



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105837684 A

(43)申请公布日 2016.08.10

(21)申请号 201610296488.6

C12N 5/20(2006.01)

(22)申请日 2016.05.06

G01N 33/577(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/53(2006.01)

CCTCC No:C201619 2016.01.22

(71)申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72)发明人 孙树汉 王芳 朱怡卿 刘岩

马金召 黄金凤 袁继行 杨富

薛赓

(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 赵青

(51)Int.Cl.

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

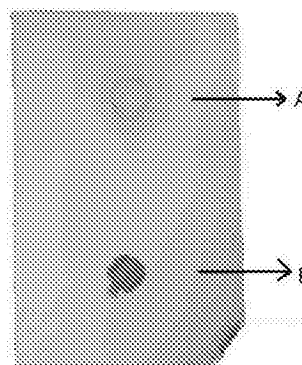
序列表6页 附图1页

(54)发明名称

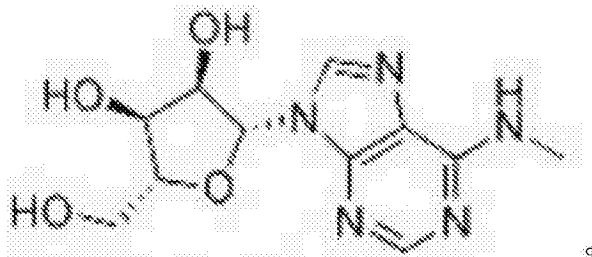
一种抗m6A单克隆抗体的制备与应用

(57)摘要

本发明涉及医学生物工程技术领域,具体是一种抗RNA表观遗传修饰m6A的单克隆抗体、用于制备该单克隆抗体的复合物、分泌该单克隆抗体的杂交瘤细胞株,以及该单抗在检测不同器官组织、不同发育阶段器官组织及肿瘤组织中RNA甲基化程度的应用。本发明的单克隆抗体可特异性识别吸附在硝酸纤维素膜上的变性状态下的m6A分子,实现准确、灵敏地检测RNA的甲基化水平及m6A在RNA转录物的分布,可用于研究RNA甲基化修饰对人类器官发育和肿瘤发生等生理及病理过程的调控作用,对基因表达的转录后调控机制及相关疾病的研究具有十分重大的意义。



1. 一种用于制备抗m6A单克隆抗体的蛋白-核苷偶联复合物,包括核苷及其偶联的载体蛋白,其中核苷是m6A,其化学结构如下式所示;其中偶联的载体蛋白是钥孔血蓝蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;



2. 一种抗m6A单克隆抗体,是由保藏编号为CCTCC No:C201619的杂交瘤细胞株分泌产生。

3. 一种杂交瘤细胞株,其保藏编号为CCTCC No:C201619。

4. 一种如权利要求2所述的抗m6A单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

- a) 合成如权利要求1所述的蛋白-核苷偶联复合物;
- b) 将上述复合物作为免疫原免疫小鼠;
- c) 获取免疫小鼠的脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞融合;
- d) 经过多轮筛选获得分泌识别m6A单分子的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;
- e) 通过在小鼠体内接种上述杂交瘤细胞生产腹水抗体,将腹水进行纯化,得到所述的抗m6A单克隆抗体。

5. 一种如权利要求1所述的用于制备抗m6A单克隆抗体的蛋白-核苷偶联复合物在制备用于检测RNA甲基化的免疫检测试剂或试剂盒中的应用。

6. 一种如权利要求2所述的抗m6A单克隆抗体在制备用于检测RNA甲基化的免疫检测试剂或试剂盒中的应用。

7. 一种如权利要求3所述的杂交瘤细胞株在制备用于检测RNA甲基化的免疫检测试剂或试剂盒中的应用。

8. 如权利要求5-7任一所述的应用,其特征在于,所述的免疫检测试剂或试剂盒为点杂交、Northern Blot或免疫共沉淀的试剂或试剂盒。

一种抗m6A单克隆抗体的制备与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物工程技术领域,具体地说,是一种抗m6A单克隆抗体,以及该单克隆抗体在研究RNA甲基化修饰对人类器官发育和肿瘤发生等生理及病理过程的调控作用中的应用。

背景技术

[0002] 化学修饰是人类基因组丰富的组件,存在于DNA和蛋白质上,其动态变化通过参与基因表达调控,决定细胞的状态,影响细胞的分化和发育。最新的研究表明,RNA的化学修饰也存在这类似的动态调控机制。其中,m6A作为真核生物最常见的RNA转录后修饰形式,成为了近年来表观遗传学研究的热点。m6A是发生在碱基A第六位N原子上的甲基化修饰形式,广泛出现在mRNA、tRNA、rRNA以及ncRNA中,其导致了超过80%的RNA碱基甲基化。研究证实,基于m6A修饰的RNA甲基化调控通过调节RNA的代谢,参与机体发育、代谢及繁殖的整个过程。该表观修饰表达丰度的变化与肥胖和糖尿病等多种疾病密切相关。但目前人们对m6A的研究还十分有限,其在转录物中的分布和具体生物学功能仍不明确。

[0003] 因此,制备具有高特异性、高亲和力的m6A单克隆抗体,实现准确、灵敏地检测RNA的甲基化水平及m6A在RNA转录物的分布,对基因表达的转录后调控机制及相关疾病的研究具有十分重大的意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种抗RNA表观遗传修饰m6A的单克隆抗体、用于制备该单克隆抗体的复合物、分泌该单克隆抗体的杂交瘤细胞株,以及该单抗在检测不同器官组织、不同发育阶段器官组织及肿瘤组织中RNA甲基化程度的应用。

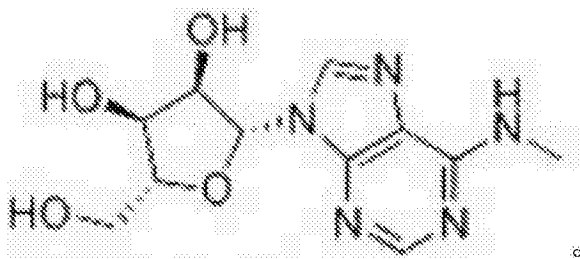
[0005] 本发明针对m6A的分子量只有281Da,免疫原性较弱的问题,在抗体制备过程中通过与半抗原偶联提高m6A的免疫原性。常见的半抗原包括BSA、OVA和KLH,鉴于KLH分子量最大、免疫原性最好,本发明通过活化KLH的羧基基团与m6A的氨基偶联,形成具有较好免疫原性的蛋白-核苷偶联复合物。

[0006] 本发明克服传统ELISA筛选方法假阳性多、工作量大的缺陷,采用多轮点杂交技术筛选出高特异性、高亲和力的单克隆抗体细胞株,作为抗m6A单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0007] 本发明的单克隆抗体的获得采用了本技术领域常规的方法,即通过在小鼠体内接种杂交瘤细胞并产生腹水抗体,取出腹水经纯化而得到。

[0008] 本发明的第一方面,提供一种用于制备抗m6A单克隆抗体的蛋白-核苷偶联复合物(简称KLH-m6A复合物),包括核苷及其偶联的载体蛋白。其中核苷是m6A,其化学结构如下式所示;其中偶联的载体蛋白是钥孔血蓝蛋白(KLH,keyhole limpet hemocyanin),其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;

[0009]



[0010] 本发明的第二方面,提供一种抗m6A单克隆抗体,是由保藏编号为CCTCC No.: C201619的杂交瘤细胞株分泌产生。

[0011] 本发明的第三方面,提供一种杂交瘤细胞株,命名为RME,保藏于中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC),保藏日期2016年1月22日,保藏编号CCTCC No.:C201619。

[0012] 本发明的第四方面,提供一种上述抗m6A单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0013] a)合成上述的由核苷m6A和载体蛋白KLH组成的KLH-m6A复合物;

[0014] b)将上述复合物作为免疫原免疫小鼠;

[0015] c)获取免疫小鼠的脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞融合;

[0016] d)经过多轮筛选获得分泌识别m6A单分子的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0017] e)通过在小鼠体内接种上述杂交瘤细胞生产腹水抗体,将腹水进行纯化,得到所述的抗m6A单克隆抗体。

[0018] 较优的,所述的步骤b中将成功获得的KLH-m6A复合物同免疫佐剂混合。

[0019] 较优的,所述的步骤c中免疫小鼠为鼠龄8~12周的雌性BALB/c健康小鼠;取免疫小鼠的脾脏细胞同小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)细胞进行融合。

[0020] 较优的,所述的步骤d中采用倍比稀释技术制备单克隆细胞株,经多轮点杂交技术筛选出高特异性、高亲和力的单克隆抗体细胞株,作为抗m6A单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0021] 较优的,所述的步骤e中扩大培养杂交瘤细胞至 10^6 个,接种小鼠腹腔,生产腹水抗体,将腹水应用IgG抗体纯化试剂盒纯化获得抗m6A线性表位的单克隆抗体。

[0022] 本发明的第五方面,提供上述用于制备抗m6A单克隆抗体的蛋白-核苷偶联复合物在制备用于检测RNA甲基化的免疫检测试剂或试剂盒中的应用。

[0023] 本发明的第六方面,提供上述抗m6A单克隆抗体在制备用于检测RNA甲基化的免疫检测试剂或试剂盒中的应用。

[0024] 本发明的第七方面,提供上述杂交瘤细胞株在制备用于检测RNA甲基化的免疫检测试剂或试剂盒中的应用。

[0025] 较优的,上述的免疫检测试剂或试剂盒为点杂交、Northern Blot或免疫共沉淀等的试剂或试剂盒。

[0026] 较优的,上述的免疫检测试剂或试剂盒是检测不同器官组织、不同发育阶段器官组织及肿瘤组织中RNA甲基化程度的试剂或试剂盒。所述的肿瘤为肝癌。

[0027] 本发明优点在于:

[0028] 本发明提供一种抗RNA表观遗传修饰m6A的具有高特异性、高亲和力的单克隆抗体,该单克隆抗体是一种免疫球蛋白,可特异性识别吸附在硝酸纤维素膜上的变性状态下的m6A分子,实现准确、灵敏地检测RNA的甲基化水平及m6A在RNA转录物的分布,可用于研究RNA甲基化修饰对人类器官发育和肿瘤发生等生理及病理过程的调控作用,对基因表达的

转录后调控机制及相关疾病的研究具有十分重大的意义。

[0029] 生物材料样品的保藏信息：

[0030] 保藏单位：中国典型培养物保藏中心(CCTCC)

[0031] 地址：中国湖北省武汉市武汉大学

[0032] 保藏日期：2016年1月22日

[0033] 保藏编号：CCTCC No:C201619

[0034] 分类命名：杂交瘤细胞株RME

附图说明

[0035] 图1是点杂交检测图，其中A是普通细胞培养上清与m6A结合的点；B是杂交瘤细胞株培养上清与m6A结合的点。

[0036] 图2是Northern Blot检测图，其中1、2、3条带分别是肝癌组织RNA抽提物、LM3细胞RNA抽提物和7701细胞RNA抽提物与杂交瘤细胞培养上清结合的图，4是空白对照。

具体实施方式

[0037] 下面结合实施例对本发明提供的具体实施方式作详细说明。

[0038] 实施例1.m6A偶联复合物的制备：

[0039] 本发明将抗原m6A与钥孔血蓝蛋白KLH偶联，以偶联物作为免疫原，增强小分子m6A的免疫原性。本发明使用商品化偶联试剂盒(ReadiLink™ KLH Conjugation kit, AAT Bioquest®)进行偶联，具体操作步骤如下：

[0040] 1.准备KLH-m6A连接

[0041] 1)用200uI的ddH₂O来溶解KLH(禁忌漩涡振荡和加热)。

[0042] 2)称取2mg的m6A，用450uI的偶联缓冲液(conjugation bufferrong)溶解。

[0043] 3)将200uI的KLH溶液和450uI的m6A进行混合，成为KLH-m6A混合液。

[0044] 4)用1mI的ddH₂O溶解EDC，取50uI加入KLH-m6A混合液，迅速并轻柔混匀，然后室温孵育2h。

[0045] 2.将KLH-m6A进行去盐离子纯化

[0046] 1)用10mI的ddH₂O来稀释纯化缓冲液(Purification Buffer Salts)。

[0047] 2)扭下去盐离子柱的底座，松开盖子，将柱子放在收集管中。

[0048] 3)1,000g离心2分钟，弃储存液。

[0049] 4)加1mI的纯化缓冲液(Purification Buffer Salts)，1,000g离心2分钟，弃滤液再重复三次。

[0050] 5)将离心柱置于新的收集管，小心地将室温孵育2h后的样品加入去盐离子柱的中心，1,000g离心2分钟。

[0051] 6)收集样本于1.5mI EP管，-20度储存。

[0052] 实施例2.抗m6A的单克隆抗体的制备和纯化

[0053] 1.抗原混合液的制备

[0054] 取25uI的m6A偶联复合物，加入25uI的生理盐水进行，成为50uI的抗原稀释液，与50uI的佐剂迅速混合，即100uI的抗原混合液(此为每只BABL/C小鼠的免疫用量)。

[0055] 2.免疫动物

[0056] 本发明所用免疫动物为BALB/c小鼠,免疫佐剂为KX0210041,购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

[0057] 1)腿部肌肉注射免疫BABL/C小鼠(100uI/只)。

[0058] 2)每隔一个月进行重复免疫,免疫三次。

[0059] 3.单克隆抗体的制备和纯化

[0060] 将成功获得的抗原混合免疫鼠龄为8~12周的雌性BALB/c健康小鼠3只。采取小鼠快速免疫方式,将3只小鼠的脾脏混合进行融合。

[0061] 免疫反应最好的小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0)进行融合,融合后的细胞经过适当稀释,分置于96孔培养板中培养,培养10-14天进行ELISA检测,挑选OD值高的孔中的细胞进行有限稀释法亚克隆。

[0062] 具体方法如下:

[0063] 1)将有限稀释的细胞培养至96孔板中,待克隆生长到全孔的1/6时,标记单克隆及多克隆,对单克隆进行ELISA检测。

[0064] 2)ELISA检测后将OD值最高的单克隆再有限稀释接入96孔板中如上法所述再次亚克隆,此过程重复数次,直至阳性孔比率为100%,即认为此为单克隆。即通常认为的建株成功的细胞株。

[0065] 3)将筛选得到的阳性单克隆扩大培养,细胞数按 $1-2 \times 10^6$ /管进行冻存。同时收集细胞安排腹水制备。

[0066] 4)细胞株采用小鼠腹腔接种法制备腹水,10-14天收集腹水,ELISA检测腹水是否制备成功。

[0067] 5)腹水完成后采用Protein G柱纯化腹水。

[0068] 实施例3.抗m6A的单克隆抗体的鉴定及检测应用

[0069] 1.单克隆抗体的点杂交检测应用:

[0070] 分别将m6A核苷溶液和KLH蛋白溶液点样于硝酸纤维素膜上,待溶液吸干,加封闭液于室温封闭至少1h;PBST洗液洗膜5次,用所制备的单克隆抗体作为一抗,4℃孵育过夜。孵育结束后用PBST洗液洗膜5次,抗体稀释液稀释HRP标记的抗小鼠二抗,孵育1h,PBST洗液洗膜5次。用增强型HRP-DAB底物显色试剂盒进行显色,结果如图1所示。

[0071] 结果表明该单克隆抗体能较为特异性地识别m6A,而不识别载体蛋白KLH。

[0072] 2.单克隆抗体的Northern Blot检测应用:

[0073] 变性的小鼠肝癌组织RNA、LM3细胞RNA和7701细胞RNA进行琼脂糖电泳;通过虹吸将RNA转移至尼龙膜上;紫外灯下交联;含10%脱脂奶粉的PBS封闭1h;PBST洗液洗膜5次,用所制备的单克隆抗体作为一抗,4℃孵育过夜。孵育结束后用PBST洗液洗膜5次,抗体稀释液稀释HRP标记的抗小鼠二抗,孵育1h,PBST洗液洗膜5次。用增强型HRP-DAB底物显色试剂盒进行显色,结果如图2所示。

[0074] 结果表明单克隆抗体可用于分析组织和细胞来源的RNA中m6A的分布。

[0075] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可做出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国人民解放军第二军医大学
 <120> 一种抗 m6A 单克隆抗体的制备与应用
 <130> /
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 1734
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 1
 Val Met Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Leu Asp Lys Arg Gln Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Lys Ala Leu Glu Ser Met Lys Ala Asp His Ser Ser Asp
 20 25 30
 Gly Phe Gln Ala Ile Ala Ser Phe His Ala Leu Pro Pro Leu Cys Pro
 35 40 45
 Ser Pro Ala Ala Ser Lys Arg Phe Ala Cys Cys Val His Gly Met Ala
 50 55 60
 Thr Phe Pro Gln Trp His Arg Leu Tyr Thr Val Gln Phe Gln Asp Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Lys His Gly Ala Val Val Gly Leu Pro Tyr Trp Asp Trp Thr
 85 90 95
 Leu Pro Arg Ser Glu Leu Pro Glu Leu Leu Thr Val Ser Thr Ile His
 100 105 110
 Asp Pro Glu Thr Gly Arg Asp Ile Pro Asn Pro Phe Ile Gly Ser Lys
 115 120 125
 Ile Glu Phe Glu Gly Glu Asn Val His Thr Lys Arg Asp Ile Asn Arg
 130 135 140
 Asp Arg Leu Phe Gln Gly Ser Thr Lys Thr His His Asn Trp Phe Ile
 145 150 155 160
 Glu Gln Ala Leu Leu Ala Leu Glu Gln Thr Asn Tyr Cys Asp Phe Glu
 165 170 175
 Val Gln Phe Glu Ile Met His Asn Gly Val His Thr Trp Val Gly Gly
 180 185 190
 Lys Glu Pro Tyr Gly Ile Gly His Leu His Tyr Ala Ser Tyr Asp Pro
 195 200 205
 Leu Phe Tyr Ile His His Ser Gln Thr Asp Arg Ile Trp Ala Ile Trp
 210 215 220
 Gln Ser Leu Gln Arg Phe Arg Gly Leu Ser Gly Ser Glu Ala Asn Cys
 225 230 235 240
 Ala Val Asn Leu Met Lys Thr Pro Leu Lys Pro Phe Ser Phe Gly Ala
 245 250 255

[0001]

[0002]

```

Pro Tyr Asn Leu Asn Asp His Thr His Asp Phe Ser Lys Pro Glu Asp
      260                      265                      270
Thr Phe Asp Tyr Gln Lys Phe Gly Tyr Ile Tyr Asp Thr Leu Glu Phe
      275                      280                      285
Ala Gly Trp Ser Ile Arg Gly Ile Asp His Ile Val Arg Asn Arg Gln
      290                      295                      300
Glu His Ser Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu Glu Gly Phe Gly Thr
      305                      310                      315                      320
Ser Ala Thr Val Asp Phe Gln Val Cys Arg Thr Ala Gly Asp Cys Glu
      325                      330                      335
Asp Ala Gly Tyr Phe Thr Val Leu Gly Gly Glu Lys Glu Met Pro Trp
      340                      345                      350
Ala Phe Asp Arg Leu Tyr Lys Tyr Asp Ile Thr Glu Thr Leu Asp Lys
      355                      360                      365
Met Asn Leu Arg His Asp Glu Ile Phe Gln Ile Glu Val Thr Ile Thr
      370                      375                      380
Ser Tyr Asp Gly Thr Val Leu Asp Ser Gly Leu Ile Pro Thr Pro Ser
      385                      390                      395                      400
Ile Ile Tyr Asp Pro Ala His His Asp Ile Ser Ser His His Leu Ser
      405                      410                      415
Leu Asn Lys Val Arg His Asp Leu Ser Thr Leu Ser Glu Arg Asp Ile
      420                      425                      430
Gly Ser Leu Lys Tyr Ala Leu Ser Ser Leu Gln Ala Asp Thr Ser Ala
      435                      440                      445
Asp Gly Phe Ala Ala Ile Ala Ser Phe His Gly Leu Pro Ala Lys Cys
      450                      455                      460
Asn Asp Ser His Asn Asn Glu Val Ala Cys Cys Ile His Gly Met Pro
      465                      470                      475                      480
Thr Phe Pro His Trp His Arg Leu Tyr Thr Leu Gln Phe Glu Gln Ala
      485                      490                      495
Leu Arg Arg His Gly Ser Ser Val Ala Val Pro Tyr Trp Asp Trp Thr
      500                      505                      510
Lys Pro Ile His Asn Ile Pro His Leu Phe Thr Asp Lys Glu Tyr Tyr
      515                      520                      525
Asp Val Trp Arg Asn Lys Val Met Pro Asn Pro Phe Ala Arg Gly Tyr
      530                      535                      540
Val Pro Ser His Asp Thr Tyr Thr Val Arg Asp Val Gln Glu Gly Leu
      545                      550                      555                      560
Phe His Leu Thr Ser Thr Gly Glu His Ser Ala Leu Leu Asn Gln Ala
      565                      570                      575
Leu Leu Ala Leu Glu Gln His Asp Tyr Cys Asp Phe Ala Val Gln Phe
      580                      585                      590
Glu Val Met His Asn Thr Ile His Tyr Leu Val Gly Gly Pro Gln Val
      595                      600                      605
Tyr Ser Leu Ser Ser Leu His Tyr Ala Ser Tyr Asp Pro Ile Phe Phe
      610                      615                      620

```


[0003]

```

Ile His His Ser Phe Val Asp Lys Val Trp Ala Val Trp Gln Ala Leu
625                630                635                640
Gln Glu Lys Arg Gly Leu Pro Ser Asp Arg Ala Asp Cys Ala Val Ser
                645                650                655
Leu Met Thr Gln Asn Met Arg Pro Phe His Tyr Glu Ile Asn His Asn
                660                665                670
Gln Phe Thr Lys Lys His Ala Val Pro Asn Asp Val Phe Lys Tyr Glu
675                680                685
Leu Leu Gly Tyr Arg Tyr Asp Asn Leu Glu Ile Gly Gly Met Asn Leu
690                695                700
His Glu Ile Glu Lys Glu Ile Lys Asp Lys Gln His His Val Arg Val
705                710                715                720
Phe Ala Gly Phe Leu Leu His Gly Ile Arg Thr Ser Ala Asp Val Gln
                725                730                735
Phe Gln Ile Cys Lys Thr Ser Glu Asp Cys His His Gly Gly Gln Ile
740                745                750
Phe Val Leu Gly Gly Thr Lys Glu Met Ala Trp Ala Tyr Asn Arg Leu
755                760                765
Phe Lys Tyr Asp Ile Thr His Ala Leu His Asp Ala His Ile Thr Pro
770                775                780
Glu Asp Val Phe His Pro Ser Glu Pro Phe Phe Ile Lys Val Ser Val
785                790                795                800
Thr Ala Val Asn Gly Thr Val Leu Pro Ala Ser Ile Leu His Ala Pro
                805                810                815
Thr Ile Ile Tyr Glu Pro Gly Leu Asp His His Glu Asp His His Ser
820                825                830
Ser Ser Met Ala Gly His Gly Val Arg Lys Glu Ile Asn Thr Leu Thr
835                840                845
Thr Ala Glu Val Asp Asn Leu Lys Asp Ala Met Arg Ala Val Met Ala
850                855                860
Asp His Gly Pro Asn Gly Tyr Gln Ala Ile Ala Ala Phe His Gly Asn
865                870                875                880
Pro Pro Met Cys Pro Met Pro Asp Gly Lys Asn Tyr Ser Cys Cys Thr
                885                890                895
His Gly Met Ala Thr Phe Pro His Trp His Arg Leu Tyr Thr Lys Gln
900                905                910
Met Glu Asp Ala Leu Thr Ala His Gly Ala Arg Val Gly Leu Pro Tyr
915                920                925
Trp Asp Gly Thr Thr Ala Phe Thr Ala Leu Pro Thr Phe Val Thr Asp
930                935                940
Glu Glu Asp Asn Pro Phe His His Gly His Ile Asp Tyr Leu Gly Val
945                950                955                960
Asp Thr Thr Arg Ser Pro Arg Asp Lys Leu Phe Asn Asp Pro Glu Arg
                965                970                975
Gly Ser Glu Ser Phe Phe Tyr Arg Gln Val Leu Leu Ala Leu Glu Gln
980                985                990

```

[0004]

Thr Asp Phe Cys Gln Phe Glu Val	Gln Phe Glu Ile Thr	His Asn Ala
995	1000	1005
Ile His Ser Trp Thr Gly Gly	Leu Thr Pro Tyr Gly	Met Ser Thr
1010	1015	1020
Leu Glu Tyr Thr Thr Tyr Asp	Pro Leu Phe Trp Leu	His His Ala
1025	1030	1035
Asn Thr Asp Arg Ile Trp Ala	Ile Trp Gln Ala Leu	Gln Glu Tyr
1040	1045	1050
Arg Gly Leu Pro Tyr Asp His	Ala Asn Cys Glu Ile	Gln Ala Met
1055	1060	1065
Lys Arg Pro Leu Arg Pro Phe	Ser Asp Pro Ile Asn	His Asn Ala
1070	1075	1080
Phe Thr His Ser Asn Ala Lys	Pro Thr Asp Val Phe	Glu Tyr Ser
1085	1090	1095
Arg Phe Asn Phe Gln Tyr Asp	Asn Leu Arg Phe His	Gly Met Thr
1100	1105	1110
Ile Lys Lys Leu Glu His Glu	Leu Glu Lys Gln Lys	Glu Glu Asp
1115	1120	1125
Arg Thr Phe Ala Ala Phe Leu	Leu His Gly Ile Lys	Lys Ser Ala
1130	1135	1140
Asp Val Ser Phe Asp Val Cys	Asn His Asp Gly Glu	Cys His Phe
1145	1150	1155
Ala Gly Thr Phe Ala Ile Leu	Gly Gly Glu His Glu	Met Pro Trp
1160	1165	1170
Ser Phe Asp Arg Leu Phe Arg	Tyr Asp Ile Thr Gln	Val Leu Lys
1175	1180	1185
Gln Met His Leu Glu Tyr Asp	Ser Asp Phe Thr Phe	His Met Arg
1190	1195	1200
Ile Ile Asp Thr Ser Gly Lys	Gln Leu Pro Ser Asp	Leu Ile Lys
1205	1210	1215
Met Pro Thr Val Glu His Ser	Pro Gly Gly Lys His	His Glu Lys
1220	1225	1230
His His Glu Asp His His Glu	Asp Ile Leu Val Arg	Lys Asn Ile
1235	1240	1245
His Ser Leu Ser His His Glu	Ala Glu Glu Leu Arg	Asp Ala Leu
1250	1255	1260
Tyr Lys Leu Gln Asn Asp Glu	Ser His Gly Gly Tyr	Glu His Ile
1265	1270	1275
Ala Gly Phe His Gly Tyr Pro	Asn Leu Cys Pro Glu	Lys Gly Asp
1280	1285	1290
Glu Lys Tyr Pro Cys Cys Val	His Gly Met Ser Ile	Phe Pro His
1295	1300	1305
Trp His Arg Leu His Thr Ile	Gln Phe Glu Arg Ala	Leu Lys Lys
1310	1315	1320
His Gly Ser His Leu Gly Ile	Pro Tyr Trp Asp Trp	Thr Gln Thr
1325	1330	1335

[0005]

Ile Ser Ser Leu Pro Thr Phe	Phe Ala Asp Ser Gly	Asn Asn Asn
1340	1345	1350
Pro Phe Phe Lys Tyr His Ile	Arg Ser Ile Asn Gln	Asp Thr Val
1355	1360	1365
Arg Asp Val Asn Glu Ala Ile	Phe Gln Gln Thr Lys	Phe Gly Glu
1370	1375	1380
Phe Ser Ser Ile Phe Tyr Leu	Ala Leu Gln Ala Leu	Glu Glu Asp
1385	1390	1395
Asn Tyr Cys Asp Phe Glu Val	Gln Tyr Glu Ile Leu	His Asn Glu
1400	1405	1410
Val His Ala Leu Ile Gly Gly	Ala Glu Lys Tyr Ser	Met Ser Thr
1415	1420	1425
Leu Glu Tyr Ser Ala Phe Asp	Pro Tyr Phe Met Ile	His His Ala
1430	1435	1440
Ser Leu Asp Lys Ile Trp Ile	Ile Trp Gln Glu Leu	Gln Lys Arg
1445	1450	1455
Arg Val Lys Pro Ala His Ala	Gly Ser Cys Ala Gly	Asp Ile Met
1460	1465	1470
His Val Pro Leu His Pro Phe	Asn Tyr Glu Ser Val	Asn Asn Asp
1475	1480	1485
Asp Phe Thr Arg Glu Asn Ser	Leu Pro Asn Ala Val	Val Asp Ser
1490	1495	1500
His Arg Phe Asn Tyr Lys Tyr	Asp Asn Leu Asn Leu	His Gly His
1505	1510	1515
Asn Ile Glu Glu Leu Glu Glu	Val Leu Arg Ser Leu	Arg Leu Lys
1520	1525	1530
Ser Arg Val Phe Ala Gly Phe	Val Leu Ser Gly Ile	Arg Thr Thr
1535	1540	1545
Ala Val Val Lys Val Tyr Ile	Lys Ser Gly Thr Asp	Ser Asp Asp
1550	1555	1560
Glu Tyr Ala Gly Ser Phe Val	Ile Leu Gly Gly Ala	Lys Glu Met
1565	1570	1575
Pro Trp Ala Tyr Glu Arg Leu	Tyr Arg Phe Asp Ile	Thr Glu Thr
1580	1585	1590
Val His Asn Leu Asn Leu Thr	Asp Asp His Val Lys	Phe Arg Phe
1595	1600	1605
Asp Leu Lys Lys Tyr Asp His	Thr Glu Leu Asp Ala	Ser Val Leu
1610	1615	1620
Pro Ala Pro Ile Ile Val Arg	Arg Pro Asn Asn Ala	Val Phe Asp
1625	1630	1635
Ile Ile Glu Ile Pro Ile Gly	Lys Asp Val Asn Leu	Pro Pro Lys
1640	1645	1650
Val Val Val Lys Arg Gly Thr	Lys Ile Met Phe Met	Ser Val Asp
1655	1660	1665
Glu Ala Val Thr Thr Pro Met	Leu Asn Leu Gly Ser	Tyr Thr Ala
1670	1675	1680

[0006]	Met Phe Lys Cys Lys Val Pro Pro Phe Ser Phe His Ala Phe Glu	
	1685	1690 1695
	Leu Gly Lys Met Tyr Ser Val Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Met Thr	
	1700	1705 1710
	Ala Ser Thr Thr Glu Leu Cys Asn Asp Asn Asn Leu Arg Ile His	
	1715	1720 1725
	Val His Val Asp Asp Glu	
	1730	

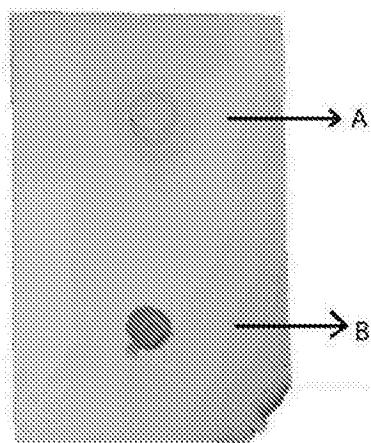


图1

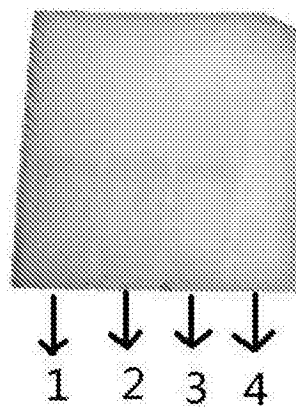


图2

专利名称(译)	一种抗m6A单克隆抗体的制备与应用		
公开(公告)号	CN105837684A	公开(公告)日	2016-08-10
申请号	CN201610296488.6	申请日	2016-05-06
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	孙树汉 王芳 朱怡卿 刘岩 马金召 黄金凤 袁继行 杨富 薛赓		
发明人	孙树汉 王芳 朱怡卿 刘岩 马金召 黄金凤 袁继行 杨富 薛赓		
IPC分类号	C07K14/795 C07K16/44 C12N5/20 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00		
代理人(译)	赵青		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学生物工程技术领域，具体是一种抗RNA表观遗传修饰m6A的单克隆抗体、用于制备该单克隆抗体的复合物、分泌该单克隆抗体的杂交瘤细胞株，以及该单抗在检测不同器官组织、不同发育阶段器官组织及肿瘤组织中RNA甲基化程度的应用。本发明的单克隆抗体可特异性识别吸附在硝酸纤维素膜上的变性状态下的m6A分子，实现准确、灵敏地检测RNA的甲基化水平及m6A在RNA转录物的分布，可用于研究RNA甲基化修饰对人类器官发育和肿瘤发生等生理及病理过程的调控作用，对基因表达的转录后调控机制及相关疾病的研究具有十分重大的意义。

