

[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 200710055758.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月5日

[11] 公开号 CN 101135686A

[22] 申请日 2007.6.13

[21] 申请号 200710055758.5

[71] 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前卫路10号

[72] 发明人 马忠森 王秀丽 郑永晨 吴春风  
杨洋 吴艳峰 尹金植 杨俊玲  
任锦 安继红 赫国志

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限责任  
公司

代理人 陈宏伟

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

[54] 发明名称

检测诱骗受体3的双抗体夹心ELISA方法

[57] 摘要

本发明公开一种检测诱骗受体3的双抗体夹心ELISA方法。构建DcR3基因，表达纯化DcR3蛋白并进行鉴定，以高纯度的His-DcR3融合蛋白为免疫原，制备并纯化抗人DcR3多克隆抗体及单克隆抗体，以抗人DcR3多克隆抗体为捕获抗体，以生物素化的抗人DcR3单克隆抗体为检测抗体，建立检测DcR3多抗和单抗双抗体夹心ELISA方法，以抗DcR3多克隆抗体为捕获抗体可以捕获更多抗原，因此具有更好的灵敏度，为肿瘤及自身免疫疾病等DcR3相关疾病的诊断、疗效观察及预后判断提供一种简便、经济的检测方法，为研究DcR3蛋白功能及其在组织细胞表达分布等奠定基础。

1、一种检测诱骗受体 3 的双抗体夹心 ELISA 方法，其特征在于：

以纯化的多克隆抗体为捕捉抗体，以生物素化的单克隆抗体为检测抗体，建立检测可溶性 DcR3 含量的双抗体夹心 ELISA 法。

2、诱骗受体 3 基因的构建及蛋白制备工艺，其特征在于：

应用重叠 PCR 方法获得 DcR3 基因，构建的 pET28a(+)/DcR3 重组表达质粒转化入大肠杆菌 BL21 菌株，IPTG 诱导表达 His-DcR3 融合蛋白，镍柱亲和层析纯化目的蛋白，SDS-PAGE 及 Western blot 分析表达产物。

3、抗人诱骗受体 3 单克隆抗体的制备工艺，包括以下步骤：

采用纯化的 His-DcR3 融合蛋白免疫 BALB/c 鼠，共腹腔免疫四次，待小鼠血清抗体达理想效价时，取免疫的小鼠脾脏淋巴细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞在 PEG4000 作用下进行融合，以 HAT 培养基选择培养，间接 ELISA 法筛选阳性孔，将有限稀释法克隆后的杂交瘤细胞接种入小鼠腹腔产生腹水，收集的腹水经过预处理后采用辛酸-饱和硫酸铵沉淀法、ProteinA 亲和层析法进行纯化，制备单克隆抗体。

4、抗人诱骗受体 3 多克隆抗体的制备工艺，其特征在于：

采用高纯度的 His-DcR3 融合蛋白免疫家兔，制备并纯化兔血清，制备多克隆抗体。

## 检测诱骗受体 3 的双抗体夹心 ELISA 方法

### 技术领域

本发明公开一种检测诱骗受体 3 的双抗体夹心 ELISA 方法，用于恶性肿瘤及自身免疫疾病等 DcR3 相关疾病的临床辅助诊断，属于生物基因工程及疾病检测诊断试剂方法技术领域。

### 背景技术

诱骗受体 3 (decoy receptor 3, DcR3, 又称 TR6) 为近年新发现的一种可溶性肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族成员，可与 Fas、HVEM、DR3 竞争性结合其相应配体 FasL、LIGHT 及 TL1A (Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer[J]. Nature, 1998, 396(6712):699-703; Yu KY, Kwon B, Ni J, et al. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis[J]. J Biol Chem, 1999, 274(20):13733-13736; Migone TS, Zhang J, Luo X, TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator[J]. Immunity. 2002;16(3):479-92)，但并不介导细胞凋亡，在细胞的生长、分化、死亡以及免疫调节等方面发挥重要作用，与肿瘤、自身免疫疾病、移植排斥等密切相关。研究表明 DcR3 在恶性肿瘤如肺癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、结肠腺癌、EBV 相关淋巴瘤、神经胶质瘤组织以及自身免疫病如系统性红斑狼疮、矽肺、进行性系统性硬化病的外周血单个核细胞中存在高表达，而在正常组织不表达或低表达，因而，DcR3 有望作为一种新的标志物用于恶性肿瘤和自身免疫病的临床辅助诊断。DcR3 属分泌性蛋白，有研究表明肝癌、胃癌等血清中 DcR3 表达水平与肿块大小、分期及浸润、转移等相关，肿瘤切除治疗后，DcR3 水平急剧下降，经过随访，发现与 DcR3 表达正常的胃癌患者相比，DcR3 高表达的患者生存期明显缩短 (Takahama Y, Yamada Y, Emoto K, et al. The prognostic significance of overexpression of the decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in patients with gastric carcinomas[J]. Gastric Cancer, 2002, 5(2):61-68)，因此，术后检测血清 DcR3 水平有助于观察肿瘤是否切除完全或有无复发及预后判断。

## 发明内容

本发明公开一种检测诱骗受体 3 的双抗体夹心 ELISA 方法，用于恶性肿瘤及自身免疫疾病等 DcR3 相关疾病的临床辅助诊断。

本发明还提供了一种诱骗受体 3 基因的构建及蛋白制备工艺。

本发明还提供了一种检测诱骗受体 3 的单克隆和多克隆抗体的制备工艺，适用于工业化生产。

本发明的技术解决方案如下：

以纯化的多克隆抗体为捕捉抗体，以生物素化的单克隆抗体为检测抗体，建立检测可溶性 DcR3 含量的双抗体夹心 ELISA 法。

应用重叠 PCR 方法获得 DcR3 基因，构建的 pET28a(+)/DcR3 重组表达质粒转化入大肠杆菌 BL21 菌株，IPTG 诱导表达 His-DcR3 融合蛋白，镍柱亲和层析纯化目的蛋白，SDS-PAGE 及 Western blot 分析表达产物。

构建 DcR3 基因，表达并纯化 DcR3 蛋白，以 DcR3 蛋白为抗原制备高效价和高特异性抗人 DcR3 单克隆抗体和多克隆抗体，并进行鉴定。以纯化的多克隆抗体为捕捉抗体，以生物素化的单克隆抗体为检测抗体，建立检测可溶性 DcR3 含量的双抗体夹心 ELISA 法，为肿瘤及自身免疫疾病等 DcR3 相关疾病的诊断、疗效观察及预后判断提供一种简便、经济的检测方法，为研究 DcR3 蛋白功能及其在组织细胞表达分布等奠定基础。

具体制备工艺包括以下步骤：

应用重叠 PCR 方法获得 DcR3 基因，构建的 pET28a(+)/DcR3 重组表达质粒转化入大肠杆菌 BL21 菌株，IPTG 诱导表达 His-DcR3 融合蛋白，镍柱亲和层析法纯化目的蛋白，SDS-PAGE 及 Western blot 分析表达产物。采用纯化的 His-DcR3 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠，共腹腔免疫四次，待小鼠血清抗体达理想效价时，取免疫的小鼠脾脏淋巴细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞在 PEG4000 作用下进行融合，以 HAT 培养基选择培养，间接 ELISA 法筛选阳性孔，将有限稀释法克隆后的杂交瘤细胞接种入小鼠腹腔产生腹水，收集的腹水经过预处理后采用辛酸-饱和硫酸铵沉淀法、ProteinA 亲和层析法进行纯化，制备抗人 DcR3 单克隆抗体。SDS-PAGE、Western blot 和间接 ELISA 法等鉴定单克隆抗体的纯度、特异性和效价等。同时，采用高纯度的 His-DcR3 融合蛋白免疫家兔，采集兔血清，制备并纯化抗人 DcR3 多克隆抗体，以该抗人 DcR3 多克隆抗体为捕获抗体，以生物素化的抗人 DcR3 单克隆抗体为检测抗体，建立检测 DcR3 含量的双抗体夹心 ELISA 方法。

本发明的积极效果在于：以高纯度的 His-DcR3 融合蛋白为免疫原，制备并纯化抗人 DcR3 多克隆抗体及单克隆抗体，以抗人 DcR3 多克隆抗体为捕获抗体，以生物素化的抗人 DcR3 单克隆抗体为检测抗体，建立多抗和单抗双抗体夹心 ELISA 方法，以兔抗 DcR3 多克隆抗体为捕获抗体可以捕获更多抗原，因此具有更好的灵敏度，为肿瘤及自身免疫疾病等 DcR3 相关疾病的诊断、疗效观察及预后判断提供一种简便、经济的检测方法，为研究 DcR3 蛋白功能及其在组织细胞表达分布等奠定基础。

#### 附图说明

图 1 为重叠 PCR 方法构建的 DcR3 基因电泳图。

1 为 DcR3 基因，2 为 DL2 000 marker。

图 2 为 pET-28a(+)/ DcR3 重组体酶切鉴定电泳图。

1 为  $\lambda$ -HindIII DNA Marker，2 为 BamHI 单酶切，3 为 BamHI 和 HindIII 双酶切，4 为 DL2 000 marker。

图 3 为纯化前后的 His-DcR3 融合蛋白电泳图。

1 为蛋白低分子量 marker，2 为纯化前表达的全菌蛋白，3 为纯化后的 His-DcR3 融合蛋白。

图 4 为纯化的 His-DcR3 融合蛋白特异性鉴定的 Western blot 分析图。

1 纯化的 His-DcR3 融合蛋白，2 为阴性对照，3 为蛋白低分子量 marker。

图 5 为多克隆抗体及 1B1 细胞株抗人 DcR3 单抗纯化后 SDS-PAGE 电泳分析图。

1 为纯化后兔抗人 DcR3 多克隆抗体，2 为纯化后 1B1 细胞株抗人 DcR3 单抗，3 为蛋白低分子量 marker。

图 6 为 1B1 细胞株抗人 DcR3 单抗特异性鉴定的 Western blot 分析图。

1 为 His-DcR3 融合蛋白，2 为诱导后的 pET28a(+) 空载体菌蛋白，3 为蛋白低分子量 marker。

图 7 为双抗体夹心 ELISA 的标准曲线。

横坐标为不同稀释度的标准品 DcR3 蛋白，纵坐标为相应的 OD<sub>492nm</sub> 值。

#### 具体实施例

通过以下实施例进一步举例描述本发明，并不以任何方式限制本发明，在不背离本发明的技术解决方案的前提下，对本发明所作的本领域普通技术人员容易实现的任何改动或改变都将落入本发明的权利要求范围之内。

## 实施例1

### DcR3基因的构建、表达及纯化

#### 1 方法

##### 1.1 DcR3 基因的构建

根据 Genbank 中所提供的人 DcR3mRNA 序列，去除 N 末端 29 个信号肽，设计合成下列 8 个引物片段，分别命名为 P1-P8，由大连宝生物公司合成。

P1: ggatccatggcagaaacacccacctaccctggcgggacgcagagacaggggagcggctggtgtgcgccagtgccccccaggcacctttgtgcagcgccgtgc

P2: ctccccgcagaggacgttgcagtagcggcagcgcctccaggtagttccagaactgcgtgtagtggcgcgggtgacacgggccacacgtcgtggggctgtctcggcggcacggccgctgcaca

P3: cgtcctctgcggggagcgtgaggaggaggcacgggcttgccacgccaccacaaccgtgcctgccgctgccgaccggctttcttcgcgcacgctggttttctgcttgaggcacgcatcgtgt

P4: ctgctctgagctggagctgctggctgagaaggtgcctggggggcacggctggcactgcgtgttctggctgggggtgccccggggcaatcacgccggcaccaggtggacacgatgcgtgctcc

P5: ctccagctcagagcagtgccagccccaccgcaactgcacggccctgggctggccctcaatgtgccaggctcttctccatgacacctgtgcaccagctgcactggcttccccctcagc

P6: ctcgagggcctgcagcagccgctgcagcctcttgatggagatgtcctggaaagccacaaagtccatgacggcacgctcacactcctcagctcctggtaccctggtgctgagggggaagcca

P7: gctgcaggccctcgaggccccggagggtgggggtccgacaccaagggcgggcccgcggccttgacagctgaagctgcgtcggcggctcacggagctcctgggggagcaggacggggcgctg

P8: aagcttgtgcacagggaggaagcgtgacggacgctccgctccagccccgggcatcctggccacgcgcagcgcctgcagcagccgcaccagcagcgcctcctgc

在P1和P8的5'端分别引入BamH I和Hind III酶切位点，重叠PCR方法构建人DcR3基因。第一轮PCR反应将P1和P2、P3和P4、P5和P6、P7和P8配对，分别生成产物P1-2(210bp)、P3-4(226bp)、P5-6(226bp)、P7-8(211bp)；第二轮PCR反应将P1-2和P3-4、P5-6和P7-8配对，分别生成产物P1-4(420bp)、P5-8(421bp)；第三轮PCR反应将P1-4和P5-8连接生成产物P1-8(825bp)。PCR反应条件均为94℃预变性5min，94℃变性40s，58℃退火30s，72℃延伸30s，共30个循环，72℃终止延伸5min。

##### 1.2 pET28a(+)/DcR3重组质粒的构建及鉴定

产物P1-8与原核表达载体pET28a(+)分别用Hind III和BamH I双酶切，凝胶回收的产

物P1-8与载体按5:1摩尔比混合后,在T<sub>4</sub>DNA连接酶作用下16℃过夜连接,构建重组质粒。重组质粒转化*E. coli* BL21后,在含卡那霉素的LB平板上随机挑取20个菌落,少量扩菌,小量抽提质粒,BamH I或(及)Hind III酶切鉴定,阳性重组质粒送由大连宝生物进行测序。

### 1.3 DcR3蛋白的诱导表达

挑取转化有正确重组质粒的*E. coli* BL21表达菌单个菌落,接种于含卡那霉素抗性的LB液体培养基中,37℃振荡培养过夜,按1:50比例转种于含卡那抗性的LB液体培养基中,继续培养至OD<sub>600</sub>为0.4~0.6时,在不同终浓度IPTG(0.01、0.1、1、5、10 mM/L)、不同温度(28℃、37℃)下诱导蛋白表达,行SDS-PAGE分析蛋白表达情况,摸索最佳诱导条件。

### 1.4 DcR3蛋白表达形式分析及纯化

离心收集诱导后的菌体,超声波裂解,离心收集沉淀,用2%脱氧胆酸钠、1 M、3 M尿素分别洗涤一次,沉淀重悬于8M尿素(含50 mM/L β-巯基乙醇),4℃搅拌过夜,变性蛋白取上清流经Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱,通过不同pH值洗脱液洗脱目的蛋白,纯化产物透析复性。用SDS-PAGE和Western blot进行目的蛋白分析,采用Bradford法测定目的蛋白浓度。

### 1.5 间接ELISA鉴定特异性

以纯化后的目的蛋白(5 μg/ml)为固相包被酶标板,同时设立阴性对照和空白对照,各三复孔。1:5000鼠抗人DcR3单克隆抗体为一抗,1:10000HRP标记的羊抗鼠IgG抗体为二抗,OPD为底物,测定492nm的OD值,以P/N≥2.1为阳性。

### 1.6 Western blot鉴定特异性

将纯化的DcR3蛋白与诱导后的pET28a(+)空载体蛋白SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜上,以鼠抗人DcR3单克隆抗体为一抗,以HRP标记的羊抗鼠IgG抗体为二抗,通过ECL显色系统进行Western blot检测。

## 2 结果

### 2.1 DcR3 基因的构建

经过三轮PCR,最终生成825bp的PCR产物(含酶切位点),与预期值相符(图1)。

### 2.2 pET-28a(+)/DcR3 重组体的构建及酶切鉴定

通过亚克隆构建的重组质粒经BamHI单酶切,琼脂糖凝胶电泳可见大小为6182bp的单条带,经BamHI和HindIII双酶切后可见5369bp及813bp两条带,与预期相符。

阳性重组质粒测序结果正确（图2）。

### 2.3 DcR3 的原核表达的动力学分析

将通过亚克隆方法构建的 pET-28a(+)/ DcR3 重组质粒转化入 BL21 感受态细胞中，尝试了不同终浓度 IPTG（0.01、0.1、1、5、10 mM）、不同温度（28℃和 37℃）及不同时间段（0、1、2、3、4、5h）蛋白表达情况，结果显示诱导后在 33KD 左右较诱导前有明显蛋白表达带，28℃蛋白的表达量较 37℃表达量增多，3h 蛋白表达量达到高峰，再增加表达时间蛋白量无明显增多，而在不同终浓度的 IPTG 诱导下蛋白表达量无明显差异。

### 2.4 目的蛋白的纯化及复性

28℃终浓度为 0.01 mM 的 IPTG 诱导表达 3h，凝胶薄层扫描显示目的蛋白表达量约占菌蛋白总量的 38%。离心收集菌体，沉淀悬浮于裂解缓冲液中，经超声波破碎后，收集破菌的上清与沉淀进行 SDS-PAGE，组分主要集中于超声破菌的沉淀中，说明为包涵体形式表达。包涵体经洗涤、8M 尿素溶解、Ni<sup>2+</sup>亲和层析方法纯化后，SDS-PAGE 电泳显示 33KD 左右有单一条带，与预期值相符，凝胶薄层扫描显示蛋白纯度达 98%（图3）。

### 2.5 间接 ELISA 特异性鉴定

纯化后的目的蛋白可与抗 DcR3 单克隆抗体特异性结合，三复孔 P/N 值分别为 3.5，3.43，3.47，表明所纯化的蛋白为 DcR3 蛋白。

### 2.6 Western blot 特异性鉴定

转印至 PVDF 膜上的 DcR3 融合蛋白与抗 DcR3 单克隆抗体在分子量约 33kD 处出现一特异条带，说明 DcR3 目的蛋白得以成功表达，表达的蛋白具有抗原性（图4）。

### 2.7 间接ELISA效价测定

将兔多抗血清和初步纯化的多抗分别倍比稀释，纯化前多抗效价为1：2560000，纯化后效价为1：1280000，表明获得高效价的多克隆抗体，抗体浓度为9mg/ml。

## 实施例2

### 单克隆抗体的研制和鉴定

#### 1 方法

##### 1.1 动物免疫

纯化的 His-DcR3 融合蛋白免疫 BALB/c 鼠，初次免疫取 100 μ l (约 50 μ g) 抗原加等量弗氏完全佐剂充分乳化，腹腔注射，第 14d 取 100 μ l (约 50 μ g) 加等量弗氏不完全佐剂加强免疫，以后每隔两周等量抗原不加佐剂腹腔免疫两次，测定小鼠血清抗体效价达

1:  $10^6$  以上时准备融合, 融合前三天取效价最高的小鼠腹腔注射抗原  $100 \mu\text{g}$ 。

## 1.2 杂交瘤细胞株的建立及单克隆抗体的制备

### 1.2.1 细胞融合

无菌条件下, 取对数生长的 SP2/0 细胞, 1000rpm 离心 8 分钟, 弃上清, 用 RPMI1640 不完全培养液混悬细胞后计数, 取所需的细胞数。制备免疫小鼠脾细胞悬液, 将 SP2/0 细胞与脾细胞按 1:5 的比例混合,  $37^\circ\text{C}$  水浴 50%PEG4000 作用下进行融合, 融合后 1000rpm 离心 8 分钟, 弃上清, 用含有饲养细胞的 HAT 完全培养液轻轻混悬, 接种在 96 孔细胞培养板中, 置  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱培养。第 10 天换 HT 选择培养基, 第 14 天换含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基。

### 1.2.2 筛选及克隆化

2-3 周后当杂交瘤细胞长至孔底面积  $1/5$  以上时, 分别包被 His-DcR3 融合蛋白与 His 蛋白, 同时设立阴、阳性及空白对照, 应用间接 ELISA 方法检测培养上清液。以  $P/N \geq 2.1$  为阳性, 选取与 His-DcR3 融合蛋白反应阳性而与 His 蛋白反应阴性孔的细胞通过有限稀释法连续克隆 2-3 次, 直至所有单个克隆细胞阳性孔率为 100%时扩大培养, 进行细胞冻存和腹水制备。

### 1.2.3 腹水制备及纯化

每只 BALB/c 小鼠腹腔注射无菌液体石蜡  $500 \mu\text{l}$ , 7 天后每只鼠腹腔接种杂交瘤细胞  $5 \sim 7 \times 10^5$  个, 14 天左右采集腹水。二氧化硅吸附法对腹水进行预处理, 采用辛酸-饱和硫酸铵沉淀法、ProteinA 亲和层析进行纯化。SDS-PAGE 分析纯度, 紫外分光光度计测定纯化后单克隆抗体含量后, 过滤除菌后分装,  $-70^\circ\text{C}$  冻存。

## 1.3 单克隆抗体的鉴定

### 1.3.1 效价的测定

将纯化前后的单克隆抗体倍比稀释, 以 1:200 稀释的正常小鼠血清作为阴性对照, 应用间接 ELISA 方法测定  $A_{492\text{nm}}$  值, 以  $P/N \geq 2.1$  为阳性, 测定单抗效价。

### 1.3.2 免疫球蛋白类和亚类的鉴定

按操作说明将杂交瘤上清 1:200 稀释, 取  $150 \mu\text{l}$  稀释液加入含有亚类定性试剂的试管底部, 30s 后将试纸条插入管底, 5-10min 后观察结果, 判读轻链、重链。

### 1.3.3 杂交瘤细胞染色体核型分析

生长良好的杂交瘤细胞悬液 10ml 加入秋水仙素, 使其终浓度为  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 继续培养 3h, 1000rpm 离心 10min, 重蒸水室温低渗处理 20min, 离心弃上清, 细胞固定后

Gimsa 染色，油镜下观察染色体计数。

#### 1.3.4 相对亲和力鉴定

采用非竞争 ELISA 方法确定单克隆抗体的亲和力。分别以不同浓度 ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 的纯化的 DcR3 融合蛋白为固相，纯化的单抗为起始浓度进行倍比稀释，根据 OD 值计算抗体亲和力的大小。

#### 1.3.5 Western blot 鉴定抗体特异性

将纯化的 DcR3 蛋白及 pET-28a(+) 空载体蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上，以 1:5000 稀释的小鼠腹水为一抗，以 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗，通过 ECL 显色系统进行 Western blot 检测。

## 2 结果

### 2.1 杂交瘤细胞株的建立

HAT 选择培养第三天可见融合的细胞克隆，融合率为 93.0% (269/288)，阳性克隆率为 85.0% (246/288)，经有限稀释法对阳性克隆进行 2-3 次克隆，共获得 5 株能稳定分泌特异性抗 DcR3 的 McAb 杂交瘤细胞株，分别命名为 1A9、1B1、1F5、1G4 及 2H6。

### 2.2 腹水单克隆抗体的纯化

腹水经 proteinA 层析柱纯化后，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳扫描，鉴定其纯度为 95% (图 5)。相对分子质量为 146kD (轻链为 23kD，重链为 50kD)。紫外分光光度计测定纯化蛋白的浓度为 15mg/ml。

### 2.3 单抗效价、亚类、染色体及亲和常数的鉴定

杂交瘤细胞株	效价	亚类	染色体条数	亲和力常数 ( $M^{-1}$ )
1A9	$1 \times 10^5$	IgG1 $\kappa$ 链	102	$5.11 \times 10^9$
1B1	$1 \times 10^7$	IgG1 $\kappa$ 链	102	$9.62 \times 10^{10}$
1F5	$1 \times 10^4$	IgG1 $\kappa$ 链	104	$1.62 \times 10^8$
1G4	$1 \times 10^4$	IgG1 $\kappa$ 链	104	$5.62 \times 10^9$
2H6	$1 \times 10^6$	IgG1 $\kappa$ 链	102	$6.3 \times 10^{10}$

### 2.4 Western blot 鉴定

五株杂交瘤细胞株分泌的抗 DcR3 单克隆抗体均能与转印至 PVDF 膜上的 DcR3 融合蛋白在分子量约为 33kD 处形成单一的阳性染色带，并且与 pET 载体蛋白无交叉反应 (图 6)。

## 实施例3

## DcR3多克隆抗体的制备

### 1 方法

#### 1.1 动物免疫

取纯化后的 His-DcR3 蛋白 500  $\mu$  l (约 500  $\mu$  g) 与等量弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后采用背部多点注射法免疫家兔。2 周后取 DcR3 抗原加弗氏不完全佐剂同法加强免疫, 免疫抗原量约 200  $\mu$  g, 以后每两周免疫一次, 全程共免疫 5 次, 末次免疫后 7 天于耳缘静脉取血, 试血后颈动脉放血, 收集血清,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。

#### 1.2 多克隆抗体的纯化及效价鉴定

采用饱和硫酸铵沉淀法及 ProteinA 亲和层析法进行兔血清的纯化。间接 ELISA 方法测定纯化前后血清效价、SDS-PAGE 分析纯度, 紫外分光光度计测定纯化后多克隆抗体含量, 过滤除菌后分装,  $-70^{\circ}\text{C}$  冻存。

### 2 结果

兔血清经 proteinA 层析柱纯化后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳扫描, 鉴定其纯度为 90% (图 5)。将兔多抗血清和初步纯化的多抗分别倍比稀释, 纯化前多抗效价为 1: 2560000, 纯化后效价为 1: 1280000, 表明获得高效价的多克隆抗体, 抗体浓度为 9mg/ml。

## 实施例4

### 双抗体夹心ELISA方法的建立

#### 1 方法

##### 1.1 单克隆抗体生物素化

将生物素-羟醛琥酰亚胺酯 (BNHS) 用二甲基甲酰胺 (DMF) 配成 1mg/ml 溶液, 纯化的单克隆抗体稀释成 2mg/ml 溶液, 按 BNHS: 单抗为 1: 8 的体积比将两者混匀, 反应 2-4h 后  $4^{\circ}\text{C}$  透析过夜, 透析结束后加入等体积甘油, 小量分装,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

##### 1.2 DcR3 标准曲线的绘制

纯化的适当浓度 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 稀释的多克隆抗体包被酶标板, 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  包被 3h; PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 3% 的 BSA 溶液封闭, 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜; PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 加入梯度稀释的标准品 DcR3 蛋白, 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1h, 同时设立阴性对照和空白对照; PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 加入适当稀释 (1: 10000) 的生物素化单克隆抗体, 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1h; PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 加入 1: 5000 稀释的链酶亲和素-HRP, 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 20min, PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 加入 OPD 底物溶液, 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 避光反应 10-20min; 2M 硫酸溶液终止反应, 50  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

以不同梯度稀释的标准品DcR3蛋白含量为横坐标，以相应的OD值为纵坐标绘制标准曲线，建立回归方程，并计算阴性对照的OD<sub>492nm</sub>值均数和标准差(S)，以均数+2S的OD<sub>492nm</sub>值在标准曲线上所对应的DcR3浓度为该法的最小检出量，即灵敏度。

### 1.3 正常人和不同患者血清DcR3含量检测

5ug/ml纯化的DcR3多克隆抗体包被酶标板，100ul/孔，37℃包被3h；弃包被液，250ul/孔洗涤液，洗涤三次，每次5min；200ul/孔封闭液，37℃封闭2h；弃封闭液，250ul/孔洗涤液，洗涤三次，每次5min；加入待检血清，100ul/孔，37℃孵育1h，阴性对照为等体积抗体稀释液，空白对照不加DcR3；250ul/孔洗涤液，洗涤三次，每次5min；加入1:10000稀释的生物素化的1B1 mAb，100ul/孔，37℃孵育1h；250ul/孔洗涤液，洗涤三次，每次5min；加1:5000稀释的Avidin-HRP，37℃孵育20min；250ul/孔洗涤液，洗涤五次，每次5min；加入OPD底物缓冲液，100ul/孔，避光显色10-20min；加入50ul/孔2M硫酸终止反应，酶标仪测定OD<sub>492nm</sub>值。

### 1.4 统计学处理t检验

## 2 结果

### 2.1 DcR3标准曲线的建立

将标准品DcR3蛋白倍比稀释成浓度0.15, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10ng/ml，采用双抗体夹心ELISA方法重复检测三次，结果表明，其具有良好线性关系的检测区间为0.3125 - 10ng/ml。计算阴性对照的OD<sub>492nm</sub>值均数和标准差(S)，以均数+2S的OD<sub>492nm</sub>值在标准曲线上所对应的DcR3浓度为该方法最小检出量，即灵敏度。标准曲线线性方程为 $y=0.1899x+0.1506$  ( $R^2=0.9931$ )，阴性对照的OD值均数为0.145，标准差为0.011，均数+2S=0.186，对照曲线得出最小检出量为86pg/ml (图7)。

### 2.2 健康对照和不同患者血清DcR3含量检测的统计学处理

肺间质病和恶性肿瘤患者血清中DcR3含量明显高于正常人，差异具有统计学意义( $p<0.01$ )。而肺间质病与恶性肿瘤患者比较，血清中DcR3含量差异无统计学意义( $p>0.05$ )。

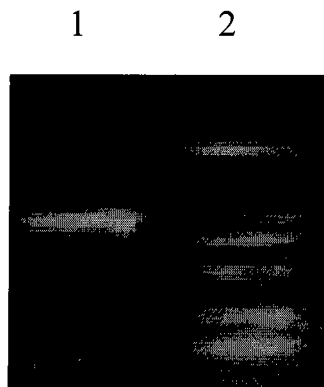


图 1

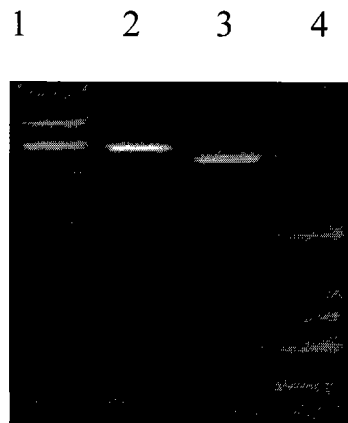


图 2

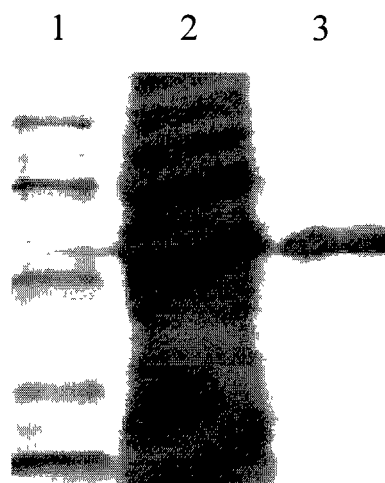


图 3

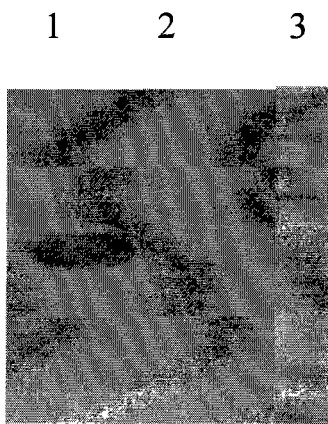


图 4

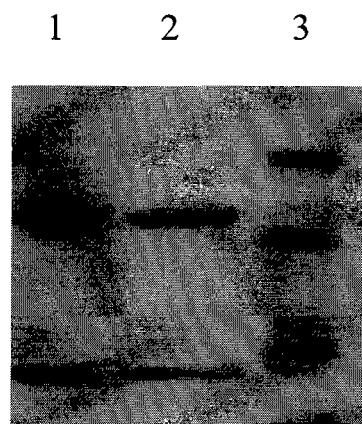


图 5

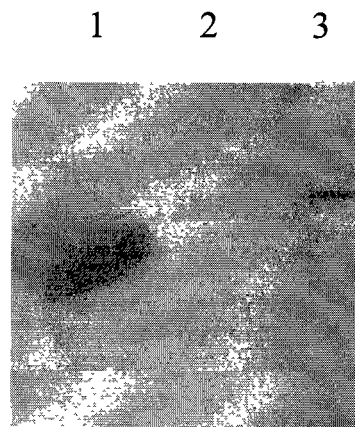


图 6

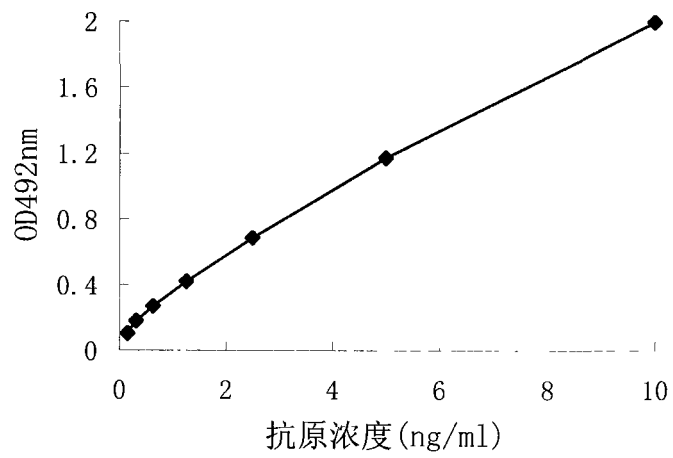


图 7

专利名称(译)	检测诱骗受体3的双抗体夹心ELISA方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101135686A</a>	公开(公告)日	2008-03-05
申请号	CN200710055758.5	申请日	2007-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	马忠森 王秀丽 郑永晨 吴春风 杨洋 吴艳峰 尹金植 杨俊玲 任锦 安继红 赫国志		
发明人	马忠森 王秀丽 郑永晨 吴春风 杨洋 吴艳峰 尹金植 杨俊玲 任锦 安继红 赫国志		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/541 G01N33/574 G01N33/531		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开一种检测诱骗受体3的双抗体夹心ELISA方法。构建DcR3基因，表达纯化DcR3蛋白并进行鉴定，以高纯度的His - DcR3融合蛋白为免疫原，制备并纯化抗人DcR3多克隆抗体及单克隆抗体，以抗人DcR3多克隆抗体为捕获抗体，以生物素化的抗人DcR3单克隆抗体为检测抗体，建立检测DcR3多抗和单抗双抗体夹心ELISA方法，以抗DcR3多克隆抗体为捕获抗体可以捕获更多抗原，因此具有更好的灵敏度，为肿瘤及自身免疫疾病等DcR3相关疾病的诊断、疗效观察及预后判断提供一种简便、经济的检测方法，为研究DcR3蛋白功能及其在组织细胞表达分布等奠定基础。



图 1

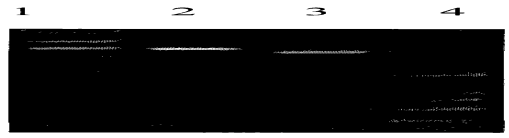


图 2

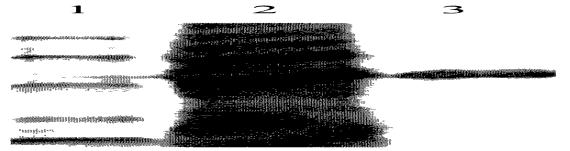


图 3