



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110007071 A

(43)申请公布日 2019.07.12

(21)申请号 201910256743.8

(22)申请日 2019.04.01

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心有限
公司

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业
开发区科学大道53号4号楼7层84号

申请人 河南省生物工程技术研究中心

(72)发明人 王云龙 张璐 李玉林 程蕾
王继创 邓黎黎

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

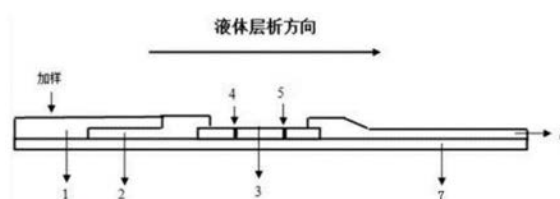
权利要求书1页 说明书11页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制
备方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及荧光免疫层析技术领域,具体涉
及一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制
备方法及其应用。一种CKAP4标记抗体-荧光微球复
合物的制备方法,包括如下步骤:(1)用EDC振荡
活化荧光微球;(2)使荧光微球与CKAP4标记抗体
偶联;(3)加入5%-15%BSA溶液振荡封闭,离心,
去上清;(4)加入保护液,超声,振荡偶联,离心,
去上清;(5)加入5%-15%BSA溶液,振荡封闭,振
荡结束后离心,去上清,沉淀用保护液吹散,即得
所述CKAP4标记抗体-荧光微球复合物溶液。该
CKAP4标记抗体-荧光微球复合物用于制备免疫
荧光层析试纸条可实现CKAP4的快速检测,线性
范围宽。



1. 一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:(1)将荧光微球置于硼酸缓冲液中,加入EDC振荡活化;(2)离心,去上清,加硼酸缓冲液重悬沉淀,加入标记抗体,旋涡混匀;(3)向步骤(2)所得溶液中加入5%-15%BSA溶液振荡封闭,离心,去上清;(4)向步骤(3)所得沉淀中加入保护液,超声,振荡偶联,离心,去上清;(5)向步骤(4)所得的沉淀中加入5%-15%BSA溶液,振荡封闭,振荡结束后离心,去上清,沉淀用保护液吹散,即得所述CKAP4标记抗体-荧光微球复合物溶液。

2. 根据权利要求1所述的CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法,其特征在于,所述保护液包括0.02-0.08M pH=8.0Tris-Hcl、0.3-0.8%TWEEN-20和0.05-0.15%BSA。

3. 一种CKAP4免疫层析检测试纸条的结合垫的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)将玻璃纤维膜用处理液处理、干燥;(2)将按照如权利要求1或2所述的方法制备得到的CKAP4标记抗体-荧光微球复合物溶液涂于经步骤(1)处理后得到的玻璃纤维膜上,37℃烘干。

4. 根据权利要求3所述的CKAP4免疫层析检测试纸条的结合垫的制备方法,其特征在于,所述处理液包括0.005-0.015M pH=8.0Tris-Hcl、0.05-0.15%Tween-20、0.05-0.15%BSA和3-8%蔗糖。

5. 一种如权利要求3或4所述的方法制备得到的CKAP4免疫层析检测试纸条的结合垫。

6. 一种CKAP4免疫层析检测试纸条,包括底板、样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和如权利要求5所述的结合垫。

7. 根据权利要求6所述的CKAP4免疫层析检测试纸条,其特征在于,所述硝酸纤维素膜上包被有检测线T线和质控线C线,所述T线处包被有1.0mg/mL-2.0mg/mL CKAP4包被抗体,所述C线处包被有1.0mg/mL-2.0mg/mL羊抗鼠抗体IgG。

8. 根据权利要求6所述的CKAP4免疫层析检测试纸条,其特征在于,所述CKAP4标记抗体来源于CKAP4抗原表位肽多肽A,所述CKAP4包被抗体来源于CKAP4抗原表位肽多肽B,所述多肽A的氨基酸序列为RSHQDFSRQREEL,所述多肽B的氨基酸序列为DSHGPKEDGG。

9. 根据权利要求6所述的CKAP4免疫层析检测试纸条,其特征在于,所述CKAP4标记抗体来源于CKAP4抗原表位肽多肽B,所述CKAP4包被抗体来源于CKAP4抗原表位肽多肽A,所述多肽A的氨基酸序列为RSHQDFSRQREEL,所述多肽B的氨基酸序列为DSHGPKEDGG。

10. 根据权利要求6-9中任意一项所述的CKAP4免疫层析检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:(1)将所述硝酸纤维素膜粘贴在底板上;(2)分别在所述硝酸纤维素膜的两端粘贴所述结合垫和吸水垫,所述结合垫和吸水垫分别叠压在所述硝酸纤维素膜两端端部的上方;(3)将样品垫叠压在所述结合垫远离所述硝酸纤维素膜的一端的上方。

一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光免疫层析技术领域,具体涉及一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 肺癌发病率在男性恶性肿瘤中已居首位,在女性发病率也迅速增高,肺癌成为危害生命健康的一种主要疾病。多数患者确诊时病情已发展至中晚期,错过疾病的治疗的最佳时期,治疗难度进一步加大。因此,寻找有效的肿瘤标志物用于癌变的机理研究、疾病的早期诊断及高危人群的筛查成为肺癌研究的当务之急。

[0003] 目前临床上常用的早期诊断肺癌的方法主要有传统的X线胸片、痰脱落细胞及纤维支气管镜等检查方法,其应用于肺癌的筛查(尤其在高危人群中)并没有降低被筛选人群肺癌的死亡率,同时由于检测敏感性差、过程痛苦、患者耐受性差、不能早期动态监测等而受到限制。

[0004] 肺癌标志物是在肿瘤发生、发展过程中由肿瘤细胞表达、分布在组织、血液和体液中的大分子物质,具有组织特异性,其分布的类型及浓度变化与发病个体的肿瘤起源和生长密切相关,因其具有可以从分子生物学方向对肺癌进行分子诊断、分型分期等优点,近年来被临床上广泛应用于肺癌早期诊断、临床分型和预后评判。因此研究和发现肺癌的特异性标志物,建立经济、更适合早期诊断的检测方法,对肺癌的防治工作无疑将起到极大的作用。

[0005] CKAP4,又称P63、细胞骨架相关膜蛋白4(CKAP4),分子量63KD,是一种II型跨膜蛋白,连接于内质网与微管之间。最新研究表明,在肺癌的I-IV期,血清中血清癌胚胎抗原,细胞角蛋白19片段和SCC抗原的敏感性分别为30%-52%、17%-82%和24%-39%。研究指出,血清中CKAP4的敏感性在训练组为81%,在验证组为69%,均高于目前临床应用的血清诊断标志物的敏感性。

[0006] 目前,CKAP4快速诊断试剂盒的研制处于起步阶段,目前尚未见有用于CKAP4快速检测相关的技术方案公开。

发明内容

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法,以制备用于CKAP4免疫荧光层析的标记物;本发明的另一目的在于制备用于CKAP4免疫荧光层析的结合垫及其制备方法;本发明的另一目的在于提供一种CKAP4免疫荧光层析试纸条及其制备方法。

[0008] 本发明的CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法采用如下技术方案:

[0009] 一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法,包括如下步骤:(1)将荧光微球置于硼酸缓冲液中,加入EDC振荡活化;(2)离心,去上清,加硼酸缓冲液重悬沉淀,加入标记抗体,旋涡混匀;(3)向步骤(2)所得溶液中加入5%-15%BSA溶液振荡封闭(可起到防止荧

光微球与标记抗体分离开的作用),离心,去上清;(4)向步骤(3)所得沉淀中加入保护液,超声,振荡偶联,离心,去上清(步骤(4)可起到洗去荧光微球上附着的杂质的目的);(5)向步骤(4)所得的沉淀中加入5%-15%BSA溶液,振荡封闭,振荡结束后离心,去上清,沉淀用保护液吹散,即得所述CKAP4标记抗体-荧光微球复合物溶液。更优选的,EDC活化荧光微球时在25-30℃的环境中振荡30min;离心的参数为:12000-16000r/min,离心10-30min,最优选14000r/min,离心20min;荧光微球优选Eu羧基荧光微球。

[0010] 优选的,所述保护液包括0.02-0.08M pH=8.0Tris-Hcl、0.3-0.8%Tween-20和0.05-0.15%BSA,有助于提高试纸条的稳定性。

[0011] 一种CKAP4免疫层析检测试纸条的结合垫的制备方法,包括如下步骤:(1)将玻璃纤维膜用处理液处理、干燥;(2)将按照如上所述的方法制备得到的CKAP4标记抗体-荧光微球复合物溶液涂于经步骤(1)处理后得到的玻璃纤维膜上,37℃烘干。CKAP4标记抗体-荧光微球复合物溶液以能均有充满玻璃纤维膜为宜,其用量优选为4 μ L/7mm²;其中标记抗体代指与荧光微球结合的抗体,所述标记抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0012] 优选的,所述处理液包括0.005-0.015M pH=8.0Tris-Hcl、0.05-0.15%TWEEN-20、0.05-0.15%BSA和3-8%蔗糖。

[0013] 一种如上所述的结合垫的制备方法制备得到的CKAP4免疫层析检测试纸条结合垫。

[0014] 一种CKAP4免疫层析检测试纸条,包括底板、样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和如上所述的结合垫。其中包被抗体代指与包被于硝酸纤维素膜上作为C线的抗体,所述包被抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0015] 优选的,所述硝酸纤维素膜上包被有检测线T线和质控线C线,所述T线处包被有1.0mg/mL-2.0mg/mL CKAP4包被抗体,所述C线处包被有1.0mg/mL-2.0mg/mL羊抗鼠抗体IgG。

[0016] 优选的,所述CKAP4标记抗体来源于CKAP4抗原表位肽多肽A,所述CKAP4包被抗体来源于CKAP4抗原表位肽多肽B,所述多肽A的氨基酸序列为RSHQDFSRQREEL,所述多肽B的氨基酸序列为DSHGPKEDGG。当标记抗体为来源于多肽A的单克隆抗体、包被抗体为来源于多肽B的单克隆抗体时,有助于增强标记抗体和包被抗体分别与CKAP4的特异性结合,进而提高试纸条检测的特异性和准确度。

[0017] 优选的,所述CKAP4标记抗体来源于CKAP4抗原表位肽多肽B,所述CKAP4包被抗体来源于CKAP4抗原表位肽多肽A,所述多肽A的氨基酸序列为RSHQDFSRQREEL,所述多肽B的氨基酸序列为DSHGPKEDGG。当标记抗体为来源于多肽A的单克隆抗体、包被抗体为来源于多肽A的单克隆抗体时,有助于增强标记抗体和包被抗体分别与CKAP4的特异性结合,进而提高试纸条检测的特异性和准确度。

[0018] 如上所述的CKAP4免疫层析检测试纸条的制备方法,包括如下步骤:(1)将所述硝酸纤维素膜粘贴在底板上;(2)分别在所述硝酸纤维素膜的两端粘贴所述结合垫和吸水垫,所述结合垫和吸水垫分别叠压在所述硝酸纤维素膜两端端部的上方;(3)将样品垫叠压在所述结合垫远离所述硝酸纤维素膜的一端的上方。优选的,硝酸纤维素膜与结合垫、吸水垫分别重叠1-2mm,样品垫与结合垫重叠1-2mm。

[0019] 本发明的有益效果是:CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法有助于CKAP4

标记抗体和荧光微球的结合,增强CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的稳定性,进而当CKAP4标记抗体-荧光微球复合物用于免疫层析检测时的灵敏度的作用。

[0020] 本发明的CKAP4检测试纸条以血清为样品,5min左右即可获取检测结果,且操作方法简便,可有效提高CKAP4检测的效率,便于推广。

[0021] 本发明提的CKAP4检测试纸条,线性范围可达5-100ng/ml,线性范围宽,特异性好,能够迅速及时地帮助诊断病情,监测预后。本发明的CKAP4检测试纸条与免疫组化法相关性好,检测效果可靠。

[0022] 当标记抗体选择来源于CKAP4抗原表位肽多肽A或多肽B的单克隆抗体、包被抗体选择来源于CKAP4抗原表位肽多肽B或多肽A的单克隆抗体(若标记抗体为来源于多肽A的单克隆抗体,则包被抗体为来源于多肽B的单克隆抗体;反之,亦然)时,试纸条检测的线性范围更宽。

附图说明

[0023] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0024] 图1为本发明的CKAP4试纸条的结构示意图;

[0025] 图2为所述CKAP4试纸条定性检测的结果示意图;

[0026] 图3为试纸条2的标准曲线图

[0027] 图1中:1-样品垫;2-结合垫;3-硝酸纤维素膜;4-T线;5-C线;6-吸水垫;7-底板。

具体实施方式

[0028] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 实施例一:CKAP4检测试纸条的制备及使用方法

[0030] 1.1结合垫的制备

[0031] 1.1.1CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备

[0032] (1)取荧光微球(购自上海溯源生物技术有限公司,羧基荧光微球)15uL,加入600uL 50mmol/L硼酸缓冲液中,旋涡混匀;

[0033] (2)加入100ug的EDC,25-30℃摇床振荡30min,14000r/min,离心20min;

[0034] (3)沉淀重悬于硼酸缓冲液,清洗1次,离心同步骤(2);

[0035] (4)利用1mL 50mmol/L硼酸缓冲液重悬沉淀,加入100ug标记抗体(与荧光微球形成复合物的单克隆抗体),旋涡混匀;

[0036] (5)加入50uL10%BSA(可起到防止荧光微球与标记抗体分离开的作用),25-30℃振荡封闭1h,14000r/min,离心15min;沉淀用1mL保护液(0.05M pH=8.0的Tris-Hcl、0.5%(体积分数)TWEEN-20和0.1%BSA,上述各组分的浓度均为终浓度,BSA的浓度为质量百分

数)吹散,超声30s,4℃保存备用;

[0037] (6) 25-30℃振荡偶联2h,离心同步骤(2),加入50uL 10%BSA,25-30℃振荡1h,14000r/min,离心15min;沉淀用1mL保护液(0.05M pH=8.0的Tris-Hcl、0.5%TWEEN-20(体积分数)和0.1%BSA(质量分数),上述各组分的浓度均为终浓度,BSA的浓度为质量百分数)吹散,超声30s,4℃保存备用。保护液的具体配制方法如下:取pH=8.0 0.2M Tris-Hcl 25mL、TWEEN-20 0.5mL、BSA 0.1g、纯化水75mL混合均匀。

[0038] 1.1.2将CKAP4单克隆抗体-荧光微球复合物固定于玻璃纤维膜制成结合垫2

[0039] 将玻璃纤维膜(长10cm,宽7mm)利用处理液(0.01M pH=8.0Tris-Hcl、0.1%Tween-20(体积分数)、0.1%BSA(质量分数)和0.1%蔗糖(质量分数),上述各组分的浓度均为终浓度)处理,37℃烘干,然后将制备好的CKAP4单抗-荧光微球溶液((40uL/cm)涂于玻璃纤维膜,要求溶液均匀充满玻璃纤维膜,37℃烘干,制成结合垫2,4℃铝箔袋(含干燥剂)密封备用。处理液的具体配制方法如下:取pH=8.0 0.2M Tris-Hcl 10mL、TWEEN-20 0.1mL、BSA 0.1g、蔗糖5g、纯化水75mL混合均匀。

[0040] 1.2在硝酸纤维素膜上包被T线和C线

[0041] 揭去底板7(PVC板)中间粘性贴纸,NC膜(硝酸纤维素膜3)紧贴上端贴纸的下端。划线前,调整XYZ三维点膜喷金仪的划线位置(X、Y、Z)、划样量等,调整完毕后,模拟划线,使质控线C线5和检测线T线4在NC膜3中间位置后,将羊抗鼠IgG(1mg/mL)作为质控线C线5,将包被抗体(1.5mg/mL,包被抗体是指包被于硝酸纤维素膜上作为检测线T线的单克隆抗体)作为检测线T线4,在NC膜3均匀划线,划线结束后,37℃烘干2h,密封在自封袋中备用。

[0042] 1.3试纸条的组装

[0043] 揭去底板7(PVC板)上端一条和下端两条粘性纸贴,将吸水垫6、已铺CKAP4标记抗体-荧光微球的结合垫2、样品垫1依次搭接组装,各重叠区域均为1mm将微电脑自动斩切机的机盖掀起,把组装好的包被板放入物料放置平台,斩切为宽3.9mm的试纸条,4℃铝箔袋密封保存(组装好的试纸条的结构参见说明书附图图1)。

[0044] 1.4试纸条的使用方法

[0045] 待试纸条恢复室温后,在加样孔位置加入待检样本(血清样本),70uL/孔,计时5min;

[0046] 1.4.1定量检测:试纸条移至荧光免疫层析读数仪中检测,记录T线和C线荧光值,根据预先设置于荧光免疫层析读数仪中的标准曲线进行计算,即可直接读出所测样本中CKAP4的浓度。

[0047] 1.4.2定性检测:试纸条移至紫外灯下观察,可直接判读结果:C线有荧光亮度出现,而T线无荧光亮度或荧光强度较弱,判定结果为阴性或低于检测限;C和T线均显示荧光亮度,判定结果为阳性;C线无荧光亮度出现,T线有或无荧光亮度,判定试纸条结果无效(参见说明书附图图2)。

[0048] 实施例二:以市售CKAP4抗体(上海硕博生物科技有限公司,从中选择配对最好的抗体)为标记抗体和包被抗体制备CKAP4检测试纸条(试纸条1),所用的其他制剂及制备方法同实施例一。

[0049] 实施例三:以CKAP4抗原表位肽多肽A和多肽B为来源制备单克隆抗体。

[0050] 1.抗原表位的筛选:

[0051] NCBI查阅获得人CKAP4氨基酸序列,用DNAssist、DNA STAR、BcePred Prediction Server等软件分析CKAP4蛋白B细胞表位。在进行抗原表位分析时将经软件分析得到的抗原表位肽与表皮生长因子受体EGFR进行对接,选取打分函数大于130分的多肽作为候选抗原表位肽,并进一步通过实验进行筛选。经大量实验验证,最终筛选到两个CKAP4抗原表位多肽:

[0052] 多肽A的氨基酸序列:RSHQDFSRQREEL

[0053] 多肽B的氨基酸序列:DSHGPKEDGG

[0054] 多肽A和多肽B可采用化学合成法制备,如固相合成法等。此处不再赘述。

[0055] 2.CKAP4抗原的制备与鉴定:

[0056] 2.1CKAP4抗原的制备,具体步骤如下:

[0057] (1) 称量BSA固体4mg,置于400 μ L MES缓冲液(0.1M,pH 5.0)溶解,制备10mg/mL BSA溶液;

[0058] (2) 称量多肽A(由上海强耀生物科技有限公司按照提供的氨基酸序列合成多肽)、多肽B(由上海强耀生物科技有限公司按照提供的氨基酸序列合成多肽)各2mg,分别溶解于500 μ L MES缓冲液(0.1M,pH 5.0)中,制成CKAP4(A)、CKAP4(B)溶液;分别取步骤(1)所得到的BSA溶液200 μ L置于4mg/mL的CKAP4(A)、CKAP4(B)溶液,漩涡混匀;

[0059] (3) 将EDC平衡室温,称量EDC 20mg,溶解于2mL纯化水中,制备10mg/mL的EDC溶液;

[0060] (4) 将上述配制的EDC溶液取100 μ L,即刻分别置于CKAP4(A)与BSA、CKAP4(B)与BSA的混合液中,25 $^{\circ}$ C摇床振荡2h,最终制备CKAP4-A(CKAP4(A)-BSA)、CKAP4-B(CKAP4(B)-BSA)两种完全抗原,-20 $^{\circ}$ C保存;

[0061] (5) 取部分步骤(4)所得到的偶联产物,使用pH 7.2的磷酸盐缓冲液透析,每4h更换透析液,更换4次后取出产物鉴定。

[0062] 2.2对所得到的抗原进行检测

[0063] 2.2.1微量紫外分光光度计下分别对CKAP4(A)、CKAP4(B)、CKAP4-A、CKAP4-B和BSA,进行紫外光谱扫描,比较偶联前、偶联后的扫描图谱变化,初步判定多肽A或多肽B与载体蛋白(BSA)是否偶联。选取多肽A或多肽B与载体偶联的样品进行SDS-PAGE凝胶电泳。

[0064] 2.2.2SDS-PAGE电泳鉴定(5%的浓缩胶、8%分离胶),具体步骤如下:

[0065] (1) 准备好SDS-PAGE实验所需的相关试剂与仪器设备;

[0066] (2) 纯化水冲洗电泳板,板夹夹紧电泳板,利用纯化水检漏;无水浸出后,倒出纯化水,长条吸水纸清除残余纯化水;

[0067] (3) 按照配方制备分离胶(依据样品分子大小选择),沿电泳板一侧缝隙将其缓慢注入底端,预防分离胶中存在气泡,室温条件下,纯化水水封约1h;

[0068] (4) 待上述胶凝固后,倒液封纯化水,吸水纸紧靠一侧清除纯化水;

[0069] (5) 制备5%浓缩胶,紧靠一侧缝隙缓慢注入分离胶顶端,为避免梳齿下端气泡存在,保持梳子清洁,缓慢插入浓缩胶(深度约1cm),待凝固后待用;

[0070] (6) 缓慢拔出梳子,组装电泳设备上,灌入1 \times 电泳缓冲溶液,利用自制的细长枪头加样,点样量6 μ L/孔;

[0071] (7) 接通电源,当电泳缓冲液中自下而上冒气泡时,电泳开始,当蓝色染色带即将迁移出电泳板时,关闭电源;

[0072] (8) 取出电泳板, 去掉板夹, 将电泳板打开, 标记样品孔位后, 缓慢取出凝胶, 纯化水三次冲洗除杂, 浸于染色液中, 脱色摇床染色约40min;

[0073] (9) 染色结束后, 纯化水冲洗染色凝胶, 再置于脱色液中, 用脱色摇床脱色2h, 按时替换旧脱色液, 观察凝胶背景, 若其变透明则清洗干净, 将其平躺于灯箱拍照。

[0074] 3. 小鼠免疫程序

[0075] 取BALB/c雌性小鼠6只, 约6~8周龄, 其中CKAP4-A、CKAP4-B各免疫3只, 采用皮下多点免疫注射。按照如下方案进行免疫:

[0076] 首免采用弗氏完全佐剂(FCA)与CKAP4-A/CKAP4-B等体积混合;

[0077] 二免、三免采用弗氏不完全佐剂(FIA)与CKAP4-A/CKAP4-B等体积混合;

[0078] 三免后若小鼠血清抗体效价 $<1:104$, 则免疫继续进行, 直至抗体效价 $>1:104$;

[0079] 融合前3天, 进行加强免疫, 不添加佐剂。

[0080] 按照上述方案对小鼠免疫CKAP4-A/CKAP4-B。选取两个免疫小组中最高效价的小鼠继续进行下一步实验。

[0081] 具体免疫方案如下表1所示:

[0082] 表1

	一免(0 天)	二免(14 天)	三免(28 天)	加强免疫(融合前 3 天)
[0083]	CKAP4 -A (50ug/只) +FCA	CKAP4 -A (100ug/只) +FIA	CKAP4 -A (100ug/只) +FIA	CKAP4 -A 200ug/只
	CKAP4 -B (50ug/只) +FCA	CKAP4 -B (100ug/只) +FIA	CKAP4 -B (100ug/只) +FIA	CKAP4 -B 200ug/只

[0084] 4. CKAP4单克隆抗体制备

[0085] 为获得特异性识别CKAP4抗原、无限增殖的杂交瘤细胞, 先进行细胞融合, 随后进行细胞克隆化。经2-4次克隆化, 运用间接ELISA测定后最终筛选到稳定分泌CKAP4抗体的单克隆细胞株, 采用小鼠腹腔接种诱生法制备单克隆抗体。采用正辛酸——硫酸铵沉淀法纯化腹水单克隆抗体。

[0086] 4.1 细胞融合

[0087] 按1:6比例将脾脏细胞和SP 2/0 (骨髓瘤细胞系) 溶液混合, 旋涡均匀, 1600rpm离心细胞5min, 吸水纸清除水份, 轻微摇晃将沉淀分散。37℃水浴条件下, 滴加1mL预热的PEG2000 (操作需约1min内完成), 计时1min促进融合反应。即刻加入预热的1640培养液, 将融合细胞低转速离心, 弃废液, 洗涤2次, 用HAT培养液轻微吹散细胞。准备好铺有饲养层细胞的96孔板, 滴加吹散的融合细胞, 100μL/孔, 放入CO₂培养箱培养, 培养期间根据时间换液。

[0088] 4.2.1 阳性单克隆细胞筛选及克隆化

[0089] 为获得特异性识别CKAP4抗原、无限增殖的杂交瘤细胞, 经融合后, 需进一步细胞克隆化。间接ELISA法初检的阳性杂交瘤细胞, 经培养后, 也会因细胞突变等因素, 造成细胞丧失分泌CKAP4抗体的能力, 通常需经2~4次克隆化、间接ELISA测定后, 最终筛选到稳定分

泌CKAP4抗体的单克隆细胞株。本研究采用有限稀释法进行阳性细胞克隆化,约10d后,将单克隆孔上清采用间接ELISA法测定,从中选取高OD值的孔再进行克隆化(分别检测免疫前血清(N)和免疫后血清(P)的OD450值,以含抗体血清最大稀释倍数的倒数为评价指标。当免疫前血清的OD值(N)/免疫后血清的OD值(P) ≤ 2.1 (效价为1:64000)时结果为阳性,具体数据参见下表2),重复2~3次,挑选数次克隆均为阳性的单克隆细胞株做备选细胞株。将筛选出的细胞株进行扩大培养,并且及时传代和冻存,分别冻存15d,30d,60d,90d后复苏,通过对细胞台盼蓝染色、细胞计数检测细胞活力,用间接ELISA方法检测细胞分泌特异性抗体的能力,从而判断筛选出的细胞株的稳定性。最终筛选到8株细胞株,其编号分别为:2A2、3C2、4D5、4E2、5C4、6E1、7F2、8D5,备用。

[0090] 表2间接ELISA法测定血清抗体

血清稀释倍数	P/N
2000	0.047
4000	0.065
8000	0.079
[0091] 16000	0.115
32000	0.237
64000	0.512
128000	0.746
256000	1.015

[0092] 4.2.2单克隆细胞株亚型测定

[0093] 对稳定细胞株分泌的上清分别进行鉴定,主要操作如下:

[0094] (1) 移取试剂盒内各组分,放置30min,平衡至室温。

[0095] (2) 将浓缩洗液稀释至所需浓度,取出酶标板,用样本稀释液分别将每株单抗稀释,100 μ L/孔,样品稀释液作为对照,酶标板上详细标记,黏紧封板膜,37 $^{\circ}$ C反应30min。

[0096] (3) 准备6种HRP酶标二抗,包括IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM,稀释后分别100 μ L/孔,酶标板上详细标记,黏紧封板膜,37 $^{\circ}$ C反应30min。

[0097] 单抗亚型测定结果,见下表3所示:

[0098] 表3

[0099]

抗体编号	2A2	3C2	4D5	4E2	5C4	6E1	7F2	8D5
亚型类型	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG1

[0100] 通过测定8株杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的亚型可知,2A2是IgG2a,5C4是IgG2b,其他6株均为IgG1,6株IgG1的单抗可作为下步配对筛选的原材料。

[0101] 4.3单克隆抗体腹水制备

[0102] 采用小鼠腹腔接种诱生法制备单克隆抗体,具体步骤如下:

[0103] (1) 在小鼠腹腔内注射液体石蜡,0.5mL/只,使雄性小鼠(约12周龄)致敏,诱生腹水。

[0104] (2) 将阳性杂交瘤细胞株(处于对数期)进行收集,分别对小鼠腹腔注射,3只小鼠/每株,0.2mL/只。

[0105] (3) 7-10d后,筛选出腹部明显凸起的小鼠并处死,用注射器收集腹水。4℃腹水静置6h以上,4000rpm离心5min,去除上层油脂,慢慢吸出中间澄清部分即为腹水。

[0106] 4.4单克隆抗体的纯化及性能检测:

[0107] 4.4.1采用正辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水单克隆抗体。将各单抗用微量紫外分光光度计测定浓度,然后通过SDS-PAGE电泳法测定纯化后各单抗纯度。经处理后的样品6μL/孔,3μL/孔Marker,采用8%分离胶、5%浓缩胶进行电泳,经染色、脱色后观察,分装标记,-20℃保存,纯化后测定6株单抗的蛋白浓度,抗体浓度均超过5mg/ml,满足方法建立对测定浓度的要求。具体数据如下表4所示:

[0108] 表4

[0109]

抗体编号	3C2	4D5	4E2	6E1	7F2	8D5
浓度 (mg/ml)	6.23	5.31	5.34	7.42	8.68	9.07

[0110] 4.4.2采用8%分离胶、5%浓缩胶,对纯化后的单克隆抗体进行SDS-PAGE鉴定。结果显示,6株单克隆抗体条带都在150到170KD附近,分子量与预期大小一致,且纯度较好。

[0111] 4.5单克隆抗体特异性鉴定

[0112] 4.5.1将CKAP4 (A) -BSA,CKAP4 (B) -BSA,BSA分别作为包被抗原,对从6株杂交瘤细胞(3C2、4D5、4E2、6E1、7F2和8D5)纯化出的单克隆抗体分别采用间接ELISA方法进行鉴定,平行检测3次,同时设置空白对照和阴性对照。

[0113] 单克隆抗体与蛋白载体的交叉反应如下表5所示:

[0114] 表5

[0115]

	3C2	4D5	4E2	6E1	7F2	8D5
BSA	—	—	—	—	—	—
CKAP4 (A) -BSA	+	—	—	+	+	—
CKAP4 (B) -BSA	—	+	+	—	—	+
CKAP4	+	+	+	+	+	+

[0116] 注: +、—分别为阳性、阴性,OD值>0.105为阳性,反之为阴性。

[0117] 结论: 从上表可知,包被BSA的孔均为阴性,而包被CKAP4 (A) -BSA的孔与3C2、6E1和7F2的单克隆抗体呈阳性反应,与4D5、4E2和8D5呈阴性反应;包被CKAP4 (B) -BSA的孔与4D5、4E2和8D5呈阳性反应,与3C2、6E1和7F2的单克隆抗体呈阴性反应,说明所获单抗是针对CKAP4的特异性抗体,而不是针对载体BSA的抗体;其中3C2、6E1、7F2是针对CKAP4-A完全抗原的特异性抗体,4D5、4E2和8D5为CKAP4-B完全抗原的特异性抗体。

[0118] 4.5.2验证6株CKAP4单克隆抗体是否有非特异性反应:

[0119] 运用纯化出来的抗体与CEA抗原和CA125抗原血清进行免疫反应,结果表明纯化单

抗具有特异性,证明所筛选CKAP4抗原表位肽(多肽A和多肽B)具有潜在的抗原决定簇特性。具体结果见下表6:

[0120] 表6

[0121]

	3C2	4D5	4E2	6E1	7F2	8D5
CKAP4 (A) -BSA	+	—	—	+	+	—
CKAP4 (B) -BSA	—	+	+	—	—	+
CEA 抗原	—	—	—	—	—	—
CA125 抗原	—	—	—	—	—	—
细胞角 蛋白 19	—	—	—	—	—	—
SCC	—	—	—	—	—	—

[0122] 结论:6株单抗对干扰抗原(CEA抗原、CA125抗原)无特异反应,效果较好。

[0123] 4.6ELISA方法筛选配对单抗

[0124] 将制备的CKAP4单克隆抗体,采用改良的过碘酸钠法对所得单克隆抗体进行HRP标记。采用双抗体夹心ELISA检测的方法,参考本实验室检测系统,以制备的标准品为待检样本,对所获单抗和HRP标记单抗进行配对筛选(去除自身配对),通过测定的OD值高低判断抗体是否配对,选择OD值高的作为较优配对。主要步骤如下:

[0125] (1) 采用CKAP4单抗作为包被,包被量:500ng/孔,样本量:20μL/孔;

[0126] (2) 用酶标稀释液将HRP标记抗体1/2000稀释,50μL/孔;

[0127] 所筛选的较优配对见下表7所示:

[0128] 表7

[0129]

包被 CKAP4 单抗	HRP 标记 抗体	OD 值	空白对 照 (OD 值)	包被 CKAP4 单抗	HRP 标记 抗体	OD 值	空白对 照 (OD 值)
3C2	HRP-4E2	0.301	0.125	6E1	HRP-4E2	1.233	0.032
	HRP-4D5	0.119	0.015		HRP-7F2	0.160	0.041
	HRP-6E1	0.087	0.034		HRP-3C2	0.056	0.035
	HRP-7F2	0.045	0.062		HRP-4D5	0.043	0.035
	HRP-8D5	0.098	0.032		HRP-8D5	0.089	0.032
4D5	HRP-6E1	0.212	0.015	7F2	HRP-4E2	0.151	0.043
	HRP-3C2	0.054	0.036		HRP-3C2	0.051	0.034
	HRP-4E2	0.049	0.063		HRP-4D5	0.067	0.021
	HRP-7F2	0.032	0.044		HRP-6E1	0.064	0.034
	HRP-8D5	0.109	0.034		HRP-8D5	0.055	0.034
4E2	HRP-7F2	1.834	0.022	8D5	HRP-4D5	1.423	0.019
	HRP-4D5	0.126	0.023		HRP-3C2	1.382	0.023
	HRP-3C2	0.062	0.042		HRP-4E2	0.078	0.018
	HRP-6E1	0.057	0.023		HRP-6E1	0.048	0.025
	HRP-8D5	0.046	0.017		HRP-7F2	0.169	0.024

[0130] 实施例四：以实施例三制备得到的单克隆抗体6E1为标记抗体，4D5为包被抗体制备CKAP4检测试纸条（试纸条2），所用的其他制剂及制备方法同实施例一。

[0131] 实施例五：对实施例二所制得的试纸条1和实施例四所制得的试纸条2的检测性能进行验证。

[0132] 1.1标准曲线的建立：

[0133] 配置一系列浓度梯度的CKAP4标准液：0、0.39、0.78、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100、150、200、300、400（ng/ml），取70uL滴加到免疫层析试纸条上，5min后用荧光免疫层析读数仪读取T线和C线的荧光强度，分别将T/C的荧光强度及对应的CKAP4标准液浓度做拟合曲线，得到荧光强度与浓度对应的公式。

[0134] 1.2精密性检测

[0135] 1.2.1批内精密性检测：同批次50条CKAP4检测试纸条重复检测中值质控品（50ng/mL），采用T线荧光强度的变异系数 $CV=SD/\bar{x}$ ，计算得出批内精密性。

[0136] 1.2.2批间精密性：采用按照相同方法制备的3个批次（每批20条）的CKAP4检测试纸条检测中值质控品（50ng/mL），采用T线荧光强度的变异系数 $CV=SD/\bar{x}$ ，计算得出批间精密性。

[0137] 2.用于进行上述测试（1.1-1.3）的试纸条：

[0138] 试纸条1：以上海硕博生物科技有限公司提供的两种CKAP4抗体样品（从中选择配对最好的抗体）分别作为标记抗体和包被抗体，其余制作步骤同实施例二；

[0139] 试纸条2：该试纸条制作时所采用的标记抗体为6E1，包被抗体为4D5，参见表6（表6

中的其他单克隆抗体也可用于制作试纸条,且包被抗体和标记抗体可以互换),其余制作步骤同实施例二(试纸条2的标准曲线图参见说明书附图图3);

[0140] 3.检测结果:具体检测结果见下表8

[0141] 表8

[0142]

试纸条	批内精密性	批间精密性	线性范围(梯度稀释质控品)	R ²
试纸条1	CV=10.37	CV=12.69	10-95ng/ml	0.9631
试纸条2	CV=14.12	CV=14.88	5-100ng/ml	0.9877

[0143] 其中,试纸条1为采用市售CKAP4抗体作为标记抗体和包被抗体制备得到的试纸条。

[0144] 4.方法学比对

[0145] 本方法(采用试纸条2进行检测)和郑大一附院免疫组化法平行检测45份肺癌患者临床血浆样本,符合率达91%,具体结果详见下表9

[0146] 表9

	CKAP4 范围	免疫组化检测例数	荧光免疫层析检测例数	符合率
	≥ 20	3	3	100%
	$5 \leq \text{CKAP4} < 20$	6	6	100%
[0147]	$2 \leq \text{CKAP4} < 5$	8	9	87.50%
	$0.5 \leq \text{CKAP4} < 2$	21	19	90.47%
	$0.25 \leq \text{CKAP4} < 0.5$	2	3	66.67%
	$\text{CKAP4} < 0.1$	3	3	100%
	合计	43	43	91%

[0148] 由上表9可知,本发明的检测方法和免疫组化法具有良好的相关性,检测结果可靠,可用于CKAP4的快速检测。

[0149] 此外,在本发明所制作的CKAP4试纸条的基础上,本领域技术人员应当得知可将所制作的CKAP4试纸条进一步制作成检测卡或与其他在检测时常用的装置(如采血装置、消毒装置、液体量取装置等)组合在一起,制成检测试剂盒以更方便使用。此外,本领域技术人员公知,本发明所制备得到的单克隆抗体也可适用于其他方法的检测,此处不再赘述。

[0150] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 河南省生物工程技术研究中心有限公司

河南省生物工程技术研究中心

<120> 一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法及其应用

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Arg Ser His Gln Asp Phe Ser Arg Gln Arg Glu Glu Leu

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Asp Ser His Gly Pro Lys Glu Asp Gly Gly

1 5 10

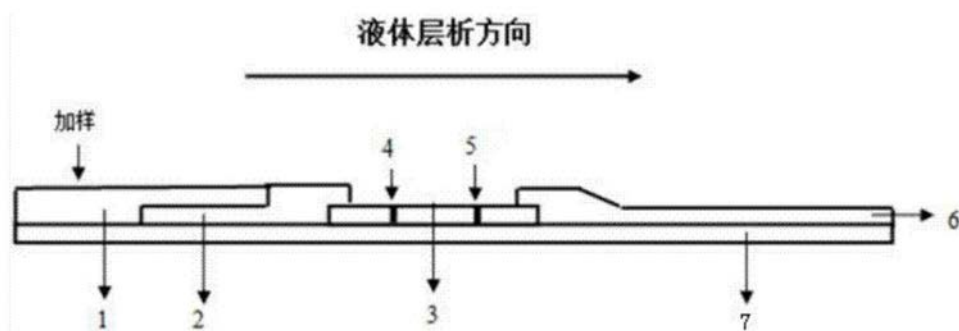


图1

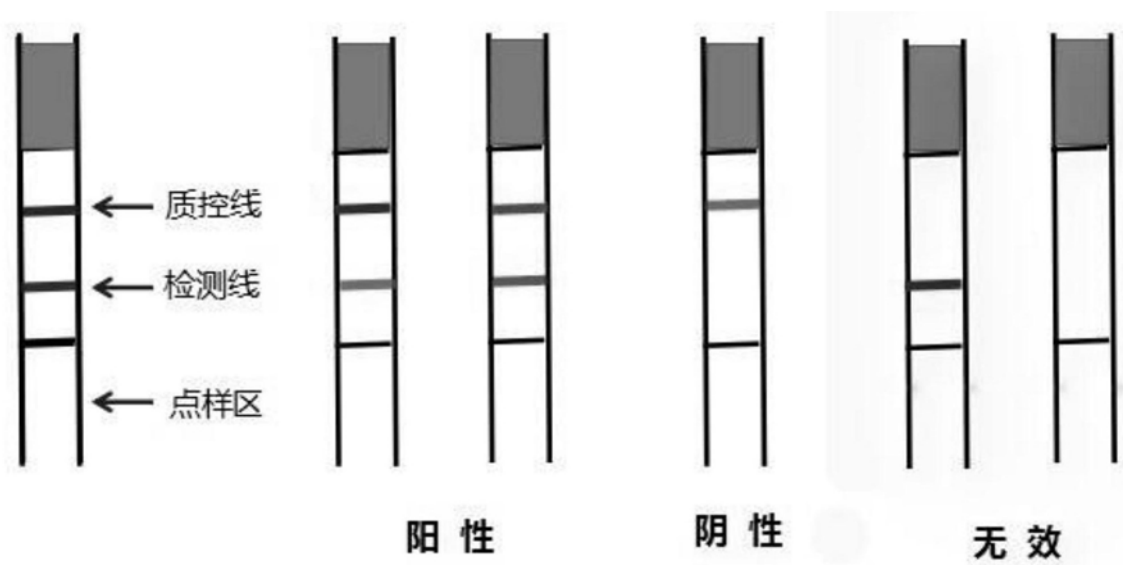


图2

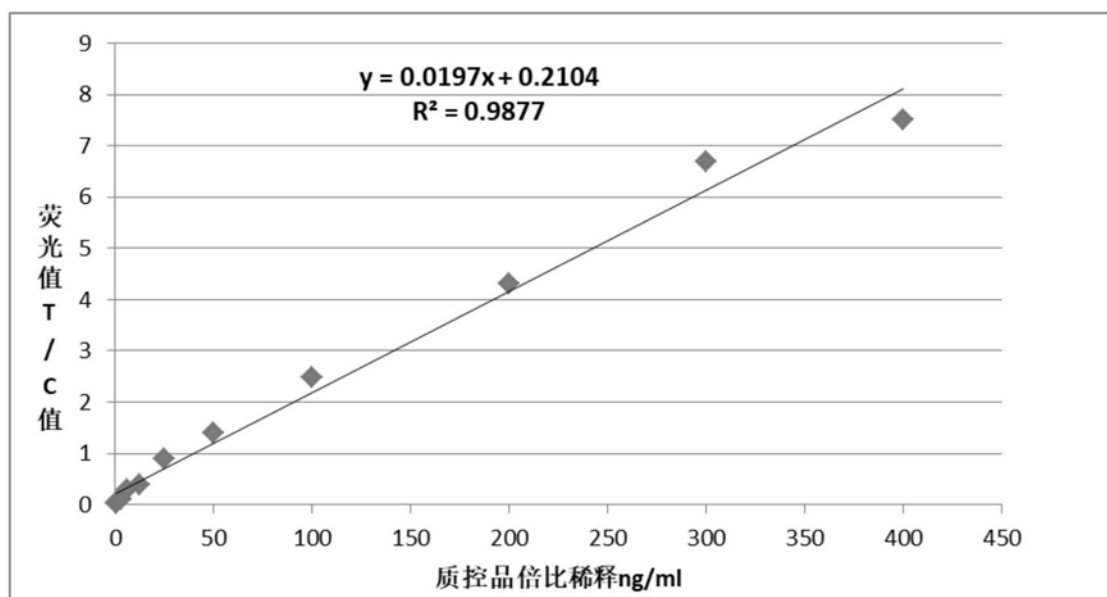


图3

专利名称(译)	一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN110007071A	公开(公告)日	2019-07-12
申请号	CN201910256743.8	申请日	2019-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
[标]发明人	王云龙 张璐 李玉林 程蕾 王继创 邓黎黎		
发明人	王云龙 张璐 李玉林 程蕾 王继创 邓黎黎		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	张鹏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及荧光免疫层析技术领域，具体涉及一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法及其应用。一种CKAP4标记抗体-荧光微球复合物的制备方法，包括如下步骤：(1)用EDC振荡活化荧光微球；(2)使荧光微球与CKAP4标记抗体偶联；(3)加入5%-15%BSA溶液振荡封闭，离心，去上清；(4)加入保护液，超声，振荡偶联，离心，去上清；(5)加入5%-15%BSA溶液，振荡封闭，振荡结束后离心，去上清，沉淀用保护液吹散，即得所述CKAP4标记抗体-荧光微球复合物溶液。该CKAP4标记抗体-荧光微球复合物用于制备免疫荧光层析试纸条可实现CKAP4的快速检测，线性范围宽。

