



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109535252 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811543728.3

(22)申请日 2018.12.17

(71)申请人 江苏莱森生物科技研究院有限公司

地址 212004 江苏省镇江市京口区新区丁
卯经十五路99号30幢

(72)发明人 刘晗青 屠志刚

(74)专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理
有限公司 11467

代理人 冯燕平

(51)Int.Cl.

C07K 16/22(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

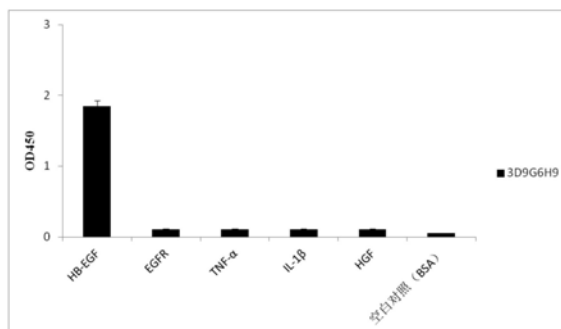
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图4页

(54)发明名称

一种抗HB-EGF单克隆抗体及其制备方法

(57)摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种抗HB-EGF单克隆抗体及其制备方法。本发明所述抗HB-EGF单克隆抗体的制备方法是用纯化后的HB-EGF蛋白作为免疫原,免疫BALB/c小鼠,提取免疫成功的小鼠脾脏淋巴细胞,通过细胞融合技术将淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,经过二轮亚克隆筛选后获得稳定分泌抗HB-EGF的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,从而获得抗HB-EGF单克隆抗体,本发明的抗HB-EGF单克隆抗体可用于免疫印迹、免疫荧光等免疫学检测,所获抗体经验证具有良好的特异性结合能力。



1. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体为抗HB-EGF单克隆抗体,所述轻链可变区如SEQ .ID.NO. 2所示,重链可变区如SEQ .ID.NO. 1所示。

2. 一种权利要求1所述单克隆抗体的制备方法,其特征在于,首先用HB-EGF蛋白免疫小鼠,再用免疫成功小鼠的脾脏淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,通过筛选阳性克隆得到特异性分泌抗HB-EGF单克隆抗体杂交瘤细胞株,将该细胞接种于提前用液体石蜡致敏的小鼠腹腔,大量生产抗HB-EGF单克隆抗体,并通过蛋白纯化的方式制备得到高纯度的抗HB-EGF单克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述蛋白免疫为经过三次蛋白免疫;所述骨髓瘤细胞为SP2/0骨髓瘤细胞。

4. 一种能产生权利要求1-2任一项所述单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

5. 权利要求1所述的单克隆抗体于制备产品中的应用,其特征在于,所述的产品应用于免疫学检测。

6. 权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的产品应用于基因工程抗体或抗原的鉴定。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述应用为在制备用于检测HB-EGF抗体或抗原的检测试剂中的应用。

8. 权利要求6所述的应用,其特征在于,所述应用为制备ELASA试剂盒。

一种抗HB-EGF单克隆抗体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种抗HB-EGF单克隆抗体及其制备方法。

背景技术

[0002] 人表皮生长因子受体(HER)家族包括被命名为HER-1(ErbB1)、HER-2(ErbB2)、HER-3(ErbB3)和HER-4(ErbB)在内的4种不同的酪氨酸激酶受体。这些受体在多数表皮细胞、间质细胞及肿瘤细胞内均存在表达,如HER-1和HER-2被发现在上皮来源和间质来源的子宫恶性肿瘤中存在高表达,研究已发现在乳腺癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌及肾癌等多种癌症中均存在HER-1的异常激活和过表达现象,HER-3在HER-2阳性乳腺癌患者体内的表达情况与乳腺癌治疗的预后不良存在相关性。肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)为表皮生长因子家族中的一员,可与HER结合,以旁分泌、自分泌、近分泌的形式发挥其生物活性,在无配体结合状态下,HER通常以单体的形式存在于细胞膜表面。当它的胞外区与配体结合时,如HB-EGF,会激活一系列信号通路,启动信号转导级联反应,刺激肿瘤细胞增殖,并抑制细胞凋亡,广泛参与如伤口愈合、胚胎植入、心脏发育等生理过程和动脉粥样硬化、脑损伤、肿瘤发生等众多病理进程,而应用小分子抑制剂或单克隆抗体阻断相关信号通路则可逆转该过程。

[0003] 大量研究表明,HB-EGF可促进肿瘤细胞增殖和血管新生,增强癌细胞增殖、黏附、侵袭的能力。近年来,HB-EGF被发现在一些癌症中或可作为早期检测和不良预后的肿瘤标志物。但是目前HB-EGF抗体存在特异性差,产量低的缺点,限制了HB-EGF的应用,因此,继续开发一种高特异性、高亲和性、高产量的HB-EGF抗体。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于一种抗HB-EGF单克隆抗体、其制备方法及其应用。

[0005] 本发明利用HB-EGF蛋白作为免疫原免疫BALB/c小鼠,利用细胞融合技术将免疫成功的小鼠脾脏淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞相融合筛选能够稳定分泌抗HB-EGF单克隆抗体的杂交瘤细胞株,大量生产HB-EGF单克隆抗体,经纯化后获得高纯度的HB-EGF单克隆抗体,对进一步研究以HB-EGF为靶点的生物诊断及治疗药物等方面具有重要的意义。

[0006] 本发明的方案通过如下技术手段得以实现:

本发明首先提供一种单克隆抗体,所述单克隆抗体为抗HB-EGF单克隆抗体,所述抗体重链可变区氨基酸序列如SEQ .ID.NO. 1所示,轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ .ID.NO. 2所示。

[0007] 本发明还提供所述抗HB-EGF单克隆抗体的制备方法,本发明首先用HB-EGF蛋白免疫BALB/c小鼠,再用免疫成功小鼠的脾脏淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,通过筛选阳性克隆得到特异性分泌抗HB-EGF单克隆抗体杂交瘤细胞株,将该细胞接种于提前用液体石蜡致敏的BALB/c小鼠腹腔,大量生产抗HB-EGF单克隆抗体,并通过蛋白纯化的方式制备得到高纯

度的抗HB-EGF单克隆抗体。

[0008] 所述蛋白免疫为经过三次蛋白免疫;所述骨髓瘤细胞为SP2/0骨髓瘤细胞。

[0009] 本发明还提供所述抗HB-EGF单克隆抗体的应用,所述应用为制备ELISA试剂盒。

[0010] 本发明所述抗HB-EGF单克隆抗体的应用,具体为用于免疫学检测,具体的为检测HB-EGF蛋白。

[0011] 本发明的有益效果:

HB-EGF的异常表达现象存在于如乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等多种癌症中,其可通过与相应的受体HER结合,干预多条细胞信号转导通路,促进癌细胞的增殖、黏附、侵袭及实体瘤的发展。本发明得到的抗HB-EGF单克隆抗体具有特异性高,可大量生产的特点,所得抗体的效价均达到 1×10^8 以上。本发明所得到的抗HB-EGF单克隆抗体能够特异性的结合HB-EGF蛋白,可用于细胞的免疫学检测,具有广阔的市场前景,也可能对进一步开发以HB-EGF为靶点的生物治疗药物具有重要的临床意义。

附图说明

[0012] 图1为重组蛋白HB-EGF组分收集的 SDS-PAGE电泳图。

[0013] 图2为纯化后的HB-EGF单克隆抗体组分收集的SDS-PAGE电泳图。

[0014] 图3为不同稀释度HB-EGF单克隆抗体的免疫效价检测结果。

[0015] 图4为HB-EGF单克隆抗体的特异性及交叉反应鉴定结果。

[0016] 图5为HB-EGF单克隆抗体对HB-EGF重组质粒瞬时转染的293A细胞进行Western blot实验结果。

[0017] 图6为 HB-EGF单克隆抗体对HB-EGF重组质粒瞬时转染293A细胞进行免疫荧光染色实验结果。

[0018] 图7为HB-EGF基因工程抗体的特异性鉴定结果。

具体实施方式

[0019] 以下结合实施案例来进一步解释本发明,但实施案例并不对本发明做任何形式的限定。以下实施案例中的方法、设备、材料,如果未进行特别说明,均为本领域常规方法、设备和材料。

[0020] 实施例1:HB-EGF单克隆抗体制备

(1) 重组HB-EGF蛋白的表达与纯化

a. 转化大肠杆菌BL21表达目标重组蛋白

重组质粒pET-30a-HB-EGF(购自Invitrogen公司),采用42℃热激90 s的方法将重组质粒转化进大肠杆菌BL21,挑取卡那霉素抗性的菌斑,在500 mL LB培养基中培养至当菌液的OD为0.6~0.8时,加入0.5 mM IPTG诱导目标蛋白的表达,25℃恒温培养12 h后,收集菌体,超声破菌,离心收集上清。

[0021] b. 重组蛋白纯化

将菌体裂解液上清加入镍柱层析柱中(购自Novagen),4℃结合过夜,弃去上清,用Wash Buffer缓冲液洗去层析柱中未结合的蛋白,然后用10倍柱体积的500 mM咪唑缓冲液洗脱重组蛋白,SDS-PAGE电泳检测重组蛋白的表达,如图1所示,图中从左往右依次为第一、二、三

依次洗脱的HB-EGF蛋白,蛋白经五次洗脱即能获得较高的纯度,收集第五次洗脱后的蛋白,冻干后进行后续动物免疫。

[0022] (2) BALB/c小鼠的免疫与效价检测

本实施例所用BALB/c小鼠购自南京大学动物模式研究所。

[0023] a. 首次免疫:

取重组HB-EGF蛋白100 μg ,添加PBS稀释到200 μL ,加入200 μL 的弗氏完全佐剂,充分乳化成黏厚的乳剂,腹部皮下多点注射,完成首次免疫。

[0024] b. 第二次免疫:

首次免疫间隔三周后,取同样的重组HB-EGF蛋白100 μg ,添加PBS稀释到200 μL ,加入等体积的弗氏不完全佐剂,充分乳化成黏厚的乳剂,腹部皮下多点注射,完成第二次免疫。

[0025] c. 利用间接ELISA法检测第二次免疫后小鼠血清效价:

取出重组HB-EGF蛋白,用pH9.6,0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液将HB-EGF蛋白稀释为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后加入96孔酶标板,每孔100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,取出包被过夜的酶标板,TBS-T缓冲液洗涤3次后,拍干酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存待用。第二次免疫后1周,从小鼠尾静脉适量采血,5000 g离心15 min分离血清,用样本稀释液(含有0.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)将血清按1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000梯度进行稀释,每孔100 μL 加入待检测酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$,孵育1h后,经TBS-T缓冲液洗涤3次,拍干酶标板,每孔加入100 μL 1:5000稀释后的HRP标记的山羊抗小鼠二抗(购自Jackson Immuno Research公司),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。取出酶标板,经TBS-T缓冲液洗涤5次后,每孔加入100 μL TMB底物显示液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色10~15 min,随后加入50 μL 终止液终止反应,于酶标仪450 nm波长下读取吸光值。选取血清效价达到1:10⁵以上小鼠,进行第三次免疫;

d. 第三次免疫:

第二次免疫间隔三周后,对血清效价达到1:10⁵以上小鼠进行第三次免疫,具体方法与第二次免疫一致;

e. 强化免疫/冲击免疫:

在第三次免疫间隔三周后,进行最后一次强化免疫/冲击免疫,取重组HB-EGF蛋白200 μg ,添加PBS稀释到200 μL ,腹部皮下多点注射,完成强化免疫/冲击免疫,免疫结束后3~4天后取小鼠脾脏细胞进行细胞融合。

[0026] (2) 杂交瘤细胞的融合、筛选

a. 饲养层细胞的制备:

取成年未免疫BALB/c小鼠,引颈处死,75%酒精中浸泡5 min后置于无菌操作台中,固定在解剖板上;用灭菌剪刀剪开最外层毛皮,用镊子撕开,暴露出腹部肌肉;用5 mL注射器吸取5 mL生理盐水,注射入小鼠腹腔,待腹腔胀大后,用酒精棉对其腹部进行3~5 min按摩,使得生理盐水充分分布腹腔各处后,小心吸出生理盐水,250 g离心5~10 min,弃上清,用含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基重悬后铺96孔板,每孔100 μL ,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 5%CO₂培养箱中培养,待用。

[0027] b. 准备SP2/0骨髓瘤细胞:

复苏一支8AG筛选过的SP2/0骨髓瘤细胞(购自中科院昆明细胞库)于15 cm培养皿中,用10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,当细胞铺满培养皿50~60%时进行传代并扩大培

养。细胞融合时,取约3~4碟SP2/0骨髓瘤细胞弃去培养基,用10 mL预先37℃温育的RPMI 1640培养基将细胞吹打下来,放入离心管中,再加入10 mL RPMI 1640培养基,吹打均匀放入50 mL离心管,250 g,离心5 min,弃去上清,待用。

[0028] c. 免疫后的小鼠脾脏细胞的制备:

取冲击免疫结束后3天的BALB/c小鼠,引颈处死,75%酒精中浸泡5 min后置于无菌操作台中,固定在解剖板上;用灭菌剪刀剪开最外层毛皮,然后用镊子撕开,暴露出腹部肌肉,然后打开腹腔,取出小鼠脾脏,经80目网筛充分研磨后,加入5 mL RPMI 1640培养基重悬,吸出细胞悬液于50mL离心管里,250 g,离心5 min,弃上清,待用。

[0029] d. 细胞融合:

通过细胞计数,将脾脏淋巴细胞按5:1的比例与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0混合,吹打均匀,250 g,离心5 min,弃去上清,用手指轻轻击打离心管底部,使细胞分布均匀、蓬松;取出37℃预热的1 mL PEG1500,混匀后吸出,将PEG1500逐滴加入混合好的细胞中,加入过程中要轻轻晃动离心管,控制滴速,时间控制在90 s左右;取出37℃预热RPMI 1640培养基,于第1 min逐滴加入1 mL,均匀滴入,边滴加边缓慢旋转混匀,第2 min加入3 mL,第3 min加入10 mL速度逐步加快,终止细胞融合,共加入14 mL培养基,注意此过程先慢后快。轻轻混匀,37℃静置5 min后,250 g,离心5 min,弃去上清。

[0030] e. 铺板:

利用HAT特殊培养基重悬上述融合细胞,轻轻吹打混匀,将细胞培养液加入提前准备的含饲养层细胞的96孔培养板中,100 μ L/孔,37℃ 5%CO₂培养箱培养。经HAT筛选后,未融合的骨髓瘤细胞将无法生长,而有效融合的杂交瘤细胞将在培养孔内生长、增殖、并分泌抗体。

[0031] f. 利用间接ELISA法筛选生产单克隆抗体的杂交瘤细胞:

取出重组HB-EGF蛋白,用pH9.6,0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液将HB-EGF蛋白稀释为1 μ g/mL加入96孔酶标板,100 μ L/孔,4℃包被过夜,取出包被过夜的酶标板,TBS-T洗涤3次后,拍干酶标板,4℃贮存待用。

[0032] 细胞融合后第4~5天可以在显微镜下看到4~5颗细胞聚集在一起的细胞集落,此时可进行第一次换液,吸出原有培养基,重新加入HAT培养基,第8~10天进行第二次换液,此时细胞集落约铺满1/10孔,可用HT培养基代替HAT培养基,第二次换液后48 h,从每个孔里取出50 μ L培养基上清,加入预先包被的酶标板中,37℃,孵育1 h后,经TBS-T洗涤3次,拍干酶标板,每孔加入100 μ L 1:5000稀释HRP标记的山羊抗小鼠二抗,37℃孵育30 min后,经TBS-T洗涤5次后,每孔加入100 μ L加入TMB底物显示液,37℃避光显色10~15 min,随后加入50 μ L终止液终止反应,于酶标仪450 nm波长下读取吸光值。显色反应明显且吸光度值较高(OD450数值大于2.0以上)的孔即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0033] g. 第一次亚克隆筛选:

采用有限稀释法对阳性的孔进行第一次亚克隆筛选。稀释杂交瘤细胞:将阳性孔的杂交瘤细胞吹打均匀,进行细胞计数,根据细胞密度,将细胞稀释到10个/mL,加入96孔板中,每孔100 μ L,即1个细胞/孔,放入37℃ 5%CO₂培养箱中培养,3~5天后,通过显微镜观察,选取有且仅有一个由4~5颗细胞聚集在一起的细胞集落为目标孔,利用间接ELISA法筛选出阳性的单克隆细胞株,方法同上。

[0034] h. 第二次亚克隆筛选:

待第一次亚克隆筛选出的阳性孔中的细胞集落铺满1/10孔时,进行第二次亚克隆筛选,方法同上,最终选取抗体分泌性最好的杂交瘤细胞株编号命名为: 3D9G6H9。

[0035] (4) 抗HB-EGF单克隆抗体的生产及纯化。

[0036] a. 小鼠单克隆抗体腹水的制备:

取6~8周龄的雌性BALB/c小鼠,腹腔注射500 μ L液体石蜡致敏,4~7天后,将3D9G6H9杂交瘤细胞株按 5×10^5 个/只,注射入已致敏小鼠腹腔,7~14天后观察小鼠腹水生产情况,如腹部明显膨大,即可抽取腹水,腹水采集后5000 g离心10~15 min去除油脂和沉淀,收集上清,即为腹水抗HB-EGF单克隆抗体,本发明中由3D9G6H9杂交瘤细胞株生产的单克隆抗体以细胞株编号区分。

[0037] b. 小鼠单克隆抗体腹水的纯化:

利用正辛酸-蛋白G法对腹水抗体进行纯化,抗体纯度经SDS-PAGE电泳验证,如图2所示,图中从左往右依次为第一、二、三洗脱的抗体,抗体经第二次洗脱即能获得较高的纯度,抗HB-EGF单克隆抗体IgG (H+L) 分子量约为160KD,其中IgG重链约为55KD, IgG轻链约为25KD。

[0038] 纯化抗体具体方法如下:

抗体与醋酸盐缓冲液按体积比1:3充分混匀,逐滴加入正辛酸,混匀后,4℃静置1 h,3000g离心30 min,取上清,弃沉淀;

加入0.1倍体积的10 $\times$ PBS,调节pH至7.4,溶液经0.45 μ m滤膜过滤;

将过滤后的液体装入已平衡的蛋白G-层析柱中;

利用20倍体积PBS洗涤非特异性结合的蛋白;

利用10倍体积pH2~3的0.1 mol/L的甘氨酸缓冲液洗脱抗体并收集液体;

将洗脱液加入10 KD超滤管,5000 g 4℃离心10~15 min进一步浓缩抗体,加入50%甘油,-20℃保存。

[0039] 实施例2:HB-EGF单克隆抗体效价测定及特异性

(1) 单克隆抗体的效价测定:

用pH9.6,0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液将HB-EGF蛋白稀释为1 μ g/mL,包被酶标板,100 μ L/孔,4℃过夜;用样本稀释液(含有0.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)将以上单克隆抗体按1:10³、1:10⁴、1:10⁵、1:10⁶、1:10⁷、1:10⁸、1:10⁹、1:10¹⁰稀释,100 μ L/孔,37℃孵育1 h;取出酶标板,经TBS-T洗涤3次,拍干酶标板,每孔加入100 μ L 1:5000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠二抗,37℃孵育30 min;经TBS-T洗涤5次后,每孔加入100 μ L加入TMB底物显示液,37℃避光显色10~15 min,随后加入50 μ L终止液终止反应,于酶标仪450 nm波长下读取吸光值,结果如图3所示,本发明中纯化后的单克隆抗体的效价均达到 1×10^8 。

[0040] (2) 单克隆抗体特异性识别及交叉反应鉴定:

用碳酸盐缓冲液将EGFR、TNF- α 、IL-1 β 、HGF蛋白稀释为1 μ g/mL,包被酶标板,并设置空白对照,空白对照组为1 μ g/mL BSA蛋白,用HB-EGF单克隆抗体进行间接法ELISA检测,实验结果如图4所示,HB-EGF单克隆抗体与EGFR、TNF- α 、IL-1 β 、HGF蛋白之间均无交叉反应,表明该抗体的特异性较好。

[0041] 实施例3:HB-EGF单克隆抗体的应用

(1) Western blot实验:

利用lipofectamine 2000将重组质粒pCDH-EF1-HBEGF-T2A-Puro(购自Invitrogen公司)及其对照pCDH-EF1-T2A-Puro质粒(购自Invitrogen公司),转染入293A细胞,转染结束后48 h,用RIPA裂解液将细胞裂解,5000 g 4℃离心20 min,收集上清,BCA试剂盒检测蛋白浓度;细胞裂解液经12% SDS-PAGE电泳分离,随后将PAGE胶置于PVDF膜上,120 mA转膜240 min;将PVDF膜放入5%的脱脂牛奶中室温封闭1 h,然后分别用1:5000本发明中HB-EGF单克隆抗体作为一抗4℃孵育过夜;取出PVDF膜,PBS-T漂洗3次,每次5min,置于1:5000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠二抗中室温孵育1 h后,弃二抗,PBS-T洗涤5次,每次5min;将膜加入显色液中避光显影,拍照记录实验结果,如图5所示,本发明的HB-EGF单克隆抗体能够特异性识别HB-EGF蛋白,并且能够用于检测细胞中的HB-EGF蛋白,说明本发明中的生产的HB-EGF抗体具有较高的特异性。

[0042] (2) 免疫荧光实验:

利用免疫荧光实验检测单克隆抗体结合大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞PC12(购自中科院昆明细胞库)中HB-EGF的能力,与单克隆抗体孵育进行免疫荧光染色实验,具体实验方法如下:

PC12细胞贴壁生长后,采用4%多聚甲醛进行固定;

细胞固定后,利用PBS洗涤3次,加入0.5% TritonX-100,室温静置5 min,利用PBS洗涤3次后,加入5% BSA-PBS,37℃封闭1 h;

细胞封闭后加入HB-EGF单克隆抗体(1μg/mL),37℃孵育1 h;

PBS洗涤3次后,加入FITC标记的山羊抗小鼠二抗(购自Jackson Immuno Research公司),室温孵育45 min;

PBS洗涤3次后,加入DAPI荧光染料室温避光孵育10 min;

PBS洗涤3次后,荧光显微镜分别在405 nm和488 nm处观察,拍照。结果如图6所示:抗HB-EGF单克隆抗体均能特异地与PC12细胞中的HB-EGF结合并呈现出较强的绿色荧光。

[0043] 实施例4: HB-EGF单克隆抗体重轻链可变区的测序及鉴定

(1) HB-EGF单克隆抗体重轻链可变区的扩增及序列测定

单克隆细胞长期保存,可能由于多次传代后不稳定及污染问题导致阳性克隆丢失,为解决上述问题,在本发明过程中,利用分子生物学技术,对阳性单克隆细胞株进行重链可变区(mVH)和轻链可变区(mVL)基因扩增,并进行序列鉴定。

[0044] 具体方法如下:收集生长状态良好的杂交瘤细胞,利用Thermo公司的Trizol提取杂交瘤细胞总RNA,按南京诺唯赞公司的HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)说明书的操作方案将mRNA逆转录为cDNA,-20℃冻存储存。逆转录反应体系为5 μL RNA(2500 ng),10 μL 4×gDNA,10 μL 5×supermix II,加ddH₂O补足至50 μL,总反应体积为50 μL。

[0045] 以cDNA为模板,通过NCBI数据库查找鼠源重链FR1区及铰链区基因序列(NC000078.6),根据序列设计重链PCR引物,上游序列为(SEQ.ID.NO.3): GCGCTCGAGCAGKTCCAGCTGAAGCAGTC,下游序列为(SEQ.ID.NO.4): GCGACTAGTGCATTTGCATGGAGGACAG;同样通过NCBI数据库查找鼠源轻链FR1区及恒定区基因序列(NC000072.6),设计轻链PCR引物,上游序列为(SEQ.ID.NO.5):

G C G G A G C T C G A T R T T G T G A T G A C C C A R A C , 下游序列为 (SEQ. ID. NO. 6) : GCGTCTAGACTCATTCCTGTTGAAGCTCT, 分别PCR获得抗体的轻链和重链片段。按南京诺唯赞公司的Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase说明书的操作方案进行PCR, PCR反应体系为: 25 μ L 2 $\times$ Phanta, 1 μ L dNTP, 4 μ L 10 μ M引物对, 4 μ L 杂交瘤细胞cDNA, 1 μ L DNA polymerase, 15 μ L dd H₂O, 总反应体积为50 μ L。扩增条件为: 预变性94 $^{\circ}$ C, 3 min; 变性94 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火64 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸72 $^{\circ}$ C, 5 min。按照OMEGA公司OMEGA Gel Extraction Kit说明书对PCR产物进行胶回收, 进行测序分析, 获得杂交瘤细胞的重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 1, 轻链可变区序列氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 2。

[0046] 重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 1:

QIQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKVKSLHWVKRPEQGLEWIGDIKPKNGATKYAPPFLGKASITAD
TSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCIRDGNSKLIWGQGTTLTVSS

轻链可变区序列氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 2:

DVVVTQTPLSLSVSLGDRASISCAAQAIIVHLNGNTKLEWYLQKPGQSPKPLIYSVKNDKSGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDLGVYYCAQGHVLPFTF

(2) HB-EGF单克隆抗体重轻链可变区序列鉴定

将重链可变区序列克隆入pFUSEss-CHIg-mG2b-TDS (购自Invitrogen公司) 载体, 轻链可变区序列克隆入pFUSE2ss-CLIg-mk-TDS (购自Invitrogen公司) 载体, 分别挑取博来霉素与杀稻瘟菌素抗性的菌斑, 扩大培养后进行质粒抽提, 并进行测序分析, 选取测序结果正确的质粒共同转染入人胚胎肾上皮细胞HEK293A、中国仓鼠卵巢细胞CHO细胞 (购自中科院昆明细胞库), 收集48 h后的细胞上清液, 4000 g离心30 min, 去除上清中细胞等杂质, 并用0.45 μ m滤器过滤除菌后进行间接ELISA实验, 检测上清液中是否存在相应的HB-EGF抗体, 结果如图7所示, 细胞上清能够检测到HB-EGF抗体, 表明筛选的HB-EGF单克隆抗体的重、轻链可变区具有较好的特异性且能够通过转染适当的受体细胞如HEK293、CHO细胞等表达出HB-EGF抗体。

序列表

<110> 江苏莱森生物科技研究院有限公司

<120> 一种抗HB-EGF单克隆抗体及其制备方法

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

```

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Arg Pro Gly Ala
1           5           10           15
Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Val Lys
          20           25           30
Ser Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
Gly Asp Ile Lys Pro Lys Asn Gly Ala Thr Lys Tyr Ala Pro Pro Phe
          50           55           60
Leu Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ile Arg Asp Gly Asn Ser Lys Leu Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
          100          105          110
Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 2

<211> 103

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

```

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Asp Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ala Gln Ala Ile Val His Leu
          20           25           30
Asn Gly Asn Thr Lys Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Val Lys Asn Asp Lys Ser Gly Val Pro

```

50	55	60														
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
65					70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Gly	
			85						90					95		
Lys	His	Val	Leu	Pro	Thr	Phe										
			100													

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gcgctcgagc agktccagct gaagcagtc 29

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gcgactagtgc catttgcagtg gaggacag 28

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gcggagctcg atrttgtgat gaccarac 29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

gcgtctagac tcattcctgt tgaagctct 29

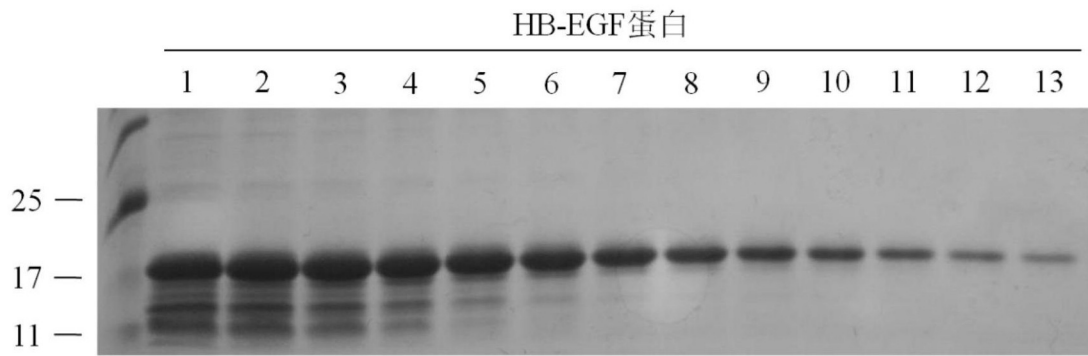


图1

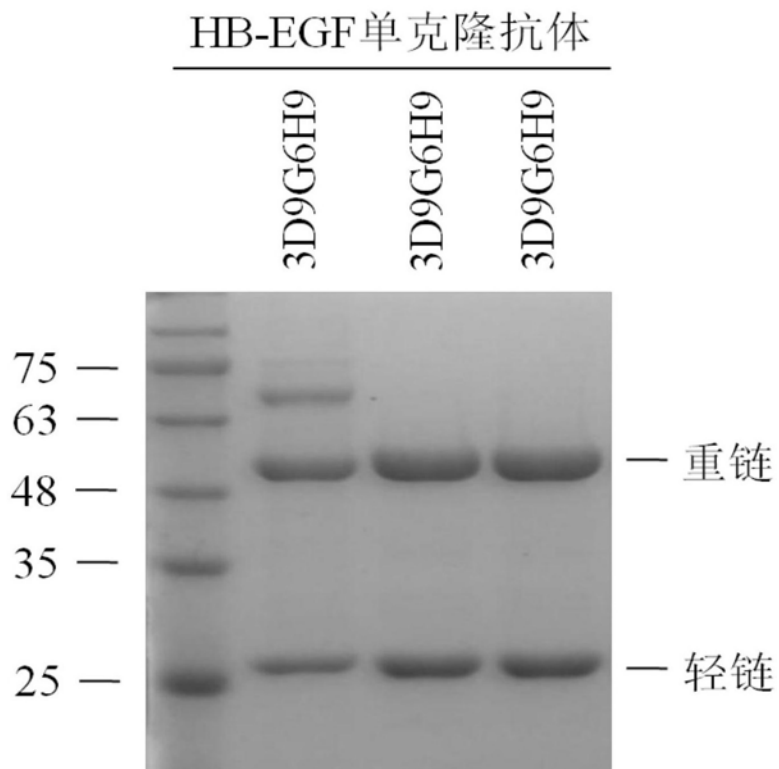


图2

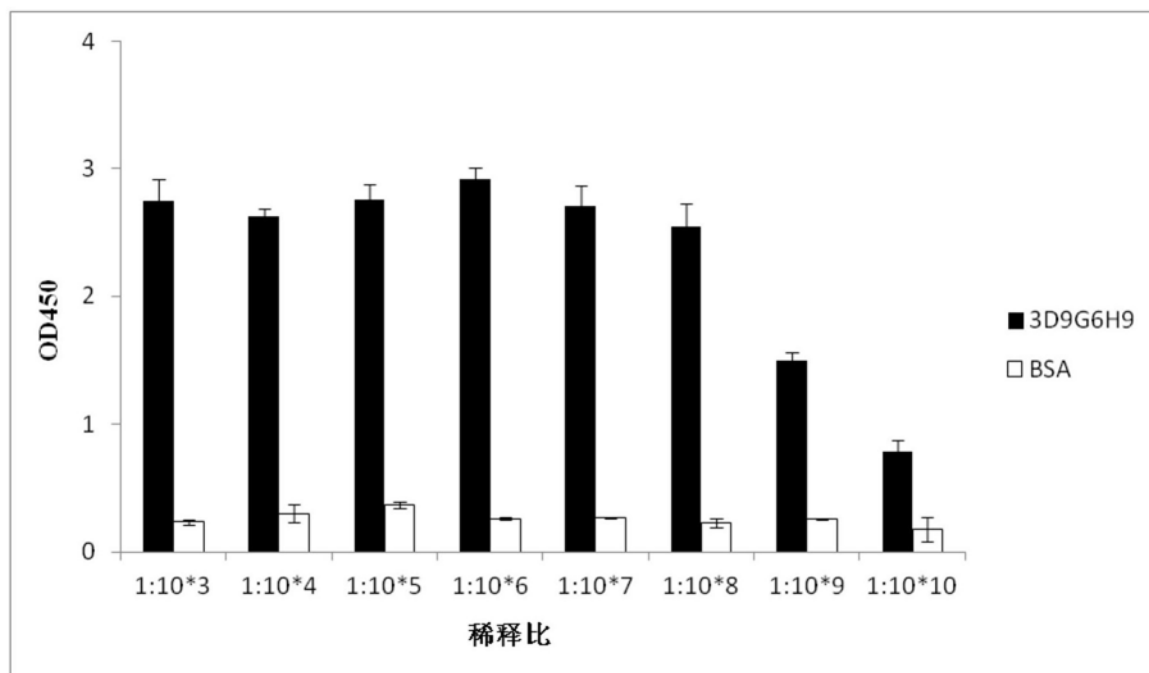


图3

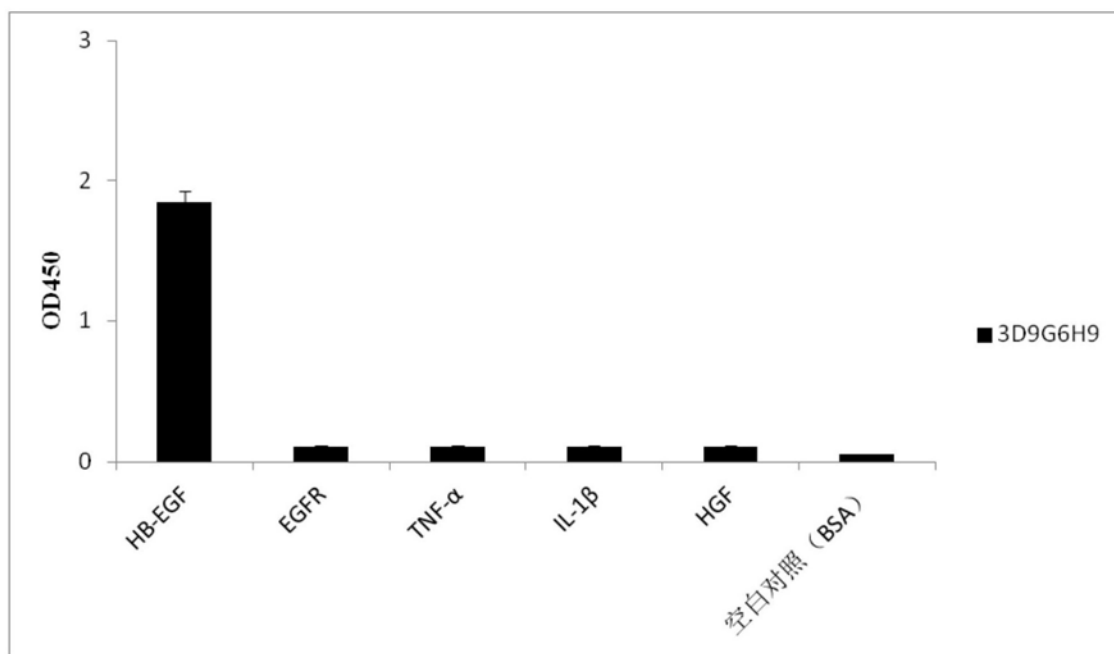


图4

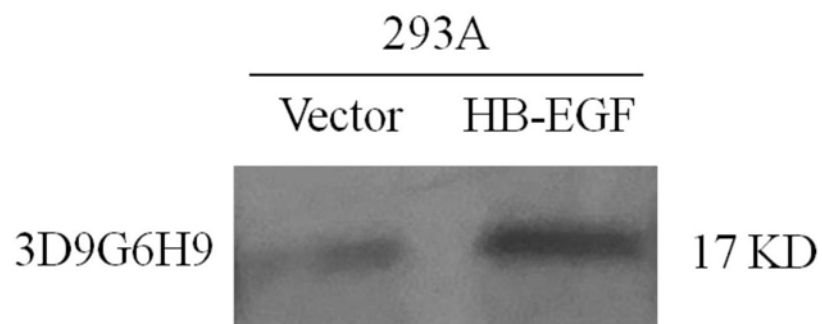


图5

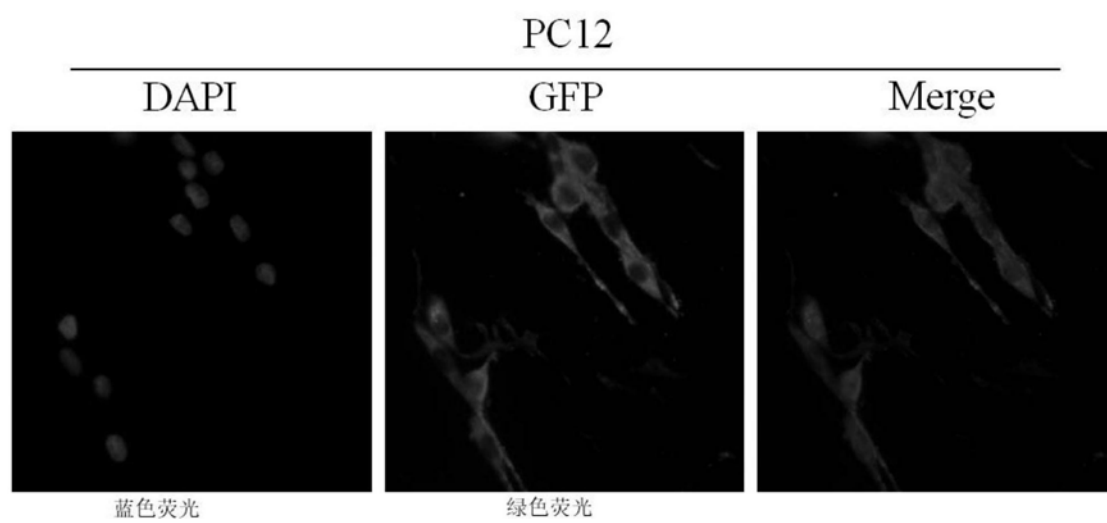


图6

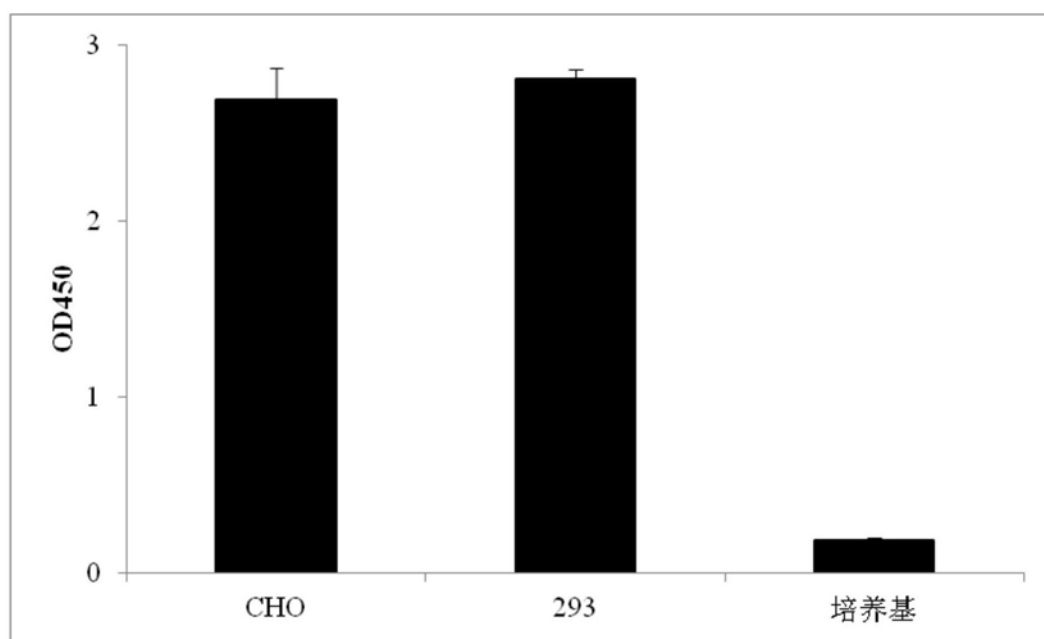


图7

专利名称(译)	一种抗HB-EGF单克隆抗体及其制备方法		
公开(公告)号	CN109535252A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811543728.3	申请日	2018-12-17
[标]发明人	刘晗青 屠志刚		
发明人	刘晗青 屠志刚		
IPC分类号	C07K16/22 C12N5/20 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/22 G01N33/53		
代理人(译)	冯燕平		
其他公开文献	CN109535252B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种抗HB-EGF单克隆抗体及其制备方法。本发明所述抗HB-EGF单克隆抗体的制备方法是用纯化后的HB-EGF蛋白作为免疫原，免疫BALB/c小鼠，提取免疫成功的小鼠脾脏淋巴细胞，通过细胞融合技术将淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行融合，经过二轮亚克隆筛选后获得稳定分泌抗HB-EGF的单克隆抗体的杂交瘤细胞株，从而获得抗HB-EGF单克隆抗体，本发明的抗HB-EGF单克隆抗体可用于免疫印迹、免疫荧光等免疫学检测，所获抗体经验证具有良好的特异性结合能力。

