



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110031629 A

(43)申请公布日 2019.07.19

(21)申请号 201810027820.8

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2018.01.11

G01N 33/543(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC No. 11595 2015.11.24

CGMCC No. 11596 2015.11.24

(71)申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 韩泽广 徐晓 翟杨杨

(74)专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 庄文莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

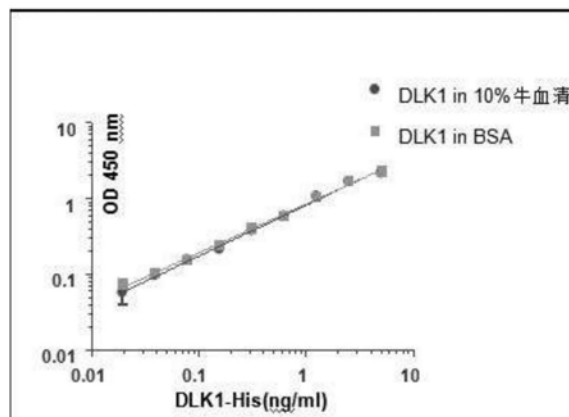
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒及其用途

(57)摘要

本发明公开了一种检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒及其用途。本发明的ELISA试剂盒的抗原采用重组的人DLK1抗原。本发明的检测方法具有高敏感性和特异性,并能快速检验出DLK1的表达和肝癌和肝母细胞瘤,本发明的ELISA试剂盒在肝癌和肝母细胞瘤的防治和诊断中拥有广阔的应用前景。



1. 一种分泌DLK1单克隆抗体的杂交瘤细胞系,其特征在于,所述杂交瘤细胞系为SP2/0和Balb/c小鼠脾细胞单克隆抗体杂交瘤细胞株;保藏编号分别为CGMCC No.11596或CGMCC No.11595。

2. 一种DLK1单克隆抗体,其特征在于,所述DLK1单克隆抗体由如权利要求1所述的杂交瘤细胞系分泌产生。

3. 一种如权利要求2所述的DLK1单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

S1、制备重组人DLK1蛋白为免疫原;

S2、动物免疫:通过反复多次小剂量的小鼠皮下免疫,获得分泌高效价的抗人DLK1单克隆抗体的小鼠;

S3、挑取分泌高效价的抗人DLK1单克隆抗体的小鼠,取其脾脏细胞,在体外与小鼠骨髓瘤细胞融合;

S4、酶联免疫吸附试验筛选抗体分泌阳性的杂交瘤细胞;

S5、阳性杂交瘤细胞经亚克隆鉴定得到稳定分泌抗人DLK1单克隆抗体的杂交瘤单克隆细胞;

S6、将杂交瘤单克隆细胞扩增培养,收集培养液,采用亲和层析法分离纯化抗人DLK1单克隆抗体。

4. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤S1具体为:插入片段kappa sp-DLK1soluble reg-His6tag,将其克隆到哺乳动物表达载体pCPC载体中,获得表达质粒pCPC-DLK1-His,转染293-E/CHOE细胞,筛选出高效表达工程细胞株,细胞株经培养扩增、收集上清分离纯化后,获得纯度95%以上的重组人DLK1蛋白。

5. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤S2中,小鼠皮下免疫的方法为:将纯化的所述重组人DLK1蛋白与弗氏完全佐剂混合,于皮下多点注射小鼠。

6. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤S6中,所述亲和层析法具体为:将含单克隆抗体的杂交瘤单克隆细胞滤液上清上样于预先填充有共价交联了重组人DLK1蛋白的Ni-EF亲和层析柱中;上样完毕,亲和层析柱以0.1M Tris-HCL Ph8.0洗脱去除杂蛋白,再以柠檬酸洗脱被Ni-EF柱吸附的抗体蛋白,再透析;透析后的样品再经过滤后即获得纯化的抗人DLK1单克隆抗体。

7. 一种检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:已包被权利要求2所述的DLK1单克隆抗体的固相载体、酶标记的权利要求2所述的DLK1单克隆抗体、酶的底物、阴性对照品和阳性对照品、包被液、洗涤液以及酶反应终止液。

8. 根据权利要求7所述的检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒,其特征在于,所述的酶标记的DLK1单克隆抗体分为两种,包括:

1号酶结合物,采用生物素标记的由保藏编号为CGMCC No.11596的杂交瘤细胞系分泌产生的小鼠抗人DLK1单克隆抗体;

2号酶结合物,采用辣根过氧化物酶链亲和素标记的由保藏编号为CGMCC No.11595的杂交瘤细胞系分泌产生的小鼠抗人DLK1单克隆抗体。

9. 一种采用权利要求7或8所述的ELISA试剂盒进行人血清DLK1蛋白的检测方法,其特征在于,所述方法包含如下步骤:

A1、样本稀释：用样本稀释液将待检血清稀释；

A2、加样反应：

A2-1、样本检测孔每孔分别加已稀释样本血清，每个样本平行检测做两个或两个以上的重复孔，同时设同样数量的阴性、阳性及空白对照，取阴性、阳性对照品分别加入反应孔内，空白对照孔加入样本稀释液；

A2-2、37℃避光反应60分钟后甩去孔内液体，每孔用样本稀释液或洗涤液注满，立即甩去，再注满样本稀释液或洗涤液，静置2分钟，甩去液体，重复洗涤3次，每次均需静置2分钟，最后一次甩去拍干；

A3、加酶反应：

A3-1、每孔加1号酶结合物的工作溶液，37℃避光反应60分钟后甩去孔内液体，如上洗涤，拍干；

A3-2、每孔加2号酶结合物的工作溶液，37℃避光反应30分钟后甩去孔内液体，如上重复5次洗涤，拍干；

A4、显色反应：每孔加配好的底物显色液TMB，室温反应10-15分钟，加酶反应终止液，混匀，终止反应，立即用酶标仪测读；

A5、酶标仪测读数：将已终止反应的酶标板立即测读，以空白对照调零于450nm读取OD值；待检孔OD值大于或等于阴性对照2.0倍者为阳性。

10. 一种如权利要求7或8所述的ELISA试剂盒在制备检测肝癌和肝母细胞瘤产品中的用途。

检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其涉及一种检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒及其用途。

背景技术

[0002] 肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)在我国的发病率很高,在世界上也是第五大常见恶性肿瘤,缺乏早期预防诊疗措施,恶性程度高,进展快,预后差,化疗疗效甚微,手术治疗难根治,在我国,肝癌的发病率和死亡率位居癌症中的第二位。肝癌的发生是一个多阶段、多因素累积作用,以及多个基因参与和突变的结果,其具体病因和发病机制尚未清楚。已知的多种参与原发性肝癌的可能的外因有病毒性肝炎,肝硬化,黄曲霉素,饮用水污染和一些化学致癌物质如亚硝胺类等。另外,机体内部的基因突变,染色体重排,表观遗传修饰等等都参与了肝癌的发生与发展。因此,寻找可能的与肝癌发生发展相关的基因并探索相应的可能的诊疗手段就成为各国医学工作者的共同目标。AFP是目前肝癌诊断的唯一血清学标志物,只有60-70%的检出率,仍有相当一部分人不能依靠血清学检测诊断。

[0003] 肝母细胞瘤(Hepatoblastoma,HB)是儿童最常见的肝脏原发恶性肿瘤,占小儿肝脏恶性肿瘤的90%,本病恶性程度极高,易通过血液和淋巴途径早期发生广泛转移,较常见的转移部位有肺、腹腔、淋巴结和脑。90%的肝母细胞瘤发生于3岁以下的儿童,60%的发生于1岁以下的儿童。由于HB发病机制尚不明确,治疗难度大,现有的治疗方案包括手术治疗、介入、化疗、肝移植等多学科协作治疗。目前手术切除是治疗肝母细胞瘤最重要的治疗方法,化疗有助于将不能手术的肿瘤转化为手术可切除的肿瘤。但临床上约超过半数的患者在就诊时就已失去了手术治疗的机会。能手术完全切除者及术后化疗的综合性治疗,明显地提高了患儿生存率及生活质量。

[0004] 因此HB治疗的重点应努力提高肿瘤完整切除率,术后规范化疗,提高肿瘤治愈率。在此过程中,密切追踪检测肿瘤的指标尤为重要。

[0005] AFP是一种血清蛋白,正常新生儿高水平表达,出生后AFP水平逐渐衰减,至1岁时AFP水平才能下降至正常水平。AFP在大多数HB患者中可显著升高,经临床检测发现AFP在80%~90%的HB患儿中呈阳性,所以现在作为临床广泛采纳的检测指标。在HB肿瘤完全切除后,AFP水平理论上应明显下降,在数周内接近正常值。若不能达正常值,则可能表明有残留肿瘤。不能手术切除而接受化疗的患儿中,化疗后AFP水平下降速度与预后相关,美国COG报道在开始4个疗程化疗后,AFP水平下降2个对数级者75%生存;而在第二次手术前AFP水平下降小于2个对数级者,则生存率极低。但目前临床上有一部分经过手术和化疗后临床症状缓解及影像学检查无残余病灶的患儿,其AFP水平居高不下。对这部分患儿和年龄小于1岁的HB婴儿手术和化疗后的AFP检测结果往往给临床医生和患儿家长造成很大的困扰,不能准确评估肿瘤对治疗的效应及监测疾病是否复发。

[0006] 因此AFP作为目前肝癌和肝母细胞瘤唯一的血清监测指标具有其临床上的局限性,因此另外寻找特异、可靠的临床检测指标成为亟待解决的临床难题。

[0007] 肝癌和肝母细胞瘤的早期诊断仍然是防治它们的重要手段。

[0008] 肝癌的血清学检查指标:甲胎蛋白异质体 (FucAFP):目前以扁豆凝集素 (LCA) 亲和交叉免疫自显影法测定AFP异质体诊断价值为高。有二种异质体即LCA非结合型 (AFP-N-L) 和结合型 (AFP-R-L)。肝癌含AFP-N-L平均 $49.13 \pm 27.20\%$ (0~100%), <75%为肝癌诊断标准,阳性率86.0%,随病情恶化而降低。

[0009] 非癌肝病AFP-N-L为 $93.30 \pm 7.66\%$ 假阳性率为1.6%。

[0010] 肝癌的血清学检查指标醛缩酶同工酶A (ALD-A):肝癌时ALD-A出现并增高>800ng/ml时有助诊断,AFP阴性肝癌阳性率为73.6%。

[0011] 肝癌的血清学检查指标血清岩藻糖苷酶 (AFu):AFu属溶酶体酸性水解酶类,主要生理功能是参与岩糖基的糖蛋白、糖脂等生物活性大分子的分解代谢。AFu超过110Kat/L应考虑原发性肝癌,国内报道AFu诊断原发性肝癌的阳性率为81.2%,对AFP阴性肝癌和小肝癌阳性率分别为76.1%和70.8%,继发性肝癌、良性肝占位病变均阴性,但肝硬化、慢性肝炎的假阳性较高。

[0012] 综上所述,肝癌标志物对原发性肝癌尤其是AFP阴性病例的诊断有一定的辅助意义,但仍不能取代AFP在肝癌诊断中的地位。过去一直认为AFP是诊断原发性肝癌的特异性肿瘤标志物,具有确立诊断,早期诊断,鉴别诊断的作用,近年来的临床研究却发现,部分肝硬化病人会长期出现AFP数值达到上千,但多年都没有肝癌的发病迹象,同时发现约20%的晚期肝癌病人,直至病故前,AFP仍不超过10。目前常用化学发光法,酶标法,酶标电泳法,放射免疫法检测。根据实践经验,血清AFP检测联合1~2种肝癌标志物即可明显提高原发性肝癌的阳性检出率。临床分析中尚应结合病史、影像诊断学或组织学资料综合判断,才能得出准确结论。

[0013] DLK1是我们前期发现的肝癌干细胞标志物基因,它在干细胞膜表面表达。人DLK1蛋白是由383个(小鼠385个,大鼠383个)氨基酸组成的穿膜蛋白,其结构和氨基酸序列与无脊椎动物如果蝇的Delta、Notch、Serrate,线虫的Lin-12和glp1,以及哺乳动物Notch蛋白的对应结构有着高度同源性。DLK1的特点是在细胞膜外区域拥有6串表皮生长因子(EGF)样重复片段和一段信号序列。该重复片段是一段由35~40个氨基酸组成的结构域,拥有6个半胱氨酸的保守间隔。DLK1N端所连接糖链的大小变化使其分子量分布在45~60kDa之间。FA1 (fetal antigen 1)最早从人羊水中分离所得,是一种含有225~262个氨基酸的单链糖蛋白,被认为是DLK1蛋白胞外部分的大片段蛋白酶切水解产物,即其溶解形式。

[0014] DLK1的分泌性片段可以分泌到人血清中,在肝癌或肝母细胞瘤患者血清中有可能可以检测到。

[0015] 目前用于DLK1的免疫诊断检测方法主要是:免疫酶联吸附试验(ELISA)。

[0016] 免疫酶联吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)是以酶标记的抗体或抗原为主要试剂的检测方法,属于一种标记免疫技术,在各种诊断方法中,ELISA是人们研究的最为详细的一种。目前市面上已有的DLK1检测试剂盒是R&D公司的Human Pref-1/DLK-1/FA1Quantikine ELISA Kit(货号:DPRF10,已停产)和AdipoGen公司的DLK1, SOLUBLE (human) ELISA KIT, (Cat.No.AG-45A-0032EK-KI01)。

发明内容

[0017] 本发明的目的在于提供一种检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒及其用途。具体要解决的技术问题如下：

[0018] 本发明要解决的技术问题之一是提供能与天然的DLK1或变性的DLK1特异结合的单克隆抗体。

[0019] 本发明要解决的技术问题之二是提供分泌产生上述单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

[0020] 本发明要解决的技术问题之三是提供本发明的单克隆抗体的制备方法。

[0021] 本发明要解决的技术问题之四是提供包含本发明单克隆抗体的一种具有高敏感性和特异性的快速检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒。

[0022] 本发明要解决的技术问题之五是提供上述ELISA试剂盒的包被液采用1*PBS。

[0023] 本发明要解决的技术问题之六是提供上述ELISA试剂盒的包被液通过8.18g氯化钠、0.2g氯化钾、3.58g 12水磷酸氢二钠、0.24g磷酸二氢钾，用氢氧化钠调PH至7.3再定容至1000ml时制得。

[0024] 本发明要解决的技术问题之七是提供上述ELISA试剂盒所述的酶反应终止液采用1.0N盐酸。

[0025] 本发明要解决的技术问题之八是提供上述ELISA试剂盒的检测方法。

[0026] 本发明要解决的技术问题之九是提供上述ELISA试剂盒的应用。

[0027] 为了解决上述技术问题，本发明通过如下技术方案实现：

[0028] 本发明选取重组人DLK1蛋白胞外端(24aa-303aa)为免疫原，通过反复多次小剂量的小鼠皮下免疫，获得分泌高效价的抗DLK1单克隆抗体的小鼠；再从中挑取小鼠，取其脾脏细胞，通过体外与小鼠骨髓瘤细胞融合、再经药物筛选及亚克隆等步骤而建立了多株稳定分泌抗人DLK1抗体的杂交瘤单克隆细胞。其中两株代号分别为29A7D11C8B7-019、27B1C2E3G8-020的杂交瘤细胞株，经ELISA、免疫印迹、流式细胞术，免疫组化等多种方法鉴定，证实其所分泌的单克隆抗体能够特异识别并结合人DLK1。

[0029] 本发明的第一方面，提供两种可分泌DLK1单克隆抗体的杂交瘤细胞系，所述杂交瘤细胞系为SP2/0和Balb/c小鼠脾细胞单克隆抗体杂交瘤细胞株；保藏编号分别为CGMCC No.11596或CGMCC No.11595。

[0030] 在本发明的第二方面，提供两种可特异结合DLK1蛋白的DLK1单克隆抗体，由上述保藏编号为CGMCC No.11596或CGMCC No.11595的杂交瘤细胞系分泌产生。

[0031] 在本发明的第三方面，提供上述单克隆抗体的制备方法，包括如下步骤：

[0032] 步骤1. 制备重组人DLK1蛋白为免疫原；

[0033] 步骤2. 动物免疫：通过反复多次小剂量的小鼠皮下免疫，获得分泌高效价的抗人DLK1单克隆抗体的小鼠；

[0034] 步骤3. 从中挑取小鼠，取其脾脏细胞，在体外与小鼠骨髓瘤细胞融合；

[0035] 步骤4. 酶联免疫吸附试验筛选抗体分泌阳性的杂交瘤细胞；

[0036] 步骤5. 阳性杂交瘤细胞经亚克隆鉴定得到多株稳定分泌抗人DLK1单克隆抗体的杂交瘤单克隆细胞；

[0037] 步骤6. 将杂交瘤细胞扩增培养，收集培养液，采用亲和层析法分离纯化抗人DLK1单克隆抗体。

[0038] 其中，步骤1具体为：插入片段kappa sp-DLK1soluble reg-His6tag，将其克隆到

哺乳动物表达载体pCPC载体中,获得表达质粒pCPC-DLK1-His,转染293-E/CHOE细胞,筛选出高效表达工程细胞株,细胞株经培养扩增、收集上清分离纯化后,获得纯度95%以上的DLK1蛋白。

[0039] 其中,步骤2所述小鼠皮下免疫的方法为:将所述纯化的重组人DLK1蛋白与弗氏完全佐剂混合,于皮下多点注射小鼠。

[0040] 其中,步骤6所述的亲和层析法具体为:将含单克隆抗体的杂交瘤细胞滤液上清上样于预先填充有共价交联了重组人DLK1蛋白的Ni-EF亲和层析柱中;上样完毕,亲和层析柱以0.1M Tris-HCL Ph8.0洗脱去除杂蛋白,再以柠檬酸洗脱被Ni-EF柱吸附的抗体蛋白,再透析;透析后的样品再经过滤后即获得纯化的抗DLK1单克隆抗体。

[0041] 在本发明的第四方面,提供一种检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒,包括:已包被DLK1单克隆抗体的固相载体、酶标记的DLK1单克隆抗体、酶的底物、阴性对照品和阳性对照品、包被液、洗涤液以及酶反应终止液,所述固相载体上包被的DLK1抗体来源于重组的抗体蛋白020。

[0042] 所述的包被液采用1*PBS。

[0043] 所述的包被液通过8.18g氯化钠、0.2g氯化钾、3.58g 12水磷酸氢二钠、0.24g磷酸二氢钾,用氢氧化钠调PH至7.3再定容至1000ml时制得。

[0044] 所述的酶标记抗原分为两种,包括:

[0045] 1号酶结合物,采用生物素标记的由保藏编号为CGMCC No.11596的杂交瘤细胞系分泌产生的小鼠抗人DLK1单克隆抗体;1号酶结合物的工作溶液配置:用样本稀释液按1:10000比例稀释,充分混匀,即配置成1号酶结合物工作溶液,此处需要即用即配;

[0046] 2号酶结合物,采用辣根过氧化物酶链(霉)亲和素(Horseradish Peroxidase Streptavidin)标记的由保藏编号为CGMCC No.11595的杂交瘤细胞系分泌产生的小鼠抗人DLK1单克隆抗体;2号酶结合物的工作溶液配置:用样本稀释液按1:5000比例稀释,充分混匀,即配置成2号酶结合物工作溶液,此处亦需要即用即配。

[0047] 所述的酶反应终止液采用1.0N盐酸溶液。

[0048] 在本发明的第五方面,提供一种检测人血清DLK1的检测方法,包含如下步骤:

[0049] 步骤1、样本稀释:用样本稀释液将待检血清按1:20稀释(含量特别高的,稀释比例加大);

[0050] 步骤2、加样反应:

[0051] (1) 样本检测孔每孔分别加已稀释样本血清50u1,每个样本平行检测做两个或两个以上的重复孔,同时设阴性、阳性及空白对照各2孔,取阴性、阳性对照品各100u1分别加入反应孔内,空白对照孔仅加入100u1样本稀释液;

[0052] (2) 37℃避光反应60分钟后甩去孔内液体,每孔用样本稀释液或洗涤液注满,立即甩去,再注满样本稀释液或洗涤液,静置2分钟,甩去液体,重复洗涤3次,每次均需静置2分钟,最后一次甩去拍干;

[0053] 步骤3、加酶反应:

[0054] (1) 每孔加1号酶结合物的工作溶液50u1,37℃避光反应60分钟后甩去孔内液体,如上洗涤,拍干;

[0055] (2) 每孔加2号酶结合物的工作溶液50u1,37℃避光反应30分钟后甩去孔内液体,

如上重复5次洗涤,拍干;

[0056] 步骤4、显色反应:每孔加配好的底物显色液TMB 100ul,室温反应10-15分钟,加酶反应终止液50ul/well,混匀,终止反应,立即用酶标仪测读;

[0057] 步骤5、酶标仪测读数:将已终止反应的酶标板立即测读,以空白对照调零于450nm读取OD值。

[0058] 在本发明的第六方面,提供上述ELISA试剂盒在制备检测肝癌及肝母细胞瘤的产品中的应用。所述应用不包括在疾病诊断和治疗上的应用。

[0059] 本发明的一种可分泌DLK1单克隆抗体的杂交瘤细胞系代号为29A7D11C8B7-019,分类命名为SP2/0和Ba1b/c小鼠脾细胞单克隆抗体杂交瘤细胞株,已于2015年11月24日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称为CGMCC),保藏编号为CGMCC No.11596,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所。

[0060] 本发明的另一种可分泌DLK1单克隆抗体的杂交瘤细胞系代号为27B1C2E3G8-020,分类命名为SP2/0和Ba1b/c小鼠脾细胞单克隆抗体杂交瘤细胞株,已于2015年11月24日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称为CGMCC),保藏编号为CGMCC No.11595,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所。

[0061] 与现有技术相比,本发明具有的有益效果如下:

[0062] 1、本发明的检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒及检测方法具有高敏感性和特异性,并能快速检验出DLK1的表达和肝癌和肝母细胞瘤;在检测人肝癌和肝母细胞瘤患者血清中有着重要的作用;

[0063] 2、本发明的技术优势在于要比现有的市面上DLK1检测试剂盒提高了DLK1蛋白被检出的灵敏度,能够检测出血清中更低浓度的DLK1蛋白,对临床的诊断提供更可靠的参考意义。

附图说明

[0064] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0065] 图1为以ELISA法鉴定检测019/02杂交瘤细胞上清液与重组DLK1蛋白结合的标准曲线图;

[0066] 图2为是本发明实施例5中ELISA检测试剂盒和现有的商业化试剂盒的标准曲线比较示意图;其中,mAb020(0.25ug/ml)指本发明的试剂盒的标准曲线,Kit指的是对照的商业化试剂盒(Human Pref-1/DLK-1/FA1Quantikine ELISA Kit)的标准曲线;

[0067] 图3为采用商业化对照试剂盒对肝癌样本进行检测的结果图;

[0068] 图4为利用本发明的试剂盒对40例正常儿童血清中的DLK1的检测结果图;

[0069] 图5为利用本发明的试剂盒对肝癌血清样本进行检测的结果图。

具体实施方式

[0070] 下面结合实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干调整和改进。这些都属于本发明的保

护范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0071] 实施例1、稳定分泌抗DLK1单克隆抗体的杂交瘤细胞系的建立与筛选鉴定

[0072] 步骤1. 重组人DLK1蛋白(免疫抗原)的制备

[0073] 利用PCR技术从自建质粒载体pcDNA3.1B-DLK1(pcDNA3.1B序列的5'端删除了BGH序列并加入T7启动子,XhoI、NotI、EcoRV和EcoRI酶切位点,并引入了3个flag标签,改造后的载体更加方便地应用于基因表达)中扩增得到编码人DLK1分泌区序列(DLK1soluble region,24-303aa)的基因片断,前边加入kappa信号肽序列,后边加入His 6tag标签序列,构建插入片段kappa sp-DLK1soluble reg-His 6tag,经序列测定鉴定正确,用限制性内切酶处理后,将其克隆到表达载体pCPC(KpnI/NotI)(购买获得)中。获得表达质粒pCPC-DLK1-His,转染293-E/CHOE细胞株,筛选出高效表达细胞株。高效表达细胞株经扩增培养,表达分离纯化后,获得纯度95%以上的DLK1-His蛋白。

[0074] 步骤2、动物免疫:

[0075] 将上述纯化的重组人DLK1蛋白与弗氏完全佐剂混合,于皮下多点注射5只Balb/c,5只SJL小鼠(100u1/只,共100ug DLK1蛋白)。首次免疫2-3周后,小鼠再给予皮下多点注射DLK1蛋白与不完全佐剂混合液加强免疫。加强免疫2-3次后,取少量小鼠血清,用包被DLK1蛋白的96-孔酶标板以ELISA法检测小鼠血清中抗DLK1蛋白抗体的效价,效价高者小鼠脾细胞用于下一步的细胞融合。

[0076] 步骤3、细胞融合:

[0077] 在DLK1蛋白末次免疫后3天,无菌制备小鼠脾细胞悬液,与S/P 20小鼠骨髓瘤细胞(购自中国科学院上海生命科学院细胞保藏中心)以10:1的比例在50%PEG-1500(美国Sigma公司产品)作用下融合。融合按常规法(Kohler G.and Milstein C:Nature 1975;256:495-497),PEG用量1ml,1分钟内缓慢加完。反应90秒后,以无血清的RPMI-1640培养基终止反应,1000rpm离心10min,去除上清液,再将离心沉淀下的细胞以含10%HAT(H为次黄嘌呤、A氨基碟呤、T胸腺嘧啶核苷,为Sigma公司产品)的RPMI 1640-10%FCS培养基将细胞浓度调节至 1×10^6 个/ml,加入96孔平底细胞培养板(每孔200u1),于37℃,5%CO₂培养箱中培养2-3周。

[0078] 步骤4、酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选抗体分泌阳性的杂交瘤细胞:

[0079] 以重组人DLK1蛋白(1μg/ml,pH 7.4,PBS液)包被酶标板,37℃包被2小时或4℃过夜;2%牛血清白蛋白(BSA)封闭,4℃过夜。经PBS-0.1%Tween20液洗涤后加入待检杂交瘤细胞培养上清(以未融合的S/P 20骨髓瘤细胞培养上清为阴性对照)37℃孵育2小时;经PBS-0.1%Tween20液洗涤后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠Ig(Sigma公司产品),37℃孵育1小时;再经PBS-0.1%Tween20液充分洗涤后,加入TMB底物液显色10-15min,以0.1M HCl终止反应。在plus384酶标仪(M.D公司产品)中读取450nm处OD值。测得的OD 450值比阴性对照高5-10倍的杂交瘤细胞再克隆化,并进行扩增冻存。

[0080] 步骤5、阳性杂交瘤细胞的亚克隆化-有限稀释法

[0081] 将上述初筛得到的阳性细胞以RPMI-1640-10%FCS培养基稀释至每孔1-10个细胞,铺于96-孔细胞培养板,于37℃,5%CO₂培养箱中培养2-3周。待克隆长成,取上清液以ELISA再次检测鉴定抗DLK1抗体的分泌。经检测鉴定,获得多个抗体分泌阳性细胞株。其中,

经再次亚克隆鉴定,获得了二株代号分别为29A7D11C8B7-019、27B1C2E3G8-020(简称019、020)的稳定分泌抗DLK1单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别对应保藏编号为CGMCC No.11596、CGMCC No.11595的杂交瘤细胞株。图1为以ELISA法鉴定检测019/020杂交瘤细胞上清液与重组DLK1蛋白结合,结果证明该杂交瘤细胞上清液含高效价抗DLK1蛋白的单克隆抗体。该单克隆抗体经鉴定分别为IgG2a, IgG1类。该杂交瘤细胞株再经大量扩增、长期传代培养并冻存。下表1为图1曲线对应的数据。

[0082] 表1

[0083]

| | 牛血清组 | BSA组 |
|------|-------------|-------------|
| r2 | 0.9855 | 0.9943 |
| 应用范围 | 0.02-5ng/ml | 0.02-5ng/ml |

[0084] 实施例2、抗DLK1单克隆抗体的体外制备及纯化

[0085] 将建立的019/020杂交瘤细胞于无血清培养基中扩增培养,待细胞浓度达 10^5 个/ml以上时停止加液,再持续培养直至细胞培养液变黄。收集培养液,1500rpm离心10分钟,上清液再经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后于 4°C 或 -20°C 保存备用或直接用于下一步的单克隆抗体的分离纯化。

[0086] 步骤6.将杂交瘤细胞扩增培养,收集培养液,采用亲和层析法分离纯化抗人DLK1单克隆抗体。

[0087] 在本实施例中,抗DLK1单克隆抗体(019/020)的分离纯化采用亲和层析法。其纯化步骤为:将含019/020单克隆抗体的杂交瘤细胞滤液上清上样于预先填充DLK1ProteinA(GE产品)的亲和层析柱中(200ml/5ml层析柱);上样完毕,亲和层析柱以 0.1M Tris-HCL Ph8.0洗脱去除杂蛋白,再以低pH(2.7)柠檬酸(0.1M)液洗脱被吸附的抗体蛋白。洗脱液以 1mol/L Tris(pH 9.0)调节pH至7.0,再对10倍的体积的 $1\times$ PBS透析12~16小时后(期间换液2-3次),透析后的样品再经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤后即获得纯化的抗人DLK1单克隆抗体。

[0088] 实施例3、人血清DLK1蛋白酶联检测试剂盒的制备

[0089] 1.包被抗原的固相载体

[0090] 固相载体可以选用聚苯乙烯或聚氯乙烯,采用96孔板或微量滴定板的形式。

[0091] 将实施例2制得的抗人DLK1单克隆抗体(019/020) 100u1/每孔 (0.25ug/ml)包被于聚苯乙烯或聚氯乙烯反应孔中。

[0092] 2.溶液配制

[0093] 2.1包被缓冲液的制备

[0094] 所述的包被液采用 $1\times$ PBS。所述的包被液通过 8.18g 氯化钠、 0.2g 氯化钾、 3.58g 12 水磷酸氢二钠、 0.24g 磷酸二氢钾,用氢氧化钠调PH至7.3再定容至 1000ml 时制得。

[0095] 2.2制备酶结合物(酶标记抗原)

[0096] 这里酶标记抗原分为两种,包括:

[0097] 1号酶结合物,采用生物素标记的DLK1抗体(代号019)。

[0098] 1号酶结合物的工作溶液配置:用样本稀释液按 $1:10000$ 比例稀释,充分混匀,即配置成1号酶结合物工作溶液,此处需要即用即配。

[0099] 2号酶结合物,采用辣根过氧化物酶链(霉)亲和素Horseradish Peroxidase

Streptavidin标记的DLK1抗体(代号020)。(SIGMA,S2438-250UG)

[0100] 2号酶结合物的工作溶液配置:用样本稀释液按1:5000比例稀释,充分混匀,即配置成2号酶结合物工作溶液,此处亦需要即用即配。

[0101] 2.3酶的底物液(显色液)

[0102] 双组份TMB(湖州英创生物科技,TMB-S-003),现用现配,使用时A液B液按1:1混匀。

[0103] 2.4样本稀释液或洗涤液配置

[0104] 选用如下样品及重量:1%BSA

1) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58g

2) KH_2PO_4 0.24g

3) KCl 0.2g

[0105] 4) NaCl 8.18g

5) Tween-20 0.5ml

6) BSA 5g

水 定容至 1000ml

[0106] 配置成为样本稀释液。

[0107] 2.5终止液的配置

[0108] 用10ml HCl(36-38%,7647-01-0,12M)加入110ml蒸馏水中,混合过程需缓慢进行,配置成1N的HCl,终止液。

[0109] 实施例4、检测方法及操作程序

[0110] 1.样本稀释

[0111] 用样本稀释液将待检血清按1:20稀释,如将5u1血清中加入100u1稀释液,充分混匀。阴、阳对照品不用稀释。

[0112] 2.加样反应

[0113] 2.1样本检测孔每孔分别加已稀释样本血清50u1,建议每个样本平行检测2孔。同时设阴性、阳性及空白对照各2孔,取阴性、阳性对照品各50u1分别加入反应孔内,空白对照孔仅加入50u1样本稀释液。

[0114] 2.2 37℃避光反应60分钟后甩去孔内液体,每孔用样本稀释液或洗涤液注满,立即甩去,再注满样本稀释液或洗涤液,静置2分钟,甩去液体,重复洗涤3次,每次均需静置2分钟,最后一次甩去拍干。

[0115] 3.加酶反应

[0116] 3.1每孔加1号酶结合物的工作溶液(即用即配)50u1,37℃避光反应60分钟后甩去孔内液体,如上洗涤,拍干。

[0117] 3.2每孔加2号酶结合物的工作溶液(即用即配)50u1,37℃避光反应30分钟后甩去孔内液体,如上重复3次洗涤,拍干。

[0118] 4.显色反应:每孔加配好的底物显色液(现用现配)TMB,100u1/孔,室温反应15分

钟。加终止液1.0N HCL 50u1/孔,混匀,终止反应。立即用酶标仪测读。

[0119] 5. 酶标仪测读数:将已终止反应的酶标板立即测读,以空白对照调零于450nm读取OD值。

[0120] 这里需要注意的是,本体系显色反应快,在显色、终止及测取读数时,必须每块逐次进行,否则极易造成误差。

[0121] 6. 结果判断

[0122] 仪器判断:待检孔OD值大于或等于阴性对照2.0倍者为阳性。当阴性对照OD值低于0.05时按0.05计算。

[0123] 7. 注意事项

[0124] (1) 在使用排枪加样时,必须避免枪头触及ELISA板孔内壁;

[0125] (2) 试剂盒在2-8℃下保存,其中1号酶结合物(1号液)、底物(3号液)、阴性对照品、阳性对照品需保存于-20℃,每次取出时先平衡至室温后使用;

[0126] (3) 洗涤时将稀释液或洗涤液注满孔内,每次停放2分钟后甩去孔内液体。禁用自来水等其它水源。

[0127] 实施例5、本发明的人血清DLK1蛋白酶联检测试剂盒与现有的商品化试剂盒的比较。

[0128] 将本发明的人血清DLK1蛋白酶联检测试剂盒与现有的商品化试剂盒(货号: DPRF10, Human Pref-1/DLK-1/FA1Quantikine ELISA Kit)进行标准曲线的比较。

[0129] 图2是本实施例中的ELISA检测试剂盒和现有的商业化试剂盒的标准曲线比较示意图;如图2所示,结果表明:本发明的试剂盒灵敏度高于商业化试剂盒。

[0130] 本发明试剂盒的r²和检测范围见下表2:

[0131] 表2

[0132]

| | |
|----------------|-------------|
| | in BSA |
| r ² | 0.9943 |
| 应用范围 | 0.02-5ng/ml |

[0133] 商业化试剂盒的r²和应用范围见下表3:

[0134] 表3

[0135]

| | |
|----------------|---------------|
| r ² | 0.9935 |
| 应用范围 | 0.156-10ng/ml |

[0136] 实施例6、进一步将人体血清对本发明的试剂盒进行检验,以得出本试剂盒的检验效果及临床上的应用前景。

[0137] 1. 评价重组抗体#019和#020用于肿瘤(肝癌,肝母细胞瘤)ELISA诊断的敏感性

[0138] 采血方法:以肝母细胞瘤,儿童生殖系统肿瘤(睾丸癌,卵黄囊瘤等)患者,婴儿肝炎,正常儿童为采血对象

[0139] (1) 选择一定数量的肝母细胞瘤患者,儿童生殖系统肿瘤(睾丸癌,卵黄囊瘤等)患者,婴儿肝炎,正常儿童,采集手术前后或者门诊体检或化疗时的血样。血样须有AFP临床检测数值

[0140] 全部血样重新编号,达到单盲法、双盲法的要求。

[0141] 2.ELISA检测

[0142] 2.1人血清DLK1检测试剂盒:采用R&D systems公司出品的Human Pref/DLK1-1/FA1Quantikine ELISA kit作为对照。

[0143] 采用商业化对照试剂盒对肝癌样本进行检测,可检测到部分血清样本DLK1表达阳性。如图3所示,40例肝癌样本中可检测到6例血清样本DLK1表达为阳性。

[0144] 2.2实验室检测:

[0145] 诊断抗体:#019、#020 2个抗体联合使用

[0146] ELISA:生物素/链霉亲和素

[0147] 阴性标准:以正常儿童的血清为参照。

[0148] 阳性对照:DLK1为胚胎表达基因,跟AFP类似,刚出生不久的婴儿尚有较高水平的DLK1表达,属于生理性高表达。因此,出生小于1个月的婴儿血清也可作为阳性对照。

[0149] 利用本专利试剂盒对40例正常儿童血清中的DLK1的检测(10例小于1月龄婴儿,10例为1个月到1岁的婴幼儿,10例为1岁到3岁的幼儿,10例为大于三岁的儿童)。如图4,结果显示,本试剂盒可以区分不同年龄的DLK1表达情况。小于1月龄的婴儿血清DLK1蛋白表达最高,10例样本均为阳性;1个月到1岁的婴幼儿血清样本中只有4例DLK1蛋白表达为阳性;而1岁到3岁的幼儿及大于三岁的儿童血清样本中几乎检测不到DLK1蛋白表达。

[0150] 利用本专利试剂盒对肝癌血清样本进行检测;如图5所示,可以检出DLK1表达升高的血清样本。对20例肝癌血清样本分别进行1:4和1:10的稀释,结果表明,相比1:4血清稀释浓度,血清样本经1:10稀释后仍可检测到DLK1蛋白的表达。

[0151] 3.统计结果

[0152] 对采集的肝母细胞瘤及其他患者血样分别采用单盲法、双盲法进行了ELISA的检测,检测的总样本数为79例(表4)。

[0153] 结果表明,DLK1和AFP在对患者血清的检测中有一致性,也有互补性,有望作为临床上AFP阴性的部分患者的补充诊断指标。

[0154] 表4 019和020抗体ELISA诊断法在肝母细胞瘤等患者血清中盲法评估结果

[0155]

| 诊断抗原 | 例数 | 所占比率(%) |
|--------------|----|---------|
| AFP升高 | 37 | 46.83 |
| DLK1升高 | 28 | 35.44 |
| AFP升高,DLK1正常 | 19 | 24.05 |
| AFP正常,DLK1升高 | 10 | 12.66 |
| AFP升高,DLK1升高 | 18 | 22.78 |

[0156] 4.结果分析

[0157] 目前儿童肝母细胞瘤,生殖腺肿瘤,婴儿肝炎的检测主要依靠AFP的血清学检查,但是AFP的检测也有一定的漏检率,由于方法的敏感性或者其他干扰因素的影响,这种方法的检测结果不能如实的反映实际的患病人数。因此,另外的敏感性和特异性较高的诊断指标检测试剂盒的开发对肝母细胞瘤,生殖腺肿瘤,婴儿肝炎的诊断尤为重要。本发明通过对肝癌及肝母细胞瘤相关基因的研究发掘的可能的诊断靶分子,利用分子生物学实验室技

术,获得了1个具有诊断价值的靶基因DLK1,并通过肝母细胞瘤,生殖腺肿瘤,婴儿肝炎及正常儿童的血清检测,结果表明,DLK1的重组抗体可作为诊断试剂盒用于患者血清检测,其敏感性略高于成熟试剂盒,特异性接近于成熟试剂盒。因此,这2个重组抗体均有进一步开发为诊断试剂盒的前景。

[0158] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

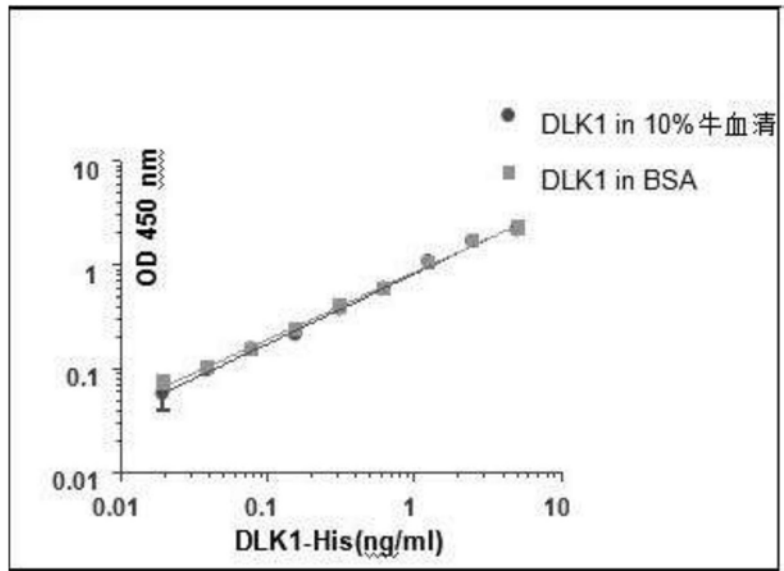


图1

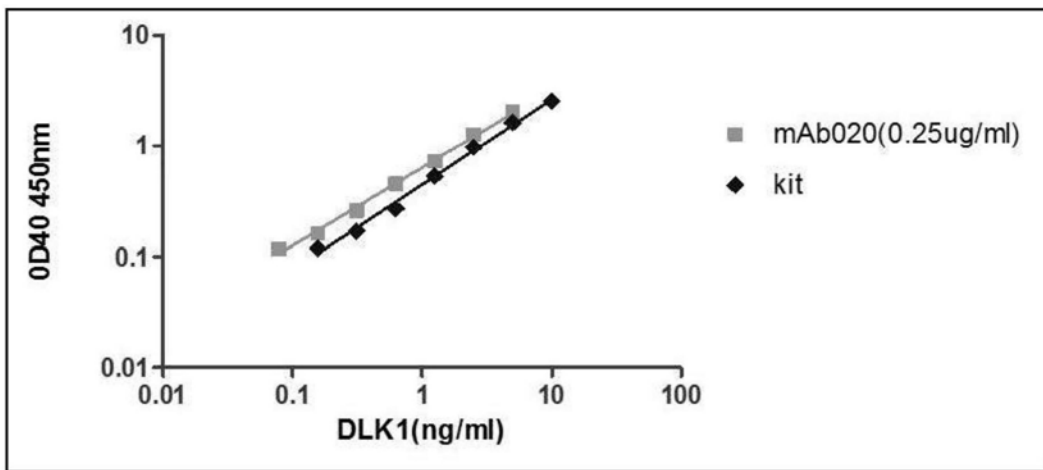


图2

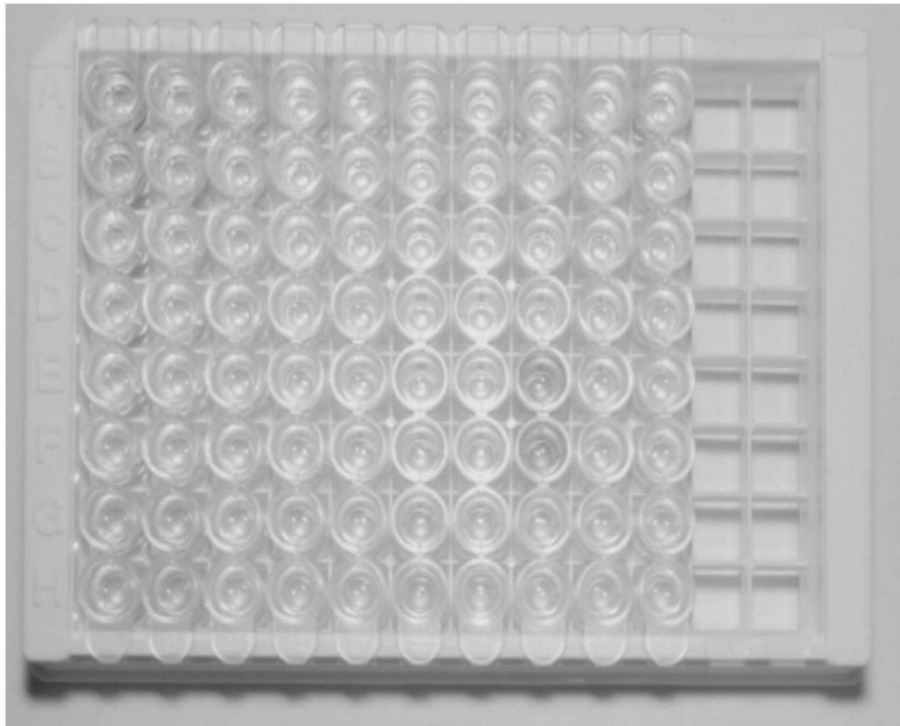


图3

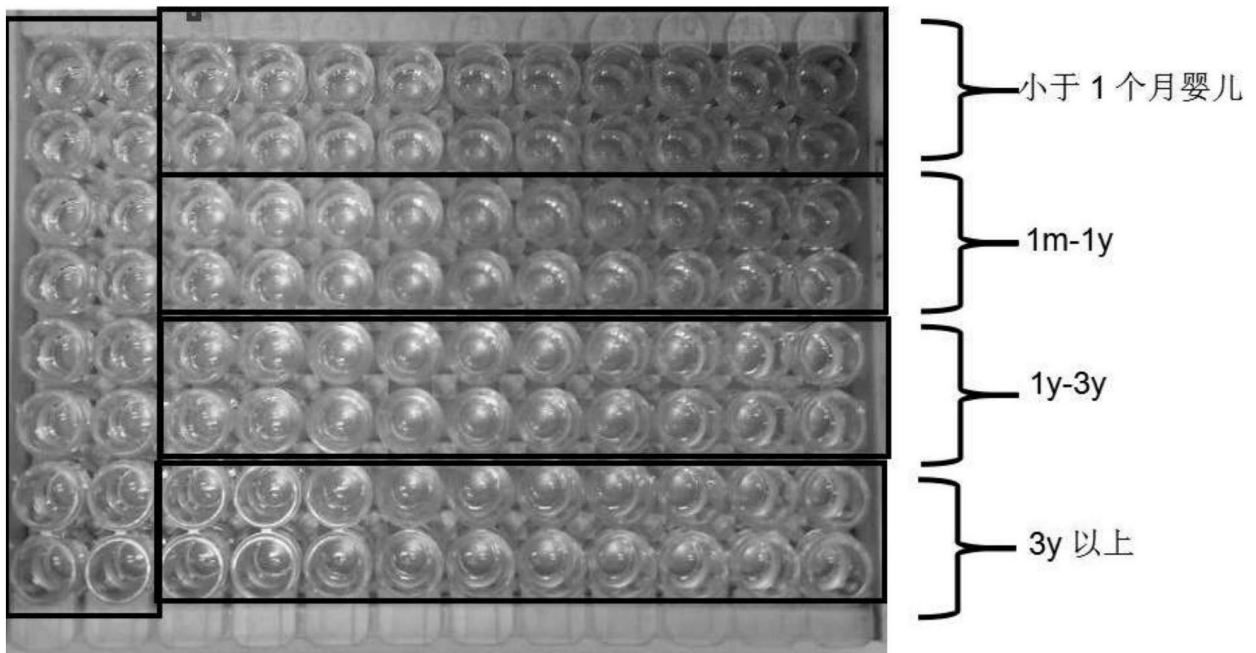


图4

标准曲线

1: 4 稀释

1: 10 稀释

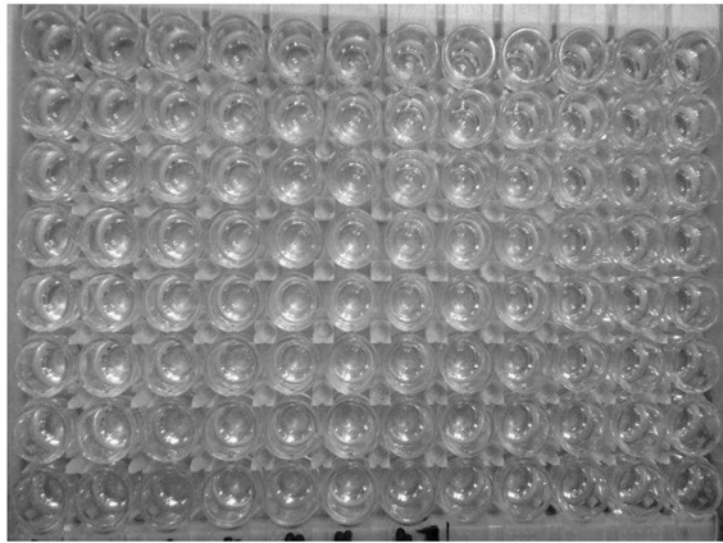


图5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN110031629A | 公开(公告)日 | 2019-07-19 |
| 申请号 | CN201810027820.8 | 申请日 | 2018-01-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 上海交通大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 上海交通大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 上海交通大学 | | |
| [标]发明人 | 韩泽广 徐晓 | | |
| 发明人 | 韩泽广 徐晓 翟杨杨 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/535 G01N33/543 | | |
| CPC分类号 | G01N33/535 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/57438 G01N33/57484 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2033/57461 G01N2333/4746 G01N2800/085 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种检测人血清DLK1蛋白的ELISA试剂盒及其用途。本发明的ELISA试剂盒的抗原采用重组的人DLK1抗原。本发明的检测方法具有高敏感性和特异性，并能快速检验出DLK1的表达和肝癌和肝母细胞瘤，本发明的ELISA试剂盒在肝癌和肝母细胞瘤的防治和诊断中拥有广阔的应用前景。

