



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102574927 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201080042414. 0

(22) 申请日 2010. 09. 28

(30) 优先权数据

2009-222893 2009. 09. 28 JP

2009-298213 2009. 12. 28 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/066847 2010. 09. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/037262 JA 2011. 03. 31

(83) 生物保藏信息

NITE BP-805 2009. 08. 25

NITE BP-810 2009. 09. 10

NITE BP-811 2009. 09. 10

NITE BP-812 2009. 09. 10

(73) 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

(72) 发明人 酒井绫子 梶田昌裕

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006. 01)

C12N 5/0781 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101124338 A, 2008. 02. 13, 说明书第 32 页倒数第 1 段 - 第 33 页第 1 段.

CN 101124338 A, 2008. 02. 13, 说明书第 32 页倒数第 1 段 - 第 33 页第 1 段.

WO 2007139373 A1, 2007. 12. 06, 说明书第 10 页第 30 行 - 12 页第 17 行.

CN 101243191 A, 2008. 08. 13, 全文.

周贝贝. 一种快速高效的全基因组甲基化 CpG 岛富集方法的建立. 《中国生物工程杂志》. 2008, 第 28 卷 (第 5 期), 78-82.

审查员 李有朝

权利要求书1页 说明书20页

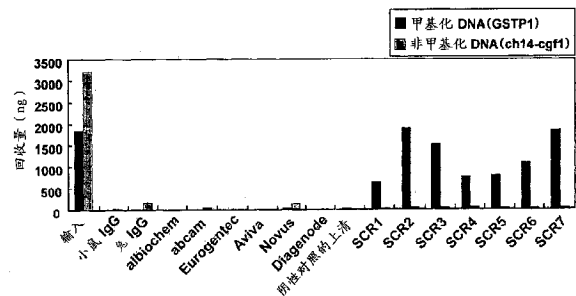
序列表5页 附图5页

(54) 发明名称

产生抗甲基化 DNA 抗体的杂交瘤及其利用

(57) 摘要

本发明涉及将从用包含 5' -(5- 甲基 -2' - 脱氧胞苷 -3' - 磷酸)-2' - 脱氧鸟苷 3' - 磷酸的抗原免疫的动物得到的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合而得到的, 产生抗甲基化 DNA 抗体的杂交瘤. 另外, 本发明涉及由该杂交瘤产生的单克隆抗体及使用该抗体将甲基化 DNA 免疫沉降的方法.



1. 杂交瘤,其是以保藏号 NITE BP-805 号在独立行政法人制品评价技术基盘机构保藏的杂交瘤。
2. 单克隆抗体,其由权利要求 1 所述的杂交瘤产生。
3. 将甲基化 DNA 免疫沉降的方法,其包括:
使从活体样品提取的 DNA 成为单链 DNA 片段的步骤;
从单链 DNA 片段使用权利要求 2 所述的单克隆抗体将甲基化 DNA 免疫沉降的步骤;以及回收免疫沉降的甲基化 DNA 的步骤。

产生抗甲基化 DNA 抗体的杂交瘤及其利用

【技术领域】

[0001] 本发明涉及产生抗甲基化 DNA 抗体的杂交瘤、由该杂交瘤产生的单克隆抗体、及使用该抗体将甲基化 DNA 免疫沉降的方法。

【背景技术】

[0002] 在高等真核生物的染色体 DNA 中,构成 DNA 的碱基之中胞嘧啶 (C) 的 5 位有被甲基化修饰的情况。此高等真核生物中的 DNA 的甲基化作为遗传信息的表达抑制结构发挥功能。例如,包括多个某基因的启动子区域中常见的 CpG 序列的区域(也称为“CpG 岛”或“CG 岛”)被甲基化时,其基因的转录被抑制。对此,CpG 岛不被甲基化时,启动子区域可结合转录因子,因此该基因成可转录的状态。

[0003] 如此,DNA 的甲基化是基因表达的控制结构之一。因此,DNA 的甲基化在初期胚发生、组织特异性的基因的表达、作为哺乳动物中特征性的现象的基因印迹或 X 染色体的失活、染色体的稳定化、DNA 复制的时机等的各种各样的生理的、病理性的现象中发挥重要的作用。

[0004] 再者近年越来越明了在癌或其他疾病中涉及 DNA 的甲基化。因此,进行对于基于各种各样的基因的甲基化的解析的癌的确切诊断或预后预测等。

[0005] 作为用于 DNA 的甲基化解析而回收甲基化 DNA 的方法之一,知甲基化 DNA 免疫沉降法(methylation DNA Immunoprecipitation:MeDIP 法)。在 MeDIP 法中,使用特异性地识别甲基化 DNA 的抗体或甲基化 DNA 结合蛋白质将甲基化 DNA 免疫沉降,可浓缩样品中包括的甲基化 DNA。另外知,通过使用将此 MeDIP 法和微阵列解析技术组合的 MeDIP-芯片法,可一并解析 DNA 的甲基化状态。

[0006] 可在这样的 MeDIP 法中使用的抗甲基化 DNA 抗体,至今有各种的抗体市售,例如,常使用识别 5-甲基胞嘧啶或 5-甲基胞苷的抗体。另外,在特开 2003-125766 号公报(专利文献 1)中记载,将 5-甲基-2'-脱氧胞苷作为抗原使用而制备杂交瘤,从此杂交瘤得单克隆抗体,通过使用该抗体的酶联免疫吸附法(ELISA 法)可定量 5-甲基-2'-脱氧胞苷。

[0007] 【现有技术文献】

[0008] 【专利文献】

[0009] 专利文献 1:特开 2003-125766 号公报

【发明内容】

[0010] 【发明要解决的技术课题】

[0011] 对通过 MeDIP 法得到的 DNA 进行甲基化 DNA 解析时,优选在该 MeDIP 法中由抗甲基化 DNA 抗体的甲基化 DNA 的回收量及浓缩率高。

[0012] 但是,使用结合能差的抗甲基化 DNA 抗体对 DNA 含有量少的样品实施 MeDIP 法时,由于无法回收甲基化 DNA 解析中必要并且充分的量的甲基化 DNA,有该解析的灵敏度降低的担忧。另外,使用特异性劣的抗甲基化 DNA 抗体实施 MeDIP 法时,由于得到的 DNA 中的非

甲基化 DNA 含有量变多,有甲基化 DNA 解析的信赖性降低的担忧。

[0013] 从而,为了通过 MeDIP 法更提高甲基化 DNA 的回收量及浓缩率,期望对甲基化 DNA 有优良的结合能及特异性的抗甲基化 DNA 抗体的开发。

[0014] 本发明鉴于如上述一样的事实,旨在提供对甲基化 DNA 有优良的结合能及特异性的产生抗甲基化 DNA 抗体的杂交瘤。

[0015] 另外,本发明旨在提供使甲基化 DNA 的回收量及浓缩率中优良的 MeDIP 法可能的抗甲基化 DNA 抗体。

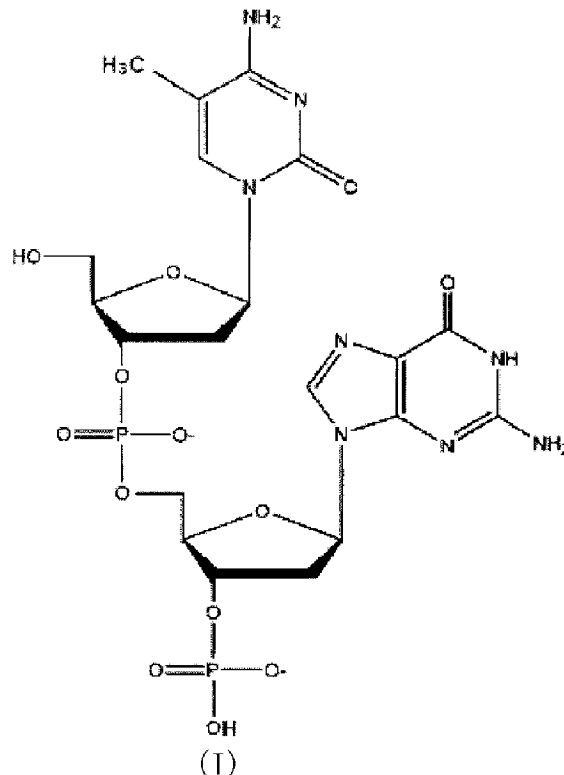
[0016] 再者,本发明旨在提供使用上述的抗甲基化 DNA 抗体的,甲基化 DNA 的回收量及浓缩率优良的 MeDIP 法。

[0017] 【解决课题的技术方案】

[0018] 本发明人关注于将以下的式 (I) :

[0019] 【化 1】

[0020]



[0021] 所示的,5'-(5-甲基-2'-脱氧胞苷-3'-磷酸)-2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸(以下,也称为“5-甲基-dCpdGp”)作为抗原使用。然后,用包含5-甲基-dCpdGp的抗原免疫动物,将从该动物得到的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合而制备杂交瘤,发现从此杂交瘤得到有对甲基化 DNA 优良的结合能及特异性的抗甲基化 DNA 抗体,从而完成本发明。

[0022] 即,根据本发明,提供将从用包含5-甲基-dCpdGp的抗原免疫的动物得到的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合而得到的杂交瘤(以下,也称为“本发明的杂交瘤”)。

[0023] 另外,根据本发明,提供由上述的杂交瘤产生的单克隆抗体、及使用该抗体将甲基化 DNA 免疫沉降的方法。

[0024] 【发明效果】

[0025] 由本发明的杂交瘤可得有对甲基化 DNA、特别是甲基化 CpG 序列优良的结合能及

特异性的抗甲基化 DNA 抗体。另外,通过使用得到的抗体进行 MeDIP 法,相比使用以往的抗甲基化 DNA 抗体时更可显著地升高甲基化 DNA 的回收量及浓缩率。

【附图说明】

[0026] 【图 1】是示利用使用本发明的杂交瘤的培养上清及各种市售抗体的 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 及非甲基化 DNA 的量的柱状图。

[0027] 【图 2】是示利用使用本发明的杂交瘤的培养上清及各种市售抗体的 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 的浓缩率的柱状图。

[0028] 【图 3】是示在各反应条件中,利用使用本发明的单克隆抗体及市售抗体的 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 及非甲基化 DNA 的量的柱状图。

[0029] 【图 4】是示在各反应条件中,利用使用本发明的单克隆抗体及市售抗体的 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 的浓缩率的柱状图。

[0030] 【图 5】是示利用使用本发明的单克隆抗体及市售抗体的 MeDIP 法回收的 3MeCG 及 3MeCT 的回收率的柱状图。

【实施方式】

[0032] “CpG 序列”是指碱基序列中的胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G) 从 5' 向 3' 的方向以此顺序邻接的序列。同样地,“CpT 序列”是指碱基序列中的 C 和胸腺嘧啶 (T) 从 5' 向 3' 的方向以此顺序邻接的序列。再有,CpG 及 CpT 的“p”的文字表示 C 和 G(或者 T)之间的磷酸二酯键。

[0033] “甲基化 CpG 序列”表示胞嘧啶的 5 位被甲基化修饰的 CpG 序列。知在哺乳类的基因组 DNA 中,在有 CpG 序列的部位中胞嘧啶的 5 位被甲基化修饰。

[0034] “杂交瘤”是指将淋巴细胞等的抗体产生细胞和骨髓瘤(骨髓肿)细胞人工地融合而得到的杂种细胞,是有抗体产生能的培养可能的细胞。

[0035] 在本说明书中,甲基化 DNA 的“浓缩率”以通过 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 的相对于非甲基化 DNA 的重量比([甲基化 DNA 的重量值]/[非甲基化 DNA 的重量值])表示。

[0036] 本发明的杂交瘤是将从用包含 5-甲基-dCpdGp 的抗原免疫的动物得到的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合而得到的杂交瘤。

[0037] 接下来,对本发明的杂交瘤的制备、由该杂交瘤产生的单克隆抗体的制备及使用该抗体将甲基化 DNA 免疫沉降的方法进行说明。

[0038] 再有,这些的方法自体均为本领域技术人员周知惯用的技术,制备杂交瘤的方法在例如 Hybridoma Techniques(冷泉港实验室,1980 年版)及细胞组织化学(山下修二等,日本组织细胞化学会编;学际企画、1986 年)中记载,将甲基化 DNA 免疫沉降的方法在例如外因遗传学实验流程(牛岛俊和、真贝洋一等编、羊土公司、2008 年)中记载。

[0039] 1. 本发明的杂交瘤的制备

[0040] 本发明的杂交瘤可如以下一样制备。再有,一般而言杂交瘤的制备方法包括以下的步骤:

[0041] (1) 制备免疫用抗原的步骤、(2) 将动物用抗原免疫的步骤、(3) 从动物单离抗体产生细胞的步骤、(4) 制备与抗体产生细胞的细胞融合中使用的骨髓瘤细胞的步骤、(5) 将抗体产生细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合而作为杂交瘤的步骤、(6) 选择性培养杂交瘤的

步骤、(7) 筛选产生目的抗体的杂交瘤的步骤、及 (8) 克隆通过筛选选择的杂交瘤的步骤。

[0042] 接下来,对上述的各步骤进行更详细地说明。

[0043] (1) 抗原的制备

[0044] 在本发明的杂交瘤的制备中,作为免疫用抗原使用包含 5- 甲基 -dCpdGp 的抗原。

[0045] 包含 5- 甲基 -dCpdGp 的抗原只要是包括作为半抗原至少包含 5- 甲基 -dCpdGp 的化合物与在免疫学方法中与该化合物结合而发生免疫原性的适宜的载体分子的缀合物的抗原即可。该抗原再包括佐剂等的辅助剂也可。

[0046] 另外,上述的包含 5- 甲基 -dCpdGp 的化合物优选是包含 5- 甲基 -dCpdGp 的核酸、更优选是包含 5- 甲基 -dCpdGp 的 DNA。

[0047] 为了制备本发明的杂交瘤,优选使用将 5- 甲基 -dCpdGp 和载体分子的缀合物溶解或悬浮到适当的缓冲液(例如,磷酸缓冲液等)中,向其中混合弗氏完全佐剂或不完全佐剂、或者明矾等的辅助剂而制备的免疫用抗原。

[0048] 作为上述的载体分子,只要是在免疫学方法中通常使用,结合到半抗原而发生免疫原性的分子即可,可举出例如牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin:BSA)、卵清蛋白(Ovalbumin:OVA)、匙孔青贝血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin:KLH)。它们之中也优选 KLH。

[0049] 半抗原和载体分子的缀合物而言,一般而言,可举出有使羧基和 α -氨基反应的酰胺键的缀合物、使用交联剂而将两者交联结合的缀合物等。得到那样的缀合物的方法而言,可使用碳二亚胺法、戊二醛法、偶氮缩合法、马来酰亚胺苯甲酰氧基琥珀酰亚胺(MBS)法等,它们之中也优选 MBS 法。

[0050] 在使用 MBS 法时,通过向 5- 甲基 -dCpdGp 的鸟苷的磷酸基预先结合具有巯基的接头(例如,碳原子数 1~5 的烷基巯基),可将该接头的巯基和 KLH 的氨基通过 MBS 交联而结合。

[0051] (2) 由抗原的动物的免疫化

[0052] 由上述的抗原,可免疫选自哺乳类或鸟类的动物。那样的动物只要是可在免疫学方法中通常使用的动物即可,哺乳类而言,可举出例如小鼠、大鼠、猪鼠、兔、牛、马、山羊、羊、猪、狗、猫等,鸟类而言,可举出例如鸡、鸭、火鸡、鸵鸟等。它们之中也优选小鼠。

[0053] 将上述的抗原施用到动物的方法是皮下注射、腹腔内注射、静脉注射、皮内注射或肌肉内注射之任何也可,它们之中也优选皮下注射或腹腔内注射。免疫可以 1 次或适当的间隔、例如 1~5 周的间隔多次进行。另外,1 次的免疫中使用的抗原量根据使用的动物而不同,优选每 1 只使用 1~1000 μ g。

[0054] 再有,为了确认在免疫的动物的体内是否产生针对抗原的抗体,从该动物采集血液,对从该血液分离的血清,通过 ELISA 法等可评价与抗原的反应性。该反应性不充分时,也可追加进行上述的免疫。

[0055] (3) 抗体产生细胞的单离

[0056] 从如上述一样免疫的动物的细胞,单离有产生目的抗体的可能性的抗体产生细胞。抗体产生细胞而言,可举出从脾脏、胸腺、淋巴节、末梢血或这些的组合得到的有抗体产生能的细胞,它们之中也优选脾脏细胞或淋巴节 B 细胞。例如,可在向上述的动物的最终免疫之后,从确认抗体产生的动物摘出脾脏,单离脾脏细胞。

[0057] (4) 骨髓瘤细胞的制备

[0058] 本发明的杂交瘤的制备中使用的骨髓瘤细胞可从杂交瘤的制备中一般地使用的细胞中适宜选择。那样的骨髓瘤细胞而言,可举出例如小鼠来源的 P3U1、X63.653、Sp2/0、X63-Ag8、NS-1、MPC-11 等,大鼠来源的 AG1、AG2、AG3、RCY3、210 等。再有,优选抗体产生细胞和骨髓瘤细胞是同种的动物来源。

[0059] 培养上述的骨髓瘤细胞的培养基而言,可选自细胞培养中通常使用的培养基,可举出例如 Dulbecco 改变 Eagle 培养基 (DMEM)、Iscove 改变 Dulbecco 培养基 (IMDM)、向 RPMI-1640 等适量添加胎牛血清 (FCS) 的培养基。

[0060] (5) 抗体产生细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合

[0061] 细胞融合可通过使用仙台病毒的方法、使用聚乙二醇的方法 (PEG 法)、通过电处理的方法 (电融合法) 等而进行。PEG 法可根据例如 Kohler 及 Milstein 的方法 (Nature, 256:495-497, 1975) 进行,例如通过使用 30 ~ 50% 聚乙二醇 (平均分子量 1000 ~ 4000) 在 30 ~ 40°C 的温度,将抗体产生细胞和骨髓瘤细胞混合 1 ~ 10 分钟来进行。

[0062] 另外,电融合法是,例如,向抗体产生细胞和骨髓瘤细胞的混合液首先通电 10 ~ 80V 的交流电压 1 ~ 20 秒钟而使细胞们接触,接下来通过以 10 ~ 100 μ 秒的脉宽实施 1 ~ 5kV/cm 的高电压直流脉冲来进行。

[0063] (6) 杂交瘤的选择的培养

[0064] 通过细胞融合得到的杂交瘤的选择可通过使用仅杂交瘤可培育的选择培养基进行培养。那样的选择培养基而言,优选使用包括 HAT (次黄嘌呤、氨基喋呤及胸腺嘧啶) 或 Haz (次黄嘌呤 - 氮杂丝氨酸) 的培养基。

[0065] 例如,使用含有 HAT 的培养基的杂交瘤的选择培养是在作为骨髓瘤细胞使用 HGPRT (次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶) 缺损株时有效。即,由于不与抗体产生细胞融合的 HGPRT 缺损骨髓瘤细胞的增殖被 HAT 抑制,通过将细胞融合步骤后的细胞群在含有 HAT 的培养基中培养,可选择性培养杂交瘤。

[0066] (7) 杂交瘤的筛选

[0067] 为了在如上述一样培养的杂交瘤之中,选择可产生目的抗体的杂交瘤,进行筛选。

[0068] 由于杂交瘤将产生的抗体向细胞外分泌,采集在选择培养基中确认增殖的杂交瘤的培养上清,通过由 MeDIP 法及 ELISA 法评价此上清中的本发明的单克隆抗体的有无及抗体存在时的其效价,可筛选杂交瘤。

[0069] (8) 杂交瘤的克隆

[0070] 通过上述的筛选得到产生目的单克隆抗体的杂交瘤之后,进行该杂交瘤的克隆。克隆的方法而言,可举出例如,稀释至每孔接种 1 个的细胞的方法 (有限稀释法)、在软琼脂糖培养基上接种细胞之后,取得集落的方法、通过显微操作仪取得 1 个的细胞的方法、通过细胞分选仪分离 1 个细胞的 FACS 法等,优选简便的有限稀释法。

[0071] 另外,对于克隆的杂交瘤,再重复进行筛选及克隆,选择抗体的效价更优良的杂交瘤也可。

[0072] 本发明人,根据上述的步骤,在将从用包含 5-甲基 -dCpdGp 的抗原免疫的小鼠得到的脾脏细胞和骨髓瘤细胞 P3U1 通过电融合法进行细胞融合而得到的杂交瘤克隆之中,取得产生在 MeDIP 法及竞争结合抑制试验 (ELISA 法) 中示良好的效价的单克隆抗体的克

隆 SCR1 ~ 7。

[0073] 再有,以下的表 1 中示在独立行政法人制品评价技术基盘机构(千叶县木更津市上总镰足 2-5-8、〒292-0818、日本)中保藏的各克隆的保藏号及保藏年月日。

[0074] 【表 1】

[0075]

克隆	保藏号	保藏年月日
SCR1	NITE BP-810 号	2009 年 9 月 10 日
SCR2	NITE BP-805 号	2009 年 8 月 25 日
SCR3	NITE BP-811 号	2009 年 9 月 10 日
SCR6	NITE BP-812 号	2009 年 9 月 10 日

[0076] 2. 本发明的单克隆抗体的制备

[0077] 本发明的单克隆抗体可从本发明的杂交瘤的培养上清得到。另外,本发明的单克隆抗体也可从使本发明的杂交瘤在裸鼠等的动物的腹腔内增殖而得到的腹水中得到。

[0078] 再者,本发明的单克隆抗体通过基因重组技术得到也可。即,从本发明的杂交瘤的基因组 DNA 鉴定本发明的单克隆抗体的重链及轻链抗体基因,将有该抗体基因的序列的 DNA 片段整合到适当的表达载体,将得到的载体导入骨髓瘤细胞等的不产生 Ig 蛋白质的细胞,通过表达本发明的单克隆抗体,得到本发明的单克隆抗体也可。

[0079] 由于上述的培养上清及腹水包含本发明的单克隆抗体,直接在 MeDIP 法等中使用也可。但是,为了提高 MeDIP 法中的甲基化 DNA 的回收量及浓缩率,从上述的培养上清或腹水纯化本发明的单克隆抗体,优选使用纯化的本发明的单克隆抗体。

[0080] 本发明的单克隆抗体的纯化方法而言,可选自本领域技术人员公知的方法,可举出例如,透析、硫酸铵分级分离、聚乙二醇分级分离、乙醇分级分离、亲和层析、离子交换柱层析、高效液相层析、凝胶过滤、冷冻干燥等。这些的纯化方法之中也优选亲和层析,更优选使用蛋白 A(或者 G)柱的亲和层析。

[0081] 另外,如上述一样得到的单克隆抗体,例如,可通过使用 ELISA 法等的方法或试剂盒来确定亚类等。

[0082] 在本发明的单克隆抗体也包括通过将该抗体片段化而得到的活性片段。那样的活性片段而言,只要是不失对甲基化 DNA 的特异性结合活性的片段即可。这些的活性片段,例如,可通过将纯化的本发明的单克隆抗体用木瓜蛋白酶、胃蛋白酶或胰蛋白酶等处理来制备。

[0083] 本发明的单克隆抗体对甲基化 DNA 有优良的结合能及特异性。

[0084] 因此,可在作为回收及浓缩甲基化 DNA 的方法的 MeDIP 法中适宜地利用。

[0085] 3. 使用本发明的单克隆抗体的甲基化 DNA 免疫沉降法(MeDIP 法)

[0086] 使用本发明的单克隆抗体的 MeDIP 法(以下,也称为“本发明的 MeDIP 法”),通过作为抗甲基化 DNA 抗体使用本发明的单克隆抗体,相比以往的将抗甲基化胞嘧啶抗体等作为抗甲基化 DNA 抗体使用时,可回收更大量的甲基化 DNA 而浓缩。

[0087] 从而,将通过本发明的 MeDIP 法得到的甲基化 DNA 在甲基化 DNA 解析中使用,则可将浓缩率高的大量的甲基化 DNA 作为该解析的样品。

[0088] 从而,本发明的 MeDIP 法适宜于甲基化 DNA 解析用样品的制备。

[0089] 本发明的 MeDIP 法包括下列 3 步骤:(1) 使从活体样品提取的 DNA 成为单链 DNA 片段的步骤、(2) 从单链 DNA 片段使用本发明的单克隆抗体将甲基化 DNA 免疫沉降的步骤、及 (3) 回收免疫沉降的甲基化 DNA 的步骤。另外,本发明的 MeDIP 法为了在 DNA 回收后确认是否特异性地得到甲基化 DNA,再优选包括 (4) 检测甲基化 DNA 的步骤。

[0090] 接下来,对各步骤进行更详细地说明。

[0091] (1) 从活体样品的 DNA 的提取、该 DNA 的片段化及向单链的变性

[0092] 从由解析对象得到的活体样品提取 DNA。活体样品而言,只要是包括解析对象的 DNA 的样品,就不特别限定,优选是包括基因组 DNA 的样品、可使用例如培养细胞、临床待测样品等。作为临床待测样品,具体可举出,血液、血清、淋巴细胞、尿、乳头分泌液、通过手术或活体检查等采集的组织等。

[0093] 从活体样品的 DNA 的提取可通过本领域技术人员公知的方法进行。例如,可通过将包括可使细胞及 / 或组织可溶化的表面活性剂(胆酸钠、十二烷基硫酸钠等)的处理液和活体样品混合之后,实施物理处理(搅拌、均化等)而使活体样品中包括的 DNA 游离到溶液中来提取 DNA。

[0094] 也可将得到的 DNA,通过公知的方法、例如将上述的溶液离心分离而回收上清,将此上清用苯酚 / 氯仿提取等来纯化。另外,从活体样品的 DNA 的提取及纯化也可使用市售的试剂盒进行。

[0095] 接下来,将得到的 DNA 片段化成适当的长度,例如,200 ~ 1000bp 程度。

[0096] DNA 的片段化可通过超声波处理、碱处理、酶处理等来进行。例如,可使用氢氧化钠进行碱处理时,向 DNA 溶液中添加氢氧化钠溶液至终浓度达到 0.1 ~ 1.0N,通过于 10 ~ 40℃温育 5 ~ 15 分钟来将 DNA 片段化。另外,进行酶处理时,可使用限制酶。限制酶可基于 DNA 的碱基序列适宜选择,可使用例如 MseI 或 BamHI 等。

[0097] 然后,将如上述一样得到的 DNA 片段加热变性之后,使通过急冷却成为单链。例如,通过将包括 DNA 片段的溶液于 94 ~ 96℃加热 5 ~ 15 分钟之后,急冷却至 2 ~ 4℃,可使 DNA 片段成为单链。

[0098] 在以下的免疫沉降的步骤中,由于向包括上述得到的单链 DNA 片段的溶液添加本发明的单克隆抗体,优选将该溶液用免疫沉降法中通常使用的缓冲液稀释。再有,也可向稀释的溶液预先适量加抗体结合用载体而通过旋转等,对非特异性地结合到该载体的蛋白质等进行除处理(以下,称之为“预清除处理”)。这样的抗体结合用载体只要是可与 IgG 的 Fc 区域特异性地结合的载体即可,可举出例如蛋白 A(或者 G) 琼脂糖珠等。

[0099] (2) 甲基化 DNA 的免疫沉降

[0100] 甲基化 DNA 的免疫沉降通过向包括单链 DNA 片段的溶液适量加本发明的单克隆抗体,接触 20 分钟 ~ 24 小时而使抗体和抗原反应之后,加抗体结合用载体而,再接触 20 分钟 ~ 3 小时来进行。

[0101] 本发明的单克隆抗体的添加量(终浓度)选自相对于包括单链 DNA 片段的溶液(1 μg/ml) 是 0.01 ~ 100 μg/ml 的范围。另外,使用本发明的单克隆抗体进行甲基化 DNA

的免疫沉降时,可在周围温度 4 ~ 50°C、优选是 4 ~ 37°C 的范围进行。

[0102] 另外,甲基化 DNA 的免疫沉降也可通过向上述的包括单链 DNA 片段的溶液加向抗体结合用载体预先结合本发明的单克隆抗体的复合物来进行。

[0103] (3) 甲基化 DNA 的回收

[0104] 通过离心分离等回收上述的抗体结合用载体,将其用适宜的清洗用缓冲液清洗数次之后,使用适宜的溶出用缓冲液,由结合到抗体结合用载体的本发明的单克隆抗体将捕捉的甲基化 DNA 溶出而回收。

[0105] 得到的甲基化 DNA 也可通过苯酚 / 氯仿法及乙醇沉淀法等本领域技术人员公知的方法、或者试剂盒等来纯化。

[0106] (4) 甲基化 DNA 的检测

[0107] 至于是否可通过上述的免疫沉降特异性地回收甲基化 DNA,可通过 PCR 法、定量 PCR 法、亚硫酸氢盐测序法等公知的甲基化 DNA 检测方法来确定。

[0108] (i) 由 PCR 法或定量 PCR 法的检测

[0109] 通过 PCR 法或定量 PCR 法检测甲基化 DNA 时,一般而言也可使用可得到的 PCR 用或定量 PCR 用试剂盒。另外,在 PCR 法中,可通过用琼脂糖电泳法确认扩增产物的存在来检测甲基化 DNA。

[0110] 扩增的反应条件可由本领域技术人员根据扩增的区域的碱基序列、扩增的长度等适宜确定。

[0111] 另外,扩增用引物是,使用在作为活体样品的细胞及组织等中,针对甲基化修饰的基因的序列的引物(检测用)及针对未被甲基化修饰的基因的序列的引物(阴性对照用)即可。

[0112] (ii) 由亚硫酸氢盐测序法的检测

[0113] 通过亚硫酸氢盐测序法检测甲基化 DNA 时,将通过 MeDIP 法回收的 DNA 用亚硫酸氢盐处理。

[0114] 亚硫酸氢盐处理是指将亚硫酸氢的钠盐、钾盐、钙盐、镁盐等的亚硫酸氢盐(亚硫酸氢盐)的溶液添加到 DNA 溶液中,将该 DNA 中包括的非甲基化胞嘧啶(C)通过脱氨基化反应变换为尿嘧啶(U)的处理。另一方面,亚硫酸氢盐不与甲基化胞嘧啶作用,不发生如上述一样的碱基的变换。从而, DNA 的甲基化状态的差异通过亚硫酸氢盐处理而变换为碱基序列的差异(C及U)。

[0115] 通过此亚硫酸氢盐处理而将 DNA 中的非甲基化胞嘧啶变换为尿嘧啶,可通过该 DNA 的测序解析,检测与原本的碱基序列的差异,检测甲基化 DNA。

[0116] 接下来,通过实施例详细地说明本发明,但本发明不受这些的实施例的限定。

【实施例】

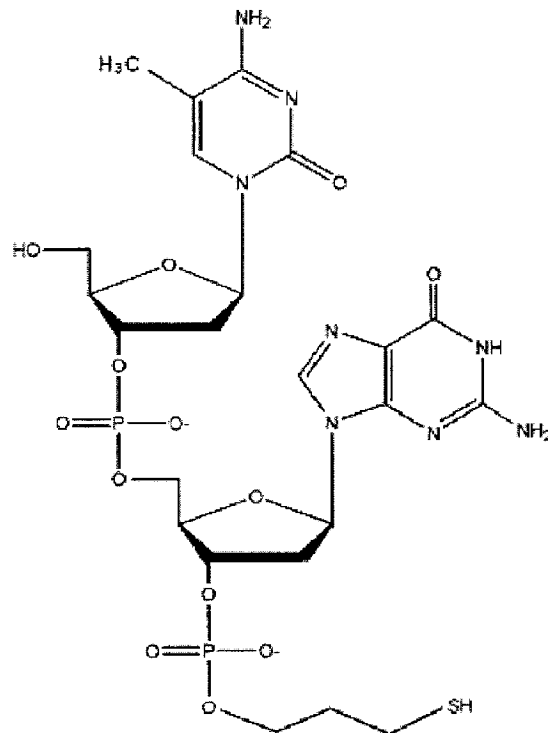
[0117] 【实施例 1:杂交瘤的制备】

[0118] 1. 由免疫用抗原及 ELISA 法的筛选用抗原的制备

[0119] 向下述的式(II)所示的,5-甲基-dCpdGp 通过 MBS 法交联结合作为接头结合丙烷巯基的 5'-(5-甲基-2'-脱氧胞苷-3'-磷酸)-2'-脱氧鸟苷 3'-磷酸-3-巯基丙酯(以下,也称为“5-甲基-dCpdGpC3H6SH”)和作为载体的 KLH 来制备免疫用抗原。

[0120] 【化 2】

[0121]



(II)

[0122] 另外,将 5-甲基-dCpdGpC3H6SH 和 BSA 通过 MBS 法交联结合,制备由 ELISA 法的筛选用抗原。

[0123] 将上述的免疫用抗原 100 μ g 和弗氏完全佐剂 (FCA) 100 μ l 混合而乳化,制备 FCA 抗原液。另外,将免疫用抗原 100 μ g 和弗氏不完全佐剂 (FIA) 100 μ l 混合而乳化,制备 FIA 抗原液。

[0124] 2. 向小鼠的免疫

[0125] 将 FCA 抗原液 100 μ l 施用到 9 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 (日本 Charles River 株式会社) 的腹腔内 (初次免疫)。其后,每 2 周 6 次、将 FIA 抗原溶液 100 μ l 腹腔内施用 (追加免疫)。

[0126] 3. 脾脏细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合

[0127] 从最后的追加免疫 14 天后,从小鼠无菌摘出脾脏。然后,在 RPMI-1640 培养基中从脾脏除去脂肪。向除去脂肪的脾脏用注射器注入培养基之后,将脾脏的两端用夹切落,从脾脏将细胞取出到培养基中。将得到的细胞在培养基中分散之后,使通过不锈钢网而取得脾脏细胞的悬浮液。

[0128] 将得到的脾脏细胞 (1×10^8 细胞) 和小鼠骨髓瘤细胞 P3U1 (2×10^7 细胞) 混合,使用电融合装置 SSH-2 (岛津制作所制) 进行细胞融合。再有,此细胞融合是向脾脏细胞和骨髓瘤细胞的混合液通电交流电压 (40V) 10 秒钟之后,施加直流脉冲 (2.3kV/cm、脉宽 40 μ 秒) 来进行。

[0129] 4. 杂交瘤的培养

[0130] 将杂交瘤悬浮于含有 HAT 的培养基 (包括 1×10^{-4} M 次黄嘌呤、 4×10^{-7} M 氨基喋呤、 1.5×10^{-5} M 胸腺嘧啶及 20% FCS 的 RPMI-1640 培养基) 至达到 1.2×10^6 细胞/ml,向 96 孔

板 (Nunc 公司制; 以下, 称之为培养用板) 的各孔接种至达到 1.2×10^5 细胞 / 孔。将培养用板在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的恒温槽内静置, 开始杂交瘤的培养。培养 10 天而使出现杂交瘤的集落, 进行产生单克隆抗体的杂交瘤的筛选。

[0131] 5. 由 ELISA 法的杂交瘤的筛选

[0132] 向磷酸缓冲液 (140mM NaCl 、 2.7mM KCl 、 $10\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ 及 $1.8\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.4); 以下, 称之为 PBS) 中添加上述 1. 中制备的筛选用抗原至达到终浓度 $5 \mu\text{g/ml}$, 制备固定用抗原溶液。将此固定用抗原溶液 $50 \mu\text{l}$ 添加到 96 孔的聚苯乙烯制微滴定板的各孔中 (以下, 称之为抗原固定板)。将抗原固定板于 4°C 静置一晚之后, 将各孔用 PBS ($200 \mu\text{l}$ / 孔) 清洗。清洗后, 向抗原固定板的各孔以 $200 \mu\text{l}$ / 孔添加 BLOCK ACE (大日本制药株式会社), 将该板于室温静置 1 小时。其后, 将各孔用包括 0.05% Tween20 的 PBS (以下, 也称为“PBS-T”; $200 \mu\text{l}$ / 孔) 清洗。

[0133] 接下来, 从培养用板的各孔采集上述的杂交瘤的培养上清, 向抗原固定板的各孔各添加 $50 \mu\text{l}$, 于室温搅拌 1 小时。搅拌后, 将各孔用 PBS-T ($200 \mu\text{l}$ / 孔) 清洗 2 次。清洗后, 向抗原固定板的各孔各添加 $100 \mu\text{l}$ 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗小鼠 Ig 多克隆抗体 (Cappel 公司制), 于室温反应 1 小时。反应后, 将各孔用 PBS-T ($200 \mu\text{l}$ / 孔) 清洗 2 次。清洗后, 以各孔各 $100 \mu\text{l}$ 加包括作为 HRP 的底物的正苯二胺 (OPDA) 的底物液 ($10\text{mg}/25\text{ml}$ 的 OPDA + $2 \mu\text{l}$ 的 $30\% \text{H}_2\text{O}_2$ / 25ml 的柠檬酸溶液), 将抗原固定板遮光而使于室温静置 20 分钟。然后, 向各孔加各 $100 \mu\text{l}$ 包括 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ 的反应停止液之后, 对各孔中的反应液, 使用酶标仪 (Model 3550; Bio-Rad 公司制) 测定 490nm 的吸光度。

[0134] 6. 由 MeDIP 法的杂交瘤的筛选

[0135] 将从人乳腺癌细胞株 MCF7 提取的基因组 DNA ($4 \mu\text{g}$) 用限制酶 MseI (NEB 公司) 于 37°C 反应一晚, 片段化成 $300 \sim 1000\text{bp}$ 。接下来, 将反应后的 DNA 片段于 95°C 加热 10 分钟而变性, 于 4°C 急冷却而使成为单链 DNA 片段。将得到的单链 DNA 片段根据染色质免疫沉淀测定试剂盒 (Upstate biotechnology 公司) 中附带的手册, 用附属于该测定试剂盒的稀释用缓冲液稀释。其后, 添加蛋白 G 琼脂糖珠 (GEHEALTHCARE 公司), 于 4°C 旋转 30 分钟而进行预清除处理。然后, 离心分离后, 将回收的上清分注到管中, 作为 MeDIP 用待测样品及对照用待测样品。

[0136] 将上述的使用 ELISA 法的筛选中示高的吸光度的杂交瘤的培养上清添加到 MeDIP 用待测样品, 将正常小鼠 IgG 抗体 (SantaCruz 公司) 添加到对照用待测样品。然后, 将这些于 4°C 旋转一晚而反应之后, 分别添加蛋白 G 琼脂糖珠 (GE HEALTHCARE 公司), 再者于 4°C 旋转 1 小时而进行免疫沉降。由此, 将上述的培养上清中包括的抗体和 DNA 的复合物结合到蛋白 G 琼脂糖珠而回收。接下来, 将回收的珠用染色质免疫沉淀测定试剂盒 (Upstate 公司) 的清洗用缓冲液清洗之后, 将上述的复合物中的 DNA 用上述试剂盒的溶出用缓冲液溶出。然后, 使溶出的 DNA 与蛋白酶 K 反应之后, 使用 Qiaquick PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN 公司) 纯化。

[0137] 再有, 上述的清洗、溶出及纯化基于各试剂盒的使用说明书的记载进行。

[0138] 接下来, 为了确认通过上述的 MeDIP 法, 是否可特异性地回收甲基化 DNA, 进行 PCR 法及琼脂糖电泳法。

[0139] (i) PCR 反应液的制备

[0140] 将下述的试剂混合,制备 25 μ l 的反应液。

[0141]

2×FastStart Universal SYBR Green Master(Rox) (ROCHE 公司)	12.5 μ l
正向 (F) 引物 (10 μ M)	1 μ l
反向 (R) 引物 (10 μ M)	1 μ l
回收的 DNA	1 μ l
dH ₂ O	9.5 μ l

[0142] 使用的引物的序列如下。

[0143] 作为甲基化 DNA 检测用引物组,使用用于扩增 MCF7 细胞中已知被甲基化修饰的 GSTP1 基因的启动子区域的引物组。以下示 GSTP1 引物的序列。

[0144] F :5' -GAGGCCTTCGCTGGAGTT-3' (SEQ ID NO :1)

[0145] R :5' -GTACTCACTGGTGGCGAAGA-3' (SEQ ID NO :2)

[0146] 另外,作为非甲基化 DNA 检测用引物组,使用用于扩增在人的第 14 染色体中存在,无 CpG 序列而未被甲基化修饰的区域(以下,称之为 CGF-1 区域)的引物组。以下示 CGF-1 区域的序列。

[0147] <CGF-1 区域>

[0148] GGAGGAGTCA AGAGAAGTTG GAAGCCAACT

[0149] GAGAGAGAGG GAAGGCTTGA AGTGGTCAGG ACAGTGAACA

[0150] CCTAAGAGAC ATCCACTGAA TTTGCCCACT AGGAAGCCAT

[0151] TAGTGACTTC AATAGGAACA TCTTCAGTGC ATCATGAAGG

[0152] CCAAAGATTG CCATGAAAGA GAGGAATGGA AATGGAGTGT

[0153] GGG(SEQ ID NO :10)

[0154] 另外,以下示 CGF-1 引物的序列。

[0155] F :5' -GGAGGAGTCAAGAGAAGTTGGAAGC-3' (SEQ ID NO :3)

[0156] R :5' -CCCACACTCCATTTCCATTCCTC-3' (SEQ ID NO :4)

[0157] (ii)PCR 的反应条件

[0158] 使用上述的反应液,在下述的条件下进行 PCR。

[0159] 于 95°C 10 分钟的 1 个循环、

[0160] 于 95°C 30 秒钟、于 66°C 15 秒钟及于 72°C 30 秒钟的 45 个循环、

[0161] 于 95°C 1 分钟、于 66°C 30 秒钟及于 95°C 30 秒钟的 1 个循环。

[0162] (iii) 琼脂糖电泳

[0163] 将上述的各 PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,确认扩增产物的存在。然后,选择成为 GSTP1 基因的扩增产物更多,并且 CGF-1 区域的扩增产物更少的结果的培养上清的杂交瘤。

[0164] 7. 杂交瘤的克隆

[0165] 将选择的杂交瘤通过使用杂交瘤克隆因子 (IGEN 公司) 的有限稀释法克隆。从克

隆第 10 天,用与上述的使用 ELISA 法的杂交瘤的筛选同样的方法,克隆产生抗体的杂交瘤(抗体产生杂交瘤)。

[0166] 8. 由竞争结合抑制试验的抗体产生杂交瘤的选择

[0167] 制备以下的化合物 1 及 2 的各溶液(1mM),将这些于 95°C 热处理 10 分钟之后,在冰中冷却 2 分钟。

[0168] 化合物 1 :5-甲基 -dCpdGpC3H6SH

[0169] 化合物 2 :NNNCGNNN(“N”示任意的核苷酸)

[0170] 向 PBS 中添加在上述的 1. 中制备的筛选用抗原至达到终浓度 5 μ g/ml,制备固定用抗原溶液。将此固定用抗原溶液 50 μ l 添加到 96 孔的聚苯乙烯制微滴定板的各孔(以下,称之为抗原固定板)。将抗原固定板于 4°C 静置一晚之后,将各孔用 PBS(200 μ l/孔)清洗。清洗后,向抗原固定板的各孔以 200 μ l/孔添加 BLOCK ACE(大日本制药株式会社),将该板于室温静置 1 小时。其后,将各孔用 PBS-T(200 μ l/孔)清洗。

[0171] 接下来,向抗原固定板的各孔各自添加各 50 μ l 上述的杂交瘤的培养上清及上述的化合物 1 的溶液,于室温搅拌 1 小时。搅拌后,将各孔用 PBS-T(200 μ l/孔)清洗 2 次。清洗后,将 HRP 标记抗小鼠 Ig 多克隆抗体(Cappel 公司制)以各 100 μ l 添加到各孔,于室温反应 1 小时。反应后,将各孔用 PBS-T(200 μ l/孔)清洗 2 次。清洗后,将上述的包括 OPDA 的底物液以各 100 μ l 加到各孔,将抗原固定板遮光而于室温静置 20 分钟。然后,将包括 2N H_2SO_4 的反应停止液以各 100 μ l 加到各孔之后,对各孔中的反应液,使用酶标仪(Model 3550 ;Bio-Rad 公司制)测定 490nm 的吸光度。

[0172] 由此确认,由抗体产生杂交瘤产生的抗体的向化合物 1 的交差反应。另外,代替化合物 1 的溶液,使用化合物 2 的溶液同样地确认由抗体产生杂交瘤产生的抗体的向化合物 2 的交差反应。基于这些的结果,选择产生化合物 1 中示交差反应,但化合物 2 中未示交差反应的抗体的抗体产生杂交瘤。

[0173] 对于进行 2 次上述的克隆及竞争结合抑制试验而选择的杂交瘤,再进行上述的由 MeDIP 法的杂交瘤的筛选,得 7 个杂交瘤的克隆(SCR1 ~ 7)。

[0174] 再有,如表 1 所示,SCR2 是在 2009 年 8 月 25 日以保藏号 NITEBP-805 号,SCR1、3 及 6 是在 2009 年 9 月 10 日分别以保藏号 NITEBP-810 号、保藏号 NITE BP-811 号及保藏号 NITE BP-812 号在独立行政法人制品评价技术基盘机构(千叶县木更津市上总镰足 2-5-8、〒292-0818、日本)保藏。

[0175] 【实施例 2 :由 MeDIP 法的单克隆抗体的效价的检查】

[0176] 1. 由 MeDIP 法的甲基化 DNA 的回收

[0177] 进行与实施例 1 的 6. 同样的操作,从由 MCF7 提取的基因组 DNA(4 μ g),制备单链 DNA 片段的稀释液,将此稀释液预清除处理,得 MeDIP 用待测样品及对照用待测样品。

[0178] 将上述的 SCR1 ~ 7 的培养上清、市售的抗甲基化胞嘧啶抗体及抗甲基化胞苷抗体各自添加到 MeDIP 用待测样品,将正常小鼠 IgG 抗体(SantaCruz 公司)、正常兔 IgG 抗体(SantaCruz 公司)及在上述的使用 ELISA 法的筛选中确认不到抗体产生能的杂交瘤的培养上清(阴性对照之上清)各自添加到对照用待测样品。然后,将这些于 4°C 旋转一晚而使抗体和抗原反应之后,向各自添加蛋白 G 琼脂糖珠(GE HEALTHCARE 公司),再于 4°C 旋转 1 小时而进行免疫沉降。然后,进行与实施例 1 的 6. 同样的操作,从回收的珠溶出 DNA,将其纯

化。

[0179] 再有,在以下的表 2 示使用的市售抗体的厂商、克隆名等。

[0180] 【表 2】

[0181]

厂商	抗体名	克隆名	免疫动物
Calbiochem	抗-5-甲基胞嘧啶小鼠 mAb	16233D3	小鼠
abcam	5-甲基胞苷	33D3	小鼠
Eurogentec	5-甲基胞苷	单克隆	小鼠
Aviva System Biology	5-甲基胞嘧啶	33D3	小鼠
Novus Biologicals	胞嘧啶(5-甲基)	多克隆	羊
Diagenode	5-甲基胞苷	单克隆	小鼠

[0182] 2. 定量 PCR 法

[0183] 接下来,为了检查上述的由 MeDIP 法得到的甲基化 DNA 的回收量及浓缩率,进行定量 PCR 法。

[0184] (i) PCR 反应液的制备

[0185] 将下述的试剂混合,制备 25 μ l 的反应液。再有,对于上述的从 MCF7 提取的基因组 DNA 的稀释系列(0.1、1.0、10 及 100ng/ μ l)也同样地制备反应液,将这些作为标准曲线制成用样品。

[0186]

2 \times FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)(ROCHE 公司)	12.5 μ l
F 引物(10 μ M)	1 μ l
R 引物(10 μ M)	1 μ l
回收的 DNA	1 μ l
dH ₂ O	9.5 μ l

[0187] 引物则使用上述的 GSTP1 引物(SEQ ID NO:1 及 2)以及 CGF-1 引物(SEQ ID NO:3 及 4)。

[0188] 对于上述的反应液,使用 Mx3005P(Stratagene 公司制),在下述的反应条件下进行定量 PCR。

[0189] (ii) 定量 PCR 的反应条件

[0190] 于 95 $^{\circ}$ C 10 分钟的 1 个循环、

[0191] 于 95 $^{\circ}$ C 30 秒钟、于 66 $^{\circ}$ C 15 秒钟及于 72 $^{\circ}$ C 30 秒钟的 45 个循环、

[0192] 于 95°C 1 分钟、于 66°C 30 秒钟及于 95°C 30 秒钟的 1 个循环。

[0193] 3. 结果

[0194] 图 1 及 2 示通过使用各抗体的 MeDIP 法得到的甲基化 DNA 的回收量及浓缩率。图 1 是示使用 SCR1 ~ 7 的杂交瘤的培养上清及各种市售抗体通过 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 及非甲基化 DNA 的量的柱状图。图 2 是示使用 SCR1 ~ 7 的杂交瘤的培养上清及各种市售抗体通过 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 的浓缩率的柱状图。

[0195] 从图 1 及 2 知,由 SCR1 ~ 7 的培养上清的甲基化 DNA 的回收量及浓缩率,相比市售抗体,均显著地高。

[0196] 例如,从图 1 知,使用 SCR1 ~ 7 的杂交瘤的培养上清,则相比各种市售抗体,由 MeDIP 法的甲基化 DNA 的回收量显著地更高。更具体而言,相比在市售抗体之中示最多的回收量的 Novus 公司的抗体,SCR1 示 45.9 倍、SCR2 示 136.4 倍、SCR3 示 109.3 倍、SCR4 示 54 倍、SCR5 示 56.6 倍、SCR6 示 78.1 倍、SCR7 示 132.8 倍的回收量。结果提示,由本发明的杂交瘤产生的抗体,相比各种市售抗体,向甲基化 DNA 的结合能更高。

[0197] 再者知,使用 SCR1 ~ 7 的杂交瘤的培养上清的 MeDIP 法,相比甲基化 DNA 的回收量的增加,几乎无非甲基化 DNA 的回收量的增加。因此提示,由本发明的杂交瘤产生的抗体,相比各种市售抗体,向甲基化 DNA 的特异性更高。

[0198] 另外,从图 2 知,相比各种市售抗体,由 SCR1 ~ 7 产生的抗体的由 MeDIP 法的甲基化 DNA 的浓缩率高。更具体而言,对于浓缩率,相比输入,SCR1 示 67 倍、SCR2 示 124 倍、SCR3 示 97 倍、SCR4 示 57 倍、SCR5 示 84 倍、SCR6 示 108 倍、SCR7 示 99 倍的浓缩率。

[0199] 再者,相比市售抗体之中示最高的浓缩率的 Diagenode 公司的抗体,SCR1 示 3.3 倍、SCR2 示 6.1 倍、SCR3 示 4.8 倍、SCR4 示 2.8 倍、SCR5 示 4.1 倍、SCR6 示 5.3 倍、SCR7 示 4.9 倍的浓缩率。

[0200] 结果提示,由本发明的杂交瘤产生的抗体,相比各种市售抗体,向甲基化 DNA 的特异性更高。

[0201] 【实施例 3:从腹水的单克隆抗体的纯化】

[0202] 1. 腹水的制备

[0203] 向 5 只 Balb/c 裸鼠 (6 周龄、雌性:日本 Charles River 株式会社) 的腹腔内接种杂交瘤 SCR2 (1×10^7 细胞/只)。从接种 1 周后,向该小鼠追加接种 SCR2 (1×10^7 细胞/只)。从追加接种 2 周后,从该小鼠使用注射器采集腹水。

[0204] 2. 硫酸铵盐析

[0205] 向得到的腹水 17.5ml 各少量加达 50% 饱和的量 (5.1g) 的硫酸铵,冷却着搅拌而得到沉淀。接下来,回收此沉淀,用 PBS 溶解而作为溶液。然后,将该溶液放入透析管,用 4L 的 PBS 透析 12 天。透析后,通过将管内的溶液用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤器过滤,得纯化的单克隆抗体 (279mg)。

[0206] 另外,使用小鼠单克隆抗体同种分型测试试剂盒 (Serotec 公司) 检查得到的单克隆抗体的亚类的结果是 IgG2a (κ)。

[0207] 在以下的实施例 4 中使用由此 SCR2 得到的单克隆抗体。

[0208] 【实施例 4:单克隆抗体的温度特性的检查】

[0209] 1. MeDIP 法

[0210] 进行与实施例 1 的 6. 同样的操作,从由 MCF7 提取的基因组 DNA (4 μ g), 制备单链 DNA 片段的稀释液, 对此稀释液进行预清除处理, 得 MeDIP 用待测样品及对照用待测样品。

[0211] 将从上述的 SCR2 得到的单克隆抗体、Diagenode 公司的抗甲基化胞苷抗体各自添加到 MeDIP 用待测样品, 将正常小鼠 IgG 抗体 (SantaCruz 公司) 添加到对照用待测样品。然后, 将这些在于 4°C 一晚、于 4°C 1 小时、于室温 1 小时或于 37°C 1 小时的条件下旋转而使抗体和抗原反应之后, 向各自添加蛋白 G 琼脂糖珠 (GE HEALTHCARE 公司), 再在各温度旋转 1 小时而进行免疫沉降。然后, 进行与实施例 1 的 6. 同样的操作, 从回收的珠溶出 DNA, 将其纯化。

[0212] 2. 定量 PCR 法

[0213] 接下来, 为了检查通过上述的 MeDIP 法得到的甲基化 DNA 的回收量及浓缩率, 进行定量 PCR 法。

[0214] (i) PCR 反应液的制备

[0215] 将下述的试剂混合, 制备 25 μ l 的反应液。再有, 对于上述的由 MCF7 提取的基因组 DNA 的稀释系列 (0. 1、1. 0、10 及 100ng/ μ l), 也同样地制备反应液, 将这些作为标准曲线制成用样品。

[0216]

2×FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (ROCHE 公司)	12.5 μ l
F 引物 (10 μ M)	1 μ l
R 引物 (10 μ M)	1 μ l
回收的 DNA	1 μ l
dH ₂ O	9.5 μ l

[0217] 作为甲基化 DNA 检测用引物组, 使用用于扩增 FBRS 基因及 REXO1L1 基因的引物组。再有, 本发明人确认, 由这些的引物组扩增的区域在 MCF7 细胞中被甲基化修饰 (参照后述的参考例)。

[0218] 另外, 作为非甲基化 DNA 检测用引物, 使用上述的 CGF-1 引物组。

[0219] 以下示 FBRS 引物组及 REXO1L1 引物组的序列。

[0220] ● FBRS 引物组

[0221] F : 5' -GAGAAGTAGTTGGAAGGAGAGG-3' (SEQ ID NO :5)

[0222] R : 5' -CCCTACACTAACTACAATAATTTAATATCC-3' (SEQ ID NO :6)

[0223] ● REXO1L1 引物组

[0224] F : 5' -GTAGGATGGTTTGGATTTGGGGTAA-3' (SEQ ID NO :7)

[0225] R : 5' -CAACTACTCCTAACTCTATAAACTACCAA-3' (SEQ ID NO :8)

[0226] 对于上述的反应液, 使用 Mx3005P (Stratagene 公司制), 在下述的反应条件下进行定量 PCR。

[0227] (ii) 定量 PCR 的反应条件

[0228] 于 95°C 10 分钟的 1 个循环、

[0229] 于 95°C 30 秒钟、于 66°C 15 秒钟及于 72°C 30 秒钟的 45 个循环、

[0230] 于 95°C 1 分钟、于 66°C 30 秒钟及于 95°C 30 秒钟的 1 个循环。

[0231] 但是,对使用 FBRS 引物组的反应液,在下述的条件下进行定量 PCR。

[0232] 于 95°C 10 分钟的 1 个循环、

[0233] 于 95°C 30 秒钟、于 63°C 15 秒钟及于 72°C 30 秒钟的 45 个循环、

[0234] 于 95°C 1 分钟、于 63°C 30 秒钟及于 95°C 30 秒钟的 1 个循环。

[0235] 3. 结果

[0236] 图 3 及 4 示,各条件下的通过 MeDIP 法得到的甲基化 DNA 的回收量及浓缩率。图 3 是示在各反应条件下的,通过使用由 SCR2 得到的单克隆抗体及市售抗体的 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 及非甲基化 DNA 的量的柱状图。图 4 是示在各反应条件下,通过使用由 SCR2 得到的单克隆抗体及市售抗体的 MeDIP 法回收的甲基化 DNA 的浓缩率的柱状图。

[0237] 从图 3 知,由 SCR2 得到的单克隆抗体,在任何的反应条件下,由 MeDIP 法的甲基化 DNA 的回收量高。另外知,由 SCR2 得到的单克隆抗体,在任何的反应条件下,几乎无由 MeDIP 法的非甲基化 DNA 的回收量的增加。因此提示,由 SCR2 得到的单克隆抗体,在各反应条件下,有向甲基化 DNA 的高的结合能及特异性。

[0238] 再者,从图 4 知,由 SCR2 得到的单克隆抗体,在任何的反应条件下,由 MeDIP 法的甲基化 DNA 的浓缩率高。因此提示,由 SCR2 得到的单克隆抗体,在各反应条件中,有向甲基化 DNA 的高的特异性。

[0239] 从上述的结果示,以往、在 MeDIP 法中于 4°C 进行一晚的反应,但使用本发明的单克隆抗体,则可在于 4°C 1 小时、于室温 1 小时及于 37°C 1 小时之任何的条件下也进行 MeDIP 法。

[0240] 【参考例 :由亚硫酸氢盐测序法的甲基化 DNA 的检测】

[0241] 通过亚硫酸氢盐测序法检查由实施例 4 中使用的 FBRS 基因及 REXO1L1 基因的引物组扩增的区域在 MCF7 细胞中被甲基化修饰。

[0242] 1. 亚硫酸氢盐处理的 DNA 溶液的制备

[0243] 将由 MCF7 细胞提取的基因组 DNA (2 μ g) 在 19 μ l 的水中稀释,向其中添加 1 μ l 6N 氢氧化钠水溶液而使终浓度 0.3N,于 37°C 温育 15 分钟而使变性。

[0244] 接下来,向上述的 DNA 溶液添加 120 μ l 0.6M 亚硫酸氢钠 /0.6M 氢醌溶液之后,以于 95°C 30 秒钟及于 50°C 15 分钟的 1 个循环,通过将其重复 15 个循环,处理亚硫酸氢盐。然后,将处理的溶液使用 Wizard(注册商标)DNA Clean-up System(Promega 公司)脱盐,在 TE 缓冲液 50 μ l 中溶出,得到将非甲基化胞嘧啶变换为尿嘧啶的 DNA 溶液。

[0245] 向上述的 DNA 溶液添加 5 μ l 3N 氢氧化钠水溶液,于室温温育 5 分钟之后,用 Qiaquick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN 公司)纯化,得到 DNA 溶液。

[0246] 2. 测序解析

[0247] 以得到的 DNA 溶液作为模板,使用上述的 FBRS 基因及 REXO1L1 基因的引物组进行 PCR 法。

[0248] (i)PCR 反应液的制备

[0249] 将下述的试剂混合,制备 15 μ l 的反应液。

[0250]

10x Ex Taq(注册商标)缓冲液(宝生物株式会社)	12.5 μ l
dNTP mix(2.5mM)	1.2 μ l

F 引物 (10 μ M)	0.6 μ l
R 引物 (10 μ M)	0.6 μ l
DNA 溶液	1 μ l
Ex Taq(注册商标) 聚合酶 (宝生物株式会社)	0.12 μ l
dH ₂ O	9.98 μ l

[0251] 使用上述的反应液,在下述的条件下进行 PCR。

[0252] (ii) 定量 PCR 的反应条件

[0253] 于 95°C 4 分钟 30 秒钟的 1 个循环、

[0254] 于 95°C 30 秒钟、于 66°C 15 秒钟及于 72°C 30 秒钟的 40 个循环、

[0255] 于 4°C 放置。

[0256] 但是,对于使用 FBRS 引物组的反应液,在下述的条件下进行定量 PCR。

[0257] 于 95°C 4 分钟 30 秒钟的 1 个循环、

[0258] 于 95°C 30 秒钟、于 60°C 15 秒钟及于 72°C 30 秒钟的 40 个循环、

[0259] 于 4°C 放置。

[0260] 将得到的各 PCR 产物整合到 TA 克隆试剂盒 (Invitrogen 公司) 的 pCR(注册商标) 2.1 载体,回收这些的质粒,使用 M13Rv 引物进行测序解析。

[0261] 再有,以下示 M13Rv 引物的序列。

[0262] 5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEQ ID NO :9)

[0263] 基于测序结果,表 3 示在 FBRS 基因及 REX01L1 基因的扩增区域中存在的 CpG 序列的甲基化状态。在此表中,CpG 序列的行中示的数字是从各基因的扩增区域的 5' 末端依出现顺序数的 CpG 序列的编号。●表示甲基化 CpG 序列、○表示非甲基化 CpG 序列。

[0264] 【表 3】FBRS

[0265]

CpG 序列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
克隆 1	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●
克隆 2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	●
克隆 3	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●
克隆 4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	●
克隆 5	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
克隆 6	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

[0266] PEX01L1

[0267]

CpG 序列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
克隆 1	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	○	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●
克隆 2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○
克隆 3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○

[0268] 如表 3 所示,在 MCF7 细胞中,FBRS 及 REX01L1 基因的扩增的区域中存在的 CpG 序列几乎全有被甲基化的倾向。

[0269] 从而,上述的引物组可在通过 MeDIP 法回收的 MCF7 细胞的甲基化基因组 DNA 的定量 PCR 中适宜地使用。

[0270] 【实施例 5:本发明的单克隆抗体识别的表位的检查】

[0271] 将作为包括甲基化 CpG 的寡核苷酸的 3MeCG 和作为包括甲基化 CpT 的寡核苷酸的 3MeCT 作为抗原使用,检查本发明的单克隆抗体识别的表位。

[0272] 1. MeDIP 法

[0273] 进行与实施例 1 的 6. 同样的操作,从由 MCF7 提取的基因组 DNA (4 μg),制备单链 DNA 片段的稀释液。接下来,对此稀释液进行预清除处理,得到 DNA 样品。然后,向得到的 DNA 样品添加预先于 95°C 加热 10 分钟而变性,并于 4°C 急冷却的 3MeCG,作为 3MeCG 待测样品。再有,以下示 3MeCG 的序列。

[0274] <3MeCG>

[0275] 5' -CGAGGTCGACGGTATTGATm5cGAGTATCGATAGTm5c

[0276] GATATCGATATCGATATm5cGATATAACAACGTCGTGACTGG-3'

[0277] (SEQ ID NO :11)

[0278] (序列中的“m5c”表示 5-甲基胞嘧啶。)

[0279] 在上述的 3MeCG 待测样品的制备中,除了代替 3MeCG,使用 3MeCT 以外、进行同样地操作而制备 3MeCT 待测样品。再有,以下示 3MeCT 的序列。

[0280] <3MeCT>

[0281] 5' -CGAGGTCGACGGTATTGATm5cTAGTATCGATAGTm5c

[0282] TATATCGATATCGATATm5cTATATAACAACGTCGTGACTGG-3'

[0283] (SEQ ID NO :12)

[0284] 将由上述的 SCR2 及 SCR3 得到的单克隆抗体以及 Diagenode 公司的抗甲基化胞苷抗体各自添加到 3MeCG 待测样品及 3MeCT。然后,将这些待测样品于 4°C 旋转一晚而使抗体和抗原反应。其后,向各自添加蛋白 G 琼脂糖珠 (GE HEALTHCARE 公司),进行与实施例 1 的 6. 同样的操作,从回收的珠溶出 DNA,将其纯化。

[0285] 2. 定量 PCR 法

[0286] 接下来,为了检查上述的通过 MeDIP 法得到的甲基化 DNA 的回收量,进行定量 PCR 法。

[0287] (i) PCR 反应液的制备

[0288] 制备 25 μl 与实施例 2 中同样的反应液。

[0289] 作为甲基化 DNA 检测用引物组,使用以下的 SEQ ID NO :12 及 SEQ ID NO :13 所示的引物。此引物组可特异性地扩增上述的 3MeCG 及 3MeCT。

[0290] F :5' -CGAGGTCGACGGTAT-3' (SEQ ID NO :13)

[0291] R :5' -CCAGTCACGACGTTGTA-3' (SEQ ID NO :14)

[0292] 对于上述的反应液,使用 Mx3005P (Stratagene 公司制),在下述的反应条件下进行定量 PCR。

[0293] (ii) 定量 PCR 的反应条件

[0294] 于 95°C 10 分钟的 1 个循环、

[0295] 于 95°C 30 秒钟、于 55°C 15 秒钟及于 72°C 30 秒钟的 45 个循环、

[0296] 于 95°C 1 分钟、于 55°C 30 秒钟及于 95°C 30 秒钟的 1 个循环。

[0297] 为了制成标准曲线,制备 3MeCG 及 3MeCT 的各自的稀释系列。然后,对于这些进行定量 PCR 而制成标准曲线。基于此标准曲线,用上述的 MeDIP 法对回收的各 DNA,从通过定量 PCR 法得到的 Ct 值算出拷贝数,将其作为甲基化 DNA 的回收量(拷贝)。

[0298] 另外,对于上述的 MeDIP 法中使用的免疫沉降前的 3MeCG 待测样品及 3MeCT 待测样品进行定量 PCR,从得到的 Ct 值算出拷贝数,将其作为输入 DNA 的回收量(拷贝)。从算出的甲基化 DNA 的回收量(拷贝)及输入 DNA 的回收量(拷贝),根据以下的式(1)算出回收率(拷贝/拷贝)。

[0299] [回收率(拷贝/拷贝)] = [甲基化 DNA 的回收量(拷贝)]/[输入 DNA 的回收量(拷贝)]... (1)

[0300] 3. 结果

[0301] 表 1 及图 5 示通过由 SCR2 及 SCR3 得到的单克隆抗体、以及使用 Diagenode 公司的抗甲基化胞苷抗体的 MeDIP 法的 3MeCG 及 3MeCT 的回收率。

[0302] 【表 4】

[0303]

	抗体	回收率(拷贝/拷贝)
3MeCG	Diagenode	0.01
	SCR2	13
	SCR3	8
3MeCT	Diagenode	0.03
	SCR2	0.04
	SCR3	0.05

[0304] 如表 1 及图 5 所示,使用了 Diagenode 公司的抗甲基化胞苷抗体。

[0305] 通过 MeDIP 法,在 3MeCG 和 3MeCT 的回收率之间,未见显著的差异。

[0306] 另一方面知,在使用分别从 SCR2 及 SCR3 得到的单克隆抗体的 MeDIP 法中,相比 3MeCT 的回收率,3MeCG 的回收率显著地更高。更具体而言知,由 SCR2 得到的单克隆抗体以 3MeCT 的 325 倍回收 3MeCG。另外知,由 SCR3 得到的单克隆抗体以 3MeCT 的 160 倍回收 3MeCG。

[0307] 因此示,由 SCR2 及 SCR3 得到的单克隆抗体将甲基化 CpG 序列作为表位识别。

[0308] 本申请与 2009 年 9 月 28 日申请的日本国专利申请特愿 2009-222893 号及 2009 年 12 月 28 日申请的日本国专利申请特愿 2009-298213 号相关,将这些的专利权利要求、说

说明书、附图及摘要的全部通过引用并入本说明书中。

[0001]

序列表

<110> Sysmex Corporation
 <120> 产生抗甲基化DNA抗体的杂交瘤及其利用
 <130> TM5453PC
 <150> JP2009-222893
 <151> 2009-09-28
 <150> JP2009-298213
 <151> 2009-12-28
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物
 <400> 1
 gaggccttcg ctggagtt 18
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物
 <400> 2
 gtactcactg gtggcgaaga 20
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物
 <400> 3
 ggaggagtca agagaagttg gaagc 25

[0002]

<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	1	
	cccacactcc atttccattc etc	23
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	5	
	gagaagtagt tggaaggaga gg	22
<210>	6	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	6	
	ccctacacta actacaataa tttaatatcc	30
<210>	7	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	7	
	gtaggatggt ttggatttgg ggaa	25
<210>	8	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0003]

<220>		
<223>	引物	
<400>	8	
	caactactcc taactctata aactaccaa	29
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	9	
	ggaaacagct atgaccatg	19
<210>	10	
<211>	193	
<212>	DNA	
<213>	智人 (Homo sapiens)	
<400>	10	
	ggaggagtca agagaagttg gaagccaact gagagagagg gaaggcttga agtggtcagg	60
	acagtgaaca cctaagagac atccaactgaa ttgtcccact aggaagccat tagtgacctc	120
	aataggaaca tcttcagtgc atcatgaagg ccaaagattg ccatgaaaga gaggaatgga	180
	aatggagtgt ggg	193
<210>	11	
<211>	73	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(20)..(20)	
<223>	m5c	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(34)..(34)	
<223>	m5c	

[0004]

<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(52)..(52)	
<223>	m5c	
<400>	11	
	cgaggctcgac ggtattgatc gagtatcgat agtctatc gatatcgata tcgatataca	60
	acgtcgtgac tgg	73
<210>	12	
<211>	73	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(20)..(20)	
<223>	m5c	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(34)..(34)	
<223>	m5c	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(52)..(52)	
<223>	m5c	
<400>	12	
	cgaggctcgac ggtattgatc tagtatcgat agtctatc gatatcgata tctatataca	60
	acgtcgtgac tgg	73
<210>	13	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	13	
	cgaggctcgac ggtat	15
<210>	14	

[0005]

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 14

ccagtcacga cgttgta

17

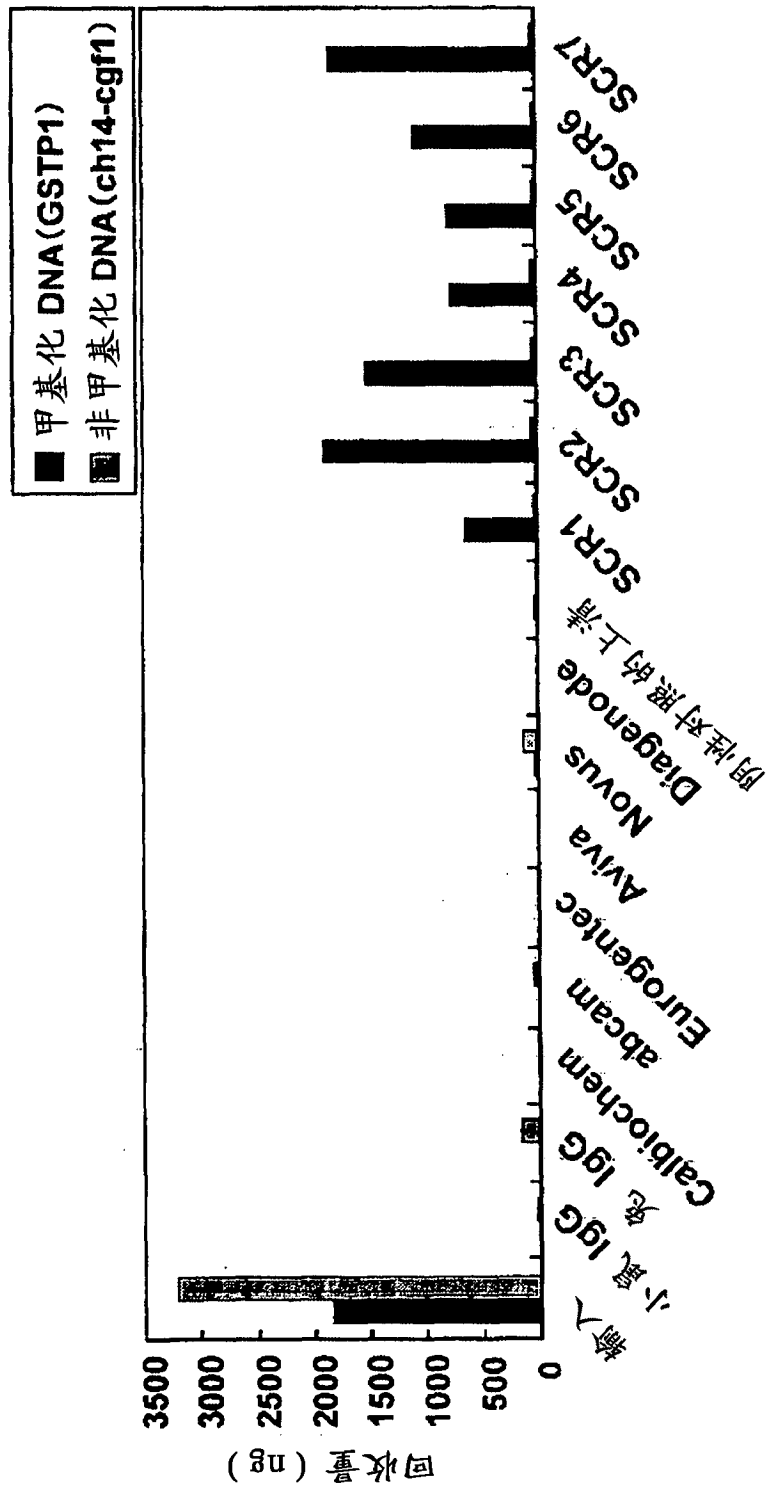


图 1

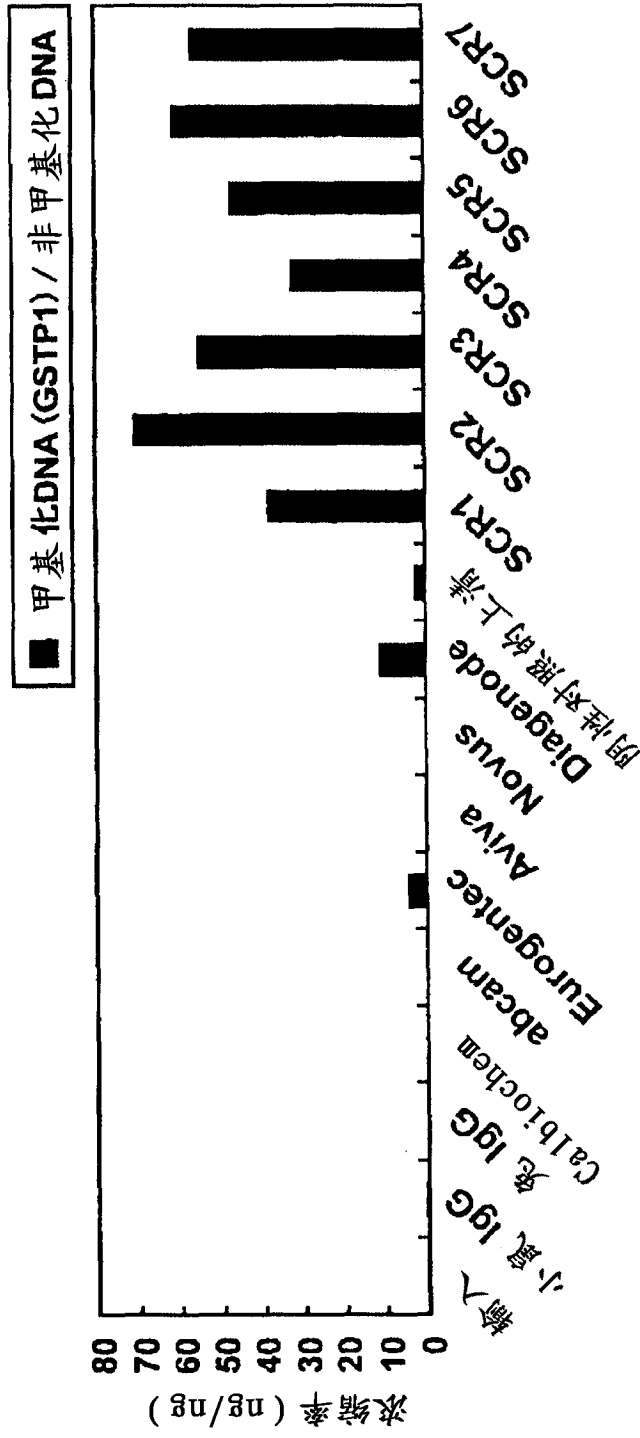


图 2

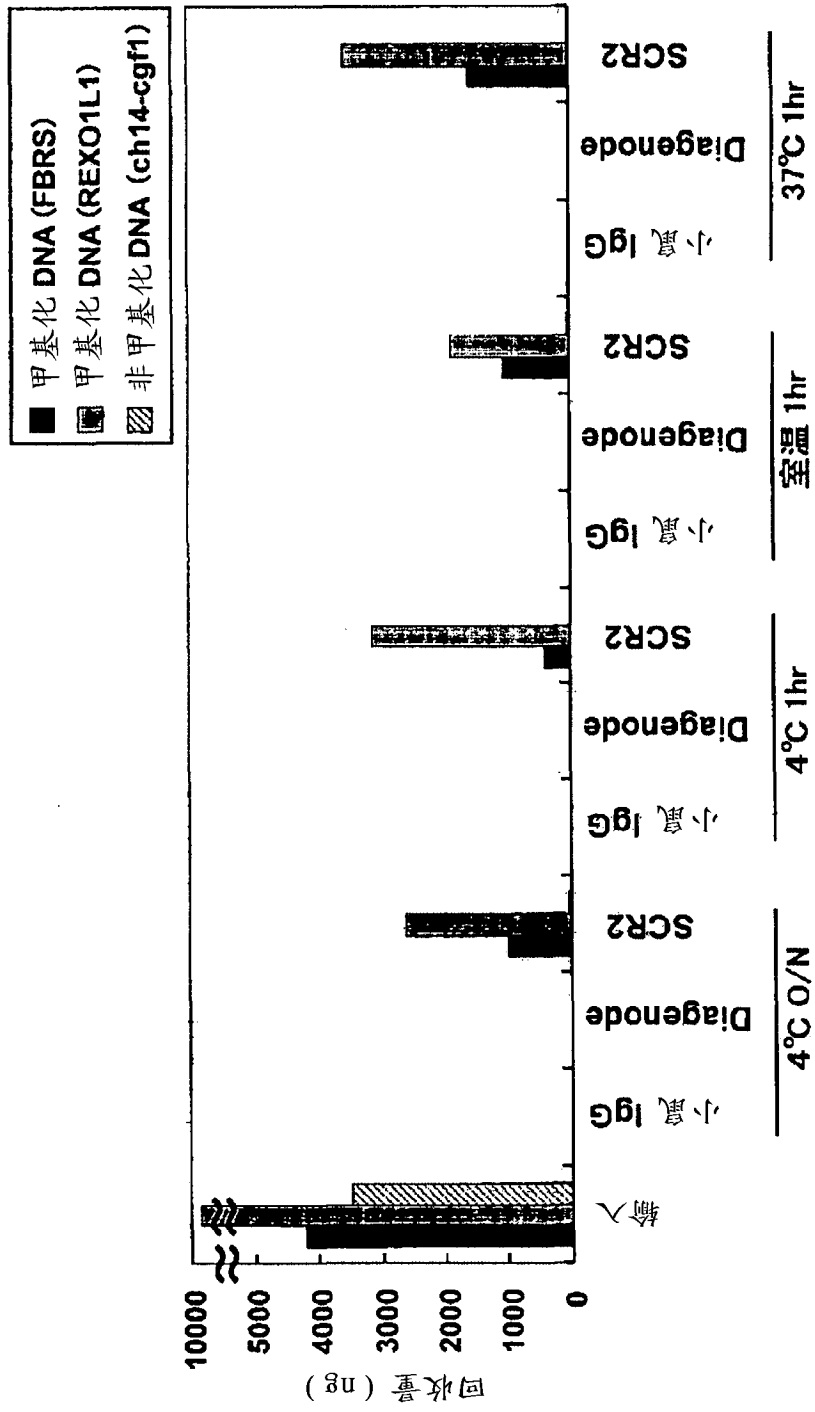


图 3

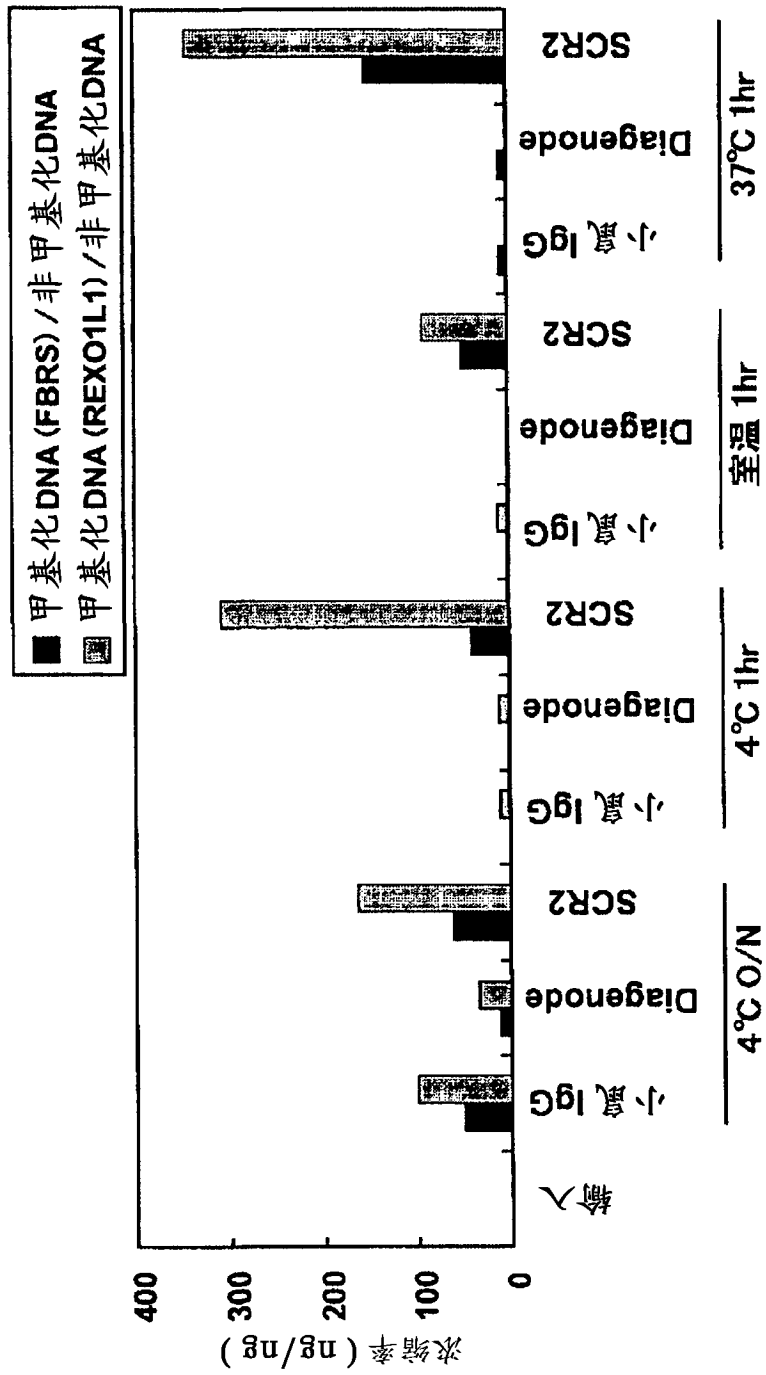


图 4

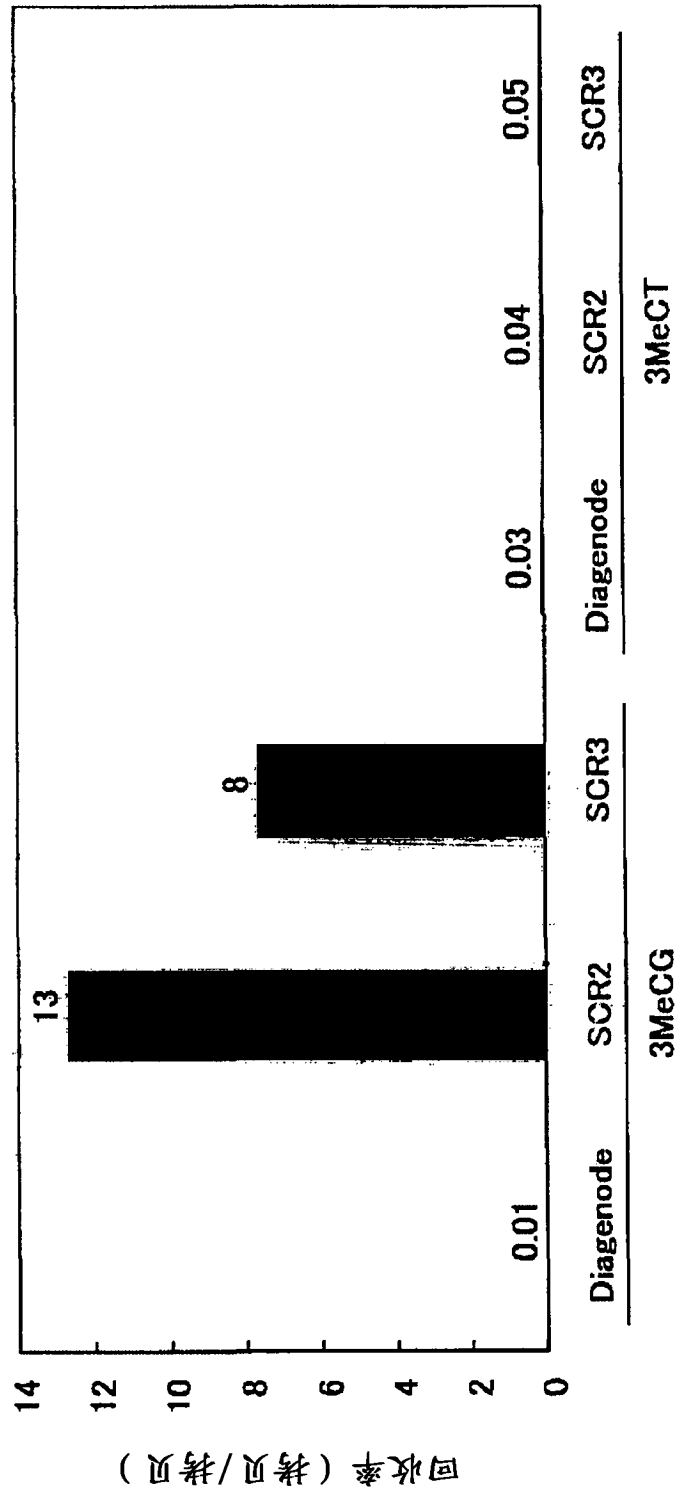


图 5

专利名称(译)	产生抗甲基化DNA抗体的杂交瘤及其利用		
公开(公告)号	CN102574927B	公开(公告)日	2015-01-07
申请号	CN201080042414.0	申请日	2010-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
[标]发明人	酒井绫子 梶田昌裕		
发明人	酒井绫子 梶田昌裕		
IPC分类号	C07K16/44 C12N5/0781 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 C12N5/163 C07K16/44		
优先权	2009222893 2009-09-28 JP 2009298213 2009-12-28 JP		
其他公开文献	CN102574927A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及将从用包含5'-(5-甲基-2'-脱氧胞苷-3'-磷酸)-2'-脱氧鸟苷3'-磷酸的抗原免疫的动物得到的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合而得到的，产生抗甲基化DNA抗体的杂交瘤。另外，本发明涉及由该杂交瘤产生的单克隆抗体及使用该抗体将甲基化DNA免疫沉降的方法。

