

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/12



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410005171.X

C12N 15/54 C12N 15/63
C07K 16/06 C07K 16/40
A61K 38/45 C12Q 1/68
G01N 33/53

[43] 公开日 2004 年 12 月 29 日

[11] 公开号 CN 1557951A

[22] 申请日 2004.2.11

[74] 专利代理机构 石家庄新世纪专利事务有限公司
代理人 董金国

[21] 申请号 200410005171.X

[71] 申请人 单保恩

地址 050011 河北省石家庄市健康路 12 号河北医科大学第四医院科研中心

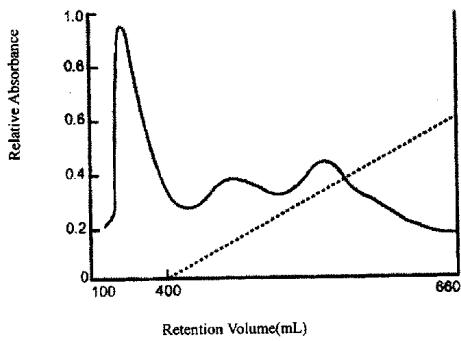
[72] 发明人 马 洪 单保恩

[54] 发明名称 非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法及其用途

[57] 摘要

本发明属于基因治疗领域，特别是指一种辅助乳腺癌诊断、治疗方案制定及估计预后的相关基因——非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法及其用途。主要包括细胞株及细胞培养、应用 Bac - to - Bac 方法进行制备重组 Syk 基因的杆状病毒、纯化 bacmidid Syk DNA、SF21 细胞的大量制备、Syk 的分离、纯化等工艺步骤。利用非受体型酪氨酸蛋白激酶 (Spleen tyrosine kinase) Syk 制备免抗 Syk 抗体。本发明解决了乳腺癌的早期诊断、治疗方案选择、病情复发和转移监测、疗效评价和预后估价以及群体随访观察和普查等方面的问题，具有工艺设计合理，可辅助乳腺癌诊断、治疗方案制定及估计预后等优点。

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 3 页



1、非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法，其特征在于它包括以下工艺步骤：

A、细胞株及细胞培养：Sf21 细胞株应用 Grace's 培养基进行培养，将细胞调整到 $1 \times 10^9/L$ 的密度，用培养瓶于恒温摇床（80-100 转/分、26-28℃ 进行培养）经胎盼蓝染色检测活细胞百分率应为 95%-100%；

B、应用 Bac-to-Bac 方法进行制备重组 Syk 基因的杆状病毒；

C、纯化 baculid Syk DNA：应用脂质体介导技术，将转染 Syk 基因的 Sf21 细胞于 28℃ 培养 4-6 天，用 cellfectin 试剂（Gibco-BRL）进行选择培养，收集细胞制备 Syk DNA；应用噬菌体纯化法纯化病毒颗粒，经培养一些孔形成噬菌斑，将这些阳性培养孔细胞经 SDS-PAGE 检测 Mr 为 72×10^3 蛋白条带的存在；

D、Sf21 细胞的大量制备：于培养瓶中加入 1 L 呈对数生长期的 Sf21 细胞悬液 [$(1.0-1.2) \times 10^6/mL$]，加入病毒贮存液 ($\approx 2.5 \times 10^8$ pfu/mL)，于恒温摇床（80-100 转/分、28℃）培养 48 小时进行病毒感染（病毒感染率约为 6）和细胞增殖；

E、Syk 的分离、纯化：收集细胞悬液进行低速离心，将细胞沉淀物 (2.5×10^9) 与细胞裂解液共同培养 30 分钟，于冰浴中用超声波破碎仪振荡裂解 3 次，每次 30 秒，将细胞裂解液于 4℃ 超速离心，收集上清液并过滤，将滤液加入活化的 Yellow-3 层析柱 (2.5×10 cm, Sigma)，用两倍体积的缓冲液和 1 倍体积的含有 200 mmol/L NaCl 的缓冲液冲洗层析柱。Syk 蛋白用 3.5 倍体积的含 200 mmol/L-1 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱。

2、根据权利要求 1 所述的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法，其特征在于所述的 A 步骤中 Sf21 细胞株来源于黏虫卵巢组织 (Spodoptera frugiperda, 由美国 Inritrogen 提供)。

3、根据权利要求 1 所述的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法，其特征在于所述的 E 步骤中低速离心的转速为 500 g，时间为 7min。

4、根据权利要求 1 所述的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法，其特征在于所述的 E 步骤中细胞裂解液为由 20 mmol/L 磷酸钠 pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mL/L Triton-100, 200 μg/Ml 抑蛋白酶肽, 50 μg/mL 亮抑蛋白酶肽, 10 mmol/L 焦亚硫酸钠组成的混合溶液。

5、根据权利要求 1 所述的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法，其特征在于所述的 E 步骤中超速离心的转速 100000 g，离心时间为 60 分钟。

6、根据权利要求 1 所述的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法，其特征在于所述的 E 步骤中两倍体积的缓冲液为由 20 mmol/L Na-Pi, pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT 组成的混合溶液。

7、根据权利要求 1 所述的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的用途，其特征在于利用非受体型酪氨酸蛋白激酶 (Spleen tyrosine kinase) Syk 制备兔抗 Syk 抗体。

8、根据权利要求 7 所述的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的用途，其特征在于所述的将 Syk 蛋白 (0.25g/L) 0.4 mL 与福氏完全佐剂 0.5 mL 混匀后，注射于小兔腹股沟和后脚掌；15 小时后，将同样量的 Syk 蛋白与福氏不完全佐剂 0.5 mL 混匀后，进行第二次免疫兔，注射部位为小兔腹股沟和后脚掌；30 小时后进行加强免疫，取 Syk 蛋白 (0.5g/L) 0.2 mL 用 0.6 mL 生理盐水稀释后，于背部皮下多点注射，45 小时后再耳静脉注射加强免疫 1 次，剂量同加强免疫；于初次免疫 2 星期后，开始采静脉血，用 ELISA 法 (以 0.05 mol/L pH9.5 CRS 稀释的 Syk 蛋白包被) 检测兔抗 Syk 抗体的效价；基础免疫后于第 2、3、5、6 wk 分别采取静脉血，用间接 ELISA 法检测抗 Syk 血清的效价；于第 2 次加强免疫后第 4 天，颈动脉放血、分离血清。

非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法及其用途

技术领域

本发明属于基因治疗领域，特别是指一种辅助乳腺癌诊断、治疗方案制定及估计预后的相关基因--非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法及其用途。

背景技术

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤，近年来，国内外乳腺癌发病呈上升趋势。目前，对于乳腺癌还没有较好的诊断方法。肿瘤标志物在乳腺癌的早期诊断、治疗方案选择、病情复发和转移监测、疗效评价和预后估价以及群体随访观察和普查等方面有重要意义。一种新的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk (Spleen tyrosine kinase)，是 B 细胞激活信号转导过程中最重要的激酶，也是促进乳腺上皮生长的强力因子，已证明，在乳腺癌发生过程中，CpG 岛超甲基化作用可导致许多癌症相关基因失活。CpG 岛超甲基化作用是一种在突变、缺失、异位等序列变异之外的非序列性变化。很多肿瘤的发生都涉及基因组的甲基化改变，包括抑癌基因的超甲基化和原癌基因的去甲基化。在乳腺癌逐渐发生的过程中，Syk 基因频繁的失活。因为 Syk 可作为肿瘤抑制因子，它在乳腺癌中表达缺失与肿瘤的侵袭性有关。异常的 Syk 基因甲基化可导致其蛋白表达缺失，从而导致肿瘤侵袭性生长。Syk 在正常的乳腺腺体和上皮组织及非侵袭性乳腺癌细胞株中很容易检测到 Syk 的表达，而在侵袭性乳腺癌细胞株中则表达降低或缺失，是乳腺癌细胞生长和转移的重要抑制因子。因此，可将 Syk 的多克隆抗体应用于乳腺癌的检测。

发明内容

本发明的内容在于提供一种非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法及其用途用于辅助乳腺癌诊断、治疗方案制定及估计预后。

本发明的整体技术构思是：

非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法，包括以下工艺步骤：

A、细胞株及细胞培养：Sf21 细胞株应用 Grace's 培养基进行培养，将细胞调整到 $1 \times 10^9/L$ 的密度，用培养瓶于恒温摇床（80-100 转/分、26-28℃ 进行培养）经胎盼蓝染色检测活细胞百分率应为 95%-100%；

B、应用 Bac-to-Bac 方法进行制备重组 Syk 基因的杆状病毒；

C、纯化 baconid Syk DNA：应用脂质体介导技术，将转染 Syk 基因的 Sf21 细胞于 28℃培养 4-6 天，用 cellfectin 试剂 (Gibco-BRL) 进行选择培养，收集细胞制备 Syk DNA；应用噬菌体纯化法纯化病毒颗粒，经培养一些孔形成噬菌斑，将这些阳性培养孔细胞经 SDS-PAGE 检测 Mr 为 72×10^3 蛋白条带的存在；

D、Sf21 细胞的大量制备：于培养瓶中加入 1 L 呈对数生长期的 Sf21 细胞悬液 [$(1.0-1.2) \times 10^6$ /mL]，加入病毒贮存液 ($\approx 2.5 \times 10^8$ pfu/mL)，于恒温摇床 (80-100 转/分、28℃) 培养 48 小时进行病毒感染 (病毒感染率约为 6) 和细胞增殖；

E、Syk 的分离、纯化：收集细胞悬液进行低速离心，将细胞沉淀物 (2.5×10^9) 与细胞裂解液共同培养 30 分钟，于冰浴中用超声波破碎仪振荡裂解 3 次，每次 30 秒，将细胞裂解液于 4℃ 超速离心，收集上清液并过滤，将滤液加入活化的 Yellow-3 层析柱 (2.5×10 cm, Sigma)，用两倍体积的缓冲液和 1 倍体积的含有 200 mmol/L NaCl 的缓冲液冲洗层析柱。Syk 蛋白用 3.5 倍体积的含 200 mmol/L-1 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱。

非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的用途是非受体型酪氨酸蛋白激酶 (Spleen tyrosine kinase) Syk 制备兔抗 Syk 抗体。具体用法是将 Syk 蛋白 (0.25g/L) 0.4 mL 与福氏完全佐剂 0.5 mL 混匀后，注射于小兔腹股沟和后脚掌；15 小时后，将同样量的 Syk 蛋白与福氏不完全佐剂 0.5 mL 混匀后，进行第二次免疫兔，注射部位为小兔腹股沟和后脚掌；30 小时后进行加强免疫，取 Syk 蛋白 (0.5g/L) 0.2 mL 用 0.6 mL 生理盐水稀释后，于背部皮下多点注射，45 小时后再耳静脉注射加强免疫 1 次，剂量同加强免疫；于初次免疫 2 星期后，开始采静脉血，用 ELISA 法 (以 0.05 mol/L pH9.5 CRS 稀释的 Syk 蛋白包被) 检测兔抗 Syk 抗体的效价；基础免疫后于第 2、3、5、6 wk 分别采取静脉血，用间接 ELISA 法检测抗 Syk 血清的效价；于第 2 次加强免疫后第 4 天，颈动脉放血、分离血清。

本发明中各相关步骤的工艺条件是：

A 步骤中 Sf21 细胞株来源于黏虫卵巢组织 (Spodoptera frugiperda, 由美国 Inritrogen 提供)。

E 步骤中低速离心的转速为 500 g，离心时间 7min。细胞裂解液为由 20 mmol/L 磷酸钠 pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mL/L

Triton-100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 抑蛋白酶肽, 50 $\mu\text{g/mL}$ 亮抑蛋白酶肽, 10 mmol/L 焦亚硫酸钠组成的混合溶液。超速离心的转速 100000 g , 离心时间为 60 分钟。两倍体积的缓冲液为由 20 mmol/L Na-Pi, pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT 组成的混合溶液。

本发明所具有的实质性特点和取得的显著技术进步是：

本发明所采用的制备方法整体设计合理, 所制备的非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 采用免疫组化方法检测乳腺组织中 Syk 的蛋白表达情况; 采用 RT-PCR 的方法检测乳腺组织中 Syk 基因表达情况; 其在乳腺癌发生中的作用机理研究采用 MSP 方法检测乳腺组织中 Syk 基因的甲基化情况。对其在乳腺癌发生、发展中的作用机理进行了研究, 明确了 Syk 是促进乳腺上皮生长的强力因子, 在正常的乳腺腺体和上皮组织及非侵袭性乳腺癌细胞株中很容易检测到 Syk 的表达, 而在侵袭性乳腺癌细胞株中则表达降低或缺失, 是乳腺癌细胞生长和转移的重要抑制因子。很多肿瘤的发生都涉及基因组的甲基化改变, 包括抑癌基因的超甲基化和原癌基因的去甲基化。在乳腺癌逐渐发生过程中, Syk 基因由于 CpG 岛超甲基化作用而频繁的失活。因为 Syk 可作为肿瘤抑制因子, 它在乳腺癌中表达缺失与肿瘤的侵袭性有关。异常的 Syk 基因甲基化可导致其蛋白表达缺失, 从而导致肿瘤侵袭性生长。

附图说明

本发明的附图有:

图 1 是 Yellow-3 柱层析纯化 Syk 结果示意图。

图 2 是 SDS-PAGE 分离结果显示示意图。

图 3 是免疫印迹结果显示示意图。

图 4 是 Syk 层析成分进一步用 Toyopearl AF-Heptin-650M 层析柱分离的结果示意图。

图 5 是 Syk 另一层析成分进一步用 Toyopearl AF-Heptin-650M 层析柱分离的结果示意图。

图 6 是 Syk 蛋白的等电聚焦分析 (IEF) 结果示意图。

图 7 是 Syk 在不同乳腺组织中表达的免疫组化检测: 将正常乳腺组织和乳腺癌组织切片进行免疫组化染色, 正常乳腺组织细胞胞浆中可见棕黄色颗粒。

图 8 是 Syk 在不同乳腺组织中表达的免疫组化检测: 将正常乳腺组织和

乳腺癌组织切片进行免疫组化染色，在原位癌细胞胞浆中颗粒颜色变浅。

图 9 是 Syk 在不同乳腺组织中表达的免疫组化检测：将正常乳腺组织和乳腺癌组织切片进行免疫组化染色，在浸润性乳腺导管癌组织的细胞浆中不着色。

图 10 是不同 Syk 样品经 SDS-PAGE 分离结果示意图。

图 11 是不同 Syk 样品经 CBB 染色和抗 Syk 抗体免疫印迹结果示意图。

由图 1 可知将从 Sf21 细胞提取的蛋白质，用 Yellow-3 层析柱分离得到两个 Syk 层析成分，(图 1 黑色区域，表示 23-33 和 34-41 两个层析成分的峰值)，析出两个 Syk 的盐浓度梯度(虚线)分别在 420-500 mmol/L 和 550-650 mmol/L NaCl 之间。

图 2 中 SDS-PAGE 分离结果显示，23-33 和 34-41 两个层析成分均含有单一的蛋白条带， Mr 为 72×10^3 。

图 3 免疫印迹结果显示两种蛋白质均为 Syk。

由图 4 可知经 Yellow-3 凝胶层析分离的 23-33 层析成分进一步用 Toyopearl AF-Heptin-650M 层析柱分离，得到了单一的蛋白质峰。

图 5 同样，34-41 层析成分经 Toyopearl AF-Heptin-650M 层析柱分离，得到了单一的蛋白质峰。

由图 6 可知经 Toyopearl AF-Heptin-650M 纯化的用两个 Syk 成分免疫印迹分析虽显示相同结果，但经 IEF 分析，这两个 Syk 具有不同的 pI 值。

由图 10、11 可知经 SDS-PAGE 分离，CBB 染色结果显示，细胞裂解产物出现多条蛋白条带(图 10 泳道 1)。细胞裂解产物经 100 000 g 离心后的上清液也出现多条蛋白条带(图 10 泳道 2)。但经 Yellow-3 凝胶层析(泳道 A3)，并进一步用 Toyopearl AF-Heptin-650M 层析纯化后，显示单一的 Syk 特异性蛋白条带(泳道 A4)。免疫印迹结果显示， $Mr 72 \times 10^3$ 的蛋白质为 Syk(图 11)。

具体实施方式

以下结合附图对本发明的实施例做进一步描述：

非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的制备方法，包括以下工艺步骤：

A、细胞株及细胞培养：Sf21 细胞株(来源于黏虫卵巢组织(*Spodoptera frugiperda*)，由美国 Innitrogen 提供)。应用 Grace's 培养基进行培养，将细胞调整到 $1 \times 10^9/L$ 的密度，用培养瓶于恒温摇床(80-100 转/分、26-28 °C 进行培养)经胎盼蓝染色检测活细胞百分率应为 95%-100%。

B、应用 Bac-to-Bac 方法进行制备重组 Syk 基因的杆状病毒。

C、纯化 bacmid Syk DNA：应用脂质体介导技术，将转染 Syk 基因的 Sf21 细胞于 28℃ 培养 4-6 天，用 cellfectin 试剂 (Gibco-BRL) 进行选择培养，收集细胞制备 Syk DNA；应用噬菌体纯化法纯化病毒颗粒，经培养一些孔形成噬菌斑，将这些阳性培养孔细胞经 SDS-PAGE 检测 Mr 为 72×10^3 蛋白条带的存在。

D、Sf21 细胞的大量制备：于培养瓶中加入 1 L 呈对数生长期的 Sf21 细胞悬液 [$(1.0-1.2) \times 10^6 / \text{mL}$]，加入病毒贮存液 ($\approx 2.5 \times 10^8 \text{ pfu/mL}$)，于恒温摇床 (80-100 转/分、28℃) 培养 48 小时进行病毒感染 (病毒感染率约为 6) 和细胞增殖。

E、Syk 的分离、纯化：收集细胞悬液进行低速离心 (500 g, 7min)，将细胞沉淀物 (2.5×10^9) 与细胞裂解液 (20 mmol/L 磷酸钠 pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mL/L Triton-100, 200 μg/mL 抑蛋白酶肽, 50 μg/mL 亮抑蛋白酶肽, 10 mmol/L 焦亚硫酸钠) 共同培养 30 分钟，于冰浴中用超声波破碎仪振荡裂解 3 次，每次 30 秒，将细胞裂解液于 4℃ 超速离心 (100000 g, 60 分钟)，收集上清液并过滤，将滤液加入活化的 Yeelow-3 层析柱 (2.5 × 10 cm, Sigma)，用两倍体积的缓冲液和 1 倍体积的含有 200 mmol/L NaCl 的缓冲液 (20 mmol/L Na-Pi, pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT) 冲洗层析柱。Syk 蛋白用 3.5 倍体积的含 200 mmol/L-1 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱。

非受体型酪氨酸蛋白激酶 Syk 的用途是非受体型酪氨酸蛋白激酶 (Spleen tyrosine kinase) Syk 制备兔抗 Syk 抗体。具体用法是将 Syk 蛋白 (0.25g/L) 0.4 mL 与福氏完全佐剂 0.5 mL 混匀后，注射于小兔腹股沟和后脚掌；15 小时后，将同样量的 Syk 蛋白与福氏不完全佐剂 0.5 mL 混匀后，进行第二次免疫兔，注射部位为小兔腹股沟和后脚掌；30 小时后进行加强免疫，取 Syk 蛋白 (0.5g/L) 0.2 mL 用 0.6 mL 生理盐水稀释后，于背部皮下多点注射，45 小时后再耳静脉注射加强免疫 1 次，剂量同加强免疫；于初次免疫 2 星期后，开始采静脉血，用 ELISA 法 (以 0.05 mol/L pH9.5 CRS 稀释的 Syk 蛋白包被) 检测兔抗 Syk 抗体的效价；基础免疫后于第 2、3、5、6 wk 分别采取静脉血，用间接 ELISA 法检测抗 Syk 血清的效价；于第 2 次加强免疫后第 4 天，颈动脉放血、分离血清。

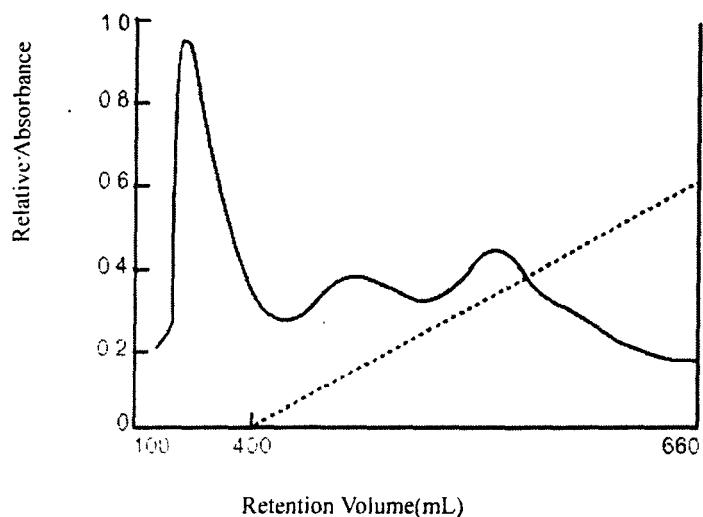


图 1

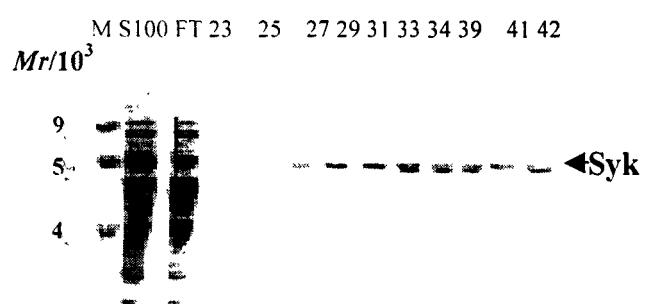


图 2

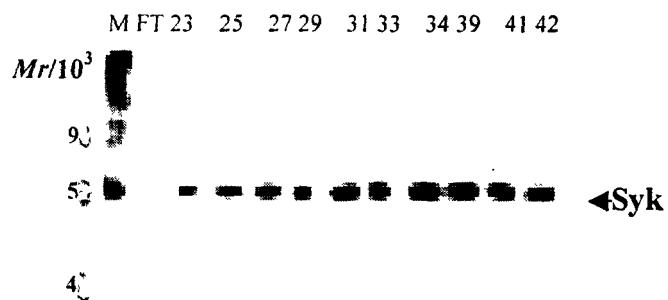


图 3

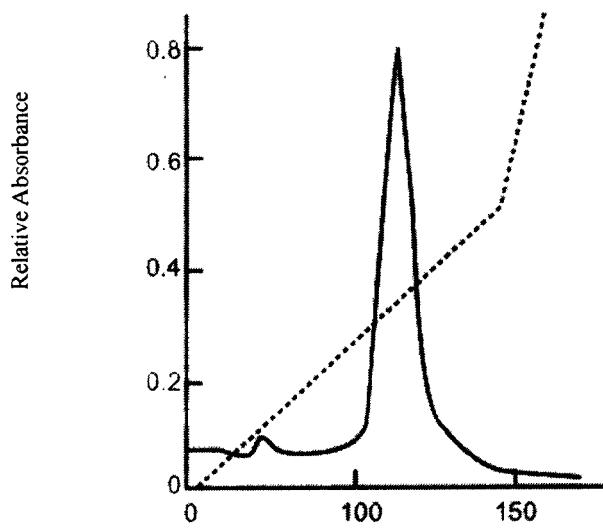


图 4

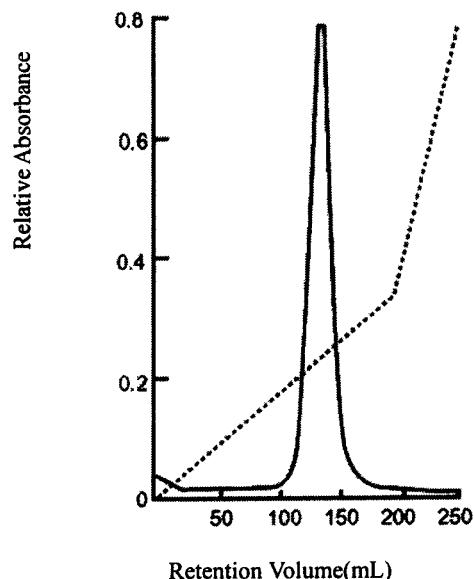


图 5

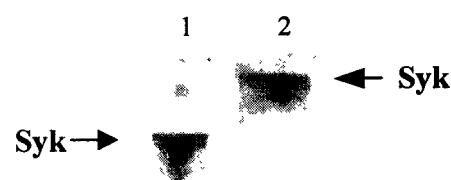


图 6



图 7



图 8

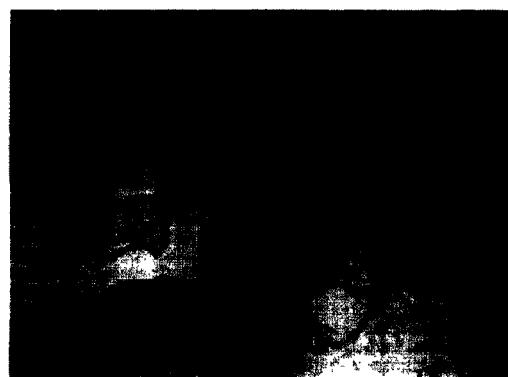


图 9

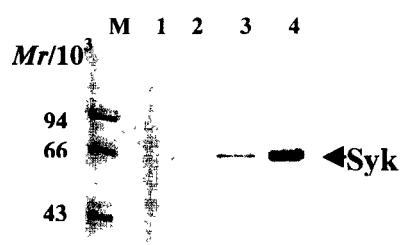


图 10

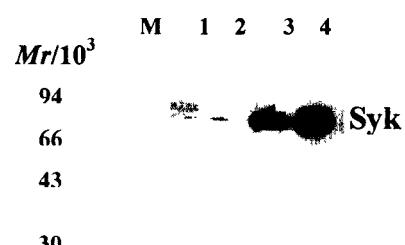


图 11

专利名称(译)	非受体型酪氨酸蛋白激酶Syk的制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN1557951A	公开(公告)日	2004-12-29
申请号	CN200410005171.X	申请日	2004-02-11
[标]发明人	马洪 单保恩		
发明人	马洪 单保恩		
IPC分类号	A61K38/45 C07K16/06 C07K16/40 C12N9/12 C12N15/54 C12N15/63 C12Q1/68 G01N33/53		
代理人(译)	董金国		
其他公开文献	CN1261566C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于基因治疗领域，特别是指一种辅助乳腺癌诊断、治疗方案制定及估计预后的相关基因——非受体型酪氨酸蛋白激酶Syk的制备方法及其用途。主要包括细胞株及细胞培养、应用Bac - to - Bac方法进行制备重组Syk基因的杆状病毒、纯化baconid Syk DNA、Sf21细胞的大量制备、Syk的分离、纯化等工艺步骤。利用非受体型酪氨酸蛋白激酶(Spleen tyrosine kinase)Syk制备兔抗Syk抗体。本发明解决了乳腺癌的早期诊断、治疗方案选择、病情复发和转移监测、疗效评价和预后估价以及群体随访观察和普查等方面的问题，具有工艺设计合理，可辅助乳腺癌诊断、治疗方案制定及估计预后等优点。

