



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102507943 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 10

(21) 申请号 201110343942. 6

审查员 王丽华

(22) 申请日 2011. 11. 03

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :C201172 2011. 08. 31

(73) 专利权人 潘世扬

地址 210029 江苏省南京市广州路 300 号江苏省人民医院医学检验科

(72) 发明人 潘世扬 黄珮珺 王芳

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218

代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

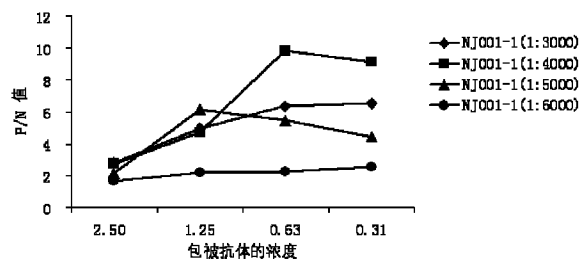
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒及其制备方法。该试剂盒,包含如下组成:保藏号为 CCTCC NO :C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1,抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的 96 孔酶标板,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG,抗体稀释液:1% PBS,洗液,终止液 2M H₂SO₄, TMB 底物显色液,阳性对照:SPC-A1 裂解液,阴性对照:人 AB 血清或胎牛血清和空白对照 1% PBS。与现有检测方法比较,该试剂盒用于非小细胞肺癌的检测具有最好的敏感性(59.1%)和特异性(4.4%),同时具有较好的精密度和稳定性。



1. 一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒,其特征在于包含如下组成:保藏号为 CCTCC NO:C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1 5-10 μ L,抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的 96 孔酶标板 1 块,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 5-10 μ L,抗体稀释液 1% PBS 40-50 mL,洗液 40-50 mL,终止液 2 M H_2SO_4 8-10 mL,TMB 底物显色液 A、B 液各 8-10 mL,阳性对照:SPC-A1 裂解液 400-600 μ L,阴性对照:人 AB 血清或胎牛血清 400-600 μ L 和空白对照:1% PBS 1-2 mL;其中,所述的保藏号为 CCTCC NO:C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1 浓度为 200 mg/L,使用时稀释度为 1:4 000;

所述的抗 SPC-A1 兔多克隆抗体的通过如下方法制备:首次免疫用 1×10^8 个 SPC-A1 细胞对新西兰兔进行耳缘静脉注射,其后隔一周加强免疫一次,免疫剂量为 3×10^8 个细胞,每次免疫前均进行耳缘静脉采血,间接 ELISA 法检测血清抗体效价,待抗体滴度达大于或等于 1:300 000 后进行腹主动脉放血,将兔血 37 $^{\circ}C$ 放置 1 h,再转入 4 $^{\circ}C$ 过夜,待血液充分收缩后迅速分离血清,并于 4 $^{\circ}C$,3000 r/min 离心 30 min,收集上清,利用 Protein A 亲和层析法进行纯化,纯化后效价为 1:150 000-170 000;

所述的抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的酶标板通过如下方法制备:用 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液将纯化后抗 SPC-A1 兔多克隆抗体稀释成目的浓度 0.63 μ g/mL;将稀释好的抗体溶液混匀后加入微孔中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}C$ 过夜;洗板 3 次;加入 3% BSA 封闭液,300 μ L/孔,4 $^{\circ}C$ 过夜;洗板 3 次;所述的 pH9.6 的碳酸盐包被缓冲液: Na_2CO_3 1.59 g, $NaHCO_3$ 2.93 g,加 ddH₂O 至 1 L,最后用 10 M NaOH 调节 pH 至 9.6,混匀;所述的洗液配方为:2.0 g NaCl;0.2 g KH_2PO_4 ;2.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$;0.2 g KCl;0.2 g NaN_3 ;40 mL ddH₂O;0.5 mL 吐温 -20,临用前加 ddH₂O 至 1 L;SPC-A1 裂解液制备方法为:将 SPC-A1 铺于六孔板中,浓度为 1×10^6 个/mL;待细胞铺满孔底后,弃培养液,加 4 $^{\circ}C$ 预冷 1% PBS 洗两遍,2 mL/孔;每孔加入裂解液 150 μ L,置于震荡器上;30 min 后,用枪头刮取贴壁细胞,收集裂解液于 1.5 mL EP 管中,13 000 g 离心 10 min;留取上清,分装后 -20 $^{\circ}C$ 保存。

2. 权利要求 1 所述的用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于包含如下步骤:

(1) 单克隆抗体 NJ001-1 的制备:取 8-10 周龄雌性 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5 mL 石蜡油,10 d 后分别腹腔注射生长良好的保藏号为 CCTCC NO:C201172 的杂交瘤细胞 NM001-1 1×10^6 /只,1-2 周后抽吸腹水,37 $^{\circ}C$ 1 h 后,4 $^{\circ}C$ 过夜,次日将腹水离心,经 Protein G 亲和层析柱纯化,得到纯化的单克隆抗体 NJ001-1,抗体经甘油与水比例为 1:1 的液体进行溶解,终浓度为 200 mg/L;

(2) 抗 SPC-A1 兔多克隆抗体的制备:首次免疫用 1×10^8 个 SPC-A1 细胞对新西兰兔进行耳缘静脉注射,其后隔一周加强免疫一次,免疫剂量为 3×10^8 个细胞,每次免疫前均进行耳缘静脉采血,间接 ELISA 法检测血清抗体效价,待抗体滴度达大于或等于 1:300 000 后进行腹主动脉放血,将兔血 37 $^{\circ}C$ 放置 1 h,再转入 4 $^{\circ}C$ 过夜,待血液充分收缩后迅速分离血清,并于 4 $^{\circ}C$,3 000 r/min 离心 30 min,收集上清,利用 Protein A 亲和层析法进行纯化,纯化后效价为 1:150 000-1:170 000,浓度为 14.77 μ g/mL;

(3) 抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被酶标板:用 pH9.6 的碳酸盐包被缓冲液将纯化后抗 SPC-A1 兔多克隆抗体稀释成目的浓度 0.63 μ g/mL;将稀释好的液体充分混匀后加入微孔

中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜;洗板3次,200 μ L/孔;加入3% BSA 封闭液,300 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜;洗板3次,200 μ L/孔;-20 $^{\circ}$ C保存;

(4) 洗液、SPC-A1 裂解液、1%PBS 的配制:

洗液:2.0 g NaCl;0.2 g KH_2PO_4 ;2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$;0.2 g KCl;0.2 g NaN_3 ;40 mL ddH_2O ;0.5 mL 吐温-20,临用前加 ddH_2O 至 1 L;

SPC-A1 裂解液制备方法:将 SPC-A1 铺于六孔板中,浓度为 1×10^6 个/mL;待细胞铺满孔底后,弃培养液,加 4 $^{\circ}$ C 预冷 1% PBS 洗两遍,2 mL/孔;每孔加入裂解液 150 μ L,置于震荡器上;30 min 后,用枪头刮取贴壁细胞,收集裂解液于 1.5 mL EP 管中,13 000 g 离心 10 min;留取上清,分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存;

1% PBS:8 g NaCl;2.2 g KCl;1.44 g Na_2HPO_4 ;0.24 g KH_2PO_4 ;加 ddH_2O 至 800 mL;

(5) 试剂盒组装:上述制备的保藏号为 CCTCC NO:C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1 5-10 μ L,抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的酶标板 1 块,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 5-10 μ L,抗体稀释液 1% PBS 50 mL,洗液 40-50 mL,终止液 2 M H_2SO_4 8-10 mL,TMB 底物显色液 A、B 液各 8-10 mL,阳性对照:SPC-A1 裂解液 400-600 μ L,阴性对照:人 AB 血清或胎牛血清 400-600 μ L 和空白对照:1%PBS 1-2 mL 组装成试剂盒。

3. 根据权利要求 2 所述的用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于所述的 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液: Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g,加 ddH_2O 至 1 L,最后用 10 M NaOH 调节 pH 至 9.6,混匀。

一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物样品检测领域,涉及一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 肺癌是人类发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,全球每年肺癌发生超过 150 万例,其中 80% 为非小细胞肺癌 (NSCLC)。非小细胞型肺癌,包括鳞癌、腺癌、大细胞癌,与小细胞癌相比其癌细胞生长分裂较慢,扩散转移相对较晚。尽管诊治技术日新月异,肺癌的 5 年生存率仍不到 15%。要提高肺癌患者的生存率,早期诊断尤其重要。单克隆抗体具有高度特异性,在肿瘤诊断和治疗方面都成为当前的研究热点。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒。

[0004] 本发明的另一目的是提供该 ELISA 试剂盒的制备方法。

[0005] 本发明的目的可通过如下技术方案实现:

[0006] 一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒,包含如下组成:保藏号为 CCTCC NO:C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1,抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的 96 孔酶标板,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG,抗体稀释液:1% PBS,洗液,终止液 2M H_2SO_4 ,TMB 底物显色液,阳性对照:SPC-A1 裂解液,阴性对照:人 AB 血清或胎牛血清和空白对照:1% PBS。

[0007] 所述的用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒,优选包含如下组成:

[0008] 保藏号为 CCTCC NO:C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1 5-10 μ L,抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的酶标板 1 块,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 5-10 μ L,抗体稀释液为 1% PBS 40-50mL,洗液 40-50mL,终止液 2M H_2SO_4 8-10mL,TMB 底物显色液 A、B 液各 8-10mL,阳性对照:SPC-A1 裂解液 400-600 μ L,阴性对照:人 AB 血清或胎牛血清 400-600 μ L 和空白对照:1% PBS 1-2mL。

[0009] 其中,所述的保藏号为 CCTCC NO:C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1 浓度为 200mg/L。

[0010] 所述的抗 SPC-A1 兔多克隆抗体的通过如下方法制备:首次免疫用 1×10^8 个 SPC-A1 细胞对新西兰兔进行耳缘静脉注射,其后隔一周加强免疫一次,免疫剂量为 3×10^8 个细胞,每次免疫前均进行耳缘静脉采血,间接 ELISA 法检测血清抗体效价,待抗体滴度大于或等于 1:300000 后进行腹主动脉放血,将兔血 37°C 放置 1h,再转入 4°C 过夜,待血液充分收缩后迅速分离血清,并于 4°C,3000r/min 离心 30min,收集上清,利用 Protein A 亲和层析法进行纯化,纯化后效价为 1:150 000-1:170 000。

[0011] 所述的抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的酶标板通过如下方法制备:用 pH9.6 的碳酸

盐包被缓冲液将纯化后抗 SPC-A1 兔多克隆抗体稀释成目的浓度 $0.63 \mu\text{g/mL}$;将稀释好的抗体溶液混匀后加入微孔中, $100 \mu\text{L/孔}$, 4°C 过夜 ;洗板 3 次 ;加入 3% BSA 封闭液, $300 \mu\text{L/孔}$, 4°C 过夜 ;洗板 3 次。

[0012] 所述的 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液 : Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加 ddH_2O 至 1L, 最后用 10M NaOH 调节 pH 至 9.6, 混匀。

[0013] 所述的洗液配方为 : 2.0g NaCl ; 0.2g KH_2PO_4 ; 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0.2g KCl ; 0.2g NaN_3 ; 40mL ddH_2O ; 0.5mL 吐温 -20, 临用前加 ddH_2O 至 1L ; SPC-A1 裂解液制备方法为 : 将 SPC-A1 铺于六孔板中, 浓度为 1×10^6 个 /mL ; 待细胞铺满孔底后, 弃培养液, 加 4°C 预冷 1% PBS 洗两遍, 2mL/孔 ; 每孔加入裂解液 $150 \mu\text{L}$, 置于震荡器上 ; 30min 后, 用枪头刮取贴壁细胞, 收集裂解液于 1.5mL EP 管中, 13000g 离心 10min ; 留取上清, 分装后 -20°C 保存。

[0014] 所述的用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒的制备方法, 包含如下步骤 :

[0015] (1) 单克隆抗体 NJ001-1 的制备 : 取 8-10 周龄雌性 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5mL 石蜡油, 10d 后分别腹腔注射生长良好的保藏号为 CCTCC NO : C201172 的杂交瘤细胞 NM001-11 $\times 10^6$ /只, 1-2 周后抽吸腹水, 37°C 1h 后, 4°C 过夜, 次日将腹水离心, 经 Protein G 亲和层析柱纯化, 得到纯化的单克隆抗体 NJ001-1, 抗体经甘油与水比例为 1 : 1 的液体进行溶解, 终浓度为 200mg/L ;

[0016] (2) 抗 SPC-A1 兔多克隆抗体的制备 : 首次免疫用 1×10^8 个 SPC-A1 细胞对新西兰兔进行耳缘静脉注射, 其后隔一周加强免疫一次, 免疫剂量为 3×10^8 个细胞, 每次免疫前均进行耳缘静脉采血, 间接 ELISA 法检测血清抗体效价, 待抗体滴度达大于或等于 1 : 300 000 后进行腹主动脉放血, 将兔血 37°C 放置 1h, 再转入 4°C 过夜, 待血液充分收缩后迅速分离血清, 并于 4°C , 3000r/min 离心 30min, 收集上清, 利用 Protein A 亲和层析法进行纯化, 纯化后效价为 1 : 150 000-1 : 170 000, 浓度为 $14.77 \mu\text{g/mL}$;

[0017] (3) 抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被酶标板 : 用 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液将纯化后抗 SPC-A1 兔多克隆抗体稀释成目的浓度 $0.63 \mu\text{g/mL}$; 将稀释好的液体充分混匀后加入微孔中, $100 \mu\text{L/孔}$, 4°C 过夜 ; 洗板 3 次, $200 \mu\text{L/孔}$; 加入 3% BSA 封闭液, $300 \mu\text{L/孔}$, 4°C 过夜 ; 洗板 3 次, $200 \mu\text{L/孔}$; -20°C 保存 ;

[0018] (4) 洗液、SPC-A1 裂解液、1% PBS 的配制 : 洗液 : 2.0g NaCl ; 0.2g KH_2PO_4 ; 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0.2g KCl ; 0.2g NaN_3 ; 40mL ddH_2O ; 0.5mL 吐温 -20, 临用前加 ddH_2O 至 1L ; SPC-A1 裂解液制备方法 : 将 SPC-A1 铺于六孔板中, 浓度为 1×10^6 个 /mL ; 待细胞铺满孔底后, 弃培养液, 加 4°C 预冷 1% PBS 洗两遍, 2mL/孔 ; 每孔加入裂解液 $150 \mu\text{L}$, 置于震荡器上 ; 30min 后, 用枪头刮取贴壁细胞, 收集裂解液于 1.5mL EP 管中, 13000g 离心 10min ; 留取上清, 分装后 -20°C 保存 ; 1% PBS : 8g NaCl ; 2.2g KCl ; 1.44g Na_2HPO_4 ; 0.24g KH_2PO_4 ; 加 ddH_2O 至 800mL ;

[0019] (5) 试剂盒组装 : 上述制备的保藏号为 CCTCC NO : C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1 $5-10 \mu\text{L}$, 抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的酶标板 1 块, 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG $5-10 \mu\text{L}$, 抗体稀释液为 1% PBS $40-50\text{mL}$, 洗液 $40-50\text{mL}$, 终止液 2M H_2SO_4 $8-10\text{mL}$, TMB 底物显色液 A、B 液各 $8-10\text{mL}$, 阳性对照 : SPC-A1 裂解液 $400-600 \mu\text{L}$, 阴性对照 : 人 AB 血清或胎牛血清 $400-600 \mu\text{L}$ 和空白对照 : 1% PBS $1-2\text{mL}$

组装成试剂盒。

[0020] 所述的 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液 : Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加 ddH_2O 至 1L, 最后用 10M NaOH 调节 pH 至 9.6, 混匀。

[0021] 本发明的有益效果 :

[0022] 本发明在成功制备了能特异性识别非小细胞肺癌的单抗 NJ001-1 的基础上, 首先通过 Western blot 证实了肺腺癌患者血清中 NJ001-1 相关靶抗原的表达水平明显高于健康体检者 ; 然后免疫新西兰兔制备并纯化得到高效价的抗 SPC-A1 的多克隆抗体, 联合该多抗和 NJ001-1 单抗建立双抗体夹心 ELISA 试剂盒, 最后利用该试剂盒对大量的临床样本进行检测和分析。结果显示, 该试剂盒用于非小细胞肺癌的检测具有很好的特异性、精密度和稳定性, 有望在临床检测中发挥重要作用。目前市面上无国家 FDA 批准的非小细胞肺癌抗原 ELISA 检测试剂盒, 采用现有电化学发光方法检测非小细胞肺癌, 与本 ELISA 检测方法比较, 更敏感的化学发光法进行检测, 结果显示本发明试剂盒用于非小细胞肺癌的检测时敏感度和特异性均优于化学发光法。

附图说明

[0023] 图 1 间接细胞 ELISA 法分析单抗 NJ001-1 与多种肿瘤细胞及非肿瘤细胞的反应性。

[0024] 图 2 血清中 NJ001-1 相关靶抗原的蛋白免疫印迹结果及灰度分析 ;

[0025] A : 2、3 和 6 为三位健康体检者的血清样本, 4 和 5 为两位肺腺癌患者的血清样本, 1 为 SPC-A1 细胞裂解液 (阳性对照) ;

[0026] B : 1 为肺腺癌患者, 2 为健康体检者, 3 为阳性对照。

[0027] 图 3 抗 SPC-A1 多克隆抗体的效价检测。

[0028] 图 4 棋盘法确定包被抗体和 NJ001-1 的最佳工作浓度。

[0029] 生物材料样品的保藏信息

[0030] 杂交瘤细胞株 NM001-1 于 2011 年 8 月 31 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏地址为中国武汉, 武汉大学, 保藏号为 CCTCC NO : C201172。

具体实施方式

[0031] 1、以下实施例中所涉及的细胞及主要试剂 : 人肺癌细胞系 SPC-A1、A549、NCI-H460、NCI-H520, 人肝癌细胞系 HepG2, 人乳腺癌细胞系 ZR-75-30, 人结肠癌细胞系 CoLo205 及人胚肺成纤维细胞系 WI-38 购自中国科学院细胞库 ; SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞系由本实验室保存 ; 6-8 周龄和 8-10 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物公司。RPMI 1640、DMEM、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、聚乙二醇、次黄嘌呤胸腺嘧啶核苷 (HT)、氨基喋呤次黄嘌呤胸腺嘧啶核苷 (HAT)、人 AB 血清和石蜡油购自美国 Gibco Invitrogen 公司 ; FITC 标记的羊抗鼠 IgG 及可溶型单组分 TMB 底物溶液购自北京天根公司 ; 小鼠 Ig 亚型测定试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司 ; Western blot 显色剂购自美国 Cell Signaling 公司 ; 肺炎性假瘤组织、肺癌组织及乳腺癌组织由江苏省人民医院病理科提供 ; Model 550 型酶标仪购自 Bio-Rad 公司。2.5Kg 的雄性新西兰兔购自上海斯莱克实验动物公司。BSA 购自 Biosharp 公司 ; GAPDH 抗体购自碧云天公司 ; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购自中杉

金桥公司 ;Proteo Extract Albumin/IgG Removal Kit 购自默克公司。

[0032] 2、以下实施例中所涉及的细胞培养方法为：上述细胞分别生长于含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素各 100U/mL 的 DMEM 或 RPMI1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。人外周血单个核细胞 (PBMC) 获自健康献血者,采用常规淋巴细胞分离液分离。

[0033] 3、标本收集 2007 年 10 月至 2011 年 6 月病理科确诊的肺癌患者 303 例,其中 195 例为肺腺癌,作为实施例 6-8 中的肺腺癌组,69 例为肺鳞癌,作为实施例 6-8 中的肺鳞癌,肺腺癌组和肺鳞癌组合并作为非小细胞肺癌组 ;39 例为小细胞肺癌,作为实施例 6-8 中的小细胞肺癌组 ;同时收集 50 例肺良性疾病患者,作为实施例 6-8 中的肺良性疾病组和 500 例健康体检者作为实施例 6-8 中的健康体检组。临床病理参数见表 1,随访至 2011 年 10 月。

[0034] 表 1 不同组别的临床病理参数

[0035]

		肺腺癌组	肺鳞癌组	小细胞肺癌组	肺良性疾病组	健康体检组
年龄 (岁)	≥60	92	22	19	31	312
	< 60	103	47	20	19	188
中位年龄(岁)		60.0	64.0	61.0	56.5	55.0
性别	男	116	64	32	31	295
	女	79	5	7	19	205
临床分期	I/II	30	15	-	-	-
	III/IV	94	14	-	-	-

[0036] 4、标本处理用血清分离胶真空采血管采集静脉血 2mL,先室温 3000r/min 离心 10min,转移上层血清,再于 4℃、16 000×g 离心 10min,吸取上层无细胞血清分装每管 200 μ L,置 -70℃ 保存。上述操作于标本采集后 2h 内完成。

[0037] 5、统计学分析采用 SPSS 16.0 统计学软件对数据进行统计分析。定性资料的组间比较采用 Fisher's 确切概率法, P < 0.05 时具有统计学意义。

[0038] 实施例 1 单抗制备

[0039] 1.1 动物免疫取 6-8 周雌性 BALB/c 小鼠,每只用 2×10⁶SPC-A1 细胞 / 次腹腔注射免疫 3 次,每次间隔 2 周。每次免疫前均进行小鼠内眦采血,间接细胞 ELISA 法检测小鼠血清抗体效价,待免疫小鼠血清抗体滴度达到最大并不再升高时取鼠脾细胞进行融合,融合前 3d 加强免疫 1 次。

[0040] 1.2 间接细胞 ELISA 试验接种 SPC-A1 细胞 10⁵/ 孔于 96 孔板上,至细胞生长融合达 80%,95%乙醇固定,PBS 洗 3 次,0.2% Triton-X-100 通透 20min,再用 50g/L BSA 37℃ 封闭 2h,依次加入不同稀释度的免疫小鼠血清 100 μ L,37℃ 温育 1h,再经 PBS 洗 3 次后,加入 1 : 1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 100 μ L,37℃ 温育 45min,经 PBS 洗涤后,加入 TMB 显色液,37℃ 温育 10min 后终止反应,用酶标仪测定 450nm 时吸光度 (OD) 值,以未免疫小鼠血清 (1 : 1 000) 作为阴性对照。

[0041] 1.3 细胞融合取免疫小鼠脾脏研磨制成细胞悬液,与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合 (姚晓玲,柳晓燕,吴强,等. 人肺癌相关单克隆抗体的制备及其抗原的纯化 [J]. 中国免疫学杂志,2006,22(12):1140-1145.),首次融合 480 孔,融合 1 周后出现细胞克隆,有 330 孔生长杂交瘤细胞,融合率约为 70%。按照 1.2 中的方法进行间接细胞

ELISA 试验筛选阳性杂交瘤细胞（将 1.2 间接细胞 ELISA 试验中的免疫小鼠血清替换为杂交瘤细胞培养上清），进行转种和 3 次有限稀释法亚克隆，采获得稳定分泌抗 SPC-A1 单抗且阳性最强的杂交瘤细胞株 NM001-1。将杂交瘤细胞株 NM001-1 于 2011 年 8 月 31 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏地址为武汉，武汉大学，保藏号为 CCTCC NO :C201172。

[0042] 1.4 单抗腹水的制备及纯化

[0043] 取 8-10 周龄雌性 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5mL 石蜡油，10d 后分别腹腔注射生长良好的杂交瘤细胞 NM001-1 (CCTCC NO :C201172) 约 1×10^6 / 只，1-2 周后抽吸腹水，37℃ 1h 后，4℃ 过夜，次日分别将腹水离心，经 Protein G 亲和层析柱纯化，得到纯化的单克隆抗体 NJ001-1；抗体经甘油与水比例为 1 : 1 的液体进行溶解，终浓度为 200mg/L。

[0044] 1.5 单抗的鉴定

[0045] 1.5.1 单抗 Ig 亚类的鉴定：纯化单抗用 PBS 1 : 10 000 稀释，按照测定试剂盒说明书操作。单抗 NJ001-1 的亚类均为 IgG，轻链为 κ 链。

[0046] 1.5.2 单抗效价的测定：分别将纯化的单抗 NJ001-1 用 PBS 倍比稀释，分别取 100 μ L 加入包被有 SPCA1 细胞的 96 孔板中，用间接细胞 ELISA 法测定 OD₄₅₀ 值，能与包被细胞发生免疫反应的单抗最大稀释度即为其效价。单克隆抗体 NJ001-1 效价为 4×10^6 ，用于本发明试剂盒的制备。

[0047] 1.5.3 单抗特异性的鉴定：用纯化的单抗 NJ001-1 与上述 8 种肿瘤细胞（人肺癌细胞系：肺腺癌 SPC-A1 和 A549，大细胞肺癌：NCI-H460，肺鳞癌：NCI-H520，人肝癌细胞系：HepG2，人乳腺癌细胞系：ZR-75-30，人结肠癌细胞系：Co1o205 与人胚肺成纤维细胞系：WI-38）及健康人 PBMC 分别做间接细胞 ELISA 分析，观察有无阳性反应。结果显示，单抗 NJ001-1 仅对肺癌细胞（SPCA1、A549、NCI-H520、NCI-H460）抗原具有较强反应，对其他肿瘤细胞（HepG2、Co1o 205、ZR-75-30）抗原、正常人胚肺细胞（WI-38）抗原及健康人 PBMC 均无反应（见图 1）。

[0048] 实施例 2 蛋白免疫印迹 (Western blot)

[0049] 随机选择 3 例肺腺癌患者和 2 例健康体检者的血清，通过 Proteo Extract Albumin/IgG Removal 试剂盒除去血清中的白蛋白和 IgG，经冷冰酮法对样本进行浓缩。将浓缩后的样本加样至 12% 的 SDS-PAGE 胶进行蛋白分离，后将蛋白转移至 PVDF 膜，用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2h，再分别以 1 : 1 000 稀释的 NJ001-1 单抗和 1 : 400 稀释的 GAPDH 抗体 4℃ 摇床孵育过夜，取出膜用 1×TBST 漂洗 3 次，加入 1 : 3 000 稀释的羊抗鼠二抗室温摇床孵育 2h，1×TBST 漂洗 3 次后进行 ECL 显色。肺腺癌患者血清中 NJ001-1 相关靶抗原的表达水平显著高于健康体检者，见图 2A，灰度分析结果见图 2B。

[0050] 实施例 3 抗 SPC-A1 多克隆抗体的制备

[0051] 首次免疫用 1×10^8 个 SPC-A1 细胞对新西兰兔进行耳缘静脉注射，其后隔一周加强免疫一次，免疫剂量为 3×10^8 个细胞。每次免疫前均进行耳缘静脉采血，间接 ELISA 法（以 SPC-A1 细胞铺板，浓度为 1×10^5 个 / 孔，将免疫前血清和该次采集的血清从 1 : 5 000 开始分别进行倍比稀释后加样，以辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 作为二抗，以 OD₄₅₀ 大于 2.1 倍阴性对照孔的血清最高稀释倍数作为血清的效价）检测血清抗体效价。待抗体滴度达大于或等于 1 : 300 000 后进行腹主动脉放血，将兔血 37℃ 放置 1h，再转入 4℃ 过夜，待血液充分收缩后迅速分离血清，并于 4℃，3 000r/min 离心 30min，收集上清，利用 Protein

A 亲和层析法进行纯化,纯化后效价为 1 : 160 000,见图 3,浓度为 14.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0052] 实施例 4 包被抗体和一抗最佳工作浓度的确定

[0053] 用棋盘滴定实验确定包被抗体和一抗的工作浓度。用包被缓冲液 (pH 9.6) 将包被抗体 (抗 SPC-A1 兔多抗, 14.77mg/mL) 稀释成 2.50、1.25、0.63 及 0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被酶标板, 100 μL 每孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 用洗液洗板 3 次; 3% BSA 每孔 300 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 得到抗 SPC-A1 多克隆抗体包被的酶标板; 用洗液洗板同上, 加入待检血清, 50 μL 每孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2h, 洗板 5 次; 将一抗 (单克隆抗体 NJ001-1, 200mg/L) 分别用 1% PBS (抗体稀释液) 进行 1 : 3 000、1 : 4 000、1 : 5 000 和 1 : 6 000 的稀释, 每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h; 洗板 5 次; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG, 用 1% PBS (抗体稀释液) 稀释至 1 : 3 000, 每孔加 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min, 用洗液洗板 5 次; 每孔加入新鲜配制的 TMB 底物显色液 100 μL (空白孔除外), 室温避光显色 10min, 以 2M H_2SO_4 的终止液终止反应。用 Model1550 型酶联仪 (Bio-Rad 公司) 读取 OD 值, 读数波长 450nm。阳性、阴性和空白对照分别为 SPC-A1 裂解液, 人 AB 血清或胎牛血清和 1% PBS。选择阳性孔 OD_{450} 值 / 阴性孔 OD_{450} 值 (P/N 值) 最大孔所对应的包被抗体和一抗的浓度为最佳工作浓度。结果显示: 当包被抗体的浓度为 0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 一抗稀释度为 1 : 4 000 时, 可保证尽可能多地结合靶抗原, 同时 P/N 值最大 (9.8), 见图 4。

[0054] 上述方法中涉及的各试剂的配制方法:

[0055] 终止液、TMB 底物显色液: 购自上海科华公司

[0056] 洗液: 2.0g NaCl; 0.2g KH_2PO_4 ; 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0.2g KCl; 0.2g NaN_3 ; 40mL ddH₂O; 0.5mL 吐温 -20, 临用前加 ddH₂O 至 1L。

[0057] SPC-A1 裂解液制备方法: 将 SPC-A1 铺于六孔板中 (浓度为 1×10^6 个 / mL); 待细胞铺满孔底后, 弃培养液, 加 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 1% PBS 洗两遍, 2mL / 孔; 每孔加入裂解液 150 μL , 置于震荡器上; 30min 后, 用枪头刮取贴壁细胞, 收集裂解液于 1.5mL EP 管中, 13000g 离心 10min; 留取上清, 分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0058] 抗体稀释液 1% PBS: 8g NaCl; 2.2g KCl; 1.44g Na_2HPO_4 ; 0.24g KH_2PO_4 ; 加 ddH₂O 至 800mL。pH9.6 的碳酸盐包被缓冲液: Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加蒸馏水至 1L, 最后用 10M NaOH 调节 pH 至 9.6, 充分混匀。

[0059] 实施例 5

[0060] 用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心 ELISA 试剂盒, 包含如下组分: 上述制备的保藏号为 CCTCC NO: C201172 的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体 NJ001-1 5 μL , 抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的 96 孔酶标板, 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 5 μL , 洗液 40mL, 终止液 2M H_2SO_4 8mL, TMB 底物显色液 A、B 液各 8mL, 阳性对照: SPC-A1 裂解液 500 μL , 阴性对照: 人 AB 血清或胎牛血清 500 μL 和空白对照: 1% PBS 1mL, 抗体稀释液为 1% PBS 50mL。

[0061] 试剂盒中使用的单抗、多抗以及各试剂的制备方法见实施例 1、3、4。终止液、TMB 底物显色液: 购自上海科华生物工程股份有限公司。

[0062] 所述的抗 SPC-A1 兔多克隆抗体包被的酶标板通过如下方法制备: 用 pH9.6 的碳酸盐包被缓冲液将纯化后抗 SPC-A1 兔多克隆抗体稀释成目的浓度 0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 将稀释好的抗体溶液混匀后加入微孔中, 100 μL / 孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 洗板 3 次, 200 μL / 孔; 加入 3% BSA 封

闭液, 300 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 洗板 3 次, 200 μ L/孔; -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0063] 实施例 6

[0064] 从冰箱中取出 -20 $^{\circ}$ C 保存的实施例 5 制备的试剂盒, 待测血清、阳性对照 (SPC-A1 裂解液) 及阴性对照 (人 AB 血清或胎牛血清), 置于冰上融解; 取出已包被 ELISA 板及相关试剂恢复至室温; 待血清融解后, 颠倒混匀, 离心; 取待测血清上清 50 μ L 加入微孔中, 同时加入阳性对照、阴性对照、空白对照各 50 μ L/孔; 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 取出 ELISA 板用洗液洗板 5 次, 200 μ L/孔, 每次 2min; 用抗体稀释液 1% PBS 按 1 : 4 000 稀释一抗 NJ001-1, 100 μ L/孔加入微孔; 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗板同前; 用抗体稀释液 1% PBS 按照 1 : 3 000 稀释二抗辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG, 100 μ L/孔加入微孔; 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 洗板同前; 将 TMB 底物显色液 A、B 按 1 : 1 混合, 100 μ L/孔加入微孔中 (空白对照孔不加底物), 室温避光 10min, 加入终止液, 50 μ L/孔; Model 550 型酶联仪检测 OD₄₅₀ 值。

[0065] 双抗体夹心 ELISA 法检测结果显示 (表 2) 肺腺癌、肺鳞癌、小细胞肺癌和肺良性疾病组的检测阳性率分别为 63.1% (123/195), 47.8% (33/69), 20.5% (8/39) 和 12.0% (6/50) 均显著高于健康体检组 (4.4%, $P < 0.05$)。非小细胞肺癌组 (肺腺癌和肺鳞癌) 的阳性率显著高于小细胞肺癌组 (59.1% vs 20.5%, $P < 0.05$) 和肺良性疾病组 (59.1% vs 12.0%, $P < 0.05$)。另外, 非小细胞肺癌中肺腺癌组的阳性率显著高于肺鳞癌组 (63.1% vs 47.8%, $P < 0.05$)。195 例肺腺癌患者中已明确病理分期的为 124 例, 其中早期组 (I/II) 和晚期组 (III/IV) 的阳性率分别达 63.3% (19/30) 和 79.8% (75/94), 结果表明, 本方法在早期肺腺癌病例中即有较高的检出率, 有助于肺腺癌的早期诊断。

[0066] 表 2 双抗体夹心 ELISA 法检测各组的阳性率

	组别	例数	阳性 (%)	阴性 (%)
	非小细胞肺癌组	264	156 (59.1)	108 (40.1)
	肺腺癌组	195	123 (63.1)	72 (36.9)
[0067]	肺鳞癌组	69	33 (47.8) *	36 (52.2)
	小细胞肺癌组	39	8 (20.5) * Δ	31 (79.5)
	肺良性疾病组	50	6 (12.0) * Δ	44 (88.0)
	健康对照组	500	22 (4.4) * Δ \square	478 (95.6)

[0068] 注: * 与肺腺癌组阳性率比较, $P < 0.05$; Δ 与肺鳞癌组阳性率比较, $P < 0.05$; \square 与小细胞肺癌组阳性率比较, $P < 0.05$; \square 与肺良性疾病组阳性率比较, $P < 0.05$

[0069] 实施例 7

[0070] 通过较 ELISA 方法敏感的化学发光法对样本进行血清 CEA、NSE 和 CYFRA21-1 的同步检测, 与基于本发明双抗体夹心 ELISA 试剂盒的双抗体夹心 ELISA 方法进行比较。

[0071] 1. 敏感性: 表 3 中基于本发明双抗体夹心 ELISA 试剂盒的双抗体夹心 ELISA 法对非小细胞肺癌患者的检测阳性率为 59.1% (156/264), 显著高于 CEA、NSE 和 CYFRA21-1 的阳性率 (41.3%、17.4% 和 37.1%), 故本发明试剂盒对 NJ001-1 相关靶抗原的检测较 CEA、

NSE 和 CYFRA21-1 检测相应靶抗原具有更高的敏感性；

[0072] 2. 特异性：基于本发明双抗体夹心 ELISA 试剂盒的双抗体夹心 ELISA 法对小细胞肺癌患者，肺良性疾病患者和健康体检者的检测阳性率分别为 20.5%、12.0%和 4.4%，均明显低于 CEA、NSE 和 CYFRA21-1 的阳性率（其中 CEA 阳性率为 25.6%、14.0%和 5.8%，NSE 的阳性率为 56.4%、18.0%和 9.8%，CYFRA21-1 的阳性率为 23.1%、16.0%和 6.4%），故该试剂盒对 NJ001-1 相关靶抗原的检测较 CEA、NSE 和 CYFRA21-1 检测相应靶抗原具有更好的特异性。

[0073] 表 3 各组别中 ELISA 法检测 NJ001-1 相关靶抗原与化学发光法检测三种肿瘤标志物的阳性率

[0074]

	阳性率			
	非小细胞肺癌组 (n=264)	小细胞肺癌组 (n=39)	肺良性疾病组 (n=50)	健康体检组 (n=500)
1.CEA	41.3%*	25.6%	14.0%	5.8%
2.NSE	17.4%*	56.4% [○]	18.0%	9.8% [△]
3.CYFRA21-1	37.1%*	23.1%	16.0%	6.4%
4.NJ001-1 相关靶抗原	59.1%	20.5%	12.0%	4.4%

[0075] 注：* 与 NJ001-1 相关靶抗原比较， $P < 0.05$ ；[○] 与 NJ001-1 相关靶抗原比较， $P < 0.05$ ；[△] 与 NJ001-1 相关靶抗原比较， $P < 0.05$ ；

[0076] 3. 对于肺腺癌：表 4 中基于本发明双抗体夹心 ELISA 试剂盒的双抗体夹心 ELISA 法检测 195 例肺腺癌患者血清中 NJ001-1 相关靶抗原的阳性率为 63.1%，显著高于电化学发光方法（CEA 45.1%，NSE 15.9%，和 CYFRA21-1 33.8%）， $P < 0.05$ 。

[0077] 4. 对于肺鳞癌：与上述结果相似，表 4 中基于本发明双抗体夹心 ELISA 试剂盒的双抗体夹心 ELISA 法检测 69 例肺腺癌患者血清中 NJ001-1 相关靶抗原的阳性率为 47.8%，明显高于电化学发光方法（CEA 30.4%，NSE 21.7%和 CYFRA21-1 46.4%）。

[0078] 5. 对于三项联合检测：采用电化学发光方法联合 CEA、NSE、和 CYFRA21-1 三项指标检测 264 例非小细胞肺癌患者血清的阳性率为 59.5%（157/264）；而仅采用基于本发明双抗体夹心 ELISA 试剂盒的双抗体夹心 ELISA 法检测 NJ001-1 相关靶抗原单项检测即可达到近乎相同阳性检出率 59.1%（156/264）。

[0079] 6. 对于四项联合检测：在三项联合检测基础上加入本发明检测，即四项联合（NJ001-1 相关靶抗原、CEA、NSE 和 CYFRA21-1）在肺腺癌及肺鳞癌患者血清中的阳性检出率分别为 85.1%，75.4%，显著高于三项联合（CEA、NSE 和 CYFRA21-1）的阳性检出率 60.5%，56.6%，大幅度地提高（约提高 20%左右）非小细胞肺癌的阳性检出率，见表 4。

[0080] 表 4 肺腺癌和肺鳞癌组中单项和联合检测 NJ001-1 相关靶抗原及三种肿瘤标志物的阳性率

[0081]

	阳性率	
	肺腺癌组 (n=195)	肺鳞癌组 (n=69)
1.CEA	45.1% [○]	30.4%
2.NSE	15.9% [○]	21.7% [□]
3.CYFRA21-1	33.8% [○]	46.4%
4.NJ001-1 相关靶抗原	63.1%	47.8%
5.三项联合 (CEA+ NSE+CYFRA21-1)	60.5% [*]	56.5% [△]
6.四项联合 (CEA+NSE+CYFRA21-1+ NJ001-1 相关靶抗原)	85.1%	75.4%

[0082] 注 : * 与四项联合组比较, $P < 0.01$; \circ 表示与 NJ001-1 相关靶抗原比较, $P < 0.05$; \triangle 表示与四项联合组比较, $P < 0.05$; \square 表示与 NJ001-1 相关靶抗原比较, $P < 0.05$.

[0083] 实施例 8

[0084] 精密度 : 混合 10 份非小细胞肺癌患者的血清, 利用实施例 5 制备的双抗体夹心 ELISA 试剂盒对其连续检测 20 次, 另外每天检测 1 次, 连续检测 20 天, 结果显示, 批内和批间的 CV% 分别为 2.24% 和 2.52%, 均在允许误差范围内 (批内 CV% $< 2.5\%$, 批间 CV% $< 3.3\%$), 故该法精密度高, 重复性较好。

[0085] 稳定性 : 将实施例 5 制备的双抗体夹心 ELISA 试剂盒置于 -20°C 分别保存 30d、90d 和 270d, 再分别对高水平样本 (10 份非小细胞肺癌患者的混合血清) 和低水平样本 (10 份健康体检者的混合血清) 进行检测, 高水平样本的 CV% 为 1.83%, 低水平样本的 CV% 为 2.11%, 均小于 3.3%, 说明该试剂盒具有良好的稳定性。

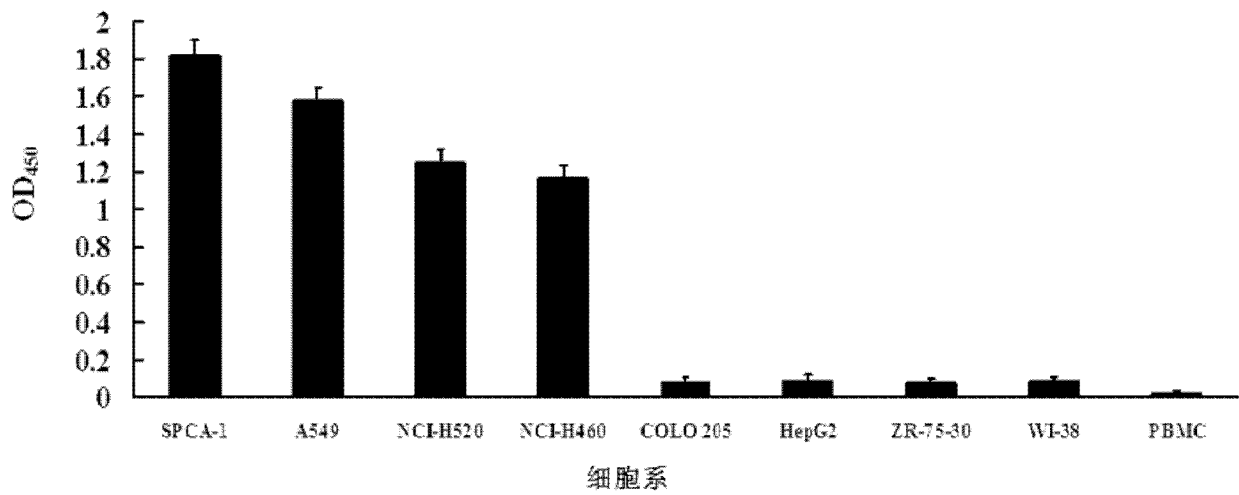


图 1

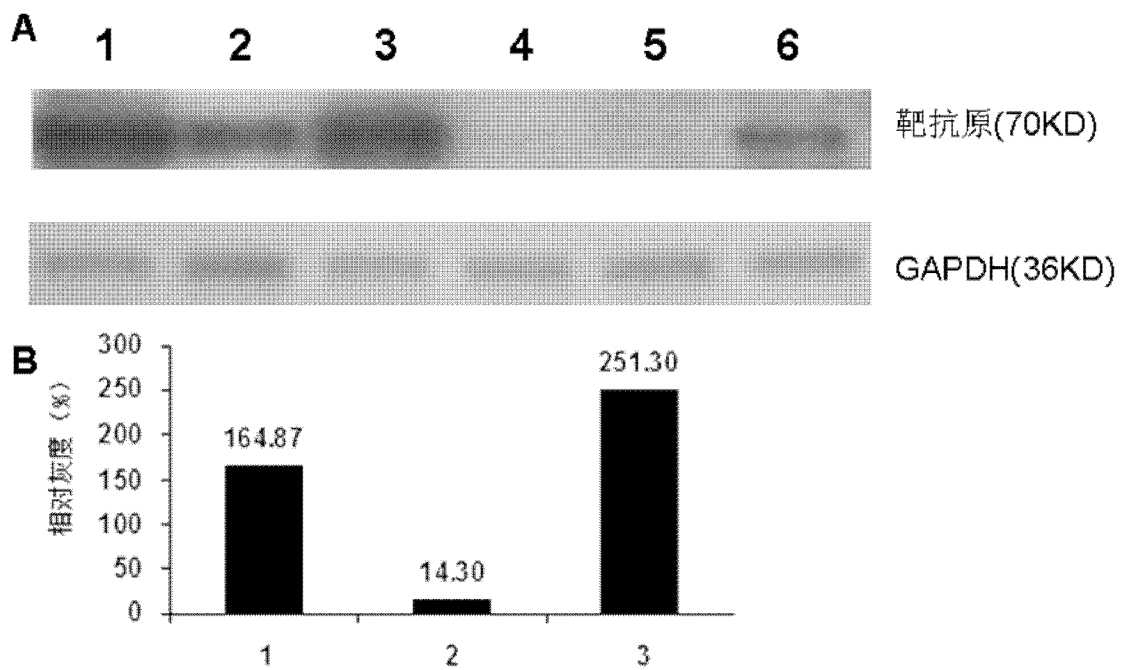


图 2

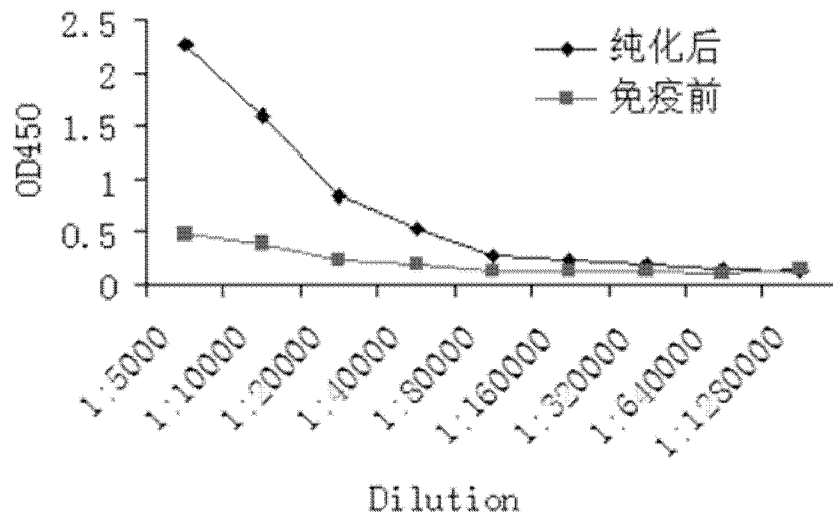


图 3

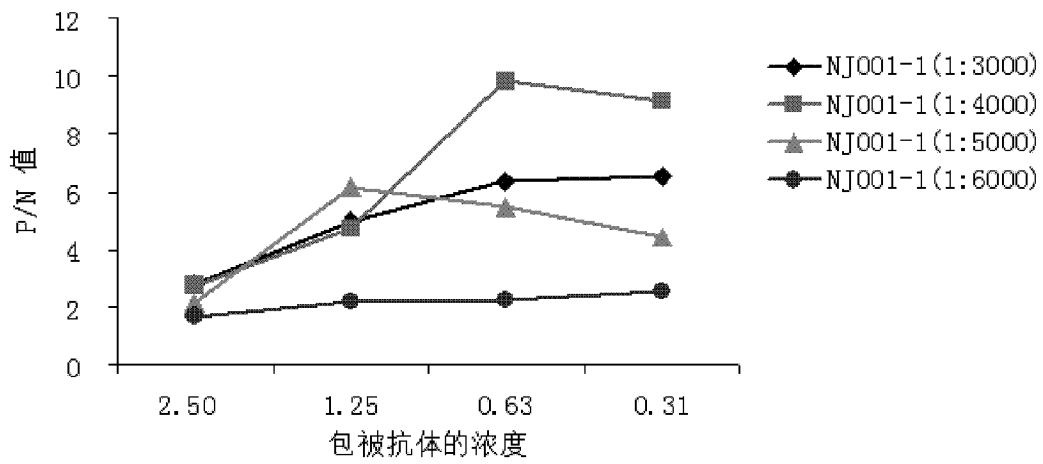


图 4

专利名称(译)	一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心ELISA试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102507943B	公开(公告)日	2013-04-10
申请号	CN201110343942.6	申请日	2011-11-03
申请(专利权)人(译)	潘世扬		
当前申请(专利权)人(译)	潘世扬		
[标]发明人	潘世扬 黄珮璐 王芳		
发明人	潘世扬 黄珮璐 王芳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57423 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/531		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN102507943A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测非小细胞肺癌的双抗体夹心ELISA试剂盒及其制备方法。该试剂盒，包含如下组成：保藏号为CCTCC NO：C201172的杂交瘤细胞株分泌的抗人非小细胞肺癌单克隆抗体NJ001-1，抗SPC-A1兔多克隆抗体包被的96孔酶标板，辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG，抗体稀释液：1%PBS，洗液，终止液2M H2SO4，TMB底物显色液，阳性对照：SPC-A1裂解液，阴性对照：人AB血清或胎牛血清和空白对照1%PBS。与现有检测方法比较，该试剂盒用于非小细胞肺癌的检测具有最好的敏感性(59.1%)和特异性(4.4%)，同时具有较好的精密度和稳定性。

