

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/554

G01N 33/535 G01N 27/404

G01N 27/327



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410064732.3

[43] 公开日 2005 年 3 月 2 日

[11] 公开号 CN 1588078A

[22] 申请日 2004.9.24

[21] 申请号 200410064732.3

[71] 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号

[72] 发明人 鞠焜先 杜 丹

[74] 专利代理机构 南京苏高专利事务所

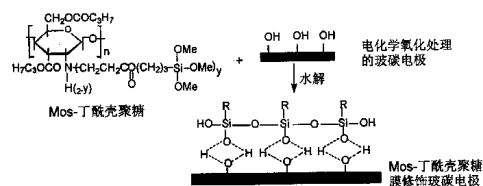
代理人 成立珍

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法

[57] 摘要

本发明建立了一种肿瘤细胞表面分化抗原的原位电化学免疫检测新方法。通过化学修饰技术成功地将肿瘤细胞固定在金胶-壳聚糖膜仿生界面。本发明利用电化学技术简便、易行、价廉的特点，结合免疫分析高选择性、高灵敏度方法，通过固定化肿瘤细胞表面结合的酶对底物的催化反应产生具有电化学活性的分子，实现了肿瘤细胞膜表面抗原的原位安培检测。该方法将制备和检测集于一电极表面，细胞所需量及其它试剂的耗量少，温育时间短，测定成本低，检测速度和效率高。由于电化学仪器操作简单、成本较低、分析速度快，可望实现临床肿瘤细胞表面各种抗原表达水平的快速测定，为肿瘤疾病的诊断与治疗提供了新途径。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是玻碳电极经电化学预处理活化后形成富氧层以增加电极表面的亲水性，以电化学预处理的玻碳电极表面形成金胶-壳聚糖膜，构造生物兼容性好的仿生界面，用于肿瘤细胞在电极表面的固定，结合免疫学原理，通过两步温育反应将碱性磷酸酶标记抗体结合到细胞膜表面，利用酶对底物的催化反应产生的电化学活性物质的安培响应，即利用酶对底物的催化反应产生具有电化学活性的分子，根据该分子的安培响应测定肿瘤细胞表面的抗原的含量。

2、根据权利要求1所述的肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是在生物兼容性好的金胶-壳聚糖膜仿生界面上，固定的肿瘤细胞稳定地保持其天然状态。

3、根据权利要求1所述的肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是改良后的界面使肿瘤细胞表面特异性分化抗原充分裸露，经两步温育过程将碱性磷酸酶（AP）标记抗体引入到细胞膜表面，催化1-萘酚磷酸酯（1-NP）水解产生具有电化学活性的1-萘酚，根据1-萘酚的氧化电流测定细胞表面的抗原。

4、根据权利要求1所述的肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是在最佳免疫反应条件下，安培响应与用于固定的细胞浓度的对数有线性关系，进行肿瘤细胞浓度的定量。

5、根据权利要求1所述的肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是以BSA/EDTA/PBS为稀释液，将P-gp鼠抗人一抗（P-gp MAb）和碱性磷酸酶标记羊抗鼠二抗（AP-P-gp MAb）稀释至不同浓度；将待量的样品依次在含有P-gp MAb和AP-P-gp MAb的PBS溶液中分别温育，通过两步温育反应将碱性磷酸酶标记抗体结合到细胞膜表面。

6、根据权利要求5所述的肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是最佳免疫反应条件为5 μg/ml P-gp MAb, 2 μg/ml AP-P-gp MAb, pH 7.4 PBS, 在35 °C 下温育60 min。

7、根据权利要求 6 所述的肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是碱性磷酸酶标记抗体结合到细胞膜表面的玻碳电极置于含有 0.25 mM 1-萘基酚磷酸酯的 1.0 ml pH 7.4 PBS 中记录电化学响应，利用 AP 催化 1-NP 水解产生的 1-萘酚的氧化电流测定细胞表面的 P-gp 抗原的含量。

8、根据权利要求 1 和 2 所述的肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是检测其它肿瘤细胞表面的肿瘤相关抗原和细胞浓度，如卵巢癌细胞表面的糖蛋白 CA125、胰腺癌细胞表面的糖蛋白 CA19-9、原发性肝癌细胞表面的甲胎蛋白（AFP）、结肠癌细胞表面的癌胚抗原（CEA）进行原位检测。

9、根据权利要求 3 和 5 所述的肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法，其特征是用辣根过氧化酶、葡萄糖氧化酶、漆酶等标记的二抗和相应的可产生电化学响应的底物用于肿瘤细胞表面抗原和细胞浓度的原位电化学免疫测定。

肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法

技术领域

本发明涉及细胞表面抗原的免疫测定方法，尤其是结合电化学分析技术建立了肿瘤细胞表面抗原的原位测定方法。

背景技术

恶性肿瘤的发病率和死亡率的上升趋势正直接威胁着人类健康，它的早期诊断和治疗是提高肿瘤患者生存率的关键，早期诊断和疗效观察方法的研究已成为肿瘤防治研究的重要前沿领域之一。肿瘤相关抗原是一些因癌细胞代谢改变而产生并可指示癌变过程的物质，它们多是细胞癌变过程中出现的新抗原及过度表达的抗原，利用肿瘤相关抗原作为肿瘤标志物，通过免疫分析来进行恶性肿瘤的早期检出已成为肿瘤疾病诊断和病情监控的主要手段。以免疫细胞化学方法来检测和定位肿瘤细胞所特有的肿瘤标记物，越来越引起许多肿瘤病理学工作者的兴趣，正受到科研工作者的普遍关注与重视。

肿瘤的抗原性是肿瘤免疫学的核心问题。进入 20 世纪 80 年代，随着单克隆抗体技术的诞生，越来越多的细胞表面上具有免疫功能的分子被发现，为癌细胞的检出和肿瘤疾病的诊断提供了新途径。利用流式细胞术对细胞表面分化抗原的研究表明不同的肿瘤细胞具有各自的免疫表型，因而测定细胞表面抗原表达的水平，对于了解肿瘤细胞的增殖与分化情况和采取相应药物进行治疗具有重要的临床意义。

电化学分析技术具有许多优越性，如测试探头可微型化，不受体系浊度和颜色影响，方法灵敏度高、速度快、花费低、危害小等。它还具有检测仪器简单、易于微型化的特点，线性范围宽、灵敏度高，因而可直接将检测信号转换为直观易读的浓度值，便于非专业人士使用。目前，利用电化学方法对恶性肿瘤细胞表面分化抗原进行原位免疫测定未见报道。发展肿瘤细胞免疫表达和细胞因子的原位电化学免疫检测新技术，对肿瘤疾病的早期免疫临床诊断、疗效观察和指导治疗具有重要意义，对于分析化学特别是电分析化学的发展也具有推动作用。

发明内容

本发明目的是：建立一种肿瘤细胞表面分化抗原的原位检测新方法。利用电化学分析简便、易行、价廉的特点，结合免疫分析高选择性、高灵敏度方法，发展肿瘤细胞免疫表达和细胞因子的原位电化学免疫检测新技术，为肿瘤疾病的诊断与治疗提供新途径。

本发明首先在电化学预处理的玻碳电极表面形成金胶-壳聚糖膜，构造生物兼容性好的仿生界面，用于肿瘤细胞在电极表面的固定。结合免疫学原理，通过两步温育反应将碱性磷酸酶标记抗体结合到细胞膜表面，利用酶对底物的催化反应产生的电化学活性物质的安培响应测定肿瘤细胞表面抗原的含量，建立了一种肿瘤细胞表面免疫表达的原位电化学免疫检测新技术。

玻碳电极经电化学预处理活化后形成富氧层以增加电极表面的亲水性，有利于构造生物兼容性好的金胶-壳聚糖膜仿生界面。在此界面上，固定的肿瘤细胞可稳定地保持其天然状态。该方法改良后的界面使肿瘤细胞表面特异性分化抗原充分裸露，经两步温育过程将碱性磷酸酶（AP）标记抗体引入到细胞膜表面，催化 1-萘酚磷酸酯（1-NP）水解产生具有电化学活性的 1-萘酚，根据 1-萘酚的氧化电流测定细胞表面的抗原，从而发展了一种肿瘤细胞免疫表达的原位电化学免疫检测新技术。

1. 肿瘤细胞固定

（1）对玻碳电极（GCE）表面进行电化学预处理，得到洁净、亲水的富氧基表面。

（2）在处理后的玻碳电极表面滴涂一定浓度的交联 Mos-丁酰壳聚糖溶液，水解后自然成膜，如图 1 所示。

（3）将壳聚糖膜修饰电极（CS/GCE）浸入金胶溶液中 30 min 取出，自然干燥后得到金胶-壳聚糖膜仿生界面。该界面的生物兼容性与浸泡金胶的时间及金胶的含量有关。CS/GCE 在金胶溶液中浸泡时间越长，吸附的金胶纳米粒子越多；但时间太长，金胶溶液团聚且慢慢出现黑色沉淀，影响吸附到电极表面的金纳米粒子的性质。只有当吸附金胶的含量一定，才能得到分布均匀、稳定性高、生物兼容性好的功能膜。

（4）将肿瘤细胞悬浊液滴涂于上述金胶-壳聚糖膜修饰电极（Au-CS/GCE）表

面进行肿瘤细胞的固定。

2. 肿瘤细胞表面抗原及细胞浓度的电化学免疫检测

(1) 免疫反应条件的优化, 包括以下四个方面:

a) 温育液中酶标抗体的含量: 为获得最优的检测范围和灵敏度, 温育液中酶标抗体的含量要满足固定化细胞表面抗原结合所需的量。

b) 缓冲溶液的 pH 值: 细胞在人体正常 pH 条件下才具有最佳活性, 同时抗体上标记酶的活性也与溶液酸度有关, 碱性磷酸酶在较低的 pH 条件下很不稳定。

c) 温育时间: 免疫反应(抗原、抗体间的识别、结合)通常需要一定时间来完成, 为保证测定的准确性和灵敏性, 要求控制一定的反应时间确保免疫反应的完成。

d) 温育温度: 免疫反应一般在人体或高等动物体内发生, 其对温度较敏感。在适合的温度下(一般是常温或人体温度), 免疫反应达到最大效率。

(2) 将得到的结合 AP 标记抗体的肿瘤细胞修饰电极于含 1-NP 检测溶液中进行电化学检测, AP 催化 1-NP 水解产生具有电化学活性的 1-萘酚, 根据 1-萘酚的氧化电流测定肿瘤细胞表面的抗原。

(3) 改变固定化肿瘤细胞的浓度, 在最佳免疫反应条件下测定不同细胞浓度时的电化学响应, 进行肿瘤细胞的定量。检测原理见图 2 (以肿瘤细胞表面 P-gp 检测为例)。

对于不同的肿瘤细胞, 产生的表面抗原具有不同的免疫反应条件或特征: K562 白血病细胞(K562/ADM 细胞)表面 P-gp 抗原测定将 P-gp 鼠抗人一抗(P-gp MAbs)和碱性磷酸酶标记羊抗鼠二抗(AP-P-gp MAbs)的 PBS 溶液中分别温育, 将碱性磷酸酶标记抗体结合到细胞膜表面, 得到 AP-P-gp-K562/ADM-Au-CS/GCE。其它肿瘤细胞表面的肿瘤相关抗原和细胞浓度, 如卵巢癌细胞表面的糖蛋白 CA125、胰腺癌细胞表面的糖蛋白 CA19-9、原发性肝癌细胞表面的甲胎蛋白(AFP)、结肠癌细胞表面的癌胚抗原(CEA)等都可以用该方法进行原位检测。而其它酶, 如辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、漆酶等标记的二抗和相应的可产生电化学响应的底物也可以用于肿瘤细胞表面抗原和细胞浓度的原位电化学免疫测定。

本发明的特点是: 结合免疫分析高选择性、高灵敏度方法, 利用电化学分析

简便、易行、价廉的特点，建立了一种肿瘤细胞表面分化抗原的原位电化学免疫检测新技术，为肿瘤细胞各种抗原表达水平的测定及肿瘤疾病的诊断与治疗提供了新途径。该方法较现有的肿瘤抗原分析方法，具有以下优点：

(1) 电化学仪器操作简便灵活、成本较低、分析速度快，适用于临床快速检测；

(2) 利用壳聚糖这种天然高分子材料固定肿瘤细胞具有很好的应用前景，该材料价廉易得、低毒性、亲水性，且具有良好的化学稳定性和生物兼容性；

(3) 将制备和检测集于一电极表面，细胞所需量及其它试剂的耗量少，温育时间短，进而降低了测定成本；

(4) 该方法表现出很好的精确性、重复性和稳定性，制备方法简单，检测成本较现有的肿瘤细胞表面抗原的原位测定方法，如流式细胞技术，要低得多。

(5) 不仅在理论上为肿瘤细胞表面抗原的原位测定建立了一种新方法，而且可望代替流式细胞仪发展新型的细胞免疫分析测定技术并向市场推广。

本发明通过化学修饰技术成功地将肿瘤细胞固定在金胶-壳聚糖膜仿生界面，该材料价廉易得、低毒性、亲水性，且具有良好的化学稳定性和生物兼容性，用于生物分子的固定具有很好的应用前景。结合免疫分析的特异性识别反应温育酶标抗体，通过酶对底物催化产生电活性物质进行安培检测，实现了肿瘤细胞膜表面抗原的原位检测。由于电化学检测操作简单、成本较低、分析速度快，可望实现临床肿瘤细胞表面各种抗原表达水平的快速测定，为肿瘤疾病的诊断与治疗提供了新途径。

附图说明

图1 为本发明 Mos-丁酰壳聚糖膜的形成

图2 为本发明肿瘤细胞固定及表面 P-gp 抗原的原位电化学免疫测定方法的反应原理图

具体实施方式

以阿霉素诱导 K562 白血病细胞 (K562/ADM 细胞) 表面 P-gp 抗原测定为例，当然一般的样品也完全可以被本发明方法检测：

1. K562/ADM 细胞固定

(1) 电极抛光: 将 4 mm 盘状玻碳电极分别用 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的 α -氧化铝悬浆在麂皮上抛光呈镜面, 二次水冲洗干净, 再依次用 1:1 硝酸、丙酮、二次水超声清洗, 得到新鲜、洁净的电极表面。

(2) 电极表面预处理: 将抛光后的玻碳电极在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液中进行 +1.75 V 恒电位下氧化电解 300 秒后, 再依次于 +0.3 ~ +1.3 V 和 +0.3 ~ -1.3 V 电位范围内循环扫描直至得到稳定电流值。取出电极, 二次水冲洗后, 氮气吹干。

(3) 壳聚糖膜的形成: 取 5 μl 1.0 wt.% 交联 Mos-丁酰壳聚糖溶液, 滴涂在经过上述步骤处理的电极表面, 水解成膜, 得到壳聚糖膜修饰电极 (CS/GCE)。

(4) 金胶-壳聚糖膜的形成: 将 CS/GCE 浸入新制备的 24-nm 的金胶溶液中, 30 min 后取出, 自然干燥后得到金胶-壳聚糖 (Au-CS) 膜仿生界面。

(5) K562/ADM 细胞固定: 取 5 μl 2.0×10^6 cells/ml 细胞悬浊液滴涂于上述金胶-壳聚糖膜修饰电极 (Au-CS/GCE) 表面, 实现 K562/ADM 细胞的固定, 得到 K562/ADM-Au-CS/GCE。

2. 固定化 K562/ADM 细胞表面 P-gp 抗原免疫反应条件的优化

分别改变温育溶液中抗体的含量、温育液的 pH 值、温育温度及温育时间, 选择达到最大电流响应时对应的值作为最佳免疫反应条件, 其检测过程为: 以 BSA/EDTA/PBS 为稀释液, 将 P-gp 鼠抗人一抗 (P-gp MAb) 和碱性磷酸酶标记羊抗鼠二抗 (AP-P-gp MAb) 稀释至不同浓度。将 K562/ADM-Au-CS/GCE 依次在含有 P-gp MAb 和 AP-P-gp MAb 的 PBS 溶液中分别温育, 通过两步温育反应将碱性磷酸酶标记抗体结合到细胞膜表面, 得到 AP-P-gp-K562/ADM-Au-CS/GCE。

实验结果显示, 最佳免疫反应条件为 5 $\mu\text{g/ml}$ P-gp MAb, 2 $\mu\text{g/ml}$ AP-P-gp MAb, pH 7.4 PBS, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 60 min。

3. 细胞表面 P-gp 抗原的检测

将 AP-P-gp-K562/ADM-Au-CS/GCE 置于含有 0.25 mM 1-萘基酚磷酸酯的 1.0 ml pH 7.4 PBS 中记录电化学响应, 利用 AP 催化 1-NP 水解产生的 1-萘酚的氧化电流测定 K562/ADM 细胞表面的 P-gp 抗原的含量。其制备过程与检测原理如图 2 所示。

4. K562/ADM 细胞的定量

在优化的实验条件下，改变用于固定的 K562/ADM 细胞浓度，在最佳免疫反应条件下测定不同细胞浓度时得到的电化学响应，根据电流与细胞浓度的对数间的线性关系进行 K562/ADM 细胞浓度的定量。

辣根过氧化酶、葡萄糖氧化酶、漆酶等标记的二抗和相应的可产生电化学响应的底物也可以用于肿瘤细胞表面抗原和细胞浓度的原位电化学免疫测定相应用于检测卵巢癌细胞表面的糖蛋白 CA125、胰腺癌细胞表面的糖蛋白 CA19-9、原发性肝癌细胞表面的甲胎蛋白（AFP）、结肠癌细胞表面的癌胚抗原（CEA）亦采用本发明的方法。

专利名称(译)	肿瘤细胞表面抗原的原位电化学免疫测定方法		
公开(公告)号	CN1588078A	公开(公告)日	2005-03-02
申请号	CN200410064732.3	申请日	2004-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	鞠焯先 牡丹		
发明人	鞠焯先 牡丹		
IPC分类号	G01N27/327 G01N27/404 G01N33/535 G01N33/554		
代理人(译)	成立珍		
其他公开文献	CN1312480C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明建立了一种肿瘤细胞表面分化抗原的原位电化学免疫检测新方法。通过化学修饰技术成功地将肿瘤细胞固定在金胶-壳聚糖膜仿生界面。本发明利用电化学技术简便、易行、价廉的特点，结合免疫分析高选择性、高灵敏度方法，通过固定化肿瘤细胞表面结合的酶对底物的催化反应产生具有电化学活性的分子，实现了肿瘤细胞膜表面抗原的原位安培检测。该方法将制备和检测集于一电极表面，细胞所需量及其它试剂的耗量少，温育时间短，测定成本低，检测速度和效率高。由于电化学仪器操作简单、成本较低、分析速度快，可望实现临床肿瘤细胞表面各种抗原表达水平的快速测定，为肿瘤疾病的诊断与治疗提供了新途径。

