



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1641353 B

(45) 授权公告日 2012.06.06

-
- (21) 申请号 200410103370.4 第 26 行 .
US 5987275 A, 1995.09.29, 全文 .
(22) 申请日 2004.11.12 US 5228960 , 1999.09.07, 全文 .
(30) 优先权数据
0313246 2003.11.12 FR 审查员 奚静
(73) 专利权人 莎碧亚公司
地址 法国利塞斯
(72) 发明人 弗雷德里克·罗贝尔
雷吉斯·安德烈
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 李华英
(51) Int. Cl.
G01N 33/561 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 27/447 (2006.01)
(56) 对比文件
US 5948231 A, 1999.09.07, 全文 .
US 5567282 A, 1996.10.22, 权利要求 1-25,
第 7 栏第 18 行-43 行, 第 11 栏第 33 行-第 12 栏

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 35 页

(54) 发明名称

通过毛细管电泳和免疫位移对单克隆蛋白进行分析 and 分型

(57) 摘要

通过毛细管电泳和免疫位移对单克隆蛋白进行分析 and 分型本发明涉及对生物样品进行毛细管电泳分析的方法, 包括采用带有超额负电荷的修饰抗体, 当在电泳过程中分离生物样品中的蛋白质时, 所述修饰抗体可以迁移至所述蛋白质的迁移区域之外的区域, 所述抗体具有针对预定靶蛋白的抗原特异性。

1. 一种对生物样品进行毛细管电泳分析的方法,包括采用带有超额负电荷的修饰抗体,以使当生物样品中球蛋白在电泳过程中被分离时,所述修饰抗体迁移至位于生物样品中球蛋白的迁移区域之外的区域,所述抗体具有针对预定靶蛋白的抗原特异性并且通过 i) 在 EDCI (1-(3-二甲基氨丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐) 存在下与苯六甲酸反应或 (ii) 与包括至少一个羧酸官能团的酞反应来获得。

2. 如权利要求 1 所述的对生物样品进行毛细管电泳分析的方法,包括以下步骤:

a) 在带有超额负电荷的修饰抗体存在的情况下,通过毛细管电泳分离生物样品的第一等分试样的组分,所述修饰抗体具有确定的抗原特异性,其可以与可能存在于生物样品中的单克隆蛋白质形成抗原抗体复合物,并检测所述生物样品中的经分离的组分;

b) 将步骤 a) 中获得的电泳图谱,与在不存在所述具有预定抗原特异性的带有超额负电荷的修饰抗体时对同一样品的另一等分试样的组分进行毛细管电泳分离得到的电泳图谱进行比较。

3. 如权利要求 1 或 2 的方法,其中采用带有超额负电荷的修饰抗体形成一组具有不同抗原特异性的抗体,与生物样品的同一等分试样接触,通过毛细管电泳分离所述样品的组分。

4. 如权利要求 2 所述的对生物样品进行毛细管电泳分析的方法,其中将生物样品至少分为 2 个等分试样,在通过电泳分离所述生物样品的组分之前,包括以下步骤:

1) 将包含带有超额负电荷的修饰抗体的介质在温育条件下与生物样品的一个等分试样接触,从而当生物样品中存在被所述抗体特异识别的靶蛋白时,所述抗体与所述靶蛋白发生免疫反应,所述修饰抗体具有确定的抗原特异性,并将生物样品的另一等分试样与所述介质接触,但是所述介质中不含有修饰抗体;

2) 将步骤 1) 中温育的生物样品的等分试样注入电泳毛细管中。

5. 如权利要求 3 所述的对生物样品进行毛细管电泳分析的方法,其中将生物样品至少分为 2 个等分试样,在通过电泳分离所述生物样品的组分之前,包括以下步骤:

1) 将包含带有超额负电荷的修饰抗体的介质在温育条件下与生物样品的一个等分试样接触,从而当生物样品中存在被所述抗体特异识别的靶蛋白时,所述抗体与所述靶蛋白发生免疫反应,所述修饰抗体具有确定的抗原特异性,并将生物样品的另一等分试样与所述介质接触,但是所述介质中不含有修饰抗体;

2) 将步骤 1) 中温育的生物样品的等分试样注入电泳毛细管中。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的对生物样品进行毛细管电泳分析的方法,其中在通过电泳分离所述生物样品的组分之前,包括以下步骤:

1) 将包含带有超额负电荷的修饰抗体的介质注入电泳毛细管中,所述修饰抗体具有确定的抗原特异性,并将不含所述修饰抗体的所述介质注入另一电泳毛细管中;

2) 在一定条件下将生物样品注入按照步骤 1) 处理的电泳毛细管中,所述条件是当生物样品中存在一种靶蛋白或多种靶蛋白时,使所述抗体和靶蛋白发生免疫反应。

7. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,其中当带有超额负电荷的修饰抗体组包括具有不同预定特异性的 n 种类型抗体时,所述生物样品至少被分为 $n+1$ 个等分试样。

8. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,其特征在于,所述抗体选自抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗 κ 和抗 λ 抗体。

9. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,其特征在于,所采用的抗体为抗 IgG 抗体、抗 IgA 抗体、抗 IgM 抗体、抗- κ 抗体和抗- λ 抗体。

10. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,其特征在于,所述带有超额负电荷的修饰抗体为抗体与包括至少一个羧酸官能团的酞的反应产物。

11. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,其特征在于,所述带有超额负电荷的修饰抗体相对于其识别的存在于生物样品中的靶蛋白是过量的。

12. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述带有超额负电荷的修饰抗体为与 1,2,4- 苯三羧酸酞的反应产物。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述带有超额负电荷的修饰抗体为抗体与包括至少一个羧酸官能团的酞的反应产物,所述反应包括将酞即时溶解于二甲基甲酰胺 (DMF) 中,使溶解的酞与溶液中的抗体相接触,从而使酞与抗体反应,所述反应在 37°C 进行,条件是使负电荷移至所述抗体。

14. 如权利要求 1 的方法,其中所述带有超额负电荷的修饰抗体是在 EDCI (1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳化二亚胺盐酸盐) 存在下使抗体与苯六甲酸反应的产物。

15. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,其中毛细管电泳在 pH 为 9 至 11 的碱性缓冲液中进行,所述缓冲液包括缓冲化合物以及至少一种可以增加所述缓冲液的离子强度的添加剂。

16. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,其中所述生物样品选自血浆、尿或脑脊液样品。

17. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,其中所述生物样品为血清样品。

18. 如权利要求 1、2、4 或 5 任一所述的方法,用于对生物样品中的单克隆蛋白质 (Mc 蛋白质) 进行毛细管电泳分析。

19. 一种对生物样品中的称为 Mc 蛋白质的单克隆蛋白质进行研究和分型的方法,包括对生物样品的不同等分试样进行根据权利要求 1 至 18 任一所述的毛细管电泳分析,每个等分试样与分别选自抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗- κ 和抗- λ 免疫球蛋白的抗体接触,所述抗体经修饰带有负电荷。

20. 一种通过毛细管电泳对生物样品中的单克隆蛋白质进行研究和分型的方法,其中使用了通过 (i) 在 EDCI (1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳化二亚胺盐酸盐) 存在下与苯六甲酸反应或 (ii) 与包括至少一个羧酸官能团的酞反应而获得的带有超额负电荷的修饰抗体,并且其中在生物样品中的蛋白电泳图谱中,通过免疫扣除对应于 Mc 蛋白质的峰,检测生物样品中所述 Mc 蛋白质的存在,所述带有超额负电荷的修饰抗体与 Mc 蛋白质之间形成的复合物的迁移位于生物样品中球蛋白的电泳图谱之外。

21. 一种制备带有超额负电荷的修饰抗体的方法,包括以下步骤:

●将包含至少一个羧酸官能团的酞即时溶解于二甲基甲酰胺 (DMF) 中;

●在一定条件下将抗体与溶解的酞接触,所述条件使酞和抗体反应生成在碱性 pH 下带有超额负电荷的修饰抗体。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述酞为苯三羧酸酞。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的方法,其中所述酞即时溶解于纯 DMF 中。

24. 带有超额负电荷的修饰抗体,其特征在于,将酸官能团移至所述抗体上,使所述

抗体具有以下能力,其电泳迁移至在相同毛细管电泳分离条件下分离出的 IgG、IgA、IgM、IgE 和 IgD 型免疫球蛋白的迁移图谱之外;通过所述抗体 (i) 在 EDCI (1-(3- 二甲基氨丙基)-3- 乙基碳化二亚胺盐酸盐) 存在下与苯六甲酸反应或 (ii) 与包括至少一个羧酸官能团的酞反应而使所述酸官能团移至所述抗体。

25. 如权利要求 24 所述的带有超额负电荷的修饰抗体,其通过实施如权利要求 21 至 23 任一所述的方法而获得。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的带有超额负电荷的修饰抗体,所述抗体选自抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗- κ 、抗- λ 、抗-游离 κ 、抗-游离 λ 免疫球蛋白。

27. 如权利要求 24 或 25 所述的带有超额负电荷的修饰抗体,以五价抗血清的形式混合,其含有所述带有超额负电荷的经修饰的抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗- κ 和抗- λ 抗体,或以三价抗血清的形式混合,其含有所述带有超额负电荷的抗 IgG、抗 IgA 和抗 IgM 抗体。

28. 如权利要求 24 所述的带有超额负电荷的修饰抗体,其特征在于它们为多克隆抗体。

29. 一种对生物样品中的单克隆蛋白质进行检测和分型的试剂盒,包括如权利要求 24 至 28 任一所述的带有超额负电荷的修饰抗体,以及适当的稀释剂。

30. 如权利要求 24 至 28 任一所述抗体的应用,用于通过毛细管电泳和免疫位移检测生物样品中存在的 Mc 蛋白质。

31. 如权利要求 24 至 26 和 28 任一所述抗体的应用,用于对生物样品中存在的 Mc 蛋白质进行分型。

通过毛细管电泳和免疫位移对单克隆蛋白进行分析和分型

[0001] 本发明涉及通过毛细管电泳和免疫位移分析生物样品的领域。

[0002] 本发明特别涉及通过毛细管电泳分析生物样品的方法,其中用免疫技术对样品进行处理,从而对样品的组分进行电泳分离。在本发明中,术语“免疫扣除”是指抑制特定蛋白在电泳图谱中的峰,其是由于所述蛋白的峰发生免疫位移导致,即位移至图谱中的另一位置。

[0003] 尤其是,本发明涉及可以用于诊断过程的方法,特别涉及对生物样品中的蛋白进行研究和分型,其能证明存在有单克隆疾病,也就是公知的单克隆丙种球蛋白血症 (gamma pathies) 或异型蛋白血症。

[0004] B 淋巴细胞的正常发育使得在成熟 B 淋巴细胞的表面产生开始时具有相同的同种型的同种型 M 和 G 免疫球蛋白。在单克隆疾病初期的浆细胞疾病是由于当表面免疫球蛋白暴露于特定抗原后对发展至抗体分泌细胞的细胞成熟过程的控制存在缺陷。在这种情况下,当抗原消失时,继续分泌对宿主所暴露的抗原具有亲合力的免疫球蛋白。通常,特定种属的免疫球蛋白分为不同类型的抗体,每种类型用一种同种型确定,在该种属内所确定的不同同种型是该种属的所有正常个体所共有的。免疫球蛋白通常由重链 (2 个重链) 和轻链 (2 个轻链) 构成。已经在具有四个链的结构中确认了五种重链同种型 (M, G, A, D, E) 和两种轻链同种型 (κ 和 λ)。除了这些同种型之外,免疫球蛋白还通过决定子表征,所述决定子对应于给定种属的个体之间的差异,称为同种异型,还可以通过它们的个体基因型表征,其对应于免疫球蛋白分子与抗原结合的部分。这样,所述个体基因型表示了由特定的产生抗体的细胞系所生成的分子的特征。

[0005] 因此,浆细胞疾病的特征是特定免疫球蛋白或特定免疫球蛋白链的改变,检测和表征所述改变具有非常重要的临床意义。

[0006] 生物样品的电泳分析允许对丝胶 (seric) 蛋白质进行鉴别,并确定这些蛋白质的量,尤其是免疫球蛋白的量。在电场中,蛋白质的迁移是其大小和电荷的函数,形成包括一系列峰 (也称为级分) 的电泳图谱,每个峰对应一个或多个蛋白质。 γ 级分特别是由免疫球蛋白形成的,主要是 G 型免疫球蛋白。在患有分泌单克隆蛋白质 (也称为“Mc 蛋白质”) 的浆细胞疾病的患者中,对应于一种已知同种型的免疫球蛋白的量可以显著高于正常的量,其导致了从血清样品分离出的一个或多个蛋白质峰发生改变,从而使电泳图谱发生改变。

[0007] 当研究浆细胞疾病以及监测患有异型蛋白血症的患者时,检测单克隆蛋白质特别是检测特定免疫球蛋白同种型生成量的增加具有重大意义。例如,人们已经观察到,根据特定病例特别是在肿瘤发展中,丝胶 Mc 蛋白质的量与疾病的发展直接相关。因此,Mc 蛋白质可以作为肿瘤标记物,当与其它症状相联系时,在诊断时可以考虑 Mc 蛋白质。

[0008] 浆细胞疾病不仅与 Mc 蛋白质的异常生成有关;与 Mc 蛋白质的生成有关的疾病包括淋巴瘤,例如慢性淋巴性白血病或 B 或 T 淋巴细胞系的淋巴瘤,某些非淋巴细胞的增殖,例如慢性髓细胞性白血病,以及乳腺癌或结肠癌。

[0009] 单克隆 Mc 蛋白质还可以在特定的非恶性疾病中生成,例如肝硬变 (cyrrhosis)、

伯克氏肉样瘤、寄生虫病或 Gaucher 病。单克隆蛋白质的生成还可以在自身免疫性疾病中检测出,例如类风湿多发性关节炎、肌无力或冷凝集素病。

[0010] 由于能够检测出生物样品中单克隆蛋白质的存在以及能够发现随着时间被检测的单克隆蛋白质的变化,琼脂糖凝胶以及毛细管电泳成为进行诊断或监测患者的可选择方法。

[0011] 根据有关的疾病,Mc 蛋白质具有不同的性质,由完整的抗体分子或抗体片段构成。这样,可以单独生成重链或轻链。例如在患有骨髓瘤的患者尿中分泌的本斯·琼斯氏蛋白仅仅为轻链形式。

[0012] 确定免疫球蛋白的同种型使得 Mc 蛋白质作为其重链性质的函数和 / 或轻链性质的函数而进行分型。对免疫球蛋白进行分型的技术可以确定生物样品中每个单克隆蛋白质相关的重链和 / 或轻链类型。

[0013] 除了检测所述 Mc 蛋白质之外,对所述蛋白质进行分型从而对与其相关的疾病进行表征也是非常重要的。为了达到该目的,已经提出了不同的方法,例如柱色谱、琼脂糖凝胶电泳或毛细管电泳。在采用琼脂糖凝胶电泳的方法中,来自生物样品的蛋白通过电泳以电泳图谱的形式进行分离,在所述图谱中,蛋白质特别是球蛋白以峰或带的形式显示,其中可以包括单克隆蛋白质,单克隆蛋白质的性质例如通过免疫固定于琼脂糖凝胶上来确定。所述方法包括两个步骤,即琼脂糖凝胶电泳和免疫沉淀。将相同生物样品的几个等分试样平行沉积于琼脂糖凝胶上,然后施加电场以分离蛋白尤其是免疫球蛋白。每个泳道用对所研究的免疫球蛋白 (IgG、IgA、IgM, κ 和 λ , 可以是游离 κ , 游离 λ , IgD 以及 IgE) 具有特异性的抗体类型进行温育,从而在样品的免疫球蛋白和抗体之间形成免疫复合物。洗净凝胶以去除未沉淀的蛋白之后,进行染色,其显示了免疫复合物的位置:当不存在单克隆蛋白质时,只显示被染色的扩散背景(对应于构成“多克隆背景”的多个单克隆蛋白质);当存在单克隆蛋白质时,在凝胶的特定区域显示染色带。采用参照泳道(没有抗血清),就可以对凝胶上可见的每个单克隆带进行分型。

[0014] 在毛细管电泳中采用的一种分型技术是免疫扣除,如美国专利 US-A-5228960 中所述。所述技术包括用特定抗体对生物样品的等分试样进行温育,所述特定抗体可以从所述样品中扣除特定组分(例如免疫球蛋白)。所述组分吸附于其上固定有抗体的固相:从而其不再存在于通过毛细管电泳进行分析的样品中。然后将经处理的不同等分试样(其中根据所使用的抗体的特异性除去了特定的免疫球蛋白)注入毛细管中,在毛细管的端部施加电场从而分离出等分试样中含有的蛋白质。所获得的图谱与未处理的等分试样的图谱进行比较。

[0015] 人们还提出了其它对通过毛细管电泳从样品中分离出的单克隆蛋白质进行鉴别的技术,例如欧洲专利 EP-B1-0690988。该欧洲专利描述了毛细管电泳分离与免疫扣除步骤的结合,其目的是有利于 Mc 蛋白质的分类。在该专利中,免疫扣除在“毛细管上”进行,其采用的方法包括将样品的第一部分通过电泳分离成不同的组分,检测这些组分,然后混合所述样品的第二部分和至少一个配对物质,所述配对物质能够特异结合样品中含有的预定分析物,应该理解,所述用于结合的特定配对物质的电泳迁移率不同于所述分析物。所述样品的第二部分通过毛细管电泳被分离成不同的组分,检测这些组分。然后对所分离出的组分与在不存在结合所需要的分析物的特定配对物质而得到的组分进行比较。

[0016] EP-B1-0690988 描述了用于结合分析物的配对物质为经修饰的分子,尤其是抗 Mc 蛋白质的抗体,其经过了化学修饰,从而其在毛细管电泳中的迁移时间使其位于电泳图谱中的 γ 区域之外。所提出的对抗体进行的一种化学修饰是使抗体与琥珀酸酐反应使其具有额外的羧基官能团,其在碱性 pH 条件下带负电荷。在所描述的分析条件下 (pH10),所述抗体的总负电荷增加了。

[0017] 在研究“真正”生物样品例如血清中的单克隆蛋白质时,EP-B1-0690988 中描述的对抗体进行修饰的条件以及所报道的试验结果仅仅涉及经纯化的 G 型免疫球蛋白的分析和分离,而不是血清分析,从而对所述方法的恰当性提出了怀疑。

[0018] 因此,本发明提出了另一种可以有效用于生物样品的方法,其结合了对生物样品的组分进行分离的毛细管电泳和对可能存在于待分析生物样品中的 Mc 蛋白质进行分型的免疫扣除。

[0019] 本发明的方法的一个优势在于,当 Mc 蛋白质存在于生物样品中并经毛细管电泳分离时,所述方法允许对应于 Mc 蛋白质的电泳峰发生位移,其位于相应于样品中蛋白质的迁移图谱的区带之外,特别是位于球蛋白迁移区带之外。所述位移将代表经分离的 Mc 蛋白质的峰从所述蛋白质的在迁移步骤结束时的预期位置中扣除,而不干扰样品中其它蛋白质的分离。与 US-A-5228960 中所述的方法相反,所述被抗体识别的单克隆蛋白质存在于被注入而进行毛细管电泳的样品中。由于所述蛋白质从其初始位置发生了位移,仅仅将其从图谱中扣除。因此,所述方法可以对分析结果进行可靠地读取,消除了任何可能的在对应于样品中分离蛋白的相邻峰之间的混淆。

[0020] 本发明还涉及抗体,将所述抗体的特定化学官能团与修饰剂反应从而使所述抗体经化学修饰,使其具有额外的在碱性 pH 下带负电荷的化学官能团(例如羧基官能团):每个经修饰的化学官能团使抗体具有一个和多个额外的负电荷。这些抗体用于特定的对应于生物样品中 Mc 蛋白质的峰的免疫扣除/免疫位移。

[0021] 与在碱性 pH 值时已经带有负电荷的起始抗体相比,在本发明中制备的抗体在碱性 pH 值时具有额外的负电荷,这是由于其获得了例如另外的羧酸功能官能团。因此,这些抗体在下文被称为“带有超额负电荷的修饰抗体”或“修饰抗体”。

[0022] 本发明还涉及通过毛细管电泳将蛋白质从生物样品中分离出来并用免疫扣除进行检测的试剂盒,因而从可能包含在测试生物样品中的单克隆蛋白质中对这些蛋白质进行确认,如果合适,还对它们进行定量。

[0023] 本发明还涉及一种制备化学修饰抗体的方法,在可以将所述抗体用于免疫扣除的条件下,使这些抗体移植有额外的电荷,所述电荷在碱性 pH 下为负电荷(带有超额负电荷的修饰抗体)。

[0024] 因此,本发明涉及一种对生物样品进行毛细管电泳分析的方法,包括采用带有超额负电荷的修饰抗体,所述抗体迁移至生物样品中的蛋白质在电泳期间进行分离的迁移区域之外,所述抗体对预定的单克隆蛋白质具有抗原特异性。

[0025] 当在充满电解液的毛细管中分离生物样品中的蛋白质时,在电场的影响下,蛋白质发生迁移:在从阳极向阴极的迁移中携带所述蛋白质。由于蛋白质之间在电泳流量(与蛋白质上的电荷有关)和电渗流量(与毛细管内表面上的电荷有关)存在差异,使得待检测的蛋白质被分离出来。

[0026] 从而注入毛细管的样品中的蛋白质确定了一电泳迁移图谱,其可以分为对应于 γ (离阴极最近)、 β -2、 β -1、 α -2、 α -1 以及白蛋白区域 (后一区域离阳极最近) 的多个区域,如本申请说明书的附图所示。生物样品中所含的免疫球蛋白,包括 Mc 蛋白质,从区域 α -1 迁移至区域 γ 。

[0027] 为了对生物样品中含有的单克隆蛋白质进行电泳分离并采用免疫扣除反应对它们进行可靠的分型,本发明人设计出了进行免疫扣除的条件,其使得对应于单克隆蛋白质的峰从样品蛋白的迁移图谱 (特别是球蛋白的迁移图谱) 中扣除,并使单克隆蛋白质的峰迁移至位于 γ 区域和 α -1 区域之间的区域之外。

[0028] 更精确地,样品中待研究的单克隆蛋白质并不从分析介质中去除,而是在所述蛋白与带有超额负电荷的修饰抗体的结合的影响下发生位移,所述抗体特异性识别所述单克隆蛋白质,其条件是,所述单克隆蛋白质和所述修饰抗体形成的复合物位移至样品中球蛋白 (球蛋白对应于电泳图谱上的 γ , β -2, β -1, α -2, α -1 电泳级分) 的迁移图谱之外。

[0029] 更精确地,所述复合物 (Mc 蛋白质 - 在碱性 pH 下带负电荷的抗体) 在电泳迁移之后位于经分离的蛋白图谱的最靠阳极区。

[0030] 从而,可以在经分离的免疫球蛋白的图谱之外看见所述修饰抗体 - Mc 蛋白质复合物,尤其是,所述复合物与 γ 区域分隔开,朝向白蛋白,在靠近白蛋白和 α -1 处可能看见,其不干扰对阳极单克隆蛋白质 (即,迁移至 α -1/ α -2) 的任意检测,这是由于所述复合物的迁移率位于单克隆蛋白质和修饰抗体的迁移率之间。

[0031] 原则上,提供过量的所述经修饰抗体用于反应,未反应的抗体部分可以在朝向阳极方向上看见,超过对应于白蛋白的峰 (即其迁移比白蛋白更靠阳极)。

[0032] 本发明的第一个对生物样品进行毛细管电泳分离和免疫扣除的方法包括以下步骤:

[0033] a) 在带有超额负电荷的修饰抗体的存在下,用毛细管电泳分离生物样品的第一等分试样的组分,然后检测生物样品中的经分离的组分,所述修饰抗体具有确定的抗原特异性并可以与可能存在于生物样品中的单克隆蛋白质形成抗原抗体复合物;

[0034] b) 比较步骤 a) 中得到的电泳图谱和在不存在所述具有确定抗原特异性的带有超额负电荷的修饰抗体时通过毛细管电泳对同一样品的另一等分试样的组分进行分离而得到的电泳图谱。

[0035] 可以观察到,生物样品通常包括免疫球蛋白的多克隆组分,构成了位于 (或靠近) 电泳图谱中 γ 区域的“多克隆背景”。在进行适于分离 Mc 蛋白质的毛细管电泳的条件下,所述多克隆免疫球蛋白的峰比 Mc 免疫球蛋白的峰宽 (这是因为,它们含有大量的具有相似迁移率的免疫球蛋白);根据组成免疫球蛋白的类型 (G, A, M, κ 和 λ),当样品与带有超额负电荷的修饰抗体接触时,所述多克隆背景将减小。在此情况下,相对于宽的多克隆峰,可以标记出聚集的待检测 Mc 峰,从而区别出单克隆峰和多克隆背景。

[0036] 在本发明的优选实施例中,给定生物样品的等分试样平行地与不同的抗体接触,所述不同抗体形成一组带超额负电荷的修饰抗体,在所述组中,每个抗体类型具有针对一种免疫球蛋白同种型的特定抗原特异性。

[0037] 因此,其可以平行地用具有不同特异性的修饰抗体对同样的生物样品进行分析,其中所述被选择的抗体的抗原特异性为可被所述抗体识别的被研究的单克隆蛋白质的函

数,也是平行位于电泳装置上的毛细管数量的函数。

[0038] 根据本发明的另一特定实施例,在上述其中一个方法中,在通过电泳分离生物样品的组分之前,生物样品被分为至少两个等分,所述方法包括以下步骤:

[0039] 1) 将含有带超额负电荷的修饰抗体的介质在温育条件下与生物样品的一个等分试样接触,所述修饰抗体具有确定的抗原特异性,所述温育条件使得所述抗体与当存在于生物样品中被所述抗体特异识别的靶蛋白之间发生免疫反应,将生物样品的另一等分试样与所述介质接触,但是所述介质中不含有修饰抗体;

[0040] 2) 将步骤 1) 中温育的生物样品的等分试样注入电泳毛细管中。

[0041] 在本发明的另一特定实施例中,在通过电泳分离生物样品的组分之前,所述毛细管电泳分析方法包括以下步骤:

[0042] 1) 将含有带超额负电荷的修饰抗体的介质注入电泳毛细管中,所述抗体具有确定的抗原特异性,并将不含有所述修饰抗体的介质注入另一电泳毛细管中;

[0043] 2) 在允许所述抗体与当存在于生物样品中的靶蛋白之间发生免疫反应条件下,将生物样品注入经步骤 1) 处理的电泳毛细管中。

[0044] 为了分析生物样品,当带有超额负电荷的修饰抗体包括 n 种具有不同预定特异性的抗体时,将所述生物样品至少分为 $n+1$ 个等分试样。

[0045] 用于制备带超额负电荷的修饰抗体的抗体为选自抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗 IgE、抗 IgD、抗 κ 、抗 λ 、游离抗 κ 和游离抗 λ 的免疫球蛋白。

[0046] 优选地,所述抗体选自抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗 κ 和抗 λ 抗体。在本发明的特定实施例中,采用了包括 5 种上述抗体的抗体组。在本发明的另一实施例中,使用了包括全部或部分这些抗体的混合物,例如 5 种抗体(五价抗血清)的混合物或 3 种抗体(三价抗血清)的混合物,例如含有抗 IgG、IgA、IgM 重链的抗体。

[0047] 本发明方法的实施例还可以局限于仅仅使用上述抗体的一部分。

[0048] 为了得到可用于本发明的带有超额负电荷的修饰抗体,具有选定抗原特异性的抗体与在碱性 pH 下提供额外负电荷的化合物反应,例如带有负电荷的酞。例如,抗体的胺官能团可以与酞反应,从而对于每个经修饰的胺基在抗体上生成一个额外的羧酸官能团(以及由此在碱性 pH 条件下带有额外的负电荷)。

[0049] 为了生成所述带超额负电荷的修饰抗体,所采用的酞有利地是苯三羧酸酞。所述酞为每个经修饰的胺基提供两个羧酸官能团(以及由此在碱性 pH 条件下带有两个额外的负电荷):第一个官能团是由于酞与胺基反应;第二个官能团是由于其结构。由于所述酞带有至少一个羧酸官能团,其在碱性 pH 下带有负电荷,因此,本发明的酞称为带负电荷的酞。

[0050] 通过抗体与带负电荷的酞反应可以获得经足够修饰的抗体,即在碱性 pH 下带有足够负电荷,将酞特别是苯三羧酸酞即时溶解于二甲基甲酰胺(DMF),使溶解的酞与溶液中的抗体接触,使抗体带有负电荷,所述反应在 37°C 下进行,其条件是使羧酸官能团移至抗体上。

[0051] 如果将 DMF 中的酞溶液与抗体接触,在可能的最后关头得到具有额外羧酸官能团的抗体(以及由此在碱性 pH 条件下带有额外的负电荷)并防止酞被抗体溶液中的水改变,这样可以更高的效率将酞移至抗体上。

[0052] 以下将详细描述制备修饰抗体的方法。

[0053] 为了在抗体上提供额外的羧酸官能团（以及由此在碱性 pH 条件下带有额外的负电荷），可以采用羧酸（在碱性 pH 条件下提供负电荷）与耦合剂，例如 EDCI（1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐）联合。例如，可以使用苯六甲酸，其在 EDCI 存在下与抗体的胺基反应。

[0054] 当生物样品中存在修饰抗体所识别的靶蛋白质时，相对于所述靶蛋白质来说，在本发明的毛细管电泳分析中采用的修饰抗体通常是过量的。

[0055] 所述过量不仅可以使蛋白质图谱中靶 Mc 蛋白质完全消失，而且还可以使修饰抗体-Mc 蛋白质复合物在图谱上具有最优化的位置：具有预定抗原特异性的修饰抗体和样品中所述抗体识别的靶蛋白的比率过低则不能完全扣除 Mc 峰，而且与所述比率较高的情况相比，所述复合物的迁移将更加靠近阴极。

[0056] 在本发明的特定实施例中，在免疫扣除中采用的具有特异性的带负电荷的抗体的浓度为大约 10g/l。

[0057] 本发明还涉及带有超额负电荷的修饰抗体，所述修饰抗体是抗体与携带至少两个羧酸官能团的酞的反应产物，优选地，所述酞为 1,2,4-苯三羧酸酞。

[0058] 因此，在所述毛细管电泳和免疫扣除分析方法中使用的抗体优选为抗体与带有负电荷的酞的反应产物，所述反应包括将酞即时溶解于二甲基甲酰胺（DMF），使溶解的酞与溶液中的抗体接触，使酞与抗体反应，所述反应在 37°C 下进行，其条件是使额外的化学官能团移至所述抗体上，尤其是位于碱性 pH 的羧酸官能团。

[0059] 所述分析生物样品的方法可以用于不同类型的生物样品中，例如血清、血浆、尿或脑脊液样品中。

[0060] 根据所使用的生物样品的性质和 / 或其来源（即根据患者的病史），对电泳分离的结果的解释应考虑可能发生在带有超额负电荷的修饰抗体和样品中蛋白质之间的干扰。本领域技术人员可以观察到所述干扰并对其进行分析，在来自用抗凝化合物进行治疗的一些患者的含有纤维蛋白原的样品即血浆或血清样品中已经观察到了所述干扰。本发明人发现，纤维蛋白原可以与本发明的带有超额负电荷的修饰抗体在非特异性反应中反应（即不是抗原抗体类型的反应）。在此情况下，当存在纤维蛋白原时，其在电泳图谱中表现为在区域 β 和 γ 之间具有一个峰，当用本发明的带有超额负电荷的修饰抗体处理样品之后，所述峰从其正常的迁移区带发生移动，所述移动与所使用的带有超额负电荷的修饰抗体的特异性无关。换言之，标志着样品中纤维蛋白原存在的峰只在对照电泳图谱（ELP）中显示，而在与带有超额负电荷的修饰抗体发生免疫反应的蛋白图谱中消失（免疫位移至所述图谱之外的区域）。

[0061] 以液体模式进行毛细管电泳的条件是通常本领域技术人员采用的用于以下步骤的条件：将样品注入毛细管中，在电渗电流的影响下通过电泳迁移从样品中分离出组分。所述步骤包括采用电泳缓冲液，例如国际专利申请 WO-A-02/057736 和 WO-A-02/057737 中所描述的缓冲液，应这样理解，所述电泳缓冲液的选择允许以峰的形式对 Mc 蛋白质进行分离。进行毛细管电泳的条件是例如 Capillarys (SEBIA) 自动仪所采用的条件，包括 SEBIA 出售的缓冲液，其商品名为 CAPILLARYS B1B2+，Capillarys Protein(e)6 和 CAPILLARYS Protein(e)5。

[0062] 例如，用于电泳迁移的分析缓冲液较为有利的是 pH 为 9 至 11 的碱性缓冲液，优选

为 10 左右,特别是包括缓冲化合物和至少一个可以增加所述分析缓冲液离子强度的添加剂。

[0063] 在化学修饰对用于免疫扣除步骤的抗体的迁移率的影响下,上述毛细管电泳分析方法可以对电泳分离步骤中单克隆蛋白质和样品中蛋白组分的共同迁移而得到的结果进行矫正。本发明的方法可以避免单克隆蛋白质与构成生物样品的其它蛋白之间的干扰,所述单克隆蛋白质被带有超额负电荷的抗体识别。所述对生物样品中单克隆蛋白质进行可靠检测的重要优势来自这样一个事实,Mc 蛋白质-修饰抗体复合物迁移在球蛋白之后,从而可以对被带有超额负电荷的抗体识别的 Mc 蛋白质进行分型,而不考虑电泳迁移中所述单克隆蛋白质的位置。

[0064] 对应于 Mc 蛋白质-带负电荷的抗体复合物的峰的免疫扣除是完全的,意味着在对应于生物样品中球蛋白的迁移图谱的区带中不能检测出对应于单克隆蛋白质的所述峰。

[0065] 因此,本发明的方法优选适用于对所有类型的单克隆 IgG、IgA、IgM、IgD、IgE 和自由链免疫球蛋白进行检测和分型,而不用考虑它们的迁移率,这是因为,迁移图谱的 γ 、 β 和 α 区域与带有超额负电荷的修饰抗体及其与样品中存在的 Mc 蛋白质形成的复合物的迁移区域之间不产生干扰。

[0066] 因此,本发明的方法适用于对生物样品中的单克隆蛋白质进行毛细管电泳分析。

[0067] 为了对生物样品中的单克隆蛋白质进行检测和分型,有利的是平行进行多个毛细管分析,所述生物样品分为不同的等分试样,等分试样的数量至少等于用于研究 Mc 蛋白质的免疫球蛋白类型的数量。

[0068] 为了对生物样品中的 Mc 蛋白质进行分型,通常至少进行 6 个平行毛细管分析。

[0069] 优选地,所述带有超额负电荷的修饰抗体为免疫球蛋白,其抗原特异性选自抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗- κ 、抗- λ 、和/或抗-游离 κ 和/或抗-游离 λ 免疫球蛋白。

[0070] 也可以加入抗 IgD 和/或抗 IgE 免疫球蛋白。

[0071] 除了以下事实以外,即生物样品中可能存在的 Mc 蛋白质可以用本发明的方法进行分型,当存在 Mc 蛋白质时,可以对所述 Mc 蛋白质进行定量。为此,对应于已经从图谱中扣除 Mc 蛋白质的峰的表面积被确定。

[0072] 本发明的方法还可以用于鉴定在电泳图谱中可见的其它蛋白(不是免疫球蛋白);例如,可以使用具有抗人结合珠蛋白、- α 1 抗胰蛋白酶 (antitrypsin)、-C3 补体、-C4 补体、-转铁蛋白特异性、-RBP、 β 2 球蛋白、- α 1 球蛋白或具有其它特异性的抗体的修饰抗体。采用这些抗体,可以对构成电泳图谱的一部分的蛋白进行鉴定,或挑选出迁移率异于正常的这些蛋白的特定显型。

[0073] 可以类似地采用本说明书所述的本发明的实施条件,检测免疫球蛋白之外的蛋白。

[0074] 本发明还涉及制备带有超额负电荷的修饰抗体的方法,其包括以下步骤:

[0075] ●将含有至少一个羧酸官能团的酞即时溶解于二甲基甲酰胺 (DMF);

[0076] ●使抗体与所述溶解的酞接触,其条件是,所述酞和抗体反应获得在碱性 pH 下带有超额负电荷的修饰抗体。

[0077] 被选择使抗体在碱性 pH 下带有额外负电荷的酞是至少具有一个羧酸官能团的酞。

[0078] 被选择在碱性 pH 下提供额外负电荷的酞优选为苯三羧酸酞。

[0079] 在实验部分将对所述带有超额负电荷的修饰抗体的制备方法进行详细描述。

[0080] 应强调的是,为了有效提供负电荷,上述步骤有利地包括将酞溶解于纯二甲基甲酰胺中,然后混合所述酞溶液,此时,即随后其移至所述抗体。

[0081] 遵守这些条件防止酞被抗体溶液中的水破坏,这是因为,所述破坏将改变制备带电抗体的效率,减少了碱性 pH 时的额外负电荷。

[0082] 优选地,酞和抗体之间的反应,特别是苯三羧酸酞和抗体之间的反应在 37°C 或适当的温度下进行,以增加移至抗体上的酞分子数量,反应时间例如大约 1 小时。

[0083] 在与酞接触之前,有利地是,对需移植的抗血清用 PBS 缓冲液或磷酸盐缓冲液进行渗析。进一步地,当抗体与 DMF 中的酞溶液接触时,优选加入氢氧化钠,氢氧化钠可以对已经存在的苯三羧酸酞的羧酸官能团和在酞与抗体反应过程中形成的羧酸官能团进行更好地缓冲(保持反应介质的 pH 为中性,使酞与抗体的胺基的反应持续进行)。

[0084] 在本发明的特定优选实施例中,在与 DMF 中的酞接触过程中,事先用 pH7.4 的 PBS 缓冲液或磷酸盐缓冲液进行渗析的所述抗体与 5N 氢氧化钠接触,优选地,加入的氢氧化钠当量等于(1)在反应过程中形成的羧酸官能团数量和(2)由酞提供的羧酸官能团数量。然后,在保存所述抗体的介质中渗析所述修饰抗体,将所述溶液调整至适当的工作浓度(大约 10g/l),将其放置于具有最佳抗体/抗原比率的条件。

[0085] 本发明还涉及带有超额负电荷的修饰抗体,其特征在于,所述抗体包括移植过来的羧酸官能团,所述羧酸官能团使所述抗体具有电泳迁移至生物样品中免疫球蛋白的迁移图谱之外的能力,所述免疫球蛋白在相同的分离条件下通过毛细管电泳进行分离。所述带有超额负电荷的修饰抗体优选由实施一个上述方法而得到。

[0086] 所述带有超额负电荷的修饰抗体为单克隆抗体。可替换地,所述修饰抗体可以为多克隆抗体。

[0087] 抗体和样品的抗原蛋白可以两种方式进行接触:在注入毛细管之前,在样品支撑物中,例如在 Capillary 头中,将修饰抗体溶液与生物样品混合,所述样品优选为稀释的,或者在另一方式中,顺序将修饰抗体溶液和经稀释的样品注入毛细管中。进行接触步骤的第二种方式使得在毛细管的内部(毛细管内)发生抗原/抗体反应,其与在头部或其它样品支撑物中将两个溶液进行混合的常规方式同样有效,相对于样品中的蛋白和注入两种溶液的顺序,由于修饰抗体具有不同的迁移率,从而使第二种模式成为可能:修饰抗体比样品中的蛋白的迁移率低的多(由于它们具有较大的负电荷),因此首先注入,在注射修饰抗体之后注入样品使得样品通过抗体区域,从而可以从被抗体识别的抗原的蛋白图谱中扣除。

[0088] 本发明还涉及用于检测生物样品中单克隆蛋白质的试剂盒,包括本发明的抗体和其它组分,例如用于包含抗体的介质,但是所述组分不含有抗体(以获得参考图谱),和/或电泳缓冲液和/或清洗毛细管和/或特定的具有减少体积的稀释头的溶液和/或用以稀释待分析样品的稀释液,其可以例如对在不同分析过程得到的不同曲线进行良好的叠加。可选择地,所述试剂盒还包括进行电泳和免疫位移分析的指示,从而显示 Mc 蛋白质并进行分型。

[0089] 优选地,所述试剂盒包括一组具有抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗- κ 和抗- λ 特异性的抗体。

[0090] 另一类型的试剂盒可以包括具有抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗- κ 和抗- λ 特异性的抗体的混合物。所述混合物可以称为五价抗血清,其可以确定出现在电泳图谱中的峰或所述图谱一部分的变形的单克隆性质。由于 Mc 免疫球蛋白不仅可以出现在 γ 区域,还可以出现在 β 和 α 区域,而且可以被通常出现在毛细管电泳图谱中的这些区域的蛋白掩盖,因此,所述试剂盒具有特别的吸引力。在本发明的该实施例中,所述样品在两条泳道上进行检测:一条为参照泳道(只含有抗体介质,不含有抗体),一条泳道可以显示电泳蛋白上存在单克隆峰(采用五价抗血清)。

[0091] 另一类型的试剂盒可以含有具有抗重链特异性(γ 、 α 和 μ , 抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM, 可以称为三价抗血清)的抗体和/或具有抗轻链、 κ 和 λ (游离和结合)特异性的抗体,和/或具有抗游离轻 κ 和 λ 链特异性的抗体的混合物。所述试剂盒可以通过毛细管电泳检测和确定人尿或血清中存在的本斯琼斯氏蛋白或游离轻 Mc(κ 或 λ) 链。在该实施例中,当采用这些抗血清时,所述样品在 6 条泳道上测试:一条为参照泳道(只含有抗体介质,不含有所述抗体),5 条泳道用于表征一条或多条 Mc 带;采用三价抗血清显示重链的存在,以及轻链类型(κ 或 λ ; 游离或结合)。

[0092] 通过对未经处理的抗体混合物进行修饰或通过混合已经被抗体型修饰的抗体,得到修饰抗体的混合物。在本发明中,优选制备已经事先被修饰而带有超额负电荷的抗体混合物。

[0093] 在本发明中,电泳分离的结果如例子中所示,其为电泳图谱的形式,其中对应于以下蛋白的峰在所述图谱上消失,所述蛋白通过与带有超额负电荷的抗体的特定免疫反应被鉴别。

[0094] 可替换地,所述结果也可以这样的电泳图谱形式表示,这种图谱中仅仅显示了对应于通过与带有超额负电荷的抗体的特定免疫反应被鉴别的蛋白的峰。在实施本发明的方法的过程中,所述峰从分离的蛋白图谱中消失。但是,对结果进行处理从而只显示该峰。

[0095] 为此,可以采用适当的数据处理技术将经带有超额负电荷的修饰抗体处理的所述样品的一个等分试样的电泳图谱从同一样品的未经处理的等分试样的图谱中扣除。扣除所有的经处理等分试样的图谱得到了用免疫固定获得的图象类型。

[0096] 本发明的其它特征和优点将通过以下实施例和图形变得更加清楚,所述实施例和图形用于阐述本发明。

[0097] 附图 1 至 13 显示了检测不同生物样品中单克隆蛋白质并对其进行分型的例子,从而提高了对这些疾病的预测和治疗。在附图 2 至 13 中,图谱的灰面表示在本发明的抗体存在时分离出的丝胶蛋白;还显示了存在所述抗体之外分离出的丝胶蛋白图谱,但是线条较弱。在每个图中还单独显示了没有用本发明的抗体处理的分离蛋白的图谱,表示为 ELP。

[0098] 毛细管电泳

[0099] 在 CE 装置上对临床样品进行毛细管电泳,所述 CE 装置配备有 8 个熔融二氧化硅毛细管,其内径为 25 微米(CAPILLARYS, Sebia)。在 200nm 处进行检测。将样品放置于装置的样品进料器中,通过水力自动注入。施加大约 400V/cm 的电场,分离样品少于 5 分钟。在每次分析前,用 0.25M 氢氧化钠清洗所述毛细管,然后用分析缓冲液清洗。

[0100] 用三羧酸酐对抗体进行修饰的方法

[0101] a) 用 pH7.4、100mM 的磷酸盐缓冲液对 10g/l、10ml 的待移植抗血清(抗人 IgG、A、

M、抗 κ 或抗 λ , DAKO, 丹麦) 进行渗析。

[0102] b) 用 DMF 制备 100mM 的 1,2,4- 苯三羧酸酐溶液。

[0103] c) 经渗析的抗体溶液与 5N 氢氧化钠混合, 然后与 DMF 中的所述酐溶液 (213 μ l 5N 氢氧化钠 +10ml 抗体溶液 +5.33ml 于 DMF 中的酐)。

[0104] d) 将反应介质放于振荡器上, 在 37°C 下轻轻振荡 1 小时。

[0105] e) 在 100mM、pH7.4 的磷酸盐缓冲液中对所述混合物进行渗析, 更换渗析液数次。

[0106] f) 一旦渗析结束, 将柱放置在粉状 PEG6000 中 1 小时。

[0107] g) 一旦浓缩结束, 用 100mM、pH7.4 的磷酸盐 +1g/l 硝酸钠溶液对后者进行渗析。

[0108] h) 用 100mM、pH7.4 的磷酸盐 +1g/l 硝酸钠的溶液将柱的体积调整至 10ml。

[0109] i) 对获得溶液用孔隙为 0.45 μ m 的膜进行过滤, 然后储存于 4°C 下。可以采用任意的存储介质, 只要其离子强度足够保存抗体 (即, 接近于生理盐水的离子强度)。

[0110] 用苯六甲酸修饰抗体的方法

[0111] a) pH7.4、40mM 的磷酸盐缓冲液对 10g/l、10ml 待分析的抗血清 (抗人 IgG、A、M、抗 κ 或抗 λ , DAKO, 丹麦) 进行渗析。

[0112] b) 加入 50 μ l/ml 的 5N 氢氧化钠。

[0113] c) 加入 18mg/ml 苯六甲酸, 然后加入 50mg/ml EDCI。

[0114] d) 将反应介质放于振荡器上, 在 37°C 下轻轻振荡 1 小时。

[0115] e) 在 100mM、pH7.4 的磷酸盐缓冲液中对所述混合物进行渗析, 更换渗析液数次。

[0116] f) 一旦渗析结束, 将柱放置在粉状 PEG6000 中 1 小时。

[0117] g) 一旦浓缩结束, 用 100mM、pH7.4 的磷酸盐 +1g/l 硝酸钠溶液对后者进行渗析。

[0118] h) 用 100mM、pH7.4 的磷酸盐 +1g/l 硝酸钠的溶液将柱的体积调整至 10ml。

[0119] i) 对获得溶液用孔隙为 0.45 μ m 的膜进行过滤, 然后储存于 4°C 下。

[0120] 血清免疫分型的方法

[0121] Cappillarys (SEBIA) 是一种平行进行 8 个毛细管分析的装置。免疫分型的头是特定用于分型的 CAPILLARYS 头, 由 6 个 100 μ l 的孔和一个 400 μ l 的双孔构成。在孔 1 中含有 60 μ l 的 100mM 磷酸盐溶液, 孔 2 中含有 60 μ l 的修饰抗 IgG, 孔 3 中含有 60 μ l 的修饰抗 IgA, 孔 4 中含有 60 μ l 的修饰抗 IgM, 孔 5 中含有 60 μ l 的修饰抗 κ , 孔 6 中含有 60 μ l 的修饰抗 λ , 双孔 7/8 中含有 380 μ l 免疫分型用稀释液 (Sebia 采用的分析缓冲液中含有 0.02M 苯甲醇)。

[0122] a) 将待分型的血清管放于 CAPILLARYS 载体的位置 1 处, 所述载体上放置有“免疫分型”头。

[0123] b) 将所述载体放入装置中: 所述自动仪在双孔 7/8 中以 1/20 的比例稀释血清, 使双孔均匀, 在孔 1 至 6 中的每一个加入 40 μ l, 使每个孔均匀。

[0124] c) 在下列条件下进行毛细管分析:

[0125] 分析缓冲液可以是 Sebia Capillarys B1B2+ 或 Sebia Capillarys Protein 缓冲液;

[0126] B1B2+ 缓冲液: 温度 32°C, 迁移电压 7kV, 获取窗口 100-235s, 注入 250mbar*5s;

[0127] Sebia Capillarys Protein(e) 缓冲液: 温度 37°C, 迁移电压 6.5kV, 获取窗口 110-275s, 注入 250mbar*5s;

[0128] d) 比较孔 1 和之后的五个孔的毛细管分析,从而对分析血清进行分型。

[0129] 特定血清的操作条件:

[0130] 如果血清中 γ 组分较低,步骤 b) 稀释液的稀释度为 $1/10^{\text{th}}$ 。如果在使用 B1B2+ 缓冲液的 Capillarys 装置中, γ 级分进行分析的值低于用所述缓冲液限定的所述组分的正常值,即低于大约 10% (或 $< 7.5\text{g/l}$),则认为 γ 组分低。

[0131] 如果血清中 γ 组分大于大约 20g/l ,则步骤 b) 稀释液的稀释度为 $1/40^{\text{th}}$ 。

[0132] 对血清进行免疫分型的方法的变形:毛细管内免疫扣除

[0133] 在此情况下,采用 2 个头:

[0134] 1 个头由 6 个孔构成:孔 1 含有 $100\ \mu\text{l}$ 的 100mM 磷酸盐溶液,孔 2 中含有 $100\ \mu\text{l}$ 的修饰抗 IgG,孔 3 中含有 $100\ \mu\text{l}$ 的修饰抗 IgA,孔 4 中含有 $100\ \mu\text{l}$ 的修饰抗 IgM,孔 5 中含有 $100\ \mu\text{l}$ 的修饰抗 κ ,孔 6 中含有 $100\ \mu\text{l}$ 的修饰抗 λ ;

[0135] 1 个用于血清稀释的头由 7 个孔构成:双孔 7/8 中含有 $380\ \mu\text{l}$ 免疫分型用稀释液 (Sebia Capillarys B1B2+ 缓冲液中含有 0.02M 苯甲醇)。

[0136] a) 将含有所述抗血清头的第一载体引入装置中;该自动仪器向毛细管内注入所述抗体 ($250\text{mbar}\cdot 5\text{s}$)。

[0137] b) 将含有血清稀释头和位于位置 1 的血清管的第二载体引入装置中:该自动仪器在双孔 7/8 中进行 $1/20^{\text{th}}$ 的稀释,使双孔均匀,分别加入孔 1 至 6 (每孔为 $40\ \mu\text{l}$ 的经 $1/20^{\text{th}}$ 稀释的血清 + $60\ \mu\text{l}$ 的分析缓冲液);然后将稀释血清注入毛细管中 ($250\text{mbar}\cdot 5\text{s}$)。

[0138] c) 所述缓冲液可以是 Sebia Capillarys B1B2+ 缓冲液或 Sebia Capillarys Protein(e) 缓冲液;

[0139] B1B2+ 缓冲液:温度 32°C ,迁移电压 7kV ,获取窗口 $100\text{--}235\text{s}$;

[0140] Sebia Capillarys Protein(e) 缓冲液:温度 37°C ,迁移电压 6.5kV ,获取窗口 $110\text{--}275\text{s}$ 。

[0141] d) 比较孔 1 和之后的五个孔的毛细管分析,从而对血清进行分型。

[0142] 结果

[0143] ● 例 1:在用 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰之前和之后在采用 Sebia Capillarys B1B2+ (获取窗口 $100\text{--}350\text{s}$) 缓冲液的 Capillarys 上分析抗人 IgG, DAKO;对所述抗体的修饰显著延缓了其迁移:其迁移时间从 122s 改变至 267s (附图 1a 和 1b)。

[0144] ● 例 2:对含有单克隆 A 型 λ 蛋白的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capillarys B1B2+ 缓冲液 (获取窗口 $100\text{--}235\text{s}$) 的 Capillarys 上迁移至 $\beta\text{-}2$:所述血清的 6 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体 (抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ) 和所述抗体的介质 (不含抗体:ELP 泳道) 混合。与 ELP 泳道比较 (黑色;附图 2),清楚地显示,用抗 IgA 和抗 lambda 处理的等分试样在 $\beta\text{-}2$ 区域中没有单克隆峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体没有干扰球蛋白的迁移。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0145] ● 例 3:对含有单克隆 G 型 λ 蛋白的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capillarys B1B2+ 缓冲液 (获取窗口 $100\text{--}235\text{s}$) 的 Capillarys 上迁移至 $\beta\text{-}1$:所述血清的 6 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体 (抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ) 和所述抗体的介质 (不含抗体:ELP 泳道) 混合。与 ELP 泳道比较 (黑色;附图 3),清楚地显

示,用抗 IgG 和抗 lambda 处理的等分试样在 $\beta-1$ 区域中没有单克隆峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0146] ●例 4:对含有单克隆 A 型 K 蛋白的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液(获取窗口 100-235s)的 Capillarys 上迁移至 $\beta-1$ 和 $\alpha-2$ 之间;所述血清的 6 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体(抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ)和所述抗体的介质(不含抗体:ELP 泳道)混合。与 ELP 泳道比较(黑色;附图 4),清楚地显示,用抗 IgA 和抗 K 处理的等分试样在 $\beta-1/\alpha-2$ 区域中没有单克隆峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0147] ●例 5:对含有单克隆 G 型 λ 蛋白的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液(获取窗口 100-235s)的 Capillarys 上迁移至 γ ;所述血清的 6 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体(抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ)和所述抗体的介质(不含抗体:ELP 泳道)混合。与 ELP 泳道比较(黑色;附图 5),清楚地显示,用抗 IgG 和抗 λ 处理的等分试样在 γ 区域中没有单克隆峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0148] ●例 6:对含有单克隆 A 型 λ 蛋白的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液(获取窗口 100-235s)的 Capillarys 上迁移至 $\beta-1$ 和 $\beta-2$ 之间;所述血清的 6 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体(抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ)和所述抗体的介质(不含抗体:ELP 泳道)混合。与 ELP 泳道比较(黑色;附图 6),清楚地显示,用抗 IgA 和抗 λ 处理的等分试样在 $\beta-1/\beta-2$ 区域中没有单克隆峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0149] ●例 7:对含有单克隆 M 型 κ 蛋白的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液(获取窗口 100-235s)的 Capillarys 上迁移至 γ ;所述血清的 6 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体(抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ)和所述抗体的介质(不含抗体:ELP 泳道)混合。与 ELP 泳道比较(黑色;附图 7),清楚地显示,用抗 IgM 和抗 κ 处理的等分试样在 γ 区域中没有单克隆峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0150] ●例 8:对含有单克隆游离 λ 型蛋白的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液(获取窗口 100-235s)的 Capillarys 上迁移至 γ ;所述血清的 8 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 7 种抗体(抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ 、-游离 κ 、-游离 λ)和所述抗体的介质(不含抗体:ELP 泳道)混合。与 ELP 泳道比较(黑色;附图 8),清楚地显示,用抗 λ 和抗游离 λ 处理的等分试样在 γ 区域中没有单克隆峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体对没有球蛋白迁移干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0151] ●例 9:比较采用经 1,2,4- 苯三羧酸酐或苯六甲酸/EDCI 修饰的抗人 IgG 抗体对

含有单克隆 G 型 κ 蛋白的血清进行的免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液 (获取窗口 100-235s) 的 Capillarys 上迁移至 γ ;所述血清的 3 个等分试样与 2 种经 1,2,4- 苯三羧酸酐和苯六甲酸 /EDCI 修饰的抗人 IgG 以及所述抗体的介质 (不含抗体;ELP 泳道) 混合。与 ELP 泳道比较 (黑色;附图 9),清楚地显示,用 2 种修饰抗体处理的等分试样在 β -1 区域中没有单克隆峰。还注意到,在两种情况下,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0152] ● 例 10:对含有单克隆 G 型 κ 蛋白的血清进行毛细管内免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液 (获取窗口 100-235s) 的 Capillarys 上迁移至 γ ;所述抗体介质 (不含抗体) 与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体 (抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ) 放置于第一头内。所述血清的 6 个等分试样用含有注射标记物 (头 2) 的 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液稀释。注入抗体之后注入稀释的血清等分试样,进行 6 个迁移。与 ELP 泳道比较 (黑色;附图 10),清楚地显示,用抗 IgG 和抗 κ 处理的等分试样在 γ 区域中没有单克隆峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0153] ● 例 11:采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液 (获取窗口 100-235s) 的 Capillarys 装置上对血清进行分析,采用五价抗血清 (用 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ 的混合物) 验证血清中突出于 β -1 区域的峰的 Mc 性质:所述血清的 2 个等分试样与五价抗血清和这些抗体的介质 (不含抗体;ELP 泳道) 相混合。与 ELP 泳道比较 (黑色;附图 11),清楚地显示,在用五价抗血清处理的泳道中没有突出于 β -1 区域的峰,其指示了该峰的 Mc 性质 (M 型 κ Mc 蛋白质)。还注意到,多克隆背景的消失,所述血清没有 β -2 部分,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

[0154] ● 例 12:对含有游离 λ 型 Mc 蛋白质的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys B1B2+ 缓冲液 (获取窗口 100-235s) 的 Capillarys 上迁移至 γ ;所述血清的 6 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体 (三价抗血清 (抗 IgG、-IgA、-IgM 抗体的混合物)、抗 κ 、抗 λ 、抗游离 κ 、抗游离 λ) 和所述抗体的介质 (不含抗体;ELP 泳道) 混合。与 ELP 泳道比较 (黑色;附图 12),清楚地显示,在用三价抗血清处理的泳道中,多克隆背景消失,而不是 Mc 峰消失。平行地,在抗 λ 和抗游离 λ 泳道,观察到 Mc 峰的消失。在抗 κ 和抗游离 κ 的泳道,只观察到多克隆背景的减小。还注意到,所述血清没有 β -2 部分,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。

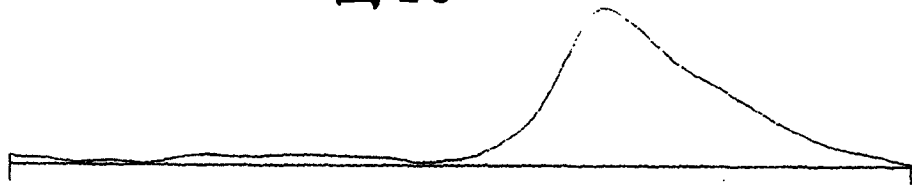
[0155] ● 例 13:对含有 M 型 κ Mc 蛋白质的血清进行免疫分型,所述血清在采用 Sebia Capliarys Protein(e) 缓冲液 (获取窗口 110-275s) 的 Capillarys 装置上迁移至 γ ;所述血清的 6 个等分试样与经 1,2,4- 苯三羧酸酐修饰的 5 种抗体 (抗 IgG、-IgA、-IgM、- κ 、- λ) 和所述抗体的介质 (不含抗体;ELP 泳道) 混合。与 ELP 泳道比较 (黑色;附图 13),清楚地显示,用抗 IgM 和抗 κ 处理的等分试样在 γ 区域中没有 Mc 峰。对于其它泳道,只观察到多克隆背景的减少。还注意到,免疫复合物和修饰抗体对球蛋白迁移没有干扰。迁移至 γ 前面的峰为注射标记物,有利于叠加图谱。



丝胶蛋白的电泳
抗IgG DAKO窗口105-350秒, 122秒

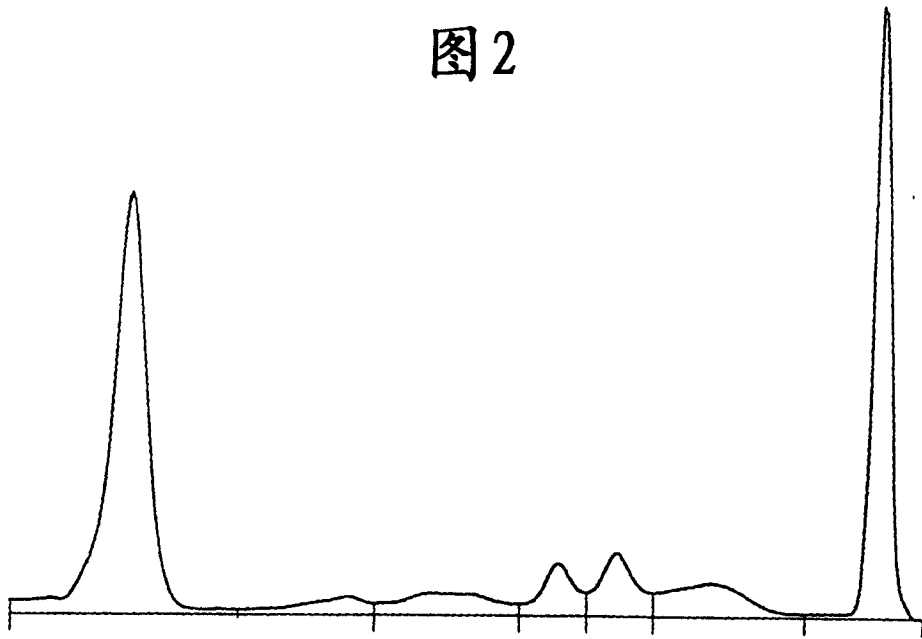
图 1a

图 1b



丝胶蛋白的电泳
修饰抗IgG 窗口105-350秒, 267秒

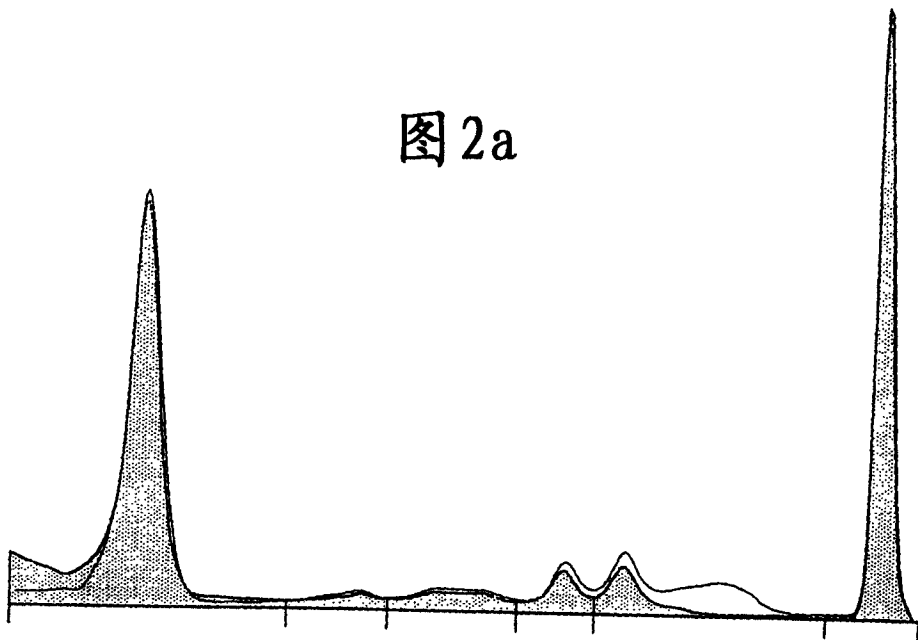
图2



电泳

β -2区域的具有A型 λ 的血清-ELP

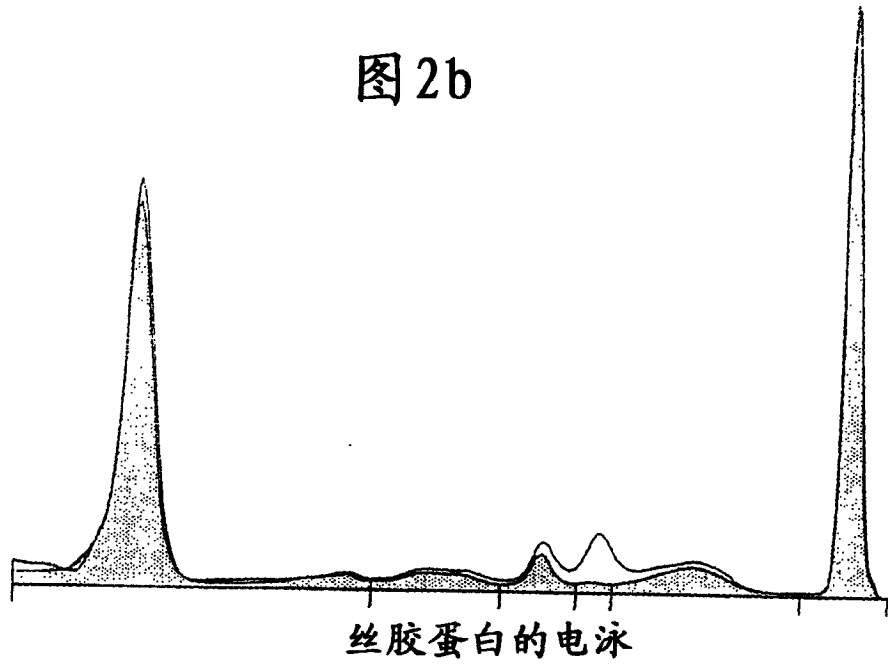
图2a



丝胶蛋白的电泳

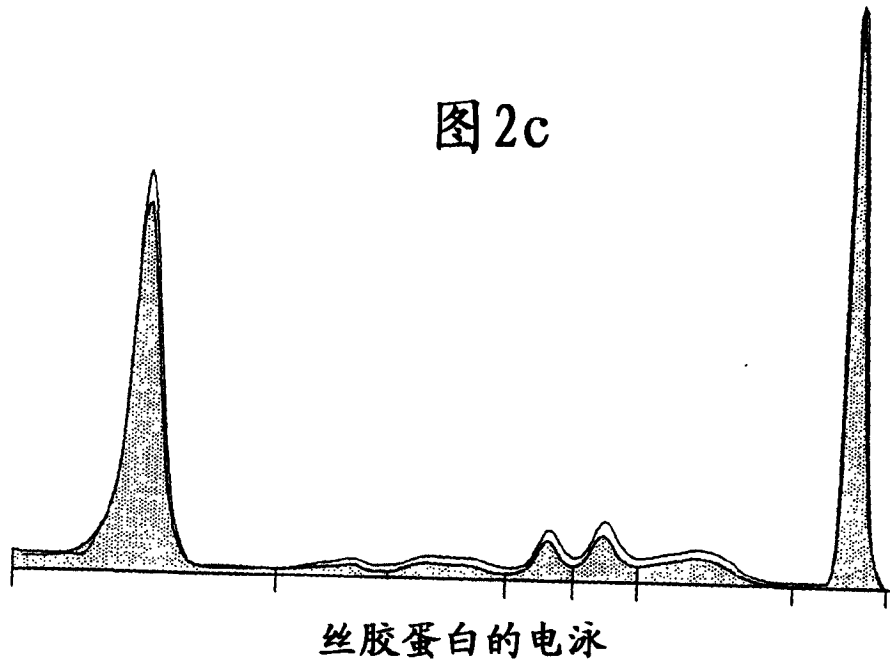
抗IgG

图 2b



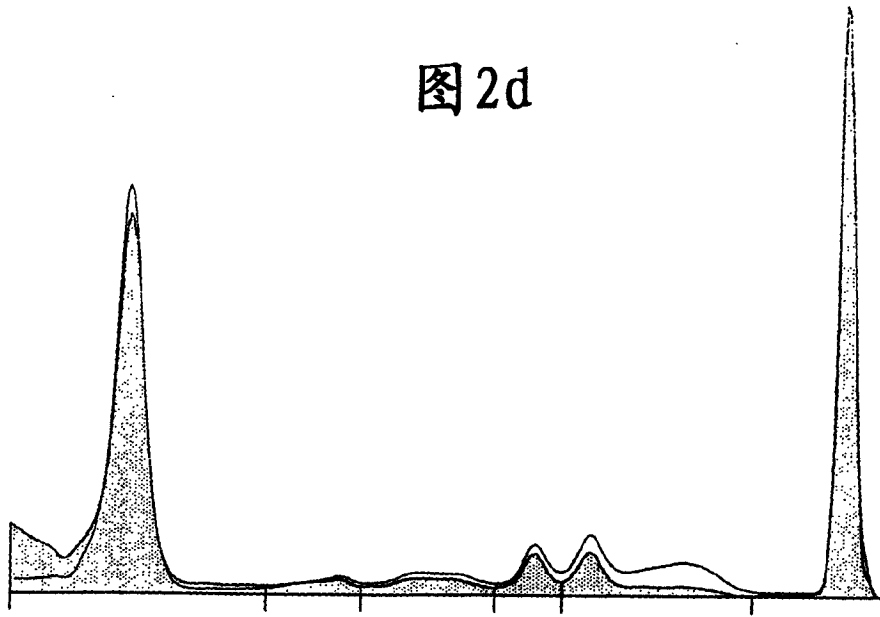
抗 IgA

图 2c



抗 IgM

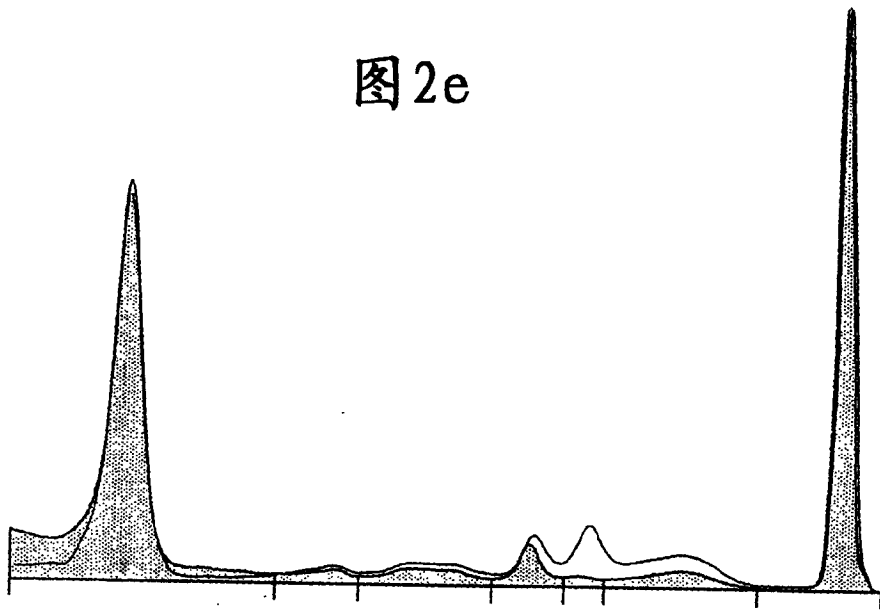
图 2d



丝胶蛋白的电泳

抗 κ

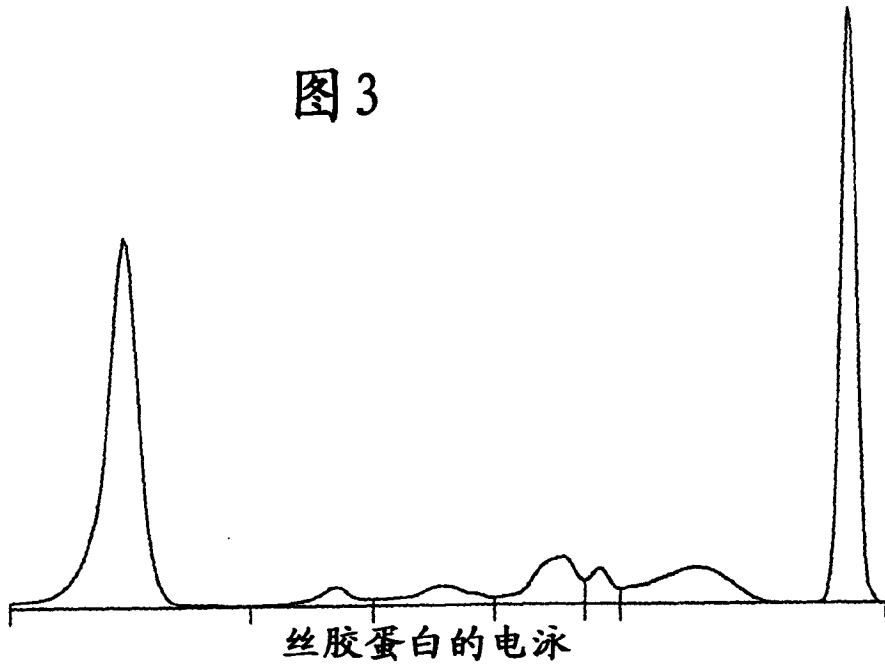
图 2e



丝胶蛋白的电泳

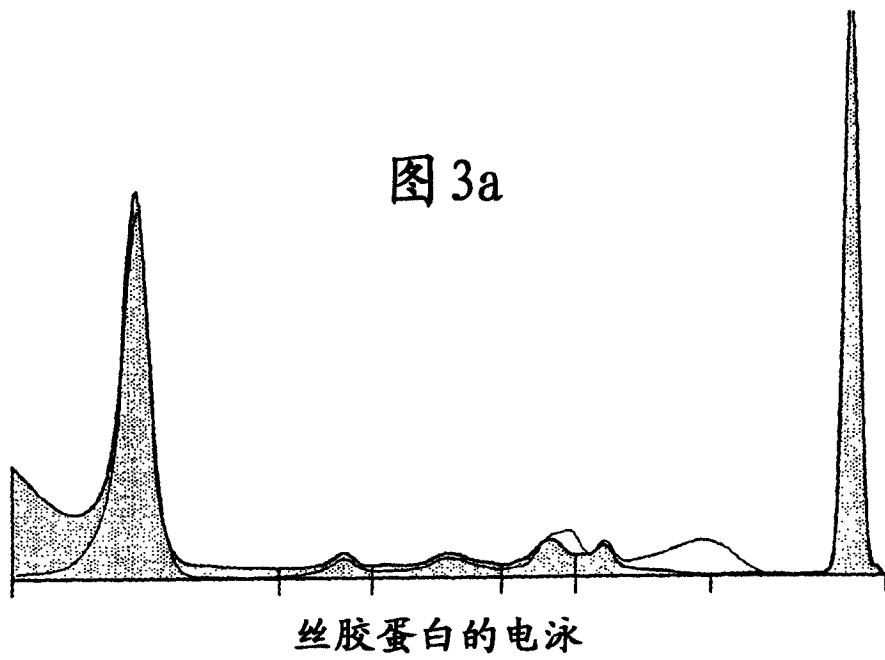
抗 λ

图3



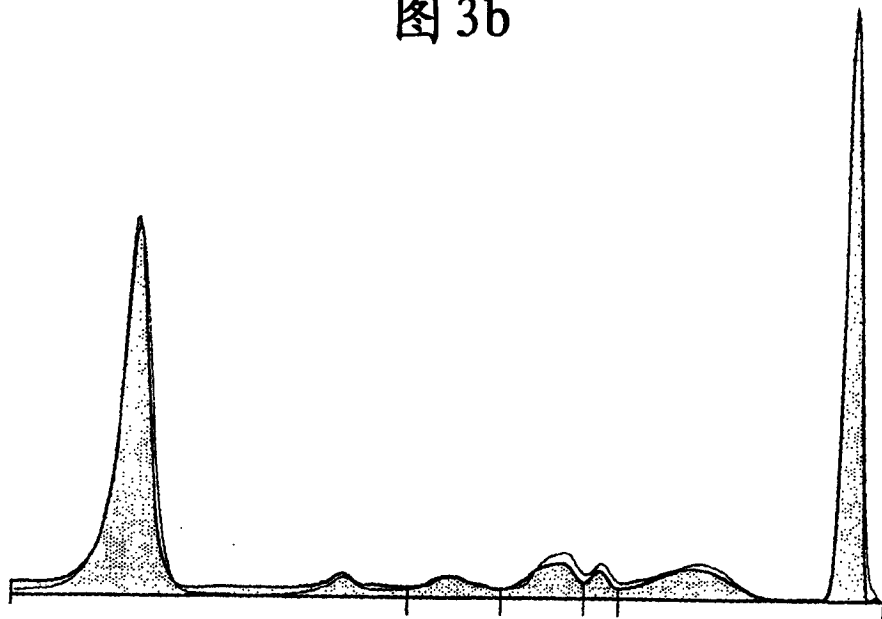
β -1区域的具有G型 λ 的血清-ELP

图3a



抗IgG

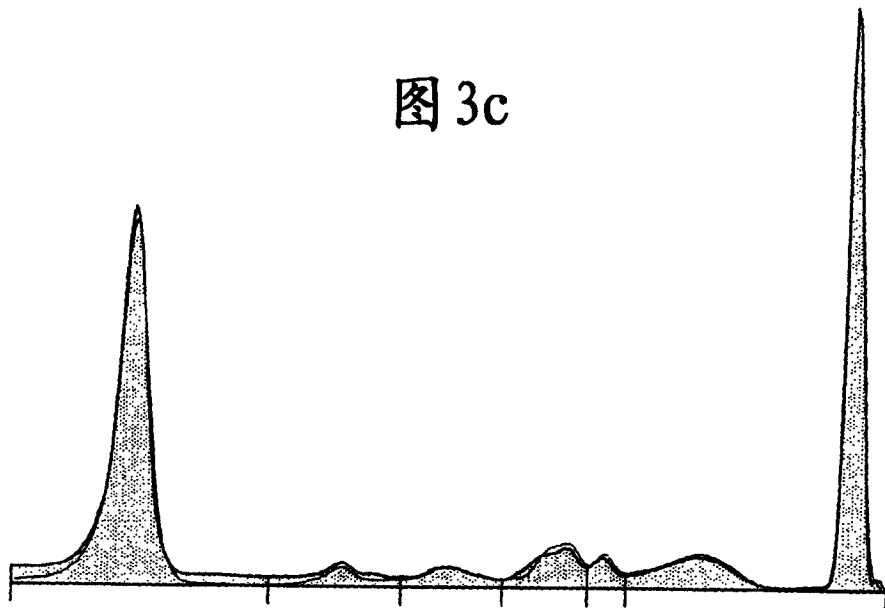
图 3b



丝胶蛋白的电泳

抗 IgA

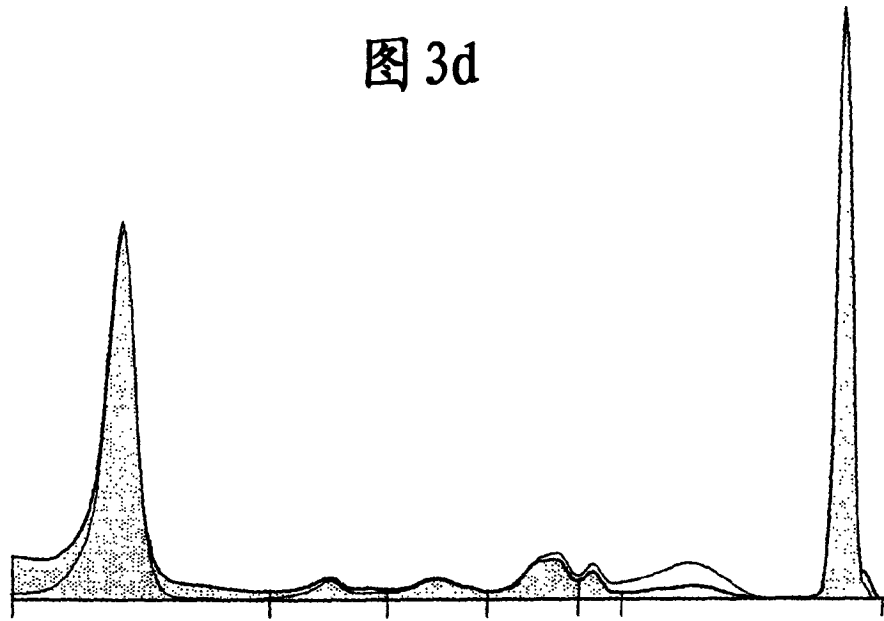
图 3c



丝胶蛋白的电泳

抗 IgM

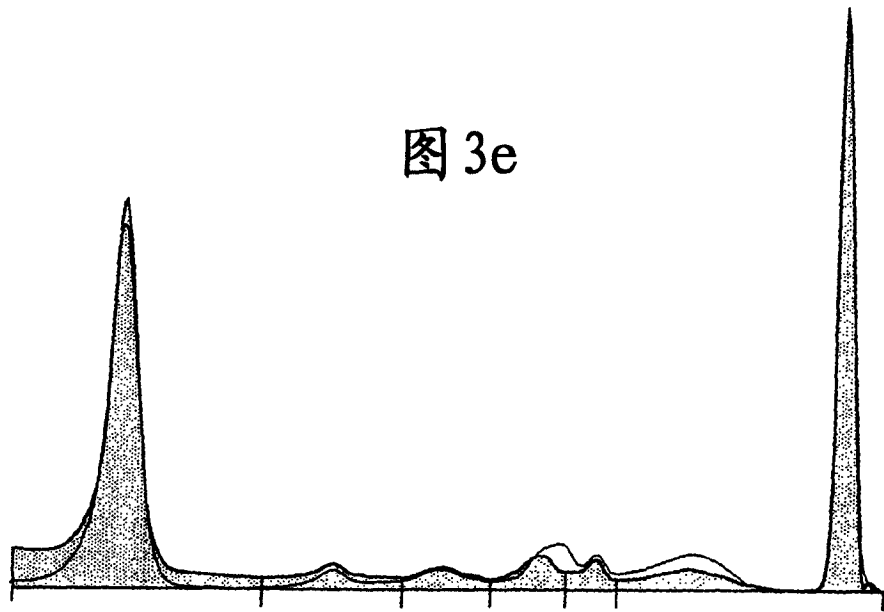
图 3d



丝胶蛋白的电泳

抗 κ

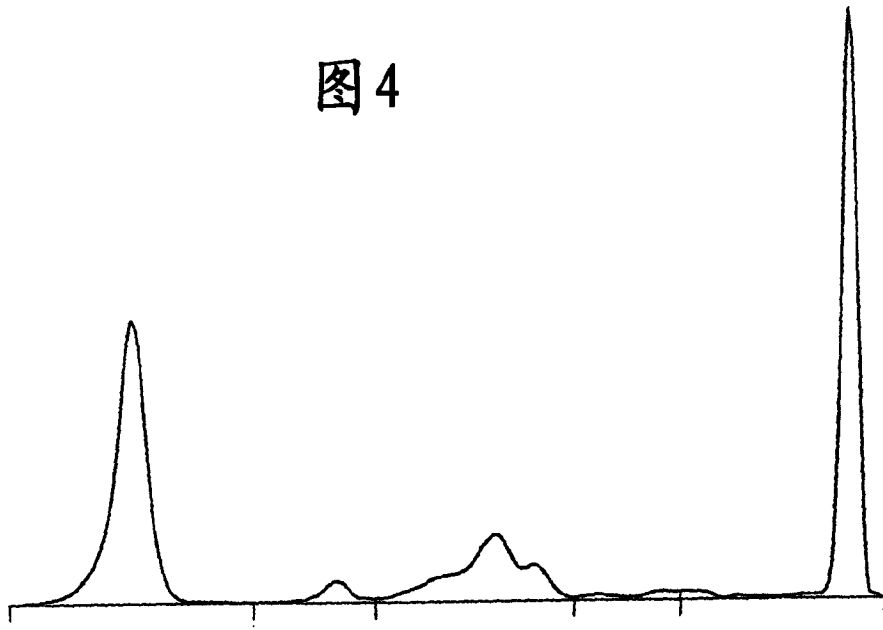
图 3e



丝胶蛋白的电泳

抗 λ

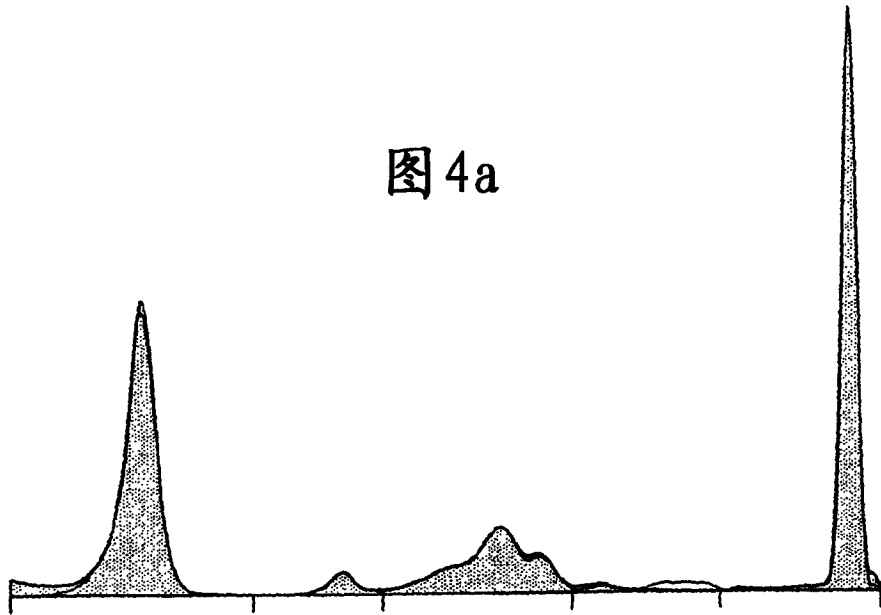
图4



电泳

在 $\alpha-2/\beta-1$ 的具有A型 κ 的血清-ELP

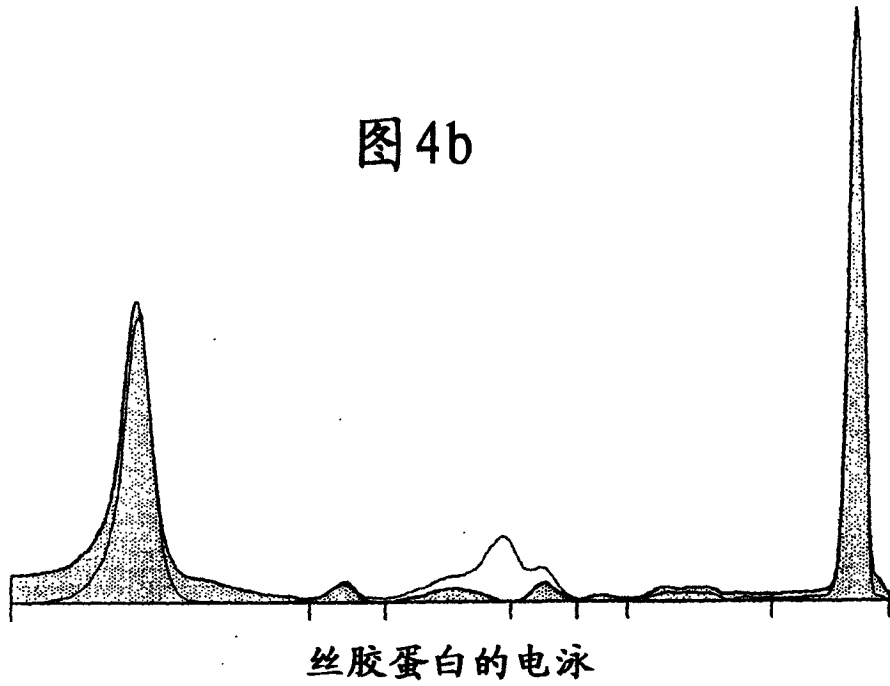
图4a



丝胶蛋白的电泳

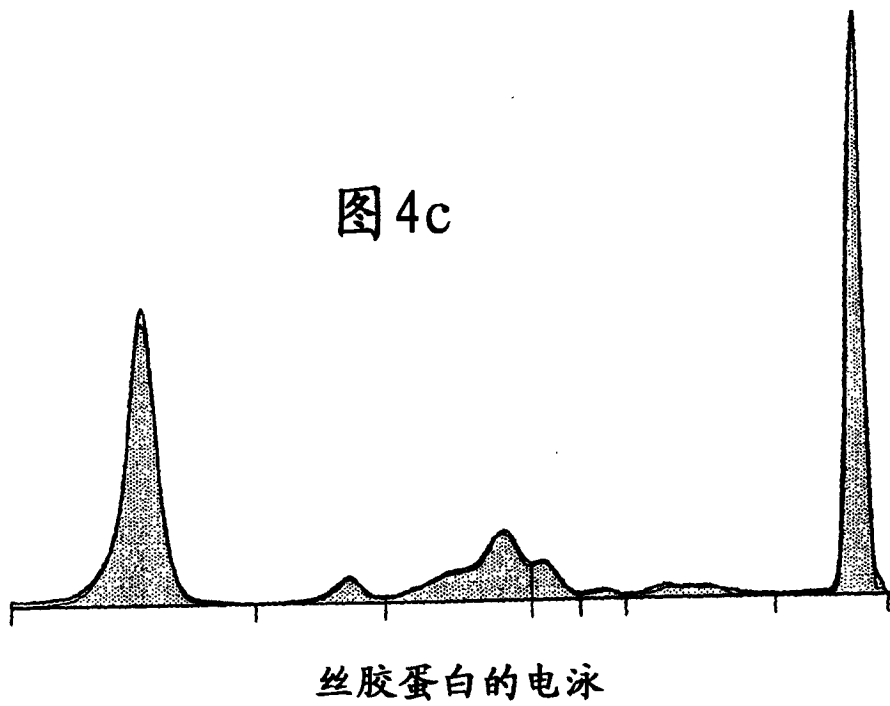
抗IgG

图4b



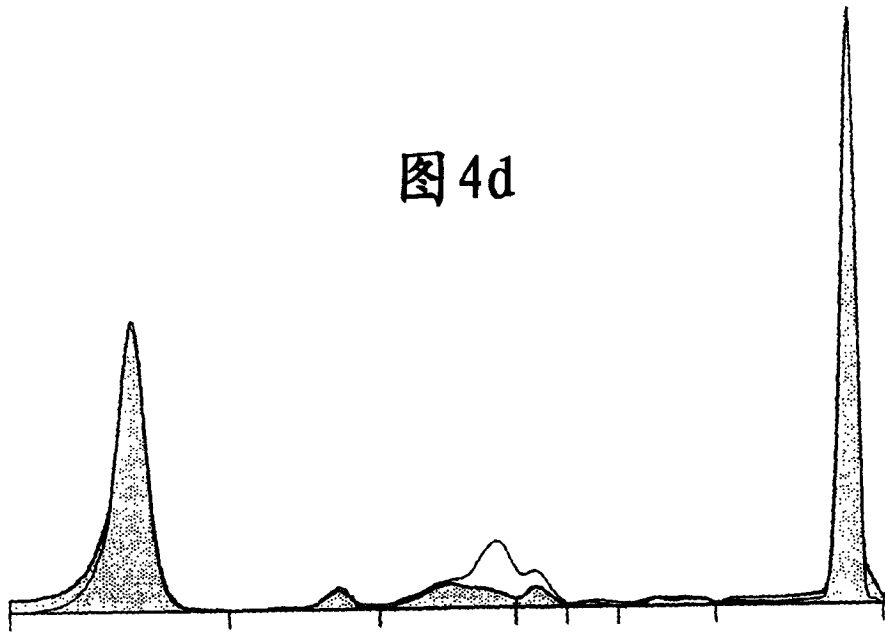
抗IgA

图4c



抗IgM

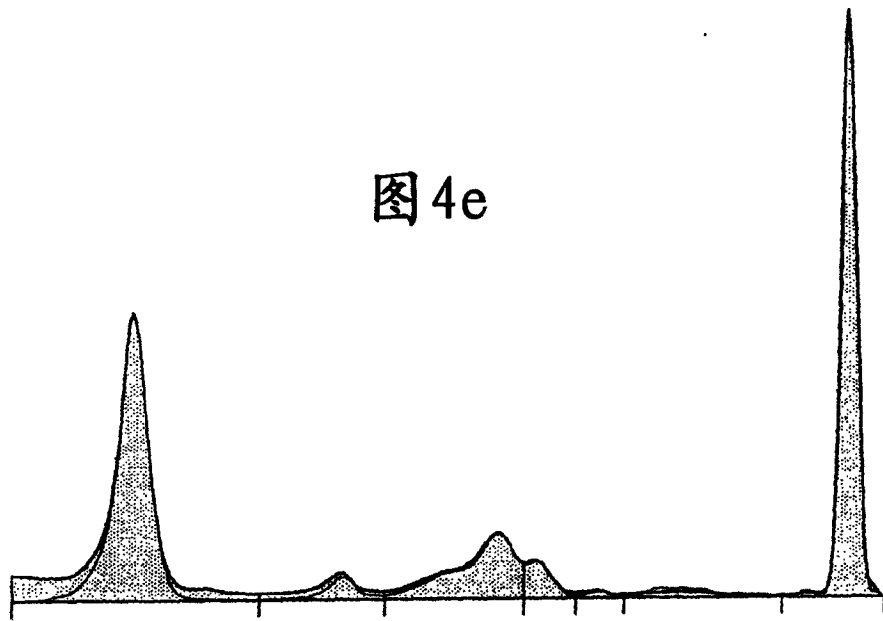
图 4d



丝胶蛋白的电泳

抗 κ

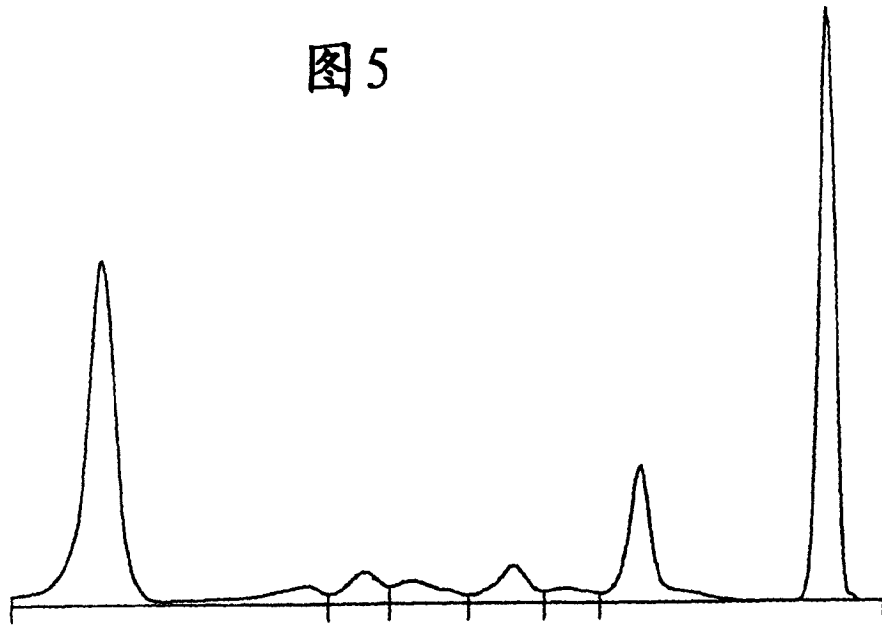
图 4e



丝胶蛋白的电泳

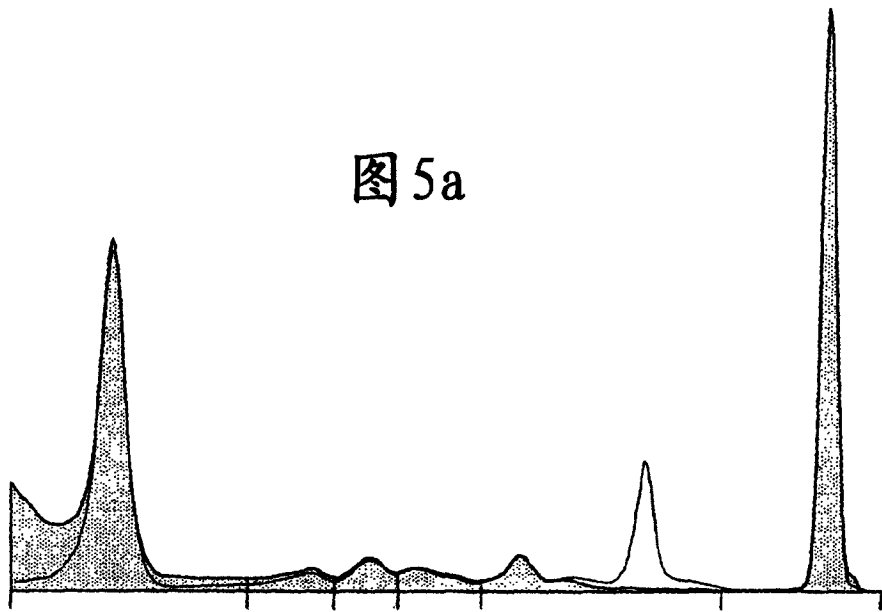
抗 λ

图5



具有G型λ的血清-ELP

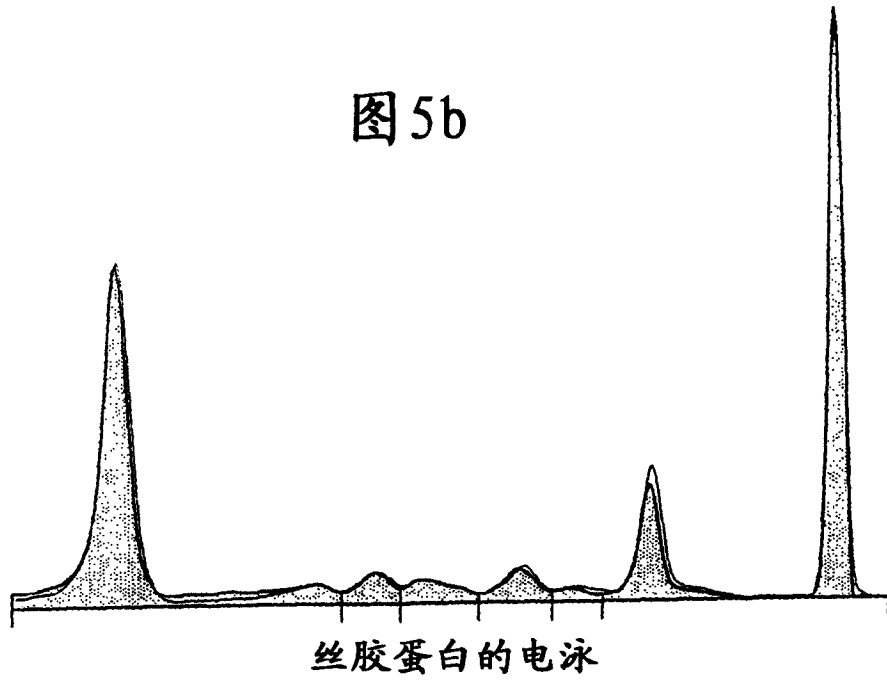
图5a



丝胶蛋白的电泳

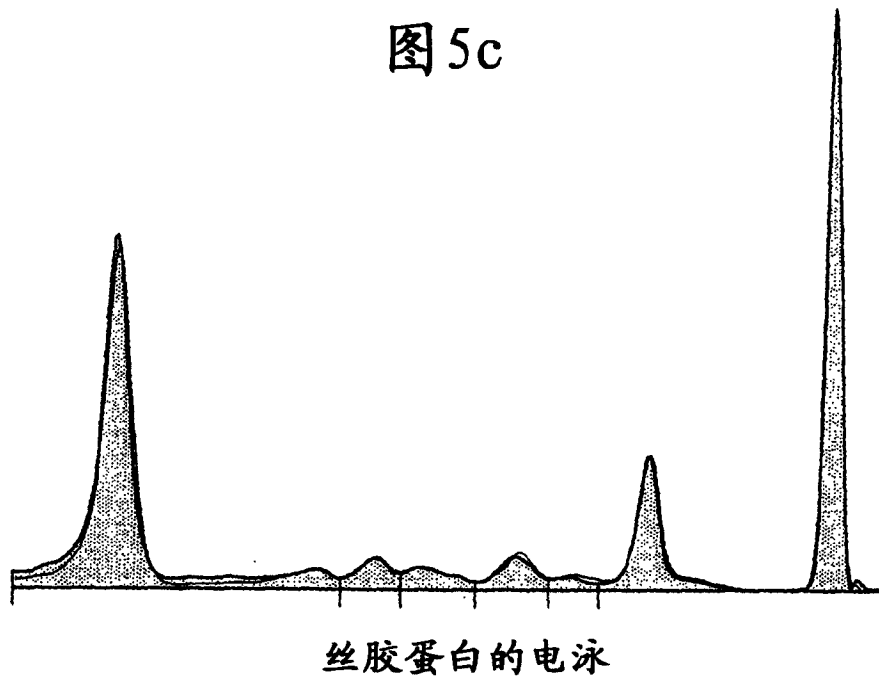
抗 IgG

图5b



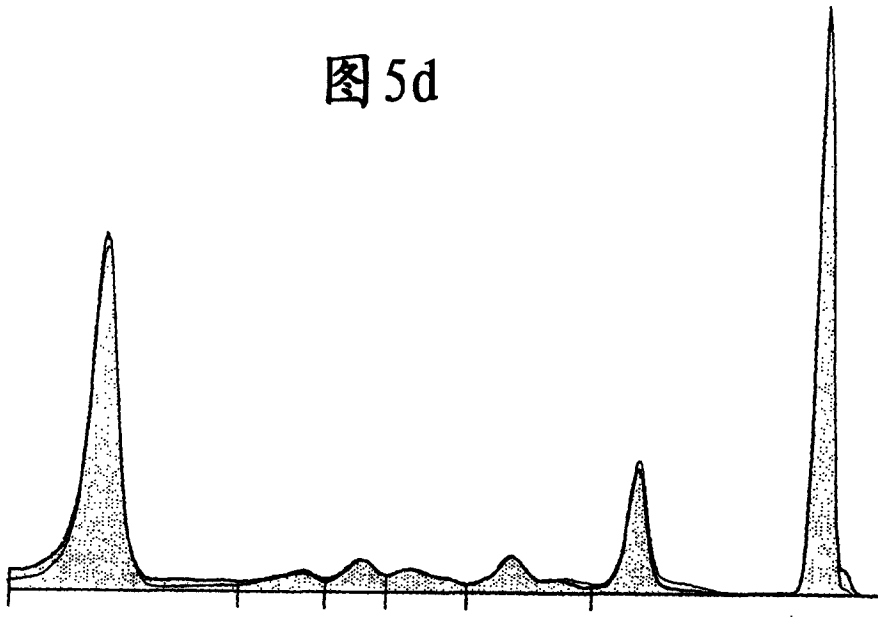
抗 IgA

图5c



抗 IgM

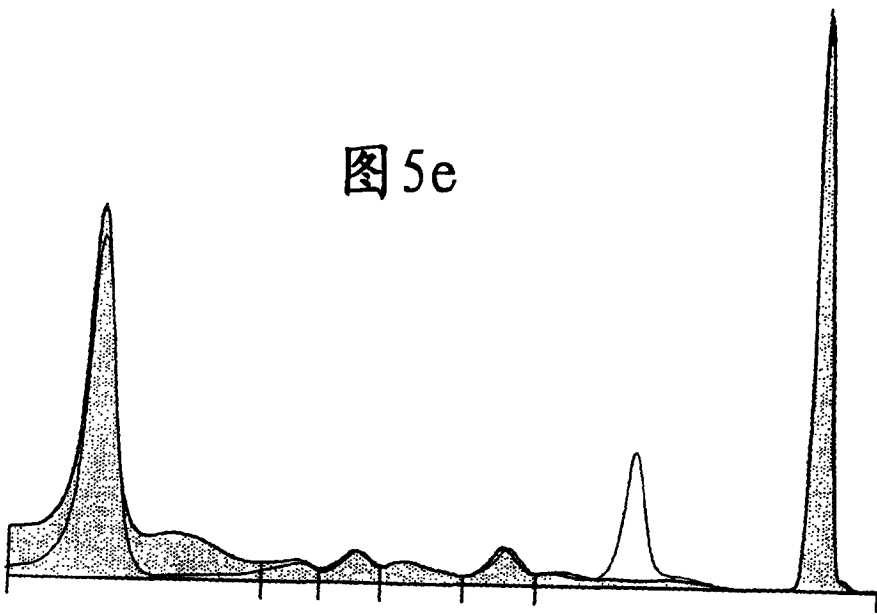
图5d



丝胶蛋白的电泳

抗κ

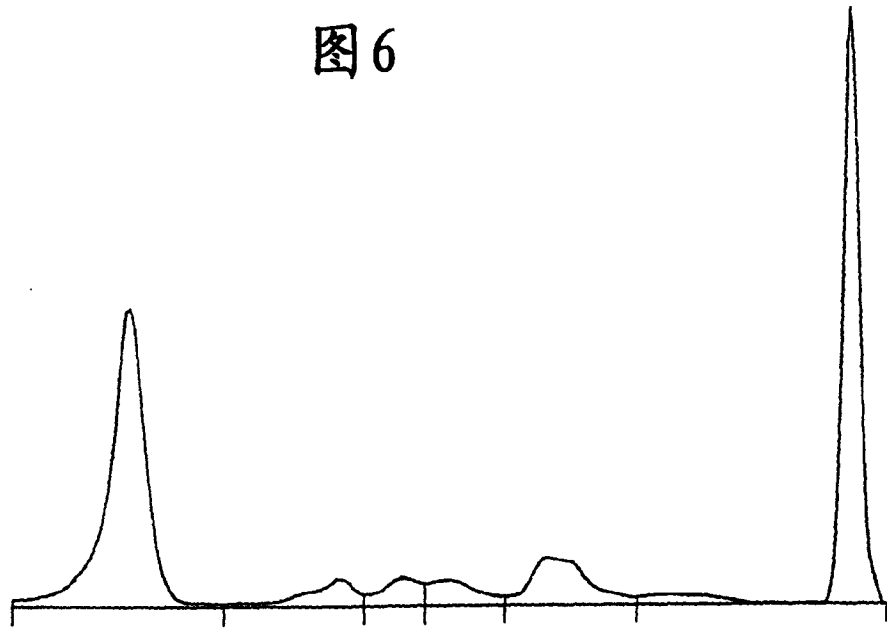
图5e



丝胶蛋白的电泳

抗λ

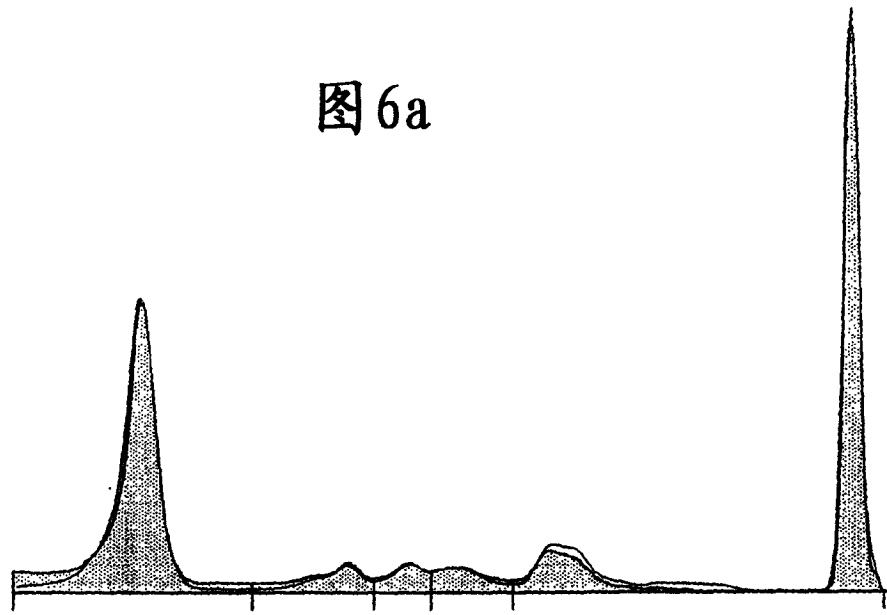
图6



丝胶蛋白的电泳

在 $\beta-1/\beta-2$ 的具有A型 λ 的血清-ELP

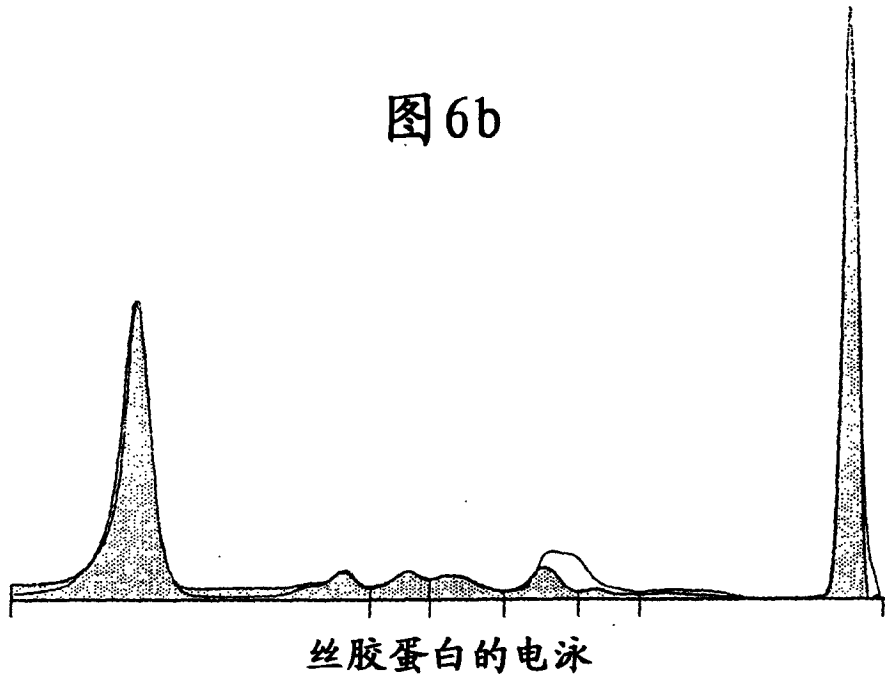
图6a



丝胶蛋白的电泳

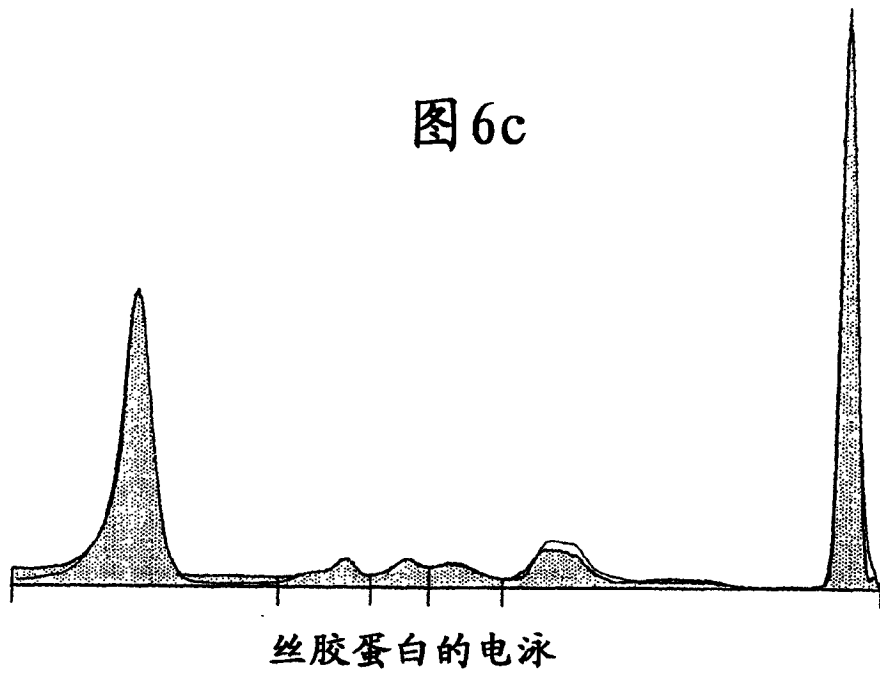
抗IgG

图6b



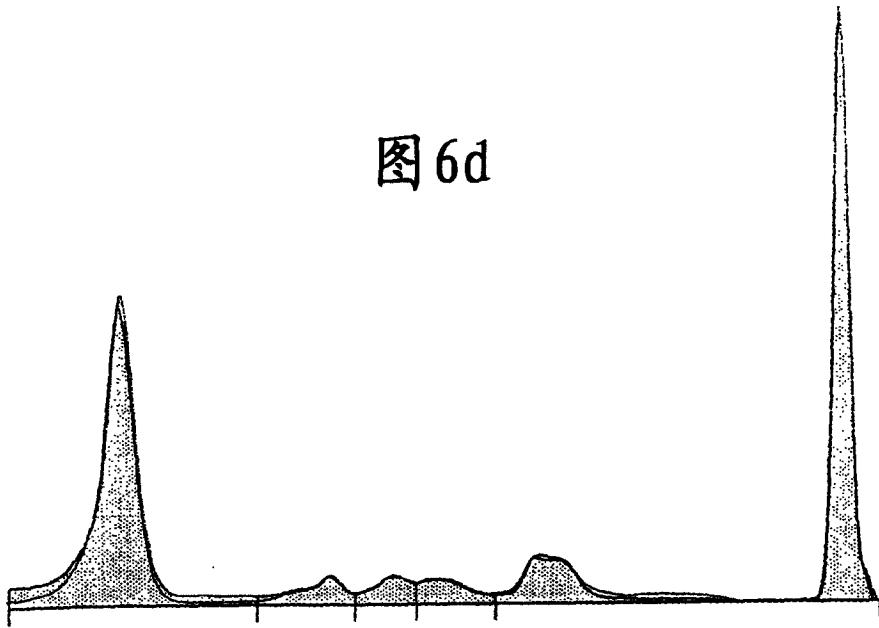
抗IgA

图6c



抗IgM

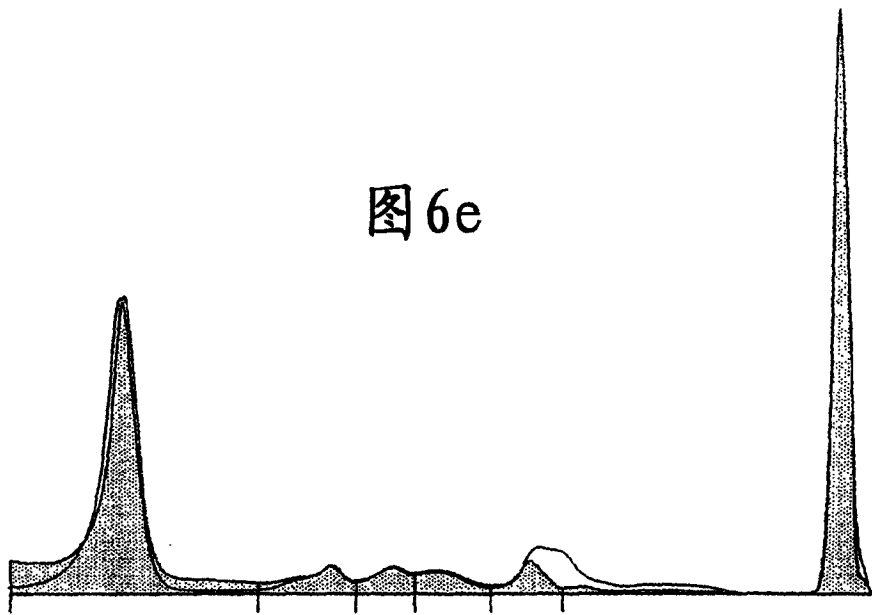
图 6d



丝胶蛋白的电泳

抗 κ

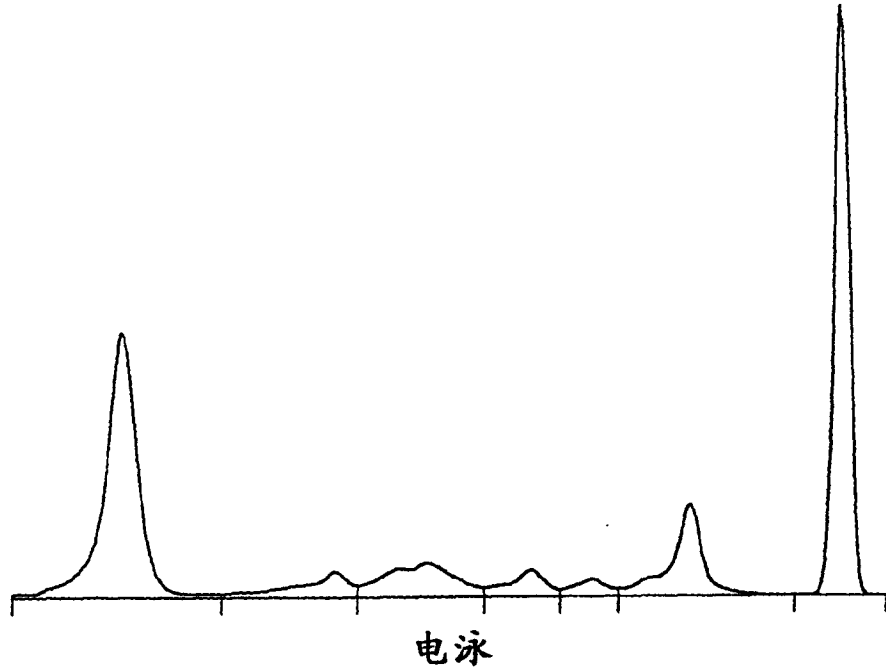
图 6e



丝胶蛋白的电泳

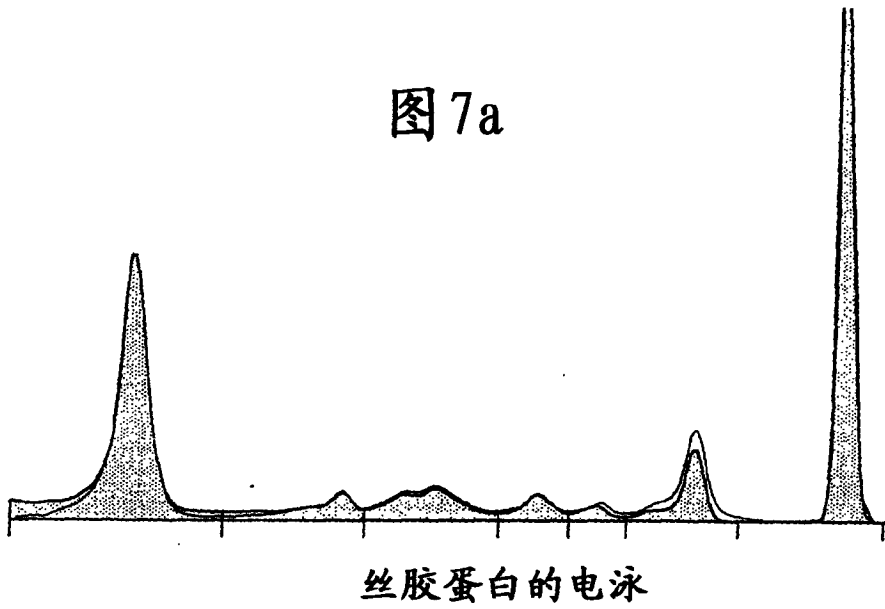
抗 λ

图7



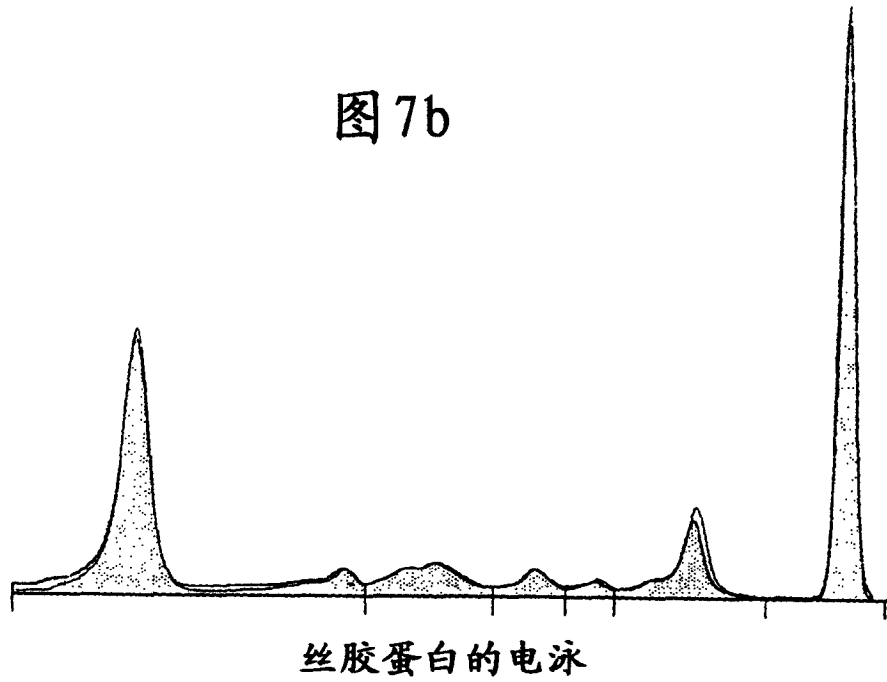
具有M型κ的血清-ELP

图7a



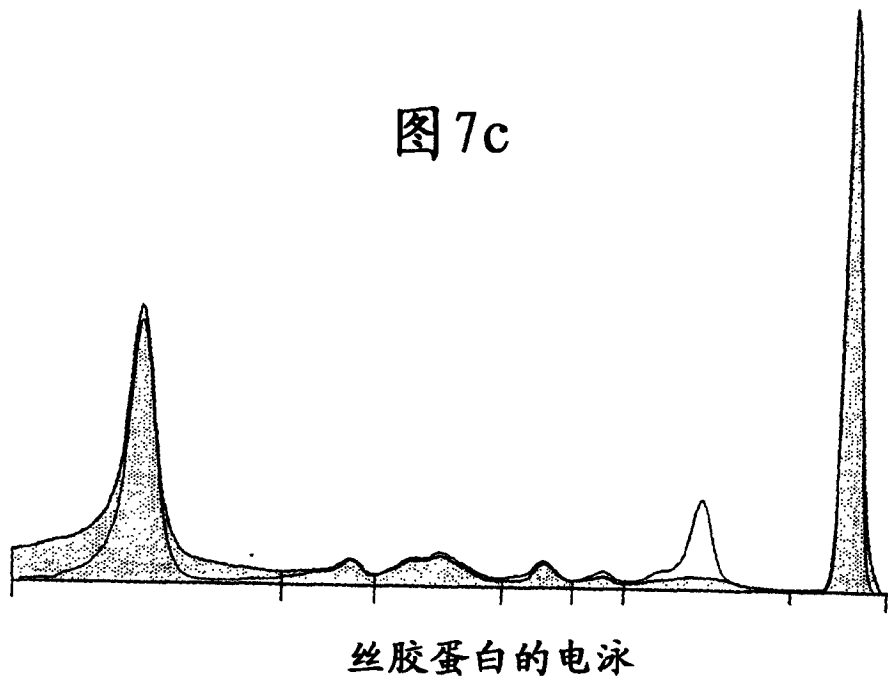
抗IgG

图7b



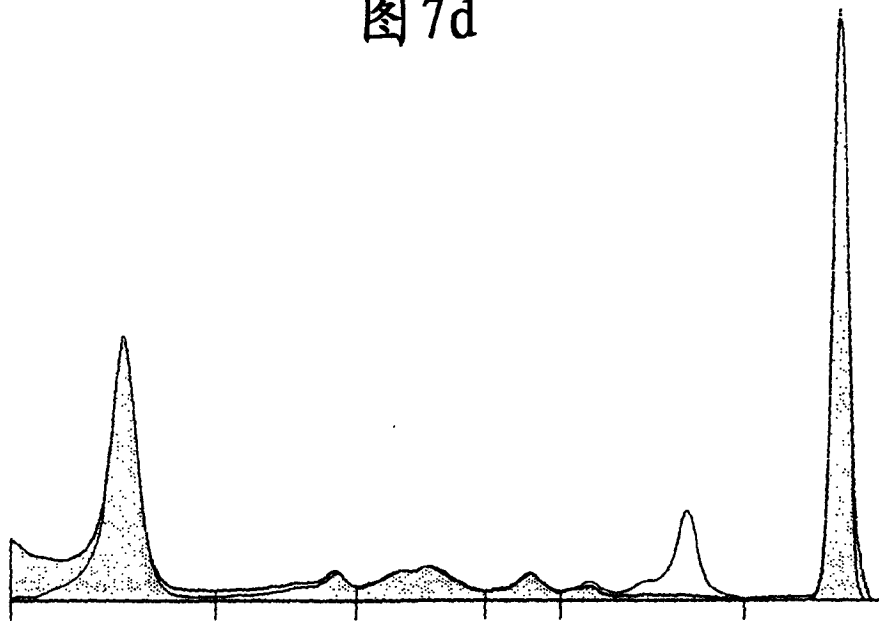
抗IgA

图7c



抗IgM

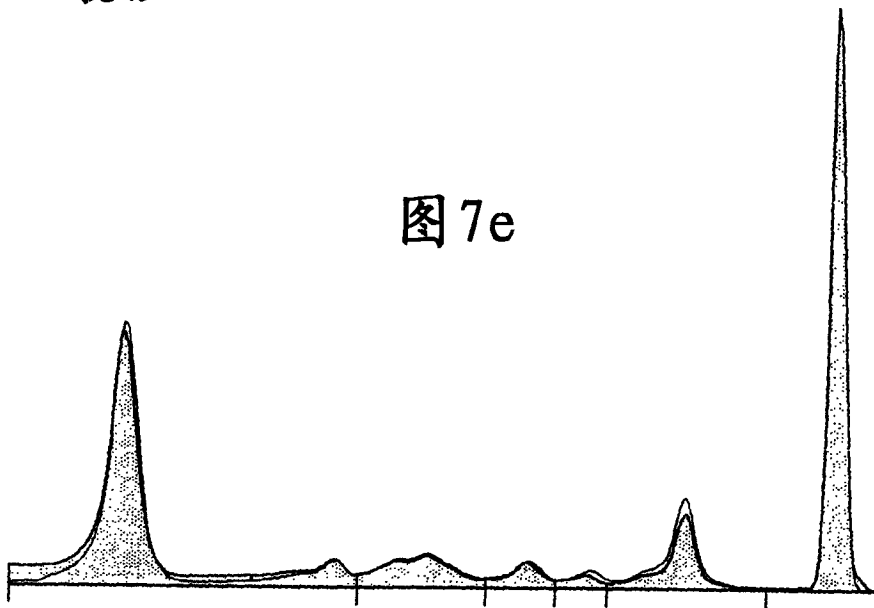
图 7d



丝胶蛋白的电泳

抗 κ

图 7e



丝胶蛋白的电泳

抗 λ

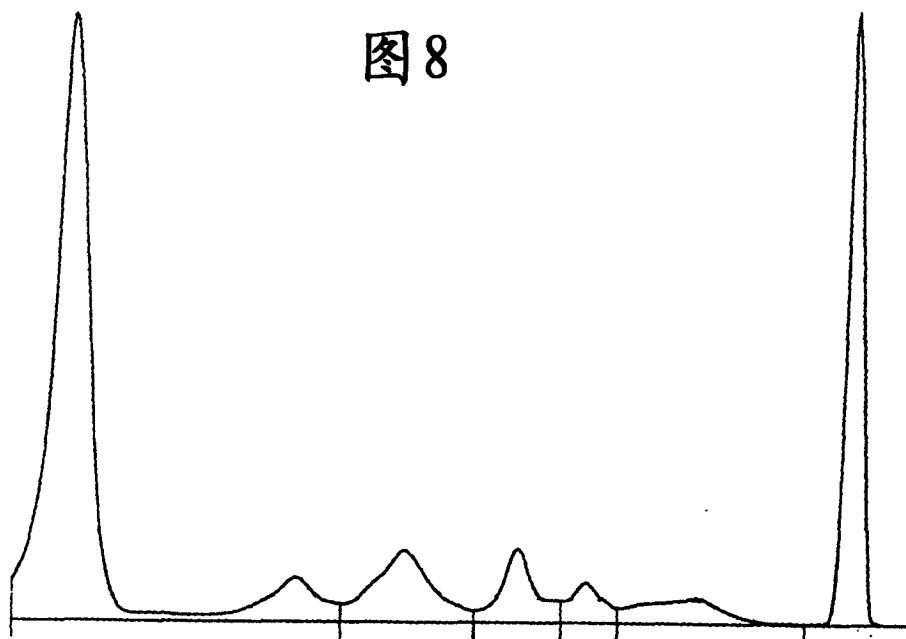


图 8

丝胶蛋白的电泳
位于 μ 区的具有游离 λ 的血清-ELP

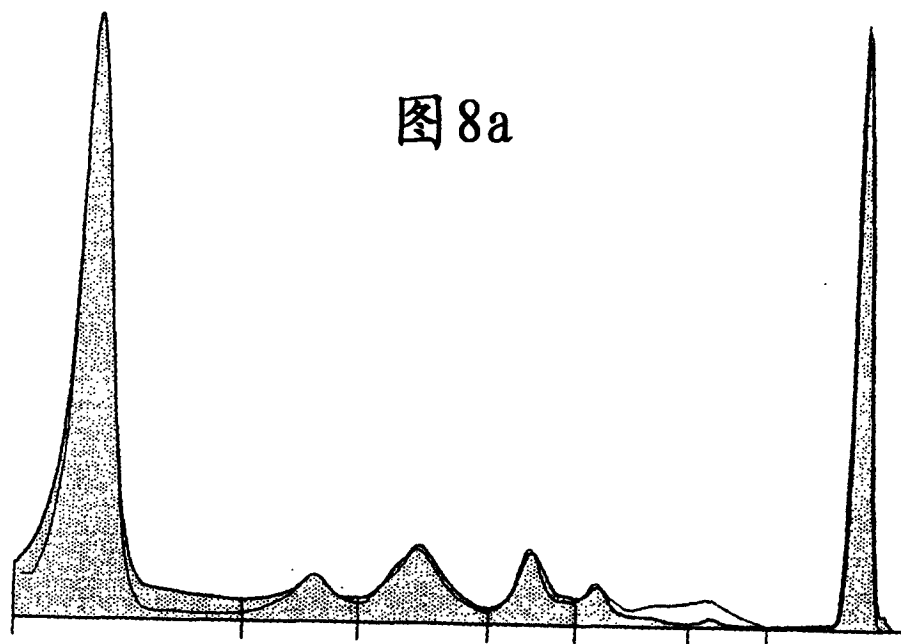
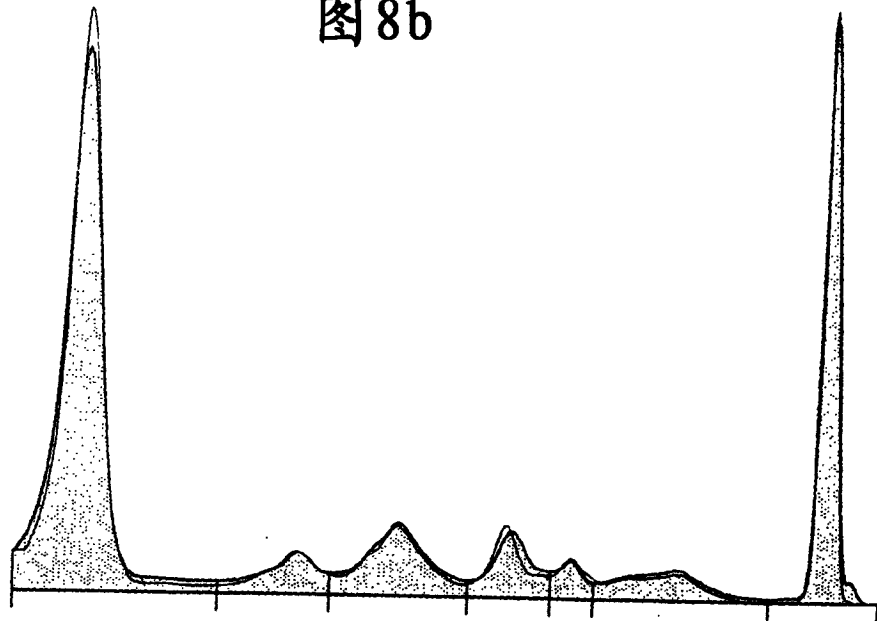


图 8a

丝胶蛋白的电泳

抗IgG

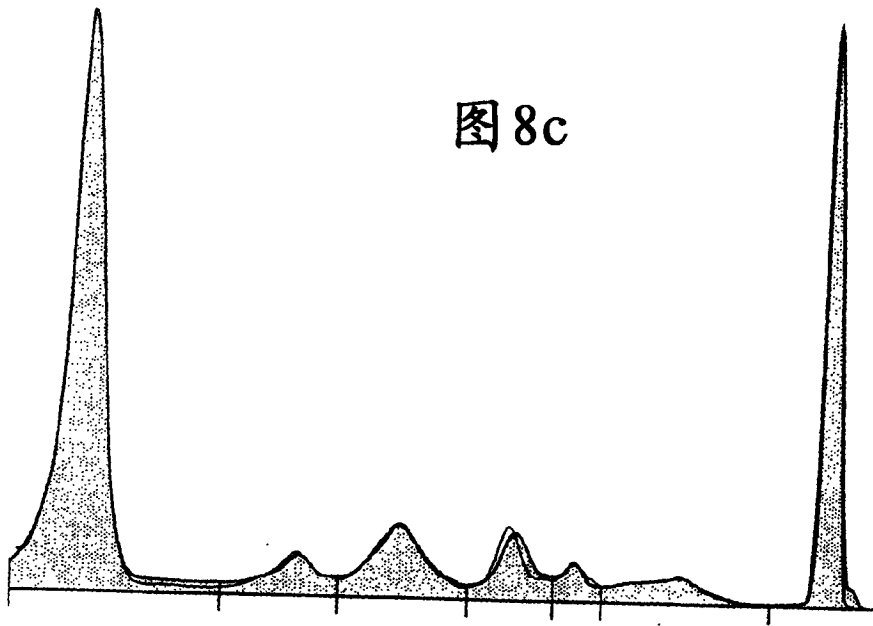
图8b



丝胶蛋白的电泳

抗 IgA

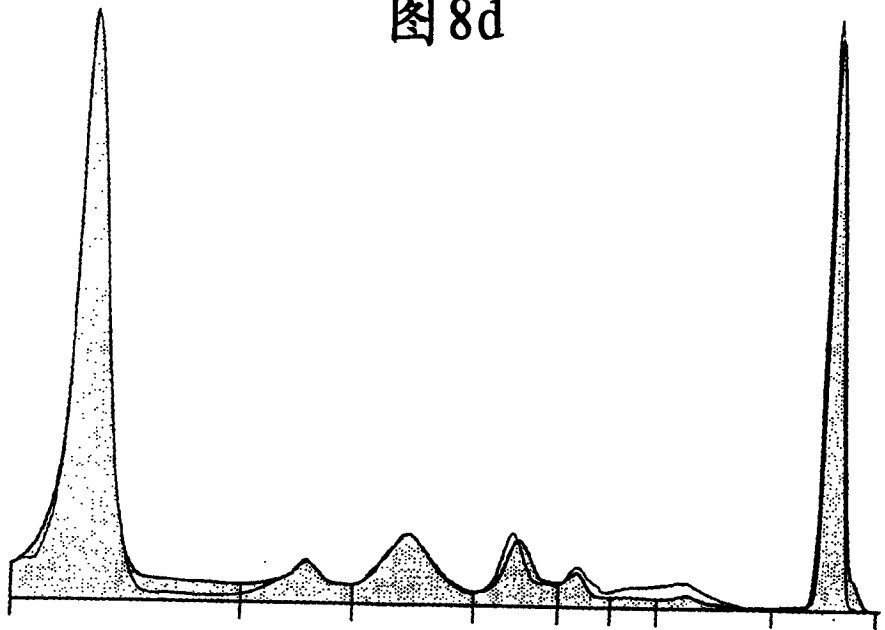
图8c



丝胶蛋白的电泳

抗 IgM

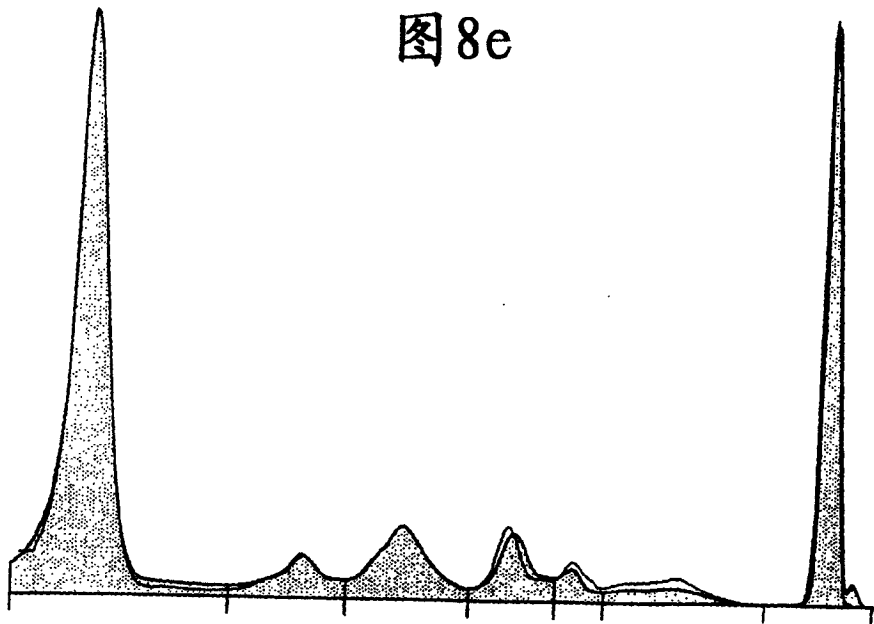
图 8d



丝胶蛋白的电泳

抗 κ

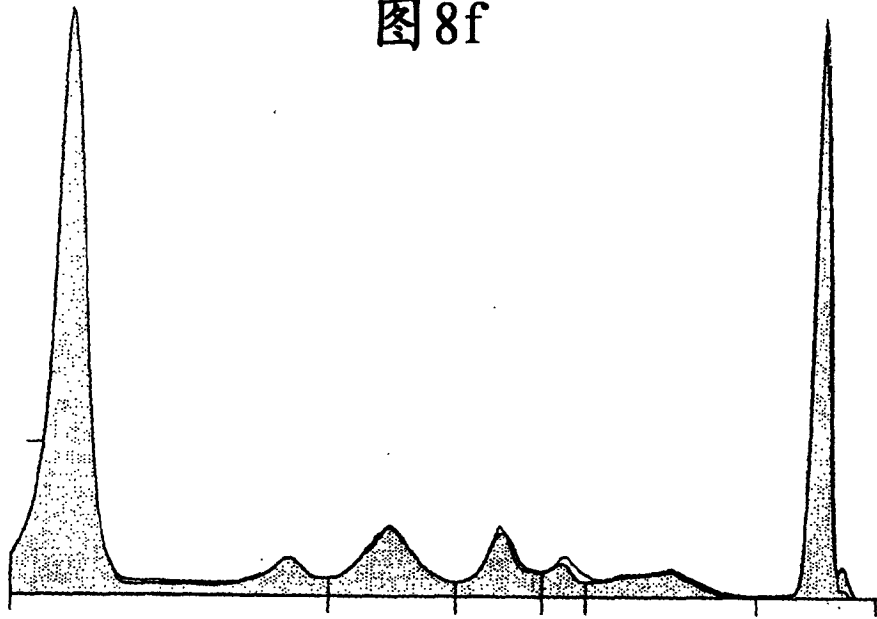
图 8e



丝胶蛋白的电泳

抗 λ

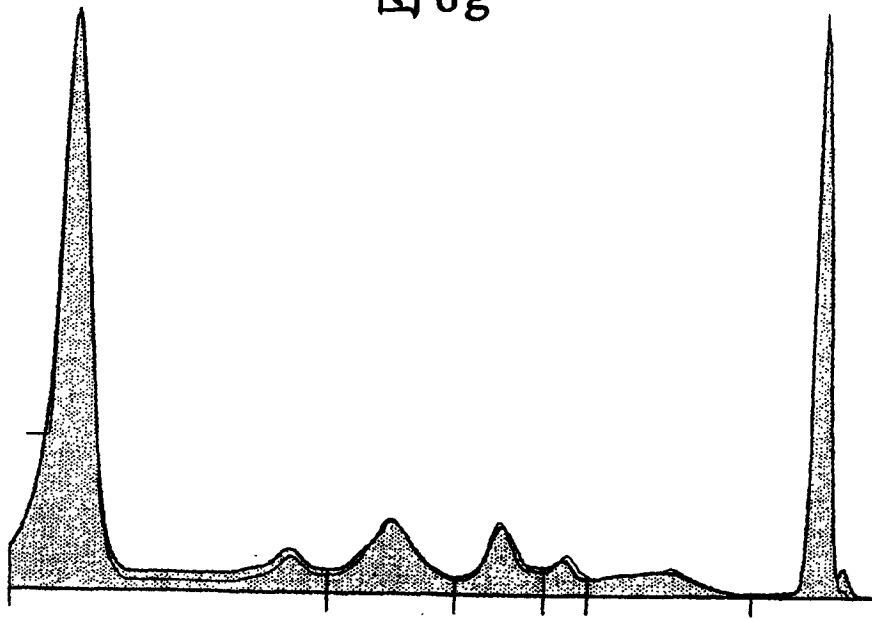
图 8f



丝胶蛋白的电泳

抗游离 K

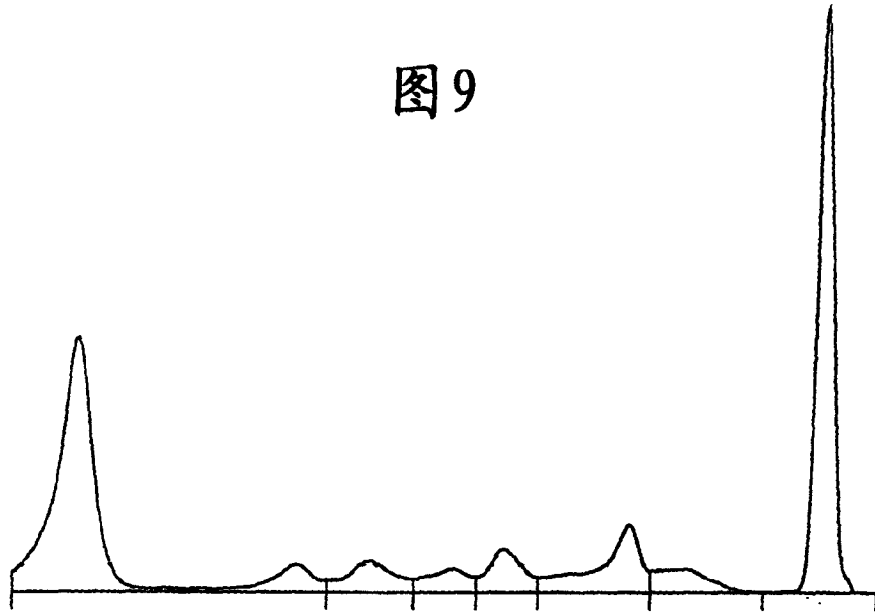
图 8g



丝胶蛋白的电泳

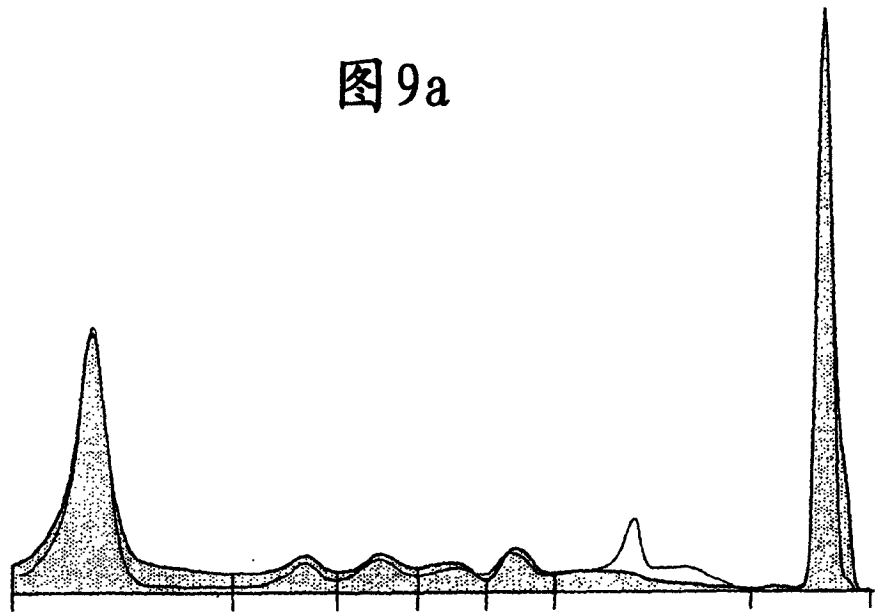
抗游离 入

图9



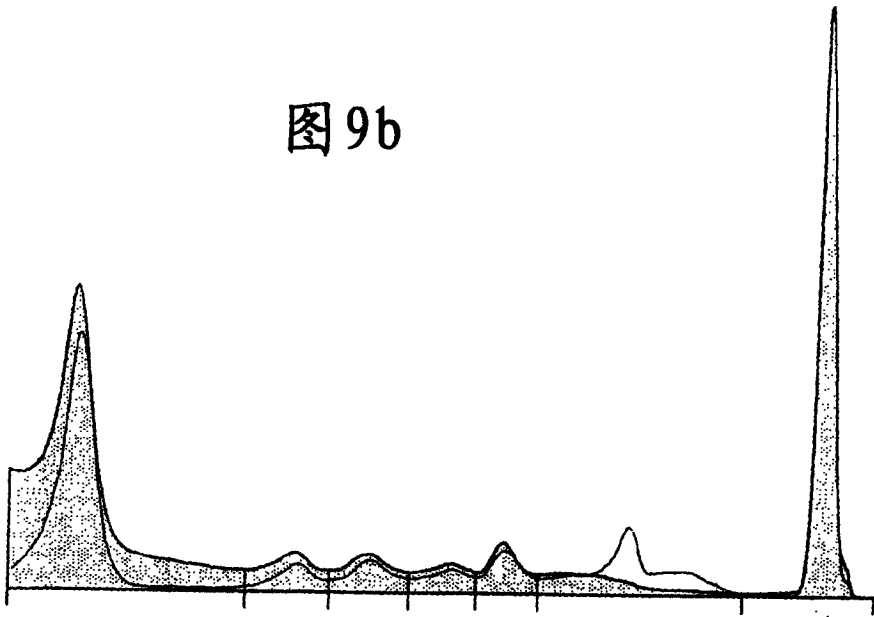
丝胶蛋白的电泳
γ 区域的具有G型λ 的血清-ELP

图9a



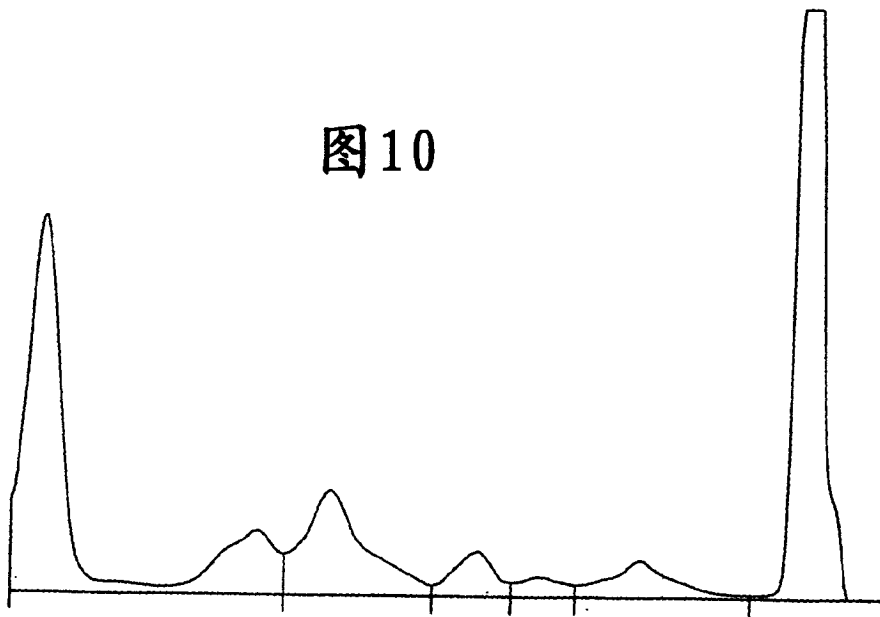
丝胶蛋白的电泳
移植有三羧酸酐的抗IgG

图 9b



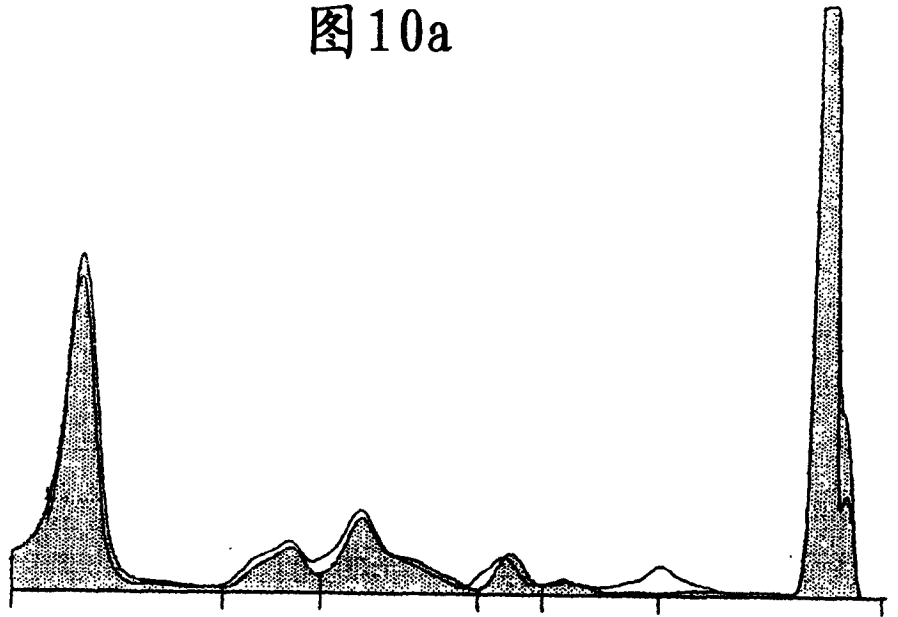
丝胶蛋白的电泳
移植有苯六甲酸的抗IgG

图 10



丝胶蛋白的电泳
在毛细管内方法中， γ 区域的具有G型 κ 的血清-ELP

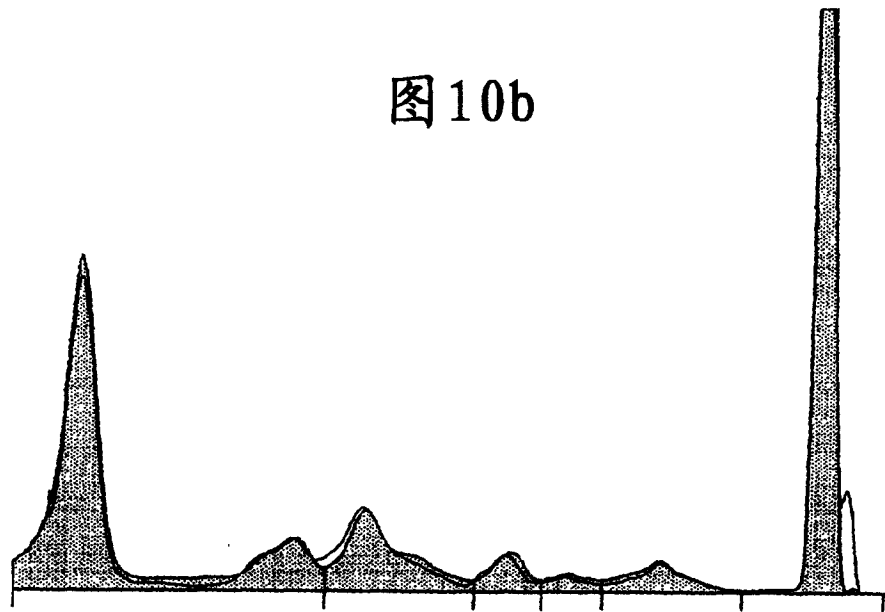
图10a



丝胶蛋白的电泳

抗IgG

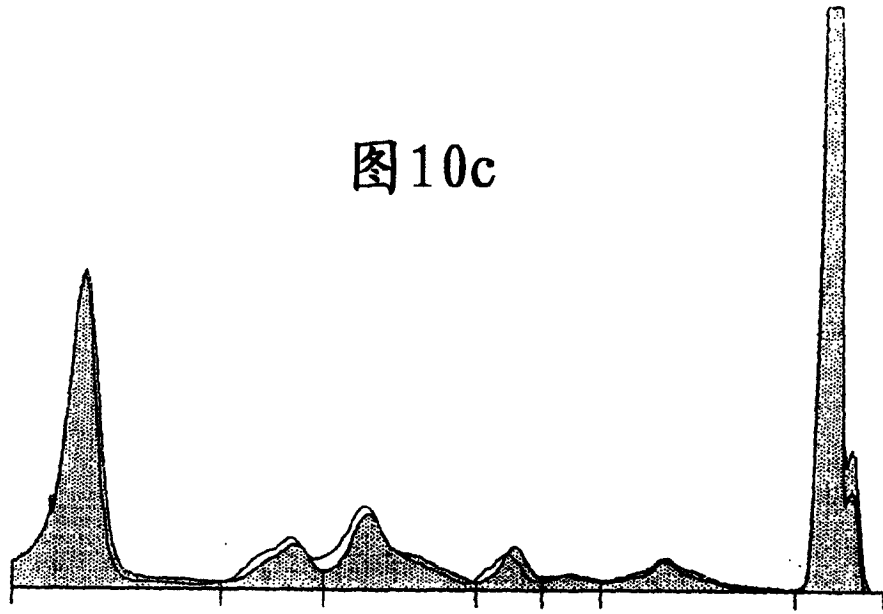
图10b



丝胶蛋白的电泳

抗IgA

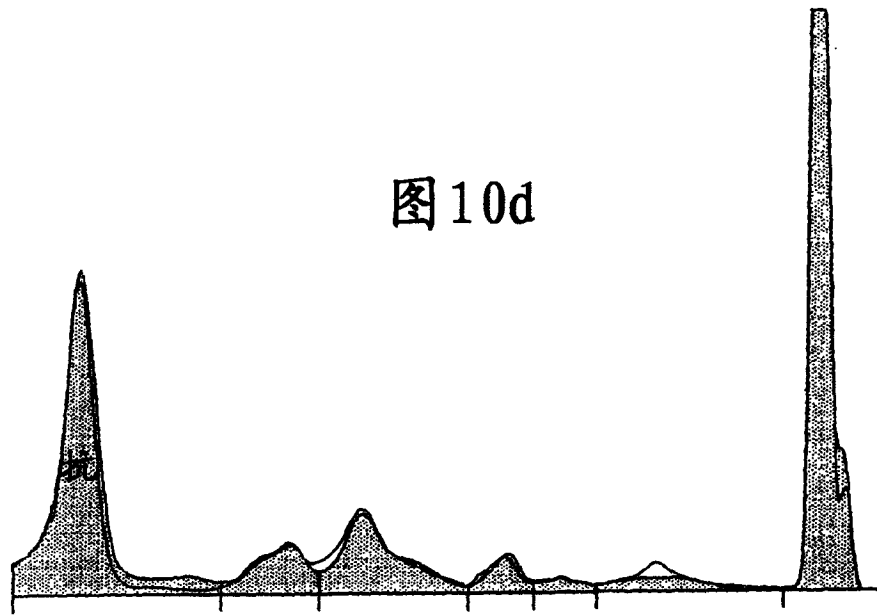
图10c



丝胶蛋白的电泳

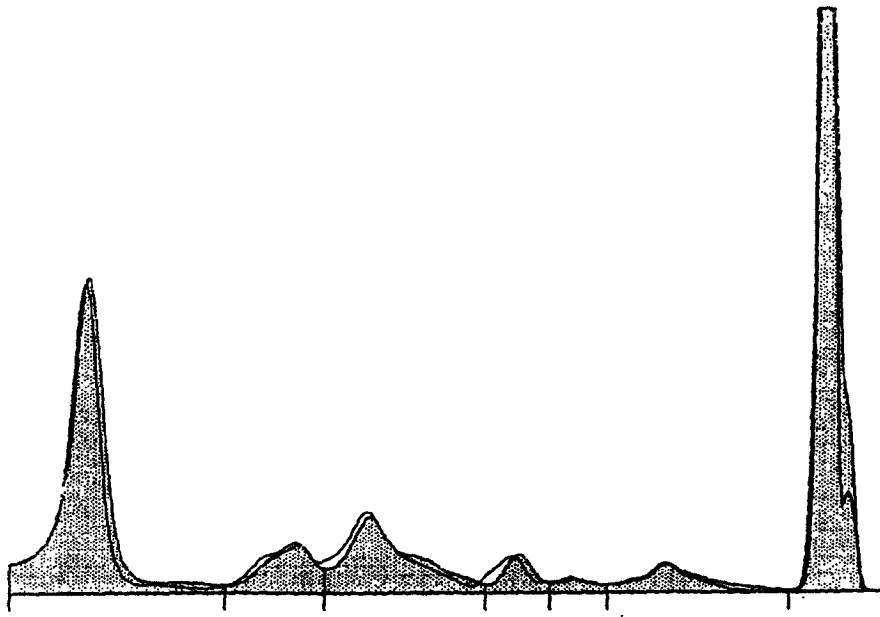
抗 IgM

图10d



丝胶蛋白的电泳

抗 κ

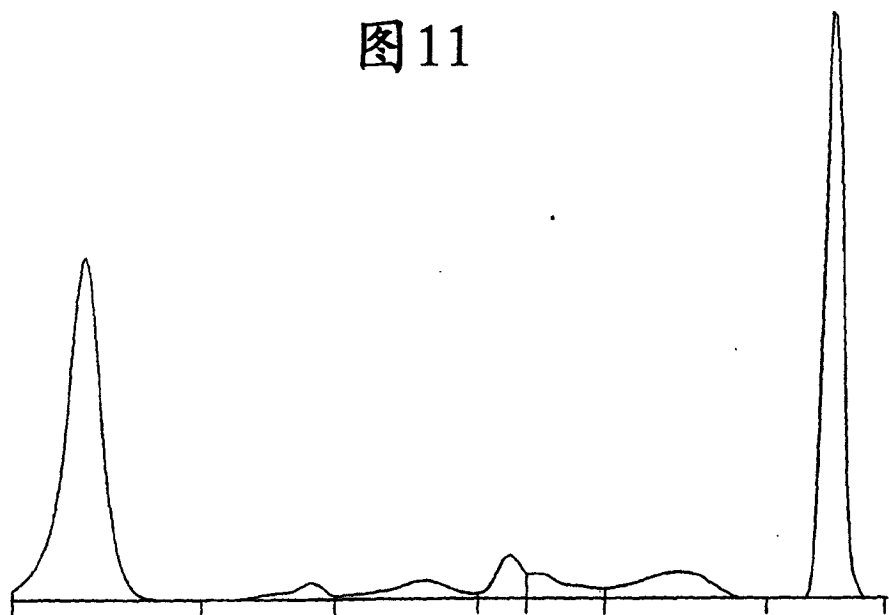


丝胶蛋白的电泳

抗λ

图 10e

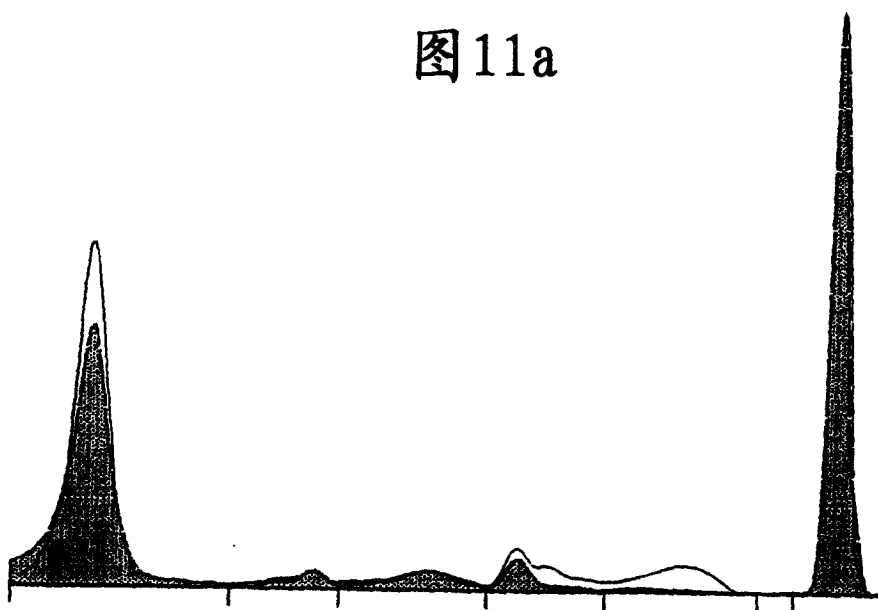
图 11



丝胶蛋白的电泳

峰突出于 β -1 区域的血清-ELP

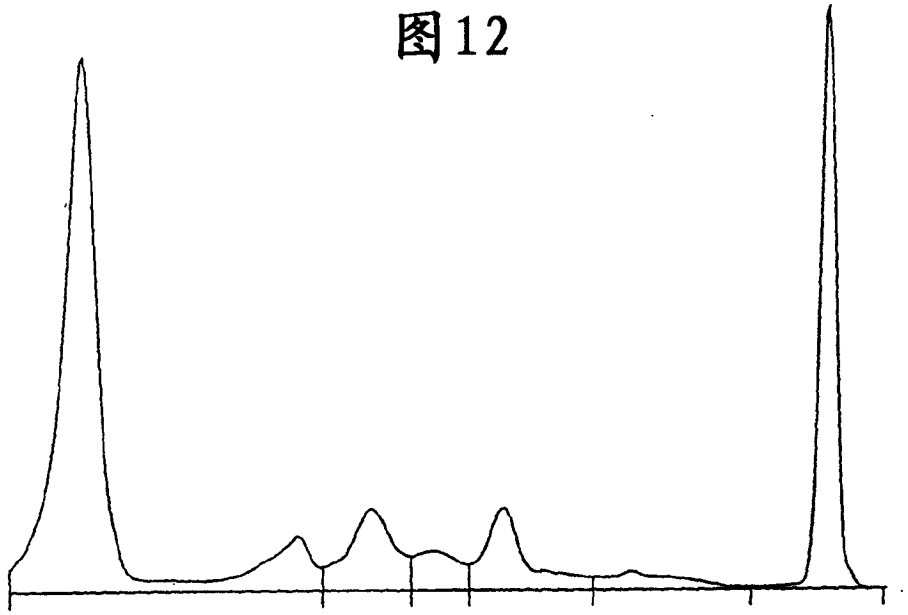
图 11a



丝胶蛋白的电泳

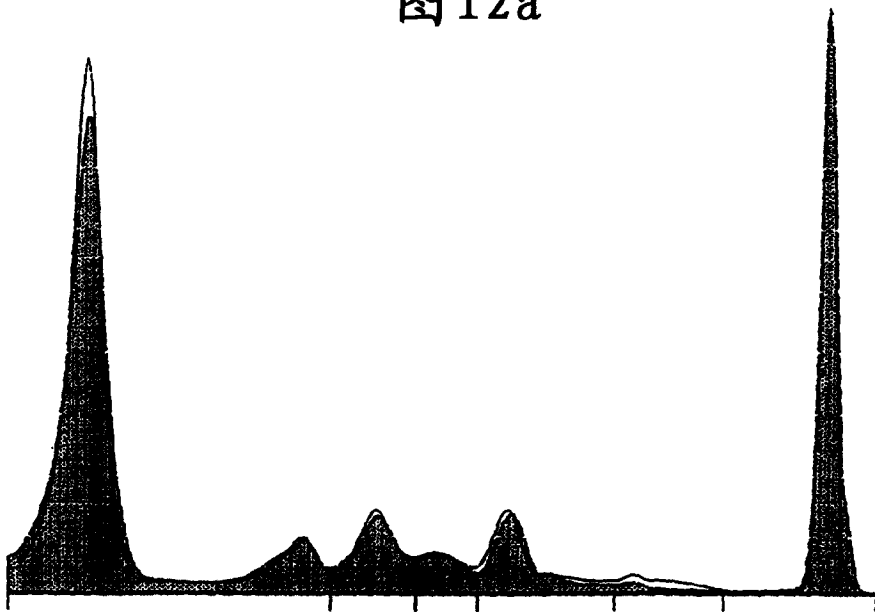
峰突出于 β -1 区域的血清-五价

图 12



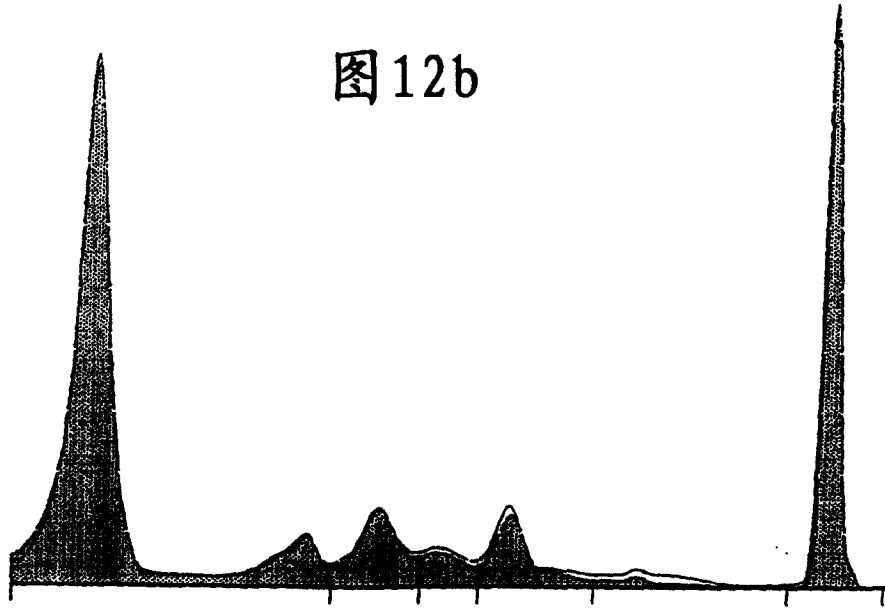
丝胶蛋白的电泳
在 γ 区域具有游离 λ 的血清-ELP

图 12a



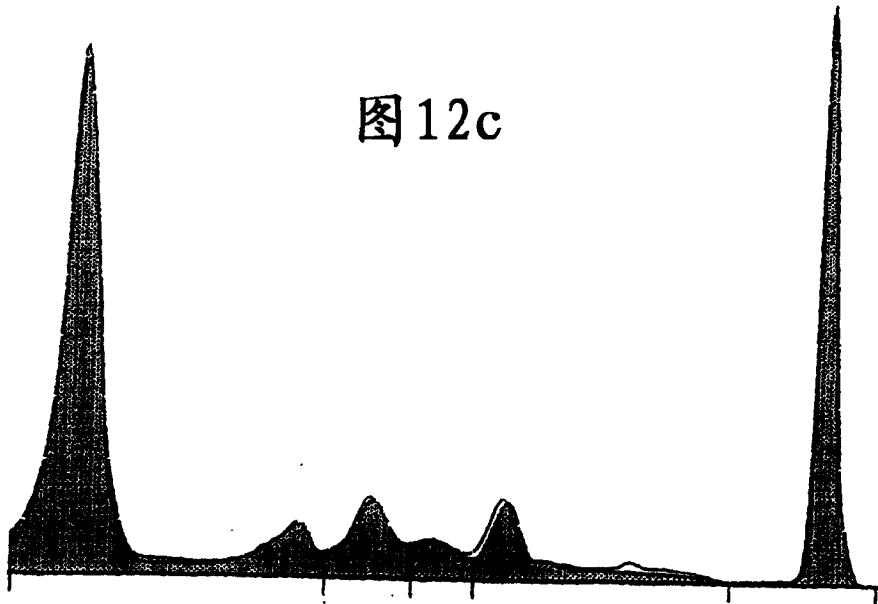
丝胶蛋白的电泳
在 γ 区域具有游离 λ 的血清-三价

图 12b



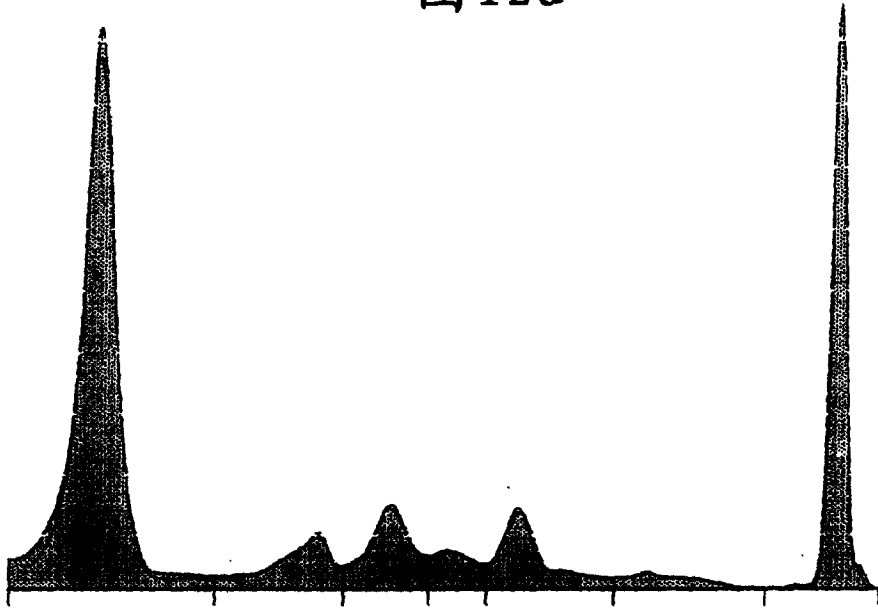
丝胶蛋白的电泳
在 γ 区域具有游离 λ 的血清-抗 κ

图 12c



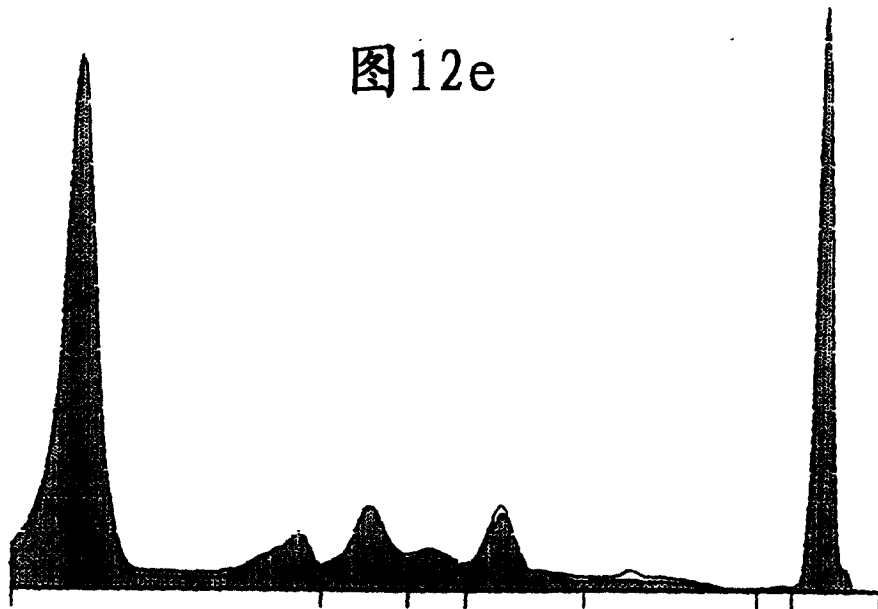
丝胶蛋白的电泳
在 γ 区域具有游离 λ 的血清-抗 λ

图12d



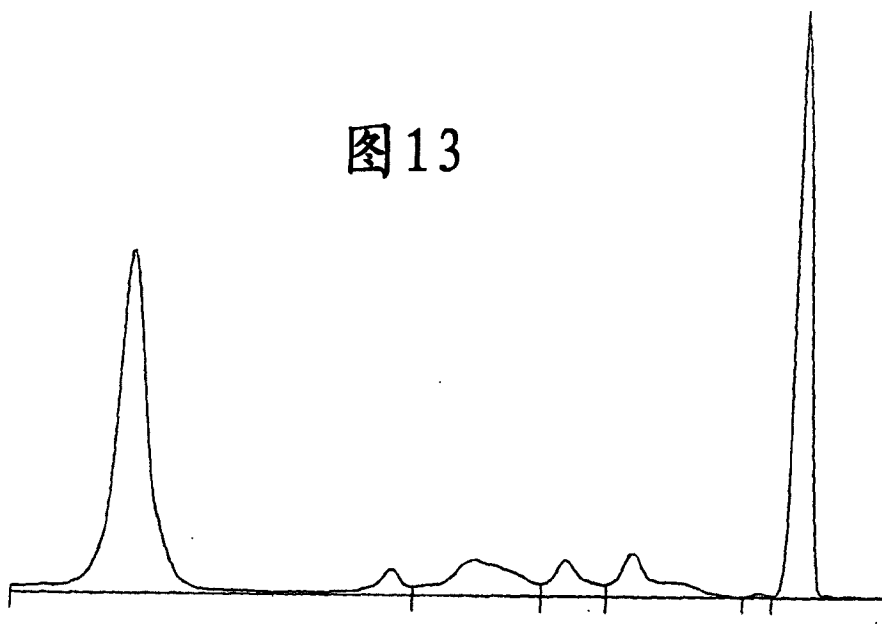
丝胶蛋白的电泳
在 γ 区域具有游离 λ 的血清-抗游离 κ

图12e



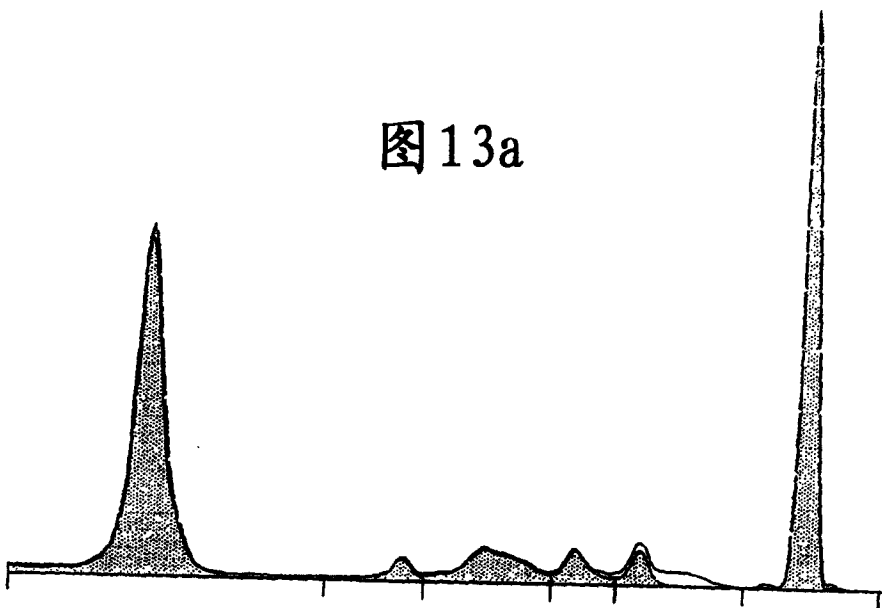
丝胶蛋白的电泳
在 γ 区域具有游离 λ 的血清-抗游离 λ

图13



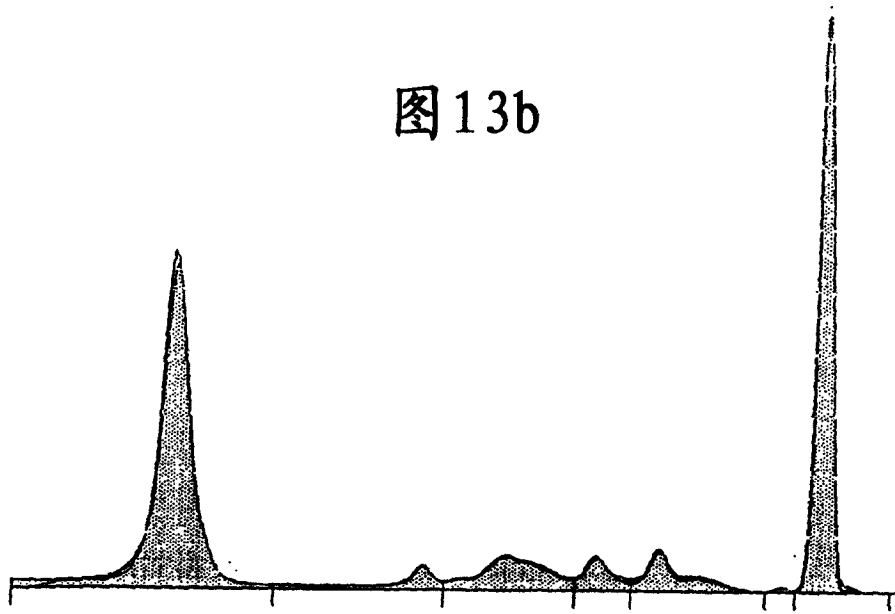
丝胶蛋白的电泳
在 γ 区域的具有M型 κ 的血清, Protein缓冲液-ELP

图13a



丝胶蛋白的电泳
抗IgG

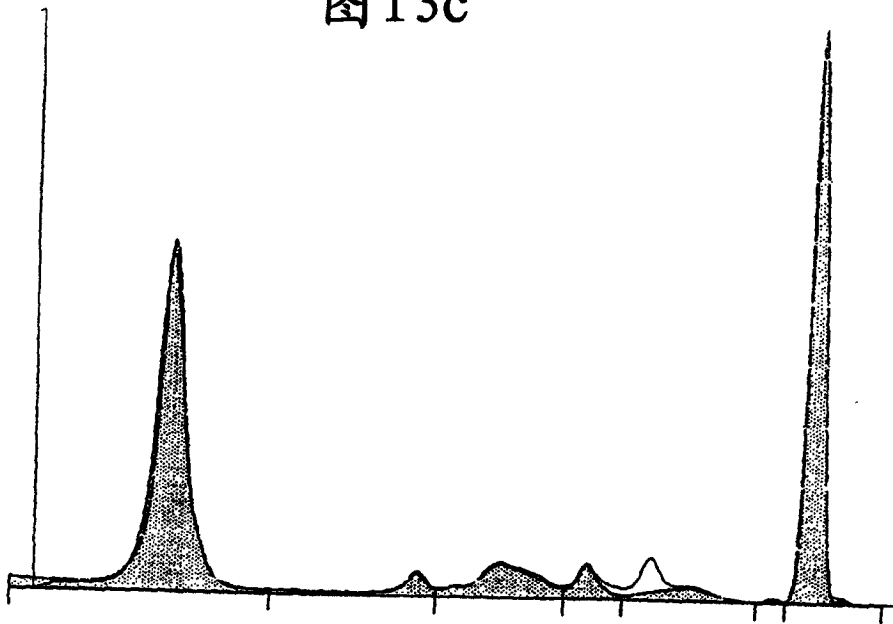
图13b



丝胶蛋白的电泳

抗IgA

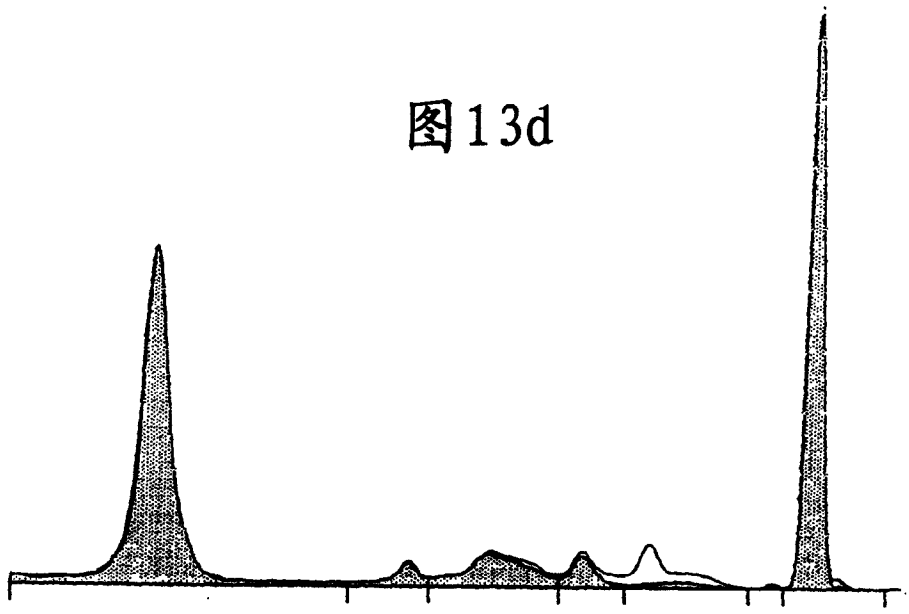
图13c



丝胶蛋白的电泳

抗IgM

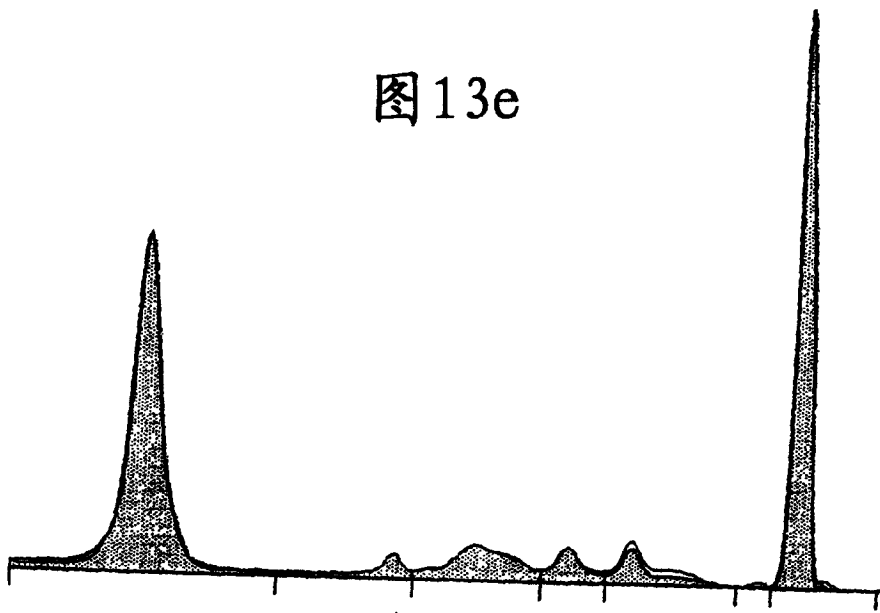
图13d



丝胶蛋白的电泳

抗κ

图13e



丝胶蛋白的电泳

抗λ

专利名称(译)	通过毛细管电泳和免疫位移对单克隆蛋白进行分析和分型		
公开(公告)号	CN1641353B	公开(公告)日	2012-06-06
申请号	CN200410103370.4	申请日	2004-11-12
申请(专利权)人(译)	莎碧亚公司		
当前申请(专利权)人(译)	莎碧亚公司		
[标]发明人	雷吉斯安德烈		
发明人	弗雷德里克·罗贝尔 雷吉斯·安德烈		
IPC分类号	G01N33/561 G01N33/53 G01N27/447 G01N33/537 C07K16/00 C07K16/06 C07K16/18 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/00 G01N33/6854 G01N33/561 G01N27/44726 C07K16/065		
代理人(译)	李华英		
优先权	2003013246 2003-11-12 FR		
其他公开文献	CN1641353A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过毛细管电泳和免疫位移对单克隆蛋白进行分析和分型本发明涉及对生物样品进行毛细管电泳分析的方法，包括采用带有超额负电荷的修饰抗体，当在电泳过程中分离生物样品中的蛋白质时，所述修饰抗体可以迁移至所述蛋白质的迁移区域之外的区域，所述抗体具有针对预定靶蛋白的抗原特异性。



丝胶蛋白的电泳
抗IgG DAKO窗口105-350秒, 122秒