



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103048458 A

(43) 申请公布日 2013.04.17

(21) 申请号 201210496684.X

(22) 申请日 2012.11.29

(71) 申请人 大连大学

地址 116622 辽宁省大连市开发区学府大街  
10号

(72) 发明人 李文哲 金锦花

(74) 专利代理机构 大连智慧专利事务所 21215

代理人 刘琦

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 3 页

### (54) 发明名称

利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法

### (57) 摘要

本发明一种利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,通过蛋白纯化技术将原核表达 C-Myc 蛋白提纯;进行免疫的小鼠脾细胞与 SP2/O 骨髓瘤细胞进行细胞融合,经 ELISA 法筛选,亚克隆及单克隆抗体 Ig 亚型鉴定,获得 2 株能够稳定分泌抗 C-myc IgG<sub>1</sub>的克隆及抗 C-myc IgM 克隆。利用抗 c-Myc IgG<sub>1</sub>抗体以及抗 c-Myc IgM 抗体,建立快速检测 c-Myc 的一种夹心法 ELISA 法和两种直接法 ELISA 法。本发明对 C-myc 蛋白样品进行准确测定,可检测的 C-myc 蛋白浓度范围为 0.01 ~ 1000pmol/L,检出下限为 0.01 ~ 0.05pmol/L,大大提高了检测 C-Myc 的特异性和敏感性,操作简单、重复性高,本发明检测肿瘤组织中的 C-Myc 的表达量,为恶性肿瘤的筛选提供实验数据。

1. 一种利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征就在于,包括如下步骤:

S1、制备 C-myc 抗原,并纯化,获得纯化的 C-myc 蛋白;

S2、利用所述纯化的 C-myc 蛋白进行免疫健康 Balb/c 小鼠;

S3、将免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合;

S4、筛选阳性杂交瘤细胞;

S5、对所述阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,获得 2 株能够稳定分泌抗 C-myc IgG<sub>1</sub> 的克隆及抗 C-myc IgM 的单克隆抗体杂交瘤细胞株;

S6、Balb/c 小鼠腹腔内注射两种所述单克隆抗体杂交瘤细胞株,大量制备单克隆抗体;

S7、选用以下三种方法中的任意一种,实现快速检测 C-Myc:

方法 1:利用两种抗 c-Myc 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的夹心法 ELISA 法。

方法 2:利用抗 c-Myc IgM 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的直接法 ELISA 法。

方法 3:利用抗 c-Myc IgG 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的直接法 ELISA 法。

2. 根据权利要求 1 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征就在于,步骤 S1 的具体方法为:

S11、将含有原核表达载体的 pET20b-C-myc 表达菌 E. coli BL21 在 37°C 震荡培养, 170rpm;

S12、经 IPTG 诱导后,收集菌体,超声波打碎、利用镍柱子层析纯化。

3. 根据权利要求 2 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征就在于,S1 的具体方法为:将含有原核表达载体 pET20b-C-myc 表达菌的 E. coli BL21 在 37°C 震荡培养, 170rpm;菌液 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.4-0.6 时,经 1-2mM IPTG 诱导 1-3 小时后,6500rpm 离心 10min 收集细胞,悬浮,破碎超声破碎仪破碎细胞 10min,2-8M 尿素进行变性 2h 后再复性,经 AKATA 仪用镍离子亲和层析柱纯化蛋白,最后得到 90-95% 以上纯度的 C-Myc 蛋白。

4. 根据权利要求 3 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征就在于,S2 具体步骤为:利用原核表达并纯化的 C-myc 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,将抗原注射入健康 Balb/c 小鼠腹腔内,0.4ml/只,抗原量为 50-100 μg/只;首次免疫 14 天后,改用弗氏不完全佐剂与同体积的抗原量充分乳化进行第 2 次免疫,抗原量不变;第 28 天,按照 100-200 μg/只抗原量对小鼠进行第三次免疫,小鼠的抗体效价达到了 1:64000-1:1280000。

5. 根据权利要求 4 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征就在于,S3 具体步骤为:Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 5:1-10:1 的比例混合于 50ml 离心管中,1200rpm、5min 离心,弃上清,在 25s-30s 内迅速滴入 37°C 预热的 50% 的 PEG1000 约 0.5ml 并轻轻混匀,700rpm、2min 离心,再沿管壁缓慢加入 37°C 预热的 RPMI-1640 基础培养基 15ml,使试管做划圆样运动约 2min,离心 1400rpm、5min,弃上清,同法再清洗 1 次。沿管壁缓慢加入 37°C 预热的 HT 培养基 30ml,轻轻混匀融合细胞。

6. 根据权利要求 5 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征就在于,S5 具体步骤为:当杂交瘤细胞集落生长 40-60% 以上时,用 ELISA 方法筛选阳性孔;

针对阳性孔,用 HT 培养基稀释细胞,进行亚克隆。培养第 8-9 天,对标记的单克隆细胞孔的上清进行 ELISA 检测,筛选阳性克隆。

7. 根据权利要求 6 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征在于, S6 具体步骤为:向健康雌性 Balb/c 小鼠腹腔内注射高压灭菌后的液体石蜡油,0.4-0.6ml/只。一周后,再向其腹腔注射能稳定分泌 C-myc 抗体的杂交瘤细胞,0.5ml/只,细胞数约为  $2-5 \times 10^6$  个;

10-14 天后,待小鼠腹部明显膨大并行动迟缓时,收集腹水,3000rpm、10min 离心,弃去脂肪和石蜡油,收集中层澄清腹水,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存备用。2B2 及 2A9 克隆的小鼠腹水效价分别为 1:64000、1:32000。

8. 根据权利要求 7 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征在于, S7 中方法 1 的具体步骤为:

用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被抗 C-myc IgM 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,使浓度达到  $5-20 \mu\text{g/ml}$ ;

用 PBS-T 洗涤,  $200 \mu\text{l}$ /孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次;

加入 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液,  $37^{\circ}\text{C}$  反应 1h;

用 PBS-T 洗涤;加入封闭液  $200 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  湿盒温浴 1h;

加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 C-myc IgM 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  湿盒温浴 1h;

用 PBS-T 洗涤;将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgG 做 1:5000 稀释,  $100 \mu\text{l}$ /孔加入酶标板,  $37^{\circ}\text{C}$  湿盒温浴 1h;

用 PBS-T 洗涤;加入邻苯二胺液  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  避光反应 15min;

加入终止液,  $2\text{mol/L}$  硫酸溶液,  $100 \mu\text{l}$ /孔,酶标仪测定  $\text{OD}_{492\text{nm}}$  值。

9. 根据权利要求 7 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征在于, S7 中方法 2 的具体步骤为:

用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液。用 PBS-T 洗涤,  $200 \mu\text{l}$ /孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次;加入封闭液  $200 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 1h;加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 C-Myc IgM (2A9)  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgM 做 1:5000-1:10000 稀释,  $100 \mu\text{l}$ /孔加入酶标板,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;加入邻苯二胺(OPD)液  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  避光反应 15min;加入终止液( $2\text{mol/L}$  硫酸溶液)  $100 \mu\text{l}$ /孔,酶标仪测定  $\text{OD}_{492\text{nm}}$  值。

10. 根据权利要求 7 所述利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,其特征在于,在步骤 S7 中方法 3 的具体步骤为:

用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液。  $37^{\circ}\text{C}$  反应 1h;用 PBS-T 洗涤;加入封闭液  $200 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 1h;加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 c-Myc IgG(2B2)  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgG 做 1:5000 稀释,  $100 \mu\text{l}$ /孔加入酶标板,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;加入邻苯二胺(OPD)液  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  避光反应 15min;加入终止液( $2\text{mol/L}$  硫酸溶液)  $100 \mu\text{l}$ /孔,酶标仪测定  $\text{OD}_{492\text{nm}}$  值。

## 利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种肿瘤检测试剂盒开发领域,更具体地说,涉及一种利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法。

### 背景技术

[0002] 原癌基因 C-myc 是一种使细胞无限增殖、获永生化功能、促进细胞分裂的可调节基因,在很多肿瘤中都高表达<sup>[1]</sup>。在癌变细胞中, C-myc 蛋白表达异常增高,使细胞脱离正常生长的调节限制,向恶性表型转化,发生癌变。据报道, C-myc 基因的过表达与肿瘤发生发展密切相关,如白血病,肺癌,肝癌,胃癌,乳腺癌,结肠癌,宫颈癌,某些神经母细胞病,视网膜母细胞瘤,成骨肉瘤,软骨肉瘤,脊索瘤,脂肪肉瘤,横纹肌肉瘤,何杰金氏病及头部肿瘤等都有 C-myc 基因的扩增或过度表达<sup>[2]</sup>。特别是在所有的 B 淋巴细胞性白血病组织中 C-myc 基因过表达<sup>[3]</sup>。与正常细胞相比,肿瘤细胞中 C-myc 的表达量增高几十倍,是恶性肿瘤发生的一个重要标志。

[0003] 目前,有关 C-Myc 研究的文章及专利如下:

[0004] (1) Dang CV, Resar LM, Emison E, et al. Function of the C-myc oncogenic transcription factor[J]. Exp Cell Res, 1999, 253(1):63-77.

[0005] (2) Riou GF, Bourhis J, Le MG. The C-myc proto-oncogene in invasive carcinomas of the uterine cervix: clinical relevance of over expression in early stages of the cancer[J]. Anticancer Res, 1990, 9-10(5A):1225-1231.

[0006] (3) May PC, Foot N, Dunn R, et al. Detection of cryptic and variant IgH-MYC rearrangements in high-grade non-Hodgkin's lymphoma by fluorescence in situ hybridization: implications for cytogenetic testing[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 198(1):71-75.

[0007] (4) 用于检测致癌基因 C-myc 重组蛋白的 LSPR 传感芯片(专利公开号: CN102175649A)

[0008] (5) 一种致癌基因 C-myc 蛋白的荧光光谱测定方法(专利公开号: CN101893573A)

[0009] 文章 1-3 主要研究关于 C-Myc 在肿瘤组织中的高表达的意义以及其机理。

[0010] 专利 4 发明提供了一种基于局域表面等离子体共振(LSPR)光谱检测致癌基因 C-myc 重组蛋白的 LSPR 传感芯片。在 LSPR 传感芯片的金膜表面组装上一层 DTT 单分子层,接上金纳米粒子层,在所述金纳米粒子层表面修饰上 3-巯基丙酸单分子层,然后通过 DMAP-EDC 活化,使 3-巯基丙酸单分子层与 C-myc 单克隆抗体结合,通过 C-myc 单克隆抗体与 C-myc 重组蛋白的免疫反应结合,引起金纳米粒子表面产生局域表面等离子体共振吸收峰的位移,以此来检测癌变组织中 C-myc 重组蛋白的含量。

[0011] 专利 5 发明公开了一种致癌基因 C-myc 蛋白的荧光光谱测定方法,其测定依据是 C-myc 蛋白本身具有荧光性并且与金纳米溶胶结合后发生荧光猝灭现象,该荧光猝灭强度( $\Delta F$ )与 C-myc 蛋白浓度变化之间呈线性对应关系,达到测定 C-myc 蛋白含量的目的。

[0012] 目前,利用两种单克隆抗体快速检测 c-Myc 的 ELISA 尚无报道。

### 发明内容

[0013] 本发明开发一种利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA,旨在获得稳定分泌特异性和敏感性很高的抗 C-myc IgG<sub>1</sub> 单克隆抗体和 IgM 单克隆抗体,为多种肿瘤特别是 B 淋巴细胞性白血病诊断试剂盒的开发提供坚实的数据基础。

[0014] 为了达到上述目的,本发明一种利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法,包括如下步骤:

[0015] S1、制备 C-myc 抗原,并纯化,获得纯化的 C-myc 蛋白;

[0016] S2、利用所述纯化的 C-myc 蛋白进行免疫健康 Balb/c 小鼠;

[0017] S3、将免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合;

[0018] S4、筛选阳性杂交瘤细胞;

[0019] S5、对所述阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,获得 2 株能够稳定分泌抗 C-myc IgG<sub>1</sub> 的克隆及抗 C-myc IgM 的单克隆抗体杂交瘤细胞株;

[0020] S6、Balb/c 小鼠腹腔内注射两种所述单克隆抗体杂交瘤细胞株,大量制备单克隆抗体;

[0021] S7、选用以下三种方法中的任意一种,实现快速检测 C-Myc:

[0022] 方法 1:利用两种抗 c-Myc 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的夹心法 ELISA 法。

[0023] 方法 2:利用抗 c-Myc IgM 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的直接法 ELISA 法。

[0024] 方法 3:利用抗 c-Myc IgG 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的直接法 ELISA 法。

[0025] 优选方式下,步骤 S1 的具体分步为:

[0026] S11、将含有原核表达载体的 pET20b-C-myc 表达菌 E. coli BL21 在 37°C 震荡培养,170rpm;

[0027] S12、经 IPTG 诱导后,收集菌体,超声波打碎、利用镍柱子层析纯化。

[0028] 具体说,步骤 S1 的具体方法为:将含有原核表达载体 pET20b-C-myc 表达菌的 E. coli BL21 在 37°C 震荡培养,170rpm;菌液 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.4-0.6 时,经 1-2mM IPTG 诱导 1-3 小时后,6500rpm 离心 10min 收集细胞,悬浮,破碎超声破碎仪破碎细胞 10min,2-8M 尿素进行变性 2h 后再复性,经 AKATA 仪用镍离子亲和层析柱纯化蛋白,最后得到 90-95% 以上纯度的 C-Myc 蛋白。

[0029] 优选方式下,上述步骤 S2 具体步骤为:利用原核表达并纯化的 C-myc 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,将抗原注射入健康 Balb/c 小鼠腹腔内,0.4ml/只,抗原量为 50-100 μg/只;首次免疫 14 天后,改用弗氏不完全佐剂与同体积的抗原量充分乳化进行第 2 次免疫,抗原量不变;第 28 天,按照 100-200 μg/只抗原量对小鼠进行第三次免疫,小鼠的抗体效价达到了 1:64000-1:1280000。

[0030] 优选方式下,上述步骤 S3 具体步骤为:Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 5:1-10:1 的比例混合于 50ml 离心管中,1200rpm、5min 离心,弃上清,在 25s-30s 内迅速滴

入 37℃ 预热的 50% 的 PEG1000 约 0.5ml 并轻轻混匀, 700rpm、2min 离心, 再沿管壁缓慢加入 37℃ 预热的 RPMI-1640 基础培养基 15ml, 使试管做划圆样运动约 2min, 离心 1400rpm、5min, 弃上清, 同法再清洗 1 次。沿管壁缓慢加入 37℃ 预热的 HT 培养基 30ml, 轻轻混匀融合细胞。

[0031] 优选方式下, 上述步骤 S5 具体步骤为: 当杂交瘤细胞集落生长 40-60% 以上时, 用 ELISA 方法筛选阳性孔; 针对阳性孔, 用 HT 培养基稀释细胞, 进行亚克隆。培养第 8-9 天, 对标记的单克隆细胞孔的上清进行 ELISA 检测, 筛选阳性克隆。

[0032] 优选方式下, 上述步骤 S6 具体步骤为: 向健康雌性 Balb/c 小鼠腹腔内注射高压灭菌后的液体石蜡油, 0.4-0.6ml/ 只。一周后, 再向其腹腔注射能稳定分泌 C-myc 抗体的杂交瘤细胞, 0.5ml/ 只, 细胞数约为  $2-5 \times 10^6$  个; 10-14 天后, 待小鼠腹部明显膨大并行动迟缓时, 收集腹水, 3000rpm、10min 离心, 弃去脂肪和石蜡油, 收集中层澄清腹水, -20℃ 冻存备用。2B2 及 2A9 克隆的小鼠腹水效价分别为 1:64000、1:32000。

[0033] 优选方式下, 上述步骤 S7 中方法 1 的具体步骤为: 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被抗 C-myc IgM 的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 使浓度达到 5-20  $\mu$ g/ml; 用 PBS-T 洗涤, 200  $\mu$ l/ 孔, 每次 30s 后甩干洗板液, 重复三次; 加入 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液, 37℃ 反应 1h; 用 PBS-T 洗涤; 加入封闭液 200  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 湿盒温浴 1h; 加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 C-myc IgM 的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 100  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 湿盒温浴 1h; 用 PBS-T 洗涤; 将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgG 做 1:5000 稀释, 100  $\mu$ l/ 孔加入酶标板, 37℃ 湿盒温浴 1h; 用 PBS-T 洗涤; 加入邻苯二胺液 100  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 避光反应 15min; 加入终止液, 2mol/L 硫酸溶液, 100  $\mu$ l/ 孔, 酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

[0034] 优选方式下, 上述步骤 S7 中方法 2 的具体步骤为: 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液。用 PBS-T 洗涤, 200  $\mu$ l/ 孔, 每次 30s 后甩干洗板液, 重复三次; 加入封闭液 200  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 温浴 1h; 加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 C-Myc IgM (2A9) 100  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 温浴 1h; 用 PBS-T 洗涤; 将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgM 做 1:5000-1:10000 稀释, 100  $\mu$ l/ 孔加入酶标板, 37℃ 温浴 1h; 用 PBS-T 洗涤; 加入邻苯二胺 (OPD) 液 100  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 避光反应 15min; 加入终止液 (2mol/L 硫酸溶液) 100  $\mu$ l/ 孔, 酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

[0035] 优选方式下, 上述步骤 S7 中方法 3 的具体步骤为: 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液。37℃ 反应 1h; 用 PBS-T 洗涤; 加入封闭液 200  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 温浴 1h; 加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 c-Myc IgG (2B2) 100  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 温浴 1h; 用 PBS-T 洗涤; 将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgG 做 1:5000 稀释, 100  $\mu$ l/ 孔加入酶标板, 37℃ 温浴 1h; 用 PBS-T 洗涤; 加入邻苯二胺 (OPD) 液 100  $\mu$ l/ 孔, 37℃ 避光反应 15min; 加入终止液 (2mol/L 硫酸溶液) 100  $\mu$ l/ 孔, 酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

[0036] 本发明利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的夹心法 ELISA, 首先通过蛋白纯化技术将原核表达 C-Myc 蛋白提纯。利用纯化 C-myc 进行免疫的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合, 经 ELISA 法筛选, 亚克隆及单克隆抗体 Ig 亚型鉴定, 获得 2 株能够稳定分泌抗 C-myc IgG<sub>1</sub> 的克隆 (2B2) 及抗 C-myc IgM (2A9) 克隆。利用抗 C-myc IgG<sub>1</sub> 抗体以及抗 C-myc IgM 抗体, 建立快速检测 c-Myc 的夹心法 ELISA。应用本发明对 C-myc 蛋白样品进行准确测定, 可检测的 C-myc 蛋白浓度范围为 0.01 ~ 1000pmol/L, 检出下限为 0.01 ~ 0.05pmol/L。本发明大大提高了检测 C-Myc 的特异性和敏感性, 操作简单、重复性高, 本发

明检测肿瘤组织中的 C-Myc 的表达量,为恶性肿瘤的筛选提供实验数据。本发明可将利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的夹心法 ELISA 开发成具有自主知识产权的新型检测肿瘤试剂盒并推向产业化,造福全人类,具有极大的社会意义和广泛的市场意义。

### 附图说明

[0037] 图 1 是 C-myc 蛋白纯化图 ;其中,泳道 1 为蛋白质 marker ;泳道 2 为菌体裂解液上清 ;泳道 3 为菌体裂解液包涵体 ;纯化的 C-myc 蛋白 ;

[0038] 图 2 是小鼠 3 次免疫后血清中的抗体效价 ;

[0039] 图 3 是融合第 9 天的杂交瘤细胞株(200 倍) ;

[0040] 图 4 是单克隆抗体的亚型鉴定 ;

[0041] 图 5 是测定健康组织和肿瘤组织中 c-Myc 含量的比较。

### 具体实施方式

[0042] 本发明的技术方案是 :本发明首先原核表达 c-Myc 蛋白,再通过蛋白纯化技术将 c-Myc 蛋白提取、纯化。利用纯化 C-myc 进行免疫的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合,经 ELISA 法筛选,亚克隆及单克隆抗体 Ig 亚型鉴定,获得 2 株能够稳定分泌抗 C-myc IgG<sub>1</sub> 的克隆(2B2)及抗 C-myc IgM (2A9)克隆。利用抗 C-myc IgG<sub>1</sub> 单克隆抗体以及抗 C-myc IgM 单克隆抗体,建立快速检测 c-Myc 的夹心法 ELISA。

[0043] 实施例 1 :

[0044] 具体方法步骤如下 :

[0045] 1. C-myc 抗原的制备与纯化

[0046] 菌液 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.4 时,经 IPTG 诱导 1 小时后,6500rpm 离心 10min 收集细胞,悬浮,超声破碎仪破碎细胞(20% 功率,破碎 10min),2-8M 尿素进行变性 2h 后再复性,经 AKATA 仪用镍离子亲和层析柱纯化蛋白,最后得到 95% 以上纯度的 c-Myc 蛋白(图 1)。

[0047] 2. 单克隆抗体的制备

[0048] 2.1 动物免疫

[0049] 利用原核表达并纯化的 C-myc 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,将抗原注射入健康 Balb/c 小鼠腹腔内,0.4ml/ 只,抗原量为 50 μ g/ 只 ;首次免疫 14 天后,改用弗氏不完全佐剂与同体积的抗原量充分乳化进行第 2 次免疫,抗原量不变 ;第 28 天,按照 100 μ g/ 只抗原量对小鼠进行加强免疫。第三次免疫后,小鼠的抗体效价达到了 1:640000,见图 2,结果说明所建立的免疫程序合理有效。

[0050] 2.2 细胞融合

[0051] 收集免疫 Balb/c 小鼠脾细胞后与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 10:1 的比例混合于 50ml 离心管中,1200rpm、5min 离心,弃上清,在 25s 时迅速滴入 37℃ 预热的 50% 的 PEG1000 约 0.5ml 并轻轻混匀,700rpm、2min 离心,再沿管壁缓慢加入 37℃ 预热的 RPMI-1640 基础培养基 15ml,使试管做划圆样运动约 2min,1400rpm、5min 离心,弃上清,同法再清洗 1 次。沿管壁缓慢加入 37℃ 预热的 HT 培养基 30ml,轻轻混匀融合细胞,滴加到预先铺有滋养层细胞的 96 孔板中,100 μ l/ 孔,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。次日补加 HAT 培养基 [含有次黄嘌呤(H)、氨基蝶呤(A)、胸苷(T)和甘氨酸的完全培养基] 50 μ l/ 孔 ;第 4 天,每孔吸弃 200 μ l,

再加入 HAT 培养基  $100 \mu\text{l}$ /孔;第 7 天,每孔再补加  $100 \mu\text{l}$  HAT 培养基。融合后第 9 天,镜下会观察到未融合或自身融合的脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞会全部死亡,而杂交瘤细胞存活(图 3)。

#### [0052] 2.3 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

[0053] 当杂交瘤细胞集落生长 50% 以上时,用 ELISA 方法筛选阳性孔。针对阳性孔,用 HT 培养基 [含有次黄嘌呤 (H)、胸苷 (T) 的培养基] 稀释细胞,滴加到另一已铺有滋养细胞的 96 孔板内,进行亚克隆。亚克隆第 5 天,标记有单克隆细胞的孔并半量更换 HT 培养基。第 9 天,对标记的单克隆细胞孔的上清进行 ELISA 检测,获得 2 株能稳定分泌抗 C-myc 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,2B2 及 2A9 克隆。

[0054] 经用 Sigma 的 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 检测,显示出 2B2 及 2A9 克隆的抗体类型分别为 IgG<sub>1</sub> 亚类和 IgM (图 4)。

#### [0055] 2.4 单克隆抗体的大量制备

[0056] 在健康雌性 Balb/c 小鼠腹腔内注射高压灭菌后的液体石蜡油,0.4ml/只。一周后,再向其腹腔注射能稳定分泌 C-myc 抗体的杂交瘤细胞,0.5ml/只(细胞数约为  $2 \times 10^6$  个)。10-14 天后,待小鼠腹部明显膨大并行动迟缓时,收集腹水,3000rpm、10min 离心,弃去脂肪和石蜡油,收集中层澄清腹水,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存备用。2B2 及 2A9 克隆的小鼠腹水效价分别为 1:64000、1:32000,表明获得的单克隆抗体具有较高的敏感性。

#### [0057] 3 利用两种抗 c-Myc 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的夹心法 ELISA 法

##### [0058] 3.1 包被

[0059] 包被抗 c-Myc IgM (2A9),使浓度达到  $5 \mu\text{g/ml}$ ,每孔  $50 \mu\text{l}$  包被酶标板,  $37^{\circ}\text{C}$  反应 1-2h。

##### [0060] 3.2 洗板

[0061] 甩干包被液,用 PBST 洗涤,  $200 \mu\text{l}$ /孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

##### [0062] 3.3 封闭

[0063] 加入封闭液  $200 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  湿盒温浴 30min。

##### [0064] 3.4 洗板

[0065] 用 PBST 洗涤,  $200 \mu\text{l}$ /孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

##### [0066] 3.5 加入被检肿瘤细胞 Raji 细胞裂解物

[0067] 加入 1:10 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液。  $37^{\circ}\text{C}$  反应 1h。阴性对照为正常细胞裂解液;阳性对照为 Raji 细胞裂解液。

##### [0068] 3.6 洗板

[0069] 用 PBST 洗涤,  $200 \mu\text{l}$ /孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

##### [0070] 3.7 一抗反应

[0071] 加入 1:1000 倍比稀释的抗 C-myc IgM (2B2)  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^{\circ}\text{C}$  湿盒温浴 1h。

##### [0072] 3.8 洗板

[0073] 甩干一抗,用 PBST 洗涤,  $200 \mu\text{l}$ /孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

##### [0074] 3.9 二抗反应

[0075] 将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgG 做 1:5000 稀释,  $100 \mu\text{l}$ /孔加入酶标板,  $37^{\circ}\text{C}$  湿盒温浴 1h。

[0076] 3.10 洗板

[0077] 甩干二抗,用 PBST 洗涤,200  $\mu$  l/孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

[0078] 3.11 底物

[0079] 加入邻苯二胺(OPD)液 100  $\mu$  l/孔,37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min。

[0080] 3.12 终止

[0081] 加入终止液(2mol/L 硫酸溶液) 100  $\mu$  l/孔,酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

[0082] 本实验制备 B 淋巴细胞白血病细胞裂解液,进行夹心法 ELISA 实验,测定健康组织和肿瘤组织中 c-Myc 含量。实验结果用均数  $\pm$  准差表示,\*\* 表示与未免疫组比较  $P < 0.01$ ,结果见图 5。由图 5 中可见,肿瘤组织中 c-Myc 含量明显高于健康组织,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

[0083] 本实验使用抗 C-Myc IgM (2A9) 和抗 c-Myc IgG1 (2B2) 单克隆抗体快速检测肿瘤细胞中的 c-Myc 抗原,具有高度特异性和敏感性,所需时间为 4.5-6h,阳性检测率达到 100%。可检测的 c-Myc 蛋白浓度范围为 0.01 ~ 1000pmo l/L,检出下限为 0.01 ~ 0.05pmo l/L。

[0084] 实施例 2 :

[0085] 具体方法步骤如下 :

[0086] 1. C-myc 抗原的制备与纯化

[0087] 菌液 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.6 时,经 IPTG 诱导 1 小时后,6500rpm 离心 10min 收集细胞,悬浮,超声破碎仪破碎细胞(20% 功率,破碎 10min),2-8M 尿素进行变性 2h 后再复性,经 AKATA 仪用镍离子亲和层析柱纯化蛋白,最后得到 95% 以上纯度的 c-Myc 蛋白(图 1)。

[0088] 2. 单克隆抗体的制备

[0089] 2.1 动物免疫

[0090] 利用原核表达并纯化的 C-myc 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,将抗原注射入健康 Balb/c 小鼠腹腔内,0.6ml/只,抗原量为 100  $\mu$  g/只;首次免疫 14 天后,改用弗氏不完全佐剂与同体积的抗原量充分乳化进行第 2 次免疫,抗原量不变;第 28 天,按照 200  $\mu$  g/只抗原量对小鼠进行加强免疫。第三次免疫后,小鼠的抗体效价达到了 1:1280000,见图 2,结果说明所建立的免疫程序合理有效。

[0091] 2.2 细胞融合

[0092] 收集免疫 Balb/c 小鼠脾细胞后与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 5:1 的比例混合于 50ml 离心管中,1200rpm、5min 离心,弃上清,在 30s 时迅速滴入 37 $^{\circ}$ C 预热的 50% 的 PEG1000 约 0.5ml 并轻轻混匀,700rpm、2min 离心,再沿管壁缓慢加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 RPMI-1640 基础培养基 15ml,使试管做划圆样运动约 2min,1400rpm、5min 离心,弃上清,同法再清洗 1 次。沿管壁缓慢加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 HT 培养基 30ml,轻轻混匀融合细胞,滴加到预先铺有滋养层细胞的 96 孔板中,100  $\mu$  l/孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。次日补加 HAT 培养基 50  $\mu$  l/孔;第 4 天,每孔吸弃 200  $\mu$  l,再加入 HAT 培养基 100  $\mu$  l/孔;第 7 天,每孔再补加 100  $\mu$  l HAT 培养基。融合后第 9 天,镜下会观察到未融合或自身融合的脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞会全部死亡,而杂交瘤细胞存活(图 3)。

[0093] 2.3 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

[0094] 当杂交瘤细胞集落生长 50% 以上时,用 ELISA 方法筛选阳性孔。针对阳性孔,用 HT

培养基稀释细胞,滴加到另一已铺有滋养细胞的 96 孔板内,进行亚克隆。亚克隆第 5 天,标记有单克隆细胞的孔并半量更换 HT 培养基。第 9 天,对标记的单克隆细胞孔的上清进行 ELISA 检测,获得 2 株能稳定分泌抗 C-myc 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,2B2 及 2A9 克隆。

[0095] 经用 Sigma 的 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 检测,显示出 2B2 及 2A9 克隆的抗体类型分别为 IgG<sub>1</sub> 亚类和 IgM (图 4)。

[0096] 2.4 单克隆抗体的大量制备

[0097] 在健康雌性 Balb/c 小鼠腹腔内注射高压灭菌后的液体石蜡油,0.6ml/只。一周后,再向其腹腔注射能稳定分泌 C-myc 抗体的杂交瘤细胞,0.5ml/只(细胞数约为  $5 \times 10^6$  个)。10-14 天后,待小鼠腹部明显膨大并行动迟缓时,收集腹水,3000rpm、10min 离心,弃去脂肪和石蜡油,收集中层澄清腹水, -20℃ 冻存备用。2B2 及 2A9 克隆的小鼠腹水效价分别为 1:64000、1:32000,表明获得的单克隆抗体具有较高的敏感性

[0098] 3 利用抗 c-Myc IgM 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的直接法 ELISA 法

[0099] 3.1 包被

[0100] 包被 0.01 ~ 1000pmo l/L 的被检肿瘤细胞裂解液。37℃ 反应 1h。阴性对照为正常细胞裂解液;阳性对照为 Raji 细胞裂解液。

[0101] 3.2 洗板

[0102] 甩干包被液,用 PBST 洗涤,200 μ l/孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

[0103] 3.3 封闭

[0104] 加入封闭液 200 μ l/孔,37℃ 湿盒温浴 30min。

[0105] 3.4 洗板

[0106] 用 PBST 洗涤,200 μ l/孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

[0107] 3.5 一抗反应

[0108] 加入 1:2000 倍稀释的抗 C-Myc IgM (2A9) 100 μ l/孔,37℃ 温浴 1h。

[0109] 3.6 洗板

[0110] 甩干一抗,用 PBST 洗涤,200 μ l/孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

[0111] 3.7 二抗反应

[0112] 将 HRP 酶标羊抗鼠 IgM 做 1:5000 稀释,100 μ l/孔加入酶标板,37℃ 湿盒温浴 1h。

[0113] 3.8 洗板

[0114] 甩干二抗,用 PBST 洗涤,200 μ l/孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

[0115] 3.9 底物

[0116] 加入底物液 100 μ l/孔,37℃ 避光反应 15min。

[0117] 3.10 终止

[0118] 加入终止液 100 μ l/孔,酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

[0119] 本实验使用抗 C-Myc IgM (2A9) 单克隆抗体快速检测肿瘤细胞中的 c-Myc 抗原,具有高度特异性和敏感性,所需时间为 2.5-3h,阳性检测率达到 100%。可检测的 c-Myc 蛋白浓度范围为 0.01 ~ 1000pmo l/L,检出下限为 0.01 ~ 0.05pmo l/L。

[0120] 实施例 3:

[0121] 具体方法步骤如下:

[0122] 1. C-myc 抗原的制备与纯化

[0123] 菌液 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.6 时,经 IPTG 诱导 1 小时后,6500rpm 离心 10min 收集细胞,悬浮,超声破碎仪破碎细胞(20% 功率,破碎 10min),2-8M 尿素进行变性 2h 后再复性,经 AKATA 仪用镍离子亲和层析柱纯化蛋白,最后得到 95% 以上纯度的 c-Myc 蛋白(图 1)。

## [0124] 2. 单克隆抗体的制备

### [0125] 2.1 动物免疫

[0126] 利用原核表达并纯化的 C-myc 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,将抗原注射入健康 Balb/c 小鼠腹腔内,0.6ml/ 只,抗原量为 100 μg/ 只;首次免疫 14 天后,改用弗氏不完全佐剂与同体积的抗原量充分乳化进行第 2 次免疫,抗原量不变;第 28 天,按照 200 μg/ 只抗原量对小鼠进行加强免疫。第三次免疫后,小鼠的抗体效价达到了 1:1280000,见图 2,结果说明所建立的免疫程序合理有效。

### [0127] 2.2 细胞融合

[0128] 收集免疫 Balb/c 小鼠脾细胞后与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 5:1 的比例混合于 50ml 离心管中,1200rpm、5min 离心,弃上清,在 30s 时迅速滴入 37℃ 预热的 50% 的 PEG1000 约 0.5ml 并轻轻混匀,700rpm、2min 离心,再沿管壁缓慢加入 37℃ 预热的 RPMI-1640 基础培养基 15ml,使试管做划圆样运动约 2min,1400rpm、5min 离心,弃上清,同法再清洗 1 次。沿管壁缓慢加入 37℃ 预热的 HT 培养基 30ml,轻轻混匀融合细胞,滴加到预先铺有滋养层细胞的 96 孔板中,100 μl/ 孔,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。次日补加 HAT 培养基 50 μl/ 孔;第 4 天,每孔吸弃 200 μl,再加入 HAT 培养基 100 μl/ 孔;第 7 天,每孔再补加 100 μl HAT 培养基。融合后第 9 天,镜下会观察到未融合或自身融合的脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞会全部死亡,而杂交瘤细胞存活(图 3)。

### [0129] 2.3 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

[0130] 当杂交瘤细胞集落生长 50% 以上时,用 ELISA 方法筛选阳性孔。针对阳性孔,用 HT 培养基稀释细胞,滴加到另一已铺有滋养细胞的 96 孔板内,进行亚克隆。亚克隆第 5 天,标记有单克隆细胞的孔并半量更换 HT 培养基。第 9 天,对标记的单克隆细胞孔的上清进行 ELISA 检测,获得 2 株能稳定分泌抗 C-myc 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,2B2 及 2A9 克隆。

[0131] 经用 Sigma 的 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 检测,显示出 2B2 及 2A9 克隆的抗体类型分别为 IgG<sub>1</sub> 亚类和 IgM(图 4)。

### [0132] 2.4 单克隆抗体的大量制备

[0133] 在健康雌性 Balb/c 小鼠腹腔内注射高压灭菌后的液体石蜡油,0.6ml/ 只。一周后,再向其腹腔注射能稳定分泌 C-myc 抗体的杂交瘤细胞,0.5ml/ 只(细胞数约为 5×10<sup>6</sup> 个)。10-14 天后,待小鼠腹部明显膨大并行动迟缓时,收集腹水,3000rpm、10min 离心,弃去脂肪和石蜡油,收集中层澄清腹水,-20℃ 冻存备用。2B2 及 2A9 克隆的小鼠腹水效价分别为 1:64000、1:32000,表明获得的单克隆抗体具有较高的敏感性

## [0134] 3 利用抗 c-Myc IgG 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的直接法 ELISA 法

### [0135] 3.1 包被

[0136] 包被 0.01 ~ 1000pmo l/L 的被检肿瘤细胞裂解液。37℃ 反应 1h。阴性对照为正常细胞裂解液;阳性对照为 Raj i 细胞裂解液。

### [0137] 3.2 洗板

[0138] 用 PBST 洗涤,200 μl/ 孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次。

- [0139] 3.3 封闭
- [0140] 加入封闭液 200  $\mu$  l/ 孔, 37°C 湿盒温浴 30min。
- [0141] 3.4 洗板
- [0142] 用 PBST 洗涤, 200  $\mu$  l/ 孔, 每次 30s 后甩干洗板液, 重复三次。
- [0143] 3.5 一抗反应
- [0144] 加入 1 :2000 倍稀释的抗 c-Myc IgG (2B2) 100  $\mu$  l/ 孔, 37°C 湿盒温浴 1h。
- [0145] 3.6 洗板
- [0146] 甩干一抗, 用 PBST 洗涤, 200  $\mu$  l/ 孔, 每次 30s 后甩干洗板液, 重复三次。
- [0147] 3.7 二抗反应
- [0148] 将 HRP 酶标羊抗鼠 IgG 做 1:5000 稀释, 100  $\mu$  l/ 孔加入酶标板, 37°C 湿盒温浴 1h。
- [0149] 3.8 洗板
- [0150] 甩干二抗, 用 PBST 洗涤, 200  $\mu$  l/ 孔, 每次 30s 后甩干洗板液, 重复三次。
- [0151] 3.9 底物
- [0152] 加入底物液 100  $\mu$  l/ 孔, 37°C 避光反应 15min。
- [0153] 3.10 终止
- [0154] 加入终止液 100  $\mu$  l/ 孔, 酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。
- [0155] 本实验使用抗 c-Myc IgG (2B2) 单克隆抗体快速检测肿瘤细胞中的 c-Myc 抗原, 具有高度特异性和敏感性, 所需时间为 2.5-3h, 阳性检测率达到 100%。可检测的 c-Myc 蛋白浓度范围为 0.01 ~ 1000pmol/L, 检出下限为 0.01 ~ 0.05pmol/L。
- [0156] 根据上述三个实施例, 本发明利用单克隆抗体快速检测 C-Myc 的 ELISA 法, 可概括为如下步骤:
- [0157] S1、C-myc 抗原的制备与纯化, 具体分步如下:
- [0158] S11、将含有原核表达载体 (pET20b-C-myc 表达菌) 的表达菌 E. coli BL21 在 37°C 震荡培养 (170rpm);
- [0159] S12、经 IPTG 诱导后, 收集菌体, 超声波打碎、利用镍柱子层析纯化;
- [0160] S2、制备抗 C-myc 单克隆抗体, 具体分步如下:
- [0161] S21、将利用纯化的 C-myc 蛋白进行免疫健康 Balb/c 小鼠;
- [0162] S22、将免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合;
- [0163] S23、第 3-4 天, 利用 HAT 培养基进行筛选。
- [0164] S24、对阳性杂交瘤细胞进行亚克隆, 获得 2 株能稳定分泌抗 C-myc 的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 2B2 及 2A9 克隆。
- [0165] S25、2B2 及 2A9 克隆的抗体亚型分别为 IgG<sub>1</sub> 亚类和 IgM。
- [0166] S26、Balb/c 小鼠腹腔内注射 2B2 及 2A9 克隆细胞株, 大量制备单克隆抗体。
- [0167] S27、选用以下三种方法中的任意一种, 实现快速检测 C-Myc:
- [0168] 方法 1 :利用两种抗 c-Myc 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的夹心法 ELISA 法。
- [0169] 方法 2 :利用抗 c-Myc IgM 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的直接法 ELISA 法。
- [0170] 方法 3 :利用抗 c-Myc IgG 单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的直接法 ELISA

法。

[0171] 优选方式下,步骤 S1 的具体步骤为:

[0172] 将含有原核表达载体(pET20b-C-myc 表达菌)的 E. coli BL21 在 37℃ 震荡培养(170rpm),菌液 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.4-0.6 时,经 1-2mM IPTG 诱导 1-3 小时后,6500rpm 离心 10min 收集细胞,悬浮,超声破碎仪破碎细胞(20% 功率,破碎 10min),2-8M 尿素进行变性 2h 后再复性,经 AKATA 仪用镍离子亲和层析柱纯化蛋白,最后得到 90-95% 以上纯度的 C-Myc 蛋白。

[0173] 优选方式下,步骤 S21 具体步骤为:利用原核表达并纯化的 C-myc 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,将抗原注射入健康 Balb/c 小鼠腹腔内,0.4ml/只,抗原量为 50-100 μg/只;首次免疫 14 天后,改用弗氏不完全佐剂与同体积的抗原量充分乳化进行第 2 次免疫,抗原量不变;第 28 天,按照 100-200 μg/只抗原量对小鼠进行第三次免疫,小鼠的抗体效价达到了 1:64000-1:1280000。

[0174] 优选方式下,在步骤 S22 具体步骤为:Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 5:1-10:1 的比例混合于 50ml 离心管中,1200rpm、5min 离心,弃上清,在 25s-30s 内迅速滴入 37℃ 预热的 50% 的 PEG1000 约 0.5ml 并轻轻混匀,700rpm、2min 离心,再沿管壁缓慢加入 37℃ 预热的 RPMI-1640 基础培养基 15ml,使试管做划圆样运动约 2min,离心 1400rpm、5min,弃上清,同法再清洗 1 次。沿管壁缓慢加入 37℃ 预热的 HT 培养基 30ml,轻轻混匀融合细胞。

[0175] 优选方式下,在步骤 S24 具体步骤为:当杂交瘤细胞集落生长 40-60% 以上时,用 ELISA 方法筛选阳性孔。针对阳性孔,用 HT 培养基稀释细胞,进行亚克隆。培养第 8-9 天,对标记的单克隆细胞孔的上清进行 ELISA 检测,筛选阳性克隆。

[0176] 优选方式下,在步骤 S26 具体步骤为:向健康雌性 Balb/c 小鼠腹腔内注射高压灭菌后的液体石蜡油,0.4-0.6ml/只。一周后,再向其腹腔注射能稳定分泌 C-myc 抗体的杂交瘤细胞,0.5ml/只(细胞数约为 2-5×10<sup>6</sup> 个)。10-14 天后,待小鼠腹部明显膨大并行动迟缓时,收集腹水,3000rpm、10min 离心,弃去脂肪和石蜡油,收集中层澄清腹水,-20℃ 冻存备用。2B2 及 2A9 克隆的小鼠腹水效价分别为 1:64000、1:32000。

[0177] 优选方式下,在步骤 S27 中方法 1 的具体步骤为:用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被抗 C-myc IgM (2A9),使浓度达到 5-20 μg/ml;用 PBS-T 洗涤,200 μl/孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次;加入 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液。37℃ 反应 1h;用 PBS-T 洗涤;加入封闭液 200 μl/孔,37℃ 湿盒温浴 1h;加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 C-myc IgM(2B2)100 μl/孔,37℃ 湿盒温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgG 做 1:5000 稀释,100 μl/孔加入酶标板,37℃ 湿盒温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;加入邻苯二胺(OPD)液 100 μl/孔,37℃ 避光反应 15min;加入终止液(2mol/L 硫酸溶液)100 μl/孔,酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

[0178] 优选方式下,在步骤 S27 中方法 2 的具体步骤为:

[0179] 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液。用 PBS-T 洗涤,200 μl/孔,每次 30s 后甩干洗板液,重复三次;加入封闭液 200 μl/孔,37℃ 温浴 1h;加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 C-Myc IgM (2A9) 100 μl/孔,37℃ 温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgM 做 1:5000-1:10000 稀释,100 μl/孔加入酶标板,37℃ 温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;加入邻苯二胺(OPD)液 100 μl/孔,37℃ 避光反应 15min;加入终止液(2mol/L 硫酸溶液)100 μl/孔,酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

[0180] 优选方式下,在步骤 S27 中方法 3 的具体步骤为:

[0181] 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释包被 1:10-1:50 倍稀释的被检肿瘤细胞裂解液。37°C 反应 1h;用 PBS-T 洗涤;加入封闭液 200  $\mu$  l/孔,37°C 温浴 1h;加入 1:1000-1:2000 倍比稀释的抗 c-Myc IgG (2B2) 100  $\mu$  l/孔,37°C 温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;将 HRP 酶标羊抗小鼠 IgG 做 1:5000 稀释,100  $\mu$  l/孔加入酶标板,37°C 温浴 1h;用 PBS-T 洗涤;加入邻苯二胺(OPD)液 100  $\mu$  l/孔,37°C 避光反应 15min;加入终止液(2mo l/L 硫酸溶液) 100  $\mu$  l/孔,酶标仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值。

[0182] 本发明还提供了一种利用单克隆抗体检测肿瘤细胞 c-Myc 表达量的 ELISA 溶液配制方法,包括:

[0183] 洗涤液, PBS-T 缓冲液(20mM 磷酸盐缓冲液加入 0.1%Tween20);

[0184] 抗体稀释液, 2% 脱脂奶粉 PBS 溶液;

[0185] 包被液, pH 9.6 碳酸盐缓冲液;

[0186] 封闭液, 5% 脱脂奶粉 PBS 溶液;

[0187] 底物, 邻苯二胺(OPD)液;

[0188] 终止液, 2mo l/L 硫酸溶液。

[0189] 本发明所述的三种 ELISA 测定方法具有操作简便、灵敏度高、检出限低、稳定性和重现性好等优点,对恶性肿瘤的筛选具有重大的意义。

[0190] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

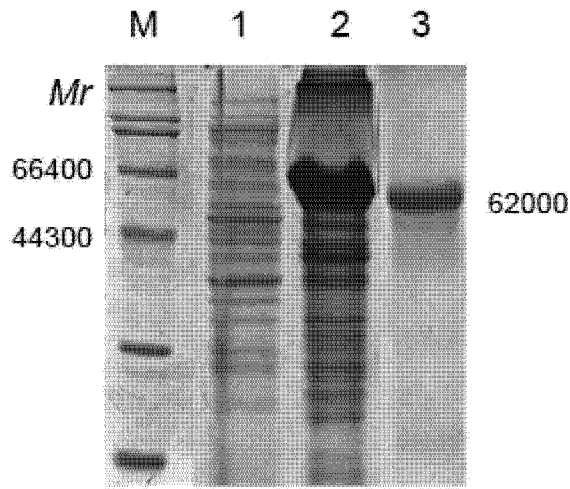


图 1

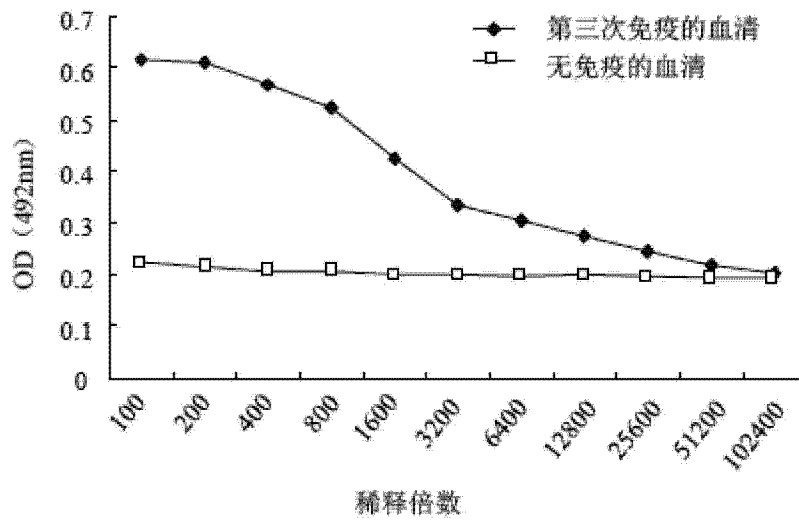


图 2

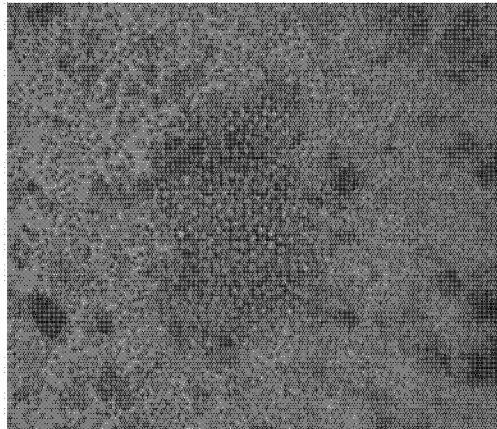


图 3

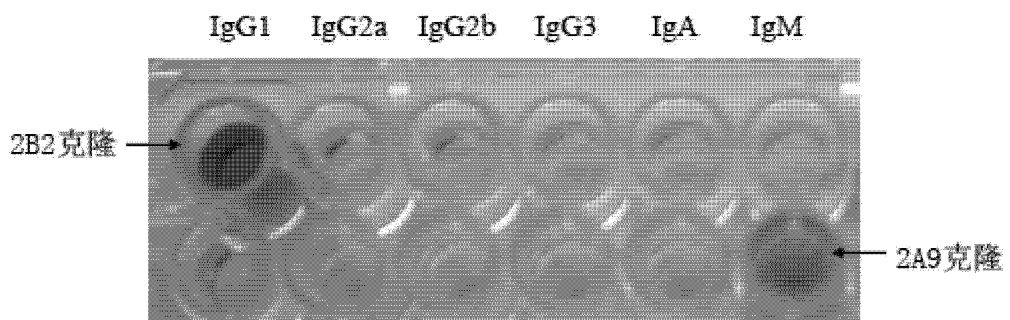


图 4

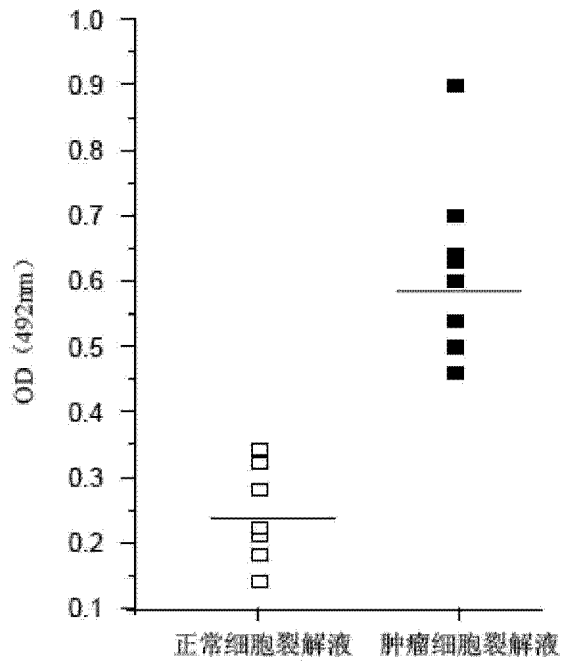


图 5

专利名称(译)	利用单克隆抗体快速检测C-Myc的ELISA法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103048458A</a>	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	CN201210496684.X	申请日	2012-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	大连大学		
申请(专利权)人(译)	大连大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连大学		
[标]发明人	李文哲 金锦花		
发明人	李文哲 金锦花		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	刘琦		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明一种利用单克隆抗体快速检测C-Myc的ELISA法，通过蛋白纯化技术将原核表达C-Myc蛋白提纯；进行免疫的小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行细胞融合，经ELISA法筛选，亚克隆及单克隆抗体Ig亚型鉴定，获得2株能够稳定分泌抗C-myc IgG1的克隆及抗C-myc IgM克隆。利用抗c-Myc IgG1抗体以及抗c-Myc IgM抗体，建立快速检测c-Myc的一种夹心法ELISA法和两种直接法ELISA法。本发明对C-myc蛋白样品进行准确测定，可检测的C-myc蛋白浓度范围为0.01 ~ 1000pmol/L，检出下限为0.01 ~ 0.05pmol/L，大大提高了检测C-Myc的特异性和敏感性，操作简单、重复性高，本发明检测肿瘤组织中的C-Myc的表达量，为恶性肿瘤的筛选提供实验数据。

