

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/531

G01N 33/574 G01N 33/96

C07K 1/14



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01113787.8

[43] 公开日 2003 年 2 月 19 日

[11] 公开号 CN 1397803A

[22] 申请日 2001.7.13 [21] 申请号 01113787.8

[71] 申请人 中国科学技术大学

地址 230026 安徽省合肥市金寨路 96 号

[72] 发明人 刘 兢 李 平 吴 强 姚 阳

官伟宁 杨 峰

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 人肿瘤抗原 p185^{HER-2} 的检测方法及肿瘤诊断用途 性抗原的纯度高的优点；可用于肿瘤血清诊断。

[57] 摘要

本发明可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测方法，特征在于将经纯化的、用表面表位包埋法制备的 p185^{HER-2} 单克隆抗体作包被抗体结合于固相支持物上，分别将含有可溶性 p185^{HER-2} 的样品和纯化的已知浓度的 p185^{HER-2} 标准抗原与包被的抗体温育，再用另一种经纯化的、辣根过氧化物酶标记的、用表面表位包埋法制备的 p185^{HER-2} 单克隆抗体做检测抗体的夹心 ELISA 检测方法。所述纯化的 p185^{HER-2} 标准抗原是采用表面表位包埋法制备的抗 p185^{HER-2} 胞外区的单克隆抗体与 Sepharose 4B - ProteinG 共价交联的亲合珠对含有 p185^{HER-2} 抗原的样品进行亲和层析的方法得到的；本发明检测方法具有检测可溶性 p185^{HER-2} 抗原的特异性强、标准可溶

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种标准可溶性 p185^{HER-2} 抗原的制备方法，包括制备与抗体交联的亲合珠、制备含有 p185^{HER-2} 抗原的样品、将含有 p185^{HER-2} 抗原的样品与亲合珠混合、将混合物装柱和洗脱抗原；其特征在于：所述与抗体交联的亲合珠是采用表面表位包埋法制备的抗 p185^{HER-2} 胞外区的单克隆抗体与 Sepharose 4B-ProteinG 共价交联的亲合珠。

2、一种可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测方法，包括将一种 p185^{HER-2} 单克隆抗体作包被抗体结合于固相支持物上，分别将含有可溶性 p185^{HER-2} 的样品和纯化的已知浓度的 p185^{HER-2} 标准抗原与包被的抗体温育，其中的 p185^{HER-2} 抗原被包被抗体选择性地捕获，再用另一种酶标记的 p185^{HER-2} 单克隆抗体作检测抗体，然后加酶的底物，采用显色反应的酶免疫检测方法检测样品的光吸收；用已知浓度的纯化的 p185^{HER-2} 标准抗原作对照，以显色反应的光吸收值对标准抗原的浓度作图，制定标准直线；将待测样品的光吸收值与标准抗原的光吸收值相比较，计算样品中 p185^{HER-2} 的浓度；其特征在于：（1）所述使用于双抗体夹心 ELISA 检测方法的 p185^{HER-2} 单克隆抗体，是经纯化和辣根过氧化物酶标记的、采用表面表位包埋法制备的 p185^{HER-2} 单克隆抗体；（2）所述纯化的 p185^{HER-2} 标准抗原是采用表面表位包埋法制备的抗 p185^{HER-2} 胞外区的单克隆抗体与 Sepharose 4B-ProteinG 共价交联的亲合珠对含有 p185^{HER-2} 抗原的样品进行亲和层析的方法得到的。

3、可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测方法在肿瘤血清诊断上的用途，包括将双抗体夹心 ELISA 显色反应的结果中标准可溶性 p185^{HER-2} 抗原的光吸收值对标准可溶性 p185^{HER-2} 抗原的已知浓度作图，得到一条标准直线；将正常人血清反应的平均光吸收值加两倍标准方差的值与此标准直线比较，找到该值所对应的 p185^{HER-2} 抗原浓度，设为阈值；将待测人血清反应的光吸收值与标准直线比较，计算血清中 p185^{HER-2} 抗原的浓度，大于阈值的则诊断为 p185^{HER-2} 高表达的肿瘤病人。其特征在于：（1）所述纯化的 p185^{HER-2} 标准抗原是采用表面表位包埋法制备的单克隆抗体与 Sepharose 4B-ProteinG 共价交联的亲合珠对含有 p185^{HER-2} 抗原的样品进行亲和层析的方法得到的。（2）所述的双抗体夹心法是采用表面表位包埋法制备的抗体，并按抗体不同亲和性，选择两种抗体最佳组合而建立的方法。

人肿瘤抗原 p185^{HER-2} 的检测方法及肿瘤诊断用途

技术领域:

本发明涉及肿瘤抗原的制备、可溶性肿瘤标记物的免疫学检测技术及其在肿瘤诊断中的应用。

背景技术:

p185^{HER-2} 是由癌基因 neu/erbB-2/HER-2 编码的一种重要的肿瘤细胞表面跨膜糖蛋白, 在乳腺、卵巢、肺、胃、肝等十余种癌症中均显示有过量表达的 p185^{HER-2} 蛋白。据美国《科学》杂志 (Science, 1989, 244: 707-712) 报导, 约有 30% 以上的乳腺癌和卵巢癌病人肿瘤组织的细胞出现 p185^{HER-2} 高表达, 该类病人肿瘤恶性程度高、预后差。《英国癌症杂志》(Br J Cancer, 1994, 70, 739-742) 报导, 检测 p185^{HER-2} 对多种肿瘤的鉴别诊断、判断预后以至治疗均有重要意义。尤其对乳腺癌, p185^{HER-2} 已被国际公认为一个重要的临床指标。《中国免疫学杂志》(2000, 16; 539-541) 报导, 通过细胞表面表位包埋法研制的 p185^{HER-2} 单抗能特异性地与高表达 p185^{HER-2} 的细胞膜外区结合, 对高表达 p185^{HER-2} 肿瘤组织具有很强的膜定位性和低胞浆染色, 特别适合对临床病例组织中 p185^{HER-2} 进行免疫组织化学方法检测。虽然免疫组化方法是目前较为常规的检测方法, 但该方法必须在外科手术切除病患组织的前提下才能使用, 而且不便于检测大批样品以及对术后病人的长期跟踪, 而病人手术前后 p185^{HER-2} 的表达水平对预后和指导治疗方案具有非常重要的作用。血清 p185^{HER-2} 检测技术可对病人进行动态观察又简便易行, 更适合临床需要。美国《生物化学杂志》(J Biol Chem, 1990; 266: 1716-20.) 报导, 应用抗体在转基因的高表达 p185^{HER-2} 的细胞株培养上清中可以检测到可溶性 p185^{HER-2} 即 p105 水平; 并指出 p185^{HER-2} 与其他细胞膜受体分子类似, 在过量表达时其胞外区可自细胞表面脱落而进入血清。随后荷兰《乳腺癌研究和治疗》杂志 (Breast cancer Res treat 1993; 24: 97-102) 和美国《癌症》杂志 (Oncology 1997; 54: 475-481) 等先后报导了利用抗 p185^{HER-2} 抗体并采用酶联免疫吸附 (ELISA) 技术进行血清 p185^{HER-2} 检测。《美国临床病理杂志》(Am J Clin Pathol, 1999; 112(suppl.1): S53-S67) 综述了世界上 16 个实验室有关血清 p185^{HER-2} 的研究结果, 指出: 血清 p185 抗原水平升高与肿瘤复发或转移具有很强的相关性, 并且预示着对化疗、放疗及激素治疗的抗性, 因此血清 p185^{HER-2} 抗原可以作为一个重要的肿瘤标记物供临床使用。

现有制备 p185^{HER-2} 抗原的方法主要有: A 法: 如美国《临床分析杂志》(Journal of Clinical Analysis, 12: 298-303, 1998) 报导的用 Superose 12 HR 层析方法从含有 p185^{HER-2} 蛋白的细胞裂解液中纯化 p185^{HER-2} 蛋白, 这种方法是根据蛋白的分子量进行分离纯化, 没有特异性, 因此 p185^{HER-2} 抗原容易丢失, 纯化效率低; B 法: 美国《癌症研究》(Cancer Research, 51, 2593-2598, May 15, 1991) 报导的用凝集素亲和柱从含有 p185^{HER-2} 蛋白的细胞裂解液中亲和层析 p185^{HER-2} 蛋白, 这种方法使用的亲和柱对所有的糖蛋白包括 p185^{HER-2} 蛋白都有吸附作用, 因此特异性低, 所得抗原的纯度低; C 法, 如美国《癌症研究》(Cancer Research, 51, 2593-2598, May 15, 1991) 报导的用活化的 Sepharose 4B 亲和柱从含有 p185^{HER-2} 胞外区蛋白的细胞培养上清中亲和层析 p185^{HER-2} 蛋白, 这种方法中使用的亲和柱需要先标记上抗体, 但是抗体在 Sepharose 4B 亲和珠上定位的多样性使得抗体上结合抗原的位点没有充分地暴露于亲和珠之外, 又由于 p185^{HER-2} 的分子量较大, 因此造成了一定的空间位阻, p185^{HER-2} 抗原不能充分地 与亲和柱上的抗体结合, 层析效率低; D 法, 如美国《免疫学方法杂志》(Journal of Immunological Methods, 132, 1990, 73-80) 报导的先对含有 p185^{HER-2} 胞外区蛋白的细胞培养上清进行亲和层析, 再进行离子交换层析, 这种方法中

增加了离子交换层析，离子交换层析是根据蛋白等电点的不同进行纯化，没有特异性，因此不仅步骤烦琐，而且增加了抗原损失的机会。

现有检测人血清 p185^{HER-2} 的方法主要有：A 法，如荷兰《乳腺癌研究及治疗》(Breast cancer research and treatment, 43: 87-95, 1997) 杂志报导的均相磁微粒法。这种检测方法将抗体标记的磁微粒作为固相载体，操作要求较高，检测抗体需要标记上 acridinium easter，检测时将 acridinium easter 激活，产生的信号是荧光信号，需要用特殊的荧光检测仪，费用较高，尚不易于推广。B 法，如美国《肿瘤研究》(cancer research 51, 2593-2598, May 15, 1991) 报导的放射免疫测定法：这种检测方法需要将检测抗体标记上同位素，产生的信号是 γ 射线，需要用 γ 计数仪检测，操作时需要特殊的防护。C 法，如美国《临床化学》(Clinical Chemistry 45, No2,1999, 292-295) 报导的凝集素-酶联免疫方法 (lectin-ELISA 方法)，这种方法用凝集素代替抗体作为检测试剂，特异性低。D 法，如美国《抗癌研究》(Anticancer research 18: 2891-2894, 1998) 报导的三抗体夹心酶联免疫检测方法 (三抗体夹心 ELISA 法)，这种方法步骤较为烦琐，不仅需要制备抗 p185^{HER-2} 的单抗，还要制备抗 p185^{HER-2} 的多抗，多抗的特异性不够强，批次间的稳定性不易于保持。E 法，如美国《临床癌症杂志》(Journal of Clinical Oncology, Vol 10, N0 9(September), 1992,1436-1443) 报导的双抗体夹心酶联免疫方法 (双抗体夹心 ELISA 法)。这种方法采用 ELISA 酶标板作为固相基质，操作简单；反应的信号是酶底物反应后的颜色变化，人体不需要接触放射性同位素，安全；采用双抗体夹心法特异性强，永生细胞产生的单克隆抗体的稳定性易于保持。但现有的 E 法由于其使用的标准抗原与 A、B、C、D 方法一样，通常是采用凝集素亲和柱亲合层析方法、离子交换层析方法、Superose 12 HR 层析方法或者 Sepharose 4B 亲合层析方法获得的，特异性不够强，抗原的纯度低。

发明内容：

本发明的目的是：提供一种标准可溶性 p185^{HER-2} 抗原的制备方法、可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测方法以及该检测方法在肿瘤血清诊断中的用途。

本发明的标准可溶性 p185^{HER-2} 抗原的制备方法，包括制备与抗体交联的亲合珠、制备含有 p185^{HER-2} 抗原的样品、将含有 p185^{HER-2} 抗原的样品与亲合珠混合、将混合物装柱和洗脱抗原；其特征在于：所述与抗体交联的亲合珠是采用表面表位包埋法制备的抗 p185^{HER-2} 胞外区的单克隆抗体与 Sepharose 4B-ProteinG 共价交联的亲合珠。

本发明的可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测方法，包括将一种 p185^{HER-2} 单克隆抗体作包被抗体结合于固相支持物上，分别将含有可溶性 p185^{HER-2} 的样品和纯化的已知浓度的 p185^{HER-2} 标准抗原与包被的抗体温育，其中的 p185^{HER-2} 抗原被包被抗体选择性地捕获，再用另一种酶标记的 p185^{HER-2} 单克隆抗体作检测抗体，然后加酶的底物，采用显色反应的酶免疫检测方法检测样品的光吸收；用已知浓度的纯化的 p185^{HER-2} 标准抗原作对照，以显色反应的光吸收值对标准抗原的浓度作图，制定标准直线；将待测样品的光吸收值与标准抗原的光吸收值相比较，计算样品中 p185^{HER-2} 的浓度；其特征在于：(1) 所述使用于双抗体夹心 ELISA 检测方法的 p185^{HER-2} 单克隆抗体，是经纯化和辣根过氧化物酶标记的、采用表面表位包埋法制备的 p185^{HER-2} 单克隆抗体；(2) 所述纯化的 p185^{HER-2} 标准抗原是采用表面表位包埋法制备的抗 p185^{HER-2} 胞外区的单克隆抗体与 Sepharose 4B-ProteinG 共价交联的亲合珠对含有 p185^{HER-2} 抗原的样品进行亲和层析的方法得到的。

本发明的可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测方法在肿瘤血清诊断上的用途，包括将双抗体夹心 ELISA 显色反应的结果中标准可溶性 p185^{HER-2} 抗原的光吸收值对标准可溶性 p185^{HER-2} 抗原的已知浓度作图，得到一条标准直线；将正常人血清反应的平均光吸收值加两倍标准方差的值与此标准直线比较，找到该值所对应的 p185^{HER-2} 抗原浓度，设为阈值；将待测人血清反应的光吸收值与标准直线比较，计算血清中 p185^{HER-2} 抗原的浓

度,大于阈值的则诊断为 p185^{HER-2} 高表达的肿瘤病人;其特征在于:所述纯化的 p185^{HER-2} 标准抗原是采用表面表位包埋法制备的单克隆抗体与 Sepharose 4B-ProteinG 共价交联的亲合珠对含有 p185^{HER-2} 抗原的样品进行亲和层析的方法得到的。

本发明与现有技术相比具有以下优点和特异性:

(1) 本发明可溶性 p185^{HER-2} 标准抗原的制备方法与现有技术相比具有以下优点:相对于 A 法:本方法具有 p185^{HER-2} 抗原与层析柱结合的特异性强、纯化效率高的优点;相对于 B 法,本方法也具有 p185^{HER-2} 抗原与层析柱结合的特异性强、抗原纯度高的优点;相对于 C 法,本方法具有克服了空间位阻、纯化效率高的优点;相对于 D 法,本方法具有步骤简单、纯化效率高的优点。由于利用抗体进行亲和层析方法,是根据抗原抗体结合的特异性进行纯化,而不是根据分子量的不同进行纯化,也不是根据糖基化与否进行纯化,也不是根据等电点的不同进行纯化,因此特异性大大提高;由于采用 Sepharose 4B-ProteinG 亲和珠而不是 Sepharose 4B 或 Sepharose4B-protein A 作为基质,抗体与其共价交联时,抗体的 Fc_γ1 片段被 Sepharose 4B 上的 proteinG 特异性结合,抗体上结合 p185^{HER-2} 抗原的 Fab 片段朝向 Sepharose 4B-ProteinG 亲和珠外,使得 p185^{HER-2} 抗原与亲和珠结合的空间位阻大大降低,纯化效率得以提高。

(2) 本发明可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测方法是采用细胞表面表位包埋法制备的单克隆抗体检测可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 方法,是在原 E 法的基础上进一步改进,因此具有原 E 法的所有优点。而且由于标准抗原制备方法的改进,相对于原 E 法,本发明方法具有纯化可溶性标准 p185^{HER-2} 抗原的效率高、特异性强、抗原的纯度高的优点。方法中所用的抗体是采用表面表位包埋法制备的抗 p185^{HER-2} 胞外区的单抗,这些单抗目前只用在免疫组化检测病理切片上,这种检测需要提供手术时切除的组织样品,未见将其用于可溶性肿瘤抗原的 ELISA 检测和纯化 p185^{HER-2} 抗原的报道。我们的进一步研究发现,将抗体纯化后标记上辣根过氧化物酶,并对标记前后抗体的性质进行免疫印迹法的检测,结果表明这几株纯化的单抗标记前后都与 p185^{HER-2} 胞外区特异性结合,并且稳定性很好,我们根据抗体不同的亲和性,选择最适的两种抗体的组合方式和抗体工作浓度,首次将其应用于可溶性 p185^{HER-2} 抗原的 ELISA 检测方法,这种检测不需要做手术,且具有很好的检测特异性和灵敏度。

(3) 根据我们采用本发明可溶性 p185^{HER-2} 的双抗体夹心 ELISA 检测方法对 88 例肿瘤病人和 137 例正常人的血清进行多次检测的结果,证明本发明的检测方法重复性、稳定性好。该检测方法检测 p185^{HER-2} 的灵敏度达到 10 到 30 ng/ml。x² 分析的结果表明,该方法能明显区别肿瘤病人和正常人群 (P<0.025),具有实用性,可应用于临床诊断。

具体实施方式:

实施例 1、制备含可溶性 p185^{HER-2} 抗原的细胞裂解液和细胞培养上清:

(1) 制备含可溶性 p185^{HER-2} 抗原的细胞裂解液:

分别收集长至 80%以上满度的 NIH/3T3 细胞(一种小鼠的成纤维细胞)和 T6-17 细胞(感染了人的 HER-2 基因的 NIH/3T3 细胞,该细胞表面高表达 p185^{HER-2}),用冷的 0.01M、PH7.2 的 PBS 洗一次,加入由 50mM Tris-HCl PH7.5、1% Trion X-100、150mM NaCl 和 8mM PMSF 组成的冷的裂解缓冲液,冰浴振荡 30 分钟,收集裂解液,4℃离心,12000rpm 10 分钟,T6-17 细胞的上清即为含 p185 粗抗原的细胞裂解液。NIH/3T3 细胞裂解液作为阴性对照。

(2) 制备含可溶性 p185^{HER-2} 抗原的细胞培养上清:

T6-17 细胞传代时改用无血清培养,待长满时,收集培养的上清,NIH/3T3 细胞的培养上清作为阴性对照。

以下各实施例中使用的细胞裂解液均按此法制备,不另注明。

实施例 2、检测可溶性 p185^{HER-2} 抗原的双抗体夹心 ELISA 法条件的建立:

- (1) 培养用细胞表面表位包埋法获得的能特异性分泌抗 p185^{HER-2} 胞外区单抗的永生的杂交瘤细胞如 A18 和 A21, 扩增后种入 6 到 8 周的 Balb/c 小鼠的腹腔中, 待长腹水后, 取出腹水, 即为粗制的单克隆抗体 A18 和 A21。
- (2) 采用常规的辛酸-硫酸铵两步沉淀法纯化腹水中的单克隆抗体 A18 和 A21
- (3) 采用改良的过碘酸钠方法制备过氧化物酶标记的纯化的单克隆抗体 A18 即 A18-HRP: 称 5mg HRP 溶于蒸馏水中, 加入 0.2ml 新配制的 0.1M 过碘酸钠 NaIO₄, 室温避光搅拌 20 分钟; 于 4℃ 对 1mM、PH4.4 的 NaAC 溶液透析过夜; 于 4℃ 将待标记抗体对 0.01M NaHCO₃ 缓冲液透析过夜; 在透析好的 HRP 溶液中加入 20ul 0.2M NaHCO₃ 溶液, 将 PH 值调到 PH9.0 和 PH9.5 之间, 立即加入透析好的 10mg/ml 的 1ml 抗体溶液, 室温避光搅拌两小时; 加入 0.1ml 新配的 4mg/ml 的硼氰化钠 NaBH₄ 溶液, 于 4℃ 搅拌 2 小时; 于 4℃ 对 0.01M PH7.2 PBS 透析过夜。标记的克分子比值和标记率均符合标记抗体使用要求的抗体即为标记好的检测抗体 A18-HRP 溶液, 其中加入等量的 60% 灭菌甘油, -20℃ 保存。
- (4) 确定包被抗体 A21 的工作浓度:

将纯化的抗体 A21 系列稀释于 0.05M NaHCO₃、PH 为 9.5 的包被缓冲液, 按 100ul/孔加入 ELISA 酶标板, 于 4℃ 包被过夜; 用泛特津公司的一号封闭剂封闭后分别加入系列稀释的作为对照的 NIH/3T3 细胞裂解液和含有可溶性 p185^{HER-2} 抗原的 T6-17 细胞裂解液; 洗涤后加入固定浓度的 A18-HRP; 加入临苯二胺(OPD)底物溶液显色, 492nm 测光吸收 (OD) 值。以检测到的 p185^{HER-2} 抗原量基本达到饱和时的 A21 浓度的 2 倍即 10ug/ml 作为包被抗体 A21 的浓度。

- (5) 确定检测抗体 A18-HRP 的工作浓度:

步骤基本同 (4), 只是 T6-17 细胞裂解液和 NIH/3T3 细胞裂解液的浓度改为固定浓度, A18-HRP 浓度改为系列稀释。将细胞裂解液在 490nm 处的光吸收值 ODT6-17 和 ODNIH/3T3 分别对抗体浓度作图, 得到两条光滑曲线; 以 ODT6-17 大于两倍的 ODNIH/3T3 时对应的 A18-HRP 浓度作为阳性。阳性范围内的抗体浓度即为抗体的工作浓度。通常选择 5ug/ml 作为 A18-HRP 的工作浓度。

实施例 3、采用抗 p185^{HER-2} 的单克隆抗体与 Sepharose 4B-Protein G 交联的亲合珠纯化 p185^{HER-2} 抗原的方法

该方法的具体步骤为:

- (1) 制备与抗 p185^{HER-2} 的单克隆抗体交联的 Sepharose 4B-Protein G 亲和珠:

将纯化的抗体溶液与经缓冲液充分溶胀的 Sepharose 4B-Protein G 胶颗粒混合, 4℃ 旋转温育过夜; 用 10 倍体积的 0.08M, PH9.0 的四硼酸钠缓冲液离心洗涤两次, 每次转速为 3000g, 时间为 2 分钟; 弃上清, 将亲和珠重悬于 10 倍体积的四硼酸钠缓冲液中, 加入固体双功能试剂 DMP, 至终浓度为 20mM, 室温轻微振荡 30 分钟; 用 10 倍体积的 0.2M, PH8.0 的乙醇胺缓冲液离心洗涤一次; 重悬亲和珠于 10 倍体积的上述乙醇胺缓冲液中, 室温轻微振荡 2 小时; 用 10 倍体积的组成为 50mM Tris-HCl PH7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.025%NaN₃ 的 Binding Buffer 洗涤一次。

通过 SDS-PAGE 电泳对加 DMP 前后等体积亲和珠进行检测, 浓缩胶为胶浓度 5%, 分离胶为胶浓度 10%。将亲和珠与上样缓冲液混合煮沸后, 离心取上清上样; 加 DMP 前的泳道中有抗体带, 加 DMP 后的泳道中没有抗体带, 说明交联成功。交联好的抗体亲和珠在 4℃ 保存于 Binding Buffer 中备用。

- (2) 将含有可溶性 p185^{HER-2} 抗原的液体 (细胞裂解液或细胞培养上清液) 与抗体亲和珠混合, 装柱, 洗涤柱并洗脱和收集抗原。

将含有可溶性 p185^{HER-2} 抗原的细胞裂解液或细胞培养上清液与交联好的抗体亲和珠混合，4℃旋转温育过夜；将混合液装柱；使液体缓慢通过层析柱，收集所有通过液；将其以同样流速再上一次柱，分部收集通过液备测（以下各步的流速可适当加快）；用 20 倍柱体积的 Binding Buffer 洗涤层析柱，分部收集洗涤液；用 20 倍柱体积的 10mM phosphate, PH6.8 的预洗脱液洗涤层析柱，分部收集预洗脱液备测；用 5 倍柱体积的 100mM Glycine, PH 2.5 的洗脱液洗脱抗原，分部收集洗脱液，每只收集管中含有 0.1 倍体积的 1.5M Tris-HCl, PH8.8 的中和缓冲液，以使洗脱液 PH 值迅速恢复到中性。

(3) 用本发明的夹心 ELISA 方法和常规的免疫印迹法对各步分部收集的样品中的可溶性 p185^{HER-2} 抗原进行检测分析：

a. 采用本发明的夹心 ELISA 法测定层析过程中各种收集液中可溶性 p185^{HER-2} 抗原分布：

纯化的抗 p185^{HER-2} 单克隆抗体 A21 稀释于 0.05M、PH9.6 的 NaHCO₃ 溶液至终浓度为 10ug/ml，包被于 ELISA 酶标板，每孔 100ul，于 4℃温育过夜；用含 0.05%吐温的 0.01M、PH7.2 的 TPBS 洗涤液洗三次，每次两分钟；每孔加入 350ul 泛特津公司一号封闭剂，室温封闭 40 分钟；同上洗涤；每孔加入 100ul 稀释于封闭液的各种收集样品，4℃温育过夜；同上洗涤；每孔加入 100ul 5ug/ml 稀释于封闭液的 A18-HRP，于 37℃保湿温育 1.5 小时；同上洗涤；每孔加入 100ul 1mg/ml OPD 底物溶液，室温避光反应 10 分钟左右；每孔加入 100ul 1M H₂SO₄，终止反应；在酶标比色仪上测 490nm 的光吸收值 OD₄₉₀。显色反应结果显示，细胞裂解液、洗涤液和预洗脱液的通过液中抗原的含量很少，获得的抗原集中在洗脱液中。说明在上样时大部分可溶性抗原都被吸附在抗体亲和柱上，通过液中都是未被吸附的杂蛋白；通过特异性洗脱液的洗涤，被抗体特异性吸附的抗原被洗脱下来，也说明洗脱液中的 p185^{HER-2} 抗原已经得到了纯化。

b. 采用免疫印迹法测定层析过程中各种收集液中可溶性 p185^{HER-2} 抗原的含量和免疫特异性：

先对通过液进行常规的 SDS-PAGE 电泳，浓缩胶为胶浓度 5%，分离胶为胶浓度 7%；电转移到 Hybond-ECL 膜上；丽春红染色；洗涤后用封闭缓冲液封闭膜；加入 2ug/ml 的抗 p185^{HER-2} 单克隆抗体，37℃温育 2 小时；洗涤，加入 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG，37℃温育 1.5 小时；洗涤，荧光底物显色，用 X 光片曝光；结果与 a 测定的结果吻合，即：夹心 ELISA 法鉴定为阳性的洗脱样品在丽春红染色以及免疫印迹法的泳道中，在 185KD 和 105KD 附近各有一条带，分别为 p185^{HER-2} 抗原及其胞外区。而夹心 ELISA 法鉴定为阴性的洗脱样品泳道中无免疫印迹带。说明洗脱液中的 p185 抗原已被纯化，纯化的 p185^{HER-2} 抗原具有被抗 p185^{HER-2} 单克隆抗体识别的特异性，纯化的抗原浓度在 1ug/ml 以上。

实施例 4、用本发明的夹心 ELISA 方法检测细胞裂解液或细胞培养上清中的可溶性 p185^{HER-2} 抗原：

同实施例 3 (3) a. 只是样品分别为细胞裂解液和细胞培养上清，用纯化的可溶性 p185^{HER-2} 抗原作为对照。显色反应的结果表明纯化的可溶性 p185^{HER-2} 抗原的浓度和 OD 值之间有很好的线性相关性；T6-17 细胞裂解液和 T6-17 细胞培养上清的 OD 值均分别为 NIH/3T3 细胞裂解液和细胞培养上清的 OD 值的两倍以上。说明该方法能够检测出细胞裂解液和细胞培养上清中的可溶性的 p185^{HER-2} 抗原。

实施例 5、本发明用于人血清中可溶性 p185^{HER-2} 的检测实验：

(1) 人血清样品的检测试验：

利用本发明的双抗体夹心 ELISA 方法已经检测 137 例正常人，65 例乳腺癌病人和 33 例其他癌症病人血清中的可溶性 p185^{HER-2} 水平。每次实验用标准的可溶性 p185^{HER-2} 抗原

作为对照。具体步骤见实施例 3。将显色反应的结果中已知浓度的可溶性 p185^{HER-2} 标准抗原的光吸收值对标准可溶性 p185^{HER-2} 抗原的浓度作图，得到一条标准直线；实验中检测的所有正常人血清反应的平均光吸收值加两倍标准方差的值与此标准直线比较，找到该值所对应的 p185^{HER-2} 抗原浓度，设为阈值，为 30ng/ml；每个人血清反应的光吸收值与标准直线比较，计算血清中 p185^{HER-2} 抗原的浓度，大于 30ng/ml 的则诊断为 p185^{HER-2} 高表达的肿瘤病人。

(2) 血清样品检测结果的统计学分析：

应用本发明的双抗体夹心 ELISA 方法对上述的肿瘤病人血清和正常人血清进行检测后，对测定结果进行卡方 (χ^2) 检验。结果表明 P 值小于 0.025，说明本方法能明显区别病人和对照组，检测结果具有统计学意义，已达到临床实用要求。

专利名称(译)	人肿瘤抗原p185HER - 2的检测方法及肿瘤诊断用途		
公开(公告)号	CN1397803A	公开(公告)日	2003-02-19
申请号	CN01113787.8	申请日	2001-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
[标]发明人	刘兢 李平 吴强 姚阳 官伟宁 杨峰		
发明人	刘兢 李平 吴强 姚阳 官伟宁 杨峰		
IPC分类号	C07K1/14 C12N7/02 G01N33/531 G01N33/574 G01N33/96		
其他公开文献	CN1232636C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明可溶性p185HER - 2抗原的双抗体夹心ELISA检测方法，特征在于将经纯化的、用表面表位包埋法制备的p185HER - 2单克隆抗体作包被抗体结合于固相支持物上，分别将含有可溶性p185HER - 2的样品和纯化的已知浓度的p185HER - 2标准抗原与包被的抗体温育，再用另一种经纯化的、辣根过氧化物酶标记的、用表面表位包埋法制备的p185HER - 2单克隆抗体做检测抗体的夹心ELISA检测方法。所述纯化的p185HER - 2标准抗原是采用表面表位包埋法制备的抗p185HER - 2胞外区的单克隆抗体与Sepharose 4B - ProteinG共价交联的亲合珠对含有p185HER - 2抗原的样品进行亲和层析的方法得到的；本发明检测方法具有检测可溶性p185HER - 2抗原的特异性强、标准可溶性抗原的纯度高的优点；可用于肿瘤血清诊断。