



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101706507 B

(45) 授权公告日 2013.05.01

(21) 申请号 200910246034.8

(22) 申请日 2009.11.20

(66) 本国优先权数据

200910101286.1 2009.07.27 CN

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38号

(72) 发明人 汤永民 李思思

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 张法高 赵杭丽

(56) 对比文件

CN 101400785 A, 2009.04.01, 全文.

Alexander V. Kolesnikov 等. Enzyme
mimicry by the antiidiotypic antibody
approach. 《PNAS》. 2000, 第 97 卷 (第 25 期),
第 13526-13531 页.

李思思等. CD45 分子及其在白血病诊治中
的应用进展. 《实用肿瘤杂志》. 2008, 第 23 卷 (第
4 期), 第 372-375 页.

审查员 于菲

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图10页

(54) 发明名称

用异硫氰酸荧光素标记的抗人 CD45RA 单抗
的应用

(57) 摘要

本发明提供一种用异硫氰酸荧光素直接标
记的抗人 CD45RA 鼠免疫球蛋白单克隆抗体
的应用。研究表明, CD45RA 鼠免疫球蛋白单克隆
抗体具有良好的识别人 CD45RA 抗原的能力, 能
够有效识别白血病病人骨髓细胞及白血病细
胞株中的 CD34+CD38-CD123+ 白血病干细胞及
CD34+CD38+CD123+ 的子代白血病细胞, 因此, 本
发明提供的用异硫氰酸荧光素直接标记的抗人
CD45RA 鼠免疫球蛋白单克隆抗体可在制备白
细胞和白血病干细胞检测试剂中应用, 该抗体在
白血病干细胞的鉴定和研究中具有极为重要的
应用价值。

CN 101706507 B

1. 一种用异硫氰酸荧光素标记的抗人 CD45RA 鼠免疫球蛋白单克隆抗体在制备白血病干细胞及其子代白血病细胞检测试剂中的应用,所述的抗人 CD45RA 单克隆抗体的重链可变区基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO 1,轻链可变区基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO 2。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的抗人 CD45RA 单克隆抗体的重链可变区基因编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO 3,轻链可变区基因编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO 4。

用异硫氰酸荧光素标记的抗人 CD45RA 单抗的应用

技术领域

[0001] 本发明属生物技术, 主要涉及鼠免疫球蛋白, 尤其涉及用异硫氰酸荧光素 (FITC) 直接标记的抗人 CD45RA 鼠免疫球蛋白单抗 [克隆名: ZCH(Zhejiang Children's Hospital)-6-3A4] 在制备白细胞和白血病干细胞检测试剂中的应用。

背景技术

[0002] 人类白细胞分化抗原 (cluster of differentiation, 简称 CD 分子) 是位于细胞表面的糖蛋白或者糖脂分子, 通过与组织基质、细胞因子及其它细胞的相互作用发挥机体正常的免疫功能。而针对 CD 分子的抗体是分析 CD 分子结构、功能和分布不可或缺的有力工具。CD 分子抗体已经广泛地应用于血液学、免疫学、病理学等领域的研究。随着多色流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 技术的日新月异, 利用 FCM 结合 CD 类抗体可以实现对大部分血液系统疾病快速而准确地诊断和鉴别诊断, 同时以单克隆抗体为导向分子的靶向药物的研究也取得了令人鼓舞的成就。因此, CD 分子及其单抗成为诸多学者研究的热点, 从 1982 年巴黎的第 1 届国际人类白细胞分化抗原工作组会议 (1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, HLDA1) 开始, 至 2004 年澳大利亚阿德莱德召开的第 8 届 HLDA8 会议, 已有 339 种 CD 分子被鉴定和命名。

[0003] 血液系统恶性肿瘤疾病的治疗方案与预后判断中, 疾病的类型是重要因素, 及时而准确地对疾病进行诊断和分型是有效治疗的前提条件。利用 FCM 技术和 CD 分子, 白血病的免疫分型和鉴别诊断较以往更为准确、快速^[1]。而在血液系统恶性肿瘤治疗中, 随着抗肿瘤药物的不断问世和造血干细胞移植的实施, 白血病的预后已经有了明显的改善。虽然白血病的诊断和治疗已经有了明显的进步, 复发和耐药仍然是白血病治疗中难以攻克的难题。已有越来越多的临床和实验研究资料显示, 白血病患者体内存在着比例极少的白血病干细胞 (Leukemia stem cells, LSCs), 在启动白血病发生和发展中起着决定性的作用, 被认为是白血病耐药和复发的根源, 细胞毒性药物可以杀死大部分的白血病细胞, 骨髓常规甚至流式细胞仪均不能检测到白血病细胞。但是此时病人体内仍可能存在白血病干细胞, 后者是白血病细胞中极微量的一群细胞, 往往处于细胞周期之外 (G0 期), 不能被常规的细胞毒性药物杀死, 成为复发的根源。从理论上讲, 如果能够捕获并彻底清除白血病干细胞, 白血病就能被彻底治愈。Bonnet 等通过对大量临床样本的研究发现, 急性髓细胞白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 中 CD34+CD38- 细胞亚群具有长期增殖能力, 该类亚群虽然在 AML 患者中所占的比例很少 (约 0.12%), 但它们却可将人类 AML 转移至非肥胖型糖尿病 / 严重联合免疫缺陷病 (NOD/SCID) 小鼠的唯一细胞, 这些白血病细胞被称为“白血病干细胞”。应用白血病干细胞移植于 NOD/SCID 小鼠的实验显示, 大部分的 AML 亚型 (除急性早幼粒细胞白血病 M3 外) 的白血病细胞均表达 CD34+CD38- 或者 CD34+CD38+/low 表型^[2]。而 CD123 表达于白血病干细胞但不表达于正常造血干细胞^[3]。Dean 等进一步研究表明由 CD34+CD38-CD123+ 标记的白血病干细胞 96% 处于细胞分裂周期的 G0 期, 处于静止期的 LSC 避免受到常规细胞周期特异性药物的攻击^[4,5]。因此, CD34+CD38-CD123+ 是比较

公认的髓系白血病干细胞的标志。如果能够识别此类细胞群对于白血病的诊断、治疗和预后判断都是极为重要的。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种用异硫氰酸荧光素 (FITC) 直接标记的抗人 CD45RA 鼠免疫球蛋白单克隆抗体 [克隆名 :ZCH-6-3A4, 该克隆名为本研究室自行命名, 已经第 7 国际人类白细胞分化抗原协作组会议 (HLDA7) 鉴定并命名] 在制备白细胞和白血病干细胞检测试剂中的应用。研究表明, CD45RA 鼠免疫球蛋白单克隆抗体能够有效识别白血病病人骨髓细胞及白血病细胞株中的 CD34+CD38-CD123+ 白血病干细胞及 CD34+CD38+CD123+ 的子代白血病细胞。

[0005] 本发明所述的用异硫氰酸荧光素 (FITC) 直接标记的单抗 (3A4-FITC) 的制备方法为: 将纯化的 3A4 单抗, 通过改良 Marshall 法^[6], 用 FITC 进行标记, 多余 FITC 经 PBS 充分透析除去。

[0006] 本发明提供的抗人 CD45RA 鼠免疫球蛋白新克隆 ZCH-6-3A4 单抗是以小儿未分化型急性淋巴细胞白血病细胞作为免疫原, 致敏 Balb/C 纯种小白鼠, 通过鼠-鼠杂交瘤单抗技术研制成功的鼠抗人 CD45RA 膜抗原 [国际分化簇 (CD) 命名为 CD45RA] 的单抗, 该抗体已在第 7 届国际人类白细胞分化抗原协作组会议 (HLDA7) 上进行了全面鉴定并获得了分化簇 (CD) 命名。所述的抗人 CD45RA 鼠免疫球蛋白单克隆抗体具有 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO 2 的核苷酸序列, 其编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO 3 和 SEQ ID NO 4。

[0007] 当纯化 3A4 单抗直接用于流式检测时是采用间接免疫荧光标记法, 即需要荧光素标记的羊抗鼠 Fc 段抗体作为二抗与其结合才能被流式细胞仪检测到, 操作步骤比较繁琐, 非特异性结合较高。因此, 本实验室采用改良 Marshall 法, 用异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记纯化的 3A4 单抗, 制备 FITC 直接标记的 3A4 荧光抗体 3A4-FITC。3A4-FITC 使流式检测步骤简化并且大大减少了非特异性结合, 并可以与其他不同荧光素偶合的抗体联合进行多色荧光分析, 使白血病亚群及白血病干细胞分析检测结果更为准确、可靠。

[0008] 由于鼠抗人 CD45RA 抗体 ZCH-6-3A4 及其荧光抗体 3A4-FITC 并非天然存在, 而是需要刻意应用特定的抗原进行免疫致敏动物, 然后通过细胞融合、筛选、鉴定等一系列繁琐而复杂的技术过程研制而成, 本发明完成了对该抗人 CD45RA 抗体 (ZCH-6-3A4) 制备、纯化, 完成了该抗人 CD45RA 抗体 (ZCH-6-3A4) 直接标记抗体 3A4-FITC 的制备。尤其是 3A4-FITC 能够识别 CD34+CD38-CD123+ 白血病细胞, 对于白血病干细胞的研究具有极为重要的应用价值。

附图说明

[0009] 图 1. 3A4 与 KG1a 细胞株反应流式图, 3A4 对美国 Becton-Dickinson (BD) 公司的抗 CD45RA 单抗 (克隆名 L48) 行阻滞实验流式图。

[0010] 图 2. 鉴定 3A4 蛋白亚类流式图。

[0011] 图 3. pGEM[®]-T Easy/VH_{3A4} 和 pGEM[®]-T Easy/VL_{3A4} 酶切鉴定电泳图。

[0012] 图 4. 抗人 CD45RA 抗原单抗 ZCH-6-3A4 的可变区重链基因 (VH_{3A4}) 序列 (两个黑

色箭头之间的序列)。

[0013] 图 5. 抗人 CD45RA 抗原单抗 ZCH-6-3A4 的可变区重链基因 (VH_{3A4}) 序列 (两个黑色箭头之间的序列)。

[0014] 图 6. 亲和层析纯化 3A4 腹水紫外监测图。

[0015] 图 7. SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定纯化的 3A4 纯度及重轻链分子量。

[0016] 图 8. 3A4 对 3A4-FITC 基础阻滞实验流式图。

[0017] 图 9. 3A4-FITC 抗体活性滴定流式图。

[0018] 图 10. 3A4 识别 CD34+CD38-CD123+KG1a 细胞株 (10A) 和初发髓系白血病患者骨髓 CD34+CD38-CD123+ 细胞 (10B) 的能力。

具体实施方式

[0019] 本发明结合附图和实施例作进一步的说明。

[0020] 实施例一

[0021] 流式细胞仪间标法检测 3A4 识别抗原能力及检测其对 BD 公司的抗 CD45RA 单抗 (克隆名 L48) 阻滞作用 (图 1)。步骤如下:

[0022] 1、计数 KG1a 细胞,调整浓度至 1×10^7 /ml,每个流式管取 100 μ l 细胞悬液;实验设 4 个反应管,依次为 A. 阴性对照管;B. 3A4 识别抗原能力检测管;C. 抗 CD45RA 单抗管;D. 3A4 阻滞抗 CD45RA 单抗管。

[0023] 2、B 管和 D 管加入 3A4 培养上清 50 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育 30min;

[0024] 3、加 PBS 1000g 离心 10 分钟,洗去未结合的 3A4;

[0025] 4、A 管和 B 管分别加入 2 μ l GAM-FITC,C 管和 D 管分别加入和 2 μ l CD45RA-FITC;

[0026] 5、加 PBS 1000g 离心 10 分钟,洗去未结合的抗体;

[0027] 6、流式细胞仪检测、分析。

[0028] 图 1 为 3A4 与 KG1a 细胞株反应流式检测图 (1B),与 BD 公司的抗 CD45RA 单抗比较流式图 (1C),并行 3A4 对抗 CD45RA 抗体的阻滞实验流式图 (1D)。结果发现,3A4 与 KG1a 细胞反应阳性率为 99.51%,MFI 为 432.63,表明 3A4 抗体活性佳。图 1E 中峰 1 为阴性对照,峰 2 为阻滞图,峰 3 为未阻滞图,表明 3A4 能完全阻滞 BD 公司的抗 CD45RA 抗体与 KG1a 的反应,提示抗 CD45RA 抗体和 3A4 识别的为同一抗原表位。

[0029] 实施例二

[0030] 3A4 免疫球蛋白亚类的鉴定:采用流式细胞仪间标法,KG1a 细胞株为反应细胞,以 3A4 为一抗,免疫球蛋白亚类鉴定试剂盒为二抗,检测不同免疫球蛋白为二抗时阳性率和平均荧光强度 (图 2)。步骤如下:

[0031] 1、计数 KG1a 细胞,调整浓度至 1×10^7 /ml,每个流式管取 100 μ l 细胞悬液;

[0032] 2、每管加 3A4 培养上清 50 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育 30min;

[0033] 3、加 PBS 1000g 离心 10 分钟,洗去未结合的 3A4;

[0034] 4、加入免疫球蛋白试剂盒中的二抗,分别为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、Ig κ 、Ig λ ,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min;

[0035] 5、加 PBS 1000g 离心 10 分钟,洗去未结合的二抗;

[0036] 6、流式细胞仪检测、分析。

[0037] 图 2 是采用流式细胞术间接法,以 KG1a 细胞株为反应细胞,3A4 为一抗,以 FITC 标记的羊抗鼠免疫球蛋白亚类抗体为二抗,检测不同二抗时的阳性率和平均荧光强度 (MFI)。结果发现 IgG1 FITC 为二抗时阳性率为 98.48%,MFI 332.85,,Kapper FITC 为二抗时,阳性率为 99.02%,MFI 为 252.20,表明 3A4 抗体属于 IgG1 κ 。

[0038] 实施例三

[0039] 本发明提供的抗人 CD45RA 鼠免疫球蛋白及其重链和轻链可变区基因通过下列步骤获得:

[0040] 1、ZCH-6-3A4 单抗的研制:基本按 Koller&Milstein 报告的鼠-鼠杂交瘤经典方法进行,以小儿急性未分化型淋巴细胞性白血病 (uALL) 细胞 (其免疫表型为 HLA-DR+, CD19+, CD10-, CD33-, TdT+, CD7-, CD41a-) 作为免疫原,将 107 白血病细胞给 8 周龄雌性 Balb/C 小鼠作腹腔注射,每周一次,共 4 次,于第 4 次注射后第 3 天,脱臼杀死小鼠,无菌取脾细胞与处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞株 NS-1 细胞 (美国 ATCC 产品) 按 6:1 混合,以 50% 聚乙二醇 (PEG,美国 Sigma 公司,分子量 3350 道尔顿) 溶液作为融合媒介进行细胞融合,于 96 孔板 (美国 Falcon 公司) 中进行选择性培养。于融合后第 9~20 天,隔日用免疫原细胞对培养上清进行间接免疫荧光法 (IIF) 筛选。阳性孔细胞经 3 次克隆化并连续 2 次 100% 孔达到阳性,即建立了能持续分泌 3A4 单抗的杂交瘤细胞系 (克隆名:ZCH-6-3A4,简称 3A4)。经 8 个多月的连续传代培养和反复冻融,其分泌 3A4 单抗的能力稳定。以其腹水 (荧光法效价 1:3200) 或培养上清 (荧光法效价 1:16) 作为 3A4 单抗的来源。

[0041] 2、3A4 重、轻链基因 (VH_{3A4}、VL_{3A4}) 的扩增和克隆

[0042] 2.1 总 RNA 的抽提和处理:

[0043] 收集 3A4 杂交瘤细胞 8×10^6 ,以核糖核酸 (RNA) 抽提试剂盒 (TRIZOL 液) 按说明书步骤抽提总 RNA。最后溶于 25 μ l DEPC (diethyl-pyrocabonate,焦碳酸二乙酯) 水中,并加入 RNasin[®] (核糖核苷酸酶抑制剂) 至终浓度为 1U/ μ l (单位/微升)。紫外分光光度计测定 A260、A280 及其比值,1% 琼脂糖电泳观察总 RNA。进行逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 前,取 2 μ l 3A4 总 RNA,按照 RQ1 (无 RNA 酶的 DNA 酶试剂盒) 说明的方法,消化总 RNA 中污染的基因组 DNA。

[0044] 2.2 总 RNA 的抽提:

[0045] (1) 计数细胞,共 8×10^6 个活细胞;

[0046] (2) 常温下 1000 转/分钟 (rpm) 离心 15 分钟,弃上清;

[0047] (3) 沉淀中加入无菌生理盐水后在 1000rpm 条件下离心 15 分钟,重复洗涤 2 次;

[0048] (4) 向沉淀中加入 8ml TRIZOL (1ml/ 10^6 细胞),立即用 5ml 无菌针筒反复抽打剪切数分钟;

[0049] (5) 将上述 TRIZOL 溶液按 1ml/管转入 1.5ml 带盖小塑料 (ependorf) 管中,室温下静置 5 分钟;

[0050] (6) 每管加入 0.2ml 氯仿,剧烈摇动 15 秒,室温下静置 10 分钟;

[0051] (7) 4°C 下 12000g 离心 15 分钟,将水相转入新的 1.5ml 的 ependorf 管中,每管加入 0.5ml 异丙醇,立即摇匀,室温下静置 10 分钟;

[0052] (8) 4°C 下,12000g 离心 10 分钟;

[0053] (9) 弃上清,每管加入 1.5ml 75% 乙醇,混匀,4°C 下,7500g 离心 5 分钟,弃上清;

[0054] (10) 真空干燥机中晾干,每管加入 25 μ l 无 RNA 酶的 DEPC 水溶解沉淀, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

[0055] 2.3 总 RNA 浓度的测定:

[0056] 取出 2 μ l 新抽提的总 RNA,加入 98 μ l DEPC 水混匀,紫外分光光度计 (GeneQuant II) 测定 260 吸光值 (A260) 及 280 吸光值 (A280),RNA 实际浓度用如下公式计算:

[0057]

$$\text{RNA浓度 (ug/\mu l)} = \frac{\text{A260}}{24} \times \text{稀释倍数}$$

[0058] 2.4 总 RNA 凝胶电泳:

[0059] 取新抽提的总 RNA 3 μ l 加入电泳上样缓冲液 5 μ l,1% 琼脂糖凝胶内含溴乙啶 (EB) 浓度 0.5 μ g/ml,经 100V 直流电压下电泳 5 分钟,凝胶成像系统观测结果并摄像保存。

[0060] 2.5 总 RNA 的处理:取总 RNA 1 μ l+ 无 RNA 酶的 DNA 酶 (RNase-freeDnase) (1U/ μ l) 10 μ l+RNasin(40U/ μ l) 1 μ l,总量达 12 μ l,经 37 $^{\circ}$ C \times 1 小时,90 $^{\circ}$ C \times 5 分钟孵浴后立即置冰上待用。

[0061] 2.6 RT-PCR:

[0062] 按照说明书,将 RQ1 无 RNA 酶的 DNA 酶处理过的总 RNA 进行逆转录 (25 μ l 体系),并用 DNA 纯化试剂盒 (QIAquick) 纯化 mRNA/cDNA 杂交双链。取纯化的 cDNA 2.5 μ l 进行 PCR。

[0063] 2.6.1 RT 反应体系:取 RQ1 处理过的总 RNA 13 μ l+ 寡聚脱氧胸苷 [Oligo(dT)] 1.5 μ l,总量达 14.5 μ l,经 65 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟,立即置冰上,加入以下试剂: DEPC 水 2.5 μ l+5 倍缓冲液 5 μ l+25mM dNTP(脱氧核苷混合物) 0.5 μ l+RNA 酶抑制剂 1.5 μ l+ 逆转录酶 (200U/ μ l) 1 μ l 至总体积 25 μ l,经 37 $^{\circ}$ C,30 分钟孵浴以合成互补脱氧核糖核苷酸 (cDNA),置 95 $^{\circ}$ C 5 分钟,然后移至 4 $^{\circ}$ C 冰浴备用。

[0064] 2.6.2 PCR 体系

[0065] (1) 50 μ l 的 PCR 反应体系:2.5 μ l 纯化的 3A4,10pmol 的轻链或重链可变区上下游引物各 1 μ l,0.5 μ l 25mM 的 dNTP,5 μ l 10 \times 高保真 PCR 缓冲液,0.2 μ l 高保真 Taq 聚合酶 (Platinum[®] Taq High Fidelity);引物序列如下:

[0066] 重链可变区 5' 引物序列 (SEQ ID NO 5):

[0067] CAG GTG CAG CTGAAG CAG TC

[0068] 重链可变区 3' 引物序列 (SEQ ID NO 6):

[0069] CCA GGG GCC AGT GGA TAG ACAAGC TTG GGT GTC GTT TT 轻链可变区 5' 引物序列 (SEQ ID NO 7):

[0070] CAAATT GTT CTC ACC CAG TCT

[0071] 轻链可变区 3' 引物序列 (SEQ ID NO 8):

[0072] GGATAC AGT TGG TGC AGC ATC

[0073] (2) 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟,94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,57 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒,共 38 个循环;

[0074] (3) 最后一个循环完成后,加入 1 μ l Taq DNA Polymerase (Taq DNA 聚合酶) 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟;

[0075] (4) 取 5 μ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 同时加标准分子量标志物, 鉴定 PCR 产物片断大小, 分别命名为 VH_{3A4} 和 VL_{3A4} 基因。结果可观察到 350 碱基对 (bp) 左右的 VH_{3A4} 条带和 325bp 左右的 VL_{3A4} 条带。将前述阳性条带切胶回收纯化得到 VH_{3A4} 和 VL_{3A4} 基因。

[0076] 3. VH_{3A4}、VL_{3A4} 基因扩增产物的克隆和鉴定将纯化的 VH_{3A4} 和 VL_{3A4} 基因片段通过连接酶分别与克隆载体 pGEM®-T Easy 连接, 获得的连接产物 pGEM®-T Easy/VH 和 pGEM®-T Easy/VL, 通过转化 DH5 α 感受态细菌, 得到数十个白色菌落和数个蓝色菌落, 分别挑取 3 个白色菌落进行质粒扩增, 抽提后进行核酸限制性内切酶 EcoRI 酶切鉴定, 1% 琼脂糖电泳结果均可见 350bp 和 325bp 左右的目的片段 (图 3)。其中, M: 低核糖核苷酸 (DNA) 标准分子量标志物; 1 ~ 3: 重组质粒 pGEM®-T Easy/VH_{3A4} 的 EcoRI 酶切; 4 ~ 6: 重组质粒 pGEM®-T Easy/VL_{3A4} 的 EcoRI 酶切, 所切出的基因片断大小与目的基因相同, 重链长度为 351bp, 轻链长度 327bp, 说明 VH_{3A4} 基因和 VL_{3A4} 基因已分别被成功克隆入 TA 载体中; 7 ~ 8: 空质粒 pGEM®-T Easy 的 EcoRI 酶切。

[0077] 4. VH_{3A4}、VL_{3A4} 基因序列测定和分析

[0078] 对阳性重组质粒纯化后进行测序, VH_{3A4} (参见图 4) 和 VL_{3A4} (参见图 5) 基因均符合小鼠 Ig 可变区框架结构。VH_{3A4} 基因全长 351bp (见序列 SEQ ID NO 1), 编码 117 个氨基酸 (见序列 SEQ ID NO 3), 在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 上进行检索, 发现此重链可变区基因与小鼠免疫球蛋白重链可变区基因的同源性达 95.83%, 氨基酸序列与小鼠 Ig 重链的同源性达 87%, 归属于小鼠 Ig 的 VH 基因。氨基酸序列分析结果显示, 重链可变区含有明确的 4 个框架区 (FR) 和 3 个抗原决定簇互补区 (CDR), 在第 21 位和第 96 位为特征性 Cys (半胱氨酸)。VH_{3A4} 氨基酸序列结构框架如下:

[0079] 1 ~ 25 FR1
 [0080] 26 ~ 33 CDR1
 [0081] 34 ~ 50 FR2
 [0082] 51 ~ 58 CDR2
 [0083] 59 ~ 96 FR3
 [0084] 97 ~ 105 CDR3
 [0085] 106 ~ 117 FR4

[0086] VL_{3A4} 基因全长 327bp (见序列 SEQ ID NO 2), 编码 109 个氨基酸 (见序列 SEQ ID NO 4), 在 NCBI 上进行检索, 发现此轻链可变区基因与小鼠 Ig κ 链的同源性达 98.58%, 氨基酸序列与小鼠 Ig κ 链的同源性达 88%, 归属于小鼠 Ig 的 V κ 基因。氨基酸序列分析结果显示, 轻链可变区含有明确的 4 个框架区 (FR) 和 3 个抗原决定簇互补区 (CDR), 在第 23 位和第 89 位为特征性半胱氨酸 (Cys)。VL_{3A4} 氨基酸序列框架如下:

[0087] 1 ~ 26 FR1
 [0088] 27 ~ 33 CDR1
 [0089] 34 ~ 50 FR2
 [0090] 51 ~ 53 CDR2
 [0091] 54 ~ 89 FR3
 [0092] 90 ~ 98 CDR3

[0093] 99 ~ 10 9FR4

[0094] 实施例四

[0095] 3A4 直标抗体 3A4-FITC 的制备 :在清洁级 BALB/c 小鼠腹腔注射 3A4 细胞,制备大量腹水。硫酸铵初步纯化后采用 Econo-Pac 蛋白 A 柱进行亲和层析 (图 6),SDS-PAGE 检测纯化蛋白的纯度 (图 7)。将获得的纯化 3A4 单抗,通过改良 Marshall 法^[6],用 FITC 进行标记,多余 FITC 经 PBS 充分透析除去。图 6 为 3A4 腹水通过亲和层析纯化柱 Econo-Pac[®] Protein A Cartridge 纯化时的紫外监测图,前峰为腹水过柱时全蛋白峰,后者为洗脱时的目的蛋白峰。图 7 为亲和层析纯化的目的蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定蛋白纯度,可见目的条带清晰,没有杂带,重链分子量为 57.9KDa,轻链分子量为 30.3KDa。

[0096] 具体步骤如下:

[0097] 1、抗体的准备:用盐水 (0.15mol/l NaCl) 及缓冲液 (0.15mol/l NaHCO₃-Na₂CO₃PH9.0) 稀释使每毫升内含蛋白 10mg,缓冲液为总量的 10%,降温至 4℃,电磁搅拌 5 ~ 10min;

[0098] 2、荧光素的准备:根据欲标记的蛋白质总量,按每毫克蛋白加 0.01mg 荧光素,用分析天平准确称所取所需的异硫氰酸荧光素粉末;

[0099] 3、结合 (或称标记):边搅拌边将称取的荧光色素渐渐加入蛋白溶液中,避免将荧光素粘于搅拌玻棒上 (大约 5 ~ 10min 内加完),加毕后,继续搅拌 12 ~ 18h。结合期间应保持蛋白溶液于 4℃左右;

[0100] 4、透析:结合完毕后,将球蛋白的溶液以 2500r/min 速度离心 20min,除去其中少量之沉淀物,pH8.0 缓冲盐水 4℃透析 72 小时。

[0101] 5、保存:将制备好的荧光抗体加叠氮钠 0.01%,分装。于 4℃可以保存半年,-20℃保存可达 2 年以上。

[0102] 用紫外分光光度计测定 3A4-FITC A495 值和 A280 值,结果分别为 0.283 和 0.3,A495/A280 比值为 0.94,介于 FITC 荧光抗体的理想比值 0.3 ~ 1.0 之间^[7]。阻滞试验显示,在 CD45RA 抗原表位被 3A4 基础单抗封闭的情况下,3A4-FITC 的阳性细胞百分数由 98.46% 下降到 10.06%,下降了 89.8% (图 8)。图 8 为 3A4 对自身抗体 3A4-FITC 基础阻滞流式图,CD45RA 抗原表位被 3A4 基础单抗封闭的情况下,3A4-FITC 的阳性细胞百分数由 98.46% (8B) 下降到 10.06% (8C),下降了 89.8%,图 8D 中的峰 1 为阴性对照,峰 2 为阻滞后图,峰 3 为未阻滞图,表明 3A4-FITC 能被自身的 3A4 单抗阻滞。

[0103] 实施例五

[0104] 3A4-FITC 活性鉴定:取 KG1a 细胞株为反应细胞,固定细胞量,逐渐增加 3A4-FITC 量,流式细胞仪检测不同 3A4-FITC 浓度时阳性率和平均荧光强度 (MFI),结果表明阳性率和 MFI 随 3A4-FITC 增多而增加,但是 0.4 μg 的 3A4-FITC 即可饱和 1×10^6 个 KG1a 细胞,继续增加 3A4-FITC 阳性率和 MFI 增加不明显,参见图 9。其中图 9A 是 3A4-FITC 滴定流式图,图 9B 是阳性率变化折线图,图显示 0.4 μg 的 3A4-FITC 即可饱和 1×10^6 个 KG1a 细胞,其阳性率为 99.5%,平均荧光强度 (MFI) 为 194.63,表明该直标抗体识别能力强,活性佳。

[0105] 实施例六

[0106] 为证实 3A4 能捕获白血病干细胞,流式细胞仪检测 3A4 识别白血病细胞株和初发白血病患者骨髓中 CD34+CD38-CD123+ 白血病干细胞的能力。结果发现 3A4 在

CD34+CD38-CD123+KG1a 细胞株上阳性率为 99.05% (图 10A), 在初发白血病患者骨髓 CD34+CD38-CD123+ 细胞上阳性率可高达 90.3% (图 10B)。

[0107] 无需进一步详细阐述, 相信采用前面所公开的内容, 本领域技术人员可最大限度地应用本发明。因此, 前面的实施方案应理解为仅是举例说明, 而非以任何方式限制本发明的范围。

[0108] 本发明涉及的序列

[0109] 1. 汤永民, CD 分子及其单克隆抗体在小儿血液肿瘤诊疗中的应用, 国外医学输血与血液学分册. 2005, 28(1):8-10.

[0110] 2. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med, 1997, 3: 730-737.

[0111] 3. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor a chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. Leukemia, 2000, 14:1777-1784.

[0112] 4. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer, 2005, 5:275-284.

[0113] 5. Countouriotis A, Moore TB, Sakamoto KM. Cell surface antigen and molecular targeting in the treatment of hematologic malignancies. Stem Cells. 2002, 20(3):215-29.

[0114] 6. 蔡文琴, 王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 四川科学技术出版社, 1994, 45-60.

[0115] 7. 沈关心, 龚非力. 抗体技术实验指南. 科学出版社, 2002. 58.

[0116] 本发明涉及的序列

[0117] <120> 用异硫氰酸荧光素标记的抗人 CD45RA 单抗的应用

[0118] <160>8

[0119] <170>Patent In Version 2.1

[0120] <210>1

[0121] <211>351

[0122] <213>人工序列

[0123] <220>

[0124] <223>94a 88c 91g 78t

[0125] <400>1

[0126] 1 CAGGTGCAGC TGAAGCAGTC TGGGGCTGAA CTGGCAAAAC CTGGGGCCTC AGTGAAGATG

[0127] 61 TCCTGCAAGG CTTCTGGCTC CACCTTTACT ACCTACTGGA TACTACTGGGT AAAACAGAGG

[0128] 121 CCTGGACAGG GTCTGGAATG GATTGGATAC ATTAATCCTA AACTGGTTA TACTGAGTAC

[0129] 181 AATCAGAAGT TCAAGGCCAA GGCCACATTG ACTGCAGACA AATCCTCCAG CACAGCCTAC

[0130] 241 ATGCAACTGA GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC TCTGCAGTCT ATTACTGTGT AAGATTTATT

[0131] 301 ACGGTAGTAG GGGGGTGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCAGC C

[0132] <210>2

- [0133] <211>327
[0134] <212>DNA
[0135] <213> 人工序列
[0136] <220>
[0137] <223>75a 99c 75g 78t
[0138] <400>2
[0139] 1 CAAATTGTTC TCACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT ATCTAGGGGA ACGGGTCACC
[0140] 61 ATGACCTGCA CTGCCAGTTC AAGTGTAAGT TCCAGTCACT TGCACTGGTA CCAGCAGAAG
[0141] 121 CCAGGATCCT CCCCCAAACT CTGGATTTAT AGCACATCCA ACCTGGCTTC TGGAGTCCCA
[0142] 181 GCTCGCTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACC TCTTACTCTC TCACAATCAG CAGCATGGAG
[0143] 241 ACTGAAGATG CTGCCACTTA TTA CTGCCAC CAGTATCATC GTTCCCCGCT CACGTTCCGGT
[0144] 301 GCTGGGACCA AGCTGGAGCT GAAACGG
[0145] <210>3
[0146] <211>117
[0147] <212>
[0148] <213> 人工序列
[0149] <220>
[0150] <400>3
[0151] 1 QVQLKQSGAE LAKPGASVKM SCKASGSTFT TYWIHWVKQR PGQGLEWIGY
[0152] 61 INPNTGYTEY NQKFKAKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCVRFI
[0153] 101 TVVGGWGQGT TLTVSSA
[0154] <210>4
[0155] <211>109
[0156] <212>
[0157] <213> 人工序列
[0158] <220>
[0159] <223>
[0160] <400>4
[0161] 1 QIVLTQSPAI MSAYLGERVT MTCTASSSVS SSSLHWYQQK PGSSPKLWIY
[0162] 51 STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSME TEDAATYYCH QYHRSPLTFG
[0163] 101 AGTKLELKR
[0164] <210>5
[0165] <211>20
[0166] <212>
[0167] <213> 人工序列
[0168] <220>
[0169] <223> 重链可变区 5' 引物序列
[0170] <400>5
[0171] CAG GTG CAG CTG AAG CAG TC

- [0172] <210>6
[0173] <211>38
[0174] <212>
[0175] <213> 人工序列
[0176] <220>
[0177] <223> 重链可变区 3' 引物序列
[0178] <400>6
[0179] CCA GGG GCC AGT GGA TAG ACA AGC TTG GGT GTC GTT TT
[0180] <210>7
[0181] <211>21
[0182] <212>
[0183] <213> 人工序列
[0184] <220>
[0185] <223> 轻链可变区 5' 引物序列
[0186] <400>7
[0187] CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT
[0188] <210>8
[0189] <211>21
[0190] <212>
[0191] <213> 人工序列
[0192] <220>
[0193] <223> 轻链可变区 3' 引物序列
[0194] <400>8
[0195] GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC

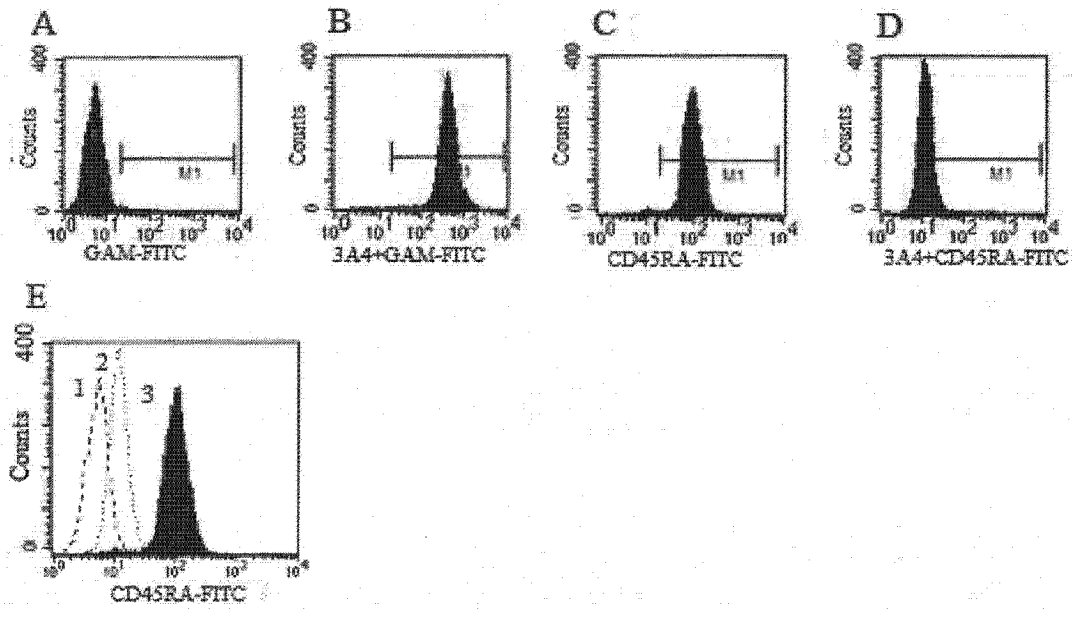


图 1

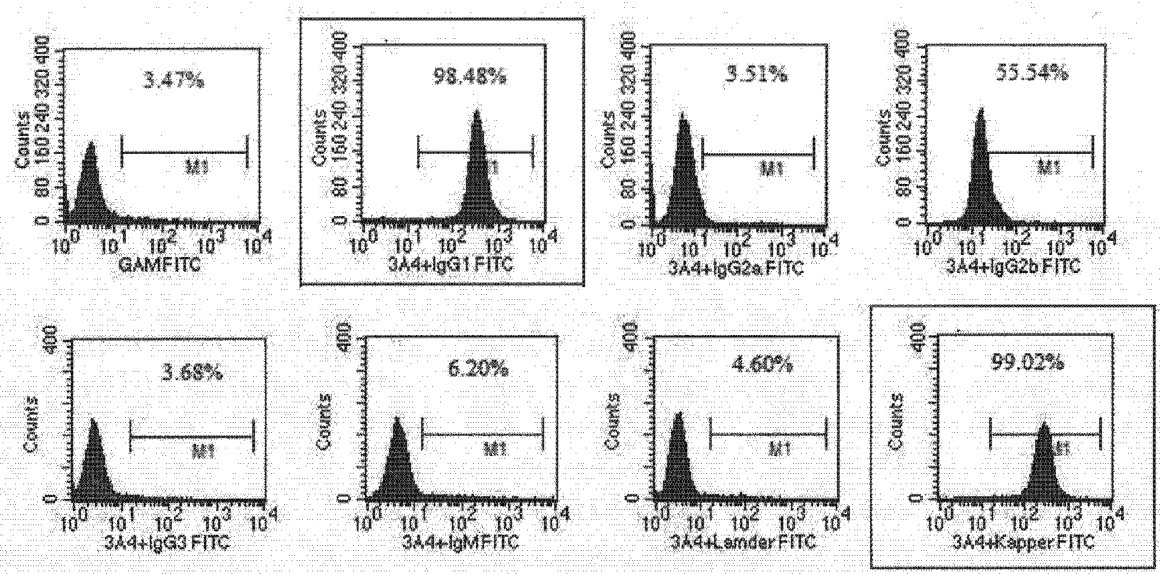


图 2

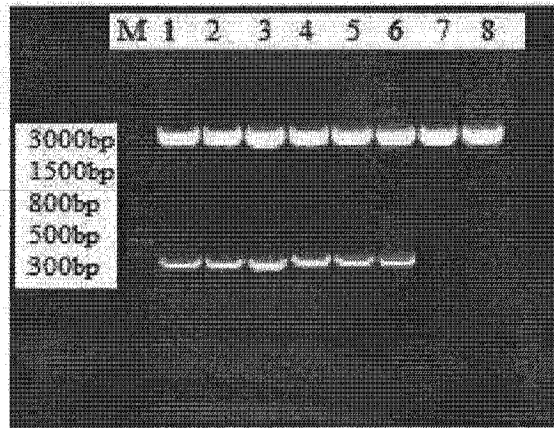
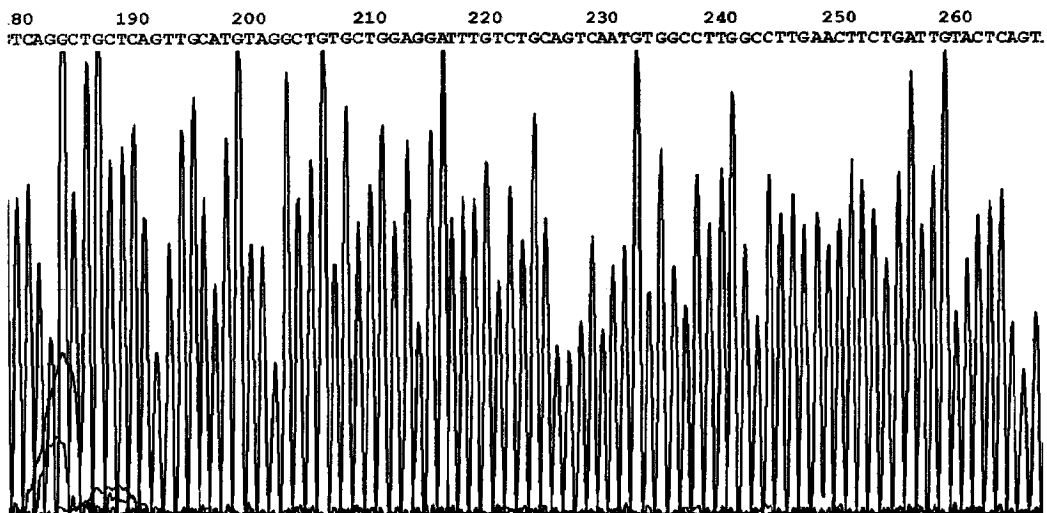
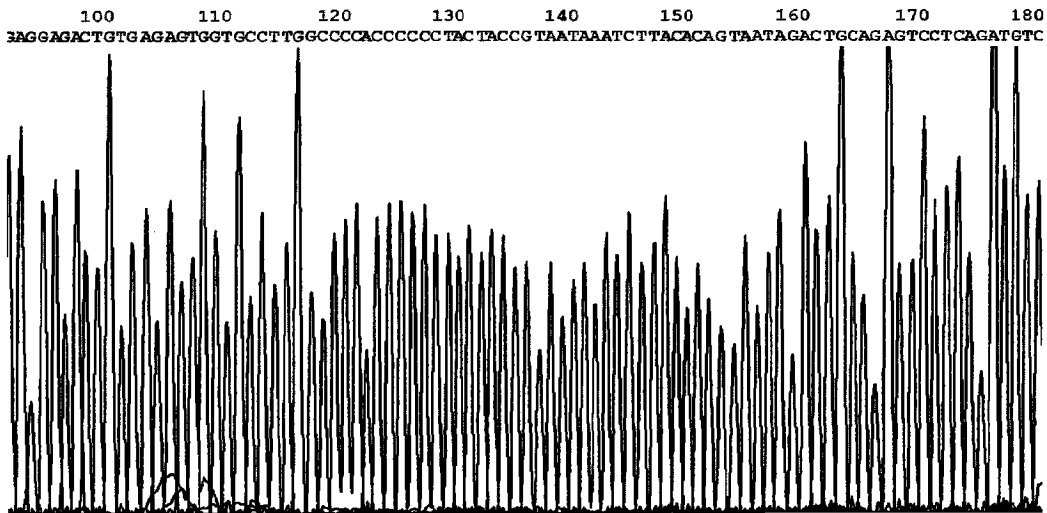
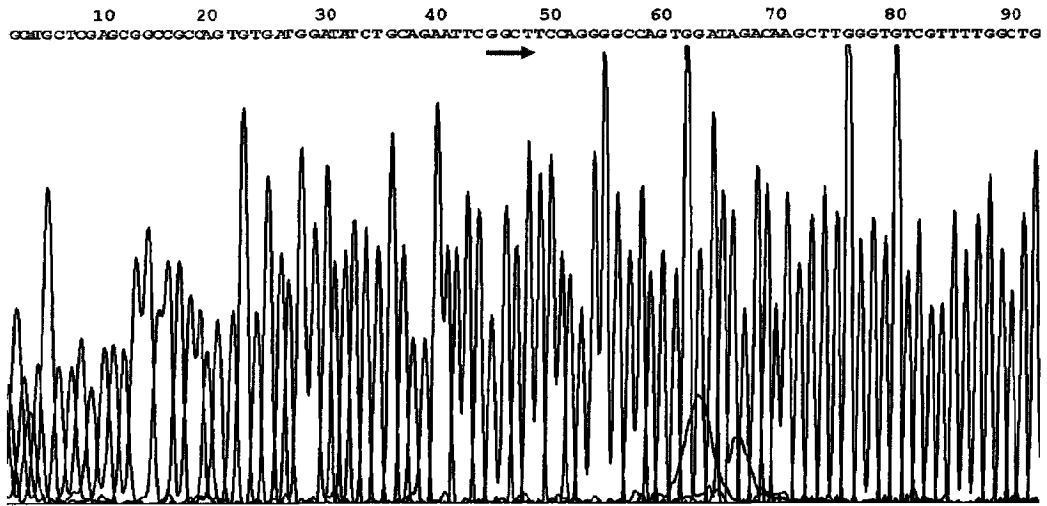


图 3

3A4重链可变区基因序列：49-399（如箭头所示）



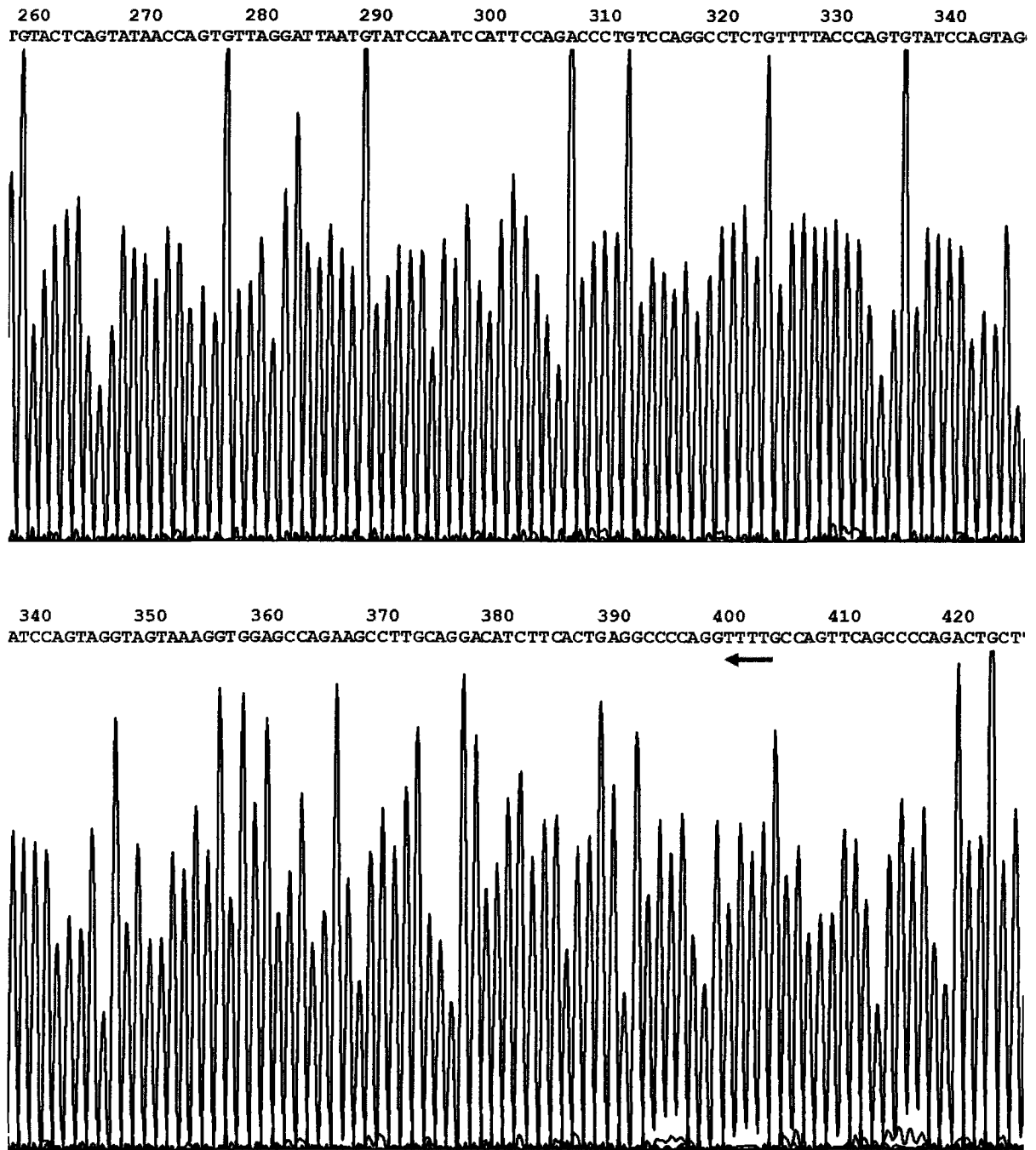
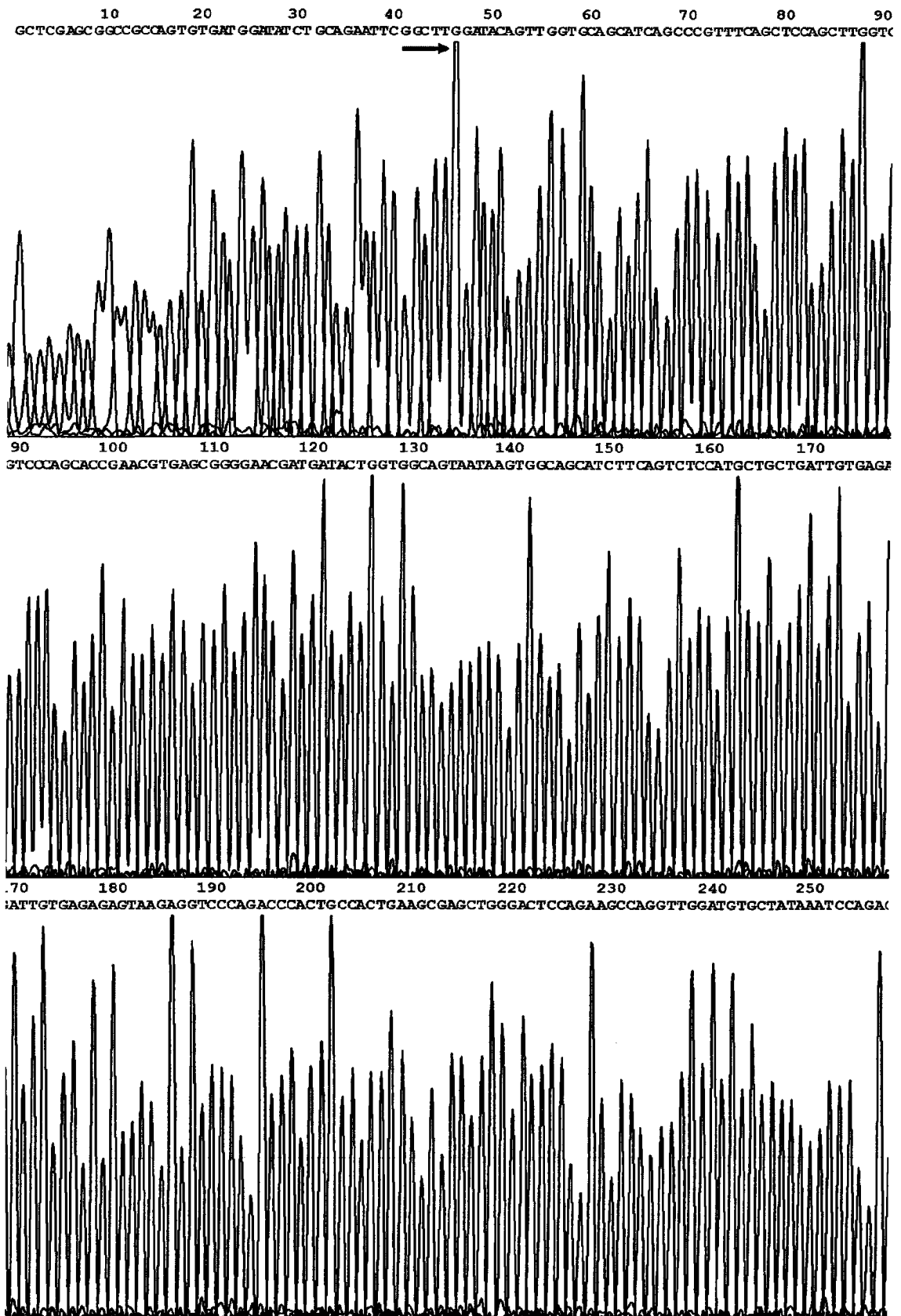


图 4

3A4轻链可变区序列：46-372（如箭头所示）



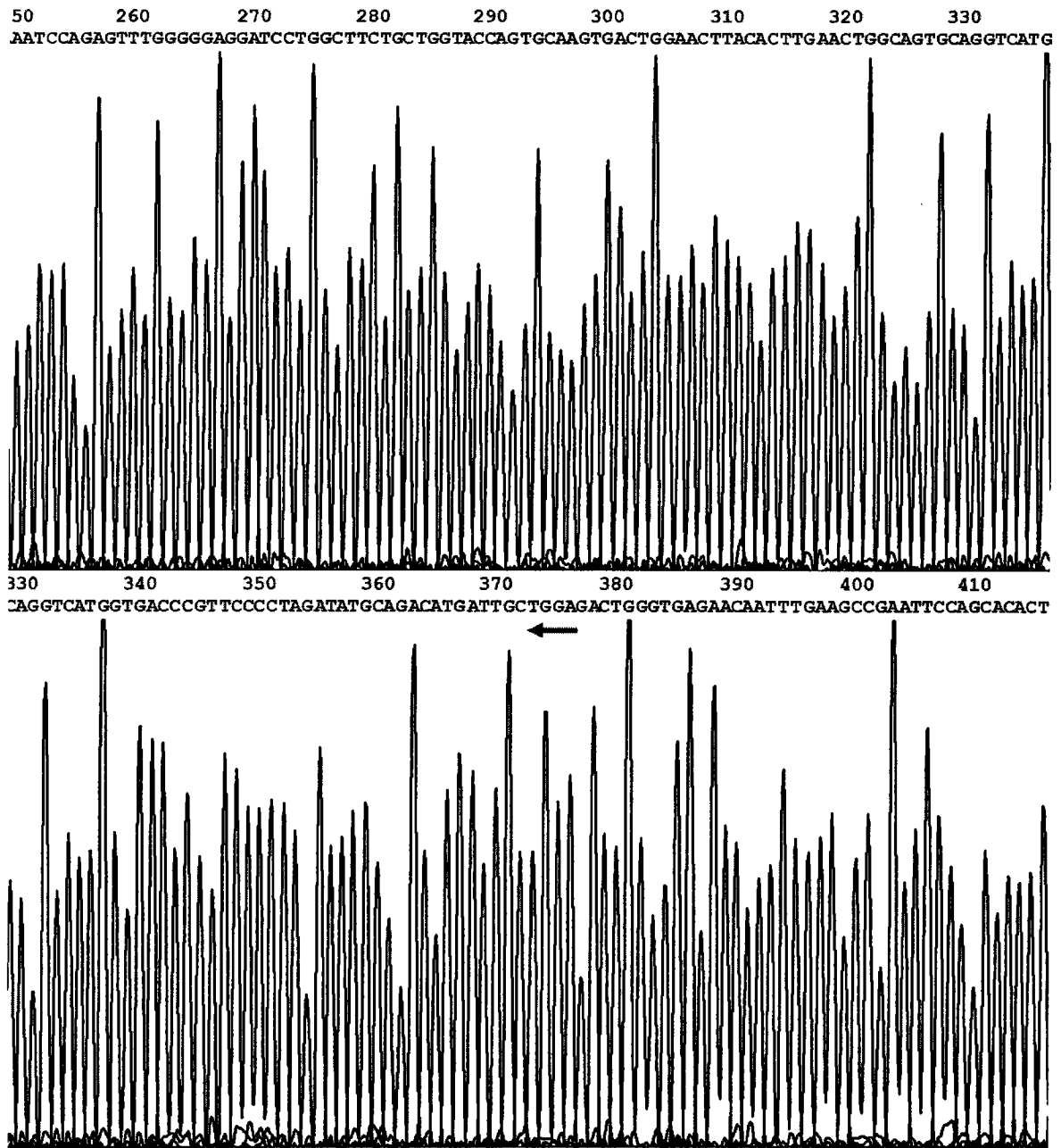


图 5

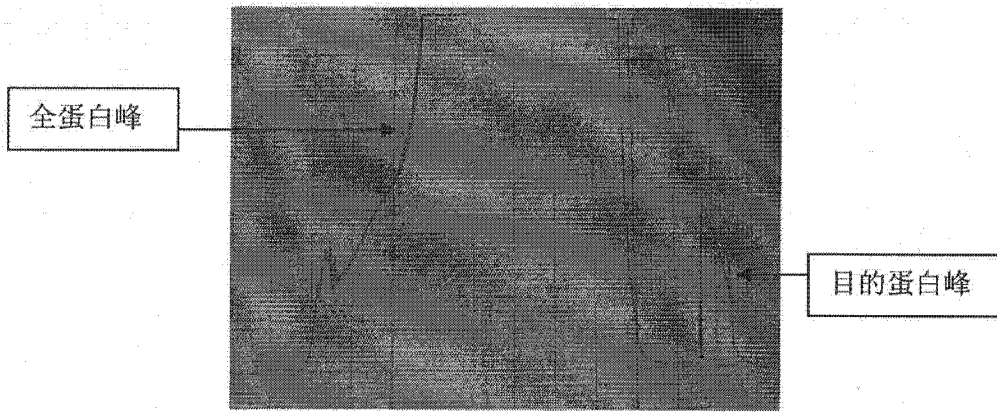


图 6



图 7

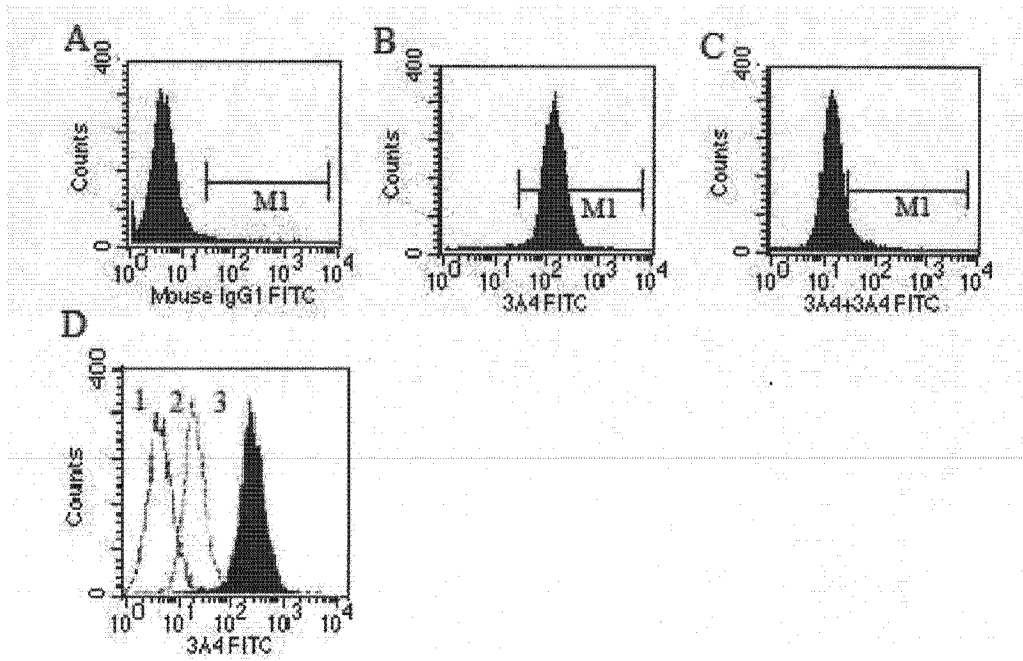


图 8

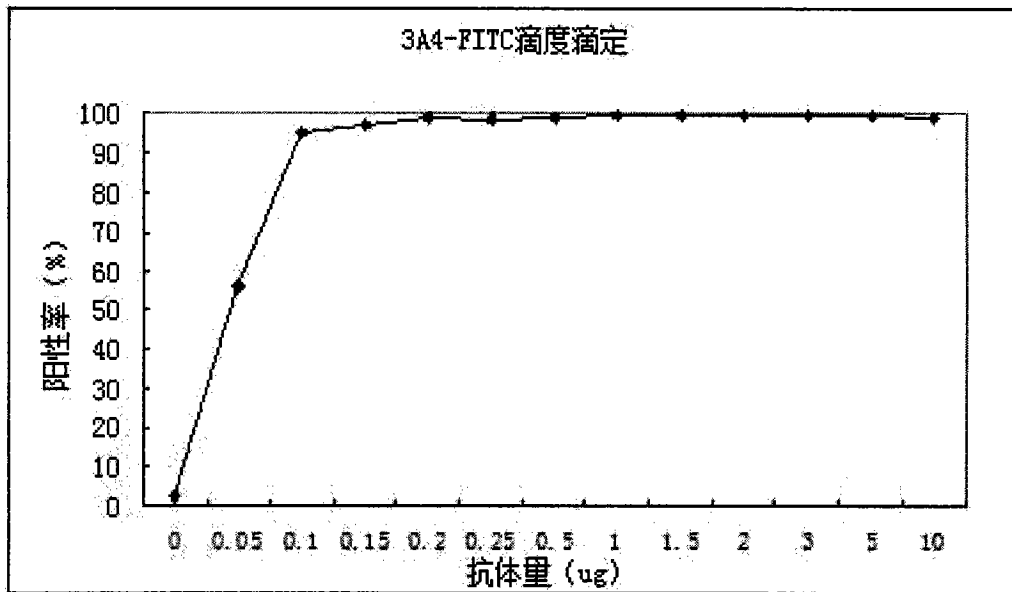
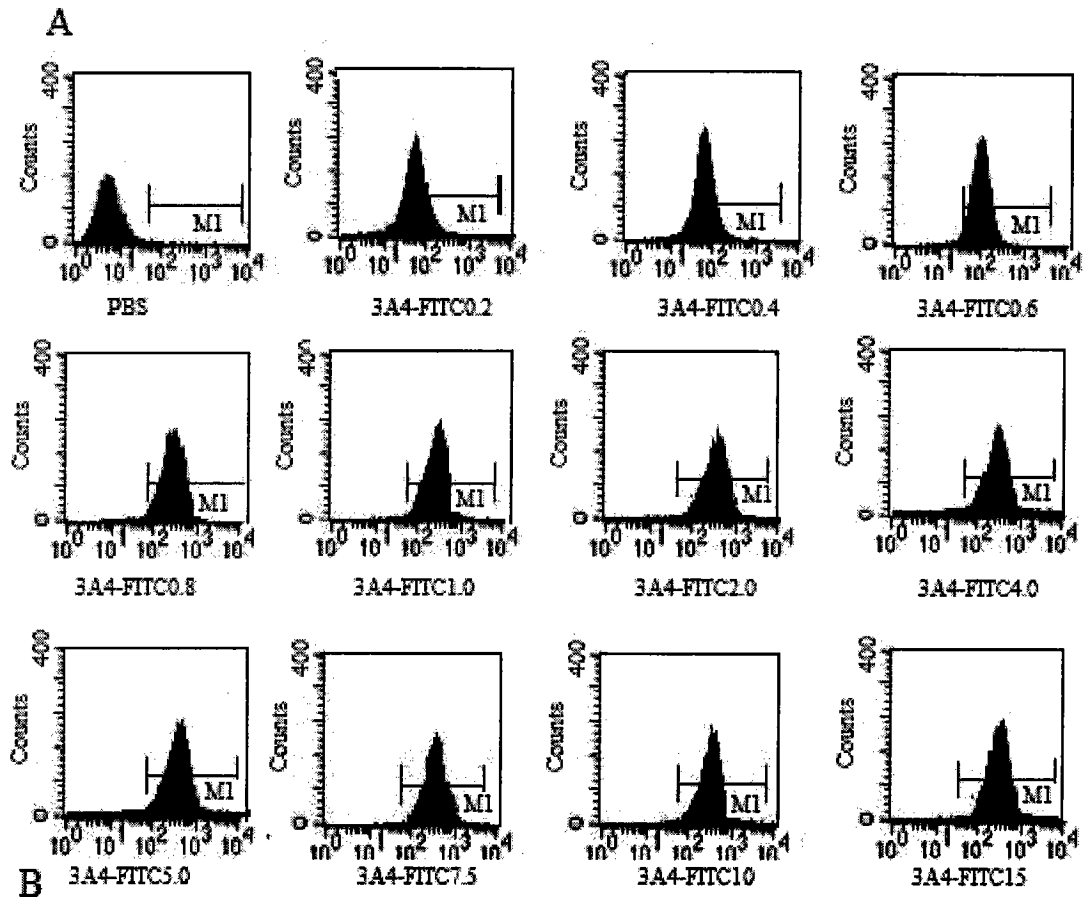


图 9

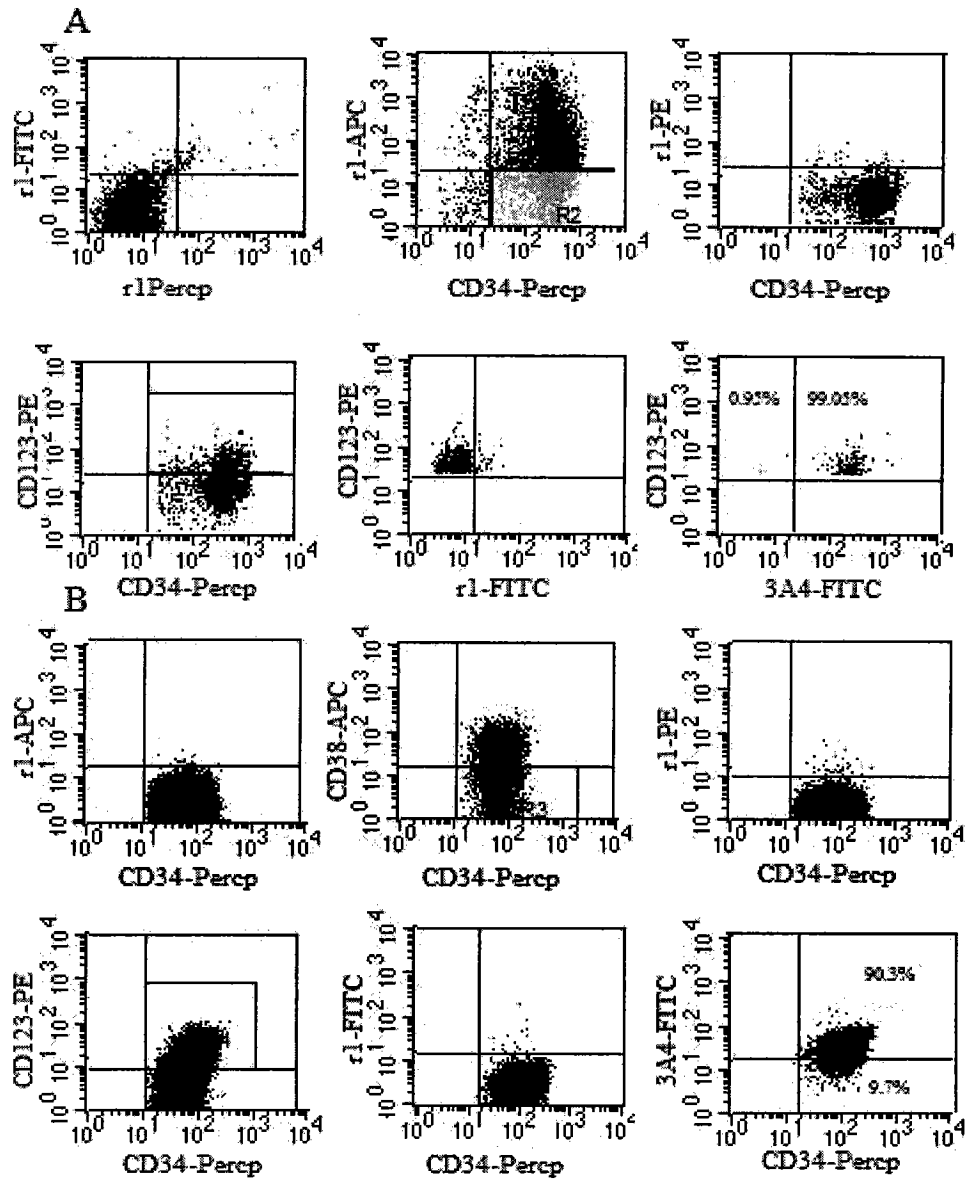


图 10

专利名称(译)	用异硫氰酸荧光素标记的抗人CD45RA单抗的应用		
公开(公告)号	CN101706507B	公开(公告)日	2013-05-01
申请号	CN200910246034.8	申请日	2009-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	汤永民 李思思		
发明人	汤永民 李思思		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 C07K16/28 C12N15/13 C12N15/63		
审查员(译)	于菲		
优先权	200910101286.1 2009-07-27 CN		
其他公开文献	CN101706507A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种用异硫氰酸荧光素直接标记的抗人CD45RA鼠免疫球蛋白单克隆抗体的应用。研究表明，CD45RA鼠免疫球蛋白单克隆抗体具有良好的识别人CD45RA抗原的能力，能够有效识别白血病病人骨髓细胞及白血病细胞株中的CD34+CD38-CD123+白血病干细胞及CD34+CD38+CD123+的子代白血病细胞，因此，本发明提供的用异硫氰酸荧光素直接标记的抗人CD45RA鼠免疫球蛋白单克隆抗体可在制备白细胞和白血病干细胞检测试剂中应用，该抗体在白血病干细胞的鉴定和研究中具有极为重要的应用价值。

