



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109517058 A

(43)申请公布日 2019.03.26

(21)申请号 201811242616.4

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2018.10.24

(71)申请人 普健生物(武汉)科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道666号光谷生物城武汉
生物技术研究院B8栋

(72)发明人 鲁亮 雷坤 秦伏波 张永霞

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限
公司 32224

代理人 徐瑛 祝蓉蓉

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

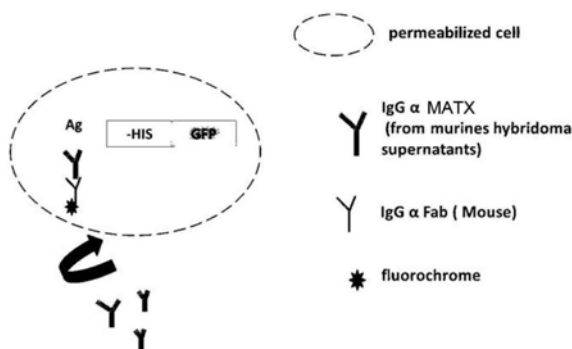
权利要求书2页 说明书8页
序列表13页 附图13页

(54)发明名称

一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法

(57)摘要

本发明公开一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,包括以下步骤:(1)抗原表达及纯化,所述抗原包括免疫抗原、筛选抗原、流式筛选抗原;(2)小鼠免疫,筛选效价高的小鼠做细胞融合;(3)预实验处理,获取通透处理的细胞,所述细胞可表达MATX-GFP-His蛋白;(4)细胞融合和筛选;(5)亚克隆;(6)抗体生产。通过预实验设计确定二抗来源及其工作浓度,以简化操作,避免筛选过程中的背景干扰,减少工作量,提高工作效率,筛选周期短,适应于流式细胞术抗体的快速筛选。



1. 一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 抗原表达及纯化,所述抗原包括免疫抗原、筛选抗原、流式筛选抗原;所述抗原含有MATX的cDNA基因序列,所述cDNA的基因序列如序列表SEQ ID NO.1所示;

(2) 小鼠免疫,筛选效价高的小鼠做细胞融合;

(3) 预实验处理,获取通透处理的细胞,所述细胞可表达MATX-GFP-His蛋白,所述MATX-GFP-His蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.2所示;

(4) 细胞融合和筛选;

(5) 亚克隆;

(6) 抗体生产。

2. 如权利要求1所述的一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,其特征在于,所述步骤(1)的具体步骤为:

A、免疫抗原表达及纯化:将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶NcoI和XhoI双酶切定向插入到E.coli pT7质粒中,得到免疫抗原表达载体质粒,将所述免疫抗原表达载体质粒转入大肠杆菌进行表达获得免疫抗原蛋白,并过镍柱纯化免疫抗原蛋白,所述免疫抗原载体质粒的N末端带His标签,所述免疫抗原载体质粒的碱基序列如序列表SEQ ID NO.3所示;

B、筛选抗原表达及纯化:将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶EcoRI和XhoI双酶切定向插入pATX1质粒中,得到质粒pATX1-6His-MATX,将质粒pATX1-6His-MATX转入哺乳动物细胞表达获得筛选抗原蛋白,并过镍柱纯化筛选抗原蛋白,所述质粒pATX1-6His-MATX的N末端带His标签和Kozak片段,所述质粒pATX1-6His-MATX的碱基序列如序列表SEQ ID NO.4所示;

C、流式筛选抗原表达及纯化:将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶EcoRI和XhoI双酶切定向插入到pATX1-GFP质粒中,得到质粒pATX1-GFP-6His-MATX,然后转入哺乳动物细胞表达获得流式筛选抗原蛋白,所述流式筛选抗原蛋白氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.5所示,所述pATX1-GFP-6His-MATX质粒的N末端带His标签、GFP标签、Kozak片段;

其中,所述免疫抗原蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.6所示,所述筛选抗原蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.7所示。

3. 如权利要求1所述的一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,其特征在于,步骤(2)具体步骤为,将步骤(1)中获得的抗原对小鼠进行免疫,并进行elisa效价和流式检测筛选小鼠做细胞融合。

4. 如权利要求1所述的一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,其特征在于,步骤(3)包括预实验一和预实验二,所述预实验一用于确定二抗选择及最适工作浓度,所述预实验二用以验证二抗最适工作浓度及流式细胞仪检测参数设定,所述二抗包括Jackson抗体和Immunoreagent抗体。

5. 如权利要求4所述的一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,其特征在于,所述预实验一的具体步骤为:

a、转染:A组利用质粒pATX1-6His-MATX转染293F细胞,平均分布到96孔板中,分成两排,每孔细胞数为 5×10^5 个,第一排的细胞:一抗为anti-His抗体,二抗为JACKSON抗体;第二排的细胞:一抗为anti-His抗体,二抗为Immunogent抗体;二抗均带有APC荧光标签,同时

设置B组空载的细胞为阴性对照,平均分布到96孔板,分成两孔,每孔细胞数为 5×10^5 个;

b、一抗染色,孵育,离心300g,5min,去上清;阴性对照进行PFA孵育:每孔加入4%PBS-PFA 100 μ l,4 $^{\circ}$ C,孵育20min,离心300g,5min,去上清,加入300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min;一抗稀释度为1:100,每孔加入100 μ l PBS-BSA+Saponin和1 μ l一抗,重悬;阴性对照不加任何溶液;4 $^{\circ}$ C,孵育30min;300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min,4 $^{\circ}$ C;洗涤之后,加入100 μ l二抗重悬,二抗稀释;

c、二抗染色,孵育:分别设置不同浓度、不同来源二抗的平行组:

Jackson抗体:稀释度分别为1:100,1:500 and 1:800,缓冲液PBS-BSA+Saponin;

Immunoreagent抗体:稀释度分别为1:20,1:500,1:1000,1:2000,缓冲液PBS-BSA+Saponin;

4 $^{\circ}$ C孵育30min,避光;300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min,去上清,200 μ l PBS-PFA将沉淀重悬;

d、流式上机检测:细胞重悬后,进行流式检测。

6.如权利要求4所述的一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,其特征在于,所述预实验二的具体步骤为:

一、转染:利用质粒pATX1-6His-MATX和质粒pATX1-GFP-6His-MATX分别转染293F细胞,同时设置空载细胞作为阴性对照;将转染的细胞混悬液平均分到2板96孔板中,其中:空载细胞:板1,2孔,每孔 5×10^5 个细胞,板2,1孔,每孔 5×10^6 个细胞;转染pATX1-6His-MATX质粒的细胞:板1,1孔加入 5×10^5 个细胞;板2,1孔,加入 1×10^6 个细胞;转染pATX1-eGFP-6His MATX质粒的细胞:板1,每孔 5×10^5 个细胞,共4孔,板2,1孔, 1×10^6 个细胞;

二、流式染色:将上述步骤一中培养的细胞进行离心300g,5min,弃上清;每孔加入4%PBS-PFA 100 μ l,4 $^{\circ}$ C,孵育30min,离心300g,5min,去上清,加入300 μ l PBS-BSA+Saponin,离心300g,5min,洗2次;洗涤后,弃上清,准备稀释浓度为100-200倍的检测细胞内抗原的一抗,即100 μ l PBS-BSA+Saponin加1 μ l,加入一抗,每孔100 μ l,4 $^{\circ}$ C,孵育30min,300 μ l PBS-BSA+Saponin,5min,300g,4 $^{\circ}$ C,洗2次,弃上清,加入优化后的二抗,每孔100 μ l;避光,4 $^{\circ}$ C,孵育30min;300 μ l PBS-BSA+Saponin,5min,300g,4 $^{\circ}$ C,洗2次,300g,4 $^{\circ}$ C,离心5min,弃上清,200 μ l PBS-PFA重悬细胞,上机检测。

7.如权利要求1所述的一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,其特征在于,所述步骤(4)具体为:①将步骤(2)筛选出的小鼠进行细胞融合培养,离心,获取杂交瘤上清,所述杂交瘤上清含有抗MATX抗体;②将步骤(3)通透处理的细胞和所述含有抗MATX抗体的杂交瘤上清进行孵育;③用红色荧光标记的二抗检测抗MATX的抗体。

一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法

技术领域

[0001] 本发明属于流式抗体筛选领域,具体涉及一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法。

背景技术

[0002] 流式细胞术(Flow Cytometry, FCM):是一种对液流中排成单列的细胞或其它生物微粒(如微球,细菌,小型模式生物等)逐个进行快速定量分析和分选的技术。流式细胞术具有速度快、精度高、准确性好等优点,是非常先进的细胞定量分析技术。该技术被广泛的应用于细胞生物学、免疫学、血液学、肿瘤学、药理学、遗传学及临床检验等多个领域,如细胞周期、细胞凋亡、细胞活力的检测,淋巴细胞亚群与疾病的关系研究,器官移植后的免疫学监测,肿瘤的特异性指标的检测,药物作用机制研究,筛选新药等等。随着流式细胞术应用领域的日益广泛,流式抗体及荧光标记产品的种类、数量也在不断增多,加上多色分析实验方案需求的增长,对抗体的流式细胞术的应用要求日趋增加。目前各大商业抗体公司开发抗体主要以wb, IF, IHC应用为主,而流式细胞仪操作繁琐,仪器维护昂贵,筛选通量限制的因素,极大限制了抗体流式应用的开发。

[0003] 申请号为CN201810143471.6的专利公开了一种利用流式细胞分选筛选纳米抗体的方法,所述方法步骤包括:(1)收集被免疫靶抗原的骆驼科动物的外周血B淋巴细胞;(2)应用靶抗原通过流式细胞术分选所述B淋巴细胞为单细胞;(3)将分选好的单个B淋巴细胞直接进行逆转录反应生成cDNA;(4)以cDNA为模板,PCR扩增抗体重链序列并回收扩增产物;(5)以步骤(4)扩增产物为模板,PCR扩增抗体的CH1与CH2序列编码基因;(6)以步骤(5)扩增为阴性的步骤(4)扩增产物为模板,PCR扩增抗体的VHH片段编码基因;(7)将步骤(6)获得的VHH片段克隆入表达载体,并在宿主菌中表达所述VHH片段;(8)鉴定步骤(7)表达的纳米抗体,但是这种方法较为复杂,且需要建立库容高、多样性丰富的抗体文库,易造成噬菌体污染。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对现有技术存在的问题,提供一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0006] 一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 抗原表达及纯化,所述抗原包括免疫抗原、筛选抗原、流式筛选抗原;所述抗原含有MATX的cDNA基因序列,所述cDNA的基因序列如序列表SEQ ID NO.1所示;

[0008] (2) 小鼠免疫,筛选效价高的小鼠做细胞融合;

[0009] (3) 预实验处理,获取通透处理的细胞,所述细胞可表达MATX-GFP-His蛋白;所述MATX-GFP-His蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.2所示;

[0010] (4) 细胞融合和筛选;

[0011] (5) 亚克隆;

[0012] (6) 抗体生产。

[0013] 进一步的,所述步骤(1)的具体步骤为:

[0014] A、免疫抗原表达及纯化:将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶NcoI和XhoI双酶切定向插入到E.coli pT7质粒中,得到免疫抗原表达载体质粒,将所述免疫抗原表达载体质粒转入大肠杆菌进行表达获得免疫抗原蛋白,并过镍柱纯化免疫抗原蛋白,所述免疫抗原载体质粒的N末端带His标签,所述免疫抗原载体质粒的碱基序列如序列表SEQ ID NO.3所示;

[0015] B、筛选抗原表达及纯化:将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶EcoRI和XhoI双酶切定向插入pATX1质粒中,得到质粒pATX1-6His-MATX,将质粒pATX1-6His-MATX转入哺乳动物细胞表达获得筛选抗原蛋白,并过镍柱纯化筛选抗原蛋白,所述质粒pATX1-6His-MATX的N末端带His标签和Kozak片段,所述质粒pATX1-6His-MATX的碱基序列如序列表SEQ ID NO.4所示;

[0016] C、流式筛选抗原表达及纯化:将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶EcoRI和XhoI双酶切定向插入到pATX1-GFP质粒中,得到质粒pATX1-GFP-6His-MATX,然后转入哺乳动物细胞表达获得流式筛选抗原蛋白,所述流式筛选抗原蛋白氨基酸序列如序列表7所示,所述pATX1-GFP-6His-MATX质粒的N末端带His标签、GFP标签、Kozak片段;

[0017] 其中,所述免疫抗原蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.6所示,所述流式筛选抗原蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.7所示。

[0018] 进一步的,步骤(2)具体步骤为,将步骤(1)中获得的抗原对小鼠进行免疫,并进行elisa效价和流式检测筛选小鼠做细胞融合。

[0019] 进一步的,步骤(3)包括预实验一和预实验二,所述预实验一用于确定二抗选择及最适工作浓度,所述预实验二用以验证二抗最适工作浓度及流式细胞仪检测参数设定,所述二抗包括Jackson抗体和Immunoreagent抗体。

[0020] 进一步的,所述预实验一的具体步骤为:

[0021] a、转染:A组利用质粒pATX1-6His-MATX转染293F细胞,平均分布到96孔板中,分成两排,每孔细胞数为 5×10^5 个,第一排的细胞:一抗为anti-His抗体,二抗为JACKSON抗体;第二排的细胞:一抗为anti-His抗体,二抗为Immunogent抗体;二抗均带有APC荧光标签,同时设置B组空载的细胞为阴性对照,平均分布到96孔板,分成两孔,每孔细胞数为 5×10^5 个;

[0022] b、一抗染色,孵育,离心300g,5min,去上清;阴性对照进行PFA孵育:每孔加入4% PBS-PFA 100 μ l,4 $^{\circ}$ C,孵育20min,离心300g,5min,去上清,300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min;一抗稀释度为1:100,每孔加入100 μ l PBS-BSA+Saponin和1 μ l一抗,重悬;阴性对照不加任何溶液;4 $^{\circ}$ C,孵育30min;300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min,4 $^{\circ}$ C;洗涤之后,加入100 μ l二抗重悬,二抗稀释;

[0023] c、二抗染色,孵育:分别设置不同浓度、不同来源二抗的平行组:

[0024] Jackson抗体:稀释度分别为1:100,1:500and 1:800,缓冲液PBS-BSA+Saponin;

[0025] Immunoreagent抗体:稀释度分别为1:20,1:500,1:1000,1:2000,缓冲液PBS-BSA+Saponin;

[0026] 4 $^{\circ}$ C孵育30min,避光;300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min,去上

清,200 μ l PBS-PFA将沉淀重悬;

[0027] d、流式上机检测:细胞重悬后,进行流式检测。

[0028] 进一步的,所述预实验二的具体步骤为:

[0029] 一、转染:利用质粒pATX1-6His-MATX和质粒pATX1-GFP-6His-MATX分别转染293F细胞,同时设置空载细胞作为阴性对照;将转染的细胞混悬液平均分到2板96孔板中,其中:空载细胞:板1,2孔,每孔 5×10^5 个细胞,板2,1孔,每孔 5×10^6 个细胞;转染pATX1-6His-MATX质粒的细胞:板1,1孔加入 5×10^5 个细胞;板2,1孔,加入 1×10^6 个细胞;转染pATX1-eGFP-6His MATX质粒的细胞:板1,每孔 5×10^5 个细胞,共4孔,板2,1孔, 1×10^6 个细胞;

[0030] 二、流式染色:将上述步骤一中培养的细胞进行离心300g,5min,弃上清;每孔加入4%PBS-PFA 100 μ l,4 $^{\circ}$ C,孵育30min,离心300g,5min,去上清,加入300 μ lPBS-BSA+Saponin,离心300g,5min,洗2次;洗涤后,弃上清,准备稀释浓度为100-200倍的检测细胞内抗原的一抗,即100 μ l PBS-BSA+Saponin加1 μ l,加入一抗,每孔100 μ l,4 $^{\circ}$ C,孵育30min,300 μ l PBS-BSA+Saponin,5min,300g,4 $^{\circ}$ C,洗2次,弃上清,加入优化后的二抗,每孔100 μ l;避光,4 $^{\circ}$ C,孵育30min;300 μ l PBS-BSA+Saponin,5min,300g,4 $^{\circ}$ C,洗2次,300g,4 $^{\circ}$ C,离心5min,弃上清,200 μ l PBS-PFA重悬细胞,上机检测。

[0031] 所述步骤(4)具体为:①将步骤(2)筛选出的小鼠进行细胞融合培养,离心,获取杂交瘤上清,所述杂交瘤上清含有抗MATX抗体,所述抗MATX抗体的氨基酸序列如序列表2所示;②将步骤(3)通透处理的细胞和所述含有抗MATX抗体的杂交瘤上清进行孵育;③用红色荧光标记的二抗检测抗MATX的抗体。

[0032] 本发明在筛选流式抗体之前,进行2步预实验,分别对二抗的工作浓度进行摸索、验证和流式细胞仪的参数进行设置;在预实验开始之前,构建带有目的蛋白基因,His标签和GFP标签的质粒,转染293F细胞系,在进行抗体筛选时,一抗将会被杂交瘤上清替代,而二抗在预实验和抗体筛选过程中相同,FACS的通道参数优化后,检测参数将被保存,杂交瘤上清筛选时可以调用相关程序,通过预实验简化步骤,确定二抗选择及流式细胞术参数的设置,减少了筛选过程中的干扰背景,提高了工作效率。

[0033] 序列表SEQ ID NO.2中目的蛋白MATX的氨基酸序列包含SEC14结构域aa93~234;MSP结构域aa327~431;TM结构域aa497~517;其中TM结构域将被去除,在蛋白表达和流式筛选过程中,这一段会被去掉。去掉TM结构域之后的蛋白氨基酸序列如序列表SEQ IDNO.8所示。

[0034] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0035] 1、在筛选抗体之前进行预实验确定二抗来源及流式细胞术参数设定,简化步骤,避免筛选过程中的干扰背景;

[0036] 2、提高工作效率,减少工作量,筛选周期短,适应于流式细胞术抗体的快速筛选。

附图说明

[0037] 图1为本发明实验组抗体染色加样流程图;

[0038] 图2为本发明阴性对照组染色加样流程图;

[0039] 图3为各样本的抗体染色流程图;

[0040] 图4-图6分别为0.5 μ l抗His抗体加上100倍、1000倍、2000倍稀释的Immunoreagent

的羊抗鼠二抗的流式检测结果；

[0041] 图7-图9分别为0.5ul抗His抗体加上100倍、1000倍、2000倍稀释的Jackson的羊抗鼠二抗的流式检测结果；

[0042] 图10为样本1-A先加抗0.5ul的抗GFP的抗体孵育，再加Immunoreagent的羊抗鼠二抗的流式检测结果；

[0043] 图11为样本1-B先加抗0.5ul的His的抗体孵育，再加Immunoreagent的羊抗鼠二抗的流式检测结果；

[0044] 图12为样本3，阳性对照，上机读取GFP荧光的流式检测结果；

[0045] 图13为样本4，阴性对照，非转染细胞的流式检测结果；

[0046] 图14为样本5，空白对照，不加一抗，只加入荧光二抗的流式检测结果；

[0047] 图15为样本6，空白对照，非转染细胞直接加入荧光二抗后的流式检测结果；

[0048] 图16为3号小鼠第四次免疫之后，血清检测转染细胞的流式检测结果；

[0049] 图17为细胞融合亚克隆筛选得到的#56抗体检测转染细胞的流式检测结果；

[0050] 图18为二抗染色融合蛋白的流程图；

[0051] 图4-图17中：P1代表待分析的活细胞群；P2代表非转染GFP标签蛋白的细胞群；P3代表转染带有GFP标签的细胞群；P4代表未转染质粒的阴性对照；P5代表转染有目的质粒的阳性样本。

具体实施方式

[0052] 下面将结合本发明中的附图，对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动条件下所获得的所有其它实施例，都属于本发明保护的范围。

[0053] 实施例1：

[0054] 一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法，主要包括以下步骤：

[0055] (1) 抗原表达及纯化，所述抗原包括免疫抗原、筛选抗原、流式筛选抗原；

[0056] (2) 动物免疫，确定做细胞融合的小鼠；

[0057] (3) 预实验处理，获取通透处理的细胞，所述细胞可表达MATX-GFP-His蛋白；

[0058] (4) 细胞融合和筛选；

[0059] (5) 亚克隆；

[0060] (6) 抗体生产。

[0061] 第一步、抗原合成及纯化：

[0062] 免疫抗原表达及纯化：将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶NcoI和XhoI双酶切定向插入到E.coli pT7质粒中，得到免疫抗原表达载体质粒，将所述免疫抗原表达载体质粒转入大肠杆菌进行表达获得免疫抗原蛋白，并过镍柱纯化免疫抗原蛋白，所述免疫抗原载体质粒的N末端带His标签，所述免疫抗原载体质粒的碱基序列如序列表SEQ ID NO.3所示；

[0063] B、筛选抗原表达及纯化：将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶EcoRI和XhoI双酶切定向插入pATX1质粒中，得到质粒pATX1-6His-MATX，将质粒pATX1-6His-MATX转入哺

乳动物细胞表达获得筛选抗原蛋白,并过镍柱纯化筛选抗原蛋白,所述质粒pATX1-6His-MATX的N末端带His标签和Kozak片段,所述质粒pATX1-6His-MATX的碱基序列如序列表SEQ ID NO.4所示;

[0064] C、流式筛选抗原表达及纯化:将MATX的cDNA基因序列利用限制性内切酶EcoRI和XhoI双酶切定向插入到pATX1-GFP质粒中,得到质粒pATX1-GFP-6His-MATX,然后转入哺乳动物细胞表达获得流式筛选抗原蛋白,所述流式筛选抗原蛋白氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.5所示,所述pATX1-GFP-6His-MATX质粒的N末端带His标签、GFP标签、Kozak片段;

[0065] 其中,所述免疫抗原蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.6所示,所述流式筛选抗原蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.7所示。

[0066] 第二步,小鼠免疫:

[0067] 免疫5只小鼠,共免疫四次,每次间隔2周,每只每次免疫25ug~100ug。第四次免疫后眼静脉采血,检测elisa效价和流式检测。

[0068] Elisa效价检测:

[0069]

包被抗原	稀释比例	小鼠 1	小鼠 2	小鼠 3	小鼠 4	小鼠 5
Human MATX1 (5 μ g/ml)	1000	2.648	1.456	2.117	2.8	2.377
	2000	1.721	0.732	1.301	1.945	1.535
	4000	1.113	0.434	0.794	1.227	0.867
	8000	0.65	0.252	0.478	0.753	0.529
	16000	0.387	0.156	0.29	0.443	0.326
	32000	0.219	0.097	0.177	0.251	0.183
	64000	0.153	0.064	0.105	0.157	0.121

[0070] 3号小鼠第四次免疫之后,血清检测转染细胞的流式检测结果如图16所示。

[0071] 第三步:流式细胞术检测预实验

[0072] 预实验1:优化二抗工作浓度

[0073] 主要目的:购买2中商业化二抗(分别来自Jackson和Immunoreagent),比较两种二抗的灵敏度并优化二抗工作浓度。根据实验需要,分别设置六种样本:(1)样本1为转染质粒的细胞系,一抗anti-GFP,二抗带有APC荧光标签的二抗;

[0074] (2)样本2为转染质粒的细胞系,一抗anti-His,二抗带有APC荧光标签的二抗;

[0075] (3)样本3为转染质粒的细胞系,不进行抗体孵育,自带GFP荧光蛋白;

[0076] (4)样本4为空载质粒,不进行抗体孵育;

[0077] (5)样本5为转染质粒的细胞系,二抗为带有APC荧光标签的二抗;

[0078] (6)样本6为空载质粒,二抗为带有APC荧光标签的二抗;

[0079] 其中,利用样本1,2,3,4进行二抗工作浓度的优化;二抗工作浓度优化后,利用5,6进行二抗工作浓度的验证和流式细胞仪检测参数的设置,主要利用样本2和样本4进行试验筛选优化,实验组即样本2和样本4的抗体染色加样流程如图1,阴性对照组抗体染色加样流

程如图2。

[0080] (1) 转染

[0081] 按照标准操作,转染 6.5×10^6 个293F细胞,质粒为pATX1-6His-MATX;

[0082] 按照同样操作,设置空载的细胞为阴性对照,细胞数量 2×10^6 个;

[0083] 流式筛选时,将每组细胞平均分布到96孔板中,

[0084] 其中, 2×10^6 (空载阴性对照细胞) 平均分布到2孔,每孔细胞数为 5×10^5 个;

[0085] 6.5×10^6 (转染pATX1-6His-MATX) 的细胞平均分布到2排,每孔细胞数为 5×10^5 个

[0086] (2) 一抗染色,孵育

[0087] 对2孔阴性对照进行固定,不进行染色处理。

[0088] 第一排的细胞:1抗为anti-His抗体,二抗为JACKSON抗体

[0089] 第二排的细胞:1抗为anti-His抗体,二抗为Immunoreagent抗体

[0090] 离心300g,5min,去上清;

[0091] PFA孵育(固定):每孔加入4%PBS-PFA 100 μ l,4 $^{\circ}$ C,孵育20min,离心300g,5min,去上清(含有PFA);

[0092] 加入300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min;

[0093] 一抗稀释度为1:100,每孔加入100 μ l PBS-BSA+Saponin和1 μ l一抗,重悬;阴性对照不加任何溶液;4 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0094] 加入300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min,4 $^{\circ}$ C;洗涤之后,加入100 μ l二抗重悬,二抗稀释。

[0095] 表1两种浓度anti-His一抗,2种抗体品牌,4种二抗浓度下,二抗筛选阳性细胞所占GFP标签阳性细胞的比例:

[0096]

	Immunoreagent				Jackson			
	100	1000	2000	5000	100	1000	2000	5000
Anti-his: 1:200	90.91%	40.29%	17.05%	2.18%	98.65%	63.48%	44.45%	5.27%
Anti-his: 1: 100	95.33%	57.02%	17.74%	3.71%	99.06%	72.62%	33.47%	6.67%

[0097] 在一抗浓度1:100稀释比例下,二抗选择为Jackson,最佳稀释浓度为1:100,该条件下,筛选得到的阳性细胞所占GFP标签阳性细胞的比例为99.06%。

[0098] (3) 二抗染色,孵育

[0099] 分别设置不同浓度、不同来源二抗的平行组:

[0100] Jackson:稀释度分别为1:100,1:500,1:800,缓冲液PBS-BSA+Saponine;

[0101] Immunoreagent:稀释度分别为1:20,1:500,1:1000,1:2000,缓冲液PBS-BSA+Saponine;4 $^{\circ}$ C孵育30min,避光;加入300 μ l PBS-BSA+Saponin,洗2次,每次离心300g,5min,4 $^{\circ}$ C;去上清,200 μ l PBS-PFA将沉淀重悬;

[0102] (4) 流式上机检测

[0103] 细胞重悬后,用排枪将96孔板中的混悬液转移到流式细胞术专用的聚苯乙烯管中,准备流式检测;

[0104] 图4-图6分别为0.5ul抗His抗体加上100倍、1000倍、2000倍稀释的Immunoreagent的羊抗鼠二抗的流式检测结果;图7-图9分别为0.5ul抗His抗体加上100倍、1000倍、2000倍稀释的Jackson的羊抗鼠二抗的流式检测结果;

[0105] 预实验二:验证二抗工作浓度及流式细胞仪检测参数设定

[0106] 主要目的:准备4种样品,

[0107] 样品1:双阳性GFP(+)/Red(+),1-A:一抗IgGαGFP,1-B:一抗IgGαHis

[0108] 样品2:单阳性Red(+)

[0109] 样品3:单阳性GFP(+)

[0110] 样品4:双阴性GFP(-)/Red(-)

[0111] 样品5,6的目的是为了验证优化后选择的二抗-PEC5。

[0112] 操作步骤

[0113] A) 转染

[0114] 根据标准操作转染带有pATX1-eGFP-6His-MATX质粒的 3.5×10^6 个细胞,转染带有pATX1-6His-MATX质粒的 3.5×10^6 个细胞

[0115] 设置阴性对照: 2×10^6 非转染的细胞

[0116] 在进行流式细胞术检测时,将转染的细胞混悬液平均分到2板96孔板中,板1:样品检测板,板2:样品储存板;

[0117] 空载对照细胞 2×10^6 个:板1,2孔,每孔 5×10^5 个细胞;板2:1孔,每孔 5×10^6 个细胞;转染pATX1-6His-MATX质粒的细胞 2×10^6 :板1,1孔加入 5×10^5 个细胞;板2,1孔,加入 1×10^6 个细胞。

[0118] 转染pATX1-eGFP-6His MATX质粒的细胞 3.5×10^6 个:板1,每孔 5×10^5 个细胞,共4孔,板2,1孔, 1×10^6 个细胞。

[0119] B) 流式染色

[0120] 样本1-A,一抗anti-GFP,优化后的带有APC荧光素的二抗;图10为样本1-A先加抗0.5ul的抗GFP的抗体孵育,再加Immunoreagent的羊抗鼠二抗的流式检测结果;

[0121] 样本1-B和样本2,一抗anti-His,二抗为优化工作浓度的带有APC荧光素的二抗;图11为样本1-B先加抗0.5ul的His的抗体孵育,再加Immunoreagent的羊抗鼠二抗的流式检测结果;

[0122] 样本3和4,不做染色处理;图12为样本3,阳性对照,上机读取GFP荧光的流式检测结果;图13为样本4,阴性对照,非转染细胞的流式检测结果;

[0123] 样本5和6,二抗为优化后的带有APC荧光素的二抗;图14为样本5,空白对照,不加一抗,只加入荧光二抗的流式检测结果;图15为样本6,空白对照,非转染细胞直接加入荧光二抗后的流式检测结果;

[0124] 各样本的抗体染色流程如图3所示;

[0125] 离心300g,5min,弃上清;PFA固定:每孔加入4%PBS-PFA 100μl,4℃,孵育30min,离心300g,5min,弃上清;加入300μl PBS-BSA+Saponin,离心300g,5min,洗2次,同时准备样本1-A和1-B的一抗,一抗稀释浓度为100~200倍,即100μlPBS-BSA+Saponin加1ul抗体。

[0126] 洗涤结束之后,弃上清,加入1-A和1-B的一抗到细胞样本1-A和1-B中,每孔100ul。4℃,孵育30min;加入300μl PBS-BSA+Saponin,5min,300g,4℃,洗2次;同时准备优化后的二抗,每孔100ul,稀释浓度根据之前的预实验确定,在优化后的二抗使用工作浓度下,样本1A的P5的阳性细胞群占P3的比例为90.93%;样本1B P5的阳性细胞群占P3的比例为71.20%;样本3和4作为阴性对照,样本5,6为空白对照。

[0127] 洗涤结束之后,弃上清,加入预先准备的二抗(样本1,2,5,6中加入)。避光,4℃,孵育30min。加入300μl PBS-BSA+Saponin,离心300g,5min,4℃,洗2次,300g,4℃,离心5min,弃上清,加入200μl PBS-PFA重悬细胞样本,用排枪将细胞混悬液转移到流式检测管中,准备上机检测。

[0128] 第四步:免疫动物血清流式细胞术检测

[0129] 筛选得到的阳性细胞群P5占转染细胞阳性细胞群P3的比例如下表:

[0130]

	阳性对照	小鼠1	小鼠2	小鼠3	小鼠4	小鼠5
P5/P3	63%	29%	51%	48%	48%	32%

[0131] 第五步:细胞融合

[0132] 根据ELISA效价检测结果和流式细胞术检测结果,选择小鼠3进细胞融合培养,离心,获取含有抗MATX抗体的杂交瘤上清。

[0133] 第六步:克隆上清筛选

[0134] (1) 将预实验中通透处理的细胞和含有抗MATX抗体的杂交瘤上清进行孵育。

[0135] (2) 用红色荧光标记的二抗检测抗MATX的抗体。

[0136] 如图18所示,转染有MATX-GFP-His基因的细胞表达MATX-GFP-His的蛋白,该细胞经过通透处理之后,细胞膜打开,抗MATX的抗体(此阶段的抗体是由小鼠杂交瘤细胞产生的)进入细胞,与MATX-GFP-His蛋白结合之后,加入荧光标记的羊抗鼠IgG二抗,该二抗可以和抗MATX的抗体发生特异性结合,从而带上阳性荧光信号。

[0137] 依据前面建立的流式筛选步骤和参数设置,对细胞融合后的elisa阳性上清进行流式筛选,筛选得到的阳性克隆进行亚克隆,亚克隆3次,最后建株。

[0138] 第七步:建株生产并验证

[0139] 建株3株,纯化后得到抗体,检测流式,结果如下:

[0140]

	阳性对照	79-20-20	80-21-15	68-4-5
P5/P3	63%	86.22%	79.84%	72.34%

[0141] 图17为细胞融合亚克隆筛选得到的#56抗体检测转染细胞的流式检测结果;

[0142] 实验条件:1) 抗体稀释浓度,1:200;2) 一抗anti-GFP阳性对照1:200;3) 二抗工作浓度:1:100。

[0143] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

序列表

<110> 普健生物武汉科技有限公司

<120> 一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法

<130> 1

<160> 8

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1545

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

gaattcgccg ccaccatggg gtetccaccat caccatcacc actccggaat ggcagaaaac 60
cacgcacaaa acaaggccaa gctgatctcc gagactagac gcagattcga ggcagaatac 120
gtgaccgata agtccgataa gtacgacgct agagacgtgg aaaggcttca gcaggacgac 180
aactgggtcg aatcttacct ctcttgagga cataacatcg tcgacgagac ccttaagatg 240
ctcgacgaga gcttccagtg gaggaaggaa atctccgtga acgacctcaa cgagagctcc 300
atcccaaggt ggcttctgga aatcggagtc atctacctcc acggatacga caaggagggg 360
aacaagctct tctggatcag ggtcaagtac cacgtgaagg accagaagac catccttgac 420
aagaaaaaac tcatcgccct ctggctggag aggtacgcta agagggaaaa cgggaagcct 480
gtcaccgtga tgttcgacct ctctgaaacc ggaatcaact ccatcgacat ggacttcgtc 540
aggttcatca tcaactgctt caaggtgtac taccctcaagt acctctccaa gatcgtgac 600
ttcgacatgc cttggctgat gaacgccgcc ttcaagattg tgaagacctg gctcgggcct 660
gaggccgtct ctctcttgaa gttcacctcc aagaacgagg tgcaggatta cgtgagcgtg 720
gagtacctgc ctctcacat gggcgggaca gatcctttta agtactccta ccctccactc 780
gtcgtatgacg acttccagac cccactgtgc gagaacggcc caattacctc agaggatgag 840
acctcatcaa aggaggatat tgagtccgat gggaaggaga ccctggagac tattagcaac 900
gaggagcaga ctccccctgct gaagaagatt aacccacag agagcacatc caaggctgag 960
gagaacgaga aggtcgatag caaggtgaag gcctttaaga agcccctgtc cgtgtttaag 1020
ggccccctgc tgcacatttc ccagctgaa gattgtgatt ttgggagcac tgagagcggc 1080
gagaagaaga cactgattgt gctgacaaac gtgactaaga acattgtggc ctttaaggtg 1140
cggacaactg ccccgagaa gtatcgggtc aaaccagca acagcagctg cgatccaggc 1200
gccagcgtcg atattgtcgt cagccacac ggcggttga cagtgtcagc ccaagatagg 1260
tttctgatta tggccgccga gatggagcag agtagtgga cagggccgc cgagttgaca 1320
cagttttgga aagaggtgcc ccggaataaa gtgatggagc accggttgcg ctgtcacaca 1380
gtggagagta gtaaaccctaa tacattgact ctgaaagata acgcctttaa catgagcgat 1440
aaaacaagcg aggatatttg cctgcagctg agccggctgc tggagagcaa ccggaaactg 1500
gaggatcagg tgcagcgggtg catttggttt cagcagtaac tcgag 1545

```

<210> 2

<211> 518

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

Met Ala Glu Asn His Ala Gln Asn Lys Ala Lys Leu Ile Ser Glu Thr
1           5           10           15
Arg Arg Arg Phe Glu Ala Glu Tyr Val Thr Asp Lys Ser Asp Lys Tyr
          20           25           30
Asp Ala Arg Asp Val Glu Arg Leu Gln Gln Asp Asp Asn Trp Val Glu
          35           40           45
Ser Tyr Leu Ser Trp Arg His Asn Ile Val Asp Glu Thr Leu Lys Met
          50           55           60
Leu Asp Glu Ser Phe Gln Trp Arg Lys Glu Ile Ser Val Asn Asp Leu
65           70           75           80
Asn Glu Ser Ser Ile Pro Arg Trp Leu Leu Glu Ile Gly Val Ile Tyr
          85           90           95
Leu His Gly Tyr Asp Lys Glu Gly Asn Lys Leu Phe Trp Ile Arg Val
          100          105          110
Lys Tyr His Val Lys Asp Gln Lys Thr Ile Leu Asp Lys Lys Lys Leu
          115          120          125
Ile Ala Phe Trp Leu Glu Arg Tyr Ala Lys Arg Glu Asn Gly Lys Pro
          130          135          140
Val Thr Val Met Phe Asp Leu Ser Glu Thr Gly Ile Asn Ser Ile Asp
145          150          155          160
Met Asp Phe Val Arg Phe Ile Ile Asn Cys Phe Lys Val Tyr Tyr Pro
          165          170          175
Lys Tyr Leu Ser Lys Ile Val Ile Phe Asp Met Pro Trp Leu Met Asn
          180          185          190
Ala Ala Phe Lys Ile Val Lys Thr Trp Leu Gly Pro Glu Ala Val Ser
          195          200          205
Leu Leu Lys Phe Thr Ser Lys Asn Glu Val Gln Asp Tyr Val Ser Val
          210          215          220
Glu Tyr Leu Pro Pro His Met Gly Gly Thr Asp Pro Phe Lys Tyr Ser
225          230          235          240
Tyr Pro Pro Leu Val Asp Asp Asp Phe Gln Thr Pro Leu Cys Glu Asn
          245          250          255
Gly Pro Ile Thr Ser Glu Asp Glu Thr Ser Ser Lys Glu Asp Ile Glu
          260          265          270
Ser Asp Gly Lys Glu Thr Leu Glu Thr Ile Ser Asn Glu Glu Gln Thr

```

275	280	285
Pro Leu Leu Lys Lys Ile Asn Pro Thr Glu Ser Thr Ser Lys Ala Glu		
290	295	300
Glu Asn Glu Lys Val Asp Ser Lys Val Lys Ala Phe Lys Lys Pro Leu		
305	310	315
Ser Val Phe Lys Gly Pro Leu Leu His Ile Ser Pro Ala Glu Glu Leu		
325	330	335
Tyr Phe Gly Ser Thr Glu Ser Gly Glu Lys Lys Thr Leu Ile Val Leu		
340	345	350
Thr Asn Val Thr Lys Asn Ile Val Ala Phe Lys Val Arg Thr Thr Ala		
355	360	365
Pro Glu Lys Tyr Arg Val Lys Pro Ser Asn Ser Ser Cys Asp Pro Gly		
370	375	380
Ala Ser Val Asp Ile Val Val Ser Pro His Gly Gly Leu Thr Val Ser		
385	390	395
Ala Gln Asp Arg Phe Leu Ile Met Ala Ala Glu Met Glu Gln Ser Ser		
405	410	415
Gly Thr Gly Pro Ala Glu Leu Thr Gln Phe Trp Lys Glu Val Pro Arg		
420	425	430
Asn Lys Val Met Glu His Arg Leu Arg Cys His Thr Val Glu Ser Ser		
435	440	445
Lys Pro Asn Thr Leu Thr Leu Lys Asp Asn Ala Phe Asn Met Ser Asp		
450	455	460
Lys Thr Ser Glu Asp Ile Cys Leu Gln Leu Ser Arg Leu Leu Glu Ser		
465	470	475
Asn Arg Lys Leu Glu Asp Gln Val Gln Arg Cys Ile Trp Phe Gln Gln		
485	490	495
Leu Leu Leu Ser Leu Thr Met Leu Leu Leu Ala Phe Val Thr Ser Phe		
500	505	510
Phe Tyr Leu Leu Tyr Ser		
515		

<210> 3

<211> 1532

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

ccatgggtag ccatcatcac catcaccaca gcggtatggc agaaaaccat gctcaaaaca 60
aagcaaaact gatcagcgag actcgtcgcc gcttcgaagc agaatacgta accgacaaga 120
gcgacaagta cgacgcacgt gatgttgaac gtctgcaaca agacgataac tgggtagaat 180

cttacctgtc ctggcgatcat aacatcgtag acgaaactct gaagatgctg gacgaatctt 240
 tccagtggcg taaggaaatc tccgtcaacg acctgaacga aagcagcatc cctcggtggc 300
 tgctggaaat tgggtgtatc tacctgcacg gttatgacaa ggaaggtaac aagctgttct 360
 ggatccgtgt caagtaccac gtcaaggacc agaaaactat cctggacaaa aagaagctga 420
 tcgccttctg gctggagcgt tacgcaaac gtgagaacgg taaaccagt accgtcatgt 480
 tcgacctgtc tgaaactggg atcaactcca tcgacatgga cttcgtccgt ttcacatca 540
 actgcttcaa agtgtactac ccgaaatacc tgagcaaaat cgtgatcttc gacatgccgt 600
 ggctgatgaa cgcgcccttc aaaatcgtga aaacctggct gggccctgaa gctgtgtctc 660
 tgctgaaatt cacctctaaa aacgaggtgc aggactacgt gtctgtggaa tatctgccgc 720
 cacacatggg tggactgat ctttcaaat attcctatcc gccgctgggt gatgacgatt 780
 tccagactcc actgtgtgaa aacggtccaa tctactagca agacgaaact tcttccaaag 840
 aggatatcga gtccgatggc aaagagacc tggaactat cagcaacgag gagcagacc 900
 cgctgctgaa aaaaattaac ccgaccgaaa gcacctctaa agctgaagag aacgagaaag 960
 tagattccaa agtaaaagcg ttcaaaaaac cgctgagcgt tttcaaaggc ccgctgctgc 1020
 acattagccc ggcggaagaa ctgtattttg gctccaccga aagcggtgaa aaaaaaccc 1080
 tgattgttct gaccaacgtt acgaaaaaca ttgttgctgt taaagttcgt acgaccgcc 1140
 cggaataata tcgcgttaaa ccgtccaact cctcctgcga tccgggcgcg tccgtagata 1200
 ttgtagtctc cccgcacggc ggcttgacgg tttctgctca ggatcgtttt ctgattatgg 1260
 ctgctgaaat ggaacagtct tctggcaccg gcccggcgga actgaccag ttttgaaag 1320
 aagttccgcg taataaagtt atggaacacc gtctgcgctg tcacaccgtt gaattcttcta 1380
 aaccgaatac cctgaccctg aaagataatg cgtttaatat gtccgataaa acgtctgaag 1440
 atatttgcct gcagctgtct cgctgtctgg aatctaaccg caaactggaa gatcaggttc 1500
 agcgtgcat ttggtttcag cagtactcg ag 1532

<210> 4

<211> 1545

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gaattcgccg ccacctggg gtctcaccat caccatcatc actccggaat ggcagaaaac 60
 cagcacaaaa acaaggccaa gctgatctcc gagactagac gcagattcga ggcagaatac 120
 gtgaccgata agtccgataa gtacgacgct agagacgtgg aaaggcttca gcaggacgac 180
 aactgggtcg aatcttacct ctctggaga cataacatcg tcgacgagac ctttaagatg 240
 ctgacgaga gcttccagtg gaggaaggaa atctccgtga acgacctcaa cgagagctcc 300
 atcccaaggt ggcttctgga aatcggagtc atctacctc acggatacga caaggagggg 360
 aacaagctct tctggatcag ggtcaagtac cacgtgaagg accagaagac catccttgac 420
 aagaaaaaac tcatcgctt ctggctggag aggtacgcta agagggaata cggaagcct 480
 gtcaccgtga tgttcgacct ctctgaaacc ggaatcaact ccatcgacat ggacttcgtc 540
 aggttcatca tcaactgctt caaggtgtac taccacaagt acctctccaa gatcgtgatc 600
 ttcgacatgc cttggctgat gaacgccgc ttcaagattg tgaagacctg gctcgggcct 660

gaggccgtct ctctcttgaa gttcacctcc aagaacgagg tgcaggatta cgtgagcgtg 720
 gagtacctgc ctctcacat gggcgggaca gatcctttta agtactccta ccctccactc 780
 gtcgatgacg acttccagac cccactgtgc gagaacggcc caattacctc agaggatgag 840
 acctcatcaa aggaggatat tgagtccgat gggaaggaga ccctggagac tattagcaac 900
 gaggagcaga ctccccctgct gaagaagatt aacccacag agagcacatc caaggctgag 960
 gagaacgaga aggtcgatag caaggtgaag gcctttaaga agcccctgtc cgtgtttaag 1020
 ggccccctgc tgcacatttc ccagctgaa gagttgtatt ttgggagcac tgagagcggc 1080
 gagaagaaga cactgattgt gctgacaaac gtgactaaga acattgtggc ctttaaggtg 1140
 cggacaactg cccccgagaa gtatcgggtc aaaccagca acagcagctg cgatccaggc 1200
 gccagcgtcg atattgtcgt cagcccacac ggcggttga cagtgtcagc ccaagatagg 1260
 tttctgatta tggccgccga gatggagcag agtagtgga cagggccgc cgagttgaca 1320
 cagttttgga aagaggtgcc ccggaataaa gtgatggagc accggttgcg ctgtcacaca 1380
 gtggagagta gtaaacccaa tacattgact ctgaaagata acgcctttaa catgagcgat 1440
 aaaacaagcg aggatatattg cctgcagctg agccggctgc tggagagcaa ccggaactg 1500
 gaggatcagg tgcagcgggtg catttggttt cagcagtaac tcgag 1545

<210> 5

<211> 762

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu
1				5				10						15	
Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly
				20				25						30	
Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile
				35				40						45	
Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr
				50				55						60	
Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys
65				70				75						80	
Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu
				85				90						95	
Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
				100				105						110	
Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
				115				120						125	
Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
				130				135						140	
Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn

145	150	155	160
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
	165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
	180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
	195	200	205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
	210	215	220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser			
225	230	235	240
Gly Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ser Ser Phe Glu Phe Ala Ala Thr Met			
	245	250	255
Gly Ser His His His His His His Ser Gly Met Ala Glu Asn His Ala			
	260	265	270
Gln Asn Lys Ala Lys Leu Ile Ser Glu Thr Arg Arg Arg Phe Glu Ala			
	275	280	285
Glu Tyr Val Thr Asp Lys Ser Asp Lys Tyr Asp Ala Arg Asp Val Glu			
	290	295	300
Arg Leu Gln Gln Asp Asp Asn Trp Val Glu Ser Tyr Leu Ser Trp Arg			
305	310	315	320
His Asn Ile Val Asp Glu Thr Leu Lys Met Leu Asp Glu Ser Phe Gln			
	325	330	335
Trp Arg Lys Glu Ile Ser Val Asn Asp Leu Asn Glu Ser Ser Ile Pro			
	340	345	350
Arg Trp Leu Leu Glu Ile Gly Val Ile Tyr Leu His Gly Tyr Asp Lys			
	355	360	365
Glu Gly Asn Lys Leu Phe Trp Ile Arg Val Lys Tyr His Val Lys Asp			
	370	375	380
Gln Lys Thr Ile Leu Asp Lys Lys Lys Leu Ile Ala Phe Trp Leu Glu			
385	390	395	400
Arg Tyr Ala Lys Arg Glu Asn Gly Lys Pro Val Thr Val Met Phe Asp			
	405	410	415
Leu Ser Glu Thr Gly Ile Asn Ser Ile Asp Met Asp Phe Val Arg Phe			
	420	425	430
Ile Ile Asn Cys Phe Lys Val Tyr Tyr Pro Lys Tyr Leu Ser Lys Ile			
	435	440	445
Val Ile Phe Asp Met Pro Trp Leu Met Asn Ala Ala Phe Lys Ile Val			
450	455	460	

Lys Thr Trp Leu Gly Pro Glu Ala Val Ser Leu Leu Lys Phe Thr Ser			
465	470	475	480
Lys Asn Glu Val Gln Asp Tyr Val Ser Val Glu Tyr Leu Pro Pro His			
	485	490	495
Met Gly Gly Thr Asp Pro Phe Lys Tyr Ser Tyr Pro Pro Leu Val Asp			
	500	505	510
Asp Asp Phe Gln Thr Pro Leu Cys Glu Asn Gly Pro Ile Thr Ser Glu			
	515	520	525
Asp Glu Thr Ser Ser Lys Glu Asp Ile Glu Ser Asp Gly Lys Glu Thr			
	530	535	540
Leu Glu Thr Ile Ser Asn Glu Glu Gln Thr Pro Leu Leu Lys Lys Ile			
545	550	555	560
Asn Pro Thr Glu Ser Thr Ser Lys Ala Glu Glu Asn Glu Lys Val Asp			
	565	570	575
Ser Lys Val Lys Ala Phe Lys Lys Pro Leu Ser Val Phe Lys Gly Pro			
	580	585	590
Leu Leu His Ile Ser Pro Ala Glu Glu Leu Tyr Phe Gly Ser Thr Glu			
	595	600	605
Ser Gly Glu Lys Lys Thr Leu Ile Val Leu Thr Asn Val Thr Lys Asn			
	610	615	620
Ile Val Ala Phe Lys Val Arg Thr Thr Ala Pro Glu Lys Tyr Arg Val			
625	630	635	640
Lys Pro Ser Asn Ser Ser Cys Asp Pro Gly Ala Ser Val Asp Ile Val			
	645	650	655
Val Ser Pro His Gly Gly Leu Thr Val Ser Ala Gln Asp Arg Phe Leu			
	660	665	670
Ile Met Ala Ala Glu Met Glu Gln Ser Ser Gly Thr Gly Pro Ala Glu			
	675	680	685
Leu Thr Gln Phe Trp Lys Glu Val Pro Arg Asn Lys Val Met Glu His			
	690	695	700
Arg Leu Arg Cys His Thr Val Glu Ser Ser Lys Pro Asn Thr Leu Thr			
705	710	715	720
Leu Lys Asp Asn Ala Phe Asn Met Ser Asp Lys Thr Ser Glu Asp Ile			
	725	730	735
Cys Leu Gln Leu Ser Arg Leu Leu Glu Ser Asn Arg Lys Leu Glu Asp			
	740	745	750
Gln Val Gln Arg Cys Ile Trp Phe Gln Gln			
	755	760	

<210> 6

<211> 507

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

```

Met Gly Ser His His His His His His Ser Gly Met Ala Glu Asn His
1           5           10           15
Ala Gln Asn Lys Ala Lys Leu Ile Ser Glu Thr Arg Arg Arg Phe Glu
          20           25           30
Ala Glu Tyr Val Thr Asp Lys Ser Asp Lys Tyr Asp Ala Arg Asp Val
          35           40           45
Glu Arg Leu Gln Gln Asp Asp Asn Trp Val Glu Ser Tyr Leu Ser Trp
          50           55           60
Arg His Asn Ile Val Asp Glu Thr Leu Lys Met Leu Asp Glu Ser Phe
65           70           75           80
Gln Trp Arg Lys Glu Ile Ser Val Asn Asp Leu Asn Glu Ser Ser Ile
          85           90           95
Pro Arg Trp Leu Leu Glu Ile Gly Val Ile Tyr Leu His Gly Tyr Asp
          100          105          110
Lys Glu Gly Asn Lys Leu Phe Trp Ile Arg Val Lys Tyr His Val Lys
          115          120          125
Asp Gln Lys Thr Ile Leu Asp Lys Lys Lys Leu Ile Ala Phe Trp Leu
          130          135          140
Glu Arg Tyr Ala Lys Arg Glu Asn Gly Lys Pro Val Thr Val Met Phe
145          150          155          160
Asp Leu Ser Glu Thr Gly Ile Asn Ser Ile Asp Met Asp Phe Val Arg
          165          170          175
Phe Ile Ile Asn Cys Phe Lys Val Tyr Tyr Pro Lys Tyr Leu Ser Lys
          180          185          190
Ile Val Ile Phe Asp Met Pro Trp Leu Met Asn Ala Ala Phe Lys Ile
          195          200          205
Val Lys Thr Trp Leu Gly Pro Glu Ala Val Ser Leu Leu Lys Phe Thr
          210          215          220
Ser Lys Asn Glu Val Gln Asp Tyr Val Ser Val Glu Tyr Leu Pro Pro
225          230          235          240
His Met Gly Gly Thr Asp Pro Phe Lys Tyr Ser Tyr Pro Pro Leu Val
          245          250          255
Asp Asp Asp Phe Gln Thr Pro Leu Cys Glu Asn Gly Pro Ile Thr Ser
          260          265          270
Glu Asp Glu Thr Ser Ser Lys Glu Asp Ile Glu Ser Asp Gly Lys Glu

```

275	280	285
Thr Leu Glu Thr Ile Ser Asn Glu Glu Gln Thr Pro Leu Leu Lys Lys		
290	295	300
Ile Asn Pro Thr Glu Ser Thr Ser Lys Ala Glu Glu Asn Glu Lys Val		
305	310	315
Asp Ser Lys Val Lys Ala Phe Lys Lys Pro Leu Ser Val Phe Lys Gly		
325	330	335
Pro Leu Leu His Ile Ser Pro Ala Glu Glu Leu Tyr Phe Gly Ser Thr		
340	345	350
Glu Ser Gly Glu Lys Lys Thr Leu Ile Val Leu Thr Asn Val Thr Lys		
355	360	365
Asn Ile Val Ala Phe Lys Val Arg Thr Thr Ala Pro Glu Lys Tyr Arg		
370	375	380
Val Lys Pro Ser Asn Ser Ser Cys Asp Pro Gly Ala Ser Val Asp Ile		
385	390	395
Val Val Ser Pro His Gly Gly Leu Thr Val Ser Ala Gln Asp Arg Phe		
405	410	415
Leu Ile Met Ala Ala Glu Met Glu Gln Ser Ser Gly Thr Gly Pro Ala		
420	425	430
Glu Leu Thr Gln Phe Trp Lys Glu Val Pro Arg Asn Lys Val Met Glu		
435	440	445
His Arg Leu Arg Cys His Thr Val Glu Ser Ser Lys Pro Asn Thr Leu		
450	455	460
Thr Leu Lys Asp Asn Ala Phe Asn Met Ser Asp Lys Thr Ser Glu Asp		
465	470	475
Ile Cys Leu Gln Leu Ser Arg Leu Leu Glu Ser Asn Arg Lys Leu Glu		
485	490	495
Asp Gln Val Gln Arg Cys Ile Trp Phe Gln Gln		
500	505	

<210> 7

<211> 507

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

Met Gly Ser His His His His His Ser Gly Met Ala Glu Asn His		
1	5	10
Ala Gln Asn Lys Ala Lys Leu Ile Ser Glu Thr Arg Arg Arg Phe Glu		
20	25	30
Ala Glu Tyr Val Thr Asp Lys Ser Asp Lys Tyr Asp Ala Arg Asp Val		

35	40	45
Glu Arg Leu Gln Gln Asp Asp Asn Trp Val Glu Ser Tyr Leu Ser Trp		
50	55	60
Arg His Asn Ile Val Asp Glu Thr Leu Lys Met Leu Asp Glu Ser Phe		
65	70	75
Gln Trp Arg Lys Glu Ile Ser Val Asn Asp Leu Asn Glu Ser Ser Ile		
85	90	95
Pro Arg Trp Leu Leu Glu Ile Gly Val Ile Tyr Leu His Gly Tyr Asp		
100	105	110
Lys Glu Gly Asn Lys Leu Phe Trp Ile Arg Val Lys Tyr His Val Lys		
115	120	125
Asp Gln Lys Thr Ile Leu Asp Lys Lys Lys Leu Ile Ala Phe Trp Leu		
130	135	140
Glu Arg Tyr Ala Lys Arg Glu Asn Gly Lys Pro Val Thr Val Met Phe		
145	150	155
Asp Leu Ser Glu Thr Gly Ile Asn Ser Ile Asp Met Asp Phe Val Arg		
165	170	175
Phe Ile Ile Asn Cys Phe Lys Val Tyr Tyr Pro Lys Tyr Leu Ser Lys		
180	185	190
Ile Val Ile Phe Asp Met Pro Trp Leu Met Asn Ala Ala Phe Lys Ile		
195	200	205
Val Lys Thr Trp Leu Gly Pro Glu Ala Val Ser Leu Leu Lys Phe Thr		
210	215	220
Ser Lys Asn Glu Val Gln Asp Tyr Val Ser Val Glu Tyr Leu Pro Pro		
225	230	235
His Met Gly Gly Thr Asp Pro Phe Lys Tyr Ser Tyr Pro Pro Leu Val		
245	250	255
Asp Asp Asp Phe Gln Thr Pro Leu Cys Glu Asn Gly Pro Ile Thr Ser		
260	265	270
Glu Asp Glu Thr Ser Ser Lys Glu Asp Ile Glu Ser Asp Gly Lys Glu		
275	280	285
Thr Leu Glu Thr Ile Ser Asn Glu Glu Gln Thr Pro Leu Leu Lys Lys		
290	295	300
Ile Asn Pro Thr Glu Ser Thr Ser Lys Ala Glu Glu Asn Glu Lys Val		
305	310	315
Asp Ser Lys Val Lys Ala Phe Lys Lys Pro Leu Ser Val Phe Lys Gly		
325	330	335
Pro Leu Leu His Ile Ser Pro Ala Glu Glu Leu Tyr Phe Gly Ser Thr		
340	345	350

Glu Ser Gly Glu Lys Lys Thr Leu Ile Val Leu Thr Asn Val Thr Lys
 355 360 365
 Asn Ile Val Ala Phe Lys Val Arg Thr Thr Ala Pro Glu Lys Tyr Arg
 370 375 380
 Val Lys Pro Ser Asn Ser Ser Cys Asp Pro Gly Ala Ser Val Asp Ile
 385 390 395 400
 Val Val Ser Pro His Gly Gly Leu Thr Val Ser Ala Gln Asp Arg Phe
 405 410 415
 Leu Ile Met Ala Ala Glu Met Glu Gln Ser Ser Gly Thr Gly Pro Ala
 420 425 430
 Glu Leu Thr Gln Phe Trp Lys Glu Val Pro Arg Asn Lys Val Met Glu
 435 440 445
 His Arg Leu Arg Cys His Thr Val Glu Ser Ser Lys Pro Asn Thr Leu
 450 455 460
 Thr Leu Lys Asp Asn Ala Phe Asn Met Ser Asp Lys Thr Ser Glu Asp
 465 470 475 480
 Ile Cys Leu Gln Leu Ser Arg Leu Leu Glu Ser Asn Arg Lys Leu Glu
 485 490 495
 Asp Gln Val Gln Arg Cys Ile Trp Phe Gln Gln
 500 505

<210> 8

<211> 496

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

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

Lys Tyr His Val Lys Asp Gln Lys Thr Ile Leu Asp Lys Lys Lys Leu		
115	120	125
Ile Ala Phe Trp Leu Glu Arg Tyr Ala Lys Arg Glu Asn Gly Lys Pro		
130	135	140
Val Thr Val Met Phe Asp Leu Ser Glu Thr Gly Ile Asn Ser Ile Asp		
145	150	155
Met Asp Phe Val Arg Phe Ile Ile Asn Cys Phe Lys Val Tyr Tyr Pro		
	165	170
		175
Lys Tyr Leu Ser Lys Ile Val Ile Phe Asp Met Pro Trp Leu Met Asn		
	180	185
		190
Ala Ala Phe Lys Ile Val Lys Thr Trp Leu Gly Pro Glu Ala Val Ser		
	195	200
		205
Leu Leu Lys Phe Thr Ser Lys Asn Glu Val Gln Asp Tyr Val Ser Val		
	210	215
		220
Glu Tyr Leu Pro Pro His Met Gly Gly Thr Asp Pro Phe Lys Tyr Ser		
225	230	235
		240
Tyr Pro Pro Leu Val Asp Asp Asp Phe Gln Thr Pro Leu Cys Glu Asn		
	245	250
		255
Gly Pro Ile Thr Ser Glu Asp Glu Thr Ser Ser Lys Glu Asp Ile Glu		
	260	265
		270
Ser Asp Gly Lys Glu Thr Leu Glu Thr Ile Ser Asn Glu Glu Gln Thr		
	275	280
		285
Pro Leu Leu Lys Lys Ile Asn Pro Thr Glu Ser Thr Ser Lys Ala Glu		
	290	295
		300
Glu Asn Glu Lys Val Asp Ser Lys Val Lys Ala Phe Lys Lys Pro Leu		
305	310	315
		320
Ser Val Phe Lys Gly Pro Leu Leu His Ile Ser Pro Ala Glu Glu Leu		
	325	330
		335
Tyr Phe Gly Ser Thr Glu Ser Gly Glu Lys Lys Thr Leu Ile Val Leu		
	340	345
		350
Thr Asn Val Thr Lys Asn Ile Val Ala Phe Lys Val Arg Thr Thr Ala		
	355	360
		365
Pro Glu Lys Tyr Arg Val Lys Pro Ser Asn Ser Ser Cys Asp Pro Gly		
	370	375
		380
Ala Ser Val Asp Ile Val Val Ser Pro His Gly Gly Leu Thr Val Ser		
385	390	395
		400
Ala Gln Asp Arg Phe Leu Ile Met Ala Ala Glu Met Glu Gln Ser Ser		
	405	410
		415
Gly Thr Gly Pro Ala Glu Leu Thr Gln Phe Trp Lys Glu Val Pro Arg		

420	425	430
Asn Lys Val Met Glu His Arg Leu Arg Cys His Thr Val Glu Ser Ser		
435	440	445
Lys Pro Asn Thr Leu Thr Leu Lys Asp Asn Ala Phe Asn Met Ser Asp		
450	455	460
Lys Thr Ser Glu Asp Ile Cys Leu Gln Leu Ser Arg Leu Leu Glu Ser		
465	470	475
Asn Arg Lys Leu Glu Asp Gln Val Gln Arg Cys Ile Trp Phe Gln Gln		
485	490	495

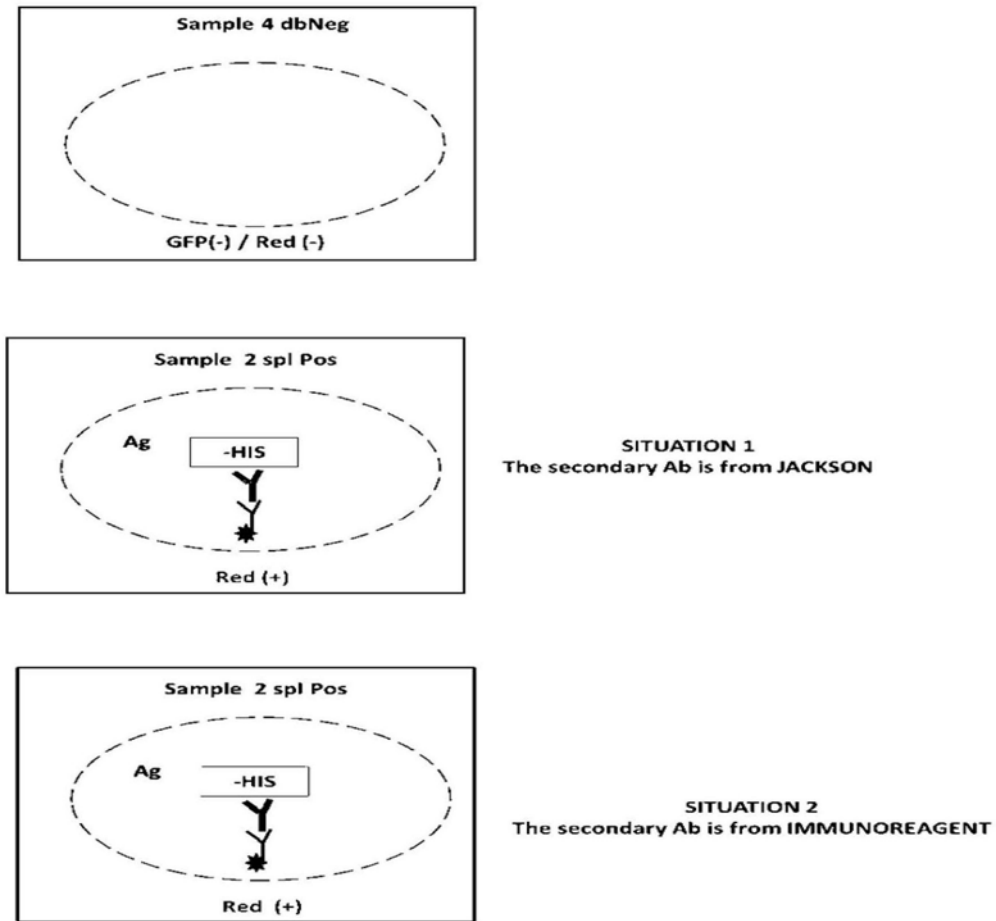


图1

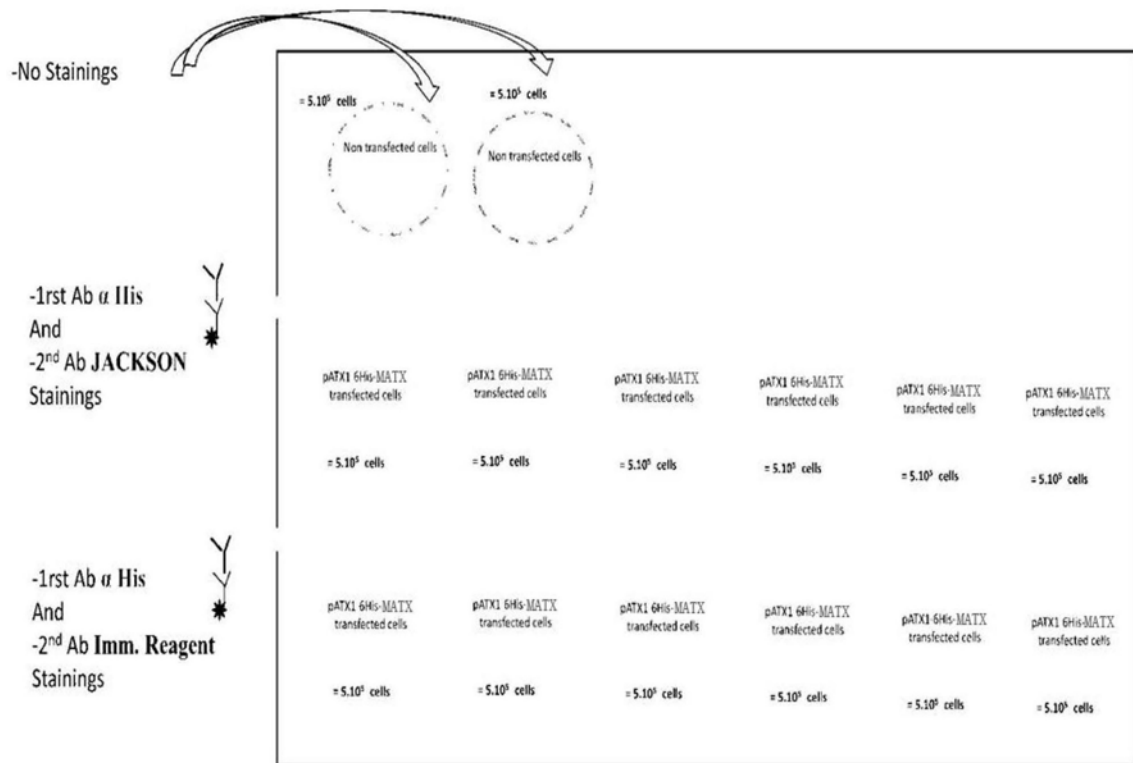


图2

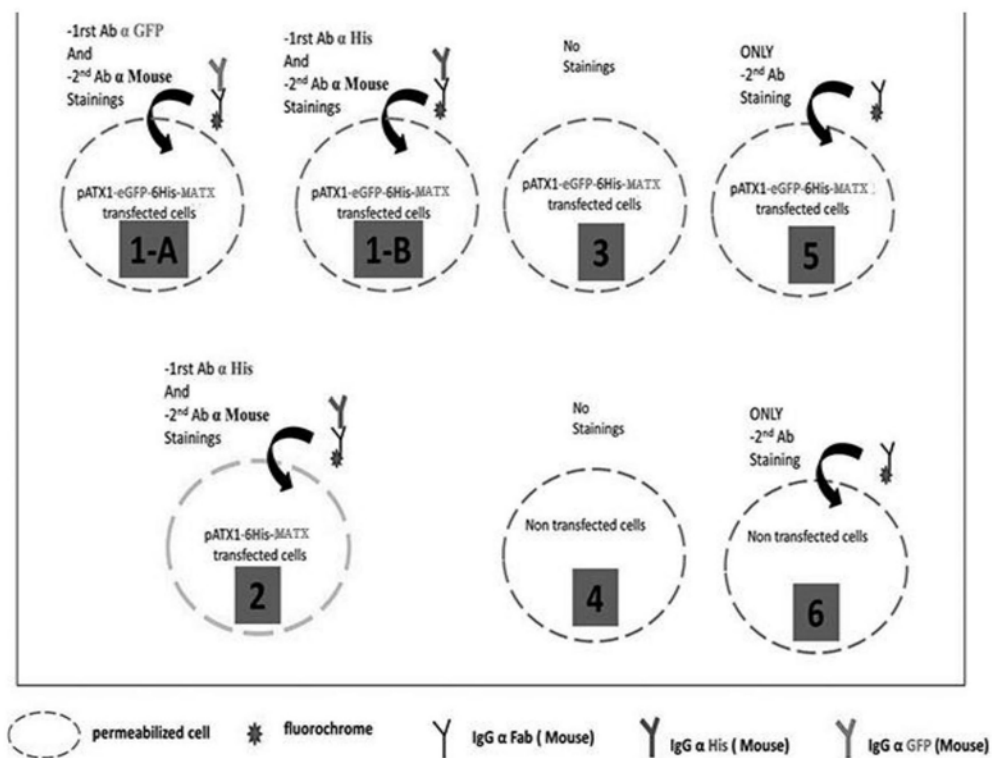


图3

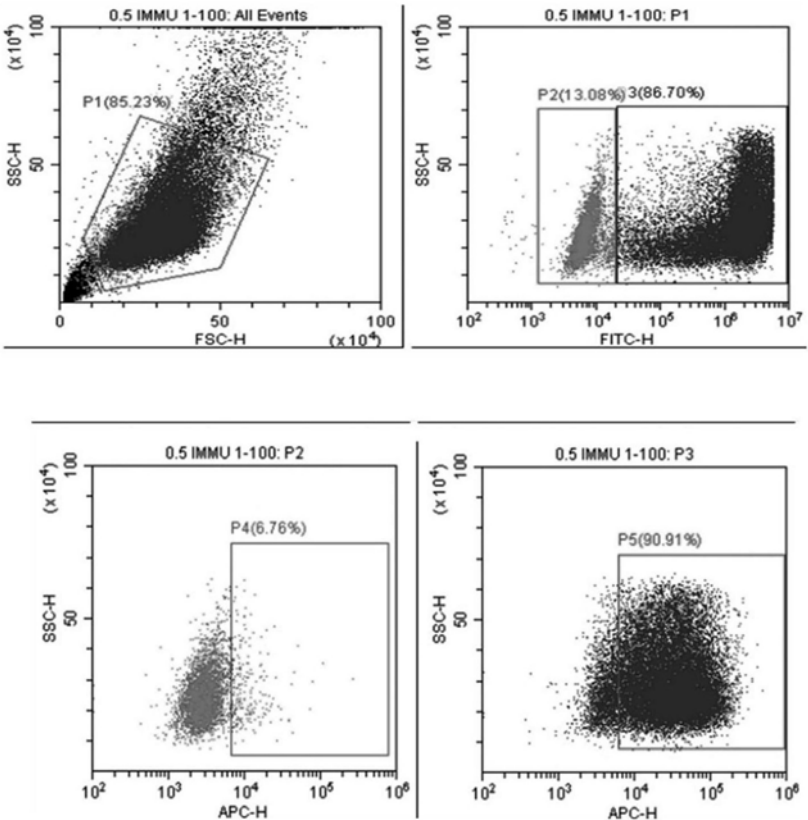


图4

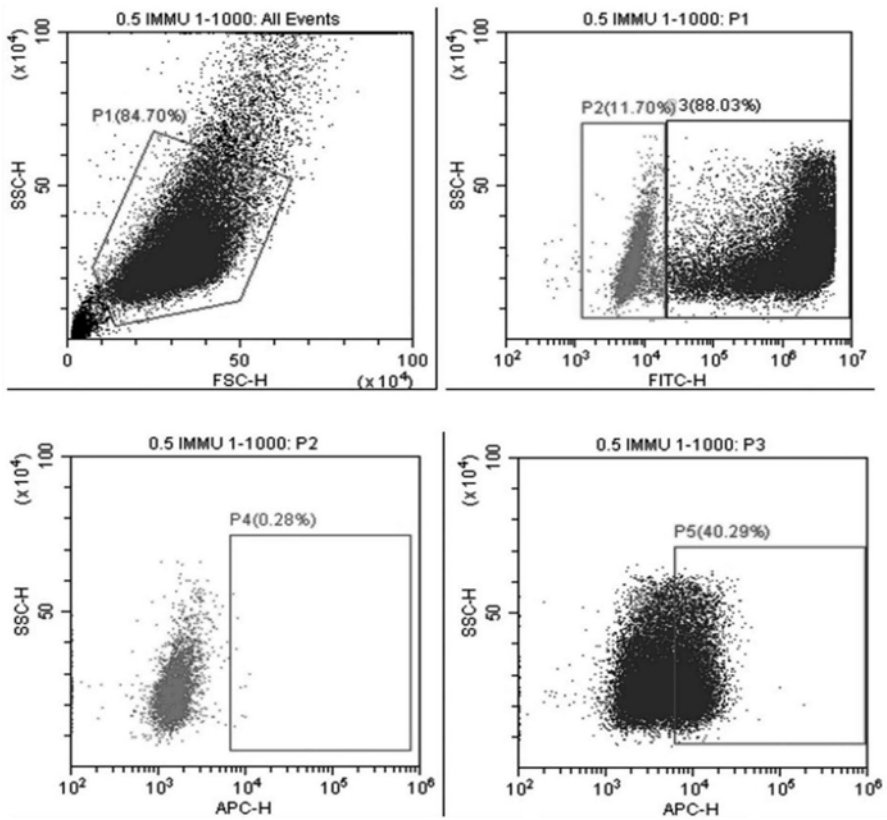


图5

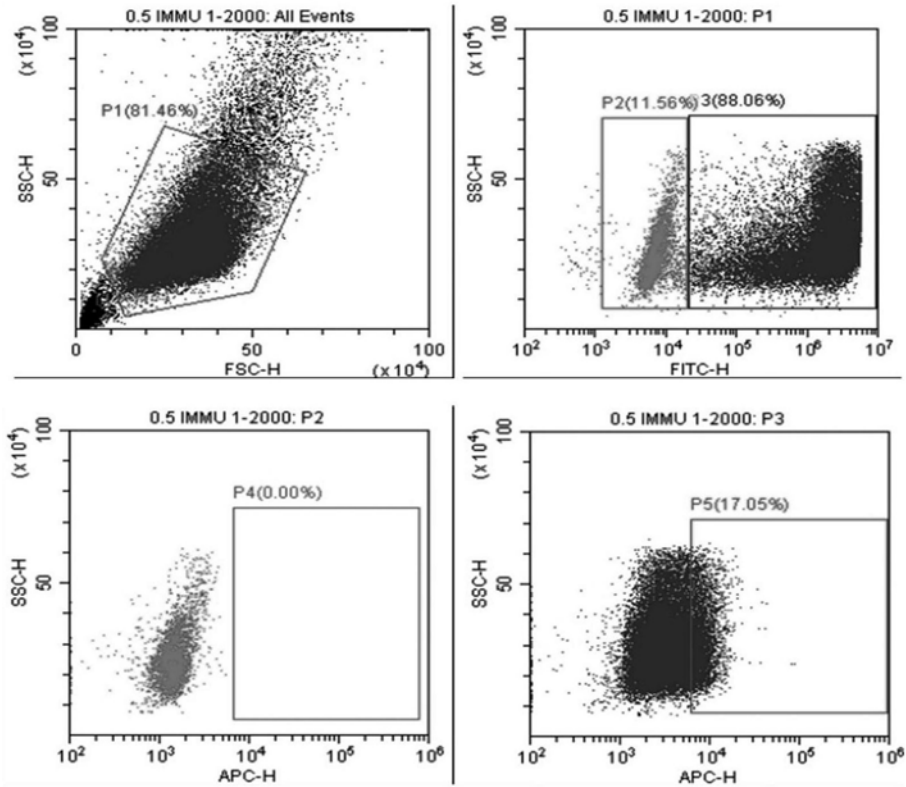


图6

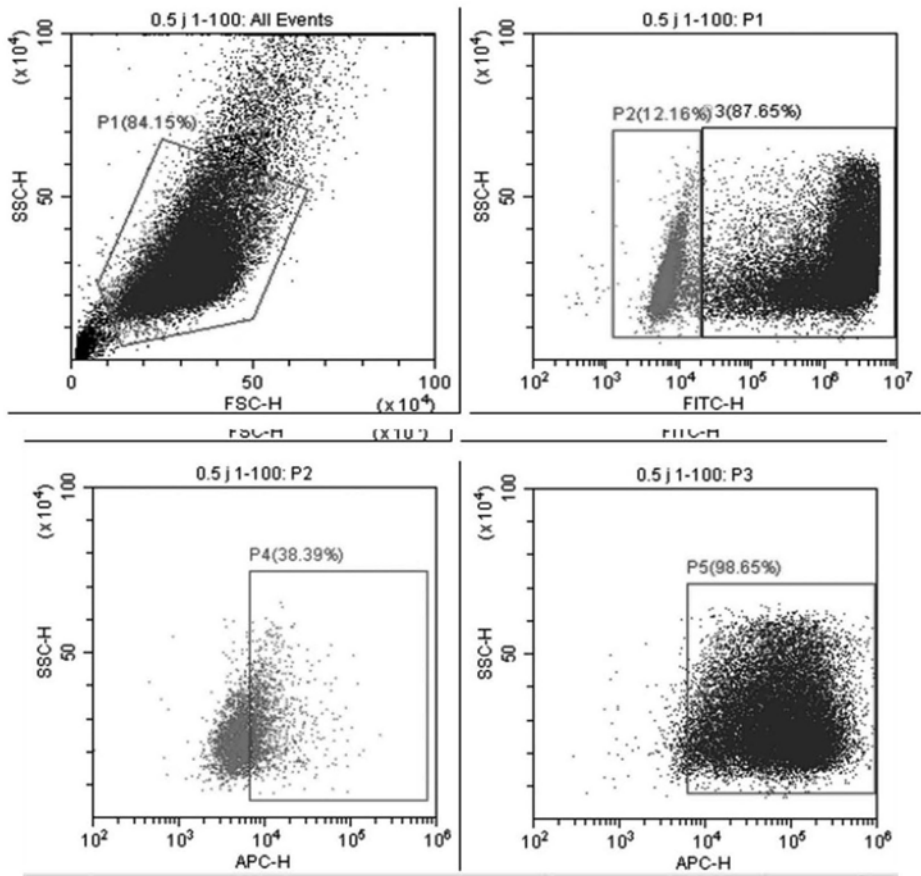


图7

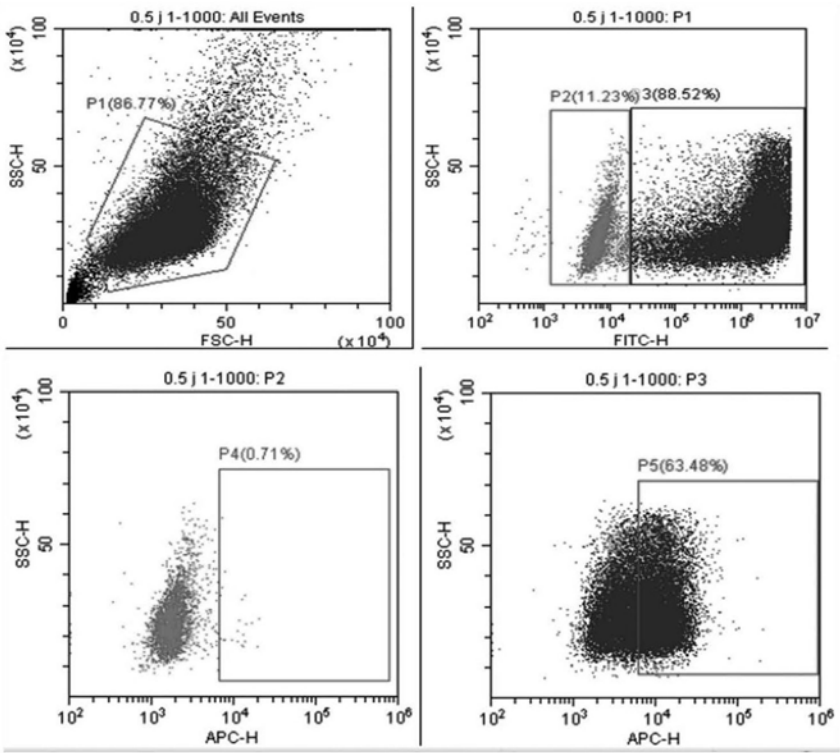


图8

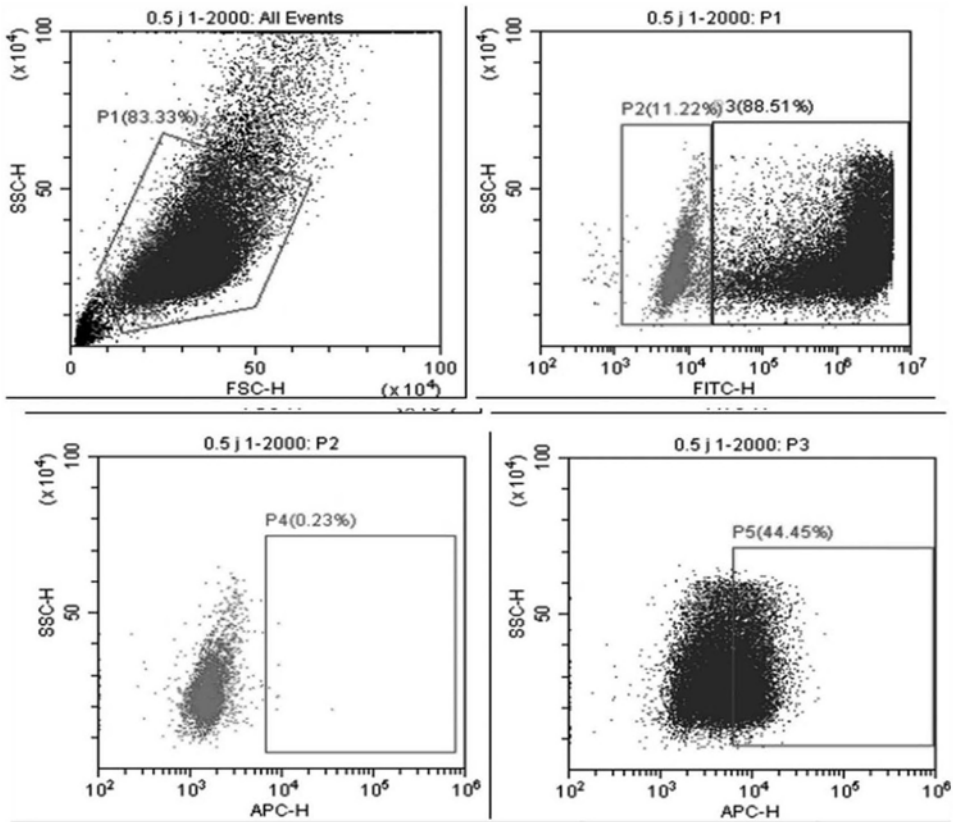


图9

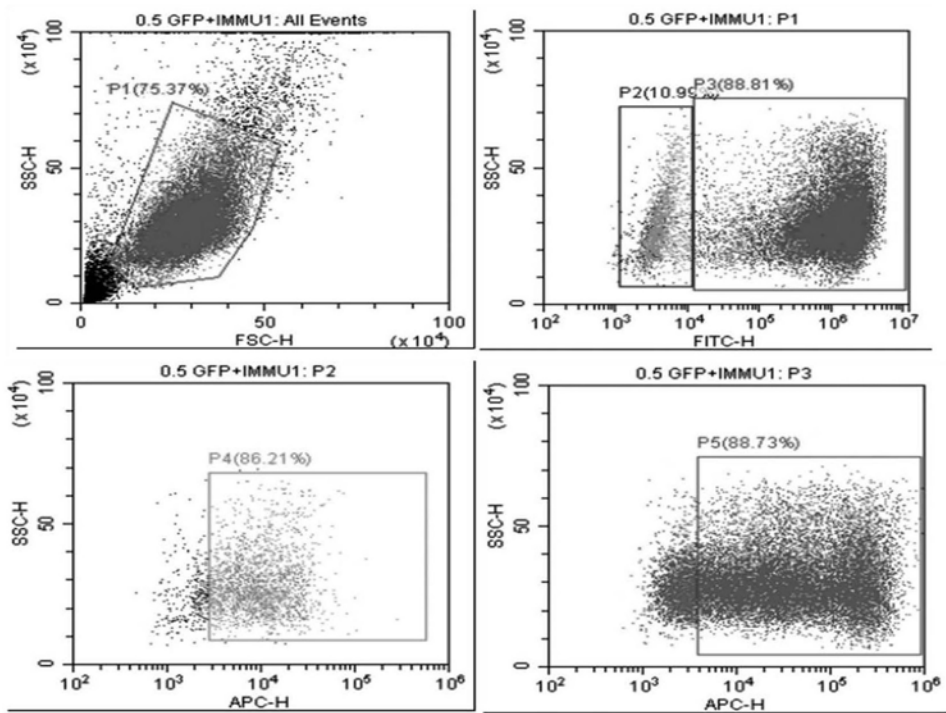


图10

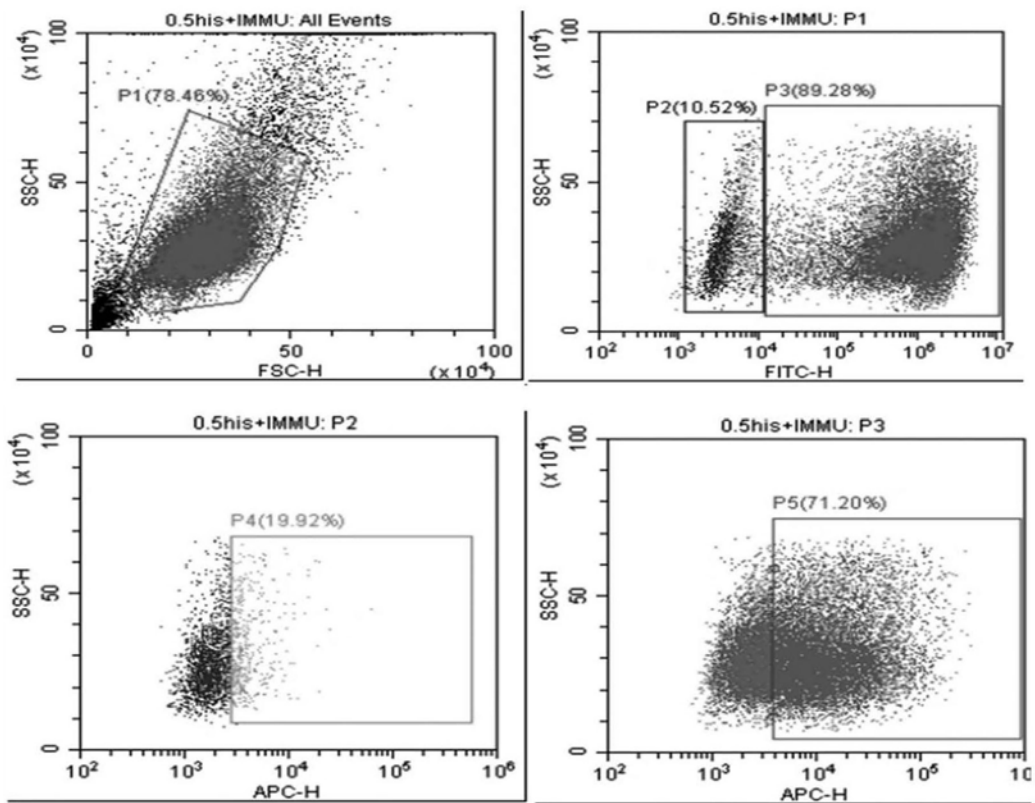


图11

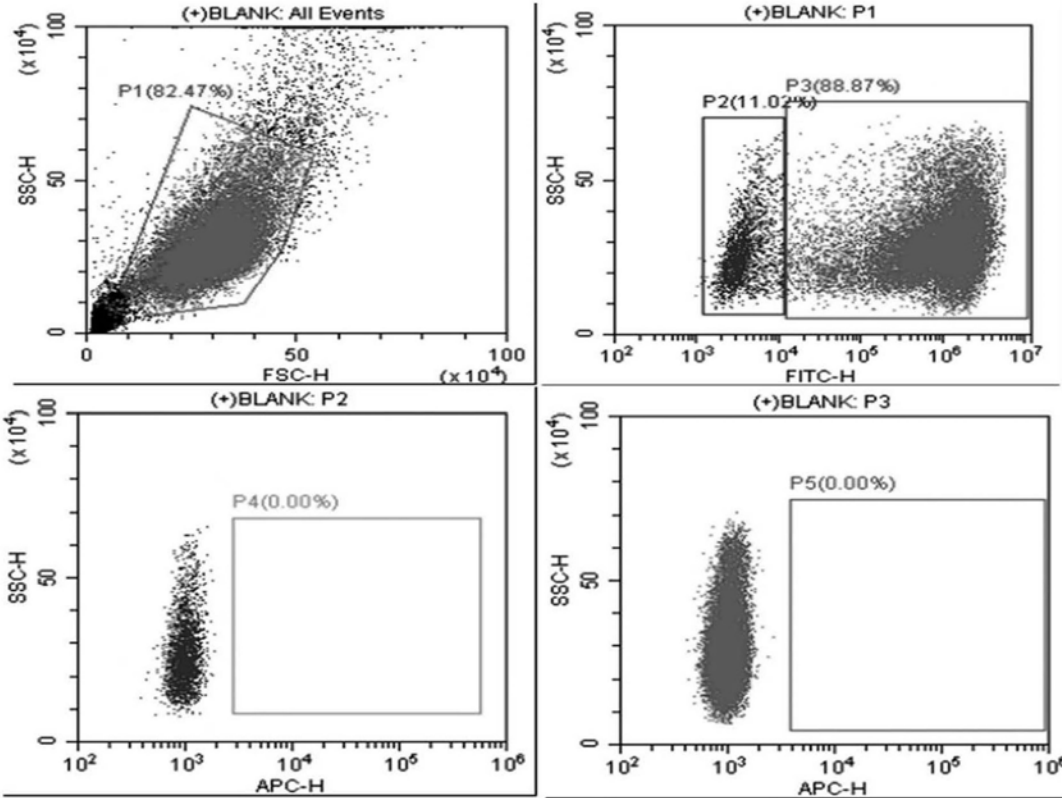


图12

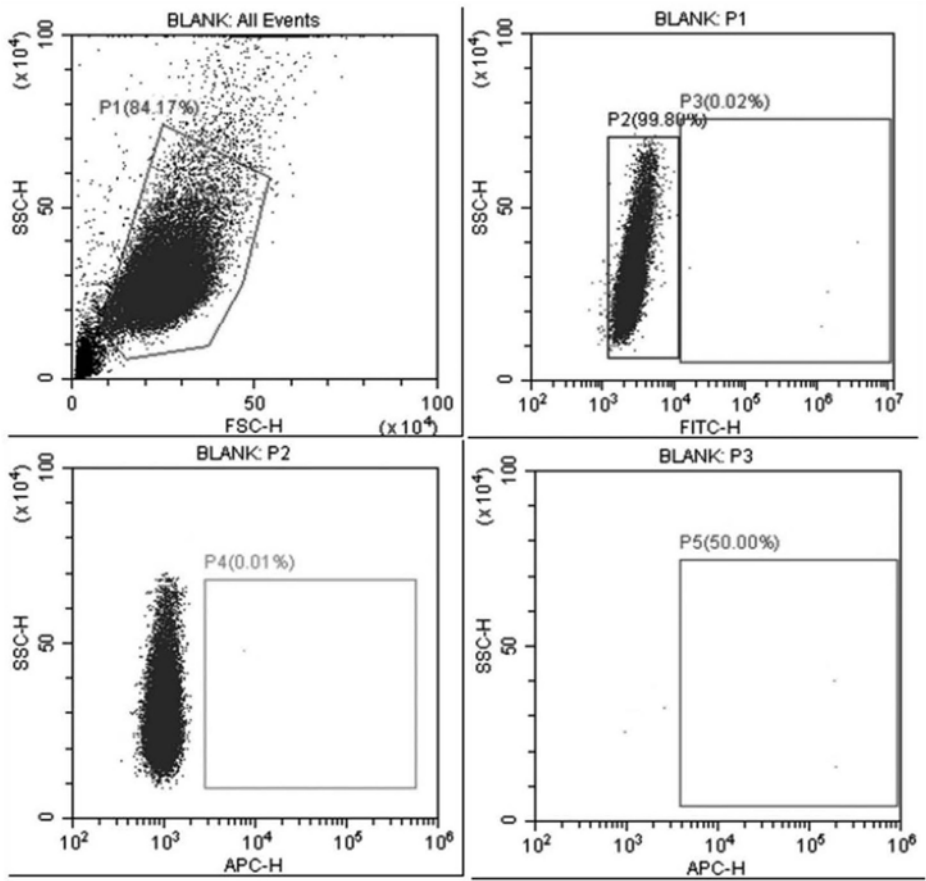


图13

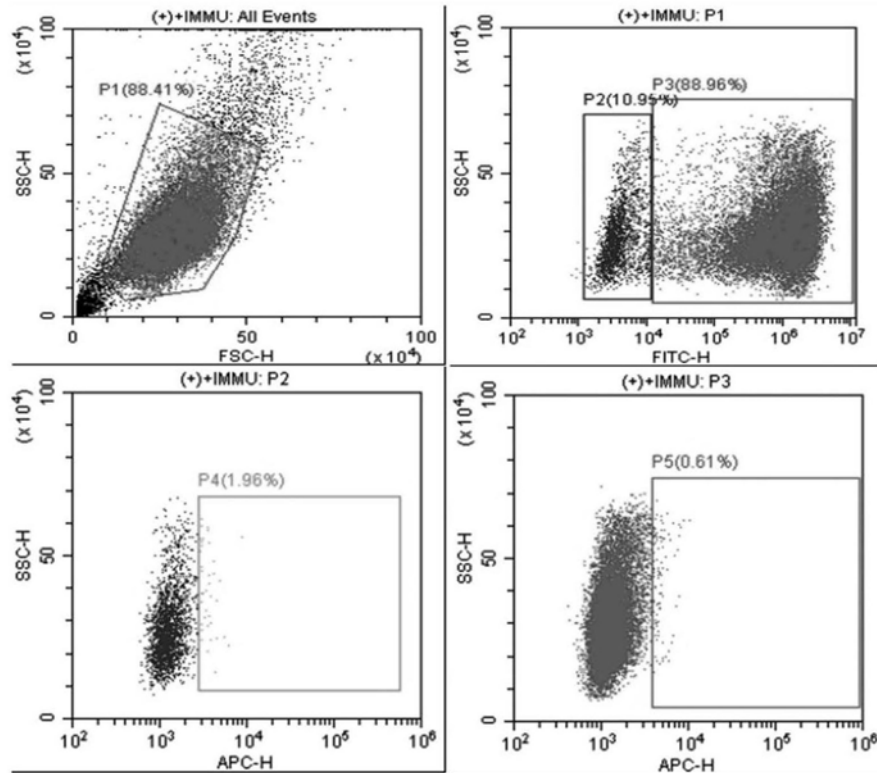


图14

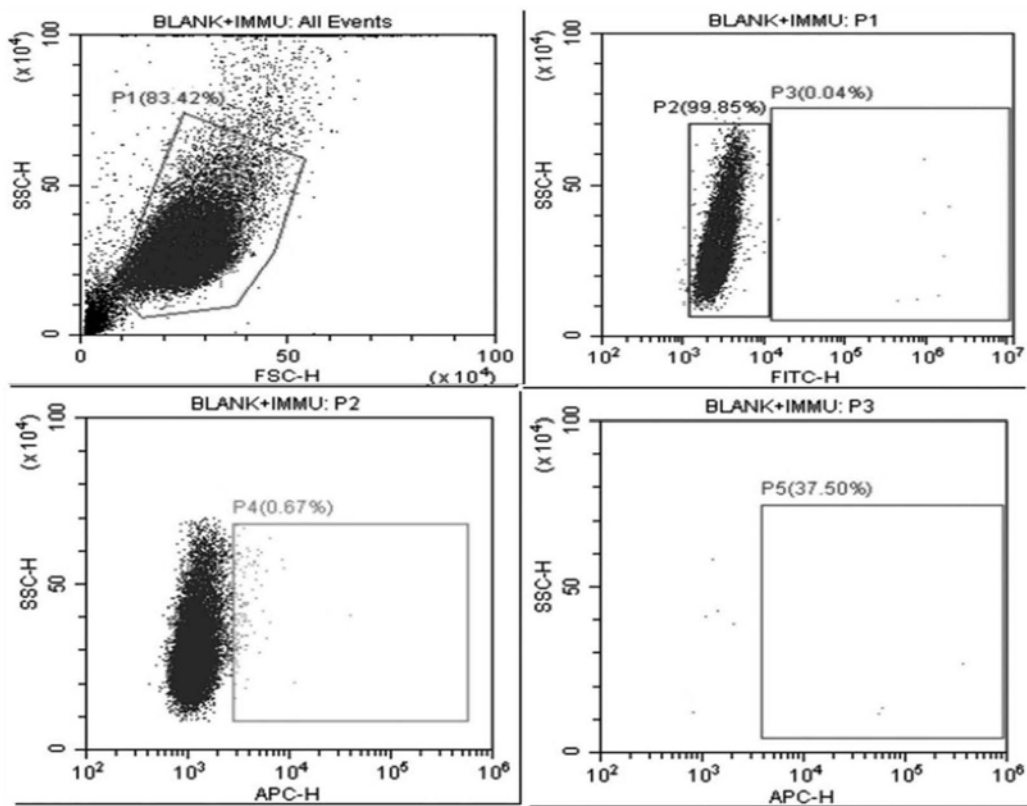


图15

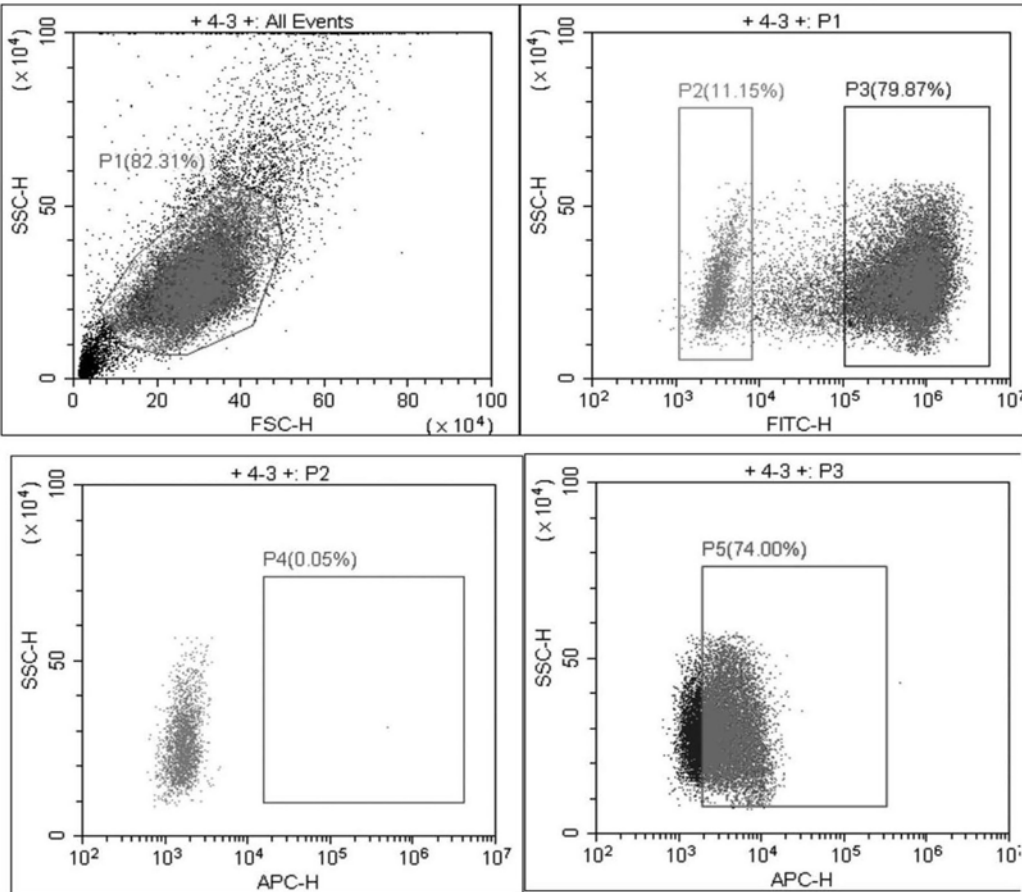


图16

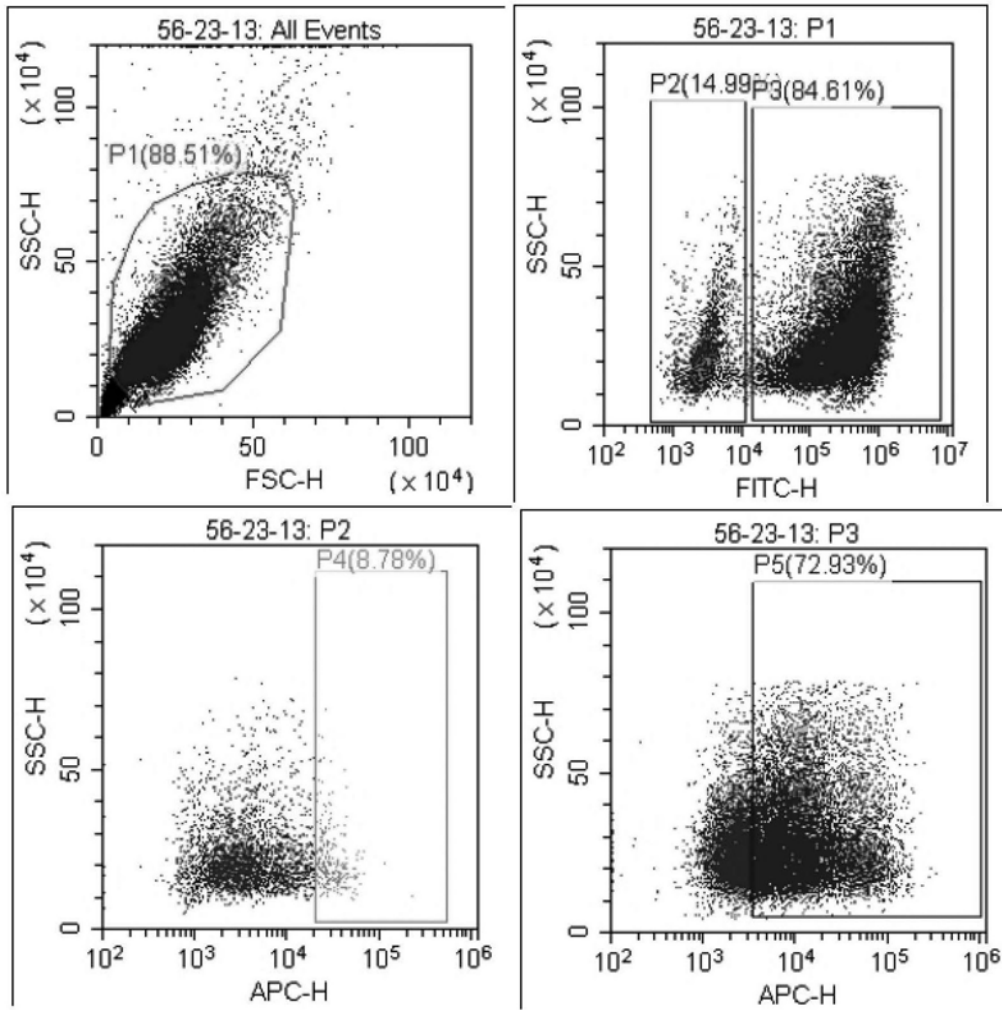


图17

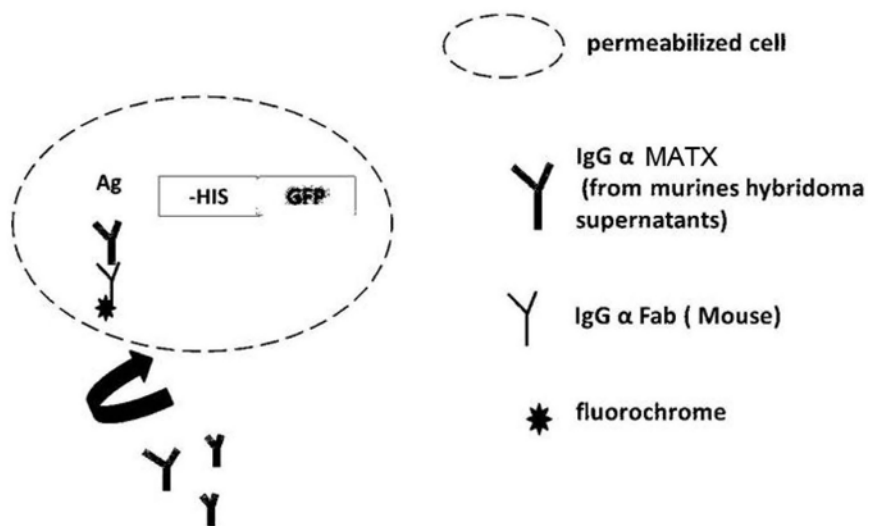


图18

专利名称(译)	一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法		
公开(公告)号	CN109517058A	公开(公告)日	2019-03-26
申请号	CN201811242616.4	申请日	2018-10-24
[标]发明人	鲁亮 雷坤 秦伏波 张永霞		
发明人	鲁亮 雷坤 秦伏波 张永霞		
IPC分类号	C07K16/00 C12N15/70 C12N15/13 G01N15/14 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/00 G01N15/1404 G01N33/53		
代理人(译)	徐瑛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种筛选能应用于流式细胞术抗体的方法，包括以下步骤：
(1)抗原表达及纯化，所述抗原包括免疫抗原、筛选抗原、流式筛选抗原；(2)小鼠免疫，筛选效价高的小鼠做细胞融合；(3)预实验处理，获取通透处理的细胞，所述细胞可表达MATX-GFP-His蛋白；(4)细胞融合和筛选；(5)亚克隆；(6)抗体生产。通过预实验设计确定二抗来源及其工作浓度，以简化操作，避免筛选过程中的背景干扰，减少工作量，提高工作效率，筛选周期短，适应于流式细胞术抗体的快速筛选。

