



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101943702 A

(43) 申请公布日 2011.01.12

(21) 申请号 201010244263.9

(22) 申请日 2010.07.29

(71) 申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路 20 号

(72) 发明人 王柯 杨润琳 徐娟 黄飏 张艺
周彬

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

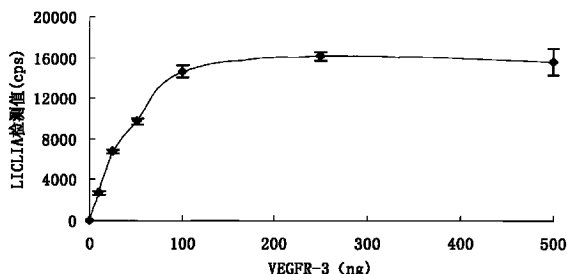
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种针对血管内皮生长因子受体-3 的光激化学发光药物筛选试剂盒

(57) 摘要

一种针对血管内皮生长因子受体-3 的光激化学发光药物筛选试剂盒,属于光激化学发光检测技术(LICLIA)领域。将含有PoLyE4Y发光微粒、VEGFR-3 激酶和 ATP 的反应缓冲液加到微孔板,加样品稀释缓冲液及样品溶液,振荡孵育;顺序加入 PY99 单抗、生物素化羊抗鼠抗体避光反应,再加入包被有链霉亲和素的感光微粒孵育后检测。PoLyE4Y 在 VEGFR-3 激酶及 ATP 的作用下磷酸化,有拮抗作用的样品抑制这种磷酸化反应;磷酸化的 PoLyE4Y 与 PY99 单抗结合,再与生物素化羊抗鼠抗体及感光微粒形成复合体,光激发下通过单线态离子氧将能量传递给发光微粒产生荧光,用光激化学发光检测仪检测,计算样品的 IC50。本发明药物筛选试剂盒结构简单,操作简便、检测时间短、灵敏度高。



1. 一种针对血管内皮生长因子受体-3, 简称 VEGFR-3, 的光激化学发光药物筛选试剂盒, 其特征是由白色不透明微孔板 (1), 连接 PolyE4Y 人工多肽的发光微粒 (2), VEGFR-3 激酶 (3), 金属离子反应缓冲液 (4), 三磷酸腺苷 ATP (5), 鼠抗磷酸化酪氨酸单抗冻干品 PY99 (6), 生物素化羊抗鼠抗体冻干品 (7) 和包被有链霉亲和素的感光微粒 (8) 组成;

所述金属离子反应缓冲液的配制: 60mmol 4-羟乙基哌嗪乙磺酸、20mmol $MgCl_2$ 、10mmol $MnCl_2$ 、5 μ mol Na_3VO_4 和 2mmol 二硫苏糖醇用蒸馏水定容至 1L。

2. 一种用权利要求 1 所述的试剂盒进行高通量药物筛选的方法, 其特征是将含有 PolyE4Y 人工多肽的发光微粒、VEGFR-3 激酶和 ATP 的金属离子反应缓冲液加入到白色不透明微孔板; 接着加入样品稀释缓冲液及不同浓度的样品溶液到各自的微孔中, 室温振荡孵育; 然后各孔顺序加入 PY99 单抗、生物素化羊抗鼠抗体进行标记免疫反应; 接着加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应, 反应后用光激化学发光检测仪检测光信号, 以样品稀释缓冲液的检测数据为阴性对照, 以加入被测样品的检测数据计算样品的半数抑制浓度 IC50;

所述样品稀释缓冲液: 水溶性样品的样品稀释缓冲液为蒸馏水, 蒸馏水作为阴性对照; 脂溶性样品的样品稀释缓冲液为 0.5% 二甲基亚砜 DMSO 溶液, 0.5% 的 DMSO 作为阴性对照。

3. 根据权利要求 2 所述的高通量药物筛选的方法, 其特征是操作为: 取 20 μ L 含有 10 μ g/mL PolyE4Y 人工多肽的发光微粒、100ng VEGFR-3 激酶和 40 μ mol/L ATP 的金属离子反应缓冲液, 加入到白色不透明微孔板; 加入 2 μ L 的样品稀释缓冲液及 2 μ L 不同浓度的样品溶液到各自的微孔中, 室温振荡孵育 1 小时; 然后各孔顺序加 20 μ L、0.2 μ g/mL 的 PY99 单抗; 继续加入 20 μ L、1 μ g/mL 生物素化羊抗鼠抗体, 37°C 孵育 30 分钟; 加 175 μ L、10 μ g/mL 包被有链霉亲和素的感光微粒, 37°C 孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号, 以样品稀释缓冲液的检测数据为阴性对照, 以加入被测样品的检测数据计算被测样品的半数抑制浓度 IC50 值。

一种针对血管内皮生长因子受体 -3 的光激化学发光药物 筛选试剂盒

技术领域

[0001] 一种针对血管内皮生长因子受体 -3 的光激化学发光药物筛选试剂盒,用于血管内皮生长因子受体 -3 拮抗剂的高通量筛选,属于光激化学发光检测技术 (LICLIA) 领域。

背景技术

[0002] 肿瘤的生长和转移与新生血管有着密切的关系,目前抗肿瘤新生血管生成治疗方面的研究已较深入,但单纯抗肿瘤血管生成治疗并未达到抗肿瘤转移的预期效果。其原因主要是由于肿瘤生物学特性的复杂性和多态性,而且转移的发生是一个多因素、多环节参与的调控过程,仅仅阻断某一条途径并不能完全阻断肿瘤细胞远处转移。

[0003] 淋巴结转移是恶性肿瘤转移的一个重要途径,有无淋巴结转移及转移淋巴结的数目一直被认为是决定肿瘤患者临床分期、治疗方案制订和预后评估的重要因素之一。国内外研究表明,血管内皮生长因子受体 -3 (vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3) 信号转导通路在肿瘤淋巴管生成中起着重要作用。VEGFR-3 与其配体 VEGF-C 或 VEGF-D 特异性结合,可促进淋巴管内皮细胞迁移,激活信号转导刺激淋巴管内皮细胞增殖,诱导肿瘤淋巴管生成。因此,针对该通路的抗体、药物及疫苗的研制成为当前肿瘤生物治疗研究的热点和方向。

[0004] 2000 年, Sugen 公司首先开发出了 VEGFR TK 抑制剂 SU5416 后,以 VEGFR 胞内部分的酪氨酸激酶为靶点设计及筛选小分子化学药物 (TKI) 成为一个研究的热点。其中最为引人注目的是索拉非尼和舒尼替尼。

[0005] 由于 VEGFR TKI 药物具有很多优点,如副作用轻微、不易产生耐药性,因此开发以 VEGFR TK 为靶点的高通量药物筛选试剂盒具有巨大的意义。目前,实际应用多采用 RIA 及 ELISA 等技术建立以 VEGFR TK 为靶点的高通量药物筛选模型。RIA 具有高度的特异性、灵敏度和实用性,但该方法存在放射性污染、半衰期短及试剂盒稳定性差等问题,而 ELISA 重复性和灵敏度较差,同时以上两种方法耗时长,操作复杂。因此基于常规方法进行药物筛选限制了筛选效率和筛选规模。

[0006] 光激化学发光检测技术 (LICLIA) 是以纳米级高分子微粒为基础的新一代检测技术,该项技术将被广泛地应用于研究生物分子的相互作用。其主要原理是由光激发产生的均相化学发光技术。它具有快速、均相 (免冲洗)、高灵敏和操作简单的特点。LICLIA 试剂由含有感光化合物的感光微粒和含有发光化合物的发光微粒组成,微粒直径约 188nm,表面覆盖多糖水凝胶。水凝胶能减少非特异性结合,同时,增加微粒的悬浮性。微粒通过水凝胶表面的功能团与生物分子共价连接。纳米级微粒大大增加了反应的表面积,每个微粒的表面包被着成百上千个生物分子,可捕获目标分子。

[0007] LICLIA 技术的核心原理是单线态氧的产生和传递。在受到红色激光 (680nm) 照射后,感光微粒能使周围环境中的氧转化为单线态氧,单线态氧的生存时间仅为 4 微秒。短暂的生存时间决定了单线态氧的传播直径很小 (约为 200nm)。如果发光微粒在 200nm 直

径范围之内,就能接受单线态氧,发出高能级的光(520nm-620nm)从而产生信号。相反,如果在200nm直径范围内没有发光微粒,单线态氧就会回落到基态氧而没有信号产生。这种依赖于两种微粒相互接近的化学能量传递是LICLIA均相反应的基础。通常在该反应体系中,微粒的浓度是很低的。两种微粒相互随机碰撞的几率很低,因此,反应体系的本底非常微弱。但通过包被在微粒表面的生物分子相互作用拉近两个微粒的距离,例如形成免疫夹心复合物,就能产生能量的有效传递并发出光信号。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于制备一种针对血管内皮生长因子受体-3的光激化学发光药物筛选试剂盒,用于针对血管内皮生长因子受体-3的高通量药物筛选。

[0009] 本发明的技术方案:一种针对血管内皮生长因子受体-3(VEGFR-3)的光激化学发光药物筛选试剂盒,由白色不透明微孔板(1),连接PolyE4Y人工多肽的发光微粒(2),VEGFR-3激酶(购于CST)(3),金属离子反应缓冲液(4),ATP(5mmol/L)(5),鼠抗磷酸化酪氨酸单抗冻干品(PY99)(购于Santa Cruz)(6),生物素化羊抗鼠抗体冻干品(购于华美生物)(7)和包被有链霉亲和素的感光微粒(购于博阳生物)(8)组成。

[0010] 连接PolyE4Y人工多肽的发光微粒(2)的制备:在离心管中加入1mg发光微粒(购于博阳生物),加入由12.5 μ L、1% Tween-20配制的0.05mg PolyE4Y人工多肽(购于Sigma)溶液,加入10 μ L、25mg/mL 硼氢化氰钠溶液,用0.1mol/L、pH 6.0的2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)缓冲液将体积补充到200 μ L,37 $^{\circ}$ C避光振荡反应48小时,加入10 μ L 0.3mol/L、pH 5.0的羧甲氧基胺半盐酸盐(CMO)溶液封闭未结合位点,37 $^{\circ}$ C避光孵育1小时,离心,分离得到已连接PolyE4Y的发光微粒,1:100用金属离子反应缓冲液稀释后备用。

[0011] 金属离子反应缓冲液(4)的配制:金属离子反应缓冲液按照如下浓度配制,60mmol 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、20mmol $MgCl_2$ 、10mmol $MnCl_2$ 、5 μ mol Na_3VO_4 和2mmol 二硫苏糖醇(DTT)用蒸馏水定容至1L。

[0012] 一种用所述的试剂盒进行高通量药物筛选的方法,将含有PolyE4Y人工多肽的发光微粒、VEGFR-3激酶和ATP的金属离子反应缓冲液加入到白色不透明微孔板;接着加入样品稀释缓冲液及不同浓度的样品到各自的微孔中,室温振荡孵育;然后各孔顺序加入PY99单抗、生物素化羊抗鼠抗体进行标记免疫反应;接着加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应,反应后用光激化学发光检测仪检测光信号,以样品稀释缓冲液的检测数据为阴性对照,以加入被测样品的检测数据计算样品的半数抑制浓度IC50值。

[0013] 所述的高通量药物筛选的方法,操作为:取20 μ L含有10 μ mol/L PolyE4Y人工多肽的发光微粒、100ng VEGFR-3激酶和ATP(40 μ mol/L)的金属离子反应缓冲液加入到白色不透明微孔板;加入2 μ L的样品稀释缓冲液及2 μ L不同浓度的样品溶液到各自的微孔中,室温振荡孵育1小时;然后各孔顺序加20 μ L、0.2 μ g/mL的PY99单抗;继续加入20 μ L、1 μ g/mL的生物素化羊抗鼠抗体,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟;加175 μ L、10 μ g/mL包被有链霉亲和素的感光微粒,37 $^{\circ}$ C孵育15分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号,以样品稀释缓冲液的检测数据为阴性对照,以加入被测样品的检测数据计算被测样品的半数抑制浓度IC50值。

[0014] 所述的高通量药物筛选的方法,其中的样品处理:水溶性样品的样品稀释缓冲液

为蒸馏水,蒸馏水作为阴性对照;脂溶性样品的样品稀释缓冲液为 0.5%二甲基亚砜 DMSO 溶液,0.5%的 DMSO 作为阴性对照。

[0015] 本发明的有益效果:本发明用于针对血管内皮生长因子受体-3 的高通量药物筛选,试剂盒结构简单,操作简便、检测时间短、灵敏度高。

附图说明

[0016] 图 1:VEGFR-3 高通量药物筛选试剂盒示意图。1、白色不透明微孔板,2、连接 PolyE4Y 人工多肽的发光微粒,3、VEGFR-3 激酶,4、金属离子反应缓冲液,5、5mmol/L ATP,6、鼠抗磷酸化酪氨酸单抗冻干品 PY99,7、生物素化羊抗鼠抗体冻干品,8、包被有链霉亲和素的感光微粒。

[0017] 图 2:LICLIA 反应示意图。

[0018] 图 3:VEGFR-3 激酶活性检测曲线图。

具体实施方式

[0019] 实施例 1 试剂盒的制备

[0020] 发光微粒、包被有链霉亲和素的感光微粒购于博阳生物科技(上海)有限公司。

[0021] 包被有 PolyE4Y 人工多肽的发光微粒制备:在离心管中加入 1mg 发光微粒,加入 12.5 μ L、1% Tween-20 配制的 0.05mg PolyE4Y 人工多肽,加入 10 μ L、25mg/mL 硼氢化氰钠溶液,用 0.1mol/L、pH 6.0 的 2-(N-吗啉)乙磺酸 MES 缓冲液将体积补充到 200 μ L,37°C 避光振荡反应 48 小时,加入 10 μ L 0.3mol/L、pH 5.0 的羧甲氧基胺半盐酸盐(CMO)溶液封闭未结合位点,37°C 避光孵育 1 小时后离心,分离得到已连接 PolyE4Y 的发光微粒,1:100 用金属离子反应缓冲液稀释后备用。

[0022] 金属离子反应缓冲液的配制:60mmol HEPES、20mmol $MgCl_2$ 、10mmol $MnCl_2$ 、5 μ mol Na_3VO_4 、2mmol DTT 用蒸馏水定容至 1L。

[0023] 试剂盒的组成:

[0024] (1)、白色不透明微孔板(12 条 \times 8 孔,可以拆分为单孔)。

[0025] (2)、1 \times 包被有 PolyE4Y 人工多肽的发光微粒:2mL。

[0026] (3)、1 \times VEGFR-3 激酶:5 μ g

[0027] (4)、1 \times 金属离子反应缓冲液(60mmol/L HEPES、20mmol/L $MgCl_2$ 、10mmol/L $MnCl_2$ 、5 μ mol/L Na_3VO_4 、2mmol/L DTT):50mL

[0028] (5)、ATP(5mmol/L):20 μ L

[0029] (6)、1 \times 鼠抗磷酸化酪氨酸单抗冻干品(PY99),用时 1mL 蒸馏水溶解。

[0030] (7)、1 \times 生物素化羊抗鼠抗体冻干品,用时 2mL 蒸馏水溶解。

[0031] (8)、1 \times 包被有链霉亲和素的感光微粒:20mL。

[0032] 测定时注意事项

[0033] 1、VEGFR-3 激酶和 ATP 保存于 -20°C,使用时置冰上操作。

[0034] 2、使用之后立即将其余试剂放回 2-8°C。

[0035] 3、在 37°C 恒温孵育过程中,避免光线照射。

[0036] 实施例 2 试剂盒的应用

[0037] 制备的试剂盒检测已知 VEGFR-3 拮抗剂 SU11248 及 PTK787 的拮抗活性。

[0038] 具体检测步骤如下：

[0039] 样品处理：将样品苹果酸舒尼替尼 (SU11248) 及瓦他拉尼 (PTK787) 用 0.5% 的 DMSO 溶液溶解，分别稀释至 1000nmol/L, 500nmol/L, 250nmol/L, 100nmol/L, 50nmol/L, 25nmol/L, 10nmol/L, 0nmol/L, 备用。

[0040] 取 20 μ L 含有 10 μ g/mL PolyE4Y 人工多肽的发光微粒、100ng VEGFR-3 激酶和 40 μ mol/L ATP 的金属离子反应缓冲液，加入到白色不透明微孔板；加入 2 μ L 0.5% 的 DMSO 样品稀释缓冲液及不同浓度的样品溶液到各自的微孔中，室温振荡孵育 1 小时；加 20 μ L、0.2 μ g/mL 的 PY99 单抗；继续加入 20 μ L、1 μ g/mL 生物素化羊抗鼠抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟；加 175 μ L、10 μ g/mL 包被有链霉亲和素的感光微粒，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号，以样品稀释缓冲液的检测数据为阴性对照，从检测数据计算被测样品的 IC50 值。

[0041] 表 1

[0042]

SU11248									IC50(nM)
样品浓度(nM)	0	10	25	50	100	250	500	1000	135.5
荧光值(cps)	10792	8894	8092	6523	4930	3939	3383	2672	

[0043] 表 2

[0044]

PTK787									IC50(nM)
样品浓度(nM)	0	10	25	50	100	250	500	1000	97.1
荧光值(cps)	10292	8744	6892	5773	4080	3039	2483	1972	

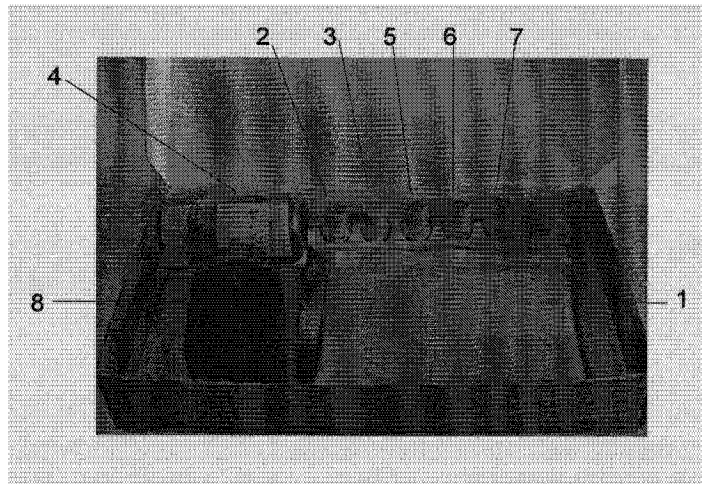


图 1

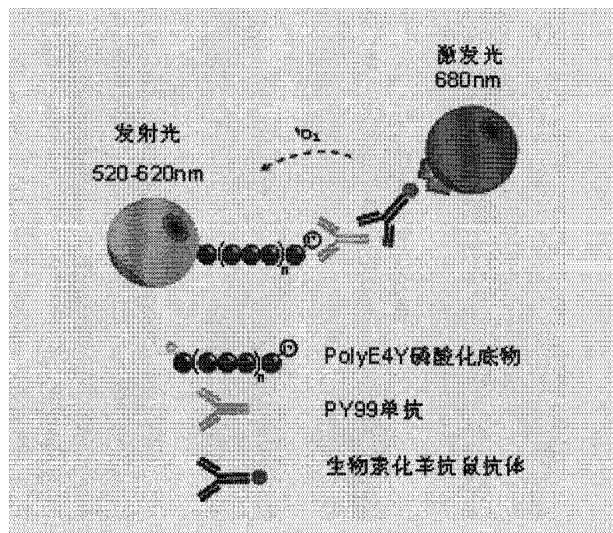


图 2

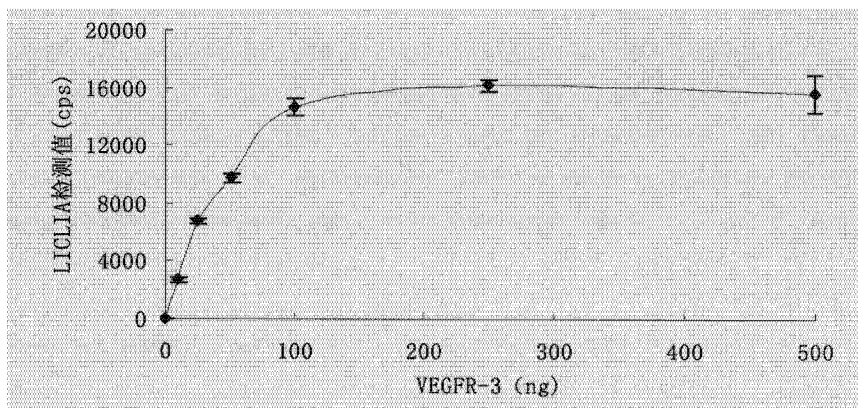


图 3

专利名称(译)	一种针对血管内皮生长因子受体-3的光激化学发光药物筛选试剂盒		
公开(公告)号	CN101943702A	公开(公告)日	2011-01-12
申请号	CN201010244263.9	申请日	2010-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	王柯 杨润琳 徐娟 黄飏 张艺 周彬		
发明人	王柯 杨润琳 徐娟 黄飏 张艺 周彬		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种针对血管内皮生长因子受体-3的光激化学发光药物筛选试剂盒，属于光激化学发光检测技术(LICLIA)领域。将含有PolyE4Y发光微粒、VEGFR-3激酶和ATP的反应缓冲液加到微孔板，加样品稀释缓冲液及样品溶液，振荡孵育；顺序加入PY99单抗、生物素化羊抗鼠抗体避光反应，再加入包被有链霉亲和素的感光微粒孵育后检测。PolyE4Y在VEGFR-3激酶及ATP的作用下磷酸化，有拮抗作用的样品抑制这种磷酸化反应；磷酸化的PolyE4Y与PY99单抗结合，再与生物素化羊抗鼠抗体及感光微粒形成复合体，光激发下通过单线态离子氧将能量传递给发光微粒产生荧光，用光激化学发光检测仪检测，计算样品的IC50。本发明药物筛选试剂盒结构简单，操作简便、检测时间短、灵敏度高。

