

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510037671.6

C12N 15/13

C07K 16/24

C12N 15/63

G01N 33/53

C12N 15/70

C12P 21/08

[43] 公开日 2005 年 8 月 17 日

[11] 公开号 CN 1654654A

[22] 申请日 2005.1.11

[21] 申请号 200510037671.6

[71] 申请人 南京师范大学

地址 210097 江苏省南京市宁海路 122 号

[72] 发明人 张双全 曹 鹏

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

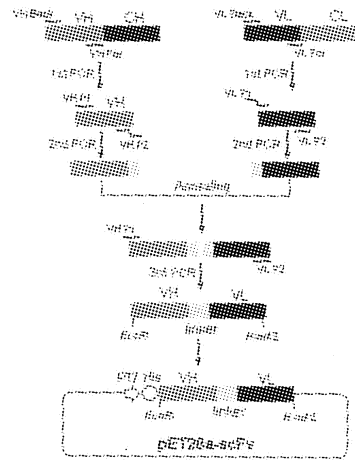
代理人 汪旭东

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 3 页

[54] 发明名称 人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链和轻链可变区基因及其应用

[57] 摘要

本发明涉及人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链和轻链可变区基因，由所述基因编码的多肽，含有所述基因的载体及所述的基因和多肽在制备 BLyS 相关的自身免疫性疾病的临床检测试剂中的应用，以及其制备方法。所述的重链可变区基因全长为 342bp，其核苷酸序列如 <400>1 所示，其编码的氨基酸序列如 <400>3 所示；所述的轻链可变区基因全长为 321bp，其核苷酸序列如 <400>2 所示，其编码的氨基酸序列如 <400>4 所示。利用基因工程表达产生的蛋白质保留了与抗体结合的能力，且 scFv 分子小，容易通过基因工程技术的改造，与一些其他效应分子结合，为构建生物导弹打下基础；还大大降低成本了，利于工业化生产。



ISSN 1008-4274

1、一种人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链可变区基因,其具有<400>1 的序列。

2、由权利要求 1 的基因编码的多肽,其具有<400>3 的序列。

3、一种人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的轻链可变区基因,其具有<400>2 的序列。

4、由权利要求 3 的基因编码的多肽,其具有<400>4 的序列。

5、一种表达载体,其含有权利要求 1 的人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链可变区基因及权利要求 2 的人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的轻链可变区基因。

6、如权利要求 5 的表达载体,其为图 2 所示的 pET28a-scFv。

7、如权利要求 5 或 6 的表达载体所表达的多肽。

8、权利要求 7 所述的多肽在制备用于 BlyS 相关的自身免疫性疾病的检测试剂中的应用。

9、权利要求 7 所述的多肽的生产方法是:从 BlyS 单克隆细胞株分离出抗体的轻重链可变区基因,并组装 scFv,用组装的 scFv 构建原核表达载体,转化大肠杆菌,构建基因工程菌,并诱导表达,对表达产物进行分离、纯化和复性。

10、如权利要求 9 所述的多肽的生产方法,具体是:

从 BlyS 单克隆细胞株 ABL-1 分离抗体的可变区基因:

收集生长良好,能分泌 BlyS 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 ABL-1,用 TRIZOL 试剂提取总 RNA,

设计兼并引物,VH 采用引物 VH Back (5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3') 和引物 VH For (5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3'),

VL 基因采用引物 VL back (5'-GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA-3') 和引物 VL For (5'-GTTAGATCTCGAGCTTGGTCCC-3') 按照 Promega 公司一步法 RT-PCR 试剂盒分别扩增 VH 和 VL,分别采用 RT-PCR 方法,钓取抗体可变区 VH 和 VL 基因,分别克隆进入载体 pMD18-T;

VH, VL 基因扩增产物的克隆:

引物设计如下:

VH P₁ (5'-ACCATGGAATTCCTGCAGGAGTCTGGTGGCTTG-3'), 含有 *EcoRI* 酶切位点,

VH P₂ (5'-AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTG-3'),

VL P₁ (5'-CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGACATTGAGCTCAC-3') ,

VL P₂ (5'-GTGGTGAAGCTTTCCTCGAGCTTGGTACCACCTC-3'), 含有 *Hind*III 酶切位点,

采用 Over-lap PCR, 在 VH 和 VL 之间设计一段柔性 linker (G₄S)₃, VH-linker-VL, 克隆于高效原核表达载体 pET28a;

高效表达, 纯化, 复性 scFv:

pET28a-scFv 转化进入 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达, 收集包含体沉淀, 尿素溶解, Ni²⁺-IDA His-bind 亲和层析纯化蛋白, 稀释法和透析法对目的蛋白复性, 纯化的蛋白稀释到复性缓冲液 I: 50mM Tris-HCl、0.15mM NaCl、2M urea、0.5mM 还原型谷胱甘肽、0.1mM 氧化型谷胱甘肽、pH 8.0, 终浓度为 100μg/ml, 复性 24h, 然后将蛋白装入复性缓冲液 II: 50mmol/L Tris-HCl、0.15mol/L NaCl、pH 8.0, 透析复性 12h, 超滤管 Centricon 30 浓缩蛋白, 13%SDS-PAGE 检测, 蛋白-20°C 保存。

人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链和轻链可变区基因及其应用

技术领域

本发明涉及人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链和轻链可变区基因,由所述基因编码的多肽,含有所述基因的载体及所述的基因和多肽在制备 BlyS 相关的自身免疫性疾病的临床检测试剂中的应用,以及其制备方法。具体地,本发明的重链和轻链可变区基因来自 BALB/C 小鼠杂交瘤细胞 ABL-1。

背景技术

人 B 淋巴细胞刺激因子 (hBlyS) 是 Moore PA 等人 (Science. 1999 Jul 9; 285 (5425): 260-3) 1999 年新发现的一种与人体免疫调控密切相关的细胞因子,属肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族,为 II 型跨膜蛋白,主要在人体外周血单核细胞、脾脏、淋巴结、骨髓等组织中表达,并能在某些金属蛋白酶的作用下以胞外可溶性部分 (hsBlyS) 游离于外周血中发挥作用。hsBlyS 是一种淋巴细胞的共刺激因子,对活化的 B 细胞有强烈的促进增殖和分化的刺激作用:对正常的 B 细胞,在用 PMA 和 Anti-IgM 预活化后,hsBlyS 能诱导其大量增殖并分泌各型免疫球蛋白,其中大部分为 IgM 和 IgA。在体内,hBlyS 对囊外 B 细胞的活化及抗原特异性 IgM 的分泌;免疫球蛋白的同型转换;脾脏生发中心 (GC) 的形成有重要作用;同时 hBlyS 对 CD4⁺和 CD8⁺亚型 T 细胞也有间接活化作用。hBlyS 作为 B 淋巴细胞发育的正调节因子,在体内具有促进 B 淋巴细胞的分化,存活的作用,而过多的 hBlyS 可导致 B 淋巴细胞的过度活化而引起自身免疫性疾病,证据如下:

- (1) hBlyS 转基因小鼠由于过度表达 hBlyS,导致了自身耐受的破坏,血清和组织中出现多种自身抗体,同时伴有系统性红斑狼疮样症状。
- (2) 狼疮样模型小鼠 (NZB×NZWF1 和 MRL-lpr/lpr) 中,血清 hBlyS 滴度明显升高,而且 hBlyS 的水平与疾病的进展呈平行的关系。
- (3) 在多种自身免疫性疾病 (如系统性红斑狼疮,类风湿性关节炎和 系统性硬化症及重症肌无力等) 患者血清中均可检测到 hBlyS 滴度明显升高。2003 年 BlyS (M. Petri et al., abstract 1712, ACR 2003 meeting) 被作为临床上诊断系统性红斑狼疮的一种 Biomarker. 所以 BlyS 抗体的研制对于 BlyS 相关的自身免疫性疾病的诊断和治疗意义重大。

单克隆抗体由两条相同的重链和轻链组成。每一条重链 (VH) 和轻链 (VL) 都分为恒定区和可变区两大部分。其中, VH 和 VL 共同组成抗原结合部位。抗体的特

异性正是由这一部位决定的。VH 和 VL 长约 110 氨基酸, 分别占轻重链的 1/2 和 1/4。在抗原结合部位中真正与抗原决定簇空间构象互补的是 3 个氨基酸变化较大的区域(CDR)。与可变区相对的是骨架区, 其氨基酸序列相对保守。scFv 是由 VH 和 VL 与一柔性氨基酸短肽拼接而成。

国外有报道从噬菌体展示文库筛选到 BLyS 的抗体(Baker KP 等 *Arthritis Rheum.* 2003 Nov; 48 (11): 3253-65.), 但由于这种抗体是没有经过免疫过的, 一般亲和力较抵, 不适合作为临床检测试剂。国内有 BLyS 抗体杂交瘤细胞株建立报道(张志方等, *中山医科大学学报*, 2002 年 03 期), 但迄今为止还没有相关基因序列的报道。

发明内容

为了寻找针对用于 BLyS 相关的自身免疫性疾病的临床检测试剂, 针对抗体杂交瘤细胞株应用于大规模生产上容易突变, 细胞株不稳定, 容易丢失, 代价昂贵等诸多缺点, 本发明应用基因工程手段, 提供了一种人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体轻链可变区基因和重链可变区基因及其表达产物, 并组装了 scFv 型的基因工程抗体片段, 使得大规模廉价生产抗体成为可能。

本发明的另一个目的在于人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体及其 scFv 抗体片段在制备用于 BLyS 相关的自身免疫性疾病的检测试剂中的应用。

根据本发明的一个方面, 本发明涉及一种人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体轻链可变区基因和重链可变区基因, 其中, 所述的重链可变区基因全长为 342bp, 其核苷酸序列如<400>1 所示, 其编码的氨基酸序列如<400>3 所示; 所述的轻链可变区基因全长为 321bp, 其核苷酸序列如<400>2 所示, 其编码的氨基酸序列如<400>4 所示。

一种表达载体, 其含有所述重链可变区基因及轻链可变区基因。具体可以是如图 2 所示的 pET28a-scFv。

涉及上述表达载体所表达的多肽, 能够与 BLyS 作用, 可以用于制备 BLyS 相关的自身免疫性疾病的检测试剂。

和基因工程生产所述 scFv 蛋白的方法是: 从 BLyS 单克隆细胞株分离出抗体的轻重链可变区基因, 并组装 scFv, 用组装的 scFv 构建原核表达载体, 转化大肠杆菌, 构建基因工程菌, 并诱导表达, 对表达产物进行分离、纯化和复性。

作为优选的方案, 具体操作是:

1) 从 BLyS 单克隆细胞株 ABL-1 分离抗体的可变区基因:

收集生长良好, 能分泌 BLyS 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 ABL-1, 用 TRIZOL 试剂提取总 RNA,

设计兼并引物, VH 采用引物 VH Back (5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3') 和引物 VH For (5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3'),

VL 基因采用引物 VL back (5'-GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA-3') 和引物 VL For (5'-GTTAGATCTCGAGCTTGGTCCC-3') 按照 Promega 公司一步法 RT-PCR 试剂盒分别扩增 VH 和 VL, 分别采用 RT-PCR 方法, 钓取抗体可变区 VH 和 VL 基因, 分别克隆进入载体 pMD18-T;

2) VH, VL 基因扩增产物的克隆:

引物设计如下:

VH P₁ (5'-ACCATGGAATTCCTGCAGGAGTCTGGTGGCTTG-3'), 含有 *EcoRI* 酶切位点,

VH P₂ (5'-AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTG-3'),

VL P₁ (5'-CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGACATTGAGCTCAC-3'),

VL P₂ (5'-GTGGTGAAGCTTTCACTCGAGCTTGGTACCACCTC-3'), 含有 *HindIII* 酶切位点,

采用 Over-lap PCR, 在 VH 和 VL 之间设计一段柔性 linker (G₄S)₃, VH-linker-VL, 克隆于高效原核表达载体 pET28a;

3) 高效表达, 纯化, 复性 scFv:

pET28a-scFv 转化进入 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达, 收集包含体沉淀, 尿素溶解, Ni²⁺-IDA His-bind 亲和层析纯化蛋白, 稀释法和透析法对目的蛋白复性, 纯化的蛋白稀释到复性缓冲液 I: 50mM Tris-HCl、0.15mM NaCl、2M urea、0.5mM 还原型谷胱甘肽、0.1mM 氧化型谷胱甘肽、pH 8.0, 终浓度为 100μg/ml, 复性 24h, 然后将蛋白装入复性缓冲液 II: 50mmol/L Tris-HCl、0.15mol/L NaCl、pH 8.0, 透析复性 12h, 超滤管 Centricon 30 浓缩蛋白, 13%SDS-PAGE 检测, 蛋白-20°C 保存。

我们利用基因工程手段首先从分泌 BlyS 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株中获得了单克隆抗体的轻重链可变区基因, 并组装了 scFv 小分子抗体, 克隆到 pET28a 表达载体中, 并能在大肠杆菌中进行高效表达, 其产生的蛋白质保留了与抗体结合的能力, 能够与 BlyS 作用, 而且与传统意义上杂交瘤抗体比较具有以下优势: scFv 分子小, 容易通过基因工程技术的改造, 与一些其他效应分子结合, 为构建生物导弹打下基础; 杂交瘤细胞株不容易保存, 规模化生产成本高, 而基因工程抗体可以采用原核表达系统, 可以很方便的生产抗体, 成本大大降低, 利于工业化生产。因此基因工程抗体的生产较杂交瘤细胞株产生抗体优势明显, 从而可以代替传统杂交瘤细胞株生产抗体。此外, BlyS 的基因工程抗体可以用来制作 BlyS

的亲层析介质用于 BlyS 的纯化。

附图说明

图 1 是 ABL-1 抗体可变区 VH 和 VL 的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析结果, 其中泳道 1 为标准蛋白; 泳道 2 为 VH 基因, 分子量大约在 340bp; 泳道 3 为 VL 基因, 分子量大约在 330bp; 泳道 4 为 VH-linker-VL 基因, 大小在 750bp 左右。

图 2 是 ABL-1 scFv 基因的组装以及表达载体构建的示意图。

图 3 是 ABL-1 scFv 的诱导表达, 纯化和鉴定的分析结果, 其中 (A1): 标准蛋白; (A2): 未诱导全菌蛋白; (A3): 诱导后全菌蛋白; (A4): 超声上清; (A5): 超声沉淀; (A6): 纯化产物; (B1): Western blotting 检测蛋白的表达。

图 4 是非竞争性 ELISA 测定 ABL-1 scFv 与 hsBlyS 的结合示意图。

图 5 是竞争性 ELISA 测定 ABL-1 scFv 抑制 ABL-1 单克隆抗体与 hsBlyS 的结合示意图。

图 6 是 Western blotting 检测 ABL-1 scFv 与 hsBlyS 的结合, 其中 (A1): 标准蛋白; (A2): 纯化 hsBlyS 蛋白; (B): ABL-1 mAb 与 hsBlyS 的结合 (C): ABL-1 scFv 与 hsBlyS 的结合; (D): 无关 IgG 与 hsBlyS 的结合 (作为阴性对照)。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

实施例 1: 从 BlyS 单克隆细胞株 ABL-1 分离抗体的可变区基因

收集生长良好, 能分泌 BlyS 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 ABL-110⁷ 个 (本研究室构建, 按照 “Current protocol in immunology” Production of Monoclonal Antibodies), 用 TRIZOL 试剂提取总 RNA。

RT-PCR 钓取 VH 基因:

参照 Promega 公司的 (Access RT-PCR System and Access RT-PCR Introductory System) 提供的方法: 一步法 RT-PCR 试剂盒分别扩增 VH 基因:

VH 基因采用引物 VH Back (5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3') 和引物 VH For (5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3'),

RT-PCR 反应总共为 50 μ l 体系: 1 μ g 的总 RNA, 10 μ l 的 5 \times AMV/*Tf1* 反应缓冲液, 浓度为 10 pmol 的引物 VH Back 和 VH For 各 5 μ l, 浓度为 500 uM 的 dNTP1 μ l, 3mM 的 MgSO₄2 μ l; 5 u AMV 逆转录酶 1 μ l 和 5 u *Tf1* DNA 聚合酶 1 μ l。反应步骤: 48 $^{\circ}$ C 逆转录反应 45 分钟; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒; 55 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟; 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟, 共 35 个循环。

RT-PCR 钓取 VL 基因:

VL 基因采用引物 VL back (5'-GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA-3') 和 VL For

(5'-GTTAGATCTCGAGCTTGGTCCC-3')。按照 Promega 公司一步法 RT-PCR 试剂盒扩增 VL。50 μ l 反应体系如下: 1 μ g 的总 RNA, 10 μ l 的 5 \times AMV/*Tf1* 反应缓冲液, 浓度为 10 pmol 的引物 VL back 和 VL For 各 5 μ l, 浓度为 500 μ M 的 dNTP 1 μ l, 3mM 的 MgSO₄ 2 μ l; 5 u AMV 逆转录酶 1 μ l 和 5 u *Tf1* DNA 聚合酶 1 μ l。反应步骤: 48 $^{\circ}$ C 逆转录反应 45 分钟; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒; 60 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟; 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟, 共 35 个循环。反应结束后, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 1。

VH 和 VL 基因扩增产物的克隆:

引物设计如下:

VH P₁ (5'-ACCATGGAATTCCTGCAGGAGTCTGGTGGCTTG-3'), 含有 *EcoRI* 酶切位点,

VH P₂ (5'-AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTG-3'),

VL P₁ (5'-CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGACATTGAGCTCAC-3'),

VL P₂ (5'-GTGGTGAAGCTTTCACTCGAGCTTGGTACCACCTC-3'), 含有 *HindIII* 酶切位点,

PCR 产物使用胶回收试剂盒纯化。取载体 pMD18-T 1 μ l, PCR 产物 4 μ l, T4 连接酶 1 μ l, 5 μ l T4 连接酶缓冲液 (2 倍), 16 度连接 18 小时。连接产物 10 μ l 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。铺板, 第二天挑取单克隆, 采用菌落 PCR 鉴定, 并送交上海博亚公司测序。测序结果如序列表 <400>1 和 <400>2 所示。

实施例 2: scFv 基因的组装

为获得 scFv, 在 VH 和 VL 之间添加一柔性 linker (G₄S)₃, 为防止在扩增过程中引入突变, 我们采用高保真酶 Pyrobest (大连宝生物)。整个组装示意图为图 2, 结果如图 1。

第一轮 PCR 反应扩增 VH:

50 μ l PCR 反应体系如下: 5 μ l 的 10 \times 反应缓冲液; 浓度为 10 μ M 的引物 VH P₁ 和 VH P₂ 2.5 μ l; 4 μ l 的 dNTP; 35 μ l H₂O; 高保真 Pyrobest 酶 0.5 μ l。95 $^{\circ}$ C 变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共 26 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 延伸 5min。

第二轮 PCR 反应扩增 VL:

50 μ l PCR 反应体系如下: 5 μ l 的 10 \times 反应缓冲液; 浓度为 10 μ M 的引物 VL P₁ 和 VL P₂ 2.5 μ l; 4 μ l 的 dNTP; 35 μ l H₂O; 高保真 Pyrobest 酶 0.5 μ l。95 $^{\circ}$ C 变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共 26 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 延伸 5min。

割胶回收 PCR 产物。

第三轮 PCR 反应扩增 VH-linker-VL:

50 μ l PCR 反应体系如下: 5 μ l 的 10 \times 反应缓冲液; 浓度为 10 μ M 的引物 VH P₁ 和 VL P₂; 2.5 μ l: 4 μ l 的 dNTP; 35 μ l H₂O; 高保真 Pyrobest 酶 0.5 μ l, 上两轮 PCR 产物各 1 μ l 做为模板。95 $^{\circ}$ C 变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共 26 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 延伸 5min. 反应。1%琼脂糖凝胶电泳, 割胶回收产物。

实施例 3: scFv 基因的酶切消化和连接

双酶切 pET28a:

EcoRI 和 *HindIII* 为 Takara 产品。2 μ l 的 10 \times M 反应缓冲液; 10 μ l 的载体 pET28a; *EcoRI* 和 *HindIII* 各 1 μ l; 7 μ l H₂O。37 $^{\circ}$ C 反应 6 小时。:

双酶切实施例 2 中的第三轮扩增产物:

2 μ l 的 10 \times M 反应缓冲液; 10 μ l 的第三轮 PCR 产物; *EcoRI* 和 *HindIII* 各 1 μ l; 7 μ l H₂O。37 $^{\circ}$ C 反应 6 小时。

1%琼脂糖凝胶电泳, 割胶回收产物。

连接反应:

T4 连接酶为 Takara 产品。2 μ l 的连接反应缓冲液 H₂O; 上轮酶切产物各 1 μ l; 16 μ l H₂O。16 $^{\circ}$ C 反应 12 小时。

取 10 μ l 产物转化感受态 DH5 α 。铺板, 第二天挑取单克隆, 采用菌落 PCR 鉴定, 并送交上海博亚公司测序。

实施例 4: scFv 单链抗体在大肠杆菌中的诱导表达。

挑取测序正确的克隆转化感受态 BL21 (DE3)。挑取单个菌落接种到 3 ml LB 培养液 (含 50 μ g/ml 卡那霉素) 中, 37 $^{\circ}$ C 培养 10 小时, 收集细菌, 按 1:100 接种到 50 ml 含相同浓度抗生素 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀=0.6 时, 加 IPTG (1mmol/L) 诱导, 37 $^{\circ}$ C 培养 5 小时, 13% SDS-PAGE 检测表达情况。结果如图 3, 清楚表明表达的蛋白分子量在 27Kd 左右。主要存在于包含体内。

实施例 5: 表达产物的分离纯化和复性

4 $^{\circ}$ C 5000g/min 离心 10min 收集菌体, 以 5 ml 50mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl 重悬沉淀, 然后冰上超声 (超声 5s, 间隙 5s, 反复 160 次), 至细胞悬液不再粘稠。室温 12000 g/min 离心 10min, 分别收集上清和沉淀。沉淀

加入 2.5 ml Binding 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, 8M urea, 5mM 咪唑, pH 8.0), 室温溶解 2 小时. 室温 12000 g/min 离心 10min, 收集上清. 取 Ni²⁺-IDA His-bind resin 1ml 装柱, 按照 Novagen 公司提供的操作手册纯化蛋白.

收集 Elution 缓冲液洗脱的蛋白, 测定蛋白浓度, 用复性缓冲液

I (50mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, 2M urea, 0.5mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.1mmol/L 氧化型谷胱甘肽 pH 8.0) 稀释蛋白至终浓度为 100 μ g/ml. 复性 24h, 接着将蛋白装入透析袋, 用复性缓冲液 II (50mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, pH 8.0) 透析复性 12h. 超滤管 Centricon 30 (Millipore, USA) 浓缩蛋白. 13%SDS-PAGE 检测. 蛋白-20 $^{\circ}$ C 保存.

实施例 6: scFv 单链抗体与 hsBlyS 结合活性测定

1) 非竞争 ELISA 法测定:

10 μ g/ml hsBlyS (NaHCO₃, pH9.6) 4 $^{\circ}$ C 包板过夜. 第二天用 1%脱脂牛奶封闭 (37 $^{\circ}$ C, 2h). 系列稀释的 scFv 分别与 hsBlyS 孵育 (37 $^{\circ}$ C, 2h). 以抗 His 单克隆抗体 (Novagen, USA) 为一抗, HRP 偶联的羊抗小鼠 IgG 为二抗, 常规 ELISA 检测 (参照 Current protocol in immunology unit 2.1-2.3). 结果如图 4

2) 竞争 ELISA 法测定:

10 μ g/ml hsBlyS (NaHCO₃, pH9.6) 4 $^{\circ}$ C 包板过夜. 系列稀释的 scFv 分别与 ABL-1 mAb 混合, 与 hsBlyS 孵育 (37 $^{\circ}$ C, 2h). 用 HRP 偶联的羊抗小鼠 IgG 检测 scFv 抑制 ABL-1 mAb 与 hsBlyS 的结合. 结果如图 5, 结果证实 ABL-1 scFv 与 ABL-1 单克隆抗体是同一表位结合 hsBlyS.

3) Western blotting 测定:

取 hsBlyS 20 μ l, 13%SDS-PAGE 电泳, 转移至硝酸纤维素薄膜, 1%BSA 封闭后, 加 scFv 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 抗 His 单克隆抗体 (Novagen, USA) 为一抗, HRP 偶联的羊抗小鼠 IgG 为二抗, TMB 显色. (具体参照 Current protocol in immunology unit 8.10). 结果如图 6, 结果表明 ABL-1 scFv 与 ABL-1 单克隆抗体识别 hsBlyS 的线性表位.

序列表

<110>南京师范大学

<120>人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链和轻链可变区基因及其应用

<160>4

<210>1

<211>342

<212> DNA

<213>小鼠 (Mus)

<400>1

gtgcaactgc aggagtcagg aggaggcttg gtacagcctg ggggttctct gagactctcc 60
tgtgcaactt ctgggttcac cttcactgat tactacatga gctgggtccg ccagcctcca 120
ggaaaggcac ttgagtgggt gggttttatt agaaacaaag ctaatggta cacaacagag 180
tacagtgcac ctgtgaaggg tcggttcacc atctccagag ataattcca aagcctcctc 240
tatctcaaa tgaacacctt gagagctgag gacagtcca cttattactg tgcaagagat 300
atcaccttc tgggccaagg gaccacggtc accgtctcct ca 342

<210>2

<211>321

<212> DNA

<213>小鼠 (Mus)

<400>2

gacattgagc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga acgggtcacc 60
atgacctgca ctgccagctc aagtgtaagt tccagttact tgcactggta ccagcagaag 120
ccagatcct cccccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtcca 180
gctcgttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc teacaatcag cagcatggag 240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagtatcctc gttcccgtta caggttcgga 300
ggggggacca agctcgag 318

<210>3

<211>114

<212> PRT

<213>小鼠 (Mus)

<400>3

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp			
	20	25	30
Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu			
	35	40	45
Trp Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu			
	50	55	60
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn			
	65	70	75
Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu			
	80	85	90
Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Thr Leu Leu Gly			
	95	100	105
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	110	114	

<210>4

<211>106

<212> PRT

<213>小鼠 (Mus)

<400>4

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu			
1	5	10	15
Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser			
	20	25	30
Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro			
	35	40	45
Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr			
	65	70	75
Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His			
	80	85	90
Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu			
	95	100	105

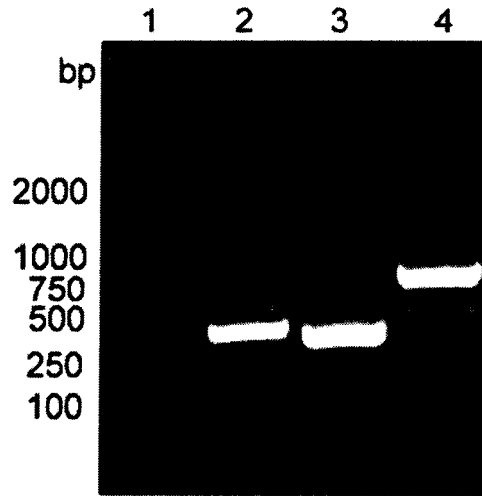


图 1

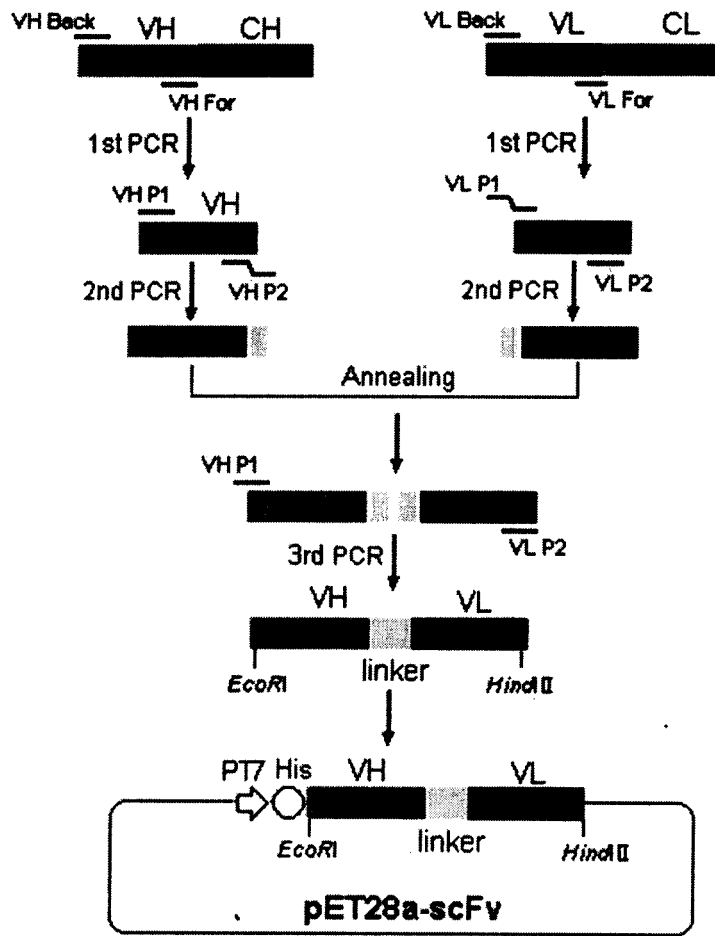


图 2

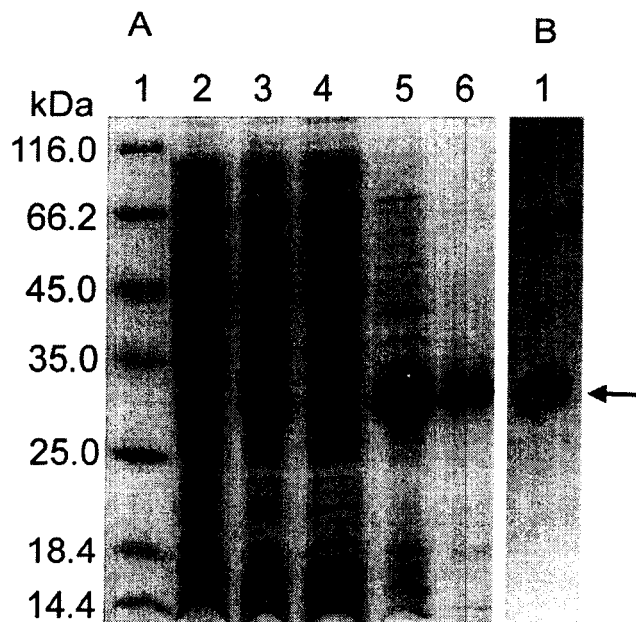


图 3

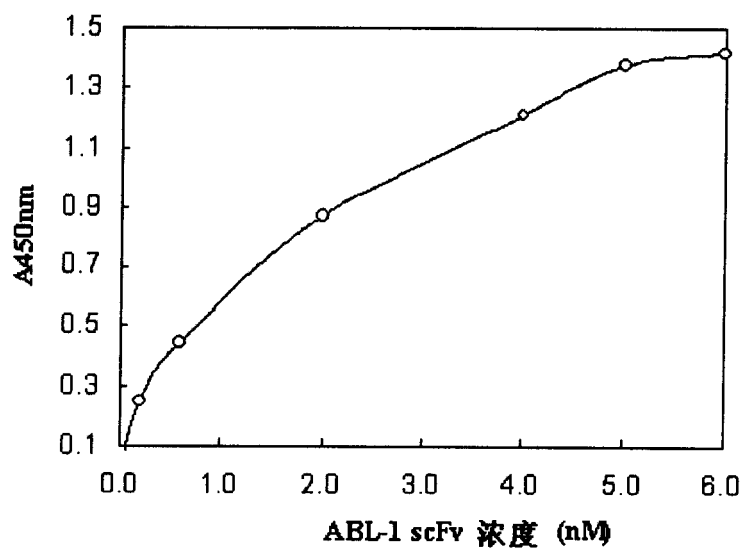


图 4

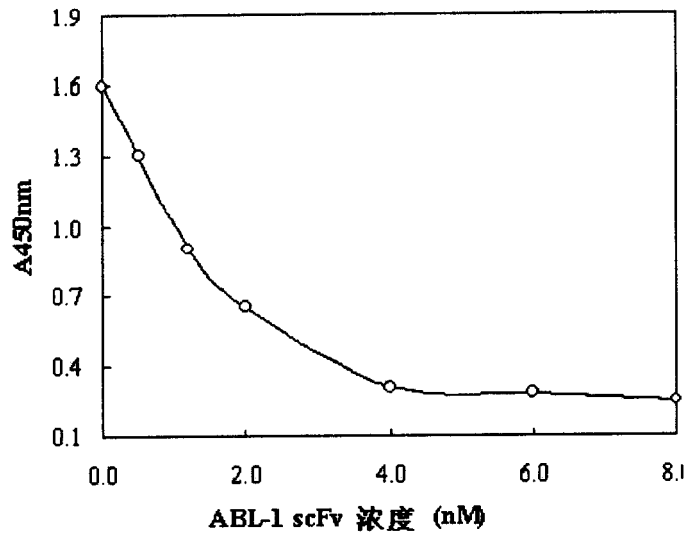


图 5

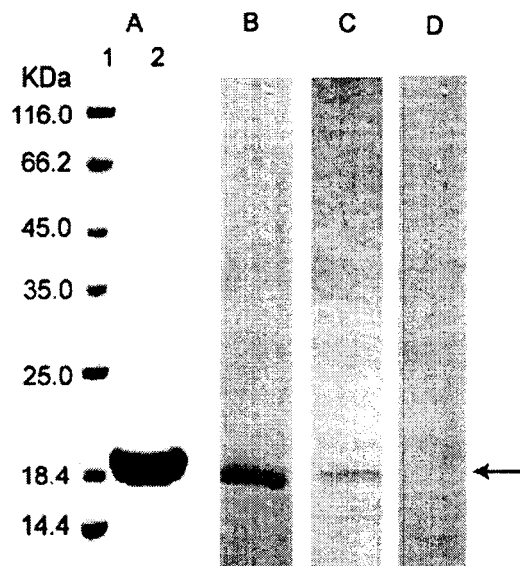


图 6

专利名称(译)	人B淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链和轻链可变区基因及其应用		
公开(公告)号	CN1654654A	公开(公告)日	2005-08-17
申请号	CN200510037671.6	申请日	2005-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	张双全 曹鹏		
发明人	张双全 曹鹏		
IPC分类号	C07K16/24 C12N15/13 C12N15/63 C12N15/70 C12P21/08 G01N33/53		
代理人(译)	汪旭东		
其他公开文献	CN1294263C		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明涉及人B淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的重链和轻链可变区基因，由所述基因编码的多肽，含有所述基因的载体及所述的基因和多肽在制备BLyS相关的自身免疫性疾病的临床检测试剂中的应用，以及其制备方法。所述的重链可变区基因全长为342bp，其核苷酸序列如1所示，其编码的氨基酸序列如3所示；所述的轻链可变区基因全长为321bp，其核苷酸序列如2所示，其编码的氨基酸序列如4所示。利用基因工程表达产生的蛋白质保留了与抗体结合的能力，且scFv分子小，容易通过基因工程的改造，与一些其他效应分子结合，为构建生物导弹打下基础；还大大降低成本了，利于工业化生产。

