

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510059716. X

[51] Int. Cl.

C12N 5/12 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 5 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100386431C

[22] 申请日 2005.3.31

[21] 申请号 200510059716. X

[73] 专利权人 北京大学

地址 100080 北京市海淀区颐和园路 5 号

[72] 发明人 陈英玉 韩文玲 马大龙 李 婷
张 婷

[56] 参考文献

CN1464057A 2003.12.31

WO2004028556A1 2004.4.8

WO0069910A1 2000.11.23

趋化素样因子 1 (CKL F1) 对关节软骨细胞增殖及代谢的影响. 程爱新. 北京大学学报(医学版), 第 35 卷第 4 期. 2003

人类新细胞因子 (CKLF21) 在大肠杆菌中的表达与鉴定. 王露等. 中华微生物学和免疫学杂志, 第 23 卷第 3 期. 2003

审查员 魏 聪

[74] 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司

代理人 王凤华

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 3 页

[54] 发明名称

人趋化因子的单克隆抗体

[57] 摘要

本发明公开了一种抗人 CKLF1 的单克隆抗体及其杂交瘤细胞系, 杂交瘤细胞系的保藏号为 CGMCC No. 1335。本发明的单克隆抗体可以用来检测各种病变组织中的 CKLF1 蛋白的表达; 该单克隆抗体还可作为探针, 利用直接免疫荧光试验检测各种疾病如哮喘、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病外周血淋巴细胞 CKLF1 的表达水平, 作为临床诊断或辅助诊断的一个标志。

1. 一种杂交瘤细胞系，保藏号为 CGMCC No. 1335。
2. 一种抗人 CKLF1 的单克隆抗体，由权利要求 1 所述的杂交瘤细胞系产生。

人趋化因子的单克隆抗体

技术领域

本发明涉及一种单克隆抗体及其杂交瘤细胞系，尤其是人趋化因子 CKLF1 的单克隆抗体以及生成该抗体的杂交瘤细胞系。

背景技术

人趋化因子 CKLF1 (Chemokine-like factor 1) 是由北京大学人类疾病基因研究中心在国际上首次克隆的一个细胞因子，它具有 CC 家族趋化因子的结构特征和趋化功能 (中国专利申请号：99107284.7)。体内外的功能试验表明，CKLF1 具有广谱的趋化活性，不仅对造血干细胞有特殊的促增殖效应，且对骨骼肌增殖也具有显著的促进作用。通过对 CKLF1 转基因小鼠的研究发现，转基因小鼠的肺组织病变明显，表现为肺组织内炎症细胞聚集，肺泡隔增厚、充血、水肿，与哮喘发病后期的病理改变相似，这提示 CKLF1 在呼吸系统炎症性疾病的发病过程中起重要的作用。

发明内容

本发明的目的在于提供能与人趋化因子 CKLF1 特异性结合的单克隆抗体。

本发明还提供了生产上述单克隆抗体的杂交瘤细胞系，它已于 2005 年 3 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，保藏号为 CGMCC No 1335。

本发明还进一步确认了所述的单克隆抗体在体外用于检测体液或病变组织中的 CKLF1 蛋白的表达。例如用于检测各种体液如血液、血浆、血清、尿、淋巴液或脑脊液中的 CKLF1 的水平；还可以测定各种疾病如哮喘、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病外周血淋巴细胞 CKLF1 的表达水平，作为临床诊断或辅助诊断的一个标志。

本发明制得的人 CKLF1 单克隆抗体，为 CKLF1 的基础研究和临床应用

研究提供了有利的工具。

本文利用趋化因子 CKLF1 的真核表达质粒为免疫原，经过肌肉免疫、常规细胞融合、筛选及克隆化，建立了稳定分泌抗 CKLF1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株（M4 克隆株）。经 ELISA、免疫印迹等方法的鉴定，杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体能够特异地识别大肠杆菌表达的重组 CKLF1 和 CKLF1 的活性片断 C27 和 C19，且具有中和活性。进一步的研究发现，CKLF1 蛋白主要表达在活化的外周血单个核细胞上，且有分泌形式的存在。临床研究资料表明，哮喘病人外周血的淋巴细胞表达高水平的 CKLF1 蛋白，本研究结果对于哮喘病人的诊断或辅助诊断、特异性治疗以及发病机理的研究提供了新的思路。

抗人 CKLF1 单克隆抗体的成功制备，为深入研究 CKLF1 蛋白的生物学效应、以及在人体内各组织器官的分布、生理和病理情况下的变化、疾病的诊断和治疗奠定了基础。

CKLF1 单克隆抗体的应用：

- (1) FITC 标记的 CKLF1 单克隆抗体为探针，利用直接免疫荧光试验检测各种疾病如哮喘、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病外周血淋巴细胞 CKLF1 的表达水平，作为临床诊断或辅助诊断的一个标志。
- (2) 利用该抗体和免疫组化检测各种病变组织中的 CKLF1 蛋白的表达。
- (3) 该抗体作为试剂盒可以测定各种体液如血液、血浆、血清、尿、淋巴液或脑脊液中的 CKLF1 的水平。
- (4) 利用该抗体制备免疫亲和层析柱，来分离纯化 CKLF1 蛋白。
- (5) 利用该单抗进行动物试验研究。
- (6) 该单抗作为 CKLF1 的拮抗剂，可以进行药理学研究，用于治疗以 CKLF1 高表达而引起的各种疾病，如哮喘，系统性红斑狼疮和 SARS 等。

附图说明

图 1 为图 1 Western Blot 检测 M4 单克隆抗体与重组 CKLF1 的特异性反应

其中 泳道 1 为大肠杆菌的裂解物+CKLF1 多克隆抗体

泳道 2 为重组 CKLF1+CKLF1 多克隆抗体

泳道 3 为大肠杆菌的裂解物+CKLF1 单克隆抗体（M4）

泳道 4 为重组 CKLF1+CKLF1 单克隆抗体 (M4)

图 2A 趋化试验检测 M4 单克隆抗体中和 CKLF1-C19 的趋化活性

图 2B 趋化试验检测 M4 单克隆抗体中和 CKLF1-C27 的趋化活性

图 3 免疫组化实验检测 CKLF1 蛋白在 PHA 刺激的外周血单个核细胞的表达

图 4 流式细胞术分析哮喘病人和正常人外周血淋巴细胞表面 CKLF1 的表达。

具体实施方式

实施例 1. 真核表达质粒的构建

利用 PCR 技术从 PHA 刺激的 U937 细胞 cDNA 文库中扩增得到 CKLF1 基因的完整开放读码框架序列, 并将其克隆到 pGEM-T easy (购自 Promega 公司) 载体中, 经序列测定获得序列正确的克隆。用限制性内切酶 EcoR I 酶切后, 将插入片段 CKLF1 释放出来, 克隆到真核表达载体 pcDI 的 EcoR I 位点中, 筛选正向插入克隆, 经内切酶鉴定正确, 命名为 pcDI-CKLF1 质粒 (Biochem J. 2001, 357, 127-135)。质粒的大量提取、纯化以及内毒素的处理方法和步骤严格按照 EndoFree™ plasmid Giga Kits(Qiagen-tip 10000,Hilden, Germany)使用说明书操作。

实施例 2. 杂交瘤细胞系的建立

步骤 1、动物免疫

将纯化的真核表达质粒 pcDI-CKLF1 于 BALB/C 小鼠 (北京大学医学部动物研究中心提供) 胫前肌沿肌纤维走向注射 100ul/只 (100ug), 注射后即行电针脉冲刺激 (80mV,100mA), 3 周后同剂量质粒再次注射, 10 天后以间接 ELISA (波长为 490nm) 检测小鼠血清中 CKLF1 蛋白多抗的效价, 效价高者进行下一步的细胞融合。

步骤 2、细胞融合

无菌制备 pcDI-CKLF1 免疫的小鼠脾细胞悬液, 与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 (来源于 ATCC) 以 5:1 的比例在 PEG1500 (为 Fluka 产品) 作用下融合, 融合按常规法 (Kohler G. and Milstein C: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975; 256:495-497), PEG 用

1ml, 1 分钟内缓慢加完, 反应时间为 90 秒, 无血清的 RPMI 1640 (为 Gibco BRL 产品) 培养基终止反应, 1000rpm 离心 10min, HAT (H 次黄嘌呤、A 氨基蝶呤、T 胸腺嘧啶核苷, 为 Gibco BRL 产品) 完全 1640 培养基调细胞浓度至 1×10^6 /ml, 加入已预先铺有饲养细胞(Balb/c 小鼠的腹腔巨噬细胞)的 96 孔平底板, 100 μ l/孔, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每隔 3 天观察并换液, 10 天后以 HT1640 (为 Gibco BRL 产品) 培养基换液, 1 周后换完全 1640 培养基。

步骤 3、间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 筛选阳性杂交瘤细胞

(1) CKLF1 多肽的合成与偶联: CKLF1 的两个活性片段的合成由深圳翰宇 (Hybio Engineering) 中国有限公司按照标准方法化学合成。它们的序列分别是 ALIYRKL LFNPSGPYQKKPVHEKKEVL(C27) 和 FNPSGPYQKKPVHEKKEVL (C19)。冻干的多肽, 溶于磷酸盐缓冲液中, 浓度为 1 mg/ml 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。用于多肽偶联的载体蛋白 Imject[®] Maleimide Activated Bovine Serum Albumin (BSA) 购自 PIERCE 公司, C27 和 C19 多肽与 BSA 的连接按照公司提供的说明书操作, 最后产生 C27-BSA 和 C19-BSA 的偶联蛋白。

(2) ELISA 试验: 以 C27-BAS 和 C19-BSA 的偶联蛋白 (1 μ g/ml) 包被酶标 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时或 4 $^{\circ}$ C 过夜; 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加入待检杂交瘤细胞(上述步骤 2 制得的细胞)培养上清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, SP2/0 细胞培养上清为阴性对照; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (为 Promega 产品)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时; 邻苯二胺(OPD)底物液显色 10—15min, 2M H₂SO₄ 终止反应。每步完成均用含 0.05% Tween 20 的 PBS 充分洗涤, ELISA Reader(Bio-Tek Instruments 公司产品)测 OD₄₉₀ 值。所测的 OD₄₉₀ 值比阴性对照高 10 倍的克隆, 进行亚克隆化, 并进行扩增冻存。

步骤 4、阳性杂交瘤细胞的克隆化—采用有限稀释法

将上述步骤 3 筛选得到的细胞以含白细胞介素 6 (IL-6) (300U/ml)的 HT 1640 培养基稀释至每孔 1 个细胞, 铺于 U 型 96 孔细胞培养板, 4 小时内镜下观察每孔实际细胞数, 记录单个细胞孔, 待其长成克隆且 ELISA 鉴定抗体分泌呈阳性, 即获得单抗分泌株, 大量扩增并冻存, 长期传代培养后, 以相同的方法再次克隆化鉴定之, 从而获得了稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞

株 M4。杂交瘤细胞株 M4 于 2005 年 3 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，保藏号为 CGMCC No. 1335。

实施例 3. 体外培养法制备单抗

将已经建立的阳性杂交瘤细胞 M4 扩大培养，待细胞浓度达 $10^5/\text{ml}$ 时停止换液，持续培养直至细胞全部死亡。收集培养上清，1500rpm，离心 10 分钟，上清含有高水平的单克隆抗体， -20°C 保存备用。

实施例 4. 体内诱生腹水法制备单抗

挑选经产 Balb/c 小鼠，腹腔内注射 0.5ml 不完全弗氏佐剂(为 Gibco BRL 产品)，7 天后每只小鼠腹腔内注射 0.5ml 含 2×10^6 的 M4 杂交瘤细胞，7-10 天后视小鼠腹部膨胀程度收集腹水， 4°C 离心，2500rpm 离心 20min，收集上清，分装并放置 -30°C 保存备用。

实施例 5 单抗的特性鉴定

步骤 1、滴度测定

取小鼠腹水做等比稀释，以 CKLF 多肽 C27-BSA 为检测抗原，间接 ELISA 法（同实施例 2 步骤 3）测定实施例 4 制备的抗体滴度，并以 SP2/0 诱生的小鼠腹水为阴性对照，ELISA 检测的结果是：1: 10^5 。

步骤 2、单克隆抗体 IgG 亚类鉴定

取 M4 杂交瘤细胞培养上清，用 SIGMA 公司提供的小鼠单克隆抗体同型试剂进行。具体方法如下：

(1) 在已包被 C27-BSA 蛋白的 ELISA 板中分别加入 M4 杂交瘤细胞培养上清，室温孵育 2 小时。

(2) 用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗板三次。分别加入羊抗鼠的 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (SIGMA 公司产品) (用 PBS1: 1000 稀释) 各 100ul/孔，每个样品设 3 个重复孔。室温孵育 30 分钟。

(3) 用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗板三次。加入 HRP 偶联的兔抗羊 IgG (SIGMA 公司产品) (用 PBST 做 1: 5000 稀释)，100ul/孔，室温孵育 15 分钟。

(4) 用含 0.05%Tween 20 的 PBS 洗板三次, 邻苯二胺(OPD)底物液显色 10~15min。

(5) 2M H₂SO₄ 终止反应。

(6) ELISA Reader 测 OD490 值, 判断单抗 IgG 亚类。

结果表明, M4 杂交瘤分泌的单抗为 IgG1 亚类免疫球蛋白。

步骤 3、单抗的纯化

将 CKLF1 单抗腹水用 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 对倍稀释。在搅拌的条件下逐滴加入饱和硫酸铵至饱和度为 50%, 4 C°静置过夜。次日 12000rpm, 离心 15 分钟, 弃上清, 沉淀溶于 PBS 中透析 2 天(期间换 4 次液)。利用 HiTrapTM Protein G (为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品) 亲和层析的方法(按说明书操作)纯化 CKLF1 蛋白的单克隆抗体。将纯化的抗体进行 SDS-PAGE 电泳, 按常规方法进行(分离胶为 12.5%, 浓缩胶为 4.5%)。纯化的抗体放 -30°C 保存备用

步骤 4、单抗稳定性的测定

复苏杂交瘤细胞, 收集不同传代次数的细胞上清, 并用 ELISA 方法检测其效价。结果表明 M4 细胞株能够稳定的产生单克隆抗体。

步骤 5、单克隆抗体的反应特异性

(1) 间接 ELISA 方法(同实施例 2 步骤 3)检测所得的单克隆抗体与 CKLF1 多肽反应特点

实验结果见表 1。结果表明, M4 单抗能与 C27 和 C19 发生特异性反应, 而与载体蛋白鸡卵清蛋白(OVA)无交叉反应。

表 1 ELISA 检测 M4 单抗与 C27 和 C19 的特异性反应

	OD490 值		
	OVA	OVA-C27	OVA-C19
M4 上清	0.240±0.078	1.744±0.125	1.941±0.143
CKLF1 多克隆抗体	0.259±0.047	0.97±0.054	0.443±0.069

上述 CKLF1 多克隆抗体的制备请参见文献: 中国医学科学院学报, 2004 26(5):496-469。

(2) Western Blot 免疫印迹实验检测 M4 单抗与 CKLF1 蛋白结合反应: 将大肠杆菌体外翻译系统合成重组 CKLF1 蛋白 (Yanan Liu, Dalong Ma.Expression of Recombinant Chemokine-Like Factor 1 with a Cell-Free Protein Biosynthesis system. Cell-Free Protein Expression. Editor: Dr. James R. Swartz, 2nd ed, 2003, ISBN 3-540-05041-8, Springer, Chapter 20, pp165-177) 和大肠杆菌裂解物进行 15% SDS-PAGE 电泳, 按常规方法在 Bio-Rad 电转移系统中将凝胶蛋白带转移到硝酸纤维素膜上 (Schleicher&Schuell 公司产品), 用 5% 脱脂奶粉在 4°C 封闭过夜, 加入由实施例 4 制备的 CKLF1 单抗, 阳性对照加入兔抗人 CKLF1 多克隆抗体 (该多克隆抗体的制备请参见文献: 中国医学科学院学报, 2004 26(5): 496-469), 室温反应 1h, 洗涤三次。随后加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠或羊抗兔 IgG, (为 Promega 产品) 室温反应 1h, 洗涤三次。最后加 NBT/BCIP(Promega 产品)底物显色。洗涤均用 TBS-T (pH7.5, 0.05mol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, 0.05% Tween-20), 每次 10min。结果如图 1 所示, M4 单抗与重组 CKLF1 蛋白有较强的特异性反应; 而与宿主菌裂解物无交叉反应。

ELISA 和 Western Blot 的结果都证明 M4 细胞株产生的单抗能与 CKLF1 分子发生强烈的结合反应, 因此可以应用到 CKLF1 的基础研究和临床应用研究。

实施例 6. 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记 CKLF1 单抗的制备

将通过实施例 5 步骤 3 纯化的 CKLF1 单克隆抗体 (2mg/ml) 在 FITC 标记缓冲液 (0.05Mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.5) 中透析, 然后与 0.1mg FITC (SIGMA 公司产品)混合, 4°C 反应 16 小时, 过 Sephadex G-50 柱 (Amersham Biosciences 公司产品), 收集标记蛋白, 标记物加 1%牛血清白蛋白和 0.1%NaN₃, 4°C 避光保存备用。

实施例 7 单克隆抗体对 CKLF1 活性片断的中和活性作用

表 2. CKLF1 单抗对 C27 和 C19 中和活性的试验设计

	试验组 1	试验组 2	阴性对照 3	阴性对照 4	阳性对照
C27	+	-	+	-	-
C19	-	+	-	+	-
CKLF1 单抗	+	+	-	-	-
小鼠 IgG	-	-	+	+	-
CCL17/TARC	-	-	-	-	+
PBS	-	-	-	-	+

将上述各组分混合，4°C 孵育 30 分钟后，放在 37°C 预温，接着进行趋化试验（Han wl, et al. Biochem J. 2001, 357, 127-135），该试验用的靶细胞是人 T 细胞白血病细胞 Hut102 细胞系（北京大学人类疾病基因研究中心保存）。CKLF1 的趋化活性用趋化指数（Chemotactic Index, CI）来表示，趋化指数高表明趋化活性强，反之则趋化活性弱。趋化试验的结果见图 2A 和 2B，图中显示 CKLF1 的活性片断 C27 和 C19 具有趋化人白血病细胞系 Hut102 的能力，而我们筛选的 M4 单克隆抗体分别与浓度为 100ng/ml 和 1000ng/ml 的 C19 多肽和 C27 多肽孵育一定的时间后，这两个活性片断的趋化指数明显下降，说明 M4 单抗具有明显的中和活性。

实施例 8 单克隆抗体用于检测外周血单核细胞的 CKLF1 表达

免疫荧光实验

(1) CKLF1 在 PHA 刺激的外周血单个核细胞上的表达

A 外周血单个核细胞的分离和培养：将肝素抗凝的 20ml 正常人外周血，用人淋巴细胞分层液（比重 $d=1.077\pm 0.001$ ，购自上海华精生物高科技有限公司）分离单个核细胞，然后加入终浓度为 50ug/ml 的植物血凝素（PHA，购自 Sigma 公司产品）在 37°C, 5%的 CO₂ 孵箱中培养，取不同时间（0、8、24、48、72 小时）培养的细胞进行下面的直接免疫荧光试验和免疫组化试验。

B 直接免疫荧光试验：将 PHA 刺激不同时间的单个核细胞用 PBS 洗两

次，加入 FITC 标记的 CKLF1 单抗（由实施例 6 制备），4°C 孵育 30 分钟，用 PBS(含 0.1%的 BSA 和 0.1%的叠氮钠)洗 2 次，流式细胞仪(FACSCalibur, 美国 BD 公司生产)分析 CKLF1 在细胞膜上的表达。为了检测细胞内的 CKLF1 的表达水平，我们将 PHA 刺激的细胞用 3%的多聚甲醛冰浴 10 分钟，然后用含 0.1% TritonX-100 和 1%BSA 的 PBS 室温反应 30 分钟，1500rpm 离心 10 分钟，最后加入 FITC 标记的 CKLF1 单抗，4°C 孵育 30 分钟，用 PBS（含 0.1%的 BSA 和 0.1%的叠氮钠）洗 2 次，流式细胞仪 FACSCalibur（BD Bioscience 公司产品）分析 CKLF1 在细胞内的表达密度。结果证明：正常人外周血单个核细胞的表面以及胞内均能表达低水平的 CKLF1 分子，经 PHA 活化后，细胞膜表面表达的 CKLF1 明显上调，随着时间的延长逐渐升高；而细胞内 CKLF1 的表达与膜表达则相反，胞内 CKLF1 的表达在活化 24 小时最高，随着时间的延长，表达逐渐下降（见表 3）。

表 3. CKLF1 在 PHA 刺激的人外周血单个核细胞上的表达密度

	细胞表面	细胞内
24h	54.73	296.08
48h	62.88	239.68
72h	64.91	173.33

C 免疫组化试验：将上述培养的细胞悬液滴在洁净的载玻片上，离心甩片，PBS 洗 2 次，每次 3 分钟，加 3%过氧化氢室温避光反应 8~10 分钟，以便去除内源性过氧化物酶；PBS 洗 2 次，加羊血清室温孵育 20 分钟；加入 1:100 稀释的 M4 单抗，室温反应 40~60 分钟；PBS 洗 3 次，加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(为 Promega 产品)，室温反应 40~45 分钟；PBS 洗 3 次，加入 DAB(SIGMA 公司产品)显色液，避光观察。免疫组化的结果（见图 3）表明，PHA 刺激 0 小时和 8 小时，基本上没有检测到 CKLF1 的表达，而在 24 小时和 48 小时，CKLF1 的表达明显上调，72 小时表达下降，实验表明活化的人外周血单个核细胞表达高水平的 CKLF1 蛋白，且存在分泌形式。

直接免疫荧光和免疫组化的结果证明，制备的单克隆抗体能够动态观察细胞中的 CKLF1 的表达，为深入研究 CKLF1 蛋白的生物学效应、以及在人

体内各组织器官的分布、生理和病理情况下的变化、疾病的诊断和治疗奠定了基础。

实施例 9 单克隆抗体用于检测哮喘病人外周血淋巴细胞膜表面 CKLF1 的表达

取哮喘病人的肝素抗凝血 0.1ml，加入 FITC 标记的抗人 CKLF1 单克隆抗体（由实施例 6 制备），轻轻混匀，4℃避光反应 30 分钟。加入 2ml 冷的 PBS（含 0.1% BSA 和 0.1% NaN₃），2000rpm 4℃离心 5 分钟，弃上清。加入溶人红细胞溶解液 1ml（用前 37℃预热），充分混匀，37℃孵育 5 分钟，立刻加入上述的 PBS 2ml 终止反应。2000rpm 4℃离心 5 分钟，弃上清，加入 0.5ml 冷的 PBS 悬浮细胞，流式细胞仪 FACSCalibur（BD Bioscience 公司产品）进行检测。结果证明，急性发作期的哮喘病人外周血淋巴细胞中，CKLF1 阳性细胞数和表达密度显著高于正常人（表 4，图 4）。因此可以将 FITC 标记的 CKLF1 单克隆抗体为探针，利用直接免疫荧光试验检测诸如哮喘病人外周血淋巴细胞 CKLF1 的表达水平，作为临床诊断或辅助诊断的一个标志。

表 4 流式细胞计分析 CKLF1 在哮喘病人和正常人外周血淋巴细胞表面的表达密度

	荧光密度	CKLF1 ⁺ 细胞 / 淋巴细胞 (%)
正常人 N1	93.68	11.81
N2	87.74	28.62
N3	100.05	14.38
哮喘病人 P1	630.17	39.74
P2	428.00	29.54
P3	274.63	33.2
P4	272.82	31.57

N1—N3 表示第 1—第 3 个正常人

P1—P4 表示第 1—第 4 个病人。

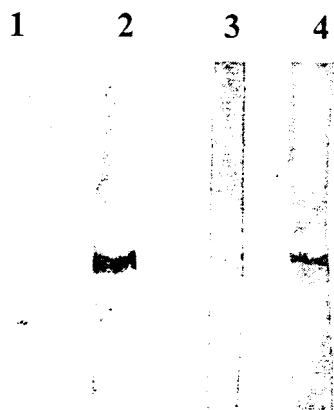


图 1

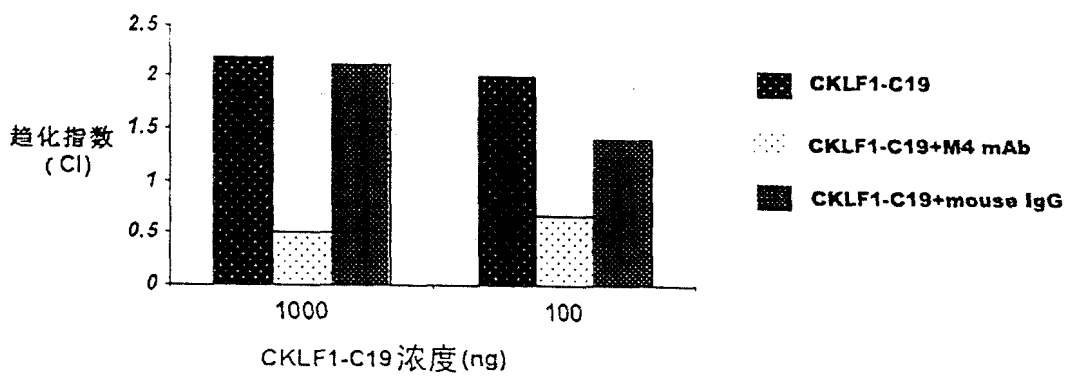


图 2A

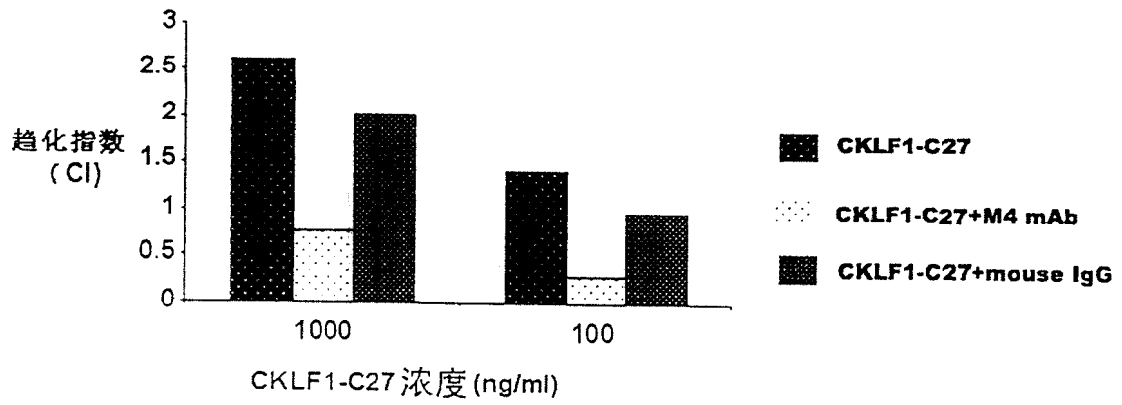


图 2B

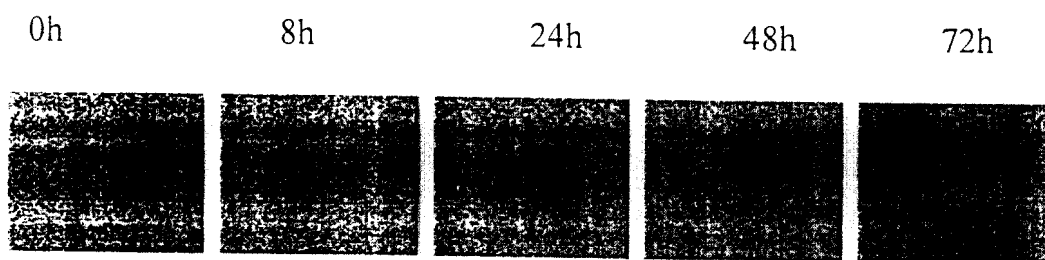


图 3

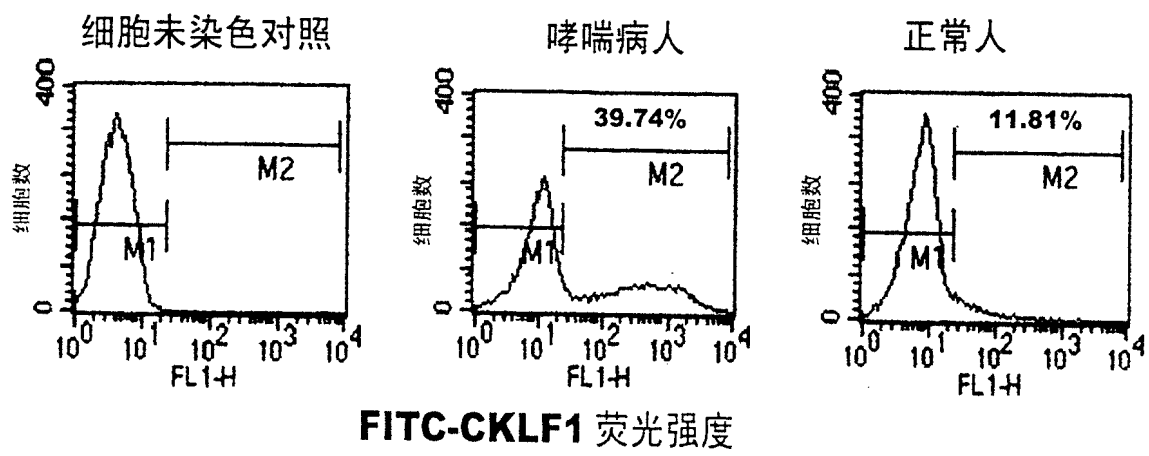


图 4

专利名称(译)	人趋化因子的单克隆抗体		
公开(公告)号	CN100386431C	公开(公告)日	2008-05-07
申请号	CN200510059716.X	申请日	2005-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	陈英玉 韩文玲 马大龙 李婷 张婷		
发明人	陈英玉 韩文玲 马大龙 李婷 张婷		
IPC分类号	C12N5/12 C07K16/18 G01N33/53		
代理人(译)	王凤华		
审查员(译)	魏聪		
其他公开文献	CN1840657A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗人CKLF1的单克隆抗体及其杂交瘤细胞系，杂交瘤细胞系的保藏号为CGMCC No.1335。本发明的单克隆抗体可以用来检测各种病变组织中的CKLF1蛋白的表达；该单克隆抗体还可作为探针，利用直接免疫荧光试验检测各种疾病如哮喘、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病外周血淋巴细胞CKLF1的表达水平，作为临床诊断或辅助诊断的一个标志。