



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107236045 A

(43)申请公布日 2017. 10. 10

(21)申请号 201710318112.5

C07H 1/00(2006.01)

(22)申请日 2017.05.08

(71)申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72)发明人 王芳 孙树汉 朱怡卿 刘岩

马金召 黄金凤 袁继行 杨富

薛赓

(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 赵青

(51)Int.Cl.

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C07H 19/167(2006.01)

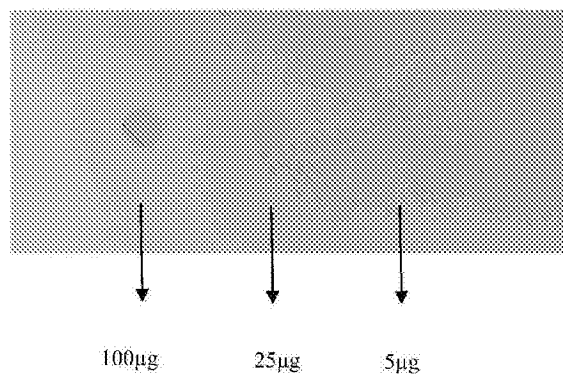
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

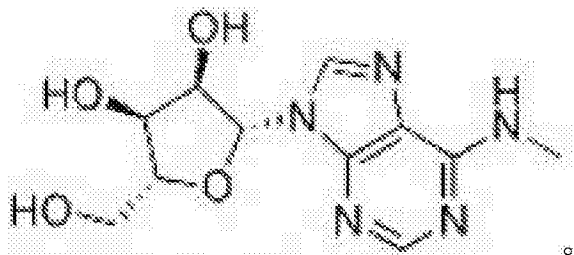
一种抗m6A单克隆抗体的制备方法

(57)摘要

本发明涉及医学生物工程领域,具体是一种抗RNA甲基化修饰方式m6A的单克隆抗体的制备方法,包括:以纳米磁珠为载体,通过纳米磁珠与m6A偶联制备抗原,以及利用该抗原制备m6A抗体。本发明通过纳米磁珠偶联的m6A来制备单克隆抗体,解决了小分子化合物免疫原性差的问题,制备了具有更加的亲和力和特异性的m6A单克隆抗体。用于研究RNA甲基化修饰对人类器官发育和肿瘤发生等生理及病理过程的调控作用,对基因表达的转录后调控机制及相关疾病的研究具有十分重大的意义。



1. 一种抗m6A单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括:步骤一,活化载体纳米磁珠;步骤二,以所述纳米磁珠为载体,通过与核苷偶联制备免疫原;步骤三,利用所述的免疫原制备m6A抗体;其中,所述的核苷是m6A,其化学结构如下式所示;所述的载体纳米磁珠:平均粒径为300-1000nm;表面氨基基团含量在 $\sim 200\mu\text{m}$;磁核为 Fe_3O_4 ;

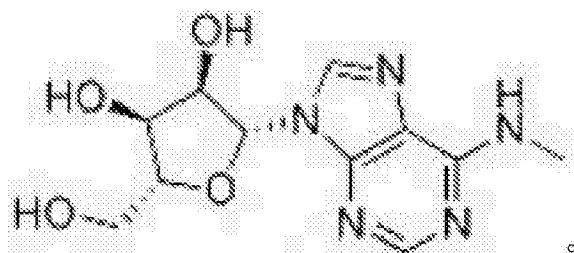


2. 根据权利要求1所述的抗m6A单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述的步骤一活化载体纳米磁珠的步骤包括:磁珠预处理,充分混匀磁珠后,取100 μL 磁珠到1mL EP管中,磁吸去除上清液,用200 μL PBS溶液洗涤3次,磁吸去上清;戊二醛活化,加入新鲜配制的质量体积比为15%的戊二醛溶液到EP管中,涡旋混匀,避光反应1h;活化后洗涤,磁珠活化后,磁吸去上清,用PBS缓冲液洗涤3次。

3. 根据权利要求1所述的抗m6A单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述的步骤二纳米磁珠与核苷偶联制备免疫原的步骤包括:向装有磁珠的EP管中加入200 μg m6A,轻柔混匀,避光反应3h;将EP管置于磁分离架上磁性分离去除上清液,加入200-1000 μL PBS溶液重悬磁珠,反应1h;将EP管置于磁性分离架上磁性分离去除上清液,用PBS洗涤3次后,重新悬浮于保存溶液中。

4. 根据权利要求1所述的抗m6A单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述的步骤三利用所述的免疫原制备m6A抗体的步骤包括:将纳米磁珠与核苷偶联物作为免疫原免疫小鼠;获取免疫小鼠的脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞融合;经过多轮筛选获得分泌识别m6A单分子的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;通过在小鼠体内接种所述的杂交瘤细胞生产腹水抗体,将腹水进行纯化,得到所述的抗m6A单克隆抗体。

5. 一种m6A偶联复合物,其特征在于,包括核苷及其偶联的载体纳米磁珠,其中核苷是m6A,其化学结构如下式所示;所述的载体纳米磁珠:平均粒径为300-1000nm;表面氨基基团含量在 $\sim 200\mu\text{m}$;磁核为 Fe_3O_4 ;



6. 根据权利要求5所述的m6A偶联复合物,其特征在于,所述的m6A偶联复合物的制备方法,包括以下步骤:

a) 磁珠预处理,充分混匀磁珠后,取100 μL 磁珠到1mL EP管中,磁吸去除上清液,用200 μL PBS溶液洗涤3次,磁吸去上清;

b) 戊二醛活化,加入新鲜配制的15%的戊二醛溶液到EP管中,涡旋混匀,避光反应1h;

- c) 活化后洗涤,磁珠活化后,磁吸去上清,用PBS缓冲液洗涤3次;
- d) 向装有磁珠的EP管中加入200 μ g m6A,轻柔混匀,避光反应3h;
- e) 将EP管置于磁分离架上磁性分离去除上清液,加入200-1000 μ L PBS溶液重悬磁珠,反应1h;
- f) 将EP管置于雌性分离架上磁性分离去除上清液,用PBS洗涤3次后,重新悬浮于保存溶液中。

一种抗m6A单克隆抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物工程技术领域,具体地说,是一种抗m6A单克隆抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 人类DNA和蛋白质上存在着丰富的化学修饰,其动态变化发挥着重要的作用,通过参与基因表达调控,决定细胞的状态,影响细胞的分化和发育。最新的研究表明, RNA中的化学修饰与DNA和蛋白质中的化学修饰相似,也在调控个体生命活动中发挥着重要的作用。其中, m6A是真核生物中最常见的RNA转录后修饰形式,也是近年来表观遗传学研究的热点。m6A是发生在碱基A第六位N原子上的甲基化修饰形式,其导致了超过80%的RNA碱基甲基化。越来越多的研究证实,基于m6A修饰的RNA甲基化调控通过调节mRNA及miRNA的剪接、转运、代谢,参与机体发育、代谢及繁殖的整个过程,并与多种疾病密切相关。目前,人们对RNA甲基化的动态变化的检测及在转录组中的分布研究主要依赖于基于m6A单克隆抗体的ELISA和MeRIP技术,因此,制备具有高特异性、高亲和力的m6A单克隆抗体十分重要。

[0003] m6A的分子量小于1000Da,属于仅有反应原性而无免疫原性的半抗原,难以通过常规的动物免疫制备抗体。目前,制备小分子半抗原抗体的一般方法是:通过共价键使半抗原与大分子质量蛋白质载体偶联,制备人工免疫原,经动物免疫程序制备特异性抗体。其中,涉及半抗原的设计,连接臂的引入及活性基团的选择等多个技术环节,工艺复杂。

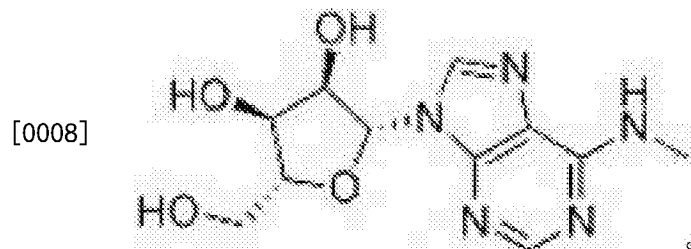
[0004] 因此,提供一种简单、易行的适用于m6A的抗体制备方法具有重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种抗RNA表观遗传修饰m6A的单克隆抗体的制备方法,用于解决现有技术中通过载体蛋白偶联m6A来制备m6A抗体技术工艺复杂成本高的问题。

[0006] 本发明的第一方面,提供一种抗m6A单克隆抗体的制备方法,包括:步骤一,活化载体纳米磁珠;步骤二,以所述纳米磁珠为载体,通过与核苷偶联制备免疫原;步骤三,利用所述的免疫原制备m6A抗体;

[0007] 其中,所述的核苷是m6A,其化学结构如下式所示;



[0009] 所述的载体纳米磁珠:平均粒径为300-1000nm;表面氨基基团含量在 $\sim 200\mu\text{m}$;磁核为 Fe_3O_4 。在本发明的优选实施方式中,所述的载体纳米磁珠选自由苏州海狸生物医学工程有限公司生产的NHS磁珠。

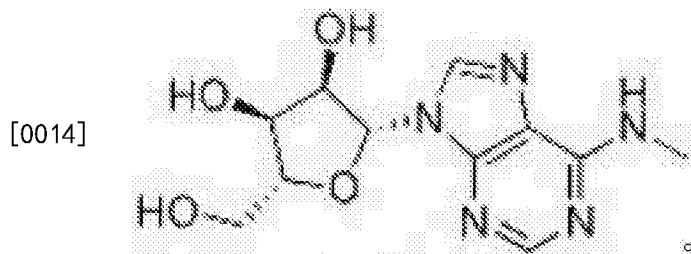
[0010] 所述的步骤一活化载体纳米磁珠的步骤包括:磁珠预处理,充分混匀磁珠后,取

100 μ L磁珠到1mL EP管中,磁吸去除上清液,用200 μ L PBS溶液洗涤 3次,磁吸去上清;戊二醛活化,加入新鲜配制的质量体积比为15%的戊二醛溶液到EP管中,涡旋混匀,避光反应1h;活化后洗涤,磁珠活化后,磁吸去上清,用PBS缓冲液洗涤3次。

[0011] 所述的步骤二纳米磁珠与核苷偶联制备免疫原的步骤包括:向装有磁珠的 EP管中加入200 μ g m6A,轻柔混匀,避光反应3h;将EP管置于磁分离架上磁性分离去除上清液,加入200-1000 μ L PBS溶液重悬磁珠,反应1h;将EP 管置于雌性分离架上磁性分离去除上清液,用PBS洗涤3次后,重新悬浮于保存溶液中。

[0012] 所述的步骤三利用所述的免疫原制备m6A抗体的步骤包括:将上述纳米磁珠与核苷偶联物作为免疫原免疫小鼠;获取免疫小鼠的脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞融合;经过多轮筛选获得分泌识别m6A单分子的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;通过在小鼠体内接种上述杂交瘤细胞生产腹水抗体,将腹水进行纯化,得到所述的抗m6A单克隆抗体。

[0013] 本发明的第二方面,提供一种m6A偶联复合物,包括核苷及其偶联的载体纳米磁珠,其中核苷是m6A,其化学结构如下式所示;所述的载体纳米磁珠:平均粒径为300-1000nm;表面氨基基团含量在 \sim 200 μ m;磁核为Fe₃O₄;



[0015] 所述的m6A偶联复合物的制备方法,包括以下步骤:

[0016] a) 磁珠预处理,充分混匀磁珠后,取100 μ L磁珠到1mL EP管中,磁吸去除上清液,用200 μ L PBS溶液洗涤3次,磁吸去上清;

[0017] b) 戊二醛活化,加入新鲜配制的戊二醛溶液(15%)到EP管中,涡旋混匀,避光反应1h;

[0018] c) 活化后洗涤,磁珠活化后,磁吸去上清,用PBS缓冲液洗涤3次;

[0019] d) 向装有磁珠的EP管中加入200 μ g m6A,轻柔混匀,避光反应3h;

[0020] e) 将EP管置于磁分离架上磁性分离去除上清液,加入200-1000 μ L PBS 溶液重悬磁珠,反应1h;

[0021] f) 将EP管置于雌性分离架上磁性分离去除上清液,用PBS洗涤3次后,重新悬浮于保存溶液中。

[0022] 本发明优点在于:

[0023] 本发明提供一种制备抗RNA表观遗传修饰m6A抗体简易、高效、廉价的方法,通过纳米磁珠偶联的m6A来制备单克隆抗体,解决了小分子化合物免疫原性差的问题,制备了具有更加的亲和力和特异性的m6A单克隆抗体。本发明方法制备的单克隆抗体可特异性识别吸附在硝酸纤维素膜上的变性状态下的m6A分子,实现准确、灵敏地监测RNA的甲基化水平的动态变化及 m6A在RNA转录物的分布,可用于研究RNA甲基化修饰对人类器官发育和肿瘤发生等生理及病理过程的调控作用,对基因表达的转录后调控机制及相关疾病的研究具有十分重大的意义。

附图说明

[0024] 图1是点杂交检测图,是纯化获得的抗体与不同稀释浓度m6A结合的点。

具体实施方式

[0025] 下面结合实施例对本发明提供的具体实施方式作详细说明。

[0026] 实施例1.m6A偶联复合物的制备:

[0027] 本发明将抗原m6A与纳米磁珠偶联,以偶联物作为免疫原,增强小分子 m6A的免疫原性。具体操作步骤如下:

[0028] a) 磁珠预处理,充分混匀磁珠后,取100 μ L磁珠到1mL EP管中,磁吸去除上清液,用200 μ L PBS溶液洗涤3次,磁吸去上清;

[0029] b) 戊二醛活化,加入新鲜配制的戊二醛溶液(15%)到EP管中,涡旋混匀,避光反应1h;

[0030] c) 活化后洗涤,磁珠活化后,磁吸去上清,用PBS缓冲液洗涤3次;

[0031] d) 向装有磁珠的EP管中加入200 μ g m6A,轻柔混匀,避光反应3h;

[0032] e) 将EP管置于磁分离架上磁性分离去除上清液,加入200-1000 μ L PBS 溶液重悬磁珠,反应1h;

[0033] f) 将EP管置于雌性分离架上磁性分离去除上清液,用PBS洗涤3次后,重新悬浮于保存溶液中。

[0034] 实施例2.抗m6A的单克隆抗体的制备和纯化

[0035] 1.抗原混合液的制备

[0036] 取25uI的m6A偶联复合物,加入25uI的生理盐水进行,成为50uI的抗原稀释液,与50uI的佐剂迅速混合,即100uI的抗原混合液(此为每只BABL/C 小鼠的免疫用量)。

[0037] 2.免疫动物

[0038] 本发明所用免疫动物为BALB/c小鼠,免疫佐剂为KX0210041,购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

[0039] 1) 腿部肌肉注射免疫BABL/C小鼠(100uI/只)。

[0040] 2) 每隔一个月进行重复免疫,免疫三次。

[0041] 3.单克隆抗体的制备和纯化

[0042] 将成功获得的抗原混合免疫鼠龄为8~12周的雌性BALB/c健康小鼠3只。采取小鼠快速免疫方式,将3只小鼠的脾脏混合进行融合。

[0043] 免疫反应最好的小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0)进行融合,融合后的细胞经过适当稀释,分置于96孔培养板中培养,培养10-14天进行ELISA 检测,挑选OD值高的孔中的细胞进行有限稀释法亚克隆。

[0044] 具体方法如下:

[0045] 1) 将有限稀释的细胞培养至96孔板中,待克隆生长到全孔的1/6时,标记单克隆及多克隆,对单克隆进行ELISA检测。

[0046] 2) ELISA检测后将OD值最高的单克隆再有限稀释接入96孔板中如上法所述再次亚克隆,此过程重复数次,直至阳性孔比率为100%,即认为此为单克隆。即通常认为的建株成

功的细胞株。

[0047] 3) 将筛选得到的阳性单克隆扩大培养, 细胞数按 $1-2 \times 10^6$ /管进行冻存。同时收集细胞安排腹水制备。

[0048] 4) 细胞株采用小鼠腹腔接种法制备腹水, 10-14天收集腹水, ELISA检测腹水是否制备成功。

[0049] 5) 腹水完成后采用ProteinA柱纯化腹水。

[0050] 实施例3. 抗m6A的单克隆抗体的点杂交检测

[0051] 分别将含有100 μ g、25 μ g、5 μ g的m6A核苷溶液点样于硝酸纤维素膜上, 待溶液吸干, 加封闭液于室温封闭至少1h; PBST洗液洗膜5次, 用所制备的单克隆抗体作为一抗, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。孵育结束后用PBST洗液洗膜5次, 抗体稀释液稀释HRP标记的抗小鼠二抗, 孵育1h, PBST洗液洗膜5次。用增强型HRP-DAB底物显色试剂盒进行显色, 结果如图1所示。

[0052] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明, 但本发明创造并不限于所述实施例, 熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可做出种种的等等的变型或替换, 这些等等的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

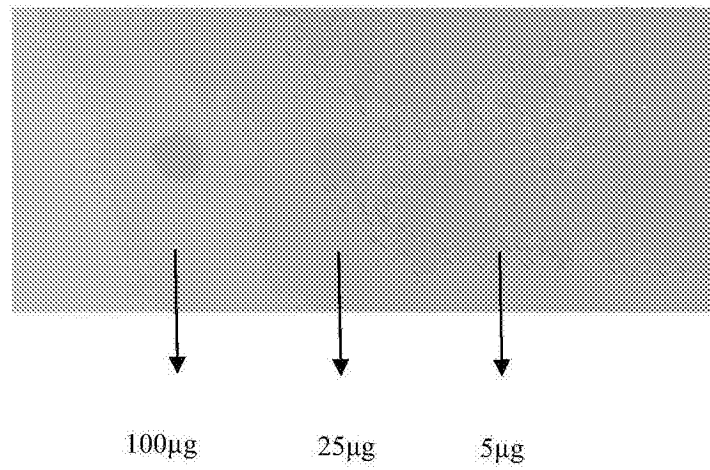


图1

专利名称(译)	一种抗m6A单克隆抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN107236045A	公开(公告)日	2017-10-10
申请号	CN2017110318112.5	申请日	2017-05-08
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	王芳 孙树汉 朱怡卿 刘岩 马金召 黄金凤 袁继行 杨富 薛赓		
发明人	王芳 孙树汉 朱怡卿 刘岩 马金召 黄金凤 袁继行 杨富 薛赓		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/577 G01N33/53 C07H19/167 C07H1/00		
CPC分类号	C07K16/44 C07H1/00 C07H19/167 C07K2317/92 G01N33/5308 G01N33/577		
代理人(译)	赵青		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学生物工程领域，具体是一种抗RNA甲基化修饰方式m6A的单克隆抗体的制备方法，包括：以纳米磁珠为载体，通过纳米磁珠与m6A偶联制备抗原，以及利用该抗原制备m6A抗体。本发明通过纳米磁珠偶联的m6A来制备单克隆抗体，解决了小分子化合物免疫原性差的问题，制备了具有更加的亲和力和特异性的m6A单克隆抗体。用于研究RNA甲基化修饰对人类器官发育和肿瘤发生等生理及病理过程的调控作用，对基因表达的转录后调控机制及相关疾病的研究具有十分重大的意义。

