

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910134244.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月27日

[11] 公开号 CN 101634657A

[22] 申请日 2009.4.14

[21] 申请号 200910134244.8

[71] 申请人 李 彬

地址 050000 河北省石家庄市新石北路金石  
工业圆创新大厦三层(博海生物)

共同申请人 张 锐

[72] 发明人 李 彬 张 锐

权利要求书3页 说明书6页

[54] 发明名称

脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法

[57] 摘要

本发明属于生物工程技术领域，特别是指一种脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法。其中细胞融合、筛选单克隆细胞系、单克隆抗体特异性筛选、单克隆抗体纯化保存、补体 C3 抗体的标记、单克隆抗体的矩阵点样、芯片的杂交等工艺步骤，解决了传统技术存在的费时、费力、结果重复性差等技术问题。此芯片可直接应用于医疗及科研机构对心脑血管疾病、动脉硬化等疾病进行检测和预防的研究，在临床诊断领域中具有极高的应用价值，单克隆抗体的均一性和生物活性单一性使抗原抗体反应结果便于质量控制，利于标准化和规范化。目前国外几乎所有的医疗机构都不同程度地采用了生物芯片技术来进行疾病的诊断和预防。用芯片技术进行大众人群的体检和临床诊断具有省时、省力、简便、快速的特点，是现代社会发展的趋势。

1、脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法，其特征在于它包括如下工艺步骤：

(1) 单克隆抗体制备：将具有较高活性 Sp2/0 细胞与致敏的脾细胞悬液按 1: 10-100 比例混合，加入聚乙二醇（美国 Sigma 公司出品）使细胞彼此融合，在两种细胞的混合细胞悬液中滴加培养液，以 HAT 选择性培养基（美国海克隆公司出品）进行细胞培养；

(2) 筛选单克隆细胞系：待融合的细胞培养至第 5-10 天时，吸取 96 孔培养板的孔中出现克隆细胞簇的培养上清用酶联免疫吸附实验方法检测抗体含量，经有限稀释进行三次亚克隆筛选，依抗体的分泌情况筛选出高效价的抗体分泌孔，将孔中细胞扩大培养，然后进行抗原特异性免疫组织化学原位测定，选高效价，高特异性的细胞株再扩大培养并冻存；

(3) 单克隆抗体特异性筛选：选经酶联免疫吸附实验检测抗体效价大于 1: 10000 的阳性孔的上清，与多厂家、多批次的脂肪细胞分化代谢产物进行特异性和效价筛选。

(4) 单克隆抗体纯化保存：使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪（美国通用公司制造）将单克隆抗体细胞系培养的溶液在 A280nm 时收集，1.44（吸光单位）浓度为 1-10mg/ml。

(5) CY3 标记抗体：用 CY3 荧光素标记补体 C3 抗体。

(6) 脂肪细胞分化代谢产物 45 种单克隆抗体微阵列点样：一张芯片点 48 个点，每一种单抗一个点，每一个点的含量 0.01-1ng/ml。

(7) 与 45 种之外的脂肪细胞分化代谢的蛋白质进行特异性筛选。

2、根据权利要求 1 所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法，其特征在于所述的步骤 (1) 将具有较高活性 Sp2/0 细胞与致敏的脾细胞悬液按 1: 10-100 比例混合，加入聚乙二醇（美国 Sigma 公司出品）使细胞彼此融合，在两种细胞的混合细胞悬液中滴加培养液，以 HAT 选择性培养基（美国海克隆公司出品）进行细胞培养。(6) 脂肪细胞分化代谢产物单克隆抗体微阵列点样：一张芯片点 45 个点，检测线性范围 0.01 ~ 10 ng/ml。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法，其特征在于所述的步骤 (1) 进行完毕后采用酶联免疫吸附实验方法测定抗血清，该方法由如下操作步骤组成：

a、包被:

以 50mmol/L、pH=9 的碳酸盐缓冲液将步骤(1)中的高纯度脂肪细胞分化代谢产物 45 种每一种 1:500 稀释,包被 96 孔聚乙烯板,真空抽干,密封 4°C 保存备用。

b、封闭:

每孔加入 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 200  $\mu$ l 洗涤,内含 1%山羊血清;

c、加样:

每孔加入细胞融合一周后的培养上清 50-100  $\mu$ l (1:5000-10000 稀释),每板设一正常对照、阳性对照及空白(磷酸盐缓冲液),洗涤;

d、加入酶标二抗每孔 100-200  $\mu$ l, 洗涤;

e、显色:

每孔加入底物 50-100  $\mu$ l;

f、比色:

以空白调零,405nm 波长测定光密度(O.D);

g、结果判断:  $P/N = \text{测定标本 O.D 均值} / \text{阴性血清 O.D 均值}$ ,  $P/N \geq 2.1$  为阳性。

4、根据权利要求 3 所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤 c 中的工艺条件为每孔加入 1:5000-10000 稀释后的培养上清 50-100  $\mu$ l,每板设一正常对照、阳性对照及空白(磷酸盐缓冲液),温度为 37°C、时间为 1 小时,洗涤 3 次。

5、根据权利要求 3 所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤 e 中的工艺条件为室温、时间为 10 分钟,然后使用终止液终止反应,经酶标仪在波长 450nm 处读取光密度值。

6、根据权利要求 1 所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤(1)中具有高活性的 Sp2/0 细胞与致敏的脾细胞的比值按 1:10-100 的比例混合,30-60 秒内逐渐加入 45%PEG(分子量:4000),静止 90-120 秒,使细胞彼此融合,在两种细胞的混合细胞悬液中,第 1 分钟滴加 4.5ml 1640 培养液;间隔 2 分钟滴加 5ml 1640 培养液,然后加 1640 培养液至 50ml,1500rpm/分钟离心 10 分钟,以 HAT 选择性培养基(美国海克隆公司出品)按 20-50%的孔为 1 个细胞/孔进行细胞培养。

7、根据权利要求 1 所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,

其特征在于所述的步骤(2)中是将细胞培养至覆盖 0%~20%孔底时,吸取培养上清用酶联免疫吸附实验方法检测抗体含量,依抗体的分泌情况筛选出高效价的抗体分泌孔,将孔中细胞再行克隆化,然后进行抗原特异的免疫组织化学测定,选高分泌特异性细胞株扩大培养或冻存。

8、根据权利要求1所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤(3)中选用的多厂家 30 批次的脂肪细胞分化代谢产物与此单克隆抗体呈阳性表达。

9、根据权利要求1所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤(4)中使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪将小鼠 IgG 单克隆抗体腹水溶液在 A280nm 时收集,吸光单位=1.44 时浓度为 1-10mg/ml。

10、根据权利要求1所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤(5)对其 C3 补体的抗体进行 CY3 标记。

11、根据权利要求1所述的脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤(6)脂肪细胞分化代谢产物单克隆抗体微阵列点样:一张芯片点 45 个点,检测范围 0.01~10 ng/ml。

## 脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法

### 技术领域

本发明属于生物工程技术领域，特别是指一种脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法

### 背景技术

本项目主要应用与在糖尿病、动脉粥样硬化、高血压、肥胖等疾病的相关蛋白领域创立抗体芯片检测技术平台，自主研发脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片检测试剂盒（抗体芯片）完全是由中国人自主开发，应用这一芯片，可通过多种方式、多种渠道、多层面检测脂肪细胞分化代谢产物的效价和含量，将检测灵敏度由 ug 提高到 ng 级，从而达到更准确、更全面的效果，其检测结果即可定性也可定量。脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片检测试剂盒（抗体芯片）对促进我国生物高技术前沿领域的发展具有重大鼓舞作用，对提升我国生物芯片技术、产品和市场的国际竞争力具有重大意义，此方法完全符合分子免疫学原理。目前国外几乎所有的主要制药公司都不同程度地采用了生物芯片技术来寻找药物靶标，查检药物的毒性或副作用及进行药物产品的定量和定性。用芯片技术进行大规模的药物筛选可以省略大量的动物试验，缩短药物筛选所用时间，从而带动创新药物的研究和开发。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法。

本发明的整体技术构思是：利用细胞融合、亚克隆及酶联免疫吸附实验进行特异性筛选技术，获得高效价、高特异性抗人脂肪细胞分化代谢产物单克隆抗体，由于此单抗效价高、特异性好，可直接应用于芯片的点样，结合 CY3 标记的补体 C3 抗体与被检产品建立了完整的检测系统检测检测 45 种脂肪分化代谢蛋白质含量的方法。此抗体芯片具有灵敏度高，特异性好、操作简单、

高通量等优点,可用于临床和体检血清的监测和质控。

脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法,它包括如下工艺步骤:

(1) 单克隆抗体制备: 将具有较高活性 Sp2/0 细胞与致敏的脾细胞悬液按 1: 10-100 比例混合, 加入聚乙二醇(美国 Sigma 公司出品)使细胞彼此融合, 在两种细胞的混合细胞悬液中滴加培养液, 以 HAT 选择性培养基(美国海克隆公司出品)进行细胞培养;

(2) 筛选单克隆细胞系: 待融合的细胞培养至第 5-10 天时, 吸取 96 孔培养板的孔中出现克隆细胞簇的培养上清用酶联免疫吸附实验方法检测抗体含量, 经有限稀释进行三次亚克隆筛选, 依抗体的分泌情况筛选出高效价的抗体分泌孔, 将孔中细胞扩大培养, 然后进行抗原特异性免疫组织化学原位测定, 选高效价, 高特异性的细胞株再扩大培养并冻存;

(3) 单克隆抗体特异性筛选: 选经酶联免疫吸附实验检测抗体效价大于 1: 10000 的阳性孔的上清, 与多厂家、多批次的脂肪细胞分化代谢产物进行特异性和效价筛选。

(4) 单克隆抗体纯化保存: 使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪(美国通用公司制造)将单克隆抗体细胞系培养的溶液在 A280nm 时收集, 1.44(吸光单位)浓度为 1-10mg/ml。

(5) CY3 标记抗体: 用 CY3 荧光素标记补体 C3 抗体。

(6) 脂肪细胞分化代谢产物 45 种单克隆抗体微阵列点样: 一张芯片点 48 个点, 每一种单抗一个点, 每一个点的含量 0.01-1ng/ml。

(7) 与 45 种之外的脂肪细胞分化代谢的蛋白质进行特异性筛选。

本发明的具体工艺步骤和各步骤中的工艺参数是:

步骤(1)中具有高活性的 Sp2/0 细胞与致敏的脾细胞的比值按 1:10 的比例混合, 加入 PEG 使细胞彼此融合, 在两种细胞的混合细胞悬液中, 第 1 分钟滴加 4.5ml 培养液; 间隔 2 分钟滴加 5ml 培养液, 然后加培养液 50ml, 以 HAT 选择培养基按 36% 的孔为 1 个细胞/孔进行细胞培养。

步骤(2)中是将细胞培养至覆盖 0% ~ 20% 孔底时, 吸取培养上清用酶联免疫吸附实验方法检测抗体含量, 依抗体的分泌情况筛选出高效价的抗体分泌孔, 将孔中细胞再行克隆化, 选高分泌特异性细胞株扩大培养或冻存。

步骤(4)中使用 AKTA 蛋白纯化仪 FPLC 将单克隆抗体细胞系培养的溶液

在 A280nm 时收集，吸光单位=1.44 时浓度为 1mg/ml。

步骤（5）中选用的是 CY3 对补体 C3 抗体的标记

步骤（6）中选用脂肪细胞分化代谢产物微阵列点样：一张芯片点 45 个点，检测范围 0.01 ~ 10 ng/ml。

本发明所取得的实质性特点和显著的技术进步在于：所获得的抗人脂肪细胞分化代谢产物 45 种单克隆抗体分别经 AKTA 蛋白纯化仪 FPLC 纯化，其效价高、特异性非常好，可直接将有限稀释的抗体点于芯片上，与标记的补体 C3 抗体和检测样本进行杂交，借助目前先进的芯片检测仪器进行检测。此技术与传统的检测方法比较，具有快速、操作便捷、高通量检测的特点；并可快速、准确地进行定性和定量检测。

本发明所公开的方法是将高纯度脂肪细胞分化代谢产物经细胞融合、克隆化培养、以及大量的组织细胞原位特异性筛选从而获得高效价、高特异性的抗人脂肪细胞分化代谢产物单克隆抗体，此抗体可直接应用于临床检测和基础研究。单克隆抗体在生物学和医学研究领域中具有极大的应用价值，是亲和层析中重要的配体，是免疫组化中主要的抗体，是免疫检验中的新型试剂，是生物治疗的导向武器。作为脂肪细胞分化代谢产物的检测试剂，抗人脂肪细胞分化代谢产物单克隆抗体可以充分发挥其优势。单克隆抗体的特异性强，可将抗原抗体反应的特异性大大提高，减少了可能的交叉反应，使试验结果可信度更大。单克隆抗体的均一性和生物活性单一性使抗原抗体反应结果便于质量控制，利于标准化和规范化。

其各项指标如下：

- 1、单克隆抗体细胞系来源于一个细胞。
- 2、阳性克隆孔酶联免疫吸附实验效价大于 1: 10000
- 3、阳性克隆孔特异性表达：45 种脂肪细胞分化代谢产物抗体如下

脂肪因子 (adipokines)：TNF- $\alpha$ 、ASP、leptin、PAI-1、IL-6、resistin、adiponectin、visfatin、RBP-4、GLUT-4、LPL、PGAR、UCPs、PPAR- $\gamma$ 、C/EBP、ADD1、SREBP1、NPY

与疾病相关的因子：MC-4R、POMC、 $\alpha$ -MSH、AgRP、orexin、GH、IGF-1、Acrp30、VEGF、HBEGF、HGF、Ang II、ACE、AGT、FA transporter、eNOS、iNOS

各分化阶段标志因子: ACC、FAS、ME、ATP-citratelase、AP2、apoE、perilipin、ACBP、PEPCK、A2-adrenoreceptor。

### 具体实施方式

以下结合实施例对本发明做进一步描述:

脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法, 其特征在于它包括如下工艺步骤:

(1) 单克隆抗体制备: 将具有较高活性 Sp2/0 细胞与致敏的脾细胞悬液按 1: 10-100 比例混合, 加入聚乙二醇(美国 Sigma 公司出品)使细胞彼此融合, 在两种细胞的混合细胞悬液中滴加培养液, 以 HAT 选择性培养基(美国海克隆公司出品)进行细胞培养;

(2) 筛选单克隆细胞系: 待融合的细胞培养至第 5-10 天时, 吸取 96 孔培养板的孔中出现克隆细胞簇的培养上清用酶联免疫吸附实验方法检测抗体含量, 经有限稀释进行三次亚克隆筛选, 依抗体的分泌情况筛选出高效价的抗体分泌孔, 将孔中细胞扩大培养, 然后进行抗原特异性免疫组织化学原位测定, 选高效价, 高特异性的细胞株再扩大培养并冻存;

(3) 单克隆抗体特异性筛选: 选经酶联免疫吸附实验检测抗体效价大于 1: 10000 的阳性孔的上清, 与多厂家、多批次的脂肪细胞分化代谢产物进行特异性和效价筛选。

(4) 单克隆抗体纯化保存: 使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪(美国通用公司制造)将单克隆抗体细胞系培养的溶液在 A280nm 时收集, 1.44(吸光单位)浓度为 1-10mg/ml。

(5) CY3 标记抗体: 用 CY3 荧光素标记补体 C3 抗体。

(6) 脂肪细胞分化代谢产物 45 种单克隆抗体微阵列点样: 一张芯片点 48 个点, 每一种单抗一个点, 每一个点的含量 0.01-1ng/ml。

(7) 与 45 种之外的脂肪细胞分化代谢的蛋白质进行特异性筛选。

步骤(1)单克隆抗体制备: 将具有较高活性 Sp2/0 细胞与致敏的脾细胞悬液按 1: 10-100 比例混合, 加入聚乙二醇(美国 Sigma 公司出品)使细胞彼此融合, 在两种细胞的混合细胞悬液中滴加培养液, 以 HAT 选择性培养基(美国海克隆公司出品)进行细胞培养;

步骤(2)进行完毕后采用酶联免疫吸附实验方法测定抗血清,该方法由如下操作步骤组成:

a、包被:

以 50mmol/L、pH=9 的碳酸盐缓冲液将步骤(1)中的高纯度脂肪细胞分化代谢产物 45 种分别 1: 500 稀释,包被 96 孔聚乙烯板,真空抽干,密封 4℃保存备用。

b、封闭:

每孔加入 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 200 μl 洗涤、内含 1%山羊血清;

c、加样:

每孔加入细胞融合一周后的培养上清 50 μl (1: 5000 稀释),每板设一正常对照、阳性对照及空白(磷酸盐缓冲液),洗涤;

d、加入酶标二抗每孔 100 μl,洗涤;

e、显色:

每孔加入底物 100 μl;

f、比色:

以空白调零,405nm 波长测定光密度(O.D);

g、结果判断:  $P/N = \text{测定标本 O.D 均值} / \text{阴性血清 O.D 均值}$ ,  $P/N \geq 2.1$  为阳性。

步骤 a 中的聚乙烯板规格为 200 μl/孔、真空抽干温度为 4℃,洗涤采用 0.05%的 Tween-20 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。

步骤 b 中的工艺参数为每孔加入 pH=7.4、含 1%山羊血清磷酸盐缓冲液 200 μl,温度为 37℃、时间 1 小时,洗涤 3 次。

步骤 c 中的工艺条件为每孔加入 1: 5000 稀释后的细胞融合一周后的培养上清 50 μl,每板设一正常对照、阳性对照及空白(磷酸盐缓冲液),温度为 37℃、时间为 1 小时,洗涤 3 次。

步骤 d 中的工艺条件加入酶标二抗每孔 100 μl,温度为 37℃、时间为 1 小时,洗涤 3 次。

步骤 e 中的工艺条件为室温、时间为 10 分钟,然后使用终止液终止反应,经酶标仪在波长 450nm 处读取光密度值。

步骤(3)依抗体的分泌情况筛选出高效价的抗体分泌孔,将孔中细胞再行克隆化,与多批次脂肪细胞分化代谢产物经 ELISA 筛选呈阳性表达。然后

确定高分泌、高特异性细胞株扩大培养或冻存。

步骤（4）使用 AKTA 蛋白纯化仪 FPLC 将小鼠 IgG 单克隆抗体腹水溶液在 A280nm 时收集，吸光单位=1.44 时浓度为 1mg/ml。

步骤（5）中选用的 CY3 标记补体 C3 抗体

步骤（6）中选用的脂肪细胞分化代谢产物单克隆抗体微阵列点样：一张芯片点 45 个点，检测范围 0.01 ~ 10 ng/ml。

步骤（7）中选用的与其它脂肪细胞分化代谢产物进行特异性筛选。

此脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片经 30 批次的脂肪细胞分化代谢产物产品的特异性筛选表达均为阳性，与 11 种 18 批次的其它脂肪细胞分化代谢产物进行特异性筛选阳性表达为 0。表明此芯片特异性很高，适合提供给医疗及科研机构进行脂肪细胞分化代谢产物的鉴定和质控评价，此抗体还可制成免疫组化或酶联免疫吸附实验试剂盒开展医学基础研究。

专利名称(译)	脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101634657A</a>	公开(公告)日	2010-01-27
申请号	CN200910134244.8	申请日	2009-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	李斌 张锐		
申请(专利权)人(译)	李彬 张锐		
当前申请(专利权)人(译)	李彬 张锐		
[标]发明人	李彬 张锐		
发明人	李彬 张锐		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N21/78 C12P21/08		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于生物工程技术领域，特别是指一种脂肪细胞分化代谢产物抗体芯片的制备方法。其中细胞融合、筛选单克隆细胞系、单克隆抗体特异性筛选、单克隆抗体纯化保存、补体C3抗体的标记、单克隆抗体的矩阵点样、芯片的杂交等工艺步骤，解决了传统技术存在的费时、费力、结果重复性差等技术问题。此芯片可直接应用于医疗及科研机构对心脑血管疾病、动脉硬化等疾病进行检测和预防的研究，在临床诊断领域中具有极高的应用价值，单克隆抗体的均一性和生物活性单一性使抗原抗体反应结果便于质量控制，利于标准化和规范化。目前国外几乎所有的医疗机构都不同程度地采用了生物芯片技术来进行疾病的诊断和预防。用芯片技术进行大众人群的体检和临床诊断具有省时、省力、简便、快速的特点，是现代发展的趋势。