



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102279264 A

(43) 申请公布日 2011.12.14

(21) 申请号 201010195053.5

(22) 申请日 2010.06.09

(71) 申请人 李彬

地址 050091 河北省石家庄市新石北路 368
号金石工业园创新大厦 2 层

(72) 发明人 李彬

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

48 种恶性肿瘤标志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 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法。其中细胞融合、筛选杂交瘤细胞、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多种肿瘤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。用芯片技术进行肿瘤筛查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. 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法,其特征就在于它包括如下工艺步骤:

(1) 细胞融合:将具有较高活性 Sp2/0 骨髓瘤细胞分别与 48 种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) 筛选杂交瘤细胞: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,分别与 48 种恶性肿瘤标志物抗原进行特异性和效价筛选。

(4) 单克隆抗体纯化保存:将特异性好和效价高的克隆孔培养液吸出,使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪(美国通用公司制造)将 IgG 单克隆抗体培养上清溶液在 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) 48 种恶性肿瘤标志物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。

2. 根据权利要求 1 所述的 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法,其特征就在于所述的步骤(1)将具有较高活性 Sp2/0 骨髓瘤细胞分别与 48 种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) 恶性肿瘤标志物单克隆抗体微阵列点样:一张芯片点 48 个点,检测线性范围 0.01 ~ 10ng/ml。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法,其特征就在于所述的步骤(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 48 种恶性肿瘤标志物每一种 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 μ l 洗涤、内含 1%山羊血清;

c、加样:

每孔加入细胞融合后 7 天的细胞培养上清液 50-100 μ 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 μ l,洗涤;

e、显色:

每孔加入底物 50-100 μ 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 = 测定标本 O.D 均值 / 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48种恶性肿瘤标志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稀释后的细胞融合后7天的细胞培养上清液50-100 μ 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 $^{\circ}$ C、时间为1小时,洗涤3次。

5. 根据权利要求1所述的48种恶性肿瘤标志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骨髓瘤细胞与脾细胞的比值按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4.5ml1640培养液;间隔2分钟滴加5ml1640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。

6. 根据权利要求1所述的48种恶性肿瘤标志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。

7. 根据权利要求1所述的48种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤(3)中分别与48种恶性肿瘤标志物抗原进行特异性和效价筛选。

8. 根据权利要求1所述的48种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤(4)中将特异性好和效价高的克隆孔培养液吸出,使用AKTA-FPLC蛋白纯化仪(美国通用公司制造)将IgG单克隆抗体培养上清溶液在A280nm时收集,1.44(吸光单位)浓度为1-10mg/ml。

9. 根据权利要求1所述的48种恶性肿瘤标志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。

10. 根据权利要求1所述的48种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法,其特征在于所述的步骤(6)48种恶性肿瘤标志物单克隆抗体微阵列点样:一张芯片点48个点,检测范围0.01~10ng/ml。

48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,特别是指一种 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法

背景技术

[0002] 本项目主要应用与在食管癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌、胃转移癌等恶性肿瘤相关蛋白领域创立抗体芯片检测技术平台,自主研发 48 种恶性肿瘤标志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、多层面检测恶性肿瘤标志物的效价和含量,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,其检测结果可指导临床治疗。48 种恶性肿瘤标志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

[0003] 本发明的目的在于提供一种 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法。

[0004] 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、高特异性抗人恶性肿瘤标志物单克隆抗体,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 48 种恶性肿瘤标志物蛋白质含量的方法。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。

[0005] 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法,它包括如下工艺步骤:

[0006] (1) 细胞融合:将具有较高活性 Sp2/0 骨髓瘤细胞分别与 48 种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;

[0007] (2) 筛选杂交瘤细胞: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;

[0008] (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,分别与 48 种恶性肿瘤标志物抗原进行特异性和效价筛选。

[0009] (4) 单克隆抗体纯化保存:将特异性好和效价高的克隆孔培养液吸出,使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪(美国通用公司制造)将 IgG 单克隆抗体培养上清溶液在 A280nm 时

收集, 1.44(吸光单位)浓度为 1-10mg/ml。

[0010] (5)CY3 标记抗体 :用 CY3 荧光素标记补体 C3 抗体。

[0011] (6)48 种恶性肿瘤标志物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。

[0012] 本发明的具体工艺步骤和各步骤中的工艺参数是 :

[0013] 步骤 (1) 中具有高活性的 Sp2/0 骨髓瘤细胞与脾细胞的比值按 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。

[0014] 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。

[0015] 步骤 (3) 中采用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,分别与 48 种恶性肿瘤标志物抗原进行特异性和效价筛选。

[0016] 步骤 (4) 中将特异性好和效价高的克隆孔培养液吸出,使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪 (美国通用公司制造) 将 IgG 单克隆抗体培养上清溶液在 A280nm 时收集, 1.44(吸光单位)浓度为 1-10mg/ml。

[0017] 步骤 (5) 中选用的是 CY3 对补体 C3 抗体的标记

[0018] 步骤 (6) 中采用 48 种恶性肿瘤标志物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。

[0019] 本发明所取得的实质性特点和显著的技术进步在于 :所获得的抗人恶性肿瘤标志物 48 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、准确地进行定性检测。

[0020] 本发明所公开的方法是将高纯度 48 种恶性肿瘤标志物经细胞融合、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 48 种抗人恶性肿瘤标志物单克隆抗体,这些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。作为恶性肿瘤标志物的检测试剂,抗人恶性肿瘤标志物单克隆抗体可以充分发挥其优势。单克隆抗体其特异性强,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。

[0021] 其各项指标如下 :

[0022] 1、高活性的 Sp2/0 骨髓瘤细胞与脾细胞的比值按 1 : 10 的比例混合

[0023] 2、阳性克隆孔酶联免疫吸附实验效价大于 1 : 10000

[0024] 3、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。

[0025] 4、48 种恶性肿瘤标志物单克隆抗体如下 :CK18、CK19、Cyclin-D1、CD34、ER、PR、P53、Calcitonin、PSA、P63、CEA、S-100、Vimentin、AR、C-erbB-2、PCNA、Ki-67、HSP70、AE1、

AE3、P504S、CK34BE、CA153、CA125、CA199、ECG2、IMP1、Ras、CSK、ErbB2、p90、p16、Calnuc、CyclinE、CDK2、CIAP、Ra1A、p62、CyclinB1、Koc、CK20、EMA、CA72-4、E-Cadherin、C-KIT、Cathepsin、MDM2、Hepatocyte

具体实施方式

[0026] 以下结合实施例对本发明做进一步描述：

[0027] 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法，其特征在于它包括如下工艺步骤：

[0028] (1) 细胞融合：将具有较高活性 Sp2/0 骨髓瘤细胞分别与 48 种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；

[0029] (2) 筛选杂交瘤细胞：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；

[0030] (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，分别与 48 种恶性肿瘤标志物抗原进行特异性和效价筛选。

[0031] (4) 单克隆抗体纯化保存：将特异性好和效价高的克隆孔培养液吸出，使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪（美国通用公司制造）将 IgG 单克隆抗体培养上清溶液在 A280nm 时收集，1.44（吸光单位）浓度为 1-10mg/ml。

[0032] (5) CY3 标记抗体：用 CY3 荧光素标记补体 C3 抗体。

[0033] (6) 48 种恶性肿瘤标志物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。

[0034] 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：

[0035] a、包被：

[0036] 以 50mmol/L、pH = 9 的碳酸盐缓冲液将步骤 (1) 中的恶性肿瘤标志物 48 种每一种 1 : 500 稀释，包被 96 孔聚乙烯板，真空抽干，密封 4℃ 保存备用。

[0037] b、封闭：

[0038] 每孔加入 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 200 μ l 洗涤、内含 1% 山羊血清；

[0039] c、加样：

[0040] 每孔加入细胞融合后 7 天的细胞培养上清液 50-100 μ 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；

[0041] d、加入酶标二抗每孔 100-200 μ l，洗涤；

[0042] e、显色：

[0043] 每孔加入底物 50-100 μ l；

[0044] f、比色：

[0045] 以空白调零，405nm 波长测定光密度 (O. D)；

[0046] 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。

[0047] 步骤(2) 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;

[0048] 步骤(3) 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,分别与 48 种恶性肿瘤标志物抗原进行特异性和效价筛选。

[0049] 步骤(4) 将特异性好和效价高的克隆孔培养液吸出,使用 AKTA-FPLC 蛋白纯化仪(美国通用公司制造)将 IgG 单克隆抗体培养上清溶液在 A280nm 时收集,1.44(吸光单位)浓度为 1-10mg/ml。

[0050] 步骤(5) 用 CY3 荧光素标记补体 C3 抗体。

[0051] 步骤(6) 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。

[0052] 此 48 种恶性肿瘤标志物抗体芯片经 30 批次的恶性肿瘤标志物抗原的特异性筛选表达均为阳性,与 10 种 10 批次的正常组织进行特异性筛选表达为阴性。表明此芯片特异性很高,适合提供给医疗及科研机构进行恶性肿瘤标志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)	48种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法		
公开(公告)号	CN102279264A	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	CN201010195053.5	申请日	2010-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	李斌		
申请(专利权)人(译)	李彬		
当前申请(专利权)人(译)	李彬		
[标]发明人	李彬		
发明人	李彬		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 C07K16/18 C12N5/20		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物工程技术领域，特别是指一种48种恶性肿瘤标志物抗体芯片的制备方法。其中细胞融合、筛选杂交瘤细胞、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多种肿瘤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。用芯片技术进行肿瘤筛查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。