(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114907472 A
(43)申请公布日 2022.08.16

(21)申请号 202210361550.0

(22)申请日 2022.04.07

(71)申请人 武汉爱博泰克生物科技有限公司
地址 430078 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路388号武汉光谷国际生物医药企业加速器1.1期7栋4层01室

(72)发明人 陈亮 张云 鲁晓晓 程威 吴海 吴知才

(74)专利代理机构 北京金智普华知识产权代理有限公司 11401
专利代理师 张晓博

(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

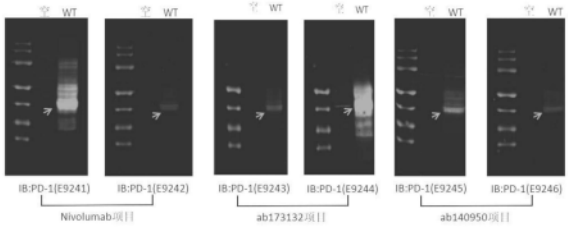
权利要求书1页 说明书10页
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

一种精准复制抗体的方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种精准复制抗体的方法及应用，所述方法通过选择市面抗体，将抗体与噬菌体展示多肽库建立对应关系，确定抗体识别的表位、解析所述表位、根据所述表位制备多肽抗原、免疫、抗体制备和抗体验证而实现市面上好用抗体的精准复制和抗体制备，该方法大大减少了抗体开发的时间和成本，能有效提高了抗体开发的成功率，对于抗体的开发和改进具有重要实践意义。



CN 114907472 A

1.一种精准复制抗体的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

S1、选择市面抗体,将抗体与噬菌体展示多肽库建立对应关系,确定抗体识别的表位;

S2、解析所述表位;

S3、根据所述表位,制备多肽抗原;

S4、用所述多肽抗原进行免疫复制抗体,采用多肽混合偶联载体蛋白和一条多肽偶联载体蛋白免疫方法;

S5、所述抗体的检测用样本制备;

S6、所述检测用样本检测方法采用WB检测或IHC检测。

2.根据权利要求1所述的一种精准复制抗体的方法,其特征在于,S1所述对应关系是采用AbMap(Antibody binding epitope Mapping)技术,建立抗体与表位的对应关系,确定抗体识别的表位(基序)。

3.根据权利要求1所述的一种精准复制抗体的方法,其特征在于,S2所述解析为解析表位多肽靠前的10-12个肽序列。

4.根据权利要求1所述的一种精准复制抗体的方法,其特征在于,S3所述多肽抗原是根据S2解析的肽序列结果,通过生化合成得到。

5.根据权利要求1所述的一种精准复制抗体的方法,其特征在于,S4所述免疫方法为:对兔子背部和腹部多点注射,即首次每只兔子750ug多肽抗原,之后每只兔子350ug抗原,每隔2周进行重复免疫,重复3次。

6.根据权利要求1所述的一种精准复制抗体的方法,其特征在于,S5所述检测用样本制备的方法为:将抗体基因克隆到设置有标签的pCDN3.1载体,测序正确后,进行无内毒素质粒提取,然后转染293T细胞,24小时后,用PBS缓冲液洗细胞一次,用Western及IP细胞裂解液裂解细胞,获得抗体检测用样本。

7.根据权利要求1所述的一种精准复制抗体的方法,其特征在于,S6所述WB检测方法为:将上述制备的细胞样本,SDS-PAGE电泳后,用电转仪将蛋白转移到NC膜上;之后,将NC膜置于5%的脱脂奶粉中,37℃封闭2小时;其次,将NC膜置于杂交袋中,加入1:1000稀释的兔抗血清2ml,37摄氏度振荡孵育2小时;之后,取出包被的NC膜用TBST洗涤3次,每次5-10min,加入1:10000稀释的IRDye800CW标记的驴抗兔二抗,37摄氏度振荡孵育1小时,TBST缓冲液洗6次,每次5-10min;最后,用Licor Odyssey Imaging System(LI-COR Biosciences)进行拍照。

8.根据权利要求1所述的一种精准复制抗体的方法,其特征在于,S6所述IHC检测方法包括:脱蜡水化、抗原修复、灭活、封闭、加入KI-67兔单抗室温孵育60min、加入即用型的HRP标记的羊抗兔二抗、显色、复染、封片以及镜检。

9.一种精准复制抗体方法的应用,其特征在于,将权1-8任一项所述的一种精准复制抗体的方法应用于抗体制备。

一种精准复制抗体的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术抗体制备领域，尤其涉及一种精准复制抗体的方法及应用。

背景技术

[0002] 抗体是一类能与抗原特异性结合的免疫球蛋白。在科研领域，抗体大量应用于WB、IF、IHC、FC、IP/CO-IP、ELISA等检测中；在IVD领域，抗体应用于免疫比浊、化学发光、胶体金、荧光免疫等检测中；在制药领域，随着抗体药技术的成熟，阻断/中和抗体大量应用于病人的治疗中。可见，抗体是生命科学、医学诊断、药学等相关领域最重要的试剂和药物之一，发挥着不可替代的作用。

[0003] 在科研和IVD领域，抗体主要由免疫动物获取，所产生的抗体，根据组分不同，分为单克隆抗体和多克隆抗体。由于单克隆抗体组分单一、特异性强、重现性高而被广泛应用。

[0004] 单克隆抗体制备，常用的有3种方法，一种是杂交瘤技术；一种是基于生物淘洗的抗体展示技术；一种是基于单个B细胞重组表达技术。这些技术均需要经过大量的筛选验证才能获得好用的抗体。

[0005] 由于免疫检测几乎完全依赖于抗体，这种发展趋势加重了我国抗体原料开发不足的危机，提高自身的核心抗体原料开发能力的压力到达了IT业对发展国产芯片业的程度。如何开发高品质抗体检测原料，一度成为“卡脖子”技术。为了获取市面好用的抗体，大多是基于靶点，制备抗原大量免疫动物，大量筛选验证，来确认抗体是否好用，该方法耗时耗力。还有一种是采用抗体复制的方法，现有技术是基于抗体测序，即采购所需抗体，运用质谱测序和数据库比对分析确定抗体序列，然后根据抗体序列，合成基因，重组表达获得抗体。基于质谱技术，复制产生的抗体，序列与商品化的抗体序列一致，会存在知识产权纠纷。同时，该方法对起始抗体的量(10mg)和纯度(大于90％)有一定要求，而且测序成本较高(15万人民币左右)，不利于规模化应用。

[0006] 现有技术公开了建立表位与抗体的对应关系，但没有提及根据表位，设计抗原(更未提及不同的抗原设计方案有何不同效果)，免疫动物后，制备抗体及对新制备的抗体进行功能验证。

[0007] 现有技术公开了表位多肽偶联到载体蛋白，免疫可以制备抗体，但没有提及如何建立抗体与表位的对应关系，也未提及根据表位如何有效设计抗原，以及不同抗原的设计方法最终产生的效果。

[0008] 现有技术公开了表位多肽可以串联起来，运用基因工程的方式进行重组表达制备蛋白，然后免疫制备抗体，但没有提及从抗体如何建立对应的表位多肽。

[0009] 因而开发一种可快速高效的复制市面上好用的抗体的方法，对于新抗体开发和改进具有重要意义。

发明内容

[0010] 本发明公开了一种精准复制抗体的方法，本发明采用以下技术方案：

[0011] 一种精准复制抗体的方法，所述方法包括以下步骤：

[0012] S1、选择市面抗体，将抗体与噬菌体展示多肽库建立对应关系，确定抗体识别的表位；

[0013] S2、解析所述表位；

[0014] S3、根据所述表位，制备多肽抗原(表位多肽)；

[0015] S4、用所述多肽抗原进行免疫复制抗体，采用多肽混合偶联载体蛋白和一条多肽偶联载体蛋白免疫方法；

[0016] S5、所述抗体的检测用样本制备；

[0017] S6、所述检测用样本WB检测或IHC检测。

[0018] 进一步地，S1所述对应关系是采用AbMap(Antibody binding epitope Mapping)技术，建立抗体与表位的对应关系，确定抗体识别的表位(基序)。

[0019] 进一步地，S2所述解析为解析表位多肽靠前的10-12个肽序列。

[0020] 进一步地，S3所述多肽抗原是根据S2解析的肽序列结果，通过生化合成得到。

[0021] 进一步地，S4所述免疫方法为：对兔子背部和腹部多点注射，即首次每只兔子750ug 多肽抗原，之后每只兔子350ug抗原，每隔2周进行重复免疫，重复3次。

[0022] 进一步地，S5所述检测用样本制备的方法为：将抗体基因克隆到设置有标签的pCDN3.1 载体，测序正确后，进行无内毒素质粒提取，然后转染293T细胞，24小时后，用PBS缓冲液洗细胞一次，用Western及IP细胞裂解液裂解细胞，获得抗体检测用样本。

[0023] 进一步地，S6所述WB检测方法为：将上述制备的细胞样本，SDS-PAGE电泳后，用电转仪将蛋白转移到NC膜上；之后，将NC膜置于5％的脱脂奶粉中，37℃封闭2小时；其次，将NC膜置于杂交袋中，加入1:1000稀释的兔抗血清2ml，37摄氏度振荡孵育2小时；之后，取出包被的NC膜用TBST洗涤3次，每次5-10min，加入1:10000稀释的IRDye800CW 标记的驴抗兔二抗，37摄氏度振荡孵育1小时，TBST缓冲液洗6次，每次5-10min；最后，用Licor Odyssey Imaging System(LI-COR Biosciences)进行拍照。

[0024] 进一步地，S6所述IHC检测方法包括：脱蜡水化、抗原修复、灭活、封闭、加入KI-67兔单抗室温孵育60min、加入即用型的HRP标记的羊抗兔二抗、显色、复染、封片以及镜检。

[0025] 一种精准复制抗体方法的应用，将上述任一项所述的一种精准复制抗体的方法应用于抗体制备。

[0026] 本发明提供了一种快速复制市面上好的抗体的方法，即：采购所需复制的抗体，将抗体与噬菌体展示多肽库建立对应关系，确定抗体识别的表位、解析所述抗体识别的表位(基序)然后根据该表位，设计蛋白或者多肽免疫，制备抗体，该方法大大减少了抗体开发的时间和成本，能有效提高抗体开发的成功率，由于重新免疫了，所制备出来的抗体与原始的抗体识别的抗原表位是相同的，但抗体的序列不同，因而该方法对于抗体的开发和改进具有重要实践意义。

附图说明

[0027] 图1为本发明多肽混合偶联载体蛋白KLH，免疫后复制的抗体WB检测示意图；

[0028] 图2为本发明表位多肽多次串联偶联载体蛋白KLH，免疫后复制的抗体WB检测示意图；

[0029] 图3为本发明重组表达制备抗原,免疫后复制的抗体WB检测示意图;

[0030] 图4为本发明一条多肽偶联载体蛋白KLH,免疫后复制的抗体IHC检测示意图。

具体实施方式

[0031] 一种精准复制抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0032] S1、选择市面抗体,将抗体与噬菌体展示多肽库建立对应关系,确定抗体识别的表位;

[0033] S2、解析所述表位;

[0034] S3、根据所述表位,制备多肽抗原(表位多肽);

[0035] S4、用所述多肽抗原进行免疫复制抗体,采用多肽混合偶联载体蛋白和一条多肽偶联载体蛋白免疫方法;

[0036] S5、所述抗体的检测用样本制备;

[0037] S6、所述检测用样本WB(免疫印迹)检测或IHC检测。

[0038] 进一步地,S1所述对应关系是采用AbMap(Antibody binding epitope Mapping)技术,建立抗体与表位的对应关系,确定抗体识别的表位(基序)。

[0039] 进一步地,S2所述解析为解析表位多肽靠前的10-12个肽序列。

[0040] 进一步地,S3所述多肽抗原是根据S2解析的肽序列结果,通过生化合成得到。

[0041] 进一步地,S4所述免疫方法为:对兔子背部和腹部多点注射,即首次每只兔子750ug 多肽抗原,之后每只兔子350ug抗原,每隔2周进行重复免疫,重复3次。

[0042] 进一步地,S5所述检测用样本制备的方法为:将抗体基因克隆到设置有标签的pCDN3.1 载体,测序正确后,进行无内毒素质粒提取,然后转染293T细胞,24小时后,用PBS缓冲液洗细胞一次,用Western及IP细胞裂解液裂解细胞,获得抗体检测用样本。

[0043] 进一步地,S6所述WB检测方法为:将上述制备的细胞样本,SDS-PAGE电泳后,用电转仪将蛋白转移到NC膜上;之后,将NC膜置于5%的脱脂奶粉(PBS缓冲液+0.5%Tween-20溶液)中,37℃封闭2小时;其次,将NC膜置于杂交袋中,加入1:1000稀释的兔抗血清 2ml,37摄氏度振荡孵育2小时;之后,取出包被的NC膜用TBST洗涤3次,每次5-10min,加入1:10000稀释的IRDye800CW标记的驴抗兔二抗(LI-COR Biosciences,Lincoln,USA), 37摄氏度振荡孵育1小时,TBST缓冲液洗6次,每次5-10min;最后,用Licor Odyssey Imaging System(LI-COR Biosciences)进行拍照。

[0044] 进一步地,S6所述IHC检测方法包括:脱蜡水化、抗原修复、灭活、封闭、加入KI-67兔单抗室温孵育60min、加入即用型的HRP标记的羊抗兔二抗、显色、复染、封片以及镜检。

[0045] 一种精准复制抗体方法的应用,将上述任一项所述的一种精准复制抗体的方法应用于抗体制备。

[0046] AbMap(Antibody binding epitope Mapping)技术,即抗体结合表位作图技术,建立抗体与表位的对应关系,确定抗体识别的表位的方法如下:

[0047] 通过免疫沉淀法,从噬菌体展示多肽文库中,富集能够与抗体样本相互作用的噬菌体,采用高通量测序技术,分别计算所有抗体样本中,每一多肽的富集倍数、所有抗体样本的噪音,去除不能与对应抗体样本相互作用的多肽序列,从而获得抗体样本识别的多肽序列,即得抗体与多肽的对应关系。其详细过程参见专利CN 109651506 A。

[0048] 首先,我们挑选了市面上3个不同来源的PD1抗体,采用AbMap(Antibody binding epitope Mapping)技术(见专利:CN 109651506 A;文献:The binding epitope of sintilimab on PD-1revealed by AbMap,Acta Biochim Biophys Sin,2021),建立抗体与表位的对应关系,具体地,解析的mimotope peptide靠前的10个12肽序列如下:

[0049]

PD1 (Nivolumab)		PD1 (ab173132)		PD1 (ab140950)	
序号	Peptides	序号	Peptides	序号	Peptides
1	TMNARQSPDRPA	1	ISVPRPWNPIQP	1	SQSFGTHIYARP
2	FRTENPALMPDF	2	QASVIDRPWNRP	2	YQSFSQPVDSSS
3	AQLTMRCYGLHC	3	MFEKPWNPTSLH	3	CQTYACDVVNRI
4	SPAAHWMEYLLR	4	SVRSQVDTPWNP	4	YFQSFRMPIFPR
5	HAELGPPRLIVR	5	DDTRPWNPHFRL	5	VSMQSFHAHVME
6	DDPSSWPAYLAR	6	SNMYRPWNPFLD	6	AGIVSKRFQLQP

[0050]

7	SMNPMWMDYIRR	7	APPQDDRPWNPS	7	HQSFGKLLASAV
8	SLRDSPDRPGFH	8	NLYRPWNPVPNV	8	TSCQTFMCSLDE
9	FRSSGANGPDWQ	9	NGNEYMARPWNP	9	WQSFGEYLEMPT
10	SPRTCPDLFCRH	10	MFPSLKPWNPKS	10	SWQSFHAALVSS

[0051] 相应的,解析出这三支抗体的表位对应如下:

[0052]

序号	抗体靶点	基序(表位)	来源	克隆号/货号
1	PD1	PDR	/	Nivolumab
2	PD1	RPWN	ABcam	ab173132
3	PD1	QSFxxxL	ABcam	ab140950

[0053] 根据表位,我们设计了四种方案,用于获取抗原,免疫动物,制备抗体,然后进行抗体验证。分别如下:

[0054] 实施例1

[0055] 方案一:用多肽混合偶联载体蛋白免疫方法,偶联KLH后免疫。

[0056] Nivolumab项目,ab173132项目,及ab140950项目,均根据解析出来的多肽抗原,从上海吉尔生化公司合成10条多肽抗原,多肽序列见下表一:

[0057]

	Nivolumab 项目	ab173132 项目	ab140950 项目
10 条多肽序列	1、T-Nle-NARQSPDRPA-C	1、ISVPRPWNPIQP-C	1、SQSFGTHIYARP-C
	2、FRTENPAL-Nle-PDFGGGS-C	2、QASVIDRPWNRP-C	2、YQSFSQPVDSSS-C
	3、AQLT-Nle-RSYGLH-C	3、Nle-FEKPWNPTSLH-C	3、SQTYASDVVNRI-C
	4、SPAAHW-Nle-EYLLR-C	4、SVRSQVDTPWNPGGGS-C	4、YFQSFR-Nle-PIFPR-C
	5、HAELGPPRLIVR-C	5、DDTRPWNPHFRL-C	5、VS-Nle-QSFHAHV-Nle-E-C
	6、DDPSSWPAYLAR-C	6、SN-Nle-YRPWNPFLD-C	6、AGIVSKRFQLQP-C
	7、S-Nle-NP-Nle-W-Nle-DYIR-C	7、APPQDDRPWNPS-C	7、HQSFGKLLASAV-C
	8、SLRDSPDRPGFH-C	8、NLYRPWNPVPNV-C	8、TSSQTF-Nle-SSLDE-C
	9、FRSSGANGPDWQ-C	9、NGNEY-Nle-ARPWNPGGGS-C	9、WQSFGEYLE-Nle-PT-C

[0058]

	10、SPRTSPDLFSRH-C	10、Nle-FPSLKPWNPKS-C	10、SWQSFHAALVSS-C

[0059] 完全抗原制备:三个项目均按照下列方法制备完全抗原。

[0060] a、将化学合成的10条多肽抗原,按照1:1的等摩尔比混合均匀,溶解于交联缓冲液(0.1M PB,0.15M NaCl)中,配制5ml浓度约4mg/ml的多肽溶液备用。

[0061] b、准确量取浓度6.15mg/ml的KLH载体蛋白(Merck,货号:374805)4ml。

[0062] c、称量10mg Sulfo-SMCC(Sigma,货号M6035),用2ml超纯水溶解配制成5mg/ml 的Sulfo-SMCC溶液。

[0063] d、将b和c2种溶液等体积混匀,用磁力搅拌器50-100rpm搅拌,室温(25℃)反应60min。

[0064] e、将d中反应完成的溶液装入10kD透析袋,在PBS(PH7.2)溶液中透析除去多余的Sulfo-SMCC。每隔3小时换液一次,换液3-4次。

[0065] f、将透析完成后的KLH加入a中,混合均匀,然后室温(25℃)放置4小时。

[0066] g、最后用10kD透析袋,在PBS(PH7.2)溶液中透析除去游离未偶联的多肽。每隔2小时换液一次,换液3-4次。透析完成后,用10kD的超滤管浓缩,将抗原浓度调整到约 1mg/ml,分装成1ml每管备用。

[0067] 免疫:3个项目,每个项目,免疫2只兔子。对兔子背部和腹部多点注射(首免每只兔子750ug多肽抗原,之后每只兔子350ug抗原),每隔2周进行重复免疫,重复3次,本实施例所用兔子为新西兰大白兔,首次免疫用完全佐剂(Sigma,货号:F5881),之后的免疫用不完全佐剂(北京博奥龙,货号:KX0210047Q-10)。

[0068] 采血:免疫结束后1周,取兔血清进行WB(免疫印迹)检测。Nivolumab项目,2只兔子的血清编号:E2941,E9242;ab173132项目,2只兔子的血清编号:E2943,E9244; ab140950项目,2只兔子的血清编号:E2945,E9246。

[0069] 抗体的检测用样本制备:将PD1基因克隆到pCDN3.1载体(N端添加Flag标签),测序正确后,进行无内毒素质粒提取,然后转染293T细胞,24小时后,用PBS缓冲液洗细胞一次,

用Western及IP细胞裂解液(碧云天,货号:P0013)裂解细胞,获得WT样本。同理,转染pCDN3.1空载体到293T细胞,24小时后,处理后获得empty vector样本。

[0070] 抗体的检测用样本WB检测:将上述制备的细胞样本,SDS-PAGE电泳后,用电转仪将蛋白转移到NC膜(硝酸纤维素膜)上;之后,将NC膜置于5%的脱脂奶粉(PBS缓冲液 +0.5% Tween-20溶液)中,37℃封闭2小时;其次,将NC膜置于杂交袋中,加入1:1000 稀释的兔抗血清2ml,37摄氏度振荡孵育2小时;之后,取出包被的NC膜用TBST缓冲液洗涤3次,每次5-10min。加入1:10000稀释的IRDye800CW(绿色荧光蛋白抗体)标记的驴抗兔二抗(LI-COR Biosciences,Lincoln,USA),37摄氏度振荡孵育1小时。TBST 洗6次,每次5-10min。最后,用Licor Odyssey Imaging System(LI-COR Biosciences) (红外荧光成像系统)进行拍照。

[0071] 结果如下:如图1,采用10条多肽抗原混合免疫,三个项目,6支兔子的抗血清,均获取了满足WB应用的抗血清。可见该方案比较合适用来制备抗体。

[0072] 实施例2

[0073] 方案二:选择短的基序多次串联(中间用gs Linker连接起来)免疫方法,偶联KLH后免疫。完全抗原制备:

[0074] 对于Nivolumab项目,设计多肽抗原:PDRgs-PDRgs-PDRgs-PDRgs-PDRgs-C;对于ab173132项目,设计多肽抗原:RPWNgs-RPWNgs-RPWNgs-RPWNgs-C;对于ab140950项目,设计多肽抗原:QSFGEYLgsQSFGKLLgsQSFHAAL-C。将这三条多肽送上海吉尔生化公司合成,之后,按照实施例1中的方法,将多肽抗原与KLH偶联。

[0075] 免疫:3个项目,每个项目,免疫2只兔子。对兔子背部和腹部多点注射(首免每只兔子750ug多肽抗原,之后每只兔子350ug抗原),每隔2周进行重复免疫,重复3次,本实施例所用兔子为新西兰大白兔,首次免疫用完全佐剂(Sigma,货号:F5881),之后的免疫用不完全佐剂(北京博奥龙,货号:KX0210047Q-10)。

[0076] 采血:免疫结束后1周,取兔血清进行WB检测。Nivolumab项目,2只兔子的血清编号:E2947,E9248;ab173132项目,2只兔子的血清编号:E2949,E9250;ab140950项目, 2只兔子的血清编号:E2951,E9252。

[0077] 抗体的检测用样本制备:将PD1基因克隆到pCDN3.1载体(N端添加Flag标签),测序正确后,进行无内毒素质粒提取,然后转染293T细胞,24小时后,用PBS缓冲液洗细胞一次,用Western及IP细胞裂解液(碧云天,货号:P0013)裂解细胞,获得WT样本。同理,转染pCDN3.1空载体到293T细胞,24小时后,处理后获得empty vector样本。

[0078] 抗体的检测用样本WB检测:将上述制备的细胞样本,SDS-PAGE电泳后,用电转仪将蛋白转移到NC膜上;之后,将NC膜置于5%的脱脂奶粉(PBS+0.5%Tween-20溶液)中, 37℃封闭2小时;其次,将NC膜置于杂交袋中,加入1:1000稀释的兔抗血清2ml,37摄氏度振荡孵育2小时;之后,取出包被的NC膜用TBST洗涤3次,每次5-10min。加入 1:10000稀释的IRDye800CW标记的驴抗兔二抗(LI-COR Biosciences,Lincoln,USA), 37摄氏度振荡孵育1小时。TBST洗6次,每次5-10min。最后,用Licor Odyssey Imaging System(LI-COR Biosciences)进行拍照。

[0079] 结果如下:如图2,采用基序多次串联免疫,三个项目,6支兔子的抗血清,ab173132项目2支兔子获取了满足WB应用的抗血清,Nivolumab项目仅1支兔子获得了满足WB应用的抗血清,而ab140950项目2支兔子均产生的是非特异性的抗体。可见该方案不太适合用于精

准抗体复制。

[0080] 实施例3

[0081] 方案三:表位串联后,根据氨基酸合成基因,将基因克隆到表达载体,重组表达制备抗原后进行免疫。

[0082] 对于Nivolumab项目,10条多肽抗原串联后(多肽间用ggggs linker连接),对应的氨基酸序列一如下:

[0083] DDPSSWPAYLARggggsHAELGPPRLIVRggggsTMNARQSPDRPAggggsAQLTMRSYGLHSggggsFRTEN PALMPDFggggsSLRDSPDRPGFHggggsSPAAHWMEYLLRggggsSPRTSPDLFSRHggggsSLRDSPDRPGFHgg ggsFRSSGANGPDWQ

[0084] 根据氨基酸序列,原核密码子优化,合成出基因序列,对应的,核苷酸序列一如下:

[0085] GATGATCCATCTTCTTGGCCTGCTTATCTGGCTCGTGGTGGTGGTGGTTCTCATGCAGAACTGGGTCCGCCGC GTCTGATTGTTCGTGGTGGTGGTGGCTCTACTATGAACGCTCGTCAGTCCCCAGATCGTCCGGCTGGTGGTGGTGGT TCTGCTCAACTGACCATGCGCTCTTACGGCCTGCATTCTGGTGGTGGTGGCAGCTTCCGCACTGAAAACCCGGCTCT GATGCCAGACTTCGGCGGTGGTGGTAGCTCTCTGCGTGATTCCCCGGATCGTCCAGGTTTCCATGGTGGTGGTGGTT CTTCTCCGGCGGCTCATTGGATGGAATATCTGCTGCGTGGTGGTGGTGGTAGCTCTCCTCGTACTTCTCCGGATCTG TTCTCCCGCCATGGTGGTGGTGGCTCTTCCCTGCGTGATTCCCCGGATCGTCCGGGTTTTCACGGCGGTGGTGGCTC TTTCCGTTCTTCCGGTGCCAACGGCCCGGATTGGCAG

[0086] ab173132项目,10条多肽抗原串联后(多肽间用ggggs linker连接),对应的氨基酸序列二如下:

[0087] SVRSQVDTPWNPggggsDDTRPWNPHFRLggggsAPPQDDRPWNPSggggsMFPSLKPWNPKSggggsNLYRP WNPVPNVggggsMFEKPWNPTSLHggggsQASVIDRPWNRPggggsISVPRPWNPIQPggggsSNMYRPWNPFLDgg ggsNGNEYMARPWNP

[0088] 根据氨基酸序列,原核密码子优化,合成出基因序列,对应的,核苷酸序列二如下:

[0089] TCTGTTCGTTCCCAAGTAGATACTCCTTGGAACCCAGGCGGTGGTGGTTCTGACGATACCCGTCCGTGGAATC CGCACTTTCGTCTGGGTGGTGGTGGTAGCGCACCACCACAAGATGACCGTCCGTGGAATCCGTCTGGCGGTGGTGGT TCTATGTTCCCGTCCCTGAAACCGTGGAACCCAAAATCTGGTGGTGGTGGTTCTAACCTGTACCGTCCGTGGAATCC GGTTCCGAACGTGGGTGGCGGTGGTTCTATGTTCGAGAAACCGTGGAACCCGACCTCTCTGCATGGTGGTGGTGGCA GCCAGGCTTCTGTTATCGATCGCCCGTGGAATCGTCCAGGTGGTGGTGGTTCTATTTCCGTTCCGCGTCCGTGGAAT CCTATTCAGCCGGGTGGCGGCGGCTCTTCTAACATGTACCGTCCGTGGAACCCGTTTCTGGACGGTGGTGGCGGTTC CAACGGTAACGAATACATGGCCCGTCCGTGGAACCCA

[0090] ab140950项目,10条多肽抗原串联后(多肽间用ggggs linker连接),对应的氨基酸序列三如下:

[0091] AGIVSKRFQLQPggggsSQSFGTHIYARPggggsYQSFSQPVDSSSggggsSQTYASDVVNRIggggsYFQSFRMPI FPRggggsSWQSFHAALVSSggggsWQSFGEYLEMPTggggsTSSQTFMSSLDEggggsHQSFGKLLASAVggggsV SMQSFHAHVME

[0092] 根据氨基酸序列,原核密码子优化,合成出基因序列,对应的,核苷酸序列三如下:

[0093] GCTGGCATCGTTTCTAAACGTTTTCAGCTGCAACCGGGTGGTGGTGGCTCTTCTCAGTCTTTCGGCACTCACA TTTATGCGCGCCCTGGTGGTGGTGGTTCTTACCAGAGCTTCTCTCAGCCGGTTGACTCTAGCTCTGGTGGTGGTGGT AGCTCCCAGACCTACGCGTCCGATGTAGTTAATCGCATCGGCGGTGGCGGTTCCTACTTTCAGAGCTT

CCGTATGCC GATTTTTCCGCGCGGTGGTGGTGGTTCCTCTTGGCAATCCTTCCACGCGGCACTGGTTTCTAGCGG CGGTGGTGGTT CCTGGCAGTCTTTCGGCGAATACCTGGAAATGCCGACGGGCGGTGGTGGCTCTACTTCTAGCCA GACCTTTATGTCC TCCCTGGACGAAGGTGGTGGCGGTTCCCATCAGAGCTTCGGTAAACTGCTGGCATCCGCAGT AGGTGGTGGTGGCTC CGTATCTATGCAGTCTTTTCACGCACACGTTATGGAA

[0094] 完全抗原制备:分别将上述三个基因克隆到pGEX-4T原核表达载体,同时克隆时,基因C端引入6xhis标签。克隆测序正确后,将质粒分别转化到BL21(DE3)菌株中,接菌培养,当OD值达到0.5左右时,用终浓度0.01mol/L的IPTG,37℃诱导表达4h,然后收菌、重悬后破菌、离心收集上清。之后用Ni-his亲和纯化,将洗脱下来的蛋白,透析到PBS 溶液,然后浓缩成1mg/ml浓度备用。

[0095] 免疫:3个项目,每个项目,免疫2只兔子。对兔子背部和腹部多点注射(首免每只兔子400ug蛋白抗原,之后每只兔子200ug抗原),每隔2周进行重复免疫,重复3次,本实施例所用兔子为新西兰大白兔,首次免疫用完全佐剂(Sigma,货号:F5881),之后的免疫用不完全佐剂(北京博奥龙,货号:KX0210047Q-10)。

[0096] 采血:免疫结束后1周,取兔血清进行WB检测。Nivolumab项目,2只兔子的血清编号:E9516,E9517;ab173132项目,2只兔子的血清编号:E9283,E9284;ab140950项目, 2只兔子的血清编号:E2981,E9282。

[0097] 抗体的检测用样本制备:将PD1基因克隆到pCDN3.1载体(N端添加Flag标签),测序正确后,进行无内毒素质粒提取,然后转染293T细胞,24小时后,用PBS缓冲液洗细胞一次,用Western及IP细胞裂解液(碧云天,货号:P0013)裂解细胞,获得WT样本。同理,转染pCDN3.1空载体到293T细胞,24小时后,处理后获得empty vector样本。

[0098] 抗体的检测用样本WB检测:将上述制备的细胞样本,SDS-PAGE电泳后,用电转仪将蛋白转移到NC膜上;之后,将NC膜置于5%的脱脂奶粉(PBS+0.5%Tween-20溶液)中, 37℃封闭2小时;其次,将NC膜置于杂交袋中,加入1:1000稀释的兔抗血清2ml,37摄氏度振荡孵育2小时;之后,取出包被的NC膜用TBST洗涤3次,每次5-10min。加入 1:10000稀释的IRDye800CW标记的驴抗兔二抗(LI-COR Biosciences,Lincoln,USA), 37摄氏度振荡孵育1小时。TBST洗6次,每次5-10min。最后,用Licor Odyssey Imaging System(LI-COR Biosciences)进行拍照。

[0099] 结果如下:如图3,采用基序多次串联免疫,三个项目,6支兔子的抗血清,仅ab140950 项目的2支兔子获得了满足WB应用的抗血清,而Nivolumab项目和ab173132项目各2支兔子均产生的是非特异性的抗体。可见该方案也不适合用于精准抗体复制。

[0100] 实施例4

[0101] 方案四:根据抗体,解析对应的表位后,用一条多肽偶联载体蛋白免疫方法。

[0102] 根据市面上Ki-67抗体(克隆号SP6),我们解析出其对应基序为:QxxxxLAG,根据基序我们设计了一条多肽抗原:TPKEKAQALEDLAGFKELFQTP-C,送上海吉尔公司合成该多肽后,采用实施例1中的方法,将该多肽抗原与KLH偶联,制备成完全抗原。

[0103] 免疫:对兔子背部和腹部多点注射(首免每只兔子750ug多肽抗原,之后每只兔子350ug 抗原),每隔2周进行重复免疫,重复3次,本实施例所用兔子为新西兰大白兔,首次免疫用完全佐剂(Sigma,货号:F5881),之后的免疫用不完全佐剂(北京博奥龙,货号:KX0210047Q-10)。一共免疫2只兔子。

[0104] 抗体的检测用样本制备:免疫结束后,采血清验证抗体效价,选择效价高的一支兔子牺牲,取脾脏,用本公司的单个B细胞兔单抗技术(兔单抗制备流程可参考本公司发明专利CN 111499746 A),制备抗体。

[0105] 抗体验证:由于该抗体主要做IHC检测,所以我们也采用IHC的方法对制备的抗体进行验证。

[0106] 方法如下:

[0107] a.脱蜡水化:将石蜡切片连同切片架一起放入脱蜡液(江原,货号:201029)1缸中,再一起从恒温箱中取出置于常温,5min后,将切片取出浸入到常温脱蜡液2缸中,并按照脱蜡液2、脱蜡液3、无水乙醇1、无水乙醇2、无水乙醇3的顺序依次将石蜡切片放入缸中,脱蜡液试剂缸每缸5min,无水乙醇试剂缸每缸3min;再用流水清洗切片3min。

[0108] b.抗原修复:在高压锅中,加入抗原修复液(0.01M柠檬酸+0.3%二水合柠檬酸三钠, pH6.0),高火预热;待修复液沸腾后将切片置于其中,并完全浸泡组织,盖好锅盖,扣上压力阀,高火继续加热;待限压阀开始转动喷气后调至中火,同时开始计时2min;计时结束后离开热源,自然降压后将高压锅移入冷水中缓慢冷却。待修复液温度降至室温。

[0109] c.灭活:用PBS缓冲液浸洗3次,每次1min,去除切片上的缓冲液;将切片完全浸入到3%过氧化氢溶液中,室温,孵育10min。

[0110] d.密封:用PBS缓冲液浸洗3次,每次3min,去除切片上的缓冲液;在样本上滴加封闭液(5%空白山羊血清,博士德生物,货号:AR1009);将切片水平放置在底部呈有水的孵育湿盒中,于常温孵育30min。

[0111] e.一抗孵育:去掉封闭液,每个切片上加1:150倍用封闭液稀释的KI-67兔单抗,于常温孵育60min;去除抗体工作液,PBS缓冲液快速漂洗1次,用缓冲液PBS浸泡洗涤3 次,每次3min。

[0112] f.二抗孵育:在组织切片上滴加HRP标记的即用型羊抗兔二抗(Dako REAL EnVision Detection System,Peroxidase,货号:K400311-2)工作液后,水平放置于孵育湿盒中,于常温孵育25min;去除切片上的试剂,缓冲液PBS快速漂洗1次,用缓冲液PBS浸泡洗涤3次,每次3min。

[0113] g.显色:在组织切片上滴加显色液(DAKO,货号:K5007)工作液,显微镜下密切观察颜色变化情况,得到合适的染色强度后;将切片浸入大量蒸馏水中即可终止显色;终止显色后,将切片入流水中清洗10min。

[0114] h.复染:将稍沥干的切片浸入Mayer's苏木素(AppliChem,货号:254766.1611) 中复染切片2分钟,复染完成后,用流水清洗3分钟;将稍沥干的切片浸入碳酸锂饱和水溶液中蓝化3s,用流水清洗3分钟。

[0115] i.封片:将清洗后的切片于无水乙醇中浸泡1次,浸泡期间需上下提拉数次,计时10 秒后,取出;置于恒温鼓风干燥箱中高温(55℃-60℃)下完全干燥;在切片中心滴加适量中性树胶(国药,货号10004160),并加盖盖玻片。

[0116] j.镜检:用显微镜观察并拍照。

[0117] 结果分析:扁桃体作为阳性和阴性组织对照,在生发中心的暗区几乎所有的B细胞都必须表现出中等到强的核染色反应,而在明区的大多数B细胞中至少可以看到弱到中等的染色反应。可见该方案适合用于精准抗体复制。

[0118] 通过上述实施例对比说明，采用多肽混合偶联载体蛋白和一条多肽偶联载体蛋白免疫方法适合用于精准抗体复制。

[0119] 以上实施例对本发明进行了进一步阐述和说明，以上实施例的说明只是用于帮助理解本申请的方法及其核心思想，对于本领域的一般技术人员，依据本申请的思想，在具体实施方式及应用范围上均会有改变之处，本说明书内容不应理解为对本申请的限制。

序列表

<110> 武汉爱博泰克生物科技有限公司

<120> 一种精准复制抗体的方法及应用

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

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

<210> 2

<211> 495

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gatgatccat cttcttggcc tgcttatctg gctcgtggtg gtggtggttc tcatgcagaa 60

ctgggtccgc cgcgtctgat tgttcgtggt ggtggtggct ctactatgaa cgctcgtcag 120
tccccagatc gtccggctgg tggtggtggt tctgctcaac tgaccatgcg ctcttacggc 180
ctgcattctg gtggtggtgg cagcttccgc actgaaaacc cggctctgat gccagacttc 240
ggcggtggtg gtagctctct gcgtgattcc ccggatcgtc caggtttcca tggtggtggt 300
ggttcttctc cggcggctca ttggatggaa tatctgctgc gtggtggtgg tggtagctct 360
cctcgtactt ctccggatct gttctcccgc catggtggtg gtggctcttc cctgcgtgat 420
tccccggatc gtccgggttt tcacggcggt ggtggctctt tccgttcttc cggtgccaac 480
ggcccggatt ggcag 495

<210> 3
<211> 165
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 3

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

<210> 4
<211> 495
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 4
tctgttcgtt cccaagtaga tactccttgg aacccaggcg gtggtggttc tgacgatacc 60
cgtccgtgga atccgcactt tcgtctgggt ggtggtggta gcgcaccacc acaagatgac 120
cgtccgtgga atccgtctgg cggtggtggt tctatgttcc cgtccctgaa accgtggaac 180
ccaaaatctg gtggtggtgg ttctaacctg taccgtccgt ggaatccggt tccgaacgtg 240
ggtggcggtg gttctatgtt cgagaaaccg tggaacccga cctctctgca tggtggtggt 300
ggcagccagg cttctgttat cgatcgcccg tggaatcgtc caggtggtgg tggttctatt 360
tccgttccgc gtccgtggaa tcctattcag ccgggtggcg gcggctcttc taacatgtac 420
cgtccgtgga acccgtttct ggacggtggt ggcggttcca acggtaacga atacatggcc 480
cgtccgtgga accca 495

<210> 5
<211> 165
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 5
Ala Gly Ile Val Ser Lys Arg Phe Gln Leu Gln Pro Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Ser Gln Ser Phe Gly Thr His Ile Tyr Ala Arg Pro Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Ser Tyr Gln Ser Phe Ser Gln Pro Val Asp Ser Ser Ser Gly Gly
35 40 45
Gly Gly Ser Ser Gln Thr Tyr Ala Ser Asp Val Val Asn Arg Ile Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Ser Tyr Phe Gln Ser Phe Arg Met Pro Ile Phe Pro Arg
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Trp Gln Ser Phe His Ala Ala Leu Val Ser
85 90 95
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Trp Gln Ser Phe Gly Glu Tyr Leu Glu Met
100 105 110
Pro Thr Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Ser Gln Thr Phe Met Ser Ser
115 120 125
Leu Asp Glu Gly Gly Gly Gly Ser His Gln Ser Phe Gly Lys Leu Leu
130 135 140
Ala Ser Ala Val Gly Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Gln Ser Phe His
145 150 155 160
Ala His Val Met Glu
165

<210> 6
<211> 495

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gctggcatcg tttctaaacg ttttcagctg caaccgggtg gtggtggctc ttctcagtct 60
ttcggcactc acatttatgc gcgccctggt ggtggtggtt cttaccagag cttctctcag 120
ccggttgact ctagctctgg tggtggtggt agctcccaga cctacgcgtc cgatgtagtt 180
aatcgcatcg gcggtggcgg ttcctacttt cagagcttcc gtatgccgat ttttccgcgc 240
ggtggtggtg gttcctcttg gcaatccttc cacgcggcac tggtttctag cggcggtggt 300
ggttcctggc agtctttcgg cgaatacctg gaaatgccga cgggcggtgg tggctctact 360
tctagccaga cctttatgtc ctccctggac gaaggtggtg gcggttccca tcagagcttc 420
ggtaaactgc tggcatccgc agtaggtggt ggtggctccg tatctatgca gtcttttcac 480
gcacacgtta tggaa 495

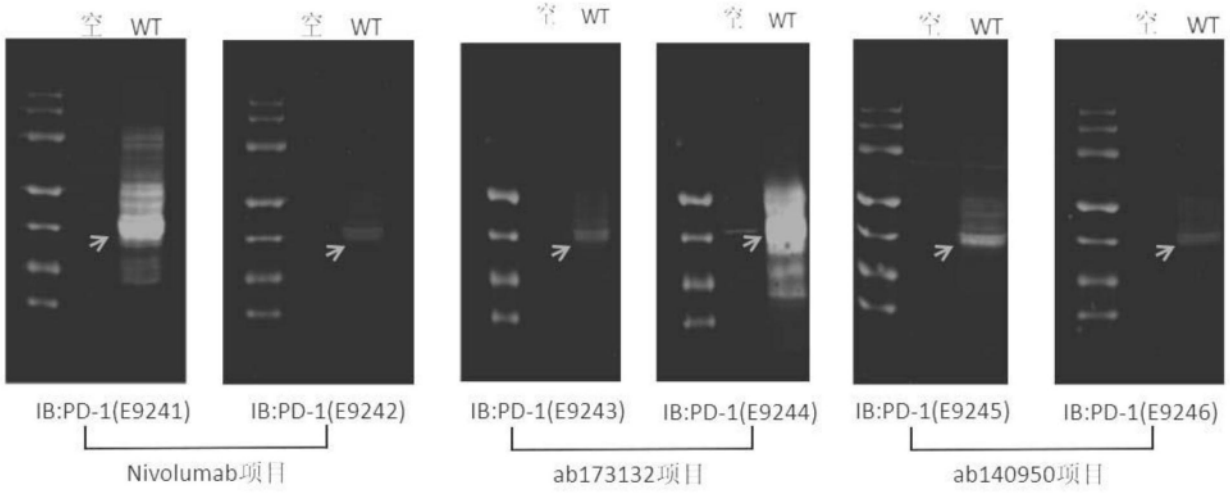

空
WT
IB:PD-1(E9241)
IB:PD-1(E9242)
IB:PD-1(E9243)
IB:PD-1(E9244)
IB:PD-1(E9245)
IB:PD-1(E9246)
Nivolumab项目
ab173132项目
ab140950项目

图1

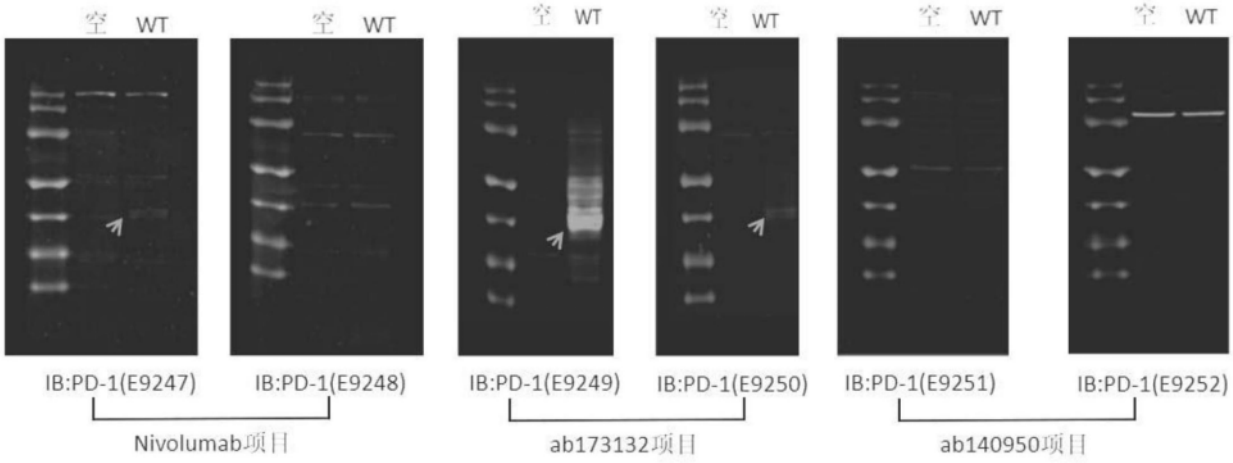

空
WT
IB:PD-1(E9247)
IB:PD-1(E9248)
IB:PD-1(E9249)
IB:PD-1(E9250)
IB:PD-1(E9251)
IB:PD-1(E9252)
Nivolumab项目
ab173132项目
ab140950项目

图2

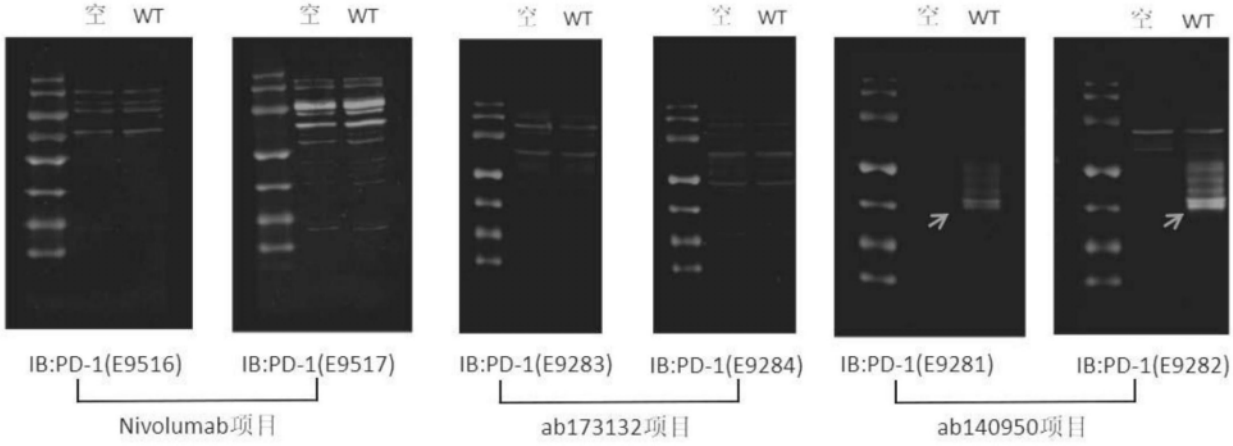

空
WT
IB:PD-1(E9516)
IB:PD-1(E9517)
IB:PD-1(E9283)
IB:PD-1(E9284)
IB:PD-1(E9281)
IB:PD-1(E9282)
Nivolumab项目
ab173132项目
ab140950项目

图3

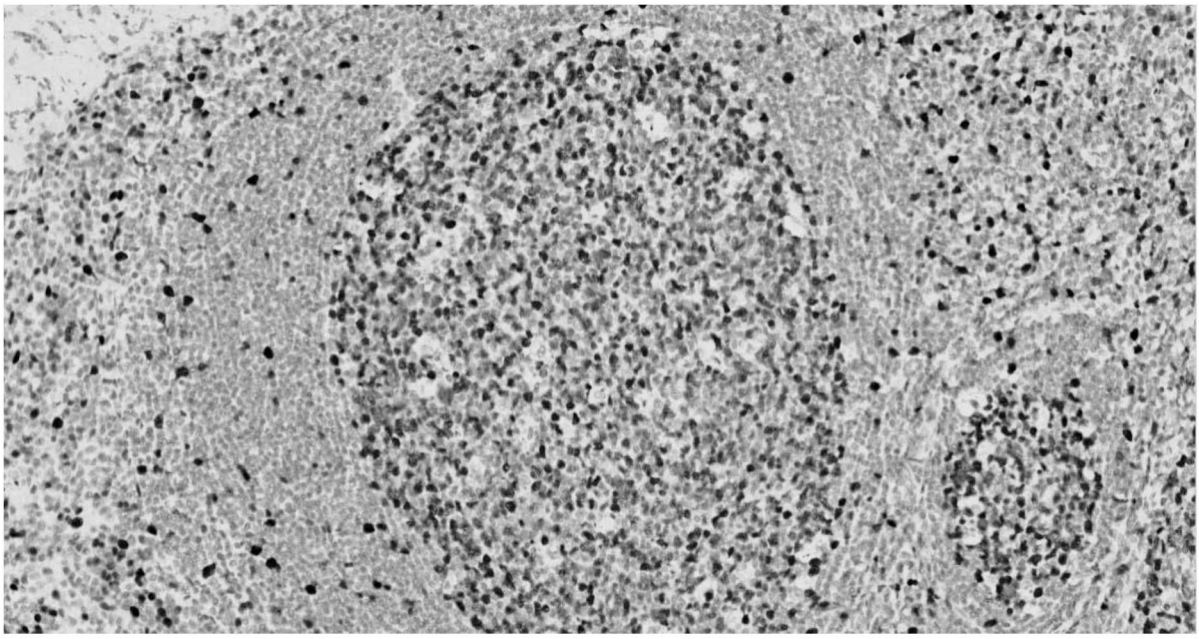


图4