



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117567607 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 20

(21) 申请号 202311129054.3

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2023.09.04

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(71) 申请人 中国人民解放军北部战区总医院
地址 110000 辽宁省沈阳市沈河区文化路
83号

申请人 深圳市光与生物科技有限公司

(72) 发明人 闫承慧 何皓 韩雅玲 杜忠波
关鸣

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

专利代理师 黄绮颖

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

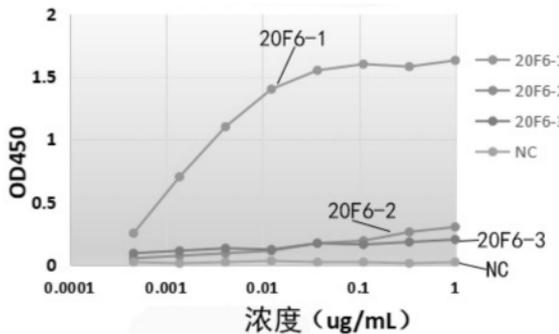
权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种抗CREG单克隆抗体20F6及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供一种抗CREG单克隆抗体20F6及其制备方法与应用。该抗CREG单克隆抗体20F6包括重链和轻链;重链包括重链可变区,重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID:1所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ ID:2所示,CDR3的氨基酸序列如SEQ ID:3所示;轻链包括轻链可变区,轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID:21所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ ID:22所示,CDR3的氨基酸序列如SEQ ID:23所示。本发明提供的抗CREG单克隆抗体20F6能够与CREG蛋白进行特异性结合,可特异性检测CREG蛋白,为心血管疾病的体外诊断试剂提供了关键的原材料。



1. 一种抗CREG单克隆抗体20F6,其特征在于:包括重链和轻链;

所述重链包括重链可变区,所述重链可变区包括CDR1、CDR2、CDR3,所述重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID:1所示,所述重链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID:2所示,所述重链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID:3所示;

所述轻链包括轻链可变区,所述轻链可变区包括CDR1、CDR2、CDR3,所述轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID:21所示,所述轻链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID:22所示,所述轻链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID:23所示。

2. 如权利要求1所述抗CREG单克隆抗体20F6,其特征在于:所述重链可变区还包括框架区FR1、FR2、FR3、FR4,所述重链可变区框架区FR1的氨基酸序列如SEQ ID:4所示,所述重链可变区框架区FR2的氨基酸序列如SEQ ID:5所示,所述重链可变区框架区FR3的氨基酸序列如SEQ ID:6所示,所述重链可变区框架区FR4的氨基酸序列如SEQ ID:7所示;

所述轻链可变区还包括框架区FR1、FR2、FR3、FR4,所述轻链可变区框架区FR1的氨基酸序列如SEQ ID:24所示,所述轻链可变区框架区FR2的氨基酸序列如SEQ ID:25所示,所述轻链可变区框架区FR3的氨基酸序列如SEQ ID:26所示,所述轻链可变区框架区FR4的氨基酸序列如SEQ ID:27所示。

3. 如权利要求1所述抗CREG单克隆抗体20F6,其特征在于:所述重链的氨基酸序列如SEQ ID:10所示;

所述轻链的氨基酸序列如SEQ ID:30所示。

4. 一种编码如权利要求1~3任意一项所述抗CREG单克隆抗体20F6的核酸分子。

5. 一种重组表达载体,其特征在于:所述重组表达载体包括如权利要求4所述核酸分子。

6. 如权利要求5所述重组表达载体,其特征在于:所述重组表达载体还包括第一信号肽、第二信号肽中的至少一种;

所述第一信号肽与所述重链可操作地连接;

所述第二信号肽与所述轻链可操作地连接。

7. 如权利要求6所述重组表达载体,其特征在于:所述第一信号肽的氨基酸序列如SEQ ID:8所示,所述第二信号肽的氨基酸序列如SEQ ID:28所示。

8. 一种宿主细胞,其特征在于:所述宿主细胞包括如权利要求5所述核酸分子或权利要求5~7任意一项所述重组表达载体。

9. 如权利要求1~3任意一项所述抗CREG单克隆抗体20F6在制备用于检测CREG蛋白的试剂盒或芯片中的应用。

10. 一种用于检测CREG蛋白的试剂盒,其特征在于:包括如权利要求1~3任意一项所述抗CREG单克隆抗体20F6。

一种抗CREG单克隆抗体20F6及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学技术领域,具体涉及一种抗CREG单克隆抗体20F6及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 1998年,哈佛大学医学院Gill教授在HeLa细胞中发现了一个转录调控基因,命名为E1A激活基因阻遏子基因(Cellular Repressor ofE1A-stimulated Gene,CREG),其编码的CREG蛋白是一个含220个氨基酸、3个M6P糖基化位点的分泌型糖蛋白,主要定位于溶酶体及核周内质网。CREG蛋白的N端含有一小段信号肽,负责引导CREG向细胞膜转运,然后分泌到细胞外。因此,在体外培养的细胞上清及人血液中可以检测到CREG蛋白的表达。

[0003] CREG蛋白广泛表达于分化成熟的组织、细胞中,在多种细胞的增殖、迁移、凋亡和分化等过程中发挥重要作用。已有证据表明,CREG蛋白是一种重要的心肌保护因子,参与心肌细胞分化维持及稳态调控。另外,有报道,CREG蛋白在心血管疾病患者血清中存在高表达,其可能为心血管疾病的早期诊断指标。基于已有的研究证据推测,如果能够对人血清中的CREG蛋白的表达水平进行检测,将对心血管疾病患者的诊断、进展以及预后判断都可能具有重要意义。因此,为了能够对心血管疾病患者血清中的CREG蛋白含量进行检测,开发和研究一种能够与CREG蛋白进行特异性结合的单克隆抗体具有极其重要的意义。

发明内容

[0004] 本发明提供一种抗CREG单克隆抗体20F6及其制备方法与应用,该抗CREG单克隆抗体20F6能够与CREG蛋白进行特异性结合,可特异性检测CREG蛋白,为心血管疾病的体外诊断试剂提供了关键的原材料。

[0005] 根据本发明的第一个方面,提供一种抗CREG单克隆抗体20F6,该抗CREG单克隆抗体20F6包括重链和轻链;重链包括重链可变区,重链可变区包括CDR1、CDR2、CDR3,重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID:1所示,重链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID:2所示,重链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID:3所示;轻链包括轻链可变区,轻链可变区包括CDR1、CDR2、CDR3,轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID:21所示,轻链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID:22所示(具体的氨基酸序列为:RAS),轻链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID:23所示。

[0006] 优选地,编码重链可变区CDR1的核苷酸序列如SEQ ID:11所示,编码重链可变区CDR2的核苷酸序列如SEQ ID:12所示,编码重链可变区CDR3的核苷酸序列如SEQ ID:13所示;编码轻链可变区CDR1的核苷酸序列如SEQ ID:31所示,编码轻链可变区CDR2的核苷酸序列如SEQ ID:32所示(具体的核苷酸序列为:AGGGCATCC),编码轻链可变区CDR3的核苷酸序列如SEQ ID:33所示。

[0007] 优选地,重链可变区还包括框架区FR1、FR2、FR3、FR4,重链可变区框架区FR1的氨基酸序列如SEQ ID:4所示,重链可变区框架区FR2的氨基酸序列如SEQ ID:5所示,重链可变

区框架区FR3的氨基酸序列如SEQ ID:6所示,重链可变区框架区FR4的氨基酸序列如SEQ ID:7所示;轻链可变区还包括框架区FR1、FR2、FR3、FR4,轻链可变区框架区FR1的氨基酸序列如SEQ ID:24所示,轻链可变区框架区FR2的氨基酸序列如SEQ ID:25所示,轻链可变区框架区FR3的氨基酸序列如SEQ ID:26所示,轻链可变区框架区FR4的氨基酸序列如SEQ ID:27所示。

[0008] 优选地,编码重链可变区框架区FR1的核苷酸序列如SEQ ID:14所示,编码重链可变区框架区FR2的核苷酸序列如SEQ ID:15所示,编码重链可变区框架区FR3的核苷酸序列如SEQ ID:16所示,编码重链可变区框架区FR4的核苷酸序列如SEQ ID:17所示;编码轻链可变区框架区FR1的核苷酸序列如SEQ ID:34所示,编码轻链可变区框架区FR2的核苷酸序列如SEQ ID:35所示,编码轻链可变区框架区FR3的核苷酸序列如SEQ ID:36所示,编码轻链可变区框架区FR4的核苷酸序列如SEQ ID:37所示。

[0009] 优选地,重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID:9所示;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID:29所示。

[0010] 优选地,编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID:19所示;编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID:39所示。

[0011] 优选地,重链的氨基酸序列如SEQ ID:10所示;轻链的氨基酸序列如SEQ ID:30所示。

[0012] 优选地,编码重链的核苷酸序列如SEQ ID:20所示;编码轻链的核苷酸序列如SEQ ID:40所示。

[0013] 优选地,上述抗CREG单克隆抗体20F6通过以下步骤制得得到:

[0014] S1.将CREG蛋白分子与载体蛋白进行偶联,制得免疫原蛋白;

[0015] S2.利用免疫原蛋白对兔进行免疫,获得兔的B细胞;

[0016] S3.对兔的B细胞进行培养和筛选,获得阳性克隆的B细胞,从阳性克隆的B细胞中提取抗CREG单克隆抗体的RNA,经过反转录和扩增,得到编码抗CREG单克隆抗体重链的核酸和编码抗CREG单克隆抗体轻链的核酸;

[0017] S4.将编码抗CREG单克隆抗体重链的核酸与编码抗CREG单克隆抗体轻链的核酸连接至载体中,得到表达载体;

[0018] S5.将表达载体通过共转染或转化的方式导入宿主细胞中,培养72~96小时,收集细胞上清,对细胞上清进行纯化,得到抗CREG单克隆抗体20F6。

[0019] 根据本发明的第二个方面,提供一种编码上述抗CREG单克隆抗体20F6的核酸分子。

[0020] 根据本发明的第三个方面,提供一种重组表达载体,该重组表达载体包括上述核酸分子。

[0021] 优选地,重组表达载体还包括第一信号肽、第二信号肽中的至少一种;第一信号肽与所述重链可操作地连接;第二信号肽与所述轻链可操作地连接。

[0022] 优选地,第一信号肽的氨基酸序列如SEQ ID:8所示,第二信号肽的氨基酸序列如SEQ ID:28所示。

[0023] 优选地,编码第一信号肽的核苷酸序列如SEQ ID:18所示,编码第二信号肽的核苷酸序列如SEQ ID:38所示。

[0024] 根据本发明的第四个方面,提供一种宿主细胞,该宿主细胞包括上述核酸分子或上述重组表达载体。

[0025] 根据本发明的第五个方面,提供上述抗CREG单克隆抗体20F6在制备用于检测CREG蛋白的试剂盒或芯片中的应用。

[0026] 根据本发明的第六个方面,提供一种用于检测CREG蛋白的试剂盒,该试剂盒包括上述抗CREG单克隆抗体20F6。

[0027] 本发明的有益效果:

[0028] 1. 本发明提供的抗CREG单克隆抗体20F6能够与CREG蛋白进行特异性结合,抗体亲和活性高,与CREG蛋白的反应效价高,可特异性检测CREG蛋白,为心血管疾病的体外诊断试剂提供了关键的原材料。

[0029] 2. 与传统的先获得杂交瘤细胞再将杂交瘤细胞通过腹腔注射至动物体内以使动物体内产生单克隆抗体的方法相比,本发明提供的抗CREG单克隆抗体20F6是通过先制备出重组表达载体,然后将重组表达载体进行转染或转化到宿主细胞中,最后再经过重组表达得到的,无需采用大量的动物进行实验,且抗CREG单克隆抗体20F6的重组表达载体的保存稳定性更高,有利于进行放大生产以制备出大量的抗CREG单克隆抗体20F6。

[0030] 3. 本发明在制备抗CREG单克隆抗体20F6的过程中,采用兔作为免疫动物,由于兔的脾脏大,基因多样性高,在小分子的抗原呈递上具有独特的优势,在后续进行阳性克隆筛选时,更容易筛选出更优的阳性克隆,提高了筛选效率,且成本低,操作更加简便。

附图说明

[0031] 图1为利用ELISA对兔抗血清中的抗CREG抗体20F6进行检测的结果图。

[0032] 图2为利用SDS-PAGE对兔抗血清中的抗CREG抗体20F6进行检测的结果图。

[0033] 图3为利用HPLC对兔抗血清中的抗CREG抗体20F6进行检测的结果图。

具体实施方式

[0034] 下面结合具体实施方式对本发明提供的技术方案中的技术特征作进一步清楚、完整的描述,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,本领域技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0035] 实施例1

[0036] 本实施例提供利用CREG抗原免疫动物及阳性克隆筛选的方法,具体步骤如下:

[0037] 1. 将CREG蛋白分子与载体蛋白(牛血清白蛋白,BSA)进行偶联,制得免疫原蛋白。

[0038] 2. 利用免疫原蛋白对新西兰大白兔(4.1~5.4kg)的背部和腹部进行皮下多点注射,每隔2周进行重复免疫以使兔体内产生抗CREG抗体(20F6),重复3次,其中,在注射免疫原蛋白时先将其与佐剂按照质量比1:1混合后再进行注射,首次免疫的注射量为750 μ g/只,之后的免疫的注射量为350 μ g/只,首次免疫采用完全佐剂(购自Sigma公司,货号:F5881),之后的免疫采用不完全佐剂(购自北京博奥龙公司,货号:KX0210047Q-10)。

[0039] 3. 免疫结束后1周,取兔抗血清,并利用酶联免疫吸附实验(ELISA)对兔抗血清进行检测,具体操作如下:将链霉亲和素溶液加入到96孔板中,然后向96孔板中加入如表1所

示的三条引物(其中,引物20F6-1是正对照,引物20F6-2和引物20F6-3为负对照,引物20F6-1、20F6-2、20F6-3均经过生物素化,即,结合了生物素Biotin,引物20F6-1含有抗体20F6修饰的RNA),于37℃下进行孵育2小时;将浓度为5μg/mL的CREG蛋白作为抗原,将CREG蛋白以50μL/孔的量加入到96孔板中,4℃下放置过夜,倾去液体,洗涤;每孔加入100μL 5% BSA进行封闭,室温放置0.5h,洗涤;将兔抗血清进行稀释得到8个浓度梯度的抗CREG抗体20F6(1μg/mL、0.3333μg/mL、0.1111μg/mL、0.0370μg/mL、0.0123μg/mL、0.0041μg/mL、0.0014μg/mL、0.0005μg/mL),然后以50μL/孔的量加入到96孔板中,继续于37℃下进行孵育2小时,洗涤,显色,终止反应,并测定波长为450nm处的OD值,以抗CREG抗体20F6的浓度为横坐标,OD450为纵坐标作图,结果如图1所示,其中,以未加入兔抗血清但加入了等量的去离子水(50μL/孔)的孔作为空白对照(NC)。

[0040] 由图1可知,兔抗血清均能够特异性识别经过抗CREG抗体20F6修饰的引物。

[0041] 表1用于进行ELISA实验的三条引物

	引物名称	序列
[0042] 正对照	20F6-1	20F6-CUGGUAACGAAUGGCUG-Biotin
负对照	20F6-2	CUGGUAACGAAUGGCUG-Biotin
	20F6-3	AAAAAAAAAAAAA-Biotin

[0043] 4. 采用200μg免疫原蛋白对新西兰大白兔的背部和腹部进行皮下多点注射以加强免疫一次,然后提取兔抗血清中的抗体(抗CREG抗体),利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)以及高效液相色谱(HPLC)对兔抗血清中的抗CREG抗体进行检测,SDS-PAGE检测结果如图2所示,HPLC检测结果如图3所示。

[0044] 图2的内图A表示的是利用SDS-PAGE对兔抗血清中的抗CREG抗体进行检测时电泳样本中加入了还原剂巯基乙醇的检测结果(还原型),由于还原剂的加入使得电泳样本中的抗CREG抗体被完全还原成单体,图2的内图B表示的是电泳样本未经过还原剂还原的检测结果(非还原型)。由图2的内图A可知,电泳样本中的抗CREG抗体被还原成大小约50KD的单体,由图2的内图B可知,未经还原剂还原的电泳样本中的抗CREG抗体的大小约为100~120KD,且具有两个条带,这说明电泳样本中的抗CREG抗体为双体蛋白。由图3可知,兔抗血清中的抗CREG抗体的出峰时间在7.5~9分钟之间。综合图2和图3的结果可以证明从兔抗血清中提取的抗体为本发明要求保护的抗CREG抗体。

[0045] 5. 三天后取兔脾脏,从脾脏中分离得到淋巴细胞,利用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CREG蛋白对B淋巴细胞进行荧光标记,然后用流式细胞仪对这类细胞进行富集,然后将细胞分选到96孔板中,一孔一个细胞,对细胞进行培养10~14天,取细胞上清,参照上述步骤3的操作进行ELISA验证实验,筛选出抗CREG抗体(20F6)效价高、特异性好的孔作为阳性孔,阳性孔中的B淋巴细胞即为阳性克隆的B细胞。

[0046] 实施例2

[0047] 将实施例1筛选得到的阳性克隆的B淋巴细胞进行抗体表达和纯化,具体操作如下:

[0048] 1. 收集阳性克隆的B淋巴细胞并进行裂解,提取其中的RNA并反转录成cDNA,采用

PCR方法,利用如表2所示的重链扩增引物、轻链扩增引物对反转录得到的cDNA进行扩增,其中,PCR反应条件如表3所示。

[0049] 表2重链扩增引物和轻链扩增引物

	引物	序列 (5' →3')	序列编号
[0050] 重链扩增引物	正向引物	GGCGTGCCCTATTCTACCTG	SEQ ID:41
	反向引物	CAAAGTCATGGTCAGTGTAGCAT	SEQ ID:42
轻链扩增引物	正向引物	GACTTTGGCACAGACCAACTT	SEQ ID:43
	反向引物	CAGGGTGTCTGAATGAATAACGA	SEQ ID:44

[0051] 表3 PCR反应条件

反应阶段	温度	时间	循环反应
预变性	95℃	2min	--
变性	95℃	1min	25 个
退火	56℃	1min	
延伸	72℃	0.5min	
--	95℃	10min	--

[0053] 2. 经过上述PCR反应从对应阳性克隆的cDNA中扩增得到天然配对的兔单克隆抗体重链基因 (VH) 和轻链基因 (VL), 并经过测序对VH和VL的序列进行确定, 重链可变区的基因序列如SEQ ID:19所示, 对应的氨基酸序列如SEQ ID:9所示; 轻链可变区的基因序列如SEQ ID:39所示, 对应的氨基酸序列如SEQ ID:29所示; 编码重链的基因序列如SEQ ID:20所示, 对应的氨基酸序列SEQ ID:10所示, 编码轻链的基因序列如SEQ ID:40所示, 对应的氨基酸序列如SEQ ID:30所示。

[0054] 3. 将重链的基因和轻链的基因分别利用同源重组的方式连接到pcDNA3.1载体 (购自invitrogen公司) 中, 进行无内毒素质粒提取后共转染CHO细胞 (购自于武汉大学典型培养物保藏中心), 转染72~96小时后, 离心除去细胞, 收集细胞上清。

[0055] 4. 利用Protein A亲和凝胶树脂对细胞表达的上清进行纯化, 即为所得抗体 (抗CREG单克隆抗体20F6), 最终获得的抗CREG单克隆抗体20F6的重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID:1所示, 重链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID:2所示, 重链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID:3所示, 轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID:21所示, 轻链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID:22所示 (具体的氨基酸序列为:RAS), 轻链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID:23所示。

[0056] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制, 尽管参照上述实施例对本发明进行了详细的说明, 所属领域的普通技术人员应当理解, 可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换, 但这些修改或替换均在本发明的保护范围之内。

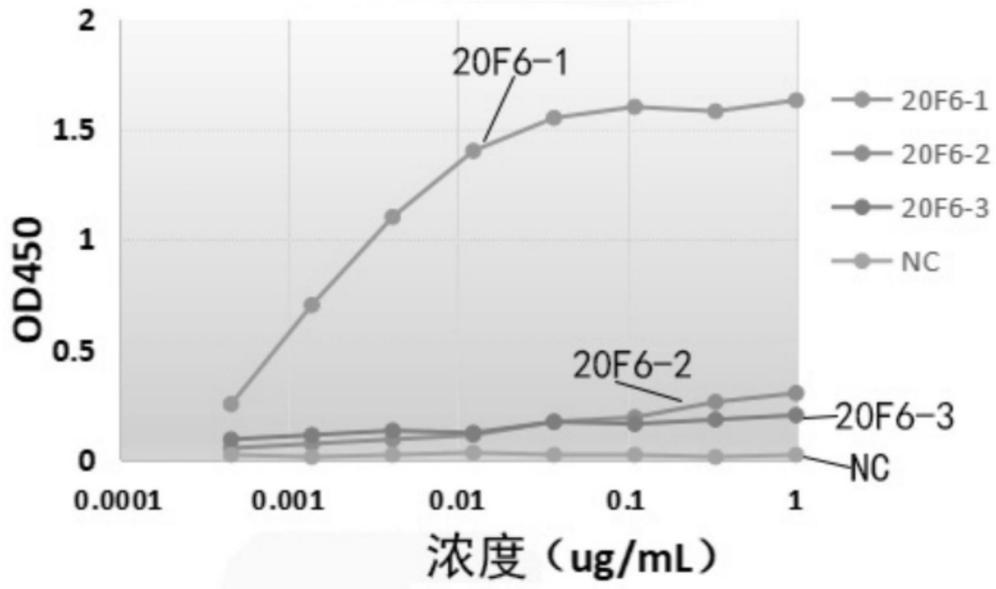


图1

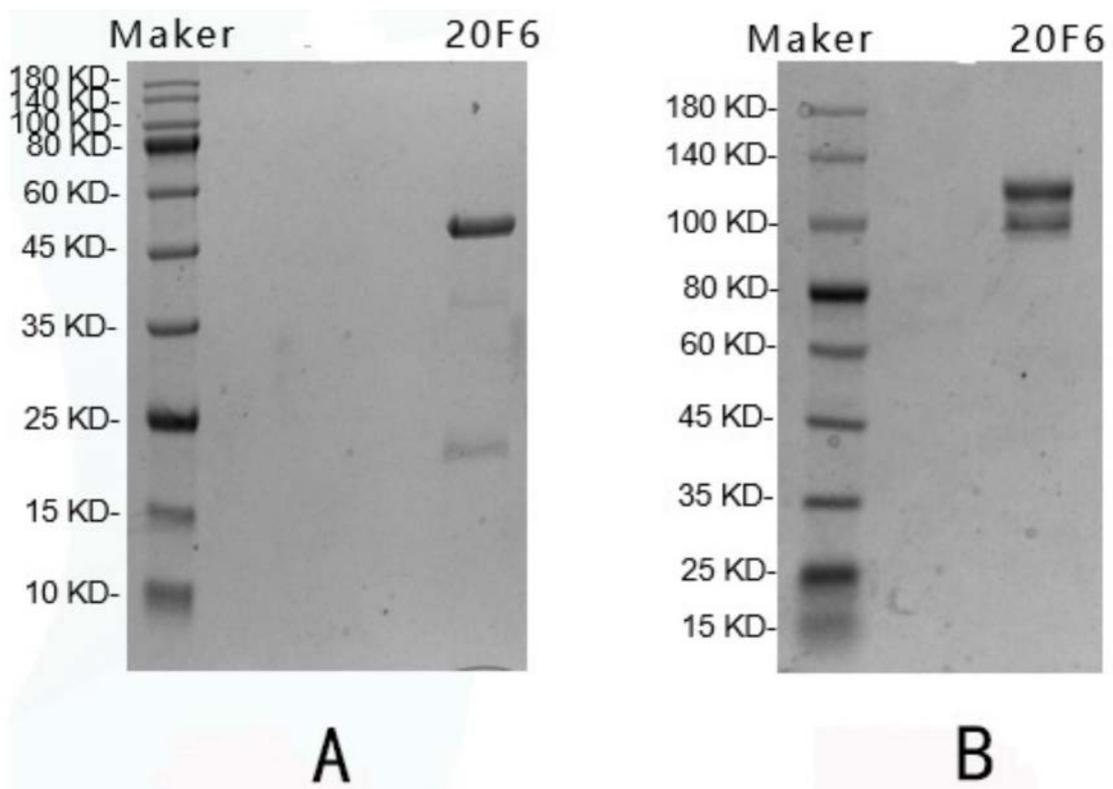


图2

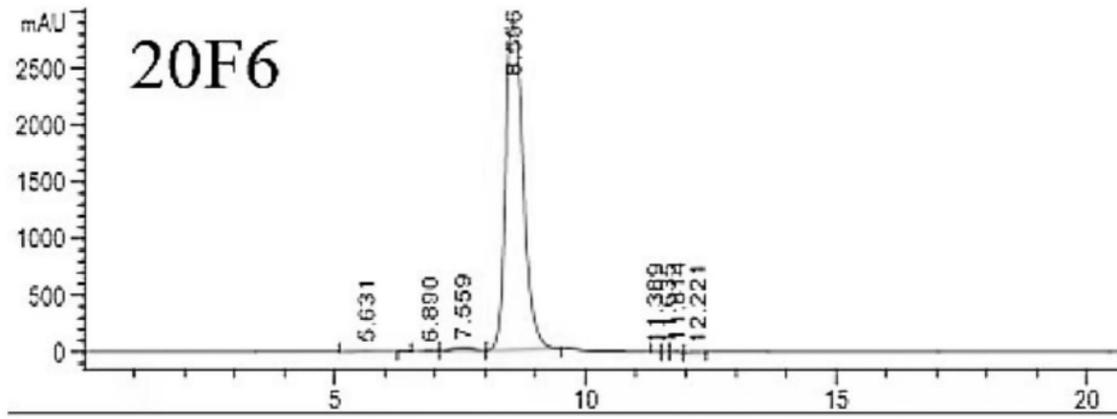


图3