



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110531077 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201810512663.X

(22)申请日 2018.05.25

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C201811 2017.12.20

(71)申请人 荣昌生物制药(烟台)有限公司

地址 264006 山东省烟台市烟台经济技术
开发区北京中路56号

(72)发明人 毛海燕 于占娇 肖童雨 李壮林
房健民

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

间皮素免疫组化检测试剂盒

(57)摘要

本申请涉及一种间皮素(Mesothelin,MSLN)
免疫组化检测试剂盒,其含有MSLN单克隆抗体3-
2G6。

1. 用于检测MSLN的免疫组化抗体组合物,其含有抗MSLN单克隆抗体3-2G6,所述抗体由以保藏编号CCTCC C201811于2017年12月20日保藏于中国典型培养物保藏中心的杂交瘤细胞产生。

2. 权利要求1所述的免疫组化抗体组合物,所述抗体组合物通过将所述抗体与抗体稀释液相混合得到,其中所述抗体稀释液包含PH 7.2的磷酸缓冲液,优选地,所述磷酸缓冲液浓度为0.005-0.5M,更优选0.01-0.1M。

3. 权利要求2所述的免疫组化抗体组合物,所述抗体稀释液还包含:0.5%-5%的蛋白质保护剂、0.05%-0.5%的表面活性剂和0.01%-0.2%的防腐剂;优选地,1%-3%的蛋白质保护剂、0.05%-0.2%的表面活性剂和0.02%-0.1%的防腐剂;更优选地,1%的蛋白质保护剂、0.05%的表面活性剂和0.05%的防腐剂。

4. 权利要求3所述的免疫组化抗体组合物,其中所述蛋白质保护剂包含牛血清白蛋白,所述表面活性剂包含吐温20,所述防腐剂包含2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮。

5. 权利要求2所述的免疫组化抗体组合物,其中所述抗体稀释液还包含0.05-0.5M NaCl,优选地0.1-0.3M NaCl,更优选0.15M NaCl。

6. 权利要求2所述的免疫组化抗体组合物,其中所述抗体稀释液包含:0.05M磷酸缓冲液、0.15M NaCl、1%牛血清白蛋白、0.05%吐温20和0.05%的ProClin300。

7. 权利要求1或2所述的免疫组化抗体组合物,其中所述抗MSLN单克隆抗体以抗体溶液的形式存在,其中抗体浓度为0.05-20 μ g/ml,更优选0.2-10 μ g/ml,最优选0.3-5 μ g/ml。

8. 权利要求7所述的免疫组化抗体组合物,其中所述抗体溶液(初始浓度1mg/ml)与所述抗体稀释液的体积比为1:200-1:18000,优选1:1600-1:6400,更优选1:3200。

9. 权利要求1-8中任一项所述的免疫组化抗体组合物在制备间皮素检测免疫组化试剂盒中的应用。

10. 用于检测MSLN的免疫组化试剂盒,其包含权利要求1-11中任一项所述的免疫组化抗体组合物。

11. 权利要求10所述的免疫组化试剂盒,其还包含:抗原修复液、免疫组化笔以及细胞质控片。

12. 权利要求11所述的免疫组化试剂盒,所述抗原修复液包含0.01M的柠檬酸或其盐,其pH为6.0。

13. 权利要求11所述的免疫组化试剂盒,所述细胞质控片包括作为对照的4种细胞,其分别为:间皮素阴性表达的293细胞、间皮素弱阳性表达的CFPAC-1细胞、间皮素阳性表达的OVCAR-3细胞、间皮素强阳性表达的OVCAR-3-MSLN细胞,其中所述OVCAR-3-MSLN细胞为经遗传修饰从而表达外源MSLN的OVCAR-3细胞。

14. 权利要求13所述的免疫组化试剂盒,所述OVCAR-3-MSLN细胞通过以下方法得到:

(1) 目的基因表达载体的构建

设计引物从包含人MSLN编码序列的载体上扩增全长MSLN,使用胶回收试剂盒进行切胶回收,并用限制性内切酶进行酶切,同时使用同种内切酶酶切慢病毒表达载体;将MSLN基因片段和表达载体进行连接,将连接产物转化到感受态细胞中,扩增后涂布平板,挑取单个菌落进行菌落PCR,选取扩增产物正确的菌落进行测序;测序正确重组质粒即为构建好的表达

质粒；

(2) 目标基因慢病毒的包装

接种293T细胞于培养瓶中,过夜培养后更换无血清培养基,将表达载体、包装载体和包膜载体混合后再与Lipofectamine2000混合后加入293T细胞(转染了腺病毒E1A基因的人肾上皮细胞系)中,培养48小时候收集上清并浓缩后分装;

(3) 目的细胞的获得

取对数生长期目的细胞,加入24孔板中,过夜培养;吸去细胞原有的培养基,加入病毒稀释液和稀释好的polybrene溶液,感染总体积为250 μ L,轻轻混匀;感染24小时后,去除含病毒的培养液,换上新鲜的完全培养基继续培养;对于携带嘌呤霉素抗性基因的病毒换上含嘌呤霉素的新鲜完全培养基,得到稳定转染的细胞株;将上述获得的过表达MSLN目的基因稳转细胞株采用有限稀释法获得单克隆,根据病理组织中MSLN表达强度,选择MSLN表达强度与病理组织中MSLN高表达强度一致的细胞株,从而得到OVCAR-3-MSLN为MSLN强阳性表达细胞。

15. 一种使用根据权利要求1-8中任一项所述的免疫组化抗体组合物针对离体石蜡组织样本中MSLN表达进行非诊断目的的检测方法,所述步骤为:

(1) 将肿瘤组织样本固定在福尔马林溶液中,然后进行梯度乙醇脱水,脱水后的组织置于二甲苯中透明,后浸入融化的低熔点石蜡中,进行石蜡包埋,待蜡块凝固后,切成厚度3-5 μ m的薄片,使用涂有多聚赖氨酸的玻片捞起组织后用漂烘仪烘干;

(2) 组织切片于65 $^{\circ}$ C烤片1小时后,在二甲苯中进行脱蜡处理,然后进行梯度乙醇水化;

(3) 在高压锅中加入抗原修复液,进行高压或热修复处理,待抗原修复液自然冷却至室温取出玻片,PBST浸泡;

(4) 甩去切片上组织周围的液体,用免疫组化油笔在组织外围画圈,在圈定区域内加新鲜配制的3%过氧化物酶阻断液,37 $^{\circ}$ C孵育,PBST清洗切片;添加根据权利要求1-8中任一项所述的免疫组化抗体组合物,同时设置阴性对照、空白对照和阳性对照,37 $^{\circ}$ C孵育,PBST清洗切片;

(5) 滴加1-2滴检测试剂I覆盖切片上组织,37 $^{\circ}$ C孵育,用PBST浸洗;小心甩去切片上组织周围的液体,滴加检测试剂II覆盖切片上组织,37 $^{\circ}$ C孵育,用PBST浸洗;上述检测试剂I、II分别为聚合物放大反应二抗系统DAB检测试剂盒中的反应放大剂和高敏型酶标抗小鼠/兔IgG聚合物;然后使用新鲜配制的DAB显色剂显色,PBST浸泡终止显色;Mayer's苏木素染核,用水冲洗多余苏木素后,再经脱水,透明,封片,用光学显微镜进行染色结果的读取及拍照。

间皮素免疫组化检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测间皮素 (Mesothelin, MSLN) 的免疫组化试剂盒。

背景技术

[0002] 间皮素 (Mesothelin, MSLN) 是一种细胞表面糖蛋白。间皮素基因编码的是一个 71KD 的前蛋白, 经修饰切割变成两段, 分别是 41KD 的糖基化磷脂酰肌醇细胞膜锚定蛋白和 30KD 的被称为巨核细胞促进因子的游离片段。有研究证实 41KD 的膜锚定蛋白包含一段与另一个肿瘤标志物 CA125 蛋白的结合区, 其可能与细胞粘附相关, 因而该锚定蛋白可能有助于肿瘤的转移, 并导致预后效果不理想。最新研究表明: MSLN 在几乎全部的间皮瘤和胰腺癌, 多数的卵巢癌和肺癌中高度表达, 在正常组织中很少表达, 一般只在胸膜间皮细胞衬、腹膜和心包有一定量表达。虽然目前 Mesothelin 的功能尚不确切, 但是无论是细胞膜结合区还是游离区都被证实可以作为间皮癌、胰腺癌、卵巢癌等多种肿瘤的标志物和治疗靶点。

[0003] 免疫组化方法的主要原理是: 应用免疫学基本原理——抗原抗体反应, 即抗原与抗体特异性结合的原理, 通过化学反应使标记抗体的显色剂 (荧光素、酶、金属离子、同位素) 显色来确定组织细胞内抗原 (多肽和蛋白质), 对其进行定位、定性及相对定量的研究方式。

[0004] 免疫组化技术的主要特点是: 1. 特异性强: 免疫学的基本原理决定了抗原与抗体之间的结合具有高度特异性; 2. 敏感性高: 抗体稀释上千倍、上万倍甚至上亿倍仍可在组织细胞中与抗原结合, 这样高敏感性的抗体抗原反应, 使免疫组化方法越来越方便地应用于常规病理诊断工作; 3. 定位准确: 该技术通过抗原抗体反应及呈色反应, 可在组织和细胞中进行抗原的准确定位, 因而可同时对不同抗原在同一组织或细胞中进行定位观察, 这样就可以进行形态与功能相结合的研究, 对病理学研究的深入具有重要的意义。在靶向药物的研究和临床使用过程中, 采用免疫组化方法对病理组织中的目标抗原进行定位和相对定量的检测, 可以预测患者是否有可能从该靶向药物的治疗中受益, 在靶向药物临床试验过程中可以提高试验成功率, 在靶向药物临床使用过程中可以提高用药精准度。目前, 已经有多款以免疫组化为原理的伴随诊断试剂盒上市, 例如: VENTANA ALK IHC 检测试剂盒是获得 FDA 批准的用于识别适合靶向药物赫赛汀治疗的患者的体外诊断 IHC 检测试剂盒, 2014 年在华获批上市, 获得了广泛的关注。但是目前尚缺乏能够满足市场需要的快速对间皮素蛋白表达进行有效检测的免疫组化抗体试剂以及相关检测方法。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的缺陷, 本发明提供了一种用于经福尔马林固定石蜡包埋的人胰腺癌、卵巢癌、间皮瘤等组织中 MSLN 的定位和半定量检测的免疫组化抗体试剂, 可以对肿瘤治疗间皮素靶向用药提供指导。

[0006] 由于经福尔马林固定石蜡包埋组织中 MSLN 抗原结构发生改变, 市售抗 MSLN 的抗体难以有效结合并实现检测, 针对这一现象本发明提供一种杂交瘤细胞株, 该细胞可产能够

特异性识别变性MSLN抗原的单克隆抗体。且所述杂交瘤细胞株于2017年12月20日保藏于中国典型培养物保藏中心(简称:CCTCC;地址:中国武汉市武昌珞珈山),分类命名为杂交瘤细胞3-2G6,保藏编号为CCTCC C201811。

[0007] 一方面,本发明提供一种检测MSLN的免疫组化抗体组合物,其含有抗MSLN单克隆抗体3-2G6,所述抗体由以保藏编号CCTCC C201811于2017年12月20日保藏于中国典型培养物保藏中心的杂交瘤细胞产生。

[0008] 在一些实施方案中,本发明的抗体组合物通过将本发明的抗体与抗体稀释液相混合得到,其中所述抗体稀释液包含PH 7.2的磷酸(PB)缓冲液,优选地,所述磷酸缓冲液浓度为0.005-0.5M,更优选0.01-0.1M。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗体稀释液还包含:0.5%-5%的蛋白质保护剂、0.05%-0.5%的表面活性剂和0.01%-0.2%的防腐剂;优选地,1%-3%的蛋白质保护剂、0.05%-0.2%的表面活性剂和0.02%-0.1%的防腐剂;更优选地,1%的蛋白质保护剂、0.05%的表面活性剂和0.05%的防腐剂。

[0010] 在一些实施方案中,所述蛋白质保护剂包含牛血清白蛋白,所述表面活性剂包含吐温20,所述防腐剂包含2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮。

[0011] 在一些实施方案中,所述抗体稀释液还包含0.05-0.5M NaCl,优选地0.1-0.3M NaCl,更优选0.15M NaCl。

[0012] 在一些实施方案中,所述抗体稀释液包含:0.05M磷酸缓冲液、0.15MNaCl、1%牛血清白蛋白、0.05%吐温20和0.05%的ProClin300。

[0013] 在一些实施方案中,所述抗MSLN单克隆抗体以抗体溶液的形式存在,其中抗体浓度为0.05-20 μ g/ml,更优选0.2-10 μ g/ml,最优选0.3-5 μ g/ml。

[0014] 在一些实施方案中,所述抗体溶液与所述抗体稀释液的体积比为1:200-1:18000,优选1:1600-1:6400,更优选1:3200。

[0015] 另一方面,本申请涉及本发明的免疫组化抗体组合物在制备间皮素检测免疫组化试剂盒中的应用。

[0016] 另一方面,本申请涉及用于检测MSLN的免疫组化试剂盒,其包含本申请所述的免疫组化抗体组合物。

[0017] 在一些实施方案中,本发明的免疫组化试剂盒还包含:抗原修复液、免疫组化笔以及细胞质控片。

[0018] 在一些实施方案中,本发明的免疫组化试剂盒中所述抗原修复液包含0.01M的柠檬酸或其盐,其pH为6.0。

[0019] 在一些实施方案中,本发明的免疫组化试剂盒包含细胞质控片,其中所述细胞质控片包括作为对照的4种细胞,其分别为:间皮素阴性表达的293细胞、间皮素弱阳性表达的CFPAC-1细胞、间皮素阳性表达的OVCAR-3细胞、间皮素强阳性表达的OVCAR-3-MSLN细胞,其中所述OVCAR-3-MSLN细胞为经遗传修饰从而表达外源MSLN的OVCAR-3细胞。

[0020] 在一些实施方案中,所述蛋白质保护剂优选为BSA(即为牛血清白蛋白)。

[0021] 在一些实施方案中,所述表面活性剂为优选Tween-20。

[0022] 在一些实施方案中,所述防腐剂为优选ProClin300。所述ProClin300包含:2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮。

[0023] 另一方面,本发明提供了由杂交瘤细胞3-2G6生产抗MSLN单克隆抗体用于检测经福尔马林固定石蜡包埋组织中MSLN的非诊断目的地的检测方法,其特征在于:

[0024] 1.将肿瘤样本固定在福尔马林溶液中,然后进行梯度乙醇脱水,脱水后的组织置于二甲苯中透明,浸入融化的低熔点石蜡中,之后进行石蜡包埋,待蜡块凝固后,切成厚度3-5 μ m的薄片,使用涂有多聚赖氨酸的玻片捞起组织后用漂烘仪烘干;

[0025] 2.组织切片于65℃烤片1小时后,在二甲苯中进行脱蜡处理,然后进行梯度乙醇水化;

[0026] 3.在高压锅中加入抗原修复液,高压锅开盖在电磁炉上大火加热至抗原修复液沸腾,停火,将切片浸没入修复液中盖上锅盖,扣上压力阀,加热至喷气,从喷气开始,调至中火计时2.5分钟,停火,拔下电源;把压力锅转移到实验台上,打开锅盖,待抗原修复液自然冷却至室温取出玻片,PBST浸泡;所述PBST为:磷酸盐吐温缓冲液;

[0027] 4.甩去切片上组织周围的液体,用免疫组化油笔在组织周围画圈,在圈定区域内加新鲜配制的3%过氧化物酶阻断液,37℃孵育10分钟,PBST清洗切片2次;加3-2G6抗体溶液,同时设置阴性对照、空白对照和阳性对照,37℃孵育60分钟,PBST清洗切片2次;

[0028] 5.滴加1-2滴检测试剂I覆盖切片上组织,37℃孵育10分钟,用PBST浸洗2次,小心甩去切片上组织周围的液体,滴加1-2滴检测试剂II覆盖切片上组织,37℃孵育10分钟,用PBST浸洗2次;上述检测试剂I、II分别为聚合物放大反应二抗系统DAB Detection Kit(福州迈新,货号:KIT-0016)中的反应放大剂和高敏型酶标抗小鼠/兔IgG聚合物;然后使用新鲜配制的DAB显色剂显色1分钟,PBST浸泡终止显色;Mayer's苏木素染核1分钟,用水冲洗多余苏木素后,再经脱水,透明,封片,用光学显微镜进行染色结果的读取及拍照。

[0029] 在一些实施方案中,待检测标本的抗原修复条件可以是:待测标本可以使用pH6.0的柠檬酸缓冲溶液进行高压修复,修复时间为2.5分钟,也可以使用该缓冲液进行热修复,修复条件为95-97℃,20分钟。

[0030] 在一些实施方案中,所述标本应在离体的30分钟内固定在福尔马林溶液中。

[0031] 在一些实施方案中,所述抗原修复液为:0.01M pH 6.0的柠檬酸盐缓冲液,修复条件是:采用上述修复液在高压条件下进行修复。

[0032] 在一些实施方案中,所述大火条件为:1600W 210℃;所述中火条件为:800W 130℃。

[0033] 在一些实施方案中,本申请所述3-2G6抗体溶液为即用型3-2G6抗体溶液,抗体浓度优选为0.05-2 μ g/mL,更优选0.2-1 μ g/mL,最优选0.31 μ g/mL;阴性对照抗体为小鼠单克隆抗体IgG1同型对照(CST,CatalogNo.5415),克隆号G3A1;阳性对照样本和阴性对照样本可用4合1细胞质控片,质控片是将4个不同间皮素表达水平的细胞制备石蜡块,并按照组织芯片的要求重新制备于一个新的石蜡块中,切片得到的;其中MSLN阴性表达的细胞系为293(0);MSLN弱阳性表达细胞为CFPAC-1(1);MSLN阳性表达细胞OVCAR-3(2);MSLN强阳性表达的细胞OVCAR-3-MSLN细胞(3)。

[0034] 利用检测MSLN的免疫组化抗体试剂检测待检测组织标本(为手术或穿刺的肿瘤组织经福尔马林固定石蜡包埋后切为厚度为3-5 μ m的薄片)中MSLN的表达情况,检测结果可对肿瘤治疗MSLN靶向用药提供指导。

[0035] 另一方面,进一步的检测结果为MSLN的表达值是,病理学家通过免疫组化染色情

况结合细胞质控片对所检组织标本中的肿瘤细胞进行半定量的由0-3的整数打分得出。在与药物共同临床之前,先将染色强度作为评分标准。其中0分表示:肿瘤细胞未出现任何形式的染色;1分表示:肿瘤细胞出现细胞膜染色,但是染色强度<CFPAC-1细胞的染色强度;2分表示:肿瘤细胞出现细胞膜染色,染色强度大于CFPAC-1,小于OVCAR-3-MSLN;3分表示:肿瘤细胞细胞膜出现染色,染色强度 $\geq$ OVCAR-3-MSLN。需要明确的是参与评分的为活的肿瘤细胞,且打分的基于定位在细胞膜上的MSLN进行的(即:只有细胞质单独染色的细胞不列入计数范围)。

[0036] 上述评分标准中提到细胞质控片由已知MSLN表达水平的细胞制备,其中包括4个细胞团:其中293细胞为MSLN阴性细胞,CFPAC-1细胞为MSLN弱阳性表达的细胞,OVCAR-3为MSLN阳性表达细胞,以上三种细胞均可通过商业化途径买到;OVCAR-3-MSLN为MSLN强阳性表达细胞,其制备方法如下:

[0037] 1.目的基因的扩增:设计引物从目的基因载体上获取扩增目的基因MSLN全长;

[0038] 2.目的基因与表达质粒酶切:扩增后的目的基因MSLN使用胶回收试剂盒进行切胶回收,并用限制性内切酶进行酶切,同时使用同种内切酶酶切表达载体pHBLV-CMV-ZsGreen-puro;

[0039] 3.目的基因表达质粒的构建:将目的基因片段和表达载体进行连接;将连接产物转化到感受态细胞中,扩增后涂布平板;挑取单个菌落进行菌落PCR;选取扩增产物正确的菌落进行测序;测序正确重组质粒即为构建好的表达质粒;

[0040] 4.目标基因慢病毒的包装:接种 1×10^7 个293T细胞于T75培养瓶中,过夜培养后更换无血清培养基,将表达质粒、包装质粒和包膜质粒混合后再与Lipofectamine2000 (Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent货号:11668027)混合后加入293T细胞中,培养48小时收集上清并浓缩后分装;

[0041] 5.目的细胞感染:取对数生长期目的细胞 5×10^4 个/mL,0.5mL/孔加入24孔板中,过夜培养;吸去细胞原有的培养基,加入病毒稀释液和稀释好的polybrene溶液,感染总体积为250 μ L,轻轻混匀;感染24小时后,去除含病毒的培养液,换上新鲜的完全培养基继续培养;对于携带嘌呤霉素抗性基因的病毒换上含嘌呤霉素的新鲜完全培养基,得到稳定转染的细胞株;

[0042] 6.目的细胞的获得:将上述获得的过表达MSLN目的基因稳转细胞株采用有限稀释法获得单个克隆,根据病理组织中MSLN表达强度,选择MSLN表达强度与病理组织中MSLN高表达强度一致的细胞株,从而得到OVCAR-MSLN为MSLN强阳性表达细胞。

[0043] 最后,本申请还涉及相关免疫组化抗体试剂或免疫组化抗体试剂盒在用于制备肿瘤检测试剂中的用途。

[0044] 本发明取得了如下技术效果:本申请所使用的即用型抗体,即通过抗体缓冲液中添加保护蛋白与防腐剂等成分,能够实现如下效果:减少抗体与组织的非特异性结合,从而可以省略BSA血清封闭步骤及其类似步骤;使抗体在较低浓度下保证长期稳定,有利于提高检测的效率和灵敏度。

[0045] 使用本申请的检测试剂盒或检测试剂能够实现快速准确针对细胞表面间皮素蛋白的检测,高于目前市面上同类试剂盒的检测灵敏度和准确度。本申请针对免疫组化检测技术的特点设计并获得了能够适用于免疫组化实验的特异性强的单克隆抗体,克服了由于

经福尔马林固定石蜡包埋组织中MSLN抗原结构发生改变,市售抗MSLN的抗体难以有效结合并实现检测的缺陷。

[0046] 本申请获得免疫组化抗体试剂能够保证抗MSLN单克隆抗体的反应性和有效期,且用户获得本申请相关产品后无需进行任何操作便可直接使用,提高了检测的便捷性。

附图说明

[0047] 图1显示了抗MSLN单克隆抗体纯度检测图谱结果;经灰度扫描分析,抗MSLN单克隆抗体条带面积百分比为95%,纯度符合要求。

[0048] 图2.A图显示了不同抗原修复条件下染色效果对比;其中(1)和(2)分别为两个不同的卵巢癌病理组织;1-3分别代表抗原修复条件1-3;B图显示了不同稀释比例3-2G6抗体对OVCAR-3细胞石蜡切片的染色结果,其中,1-6为1mg/mL的3-2G6抗体:PBST比例分别为1:25、1:100、1:400、1:1600、1:6400和1:25600时对OVCAR-3细胞石蜡切片的染色结果,在相同实验条件下OVCAR-3石蜡切片的染色强度与组织中肿瘤细胞中等MSLN染色强度相对应;C图显示了一抗孵育时间30分钟(1)和60分钟(2)的染色结果。

[0049] 图3.A图显示了Tris缓冲液与PB缓冲液下染色效果的对比,分别采用了“pH7.4 0.05M TRIS缓冲液”与“pH7.4 0.05M PB缓冲液”稀释的3-2G6抗体孵育进行免疫组化染色,图片分别列举了4个视野的染色情况;B图显示了5个离子浓度缓冲液的染色结果。条件1-缓冲液中总Na离子浓度为0.020M,条件2-缓冲液中总Na离子浓度为0.095M,条件3-缓冲液中总Na离子浓度为0.165M,条件4-缓冲液中总Na离子浓度为0.184M,条件5-缓冲液中总Na离子浓度为0.219M;C图显示了即用型3-2G6抗体制剂对肿瘤组织中不同程度MSLN表达细胞的染色结果;其中,1-4分别为优选缓冲液制备的即用型3-2G6抗体制剂对肿瘤组织中MSLN表达为阴性、弱阳性、阳性及强阳性表达的肿瘤细胞的染色结果;D图显示了3-2G6抗体制剂在45℃热破坏7天、15天及30天后效价检测结果;可以看到4-参数曲线略有下降,但仍符合免疫组化检测稳定性的要求。

[0050] 图4显示了对不同种类肿瘤细胞病理切片的免疫组化染色图。

具体实施方式

[0051] 实施例1:抗MSLN单克隆抗体的制备

[0052] (一) 杂交瘤细胞系的建立

[0053] 1. 实验材料的准备:

[0054] 以G&P Biosciences公司的MSLN-ECD(货号FCL1589)蛋白片段作为免疫原,该片段含317个氨基酸,位于MSLN(UniProt accession#Q13421, isoform 2)序列的Glu296-Ser592区域;所用培养基包括但不限于HAT、HT选择培养基、DEME培养基;实验动物包括Balb/c小鼠;所用佐剂为乳化弗氏完全佐剂、乳化弗氏不完全佐剂。

[0055] 2. 动物免疫

[0056] 基础免疫:抗原与弗氏完全佐剂等体积充分乳化,分点皮下注射,注射剂量为50μg/只,免疫2只Balb/c小鼠。

[0057] 加强免疫:抗原与弗氏不完全佐剂乳化;在进行细胞融合前3天,直接腹腔注射含50μg抗原的生理盐水溶液。

[0058] 尾血检测:取免疫小鼠的尾血进行间接ELISA法检测。

[0059] 3. 杂交瘤细胞的制备

[0060] 骨髓瘤细胞与1只小鼠的脾细胞融合,融合细胞铺10块96孔细胞培养板;使用HAT培养液选择培养1周,之后更换HT培养基继续培养。使用间接ELISA方法筛选阳性细胞克隆,对所选阳性细胞经扩大培养后,使用有限稀释法进行1次亚克隆,共获得20株经1次亚克隆操作后的单克隆杂交瘤细胞株。

[0061] 4. 杂交瘤细胞株的筛选与建立

[0062] 收集20株1次亚克隆细胞上清,分别测定抗体产量并使用变性Western-blot、间接ELISA、免疫组化(抗原修复方式为柠檬酸盐热修复)、对抗体检测性能进行分析。结果克隆号为3-2G6的细胞株所分泌的抗体能够识别变性MSLN并对MSLN不同表达量的细胞进行分级染色。将选中的3-2G6的细胞株使用有限稀释法进行第2次亚克隆,确保获得单克隆的杂交瘤细胞株。将2次亚克隆后的3-2G6细胞株产生的抗体进行变性Western-blot、间接ELISA、免疫组化试验,对抗体检测性能进行分析验证。抗体验证合格后的2次亚克隆3-2G6细胞株即扩增冻存成为最终的杂交瘤细胞株。

[0063] (二) 抗MSLN单克隆抗体的制备

[0064] 1. 小鼠腹水的制备

[0065] 选择10周龄雌性BALB/c小鼠,适应性饲养2天,之后向每只小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡。7天后对小鼠进行细胞接种,接种剂量为 1×10^6 个细胞/ml,接种体积为300 μ l/只,腹腔注射。观察小鼠生长状态及腹部大小,待小鼠腹部明显鼓胀(一般在7-10天)时取小鼠腹水,使用12号针头沿近腹股沟处进入小鼠腹腔,使腹水自然流出,无菌离心管收集。

[0066] 2. 小鼠腹水的纯化

[0067] 将上述步骤中获得的腹水于4℃高速离心(12000rpm,20min),上清经0.45 μ m的微孔滤膜抽滤,然后用体积为2mL的ProteinG SepharoseTM 4FF亲和层析柱进行纯化。平衡缓冲液为20mM磷酸盐缓冲液,pH7.0,洗脱缓冲液为0.1M甘氨酸,pH3.4,终止缓冲液为1M Tris-HCl,pH9.0。使用超滤法将抗MSLN单克隆抗体中的缓冲液置换为PBS,pH7.2,含0.05% ProClin300。确保IgG浓度 ≥ 1 mg/ml,变性非还原SDS-PAGE检测为单一条带。抗MSLN单克隆抗体纯度检测图谱在图1中显示,根据显示结果可以看出:抗MSLN单克隆抗体条带面积百分比为95%,纯度符合要求。

[0068] 实施例2:抗MSLN单克隆抗体3-2G6实验条件优化

[0069] (1) 抗原修复条件通过评估不同的抗原修复缓冲液进行优化。修复条件1(Cit 6.0)是指使用酸性pH6.0的柠檬酸盐缓冲液高压修复2.5min。修复条件2(Tris 9.0)是指使用碱性pH9.0的Tris-EDTA缓冲液高压修复2.5min。修复条件3(Tryp)指用0.25%的胰酶修复液在37℃条件下修复10min。如图2A所示:在这些试验过的条件中,Cit 6.0高压修复后染色效果优于其他几种修复方式,具体表现为目标细胞(肿瘤细胞)染色清晰,间质细胞没有非特异性染色。因此该方法最终选为本抗体适用的抗原修复方法。

[0070] (2) 对不同浓度3-2G6的染色强度进行了评估以筛选合适的抗体浓度。按照3-2G6初始浓度为1mg/ml计算,将抗体进行25倍至25600倍一系列稀释比例,用稀释后的抗体对目标抗原表达强度为2+的细胞(OVCAR-3)石蜡切片进行免疫组化染色。根据图2B所示:抗体稀释浓度为1600倍和6400倍的染色结果的阳性染色结果明显,非特异性背景反应相对较少,

我们最终选择抗体稀释3200倍用于验证试验。

[0071] (3) 对不同的一抗孵育时间进行了测试以筛选合适的抗体孵育条件。选择目标蛋白弱表达的病理组织进行一抗37℃孵育30min和37℃孵育60min的免疫组化染色测试,根据图2C所示:两个孵育时间染色结果相似,没有显著的差异,但是为了确保孵育时间充分避免假阴性结果,最终选择一抗37℃孵育60min的实验条件。

[0072] 实施例3:抗体稀释液的选择

[0073] 我们对3-2G6抗体稀释液的各个成分进行了一系列的评估,包括基质,盐离子浓度,pH值,保护蛋白浓度,表面活性剂,防腐剂等。

[0074] 基质方面,分别使用pH为7.4,0.05M的TRIS缓冲液和PB(Phosphate Buffer)作为缓冲液稀释3-2G6抗体进行免疫组化实验,根据图3A的结果所示:使用Tris缓冲液使得非特异性背景染色非常明显;

[0075] 盐离子浓度方面,分别向0.05M TRIS和PB缓冲液中添加0.015-1.2M的NaCl后发现,随着离子浓度的增加非特异性染色消失,离子浓度增加至0.15M以上时,特异性染色强度也随之降低。在其他条件相同的前提下,过高盐离子浓度会导致组织染色强度降低。因此,我们在选择抗体缓冲液盐离子浓度时需要考虑目标组织染色清晰,且尽量降低非特异的背景染色。根据图3B的结果所示:0.15M NaCl浓度下的整体染色效果最佳。因此,我们优选0.15M NaCl的盐浓度。

[0076] pH方面,比较了pH为6.0、7.3、8.6的0.05M TRIS(含0.15M NaCl)和PB(含0.15M NaCl)缓冲液对免疫组化染色结果的影响,结果显示不同pH对3-2G6抗体染色强度影响不显著。

[0077] 保护蛋白方面,比较了酪蛋白、牛血清白蛋白、山羊血清对3-2G6抗体染色性能和稳定性的影响,结果显示以上成分对免疫组化染色结果影响不大,加速稳定性实验结果显示,在上述蛋白保护剂在添加量为1%-2%时,45℃热破坏15天后3-2G6的免疫组化染色性能不会发生变化。

[0078] 表面活性剂方面,比较了两种表面活性剂Tween-20及Brij-35(即为:聚氧乙烯月桂醚),结果显示两者对3-2G6的染色性能没有产生差异。

[0079] 防腐剂方面,45℃,15天的加速稳定性试验表明ProClin300(Sigma)添加量在0.05%-0.1%时,3-2G6产品的免疫组化染色性能良好。

[0080] 综上,我们优选0.05M PB、pH7.2、0.15M NaCl、1%-2%BSA、0.05%-0.1%Tween-20以及0.05%-0.1%ProClin300作为3-2G6的抗体稀释液,稀释液与3-2G6抗体的体积比为3200:1。将抗体与稀释液混合得到抗体溶液,这种稀释完毕的抗体溶液即为本申请所述的即用型3-2G6抗体溶液。

[0081] 上述优选缓冲液的染色性能图谱在图3C中显示,实验结果表明:3-2G6抗体能够特异性结合间皮素蛋白,并能够有效地反映间皮素蛋白的表达情况;稳定性能图谱在图3D中显示,结果表明:3-2G6抗体制剂的热稳定性很好,并能够满足免疫组化对稳定性的要求。

[0082] 实施例4:利用免疫组化方法获取可供读取数据的病理切片

[0083] 首先准备已有文献报道存在MSLN过度表达的肿瘤标本(如:胰腺癌、卵巢癌、恶性间皮瘤),标本应在离体的30分钟内固定在福尔马林溶液中,然后进行梯度乙醇脱水,脱水后的组织置于二甲苯中透明,浸入融化的低熔点石蜡中,之后进行石蜡包埋,待蜡块凝固

后,切成厚度3-5 μ m的薄片,使用涂有多聚赖氨酸的玻璃片捞起组织后用漂烘仪烘干。

[0084] 免疫组化实验步骤:组织切片于65℃烤片1小时后,在二甲苯中进行10分钟的脱蜡处理,然后进行梯度乙醇水化,具体操作为将脱蜡后的切片在无水乙醇浸泡5分钟,95%乙醇浸泡5分钟,75%乙醇浸泡5分钟,最后浸泡在蒸馏水中。

[0085] 水化后的切片进行抗原修复,在高压锅中加入抗原修复液(0.01M,pH6.0的柠檬酸盐缓冲液),高压锅开盖在电磁炉上加热至抗原修复液沸腾,停火,将切片浸没入修复液中盖上锅盖,扣上压力阀,大火(1600W,210℃)加热至喷气,从喷气开始,调至中火(800W,130℃)计时2.5分钟,停火,拔下电源;把压力锅小心、平衡地转移到实验台上,直至自动锁芯落到原位,确定排气管无蒸汽或少量蒸汽排出,打开压力阀,逆时针转动锅盖手柄,打开锅盖,待抗原修复液自然冷却至室温(至少30min)取出玻片,PBST浸泡。

[0086] 小心甩去切片上组织周围的液体,用免疫组化油笔在组织周围画圈,在圈定区域内加新鲜配制的3%过氧化物酶阻断液,37℃孵育10分钟,以消除组织内过氧化物酶活性,PBST清洗切片2次。

[0087] 加即用型3-2G6抗体溶液,37℃孵育60分钟,PBST清洗切片2次。每批实验同时设置阴性对照、空白对照和阳性对照。所述即用型3-2G6抗体溶液,由实施例3所述抗体稀释液制备,抗体浓度为0.31 μ g/mL。阴性抗体对照为小鼠单克隆抗体IgG1同型对照(CST,Catalog No.5415),克隆号G3A1。阳性对照样本和阴性对照样本可用4合1细胞质控片,质控片是将4个不同间皮素表达水平的细胞制备石蜡块,并按照组织芯片的要求重新制备于一个新的石蜡块中,切片得到的。其中MSLN阴性表达的细胞系为293(0);MSLN弱阳性表达细胞为CFPAC-1(1);MSLN阳性表达细胞OVCAR-3(2);MSLN强阳性表达的细胞OVCAR-3-MSLN细胞(3)。

[0088] 滴加1-2滴检测试剂I覆盖切片上组织,37℃孵育10分钟。用PBST浸洗2次。小心甩去切片上组织周围的液体,滴加1-2滴检测试剂II覆盖切片上组织,37℃孵育10分钟,用PBST浸洗2次。上述检测试剂I、II分别为聚合物放大反应二抗系统DAB Detection Kit(购自福州迈新,货号KIT-0016)的反应放大剂和高敏型酶标抗小鼠/兔IgG聚合物。然后使用新鲜配制的DAB显色剂显色1分钟,PBST终止显色。Mayer's苏木素染核1分钟,用水冲洗多余苏木素后,再经脱水,透明,封片,用光学显微镜进行染色结果的读取及拍照。对不同病理切片的染色图谱见图4,结果显示:本申请的免疫组化试剂针对胰腺癌,卵巢癌和间皮瘤细胞能够清晰表征间皮素蛋白的表达情况。

[0089] 实施例5 MSLN表达值的判读

[0090] 病理学家结合细胞质控片对所检组织标本中肿瘤细胞的免疫组化染色情况进行半定量的由0-3的整数打分。在与MSLN靶向药物同时进行临床研究之前先将染色强度作为评分标准。其中0分表示:肿瘤细胞未出现任何形式的染色;1分表示:肿瘤细胞出现细胞膜染色,但是染色强度 $\leq$ CFPAC-1细胞的染色强度;2分表示:肿瘤细胞出现细胞膜染色,染色强度大于CFPAC-1,小于OVCAR-3-MSLN;3分表示:肿瘤细胞出现细胞膜染色,染色强度 $\geq$ OVCAR-3-MSLN。需要明确的是参与评分的为活的肿瘤细胞,且打分是基于定位在细胞膜上的MSLN进行的(即:只有细胞质单独染色的细胞不列入计数范围)根据上述标准,对图4中MSLN的表达值进行判读,判读结果如下:

[0091]

组织名称	打分结果
------	------

胰腺癌1#	2
卵巢癌1#	2
间皮瘤1#	3

[0092] 实施例6细胞质控片的制备

[0093] 6.1 OVCAR-3-MSLN细胞的制备

[0094] 目的基因表达载体的构建

[0095] 设计引物从包含人MSLN编码序列的载体(pCMV3,采购自义翘神州)上扩增全长MSLN,使用胶回收试剂盒进行切胶回收,并用限制性内切酶进行酶切,同时使用同种内切酶酶切慢病毒表达载体(pHBLV-U6-MCS-CMV-ZsGreen-PGKL-PUR0,采购自汉恒生物)。将MSLN基因片段和表达载体进行连接,将连接产物转化到感受态细胞中,扩增后涂布平板。挑取单个菌落进行菌落PCR,选取扩增产物正确的菌落进行测序。测序正确重组质粒即为构建好的表达载体。

[0096] 目标基因慢病毒的包装

[0097] 接种293T细胞于T75培养瓶中,过夜培养后更换无血清培养基,将表达载体、包装载体和包膜载体(其分别是:pHBLV-U6-MCS-CMV-ZsGreen-PGKL-PUR0、paPAX2、pMD.2G,采购自汉恒生物)混合后再与Lipofectamine2000混合后加入293T细胞(转染了腺病毒E1A基因的人肾上皮细胞系)中,培养48小时候收集上清并浓缩后分装。

[0098] 目的细胞的获得

[0099] 取对数生长期目的细胞,加入24孔板中,过夜培养;吸去细胞原有的培养基,加入病毒稀释液和稀释好的polybrene溶液,感染总体积为250μL,轻轻混匀;感染24小时后,去除含病毒的培养液,换上新鲜的完全培养基(Gibco RPMI1640-A10491-01培养基+20%FBS+0.01mg/ml胰岛素)继续培养;对于携带嘌呤霉素抗性基因的病毒换上含嘌呤霉素的新鲜完全培养基,得到稳定转染的细胞株。

[0100] 将上述获得的过表达MSLN目的基因稳转细胞株采用有限稀释法获得单克隆,根据病理组织中MSLN表达强度,选择MSLN表达强度与病理组织中MSLN高表达强度一致的细胞株,从而得到OVCAR-3-MSLN为MSLN强阳性表达细胞。

[0101] 6.2细胞石蜡包埋

[0102] 实验材料:

[0103] MSLN四合一细胞质控片包括四个细胞株:293(ATCC®Number:CRL-1573™)、CFPAC-1(ATCC®Number:CRL-1918™)、OVCAR-3(ATCC®Number:HTB-161™)以及OVCAR-3-MSLN(根据以上方法制备)。细胞培养和包埋过程中使用的材料均能通过商业途径购买获得。

[0104] 实验过程:

[0105] (1)细胞培养

[0106] 细胞名称:293(染色强度为0);

[0107] 培养基:Gibco RPMI1640培养基+10%FBS;

[0108] 细胞名称:CFPAC-1(染色强度为1);

[0109] 培养基:Gibco IMDM培养基+10%FBS;

[0110] 细胞名称:OVCAR-3(染色强度为2);

[0111] 培养基:Gibco RPMI1640-A10491-01培养基+20%FBS+0.01mg/ml胰岛素;

[0112] 细胞名称:OVCAR-3-MSLN(染色强度为3);

[0113] 培养基:Gibco RPMI1640-A10491-01培养基+20%FBS+0.01mg/ml胰岛素;

[0114] 其中所述的FBS为胎牛血清,Gibco RPMI1640(ATCC改良的)培养基是美国Gibco公司货号为A1049101的RPMI 1640培养基(即为Gibco RPMI1640-A10491-01);Gibco IMDM培养基是美国Gibco公司货号为12440053的IMDM培养基;Gibco RPMI1640普通培养基为Gibco公司货号为11875135的培养基;

[0115] 培养条件:37℃,5%CO₂静置培养;2-3天,细胞增殖到占培养皿底部80-90%传代一次。

[0116] (2) 细胞收集与固定

[0117] 上述细胞培养至铺满细胞培养皿底部的80-90%时,收取细胞。将培养基倒掉,用1-2ml PBS洗涤一次,加1-2ml 0.25%胰酶消化3-5min,显微镜下观察细胞变圆,加1ml细胞培养基终止消化,用移液器将细胞吹打均匀收集并计数,加入3-5ml PBS洗涤细胞,1000rpm离心5min,弃上清,细胞用4%多聚甲醛或者10%中性福尔马林固定液重悬,固定液的添加量为 2×10^7 cells/1ml固定液,室温固定16h-24h。

[0118] (3) 琼脂糖支撑细胞

[0119] 琼脂糖凝胶配制:称取琼脂糖加PBS配制成3-4%浓度的溶液,加盖锡箔纸于微波炉中加热至琼脂糖完全溶解,取出置于60℃水浴中保温待用。

[0120] 细胞与琼脂糖混合:1-2 $\times 10^7$ cells经过固定过程,自然沉降至体积约100 μ l,用移液器小心移去上清。将盛有细胞的离心管在60℃水浴中预热,用预热的移液器移取与细胞等体积的琼脂糖凝胶,加入离心管中与细胞混匀(混匀动作需轻柔,整个过程宜控制在3min之内,减少水分蒸发的影响),混匀后的琼脂糖、细胞混合物移到去除针头的1ml注射器针管中,室温冷却成型。

[0121] (4) 细胞团脱水

[0122] 将与琼脂糖混合的细胞团取出,切成0.5cm厚度的小段,放置在做好标记的脱水筐内。将组织块依次浸入不同浓度梯度的乙醇中进行组织脱水:70%乙醇过夜→80%乙醇1.5h→90%乙醇1.5h→95%乙醇1.5h→100%乙醇I 50min→100%乙醇II 50min。

[0123] (5) 细胞团透明

[0124] 进行完梯度乙醇脱水的细胞团依次块浸入到二甲苯I和二甲苯II中进行透明,每次进行透明时间为20min。

[0125] (6) 细胞团浸蜡

[0126] 石蜡块置于浸蜡杯中65℃烘箱中2h至石蜡完全融化,将进行组织透明后的组织块浸入到融化的石蜡中进行组织浸蜡,浸蜡1次后换蜡再进行1次浸蜡,每次1h。

[0127] (7) 细胞团包埋

[0128] 手动包埋过程在60℃烘箱中进行。将融化的石蜡倒入组织包埋底模中,将浸蜡结束的细胞团从相应的脱水筐中取出,迅速放入到组织包埋底模的石蜡中,放入时尽量不要有气泡产生,调整好细胞的位置,将做好上下标记的包埋框覆盖在包埋盒上,转移至冷却台上冷却30min可以获得组织包埋石蜡块。在使用石蜡块之前,将293细胞所在位置外边缘垂直切掉一小块石蜡,用作切片方位标记。

[0129] 6.3切片制作方法

[0130] (1) 固定:切片机按照生产厂商提供的操作说明进行使用,使用前应该保证刀片的锋利,然后将蜡块固定到支持器上,注意保证切角位置位于蜡块的右上角。

[0131] (2) 修块:修块模式下,修块切片厚度可以调节至15-20 μm ,修切蜡块至包埋的四个细胞团全部可以被切到。应该尽量的避免修块次数,并且应该保证组织的连续性。

[0132] (3) 切片:调整切片厚度为3-5 μm 左右,然后进行切片,切片必须保证完整、均匀、厚度适宜、没有刀痕、无褶皱和开裂。

[0133] (4) 展片:用毛笔轻轻挑起切片,用镊子移至漂烘仪中的水面中展开(温度37-40 $^{\circ}\text{C}$,将切片转移至漂烘仪水面的过程中,切片可以旋转但不可以翻转)。

[0134] (5) 捞片:将展开的切片贴于载玻片上,捞片时右手持载玻片磨砂区,保持石蜡缺口位于左上方,尽量避免切片和载玻片之间产生气泡。倾斜载玻片至45 $^{\circ}$ 。至切片上多余的水流下。

[0135] (6) 烤片:将载玻片置于烘箱中60 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤30min可以制成组织石蜡切片,储存以备后续实验。

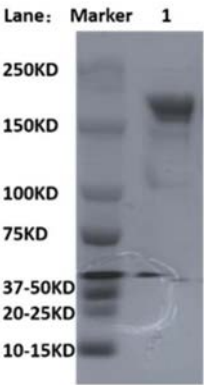
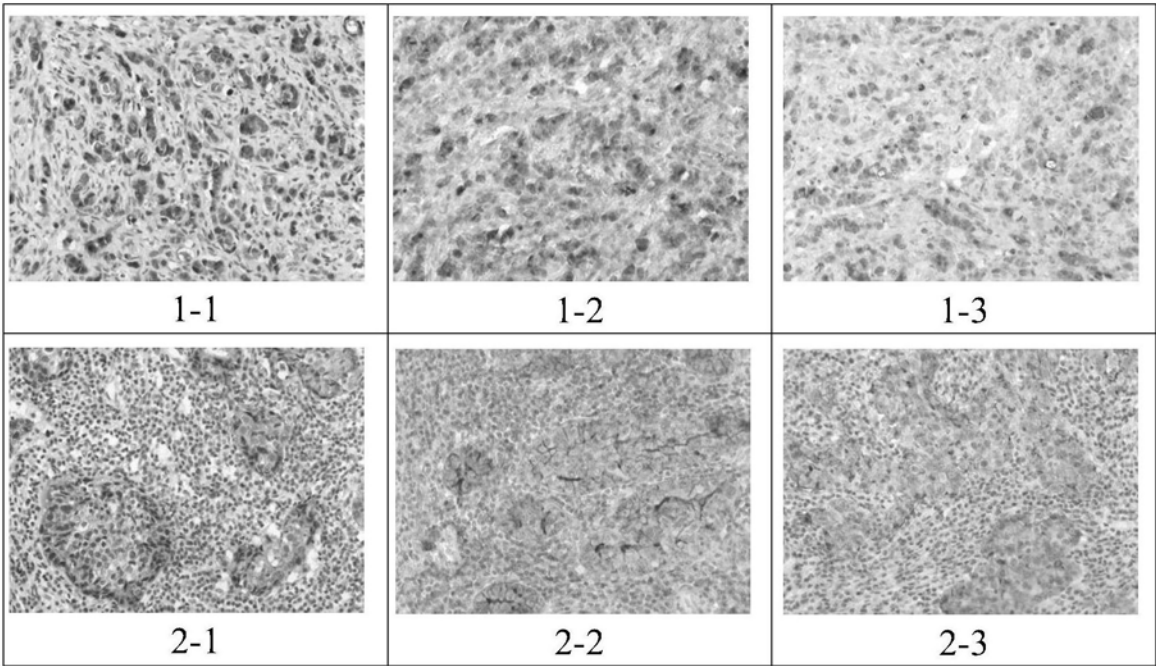
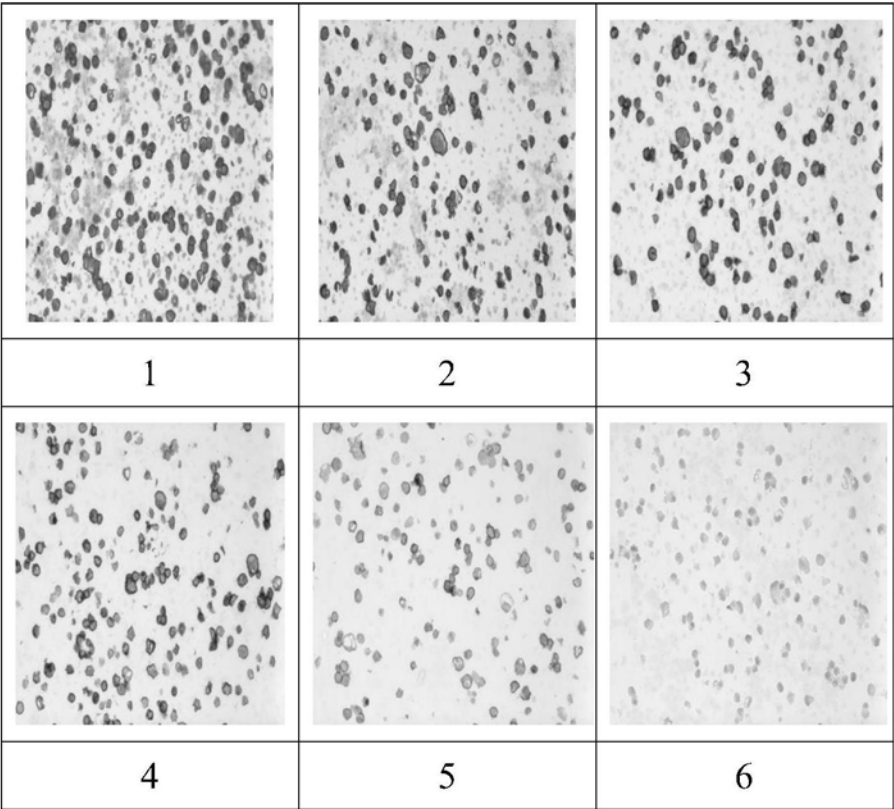


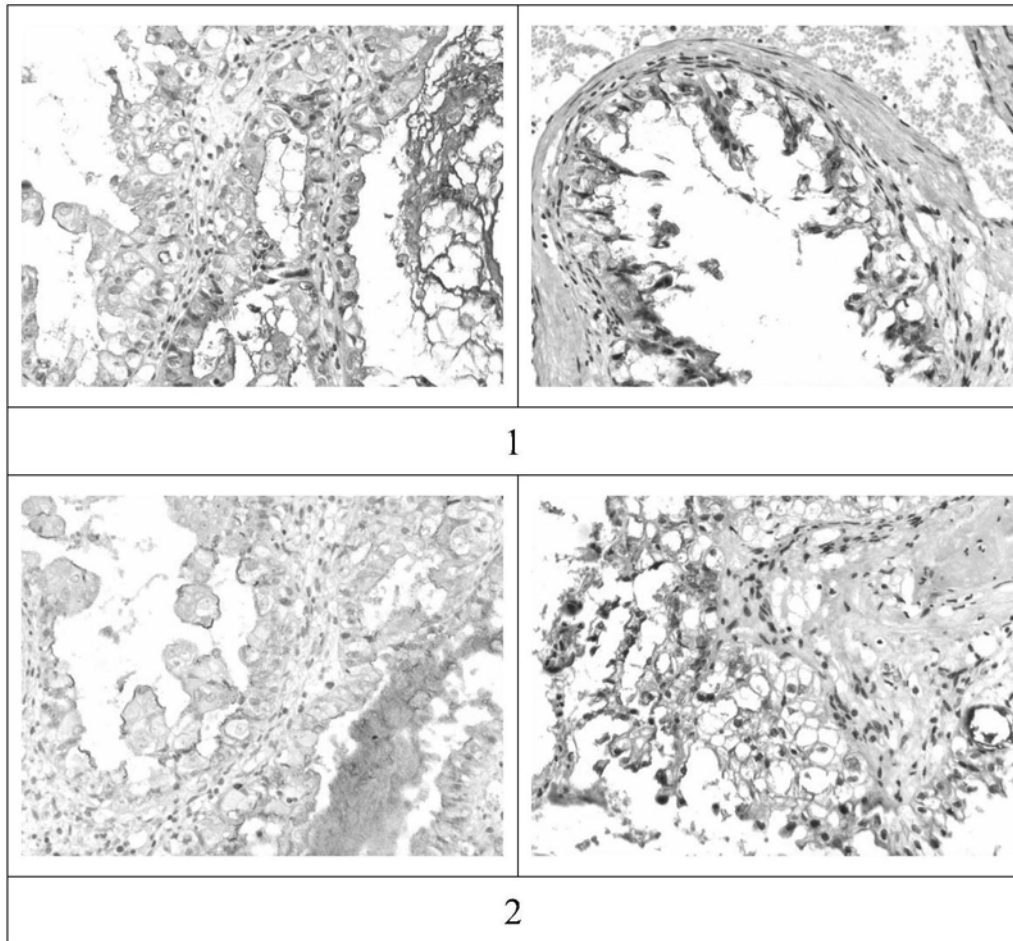
图1



A

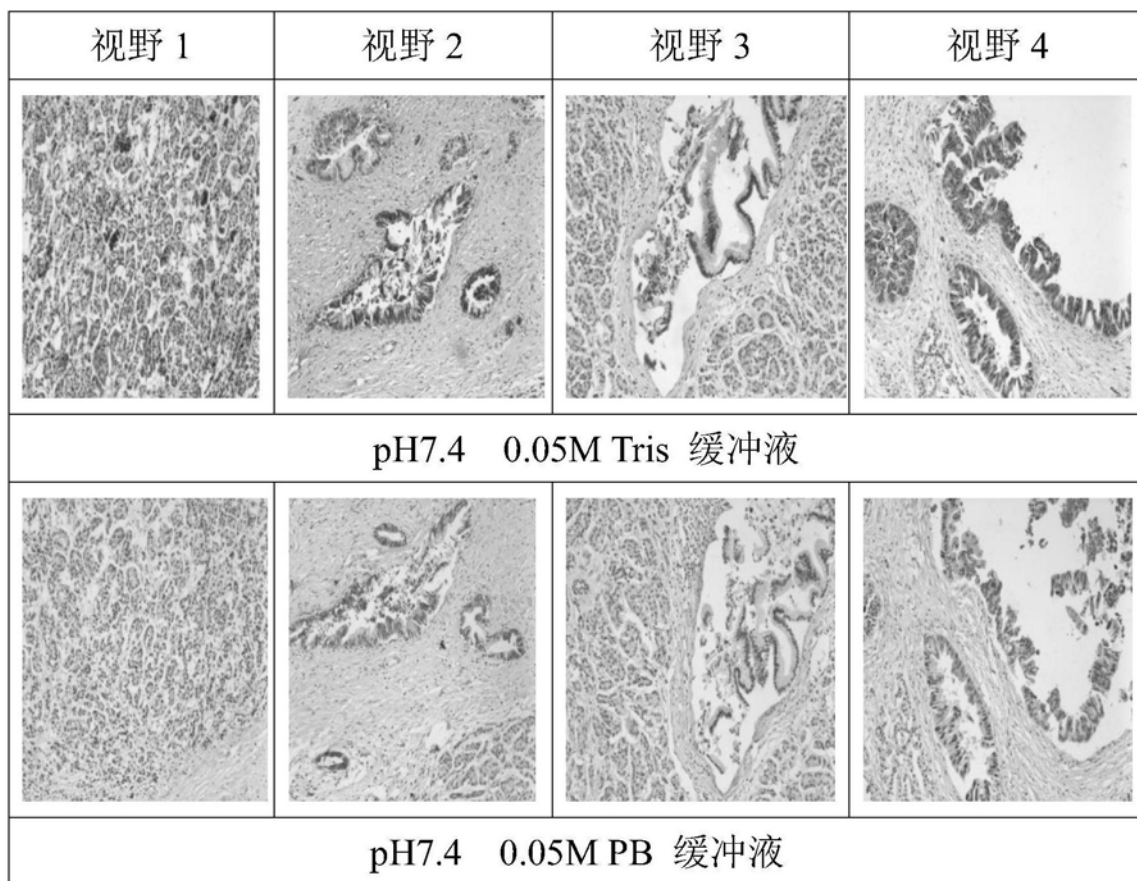


B

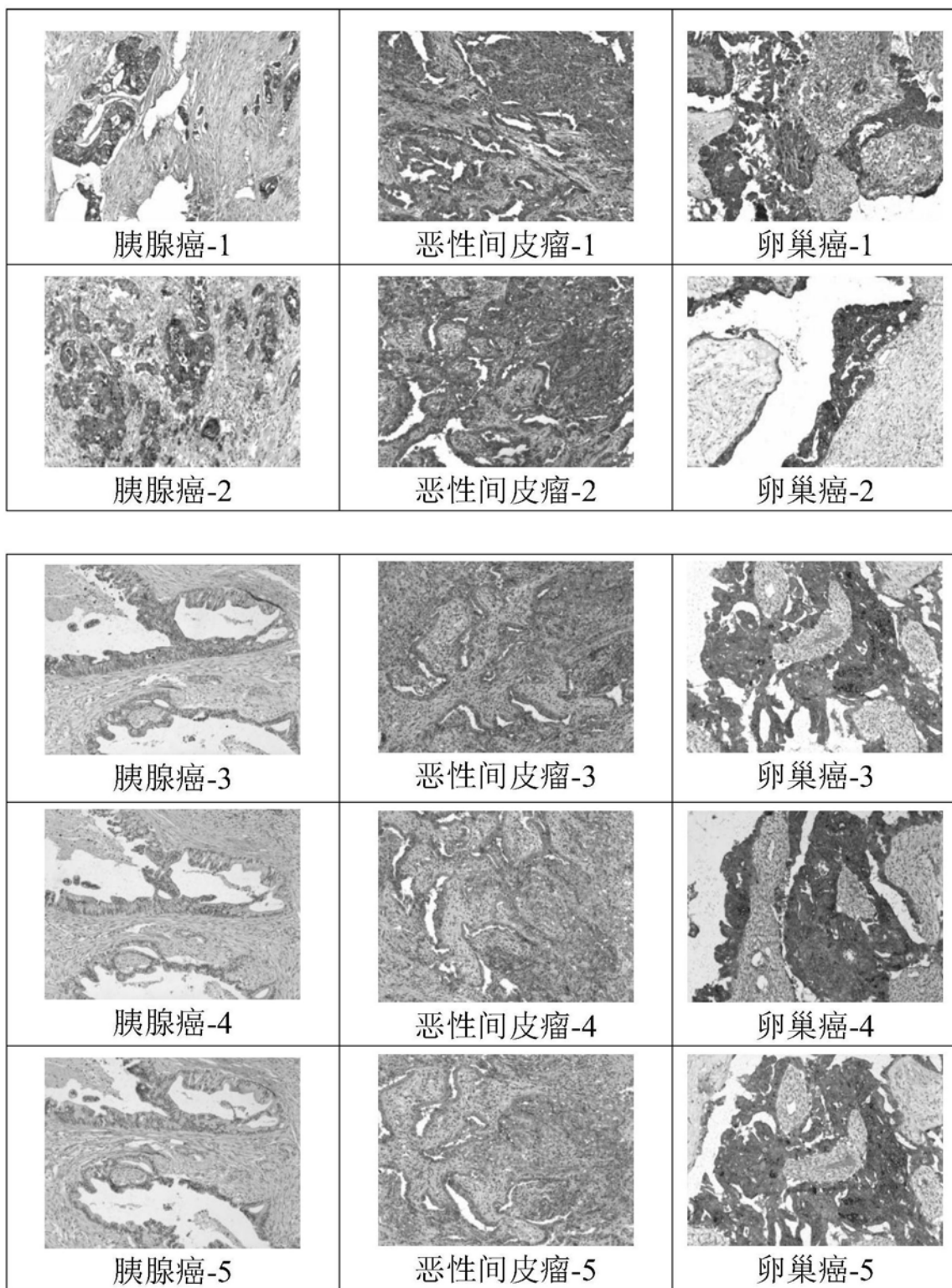


C

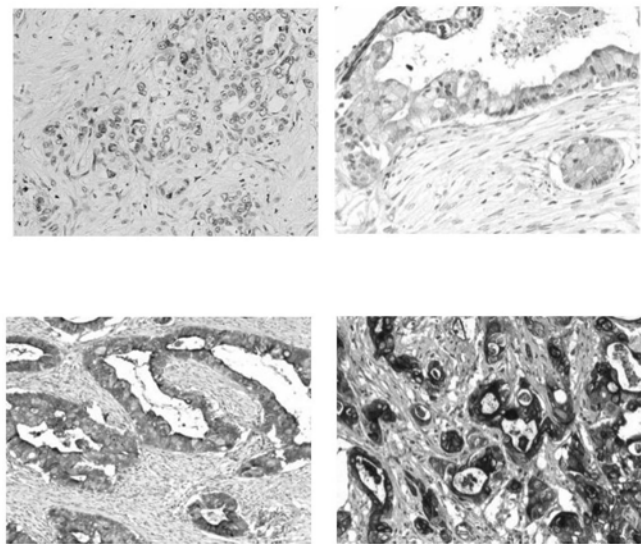
图2



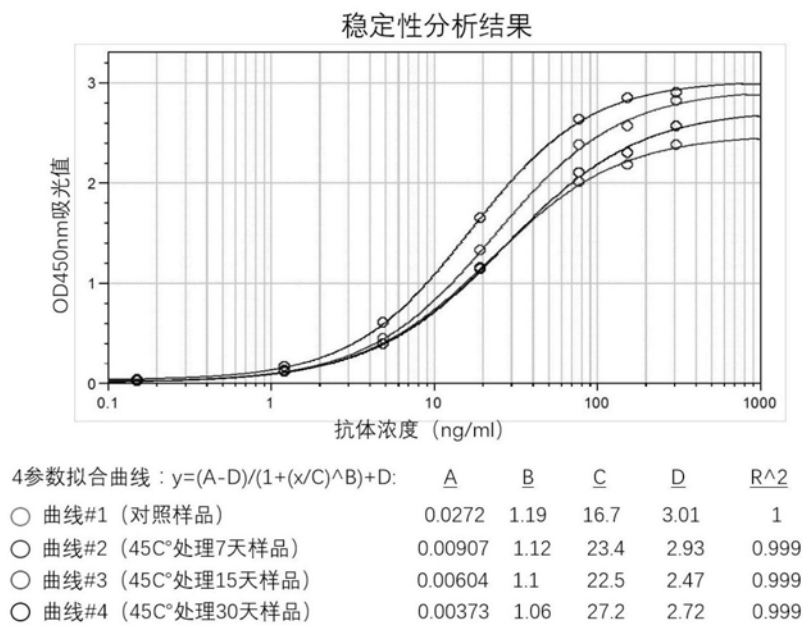
A



B



C



D

图3

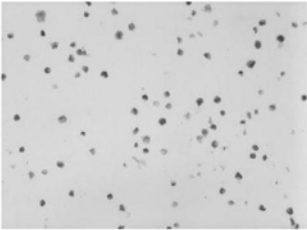
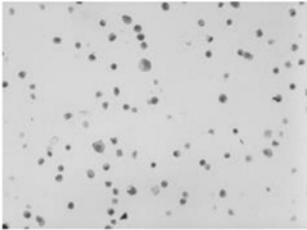
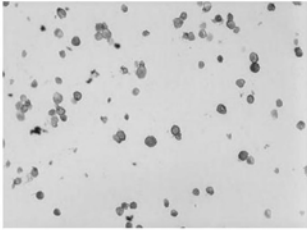
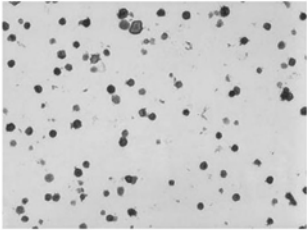
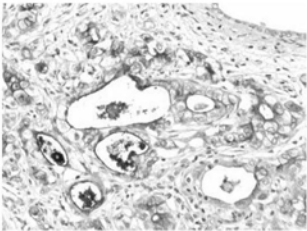
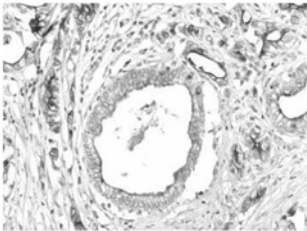
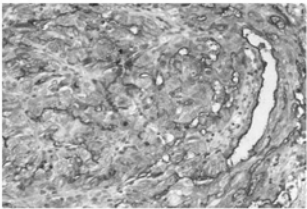
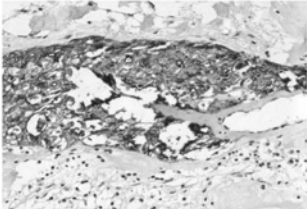
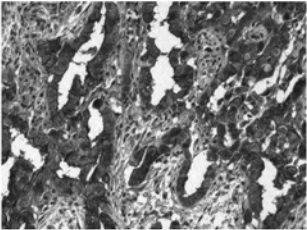
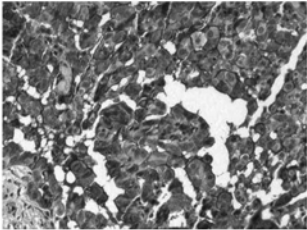
切片名称	染色结果	
细胞质控片	 293	 CFPAC-1
	 OVCAR-3	 OVCAR-MSLN
胰腺癌 1#		
卵巢癌 1#		
间皮瘤 1#		

图4

专利名称(译)	间皮素免疫组化检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110531077A	公开(公告)日	2019-12-03
申请号	CN201810512663.X	申请日	2018-05-25
[标]发明人	毛海燕 于占娇 肖童雨 李壮林 房健民		
发明人	毛海燕 于占娇 肖童雨 李壮林 房健民		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/577 G01N33/6863 G01N2333/47		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及一种间皮素(Mesothelin, MSLN)免疫组化检测试剂盒, 其含有MSLN单克隆抗体3-2G6。

Lane: Marker 1

250KD

150KD

100KD

75KD

37-50KD

20-25KD

10-15KD

