



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105527434 B

(45)授权公告日 2017.12.19

(21)申请号 201511020936.1

(22)申请日 2015.12.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105527434 A

(43)申请公布日 2016.04.27

(73)专利权人 辽宁迈迪生物科技有限公司

地址 117004 辽宁省本溪市本溪经济开发区香槐路166栋

(72)发明人 李文欣 朱明光 刘峰 宫晓丽  
王帅

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 李颖 周秀梅

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件

CN 104991077 A,2015.10.21,

CN 105044351 A,2015.11.11,

CN 102628868 A,2012.08.08,

CN 102680712 A,2012.09.19,

CN 104316685 A,2015.01.28,

审查员 李进进

权利要求书1页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种用于二乙酰精胺(DAS)检测的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及检测二乙酰精胺(N1,N<sup>12</sup>-Diacetylspermine,简称DAS)含量的方法,具体的说是一种用于二乙酰精胺(DAS)含量检测的试剂盒,试剂盒使用的抗原、抗体的制备方法以及试剂盒的研制方法和制备方案。本发明试剂盒优化了DAS含量检测方法,与传统ELISA方法相比,具有操作简便、检测速度快、精密度高、重复性好、检测结果不受操作影响、可大批量样本测试使用等优势。

1. 一种二乙酰精胺 (DAS) 免疫比浊法体外检测试剂盒, 包括R1试剂, R2试剂, 标准品和质控品, 其特征在于: 所述R1试剂为将二乙酰精胺抗体偶联在纳米颗粒上, 并添加保护液后, 以液体形态或者冻干后的固定形态保存的试剂; 所述的R2试剂为将乙酰精胺 (DAS) 分子通过偶联试剂偶联在载体蛋白上, 以液体形态或者冻干后的固体形态保存的试剂;

所述二乙酰精胺抗体是以乙酰精胺 (DAS) 分子通过偶联试剂偶联在载体蛋白上所得的产物作为免疫原, 免疫动物得多克隆抗体或经筛选得单克隆抗体;

所述R1中保护液按重量百分比计为: 0.1-0.5%的Tris、0.5-2%的PVP 40、0.5-1%的BSA、0.1-0.5%的PEG20000、2-5%的蔗糖、0.01-0.8%的TWEEN 20、0.02-0.1%的叠氮钠、0.85-1.5%的NaCl、1-4%的PEG 6000, 余量为水。

2. 按权利要求1所述的二乙酰精胺 (DAS) 免疫比浊法体外检测试剂盒, 其特征在于: 所述偶联试剂为碳二亚胺类或马来酰亚胺类; 其中, 碳二亚胺类为EDC, 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺或N-羟基琥珀酰亚胺酯类 (NHS酯); 马来酰亚胺类为4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯 (GMBS) 或4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC)。

3. 按权利要求1或2所述的二乙酰精胺 (DAS) 免疫比浊法体外检测试剂盒, 其特征在于: 所述二乙酰精胺 (DAS) 分子偶联载体蛋白是以碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺 (EDC/NHS) 作为偶联试剂, 将活化处理后的载体蛋白加入至过量的0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中, 再加入水溶性的碳二亚胺 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 混匀至清澈透明, 而后室温下静置15-30分钟; 静置后加入过量的乙酰精胺, 混匀至清澈透明, 调节体系PH值调至10-12, 室温下反应4-6小时; 反应后经透析所得产物, 即得二乙酰精胺 (DAS) 分子偶联载体蛋白。

4. 按权利要求1或2所述的二乙酰精胺 (DAS) 免疫比浊法体外检测试剂盒, 其特征在于: 所述二乙酰精胺 (DAS) 分子偶联载体蛋白是以碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺 (EDC/NHS) 作为偶联试剂, 将活化处理后的载体蛋白加入至过量的0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中, 再加入水溶性的碳二亚胺 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 混匀至清澈透明, 而后室温下静置15-30分钟; 静置后加入精胺, 混匀至清澈透明, 调节体系PH值调至10-12, 室温下反应4-6小时; 反应后经透析所得产物在2-8℃中, 向反应体系内加入酰化剂, 而后再于2-8℃下反应1-3小时, 反应物经透析即得二乙酰精胺 (DAS) 分子偶联载体蛋白。

5. 按权利要求1或2所述的二乙酰精胺 (DAS) 免疫比浊法体外检测试剂盒, 其特征在于: 所述二乙酰精胺 (DAS) 分子偶联载体蛋白是以N-[γ-马来酰亚胺丁酰氧]琥珀酰亚胺酯 (GMBS) 作为偶联试剂, 将酰化剂 (乙酸酐或无水乙酸或乙酰氯) 与精胺在2-8℃下反应60-90min, 反应后与偶联剂 (GMBS) 在0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中混合, 室温下反应3-4小时, 得乙酰精胺-GMBS偶联产物; 将载体蛋白与乙酰巯基琥珀酸在0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中混合, 室温下反应3-5小时; 反应后加入0.1M羟胺, 室温下反应30-35分钟除去乙酰基; 0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中透析, 得巯基化修饰的BSA; 将乙酰精胺-GMBS偶联产物与上述巯基化修饰的BSA混合, 室温下反应4-6小时; 0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中透析得二乙酰精胺 (DAS) 分子偶联载体蛋白。

6. 按权利要求1所述的二乙酰精胺 (DAS) 免疫比浊法体外检测试剂盒, 其特征在于: 利用所述试剂盒通过免疫比浊竞争抑制法检测样本中的二乙酰精胺。

## 一种用于二乙酰精胺 (DAS) 检测的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及检测二乙酰精胺 ( $N1, N^{12}$ -Diacetylspermine, 简称DAS) 含量的方法, 具体的说是一种用于二乙酰精胺 (DAS) 检测的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 大肠癌包括结肠癌和直肠癌, 大肠癌在全世界的发病率在恶性肿瘤中排在第三位, 在我国的发病率排在第五位, 我国男性的肠癌发病率是十万分之十六, 女性为十万分之十四, 是最常见的肿瘤之一。西方人主要是以结肠为主, 70%到80%患者所患为结肠癌, 直肠癌患者占20%到30%。我国却相反, 直肠癌患者占60%到70%, 结肠癌占30%到40%。近年的研究分析发现, 我国的直肠癌发病率基本保持不变, 结肠癌发病比例却在上升。尽管化疗对转移性结肠癌患者有效, 但预后较差。因此, 研究制备用于检测结肠癌患者肿瘤标志物含量的试剂盒具有重要的社会意义和科学价值。

[0003] 多胺包括腐胺、尸胺、亚精胺和精胺, 是一类具有生物活性含氮的低分子量有机化合物的总称。可看作是氨分子中1-3个氢原子被烷基或芳基取代后而生成的物质。可以由原核和真核细胞产生。快速生长的组织通常有活跃的多胺合成系统, 含有大量的多胺。当体内存在这样的组织时, 尿液中多胺的合成会增加。先前的研究表明与健康人相比, 癌症患者尿液中多胺的含量增加。然而, 后续的研究显示尿液中总的及游离的多胺含量由于产生了大量的假阳性和阴性结果, 因而不能作为可靠的肿瘤标志物。

[0004] DAS分子式为 $C_{14}H_{30}N_4O_2$ , 分子量286.41, 是一种多胺的二乙酰基衍生物, 在体内由鸟氨酸经鸟氨酸脱羧酶作用生成。二乙酰精胺是肿瘤细胞的代谢产物, 排泄到尿中。细胞癌变后, 乙酰基多胺分泌增加, 导致肿瘤患者尿液中二乙酰精胺浓度明显升高。DAS的早期检测是通过高效液相色谱法 (HPLC) 完成的, 后来建立了适用于尿液中DAS含量检测的酶联免疫吸附系统。有研究显示, 尿液中DAS表达量的检测可以作为结肠癌、乳腺癌和肝癌有效的新型肿瘤标志物。至此, 用于尿液中DAS含量检测的ELISA检测方法得到了广泛的临床研究。但ELISA检测方法同样存在操作复杂, 不能批量检测等问题。本发明开发的利用全自动生化分析仪检测患者样本中DAS含量的比浊法检测试剂盒, 是一种比ELISA检测方法更为方便、快捷的检测技术, 能够一次对大量样本进行检测, 并且其灵敏度高, 操作简单。

### 发明内容:

[0005] 本发明目的在于提供一种二乙酰精胺 (DAS) 免疫比浊法体外检测试剂盒。

[0006] 为实现上述目的, 本发明采用的技术方案为:

[0007] 一种二乙酰精胺 (DAS) 免疫比浊法体外检测试剂盒, 包括R1试剂, R2试剂, 标准品和质控品, 所述R1试剂为将二乙酰精胺抗体偶联在纳米颗粒上, 添加保护液后以液体形态或者冻干后的固定形态保存的试剂; 所述的R2试剂为将乙酰精胺 (DAS) 分子通过偶联试剂偶联在载体蛋白上, 以液体形态或者冻干后的固体形态保存的试剂。

[0008] 所述二乙酰精胺抗体是以乙酰精胺 (DAS) 分子通过偶联试剂偶联在载体蛋白上所

得的产物作为免疫原,再免疫动物获得多克隆抗体或经筛选获得单克隆抗体。

[0009] 所述R1中保护液按重量百分比计为:0.1-0.5%的Tris、0.5-2%的PVP40、0.5-1%的BSA、0.1-0.5%的PEG20000、2-5%的蔗糖、0.01-0.8%的TWEEN20、0.02-0.1%的叠氮钠、0.85-1.5%的NaCl、1-4%的PEG 6000,余量为水。

[0010] 所述的样本包含但不限于血清、血浆、尿液等。所述纳米颗粒包括但不限于纳米金、微球等。所述载体蛋白包括但不限于血清白蛋白(BSA)、多聚赖氨酸、卵清蛋白等。

[0011] 所述偶联试剂为碳二亚胺类或马来酰亚胺类;其中,碳二亚胺类为EDC,1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳二亚胺或N-羟基琥珀酰亚胺酯类(NHS酯);马来酰亚胺类为4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)或4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)。

[0012] 所述二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白是:以碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)作为偶联试剂,将活化处理后的载体蛋白加入至过量的0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中,再加入水溶性的碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),混匀至清澈透明,而后室温下静置15-30分钟;静置后加入过量的乙酰精胺,混匀至清澈透明,调节体系PH值至10-12,室温下反应4-6小时;反应后经透析所得产物,即得二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白。

[0013] 具体为:所述二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白是以碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)作为偶联试剂,将活化处理后的6-15mg载体蛋白加入至0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0PBS 3-8mL中,再加入水溶性的碳二亚胺(EDC)7-10mg和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)3-5mg,混匀至清澈透明,而后室温下静置15-30分钟;静置后加入乙酰精胺,混匀至清澈透明,调节体系PH值调至10-12,室温下反应4-6小时;反应后经透析所得产物,即得二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白。

[0014] 所述二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白是:以碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)作为偶联试剂,活化处理后的载体蛋白加入至过量的0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中,再加入水溶性的碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),混匀至清澈透明,而后室温下静置15-30分钟;静置后加入精胺,混匀至清澈透明,调节体系PH值调至10-12,室温下反应4-6小时;反应后经透析所得产物在2-8℃中,向反应体系内加入的酰化剂,而后再于2-8℃下反应1-3小时,反应物在经透析即得二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白。

[0015] 具体为:所述二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白是:以碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)作为偶联试剂时,将活化处理后的6-15mg载体蛋白加入至0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0PBS 3-8mL中,再加入水溶性的碳二亚胺(EDC)7-10mg和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)3-5mg,混匀至清澈透明,而后室温下静置15-30分钟;静置后加入精胺,混匀至清澈透明,调节体系PH值调至10-12,室温下反应4-6小时;反应后经透析所得产物在2-8℃中,向3-10mL反应体系内加入40μL-80μL的酰化剂,而后再于2-8℃下反应1-3小时,反应物在经透析即得二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白。

[0016] 所述二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白是以N-[γ-马来酰亚胺丁酰氧]琥珀酰亚胺酯(GMBS)作为偶联试剂,将酰化剂(乙酸酐或无水乙酸或乙酰氯)与精胺在2-8℃下反应60-90min,反应后与偶联剂(GMBS)在0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中混合,室温下反应3-4小时,得乙酰精胺-GMBS偶联产物;将载体蛋白与的乙酰巯基琥珀酸在0.01M-0.1M的

pH=6.5-8.0的PBS中混合,室温下反应3-5小时;反应后加入0.1M羟胺,室温下反应30-35分钟除去乙酰基;0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中透析,得巯基化修饰的BSA;将乙酰精胺-GMBS偶联产物与上述巯基化修饰的BSA混合,室温下反应4-6小时;0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0的PBS中透析得二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白。

[0017] 具体为:所述二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白是:以N-[ $\gamma$ -马来酰亚胺丁氧]琥珀酰亚胺酯(GMBS)作为偶联试剂,将10-15 $\mu$ L的酰化剂与15-25mg精胺在2-8 $^{\circ}$ C下反应60-90min,反应后与2-4mg偶联剂(GMBS)在0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0PBS 3-5mL缓冲溶液中混合,室温下反应3-4小时,得乙酰精胺-GMBS偶联产物;将8-15mg载体蛋白与3-7mg的乙酰巯基琥珀酸在0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0PBS 3-5mL缓冲溶液中混合,室温下反应3-5小时;反应后加入0.1M羟胺,室温下反应30-35分钟除去乙酰基;0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0PBS缓冲液中透析,得巯基化修饰的BSA;将乙酰精胺-GMBS偶联产物与上述巯基化修饰的BSA混合,室温下反应4-6小时;0.01M-0.1M的pH=6.5-8.0PBS缓冲液中透析得二乙酰精胺(DAS)分子偶联载体蛋白。

[0018] 所述载体蛋白活化处理是将载体蛋白用0.01M-0.1M pH=6.5-8.0PBS缓冲液溶解,溶解后加入MES,置于2-8 $^{\circ}$ C环境中反应半小时。

[0019] 所述酰化剂包括乙酸酐、无水乙酸或乙酰氯。

[0020] 利用所述试剂盒通过免疫比浊竞争抑制法检测样本中的二乙酰精胺。

[0021] 具体是,二乙酰精胺( $N_1, N_{12}$ -Diacetylspermine,简称DAS)分子式为 $C_{14}H_{30}N_4O_2$ ,分子量286.41,是一种多胺的二乙酰基衍生物,在体内由鸟氨酸经鸟氨酸脱羧酶作用生成。DAS本身为小分子物质,是半抗原,不具备免疫原性,仅具有反应原性,无法使用DAS本身作为免疫原制备DAS抗体,需将DAS通过偶联剂与载体蛋白偶联制备成完整的抗原,通过完全抗原免疫动物才可能获得相应的DAS抗体。

[0022] 其检测方法原理为:载体蛋白偶联的DAS抗原能与纳米颗粒上的抗DAS单克隆抗体进行特异性结合形成免疫复合物,出现浊度;尿液中的DAS与载体蛋白偶联的DAS竞争性结合DAS单克隆抗体。通过生化分析仪测定溶液浊度。浊度与尿液中DAS的含量成反比。通过测定标准品,建立一条反应度对应浓度的标准曲线,即可测定尿样中DAS浓度值。

[0023] DAS试剂盒的预期用途为体外定量检测人尿液中二乙酰精胺( $N_1, N_{12}$ -Diacetylspermine,DAS)的含量。

[0024] 本发明所具有的优点:

[0025] 本发明所采用的体外检测试剂盒的内容物中包括针对DAS的特异性单克隆抗体和纳米颗粒标记测定所需试剂,与新型纳米颗粒免疫检测方法相结合,用于检测人体生物样品的DAS含量的体外检测,开辟了DAS含量检测的新方法,与ELISA方法相比,具有操作简便、检测速度快、精密度高、重复性好、检测结果不受操作影响等优势。

## 附图说明

[0026] 图1为本发明实施例提供的标准曲线。

[0027] 图2为本发明实施例提供的采用本发明免疫比浊法与ELISA检测样本DAS含量对比图。

[0028] 图3为本发明实施例提供的采用本发明免疫比浊法与ELISA检测样本DAS含量相关

性。

### 具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明,但本发明不限于以下具体实施例。

[0030] 实施例1

[0031] BSA偶联的DAS抗原的制备:

[0032] 1. BSA的活化处理:准确称量牛血清白蛋白(BSA) 66mg,用0.01M pH=7.2PBS缓冲液5ml溶解;称取10mgMES,加入上述溶解液中,置于2-8℃环境中反应半小时;

[0033] 2. 量取活化BSA产物10mg,置于一个干净的10ml试管中,加0.01M pH=7.2PBS至体积4ml,加入EDC/NHS(7mg/3mg),混匀至清澈透明,室温下静置25分钟;

[0034] 3. 准确量取乙酰精胺5mg,加入上述反应体系,混匀至清澈透明,PH值调至10,室温下反应5小时;

[0035] 4. 反应产物在0.01M pH=7.2PBS透析液1000ml中透析48小时,中间换液4次;

[0036] 5. 用0.01M pH=7.2PBS调整终浓度至2mg/ml;

[0037] 6. 分装于干净EP管中(0.5ml/管),-20℃冰箱中保存备用。

[0038] 实施例2

[0039] 1. BSA的活化处理:准确称量牛血清白蛋白(BSA) 66mg,用0.05MpH=8.0PBS缓冲液5ml溶解;称取10mg MES,加入上述溶解液中,置于2-8℃环境中反应半小时;

[0040] 2. 量取活化BSA产物10mg,置于干净的10ml试管中,加0.05M pH=8.0PBS至体积4ml,加入EDC/NHS(10mg/5mg),混匀至清澈透明,室温下静置15分钟;

[0041] 3. 量取精胺10mg,加入至上述反应体系,混匀至清澈透明,PH值调制11.2,室温下反应4小时;

[0042] 4. 反应产物在0.05M pH=8.0PBS透析液1000ml中透析48小时,中间换液4次;

[0043] 5. 在2-8℃环境中,向反应体系内加入60μl乙酸酐,2-8℃环境下反应1小时;

[0044] 6. 反应产物在0.05M pH=8.0PBS透析液1000ml中透析48小时,中间换液4次;

[0045] 7. 用0.05M pH=8.0PBS调整终浓度至2mg/ml,分装于干净EP管中(0.5ml/管),-20℃冰箱中保存备用。

[0046] 实施例3

[0047] 1. 乙酰精胺的合成:以20mg精胺与10μL无水乙酸为合成原料,加入1mL的0.1M pH=7.2PBS中,在2-8℃环境中反应60分钟,反应期间不停搅拌混匀;

[0048] 2. 将上述所得到的乙酰精胺与偶联剂4mg GMBS在2mL 0.1M pH=7.2PBS缓冲溶液中混合,室温下反应3小时;

[0049] 3. 将10mg BSA与4mg乙酰巯基琥珀酸在2mL 0.1MPBS缓冲溶液中混合,室温下反应3小时;加入10μL 0.1M羟胺,室温下反应30分钟除去乙酰基;0.1M pH=7.2PBS缓冲液中透析4小时,除去反应杂质;

[0050] 4. 将乙酰精胺-GMBS偶联产物与上述巯基化修饰的BSA混合,室温下反应4小时;1000mL的0.1M pH=7.2PBS缓冲液中透析24小时,-20℃保存备用。

[0051] 实施例4

[0052] 1. 乙酰精胺的合成:以20mg精胺与10μL乙酸酐或乙酸为合成原料,在2-8℃环境中

加入到1mL的0.01M pH=7.2PBS反应60分钟,反应期间不停搅拌混匀;

[0053] 2.取活化BSA产物10mg,置于干净的10ml试管中,加入4mL 0.01M pH=7.2PBS中,再加入EDC/NHS (8mg/4mg),混匀至清澈透明,室温下静置45分钟;

[0054] 3.取上述方法合成的乙酰精胺,加入反应体系,混匀至清澈透明,PH值调至11,室温下反应4小时以上;

[0055] 4.反应产物在0.01M pH=7.2PBS透析液1000ml中透析48小时,中间换液4次;

[0056] 5.用0.01M pH=7.2PBS调整终浓度至2mg/ml;

[0057] 6.分装于干净EP管中(0.5ml/管),-20℃冰箱中保存备用。

[0058] 实施例5

[0059] 1.称取精胺20mg,将其与4mg偶联剂GMBS在1mL 0.01M pH=6.5PBS缓冲溶液中混合,室温下反应1.5小时;

[0060] 2.将活化BSA 10mg与4mg乙酰巯基琥珀酸在2mL 0.01M pH=6.5PBS缓冲溶液中混合,室温下反应3小时;加入10 $\mu$ L 0.1M羟胺,室温下反应30分钟除去乙酰基;0.01M PBS缓冲液1000mL中透析4小时,除去反应杂质;

[0061] 3.将精胺-GMBS偶联产物与上述巯基化修饰的BSA混合,室温下反应4小时;

[0062] 4.0.01M pH=6.5PBS缓冲液1,000ml中透析24小时,中间换液2次;

[0063] 5.在2-8℃环境中,向反应体系内加入60 $\mu$ l乙酸酐,2-8℃反应1小时;

[0064] 6.反应产物在0.01M pH=6.5PBS透析液1000ml中透析48小时,中间换液4次;

[0065] 7.用0.01M pH=6.5PBS调整终浓度至2mg/ml,分装于干净EP管中(0.5ml/管),-20℃冰箱中保存备用。

[0066] 实施例6

[0067] 多克隆抗体或经筛选所得的单克隆抗体。

[0068] 抗体制备方法过程如下:

[0069] 1.使用上述所制备的抗原作为免疫原,免疫羊、兔、鼠等动物,经多次免疫后获得含有抗DAS抗体的血浆/血清或者可表达抗DAS抗体的效应B细胞;

[0070] 2.获得血浆/血清后,通过蛋白G层析柱纯化获得试剂盒开发所需多克隆抗体;

[0071] 3.获得可表达抗DAS抗体的效应B细胞后,将B细胞与骨髓瘤细胞进行融合,筛选,获得同时具有表达抗DAS抗体及无限增殖功能的杂交瘤细胞株,进行扩大培养后,富集细胞上清,通过蛋白A层析柱纯化获得单克隆抗体。

[0072] 实施例7

[0073] 抗DAS抗体的制备

[0074] 一、免疫原为乙酰精胺分子偶联在载体蛋白BSA上所得的产物(具体操作详见实施例1-实施例5)

[0075] 浓度:2mg/ml

[0076] 二、动物选择与免疫

[0077] (一)、动物选择

[0078] 选择与所用骨髓瘤细胞同源的Balb/c健康雌性小鼠,鼠龄在6~10周。为避免小鼠反应不佳或免疫过程中死亡,同时免疫5只小鼠,编号1-5号。

[0079] (二)、免疫方案

- [0080] 1、初次免疫
- [0081] 将300ug抗原溶于PBS中,加等体积的福氏完全佐剂(CFA),乳化油包水状,采用腹腔及背部皮下多点注射,0.5ml/只,三周后进行第二次免疫;
- [0082] 2、第二次免疫
- [0083] 将300ug抗原溶于PBS中,加等体积的福氏不完全佐剂(IFA),乳化油包水状,采用腹腔及背部皮下多点注射,0.5ml/只,三周后进行第三次免疫;
- [0084] 3、第三次免疫
- [0085] 将300ug抗原溶于PBS中,加等体积的福氏不完全佐剂(IFA),乳化油包水状,采用腹腔及背部皮下多点注射,0.5ml/只,一周后采血检测抗血清活性;
- [0086] 4、抗血清活性检测(ELISA法检测抗血清活性)
- [0087] 4.1实验步骤
- [0088] 4.1.1抗原包被
- [0089] 纯抗原浓度2mg/ml,用包被液稀释后取100μl加入聚苯乙烯酶联检测板各孔中,4℃过夜后,洗液洗涤3次。
- [0090] 4.1.2封闭
- [0091] 每孔加200μl封闭液,4℃过夜或37℃两小时后,洗涤3次,拍干。置4℃冰箱保存备用。
- [0092] 4.1.3 ELISA检测
- [0093] 1)检测血清效价时,对血清做倍比稀释,100μl/孔,以正常小鼠血清为阴性对照,37℃孵育30min,洗涤3次,拍干。
- [0094] 2)加羊抗鼠-HRP,效价为105,100μl/孔,37℃孵育30min,洗涤3次,拍干。
- [0095] 3)显色:加入A、B液各50μl/孔,37℃显色15min。
- [0096] 4)终止:加入终止液50μl/孔。
- [0097] 5)读数:以450nm,630nm双波长测定各孔OD值,以与阴性对照孔OD值的比值(P/N)大于2.1为限,作为判断为阳性或确定效价的临界点。
- [0098] 经检测,5只小鼠活性强度为:4#>5#>1#>3#>2#,两周后加强免疫4#小鼠。
- [0099] 5、加强免疫
- [0100] 将50ug抗原与0.5mlPBS混合,尾静脉注入4#小鼠体内,三天后进行细胞融合。
- [0101] 三、细胞融合
- [0102] (一)、饲养细胞制备
- [0103] 1、试剂耗材:
- [0104] 1.1 RPMI-1640完全培养液;
- [0105] 1.2 RPMI-1640不完全培养液;
- [0106] 1.3 HAT培养液;
- [0107] 1.4离心机;
- [0108] 1.5其他材料:细胞稀释液,血细胞计数板,盖玻片,无菌离心管,96孔细胞培养板,眼科剪刀、镊子,大镊子,平皿,一次性1ml注射器,一次性10ml注射器。
- [0109] 2、实验动物
- [0110] Balb/c或昆明健康小鼠(雌雄均可)1只,6~10周龄,体重18~22克。



### [0111] 3、实验方法

[0112] 3.1将Balb/c或昆明小鼠拉颈脱臼处死,浸泡于75%酒精5分钟,随即放入超净工作台内,腹部朝上放于平皿内;

[0113] 3.2用眼科镊子夹起小鼠腹部皮肤,用剪刀剪一小口,注意切勿剪破腹膜,以免腹腔液外流,然后用剪刀向上下两侧做钝性分离,充分暴露腹膜,用酒精棉球擦拭腹膜消毒;

[0114] 3.3用注射器吸取不完全培养液,注入小鼠腹腔,注射器停留不动,晃动小鼠或反复抽吸几次,用原注射器抽回腹腔内液体,注入离心管;

[0115] 3.41000rpm离心10min,弃上清;

[0116] 3.5用10ml完全培养液重悬细胞,计数,调整细胞浓度为每毫升20万个,100 $\mu$ l/孔滴加到96孔细胞培养板,置37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养备用;

[0117] 3.6观察饲养细胞的生长状态,一般生长良好的饲养细胞和巨嗜细胞呈梭形或多角形、细胞透亮、折光性强。

### [0118] (二)、细胞融合

#### [0119] 1、试剂耗材

[0120] 1.1眼科镊子、剪刀数把、固定板

[0121] 1.2 37 $^{\circ}$ C温水

[0122] 1.3酒精灯、离心管、离心机、平皿

[0123] 1.4融合剂:50%PEG,W=4000(37 $^{\circ}$ C预热)

[0124] 1.5 RPMI-1640不完全培养液(37 $^{\circ}$ C预热)

[0125] 1.6 RPMI-1640完全培养液(37 $^{\circ}$ C预热)

[0126] 1.7 HAT培养液添加剂(37 $^{\circ}$ C预热)

#### [0127] 2、制备脾细胞悬液

[0128] 取加强免疫4#小鼠,眼眶采血后脱臼处死,在75%酒精中浸泡消毒后无菌条件下取出脾脏,制成脾细胞悬液,离心,1000rpm,10min,不完全培养液洗涤两次,计数,待用;

#### [0129] 3、制备骨髓瘤细胞悬液

[0130] 取3瓶生长状态良好的(活细胞数>95%)骨髓瘤细胞,使用无菌滴管对培养瓶内细胞进行吹吸,然后将细胞悬液转移到50ml离心管中,离心,1000rpm,10min,使用不完全培养液洗涤两次,计数,待用;

#### [0131] 4、细胞融合

[0132] 4.1将骨髓瘤细胞与脾细胞按1:10或1:5的数量比例混合在一起,使用50ml离心管离心,用不完全培养液洗1次,1000rpm,10min;

[0133] 4.2弃上清,用滴管吸净残留液体,以免影响PEG的浓度;

[0134] 4.3轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀略加松动;

[0135] 4.4在室温下融合

[0136] ①1分钟内加入预热的1ml 50%PEG(分子量4000),边加边摇晃;

[0137] ②作用90秒钟;

[0138] ③加预热的RPMI-1640不完全培养液,终止PEG作用,每隔2分钟分别加入1ml,2ml,3ml,4ml,5ml和10ml预热的RPMI-1640不完全培养液;

[0139] 4.5离心,1000rpm,10min;

[0140] 4.6弃上清,先用6ml左右含20%小牛血清的RPMI1640完全培养液轻轻混悬细胞,切记不能用力吹打,以免使融合在一起的细胞散开;

[0141] 4.7根据所用96孔培养板的数量,补加完全培养液(RPMI-1640完全培养液,每50ml完全培养液内添加1mlHAT培养液添加剂);

[0142] 4.8将融合后的细胞悬液加入含有饲养细胞的96孔板,100 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养;

[0143] 四、杂交瘤细胞筛选

[0144] (一)、HAT选择杂交瘤

[0145] HAT选择培养基含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶,其中氨基嘌呤可阻断DNA合成的主要途径。主要途径阻断后,靠依应急途径即在HGPRT(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)和TK(胸苷激酶)作用下,利用胸腺嘧啶和次黄嘌呤合成DNA,缺少其中一种,DNA合成不能发生。用于杂交的骨髓瘤细胞系均由经有毒药物诱导而成选择产生的代谢缺陷型细胞,细胞内均无TK或HGPRT,所以单个或融合骨髓瘤细胞在HAT培养液中将死亡。B细胞虽然有HGPRT和TK,但在体外通常培养条件下,尤其是在单个细胞环境下难于长期存活和增殖传代,因此只有杂交瘤细胞才能在HAT培养液中生长繁殖。

[0146] (二)、细胞培养、换液

[0147] 细胞融合后第一天开始,对细胞进行仔细观察,记录好细胞的生长状态、培养液有无污染、饲养细胞的状况。培养3~5天HAT培养液换液一次,10天换HT培养液培养至20天,换1640完全培养液。

[0148] (三)、筛选分泌抗体的杂交瘤细胞(以其中一块培养板附图)

[0149] 融合后当杂交瘤细胞集落生长到一定大小,培养液开始变黄,便可开始筛选抗体活性。一般常用的有:免疫荧光、放射免疫(RIA)、组织化学法和酶联免疫分析(ELISA)法等。最经常用方法是ELISA法。在收集上清时,应在上次换液后3-4天进行,以便抗体积累。上清可不经稀释或1:5-1:10稀释后再测抗体活性,用稀释抗体进行筛选时可以筛掉弱阳性的抗体,也可以去掉因高本底所造成的假阳性,检测方法如下:

[0150] 1、抗血清活性检测(ELISA法检测抗血清活性)

[0151] 1.1抗原包被

[0152] 纯抗原浓度2mg/ml,用包被液稀释后取100 $\mu$ l加入聚苯乙烯酶联检测板各孔中,4 $^{\circ}$ C过夜后,洗液洗涤3次。

[0153] 1.2封闭

[0154] 每孔加200 $\mu$ l封闭液,4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C两小时后,洗涤3次,拍干。置4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0155] 1.3 ELISA检测

[0156] 1)吸取待检测培养孔的细胞上清,100 $\mu$ l/孔,以不含细胞的培养基为阴性对照,以阳性血清作为阳性对照,37 $^{\circ}$ C孵育30min,洗涤3次,拍干。

[0157] 2)加羊抗鼠-HRP,效价为105,100 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min,洗涤3次,拍干。

[0158] 3)显色:加入A、B液各50 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C显色15min。

[0159] 4)终止:加入终止液50 $\mu$ l/孔。

[0160] 5)读数:以450nm,630nm双波长测定各孔OD值,以与阴性对照孔OD值的比值(P/N)

大于2.1为限(参见表1)。

[0161] 表1

[0162]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.010	0.020	0.015	0.020	0.040	0.020	0.060	0.020	0.973	1.132	0.020	0.006
B	0.008	0.020	0.010	0.008	0.007	0.008	0.041	0.008	0.079	0.080	0.020	0.008
C	0.050	0.035	0.030	0.044	0.063	0.020	0.004	0.023	0.050	0.014	1.257	0.891
D	0.024	0.010	0.016	1.453	0.010	0.023	0.030	0.010	0.010	0.055	0.018	0.019
E	0.017	0.019	0.022	0.010	0.060	0.010	0.050	0.010	0.041	0.007	0.025	0.023
F	0.017	0.011	0.015	0.006	0.007	0.011	0.050	0.031	0.020	0.062	0.010	0.010
G	0.050	0.050	0.008	0.035	0.050	0.886	0.008	0.984	0.062	0.042	0.009	0.006
H	0.046	0.008	0.005	0.008	1.266	0.008	0.030	0.052	0.006	1.102	0.005	0.008

[0163] 2、抗血清活性检测(胶体金试纸条检测)

[0164] 2.1试纸条制作:

[0165] 标记金垫:525nm胶体金,按6/25体积比例加K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和羊抗鼠IgG,摇床摇10min,加10%酪蛋白,封闭10min,离心,复溶,铺金,抽干;

[0166] 包被:ASP-PLL,12mg/mL,用1\*PBS稀释5倍,包被30uL/板,划一条线;

[0167] 组装:PVC板上自上到下依次为:吸水纸,NC膜,金垫(2层6mm),加样垫;

[0168] 切条:3mm/条切条;

[0169] 2.2检测:

[0170] 加样50-100uL细胞上清液,静止20min,对比显色线显色强弱,判断细胞培养基中抗体活性强弱,显色越强,抗体活性越高。

[0171] 由上述,两种方法的检测结果经比较发现,酶联检测数值高的,胶体金试纸条检测线显色深,检测结果一致,故以后的抗体筛选采用胶体金试纸条法。

[0172] 五、杂交瘤细胞的克隆化(有限稀释法)

[0173] 融合细胞经抗体活性筛选后,进行亚克隆,挑选出单克隆细胞株,步骤如下:

[0174] 1、在96孔细胞培养板中每孔依次加入100μL饲养细胞悬液(约含 $2.0 \times 10^4$ 个腹腔细胞);

[0175] 2、制备待克隆的杂交瘤细胞悬液,用含10%血清的HT培养基稀释至10个细胞/mL,每孔接种量为0.1mL细胞悬液,即每孔含1个细胞;

[0176] 3、37℃、5%CO<sub>2</sub>培养7~10天,出现肉眼可见的克隆或者在倒置显微镜下能够观察到杂交瘤细胞布满孔底1/3面积即可检测抗体;标出只有单个克隆生长的孔,取上清作抗体检测,

[0177] 4、取抗体检测阳性孔分离细胞,并转种于24孔板中扩大培养,并冻存;

[0178] 5、重复上述1-4步骤2次,挑出经克隆化后所有含细胞孔均为阳性的单克隆细胞扩大培养,保种冻存细胞。

[0179] 最后筛选出的成品细胞株编号:5D4A7A10

[0180] 六、单克隆抗体的生产

[0181] 将保种后的细胞再继续扩大培养,进行单克隆抗体的大量制备。

[0182] 1、成年Balb/c小鼠(3月龄)腹腔接种液体石蜡,每只小鼠0.3~0.5mL,7天后使用;

[0183] 2、收集对数生长期的杂交瘤细胞,用生理盐水洗涤两次,1500r/min离心10min;

[0184] 3、取样,用台盼蓝染色,计数活细胞,重新用生理盐水配制成 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml的悬液

[0185] 4、给每只小鼠腹腔注射1ml处于对数生长期的杂交瘤细胞;

[0186] 5、间隔5天后,每天观察小鼠腹水的产生情况,如腹部明显膨大,以手触摸时,皮肤有紧张感,处死小鼠,采集腹水;

[0187] 6、4000r/min离心腹水15min,除去细胞成分和其他的沉淀物,收集上清,分装,-70℃冻存备用;

[0188] 7、将编号为5D4A7A10的腹水,共计10ml,使用蛋白A层析柱纯化,并进行脱盐处理,纯化后即抗DAS抗体。

[0189] 实施例8

[0190] 试剂盒,包括R1试剂,R2试剂,标准品和质控品,所述R1试剂是将二乙酰精胺抗体偶联在纳米颗粒上后添加保护液后液体形态或者冻干后的固定形态保存的试剂。所述的R2试剂时将乙酰精胺(DAS)分子通过偶联试剂偶联在载体蛋白上后液体形态或者冻干后的固定形态保存的试剂,由上述实施例1-5制备获得。所述二乙酰精胺抗体是由乙酰精胺(DAS)分子通过偶联试剂偶联在载体蛋白上所得的产物作为免疫原,免疫动物所得多克隆抗体或经筛选所得的单克隆抗体(由上述实施例7制备获得)。

[0191] 所述的样本包含但不限于血清、血浆、尿液。所述纳米颗粒包括但不限于纳米金、微球。

[0192] 所述保护液按重量百分比计为:0.1-0.5%的Tris、0.5-2%的PVP 40、0.5-1%的BSA、0.1-0.5%的PEG20000、2-5%的蔗糖、0.01-0.8%的TWEEN 20、0.02-0.1%的叠氮钠、0.85-1.5%的NaCl、1-4%的PEG 6000,余量为水。

[0193] 所述R1试剂的制备:

[0194] 1.准备50mM pH6.0的MES缓冲液,用来活化纳米颗粒,使其终浓度为1%w/v。

[0195] 2.每毫升纳米颗粒悬液加入20mg的EDC,室温孵育20min。

[0196] 3.12000rpm离心30min,用等体积的包被缓冲液(100mM Hepes pH7.0含DAS抗体100 $\mu$ g/mL)悬浮,室温孵育2-5小时。

[0197] 4.每毫升反应溶液中加入2.5 $\mu$ L乙醇胺,持续搅拌并室温孵育10min。

[0198] 5.12000rpm离心30min,用保护液悬浮。

[0199] R2试剂为800ng/mL BSA偶联的DAS抗原;

[0200] 标准品为经水梯度稀释的DAS标准品,梯度稀释浓度为0nM、250nM、500nM、750nM、1000nM 5个浓度。

[0201] R1与R2的体积比为=150:40

[0202] 检测

[0203] 采用上述实施例的体外检测试剂盒进行体外检测,并与ELISA检测方法进行对比:

[0204] (1)采集40例生物样品(即人体尿液)立即于30分钟内,4℃条件下离心取上清作为待检样品,置于冰盒1小时内使用或-20℃保存备用;

[0205] (2)取出试剂R1、R2放置室温下至温度平衡;

[0206] (3)将R1、R2试剂和DAS标准品放在生化分析仪相应的位置,制定标准曲线(表2和参见图1);

[0207] 表2

[0208]

标准曲线	1	2	3	4	5
浓度 (nM)	0	250	500	750	1000
反应度	0.4625	0.3545	0.2139	0.1280	0.0844

[0209] (4) 通过全自动生化分析仪检测DAS质控品,设置加入R1试剂150 $\mu$ L,R2试剂40 $\mu$ L,加入样本5 $\mu$ L,第22点作为第一点检测,第45点为第二点检测,以两点差值为检测值,通过标准曲线回归,确定检测结果有效性(参见表3);

[0210] 表3

质控靶值 nM	回归浓度 nM	相对偏差%
200	201.65	0.8%
800	786.48	1.7%

[0212] (5) 用全自动生化分析仪检测DAS样本,设置加入R1试剂150 $\mu$ L,R2试剂40 $\mu$ L,加入样本5 $\mu$ L,第22点作为第一点检测,第45点为第二点检测,以两点差值为检测值,通过标准曲线回归得出最终结果。

[0213] (6) 采用本发明方式与ELISA方法检测DAS样本检测结果参见表4、图2,通过ELISA法测定值为横坐标,本法测定值为纵坐标,利用相关软件做一条直线如图3所示。

[0214] 表4两种方法检测DAS含量结果

[0215]

样 本 号	本发明实施例提供的试剂盒的免疫比浊法	ELISA 检测	样 本 号	本发明实施例提供的试剂盒的免疫比浊法	ELISA 检测
	DAS 含量 (nM)	DAS 含量 (nM)		DAS 含量 (nM)	DAS 含量 (nM)
H210	338.04	16.26	313	941.46	568.89
H294	701.91	367.49	H260	770.43	402.34
314	689.19	345.54	H172	192.81	12.09
H203	444.51	157.05	H284	292.08	101.19
H186	689.46	330.42	315	372.9	204.78
H262	952.26	442.36	H268	278.46	140.5
H271	478.2	206.06	H191	2069.31	1271.2
H304	454.44	182.33	H173	647.61	276.45
H189	583.83	264.34	H180	742.86	350.58
H212	200.49	63.19	H244	329.07	167.71
H166	498.75	201.98	H283	609.66	223.55
H169	863.25	426.92	309	2189.61	1042.4
H265	841.41	386.56	H207	623.34	218.19
H218	676.11	342.3	H183	783.12	435.19

[0216]

H204	446.52	181.46	297	469.38	150.92
H236	203.55	140.87	H178	502.86	146.73
H272	359.04	132.79	310	1015.29	452.46
H295	630.6	306.46	307	195.21	18.98
H231	606	465.16	H296	573.93	281.25
H249	691.56	203.29	H223	490.2	161.13

[0217] 由表4和图2可见通过比值可以看出,两种方法检测DAS含量趋势一致,由图3可以看出,线性方程为 $y=0.5714x-68.630$ , $r^2=0.9272$ 相关系数 $r=0.9629$ (图3所示),结果表明,两种方法测定的DAS值密切相关。且本发明方法检测DAS用生化试剂盒与ELISA方法相比,检测时间仅为10-15min,节约大量的时间,操作简便、快捷。

[0218] 实施例9

[0219] 试剂盒包括R1试剂,R2试剂,标准品和质控品。

[0220] 所述R1试剂的配制,取1mL纳米金加7 $\mu$ L的0.2M  $K_2CO_3$ ;混合后加入15 $\mu$ g DAS抗体,

混匀静置10min;再加10 $\mu$ L封闭液进行封闭,再次混匀静置10min;离心10min,转速为8000r/min,弃上清,沉淀用1mL R1保护液复溶。

[0221] R1保护液按重量百分比计为:0.3%的Tris、2%的PVP 40、1%的BSA、0.1%的PEG20000、5%的蔗糖、0.1%TWEEN 20、0.04%叠氮钠、1%的NaCl、4%的PEG 6000,余量为水。

[0222] R2试剂为800ng/mLBSA偶联的DAS抗原;

[0223] 标准品为经水梯度稀释的DAS标准品,梯度稀释浓度为0nM、250nM、500nM、750nM、1000nM 5个浓度。

[0224] R1与R2的体积比为=150:40

[0225] 实施例10

[0226] 试剂盒包括R1试剂,R2试剂,复溶液,标准品和质控品。

[0227] 所述R1试剂制备:是按照实施例8中R1配制好后分装,放入冷冻干燥机内进行冻干,使用时再将R1试剂用复溶液复溶。

[0228] 所述复溶液为:R1保护液按重量百分比计为:0.3%的Tris、2%的PVP40、1%的BSA、0.1%的PEG20000、5%的蔗糖、0.1%TWEEN 20、0.04%叠氮钠、1%的NaCl、4%的PEG 6000,余量为水。

[0229] 所述其他成分与实施例8相同。

[0230] 本发明方法与对比例检测DAS样本检测结果如下表5所示。

[0231] 表5

[0232]

样本号	DAS 含量(nM) 实施例 8	DAS 含量(nM) 实施例 9	比值
H101	125.39	139.15	1.11
H102	133.97	132.88	0.99

[0233]

H103	69.64	68.54	0.98
H104	84.08	80.25	0.95
H105	312.66	312	1.00
H106	120.43	119.55	0.99
H107	80.71	79.84	0.99
H108	98.93	99.65	1.01
H109	195.20	198.4	1.02
H110	92.14	91.37	0.99
H111	70.60	71.32	1.01
H112	81.94	80.88	0.99
H113	310.36	310.89	1.00
H114	126.65	125.75	0.99
H115	139.77	140.25	1.00
H116	204.72	208.51	1.02
H117	118.46	119.11	1.01
H118	124.27	123.42	0.99
H119	323.38	320.99	0.99
H120	419.4	415.67	0.99

[0234] 通过上述结果表明, R1试剂以液体形式和冻干形式检测DAS含量数值相差不大, 均符合产品使用要求。



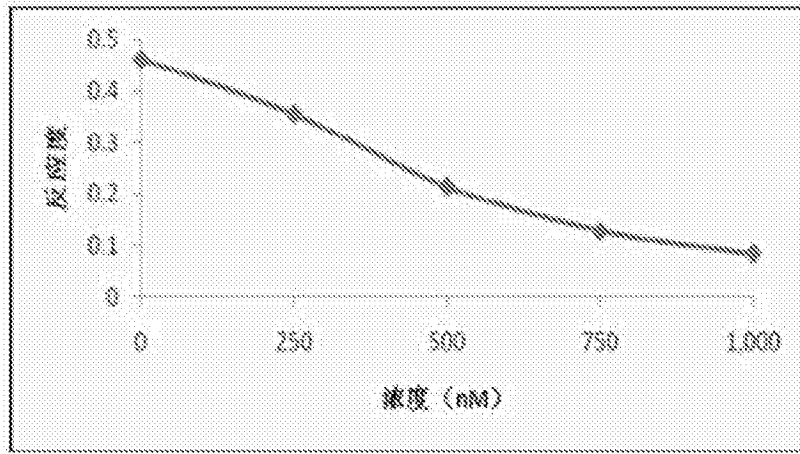


图1

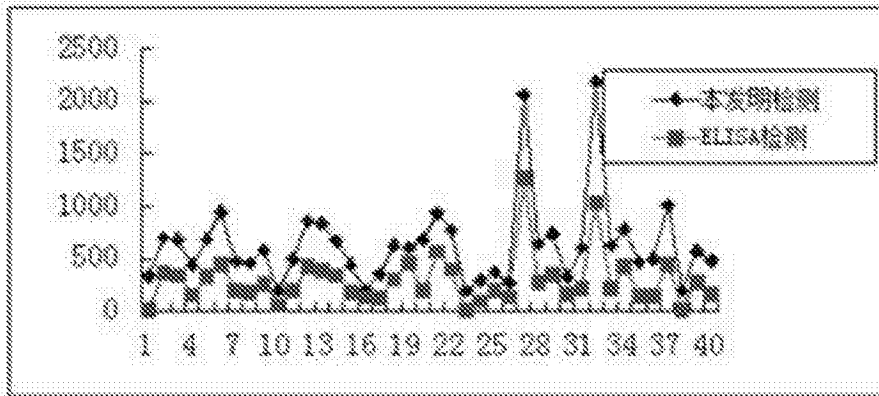


图2

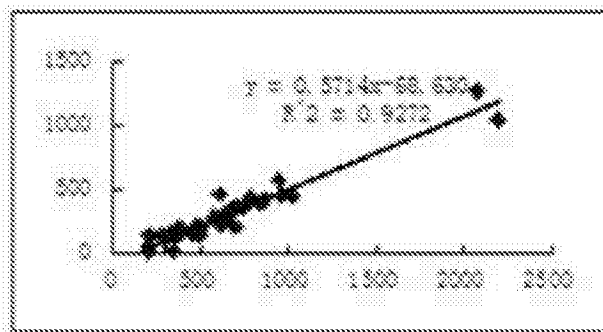


图3