

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510061036.1

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月23日

[11] 公开号 CN 1821273A

[22] 申请日 2005.10.10

[21] 申请号 200510061036.1

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 黄河 沈建根 来晓瑜 罗依

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 张法高 赵杭丽

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 5 页

[54] 发明名称

抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 及应用

[57] 摘要

本发明提供了一种抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4。以人骨髓间充质干细胞为抗原，应用杂交瘤技术制备了抗人间充质干细胞的单克隆抗体，并建立了以该单克隆抗体为探针通过流式细胞术、免疫组化、免疫荧光染色、免疫印迹检测间充质干细胞的方法。本发明为研究间充质干细胞的特异性标记提供了有效的工具，同时也为进一步阐明间充质干细胞的生物学特性提供了平台，并可推广应用多种检测技术以及临床研究。

1. 抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4, 该单克隆抗体亚型为 IgG1、 κ 型, 能与人骨髓间充质干细胞表面分子特异性结合, 产生该单克隆抗体的杂交瘤细胞是由免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞经融合、筛选、克隆、传代和反复冻存、复苏后获得的小鼠杂交瘤细胞系 ZUB4, 能稳定分泌单克隆抗体 ZUB4, 其在中国典型培养物保藏中心保藏, 保藏号为: CCTCC No. C200511, 保藏日期为: 2005 年 8 月 30 日。

2. 根据权利要求 1 所述的抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 的制备方法, 其特征是通过以下技术方案实现:

(1) 免疫原的准备: 以多供体来源的传代培养、低温冻存复苏后培养的第三~第五代的人骨髓间充质干细胞作为动物免疫的抗原。人骨髓间充质干细胞采用 Ficoll-paque 密度梯度离心结合贴壁筛选法分离培养获得, 目前公认的人间充质干细胞表面分子 CD29、CD44、CD166、CD105 阳性标记出现单峰, 造血细胞分化抗原 CD14、CD34、CD45、HLA-DR 表达阴性, 是一高度均质细胞群; 可以多次传代, 扩增至第八代细胞数可达 $2\sim 3\times 10^{10}$ 左右; 通过体外定向诱导可分化为间充质来源的成骨细胞和脂肪细胞, 也能分化为其他胚层来源的细胞; 所用的冻存方法在复苏后人骨髓间充质干细胞存活率高, 不影响细胞的生长特性、免疫表型、及增殖和多向分化潜能。

(2) 动物免疫: 选取 2~3 份供体来源的混合的人骨髓间充质干细胞, 免疫 BALB/c 小鼠, 以期产生针对间充质干细胞共同识别位点的特异性单克隆抗体。每只小鼠以 1.0×10^6 细胞腹腔注射, 每周 1 次, 共 3 次; 第 4 周加强免疫一次, 3 天后待融合。

(3) 杂交瘤细胞系的建立: 取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞以 PEG 介导融合。融合后细胞经 HAT 培养基选择性培养, 以间接免疫荧光法筛选阳性克隆。用有限稀释法对阳性孔的杂交瘤细胞进行克隆化培养, 直到克隆化细胞抗体阳性率为 100%。将杂交瘤细胞经体外连续传代 3 个月以上和反复冻存、复苏, 直到细胞系能稳定分泌单克隆抗体。

(4) 单克隆抗体的制备与纯化: 将建系的杂交瘤细胞注射到经石蜡油预处理的小鼠腹腔, 诱生腹水。诱生的腹水用盐析法和离子交换法获得纯化的单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4，在检测人间充质干细胞中应用。

4. 根据权利要求 3 所述的抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 的应用，其特征是：以该单克隆抗体为探针，通过流式细胞术检测培养扩增的间充质干细胞及骨髓细胞悬液中的间充质干细胞，并进行定量分析。

5. 根据权利要求 3 所述的抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 的应用，其特征是：采用免疫组织化学染色法检测培养扩增的间充质干细胞、骨髓组织切片和其他组织切片中的间充质干细胞相应抗原的表达，并对间充质干细胞的分布进行定位分析。

6. 根据权利要求 3 所述的抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 的应用，其特征是：结合荧光二抗，用免疫荧光染色法标记培养扩增的间充质干细胞、全骨髓细胞、其他细胞及组织冰冻切片的相应抗原，对间充质干细胞的相应抗原的表达进行定位和定量分析，并可检测间充质干细胞在组织中的分布。

7. 根据权利要求 3 所述的抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 的应用，其特征是：采用免疫印迹法检测单克隆抗体 ZUB4 的相应抗原在培养扩增的间充质干细胞及其他相关细胞中的表达。

抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 及应用

技术领域：

本发明属生物技术领域，涉及抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 及应用。

背景技术：

间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cells，间充质干细胞）是近年来成体干细胞研究领域的热点，其可以从骨髓、脐带血、脂肪组织、滑膜、骨骼肌、肺、乳牙中分离获得，具有分裂、增殖、分化成多种细胞的潜能，在一定的体内或体外诱导条件下可以分化为各个胚层的细胞，如脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、肌腱细胞、肌肉细胞、星形胶质细胞、神经元细胞、上皮细胞等；间充质干细胞免疫原性弱，不表达 MHC-II 类分子和 T 细胞共刺激分子，并具有免疫调节活性，这使异基因间充质干细胞的应用成为可能；通过基因修饰方法，可使间充质干细胞定向地表达某些特异的分子而作为细胞介导的基因治疗的理想载体。间充质干细胞是组织工程和再生医学的种子细胞，在临床应用中有广阔的前景。目前美国和欧洲多个研究中心已开展自体 and 异基因间充质干细胞治疗多种疾病的 I、II 期临床试验，主要应用于心肌梗死、成骨不全、大块的骨缺损、软骨缺损、肌腱损伤、韧带损伤的修复和重建，并对异染性脑白质营养不良（Metachromatic Leukodystrophy，MLD）、赫尔利综合征（Hurler Syndrome，MPSIH）、重型再生障碍性贫血、移植物抗宿主病等疾病的治疗有一定的临床疗效；国内亦着手开展间充质干细胞治疗重大疾病的 I 期临床研究。

骨髓间充质干细胞是由 Friedenstein 在 20 世纪 60 年代首次证实，是在骨髓中的一种非造血系统的干细胞。骨髓间充质干细胞在骨髓中以低密度存在，约 $10^4 \sim 10^5$ 个单个核细胞中含有一个间充质干细胞，但其在体外培养可以倍增 50 次而不改变其表型特征和分化潜能。迄今为止间充质干细胞没有特异性的表面标记，其不表达 CD34、CD45、CD14、血型糖蛋白 A 及 T 或 B 淋巴细胞的表面标志，认为相对特异性表面抗原 SH2、SH3、SH4、STRO-1、CD166 等。目前各个实验室主要还是通过密度梯度离心联合贴壁培养方法和免疫分选法阳性或阴性筛选获得间充质干细胞，培养传代的间充质干细胞是一群相对均一

的细胞，但是不同的分离培养条件导致获得的间充质干细胞可能来源于不同的亚群，其生物学特性可能存在一定的差异。研究者正努力寻求间充质干细胞的特异性标记，以进一步认识其生物学特性。

20世纪90年代起研究者通过杂交瘤技术，研制开发了多种人间充质干细胞相关的单克隆抗体：1991年 Paul J. Simmons 等以骨髓 CD34⁺细胞免疫小鼠获得了人骨髓基质细胞新的单克隆抗体 STRO-1；1992年 Haynesworth SE 等研制了3个间充质干细胞的单克隆抗体 SH2、SH3、SH4，之后进一步研究证实 SH2 的抗原表位位于 CD105 上，SH3、SH4 的抗原表位位于 CD73 上；1997年 J.C. Joyner 等研制的单克隆抗体 HOP-26，针对间充质干细胞成骨分化的前体细胞有特异性，研究证实其抗原表位为 CD63 上的肽段；1997年 S.P. Bruder 等将骨髓间充质干细胞诱导分化的成骨细胞免疫小鼠获得单克隆抗体 SB-10，与间充质干细胞成骨分化相关，SB-10 的抗原表位位于 CD166 上；2005年 Hyun-Jung Hoo 等报道采用骨髓间充质干细胞及细胞膜蛋白提取物免疫小鼠，获得单克隆抗体 YS08、YS14、YS18。间充质干细胞及其相关细胞的单克隆抗体的研究丰富了对间充质干细胞表面分子及其分化抗原的认识，但目前对间充质干细胞表型仍缺乏全面的认识，尚未发现其单一的特异性标记，因此进一步认识间充质干细胞的特异性标记及生物学特性，将推进间充质干细胞的研究和应用。

发明内容

本发明的一个目的是提供抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体，该单克隆抗体亚型为 IgG1、 κ 型，命名 ZUB4，能与人骨髓间充质干细胞表面分子特异性结合，用 ZUB4 通过免疫印迹法检测提取的人骨髓间充质干细胞蛋白，可获得单一的特异性阳性条带。该单克隆抗体与人外周血淋巴细胞、人血液系统细胞株及其他组织细胞株、人间充质组织及非间充质组织、大鼠间充质干细胞、其他动物骨髓细胞无交叉反应。

本发明的第二个目的是提供抗骨髓间充质干细胞单克隆抗体的制备方法，通过以下技术方案实现：

(1) 免疫原的准备：以多供体来源的传代培养、低温冻存复苏后培养的第三~第五代的人骨髓间充质干细胞作为动物免疫的抗原。人骨髓间充质干细胞采用 Ficoll-paque 密度梯度离心结合贴壁筛选法分离培养获得，目前公认的人间充质干细胞表面分子 CD29、CD44、CD166、CD105 (SH2) 阳性标记出现单峰，造血细胞分化抗原 CD14、CD34、CD45、HLA-DR 表达阴性，是一

高度均质细胞群；可以多次传代，扩增至第8代细胞数可达 $(2\sim3)\times 10^{10}$ 左右；通过体外定向诱导可分化为间充质来源的成骨细胞和脂肪细胞，也能分化为其他胚层来源的细胞（如神经元样细胞）；所用的冻存方法在复苏后人骨髓间充质干细胞存活率高，不影响细胞的生长特性、免疫表型、及增殖和多向分化潜能。

(2) 动物免疫：选取2~3份供体来源的混合的人骨髓间充质干细胞，免疫BALB/c小鼠，以期产生针对间充质干细胞共同识别位点的特异性单克隆抗体。每只小鼠以 1.0×10^6 细胞腹腔注射，每周1次，共3次；第4周加强免疫一次，3天后待融合。

(3) 杂交瘤细胞系的建立：取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）以PEG介导融合。融合后细胞经HAT培养基选择性培养，以间接免疫荧光法筛选阳性克隆。用有限稀释法对阳性孔的杂交瘤细胞进行克隆化培养，直到克隆化细胞抗体阳性率为100%。将杂交瘤细胞经体外连续传代3个月以上和反复冻存、复苏，直到细胞系能稳定分泌单克隆抗体。

(4) 单克隆抗体的制备与纯化：将建系的杂交瘤细胞注射到经石蜡油预处理的小鼠腹腔，诱生腹水。诱生的腹水用盐析法和离子交换法获得纯化的单克隆抗体。

本发明的第三目的是提供产生单克隆抗体的杂交瘤细胞，它是由免疫的BALB/c小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞经融合、筛选、克隆、传代和反复冻存、复苏后获得的小鼠杂交瘤细胞系ZUB4，能稳定分泌单克隆抗体ZUB4，其在中国典型培养物保藏中心保藏，保藏号为：CCTCC No. C200511，保藏日期为：2005年8月30日。

本发明的第四个目的是建立应用该单克隆抗体，通过流式细胞术、免疫组化、免疫荧光染色、免疫印迹等技术检测间充质干细胞的方法。

以抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体ZUB4为探针，通过流式细胞术可以检测培养扩增的间充质干细胞及骨髓细胞悬液中的间充质干细胞，并进行定量分析。

用抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体ZUB4，采用免疫组织化学染色法检测培养扩增的间充质干细胞、骨髓组织切片和其他组织切片中的间充质干细胞相应抗原的表达，并对间充质干细胞的分布进行定位分析。

用抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体ZUB4，结合荧光二抗，用免疫荧光染色法标记培养扩增的间充质干细胞、全骨髓细胞、其他细胞及组织冰冻切片

的相应蛋白分子，对间充质干细胞的相应蛋白分子的表达进行定位和定量分析，并可检测间充质干细胞在组织中的分布。

用抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4，采用免疫印迹法（Western-blot）检测单克隆抗体 ZUB4 的相应抗原在培养扩增的间充质干细胞及其他相关细胞中的表达。

本发明应用建立的人骨髓间充质干细胞的培养、冻存体系，采用多供者来源骨髓间充质干细胞为抗原免疫 BALB/c 小鼠，成功了制备一种新的抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体，可用于间充质干细胞的鉴定，为研究间充质干细胞的特异性标记提供了有效的工具，同时也为进一步阐明间充质干细胞的生物学特性提供了平台，并可推广应用于多种检测技术以及临床研究。

附图说明：

图 1 为用密度梯度离心和贴壁培养法获取的人骨髓间充质干细胞。A 为培养的原代人骨髓间充质干细胞，B 为冻存复苏后培养的人骨髓间充质干细胞。

图 2 为培养扩增第一代和第四代人骨髓间充质干细胞的生长曲线。

图 3：低温冻存前后第四代人骨髓间充质干细胞的生长曲线。

图 4：培养的第四代人骨髓间充质干细胞分别用 CD14-FITC、CD45-FITC、CD44-FITC、HLA-DR-FITC、CD34-PE、CD29-PE、CD166-PE、CD105-PE 标记，图为流式细胞术分析图。

图 5：人骨髓间充质干细胞向成骨定向诱导分化。A 为诱导分化的成骨细胞，B 为诱导成骨分化后 Von Kossa 法染色。

图 6：人骨髓间充质干细胞向脂肪定向诱导分化。A 为诱导分化的脂肪细胞，B 为诱导脂肪分化后油红 O 染色。

图 7：人骨髓间充质干细胞向神经元样细胞定向诱导分化。A 为诱导分化的神经元样细胞，B、C、D、E 分别为诱导神经分化后用免疫组织化学染色法检测神经干细胞标志物 Nestin、神经元标志物 NSE、神经元标志物 NF-M、星形胶质细胞标志物 GFAP 的表达。

图 8：以单克隆抗体 ZUB4，通过间接免疫荧光染色法检测人骨髓间充质干细胞。

图 9：用免疫组织化学染色法检测抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 的相应抗原在骨髓组织中的表达。

图 10：以单克隆抗体 ZUB4，通过流式细胞术检测人骨髓间充质干细胞。A 为阴性对照，B 为以 ZUB4 为探针的流式细胞术分析结果。

图 11 以单克隆抗体 ZUB4, 通过免疫组织化学染色法检测人骨髓间充质干细胞。A 为人骨髓间充质干细胞爬片, B 为人骨髓间充质干细胞团块。

图 12: 以单克隆抗体 ZUB4, 通过免疫印迹法检测人骨髓间充质干细胞中相应抗原的表达。

具体实施方式

实施例 1: 人骨髓间充质干细胞分离培养、鉴定、冻存及复苏

(1) 人骨髓间充质干细胞分离培养

无菌条件下采集六份健康供者的骨髓, 肝素抗凝, 用 Ficoll-paque (比重 1.077) 密度梯度离心收集单个核细胞, 以 4×10^5 个细胞/cm² 密度接种, 用含 10% (V/V) 胎牛血清的低糖 DMEM (LG-DMEM) 培养液, 置于 37°C、体积分数为 5%CO₂ 培养箱培养。48h 后更换培养液, 弃去非贴壁细胞可见有梭形贴壁细胞, 之后每 3d 换液 1 次, 15~20d 原代培养细胞贴壁融合达 80%~90%, 排列有明显方向性, 成漩涡状、网状、辐射状, 与成纤维细胞形态相似 (参见图 1), 用 0.25%胰蛋白酶-1mmol EDTA 消化, 按 1: 3 比例分瓶传代培养, 并标记为 P1 细胞。传代培养过程中每 3d 换液一次, 细胞达 90%融合后消化传代, 并标记为 P2, 以此类推。

(2) 人骨髓间充质干细胞生长特性的鉴定

取培养传代的人骨髓间充质干细胞第一、第四代细胞, 按 2×10^4 个细胞/孔的密度接种于 24 孔培养板内, 分别培养 1、2、3、4、5、6、7、8 天, 进行细胞动力学分析。培养具有以下共性特征: 细胞经传代培养后, 12h 细胞完全贴壁, 细胞形态重新变成梭形细胞, 传代培养潜伏期约为 24~36h; 传代培养对数增殖期约为 4~5d; 对数增殖期结束后进入平台期; 第四代与第一代细胞的生长没有显著差异 (参见图 2)。

(3) 人骨髓间充质干细胞表型的鉴定

取培养传代的第一、三、五代细胞, 以 CD14-FITC、CD45-FITC、CD44-FITC、HLA-DR-FITC、CD34-PE、CD29-PE、CD166-PE、CD105-PE 单克隆抗体为探针, 用流式细胞术分析间充质干细胞表面分子的表达。结果显示: CD29、CD44、CD166、CD105 (SH2) 阳性标记出现单峰, 造血细胞分化抗原 CD14、CD34、CD45、HLA-DR 表达阴性 (参见图 4)。经传代扩增后的各代间充质干细胞表面标记表达无明显差异 (参见表 1), 表明培养扩增的人骨髓来源的间充质干细胞是一均质细胞群。

表 1 成人骨髓间充质干细胞免疫表型 (% , $\bar{x} \pm s$) (n=6)

代数	细胞表面标记						
	CD14	CD29	CD34	CD44	CD45	CD166	HLA-DR
1	2.76±3.28	73.40±29.26	1.47±0.99	92.53±8.67	6.21±5.71	98.95±0.35	2.52±1.73
3	1.88±0.54	87.17±11.24	2.55±2.11	91.73±10.81	6.73±4.63	98.9±0.85	1.97±0.43
5	0.76±0.87	89.57±6.70	2.54±2.05	93.0±9.34	6.14±1.60	98.93±0.49	0.88±1.05

(4) 人骨髓间充质干细胞多分化潜能的鉴定

培养传代细胞的接近 70%融合时, 更换培养液, 加入成骨诱导培养液 (LG-DMEM, 10%胎牛血清、 10^{-8} M 地塞米松、10mM β -磷酸甘油、0.25mM 抗坏血酸)、脂肪诱导培养液、神经分化预诱导液 (LG-DMEM, 20%胎牛血清、1mM 硫代甘油)。

经成骨诱导培养 3~4d, 大约 30%细胞形态发生变化, 由原来的纺锤型变为立方型或多角型, 7d 后出现钙化斑点, 随着诱导时间的延长, 立方型或多角型细胞以及钙化斑明显增加, 约 14~21d 细胞形成广泛均一的矿化结节样结构。培养 21d 后, Von Kossa 法染色, 可以见到染成棕黑色的细胞外基质钙盐沉积 (参见图 5), 对照组无矿化结节形成能力。

经成脂肪诱导培养 1 周后, 细胞形态开始变成圆形或多角性, 细胞排列无序, 可观察到胞浆中出现高折光性的小脂滴, 随着诱导时间的延长逐渐聚集成大的脂滴。培养 21d 后, 油红 O 染色, 脂滴为橙红色, 约 80%以上间充质干细胞均诱导为脂肪细胞 (参见图 6)。

经神经分化预诱导 24 后细胞形态未见明显变化, 更换含 5mM 硫代甘油的无血清 LG-DMEM, 在诱导后 3-5h 中, 大多数间充质干细胞变为典型的神经元样细胞, 简单的双极细胞和复杂的多级细胞均有出现, 多个神经元样细胞突起可相互延伸并形成网状 (参见图 7)。免疫组化染色分析, 神经元样细胞的胞体及部分突起神经干细胞标志物 Nestin、神经元标志物 NSE、神经元标志物 NF-M 表达阳性、星形胶质细胞标志物 GFAP 表达阴性 (参见图 7)。

(5) 人骨髓间充质干细胞的冻存和复苏

将培养的间充质干细胞消化后, 用冻存保护液 (LG-DMEM、5%DMSO、30%胎牛血清) 重悬细胞, 细胞终浓度为 1×10^6 /ml, 用程控冻存方法冻存, 计算机设定降温程序: 以 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率从 4°C 降至 0°C , 平衡 5min, 以 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率降至 -30°C , 然后以 $-5^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率降至 -80°C , 快速移入 -196°C 液氮罐保存。从液氮中取出细胞放入 40°C 的恒温水浴箱快速解冻, 在 1min 内解冻完毕, 细

胞复苏后经台盼蓝染色细胞计数，台盼蓝拒染回收率 $87.67 \pm 2.52\%$ ，复苏细胞接种后 12h 细胞完全贴壁，细胞形态重新变成梭形细胞。细胞经过 2-3d 休眠期后开始迅速增殖，约 7~10d 细胞可达 80%~90% 融合，细胞排列成漩涡状、网状、辐射状，与冻存前细胞形态基本一致（参见图 1）。比较冻存前后的第四代细胞，细胞的生长特性（用 MTT 法测细胞生长曲线，参见图 3）、免疫表型（参见表 2）、及诱导分化潜能（成骨细胞、脂肪细胞、神经元样细胞）均未发生变化。

表 2 第四代人骨髓间充质干细胞冻存前后细胞免疫表型（%， $\bar{x} \pm s$ ）（n=6）

冻存前后	细胞免疫表型		
	CD29	CD44	CD166
冻存前	87.87±7.35	93.07±4.40	96.65±2.90
控冻存后	77.17±10.71	91.20±3.75	92.23±5.07

实施例 2：抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 的制备和纯化

（1）动物免疫

取雌性 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠，首次免疫用 2 份供者来源混合的第三~五代间充质干细胞悬于 PBS，约 1.0×10^6 /只注入小鼠腹腔。第 8d、15d 继续免疫，免疫方法同第一次。第 20 天，把经三次免疫后小鼠眼球采血，离心分离血清，血清与培养的人间充质干细胞共同孵育以间接免疫荧光染色法检测血清抗体效价，选择效价高的小鼠准备融合。融合前 3 天加强免疫一次，细胞数为 2.0×10^6 /只。

（2）杂交瘤细胞系的制备

完成免疫过程的小鼠准备取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）融合，在融合前一天制备饲养细胞。融合时无菌下取小鼠脾细胞，与 SP2/0 细胞以 10:1 混合，以 50%PEG 介导融合，离心后重悬于 HAT 选择性培养基中，接种于含有饲养细胞的 96 板中，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养，融合后第 3d、5d、7d 用 HAT 培养液半量换液，两周后换用 HT 培养液。

观察杂交瘤细胞的生长情况，等克隆长至孔底面积的 1/3~1/2，取培养上清液与间充质干细胞孵育，用 Ig（G+M）-FITC 荧光二抗以间接免疫荧光染色法进行抗体检测，筛选阳性克隆。以有限稀释法对阳性孔的杂交瘤细胞进行克隆化培养，直到克隆化细胞抗体阳性率为 100%，此时可将阳性克隆细胞进一

步扩大培养。将杂交瘤细胞经体外连续传代3个月以上和反复冻存、复苏，定期收集上清，用筛选抗体的方法测定上清中的抗体，直到细胞系能稳定分泌单克隆抗体。

(3) 单克隆抗体的制备和纯化

选用成年 BALB/c 小鼠，腹腔注射 0.5ml 液体石蜡，1~2 周后收集生长状态良好的单克隆杂交瘤细胞，每只小鼠腹腔注射 $0.5\sim 1.0\times 10^5$ 细胞悬液。接种细胞 14 天左右的小鼠腹部可见明显膨大，以颈椎脱臼法处死后打开腹腔，取出腹水。离心后吸取上清，分装， -20°C 保存。取 10ml 腹水抗体，加入 10ml 生理盐水稀释，用盐析法以 50% 的硫酸铵粗提免疫球蛋白，之后用 DEAE-纤维素离子交换柱纯化。

(4) 抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体 ZUB4 腹水效价及亚型鉴定

取小鼠腹水抗体，倍比稀释后与免疫的间充质干细胞孵育后，用间接免疫荧光染色法检测（方法同抗体筛选），抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体效价为 $1:10^6$ 。抗体亚型测定取杂交瘤细胞培养上清，采用金免疫层析法检测，属 IgG1 型（轻链为 κ 型）。

实施例 3：单克隆抗体 ZUB4 的特异性的鉴定

(1) 单克隆抗体 ZUB4 在人血液系统细胞、及人类细胞株中特异性的鉴定

细胞材料：培养的人骨髓间充质干细胞、外周血细胞、Ficoll-paque（比重 1.077）分离的人外周血单个核细胞、全骨髓细胞、Ficoll-paque（比重 1.077）分离的骨髓单个核细胞、HL-60（急性原髓细胞性白血病细胞株）、NB4（急性早幼粒白血病细胞株）、K562（慢性粒细胞性白血病急变期细胞株）、U-937（组织细胞淋巴瘤向单核巨噬细胞分化细胞株）、HEL（急性红白血病细胞株）、Jurkat（急性 T 淋巴细胞性白血病细胞株）、Raji（Burkitt 淋巴瘤细胞株，B 淋巴细胞）、KM3（多发性骨髓瘤细胞株）。采用活细胞间接免疫荧光染色法检测间充质干细胞膜抗原的表达，以人骨髓间充质干细胞为阳性对照（参见图 8），全骨髓细胞及骨髓单个核细胞中可见散在的阳性细胞，其余细胞均为阴性。单克隆抗体 ZUB4 与骨髓间充质干细胞的特异性结合可用于区分骨髓中的间充质干细胞与造血细胞，用于骨髓间充质干细胞的鉴定。

(2) 单克隆抗体 ZUB4 在人间充质组织及非间充质组织中特异性的鉴定

组织材料：肌腱、韧带、肌肉、血管壁、神经、胆囊、皮肤、肺、肝、小

肠、脂肪、骨髓，以上组织标本均来自外科手术标本。采用免疫组织化学染色法检测，以人骨髓间充质干细胞细胞团块的石蜡切片为阳性对照，骨髓组织中可见散在的阳性细胞（参见图 9），其余组织均为阴性。

（3）单克隆抗体 ZUB4 在大鼠、小鼠、犬、兔、鸡骨髓细胞及大鼠间充质干细胞中特异性的鉴定

细胞材料：大鼠、小鼠、犬、兔、鸡全骨髓细胞及培养的大鼠间充质干细胞。采用间接免疫荧光染色法检测，以人骨髓间充质干细胞为阳性对照，结果显示大鼠、小鼠、犬、兔、鸡全骨髓细胞及培养的大鼠间充质干细胞均为阴性，由此说明单克隆抗体 ZUB4 对人间充质干细胞有特异性。

实施例 4：单克隆抗体 ZUB4 在流式细胞术检测间充质干细胞中的应用

取体外培养的人骨髓间充质干细胞，以单克隆抗体 ZUB4 为探针，用间接流式细胞术分析间充质干细胞表面分子的表达。结果显示明显的阳性单峰（参见图 10），间充质干细胞表面分子表达为 88.07%，传代培养的间充质干细胞上 ZUB4 相应抗原表达无显著性差异。上述结果显示单克隆抗体 ZUB4 与间充质干细胞表面分子有较高的特异性结合，可用于间充质干细胞的检测和鉴定，并可定量检测间充质干细胞的数量。以单克隆抗体 ZUB4 为探针用流式细胞术检测骨髓细胞中间充质干细胞的数量，可用于研究骨髓中新鲜间充质干细胞的特性及临床诊断。

实施例 5：单克隆抗体 ZUB4 在免疫组织化学染色法检测间充质干细胞中的应用

将体外培养的人间充质干细胞爬片固定，用单克隆抗体 ZUB4 通过免疫组织化学染色法检测间充质干细胞相应抗原的表达，结果显示大于 95% 的细胞呈阳性（参见图 11）。同样用 ZUB4 通过免疫组织化学染色法检测间充质干细胞团块及骨髓组织的石蜡切片中相应抗原的表达，结果显示细胞团块中大于 95% 的细胞呈阳性、骨髓组织中有散在的阳性细胞（参见图 9）。单克隆抗体 ZUB4 用于免疫组织化学染色法检测方法，可以作为一种间充质干细胞的标记，对组织中间充质干细胞进行定位及定量的分析。

实施例 6：单克隆抗体 ZUB4 在免疫荧光染色法检测间充质干细胞中的应用

以单克隆抗体 ZUB4 为探针，结合 FITC 标记的荧光二抗，采用间接免疫

荧光染色法检测体外培养的间充质干细胞，结果显示 95%~100%的间充质干细胞呈阳性（参见图 8）。单克隆抗体 ZUB4 可有效的应用于免疫荧光染色法，通过荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等工具可以有效的观察间充质干细胞中的相应抗原的表达，进一步研究该抗原在间充质干细胞中的生物学特性。此外还可以用单克隆抗体 ZUB4 通过间接免疫荧光染色法检测骨髓细胞及其他组织中的间充质干细胞。

实施例 7：用单克隆抗体 ZUB4，通过免疫印迹法检测相应抗原的表达

提取体外培养的间充质干细胞总蛋白，用单克隆抗体 ZUB4 通过常规蛋白免疫印迹法检测相应抗原的表达，可见一特异性的阳性条带（参见图 12）。通过免疫印迹的方法可以进一步研究单克隆抗体 ZUB4 的相应抗原在间充质干细胞及相关细胞中的表达，及该抗原的生物学特性。

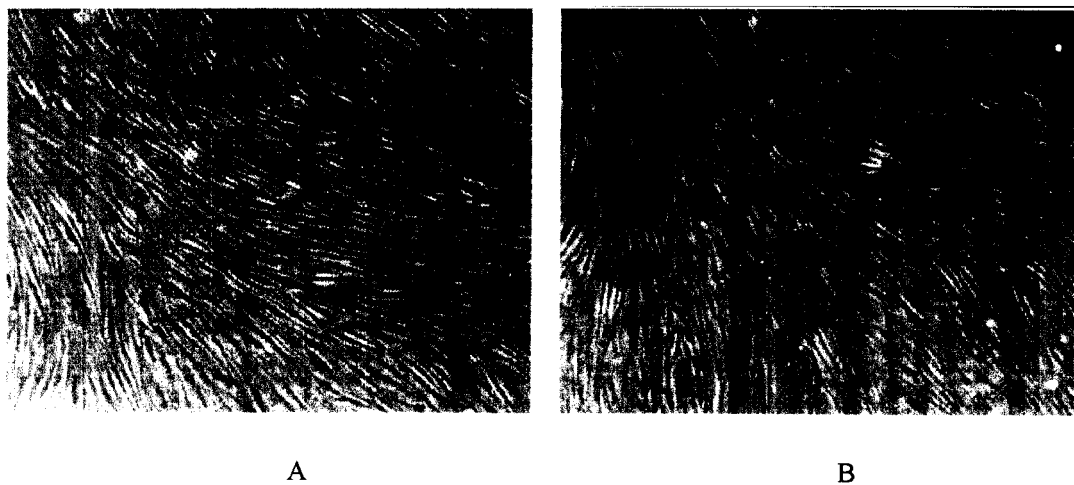


图 1

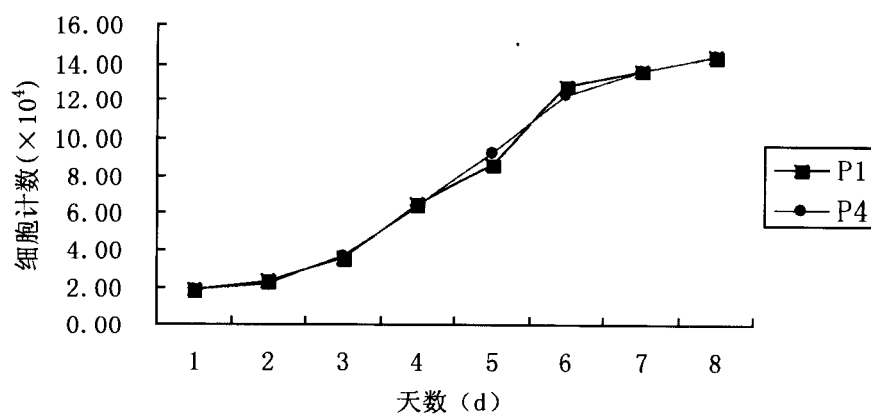


图 2

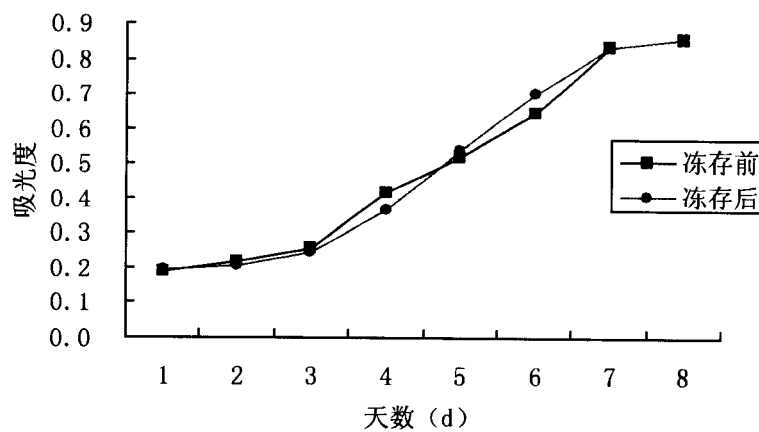


图 3

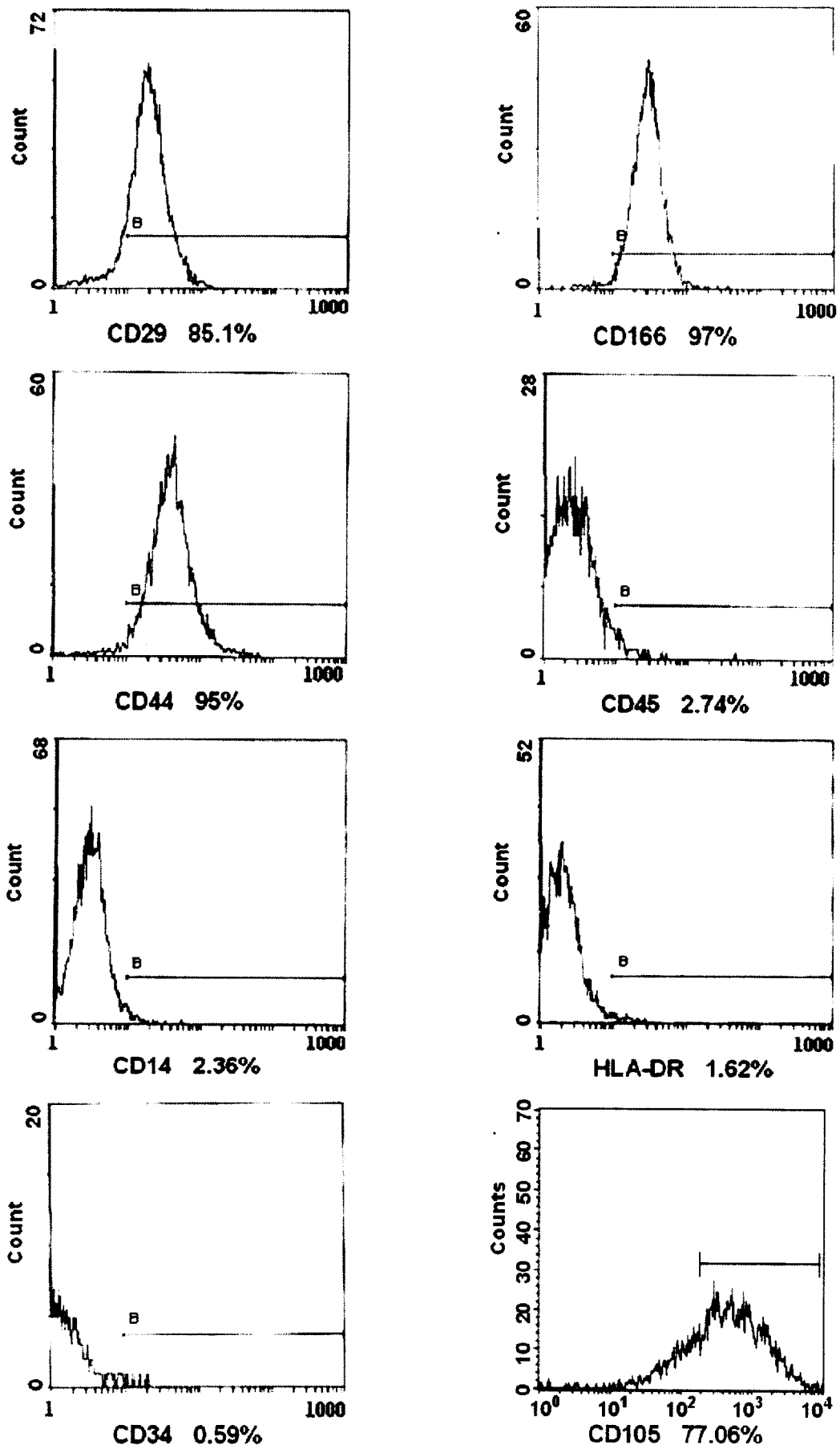


图 4

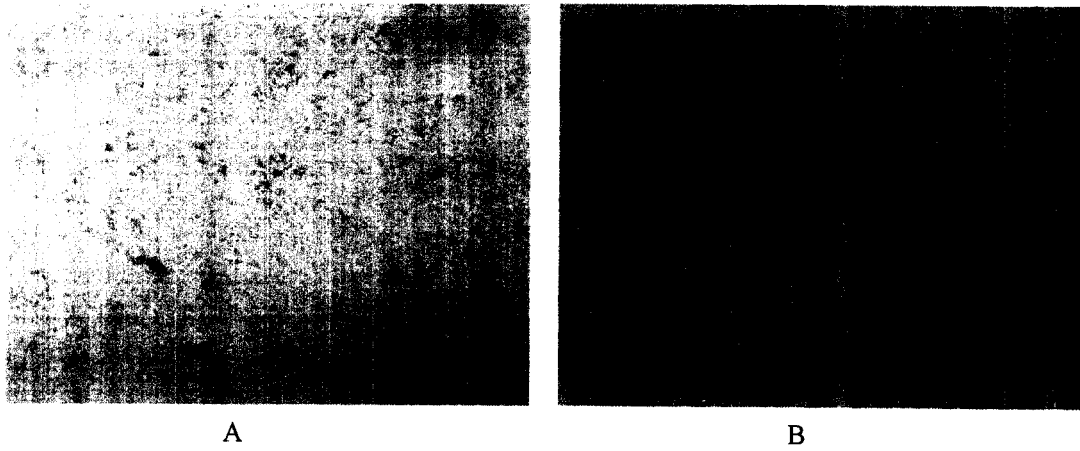


图 5

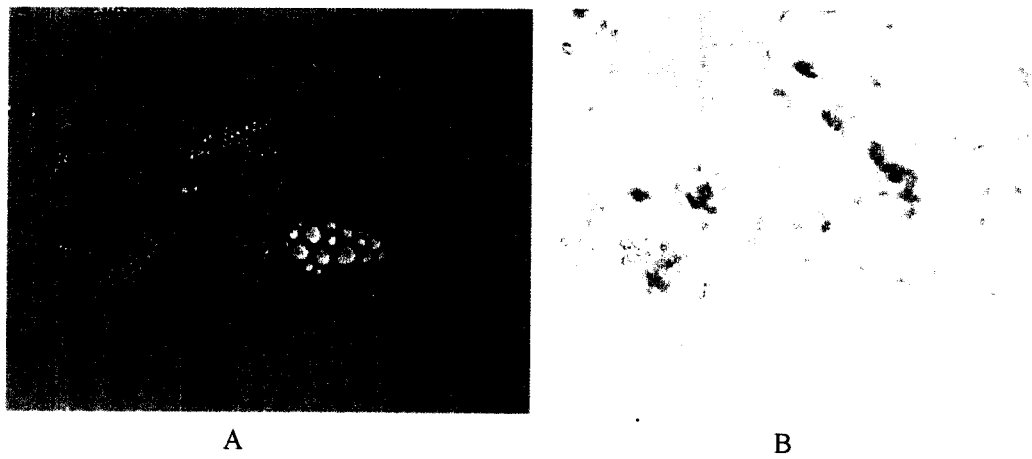
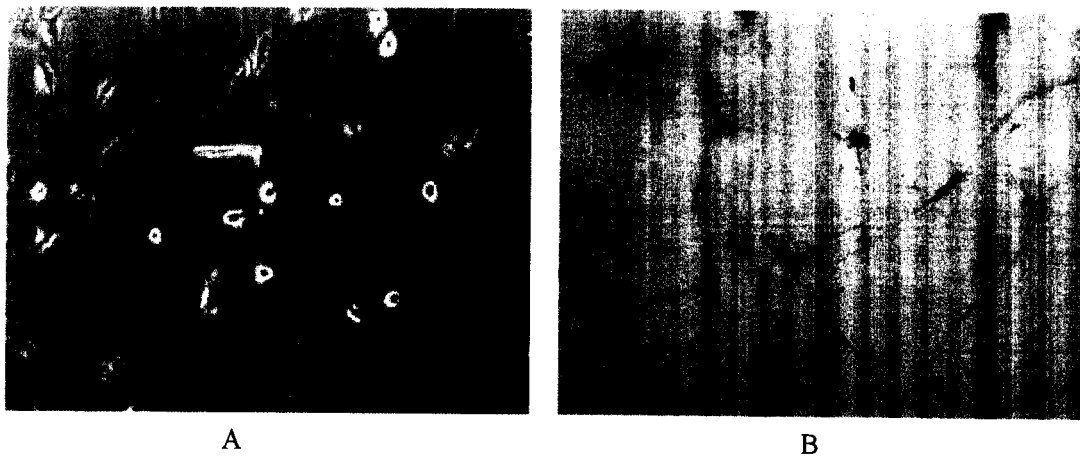
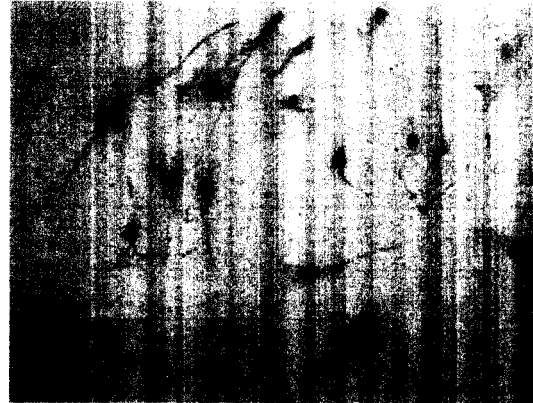


图 6

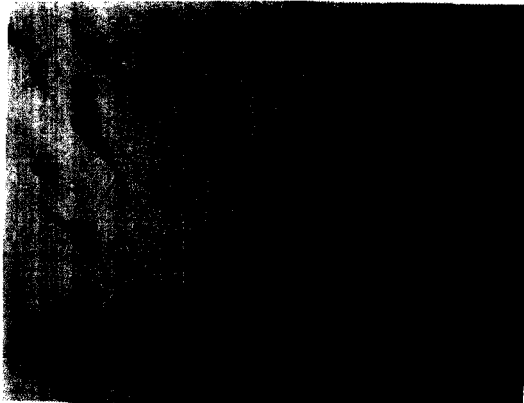




C



D



E

图 7



图 8

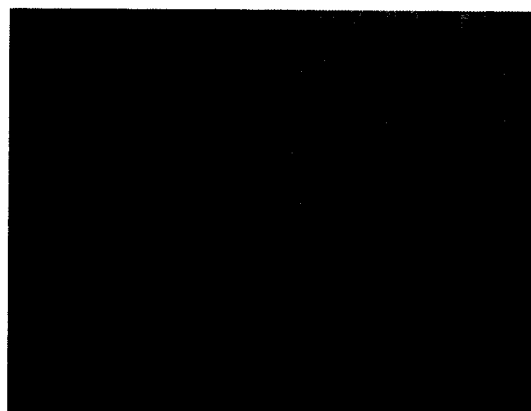


图 9

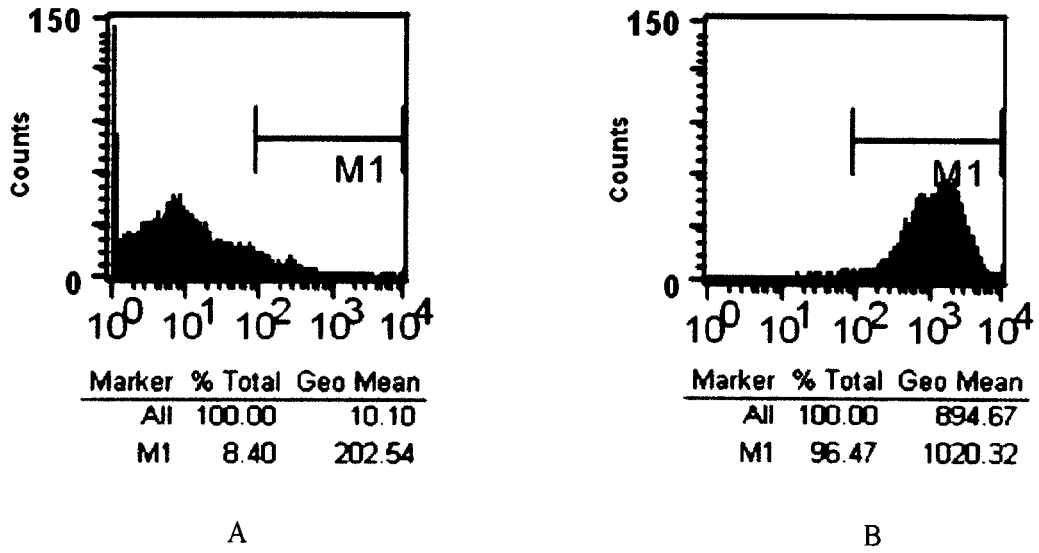


图 10

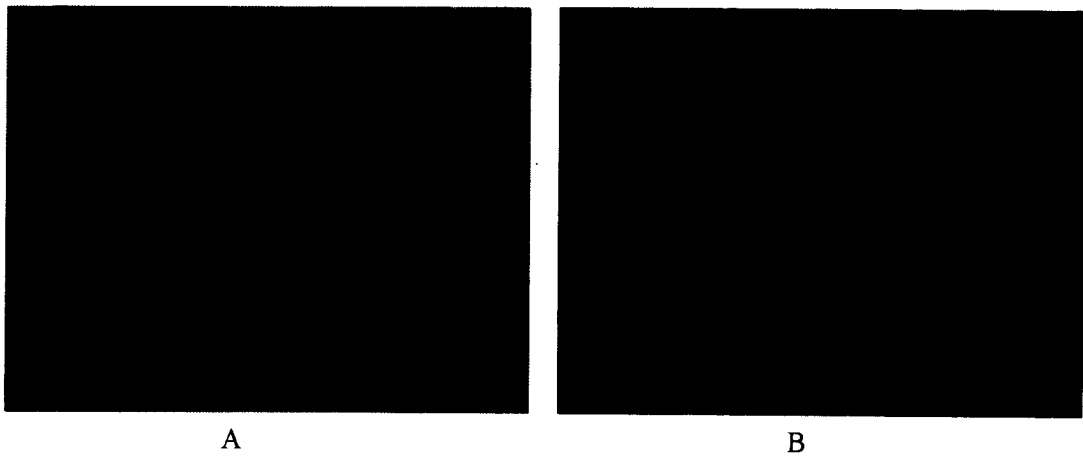


图 11

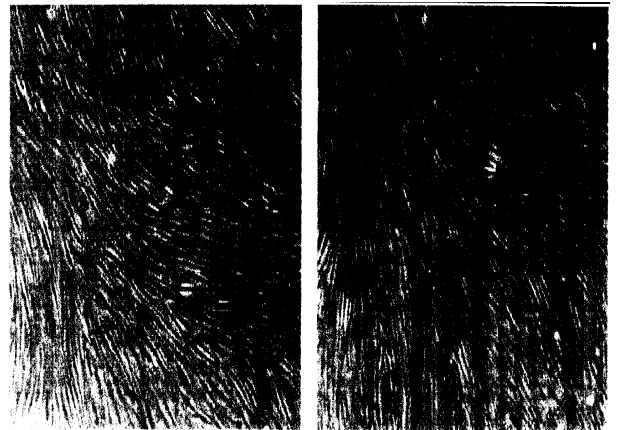


图 12

专利名称(译)	抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体ZUB4及应用		
公开(公告)号	CN1821273A	公开(公告)日	2006-08-23
申请号	CN200510061036.1	申请日	2005-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	黄河 沈建根 来晓瑜 罗依		
发明人	黄河 沈建根 来晓瑜 罗依		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/18 G01N33/53 G01N33/577		
其他公开文献	CN100398561C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种抗人骨髓间充质干细胞单克隆抗体ZUB4。以人骨髓间充质干细胞为抗原，应用杂交瘤技术制备了抗人间充质干细胞的单克隆抗体，并建立了以该单克隆抗体为探针通过流式细胞术、免疫组化、免疫荧光染色、免疫印迹检测间充质干细胞的方法。本发明为研究间充质干细胞的特异性标记提供了有效的工具，同时也为进一步阐明间充质干细胞的生物学特性提供了平台，并可推广应用于多种检测技术以及临床研究。



A

B