



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101709091 A

(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号 200910008107. X

(22) 申请日 2009.03.02

(71) 申请人 广东虹业抗体科技有限公司

地址 510663 广东省广州市萝岗区高新技术
产业开发区科学城揽月路 80 号广州科
技创新基地 A 区第四层 409-419 室

(72) 发明人 王虹

(51) Int. Cl.

G07K 16/22 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

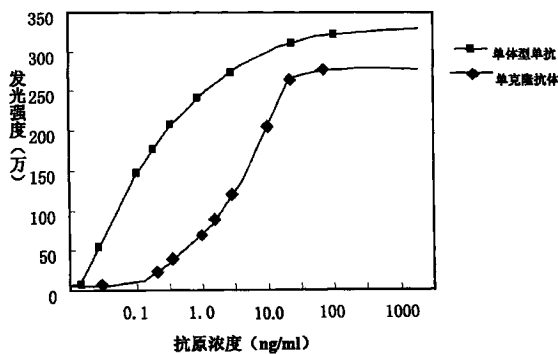
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

抗促血管生成素 2 等聚合体蛋白的单体型抗体的制备及在免疫检测方法中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种对存在聚合体结构的蛋白质采用甘氨酸酸性缓冲液进行酸处理,使之成为游离单体抗原,并以单体抗原为免疫原免疫动物制备针对蛋白线性表位的单体型抗体的方法,使用这种抗体能提高免疫学定量检测聚合体结构蛋白的准确性。以本发明方法制备的小鼠抗人促血管生成素 2 (Angiopoietins, Ang2) 单体型单抗,生产的化学发光免疫定量检测试剂,检测的灵敏度达到 50pg/ml,定量线性范围在 50pg/ml-12ng/ml,特异性强;生产的酶联免疫检测试剂,灵敏度达到 600pg/ml,定量线性范围在 0.6ng/ml-15ng/ml,特异性强。



1. 一种单体型抗体的制备方法,其特征在于:用酸性缓冲液处理多聚体蛋白质,使之成为单体抗原,以单体抗原为免疫原免疫动物制备单体型抗体。

2. 根据权利要求1的制备方法,其特征在于:所述酸性缓冲液为含有甘氨酸、柠檬酸、乙酸的酸性缓冲液,优选甘氨酸酸性缓冲液。

3. 根据权利要求1、2的制备方法,其特征在于:所述多聚体蛋白为促血管生成素2(Angiopoietins, Ang2)。

4. 一种单体型抗体的使用方法,其特征在于:将待测样品用酸性缓冲液处理,使其中待测的多聚体蛋白质成为单体抗原,与权利要求1-3任一项的制备方法得到的单体型抗体进行免疫反应,来检测待测的多聚体蛋白质的含量。

5. 根据权利要求4的使用方法,其特征在于:所述酸性缓冲液为含有甘氨酸、柠檬酸、乙酸的酸性缓冲液,优选甘氨酸酸性缓冲液。

6. 根据权利要求4、5的使用方法:其特征在于:所述多聚体蛋白为促血管生成素2(Angiopoietins, Ang2)。

7. 根据权利要求4-6任一项的使用方法,其特征在于:所述免疫反应是化学发光免疫反应、酶联免疫反应、胶体金、放射免疫反应和免疫荧光反应等技术。

抗促血管生成素 2 等聚合体蛋白的单体型抗体的制备及在免疫检测方法中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种单体型抗体的制备及使用方法,尤其是涉及用酸性缓冲液处理以聚合体形式存在的蛋白,使之成为游离单体,并用单体抗原免疫动物获得单体型抗体,单体型抗体可用于单体抗原的定量检测。

背景技术

[0002] 自然界中存在着众多的蛋白质,蛋白质是组成生物有机体的重要组成部分,不同蛋白质行使着不同的生物学功能,而蛋白质的结构、构象是决定功能的基础,每一种蛋白质都必需以一定的构象存在才能发挥正常的生物学功能。

[0003] 同样人体内存在的许多细胞因子,也必需以二聚体或多聚体的形式存在才能发挥正常的生物学功能,比如促进新生血管形成的促血管生成素 2(Angiopoietins, Ang2),它在血管重塑部位和血管丰富的肿瘤组织中是以多聚体的形式与内皮细胞表面的受体结合,激活靶细胞内的信号转导途径,刺激新生血管的形成。如由巨噬细胞和 B 细胞产生的 IL-12,在体内是以异源二聚体的形式,来促进 T 细胞和 NK 的增殖与杀瘤作用、诱导 IFN- γ 等多种细胞因子的产生及调节 Th1 细胞发育等功能。这些细胞因子由于在体内有着重要的生物学功能,其浓度的变化往往伴随着机体的生理和病理状态的改变,因此,定量检测这些以二聚体或多聚体形式存在的蛋白,可用于疾病的检测、诊断和科研领域。

[0004] 但是,这种复杂的二聚体或多聚体的空间构象却给蛋白的定量检测带来了困难。目前常用的细胞因子定量检测方法就是基于抗原抗体特异结合活性的免疫学检测方法,即在一定的反应条件下,加入一定浓度的已知抗体,反应产生的免疫复合物多少与待检样品中含有相应抗原的量成正比,当抗体浓度一定时,免疫复合物越多反应样品中的抗原量也越多,再用实验性标准曲线就可推算出样品中抗原的含量,而抗原抗体以 1 : 1 的比例结合是准确定量推算的基础。可是,如果用免疫学方法去检测上述二聚体或多聚体的蛋白,空间构象的存在影响了抗原抗体的结合,使抗原抗体的结合比例不能达到 1 : 1,从而影响了定量检测的准确性。

[0005] 首先,存在于被检物如血液或体液中的,二聚体或多聚体蛋白的空间构象位阻会影响抗原与抗体的结合,从而降低检测的灵敏度和准确性。其次,蛋白的抗原表位可能会被蛋白的空间结构所屏蔽,抗体不能识别和结合抗原,从而降低了检测的灵敏度和准确性。最后也就是最重要的一点,如果以生理性的聚合体蛋白为免疫原免疫动物制备抗体,得到的往往是空间构象抗体,这种抗体是在将二聚体或多聚体蛋白作为一个分子的基础上产生的,与真正的能识别单分子抗原表位的抗体不一样,它所识别的是在二聚体或多聚体空间结构的基础上所形成的新的不正确的抗原表位,而这种所谓的抗原表位在体内会随着蛋白的聚合和解离而消失和发生变化,非常不稳定。因此以这种空间构象抗体作为检测试剂,对抗原进行定量检测会出现较大偏差。

[0006] 本发明就是为了解决上述二聚体或多聚体蛋白定量检测中存在的缺陷而设计和

实施的,本发明从引起检测误差产生的根本性问题入手,即二聚体或多聚体结构的空 间构象是产生问题的根源,去除蛋白的空间构象,使蛋白成为单体抗原,并以单体抗原为免疫原 制备针对单体抗原线性表位的单体型抗体,以单体型抗体作为检测试剂去检测样品中被处 理过的已成为单体抗原的待检蛋白,使抗原抗体的结合比例达到 1 : 1,从而大大提高免 疫学检测的灵敏度和准确性。

[0007] 本发明一方面针对多聚体蛋白质,提供了一种单体型抗体的制备方法:即用酸性 缓冲液处理多聚体蛋白质,使之成为单体抗原,以单体抗原为免疫原免疫动物制备单体型 抗体。其中所述酸性缓冲液为含有甘氨酸、柠檬酸、乙酸的酸性缓冲液,优选甘氨酸酸性缓 冲液;所述多聚体蛋白为促血管生成素 2(Angiopoietins, Ang2) 等类似结构的蛋白。

[0008] 本发明另一方面提供了一种单体型抗体的使用方法,将待测样品用酸性缓冲液处 理,使其中待测的多聚体蛋白质成为单体抗原,与前述的制备方法得到的单体型抗体进行 免疫反应,来检测待测的多聚体蛋白质的含量。其中所述酸性缓冲液为含有甘氨酸、柠檬 酸、乙酸的酸性缓冲液,优选甘氨酸酸性缓冲液。所述多聚体蛋白为 Ang2 等类似结构蛋白。

[0009] 利用本发明方法制备的 Ang2 单体型抗体,并结合本发明所涉及的被检二聚体或 多聚体抗原预处理方法,可提高多种免疫学检测方法的灵敏度和准确性。小鼠抗人 Ang2 单 体型单抗可使人 Ang2 增强化学发光检测分析 (CLIA) 的灵敏度从 0.3ng/ml 提高到 50pg/ ml,定量线性范围在 50pg/ml-12ng/ml,特异性强,与人血清白蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红 蛋白、层粘蛋白、C 反应蛋白、Ang1、糖类抗原 CA125、APF、CEA 及其它肿瘤标志物不发生交叉反 应,批内变异系数 (CV) 小于 15%、批间 CV 值小于 18%。

[0010] 小鼠抗人 Ang2 单体型单抗可使人 Ang2 酶联免疫分析 (ELISA) 的灵敏度从 1ng/ml 提高到 0.6ng/ml;定量线性范围在 0.6ng/ml-15ng/ml;特异性不变,与人血清白蛋白、球 蛋白、脂蛋白、血红蛋白、层粘蛋白 C 反应蛋白、Ang1、糖类抗原 CA125、APF、CEA 及其它肿瘤标 志物不发生交叉反应。

[0011] 本发明的这些特征和优点以及其他特征和优点在参考以下附图和本发明的具体 实施方式之后将变得显而易见。

附图说明

[0012] 图 1. 用小鼠抗人 Ang-2 单体型单抗制备的增强化发光免疫定量检测试剂的标准 曲线示意图。

[0013] 图 2. 用小鼠抗 Ang-2 单克隆抗体制备的增强化发光免疫定量检测试剂的标准曲 线示意图。

[0014] 图 3. 抗 Ang-2 单体型单抗与抗 Ang-2 单克隆抗体制备的增强化学发光定量检测 试剂标准曲线示意图的比较。

具体实施方式

[0015] 本发明的单体型抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0016] (1) 单体抗原的制备:将多聚体蛋白溶解于酸性缓冲液中,破坏聚合体结构,使之 游离成为线性单体抗原。

[0017] (2) 免疫动物:取一定量的单体抗原溶液与等体积的福氏完全佐剂完全混合,皮

下多点注射小鼠、大鼠、兔子、羊等动物。与等体积的福氏不完全佐剂混合进行加强免疫。

[0018] (3) 收集动物血清,测定抗体效价,为所制备的单体型多克隆抗体。

[0019] (4) 细胞融合:将免疫 Bab1/c 小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0 进行融合。

[0020] (5) 筛选克隆:有限稀释法分离抗体,用间接 ELISA 法鉴定分泌阳性抗体的杂交瘤细胞。

[0021] (6) 亚克隆制备:将阳性克隆用半固体培养基培养,ELISA 检测阳性克隆。

[0022] (7) 单体型单抗性能鉴定:用间接 ELISA 和 Western blotting 检测抗体特异性,用分型抗体鉴定抗体亚型,ELISA 法测定抗体的效价和特异性。

[0023] (8) 阳性单抗的大规模制备,制备腹水并用辛酸-硫酸铵方法纯化抗体。

[0024] 结合增强化学发光酶联免疫分析方法,来说明本发明的单体型单抗在定量检测方面的优越性,具体来说包括以下步骤:

[0025] (1) 标记单体型单抗:用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶标记到单体型单抗上。

[0026] (2) 抗体配对:先用抗体粗配对实验挑选效果比较好的几株抗体,再用精确配对实验选取读数最高的一对抗体,作为检测使用。

[0027] (3) 反应条件的优化和确立:包括抗体的检测和包被浓度的确定、洗涤强度的确定、标准曲线的制作、特异性分析和精密度的测定等。

[0028] (4) 待测样品的处理:用酸性缓冲液稀释样品,使其中待测的多聚体蛋白质成为单体抗原。

[0029] (5) 反应测定:将单体抗原与单体型单抗混合反应,加入含有发光增强剂的化学发光底物作用,用化学发光免疫分析仪测量发光值,计算抗原浓度。

[0030] 结合酶联免疫分析方法,来说明本发明的单体型单抗在定量检测方面的优越性,具体来说包括以下步骤:

[0031] 步骤 1-4 与增强化学发光酶联免疫分析方法一样。

[0032] (1) 反应测定:将单体抗原与单体型单抗混合反应,加入显色底物 (TMB) 等,用酶标仪测定一定波长下 (450nm) 的吸光度,计算抗原浓度。

[0033] 下面具体以小鼠抗人 Ang-2 蛋白的单体型抗体的制备和应用为例说明

[0034] 实施例 1,小鼠抗人 Ang2 单体型抗体的制备

[0035] Ang-2 单体抗原的制备

[0036] 1. 试剂重组人 Ang-2 蛋白从 R&D 公司购买获得 (Minneapolis, MNCat. No. 623-AM/CF), -20℃ 保存备用。甘氨酸、Tween-20 购自上海生工生物公司。

[0037] 2. 将 Ang-2 蛋白冻干粉溶解于甘氨酸缓冲液 (200mM 甘氨酸, 0.2% Tween-20, pH3.2) 中,破坏 Ang-2 抗原的聚合体结构,使之成为单体抗原。

[0038] 小鼠抗 Ang-2 单体型抗体的制备

[0039] 1. 主要试剂和耗材福氏完全佐剂购自美国 Gibco 公司,HRP、DMSO、TMB 购自 Sigma 公司,丙烯酰胺、N-N' 亚甲叉双丙烯酰胺、TEMED、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、苦味酸、氯化钠、单抗亚类试剂盒等购自上海生工生物公司、FetalClone I、高糖 DMEM 细胞培养液购自 Hyclone 公司,羊抗鼠 IgG/HRP、兔抗羊 IgG/HRP 购自武汉博士德生物公司。最大吸附 96 孔酶联板购自 Nunc 公司,96 孔细胞培养板购自 Corning 公司。

[0040] 2. 细胞、动物和组织样本实验动物 Balb/c 小鼠,中山医科大学动物实验中心提

供,6~12周龄,体重17~20g,雌性,饲养于SPF级环境,恒温22~25℃,恒湿50%~65%,饮用水、饲料及实验用品均经灭菌消毒处理,实验操作遵守无菌原则。SP2/0小鼠骨髓瘤细胞购买自上海细胞研究所。

[0041] 3. 小鼠免疫

[0042] 3.1 取6-8周龄的雌性Ba1b/c小鼠,饲养一周,在免疫前尾尖取血,制备血清作为阴性对照。

[0043] 3.2 初次免疫:取180 μ g单体型抗原用1 \times PBS稀释为900 μ l,与等体积弗氏完全佐剂混合,直至形成乳浊液,采用腹部皮下多点注射,一共免疫6只小鼠,每只小鼠注射300 μ l,即30 μ g抗原,用苦味酸做好标记。

[0044] 3.3 第二次加强免疫:三周以后,取180 μ g单体型抗原用1 \times PBS稀释为900 μ l,与等体积弗氏不完全佐剂充分混匀,每只小鼠免疫30 μ g,免疫后第八天尾尖取血,制备血清,ELISA检测抗体效价。

[0045] 3.4 第三次加强免疫:三周以后,取180 μ g单体型抗原用1 \times PBS稀释为900 μ l,与等体积弗氏不完全佐剂充分混匀,每只小鼠免疫30 μ g,免疫后第八天尾尖取血,制备血清,ELISA检测抗体效价。

[0046] 3.5 冲击免疫:五周以后,挑选抗体滴度最高的一只小鼠进行冲击免疫,取40 μ g单体型抗原溶于100 μ l生理盐水中,尾静脉注射。

[0047] 3.6 其余五只小鼠再次免疫,第八天摘眼球取血,制备血清,作为多抗备用。

[0048] 4. 细胞融合

[0049] 4.1 收集SP2/0骨髓瘤细胞:提前一周复苏SP2/0细胞,用含10% FetalClone I的DMEM培养基培养,培养至对数生长期,收集细胞并计数,离心后留细胞沉淀,室温备用。

[0050] 4.2 收集免疫小鼠的脾细胞:冲击免疫后第三天,将免疫小鼠摘眼球取血,制备血清留作阳性对照,然后拉颈处死,置于0.1%新洁尔灭溶液中浸泡,在无菌条件下进行脾脏摘取手术,用IMDM培养基清洗脾脏,剪碎并轻微研磨,200目细胞筛网过滤,170 \times g离心5min,弃上清,用IMDM培养基悬浮并计数,室温保存备用。

[0051] 4.3 将SP2/0骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞混合于IMDM培养基中,170 \times g离心5min,弃上清,将离心管在掌心摇动,使细胞团松散呈糊状,置于37℃水浴中,用吸管吸取PEG缓慢加入细胞糊中,边加边搅拌,静置后加入IMDM,160 \times g离心5min,弃上清。并加入胸腺细胞作为滋养细胞,然后加入18% FetalClone I/1 \times IMDM/1 \times sp/1 \times HAT培养基,再加入甲基纤维素半固体培养基,充分混匀。

[0052] 4.4 附滋养细胞的制备:取两只3-4周龄的雌性Bab1/C小鼠,摘眼球处死,无菌操作取胸腺,研磨后加IMDM,过200目筛网过滤,离心后弃上清,胸腺细胞沉淀作为滋养细胞。

[0053] 4.5 融合细胞在半固体条件下筛选、克隆:将混合的细胞倒入直径35mm的平皿中,每皿约3ml,将小平皿置于湿盒中,37℃、5% CO₂培养箱中培养,7-10天后,在解剖镜下可见培养基中有许多白色小点,每一个小白点就是一个杂交瘤细胞形成的克隆,此时可以挑选克隆。

[0054] 5. 挑选、转移细胞克隆及再培养首先在96孔细胞培养板的每孔中滴入3滴18% FetalClone I/1 \times IMDM/1 \times sp/1 \times HAT培养基,再滴入一滴胸腺细胞作为滋养细胞,然后在解剖镜下,用加样器小心地将细胞克隆移至96孔板中,37℃、5% CO₂培养箱中培养2-3天。

[0055] 6. 间接 ELISA 法筛选阳性克隆细胞克隆于 96 孔细胞培养板中培养 2-3 天后, 部分培养基变黄, 用间接 ELISA 方法筛选阳性克隆, 并将筛选得到的阳性克隆转移到 96 孔细胞培养板中继续培养, 作好标记, 准备新一轮筛选。

[0056] 6.1 用包被液 (0.1M NaHCO₃, pH8.6) 稀释单体型 Ang-2 蛋白至 100ng/mL, 加 100 μl 到 96 孔酶联板中, 4℃湿盒过夜。

[0057] 6.2 弃包被液, PBS 洗板三次, 加入 400μl 封闭液 (PBS+3%脱脂奶粉), 室温湿盒封闭 1h。

[0058] 6.3 吸弃封闭液, 用 PBS 洗板 4 次, 一快三慢, 每次 5min。

[0059] 6.4 每孔中加入细胞培养上清 50 μl, 同时设融合前血清作阳性对照, 室温湿盒放置 1h。

[0060] 6.5 弃细胞上清, 用 PBST (0.01% Tween20) 洗板 4 次, 一快三慢, 每次 5min。

[0061] 6.6 每孔加入 100 μl HR 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗 (用 PBST 作 1 : 5000 倍稀释), 室温湿盒放置 1h。

[0062] 6.7 弃二抗, 用 PBST (0.01% Tween20) 洗板 4 次, 一快三慢, 每次 5min。

[0063] 6.8 加入新鲜配置的 TMB 显色液 100 μl, 暗盒放置显色, 待阳性对照的显色液变成蓝色以后, 加入 50 μl 2M H₂SO₄ 终止液终止显色反应, 用酶标仪测定 OD450nm 值。

[0064] 7. 阳性克隆的亚克隆制备经过 HAT 筛选后的杂交瘤克隆不能保证一个孔内只有一个细胞克隆, 可能会有数个或者甚至更多的克隆, 这些克隆可能包括抗体分泌细胞、抗体非分泌细胞、特异性单体型抗体分泌细胞和其它无关抗体的分泌细胞, 故需尽快进行亚克隆培养。

[0065] 7.1 配制亚克隆所用的半固体培养基, 10ml FetalClone I, 4ml IMDM, 26mL 2.5% 甲基纤维素, 反复颠倒混匀, 倒入 5ml 离心管中, 每管约 3ml。

[0066] 7.2 将生长在 96 孔细胞培养板中的阳性克隆细胞重悬, 取 10 μl 悬液计数, 根据计数结果吸取相应体积的悬液, 使细胞总数为 5000-6000 个, 加入到 3ml 半固体培养基, 颠倒混匀, 倒入小平皿中, 作好标记, 置湿盒内 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

[0067] 7.3 培养一周后, 每个小平皿挑选 8 个或 12 个克隆到 96 孔细胞培养板上, 用 15% FetalClone I/1×IMDM/1×sp 培养基继续培养, 用 ELISA 检测亚克隆结果, 若各孔均为阳性, 则可认为该克隆是单克隆。若阴阳交错, 则挑取其中一个阳性克隆继续亚克隆。若各孔均为阴性, 说明该阳性克隆不稳定, 已丧失分泌特异性抗体的能力。

[0068] 8. 阳性克隆扩增、冻存与复苏

[0069] 8.1 扩增将阳性克隆转移至 24 孔细胞培养板中继续培养, 待长满后转移至小培养瓶中继续扩增培养。

[0070] 8.2 冻存待上述阳性克隆生长至细胞对数生长期, 收集单细胞悬液, 1000rpm 离心 5min, 去上清, 向细胞沉淀中逐滴加入预冷的细胞冻存液 (使用前配制: 取一离心管, 加入培养基、血清, 逐滴加入二甲基亚砷 (DMSO) 至 20% 浓度, 即制成双倍的冻存液, 置于室温下待用), 轻轻吹打混匀, 使冻存细胞密度达到 1×10⁶ 个/ml ~ 1×10⁷ 个/ml (一般为 5×10⁶ 个/ml)。

[0071] 8.3 在冻存管上做好标记, 包括细胞代号及冻存日期。按每管 1 ~ 1.5mL 的量分装于冻存管内, 拧紧管盖, 放入细胞冻存盒, 置于 -80℃ 低温冰箱过夜, 然后将冻存管投入液氮

罐保存。

[0072] 8.4 复苏从液氮罐中取出冻存管,迅速放入 37℃ 水浴中慢慢晃动 2~3min,至冻存液完全溶解,将细胞转移到 15mL 离心管内,缓慢加入约 5mL 培养液,轻轻吹打混匀,将细胞悬液 1000rpm 离心 5min 后弃上清,向细胞沉淀内加入完全培养基,轻轻吹打混匀,将细胞悬液转移到培养瓶内,补足培养基,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。注:细胞冻存悬液一旦溶解后,要尽快离心除去冷冻保护液,防止冷冻保护剂对细胞产生毒性。

[0073] 实施例 2,抗 Ang-2 单体型单抗性能的鉴定

[0074] 1. 主要试剂辛酸(分析纯)、硫酸胺(分析纯)由广州化学试剂厂生产,Ang-1、Ang-3、Ang-4、VEGF、PDGF 和小鼠抗人 Ang-2 单抗购自 R&D 公司,抗小鼠各类 IgG 抗体购自武汉福士德生物工程公司、PVDF 膜购自广州维佳生物科技公司,ECL 发光显色试剂盒购自 Pierce 公司。

[0075] 2. 用间接 ELISA 鉴定抗体的特异型用单体型抗原 Ang-210ng/100 μ l/孔包被 96 孔酶联板,与筛选出的能分泌特异性抗体的杂交瘤细胞培养上清进行间接 ELISA 分析,方法同步骤 7,ELISA 结果表明共得到 22 株与单体型 Ang-2 抗原有较强结合活性的单克隆抗体细胞株。

[0076] 3. Western blotting 鉴定抗体的特异性操作步骤如下:

[0077] 3.1 SDS-PAGE 检测单体型抗原 Ang-2,将 11 μ l,10 μ g 单体型 Ang-2 样品上样,电泳至溴酚兰抵达分离胶底部结束。

[0078] 3.2 卸去玻璃板,在凝胶的一角切去一小块以便在以后的检测中识别加样顺序。

[0079] 3.3 配制 5% 脱脂奶粉 5g 脱脂奶粉溶于 100ml 1×TBST(0.05% tween-20),调节 pH 到 7.5(移液枪滴加 4N 的 NaOH,如果 pH 大于 7.5,不能用 HCl 调节,可多称 0.5~1g 脱脂奶粉)。

[0080] 3.4 处理 PVDF 膜将 PVDF 膜先浸泡于甲醇中,后用蒸馏水冲洗两次。

[0081] 3.5 转膜往平皿中倒入 pH8.3 的转移缓冲液(甲醇 20%,Tris base25mM,甘氨酸 192mM),放入滤纸,胶和膜浸泡,打开夹子使黑的一面保持水平,在上面依次放海绵垫、滤纸、胶、膜、滤纸、海绵垫,赶走气泡后合起夹子。(膜两边的滤纸不能相互接触,接触后会发生短路)将夹子放入转移槽槽中,夹子的黑面对槽的黑面,夹子的白面对槽的红面。电转移时会产热,在槽的一边放一块冰来降温。一般用 75V 转移 1h。

[0082] 3.6 封闭转膜完成后取出膜,放入 1×TBS 中浸湿后,移入含有封闭液(5%脱脂奶粉和 0.1% TBST)的平皿中,室温下脱色摇床上摇动封闭 1h 或更久。

[0083] 3.7 免疫反应倒掉封闭液,用蒸馏水冲洗 3-4 次,1×TBST 在室温脱色摇床上洗三次,每次 10min,将杂交瘤细胞上清用封闭液稀释至适当浓度后与膜在室温下孵育 1-2 小时或 40℃ 过夜。

[0084] 3.8 用 1×TBST 在室温脱色摇床上洗膜三次,每次 10min. 将 1:1000HRP-羊抗小鼠二抗与膜室温下孵育 60~80min,再用 1×TBST 洗三次,每次 10min。

[0085] 3.9 化学发光,显影和定影将 A 和 B 两种试剂等体积混合,把膜移至一保鲜膜上,将混合液滴于膜上,室温孵育 2min 后把膜放到另一保鲜膜上,去尽残液,包好,放入 X-光片夹中。暗室中,红灯下取出 X-光片,切纸刀剪裁适当大小。打开 X-光片夹,把 X-光片放在膜上,关上。根据信号的强弱适当调整曝光时间。曝光完成后,取出 X-光片迅速浸入显影

液中显影,待出现明显条带后终止显影。把 X- 光片放入定影液中定影至胶片透明为止。

[0086] 3. 10 结果发现 22 株中有 10 株结合活性强的单体型单抗,它们与抗原形成一条特异性较强的结合条带,说明这 10 株与单体型抗原能特异结合。

[0087] 4. 用免疫双向扩散法鉴定上述 10 株抗体的亚型,结果发现有 7 株是 IgG1 类免疫球蛋白,2 株是 IgG2a 类免疫球蛋白,1 株是 IgG2b 类免疫球蛋白。操作步骤如下:

[0088] 4. 1 用 PBS 配置 1 ~ 2% 的琼脂糖,煮沸后铺在载玻片上,待其自凝后用打孔器打孔,中心一个,周围 6 个。

[0089] 4. 2 中心孔加各类抗小鼠 Ig 的抗体,周围孔加阳性细胞克隆的培养上清,于湿盒中 4℃ 放置 24 ~ 48h,观察沉淀线。

[0090] 4. 3 反应完全后压干凝胶,并用吹风机吹干,在 PBS 中洗涤数次后,再吹干凝胶。

[0091] 4. 4 用考马斯亮兰染液染色 2 ~ 3min 后,脱色液脱色至条带清晰,观察结果。

[0092] 5. 单抗效价及特异性测定用 ELISA 法测定效价,以单体型 Ang-2 为抗原包被酶联板,结果显示上述 10 株单抗的效价在 1 : 800-2000 范围之内。与相关蛋白如 Ang-1、Ang-3、Ang-4、VEGF、血小板衍生生长因子 (PDGF) 等蛋白结合呈阴性反应。

[0093] 6. 单抗的大规模制备腹水的制备

[0094] 6. 1 八周龄 Balb/C 小鼠腹腔注射降植烷,1ml/ 只。一周后,收集处于对数生长期的能分泌上述特异性单抗的细胞,用无菌生理盐水洗 3 次,并调整细胞浓度到 1×10^6 /mL,注射小鼠腹腔 1ml/ 只,做好标记。

[0095] 6. 2 小鼠接种 7 ~ 10 天后可产生腹水,密切观察动物的健康状况与腹水征象,待腹水尽可能多而小鼠濒于死亡前,处死小鼠,用注射器将腹水吸入试管中,一般一只小鼠可获 5 ~ 10mL 腹水。

[0096] 6. 3 腹水处理,加入等体积的上样缓冲液,4℃ 放置过夜,次日向腹水中加入 NaCl 使浓度达到 1M,15,000g 离心 10m,去油脂,过 0.45 μ m 滤膜三次,准备上样。

[0097] 7. 纯化抗体用辛酸 - 硫酸铵方法纯化抗体。

[0098] 7. 1 用滤纸过滤腹水去沉淀和脂质,滤液用 4 倍体积 60mmol/L 醋酸缓冲液 (pH4.0) 稀释后,用 NaOH 调 pH 值至 4.5,逐滴加入辛酸 (终浓度 25 μ l/ml),室温搅拌 30 分钟后,以 6000-8000r/min 离心 30 分钟,收集上清液。

[0099] 7. 2 上清液经滤纸过滤 2 次,将滤液与 10×PBS (0.1mol/L, pH7.4) 按 10 : 1 比例混合,调 pH 至 7.4,冰浴冷却。

[0100] 7. 3 每毫升上述混合液加 0.2778 固体硫酸铵,40℃ 搅拌 30 分钟,以 4000-6000r/min 离心 20 分钟,将沉淀溶于少量 PBS,透析,测蛋白含量,冻存。

[0101] 7. 4 SDS-PAGE 电泳鉴定抗体纯度达到 90% 左右,间接 ELISA 法测定抗体效价达到 10^6 。

[0102] 实施例 3,抗 Ang-2 单体型单抗在 Ang-2 增强化学发光检测分析中的应用及优越性的体现

[0103] 1. 主要试剂过碘酸钠购自广州化学试剂厂,白蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、层粘蛋白、C 反应蛋白和 HRP 购自 Sigma 公司,XR2 发光板购自厦门佳怡美公司,Ang-2 标准品购自 R&D 公司,鲁米诺购自 Sigma 公司。BL-9600 化学发光免疫分析仪为天津贝尔公司生产。

- [0104] 2. 辣根过氧化物酶标记单体型单抗（过碘酸钠法）：
- [0105] 2.1 称取 10mg HRP 粉末于青霉素小瓶中，加入 2.5ml 双蒸水使之溶解，液体呈棕色。
- [0106] 2.2 放入磁力搅拌子搅拌的同时逐滴缓慢加入 0.5ml 新配制的 0.1MNaIO₄，室温下继续搅拌 40min，溶液呈草绿色。
- [0107] 2.3 将全部溶液用滴管装入反复用去离子水清洗的透析袋中，4℃在 1mM NaAc 缓冲液（pH4.4）中透析过夜，中间换液 3-4 次，溶液最终呈浅棕色。
- [0108] 2.4 按照酶：抗体 = 1：1 的浓度准备抗体，将抗体在 0.01M 碳酸缓冲液中透析 2 ~ 3h。
- [0109] 2.5 将透析好的 HRP 浅棕色溶液装入青霉素小瓶，搅拌下加入 0.2M 碳酸缓冲液 0.5ml，混匀后立即加入透析好的抗体，边加边用电磁搅拌器搅拌。
- [0110] 2.6 用 0.2M 碳酸缓冲液调整 HRP/ 抗体混合物的 pH 至 9.0，室温下继续搅拌 3h，加入新配制的硼氢化钠溶液 250ul，4℃放置 2h。
- [0111] 2.7 在 4℃中用 1×PBS 透析过夜，中间换液 3-4 次。
- [0112] 2.8 15,300×g 离心 15min，上清液中加入 2% thimerosal，使其终浓度为 0.01%，4℃保存备用。
- [0113] 3. 抗体配对实验筛选能在双抗夹心 ELISA 法中应用的单体型单抗组合，先用抗体粗配对实验挑选效果比较好的几株抗体，再用精确配对实验选取读数值最高的一对抗体，作为双抗夹心 ELISA 检测使用。
- [0114] 3.1 抗体粗配对实验：将上述 10 株抗体进行两两配对，步骤如下：
- [0115] 3.1.1 将酸处理过的单体抗原用包被液稀释至 100ng/mL，按每孔 100 μl 包被酶标板，置于湿盒中 4℃包被过夜。
- [0116] 3.1.2 次日弃包被液，用 PBST 清洗 4 次，快洗一次，慢洗三次，每次 5min。
- [0117] 3.1.3 每孔加入 350 μl 封闭液封闭孔中非特异吸附位点，湿盒中室温孵育 2h。
- [0118] 3.1.4 弃封闭液，将 10 种抗体两两配对共 100 种组合，每种加 50 μl 到酶联孔中，置湿盒中室温孵育 1-2h。
- [0119] 3.1.5 弃上清，用 PBST 清洗 4 次，快洗一次，慢洗三次，每次 5min。
- [0120] 3.1.6 加入用 PBST 稀释 1：500 倍 HRP 标记二抗 100 μl，置湿盒中室温孵育 1-2h。
- [0121] 3.1.7 弃二抗，用 PBST 清洗 4 次，快洗一次，慢洗三次，每次 5min。
- [0122] 3.1.8 显色，加入 100ul TMB 显色液，显色 10-15min 后用酶标仪测定 OD450 值。
- [0123] 3.1.9 选取两株抗体读数比单株抗体读数高的抗体，进行精确配对，共有 3 株抗体的配对效果比较好，将这 3 株抗体进行精确配对。
- [0124] 3.2 精确抗体配对实验
- [0125] 3.2.1 将上述纯化的 3 株单体型抗体用包被液稀释至 5 μg/mL，每孔 100 μl 包被酶标板，置于湿盒中 4℃包被过夜。
- [0126] 3.2.2 次日弃包被液，用 PBST 清洗 4 次，快洗一次，慢洗三次，每次 5min。
- [0127] 3.2.3 每孔加入 350 μl 封闭液封闭孔中非特异吸附位点，湿盒中室温孵育 2h。
- [0128] 3.2.4 弃封闭液，加入用封闭液倍比稀释的单体抗原，每孔加 100 μl 到酶联孔中，置湿盒中室温孵育 1-2h。

- [0129] 3.2.5 弃上清,用 PBST 清洗 4 次,快洗一次,慢洗三次,每次 5min。
- [0130] 3.2.6 加入用 PBST 做适当稀释度的 HRP 标记单体型抗体 100 μ l,置湿盒中室温孵育 1-2h。
- [0131] 3.2.7 弃上清,用 PBST 清洗 4 次,快洗一次,慢洗三次,每次 5min。
- [0132] 3.2.8 显色,加入 100u1 TMB 显色液,显色 10-15min 后用酶标仪测定 OD450 值。
- [0133] 3.2.9 选取线性范围较宽 (0-0.5 μ g/ml),灵敏度较高的两株单体型抗体作为双抗夹心 ELISA 检测试剂的配对抗体。
- [0134] 4. 双抗夹心 ELISA 为原理的增强化学发光检测试剂反应条件的优化
- [0135] 4.1 包被抗体和检测抗体浓度的确定,步骤如下:
- [0136] 4.1.1 将包被抗体浓度用包被液稀释 4000 倍和 2,0000 倍两个值,包被 100 μ l 于乳白色不透明聚苯乙烯板条,4 $^{\circ}$ C 包湿盒包被过夜。
- [0137] 4.1.2 每孔加入 350 μ l 封闭液封闭孔中非特异吸附位点,湿盒中室温孵育 2h,弃干液体,每孔中加入洗涤液 PBST 约 300 μ l,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次。
- [0138] 4.1.3 加入 100 μ l 10ng Ang-2 标准品,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 30min 后倒尽板孔中反应液,每孔中加入洗涤液 PBST 约 300 μ l,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次。
- [0139] 4.1.4 加入 50 μ l 用 4000 倍和 2,0000 稀释的另一株单体型抗体和 50u1HRP- 标记的多抗混合液,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 30min 后倒尽板孔中反应液,每孔中加入洗涤液 PBST 约 300u1,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次,最后一次将板中液体拍干,以防影响检测结果的准确性。
- [0140] 4.1.5 加入 50 μ l 底物 A 液 (10mmol/L 鲁米诺和发光增强剂) 和 50 μ l 底物 B 液 (主要成分为 0.1% H₂O₂),充分振荡混匀并避免产生气泡,室温避光放置 5min,用化学发光免疫分析仪测量 (最好在底物加完后 5-8min 内测量)。
- [0141] 4.1.6 结果发现将抗体浓度稀释到 2,0000 倍时检测不到抗原分子,稀释倍数太高,而将抗体浓度稀释 4000 倍时,阳性结果很明显,于是将抗体分子的浓度再做 4000,5000 和 1,0000 倍稀释,按照上述步骤重复实验,发现抗体浓度稀释 5000 倍时仍能灵敏地检测抗原分子。
- [0142] 4.2 洗涤液、洗涤强度、反应条件的确定按照上述步骤和抗体浓度进行操作,只是洗涤液 Tween20 的浓度试用 0.01%、0.05% 和 0.1% 三种浓度,孵育时间试用 30min、45min、1h 三个时间点,依据实验结果确定洗涤液 Tween20 的浓度用 0.01%、孵育时间用 30min、静置 20 秒和洗板 5 次的实验条件下的背景值最低。
- [0143] 4.3 产品性能指标检测标准曲线制作 (用常规的抗 Ang-2 单抗检测未处理的 Ang-2 标准品作为实验对照)
- [0144] 4.3.1 将包被抗体浓度用包被液稀释 5000 倍 (NaHCO₃ pH8.6),包被 100u1 于 XR2 发光板,4 $^{\circ}$ C 湿盒包被过夜。
- [0145] 4.3.2 每孔加入 350 μ l 封闭液封闭孔中非特异吸附位点,湿盒中室温孵育 2h,弃干液体,每孔中加入洗涤液 PBST (0.01% Tween-20) 约 300 μ l,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次。
- [0146] 4.3.3 加入 100 μ l 5 倍倍比浓度增加的酸处理过的 Ang-2 标准品 (0.05ng/mL、0.15ng/mL、0.45ng/mL、1.35ng/mL、4.05ng/mL、12.1ng/mL、36.3ng/mL、100ng/mL),100 μ l

PBS 作为阴性对照,振荡混匀,37℃温育 30min 后倒尽板孔中反应液,每孔中加入洗涤液 PBST 约 300 μ l,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次。

[0147] 4.3.4 加入 50 μ l 1 : 5000 倍稀释的另一株单体型抗体和 50 μ l HRP- 标记的单抗混合液,振荡混匀,37℃温育 30min 后倒尽板孔中反应液,每孔中加入洗涤液 PBST 约 300 μ l,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次,最后一次将板中液体拍干,以防影响检测结果的准确性。

[0148] 4.3.5 加入 50 μ l 底物 A 液 (10mmol/L 鲁米诺和发光增强剂) 和 50 μ l 底物 B 液 (主要成分为 0.1% H_2O_2),充分振荡混匀并避免产生气泡,室温避光放置 5min,用化学发光免疫分析仪测量 (最好在底物加完后 5-8min 内测量)。

[0149] 4.3.6 抗 Ang-2 单体型单抗检测单体抗原的标准曲线如图 1,检测的灵敏度为 0.05ng/mL,线性范围是 50pg/mL-12ng/mL,线性相关系数 $r = 0.9979$ 。

[0150] 4.3.7 抗 Ang-2 单抗检测聚合体抗原 (实验对照) 的标准曲线如图 2,检测的灵敏度为 0.3ng/mL,线性范围是 300pg/mL-10ng/mL,线性相关系数 $r = 0.9959$ 。单体型单抗与单克隆抗体在增强化学发光免疫定量检测试剂应用中的比较如图 3。

[0151] 4.4 精密度测定将同一批次的 Ang-2 标准品用酸处理成为单体抗原,每一批次重复做 10 个孔,按照上述步骤进行测定,依据函数公式: $STDEV(A1:D2)/Average(A1:D2) \times 100$ 计算得批内 CV 值小于 15%。将不同批次的 Ang-2 标准品 (约 10 批,每批次重复 3 个孔),用酸处理成为单体抗原,按照上述步骤进行测定和计算,测得批间 CV 值小于 18%。

[0152] 4.5 特异性分析 (用常规的抗 Ang-2 单抗作为实验对照) 按照标准曲线制作步骤进行操作,只是所测的样品换成白蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、层粘蛋白和 C 反应蛋白,结果显示抗 Ang-2 单体型单抗检测试剂和抗 Ang-2 单抗一样,都与 10mg/ml 白蛋白、5mg/ml 球蛋白、1mg/ml 脂蛋白、0.1mg/ml 血红蛋白、2mg/ml 层粘蛋白和 10 μ g/ml C 反应蛋白不发生交叉反应,特异性好。将所测样品换成浓度为 100ng/ml 的 Ang-1,糖类抗原 CA125、AFP 和 CEA 等肿瘤标志物发现,这两种抗体与这些蛋白也不发生交叉反应,特异性好。

[0153] 实施例 4,抗 Ang-2 单体型单抗在 Ang-2 的 ELISA 检测分析中的应用及优越性的体现

[0154] 1. 产品性能指标检测标准曲线制作 (用常规的抗 Ang-2 单抗检测未处理的 Ang-2 标准品作为实验对照)

[0155] 1.1 将包被抗体浓度用包被液稀释 5000 倍 ($NaHCO_3$ pH8.6),包被 100 μ l 于酶联板,4℃湿盒包被过夜。

[0156] 1.2 每孔加入 350 μ l 封闭液封闭孔中非特异吸附位点,湿盒中室温孵育 2h,弃干液体,每孔中加入洗涤液 PBST (0.01% Tween-20) 约 300 μ l,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次。

[0157] 1.3 加入 100 μ l 3 倍倍比浓度增加的酸处理过的 Ang-2 标准品 (0.2ng/mL、0.6ng/mL、1.8ng/mL、5.4ng/mL、15ng/mL、45ng/mL),100 μ l PBS 作为阴性对照,振荡混匀,37℃温育 30min 后倒尽板孔中反应液,每孔中加入洗涤液 PBST 约 300 μ l,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次。

[0158] 1.4 加入 50 μ l 1 : 5000 倍稀释的另一株单体型抗体和 50 μ l HRP- 标记的单抗

混合液,振荡混匀,37℃温育 30min 后倒尽板孔中反应液,每孔中加入洗涤液 PBST 约 300 μ l,静置 20 秒左右,弃干液体,如此重复洗板 5 次,最后一次将板中液体拍干,以防影响检测结果的准确性。

[0159] 1.5 加入 100 μ l TMB 底物溶液和 H₂O₂,充分振荡混匀并避免产生气泡,室温避光放置 15min,再加入 50 μ l 底物终止液,用酶标仪测定 OD450nm 值。

[0160] 1.6 抗 Ang-2 单体型单抗检测单体抗原,检测的灵敏度为 0.6ng/mL,线性范围是 600pg/mL-15ng/mL。

[0161] 1.7 抗 Ang-2 单抗检测聚合体抗原(实验对照),检测的灵敏度为 1ng/mL,线性范围是 1ng/mL-20ng/mL。

[0162] 2. 特异性分析(用抗 Ang-2 单抗作为实验对照)按照标准曲线制作步骤进行操作,只是所测的样品换成白蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、层粘蛋白和 C 反应蛋白,结果显示抗 Ang-2 单体型单抗检测试剂和抗 Ang-2 单抗一样,都与上述血液中存在的蛋白不发生交叉反应,特异性好。将所测样品换成 Ang-1,糖类抗原 CA125、AFP 和 CEA 等肿瘤标志物发现,这两种抗体与这些蛋白也不发生交叉反应,特异性好。

[0163] 以表格形式总结抗 Ang-2 单体型单抗与抗 Ang-2 单抗在 CLIA 和 ELISA 检测中的性能比较,以便更清楚地认识抗 Ang-2 单体型单抗在定量检测抗原应用中的优越性。

[0164]

		抗 Ang-2 单体型单抗	抗 Ang-2 单抗
增强化学 发光法	灵敏度	0.05ng/ml	0.3ng/ml
	线性范围	50pg/ml-12ng/ml	300pg/ml-10ng/ml
	特异性	强	强
酶联免疫 分析法	灵敏度	0.6ng/ml	1ng/ml
	线性范围	0.6ng/ml-15ng/ml	1ng/ml-20ng/ml
	特异性	强	强

[0165] 已通过上述各实施方案和具体实施例对本发明作出说明,但本领域技术人员会理解,在不偏离本发明宗旨和范围的情况下,可对本发明作出各种修改、变更和替换。

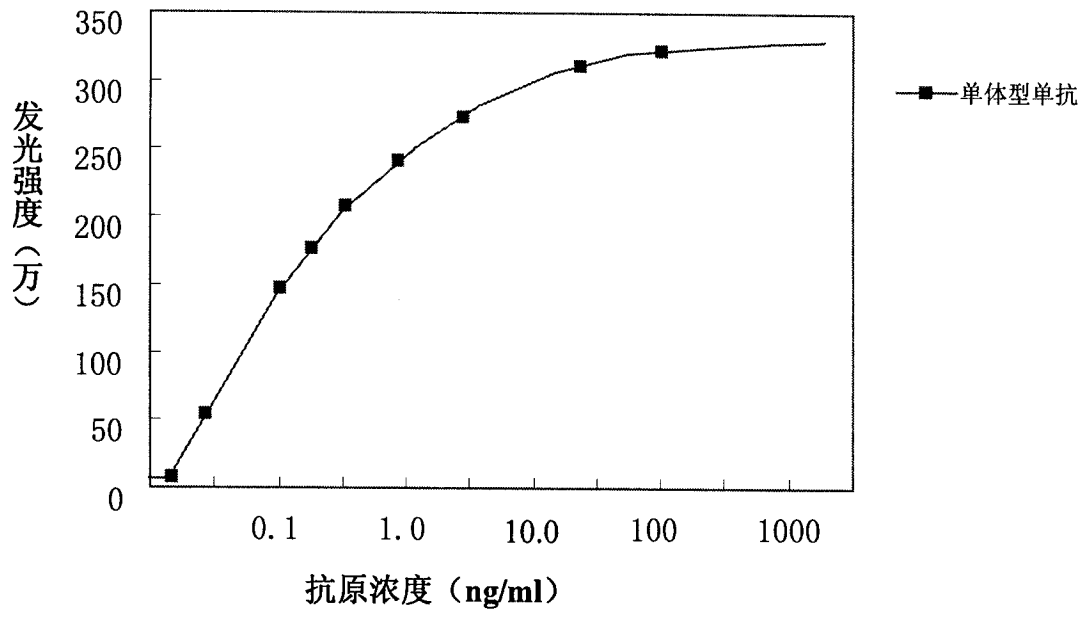


图 1

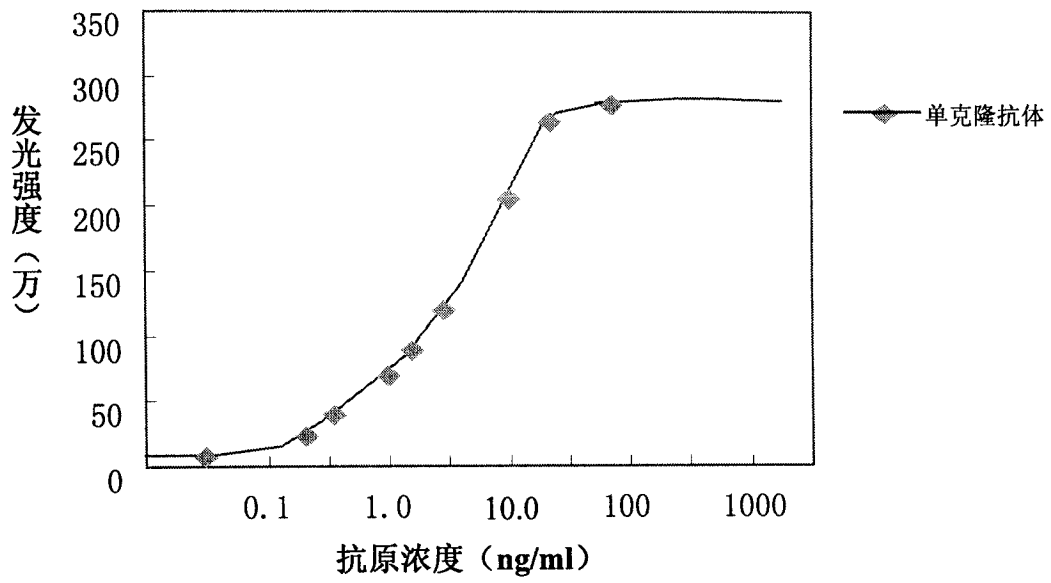


图 2

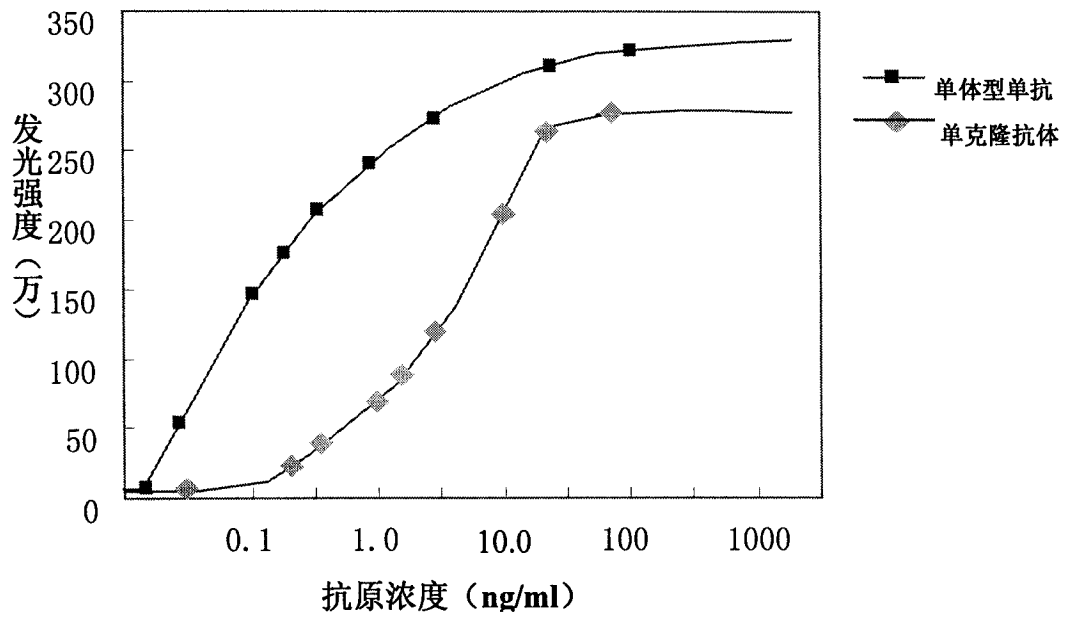


图 3

专利名称(译)	抗促血管生成素2等聚集体蛋白的单体型抗体的制备及在免疫检测方法中的应用		
公开(公告)号	CN101709091A	公开(公告)日	2010-05-19
申请号	CN200910008107.X	申请日	2009-03-02
[标]发明人	王虹		
发明人	王虹		
IPC分类号	C07K16/22 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种对存在聚集体结构的蛋白质采用甘氨酸酸性缓冲液进行酸处理，使之成为游离单体抗原，并以单体抗原为免疫原免疫动物制备针对蛋白线性表位的单体型抗体的方法，使用这种抗体能提高免疫学定量检测聚集体结构蛋白的准确性。以本发明方法制备的小鼠抗人促血管生成素2(Angiopoietins, Ang2)单体型单抗，生产的化学发光免疫定量检测试剂，检测的灵敏度达到50pg/ml，定量线性范围在50pg/ml-12ng/ml，特异性强；生产的酶联免疫检测试剂，灵敏度达到600pg/ml，定量线性范围在0.6ng/ml-15ng/ml，特异性强。

