

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510123794.1

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月30日

[11] 公开号 CN 1970573A

[22] 申请日 2005.11.24

[21] 申请号 200510123794.1

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院基础
医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

[72] 发明人 郭建巍 沈倍奋

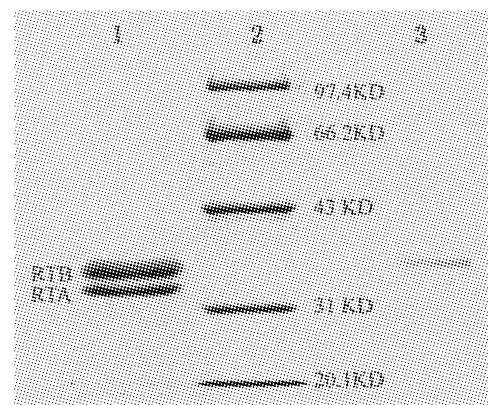
权利要求书1页 说明书21页 附图3页

[54] 发明名称

一种抗蓖麻毒素的中和性单克隆抗体3E1,其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明公开了一种抗蓖麻毒素的中和性单克隆抗体3E1,该单克隆抗体的制备方法及其在制备蓖麻毒素检测试剂、疫苗以及诊断和治疗蓖麻毒素或免疫毒素中毒药物中的应用。本发明从制备的蓖麻毒素半乳糖结合位点中和性单克隆抗体3E1杂交瘤细胞中克隆了抗体轻、重链可变区基因,所得轻链和重链可变区基因可编码正确的小鼠抗体可变区。基于上述单克隆抗体的轻、重链可变区基因,可构建和表达多种小分子基因工程抗体,基于上述基因所编码的多肽或蛋白质,可以交联上多种生物活性分子,制备疫苗及用于蓖麻毒素检测、蓖麻毒素和免疫毒素中毒的诊断或治疗药物,具有广阔的应用前景。



1. 一种抗蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1, 其特征在于轻、重链蛋白质分子分别具有如序列表中序列 3、序列 4 所示的氨基酸序列。
2. 权利要求 1 所述单克隆抗体 3E1 的轻、重链蛋白质分子编码基因, 其特征在于分别具有如序列表中序列 1、序列 2 所示的核苷酸序列。
3. 权利要求 1 所述单克隆抗体 3E1 的轻、重链蛋白质分子中的可变区, 其特征在于分别具有如序列表中序列 5、序列 6 所示的氨基酸序列。
4. 权利要求 3 所述的单克隆抗体 3E1 的轻链蛋白质分子可变区的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3, 其特征在于分别具有如序列表中序列 7、序列 8、序列 9 所示的氨基酸序列。
5. 权利要求 3 所述的单克隆抗体 3E1 的重链蛋白质分子可变区的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3, 其特征在于分别具有如序列表中序列 10、序列 11、序列 12 所示的氨基酸序列。
6. 权利要求 1 所述抗蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1 的制备方法, 包括如下步骤:
 - (1) 抗蓖麻毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建;
 - (2) 抗蓖麻毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株的筛选和鉴定;
 - (3) 单克隆抗体 3E1 对小鼠的保护作用;
 - (4) 杂交瘤细胞 3E1 轻、重链基因的钓取;
 - (5) 单克隆抗体 3E1 轻、重链可变区基因序列和氨基酸序列的确定。
7. 权利要求 1 所述抗蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1, 在制备蓖麻毒素检测、疫苗以及蓖麻毒素和免疫毒素中毒的诊断或治疗药物中的应用。

一种抗蓖麻毒素的中和性单克隆抗体 3E1，其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及一种抗蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1，还涉及该单克隆抗体的制备方法以及在制备蓖麻毒素疫苗和蓖麻毒素检测、诊断、治疗药物中的应用。

背景技术

蓖麻毒素 (Ricin) 是一种核糖体失活蛋白，它几乎可以和所有真核细胞结合，呈细胞毒作用。一分子蓖麻毒素进入细胞内，就足以使整个细胞蛋白质合成停止而死亡。其毒性是氰化物的6000倍。蓖麻毒素气溶胶进入体内，可引起严重的肺泡炎症和肺水肿，最后因肺阻塞缺氧而导致死亡 (1. Griffiths GD, Lindsay CD, Allenby AC, et al. Protection against inhalation toxicity of ricin and abrin by immunisation. Hum Exp Toxicol 1995;14:155-64. 2. Brown RFR, White DE. Ultrastructure of rat lung following inhalation of ricin aerosol. Int J Exp Pathol 1997;78:267-76.)。静脉给药每公斤体重3-5微克即可致命。迄今为止，国内外还没有适用于人的、针对蓖麻毒素中毒的专用特效药。蓖麻毒素生产原料蓖麻籽来源广泛，提取制备方法简便，很容易被恐怖分子利用，因此研究其拮抗剂具有重要的现实意义。

抗体自 19 世纪末报道可以用来治疗疾病以来，一直用于治疗毒蛇、毒蝎咬伤，具有良好的疗效。大量研究表明：用蓖麻毒素的中和抗体治疗突发性

蓖麻毒素中毒效果良好。Furukawa-Stofferdeng 等报道：给小鼠腹腔注射含蓖麻毒素中和抗体的培养上清并同时注射 0.5 g 蓖麻毒素（致死剂量），可保护受试小鼠抵抗毒素攻击（T.Furukawa-Stoffer,D.C.W.Mah,J.Cherwonogrodzky et al. A novel biological-based assay for the screening of neutralizing antibodies to ricin. *Hybridoma*,1999,18(6):505-511）。抗体治疗的成败依赖于蓖麻毒素被吸收的多少和进入体内的路径（B.M.J.Foxwell,S.I.Detre,T.A.Donovan. et al.The use of anti-ricin antibody to protect mice intoxicated with ricin. *Toxicology*, 1985, 34: 79-8834.）。在针对蓖麻毒素活性链的单克隆抗体与毒素的分子比为 4:1 时，抗体在体外可中和蓖麻毒素对 EL-4 淋巴瘤细胞的细胞毒作用。甘露醇具有增加大分子物质通过血脑屏障的功能，使用甘露醇后蓖麻毒素的毒性作用比静脉注射增加两倍，针对 Ricin 的神经中毒，颅内注射抗体后具有和静脉注射同样的保护效果。

目前，国内外针对蓖麻毒素单克隆抗体的报道，主要为检测用的单克隆抗体和具有中和活性的两类。具有中和活性单克隆抗体的报道主要为抗蓖麻毒素 A 链、B 链和 A、B 链三种形式（1.P.V.Lemley, P.Amanatides, D.C.Wright.Identification and characterization of a monoclonal antibody that neutralizes ricin toxicity in vitro and in vivo. *Hybridoma*,1994,13(5):417-421. 2. Maddaloni M, Cooke C, Wilkinson R, Stout AV, Eng L, Pincus SH. Immunological characteristics associated with the protective efficacy of antibodies to ricin. *J Immunol*. 2004,15;172(10):6221-8.）。我国对蓖麻毒素生物战剂的侦检和医学防护等研究领域刚刚起步（1.宋云扬，刘娟，应天翼，等.夹心免疫 PCR 方法检测蓖麻毒素. *免疫学杂志*,2002,18(3):229-231. 2. 郝兰群，郭胜清，郭振泉，等.抗蓖麻毒素单克隆抗体的制备及应用.*细胞与分子免疫学杂志*,

2003,19(5):517-518), 针对蓖麻毒素的恐怖袭击尚无配套诊断试剂和有效免疫治疗和防护手段, 因此迫切需要建立和发展具有自主知识产权的以抗体为基础的检测和防护用品。针对蓖麻毒素半乳糖结合位点的单克隆抗体, 目前尚无类似的报道。

发明内容

为了提供一种蓖麻毒素中毒的检测或治疗手段, 本发明公开了一种抗蓖麻毒素的单克隆抗体 3E1。

本发明公开的抗蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1 的轻、重链蛋白质分子, 其氨基酸序列分别如序列表中序列 3、序列 4 所示, 其编码基因分别如序列表中序列 1、序列 2 所示。该单克隆抗体的轻、重链蛋白质分子可变区的氨基酸序列分别如序列表中序列 5、序列 6 所示。该单克隆抗体的轻链蛋白质分子可变区的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列, 分别如序列表中序列 7、序列 8、序列 9 所示。该单克隆抗体的重链蛋白质分子可变区的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如序列表中序列 10、序列 11、序列 12 所示。

本发明还公开了上述单克隆抗体 3E1 的制备方法, 主要内容如下:

1. 抗蓖麻毒素半乳糖结合位点单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建

首先对蓖麻毒素用甲醛进行减毒处理, 然后免疫 Balb/c 小鼠, 常规方法进行细胞融合。用间接 ELISA 法筛选, 阳性细胞克隆再反复亚克隆, 直到所有杂交瘤细胞培养上清检测为 100% 阳性。对杂交瘤细胞 3E1 进行了染色体核型分析, 杂交瘤细胞 3E1 染色体平均数目为 106 条, 用双相琼脂扩散实验证明 3E1 杂交瘤细胞所分泌的免疫球蛋白亚型为 IgG1。

2. 抗蓖麻毒素半乳糖结合位点单克隆抗体杂交瘤细胞株的筛选和鉴定

用 MTT 法, 就蓖麻毒素对小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行了细胞毒实验, 结果算出蓖麻毒素对 Sp2/0 细胞的半数致死剂量 $IC_{50}=0.31ng/ml$ 。依照 IC_{50} , 筛选出中和性抗体 3E1, Western-blotting 对特异性作了评价。结果显示 3E1 为蓖麻毒素中和性抗体, 可在体外实验中, 中和蓖麻毒素对 SP2/0 细胞的毒性作用, 中和性单克隆抗体 3E1 可特异性识别蓖麻毒素的 B 链线性表位。

3. 单克隆抗体 3E1 对 BALB/C 小鼠的保护作用

亲和柱纯化 Balb/c 小鼠杂交瘤细胞腹水, 紫外分光光度计测量, 计算蛋白质含量。给小鼠注射不同剂量蓖麻毒素, 计算半数致死剂量 LD_{50} 。给小鼠注射不同剂量蓖麻毒素, 不同时间段后, 注射中和性单克隆抗体 3E1 记录生长情况。结果显示蓖麻毒素对小鼠的 LD_{50} 为 $10.4\mu g/kg$, 蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1 在小鼠注射 10 倍致死计量的蓖麻毒素 20 分钟后仍对小鼠具有保护作用。

4. 杂交瘤细胞 3E1 轻、重链基因的钓取

提取中和性单克隆抗体 3E1 细胞 RNA, 经 RT-PCR, 用两对特异性引物钓取抗体的轻重链基因。常规法连接入载体, 转化感受态细菌, 培养后挑取单个菌落, 提取质粒 PCR 鉴定后进行 DNA 测序分析。

通过本部分实验, 构建了含有蓖麻毒素中和抗体 3E1 轻、重链基因的载体, 经序列分析、比对, 编码序列为小鼠免疫球蛋白轻、重链基因 (序列表中序列 1 和序列 2)。

5. 单克隆抗体 3E1 轻、重链可变区基因序列和氨基酸序列的确定

用 www.expasy.org 在线软件将编码蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1 轻、重链可变区核苷酸序列翻译为其编码的氨基酸序列, 单克隆抗体 3E1 轻、重

链氨基酸序列如序列表中序列 3 和序列 4 所示。根据 Kabat 数据库 (ElvinA. Kabat. 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》.1991) 确定轻链可变区序列如序列表中序列 5 所示和重链可变区序列如序列表中序列 6 所示。根据 Kabat 数据库确定轻链可变区序列中的互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 其氨基酸序列分别如序列表中序列 7、序列 8 和序列 9 所示。重链可变区序列中的互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 其氨基酸序列分别如序列表中序列 10、序列 11 和序列 12 所示。

本发明应用一套设计的引物成功地从培养的蓖麻毒素半乳糖结合位点中和性单克隆抗体 3E1 杂交瘤细胞中克隆了抗体轻、重链可变区基因。所得轻链和重链可变区基因可编码正确的小鼠抗体可变区。本发明的单克隆抗体基于上述已克隆到的蓖麻毒素半乳糖结合位点和中和性单克隆抗体 3E1 轻、重链可变区基因，可构建和表达多种小分子基因工程抗体，如单链抗体、单域抗体、嵌合抗体、Fab 抗体、抗体融合蛋白等；基于上述基因所编码的多肽或蛋白质，可以交联上多种生物活性分子，制备疫苗及用于蓖麻毒素检测、蓖麻毒素和免疫毒素中毒的诊断或治疗药物，具有非常广阔的应用前景。

附图说明

图1为免疫用蓖麻毒素SDS-PAGE结果图谱，其中泳道1为纯化的非还原态蓖麻毒素；泳道2为经甲醛脱毒处理的非还原态蓖麻毒素；泳道3为纯化的还原态蓖麻毒素；泳道4为经甲醛脱毒处理的还原态蓖麻毒素；泳道5为蛋白质Marker。

图 2 为杂交瘤细胞染色体核型分析结果图。

图3为蓖麻毒素对Sp2/0细胞的细胞毒作用图，其中横坐标为蓖麻毒素的

浓度 纵坐标为蓖麻毒素Sp2/0细胞的杀伤率，依照此结果算出蓖麻毒素对Sp2/0细胞的 $IC_{50}=0.31ng/ml$ 。

图4为单克隆抗体3E1抵抗蓖麻毒素对Sp2/0细胞的细胞毒作用图，其中横坐标为单克隆抗体的种类，纵坐标为加入单克隆抗体3E1后，蓖麻毒素对Sp2/0细胞的细胞毒作用，用细胞的存活率表示。

图5为中和性单克隆抗体3E1的结合特性鉴定图，其中泳道1为蓖麻毒素的SDS-PAGE结果，上面的为B链，下面的为A链；泳道2为蛋白质Marker，泳道3为中和性单克隆抗体3E1的Western-blot 结果。结果显示中和性单克隆抗体3E1可识别蓖麻毒素B链（半乳糖结合位点）线性表位。

图6为中和性单克隆抗体3E1经Protein A纯化的层析结果图，其中峰1为上样峰，峰2为纯化的抗体峰。

图7为单克隆抗体3E1经Protein A纯化后的SDS-PAGE结果图谱其中泳道1、2、3为经Protein A纯化的中和性单克隆抗体3E1，泳道4为蛋白质Marker，A为重链，B为轻链。

图8为蓖麻毒素中和性单克隆抗体3E1杂交瘤细胞RNA提取结果图谱。

图9为蓖麻毒素中和性单克隆抗体3E1杂交瘤细胞轻重链基因的PCR结果图，其中泳道1为轻链基因；泳道2为DL2000；泳道3为重链基因。基因大小大约为660bp。

具体实施方式

通过参阅下述实施例可以更容易地了解本发明的内容，这些实施例只是为进一步说明，并不意味着限定本发明的范围。

实施例一 抗蓖麻毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建

一、 材料:

福氏完全佐剂及不完全佐剂, TMB: Sigma 公司产品

20%胎牛血清: 北京元亨圣马生物技术研究所产品

无血清 RPMI 1640: Gibco 公司产品

SP2/0 细胞: ATCC 引进, 本实验室保存。

Balb/c 小鼠: 军事医学科学院实验动物中心提供

其余试剂均为市购。

二、 方法结果:

1. 蓖麻毒素的减毒处理 在纯化后的蓖麻毒素 (Nicolson, G. L., Blaustein, J., 1972. The interaction of *Ricinus communis* agglutinin with normal and tumor cell surfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 266, 543 - 547.) 2mg/ml 中加入终浓度为 1%的甲醛, 37℃处理 72h, PH7.2 0.01M PBS 透析 72h, SDS-PAGE 检测 (图 1)。

2. Balb/c 小鼠免疫 选用 4-6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 6 只, 用 100μg ricin 腹股沟皮下免疫, 第一针加福氏完全佐剂, 第 2 针加福氏不完全佐剂, 每 3 周免疫 1 次, 共免疫 3 次。第 3 次免疫后尾静脉采血, 间接 ELISA 检测抗体产生情况, 融合前 3 天, 以 100μg ricin 腹腔加强免疫一次, 第 3 天融合。

3. 细胞融合 将免疫的小鼠摘眼球后脱颈处死, 无菌摘取小鼠脾细胞, 按常规方法进行细胞融合。具体方法: ①将免疫的小鼠摘眼球放血后脱颈处死, 75%酒精浸泡 3min, 无菌取出脾脏, 用 200 目钢网研磨单个细胞悬液, 无血清 RPMI 1640 洗两次并计数; ②收集对数生长期的 SP2/0 细胞, 用无血

清 RPMI 1640 洗两次并记数；③按 SP2/0 细胞:脾细胞=1:5 的比例混合两种细胞，用 RPMI 1640 洗 1 次，弃尽上清，轻轻将细胞打散；④在 1min 时间里缓慢加入 1ml 50% PEG (MW 1500) 溶液，置 37℃ 水浴 1min；⑤在 1min、2min、2min、5min 时间内加无血清 RPMI1640 1ml、5ml、10ml、10ml；⑥ 800r/min 离心 7min，弃上清，尽可能轻轻将细胞悬起；⑦加含 20% FCS 的 HAT(Sigma)-RPMI 1640 培养液，调整细胞浓度为 2×10^6 /ml，混匀后，滴加在铺有滋养细胞 (1×10^4 细胞/孔) 96 孔培养板 (Gibco) 中，100 μ l/孔，37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养。

4. 间接 ELISA 筛选抗蓖麻毒素单克隆抗体杂交瘤细胞 (1) 用 10 μ g/ml ricin 包被 ELISA 板，于 4℃ 过夜并封闭。依次加入待测细胞培养上清液 (37℃ 1h, PBST 洗板 4 次)，及 1:500 稀释的 50 μ l HRP-GAM (37℃ 45min, PBST 洗板 4 次)。以 TMB 底物显色后，于 450nm 波长测定 A 值。

5. 杂交瘤细胞克隆化 间接 ELISA 法筛选为阳性的细胞克隆再反复亚克隆，直到所有杂交瘤细胞培养上清检测为 100% 阳性。杂交瘤细胞的克隆化用有限稀释法：(1) 在克隆化的当天或前 1 天制备滋养细胞：脱颈处理昆明小鼠，75% 酒精浸泡消毒皮肤，无菌剥离腹部皮肤，注射器抽取 5ml 1640 培养液注入小鼠腹腔，反复冲洗后吸出腹腔洗液，用 20% 胎牛血清 1640 培养液稀释后滴入 96 孔板，每孔约 0.1ml。(2) 取少许待作克隆化的杂交瘤细胞移至另一无菌试管中，并准确计数。(3) 有限稀释法进行亚克隆。(4) 将培养板置于 5% CO₂，37℃ 孵箱中培养，5 天左右在显微镜下可观察到细胞克隆。适时换液，检测，取阳性单克隆细胞株进行扩大培养，及时冻存细胞株。

6. 杂交瘤细胞的染色体核型分析 在对数生长期的杂交瘤细胞中加入秋水仙素，终浓度为 0.02 μ g/ml，在孵箱中继续培养 4 小时后收集细胞，经低

渗裂解(加入预温至 37℃的 0.075M KCL8ml, 轻轻打匀, 37℃ 30-40 分钟)、预固定(甲醇:冰醋酸=3:1 新鲜配制, 轻轻打匀, 离心弃上清)和 3 次固定(第 1 次固定:加入 6ml 固定液, 轻轻打匀, 室温 30 分钟, 离心弃上清;第 2 次固定:加入 6ml 固定液, 轻轻打匀, 室温 15 分钟, 离心弃上清;第 3 次固定:加入 6ml 固定液, 轻轻打匀, 室温 15 分钟, 离心弃上清)处理后用少量固定液制备细胞悬液, 滴于冰水浸泡的玻片上, 文火烘干后 10% Giemsa 染色 15-20 分钟, 水洗镜检(图 2)。结果显示:经 30 个分裂相细胞的统计平均值, 杂交瘤细胞染色体数目在 85-116 (n=30) 之间变动, 平均数目为 106 条, 且有 1-2 个中部着丝粒染色体。已知 Balb/c 小鼠脾细胞染色体数目为 40 条, Sp2/0 细胞染色体数目为 60-70 条, 融合后的杂交瘤细胞染色体数目应该为 90-120 条, 由此提示所获得的抗体分泌细胞为杂交瘤细胞。

7. 杂交瘤细胞免疫球蛋白亚型的确定 用羊抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3, 就杂交瘤细胞浓缩后的培养上清作双相琼脂扩散实验, 证明 3E1 杂交瘤细胞所分泌的免疫球蛋白亚型为 IgG1。

通过本部分工作, 筛选到蓖麻毒素半乳糖结合位点单克隆抗体 3E1。

实施例二 具有蓖麻毒素半乳糖结合位点和中和性单克隆抗体

杂交瘤细胞株的筛选和鉴定

一、材料:

同上。

二、方法结果:

1. ricin 对小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 半数致死剂量 (IC₅₀) 的确定 用 RPMI-1640 稀释 ricin 使其浓度分别为 40ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0.625ng/ml、0.3125ng/ml、0.156ng/ml、0.078ng/ml,

分别加入 96 孔细胞培养板中，每一浓度 3 复孔，100 μ l/孔，调整对数生长期的 SP2/0 细胞浓度调整为 5×10^5 /ml, 100 μ l/孔。37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 孵箱中培养 24h, 每孔加入 10 μ l MTT, 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 孵箱中培养 6h, 2000r/min 离心 10min, 弃上清, 加 100 μ l DMSO 溶解结晶, 于 570nm 波长测定 A 值。按公式: 细胞死亡率%=[1- (实验组 A 值-空白组 A 值) / (对照组 A 值-空白组 A 值)] \times 100% 评价细胞毒作用, 并计算 IC₅₀ (图 3)。用 MTT 法, 就蓖麻毒素对小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行了细胞毒实验, 结果算出 IC₅₀=0.31ng/ml。

2. 单克隆抗体 3E1 的筛选及中和活性 用 RPMI-1640 稀释 ricin 使其浓度分别为 40ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0.625ng/ml、0.3125ng/ml、0.156ng/ml、0.078ng/ml, 分别加入 96 孔细胞培养板中, 每一浓度 3 复孔, 100 μ l/孔。依次分别加入 4 种待测细胞培养上清液 50 μ l/孔。调整对数生长期的 SP2/0 细胞浓度调整为 1×10^6 /ml, 50 μ l/孔。37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 孵箱中培养 24h, 每孔加入 10 μ l MTT, 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 孵箱中培养 6h, 2000r/min 离心 10min, 弃上清, 加 100 μ l DMSO 溶解结晶, 于 570nm 波长测定 A 值。按公式: 细胞存活率%=[(实验组 A 值-空白组 A 值) / (对照组 A 值-空白组 A 值)] \times 100% 评价细胞毒作用 (图 4)。

3. 单克隆抗体 3E1 特异性鉴定 将 Ricin 经 120g/L 还原 SDS-PAGE 并转移至硝酸纤维素膜上, 滴加含 5%奶粉的 PBS 于 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 用含 0.5ml/L Tween-20 的 PBS 洗膜 3 次。将膜剪成相同宽度, 依次滴加蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1 交瘤细胞培养上清 (37 $^{\circ}$ C 结合 1h, PBST 洗膜 3 次, 再用含 0.5ml/L Tween-20 的 TBS 洗涤 3 次)。及 HRP-GAM IgG (37 $^{\circ}$ C 结合 1h, 洗膜 3 次) 以 DAB 显色后, 观察结果 (图 5)。

4. 动物体内诱生单克隆抗体制备蓖麻毒素单克隆抗体 3E1 接种杂交瘤细胞前 10 天, 先给 Balb/c 小鼠 (♂, 8~12 周) 腹腔注射 0.5ml 液体石蜡油。收集对数生长期的杂交瘤细胞, 1500r/min 离心 7min, 弃上清, 生理盐水洗 2 次, 最后将细胞浓度调整为 4×10^6 /ml, 每只小鼠腹腔注射 0.5ml。7~10 天后, 可见小鼠腹部明显膨大, 碘酒和酒精棉球消毒腹部皮肤, 抽取腹水。将抽取的腹水 3000r/min 离心 10min, 收集上清, 加等量甘油, -20°C 冻存备用。

通过本部分工作, 获得了命名为 3E1 的蓖麻毒素半乳糖结合位点中和性单克隆抗体交瘤细胞, 在体外实验中, 3E1 可中和蓖麻毒素对 SP2/0 细胞的毒性作用, 中和性单克隆抗体 3E1 可特异性识别蓖麻毒素 B 链 (半乳糖结合位点) 线性表位。

实施例三 单克隆抗体 3E1 的 Protein A 纯化及 对 BALB/C 小鼠的保护性实验

一、材料:

Protein A Sepharose CL 4B 柱蛋白柱: 北京本元正阳生物技术有限公司产品; 余同上。

二、方法结果:

1. 在 2 毫升小鼠腹水中加入 1 毫升 PH8.0, 0.1mol/L 磷酸缓冲液并用 PH9.0, 1mol/L TRIS-HCL 调整 PH 为 9。把小鼠腹水加入已经用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 PH 8.0 平衡好的 Protein A Sepharose CL 4B 柱蛋白柱中, 用上述缓冲液洗柱子, 直到流出液中测不到杂蛋白为止。用 PH 3.0 的柠檬酸缓冲液洗脱, 收集流出液, 并立即用 1mol/L TRIS-HCL PH 8.5 缓冲液中和, 用

PH7.2, 0.01M PBS 透析 72h。取样在紫外分光光度计上测 OD260, OD280, 计算蛋白质含量, 冻干-20°C 保存 (图 6, 图 7)。

2. 选用 4—6 周龄、体重为 20g 左右的 Balb/c 小鼠 38 只, 分为 4 组, 雌雄各半, 按每公斤体重分别于左测腹腔注射 0 μ g、10 μ g、20 μ g、40 μ g 蓖麻毒素, 正常饲养, 每 1h 观察一次, 记录生长情况, 观察 2 周, 计算半数致死剂量 LD50, 见表 1。

3. 选用 4—6 周龄、体重为 20g 左右的 Balb/c 小鼠, 雌雄各半, 分为抗体组、PBS 组和正常对照 3 组, 共计 5 批次。按每公斤体重分别于左测腹腔注射 20 μ g、40 μ g、60 μ g、100 μ g、蓖麻毒素, 分别于 0min、10min、20min、30min 后于右侧腹腔注射纯化的中和性单克隆抗体 3E1 100 μ g, 正常饲养, 每 1h 观察一次, 记录生长情况, 观察 2 周, 结果见 (表 2、表 3、表 4)。

结果显示蓖麻毒素对小鼠的 LD50 为 10.4 μ g/kg, 蓖麻毒素中和性单克隆抗体 3E1 在小鼠注射 10 倍致死计量的蓖麻毒素 20 分钟后仍对小鼠具有保护作用。

表 1. 蓖麻毒素对 Balb/c 鼠的半数致死量确定

Dosage of ricin (μ g/kg)	number of surviving mice	number of dead mice
0	6/6	0/6
10	9/14	5/14
20	1/11	10/11
40	1/7	6/7

从结果可以计算出 LD50 为 10.4 μ g/kg

表 2. 蓖麻毒素半乳糖结合位点单克隆抗体对小鼠的保护作用 (6 LD50)

Antibody	Number of dead mice
No protection (control)	3/3 (X=18h)
60 μ g/kg ricin Intraperitoneal injection	
Ricin B chain McAb (3E1) 10 mins later	0/3

表3. 蓖麻毒素半乳糖结合位点单克隆抗体对小鼠的保护作用（10LD50，20分钟后）

Antibody	Number of dead mice
No protection (control) 100µg/kg ricin Intraperitoneal injection	3/3 (X=16h)
Ricin B chain McAb (3E1) 20 mins later	0/3

表4. 蓖麻毒素半乳糖结合位点单克隆抗体对小鼠的保护作用（10LD50，30分钟后）

Antibody	Number of dead mice
No protection (control) 100µg/kg ricin Intraperitoneal injection	3/3 (X=14.3h)
Ricin B chain McAb (3E1) 30 mins later	3/3 (X=95.4h)

实施例四 蓖麻毒素半乳糖结合位点中和性单克隆抗体

杂交瘤细胞3E1轻、重链基因的钓取

一、材料：

引物：PHs1：见序列表中序列13；PHs2：见序列表中序列14；PLs1：见序列表中序列15；PLa1：见序列表中序列16；PHa1：见序列表中序列17。
DNA片段纯化试剂盒：OMEGA生物科技公司产品；T4 DNA连接酶：New England Biolabs产品；载体PGEM Teasy：Promega 公司产品；感受态细菌JM109：购自Promega公司。余同上。

二、方法结果

1. 取对数生长期的中和性单克隆抗体 3E1 细胞 $5 \times 10^6 - 10^7$ 个，离心去除上清，将细胞均匀弹起。加 1ml TRIzol (Invitrogen) 反复吹打使细胞充分裂解，振荡 5 分钟后，加入 0.2 ml 氯仿，振荡 15 秒，室温放置 2-3 分钟， $2-8^\circ\text{C}$ 12 000 r/min，离心 15 分钟，取上清于另一新管中，加 500µl 异丙

醇混匀后室温放置 10 分钟，2-8℃ 12000 r/min 离心 10 分钟。75%乙醇洗涤沉淀，干燥后，用 20 μ l 无 RNA 酶的去离子水溶解沉淀（图 8）。

2. 取含 1 μ g 总 RNA 的溶液，依次加入 AMV 5 \times 缓冲液 4 μ l，Oligo(dT) (500ng/ μ l) 0.5 μ l，2.5mmol/L dNTP2 μ l，Rnasin (50U/ μ l) 0.5 μ l，去离子水补至 20 μ l、反转录酶 2-5U，42℃延伸 1 小时。95℃变性 5 分钟，置冰浴中，产物为 cDNA 第一链。用 2 对特异性引物 PHs1、PHa1 和 PLs1、PLa1，在 20 μ l PCR 反应体系中，分别加入反转录产物 2 μ l，Taq 酶 10 \times buffer 2 μ l，上下游引物各 1 μ l，2.5mmol/L dNTP 1 μ l，加 Taq 酶 1-2U，去离子水补至 20 μ l。95℃变性 2 分钟，循环参数为：94℃1 分钟，55℃1 分钟，72℃1 分钟，共 30 个循环，72℃后延伸 10 分钟（图 9）。

3. 用分离出欲回收的 DNA 片段，在长波紫外光下切下含目的 DNA 片段的胶块，放入离心管中，加入三倍胶体积的化胶液，55℃水浴完全溶解胶块。用 DNA 片段纯化试剂盒回收 DNA 片段并将纯化的 DNA 片段在水溶液里，将回收的 PCR 产物在 T4 DNA 连接酶缓冲液中按 2:1 的比例(摩尔比)和载体 PGEM Teasy 混合后，加入 0.5U 的 T4 DNA 连接酶于 16℃连接过夜，连接反应的总体积为 10 μ L。

4. 取连接液 10 μ l，加入 200 μ l 感受态细菌 JM109 中并轻柔混匀，冰浴 30 分钟，42℃水浴热休克 90 秒，迅速转入冰浴 2 分钟，加 800 μ l LB 培养基，转入 37℃恒温摇床，以 150 转/分钟的速度摇动 45 分钟，4000r/min 离心 1 分钟，弃去 800 μ l 上清，取沉淀涂布于含 Amp(终浓度为 100 μ g/ml)的固体 LB 平板，将平板倒置于 37℃孵箱 12~18 小时。

5. 在上述平板中挑取单个克隆，接种于含氨卞青霉素 (100 μ g/ml) 的 LB 培养基中。37℃恒温摇床 170rpm，震荡培养过夜。取 3ml 菌液加入 1.5ml

Eppendorf 管中，10000rpm 离心 1min，弃上清。将沉淀菌体重悬于 100 μ L 溶液 I 中，加新鲜配制的溶液 II 200 μ L，轻缓地上下颠倒数次，至液体变清澈为止。随后，再加入 150 μ L 溶液 III，轻柔地上下颠倒数次使液体混匀，此时出现大量白色絮状沉淀。4 $^{\circ}$ C，12000rpm 离心 5min，取上清加至另一 Eppendorf 管中，加入等体积的 Tris-HCl 饱和酚，剧烈震荡后，12000 rpm 离心 5min，将上层水相移至一新管中。再加入 500 μ L 氯仿，重新抽提一次。其后，小心吸取上层水相，移至一新管中，加 2 倍体积的无水乙醇混匀，于-20 $^{\circ}$ C 放置 3h。4 $^{\circ}$ C，12000rpm 离心 10min，弃上清，用 70%乙醇洗沉淀 2 次，室温干燥 20min，以 40 μ L 无菌双蒸水溶解，进行 PCR 鉴定及 DNA 测序分析。

构建了含有蓖麻毒素中和抗体 3E1 轻、重链基因的载体，经测序分析、序列比对为小鼠免疫球蛋白轻、重链基因（序列表中序列 1、序列 2）。

序列表

<110> 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所

<120> 一种抗蓖麻毒素的中和性单克隆抗体3E1, 其制备方法和用途

<130>

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 638

<212> DNA

<213>

<400> 1

```
ccagatgacc cagtctccat cctcactgtc tgcattctctg ggaggcaaag tcaccatcac      60
ttgcaaggca agccaagaca ttaaaaagta tatagcttgg taccaacaca agcctggaaa      120
aggctctagg ctgctcatac attacacatc tacattacag ccaggeatcc catcaaggtt      180
cagtggaaagt gggctctggga gagattattc cttcagcatc agcaacctgg agcctgaaga      240
tattgcaact tattattgtc tacagtatga taatctgtac acgttcggag gggggaccaa      300
gctggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc atcttccac catccagtga      360
gcagttaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg aacaacttct accccaaaga      420
catcaatgtc aagtggaaaga ttgatggcag tgaacgacaa aatggcgtcc tgaacagttg      480
gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc agcacctca cgttgaccaa      540
ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc actcacaaga catcaacttc      600
acctattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttaat                                638
```

<210> 2

<211> 654

<212> DNA

<213>

<400> 2

```
tctggagctg agctgatgaa gcctggggcc tcagtgaaaa tttcctgcaa ggctactggc      60
tacacattca gtagctactg gatagagtgg ataaagcaga ggcctggaca tggccttgag      120
tggattggag acattttacc tggaaagtgg agtactaact acaatgagaa gttcaagggc      180
aaggccacat tcaactgcaga tacatcctcc aacacagcct acatgcaact cagcagcctg      240
acatctgagg actctgccgt ctattactgt tcaagatctt tctactataa ttacgacggg      300
gcctactttg cttactgggg ccaagggact ctggteactg tctctgcagc caaaacgaca      360
ccccatctg tctatccact ggccccctgga tctgctgccc aaactaactc catggtgacc      420
ctgggatgcc tggtaagggt ctatttccct gagccagtga cagtgacctg gaactctgga      480
tccctgtcca gcggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg      540
agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacggt      600
gcccaccggg ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccaggga ttgt                                654
```

<210> 3
 <211> 211
 <212> PRT
 <213>

<400> 3

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Gly Lys
 1 5 10 15

Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Lys Tyr Ile Ala
 20 25 30

Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile His Tyr
 35 40 45

Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp
 65 70 75 80

Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Tyr Thr Phe Gly
 85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
 100 105 110

Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser
 115 120 125

Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys
 130 135 140

Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp
 145 150 155 160

Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu
 165 170 175

Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu
 180 185 190

Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg
 195 200 205

Asn Glu Cys
 210

<210> 4
 <211> 218
 <212> PRT

<213>

<400> 4

Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Ile Lys
20 25 30

Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Leu Pro Gly
35 40 45

Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe
50 55 60

Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
65 70 75 80

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Phe Tyr Tyr
85 90 95

Asn Tyr Asp Gly Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
165 170 175

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro
180 185 190

Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
210 215

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213>

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

<212> PRT
<213>

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Lys Tyr Ile Ala Trp
1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213>

<400> 8

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213>

<400> 9

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Tyr Thr
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213>

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213>

<400> 11

Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213>

<400> 12

Ser Phe Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Ala Tyr Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213>	
<400> 13	
aggtccagct tctcgagtca gg	22
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213>	
<400> 14	
aggtccaact gctcgagtct gg	22
<210> 15	
<211> 32	
<212> DNA	
<213>	
<400> 15	
ccagttccga gctccagatg acccagtctc ca	32
<210> 16	
<211> 34	
<212> DNA	
<213>	
<400> 16	
gcgccgtcta gaattaacac tcattcctgt tgaa	34
<210> 17	
<211> 30	
<212> DNA	
<213>	
<400> 17	
aggcttacta gtacaatccc tgggcacaat	30

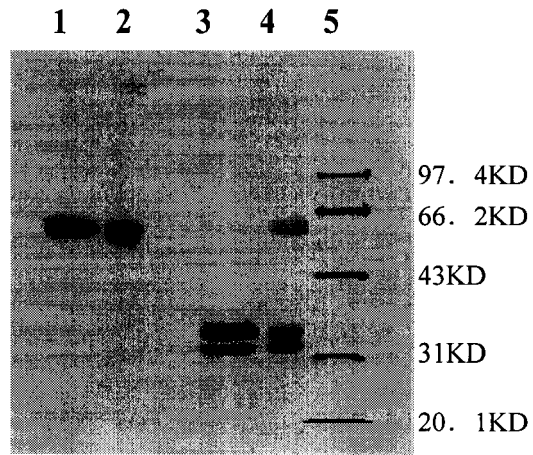


图 1



图2

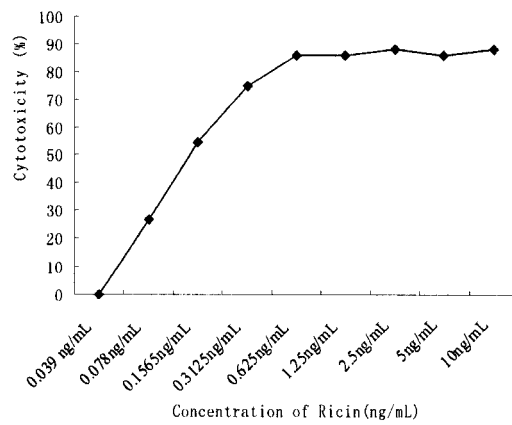


图3

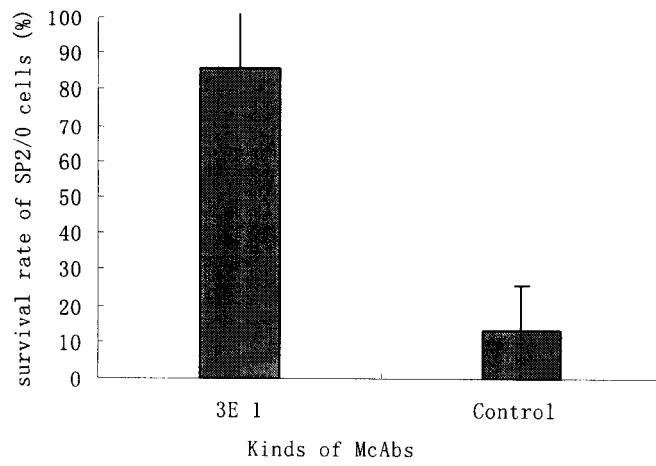


图 4

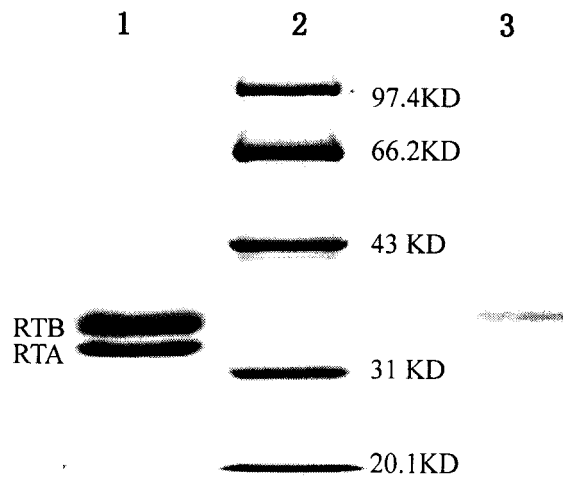


图5

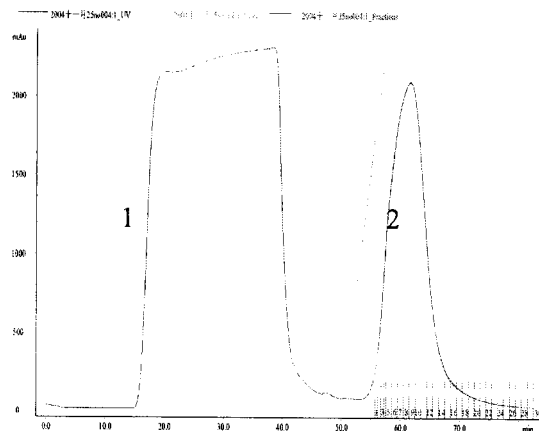


图 6

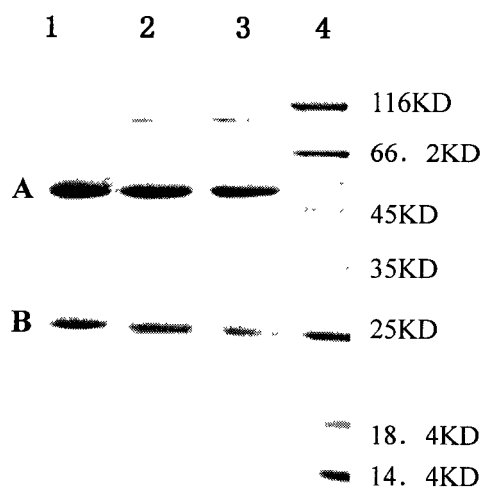


图 7

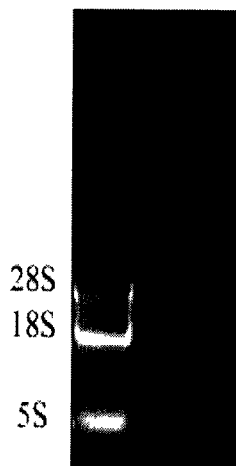


图 8

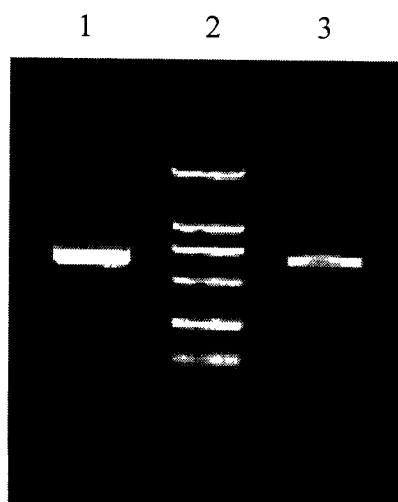


图 9

专利名称(译)	一种抗蓖麻毒素的中和性单克隆抗体3E1,其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN1970573A	公开(公告)日	2007-05-30
申请号	CN200510123794.1	申请日	2005-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	郭建巍 沈倍奋		
发明人	郭建巍 沈倍奋		
IPC分类号	C07K16/18 C07H21/00 C12N15/09 A61K39/395 G01N33/53		
其他公开文献	CN1970573B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗蓖麻毒素的中和性单克隆抗体3E1,该单克隆抗体的制备方法及其在制备蓖麻毒素检测试剂、疫苗以及诊断和治疗蓖麻毒素或免疫毒素中毒药物中的应用。本发明从制备的蓖麻毒素半乳糖结合位点中和性单克隆抗体3E1杂交瘤细胞中克隆了抗体轻、重链可变区基因,所得轻链和重链可变区基因可编码正确的小鼠抗体可变区。基于上述单克隆抗体的轻、重链可变区基因,可构建和表达多种小分子基因工程抗体,基于上述基因所编码的多肽或蛋白质,可以交联上多种生物活性分子,制备疫苗及用于蓖麻毒素检测、蓖麻毒素和免疫毒素中毒的诊断或治疗药物,具有广阔的应用前景。

