(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110950960 A
(43)申请公布日 2020.04.03

(21)申请号 201911175958.3

(22)申请日 2019.11.26

(71)申请人 中国农业大学
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 王战辉 沈建忠 温凯 江海洋 于雪芝 余文博 李红芳 段长飞 史为民

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 黄爽

(51)Int.Cl.
C07K 16/44(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页
序列表5页 附图3页

(54)发明名称

基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法

(57)摘要

本发明提供一种基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法。包括:1)根据小分子化合物M的结构,设计半抗原,合成免疫原,免疫实验动物;然后收集动物血清测定效价,选取效价高的免疫动物提取B淋巴细胞;2)将B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合,得到杂合杂交瘤细胞;3)筛选阳性杂交瘤细胞并体外扩大培养;4)对阳性杂交瘤细胞进行转录组测序,获得抗体重链和轻链的编码序列,然后利用原核或真核表达系统,制备得到小分子化合物M的抗体。本发明有效解决了传统大鼠单克隆抗体腹水制备难以及兔瘤细胞来源受限的问题,最终获得高特异性、高灵敏度和高稳定性的单克隆抗体,该方法在科研与实际应用中具有十分广阔的前景。

CN 110950960 A

1.基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)根据小分子化合物M的结构,设计免疫原,免疫实验动物;然后收集免疫动物的血清,测定效价,选取效价高的免疫动物提取B淋巴细胞;

2)将步骤1)提取的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合,得到杂合杂交瘤细胞;

3)从杂合杂交瘤细胞中筛选出阳性杂交瘤细胞并进行体外扩大培养;

4)对阳性杂交瘤细胞进行转录组测序,获得抗体重链和轻链的编码序列,然后利用原核或真核表达系统,制备得到小分子化合物M的抗体;

其中,步骤1)中所述实验动物不包括小鼠,所述实验动物优选大鼠、兔。

2.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述B淋巴细胞来自动物脾脏;和/或

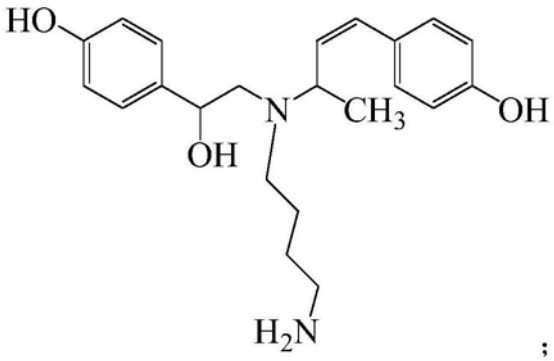
所述小鼠骨髓瘤细胞为SP2/0;和/或

步骤2)中利用聚乙二醇进行细胞融合。

3.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤3)中进行阳性杂交瘤细胞体外培养使用的培养液的成分为:含1%HAT培养基添加剂和0.5%克隆补充物的DMEM高糖型完全培养液。

4.根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,M为莱克多巴胺,对应的免疫原是由莱克多巴胺半抗原与载体蛋白偶联后得到;

所述莱克多巴胺半抗原的结构如下:



;

所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优选牛血清白蛋白。

5.根据权利要求1-4任一项所述方法制备得到的抗体。

6.莱克多巴胺单克隆抗体12H8,其特征在于,所述单克隆抗体12H8包含如下的氨基酸序列或由其组成:

i)、如SEQ ID NO:1、2所示的重链和轻链氨基酸序列;或

ii)、在i)的N端和/或C端连接标签得到的氨基酸序列;或

iii)、i)或ii)的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的抗体。

7.莱克多巴胺单克隆抗体36E9,其特征在于,所述单克隆抗体36E9包含如下的氨基酸序列或由其组成:

i′)、如SEQ ID NO:3、4所示的重链和轻链氨基酸序列;或

ii′)、在i′)的N端和/或C端连接标签得到的氨基酸序列;或

iii′)、i′)或ii′)的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的抗体。

8.编码权利要求6或7所述单克隆抗体的核酸分子。

9.含有权利要求8所述核酸分子的生物材料，所述生物材料为重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。

10.权利要求6或7所述单克隆抗体在制备莱克多巴胺检测试剂或试剂盒中的应用。

基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学和基因工程技术领域,具体地说,涉及一种基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 自1975年Kohler和Milstein建立杂交瘤技术后,单克隆抗体的研制及应用迅速发展。但由于小鼠免疫系统不能识别鼠源性的免疫原,小鼠单抗的亲和性低于大鼠、兔等动物,并且小鼠腹水产生量少,因此相继产生了许多大鼠及兔单克隆抗体的制备研究。1979年后,陆续出现大鼠-大鼠单克隆抗体制备的相关研究。大鼠-大鼠杂交瘤技术较为成熟的方法是将LOU/C大鼠脾细胞与IR983F瘤细胞进行融合制备大鼠单克隆抗体。但经调研国内已没有LOU/C大鼠,从国外引进流程较为繁琐,并且LOU/C大鼠的繁育较为复杂,增加了大鼠单克隆抗体的制备难度。随着单抗技术的发展,美国Epitomics公司制备了兔的瘤细胞,成功获得了兔单克隆抗体,使兔单克隆抗体技术得以发展。但兔的瘤细胞在专利保护范围内,导致相应的兔骨髓瘤细胞系获取困难,限制了其在科研中的应用,使得该技术无法作为科研机构的实验平台被建立与推广。因此,用常规的方法制备大鼠和兔单克隆抗体具有一定的挑战性。

[0003] 转录组测序的研究对象为特定细胞在某一功能状态下所能转录出来的所有RNA的总和,主要包括mRNA和非编码RNA。转录组研究是基因功能及结构研究的基础和出发点,通过高通量测序,能够全面快速地获得某一物种特定组织或器官在某一状态下的几乎所有转录本序列信息,已广泛应用于基础研究、临床诊断和药物研发等领域。

[0004] 本发明通过探索种间杂交瘤技术,成功获得了利用种间杂交瘤技术制备的杂交瘤细胞株并通过二代测序技术和原核表达技术获得了大鼠和兔单克隆抗体,搭建了大鼠-小鼠和兔-小鼠单抗制备平台。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法。

[0006] 本发明构思如下:基于SP2/0骨髓瘤细胞单克隆抗体技术和基于二代测序的转录组测序的生物分析技术发展已较为成熟,本发明尝试将莱克多巴胺作为靶标分子,利用莱克多巴胺(RAC)免疫原分别免疫Wistar大鼠和新西兰大白兔。取免疫后兔、大鼠的脾脏细胞分别与骨髓瘤细胞SP2/0融合,并对融合细胞进行培养增殖。通过对融合细胞进行筛选,获得可特异性识别小分子化合物的杂交瘤细胞株。利用二代测序技术对杂交瘤细胞的转录组进行测序。通过对转录组信息进行分析获得抗体重链和轻链的序列,设计特异性引物,对重链和轻链序列进行扩增,设计酶切位点,构建载体,导入大肠杆菌进行单克隆抗体的表达,通过鉴定从而获得兔和大鼠的单克隆抗体。此依托于高通量测序的杂合杂交瘤技术的发展

对高亲和力小分子化合物抗体的筛选与制备具有深远的意义。

[0007] 为了实现本发明目的，第一方面，本发明提供一种基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法，包括以下步骤：

[0008] 1)根据小分子化合物M的结构，设计免疫原，免疫实验动物；然后收集免疫动物的血清，测定效价，选取效价高的免疫动物提取B淋巴细胞；

[0009] 2)将步骤1)提取的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合，得到杂合杂交瘤细胞；

[0010] 3)从杂合杂交瘤细胞中筛选出阳性杂交瘤细胞并进行体外扩大培养；

[0011] 4)对阳性杂交瘤细胞进行转录组测序，获得抗体重链和轻链的编码序列，然后利用原核或真核表达系统，制备得到小分子化合物M的抗体；

[0012] 其中，步骤1)中所述实验动物不包括小鼠，所述实验动物优选大鼠、兔。

[0013] 本发明中，所述小分子化合物包括兽药分子、农药分子、真菌毒素、环境激素等分子量低于5000Da的化合物。

[0014] 所述B淋巴细胞可来自动物脾脏。

[0015] 优选地，所述小鼠骨髓瘤细胞为SP2/0。

[0016] 优选地，步骤2)中利用聚乙二醇(如分子量为1450Da)进行细胞融合。

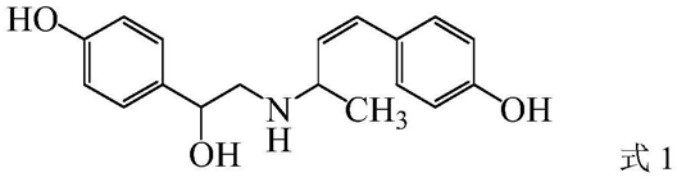
[0017] 前述的方法，步骤3)中进行阳性杂交瘤细胞体外培养使用的培养液的成分为：含1％HAT培养基添加剂和0.5％克隆补充物(HFCS)的DMEM高糖型完全培养液。其中，DMEM高糖型完全培养液是指含20％胎牛血清的80％DMEM高糖型不完全培养液。

[0018] HAT培养基添加剂(50×)Hybri-Max，购自Sigma公司，所述HAT培养基添加剂为次黄嘌呤(H)、氨基蝶呤(A)和胸苷(T)的液体混合物。

[0019] DMEM高糖型不完全培养液为Gibco公司生产的DMEM basic(1×)高糖培养液，货号C11995500BT。

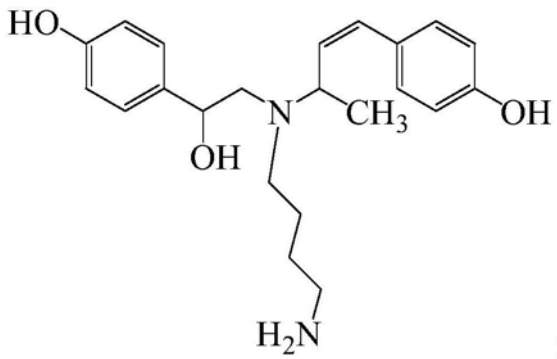
[0020] 克隆补充物(HFCS)购自Sigma公司，Hybridoma Fusion and Cloning Supplement(50×)，货号11363735001。

[0021] 当M为莱克多巴胺时(结构如式1所示)，对应的免疫原是由莱克多巴胺半抗原(Hapten 1，结构如式2所示)与载体蛋白偶联后得到。



式1

[0022]



式2

[0023] 其中，所述载体蛋白选自牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白、甲

状腺蛋白、人血清白蛋白等;优选牛血清白蛋白。

[0024] 第二方面,本发明提供按照上述方法制备得到的抗体。

[0025] 第三方面,本发明提供莱克多巴胺单克隆抗体12H8,所述单克隆抗体12H8包含如下的氨基酸序列或由其组成:

[0026] i)、如SEQ ID NO:1、2所示的重链和轻链氨基酸序列;或

[0027] ii)、在i)的N端和/或C端连接标签得到的氨基酸序列;或

[0028] iii)、i)或ii)的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的抗体。

[0029] 第四方面,本发明提供莱克多巴胺单克隆抗体36E9,所述单克隆抗体36E9包含如下的氨基酸序列或由其组成:

[0030] i′)、如SEQ ID NO:3、4所示的重链和轻链氨基酸序列;或

[0031] ii′)、在i′)的N端和/或C端连接标签得到的氨基酸序列;或

[0032] iii′)、i′)或ii′)的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的抗体。

[0033] 第五方面,本发明分别提供编码上述两种单克隆抗体的核酸分子。

[0034] 第六方面,本发明提供含有所述核酸分子的生物材料,所述生物材料包括但不限于重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。

[0035] 第七方面,本发明提供所述单克隆抗体12H8和/或36E9在制备莱克多巴胺检测试剂或试剂盒中的应用。

[0036] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0037] 本发明提供的大鼠-小鼠、兔-小鼠杂合杂交瘤技术用于小分子化合物单克隆抗体的制备较为新颖,本方法制备步骤简单,成本较低,能够获得高特异性、高灵敏度的抗体。将传统的杂交瘤融合技术与成熟的测序技术相结合,避免了多次有限稀释法的亚克隆程序,可以快速制备得到单克隆抗体。该方法有效解决了传统大鼠单克隆抗体腹水制备难以及兔瘤细胞来源受限的问题,最终获得高特异性、高灵敏度和高稳定性的单克隆抗体,该方法在科研与实际应用中具有十分广阔的前景。

附图说明

[0038] 图1为本发明实施例2中大鼠抗血清效价变化图。

[0039] 图2为本发明实施例2中兔抗血清效价变化图。

[0040] 图3为本发明实施例3中兔和大鼠杂交瘤细胞显微镜成像图。

[0041] 图4为本发明实施例4中兔和大鼠杂交瘤细胞分泌抗体12H8的标准曲线图。

[0042] 图5为本发明实施例4中兔和大鼠杂交瘤细胞分泌抗体36E9的标准曲线图。

具体实施方式

[0043] 本发明针对基于高通量测序的新型杂合杂交瘤技术(以大鼠和兔为模型动物)的技术空白,提供一种以莱克多巴胺为靶标,以Wistar大鼠和新西兰大白兔作为模型动物,基于高通量测序技术的新型杂合杂交瘤技术方法,为制备依托于异源性杂合杂交瘤技术的单克隆抗体奠定基础。

[0044] 进一步地，本发明提供一种利用莱克多巴胺制备的免疫原免疫Wistar大鼠和新西兰大白兔的方法。

[0045] 进一步地，本发明提供一种分别将大鼠脾细胞、兔脾细胞与balb/c小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行融合的方法。

[0046] 进一步地，本发明提供一种培养杂合杂交瘤细胞的方法。

[0047] 进一步地，本发明提供一种基于高通量测序技术的单克隆抗体的制备方法。

[0048] 进一步地，本发明提供一种基于抗体可变区序列，表达的单克隆抗体在小分子检测领域的应用与推广。

[0049] 进一步地，本发明通过以下技术方案实现：

[0050] 莱克多巴胺免疫原(RAC-BSA)和包被原(RAC-OVA)的制备方法包括：

[0051] 将Hapten 1通过戊二醛法共价连接到BSA/OVA上分别制备免疫原和包被原，方法如下：将20mg Hapten 1与40mg BSA或OVA在5mL PBS(pH 7.4)中混合。将戊二醛(1mL，0.5％溶液)滴加到该混合物中，在室温下搅拌3h，然后用PBS透析3天，并在20℃下保存直至使用。

[0052] 大鼠和兔的免疫方式：采用颈背部多点注射免疫法。首次免疫使用佐剂为完全弗氏佐剂，加强免疫为弗氏不完全佐剂。加强免疫次数为4次。第一次免疫：每只新西兰大白兔免疫1mL首免制剂，每只大鼠免疫0.5mL首免制剂；加强免疫：从首次免疫开始计天数，每21天进行一次加强免疫，免疫剂量与第一次免疫相同。第五次免疫1周后，采血，收集血清。

[0053] 免疫制剂的制备方法包括：将RAC-BSA(浓度为1mg/ml)与弗氏佐剂/弗氏不完全佐剂按等体积混合并乳化。

[0054] 细胞融合方法：依托于聚乙二醇的化学诱导法。

[0055] 培养杂合杂交瘤细胞的方法包括：在含1％HAT培养基添加剂的DMEM高糖型完全培养液(80％DMEM高糖型不完全培养液+20％胎牛血清)中添加0.5％杂交瘤融合和克隆补充物(HFCS)用作正常培养基的补充物，以支持融合后和克隆过程中B细胞杂交瘤的生长。

[0056] 其中，DMEM高糖型完全培养液是指含20％胎牛血清的80％DMEM高糖型不完全培养液。

[0057] HAT培养基添加剂(50×)Hybri-Max，购自Sigma公司，所述HAT培养基添加剂为次黄嘌呤(H)、氨基蝶呤(A)和胸苷(T)的液体混合物。

[0058] DMEM高糖型不完全培养液为Gibco公司生产的DMEM basic(1×)高糖培养液，货号C11995500BT。

[0059] 克隆补充物(HFCS)购自Sigma公司，Hybridoma Fusion and Cloning Supplement(50×)，货号11363735001。

[0060] 基于高通量测序技术的单克隆抗体的制备方法包括：对阳性杂交瘤细胞进行转录组测序，获得抗体重链和轻链的编码序列，通过原核生物表达系统，获得大鼠和兔的单克隆抗体。

[0061] 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。若未特别指明，实施例均按照常规实验条件，如Sambrook等分子克隆实验手册(Sambrook J&Russell DW，Molecular Cloning:a Laboratory Manual,2001)，或按照制造厂商说明书建议的条件。

[0062] 实施例1大鼠与兔的免疫

[0063] 用PBS缓冲液将免疫原(RAC-BSA)的浓度调整为1mg/mL，用Bicinchoninic Acid法

确定免疫原的浓度。

[0064] 取5只新西兰大白兔，编号分别为RAC-BSA-1、RAC-BSA-2、RAC-BSA-3、RAC-BSA-4和RAC-BSA-5。取5只Wistar大鼠，编号分别为RAC-BSA-6、RAC-BSA-7、RAC-BSA-8、RAC-BSA-9和RAC-BSA-10。首次免疫乳化制剂的制备方法：取浓度为1mg/mL的免疫原4.0mL，然后与等体积的弗氏完全佐剂混合并乳化。加强免疫乳化制剂的制备方法：取浓度为1mg/mL的免疫原4.0mL，然后与等体积的弗氏不完全佐剂混合并乳化。将上述制备的乳化佐剂以多点分散注射的方式分别注射到兔和大鼠的颈背部(兔的免疫剂量为1mL/只，大鼠的免疫剂量为0.5mL/只)，在首次免疫完成后，每21天加强免疫一次，一共进行五次免疫。从第一次免疫开始，免疫1周后采血(兔子耳缘静脉血采血，每只采血0.5mL，大鼠尾静脉采血，每只采血0.3mL)，离心收集抗血清。

[0065] 实施例2大鼠与兔抗血清的筛选

[0066] 对免疫后一周所获得的抗血清进行效价和灵敏度的测定。测定抗血清效价所用的方法为间接ELISA；测定灵敏度所用的方法为间接竞争ELISA。

[0067] 间接ELISA步骤具体为：

[0068] 将包被原RAC-OVA用碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释为0.1μg/mL，以100μL/孔的量包被ELISA板，37℃孵育2h，然后用PBST溶液洗板3次。再用含量为2％的脱脂奶粉封闭ELISA板(150μL/孔)，37℃孵育1h，然后用PBST溶液洗涤3次，拍干。将抗血清用PBS进行梯度稀释，从1:4000稀释度开始，以2为梯度，共8个稀释度。在包被好的ELISA板中加入50μL PBS缓冲液和50μL梯度稀释的抗血清溶液，37℃温箱孵育30min，然后用PBST溶液洗涤3次，拍干。每孔加入100μL酶标二抗稀释液(辣根过氧化物酶标记的羊抗大鼠二抗/羊抗兔二抗)，37℃孵育30min，然后用PBST溶液洗涤3次，拍干。每孔加入100μL显色液(2％3,3’,5,5’-四甲基联苯胺溶液和30％过氧化氢等体积混合)，37℃孵育15min。每孔加入50μL 2mol/L浓硫酸。以OD_{450nm}波长测定各孔OD值，当OD值为1.5时的抗体的最高稀释倍数即为抗体效价。图1、图2分别为免疫过程中兔血清和大鼠血清效价变化曲线图。从第一次免疫至第五次免疫，抗血清效价呈现逐渐上升、然后趋向稳定的趋势。第五次免疫后，RAC-BSA-3和RAC-BSA-10的血清的效价最高，分别为80000和65000。

[0069] 在第五次免疫后，用间接竞争ELISA测定抗血清的灵敏度，具体步骤为：在包被好的ELISA板(见间接ELISA步骤)中加入50μL不同浓度的小分子竞争物(莱克多巴胺或者其结构类似物)和稀释后的抗血清溶液，37℃温箱孵育30min，然后用PBST溶液洗涤3次，拍干。酶标二抗标记、显色和终止步骤见上述间接ELISA。对试验所得数据进行处理，用四参数方程进行拟合，可得抗血清的半数抑制浓度(IC_{50})(表1)。由表1可知，RAC-BSA-3和RAC-BSA-10抗血清的IC_{50}较低，灵敏度较高，分别为0.52ng/mL，0.83ng/mL。因此选取RAC-BSA-3和RAC-BSA-10用来进行细胞融合试验。

[0070] 表1五免后检测抗血清的效价和半数抑制浓度

[0071]

实验动物编号	效价（$\times10^3$）	IC_{50}（ng/mL）
RAC-BSA-1	60	2.71
RAC-BSA-2	30	4.35
RAC-BSA-3	80	0.52
RAC-BSA-4	35	1.23

[0072]

RAC-BSA-5	65	0.86
RAC-BSA-6	60	2.13
RAC-BSA-7	30	6.15
RAC-BSA-8	15	1.42
RAC-BSA-9	15	2.68
RAC-BSA-10	65	0.83

[0073] 实施例3细胞融合与杂交瘤细胞的筛选

[0074] 1、融合前准备

[0075] 在融合前3天，对选定的RAC-BSA-3和RAC-BSA-10，用免疫原RAC-BSA对兔和大鼠进行腹腔冲击，兔的冲击剂量为500μg/只，鼠的冲击剂量为300μg/只。冲击3天后，对兔和大鼠进行消毒处理，取其脾脏，在生物安全柜中用筛网研磨脾脏，取其脾细胞，进行细胞融合试验。

[0076] 2、大鼠细胞融合

[0077] 通过细胞计数，将大鼠脾细胞(1×10^9)与瘤细胞SP2/0(1×10^8)(按照10:1的比例)的细胞悬液，混合于50mL离心管中，1500rpm离心5min，将离心管上清倒尽后，倒扣在吸水纸上，控干水滴。轻敲管底，使沉淀松散均匀呈糊状，将其放置于37℃水浴中，左手匀速转动离心管，右手持移液管吸取预温的50％的PEG(分子量为1450Da)为1.5mL，2min内沿管壁缓缓加入，然后静置1.5min。用吸管吸取预温的DMEM不完全培养液，沿管壁缓缓加到融合细胞上，边加边轻轻晃动离心管，第1min内加1mL，第2min内加2mL，剩下的7mL在3min内加完。加完后，接着沿管壁补加DMEM不完全培养液至35mL，加完后拧紧盖，缓慢颠倒几次，混匀。1500rpm离心5min，弃去上清，将融合完成后将杂交瘤细胞重悬到300mL含1％HAT和含0.5％HFCS的DMEM完全培养液，平均分散到30个96孔培养板(每孔加入100μL重悬液，尽量保证各孔有1个融合成功的细胞团)中，在37℃5％CO_2条件下培养。

[0078] 3、兔细胞融合

[0079] 兔融合与大鼠融合方法相似。由于兔脾细胞较多，故要增加铺板数目。即将离心去上清，将融合完成后将杂交瘤细胞重悬到500mL含1％HAT和含0.5％HFCS的DMEM完全培养液，平均分散到50个96孔培养板中，在37℃5％CO_2条件下培养。

[0080] 4、融合后筛选

[0081] 融合3天后，用胶头滴管向细胞板中加入含0.5％HFCS的DMEM完全培养液(100μL/孔)。融合后7天即可观察到融合细胞生长为小集落(图3)，此时对融合细胞进行阳性筛选。然后，用间接竞争ELISA方法对阳性细胞进行性质的鉴定：包括对靶标小分子的IC_{50}的测定以及对结构类似物的交叉反应率(CR)(见公式I)。选取效价较高，灵敏度较高的细胞孔36E9(兔-小鼠杂交瘤细胞)和12H8(大鼠-小鼠杂交瘤细胞)进行扩大培养。

[0082] 实施例4杂交瘤细胞转录组测定

[0083] 当上述性质确定的扩大培养细胞培养至细胞数目为5×10^6时，使用TRIzol Reagent充分裂解5×10^6个以上新鲜收集的杂交瘤细胞。保证总RNA浓度不低于100ng/μL，体积20μL以上，RNA条带清晰无明显降解。然后将样品置于液氮中，并测序。测序结果进行基因组比对(Genome mapping)、转录组比对(Transcriptome mapping)、转录组组装(Reference-free assembly)获得抗体重链和轻链序列。设计特异性引物，对重链和轻链编

码序列进行扩增，设计酶切位点，构建重组载体(出发载体为pet22b)，导入大肠杆菌进行单克隆抗体的表达，纯化、鉴定后获得兔和大鼠的单克隆抗体。经鉴定12H8和36E9的IC_{50}分别为0.026ng/mL和0.012ng/mL(图4和图5)。为探究抗体的特异性，进一步测定了12H8和36E9对10种莱克多巴胺结构类似物的交叉反应率，计算公式如下：

[0084] CR＝IC_{50}(莱克多巴胺)/IC_{50}(莱克多巴胺结构类似物)

[0085] 由表2可知，两株抗体12H8和36E9均为高特异性抗体，与其他10种莱克多巴胺的结构类似物的较差反应均小于1.3％。与已有的莱克多巴胺小鼠单克隆抗体相比，用杂合杂交瘤技术制备的兔和大鼠的杂交瘤细胞在灵敏度方面均有较大提升。

[0086] 表2兔和大鼠杂交瘤细胞12H8和36E9上清交叉反应率的测定

[0087]

	12H8		36E9	
	IC_{50} (ng/mL)	CR (%)	IC_{50} (ng/mL)	CR (%)
莱克多巴胺	0.026	100	0.012	100
菲诺特罗	2.36	1.1	0.92	1.3
班布特罗	>100	<0.03	>100	<0.02
溴布特罗	>100	<0.03	>100	<0.02
氯丙那林	>100	<0.03	>100	<0.02
盐酸克伦特罗	>100	<0.03	>100	<0.02
马布特罗	>100	<0.03	>100	<0.02
喷布特罗	>100	<0.03	>100	<0.02
盐酸利托菌	>100	<0.03	>100	<0.02
沙丁胺醇	>100	<0.03	>100	<0.02
妥布特罗	>100	<0.03	>100	<0.02

[0088] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之做一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 中国农业大学

<120> 基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法

<130> KHP191116133.6

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

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

210 215 220
Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro
225 230 235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr
245 250 255
Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser
260 265 270
Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg
275 280 285
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile
290 295 300
Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn
305 310 315 320
Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
325 330 335
Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu
340 345 350
Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe
355 360 365
Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala
370 375 380
Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr
385 390 395 400
Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly
405 410 415
Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
420 425 430
Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
435 440

<210> 2
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 2
Met Glu Lys Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Arg Thr Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Arg Ala Ser Glu Leu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Pro Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Ser Thr
85 90 95
Ser Asp Thr Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Lys Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ile Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125
Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
145 150 155 160
Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
180 185 190
Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
195 200 205
Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
210 215 220

<210> 3
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 3

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

85 90 95

Ala Arg Leu Leu Asp Thr Arg Phe Ala Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser

195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys

210 215 220

Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro

225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr

245 250 255

Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser

260 265 270

Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg

275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile

290 295 300

Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn

305 310 315 320

Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys

325 330 335

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu

340 345 350

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe

355 360 365

Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala

370 375 380

Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr

385 390 395 400

Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly
405 410 415
Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
420 425 430
Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
435 440

<210> 4
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 4

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

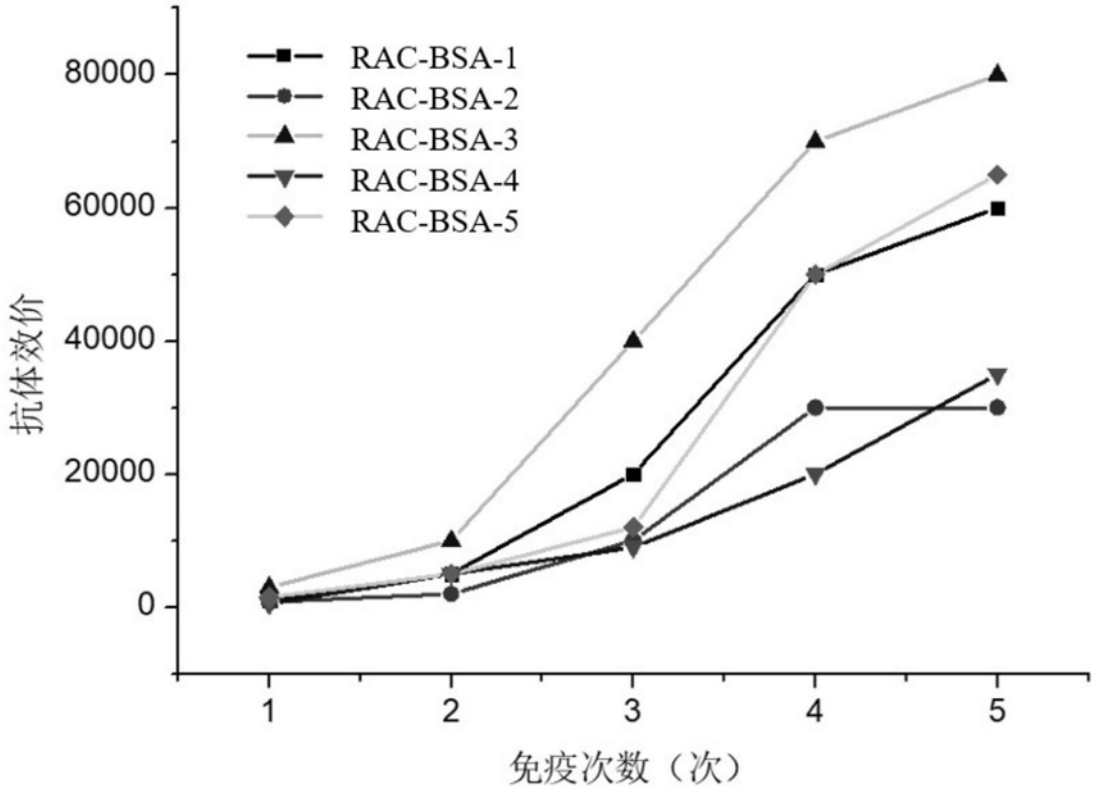

RAC-BSA-1
RAC-BSA-2
RAC-BSA-3
RAC-BSA-4
RAC-BSA-5
抗体效价
80000
60000
40000
20000
0
1
2
3
4
5
免疫次数（次）

图1

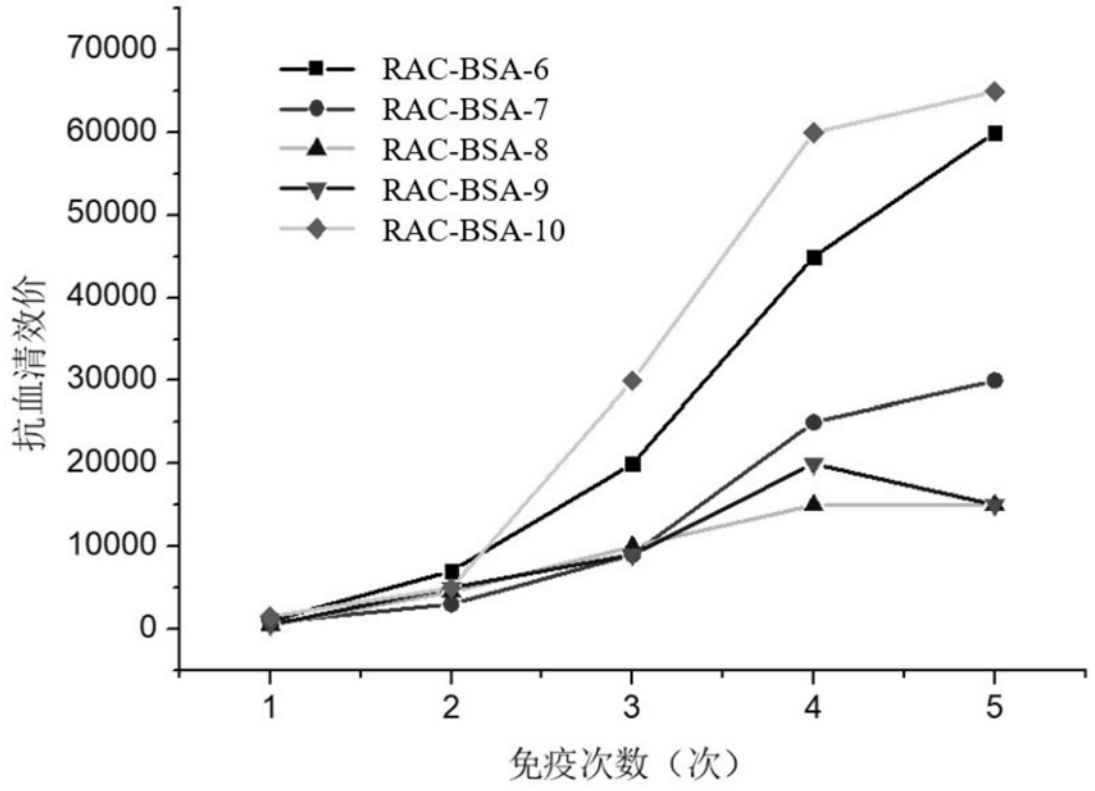

RAC-BSA-6
RAC-BSA-7
RAC-BSA-8
RAC-BSA-9
RAC-BSA-10
抗血清效价
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1
2
3
4
5
免疫次数（次）

图2

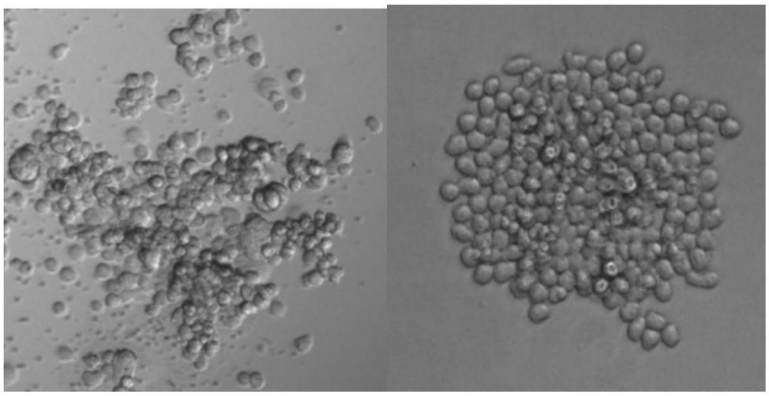


图3

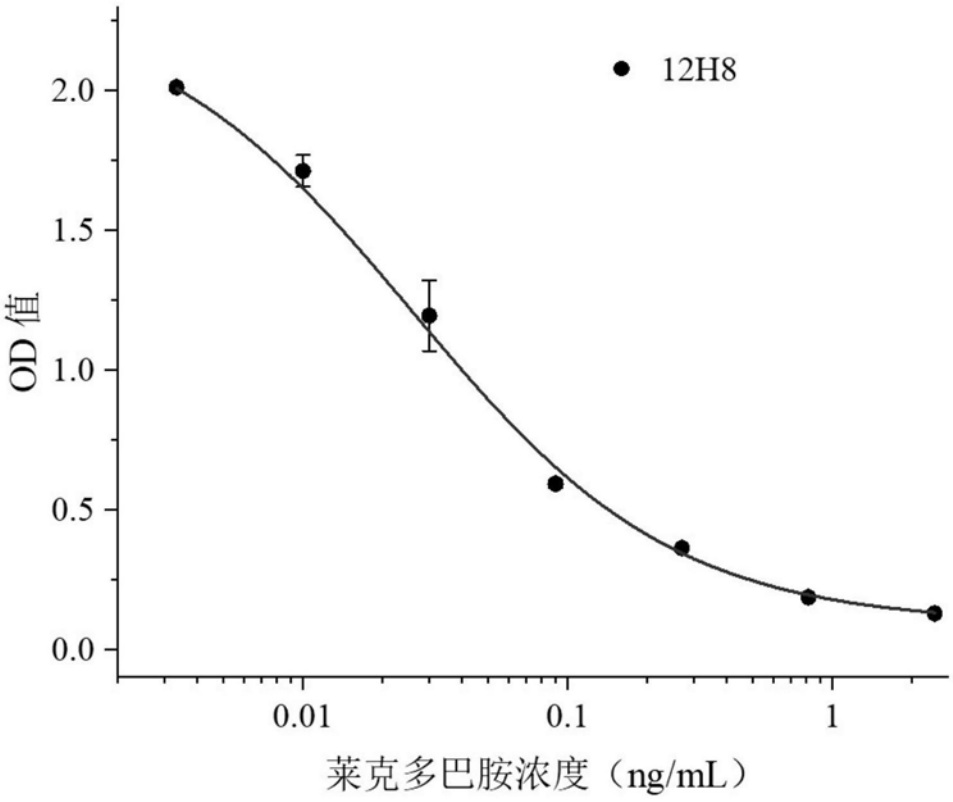


图4

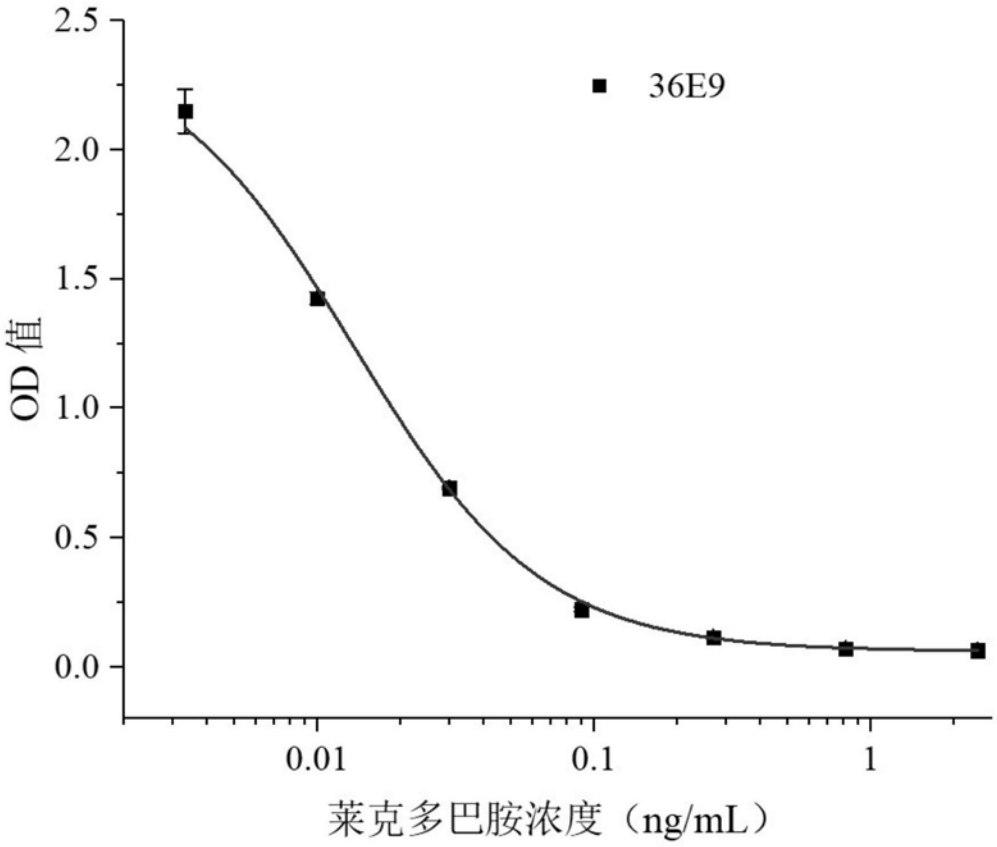
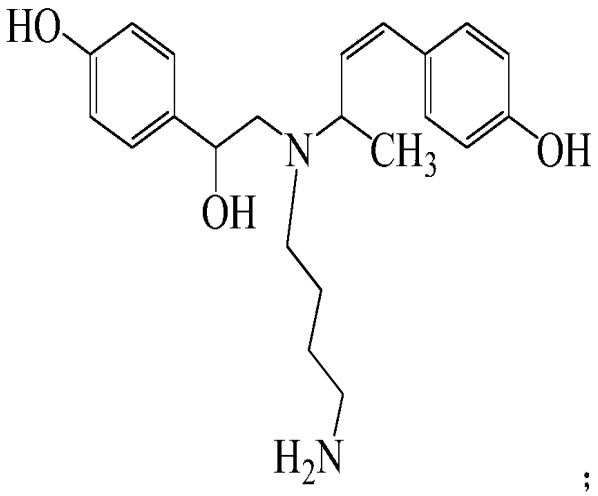


图5

专利名称(译)	基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN110950960A	公开(公告)日	2020-04-03
申请号	CN201911175958.3	申请日	2019-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 沈建忠 温凯 江海洋 于雪芝 余文博 李红芳 史为民		
发明人	王战辉 沈建忠 温凯 江海洋 于雪芝 余文博 李红芳 段长飞 史为民		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/33 G01N33/5308 G01N33/577		
代理人(译)	黄爽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于高通量测序和杂合杂交瘤技术的小分子化合物抗体的制备方法。包括：1)根据小分子化合物M的结构，设计半抗原，合成免疫原，免疫实验动物；然后收集动物血清测定效价，选取效价高的免疫动物提取B淋巴细胞；2)将B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合，得到杂合杂交瘤细胞；3)筛选阳性杂交瘤细胞并体外扩大培养；4)对阳性杂交瘤细胞进行转录组测序，获得抗体重链和轻链的编码序列，然后利用原核或真核表达系统，制备得到小分子化合物M的抗体。本发明有效解决了传统大鼠单克隆抗体腹水制备难以及兔瘤细胞来源受限的问题，最终获得高特异性、高灵敏度和高稳定性的单克隆抗体，该方法在科研与实际应用中具有十分广阔的前景。



;