

[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 200410067245.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/546 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 4 月 26 日

[11] 公开号 CN 1763530A

[22] 申请日 2004.10.18

[21] 申请号 200410067245.2

[71] 申请人 上海生物芯片有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区李冰路 151 号

[72] 发明人 张庆华 吴 船 缪金明 宋 凯
王升年 赵 芹 奚佳捷

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种多肽芯片及其制备方法并用其制备单克隆抗体组

[57] 摘要

本发明涉及一种多肽芯片，并用其筛选具有不同抗原表位的单克隆抗体组，包括步骤：1. 根据要筛选的单克隆抗体组的抗原，合成多肽，制备多肽芯片；2. 取此抗原免疫小鼠的脾脏制成细胞悬液，与骨髓瘤细胞按一定的比例混合，并在融合剂作用下进行细胞融合，产生杂交瘤细胞；3. 收集融合杂交瘤细胞，培养 7-8 天，制备成悬液；4. 使用集成了不同可能抗原表位的多肽芯片对杂交瘤细胞的悬液进行筛选、鉴定；5. 以多肽芯片筛选鉴定到的阳性克隆，建立稳定分泌具有不同抗原表位的单克隆抗体的一组细胞株；6. 扩大培养，分离纯化，得到具有不同抗原表位的单克隆抗体组。本发明可以同时筛选得到一组具有不同抗原表位的单克隆抗体组，节省了大量时间与资金，大大促进抗体的制备、研究过程。

1. 一种多肽芯片,其特征是将大量的多肽,有序的固化在载体上,利用抗原抗体的亲和反应检测具有不同抗原表位的单克隆抗体,利用这种多肽芯片可以同时得到具有不同抗原表位的单克隆抗体组,具有快速灵敏的特点。
2. 根据权利要求1所述的多肽芯片,其特征载体可以为固相支持物,也可以为液相微珠。
3. 根据权利要求1、2所述的多肽芯片,其特征载体可以为表面带有活化基团的玻璃片、醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片中的一种或一种以上的结合物。
4. 根据权利要求1、2所述的多肽芯片,其特征载体为液相中的支持物为直径1-10微米的以不同荧光标记的微珠,根据微珠携带荧光不同,微珠的种类可达到100-10,000种。
5. 根据权利要求1、2、3所述的多肽芯片,其特征载体使用生物信息学方法分析抗原所有可能的表位,合成相应多肽,根据合成多肽的数量的多少设计阵列排布,使用高速全自动点样机器人把多种多肽以及阳性对照物、阴性对照物点阵于固相表面,固相芯片表面可存在多个重复点样区域,然后,在常温条件下过夜固定样品,使用封闭液进行封闭,洗涤干燥后,4度保存,一次可大量制备固相多肽芯片。
6. 根据权利要求1、2、4所述的多肽芯片,其特征载体使用生物信息学方法分析抗原所有可能的表位,合成相应多肽,在多肽的合成过程中,在多肽的N端统一连接一分子量为6-150KD的蛋白,将准备连接多肽的微珠以EDC/S-NHS活化,将不同多肽加入不同微珠体系中,室温暗处振荡2小时,加入磷酸盐缓冲液以抽滤的方法对未结合的多肽进行清洗,以磷酸盐缓冲液重悬微珠,将连接不同多肽不同颜色的微珠以一定比例混合,一次可大量制备,4度储存备用,使用时混合好的液相多肽芯片加入96孔板或384孔板中进行检测。
7. 根据权利要求1、5所述的多肽芯片,其特征载体将杂交瘤细胞上清加到固相多肽芯片表面,杂交瘤细胞上清中的不同抗原表位的抗体分别与固相多肽芯片表面的抗原多肽特异结合,洗去未结合的其他物质后,加入标记的二抗,反应后洗去未结合物质,以芯片扫描分析进行结果的判读与分析,阳性点代表杂交瘤细胞上清中的抗体与固相多肽芯片上相应的抗原多肽特异结合。
8. 根据权利要求1、6所述的多肽芯片,其特征载体将杂交瘤细胞上清加入液相多肽芯片中,杂交瘤细胞上清中的不同抗原表位的抗体分别与液相多肽芯片中微球表面的抗原多肽特异结合,洗去未结合的其他物质后,加入标记的二抗,反应后洗去未结合物质,以微珠检测分析仪进行结果的判读与分析,阳性点代表杂交瘤细胞上清中的抗体与固相多肽芯片上相应的抗原多肽特异结合。
9. 根据权利要求1、7、8所述的多肽芯片,其特征载体检测用二抗标记有生物素,或者直接以荧光标记,或者以显色或化学发光酶催化底物中的一种或一种以上标记。
10. 根据权利要求1所述的多肽芯片,其特征载体可以大规模同时制备具有不同抗原表位的单克隆抗体组,制备方法包括以下步骤:
 - (1) 取欲获得其单克隆抗体组的抗原,将其注入小鼠腹腔进行免疫;
 - (2) 取小鼠的脾脏制成细胞悬液,与骨髓瘤细胞按一定的比例混合,并在融合剂作用下进行细胞融合,产生杂交瘤细胞;
 - (3) 收集融合杂交瘤细胞,培养7-8天,制备成悬液;
 - (4) 使用集成了不同可能抗原表位的多肽芯片对杂交瘤细胞的悬液进行筛选、鉴定;
 - (5) 经过以上多肽芯片筛选鉴定到的阳性克隆,即具有不同抗原表位抗体的克隆,使

用无限稀释法，建立稳定分泌具有不同抗原表位的单克隆抗体的一组细胞株；

- (6) 对于各细胞株分别扩大培养至细胞数量 10, 000, 000 以上或者注射小鼠获得腹水；
- (7) 使用亲和层析柱对小鼠腹水或细胞上清进行纯化，得到纯化的具有不同抗原表位的一组抗体。

一种多肽芯片及其制备方法并用其制备单克隆抗体组

技术领域

本发明属于生命科学免疫组化生物芯片领域，具体涉及一种多肽芯片及其制备方法，并用其大规模同时制备具有不同抗原表位的单克隆抗体组的方法。

背景技术

随着人类基因组计划的实施和推进，生命科学研究已进入了后基因组时代。在这个时代，生命科学的主要研究对象是功能基因组学，包括结构基因组研究和蛋白质组研究等。传统的对单个蛋白质进行研究的方式已无法满足后基因组时代的要求。这是因为：(1) 生命现象的发生往往是多因素影响的，必然涉及到多个蛋白质。(2) 多个蛋白质的参与是交织成网络的，或平行发生，或呈级联因果。(3) 在执行生理功能时蛋白质的表现是多样的、动态的，并不象基因组那样基本固定不变。因此要对生命的复杂活动有全面和深入的认识，必然要在整体、动态、网络的水平上对蛋白质进行研究。因此在上世纪 90 年代中期，国际上产生了一门新兴学科—蛋白质组学 (Proteomics)，它是以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象。可以说蛋白质组研究的开展不仅是生命科学研究进入后基因组时代的里程碑，也是后基因组时代生命科学的核心内容之一。

随着基因组学和蛋白组学等相关学科的最新研究成果的出现而发展起来的抗原表位组与抗体组学，是服务于蛋白质组研究的新技术新方法。结合鼠、兔、人及重组单克隆抗体技术，大规模建立抗原表位库及抗体库，高通量筛选抗原靶标及抗原表位，必将有力地推动蛋白组研究。

抗体是研究蛋白质性质和功能及其与疾病的关系的重要工具，在蛋白质组学研究工作中主要用于：1. 抗体是分析细胞蛋白质组的理想工具，不仅特异性高，而且能非常灵敏地解读出细胞裂解液中标本中蛋白质的相对丰度，用针对不同细胞蛋白的各种抗体，通过定量可以监测蛋白表达谱的变化。2. 利用抗体芯片或用同一抗体对不同组织和不同状况的同一组织进行平行筛选，可以确定差异表达蛋白，甚至是新的未知蛋白或疾病相关的蛋白。

目前在单克隆抗体的制备过程中，传统的筛选方法是通过 ELISA 方法测定出抗体产生多的杂交瘤，进行克隆建株，然后进一步对纯化的单抗进行鉴定，如需要再检测其抗原表位。实际工作中，融合率高时往往获得大量的产生抗体的杂交瘤，无法同时克隆，只能根据酶标仪读出的 OD 值筛选阳性细胞，进行克隆建株，这样极有可能造成得到的不同细胞株的单抗作用于同一个抗原表位。大多数蛋白质上往往存在多种表位。使用生物信息学方法对蛋白质可能的抗原表位预测分析，有目的地合成相应多肽，如对同一家族蛋白的保守片断和特异片断的多肽，筛选初不同的单克隆抗体的，可以在一次细胞融合的条件下获得多个不同抗原表位的抗体。

生物芯片技术是基于生物大分子（核酸、蛋白质等）相互作用的大规模并行分析方法，已成为当今生命科学研究领域发展最快的技术之一。蛋白芯片是检测蛋白质之间相互作用的生物芯片，它是基于抗原和抗体特异性结合的原理，利用微点阵技术及多种蛋白质结合在固相基质上，从而使传统的生物学分析手段能够在极小的范围内快速完成，达到一次实验同时分析多个生物标本或检测多种疾病的目的。蛋白质芯片技术理论上讲，能在一次试验中，给出大量的生物学信息。多肽芯片即是不同长度的肽段固定在固体支持物上，通过抗体抗原特异性结合的原理对相应的样品进行检测、筛选、鉴定。

发明内容

本发明的目的是提供一种多肽芯片，这种多肽芯片集成了不同的抗原表位，用于同时筛选获得不同抗原表位的单克隆抗体组。

本发明公开的多肽芯片包括固相多肽芯片与液相多肽芯片，固相多肽芯片的基质包括表面带有活化基团的玻璃片、醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片中的一种或一种以上的结合物；液相多肽芯片的基质包括直径 1-10 微米的以不同荧光标记的微珠，由于微珠携带荧光不同，可用于制备多肽芯片的微珠多达 1000 种。

本发明技术方案如下：

1. 根据要筛选的单克隆抗体组的抗原，合成多肽，制备多肽芯片；
2. 取此抗原免疫小鼠的脾脏制成细胞悬液，与骨髓瘤细胞按一定的比例混合，并在融合剂作用下进行细胞融合，产生杂交瘤细胞；
3. 收集融合杂交瘤细胞，培养 7-8 天，制备成悬液；
4. 使用集成了不同可能抗原表位的多肽芯片对杂交瘤细胞的悬液进行筛选、鉴定；
5. 以多肽芯片筛选鉴定到的阳性克隆，建立稳定分泌具有不同抗原表位的单克隆抗体的一组细胞株；
6. 扩大培养，分离纯化，得到具有不同抗原表位的单克隆抗体组。

本发明的优越性在于：第一，可以同时筛选得到一组具有不同抗原表位的单克隆抗体组；第二，节省了大量时间与资金，大大促进抗体的制备和研究过程，多肽芯片将具有不同抗原表位的多肽集成于芯片上，在单克隆筛选的过程中增加了目的性，筛选得到的细胞株均是针对不同抗原表位，避免了传统抗体制备过程中产生的经过大量筛选工作所得到的不同单抗都是作用于同一个抗原表位的问题，避免了工作的不断重复，节省了时间与资金；第三，促进了蛋白质组学的研究，同时获得一组具有不同抗原表位的单克隆抗体组为功能蛋白组的研究提供了很好的工具，便于检测功能蛋白组在不同发育时期，不同组织，以及正常组织与肿瘤组织中的差异表达。

附图说明

图 1：固相多肽芯片检测示意图

图 2：液相多肽芯片检测示意图

图 1：

A：固相多肽芯片支持物，可以为表面带有活化基团的玻璃片、醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片中的一种或一种以上的结合物；

B：固定在固相支持物表面的抗原多肽，根据目的抗原的氨基酸序列设计，包括了目的抗原所有可能的抗原表位；

C：杂交瘤细胞产生的具有不同抗原表位的抗体；

D：带有不同标记的羊抗或兔抗特异性抗体，标记物可以为生物素、荧光染料或者显色或化学发光酶催化底物中的一种或一种以上。

图 2：

A：液相多肽芯片支持物，为带有不同荧光标记的微珠；

B：固定在微珠表面的抗原多肽，根据目的抗原的氨基酸序列设计，包括了目的抗原所有可能的抗原表位；

C: 杂交瘤细胞产生的具有不同抗原表位的抗体;

D: 带有不同标记的羊抗或兔抗特异性抗体, 标记物可以为生物素、荧光染料或者显色或化学发光酶催化底物中的一种或一种以上。

具体实施方法

本发明公开的多肽芯片的制备方法如下:

1. 多肽的设计与合成

一方面, 根据需要制备的具有不同抗原表位的单克隆抗体组的抗原, 使用生物信息学软件对抗原的氨基酸序列进行分析, 预测其可能的抗原表位, 合成相应的多肽; 另一方面, 根据抗原的氨基酸序列, 合成固定长度的含有重复序列的一系列多肽。

2. 多肽芯片的制备

(1) 固相多肽芯片的制备

- (a) 将第一步合成的多肽溶解于一定的缓冲液体系中, 推荐含 0.05%BSA 的磷酸盐缓冲液, 多肽浓度约为 100 微克/毫升;
- (b) 将溶解的多肽溶液转入 96 孔板或 384 孔板中, 每孔大约 20 微升, 轻轻振荡, 使溶液覆盖 96 孔板或 384 孔板的底部;
- (c) 使用点样器进行点样, 固相载体可以是表面带有活化基团的玻璃片、醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片中的一种或一种以上的结合物, 点样阵列可以根据需要, 在每张片子上点多个重复区域, 每个区域对应筛选过程中的一个克隆, 点样密度为 1000 点每平方厘米, 一次可制备多张多肽芯片;
- (d) 点样完成的多肽芯片放置过夜;
- (e) 使用封闭液对多肽芯片进行封闭, 封闭液为含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液, 封闭完成的多肽芯片储存于 4 度备用;

(2) 液相多肽芯片的制备

- (a) 在多肽的合成过程中, 在多肽的 N 端统一连接一分子量为 6-150KD 的蛋白, 将连接有蛋白的多肽溶解于磷酸盐缓冲液中, 每种多肽的质量大约为 5-12 微克;
- (b) 将准备连接多肽的微珠以 EDC/S-NHS (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide/N-hydroxysulfosuccinimide) 活化, EDC 与 S-NHS 的浓度均为 50 毫克每毫升;
- (c) 将不同多肽加入不同微珠体系中, 室温暗处振荡 2 小时;
- (d) 加入磷酸盐缓冲液以抽滤的方法对未结合的多肽进行清洗;
- (e) 以磷酸盐缓冲液重悬微珠, 将连接不同多肽不同颜色的微珠以一定比例混合, 一次可大量制备, 每次微珠使用大约 1-5 微升, 4 度储存备用。

本发明公开的以多肽芯片同时大规模制备具有不同抗原表位的单克隆抗体组的制备方法如下:

1. 取欲获得其单克隆抗体组的抗原, 将其注入小鼠腹腔进行免疫;
2. 取小鼠的脾脏制成细胞悬液, 与骨髓瘤细胞按一定的比例混合, 并在融合剂作用下进行细胞融合, 产生杂交瘤细胞;
3. 收集融合杂交瘤细胞, 培养 7-8 天, 制备成悬液;
4. 使用集成了不同可能抗原表位的多肽芯片对杂交瘤细胞的悬液进行筛选、鉴定;

- (1) 固相多肽芯片对杂交瘤细胞悬液的筛选
 - (a) 将不同的杂交瘤细胞悬液（对应 96 孔细胞培养板或 384 孔细胞培养板上的各孔）加入固相多肽芯片的表面，芯片上的重复区域加入不同的细胞悬液，37 度湿盒中孵育 30-60 分钟；
 - (b) 使用磷酸盐缓冲液洗涤芯片 3-5 次；
 - (c) 在多肽芯片上加入羊抗或兔抗特异性抗体，抗体以荧光染料或者显色或化学发光酶催化底物中的一种或一种以上标记，37 度湿盒中孵育 30-60 分钟；
 - (d) 使用磷酸盐缓冲液洗涤芯片 3-5 次；
 - (e) 使用荧光染料检测的多肽芯片直接以芯片扫描仪进行检测，使用显色或化学发光酶催化底物标记的多肽芯片，加入显色液反应后，以相应的扫描仪进行检测；
- (2) 液相多肽芯片对杂交瘤细胞悬液的筛选
 - (a) 将制备好的液相多肽芯片加入 96 孔板或 384 孔板中，各孔中的液相芯片均含有可能的所有抗原表位，将不同克隆的杂交瘤细胞悬液加入液相多肽芯片中，37 度振荡孵育 30-60 分钟；
 - (b) 使用磷酸盐缓冲液抽滤洗涤芯片 3-5 次；
 - (c) 向液相芯片中加入羊抗或兔抗特异性抗体，抗体以生物素标记，或者抗体直接以荧光染料或者显色或化学发光酶催化底物中的一种或一种以上标记，37 度振荡孵育 30-60 分钟；
 - (d) 使用磷酸盐缓冲液抽滤洗涤芯片 3-5 次；
 - (e) 对加入生物素标记的抗体，加入相应荧光试剂，温育后以荧光检测仪进行检测，直接使用荧光染料标记抗体的液相多肽芯片直接以荧光检测仪进行检测，使用显色或化学发光酶催化底物标记的多肽芯片，加入显色液反应后，以相应的检测仪进行检测；
5. 经过以上多肽芯片筛选鉴定到的阳性克隆，即具有不同抗原表位抗体的克隆，使用无限稀释法，建立稳定分泌具有不同抗原表位的单克隆抗体的一组细胞株；
6. 对于各细胞株分别扩大培养至细胞数量 10, 000, 000 以上或者注射小鼠获得腹水；
7. 使用亲和层析柱对小鼠腹水或细胞上清进行纯化，得到纯化的具有不同抗原表位的一组抗体。

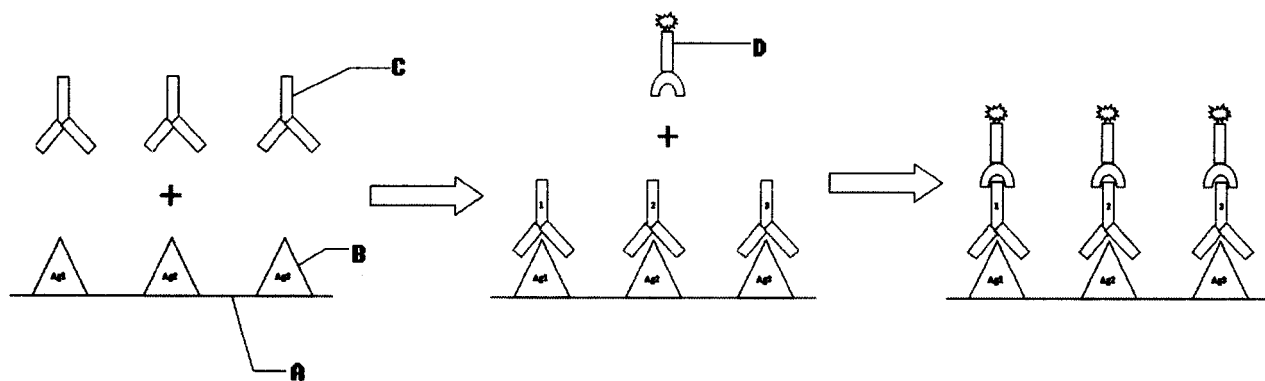


图 1

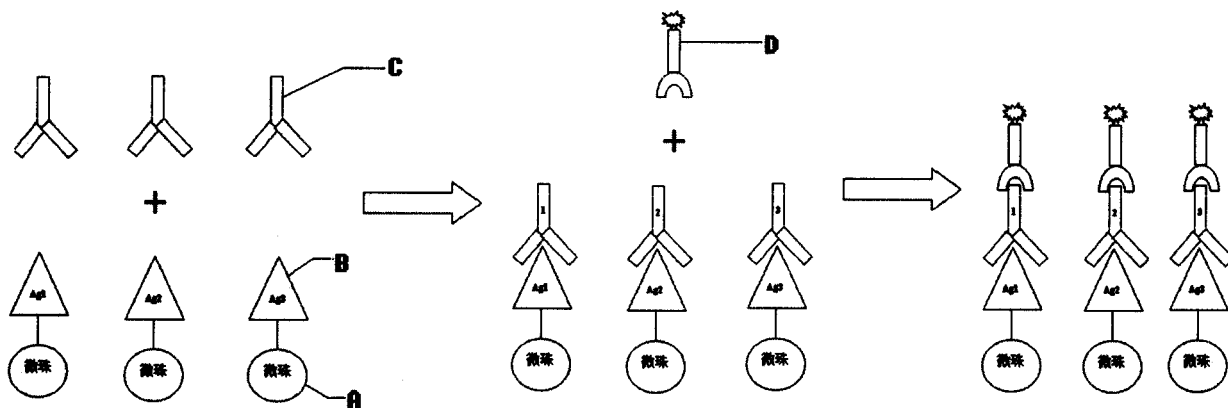


图 2

专利名称(译)	一种多肽芯片及其制备方法并用其制备单克隆抗体组		
公开(公告)号	CN1763530A	公开(公告)日	2006-04-26
申请号	CN200410067245.2	申请日	2004-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海生物芯片有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海生物芯片有限公司		
[标]发明人	张庆华 吴船 缪金明 宋凯 王升年 赵芹 奚佳捷		
发明人	张庆华 吴船 缪金明 宋凯 王升年 赵芹 奚佳捷		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/546 G01N33/547 G01N33/551		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种多肽芯片，并用其筛选具有不同抗原表位的单克隆抗体组，包括步骤：1.根据要筛选的单克隆抗体组的抗原，合成多肽，制备多肽芯片；2.取此抗原免疫小鼠的脾脏制成细胞悬液，与骨髓瘤细胞按一定的比例混合，并在融合剂作用下进行细胞融合，产生杂交瘤细胞；3.收集融合杂交瘤细胞，培养7-8天，制备成悬液；4.使用集成了不同可能抗原表位的多肽芯片对杂交瘤细胞的悬液进行筛选、鉴定；5.以多肽芯片筛选鉴定到的阳性克隆，建立稳定分泌具有不同抗原表位的单克隆抗体的一组细胞株；6.扩大培养，分离纯化，得到具有不同抗原表位的单克隆抗体组。本发明可以同时筛选得到一组具有不同抗原表位的单克隆抗体组，节省了大量时间与资金，大大促进抗体的制备、研究过程。

