



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105699653 B

(45)授权公告日 2017.08.25

(21)申请号 201410689935.5

(22)申请日 2014.11.25

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105699653 A

(43)申请公布日 2016.06.22

(83)生物保藏信息
CGMCC No.9806 2014.10.16

(73)专利权人 北京市肝病研究所
地址 100069 北京市丰台区右安门外西头
条8号

专利权人 首都医科大学附属北京佑安医院

(72)发明人 石英 陈德喜 李宁 谢立 刘凯
黄雁翔 刘芳

(74)专利代理机构 北京德和衡律师事务所
11405

代理人 陈浩

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件

WO 2014144355 A2,2014.09.18,

WO 2014144355 A2,2014.09.18,

CN 103357359 A,2013.10.23,

CN 101347721 A,2009.01.21,

CN 103903827 A,2014.07.02,

WO 2005026687 A3,2006.06.22,

审查员 杨玉路

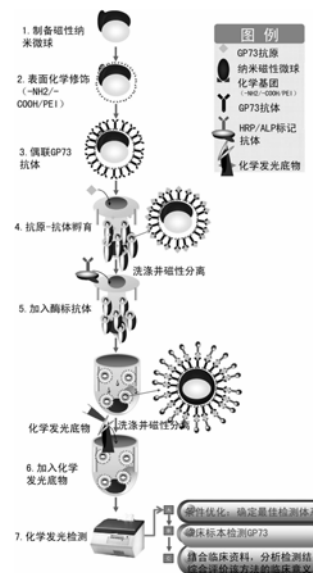
权利要求书1页 说明书13页
序列表4页 附图5页

(54)发明名称

一种超敏感超顺磁性纳米免疫微球及其检测GP73抗原的方法

(57)摘要

本发明涉及诊断试剂技术领域,特别涉及一种磁性免疫体外诊断试剂。为了解决传统酶联免疫方法中固定的抗体容量较小、反应时间较长、灵敏度相对较低和固定的抗体稳定性较低的技术问题,本发明提供一种GP73单克隆抗体及一种表面偶联有GP73单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球,及利用该微球采用双抗体夹心酶免法或化学发光法检测人血清或血浆中GP73抗原的方法。用于产生所述GP73单克隆抗体的抗原具有下述氨基酸序列:AAAERGAVELKK。本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球具有偶联更多抗体、免疫反应速度较快、特异性高、重复性好、成本低、实验条件要求简单等特点。



CN 105699653 B

1. 一种用于检测GP73抗原的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括超顺磁纳米免疫微球,所述纳米免疫微球包括纳米微球,所述纳米微球上偶联有GP73单克隆抗体;所述单克隆抗体是CGMCC保藏编号9806的GP73单克隆抗体杂交瘤细胞产生的抗体,用于产生所述单克隆抗体的抗原为下述氨基酸序列:

AAAERGAVELKK;

所述试剂盒还包括GP73多克隆抗体,产生所述多克隆抗体的抗原为下述氨基酸序列中至少两种氨基酸序列的组合:

MKEVKEQCE,

EAVASRDLS,

PERDQLVIP。

2. 根据权利要求1所述的用于检测GP73抗原的试剂盒,其特征在于,所述纳米微球包括微球核心和无机小分子,所述无机小分子覆盖在微球核心的表面形成无机小分子层,所述纳米微球通过无机小分子偶联所述抗体。

3. 根据权利要求2所述的用于检测GP73抗原的试剂盒,其特征在于,所述无机小分子是二氧化硅(SiO₂)。

4. 一种制备权利要求1所述的用于检测GP73抗原的试剂盒的方法,其特征在于,纳米免疫微球的制备方法包括下述步骤:

(1) 取50-200 μ l超顺磁性纳米微球;

(2) 对微球表面进行化学修饰;

(3) 将双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面;

(4) 用洗涤液进行洗涤;

a. 将超顺磁性纳米微球加入400-800 μ l洗涤液,并使之分散;

b. 磁性分离,弃上清液;

(5) 加入浓度为0.5~3mg/ml的GP73单克隆抗体溶液,恒温振荡反应;

(6) 磁性分离,弃上清液;

(7) 用相同洗涤液进行洗涤;

a. 每次加入洗涤液400-800 μ l,并使之分散;

b. 磁性分离,弃上清液;

c. 重复以上洗涤步骤2-3次;

d. 加入0.5~2ml贮存液,4 $^{\circ}$ C保存备用。

一种超敏感超顺磁性纳米免疫微球及其检测GP73抗原的方法

技术领域

[0001] 本发明属于诊断试剂技术领域,涉及磁性免疫体外诊断试剂,特别涉及一种表面偶联有GP73单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球,及利用该微球采用双抗体夹心酶免法或化学发光法检测人血清或血浆中GP73抗原的方法。

背景技术

[0002] 肝癌是常见的恶性肿瘤之一,“早诊、早治”是防治肝癌的关键。目前临床上对肝癌的诊断方法主要是影像学和血清标志物甲胎蛋白(AFP)的检测,早期肝癌直径小,影像学几乎检测不到,AFP诊断敏感性较低(25%),会漏检一部分早期肝癌患者。

[0003] 高尔基体蛋白73(GP73)被认为是目前最好的肝癌早期诊断血清学标志物之一,其检测敏感性和特异性均高于AFP。国内外已有的GP73试剂均为传统的酶联免疫方法,该方法的不足之处在于检测灵敏度较低,反应时间较长。

[0004] 磁性纳米微球具有超顺磁性,具有巨大的比表面积和可以偶联多种生物分子的特点。在无外加磁场时磁性纳米微球均匀分散在溶液中,使抗原-抗体快速、高效反应,在外加磁场的作用下,超顺磁性纳米微球可快速移动,通过吸附、洗涤、解吸附等操作步骤从复杂的生物化学混合物体系中分离得到目标分子;传统的酶联免疫方法是通过物理吸附将生物分子固定在酶标板表面,因而限制了该方法的敏感性和稳定性。磁性纳米微球有巨大的比表面积,可偶联更大量的生物分子,并且通过双功能化学试剂将生物分子共价偶联在其表面,因而大大提高反应速度、检测灵敏度和稳定性。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中肝癌诊断试剂检测用时长、抗体固定容量小、灵敏度较低和稳定性较差的技术问题,为了解决传统酶联免疫方法中固定的抗体容量较小、反应时间较长、灵敏度相对较低和固定的抗体稳定性较低的技术问题,本发明提供一种GP73单克隆抗体及一种表面偶联有GP73单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球,及利用该微球采用双抗体夹心酶免法或化学发光法检测人血清或血浆中GP73抗原的方法。用于产生所述GP73单克隆抗体的抗原具有下述氨基酸序列:AAAERGAVELKK。本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球具有偶联更多抗体、免疫反应速度较快、特异性高、重复性好、成本低、实验条件要求简单等特点。本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球,及利用该微球检测GP73抗原的方法,能够用于肝癌早期诊断。

[0006] 为达到上述目的,本发明的技术解决方案是:

[0007] 本发明提供一种用于检测GP73抗原的单克隆抗体,用于产生所述单克隆抗体的抗原具有下述氨基酸序列:

[0008] AAAERGAVELKK(参见序列1)。

[0009] 进一步的,所述单克隆抗体是CGMCC保藏编号9806的GP73单克隆抗体杂交瘤细胞产生的抗体。

[0010] 用于检测GP73抗原的抗体称为GP73抗体。所述GP73单克隆抗体具有高免疫活性。

[0011] GP73抗体针对GP73抗原的超保守部位(PC Site),因此具有高度敏感性和特异性。

[0012] 本发明还提供一种超顺磁纳米免疫微球,所述纳米免疫微球包括纳米微球,所述纳米微球上偶联有所述GP73单克隆抗体。

[0013] 所述超顺磁纳米免疫微球可简称为磁性免疫微球。

[0014] 所述GP73单克隆抗体通过双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面。所述双功能化学试剂是戊二醛,或,EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 碳二亚胺。

[0015] 进一步的,所述超顺磁纳米免疫微球中,所述纳米微球包括微球核心和无机小分子,所述无机小分子覆盖在微球核心的表面形成无机小分子层,所述纳米微球通过无机小分子偶联所述抗体。

[0016] 所述微球核心表面覆盖薄层无机小分子,可减少非特异性吸附。所述微球表面利用-NH₂, -COOH, 或PEI (聚醚酰亚胺) 进行表面化学修饰。

[0017] 所述微球核心的材质是四氧化三铁,所述微球核心的直径尺寸为6-12nm;所述微球的直径为10~30nm。进一步的,所述微球核心的直径尺寸为8nm。

[0018] 所述的超顺磁纳米免疫微球中,所述无机小分子是二氧化硅(SiO₂)。

[0019] 本发明还提供一种用于检测GP73的多克隆抗体,用于产生所述多克隆抗体的抗原选自下述氨基酸序列的片段:

[0020] QMKEVKEQCEERIEEVTKKGNEAVASRDLSSENNDQRQQQLQALSEP

[0021] QPRLQAAGLPHTEVPQGGKGNVLGNSKSKTPAPSSEVVLDSCRQVE

[0022] KEETNEIQVVNEEPQRDRLPQEPGREQVVEDRPVGGRGFGGAGEL

[0023] GQTPQVQAALSVSQENPEMEGPERDQLVIPDGQEEEQEAAGEGRN

[0024] QQKLRGEDDYNMDENEAESETDKQAALAGNDRNIDVFNVEDQKRD

[0025] TINLLDQREKRNHTL (参见序列5)。

[0026] 用于检测GP73抗原的多克隆抗体称为GP73多克隆抗体。所述GP73多克隆抗体上偶联酶标记物。

[0027] 进一步的,用于产生所述多克隆抗体的抗原为下述氨基酸序列中至少两种氨基酸序列的组合:

[0028] MKEVKEQCE (参见序列2);

[0029] EAVASRDLS (参见序列3);

[0030] PERDQLVIP (参见序列4)。

[0031] 本发明还提供一种制备上述纳米免疫微球的方法,所述方法包括下述步骤:

[0032] (1) 取50-200 μ l超顺磁性纳米微球;

[0033] (2) 对微球表面进行化学修饰;

[0034] (3) 将双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面;

[0035] (4) 用洗涤液进行洗涤;

[0036] a. 将超顺磁性纳米微球加入400-800 μ l洗涤液,并使之分散;

[0037] b. 磁性分离,弃上清液;

[0038] (5) 加入浓度为0.5~3mg/ml的GP73单克隆抗体溶液,恒温振荡反应;

[0039] (6) 磁性分离,弃上清液;

- [0040] (7) 用相同洗涤液进行洗涤；
- [0041] a. 每次加入洗涤液400-800 μ l, 并使之分散；
- [0042] b. 磁性分离, 弃上清液；
- [0043] c. 重复以上洗涤步骤2-3次；
- [0044] d. 加入0.5~2ml贮存液, 4 $^{\circ}$ C保存备用。
- [0045] 所述洗涤液为0.01~0.2M的碳酸盐缓冲液, PH=8.0~9.5; 或0.01~0.2M的三羟甲基氨基甲烷-盐酸盐缓冲液, PH=7.0~7.6。
- [0046] 所述GP73单克隆抗体的溶液采用碳酸盐缓冲液, PH=8.0~9.5; 或0.01~0.2M的三羟甲基氨基甲烷-盐酸盐缓冲液, PH=7.0~7.6。
- [0047] 所述贮存液为0.01~0.2M的PB, PH=7.0~8.0; 或0.01~0.2M的Tris-HCl, PH=7.0~8.0; 所述贮存液中均加入防腐剂, 所述防腐剂为0.01~0.2%的NaN₃或者0.01~0.2%的硫柳汞。
- [0048] 所述防腐剂的浓度单位为重量(克) 体积比(毫升)。
- [0049] 所述第(5)步中恒温振荡反应的温度为4~40 $^{\circ}$ C, 反应时间为10~60分钟, 振动速度为180~200rpm。
- [0050] 本发明还提供一种杂交瘤细胞株, 其是CGMCC保藏编号9806的GP73单克隆抗体杂交瘤细胞株。
- [0051] 本发明还提供一种利用所述的超顺磁性纳米免疫微球检测GP73抗原的方法(简称显色检测法), 所述方法包括下述步骤:
- [0052] (1) 将试管置于试管架上, 设阳性对照试管孔2孔, 阴性对照试管孔3孔, 空白对照孔1孔;
- [0053] (2) 在待检样品试管中加入10~50 μ l样品稀释液和5~100 μ l的待检样品, 阳性对照管和阴性对照管中分别加入阳性对照样品和阴性对照样品50~100 μ l;
- [0054] (3) 充分混匀已加贮存液的含有GP73单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球溶液后, 用加样器向各反应试管中加入5~50 μ l该微球溶液, 混匀, 4~40 $^{\circ}$ C反应0.5~2小时;
- [0055] (4) 各试管加入5~50 μ l已偶联GP73多克隆抗体的酶标记物, 混匀, 4~40 $^{\circ}$ C反应0.5~2小时;
- [0056] (5) 用相同洗涤液洗涤各管至少2次:
- [0057] a. 每次加入洗涤液400-800 μ l, 并使之分散,
- [0058] b. 磁性分离, 弃上清液;
- [0059] (6) 各管加入50~200 μ l 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液, 混匀, 4~40 $^{\circ}$ C反应10~30分钟;
- [0060] (7) 各管加入50~200 μ l终止液, 混匀, 磁性分离, 将上清液移至专用于酶标仪上进行吸光度值(OD)测量的酶标板孔中, 在酶标仪上用450nm和630nm进行双波长测定各孔OD值。
- [0061] 本发明还提供另一种利用上述的超顺磁性纳米免疫微球检测GP73抗原的方法(简称化学发光检测法), 所述方法包括下述步骤:
- [0062] (1) 将试管置于试管架上, 设阳性对照试管孔2孔, 阴性对照试管孔3孔, 空白对照孔1孔;

[0063] (2) 在待检样品试管中加入10~50 μ l样品稀释液和5~100 μ l的待检样品,阳性对照管和阴性对照管中各加入阳性对照样品和阴性对照样品50~100 μ l;

[0064] (3) 充分混匀已加贮存液的上述的含有GP73单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球溶液后,各管加入5~50 μ l该微球溶液,混匀,4~40 $^{\circ}$ C反应0.5~2小时;

[0065] (4) 各管加入5~50 μ l已偶联上述的GP73多克隆抗体的酶标记物,混匀,4~40 $^{\circ}$ C反应0.5~2小时;

[0066] (5) 用相同洗涤液洗涤各管至少2次:

[0067] a. 每次加入洗涤液400~800 μ l,并使之分散;

[0068] b. 磁性分离,弃上清液;

[0069] (6) 各管加入50~200 μ l化学发光物质溶液,该化学发光物质是:3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐(AMPPD);

[0070] (7) 用化学发光仪器检测各孔的信号值。

[0071] 上述检测GP73抗原的方法中,所述样品稀释液为0.01~0.2M的PBST,PH=5.0~8.0;或0.01~0.2M的Tris-HCl,PH=4.0~7.8;或0.001~10M的CBS,PH=9.0~11.0;或0.001~10M的醋酸盐缓冲液,PH=3.0~7.0;或0.001~10M的柠檬酸缓冲液,PH=3.0~8.0。

[0072] 所述洗涤液为0.01~0.2M的PBST,PH=7.0~8.0;或0.01~0.2M的Tris-HCl,PH=7.0~7.6。

[0073] 所述终止液为0.01~4M的H₂SO₄,或0.01~4M的HCl,或0.01~4M的柠檬酸。

[0074] 上述检测GP73抗原的方法中,所述超顺磁性纳米免疫微球上偶联的GP73单克隆抗体与酶标记物上偶联的GP73多克隆抗体识别不同的GP73抗原表位。

[0075] 上述检测GP73抗原的方法中,酶标记物偶联的GP73多克隆抗体与GP73抗原可溶性切割片段特异性结合。

[0076] 因此,本发明提供的GP73多克隆抗体针对血浆中游离的GP73具有高度特异性和敏感性。

[0077] 本发明提供的GP73多克隆抗体是利用酶标记的多克隆抗体,能够多方位地与GP73抗原的不同表位相结合,因此提高检测的灵敏度。

[0078] 本发明还提供一种用于检测GP73抗原的试剂盒,所述试剂盒包括上述的超顺磁性纳米免疫微球,和上述的GP73多克隆抗体。

[0079] 上述试剂盒利用纯化的大肠杆菌表达的GP73全长融合蛋白作为标准品,系列稀释后定量检测血浆中GP73。

[0080] 本发明提供的超顺磁性纳米微球上偶联的GP73单克隆抗体针对GP73超保守部位(PC Site)下游,例如下游的12个氨基酸,该表位在不同种属生物进化过程中仍然保守,而且在GP73被裂解后,作为细胞外部分可在血浆中检测到。因此,针对该部位的单克隆抗体具有最佳的敏感性,大大提高了人群自然变异GP73的检出率。

[0081] 酶标记物上偶联的GP73多克隆抗体,针对胞浆内游离GP73酸性区末端的序列。因此,对血浆中游离的GP73具有高度特异性和敏感性;利用多克隆抗体针对多个表位,使酶标信号获得扩大,提高了检测的灵敏度。

[0082] 本发明以超顺磁性纳米微球作为反应和分离的固相载体,合成表面偶联GP73单克

隆抗体的超顺磁性免疫微球,该微球与被检人血清或血浆中GP73抗原特异性结合,形成抗原-抗体复合物,再和标记物标记的GP73多克隆抗体特异性抗体结合,应用相应的检测系统,定性或定量检测人血清或血浆中GP73特异性抗原。

[0083] 本发明所获得的细胞株能够特异性的分泌针对GP73抗原的单克隆抗体,所产生的抗体具有较好的灵敏度和较高的特异性。

[0084] 本发明提供的GP73单克隆抗体,具有较好的灵敏度和较高的特异性。

[0085] 与现有技术相比,本发明将磁性纳米微球与效价高、特异性强的GP73单克隆抗体结合,解决了传统酶联免疫方法中固定的抗体容量较小、反应时间较长、灵敏度相对较低和固定的抗体稳定性较低的技术问题,具有偶联更多抗体、免疫反应速度较快、特异性高、重复性好、成本低、实验条件要求简单等特点。

[0086] 具体的,本发明具有下述优点:

[0087] 1、检测速度快,约1小时左右,特异性高,稳定性和重复性好。

[0088] 2、采用超顺磁性纳米微球作为反应和分离载体,明显提高了检测的灵敏度和稳定性,可检测的最低抗原浓度为100pg/ml,灵敏度达90.5%,特异性84%,AUROC:0.909。4℃储存,稳定性好。

[0089] 检测过程中:(1)在无外加磁场时,磁性纳米微球均匀分散在溶液中,使抗原和抗体的反应类似于均相反应,加速了抗原-抗体复合物的形成;(2)在外加磁场的作用下,超顺磁性纳米微球可快速移动,通过吸附、洗涤、解吸附等操作步骤从复杂的生物化学混合物体系中分离得到目标分子;(3)磁性纳米微球有巨大的比表面积,可偶联更大量的生物分子,检测灵敏度高,范围宽,对于高浓度的标本无需稀释可直接定量测定,避免了稀释误差和基质效应;(4)GP73单克隆抗体通过双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面,偶联条件温和,最大限度保持了GP73单克隆抗体的免疫活性,大大提高了检测敏感性和方便性,易于实现大规模制备GP73单克隆抗体的磁性纳米免疫微球并应用于检测人血清或血浆中的GP73抗原。

[0090] 3、本发明采用针对GP73保守部位的单克隆抗体偶联磁性纳米微球,可明显提高检测的特异性和敏感性;采用针对GP73可溶性片段的多克隆抗体偶联酶作为检测抗体,可大大提高血浆中GP73的检出率,并充分扩大检测信号,使GP73的检测有很好的特异性和敏感性。

附图说明

[0091] 图1是GP73的超保守部位结构示意图;

[0092] 图2是GP73胞外区结构示意图;

[0093] 图3是利用本发明提供的免疫微球及GP73多克隆抗体检测样品中的GP73抗原的ROC曲线图;

[0094] 图4是制备超顺磁纳米免疫微球及利用该免疫微球及GP73多克隆抗体检测样品中的GP73抗原的方法的流程示意图。

[0095] 图5是本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球的稳定性检测结果示意图;

[0096] 图6是GP73单克隆抗体腹水肝癌细胞染色免疫荧光图。

具体实施方式

[0097] 为了更易理解本发明提供的技术方案,下文将本发明的较佳的实施例,并配合图式做详细说明如下:

[0098] 如图1所示,GP73超保守部位(PC Site)下游12个氨基酸:EGRVRRAAAERG,该表位在不同种属生物进化过程中仍然保守。

[0099] 人:LQTRIMELEGRVRRAAAERG(参见序列6)

[0100] 黑猩猩:LQTRIMELEGRVRRAAAERG(参见序列7)

[0101] 小家鼠:LQTRIVELEGRVRRAAAERG(参见序列8)

[0102] 褐家鼠:LQTRIVELEGRVRRAAAERG(参见序列9)

[0103] 原鸡:LQSRIMELEGKVRRAAAAERG(参见序列10)。

[0104] 酶标记物上偶联的GP73多克隆抗体,针对胞浆内游离GP73酸性区末端的序列,GP73酸性区如图2所示。

[0105] 评价GP73是否可以作为HCC的早期诊断指标,试验用的HCC标本应为初诊病例标本,未经任何干预治疗。目前试验中的大多数HCC标本均进行过干预治疗,所以本申请选取所有标本中诊断为HCC而未有干预治疗记录的病例标本共150例绘制ROC曲线。如图3所示,利用本发明提供的磁性免疫微球、及GP73多克隆抗体检测GP73抗原的方法具有较高的准确率。

[0106] 如图4所示,本发明提供的制备超顺磁纳米免疫微球及利用该微球及GP73多克隆抗体检测GP73抗原的方法包括下述步骤:

[0107] 1、制备磁性纳米微球,

[0108] 2、利用-NH₂、-COOH或PEI进行表面化学修饰,

[0109] 3、偶联GP73单克隆抗体,

[0110] 4、抗原-抗体孵育,

[0111] 5、加入酶标多克隆抗体,洗涤并磁性分离,

[0112] 6、加入化学发光底物,

[0113] 7、化学发光检测。

[0114] 已偶联GP73单克隆抗体的纳米磁珠、裂解液和HRP稀释液于4℃、室温(20℃~25℃)放置6天、8天和10天后,测定阳性对照、HCAg-NS3阳性标本和正常人标本各1例。其OD值无显著性变化,如图5所示。说明本发明提供的超顺磁纳米免疫微球,及GP73多克隆抗体稳定性较好。

[0115] 本发明的原理:

[0116] 1、通过双功能化学试剂(戊二醛,或EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)碳二亚胺)将GP73单克隆抗体共价偶联在磁性纳米微球表面,制备磁性免疫微球(MIB)。

[0117] 2、待检样品与磁性免疫微球在37℃反应,若待检样品中含有GP73,则其将与MIB表面的GP73单抗进行特异性免疫反应,被捕获在MIB表面。

[0118] 3、加入酶标记的GP73多抗,该GP73多抗将与被捕获在MIB表面的GP73进行特异性免疫反应,形成抗体-抗原-抗体三明治夹心复合物,通过洗涤除去游离的未参与反应的抗

原、抗体等其他杂质。

[0119] 4、加入显色液A、B或化学发光底物，在三明治夹心复合物中的酶的催化作用下，产生的有色产物在波长450nm处有最高吸收峰，可用酶标仪进行测量或用化学发光检测仪检测产生的光学信号。测量值与被检GP73的浓度成正相关。

[0120] 实施例1：

[0121] 1、制备GP73单抗。

[0122] (1)、合成多肽AAAERGAVELKK (序列1)，偶联BSA (牛血清白蛋白)。

[0123] (2)、动物免疫：将步骤(1)得到的合成多肽(GP73抗原)与完全福氏佐剂等量混合制成乳化剂，共免疫Ba1b/c小鼠5只。第1次免疫100 μ g/只，4周后用不完全福氏佐剂第2次免疫，50 μ g/只。第2次免疫2周后(共6周)取尾静脉血测定效价，5只小鼠抗体效价均达到1:32000。第2次免疫4周后(共8周)用不完全福氏佐剂第3次免疫，剂量、途径与第2次相同。第3次免疫2周后(共10周)尾静脉取血再次测定效价，5只小鼠的GP73抗体效价分别为1:64000、1:64000、1:128000、1:64000、1:128000，取3号和5号小鼠做融合。

[0124] (3)、GP73单抗阳性细胞株筛选

[0125] 用免疫过的Ba1b/c小鼠制备脾细胞悬液后，吸取脾细胞和骨髓瘤细胞悬液按5:1体积比混合，置于离心管内充分混匀，离心使沉淀细胞松散均匀成糊状。

[0126] 取50%的聚乙二醇1.0ml加入混合细胞中促进融合。加入45ml HAT培养液制成细胞悬液，并加入已铺成饲养细胞层的96孔板中，每孔0.1ml，置37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养。分别于第3、6天后换液HAT 1次，10天时取上清液，用ELISA法测GP73抗体效价，进行初筛，阳性孔准备进行亚克隆。杂交瘤细胞的克隆化采用有限稀释法。用滴管反复吹打24孔板细胞，使细胞充分混匀，进行细胞计数，将混匀细胞液进行系列稀释至10个细胞/ml，将稀释好的细胞悬液每孔0.1ml接种于已铺有饲养细胞层的96孔板中，显微镜下观察细胞克隆生长情况。反复克隆多次，确定阳性单克隆细胞株后扩大培养。

[0127] (4)、腹水制备：接种杂交瘤细胞前10天Ba1b/c小鼠腹腔注射0.5ml石蜡油，每只小鼠腹腔注射0.5ml杂交瘤细胞。2周内小鼠腹部明显膨大，处死后吸出腹水，离心后低温保存上清。

[0128] 应用B淋巴细胞杂交瘤技术融合细胞，共用11块96孔板，融合率100%，阳性率20%。初筛阳性孔进行2-4次克隆，阳性率达100%。共获得11株能稳定分泌GP73 McAb的杂交瘤细胞株，分别命名，如表1第一列所示。经扩大培养后，分别制备腹水。培养上清液和腹水中GP73抗体的效价见表1。

[0129] 表1 1株GP73 McAb效价测定

[0130]

McAbs	细胞培养上清抗体效价	腹水抗体效价
-------	------------	--------

[0131]

GED467	1:2000	1:128000
GDD285	1:2000	1:32000
GCC52315	1:2000	1:2048000
GEG696	1:8000	1:128000
GEC3531	1:8000	1:128000

GCF1011	1:4000	1:512000
GEG5997	1:4000	1:512000
GAD3474	1:2000	1:2048000
GDA124	1:4000	1:8192000
GFF116	1:8000	1:8192000
GBG9601	1:4000	1:512000

[0132] 产生本发明GP73单抗的是小鼠杂交瘤细胞株GDA124。

[0133] 上述杂交瘤细胞株GDA124提交保藏，

[0134] 保藏单位是：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)。

[0135] 提交保藏的目的是：用于专利程序的生物材料保存。

[0136] 提交保藏日期是：2014年10月16日。

[0137] 保藏编号是：9806。

[0138] (5)、采用纯化GP73表达抗原和其他蛋白(人血清白蛋白HAS、BSA、GST、大肠杆菌BL-21菌体、HCV和HDV重组蛋白)分别包被酶标板,检测GP73单抗对不同蛋白的反应性。抗体特异性检测:无菌爬片置于6孔板的孔中,向孔中接种HepG2细胞(HepG2属于肝癌细胞,天然状态下即有较为丰富的GP73蛋白表达),以普通骨髓瘤细胞接种的小鼠产生的腹水作为阴性对照,其结果见表2。细胞融合率达70%后用免疫荧光检测GP73表达水平。DAPI细胞核染色(参见图6)。

[0139] 表2 11株杂交瘤细胞接种小鼠产生的腹水的特异性检测(OD值)

[0140]

McAbs	包被蛋白						
	GP73	HAS	BSA	GST	大肠杆	HCV重	HDV

[0141]

	抗原				菌 BL-21 菌体	组蛋白	重组蛋 白
GED467	1.307	0.072	0.07	0.114	0.16	0.109	0.095
GDD285	0.899	0.077	0.095	0.129	0.109	0.217	0.42
GCC52315	0.986	0.106	0.22	0.063	0.13	0.12	0.16
GEG696	1.256	0.071	0.248	0.114	0.123	0.111	0.063
GEC3531	1.385	0.085	0.109	0.079	0.079	0.066	0.081
GCF1011	1.088	0.081	0.058	0.058	0.062	0.135	0.048
GEG5997	1.065	0.131	0.076	0.129	0.081	0.132	0.109
GAD3474	0.836	0.093	0.091	0.088	0.117	0.118	0.093
GDA124	1.386	0.056	0.13	0.221	0.101	0.097	0.079
GFF116	1.588	0.079	0.098	0.097	0.085	0.105	0.137
GBG9601	1.465	0.077	0.098	0.139	0.123	0.098	0.067
阴性对照 腹水	0.213	0.145	0.075	0.064	0.053	0.085	0.102

[0142] 2、制备纳米微球。

[0143] 称取0.30g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和0.85g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,溶解于10mL二次蒸馏水中配制混合溶液,取250mL置于三口瓶内,置于65℃的恒温水浴锅中,强烈的磁力搅拌下,滴加浓NaOH溶液至pH=7,此时有棕色颗粒生成。再滴加稀NaOH溶液至pH=8,继续搅拌,加入无水乙醇,静置10min后,将温度升高进行熟化,调节酸度。搅拌的同时加入表面活性剂十二烷基苯磺酸钠,整个反应过程在氮气保护下进行。30min后,用强磁铁来沉降,分离上层清液,用蒸馏水和无水乙醇反复洗涤沉淀物,直至洗水的pH为7左右,将沉淀物置于真空干燥箱中,在75℃下干燥5h,得磁性纳米 Fe_3O_4 粉体。

[0144] 所得 Fe_3O_4 粉体是微球核心,所述微球核心的直径尺寸为6-12nm; Fe_3O_4 微球核心外表面包覆二氧化硅,所得微球的直径为10~30nm。

[0145] 3、制备纳米免疫微球:

[0146] (1) 取超顺磁性纳米微球;

[0147] (2) 对微球表面进行化学修饰;

[0148] (3) 将双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面;

[0149] (4) 取100 μl 步骤(3)所得磁性纳米微球于2ml离心管中,磁性分离,弃上清液,

[0150] (5) 每次用洗涤液(0.02M Tris-HCl,含0.02%吐温20,PH=7.4) 300 μl 洗涤,至少洗2次后,磁性分离,弃上清液,

[0151] (6) 加入200 μ l浓度为1mg/ml的GP73单抗,混匀,室温振荡反应20~30分钟,振荡速度为180rpm。

[0152] (7) 磁性分离,弃上清液,用上述洗涤液洗3次,加入0.5~2ml贮存液(0.2M PBS,含10%BSA,0.2%硫柳汞,PH=7.4),得到免疫微球。

[0153] 所得到的免疫微球置4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0154] 上述方法中偶联效率参见表3,表3显示了GP73单抗溶液在偶联磁性纳米微球前后在波长280nm处吸光度值的变化。

[0155] 表3磁性纳米微球与GP73单抗的偶联

[0156]	GP73 单抗溶液吸光度值 (280nm)		偶联效率 (%)
	偶联前	偶联后	
	0.346	0.075	78.3

[0157] 表3中:1. 偶联前GP73单抗溶液用0.1M PBS (PH=7.4) 稀释5倍后测得280nm处吸光度值为0.346。

[0158] 2. 偶联后上清液用0.1M PBS (PH=7.4) 稀释5倍后测得280nm处吸光度值为0.075。

[0159] 3. **偶联效率** = $\frac{OD_{\text{偶联前}} - OD_{\text{偶联后上清}}}{OD_{\text{偶联前}}} \times 100\%$

[0160] 表3数据显示本发明中制备的磁性纳米微球对GP73单抗有较高的偶联效率。

[0161] 实施例2

[0162] 利用实施例1提供的超敏感超顺磁性纳米免疫微球及本发明所述检测GP73抗原的方法检测402例健康献血者样品中的GP73抗原。

[0163] 血清或血浆中GP73的检测:

[0164] (1) 各试管中分别加入50 μ l样品稀释液(0.02M PBS,含0.1%Tween 20,PH=7.4),

[0165] (2) 再加入50 μ l待检样品,

[0166] (3) 阳性对照孔中加入50 μ l基因工程GP73溶液(缓冲液为0.1M PBS),

[0167] (4) 阴性对照孔中加入50 μ l正常人血清,

[0168] (5) 空白孔中不加样品稀释液。

[0169] (6) 将试管或孔中的不同物质混匀,37 $^{\circ}$ C反应15分钟后取出,

[0170] (7) 各试管分别加入50 μ l磁性免疫微球溶液(空白孔不加),混匀,37 $^{\circ}$ C反应15分钟后取出,

[0171] (8) 各试管分别加入50 μ l酶标GP73多抗(空白孔不加),混匀,37 $^{\circ}$ C反应15分钟,

[0172] (9) 磁性分离,弃上清液,每管加入400 μ l洗涤液(0.02M Tris-HCl,含0.02%Tween 20,PH=7.4),如此洗3次。

[0173] (10) 每试管中分别加入50 μ l显色液A和50 μ l显色液B,混匀后置37 $^{\circ}$ C避光反应5分钟,

[0174] (11) 每试管中均加入100 μ l 2M H₂SO₄进行终止反应,

[0175] (12) 磁性分离2分钟,取各试管上清液100 μ l移至酶标板孔中,

[0176] (13) 用酶标仪在波长450nm处测量各孔的吸光度(OD)值(参考波长为630nm)。

[0177] 综合对402例健康献血者样品检测的原始数据(OD值)结果进行分析,依据《医学科研中的统计方法》(第二版马斌荣主编科学出版社),402例体检标本的平均值 $X=0.080$,标准差 $SD=0.0173$,正常值范围= $X\pm 1.96SD$, $Cutoff=0.114$,得出结论:本研究中以标本的 $OD>0.114$ 判为GP73阳性。

[0178] 实施例3

[0179] 利用实施例1提供的超敏感超顺磁性纳米免疫微球及本发明所述检测GP73抗原的方法检测153例肝癌患者样品中的GP73抗原。

[0180] 1、具体检测方法同实施例2

[0181] 2、对153例肝癌病例血清标本的检测结果的原始数据(OD值)进行分析,所得结论如表4所示。

[0182] 表4 153例肝癌病例血清标本的检测结果统计表

[0183]

检测结果统计表项目	统计值
GP73阳性率(%)	62.1 (95/153)
已查AFP	138
AFP阳性率(%)	43.5 (60/138)
GP73阳性率(%)	63.0 (87/138)
GP73和AFP均为阳性	52
GP73和AFP均为阴性	43
78例AFP阴性中GP73的阳性率(%)	44.9 (35/78)
51例GP73阴性中AFP的阳性率(%)	15.7 (8/51)
20例肝切除病例	
GP73阳性率(%)	35.0 (7/20)
AFP阳性率(%)	20.0 (4/20)
GP73和AFP均为阳性	4
GP73和AFP均为阴性	13
15例AFP阴性中GP73阳性	3
12例GP73阴性中AFP阳性	0
2例肝移植	
GP73阳性	0
AFP阳性	1
未手术过1例, GP73、AFP均为阳性	

[0184]

43例其它治疗(介入、射频、消融、化疗等)	
GP73阳性率(%)	53.5 (23/43)
AFP阳性率(%)	34.9 (15/43)
GP73和AFP均为阳性	13
GP73和AFP均为阴性	18
28例AFP阴性中GP73阳性率(%)	35.7 (10/28)
20例GP73阴性中AFP阳性率(%)	10.0 (2/20)
2例死亡	
GP73阳性	2
AFP阳性	2

[0185] 上面表4的结果表明,利用本发明提供的GP73抗体及其检测方法与AFP方法相比,本发明提供的方法对肝癌患者的检出率更高,具有更好的灵敏度。

[0186] 实施例4

[0187] 利用实施例1提供的超敏感超顺磁性纳米免疫微球及本发明所述检测GP73抗原的方法检测528例肝硬化患者样品中的GP73抗原。

[0188] 1、血清或血浆中GP73检测方法见实施例。

[0189] 2、对528例肝硬化患者检测结果的原始数据(OD值)进行分析,分析结果如表5所示

[0190] 表5 528例肝硬化病例血清标本检测结果分析统计表

[0191]

检测结果统计表项目	统计值
GP73阳性率(%)	67.8 (358/528)
已查AFP	198
AFP阳性率(%)	28.3 (56/198)
GP73阳性率(%)	61.6 (122/198)
GP73和AFP均为阳性	45
GP73和AFP均为阴性	65
142例AFP阴性中GP73的阳性率(%)	54.2 (77/142)
76例GP73阴性中AFP的阳性率(%)	14.5 (11/76)
48例后诊断为HCC的病例中已查AFP	45
AFP阳性率(%)	44.4 (20/45)
GP73阳性率(%)	68.9 (31/45)
GP73和AFP均为阳性	14
GP73和AFP均为阴性	8
25例AFP阴性中GP73的阳性率(%)	68.0 (17/25)
14例GP73阴性中AFP的阳性率(%)	42.9 (6/14)

[0192] 总结:在已查病历的51例中,48例后期诊断为HCC,GP73阳性率70.6 (36/51) 明显高于AFP阳性率43.5% (20/46),表明GP73是较AFP好的HCC预测指标。

[0193] 实施例2,3,4中所用的酶标GP73多抗用辣根过氧化物酶(HRP)标记GP73多克隆抗体制备而得。GP73多克隆抗体通过常规免疫方法采用GP73抗原免疫新西兰大白兔而获得。

[0194] 具体采用下述方法制备GP73多抗:

[0195] (1) 分别制备具有下述氨基酸序列的多肽:

[0196] MKEVKEQCE (参见序列2);

[0197] EAVASRDLS (参见序列3);

[0198] PERDQLVIP (参见序列4)。

[0199] (2) 将步骤(1)中制备的三种多肽以1:1:1的质量比混合,用该混合物免疫新西兰大白兔。免疫动物为体重3kg的新西兰成年雌性白兔2只。免疫3次后静脉采血并分离血清,采用间接ELISA法测定效价,结果显示血清效价达1:200000以上。处死动物,收集血清。将两只兔子的血清混合后,纯化血清,获得上述GP73多抗。

[0200] 采用下述方法制备上述酶标GP73多克隆抗体:

- [0201] a) 以NaIO₄-乙二醇法进行HRP的氧化,达到终浓度10mg/ml;
- [0202] b) 在碱性碳酸盐缓冲液(0.05M, Ph9.5的碳酸盐缓冲液)中透析5小时,实现HRP对多克隆抗体的标记,反应结束后用NaBH₄溶液终止反应,再对PBS透析过夜。
- [0203] c) 用饱和硫酸铵沉淀,获得纯化的HRP酶标抗GP73多克隆抗体。
- [0204] 实施例2,3,4中作为阳性对照使用的基因工程GP73抗原为现有市场上可得到的商品。
- [0205] 实施例2,3,4中所用纳米免疫微球可检测的最低抗原浓度为100pg/ml(参见表6)。
- [0206] 表6实施例2中所用纳米免疫微球可检测的GP73抗原浓度范围
- [0207]

GP73抗原 (pg/ml)	OD值
阴性	0.045
50	0.097
100	0.146
200	0.575
500	0.711

[0208] 注:以GST蛋白作为阴性抗原对照,按照健康对照样本中获得的cutoff值,大于0.114认为是阳性结果。

[0209] 由表6的结果可以得出,本发明提供的纳米免疫微球可检测GP73抗原的最低抗原浓度为100pg/ml,灵敏度较高。

[0210] 参见表7,表7显示了本发明提供的检测GP73的方法的特异性和灵敏度。

[0211] 表7本发明提供的超敏感超顺磁性纳米免疫微球检测GP73的特异性和灵敏度

[0212]

灵敏度 (%)	特异性 (%)	Cutoff	AUROC
90.5	84.0	0.114	0.909

[0213] 注:表7中的Cutoff值是0.114,是根据实施例2中的402例体检者标本的检测结果计算出来的。

[0214] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例而已,并非用于限定本发明的保护范围。凡是根据本发明内容所做的均等变化与修饰,均涵盖在本发明的专利范围内。

SEQUENCE LISTING

<110> 北京市肝病研究所

<120> 一种超敏感超顺磁性纳米免疫微球及其检测GP73抗原的方法

<130> 140702

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Ala Ala Ala Glu Arg Gly Ala Val Glu Leu Lys Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Met Lys Glu Val Lys Glu Gln Cys Glu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Glu Ala Val Ala Ser Arg Asp Leu Ser
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Pro Glu Arg Asp Gln Leu Val Ile Pro
1 5

[0001]

<210> 5
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 5

Gln Met Lys Glu Val Lys Glu Gln Cys Glu Glu Arg Ile Glu Glu Val
 1 5 10 15

Thr Lys Lys Gly Asn Glu Ala Val Ala Ser Arg Asp Leu Ser Glu Asn
 20 25 30

Asn Asp Gln Arg Gln Gln Leu Gln Ala Leu Ser Glu Pro Gln Pro Arg
 35 40 45

Leu Gln Ala Ala Gly Leu Pro His Thr Glu Val Pro Gln Gly Lys Gly
 50 55 60

Asn Val Leu Gly Asn Ser Lys Ser Gln Thr Pro Ala Pro Ser Ser Glu
 65 70 75 80

[0002] Val Val Leu Asp Ser Lys Arg Gln Val Glu Lys Glu Glu Thr Asn Glu
 85 90 95

Ile Gln Val Val Asn Glu Glu Pro Gln Arg Asp Arg Leu Pro Gln Glu
 100 105 110

Pro Gly Arg Glu Gln Val Val Glu Asp Arg Pro Val Gly Gly Arg Gly
 115 120 125

Phe Gly Gly Ala Gly Glu Leu Gly Gln Thr Pro Gln Val Gln Ala Ala
 130 135 140

Leu Ser Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Met Glu Gly Pro Glu Arg Asp
 145 150 155 160

Gln Leu Val Ile Pro Asp Gly Gln Glu Glu Glu Gln Glu Ala Ala Gly
 165 170 175

Glu Gly Arg Asn Gln Gln Lys Leu Arg Gly Glu Asp Asp Tyr Asn Met
 180 185 190

Asp Glu Asn Glu Ala Glu Ser Glu Thr Asp Lys Gln Ala Ala Leu Ala

195

200

205

Gly Asn Asp Arg Asn Ile Asp Val Phe Asn Val Glu Asp Gln Lys Arg
 210 215 220

Asp Thr Ile Asn Leu Leu Asp Gln Arg Glu Lys Arg Asn His Thr Leu
 225 230 235 240

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6

Leu Gln Thr Arg Ile Met Glu Leu Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Glu Arg Gly
 20

[0003]

<210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 黑猩猩

<400> 7

Leu Gln Thr Arg Ile Met Glu Leu Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Glu Arg Gly
 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 8

Leu Gln Thr Arg Ile Val Glu Leu Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Glu Arg Gly
 20

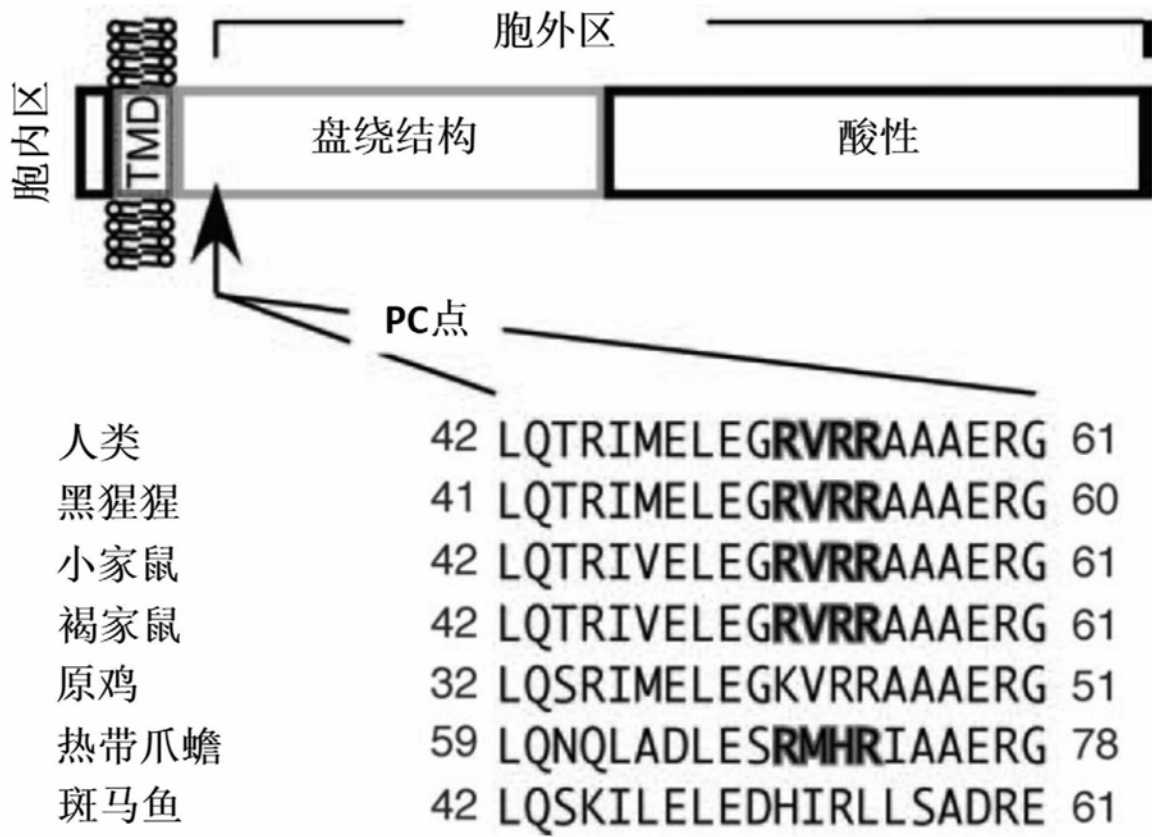


图1



图2

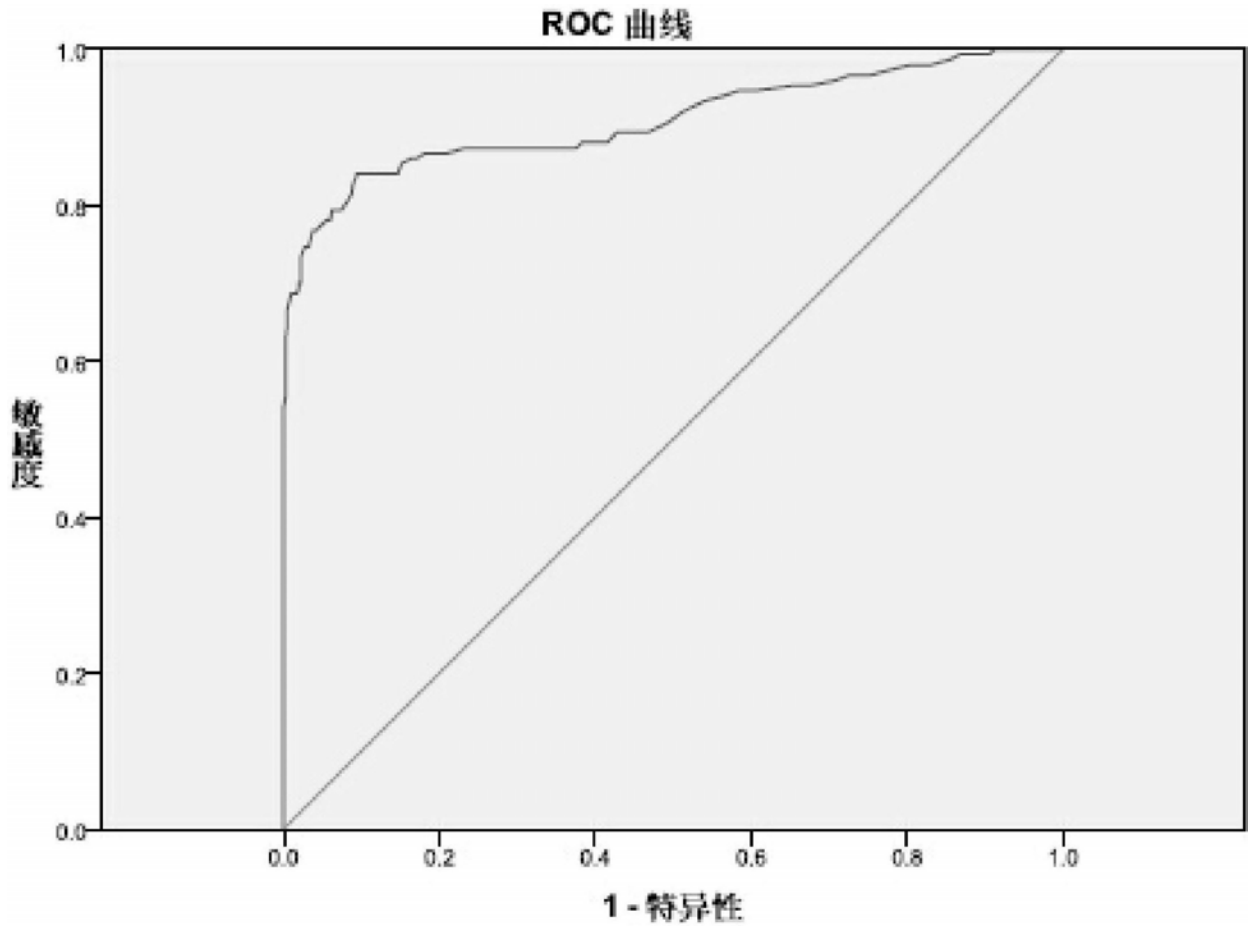


图3

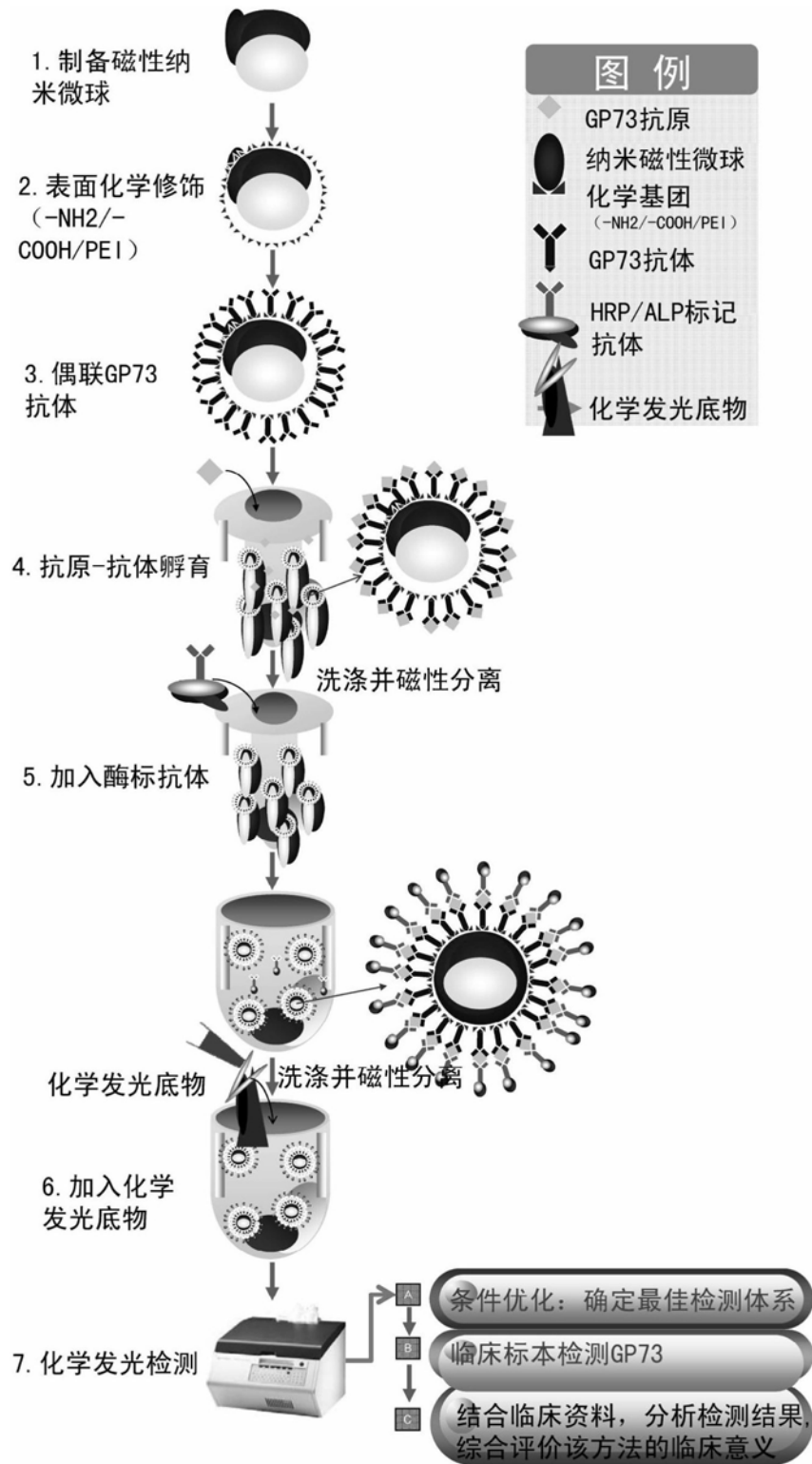


图4

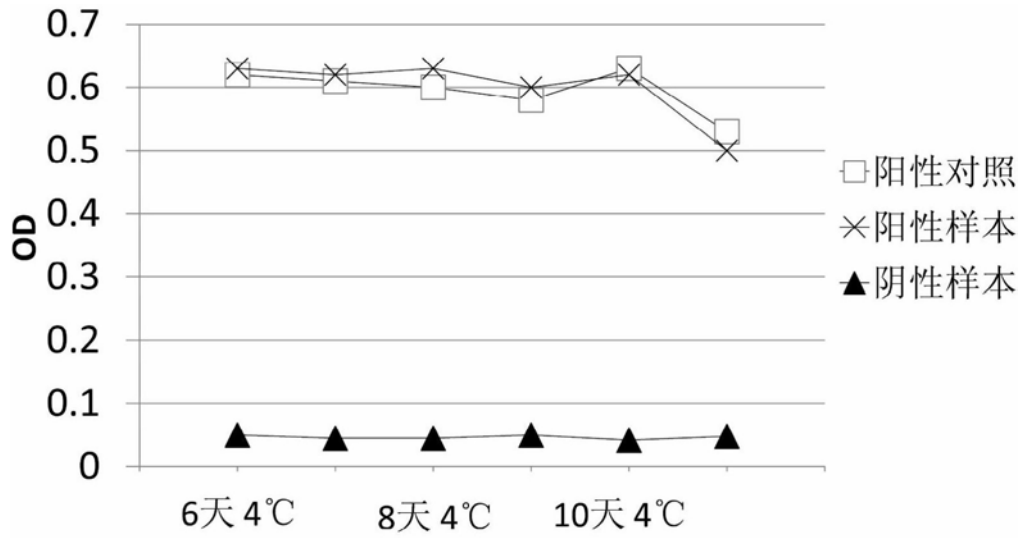


图5

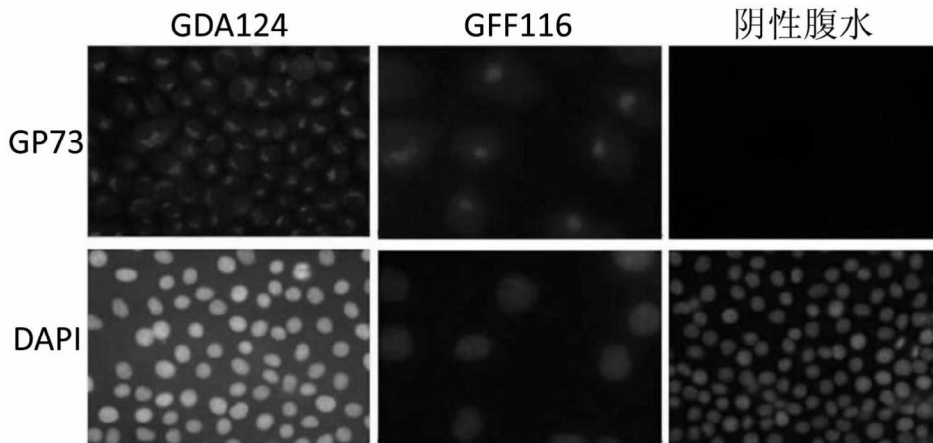


图6

专利名称(译)	一种超敏感超顺磁性纳米免疫微球及其检测GP73抗原的方法		
公开(公告)号	CN105699653B	公开(公告)日	2017-08-25
申请号	CN201410689935.5	申请日	2014-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	北京市肝病研究所 首都医科大学附属北京佑安医院		
申请(专利权)人(译)	北京市肝病研究所 首都医科大学附属北京佑安医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京市肝病研究所 首都医科大学附属北京佑安医院		
[标]发明人	石英 陈德喜 李宁 谢立 刘凯 黄雁翔 刘芳		
发明人	石英 陈德喜 李宁 谢立 刘凯 黄雁翔 刘芳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	陈浩		
其他公开文献	CN105699653A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及诊断试剂技术领域，特别涉及一种磁性免疫体外诊断试剂。为了解决传统酶联免疫方法中固定的抗体容量较小、反应时间较长、灵敏度相对较低和固定的抗体稳定性较低的技术问题，本发明提供一种GP73单克隆抗体及一种表面偶联有GP73单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球，及利用该微球采用双抗体夹心酶免法或化学发光法检测人血清或血浆中GP73抗原的方法。用于产生所述GP73单克隆抗体的抗原具有下述氨基酸序列：AAAERGAVELKK。本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球具有偶联更多抗体、免疫反应速度较快、特异性高、重复性好、成本低、实验条件要求简单等特点。

