

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610026505.0

[43] 公开日 2007年11月14日

[11] 公开号 CN 101070345A

[22] 申请日 2006.5.12

[21] 申请号 200610026505.0

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路320号

[72] 发明人 孙兵 张秀琴 田林 朱静燕
季永镛

[74] 专利代理机构 上海光华专利事务所

代理人 余明伟

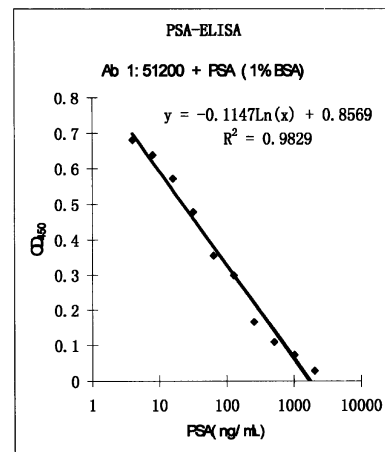
权利要求书2页 说明书19页 附图3页

[54] 发明名称

抗前列腺特异抗原 PSA 单克隆抗体及应用

[57] 摘要

本发明涉及三种抗前列腺特异抗原 PSA 的单克隆抗体及其相应的杂交瘤细胞株，保藏号分别为 CCTCC - C200620、CCTCC - C200621 和 CCTCC - C200622。本发明的单克隆抗体的 PSA 检测范围达 0 - 2048ng/mL，具有敏感、特异、制备成本低的特点。在细胞生物学、生物大分子检测和医学临床诊断等领域具有重要应用前景。



1. 抗前列腺特异抗原的单克隆抗体，分别由保藏号为 CCTCC—C200620、CCTCC—C200621 或者 CCTCC—C200622 的杂交瘤细胞系所分泌。
2. 根据权利要求 1 所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体，其特征在于，所述的抗体亚型均为 IgG1, κ。
3. 根据权利要求 1 所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体，是由下列制备方法所制备的，其步骤包括：
 - (1) 提供佐剂预处理的 Balb/c 小鼠；
 - (2) 在小鼠腹腔内接种所述的杂交瘤细胞并分泌单克隆抗体；
 - (3) 抽取腹水，即可获得单克隆抗体。
4. 根据权利要求 1 所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体，其特征在于，所述的杂交瘤细胞系的制备步骤包括：
 - (1) 人前列腺特异抗原免疫 Balb/c 小鼠；
 - (2) 分离小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞株融合；
 - (3) 加入小鼠腹腔饲养细胞与融合细胞共培养，并筛选阳性株；
 - (4) 有限稀释法克隆化筛选，即可获得单克隆抗体细胞株。
5. 分泌权利要求 1 所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的杂交瘤细胞系，其保藏号为 CCTCC—C200620、CCTCC—C200621 和 CCTCC—C200622。
6. 根据权利要求 5 所述的分泌抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的杂交瘤细胞系，其特征在于，其制备步骤包括：
 - (1) 人前列腺特异抗原免疫 Balb/c 小鼠；
 - (2) 分离小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞株融合；

- (3) 加入小鼠腹腔饲养细胞与融合细胞共培养，并筛选阳性株；
- (4) 有限稀释法克隆化筛选，即可获得单克隆抗体细胞株。
7. 权利要求 1 所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的应用，即利用 PSA 包被检测基质以竞争 ELISA 法检测 PSA。
8. 权利要求 1 所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的应用，即利用所述的单克隆抗体的双抗体夹心法 ELISA 检测 PSA，其特征在于，夹心法两两配对的抗体来源于细胞株 S-115-8 与 S-191-5，S-44-10 与 S-115-8，或者 S-44-10 与 S-191-5。
9. 根据权利要求 8 所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的应用，利用其检测前列腺特异抗原的步骤包括：
- (1) 以所述的两两配对的单克隆抗体之一包被检测基质；
- (2) 加入待测样品孵育；
- (3) 以所述的两两配对的 HRP 标记的另一单克隆抗体作为二抗，加入反应体系；
- (4) 洗涤后加入酶反应底物，以 450nm 读取 OD；
- (5) 与标准曲线对照后即可获得抗原浓度。
10. 根据权利要求 8 中所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的应用，其特征在于，抗前列腺特异抗原的有效检测范围为 0—2048ng/mL PSA。

抗前列腺特异抗原 PSA 单克隆抗体及应用

背景技术

前列腺特异抗原(prostate specific antigen , PSA) 是与前列腺癌相关的一种抗原, 属糖蛋白类物质, MW 约为 34KD, pH 为 6.8~7.5, 等电点为 6.9, 半衰期为 2.2 ± 0.8 天。PSA 存在于前列腺内质网和前列腺上皮细胞及分泌物当中, 正常前列腺及病变前列腺组织内均含有 PSA。它是公认的诊断前列腺癌的较好的肿瘤标志物, 其诊断前列腺癌的特异性为 82%-97%。前列腺癌在男性所有类型癌中占 10%~20% ,是男性最常见的癌肿。该病进展缓慢,是威胁 50 岁以上男性生命的主要癌症,在西方国家占男性死亡率的第二位。流行病学调查表明,随着我国居民生活水平的改善,环境污染的加剧以及饮食结构的改变,前列腺癌的发病率日趋上升,已引起临床上的高度重视。美国 FDA 已批准将 PSA 检测作为 50 岁以上男性的普查指标。研究显示,PSA 测定在早期诊断前列腺癌上要优于直肠指检。正常男性的 PSA 值 $< 4 \mu\text{g/L}$ 。

PSA 是 Wang 等于 1979 年首先采用免疫沉淀技术从前列腺组织中分离出来的。其主要由前列腺组织上皮细胞分泌,尿道周围腺体也分泌 PSA ,但后者很少进入血液。PSA 为单链糖蛋白,分子量为 32~34kD ,由 237 个氨基酸残基组成。编码 PSA 的 mRNA 全长为 1729bp 。PSA 为一种中性丝氨酸蛋白激酶,有酶的活性,但活性水平较低,能溶解精液中的蛋白质,在精囊包的分裂和精液的液化上发挥生理作用。PSA 能刺激前列腺癌细胞产生活性氧,该效应有浓度依赖性,PSA 浓度愈高,刺激作用愈明显,而抗 PSA 抗体可抑制 PSA 的刺激作用。Filella X 等通过体外研究证实,PSA 能明显抑制 IL - 1 β ,IL - 6 以及

TNF - α 等细胞因子的表达,提示 PSA 具有免疫调节作用。Sutkowski DM 等认为,PSA 可调节前列腺 fibromuscular 细胞生长,其机理是: PSA 降解类胰岛素生长因子结合蛋白 3 (insulin - like growth factor - binding protein - 3 , IGFBP3) ,后者被降解,类胰岛素生长因子 I (insulin - like growth factor - 1 ,IGF - 1) 从 IGF - 1 - IGFBP3 复合物中被释放,游离的 IGF - 1 有促进细胞增殖作用。PSA 基因的表达受 P53 的调控,研究表明,P53 能抑制 PSA 启动子的活性,前列腺癌患者 PSA 水平升高是前列腺组织中的 P53 的表达(或活性) 受抑制或 P53 突变的结果。黄酮类化合物能抑制前列腺癌细胞分泌 PSA。而 NF - κ B 能促进 PSA 的表达。

无论在正常或是病理状态下,进入血液循环的 PSA 都很少。PSA 在血液中以游离和结合两种形式存在。其中游离 PSA(free PSA , f - PSA) 只占小部分,结合型(complexed PSA , c - PSA) 占大部分,即与内源性蛋白酶抑制物前列腺癌 α 1 - 抗糜蛋白酶(α 1 - antichymotrysin , ACT) 结合成 PSA - ACT 复合物,以及与另一种蛋白抑制物 α 2 - 巨球蛋白(α 2 - macroglobulin , α 2M) 结合成 PSA - α 2M。在精液中,PSA 还与 C 蛋白抑制物构成复合物。由于 PSA - α 2M 不具有免疫活性,不能被现有的 PSA 检测法检测到,所以目前可定量检测到的 PSA 有 3 种: T - PSA ,F - PSA ,PSA - ACT.

前列腺特异抗原是前列腺疾病价值很高的肿瘤标志, 在临床上被广泛应用。PSA 可用在前列腺癌的诊断及分期, 还可以侦测及追踪治疗效果。PSA 虽然是前列腺组织特有的一种蛋白, 却不是前列腺癌特有的。许多前列腺的良性疾病, 包括前列腺肥大症急性或急慢性前列腺发炎都会使 PSA 上升, 而临床上怀疑有前列腺癌的病人, 或多或少也有不同程度的前列腺肥大症, 因

此如何由 PSA 区分出前列腺癌和前列腺肥大症也就格外的重要。 PSA 和肛诊是目前第一线家庭医师或泌尿科医师们筛检早期前列腺癌的重要工具。 一般来说, PSA 值随着年龄升高, 正常值也会逐渐升高, 60 到 69 岁以上的人, PSA 正常值约小于 4.5, 70 岁到 79 岁则小于 6.5, 台大医院测得最高的 PSA 值是 12,000 单位, 来自一位转移性前列腺癌之病人, 但是许多病人的 PSA 值, 比正常参考值稍高却不是很高, 如落在 6 到 10 之间, 因此到底要不要进一步作前列腺切片, 以证实得了前列腺癌, 是一个麻烦的问题, 需要进一步以其它方法验证。 PSA 的发现代表了前列腺癌研究领域上的重大进步, 也使得每年新发现前列腺癌的病例数目大为增加, 由于目前仍然没有晚期前列腺癌的根治方法, 减少前列腺癌的死亡率, 似乎唯有依赖早期发现局限于前列腺内的前列腺癌并给予适当治疗, 才能达成。

林毅等探讨了血清游离前列腺特异性抗原(F-PSA)/总前列腺特异性抗原(T-PSA)比值对前列腺癌的诊断价值。他们用 ELISA 方法测定 121 例患者血清 F-PSA、T-PSA 值,并计算 F/T 比值,评价其对前列腺癌的诊断价值;其中前列腺癌 47 例,前列腺增生 46 例,前列腺炎 10 例,前列腺癌术后患者 18 例.结果:T-PSA 在 4~10ng/mL 范围内,应用 F/T 比值可区分前列腺癌与前列腺增生 ($P < 0.005$).以 F/T 比值 0.16 为判断上限时,其诊断敏感性为 91.3%,特异性为 88.5%,诊断准确性为 89.8%,明显优于 T-PSA 和 F-PSA 单独测定结果.结论:F/T 比值可用于区别前列腺癌和前列腺增生。(李黎明, 强万明, 虞颂庭, 阎欢, 胡志东, 中国肿瘤临床 2003 年 4 期)

血前列腺特异抗原浓度升高是提示前列腺癌的敏感监测指标;但不能作为确诊指标。由于前列腺癌不是造成血前列腺特异抗原浓度升高的唯一原因;

良性前列腺增生以及感染或人为因素引起血前列腺特异抗原浓度升高。在前列腺特异抗原测定的基础上，进一步细化；以提高前列腺特异抗原对前列腺癌诊断精确度引入以下概念，为临床工作提供数据鉴别：**f PSA/t PSA**：前列腺特异抗原（"PSA"）有总前列腺特异抗原（"tPSA"）、结合前列腺特异抗原（"cPSA"）、游离前列腺特异抗原（"fPSA"）之分， $tPSA = cPSA + fPSA$ ；**f PSA/t PSA** 比值对于鉴别前列腺癌与良性前列腺增生比 **tPSA** 精确。前列腺特异抗原密度（"PSAD"）：即，血前列腺特异抗原浓度除以前列腺体积。由于良性前列腺增生是前列腺实质细胞数量增多而造成前列腺体积的增大，常会引起不同程度的血前列腺特异抗原（"PSA"）浓度升高。有助前列腺癌相与良性前列腺增生症鉴别由于前列腺特异抗原（"PSA"）测试药盒产自多家；**t PSA**，尤其是 **f PSA/t PSA**、**PSAD** 的正常值以测试实验室提供数据为准。前列腺癌者血中 **PSA** 显著升高，**PSA** 的均值与临床分期成比例且有学者认为与肿瘤体积成比例。血清 **PSA** 水平可以观察前列腺癌的治疗效果，前列腺根除术后，如无残留的前列腺组织，就不会再有 **PSA** 释放入血。因 **PSA** 在血清中的半衰期为 2.2 天，所以术后血中 **PSA** 水平就会降到测定低限以下，因此，**PSA** 是了解根治性前列腺切除术后是否仍存在病变或复发的一种敏感标志物。**Buamah** 氏等比较了 **PSA** 与前列腺酸性磷酸酶（**PAP**）对前列腺癌的诊断；在非转移前列腺癌，前者阳性率达 70%，而后者仅为 30%；在转移性前列腺癌，前者灵敏度为 100%，而后者仅 62%，**PSA** 显然比 **PAP** 更灵敏。目前临床上诊断前列腺癌的手段多为指诊、**B** 超和 **PAP** 测定，灵敏度较低。而 **PSA** 为该病的早期诊断、病理分期及疗效观察提供了新的手段，是一种特异、灵敏的肿瘤标志物。前列腺肥大者血中 **PSA** 可升高但幅度有限。男性 0~4.0

$\mu\text{g/L}$; 女性 0 (酶联免疫法)。

PSA 通常用免疫学方法进行测定。国际上强调,在建立总 PSA 检测方法时,必须采用等克分子(equi - molar),与 PSA- ACT 和 f - PSA 反应的多克隆抗体不是等克分子,一般不能用。常用检测方法有:(1) 化学发光免疫定量检测,本法采用全自动控制系统,以吡啶酯标记法,微磁性颗粒 PSA 结合的固相试剂和单抗 PSA 液相试剂,直接发光进行定量检测的技术;(2) 酶标测定法(EIA);(3) 放射免疫分析(RIA);(4) 免疫放射分析(IRMA);(5) 金标记分析,该法具有使用方便,结果易读,反应迅速,准确可靠等特点,是当前国际上最简便理想的诊断方法。适合于各级医院和医疗保健机构对可疑前列腺疾患病人进行 PSA 检测和高危人群进行健康普查。

美国海布里特克有限公司在中国申请了利用样品中非复合形式的前列腺特异抗原以改进前列腺癌检测的方法。目前市场上较为成熟的有酶免定量检测试剂盒(美国)、利用胶体金标记的前列腺癌简易测试板、甄别前列腺癌与前列腺增生试纸、EIA(产地瑞典)、RIA-CT(法国)等。进入中国市场的国外公司及产品主要是 CanAg Free PSA EIA 试剂盒、CanAg PSA EIA 试剂盒、美国 ENE 公司出品的游离前列腺特异性抗原(f-PSA)酶免定量检测试剂盒。除了国内的一些代理公司拥有一些进口的试剂盒之外,中国只有上海科华生物工程股份有限公司研制开发的总一前列腺特异抗原(PSA)酶免定量检测试剂盒,及游离一前列腺特异抗原(Free-PSA)酶免定量检测试剂盒,日前通过国家药品监督管理局审查,获得了国家药监局颁发的《新药证书及生产批件》,但没有查到相关专利信息。中国专利中相关的发明有三个:由昆明云大生物技术公司的马岚发明的一种人体全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值的检测方法以及甄别前列腺癌与前列腺增生试纸,中国专利 CN01129175.3; 以及一种人体全血或血清总 PSA 值、总 PSA 灰区值检测方

法及前列腺癌检测试纸，中国专利 CN01129174.5，两个专利中所利用的单克隆抗体为自产（昆明云大生物技术公司）或购买（如美国 Sigma 公司等）的两种不同检测为点的抗 PSA 单克隆抗体，但在其专利公开说明书中并没有对这两个单抗进行任何详细说明和性质定义。而由北京的 王泽、王天健所申请的利用竞争法建立的一种前列腺癌简易测试板，中国专利 CN03245585.2，其中所使用的抗体，也没有进行说明和性质定义。

市售的 PSA 产品检测范围有 4ug/L、10ug/L(昆明云大生物技术有限公司)，以及 0.1-30ug/L(如 CanAg Free PSA EIA)、0.1-60ug/L(如 CanAg PSA EIA)，前者对于前列腺疾病性质的判断而言，而对于定量的检测 PSA 的含量却是远远不够的，后者的进口产品价格昂贵，不适合于临床的大规模筛查。

据 European Patent Office 公布，专利号为 WO9810292 的一系列单克隆抗体已经被 CENTOCOR INC (US); HEAVNER GEORGE A (US) 所开发应用；而专利号为 CA2128285 发明了特异抗游离 P S A 的单克隆抗体小鼠骨髓瘤细胞株。但是，中国目前没有上述专利的同族专利。

综上所述，现有技术中涉及到 PSA 单抗的方法和检测形式虽然各有不同，但是这些方法所使用的抗游离 PSA 或者总 PSA 的单克隆抗体均没有相关信息和专利。而众所周知的是，特异性抗 PSA 的单克隆抗体在各种免疫检测方法中是关键的物质基础。因此，通过筛选获得具有针对不同表位的鼠源单克隆抗体，以制备和开发特异、灵敏、低成本的诊断产品以及相关方法是必须的。

发明内容

所要解决的技术问题

本发明需要解决的技术问题是提供一类抗前列腺特异抗原 PSA 单克隆抗体及应用，以克服现有同类的单克隆抗体所进行的 PSA 检测灵敏度不够或者

价格昂贵，不适合于临床大规模应用的缺陷。

技术方案

本发明的内容之一是提供三种抗前列腺特异抗原的单克隆抗体，分别由保藏号为 CCTCC—C200620、CCTCC—C200621 或者 CCTCC—C200622 的杂交瘤细胞系所分泌。上述保藏号分别对应于 S-44-10、S-115-8、S-191-5 这三株细胞株，保藏于中国典型培养物保藏中心：

杂交瘤细胞系 S-115-8，保藏编号为：CCTCC—C200620；

杂交瘤细胞系 S-191-5，保藏编号为：CCTCC—C200621；

杂交瘤细胞系 S-44-10，保藏编号为：CCTCC—C200622。

上述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的抗体亚型均为 IgG1，κ。

上述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体，是由下列制备方法所制备的，其步骤包括：

- (1) 提供佐剂预处理的 Balb/c 小鼠；
- (2) 在小鼠腹腔内接种所述的杂交瘤细胞并分泌单克隆抗体；
- (3) 抽取腹水，即可获得单克隆抗体。

本发明进一步揭示所述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的来源，即所述的杂交瘤细胞系的制备步骤包括：

- (1) 人前列腺特异抗原免疫 Balb/c 小鼠；
- (2) 分离小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞株融合；
- (3) 加入小鼠腹腔饲养细胞与融合细胞共培养，并筛选阳性株；
- (4) 有限稀释法克隆化筛选，即可获得单克隆抗体细胞株。

本发明的内容之一是提供上述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的应用，即利用 PSA 包被检测基质以竞争 ELISA 法检测 PSA。本领域的普通技术人员无需特别的实验即可理解，所述的竞争 ELISA 法检测是指竞争酶联免疫分析，即利用 S-44-10、S-115-8、S-191-5 这三株细胞株之一所产生的单克隆抗体抓捕溶液中的 PSA，而未被溶液中 PSA 结合的单克隆抗体就会被包被在 ELISA 板上的 PSA 捕获，然后加入标记的抗鼠单克隆抗体作为二抗检测固化的单克隆抗体，最后读取波长为 450nm 的 OD 值。按照该方法，只要对照浓度标准曲线就可以得出待测样品中的 PSA 含量。其检测前列腺特异抗原的步骤包括：

- (1) 以 5ng/ml 的浓度包被 PSA；
- (2) 一系列浓度梯度的 PSA、待测样品，和一定稀释度的所述的单克隆抗体之一进行温育，37 摄氏度共温育一个小时；
- (3) 在包被板上加入待测的共温育过的样品，37 摄氏度孵育两个小时；
- (4) 加入 HRP 标记的抗鼠抗体作为二抗，37 摄氏度孵育一个小时；
- (5) 洗涤后加入酶反应底物，以 450nm 读取 OD；
- (6) 与标准曲线对照后即可获得抗原浓度。

上述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的应用之二是，利用所述的单克隆抗体的双抗体夹心法 ELISA 检测 PSA，其特征在于，夹心法两两配对的抗体来源于细胞株 S-115-8 与 S-191-5，S-44-10 与 S-115-8，或者 S-44-10 与 S-191-5。其检测前列腺特异抗原的步骤包括：

- (7) 以所述的两两配对的单克隆抗体之一包被检测基质；
- (8) 加入待测样品孵育；
- (9) 以所述的两两配对的 HRP 标记了的另一单克隆抗体作为二抗，加入反应体系；
- (10) 洗涤后加入酶反应底物，以 450nm 读取 OD；
- (11) 与标准曲线对照后即可获得抗原浓度。

这些步骤并不是一成不变的，本领域的普通技术人员可以根据实际情况进行合理的修改使之符合应用要求。比如在合适的过程中增加洗涤的步骤以降低检测结果的本底等等。

在上述的抗前列腺特异抗原的单克隆抗体的应用中，抗前列腺特异抗原的有效检测范围为 0—2048ng/mL PSA。

有益效果

- 1、与目前市面上的试剂盒的监测范围相比，本发明的单克隆抗体有着更为宽广而敏感的检测范围：0-2048ng/mL，而市售的产品检测范围有 4ug/L、10ug/L(昆明云大生物技术有限公司),以及 0.1-30ug/L (如 CanAg Free PSA EIA)、0.1-60ug/L (如 CanAg PSA EIA)，这为开发检测试剂盒奠定了坚实的基础。
- 2、本发明的五株抗体具有良好的抗体特性，同时囊括了三个抗原决定簇，并且与目前诊断试剂盒中的诊断范围相比（总 PSA 正常值为 0-4ng/mL，而一旦超过了 4 ng/mL，就必须进行进一步的检测以确定是否患有前列腺癌症或者炎症），所提供的 S-102-11 具有更为广泛而

敏感的检测范围。

- 3、本发明利用人 PSA 免疫小鼠制备的系列单克隆抗体细胞株，为低成本的大规模临床 PSA 筛查提供了可能。

附图说明

图 1 是 PSA 抗原竞争性 ELISA 检测结果。Ab 1:51200; PSA 稀释在 1%BSA 中。

图 2 是 PSA 抗原竞争性 ELISA 检测结果。Ab 1:51200; PSA 稀释在正常人血清中。

图 3 是 PSA 包被浓度摸索曲线。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

下列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。所有无机化学试剂和有机溶剂购自上海化学试剂厂和 Sigma 公司。

实施例 1

动物免疫

选择与所用骨髓瘤细胞同源的 BALB/c 健康小鼠，鼠龄在 8~12 周，雌雄不限。抗原为人的游离 PSA (Biocheck, INC. CAT# 4001)。抗原原液浓度：1.84mg/mL，Balb/c 小鼠免疫剂量：100 μ g PSA 每只每次。注射方式为肌肉多点注射。使用时用 PBS 或生理盐水稀释。免疫程序：0, 3, 6 周三次免疫。融合前三天取 100 μ g 加 PBS 稀释至 0.5mL 腹腔注射，做回忆刺激。末次免疫 3 天后，分离脾细胞融合。

表 1 第三次用 PSA 免疫之后小鼠血清中的抗体滴度

第三次免疫 PSA 后 ELISA 检测小鼠血清中的抗体滴度	
小鼠	抗体滴度
#1	256,000
#2	128,000
#3	128,000
正常小鼠 (阴性对照)	<1,000

实施例 2

杂交瘤细胞株的构建及单克隆抗体的制备

1. 骨髓瘤细胞株的培养

选择瘤细胞株的最重要的一点是与待融合的 B 细胞同源。如待融合的是脾细胞，各种骨髓瘤细胞株均可应用，我们采用的是 SP2/0 细胞株。该细胞株生长及融合效率均佳，此外，该细胞株本身不分泌任何免疫球蛋白重链或轻链。细胞的最高生长刻度为 9×10^5 /mL，倍增时间通常为 10~15h。融合细胞选择在处于对数生长期、细胞形态和活性佳的细胞（活性大于 95%）。骨

髓瘤细胞株在融合前应先用含 8-氮鸟嘌呤的培养基作适应培养，在细胞融合的前一天用新鲜培养基调细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ ，次日一般即为对数生长期细胞。

2. 饲养细胞的制备

在体外培养条件下，细胞的生长依赖适当的细胞密度，因而，在培养融合细胞或细胞克隆化培养时，还需加入其他饲养细胞（feeder cell）。我们所有的饲养细胞为小鼠的腹腔细胞，制备方法为用冷冻培养液注入小鼠腹腔，轻揉腹部数次，吸出后的液体中即含小鼠腹腔细胞，其中有巨噬细胞和其他细胞。

饲养细胞调至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ，提前一天置板孔中培养。

3. 细胞融合

回忆刺激后三天做融合。

细胞融合是杂交瘤技术的中心环节，基本步骤是将两种细胞混合后加入 PEG 使细胞彼此融合。其后把培养液稀释 PEG，消除 PEG 的作用。将融合后的细胞适当稀释，分置培养板孔中培养。骨髓瘤细胞与脾细胞的比值可从 1:2 到 1:10 不等，我们用 1:4 的比例，保证了两种细胞在融合前都具有较高活性。

4. 有限稀释法

筛选阳性株选用的骨髓瘤细胞为 HAT 敏感细胞株，所以只有融合的细胞才能持续存活一周以上。融合细胞呈克隆生长，经有限稀释后（一般稀释至 0.8 个细胞/孔），按 Poisson 法计算，应有 36% 的孔为 1 个细胞/孔。细胞培养至覆盖 0%~20% 孔底时，吸取培养上清用 ELISA 检测抗体分泌量，所用

筛选用免疫所用抗原。首先把抗体的分泌含量按照 $OD_{450} > 1$ 划分为阳性和阴性孔，对阳性孔进行克隆化；连续三次克隆化均为 100%阳性的克隆，再选做扩大培养或冻存。

经过三次有限稀释法克隆化筛选得到五株抗体，分别命名为：S-44-10、S-102-11、S-115-8、S-191-5 和 S-212-9。其中 S-44-10、S-102-11 为脾细胞(来源于之前所免疫的 BALB/c 小鼠)和来自上海第二医科大学的 SP2/0 骨髓瘤细胞融合而成，S-115-8、S-191-5、S-212-9 为脾细胞和来自苏州医学院的 SP2/0 骨髓瘤细胞株融合而成。经亚型鉴定，S-102-11 为 IgG2a、k 型，S-44-10、S-115-8、S-191-5 和 S-212-9 均为 IgG1、k 型（亚型检测采用 BIO-RAD 公司小鼠亚型检测试剂盒 Catalog No.172-2055）。

5. 单克隆抗体的大量制备

取 Balb/c 小鼠，首先腹腔注射 0.5mL 液体石蜡或降植烷进行预处理。1-2 周后，腹腔内接种杂交瘤细胞。杂交瘤细胞在小鼠腹腔内增殖，并产生和分泌单克隆抗体。约 1-2 周，可见小鼠腹部膨大。用注射器抽取腹水，即可获得大量单克隆抗体。S-44-10、S-102-11 和 S-212-9 三株抗体分别按该体内诱生法制备腹水。腹水效价通过间接 ELISA 检测均为 1: 1024000。

表 2 构建 5 株抗 PSA 单克隆抗体

抗 PSA 杂交瘤细胞的构建		
融合方式	融合率	抗体阳性率
从免疫了 PSA 的 BALB/C 小鼠中取出的脾脏细胞， 与 SP2/0 融合	99.8%	67.4%

表3 抗PSA杂交瘤细胞的克隆

抗PSA抗体克隆号 S-44-10			
克隆次数	克隆率	抗体阳性率	克隆之前的抗体滴度(OD450)
1st	33.3%	100%	2.577
2nd	37.5%	100%	1.594
3rd	37.5%	100%	2.235[1.502*]
抗PSA抗体克隆号 S-102-11			
克隆次数	克隆率	抗体阳性率	克隆之前的抗体滴度(OD450)
1st	33.3%	100%	2.725
2nd	37.5%	100%	2.675
3rd	37.5%	100%	2.415[1.847*]
抗PSA抗体克隆号 S-115-8			
克隆次数	克隆率	抗体阳性率	克隆之前的抗体滴度(OD450)
1st	33.3%	100%	2.561
2nd	35.4%	100%	2.399
3rd	33.3%	100%	2.449[2.187*]
抗PSA抗体克隆号 S-191-5			
克隆次数	克隆率	抗体阳性率	克隆之前的抗体滴度(OD450)
1st	35.4%	100%	1.267
2nd	35.4%	100%	1.730
3rd	33.3%	100%	1.929[1.073*]
抗PSA抗体克隆号 S-212-9			
克隆次数	克隆率	抗体阳性率	克隆之前的抗体滴度(OD450)

1st	31.3%	100%	2.577
2nd	31.3%	100%	1.730
3rd	35.4%	100%	2.345[1.666*]

* 杂交瘤细胞增殖之前的 ELISA 结果

五株单克隆抗体的特性测定

表 4 抗 PSA 的单克隆抗体特性

抗 PSA 单克隆抗体的细胞培养上清*滴度测定和抗体亚型测定		
克隆号	抗体滴度 (OD450 ± SD)	抗体亚型**
S-44-10	2.350 ± 0.079	IgG1, κ
S-102-11	2.612 ± 0.011	IgG2a, κ
S-115-8	2.542 ± 0.237	IgG1, κ
S-191-5	2.332 ± 0.081	IgG1, κ
S-212-9	2.397 ± 0.088	IgG1, κ

* 细胞上清为 1×10^6 杂交瘤细胞在 9mL 培养基中培养三天。

** ELISA 结果。

表 5 ELISA 检测抗 PSA 单抗的腹水效价

ELISA*检测抗 PSA 单抗的腹水效价	
克隆号	抗体稀释倍数**
S-44-10	1,024,000
S-102-11	1,024,000
S-212-9	1,024,000

* ELISA 抗原包被浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 的 PSA。

** 腹水稀释度的倒数，腹水第一次稀释度数为 1:1,000。

实施例 3

单克隆抗体的应用

1. 抗原包被量饱和曲线

用细胞上清（稀释一倍）作为检测样品，包被的抗原量从 0.125 到 4g/mL 变化，一抗为各个克隆株的细胞上清，稀释一倍，二抗用羊抗鼠-HRP 检测。通过曲线斜率可看出抗原包被在 2 μ g/mL 时，上清中的抗体就开始过量了。而在 0.125 μ g/mL 到 1 μ g/mL 区间，曲线的斜率比较高，说明抗原包被在该区间较为敏感，故我们选择后续的抗原包被浓度为 0.5 μ g/mL。

PSA 包被浓度摸索曲线如图 3 所示。

2. 抗体竞争性 ELISA 实验决定五株细胞株是否由一个抗原决定簇决定

抗原包被浓度为 0.5 μ g/mL，一抗为各个细胞株的细胞上清组合（50ul/孔，所以终浓度为稀释一倍的血清），二抗用羊抗鼠-HRP 检测。通过实验结果可以得知，S-44-10 与 S-115-8，S-44-10 与 S-191-5，S-115-8 与 S-191-5 三对分别由不同的抗原决定簇决定，而 S-115-8 与 S-212-9 基本上由同一抗原决定簇决定，其他组合抗原决定簇均有相当部分的重合，但并不相同。

表 6 抗体竞争性 ELISA 细胞上清组合表

1 + 1	2 + 1	3 + 1	4 + 1	5 + 1
1 + 2	2 + 2	3 + 2	4 + 2	5 + 2
1 + 3	2 + 3	3 + 3	4 + 3	5 + 3
1 + 4	2 + 4	3 + 4	4 + 4	5 + 4
1 + 5	2 + 5	3 + 5	4 + 5	5 + 5

说明：为方便书写，以上编号分别代表了：1=S-44-10，2=S-102-11，3=

S-115-8, 4=S-191-5, 5=S-212-9。表 7 同。

表 7 抗体竞争性 ELISA 结果比较

细胞株编号组合	OD450	OD450	OD450 平均值	A. I.
1			0.242	
2			0.967	
3			1.415	
4			0.3465	
5			1.0815	
1+2	0.857	0.862	0.8595	0.421836
1+3	1.603	1.724	1.6635	1.007846
1+4	0.505	0.634	0.5695	0.935429
1+5	0.891	0.912	0.9015	0.362297
2+3	1.595	1.549	1.572	0.319899
2+4	0.969	1.052	1.0105	0.538637
2+5	1.313	1.388	1.3505	0.318526
3+4	1.517	1.523	1.52	0.725802
3+5	1.5	1.421	1.4605	0.170038
4+5	0.951	0.993	0.972	0.361345

注：A. I. 代表了两个抗体的叠加效果，计算公式为： $A. I. = 2 * A1 + 2 / (A1 + A2) - 1$ ，如果两个抗体分别独立由不同的抗原决定簇决定，那么该 A. I. 将接近 1；如果两个抗体自由的被同一个抗原决定簇结合，那么该 A. I. 将接近 0；如果 A. I. 数值在 0.5 左右，说明两个抗体的抗原决定簇有相应的重叠（Bertrand Friguet, Journal of Immunological Methods, 30(1983)351-358）。

结论：

从 A. I. 来看, 1 与 3 由两个完全独立的抗原决定簇决定, 1 与 4 也由两个自由的抗原决定簇决定, 而 3 与 4 的 A. I. 数值并不是很高, 但是仍然可以看出, 3 与 4 的抗原决定簇大部分是不同的。

从 A. I. 来看, 排除各个数值之间的差异, 3 与 5 基本上是由同一个抗原决定簇决定。

而其他 A. I. 均在 0.3-0.4 左右, 这也说明, 不同 A. I. 对应的不同抗体之间的抗原决定簇有很大部分是重叠的。

总结以上结果, 在利用抗体夹心 ELISA 检测游离 PSA 时, 可有三组配对, 分别是 1 与 3、1 与 4、3 与 4, 也就是 S-44-10 与 S-115-8, S-44-10 与 S-191-5, S-115-8 与 S-191-5, 分别组成 ELISA 检测试剂盒。

实施例 4

双抗体夹心 ELISA 法检测前列腺特异抗原

以所述的两两配对的单克隆抗体之一包被检测基质, 比如包被 S-115-8 号抗体, 浓度为 10 μ g/mL, 4 摄氏度过夜; 洗涤后用稀释液封闭, 37 摄氏度温育 2 小时; 充分洗涤之后, 加入待测样品 (包括 0-2048ng/mL 一系列浓度梯度的标准 PSA) 孵育; 以所述的两两配对的另一单克隆抗体 (HRP 标记的 S-191-5 号抗体) 作为二抗, 加入反应体系; 37 摄氏度孵育两个小时; 洗涤后, 加入标记的羊抗鼠二抗检测标记物; 最后与标准曲线对照后即可获得抗原浓度。

样品稀释液为 1%BSA, 或者为 AB 血型的正常人血清。检测结果可见该双抗体夹心法 ELISA 在 0-2048ng/mL 范围内, OD450 读数与被检测的 PSA

浓度具有良好的线性关系。该方法可以有效的利用三对不同抗原决定簇决定的单克隆抗体检测 PSA 的含量。

实施例 5

抗原竞争性 ELISA 实验检验细胞株的检测抗原量的范围

抗原包被浓度为 $5\mu\text{g/mL}$ ，一抗为 S-102-11 细胞株与各个不同浓度的 F-PSA 组合，二抗用羊抗鼠-HRP 检测。其中 S-102-11 细胞株为用硫酸铵沉淀纯化后的腹水，稀释倍数为 1: 512000 (同样方法显示 1: 256000 也可以)。稀释液为 1%BSA，或者为 AB 血型的正常人血清。结果均显示了抗体在 0-2048ng/mL PSA 范围内，OD450 读数与被检测的 PSA 浓度具有良好的线性关系。而根据抗原决定簇实验，S-102-11 与 S-44-10、S-115-8、S-191-5 的决定簇分别都有大部分的重合，故我们选取 S-44-10、S-115-8、S-191-5 这三株分别由各自独立抗原决定簇所决定的抗体细胞株保藏于中国典型培养物保藏中心。

抗原竞争性 ELISA 实验见图 1 和图 2 所示。

结论：无论是在实验的环境下 (1%BSA) 还是在模拟的自然情况下 (稀释在正常人血清中)，OD450 与 Ln (PSA 含量) 之间有着很好的线性关系， R^2 均大于 0.95。因此，0—2048ng/mL 是抗体的有效检测范围。

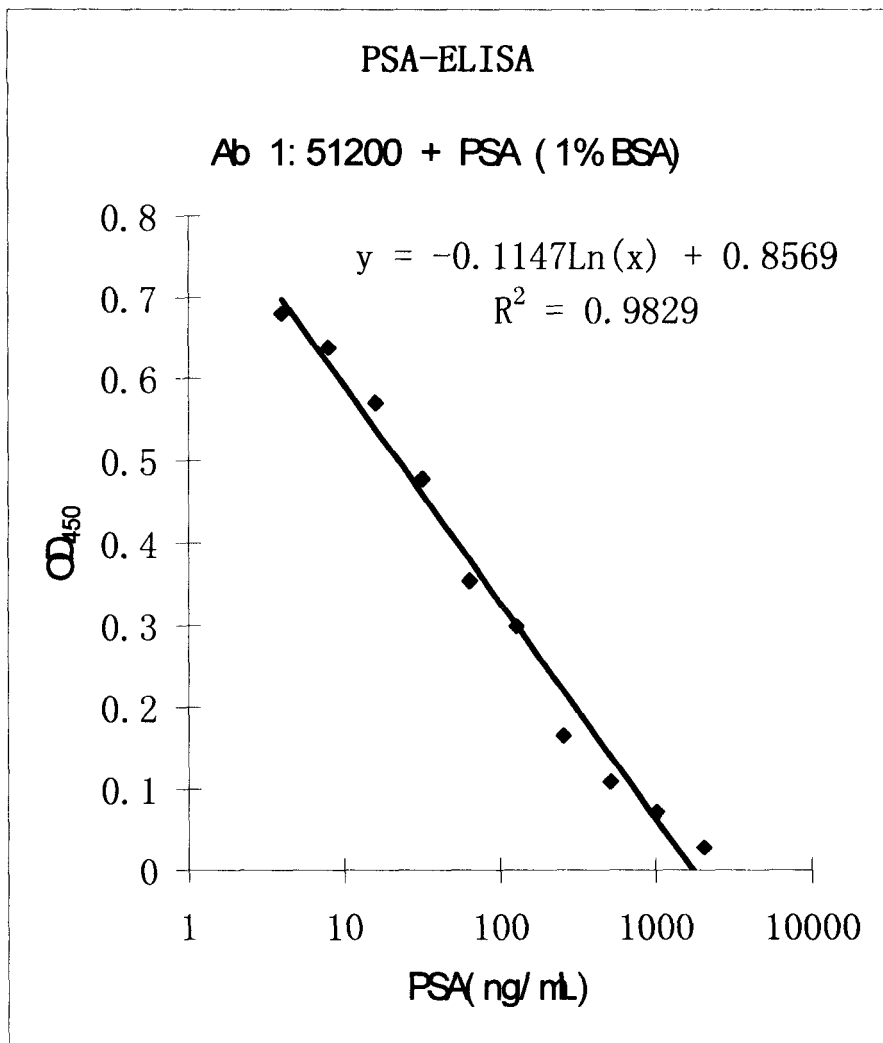


图 1

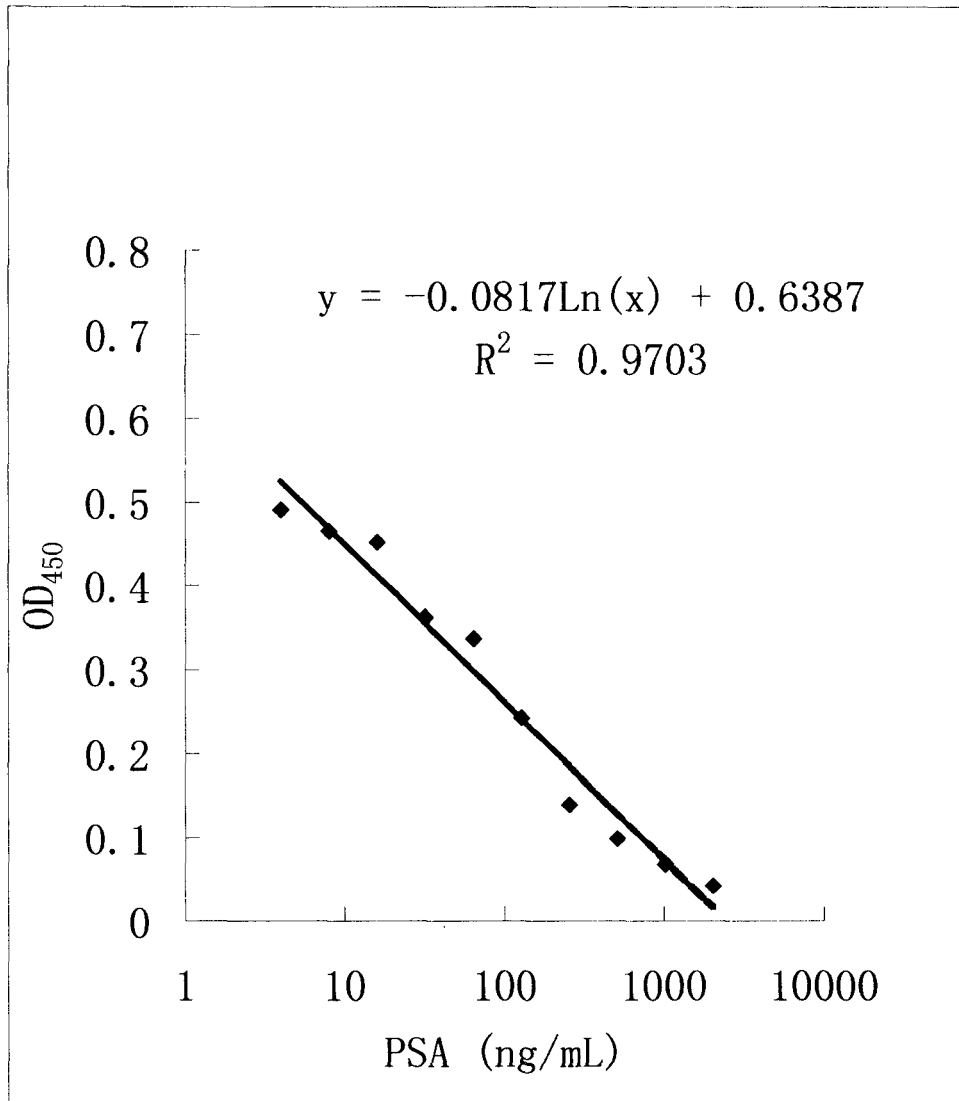


图 2

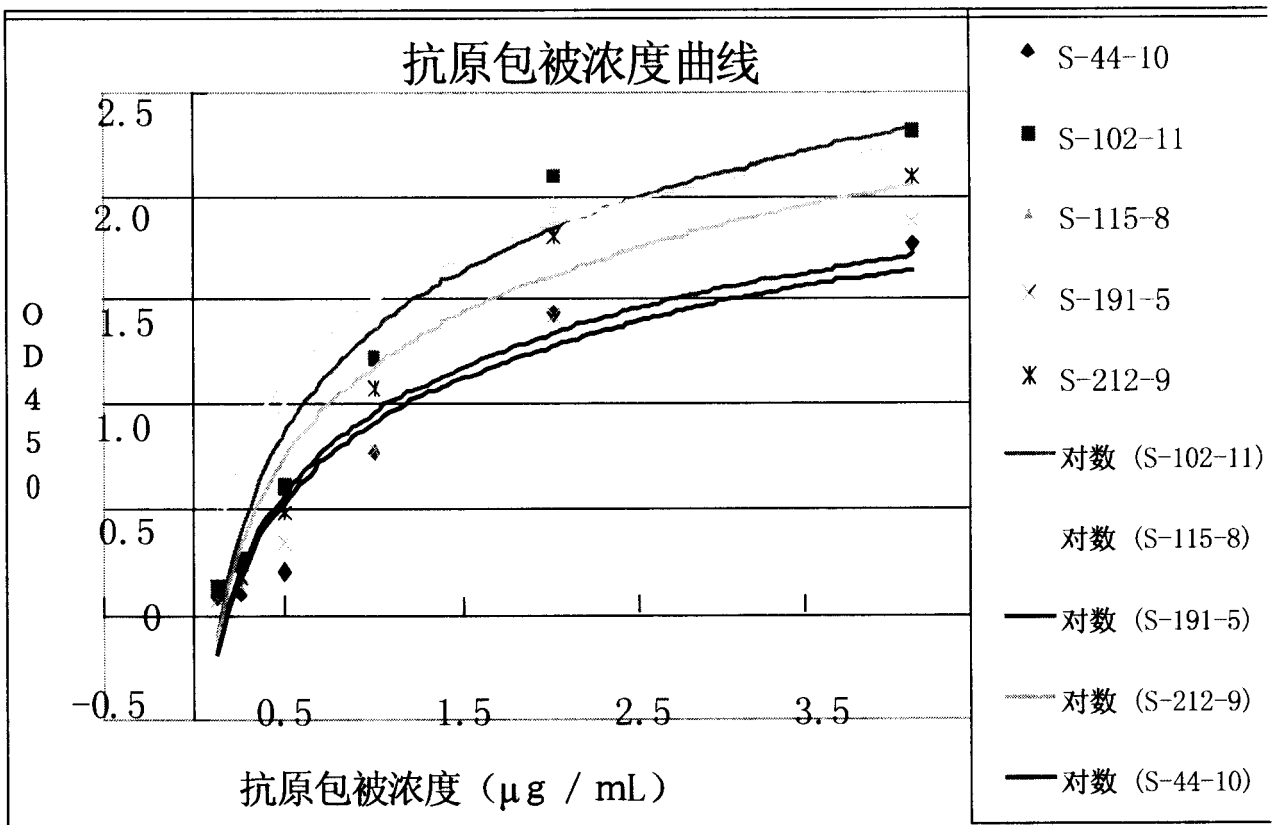


图 3

专利名称(译)	抗前列腺特异抗原PSA单克隆抗体及应用		
公开(公告)号	CN101070345A	公开(公告)日	2007-11-14
申请号	CN200610026505.0	申请日	2006-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	孙兵 张秀琴 田林 朱静燕 季永镛		
发明人	孙兵 张秀琴 田林 朱静燕 季永镛		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/574		
代理人(译)	余明伟		
其他公开文献	CN101070345B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及三种抗前列腺特异抗原PSA的单克隆抗体及其相应的杂交瘤细胞株，保藏号分别为CCTCC - C200620、CCTCC - C200621和CCTCC - C200622。本发明的单克隆抗体的PSA检测范围达0 - 2048ng/mL，具有敏感、特异、制备成本低的特点。在细胞生物学、生物大分子检测和医学临床诊断等领域具有重要应用前景。

