 根据本发明一种典型的实施方式,抗原结合片段为Fab段;标记抗体为抗Fc抗体。

当然,在本发明中抗体并不局限于IgG抗体,也可以是其他类型抗体,相应的,捕获抗体为其抗原结合片段,标记抗体为其抗可结晶段抗体。捕获抗体包括但不限于Fab'或F(ab)₂,进一步优选为F(ab)₂,因为,F(ab)₂的稳定性比Fab'的稳定性好。该捕获抗体可以通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体得到,也可以通过基因工程的方法得到。

[0063] 根据本发明一种典型的实施方式,该方法还包括:根据细胞培养物上清中的总抗体含量或细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度对筛选到的抗体进行优选,以获得与已有抗体配对好的抗体。

[0064] 根据本发明一种典型的实施方式,标记抗体标记有示踪标记物,示踪标记物直接或间接标记标记抗体;优选的,示踪标记物包括但不限于酶标记物、荧光染料、化学发光染料、异鲁米诺及衍生物和放射性标记中的至少一种。

[0065] 优选的,优选步骤包括:a)检测细胞培养物上清中抗体与所述已有抗体的夹心信号,将所得信号记为OD₁;b)检测细胞培养物上清中的总抗体含量,将所得信号记为OD₂;c)检测细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度,将所得信号记为OD₃;以及d)根据OD₁/OD₂或OD₁/OD₃的比值,对步骤a)筛选到的抗体进行评价或优选。

[0066] 其中,在步骤a)中,检测筛选到的抗体的含量,将检测的信号记为OD₁,阳性信号说明待检培养物中含有可与已有抗体配对的抗体。

[0067] 在步骤b)中,由于细胞培养物上清中的有效抗体量不相等,步骤a)中检测出培养液的强信号可能为抗体量较大导致,而非配对效果更好。因此,本发明希望能得到培养物上清中抗体量的相对值,并认为有效量总抗体含量越少而OD₁越高的抗体配对效果越好。在该步骤中,检测细胞培养物(细胞培养液)上清中的总抗体含量,将所得信号记为OD₂。

[0068] 步骤c)中,检测细胞培养物上清中待筛抗体与目的抗原的结合强度。

[0069] 步骤d)中,根据OD₁/OD₂或OD₁/OD₃的比值,对步骤a)筛选到的抗体进行评价或优选。

[0070] 根据本发明一种典型的实施方式,步骤d)包括:1)若细胞培养物为单个细胞株,则OD₁/OD₂越高的抗体与已有抗体的配对效果越好;2)若细胞培养物为多个细胞株,则选取OD₁/OD₃较高的细胞培养物分离成单个细胞继续培养得到新的细胞培养物,将新的细胞培养物按步骤1)进一步优选。OD₁/OD₃越高,即测得的筛选到的抗体的信号OD₁与测得该抗体和目的抗原结合强度的信号OD₃越接近,说明两株抗体相互干扰越小,配对效果越好。

[0071] 优选的,步骤d)具体包括:将细胞培养物按单集落孔和多集落孔分成两组;单集落孔的一组按照OD₁/OD₂由高到低排序,选择前面的N株细胞,其中N为1-20,优选为10;多集落孔的一组按照OD₁/OD₃由高到低排序,选择前面的M孔细胞分别进行亚克隆,然后按照步骤a)和步骤b)的方法对亚克隆的细胞进行检测,选取OD₁/OD₂较高的N株细胞,其中M为1-40,优选为20。

[0072] 根据本发明一种典型的实施方式,步骤b)具体包括:使用特异性结合抗体保守区的抗体或免疫球蛋白结合蛋白检测细胞培养物上清中的总抗体含量;优选的,特异性结合抗体保守区的抗体包括但不限于羊抗鼠IgM、羊抗鼠IgA、羊抗鼠IgD、羊抗鼠IgG1、羊抗鼠IgG2a、羊抗鼠IgG2b、羊抗鼠IgG3、兔抗鼠IgM、兔抗鼠IgA、兔抗鼠IgD、兔抗鼠IgG1、兔抗鼠IgG2a、兔抗鼠IgG2b和兔抗鼠IgG3中两株或多株的混合物;免疫球蛋白结合蛋白包括但不限于葡萄球菌A蛋白和/或链球菌G蛋白,该步骤所用特异性结合抗体保守区的抗体,选自上

述抗体中两株或多株的混合物。

[0073] 根据本发明一种典型的实施方式,步骤c)采用间接法检测仅有培养物中的抗体与抗原结合,具体包括:将目的抗原包被在固相上,借助第二抗体检测细胞培养物上清中的抗体与目的抗原的结合强度。在间接法检测中仅有培养物中的抗体与抗原结合,不同于夹心法中存在另一株抗体的位阻影响,所以理论上间接法检出的信号强度要高于夹心法,当两个值相当时说明两株抗体完全不影响对方与抗原的结合,配对效果达到最佳(实际操作时,由于检测环境的差异,可取夹心法与间接法的比值进行比较)。

[0074] 根据本发明一种典型的实施方式,已有抗体为抗胃泌素-17抗体、抗叶酸结合蛋白抗体、抗甲状腺过氧化物酶抗体、甲状腺球蛋白抗体、胰岛素抗体、铁蛋白抗体、血清甲胎蛋白抗体、癌胚抗体、前列腺特异性抗体、黄体生成素抗体、催乳素抗体、人绒毛促性腺激素抗体、神经元特异性烯醇化酶抗体、糖类抗原125抗体、糖类抗原153抗体、糖类抗原199抗体、细胞角蛋白十九片段抗体、糖类抗原724抗体、糖类抗原242抗体、生长激素抗体、肌红蛋白抗体、糖类抗原50抗体、C反应蛋白抗体、促肾上腺皮质激素抗体、肌酸激酶同工酶抗体、Sangtec-100蛋白质抗体、层粘连蛋白抗体、IV型胶原抗体、脑自然肽N端前体蛋白抗体、肌钙蛋白抗体、血清甲状旁腺素抗体、血清降钙素抗体、降钙素原抗体、前列腺酸性磷酸酶抗体、骨钙素抗体、妊娠相关蛋白A抗体、胃蛋白酶原I抗体、胃蛋白酶原II抗体、胰岛素样生长因子抗体或D-二聚体抗体中的任意一种。

[0075] 根据本发明一种典型的实施方式,该方法还包括将含有筛选到的抗体的细胞培养物进行扩大培养及目标抗体的大量制备与纯化。

[0076] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种制备抗体对的试剂盒。该试剂盒包括:已有抗体的抗原结合片段固定在固相介质上形成的捕获抗体,以及抗可结晶段抗体作为标记抗体,这两者用于直接从细胞培养物上清中筛选可与已有抗体配对的目标抗体。

[0077] 根据本发明一种典型的实施方式,抗原结合片段为Fab段;标记抗体为抗Fc抗体。当然,在本发明中抗体并不局限于Ig抗体,也可以是其他类型抗体,相应的,捕获抗体为其抗原结合片段,标记抗体为其抗可结晶段抗体。优选的,捕获抗体为Fab'或F(ab)₂,进一步优选为F(ab)₂,因为,F(ab)₂的稳定性比Fab'的稳定性好。该捕获抗体可以通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体得到,也可以通过基因工程的方法得到。

[0078] 根据本发明一种典型的实施方式,标记抗体标记有示踪标记物,示踪标记物直接或间接标记标记抗体;优选的,示踪标记物选自酶标记物、荧光染料、化学发光染料、异鲁米诺及衍生物和放射性标记中的至少一种。

[0079] 根据本发明一种典型的实施方式,该试剂盒还包括:特异性结合抗体保守区的抗体或免疫球蛋白结合蛋白,用于检测细胞培养物上清中的总抗体含量;优选的,特异性结合抗体保守区的抗体包括但不限于羊抗鼠IgM、羊抗鼠IgA、羊抗鼠IgD、羊抗鼠IgG1、羊抗鼠IgG2a、羊抗鼠IgG2b、羊抗鼠IgG3、兔抗鼠IgM、兔抗鼠IgA、兔抗鼠IgD、兔抗鼠IgG1、兔抗鼠IgG2a、兔抗鼠IgG2b和兔抗鼠IgG3中两株或多株的混合物;免疫球蛋白结合蛋白包括但不限于葡萄球菌A蛋白和/或链球菌G蛋白。

[0080] 根据本发明一种典型的实施方式,该试剂盒还包括:直接或间接连接在固相介质上的目的抗原,用于借助第二抗体采用间接法检测仅有培养物中的抗体与抗原结合强度。

[0081] 根据本发明一种典型的实施方式,固相为酶标板、磁珠或胶体金。

[0082] 根据本发明一种典型的实施方式,已有抗体为抗胃泌素-17抗体、抗叶酸结合蛋白抗体、抗甲状腺过氧化物酶抗体、甲状腺球蛋白抗体、胰岛素抗体、铁蛋白抗体、血清甲胎蛋白抗体、癌胚抗体、前列腺特异性抗体、黄体生成素抗体、催乳素抗体、人绒毛促性腺激素抗体、神经元特异性烯醇化酶抗体、糖类抗原125抗体、糖类抗原153抗体、糖类抗原199抗体、细胞角蛋白十九片段抗体、糖类抗原724抗体、糖类抗原242抗体、生长激素抗体、肌红蛋白抗体、糖类抗原50抗体、C反应蛋白抗体、促肾上腺皮质激素抗体、肌酸激酶同工酶抗体、Sangtec-100蛋白质抗体、层粘连蛋白抗体、IV型胶原抗体、脑自然肽N端前体蛋白抗体、肌钙蛋白抗体、血清甲状旁腺素抗体、血清降钙素抗体、降钙素原抗体、前列腺酸性磷酸酶抗体、骨钙素抗体、妊娠相关蛋白A抗体、胃蛋白酶原I抗体、胃蛋白酶原II抗体、胰岛素样生长因子抗体或D-二聚体抗体中的任意一种。

[0083] 根据本发明一种典型的实施方式,该试剂盒还包括用于细胞培养物扩大培养、目标抗体的大量制备与纯化的试剂。

[0084] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种上述试剂盒在制备抗体对中的应用。

[0085] 根据本发明一种典型的实施方式,试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪。

[0086] 具体的,在本发明一种典型的实施方式中,以高敏抗体的Fab段为捕获抗体,抗Fc抗体作为标记的标记抗体,高效制备抗体对的方法如下步骤:

[0087] a) 如图1所示,使用已有高敏抗体的Fab段为捕获抗体10,抗Fc抗体作为标记的标记抗体40(携带标记物50),通过夹心法直接从细胞培养物上清中筛选可与捕获抗体配对的抗体30(20为抗原),采用夹心法检测的信号记为 OD_1 ;

[0088] b) 如图2所示,采用双抗体夹心法定量检测细胞培养物上清中的总抗体含量,即使用两株特异性结合抗体保守区的抗体(第二抗体A 60和第二抗体B 70),夹心法检测细胞培养物上清中的总抗体80含量,将所得信号记为 OD_2 ;

[0089] c) 如图3所示,采用间接法检测(也可以采用双抗原夹心法检测)细胞培养物上清中的抗体30与目的抗原20的结合强度,即将目的抗原包被在固相上,借助标记好的标记抗体40(携带标记物50)检测培养液中抗体与抗原的结合强度,将所得信号记为 OD_3 ;

[0090] d) 根据 OD_1/OD_2 或 OD_1/OD_3 的比值,对步骤a) 筛选到的抗体进行评价和优选。

[0091] 在步骤d) 中,若细胞培养物为单个细胞株,则 OD_1/OD_2 越高的抗体与已有抗体的配对效果越好;若细胞培养物为多个细胞株,则选取 OD_1/OD_3 较高的细胞培养物分离成单个细胞继续培养得到新的细胞培养物,将新的细胞培养物按步骤1) 进一步优选。 OD_1/OD_3 越高,即夹心法与间接法结果越接近,两株抗体相互干扰越小,配对效果越好。

[0092] 下面将结合实施例进一步说明本发明的有益效果。

[0093] 胃蛋白酶、胃蛋白酶来源于sigma;

[0094] 羊抗鼠IgG Fc:-北京博奥龙免疫技术有限公司;

[0095] G17抗原由上海科肽合成。

[0096] TPO抗原及FABP抗原由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司表达得到;

[0097] TMB底物来源于北京博奥龙免疫技术有限公司;

[0098] ABEI (N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺) 来源于深圳市新产业生物医学工程股份有限公司(Snibe);

[0099] 磁性微球来源于深圳市新产业生物医学工程股份有限公司。

[0100] 实施例1

[0101] Fab' 和F(ab)₂ 包被酶标板的效果对比

[0102] 1) Fab' 和F(ab)₂的获取

[0103] 参照《精编免疫学实验指南》(JohnE.Coligan,美国,2009)提供的方法分别用木瓜蛋白酶消化完整抗体获取抗体Fab',用胃蛋白酶消化完整抗体获取F(ab)₂。使用实验室已有的抗甲状腺过氧化物酶(TPO)抗体对进行夹心实验,这对抗体为T-1和T-2。

[0104] 具体地,取2mL 2mg/mL溶于PBS(pH 7.4)的T-1,加入2mL 0.1mg/mL溶于水解缓冲液(0.02mol/L EDTA·Na₂、0.02mol/L半胱氨酸、PBS)的木瓜蛋白酶,37℃温浴8h。加入碘乙酰胺至终浓度为0.03mol/L终止水解反应,将反应液转移到透析袋,在4℃下对2L PBS(pH8.0)透析12h。使用5mm×100mm蛋白A交联琼脂糖凝胶CL-4B层析柱将上述透析后的液体上样,收集含有Fab片段和酶的流穿液,浓缩至5mL。将浓缩液上样至26mm×900mm聚丙烯酰胺葡聚糖S-200Superfine层析柱,收集分子质量大小为50kDa的组分,用SDS-PAGE法鉴定分子质量大小。取20μL终产物用10%非还原SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定终产物纯度,测定A₂₈₀值确定Fab'片段浓度。

[0105] 将2mL 3mg/mL T-1对200mL乙酸缓冲液(pH4.0)4℃透析4h,重新测定浓度并用相同pH的乙酸盐缓冲液将浓度调节至2mg/mL。用乙酸盐缓冲液(pH4.0)配制浓度为0.1mg/mL的胃蛋白酶,取1mL加入上述抗体溶液中,使酶/抗体=1:20,37℃反应4h。加入100μL 2mol/L的Tris碱终止反应。将混合液转移至透析袋,对1L pH8.0的PBS于4℃透析。将透析液上样至5mm×100mm蛋白A交联琼脂糖凝胶CL-4B层析柱上,收集未结合的流出液。将流出液浓缩至4mL,上样至26mm×900mm聚丙烯酰胺葡聚糖S-200Superfine层析柱上,收集分子质量大小为110kDa的组分。使用10%SDS非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定上述产物,仅110kDa处显示有条带,使用非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳在25kDa处显示为单一条带。测定A₂₈₀确定F(ab)₂最终浓度。

[0106] 2) T-2抗体标记HRP

[0107] 参照《精编免疫学实验指南》(JohnE.Coligan,美国,2009)提供的方法。具体的,称取2mg HRP溶于0.5mL水,加入0.2mL新配置的0.06mol/L NaIO₄,再加入0.2mL 0.16mol/L乙二醇,混匀,室温放置30min。取0.5mg T-2对0.1mol/L pH 9.5CBS 4℃透析2h,立即加入上步NaIO₄氧化的HRP溶液225μL,室温避光搅拌2h。加入40μL新配置的2mg/mL NaBH₄,混匀4℃放置2h,将上述液装入透析袋,0.01mol/L pH7.4 PBS透析过夜。

[0108] 3) Fab' 和F(ab)₂包被酶标板后与T-2的配对实验

[0109] 用CBS pH9.6将Fab'、F(ab)₂和T-1完整抗体分别稀释至1μg/mL、1μg/mL和1.36mg/mL使摩尔浓度一致,100μL/孔加入酶标板,每种加3孔,4℃孵育过夜,用PBST(含0.05%吐温-20的PBS缓冲液,pH7.4)洗涤三遍。加入200μL 1%OVA(卵清蛋白)37℃孵育2h封闭酶标板上未反应的位点,用PBST洗涤一遍。每组分别加入100μL 0.01μg/mL、0.1μg/mL和1μg/mL TPO抗原,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL 0.1μg/mL的HRP标记的T-2抗体,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL TMB底物室温孵育10min,加入50μL 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度。

[0110] 4) Fab' 和F(ab)₂包被酶标板后与处于细胞上清中的T-2的配对实验

[0111] 使用新鲜的培养基(80%RPMI1640,20%胎牛血清)培养可分泌T-2抗体的杂交瘤

细胞,两天后收集细胞培养物上清。

[0112] 用CBS pH9.6将Fab'、F(ab)₂和T-1完整抗体分别稀释至1μg/mL、1μg/mL和1.36mg/mL使摩尔浓度一致,100μL/孔加入酶标板,每种加3孔,4℃孵育过夜,用PBST(含0.05%吐温-20的PBS缓冲液,pH7.4)洗涤三遍。加入200μL 1%OVA(卵清蛋白)37℃孵育2h封闭酶标板上未反应的位点,用PBST洗涤一遍。每组分别加入50μL 0.02μg/mL、0.2μg/mL和2μg/mL TPO抗原及50μL细胞培养物上清,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL 0.1μg/mL的HRP标记的羊抗鼠IgG Fc抗体,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL TMB底物室温孵育10min,加入50μL 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度。

[0113] Fab'和F(ab)₂的包被效果

[0114] 将抗TPO抗体T-1及其Fab'和F(ab)₂分别包被酶标板,考察其与T-2抗体的配对情况,夹心法ELISA检测不同浓度的TPO抗原,结果如下表1(T-1及其Fab'和F(ab)₂与T-2配对检测):

[0115] 表1

[0116]		0.01μg/mL	0.1μg/mL	1μg/mL
	Fab'	1.96	2.65	2.74
[0117]	F(ab) ₂	2.98	3.42	3.67
	T-1	3.09	3.64	3.78

[0118] 注:表中数据表示OD₄₅₀,检测本底值(除不加抗原外,其它条件等同)小于0.2。

[0119] 将抗TPO抗体T-1及其Fab'和F(ab)₂分别包被酶标板,使用羊抗鼠IgG Fc抗体作为酶标二抗,考察三种形式的T-1抗体与细胞培养物上清中的T-2抗体的配对情况,夹心法ELISA检测不同浓度的TPO抗原,结果如下表2(T-1及其Fab'和F(ab)₂与细胞上清中的T-2配对检测):

[0120] 表2

[0121]		0.01μg/mL	0.1μg/mL	1μg/mL
	Fab'	1.46	2.33	2.65
	F(ab) ₂	2.45	3.02	3.64
	T-1	3.85	3.79	3.83

[0122] 注:表中数据表示OD₄₅₀,检测本底值(除不加抗原外,其它条件等同)小于0.2。

[0123] 实施例2

[0124] 抗胃泌素-17抗体对的制备

[0125] 胃泌素-17(G17)是一种含17个氨基酸的多肽,对肿瘤及胃病具有重大诊断意义。行业内推崇采用双抗体夹心法检验,然而此分子过小,抗体对的制备难度较高。在前期的研究过程中,本发明的发明人获取了一株与G17亲和力极高的鼠源性单克隆抗体G-1。在本实施例中,将制备G-1的配对抗体(IgG亚型)。

[0126] 1) F(ab)₂的获取

[0127] 参照《精编免疫学实验指南》(John E. Coligan, 美国, 2009)提供的方法使用胃蛋白酶消化。具体地,将2mL 3mg/mL纯化的G-1对200mL乙酸缓冲液(pH4.0)4℃透析4h,重新测定

浓度并用相同pH的乙酸盐缓冲液将浓度调节至2mg/mL。用乙酸盐缓冲液(pH4.0)配制浓度为0.1mg/mL的胃蛋白酶,取1mL加入上述抗体溶液中,使酶/抗体=1:20,37℃反应4h。加入100μL 2mol/L的Tris碱终止反应。将混合液转移至透析袋,对1L pH8.0的PBS于4℃透析。将透析液上样至5mm×100mm蛋白A交联琼脂糖凝胶CL-4B层析柱上,收集未结合的流出液。将流出液浓缩至4mL,上样至26mm×900mm聚丙烯酰胺葡聚糖S-200Superfine层析柱上,收集分子质量大小为110kDa的组分。使用10%SDS非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定上述产物,仅110kDa处显示有条带,使用非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳在25kDa处显示为单一条带。测定A280确定F(ab)₂最终浓度。

[0128] 2) 通过夹心法ELISA筛选可与G-1配对的抗体

[0129] 取一只经G17-KLH免疫成熟的Balb/c小鼠,提前三天腹腔注射300μg G17-KLH偶联物进行冲击。取其脾脏研磨获取淋巴细胞,将淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞sp2/0用PEG1500促融。融合后铺放于20块96孔细胞培养板。37℃,5%CO₂培养七天,更换新鲜的培养基(80% RPMI1640,20%胎牛血清)再培养一天。

[0130] 将G-1的F(ab)₂溶液用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至1μg/mL,每孔100μL/加入20块96孔酶标板,4℃孵育12h,用PBST(含0.05%吐温-20的PBS缓冲液,pH7.4)洗涤三遍。加入200μL 1%OVA(卵清蛋白)37℃孵育2h封闭酶标板上未反应位点,用PBST洗涤一遍。每孔加入50μL 1ng/mL的G17抗原以及50μL细胞培养液,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL 0.1μg/mL的HRP标记羊抗鼠IgG Fc抗体,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL TMB底物室温孵育10min,加入50μL 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度,记为OD₁。将OD₁>1.5的细胞培养物进行下两步检测。

[0131] 3) 通过双抗体夹心法ELISA检测细胞培养物上清中的总抗体相对量

[0132] 将羊抗鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3抗体(互无交叉)的混合物用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至2μg/mL,每孔100μL加入酶标板,4℃孵育12h,用PBST(含0.05%吐温-20的PBS缓冲液,pH7.4)洗涤三遍。加入200μL 1%OVA(卵清蛋白)37℃孵育2h,用PBST洗涤一遍。每孔加入100μL细胞培养液(用PBS稀释10倍),37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL 0.1μg/mL的HRP标记羊抗鼠IgG抗体,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL TMB底物室温孵育10min,加入50μL 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度,记为OD₂。

[0133] 4) 通过间接法ELISA检测细胞培养物上清中的抗体与抗原的结合强度

[0134] 将G17抗原(G17与BSA的偶联物)用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至1μg/mL,每孔100μL加入酶标板,4℃孵育12h,用PBST洗涤三遍。加入200μL 1%OVA(卵清蛋白)37℃孵育2h,用PBST洗涤一遍。每孔加入100μL细胞培养液(用PBS稀释10倍),37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL 0.1μg/mL的HRP标记羊抗鼠IgG抗体,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL TMB底物室温孵育10min,加入50μL 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度,记为OD₃。

[0135] 5) 细胞优选、亚克隆以及目的抗体大量制备

[0136] 将所培养的细胞按单集落孔和多集落孔分成两组,第一组按照OD₁/OD₂由高到低排序,优选前面的十株细胞(依次命名为GS1-GS10)扩大培养。

[0137] 第二组按照OD₁/OD₃由高到低排序,选择前面的二十孔细胞分别进行亚克隆。按照1)和3)的方法对亚克隆的细胞进行检测,选取OD₁/OD₂较高的十株细胞(依次命名为GP1-

GP10) 扩大培养。

[0138] 取一批Balb/c小鼠提前7天腹腔注射500 μ L弗氏不完全佐剂,每只小鼠注射 0.5×10^6 个扩大培养的杂交瘤细胞。饲喂七天后抽取小鼠腹水,通过正辛酸硫酸铵法纯化抗体。

[0139] 6) 抗体对的应用效果

[0140] 选择两种检测体系来评估所获得的抗体对。

[0141] ELISA平台:将G-1 1 μ g/mL包被酶标板,新筛选的抗体标记HRP用PBS稀释至0.1 μ g/mL,通过夹心法检测G17抗原来评估配对效果。

[0142] 具体的,使用实施例1中T2抗体的标记方法将先筛选的抗体标记HRP。将抗体G-1用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至1 μ g/mL,每孔100 μ L加入酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育12h,用PBST洗涤三遍。加入200 μ L 1%OVA 37 $^{\circ}$ C孵育2h,用PBST洗涤一遍。每孔加入50 μ L 0.1ng/mL的G17抗原和50 μ L 0.1 μ g/mL的HRP标记的新制备抗体,37 $^{\circ}$ C孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100 μ L TMB底物室温孵育10min,加入50 μ L 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度。

[0143] CLIA平台:将G-1以1:100的质量比包被磁性微球,新筛选的抗体标记ABEI,通过夹心法检测不同浓度的G17来评估配对效果。

[0144] 具体的,取2mg筛选到的抗体至200 μ L结合缓冲液(0.1mol/L 2-[N-吗啉代]乙烷磺酸,pH4.5),溶解2mg ABEI至500 μ L结合缓冲液,将两者混合;称取10mg EDC(碳化二乙胺)至超纯水中,并立即加100 μ L该溶液到上步的ABEI抗体混合液中,室温孵育2h,将产物对4L PBS 4 $^{\circ}$ C透析8h,至此标记完成。称取1mg G-1抗体和100mg磁性微球于PBS中混匀,40 $^{\circ}$ C孵育2h完成包被过程。加入20 μ gG-1抗体包被的磁性微球至Maglumi 2000全自动生化发光仪的反应杯,再加入100 μ L 0.1ng/mL的G17抗原和100 μ L ABEI标记好的抗体,37 $^{\circ}$ C反应10min,使用清洗液清洗三遍,加入100底物A(NaOH)和底物B(H₂O₂),立即送入测量室测量相对发光强度Rlu。

[0145] 实施例2所获20株抗体与G-1的配对结果

[0146] 通过F(ab)₂及羊抗鼠IgG Fc初步筛选我们得到371孔细胞OD₄₅₀>1.5,其中63孔细胞为单集落(由一个细胞生长分裂形成的单个细胞团),余下308孔细胞为多集落。通过OD₁/OD₂排序从63个单集落孔中优选10株细胞S1-S10;通过OD₁/OD₃排序从278个多集落孔中优选20株细胞,亚克隆后用OD₁/OD₂排序进一步优选10株细胞P1-P10。

[0147] 将G-1用CBS(pH 9.6)稀释至1 μ g/mL取100 μ L包被酶标板,GS1-GS10及GP1-GP10标记HRP以0.1 μ g/mL加入100 μ L,用夹心法ELISA检测100pg/mL G17抗原,结果显示:所有的抗体都与G-1配对良好,除GS7、GS8、GS9和GS10外OD₄₅₀均大于2.5。

[0148] 表3示出了夹心法ELISA评估GS1-GS10、GP1-GP10与G-1的配对情况。

[0149] 表3

[0150]

抗原浓度	GS1	GS2	GS3	GS4	GS5
100 pg/mL	3.29	3.31	3.12	2.71	2.76

	GS6	GS7	GS8	GS9	GS10
100 pg/mL	2.56	2.47	2.25	2.08	2.14
	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5
100 pg/mL	3.43	3.52	3.38	3.34	3.32
	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10
100 pg/mL	3.25	3.02	2.96	2.83	2.91

[0152] 注:表中数据表示OD₄₅₀,检测本底值(除不加抗原外,其它条件等同)小于0.2。

[0153] 将G-1包被Snibe公司生产的磁性微球,GS1-GS10及GP1-GP10标记ABEI,采用新产业Maglumi系统用夹心检测100pg/mL G17抗原,结果显示:GS2、GP1及GP8与G1配对良好,其中GS2及GP1效果最佳。

[0154] 表4示出了夹心法CLIA评估GS1-GS10、GP1-GP10与G-1的配对情况。

[0155] 表4

抗原浓度	GS1	GS2	GS3	GS4	GS5
0pg/mL	809	2430	5240	30907	18973
100pg/mL	43802	1107631	23464	58573	19645
	GS6	GS7	GS8	GS9	GS10
0pg/mL	3972	13451	3451	8512	5634
100pg/mL	8716	22142	5632	14421	6421
	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5
0pg/mL	2871	14512	16752	12133	13763
100pg/mL	1386542	56214	47532	245231	21765
	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10
0pg/mL	8965	5674	3747	16785	1652
100pg/mL	13341	8532	464673	18551	2043

[0157] 注:表示数据表示相对发光强度。

[0158] 实施例3

[0159] 抗叶酸结合蛋白抗体对的制备

[0160] 叶酸结合蛋白(FABP)又称叶酸受体蛋白,对细胞分裂、增殖和声场具有重要作用,一般采用双抗体夹心法检测。我们在前期的工作中获取了一株与FABP具有较高亲和力的抗体F-1,在本实施例中,我们将制备F-1的配对抗体。

[0161] 1) F(ab)₂的获取

[0162] 将2mL 3mg/mL纯化的F-1对200mL乙酸缓冲液(pH4.0)4℃透析4h,重新测定浓度并用相同pH的乙酸盐缓冲液将浓度调节至2mg/mL。用乙酸盐缓冲液(pH4.0)配制浓度为0.1mg/mL的胃蛋白酶,取1mL加入上述抗体溶液中,使酶/抗体=1:20,37℃反应4h。加入100μL2mol/L的Tris碱终止反应。将混合液转移至透析袋,对1L pH8.0的PBS于4℃透析。将透析液上样至5mm×100mm蛋白A交联琼脂糖凝胶CL-4B层析柱上,收集未结合的流出液。将流出液浓缩至4mL,上样至26mm×900mm聚丙烯酰胺葡聚糖S-200Superfine层析柱上,收集分子

质量大小为110kDa的组分。使用10% SDS非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定上述产物,仅110kDa处显示有条带,使用非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳在25kDa处显示为单一条带。测定A280确定F(ab)₂最终浓度。

[0163] 2) 通过夹心法ELISA筛选可与F-1配对的抗体

[0164] 取一只经FABP免疫成熟的Balb/c小鼠,提前三天腹腔注射300μg FABP进行冲击。取其脾脏研磨获取淋巴细胞,将淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞sp2/0用PEG1500促融。融合后铺放于20块96孔细胞培养板。37℃,5%CO₂培养七天,更换新鲜的培养基(80%RPMI1640,20%胎牛血清)再培养一天。

[0165] 将F-1的F(ab)₂溶液用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至1μg/mL,每孔100μL/加入20块96孔酶标板,4℃孵育12h,用PBST(含0.05%吐温-20的PBS缓冲液,pH7.4)洗涤三遍。加入200μL 1%OVA(卵清蛋白)37℃孵育2h封闭酶标板上未反应位点,用PBST洗涤一遍。每孔加入50μL 50ng/mL的FABP抗原以及50μL细胞培养液,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL 0.1μg/mL的HRP标记羊抗鼠IgG Fc抗体,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL TMB底物室温孵育10min,加入50μL 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度,记为OD₁。将OD₁>1.5的细胞培养物进行下两步检测。

[0166] 3) 通过双抗体夹心法ELISA检测细胞培养物上清中的总抗体相对量

[0167] 将羊抗鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3抗体(互无交叉)的混合物用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至2μg/mL,每孔100μL加入酶标板,4℃孵育12h,用PBST(含0.05%吐温-20的PBS缓冲液,pH7.4)洗涤三遍。加入200μL 1%OVA(卵清蛋白)37℃孵育2h,用PBST洗涤一遍。每孔加入100μL细胞培养液(用PBS稀释10倍),37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL 0.1μg/mL的HRP标记羊抗鼠IgG抗体,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL TMB底物室温孵育10min,加入50μL 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度,记为OD₂。

[0168] 4) 通过间接法ELISA检测细胞培养物上清中的抗体与抗原的结合强度

[0169] 将FABP抗原用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至1μg/mL,每孔100μL加入酶标板,4℃孵育12h,用PBST洗涤三遍。加入200μL 1%OVA(卵清蛋白)37℃孵育2h,用PBST洗涤一遍。每孔加入100μL细胞培养液(用PBS稀释10倍),37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL 0.1μg/mL的HRP标记羊抗鼠IgG抗体,37℃孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100μL TMB底物室温孵育10min,加入50μL 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度,记为OD₃。

[0170] 5) 细胞优选、亚克隆以及目的抗体大量制备

[0171] 将所培养的细胞按单集落孔和多集落孔分成两组,第一组按照OD₁/OD₂由高到低排序,优选前面的十株细胞(依次命名为FS1-FS10)扩大培养。

[0172] 第二组按照OD₁/OD₃由高到低排序,选择前面的二十孔细胞分别进行亚克隆。按照1)和3)的方法对亚克隆的细胞进行检测,选取OD₁/OD₂较高的十株细胞(依次命名为FP1-FP10)扩大培养。

[0173] 取一批Balb/c小鼠提前7天腹腔注射500μL弗氏不完全佐剂,每只小鼠注射0.5×10⁶个扩大培养的杂交瘤细胞。饲喂七天后抽取小鼠腹水,通过正辛酸硫酸铵法纯化抗体。

[0174] 6) 抗体对的应用效果

[0175] 我们选择两种检测体系来评估所获得的抗体对。

[0176] ELISA平台:将F-1 1μg/mL包被酶标板,新筛选的抗体标记HRP用PBS稀释至0.1μg/

mL,通过夹心法检测FABP抗原来评估配对效果。

[0177] 具体的,使用实施例1中T2抗体的标记方法将先筛选的抗体标记HRP。将抗体F-1用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至1 μ g/mL,每孔100 μ L加入酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育12h,用PBST洗涤三遍。加入200 μ L 1%OVA 37 $^{\circ}$ C孵育2h,用PBST洗涤一遍。每孔加入50 μ L 50ng/ml的FABP和50 μ L 0.1 μ g/mL的HRP标记的新制备抗体,37 $^{\circ}$ C孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100 μ L TMB底物室温孵育10min,加入50 μ L 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度。

[0178] CLIA平台:将F-1以1:100的质量比包被磁性微球,FS1-FS10及FP-1-FP-10抗体标记ABEI,通过夹心法检测FABP抗原来评估配对效果。

[0179] 具体的,取2mg筛选到的抗体至200 μ L结合缓冲液(0.1mol/L 2-[N-吗啉代]乙烷磺酸,pH4.5),溶解2mg ABEI至500 μ L结合缓冲液,将两者混合;称取10mg EDC(碳化二乙胺)至超纯水中,并立即加100 μ L该溶液到上步的ABEI抗体混合液中,室温孵育2h,将产物对4L PBS 4 $^{\circ}$ C透析8h,至此标记完成。称取1mg F-1抗体和100mg Snibe生产的磁性微球于PBS中混匀,40 $^{\circ}$ C孵育2h完成包被过程。使用Maglumi全自动生化发光仪装载包被F-1抗体的磁性微球至反应杯,加入100 μ L 50ng/ml的FABP和100 μ L ABEI标记好的抗体,37 $^{\circ}$ C反应10min,使用清洗液清洗三遍,加入100底物A(NaOH)和底物B(H₂O₂),立即送入测量室测量相对发光强度Rlu。

[0180] 实施例3所获20株抗体与F-1的配对结果

[0181] 通过F(ab)₂及羊抗鼠IgG Fc初步筛选我们得到480孔细胞OD₄₅₀>1.5,其中72孔细胞为单集落(由一个细胞生长分裂形成的单个细胞团),余下408孔细胞为多集落。通过OD₁/OD₂排序从72个单集落孔中优选10株细胞FS1-FS10;通过OD₁/OD₃排序从408个多集落孔中优选20株细胞,亚克隆后用OD₁/OD₂排序进一步优选10株细胞FP1-FP10。

[0182] 将F-1用CBS(pH 9.6)稀释至1 μ g/mL取100 μ L包被酶标板,FS1-FS10及FP1-FP10标记HRP并用PBS稀释至0.1 μ g/mL,每孔加入100 μ L,用夹心法ELISA检测50ng/mL FABP抗原,结果显示:所有的抗体都与F-1配对良好,除FS8、FS9和FS10外OD₄₅₀均大于2.5。

[0183] 表5示出了夹心法ELISA评估FS1-FS10、FP1-FP10与F-1的配对情况。

[0184] 表5

[0185]

抗原浓度	FS1	FS2	FS3	FS4	FS5
50ng/ml	3.82	3.56	3.11	2.65	2.78
	FS6	FS7	FS8	FS9	FS10
50ng/ml	2.68	2.52	2.32	2.41	2.14
	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5
50ng/ml	3.75	3.82	3.85	3.46	3.65
	FP6	FP7	FP8	FP9	FP10
50ng/ml	3.55	3.46	2.98	3.07	3.11

[0186] 注:表中数据表示OD₄₅₀,检测本底值(除不加抗原外,其它条件等同)小于0.2。

[0187] 将F-1包被Snibe公司生产的磁性微球,FS1-FS10及FP1-FP10标记ABEI,在Maglumi系统中用夹心检测50ng/mL FABP抗原,结果显示:FS-3、FP-1、FP-2、FP-5、FP-7和F-1配对良好,其中FS-3、FP-1及FP-7配对效果最佳。

[0188] 表6示出CLIA平台评估FS1-FS10、FP1-FP10与F-1的配对情况。

[0189] 表6

抗原浓度	FS1	FS2	FS3	FS4	FS5
0 pg/ml	5896	12474	8672	35278	6788
50 ng/ml	173110	214054	1836981	82578	124274
	FS6	FS7	FS8	FS9	FS10
0 pg/ml	8677	12571	8674	6587	5874
50 ng/ml	65814	24157	10254	6438	9375

	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5
0 pg/ml	5387	28797	16975	6837	7854
50 ng/ml	1987752	988725	268774	367784	1355789
	FP6	FP7	FP8	FP9	FP10
0 pg/ml	24875	8074	8982	12745	4387
50 ng/ml	687724	1386489	35047	254774	82449

[0192] 注:表示数据表示相对发光强度。

[0193] 对比例4

[0194] 使用当前常用方法制备FABP抗体对

[0195] 如文献“抗人甲胎蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心ELISA检测技术的建立,孙一帆,中国生物医药技术,2014年8月第9卷第4期”所述抗体对的制备方法,为目前常用策略。

[0196] 1) 获取杂交瘤细胞

[0197] 取一只经FABP免疫成熟的Balb/c小鼠,提前三天腹腔注射300 μ g FABP进行冲击。取其脾脏研磨获取淋巴细胞,将淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞sp2/0用PEG1500促融。融合后铺放于10块96孔细胞培养板。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培养七天,更换新鲜的培养基(80%RPMI1640, 20%胎牛血清)再培养一天。

[0198] 2) 筛选与FABP抗原结合的抗体

[0199] 将FABP用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至1 μ g/mL,每孔100 μ l加入酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育12h,用PBST(含0.05%吐温-20的PBS缓冲液,pH7.4)洗涤三遍。加入200 μ L 1%OVA(卵清蛋白)37 $^{\circ}$ C孵育2h,用PBST洗涤一遍。每孔加入100 μ L上述细胞培养液(用PBS稀释10倍),37 $^{\circ}$ C孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100 μ L0.1 μ g/mL的HRP标记羊抗鼠IgG抗体,37 $^{\circ}$ C孵育1h,用PBST洗涤三遍。加入100 μ LTMB底物室温孵育10min,加入50 μ L 2M H₂SO₄终止反应。测量波长450nm处的吸光度,根据吸光度从高到低选取20孔细胞。

[0200] 3) 筛选配对抗体

[0201] 对二十株细胞进行亚克隆,分离出单个的细胞株后扩大培养。同实施例1获取各株细胞分泌的大量抗体,将所获20株抗体依次命名为FE1-FE20。

[0202] 将FE1-FE20和F-1共21株抗体两两组合(可自身组合),形成441(21 \times 21)种组合。将这些组合的抗体对一株包被酶标板,一株标记HRP,使用夹心法ELISA检测梯FABP抗原,检

测结果呈阳性的细胞 (OD₄₅₀>阴性对照孔±两倍方差, 阴性对照孔为除不加抗原外全部相同)。标记及检测过程同实施例3。

[0203] 4) 抗体对的应用效果

[0204] 将配对成功的抗体对采用CLIA夹心法, 在Snibe公司的Maglumi系统上检测能否继续配对。具体的, 按实施例3的方法将抗体对一株包被Snibe生产的磁性微球, 另一株标记ABEI, 使用Maglumin 2000夹心检测FABP进行评估。

[0205] 对比例所获20株抗体的配对结果

[0206] 通过间接法筛选出1321孔细胞检测呈阳性 (OD₄₅₀>1.5), 从中选择20株结合值较高的细胞进行配对检测。将FE1-FE20及F-1共21株抗体两两配对成441组, 每组抗体一株标记HRP和另一株包被酶标板, 夹心法ELISA检测50ng/ml FABP。配对结果显示, 有62种组合OD₄₅₀>1.5, 其中仅6种组合OD₄₅₀>2.5: FE2/FE12、FE2/FE17、FE5/FE13、FE7/FE14、FE8/FE18和FE10/F-1。

[0207] 表7示出了使用常规方法筛选抗FABP抗体对。

[0208] 表7

[0209]

	FE12	FE13	FE14	FE17	FE18	F-1
FE2	2.84	0.21	0.13	3.01	0.74	0.67
FE5	0.24	2.69	0.29	0.18	0.67	1.67
FE7	0.28	0.67	2.98	0.21	0.32	0.43
FE8	0.11	0.18	0.26	0.19	2.56	0.58
FE10	0.28	0.07	0.18	0.24	0.47	3.12

[0210] 将以上6个抗体对每对分别标记ABEI和包被磁珠, 在Maglumi2000上夹心检测50ng/mL FABP抗原, 结果显示: 仅FE2/FE17存在一定配对, 其余抗体对皆不适用于Maglumi系统。

[0211] 表8示出了CLIA夹心法评估六组抗体对的配对情况。

[0212] 表8

[0213]

	FE2/FE12	FE2/FE17	FE5/FE13	FE7/FE14	FE8/FE18	FE10/F-1
0pg/ml	12841	8941	6874	5681	6624	12571
50ng/ml	26574	541001	12574	9824	8974	35714

[0214] 结果分析

[0215] 从实施例1的表1可看出, 将抗体T-1用酶消化成Fab' 段和F(ab)₂后均可以与T-2继续配对夹心检测TPO抗原, 其中F(ab)₂的配对效果接近完整的抗体。在表2中, T-2抗体存在于细胞培养物上清中, 使用HRP标记的羊抗鼠IgG Fc作为二抗, 若使用完整的T-1作为捕获抗体, 由于T-1及T-2具有相同的Fc段, 二抗与两者皆发生反应, 检测值不随抗原添加量减少而降低, 无法体现真实的配对情况。而使用Fab' 段和F(ab)₂作为捕获抗体, 检测值较高且随抗原添加量减少而降低, 说明T-1的Fab' 段和F(ab)₂皆与细胞培养物上清中的T-2抗体配对良好, 并能被很好的检测。由于F(ab)₂的稳定性较单价的Fab' 好, 故体现了更优的配对效果。综上所述, 使用抗体的Fab' 段和F(ab)₂作为捕获抗体, 可直接从细胞培养物上清中筛选与之配对的抗体。

[0216] 从实施例2和实施例3中可发现, 所筛选的抗体皆能用于夹心法ELISA, 且配对强弱

与筛选时的排序大致相符,说明优选策略较为合理。据表2和表4发现,经过两轮筛选得到的抗体(GP1-GP10和FP1-FP10)配对效果整体优于只经过单轮筛选的抗体(GS1-GS10和FS1-FS10),说明经过 OD_1/OD_3 及 OD_1/OD_2 两轮筛选,配对成功率较 OD_1/OD_2 单轮筛选均有一定提高。

[0217] 实施例3使用一次细胞融合的所有细胞集落(5000-10000)进行夹心法筛选,获得了408孔细胞,经过优选的20株细胞皆可和已有高敏抗体F-1配对应用于夹心法ELISA,其中五株可和F-1配对应用于CLIA夹心法。对比例首先筛选了20株可与抗原结合的抗体,随后将这些抗体大量制备、纯化并标记HRP。通过棋盘法从441种组合中仅筛选出6个抗体对可用于夹心法ELISA,其中1对抗体可用于CLIA夹心法。

[0218] ELISA中抗体包被酶标板的方法为物理吸附,采用的标记物HRP为大分子蛋白,标记抗体时一般采取1:1的摩尔比;而CLIA抗体包被磁珠工艺及抗体标记小分子化合物ABEI的比例等都与ELISA存在较大差异,对抗体本身性质造成的影响也不尽相同。此外,CLIA放大信号的功能远超ELISA,对抗体灵敏度的要求也更高。因此,能应用于ELISA的抗体对仅一小部分适用于CLIA。

[0219] 对比实施例3和对比例,我们发现前者在进行配对筛选时仅需要使用细胞培养物上清中的抗体,而后者需要已制备好的抗体;前者在筛选过程中不需要对抗体进行纯化和标记,后者必须使用纯化的抗体并标记HRP;同样得出20株抗体,前者全部可与已有的高敏抗体配对,而后者仅获得6个抗体对,其中只有一株可与已有的高敏抗体配对;前者获取了五对可用于CLIA夹心法的抗体对,后者仅获取1对,且配对效果不如前者。

[0220] 从以上的描述中,可以看出,本发明上述的实施例实现了如下技术效果:

[0221] 1)可直接以细胞培养物上清进行配对检测,极大的扩充了备检抗体的来源,筛选过程无需标记及纯化;

[0222] 2)在初次筛选获得过多抗体时,建立了有效的评估体系进一步优选,节约人力的同时使成功率大为增加。

[0223] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

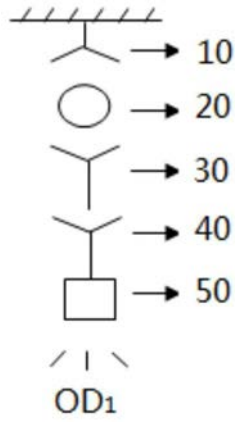


图1

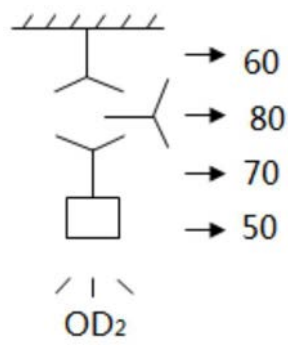


图2

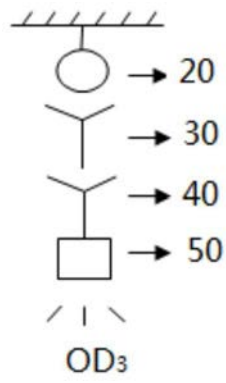


图3