



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107219351 A

(43)申请公布日 2017.09.29

(21)申请号 201710428415.2

(22)申请日 2017.06.08

(71)申请人 广东省生物资源应用研究所
地址 510260 广东省广州市新港西路105号

(72)发明人 杨威 王笑非 毛明 汪巨峰
王茜莎 韩重 肖百全 郭健敏
黄远铿 王俐梅

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G07K 16/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书2页

(54)发明名称

一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法,包括以下步骤:步骤1)表达特异表面抗原的细胞免疫小鼠,抽取小鼠脾脏细胞进行ELISA分析;步骤2)根据其结果将单细胞附着在细胞芯片上,与荧光标记的抗原结合,获得阳性克隆信息和抗体亲和力信息;步骤3)符合标准的抗体经在位基因扩增,获取抗体可变区序列。本发明所提供的方法能快速获得大量的抗体的序列和亲和力数据,本发所述的筛选方法能为制药研究领域提供很好的基础。

1. 一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法,包括以下步骤:
 - 步骤1) 表达特异表面抗原的细胞免疫小鼠,抽取小鼠脾脏细胞进行ELISA分析;
 - 步骤2) 根据其结果将单细胞附着在细胞芯片上,与荧光标记的抗原结合,获得阳性克隆信息和抗体亲和力信息;
 - 步骤3) 符合标准的抗体经在位基因扩增,获取抗体可变区序列。
2. 如权利要求1所述的基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法,其特征在于:所述步骤2)的抗原为雄特异性抗原(serologically detected H-Y antigens)。
3. 如权利要求2所述的基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法,其特征在于:所述步骤2)的抗体是H-Y噬菌体抗体。

一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法

[0001]

技术领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,特别涉及一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法。

[0003]

背景技术

[0004] 近年来,抗体新药在恶性肿瘤、自身免疫病等重大疾病的治疗中显示了良好的疗效,国际国内对抗体类药物的开发成为新热点,竞争也异常激烈。在抗体新药的开发过程中,需要建立和应用多项关键技术,包括抗体筛选和功能确认、细胞株构建和工艺开发、中试工艺放大和临床前研究等多项关键技术。目前,国内在抗体筛选和工艺开发方面,存在很多技术难点,如目前大多数采用的通过杂交瘤细胞技术的抗体筛选方法有很多弊端,无法实现大通量筛选,无法同时获取上万抗体的序列和亲和力数据等,导致获取最优化的抗体序列的概率较低。因此,建立一种可实现大通量筛选,能同时获取上万抗体的序列和亲和力数据的抗体筛选方法是抗体新药开发的必然需求。

[0005]

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法,包括以下步骤:

步骤1) 表达特异表面抗原的细胞免疫小鼠,抽取小鼠脾脏细胞进行ELISA分析;

步骤2) 根据其结果将单细胞附着在细胞芯片上,与荧光标记的抗原结合,获得阳性克隆信息和抗体亲和力信息;

步骤3) 符合标准的抗体经在位基因扩增,获取抗体可变区序列。

[0008] 其中优选地,所述步骤2)的抗原为雄特异性抗原(serologically detected H-Y antigens)。

[0009] 其中优选地,所述步骤2)的抗体是H-Y噬菌体抗体。

[0010] 相对上述背景技术,本发明所提供的方法能快速获得大量的抗体的序列和亲和力数据,本发所述的筛选方法能为制药研究领域提供很好的基础。

[0011]

具体实施方式

[0012] 本发明的核心是提供一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法。为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案,下面结合具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。

[0013] 实验动物: 8 周龄SPF级C57BL /6小鼠,雄鼠10只,体重为16-20g,由广州市赛柏诺生物科技有限公司提供。实验小鼠在光照 12 h /d、22-25℃环境温度条件下饲养,自

由饮水、采食,并按实验动物使用的3R原则饲养。

[0014] 主要试剂与仪器:重组缺陷型大肠杆菌菌株XL1-Blue的基因型为recAI、endAI、gyrA96、thi-1、hsdR17、supE44、reIA1、Iac[F' proAB, Iac1qZ Δ M15Tn10 (Tet^γ)]、辅助噬菌体VCSM13、HRP-羊抗M13购自Stratagene公司。pComb3载体是噬菌体表面Fab段表达载体,含氨苄青霉素(Amp)的抗性基因,载体大小为4029bp,由美国Scipps研究所惠赠。XbaI和XhoI购自MBI公司。显微照相系统(Motic, Moticam350),倒置显微镜(Leica, DMIL),酶标仪(上海热电公司, MuItiskan MK3)。

[0015] 实施例1

一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法,包括以下步骤:

步骤1)表达特异表面抗原的细胞免疫小鼠,抽取小鼠脾脏细胞进行ELISA分析;

脾脏细胞悬液100μL (5×10⁶个/mL)为抗原,取10μLPEG沉淀的噬菌体抗体,用3%BSA/PBS补充至100μL,同时设PBS空白、VCSM13阴性对照,HRP-羊抗M13(用3%BSA/PBS稀释4000倍)为二抗,以A值>阴性对照A值2倍以上作为阳性克隆判定标准。显色后于倒置显微镜下观察,拍照。

[0016] 步骤2)

根据其结果将单细胞附着在细胞芯片上,与荧光标记的雄特异性抗原(serologically detected H-Y antigens)结合,获得阳性克隆信息和抗体亲和力信息;

步骤3)符合标准的抗体(H-Y噬菌体抗体)经在位基因扩增,获取抗体可变区序列。

[0017] Fab抗体阳性克隆含有轻链基因(κ)和重链基因片段(fd),用接种环刮取在本实验室保存的H-Y噬菌体Fab抗体A6、A8、E6阳性克隆XL1-Blue菌株(含重组噬质粒pComb3+κ+fd),接种于1.5mLSB培养基(含10μg/mLtet和50μg/mLamp),37℃摇菌培养,待菌液变混浊,取一种环菌液在LB平板(含100μg/mLamp)上划线,37℃培养12~14h。然后挑取克隆接种于10mLSB(含20mg/Ltet和100mg/Lamp),经37℃振荡(300r/min)5h,使菌液A₆₀₀>1.0,提取质粒,利用XbaI和XhoI对菌落质粒DNA进行酶切反应,鉴定阳性克隆Fab段的插入,利用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测;

噬菌体Fab抗体的制备:酶切验证后的阳性克隆菌落培养液分别以10¹² pfuVCSM13超感染,混匀后并入100mLSB(50μg/mLamp)37℃振荡反应2h,加kana至70μg/mL,37℃振荡(300r/min)培养过夜,次日将菌液离心,取上清与PEG800(终浓度为40g/L)和NaCl(终浓度为30g/L)混匀,摇床300r/min振荡5min,再冰浴30min,使噬菌体沉淀后,于4℃,9000r/min离心20min,以1%PBS2mL悬浮噬菌体沉淀,所得上清即为噬菌体抗体。

[0018] 本发明所述的方法能快速获得大量的抗体的序列和亲和力数据,本发明所述的筛选方法能为制药研究领域提供很好的基础。

[0019] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

专利名称(译)	一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法		
公开(公告)号	CN107219351A	公开(公告)日	2017-09-29
申请号	CN2017110428415.2	申请日	2017-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	广东省生物资源应用研究所		
申请(专利权)人(译)	广东省生物资源应用研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广东省生物资源应用研究所		
[标]发明人	杨威 王笑非 毛明 汪巨峰 王茜莎 韩重 肖百全 郭健敏 王俐梅		
发明人	杨威 王笑非 毛明 汪巨峰 王茜莎 韩重 肖百全 郭健敏 黄远铿 王俐梅		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K2317/55		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于单细胞芯片技术的抗体筛选方法，包括以下步骤：步骤1) 表达特异表面抗原的细胞免疫小鼠，抽取小鼠脾脏细胞进行ELISA分析；步骤2) 根据其结果将单细胞附着在细胞芯片上，与荧光标记的抗原结合，获得阳性克隆信息和抗体亲和力信息；步骤3) 符合标准的抗体经在位基因扩增，获取抗体可变区序列。本发明所提供的方法能快速获得大量的抗体的序列和亲和力数据，本发明所述的筛选方法能为制药研究领域提供很好的基础。