



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105353117 A

(43) 申请公布日 2016.02.24

(21) 申请号 201510777896.9

(22) 申请日 2015.11.13

(71) 申请人 浙江大学

地址 310013 浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号

(72) 发明人 朱永良 秦光明 吴佳

(74) 专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 曾少丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,包括步骤:1) 胶乳微球的活化;2) 胶乳微球与抗 CD58 单克隆和多克隆 IgG 抗体交联;3) 交联体的洗涤;4) 交联体的保存。本发明制备的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体,能与异常糖基化修饰 CD58 蛋白发生特异性结合反应,而不与正常表达的 CD58 蛋白和非 CD58 蛋白发生非特异性反应;用于胶乳免疫比浊法检测外周血或血清异常糖基化修饰 CD58 分子水平,定量分析样品中异常糖基化修饰 CD58 含量。

1. 检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於,包括如下步骤:

1) 胶乳微球的活化:取胶乳微球于胶乳活化缓冲液中,采用超声波进行乳化活化后,脱盐并去除残留活化物,完成活化;

2) 胶乳微球与抗 CD58 单克隆和多克隆 IgG 抗体交联:于垂直混合仪中加入活化后的胶乳微球和抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆 / 多克隆 IgG 抗体,混匀并反应后,加入甘氨酸缓冲液混合均匀,得到交联体;

3) 交联体的洗涤:将交联体离心后取沉淀,用洗涤液重悬沉淀后离心取沉淀,重复 3-5 次,完成洗涤;

4) 交联体的保存:将洗涤后的交联体沉淀于甘氨酸保存液中超声混匀,4℃保存。

2. 根据权利要求 1 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述步骤 1) 中胶乳微球为直径为 100-165nm 的聚苯乙烯胶乳微球。

3. 根据权利要求 1 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述步骤 1) 中胶乳活化缓冲液的配方为 0.05-0.5M/L pH5.5-7.5 的 MES 缓冲液、水、吐温 -20、19.2mg/mL NHS 和 52mM/L EDAC。

4. 根据权利要求 3 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述 0.05-0.5M/L pH5.5-7.5 的 MES 缓冲液、水、吐温 -20、19.2mg/mL NHS 和 52mM/L EDAC 的配比为 1:1.5:0.01-0.015:0.5-1.5:2-4。

5. 根据权利要求 1 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述步骤 1) 中脱盐并去除残留活化物的方法为流穿葡聚糖 G-25 凝胶柱方法。

6. 根据权利要求 1 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述步骤 2) 中活化后的胶乳微球与抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆 / 多克隆 IgG 抗体的配比为 1ml:0.1-1.2mg,所述抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆 / 多克隆 IgG 抗体预先溶解于 PB 缓冲液后再与胶乳微球混合。

7. 根据权利要求 6 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述 PB 缓冲液为 100mM/L, pH7.4 的 PB 缓冲液。

8. 根据权利要求 1 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述步骤 2) 中甘氨酸缓冲液为 0.1-1.0M/L, pH7.4 的甘氨酸缓冲液。

9. 根据权利要求 1 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述步骤 3) 中洗涤液为内含 0.1% BSA 的 50mM/L, pH7.4 甘氨酸缓冲液。

10. 根据权利要求 1 所述的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,其特征在於:所述步骤 4) 中甘氨酸保存液为内含 0.1% BSA, 0.1-1.0% PVP, 0.05% NaN₃ 的 50mM/L, pH7.4 甘氨酸缓冲液。

检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本专利涉及医学检验领域,特别涉及一种检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法。

背景技术

[0002] CD58 分子即淋巴细胞功能相关抗原-3(lymphocyte function associated antigen-3, LFA-3),是细胞表面的一种跨膜蛋白质分子,属免疫球蛋白超家族的细胞粘附分子,表达于造血细胞,血管内皮和上皮细胞。CD58 分子是 T 细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)表面 CD2 分子的配体,体外研究表明 CD2 与 CD58 结合可引起淋巴细胞增殖与活化,这种作用不需要巨噬细胞等辅助细胞的参与,具有抗原非特异性,为 T 细胞激活的旁路系统。CD58 作为共刺激分子还与 CD2 分子结合形成的复合物诱导免疫细胞粘附和活化,从而参与特异性免疫应答。CD58 表达异常与多种自身免疫相关疾病密切相关:CD58 特定位点的突变是多发性硬化和某些类型淋巴瘤发病的危险因素;甲状腺自身免疫疾病中 CD58 表达与甲状腺滤泡细胞表面并参与了自身抗原的递呈和识别;同时银屑病活动期会伴随着 CD58+ 淋巴细胞的大量产生。

[0003] CD58 分子属于细胞膜性抗原,细胞膜上的 CD58 分子通常有两种存在形式,即跨膜形式(TM)和锚定形式(GPI)。近年发现两种分子形式与不同的细胞信号传导通路相关,锚定形式定位于胞膜脂筏区,跨膜形式定位于非脂筏区,但在交联作用(cross-linking)下,跨膜形式可重新定位于脂筏区并独立于锚定形式参与相关细胞信号的传导。CD58 主要分布在静止期细胞的细胞膜上,在活化细胞中的 CD58 除上述两种形式外,细胞膜表面的 CD58 可出现剪切,细胞膜外部分 CD58 分子可脱落到体液中,即可溶性 CD58 分子(sCD58)。已证实从血清、尿及某些细胞系(如 HepG2)的培养上清液中分离到可溶性 CD58 分子。外周血 sCD58 水平可间接反映 T 细胞和 NK 细胞的激活状态。CD58 分子是一种高度糖基化蛋白,作为 T 细胞表面糖蛋白受体 CD2 分子的配体,两者结合形成复合物介导多种类型细胞的细胞间粘附。CD2 分子的胞外氨基末端结构域包含一个 N-连接型糖基化位点,该结构域中天冬酰胺(Asn)N-连接型糖基化在 CD2 与 CD58 分子的结合及相互作用中起关键作用,对 CD2 分子细胞粘附功能有重要影响,然 CD58 分子糖基化修饰的改变对分子功能及细胞间相互作用的影响目前尚缺乏相关研究。

[0004] CD58 可能是一个潜在的肿瘤标志物之一。在血液系统恶性肿瘤中,CD58 被认为是未成熟肿瘤细胞的标志分子。正常 B 细胞在成熟过程中 CD58 表达逐渐减弱,然而在前体 B 细胞白血病其表达较任何分化阶段的正常细胞都要高,提示 CD58 在诊断和监测前体 B 细胞白血病微小残留灶中具有重要价值。急性淋巴细胞性白血病中恶性前体 B 细胞的 CD58 表达显著高于非恶性 B 细胞;在胃癌等实体肿瘤中高水平 CD58 表达与低存活率正相关,同时 CD58 可能参与肿瘤血管侵犯及淋巴结转移。最新的研究显示 CD58 是一群结直肠癌肿瘤干细胞的表面标志。利用化疗药物短期作用浓聚干细胞的方法,将大肠癌原代细胞系分别

经 5-FU 和奥沙利铂作用 2 周后,FCM 检测发现 CD58 阳性细胞被明显富集。进一步对其基因表达谱特征扫描发现,与 CD58 阴性大肠癌细胞比较,CD58 阳性大肠癌细胞具有低水平分泌数个趋化因子的能力。用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定发现药物富集组细胞趋化因子 8 (CXCL-8) 水平明显高于对照组。同样经无血清培养的 CD58+ 克隆球细胞 CXCL-8 水平也明显升高。CXCL-8 是一种 CXC 型炎症趋化因子,CXCL-8 可激活并增强肿瘤血管内皮细胞的增殖和抗凋亡能力,促进趋化因子受体 CXCR1、CXCR2 和 MMP-2 的表达,从而促进肿瘤血管生成和肿瘤细胞的侵袭和迁移。近来研究还表明 CXCL-8 可协同上皮间质化转录因子 Snail 促进大肠癌干细胞的增殖。以上研究结果提示 CD58 是一个潜在的监测肿瘤疾病进展和评价肿瘤预后的靶分子之一。

[0005] 肿瘤细胞表达的 CD58 蛋白在其分子结构和表面修饰上不同于正常细胞表达的 CD58。Challa-Malladi M 等发现约 20% 淋巴瘤细胞表达的 CD58DNA 存在碱基突变、缺失和拼接改变。用免疫荧光检测发现大肠癌肿瘤组织中 CD58 分子大量表达于肿瘤细胞胞浆内;进一步对原代新鲜分离的大肠癌细胞用 FCM 检测发现大肠癌细胞膜表达 CD58 阳性细胞 <5%,上述研究提示大肠癌细胞表达的 CD58 蛋白在其分子结构和表面修饰上不同于正常细胞表达的 CD58。除信号肽外,近年研究表明蛋白质关键糖基化改变也可影响蛋白质的正确定位。机体内蛋白质多数为糖蛋白,蛋白质翻译后糖基化修饰是最普遍也是最重要的一种加工方式。糖蛋白糖链影响蛋白质折叠、稳定、定位及运输等,并参与如分化与去分化、细胞转化与识别、信号传导、免疫与应答等多种生命现象的调节。在肿瘤的发生发展过程中糖蛋白的糖基化程度或糖链结构发生了改变,导致糖蛋白及其所在细胞功能异常,进而出现恶性表型。糖链结构变化与恶性肿瘤密切相关,涉及肿瘤细胞生长、黏附和转移等许多重要的生理和病理过程,甚至参与肿瘤细胞的免疫选择和克隆进化。

[0006] 肿瘤细胞中蛋白质糖基化修饰出现特异性改变。蛋白质糖基化具有糖苷的多样性、修饰的复杂性及微观不均一性等,这使得糖基化蛋白结构异常复杂。目前研究发现人体内至少有 41 种糖基化形式,但主要以两种形式存在,即天冬酰胺 (Asn) 连接的 N-连接型糖链 (N-linked glycosylation) 和丝氨酸或苏氨酸 (Ser/Thr) 连接的 O-连接型糖链 (O-linked glycosylation) 二类。肿瘤细胞中糖基化修饰也有多种形式,如特定结构的糖链表达量差异、不完整糖链结构的出现、新糖链结构的出现等。研究发现岩藻糖基化修饰改变和唾液酸化程度改变等是肿瘤中常见的糖基化修饰改变。肝癌中蛋白质岩藻糖基化修饰增加,胰腺癌中 Lewis X 唾液酸和岩藻糖基化修饰增加。糖蛋白糖链结构变化与肿瘤发生发展的密切关系已日益成为肿瘤研究的关注热点。糖链变化具有肿瘤特异性,几乎每种恶性肿瘤都具有各自特征性的糖链变化,已有的发现涉及肝癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤等。如肝癌相关糖蛋白甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP),利用小扁豆凝集素 (LCA) 可将 AFP 分成多种糖链结构不同的异质体,其中 LCA 结合型 AFP 具有肝癌特征性,又称为岩藻糖基化 AFP 或 AFP-L3,2005 年美国 FDA 确定 AFP-L3 为肝癌诊断的标志物。测定具有特征性的肿瘤糖蛋白异常分子修饰现已成为利用“糖链标志”诊断肿瘤的新思路。尤其在肿瘤发生早期,这些“糖链标志”或可扮演特异性先锋信号的作用而达到肿瘤早期诊断的目的。

[0007] 在对大肠癌细胞的研究中发现,大肠癌组织来源 CD58 分子在基因结构上与正常肠上皮来源并无差异性,然在大肠癌细胞中 CD58 分子存在异常的糖基化修饰,即异常糖基

化修饰 CD58,几乎所有的大肠癌细胞均表达异常糖基化修饰 CD58。因而,外周血异常糖基化修饰 CD58 水平可能是一个潜在的、新的肿瘤标志物之一。目前国内尚无建立外周血或血清异常糖基化修饰 CD58 检测方法。血清抗原的检测方法主要有酶联免疫吸附法、化学发光法和胶乳免疫比浊法等。传统的酶联免疫吸附法因检测时间长,灵敏度低而逐渐被新技术所取代。其中,胶乳免疫比浊法检测速度快,定量准确,适用于临床自动化检验。

发明内容

[0008] 本发明介绍了一种检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,用于血浆等体液可溶性异常糖基化修饰 CD58 蛋白分子检测,为肿瘤高危人群浓缩和大肠癌早期诊断提供一种新的肿瘤标志物。

[0009] 本发明提供的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:

[0010] 1) 胶乳微球的活化:取胶乳微球于胶乳活化缓冲液中,采用超声波进行乳化活化后,脱盐并去除残留活化物,完成活化;

[0011] 2) 胶乳微球与抗 CD58 单克隆和多克隆 IgG 抗体交联:于垂直混合仪中加入活化后的胶乳微球和抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆/多克隆 IgG 抗体,混匀并反应后,加入甘氨酸缓冲液混合均匀,得到交联体;

[0012] 3) 交联体的洗涤:将交联体离心后取沉淀,用洗涤液重悬沉淀后离心取沉淀,重复 3-5 次,完成洗涤;

[0013] 4) 交联体的保存:将洗涤后的交联体沉淀于甘氨酸保存液中超声混匀,4℃ 保存。

[0014] 进一步的,所述步骤 1) 中胶乳微球为直径为 100-165nm 的聚苯乙烯胶乳微球。

[0015] 进一步的,所述步骤 1) 中胶乳活化缓冲液的配方为 0.05-0.5M/L pH5.5-7.5 的 MES 缓冲液、水、吐温 -20、19.2mg/mL NHS 和 52mM/L EDAC。

[0016] 进一步的,所述 0.05-0.5M/L pH5.5-7.5 的 MES 缓冲液、水、吐温 -20、19.2mg/mL NHS 和 52mM/L EDAC 的配比为 1:1.5:0.01-0.015:0.5-1.5:2-4。

[0017] 进一步的,所述步骤 1) 中脱盐并去除残留活化物的方法为流穿葡聚糖 G-25 凝胶柱方法。

[0018] 进一步的,所述步骤 2) 中活化后的胶乳微球与抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆/多克隆 IgG 抗体的配比为 1ml:0.1-1.2mg,所述抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆/多克隆 IgG 抗体预先溶解于 PB 缓冲液后再与胶乳微球混合。

[0019] 进一步的,所述 PB 缓冲液为 100mM/L, pH7.4 的 PB 缓冲液。

[0020] 进一步的,所述步骤 2) 中甘氨酸缓冲液为 0.1-1.0M/L, pH7.4 的甘氨酸缓冲液。

[0021] 进一步的,所述步骤 3) 中洗涤液为内含 0.1% BSA 的 50mM/L, pH7.4 甘氨酸缓冲液。

[0022] 进一步的,所述步骤 4) 中甘氨酸保存液为内含 0.1% BSA,0.1-1.0% PVP,0.05% NaN₃ 的 50mM/L, pH7.4 甘氨酸缓冲液。

[0023] 本发明制备的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体,能与异常糖基化修饰 CD58 蛋白发生特异性结合反应,而不与正常表达的 CD58 蛋白和非 CD58 蛋白发生非特异性反应;用于胶乳免疫比浊法检测外周血或血清异常

糖基化修饰 CD58 分子水平,当样品中含有异常糖基化修饰 CD58 时,交联特异性抗体的胶乳微球可由于抗原抗体特异性结合发生凝集,造成浊度增加,通过测定样品吸光度变化,对照标准曲线,定量分析样品中异常糖基化修饰 CD58 含量,检测效能与 ELISA(酶联免疫吸附法)、化学发光免疫检测法接近或等效。

具体实施方式

[0024] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,使用实施例进一步阐述本发明。

[0025] 1. 异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆 IgG 抗体制备方法

[0026] 1.1 动物免疫

[0027] 1×10^6 大肠癌 LoVo 细胞用 RNAeasy 试剂盒分离纯化总 RNA,经 Oligo dT15 引物将总 RNA 逆转录为 cDNA,用聚合酶链式反应 (PCR) 将人 CD58 基因序列 (NM_001779.2) 扩增,经 EcoRI/BamH1 酶切后,克隆至 pLXSN 逆转录病毒载体, DNA 测序验证,构建 CD58 表达逆转录病毒载体系统,转染 PT67 细胞,生产重组逆转录病毒,按 10:1 滴度感染大肠癌 SW620 细胞,用 500-700 μ g/mL 的 G418 药物压力筛选阳性克隆 7-14 天。扩大培养,用免疫印迹法 (Western blot) 方法验证异常糖基化修饰 CD58 表达状况。用于制备异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆抗体的大肠癌 SW620 细胞应强阳性表达外源性过表达 CD58 蛋白。

[0028] 进一步以外源性过表达 CD58 分子的大肠癌 SW620 细胞尾静脉注射免疫 Balb/c 雌性小鼠 (8-10 周龄,体重 18-20g),每次免疫 1×10^6 细胞/只)。每周 1 次,连续 4 周,后续分别于第 5 周、第 7 周和第 9 周使用无佐剂细胞抗原直接腹腔注射免疫,间隔 1 周后采用尾静脉/腹腔加强免疫 1 次,3 天后细胞融合。

[0029] 1.2 杂交瘤细胞的制备

[0030] 按照常规细胞融合方法进行。取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 1:6 在 50% PEG (MW400-800) 的作用下融合,融合细胞先在次黄嘌呤-氨甲喋呤-胸腺嘧啶 (HAT) 选择培养基中培养,2 周后可换为次黄嘌呤-胸腺嘧啶 (HT) 培养基,在 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。待克隆孔长至 1/3-1/2 时,取培养上清液进行抗体检测。

[0031] 1.3 特异性克隆孔筛选

[0032] 用间接 ELISA 法筛选阳性孔。用 0.1% 戊二醛处理反应微孔 30min,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次,加入 1×10^5 的过表达 CD58 分子的大肠癌 SW620 细胞,室温反应 120min,用 PBS 洗涤 3 次,用 10% 小牛血清室温封闭 30min,再加入 100 μ l 上述培养上清液室温反应 60min,用 PBS 洗涤 3 次,最后再加入 1:2000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP 室温反应 60min,用 PBS 洗涤 3 次,加入四甲基联苯氨 (TMB) 底物显色观察。凡出现明显蓝色反应者为阳性,否则为阴性。阳性孔进一步进行竞争抑制 ELISA 法筛选。

[0033] 用竞争抑制 ELISA 法筛选异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆抗体。用 0.1% 戊二醛处理反应微孔 30min,用 PBS 洗涤 3 次,加入 1×10^5 的源自正常人外周血的淋巴细胞,室温反应 120min,用 PBS 洗涤 3 次,用 10% 小牛血清室温封闭 30min,再加入 100 μ l 上述培养上清液室温反应 60min,用 PBS 洗涤 3 次,最后再加入 1:2000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP 室温反应 60min,用 PBS 洗涤 3 次,加入 TMB 底物显色观察。凡出现明显蓝色反应者为阳性,否则为阴性。凡与正常人淋巴细胞有反应的克隆孔应丢弃,保留阴性孔,再进行有限稀释法进行 3 次

亚克隆,建株的杂交瘤细胞再扩大培养、冻存、制备腹水。

[0034] 1.4 腹水的制备和纯化

[0035] 将稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞扩大培养后,接种到预先用降植烷或液体石蜡致敏的 BALB/c 小鼠腹腔,7-12 天内观察,收取腹水,离心后测定效价。经 50% 饱和硫酸铵沉淀保存或者低温冻存。腹水采用 50% 饱和硫酸铵沉淀 - 正辛酸沉淀,或者用 50% 饱和硫酸铵沉淀 - rProteinA-Sepharose Fast Flow 亲和层析纯化,最后用 SDS-PAGE 检测纯度,需达到 90%。

[0036] 2. 异常糖基化修饰 CD58 分子多克隆 IgG 抗体制备方法

[0037] 以上述制备的固相化抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆抗体 CD58-Sepharose 4B 柱从表达 CD58 分子的大肠癌 SW620 细胞和新鲜大肠癌组织匀浆中用亲和层析法分离异常糖基化修饰的 CD58 蛋白,再用 Sephadex G-100 进一步分离纯化糖基化修饰 CD58 蛋白,用 Lorroy's 酚试剂进行蛋白质定量。以 100-250 μ g/次/只 CD58 蛋白与完全福氏佐剂混匀,家兔皮下多点注射免疫。每 1-2 周 1 次,连续 5 次,间隔 1 周后采用分离颈动脉,收集血液约 80-100 毫升,室温放置 2 小时,4 $^{\circ}$ C 10000rpm 离心 30min,分离收集血清。上述血清首先流过源自正常淋巴细胞的 CD58 蛋白-Sepharose 4B 亲和层析柱,以去除与正常 CD58 蛋白有交叉反应的抗体,然后再用异常糖基化修饰 CD58 蛋白-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化抗异常糖基化修饰 CD58 蛋白的特异性 IgG 抗体,最后用 SDS-PAGE 检测纯度,需达到 90%。

[0038] 3. 胶乳微球交联 CD58 单克隆或多克隆 IgG 抗体方法(以活化交联 4ml 的 1% 胶乳-抗体为例)

[0039] 3.1 胶乳活化

[0040] 3.1.1 0.05-0.5M/L MES 缓冲液 (pH5.5-7.5) 1ml,直径 100-165nm 的 10% 胶乳 0.4ml,水 1.5ml,吐温-20 10-15 μ l,涡旋振荡混匀。

[0041] 3.1.2 加入 19.2mg/mL NHS 0.5-1.5ml,52M/L EDAC 2-4ml,涡旋振荡 15-30 分钟。

[0042] 3.1.3 混合液超声 5 次,每次超声 5 秒,间隔 15 秒,超声能量 6000kJ。过 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱,用水洗至终体积 20ml。

[0043] 3.2 抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆 / 多克隆 IgG 抗体与胶乳交联的优化

[0044] 3.2.1 上述活化的胶乳液 1.0ml,分别与 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2mg 抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆 / 多克隆抗体(分别溶于 1.0ml 100mM/L, pH7.4 PB 缓冲液中)混匀后,于垂直混合仪反应 1-3 小时。

[0045] 3.2.2 分别加入 0.1-1.0M/L, pH7.4 甘氨酸缓冲溶液 1ml 于垂直混合仪混合 15-60 分钟,以封闭残留的活性基团。

[0046] 3.3 交联物的分离

[0047] 3.3.1 上述抗体胶乳混合液 15000-20000rpm 离心 15-60 分钟,弃上清,保留沉淀。

[0048] 3.3.2 用洗涤液 40ml 重悬沉淀(洗涤液:50mM/L, pH7.4 甘氨酸缓冲溶液内含 0.1% BSA),15000-20000rpm 离心 15-60 分钟。

[0049] 3.3.3 重复 3.3.2 步骤 3-5 次。

[0050] 3.4 抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆 / 多克隆 IgG 抗体与胶乳交联物的保存

[0051] 上述胶乳沉淀中加入 4ml 50mM/L, pH7.4 甘氨酸缓冲溶液内含 0.1% BSA, 0.1-1.0% PVP,0.05% NaN_3 ,超声 5 秒混匀,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0052] 3.5 抗异常糖基化修饰 CD58 分子单克隆 / 多克隆 IgG 抗体与胶乳交联最佳浓度的确定

[0053] 3.5.1 主要试剂组成成分

[0054] 试剂 R1 :三羟甲基氨基甲烷缓冲液 20-100mM/L, pH6.0-8.5 ;PEG (MW4000-8000) 40g/L ;BSA 5g/L

[0055] 试剂 R2 :不同交联 CD58 单克隆或多克隆抗体的胶乳微球。

[0056] 3.5.2 检测步骤

[0057] 反应类型 :速率法 温度 :37℃ 比色杯光径 :0.6cm

[0058] 主 / 副波长 :546nm/800nm 单位 :U/ml 反应方向 :上升

[0059]

	空白管(B)	校准管(S)	测定管(T)
试剂 R1	250 μ L	250 μ L	250 μ L
纯化水	3 μ L		
校准品		3 μ L	
样品			3 μ L
混匀, 37℃ 孵育 3-5 分钟,			
试剂 R2	50 μ L	50 μ L	50 μ L
混匀, 37℃ 延迟 30 秒, 反应 5 分钟, 读取吸光度 $\Delta A/min$ 。			

[0060] 3.5.3 结果确定 :

[0061] 计算校准品吸光度的差值 (A 校准 -A 空白), 建立合适的数学模 (非线性) 如 Logit-Log 等, 拟合成多点定标的校准曲线。根据各胶乳校准曲线的反应变化幅度、线性范围、相关系数和反应可重复性确定最佳的抗体与胶乳比例。

[0062] 4. 血浆可溶性异常糖基化修饰 CD58 蛋白分子检测

[0063] 4.1 主要试剂组成成分

[0064] 试剂 R1 :三羟甲基氨基甲烷缓冲液 20-100mM/L, pH6.0-8.5 ;

[0065] PEG (MW4000-8000) 40g/L ;BSA 5g/L

[0066] 试剂 R2 :交联 CD58 单克隆或多克隆抗体的胶乳微球

[0067] 4.2 检测步骤

[0068] 反应类型 :固定时间 2 点法 温度 :37℃ 比色杯光径 :1.0cm

[0069] 主 / 副波长 :546nm/800nm 单位 :U/ml 反应方向 :上升

[0070]

	空白管(B)	校准管(S)	测定管(T)
试剂 R1	250 μ L	250 μ L	250 μ L
纯化水	3 μ L		
校准品		3 μ L	
样品			3 μ L
混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3-5 分钟,			
试剂 R2	50 μ L	50 μ L	50 μ L
混匀, 37 $^{\circ}$ C 延迟 30 秒, 反应 5 分钟, 读取吸光度 $\Delta A/\text{min}$ 。			

[0071] 4.3 结果计算：

[0072] 计算校准品吸光度的差值 (A 校准 -A 空白), 建立合适的数学模 (非线性) 如 Logit-Log 等, 拟合成多点定标的校准曲线。根据样品 (A 样品 -A 空白) 的吸光度差值, 在工作曲线上求得样品中异常糖基化修饰 CD58 蛋白的含量。

[0073] 本实施例制备的检测可溶性异常糖基化修饰 CD58 分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体, 能与异常糖基化修饰 CD58 蛋白发生特异性结合反应, 而不与正常表达的 CD58 蛋白和非 CD58 蛋白发生非特异性反应; 用于胶乳免疫比浊法检测外周血或血清异常糖基化修饰 CD58 分子水平, 当样品中含有异常糖基化修饰 CD58 时, 交联特异性抗体的胶乳微球可由于抗原抗体特异性结合发生凝集, 造成浊度增加, 通过测定样品吸光度变化, 对照标准曲线, 定量分析样品中异常糖基化修饰 CD58 含量, 检测效能与 ELISA (酶联免疫吸附法)、化学发光免疫检测法接近或等效。

专利名称(译)	检测可溶性异常糖基化修饰CD58分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN105353117A	公开(公告)日	2016-02-24
申请号	CN201510777896.9	申请日	2015-11-13
[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	朱永良 秦光明 吴佳		
发明人	朱永良 秦光明 吴佳		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/57484 G01N33/6803		
其他公开文献	CN105353117B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明检测可溶性异常糖基化修饰CD58分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法，包括步骤：1)胶乳微球的活化；2)胶乳微球与抗CD58单克隆和多克隆IgG抗体交联；3)交联体的洗涤；4)交联体的保存。本发明制备的检测可溶性异常糖基化修饰CD58分子的胶乳微球交联特异性单克隆或多克隆抗体，能与异常糖基化修饰CD58蛋白发生特异性结合反应，而不与正常表达的CD58蛋白和非CD58蛋白发生非特异性反应；用于胶乳免疫比浊法检测外周血或血清异常糖基化修饰CD58分子水平，定量分析样品中异常糖基化修饰CD58含量。

	空白管(B)	校准管(S)	测定管(T)
试剂 R1	250 μ L	250 μ L	250 μ L
纯化水	3 μ L		
校准品		3 μ L	
样品			3 μ L
混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 3-5 分钟，			
试剂 R2	50 μ L	50 μ L	50 μ L
混匀，37 $^{\circ}$ C 延迟 30 秒，反应 5 分钟，读取吸光度 $\Delta A/min$ 。			