

1. 一种制备小鼠G2A单克隆抗体的组合表位抗原, 抗原的氨基酸序列为:

MCPMLKNGYNGNATPVTTTAPWASLGLSAKTCNNVSFEESRIVLLQVLQGNVLAVRNQHRWTLGLLACKDR
FVAVVYALESRGRRRRRTQTEDKETCFDMLQMSRIARIFRSIKQSMGLSAAQKAKVKHSAIASYYRGDRNAMCGL
EERLYTTDHSRQEVSRHKGWKEWSMKTDVTRLTHSRDTEELQSPVALADHYTFSRPVHPPGSPCPAKRLIEESC。

抗人G2A单克隆抗体以及检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种单克隆抗体,特别是涉及一种用于检测人巨噬细胞G2A表达量的单克隆抗体。

背景技术

[0002] 巨噬细胞是机体免疫反应重要组成部分,其主要分为I型和II型巨噬细胞(M1型和M2型巨噬细胞)两大类,特别是I型巨噬细胞对自身性免疫疾病的发生和发展起到非常重要的作用。当前,针对M1/M2型巨噬细胞的鉴定和分类主要通过检测其分泌的多种促炎和抑炎型细胞因子,并通过比较促炎和抑炎型细胞因子水平的相对高低来确定,目前还没有发现一个单一的、特异性的细胞表面标志物可用来鉴定M1/M2型巨噬细胞,检测过程复杂且不能定量。

[0003] 在多发性硬化症诊断的过程中,血液学检查是帮助提高体征检查、影像学检查意义的一项重要检测方法。近年来的研究发现,多发性硬化症患者外周血巨噬细胞主要呈现为M1型巨噬细胞,其是多发性硬化症发病和发展的重要因素,因此快速检测和鉴定M1型巨噬细胞的血液水平也成为了多发性硬化症诊断的重要指标。目前对M1型巨噬细胞的检测主要通过测定多项细胞因子的mRNA和蛋白水平来确定,但是这种检测方式需检测多个标志物,且检测方法操作繁琐、费时费力,数据判断标准模糊,且同疾病的相关性不高。因此,临床上急需一个M1型巨噬细胞特异的、同炎症和疾病相关性高的细胞表面标志物,能够快速通过流式细胞仪来进行定量的检测和判断。另外,这项标志物也可以推广成为可在其它自身免疫疾病中鉴定M1型巨噬细胞的指标。

[0004] 我们通过实验研究发现测定G蛋白偶联受体(G2A)的表达,可以作为反映M1巨噬细胞炎症存在,在临床上用于判别人体存在炎症程度的指标,特别是对于有M1巨噬细胞参与的炎症。由于G2A是G蛋白偶联受体,具有蛋白/细胞膜一体的稳定性结构,因此很难做成单抗。目前国际上并没有很好的抗人G2A单克隆抗体,所以相关实验都是基于多抗来进行。由于多抗来源不稳定,批号之间差异大,相比单抗,用作检测抗体优异性差。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种能够与G2A特异性结合的抗人G2A单克隆抗体,以及利用该抗体制备的检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒及其使用方法。本发明的抗人G2A单克隆抗体是通过设计的分段组合抗原制备的,然后以此单抗为基础制备了检测人G2A表达量的试剂盒,建立了测定人G2A表达量的方法。

[0006] 本发明小鼠抗人G2A单克隆抗体,其轻链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,重链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。轻链CDR3的序列为EVGLQVPWTSC;重链CDR3的序列为HRTISRTFQKFEI。

[0007] 本发明检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒,包括:FITC荧光标记小鼠抗人G2A单克隆抗体和PE荧光标记抗人CD14抗体;

[0008] 其中,FITC荧光标记的小鼠抗人G2A单克隆抗体为权利要求1中所述的小鼠抗人G2A单克隆抗体。

[0009] 进一步,本发明检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒,所述FITC荧光标记小鼠抗人G2A单克隆抗体按以下步骤制备:

[0010] 一、在4℃将浓度为1mg/mL的小鼠抗人G2A单克隆抗体用交联反应液至pH=9.0;

[0011] 二、将FITC按1mg/mL溶于DMSO中;

[0012] 三、按照小鼠抗人G2A单克隆抗体:FITC=1mg:150 μ g的比例将步骤二制得的FITC溶液缓慢加入步骤一透析后的小鼠抗人单克隆抗体中,边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,暗处4℃反应8h;加入5mol/L的NH₄Cl至终浓度为50mmol/L,4℃终止反应2h;

[0013] 四、将步骤三得到的交联物在PBS中透析至透析液清亮,即制得FITC荧光标记小鼠抗人G2A单克隆抗体;

[0014] 所述交联反应液的制备方法为:称取7.56g NaHCO₃,1.06g Na₂CO₃,7.36g NaCl,加水定容至1L。

[0015] 进一步,本发明检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒,还包括FACS染色缓冲液、pH值为7.4的PBS洗涤液、FC受体封闭液和细胞固定液。

[0016] 本发明检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0017] 取1-3 \times 10⁶PBMC放入塑料试管中,用PBS洗涤液洗涤后,重新悬浮于FCAS染色缓冲液中,加入FC受体封闭液5 μ l,室温放置10min,用0.5 μ g FITC荧光标记小鼠抗人G2A单克隆抗体和PE荧光标记抗人CD14抗体在室温染色10min,用PBS洗涤液洗2次,重悬于1mL细胞固定液中,上机分析。

[0018] 通过大规模的RNA-seq技术,比较多发性硬化症患者和正常人对照组的外周血巨噬细胞,确定了一系列特异性的多发性硬化症患者巨噬细胞标志物,并用传统M1/M2鉴定方式的分析数据做比对,找出了一个特异性的M1型巨噬细胞表面标志物:G蛋白偶联受体132(GPR132或G2A)蛋白。研究发现在多发性硬化症病人的外周血巨噬细胞上,不论是RNA或蛋白水平G2A均呈高度表达。进一步,通过对纯化的G2A+巨噬细胞进行传统M1/M2型分类分析发现,G2A+巨噬细胞是典型的炎症性的M1型巨噬细胞。

[0019] 本发明抗人G2A单克隆抗体以及检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒与现有技术不同之处在于:

[0020] 本发明提供了一个新的生物学标志物G蛋白偶联受体(G2A),用于评估多发性硬化症的自身免疫情况,也可用于评估其它自身免疫性炎症性疾病的病理状况。通过设计组合表位G2A抗原,成功制备了抗人G2A单克隆抗体,以免疫印迹为基础,利用此单抗设计了检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒,并建立了抗人G2A的定量检测方法。此标志物的测定,可以作为多发性硬化症,其它自身免疫性炎症性疾病的(其病理生理过程中带有自身免疫发病机理)实验室辅助诊断指标(这类疾病还可以包括,类风湿性关节炎,II类糖尿病,自身免疫性肠炎,银屑病等等),为分析评估多发性硬化症中的巨噬细胞的自身免疫炎症情况提供了快速和简便的方法。

[0021] 下面结合附图对本发明的抗人G2A单克隆抗体以及检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒作进一步说明。

附图说明

- [0022] 图1为获得本发明小鼠抗人G2A单克隆抗体所选取的胞外段；
- [0023] 图2为实施例3检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒的使用方法的步骤图；
- [0024] 图3为G2A在病人组和对照组CD14⁺细胞上的表达对比图；
- [0025] 图4为在多发性硬化病人和对照者中炎症性巨噬细胞M1的相关基因的mRNA表达对比图；
- [0026] 图5为G2A阳性和阴性的区分图；
- [0027] 图6为G2A⁺细胞中表达细胞因子的情况分析图。

具体实施方式

[0028] 实施例1

[0029] 本实施例通过设计组合表位G2A抗原(设计组合了N-terminus、ECL1、ECL2、ECL3等胞外段,作为独特的免疫原,如图1所示),制备了小鼠抗人G2A单克隆抗体,其轻链CDR3的氨基酸序列为EVGLQVPWTSC;重链CDR3的氨基酸序列为HRTISRTEFQKFEI。

[0030] 实施例2

[0031] 本实施例的检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒包括:FITC荧光标记小鼠抗人G2A单克隆抗体、PE荧光标记抗人CD14抗体、FACS染色缓冲液、pH值为7.4的PBS洗涤液、FC受体封闭液和细胞固定液。本实施例的试剂盒检测原理为:用实施例1中制得的小鼠抗人G2A单克隆抗体作为一抗、抗人CD14抗体作为二抗,免疫印迹法检测人巨噬细胞表达G2A的情况。

[0032] 其中,FITC荧光标记小鼠抗人G2A单克隆抗体按以下步骤制备:

[0033] 一、在4℃将浓度为1mg/mL的小鼠抗人G2A单克隆抗体用交联反应液透析三次,至pH=9.0;

[0034] 二、将FITC按1mg/mL溶于DMSO中(每次交联使用的FITC均为新鲜配制,避光);

[0035] 三、按照小鼠抗人G2A单克隆抗体:FITC=1mg:150μg的比例将步骤二制得的FITC溶液缓慢加入步骤一透析后的小鼠抗人单克隆抗体中,边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,暗处4℃反应8h;加入5mol/L的NH₄Cl至终浓度为50mmol/L,4℃终止反应2h;

[0036] 四、将步骤三得到的交联物在PBS中透析至透析液清亮,即制得FITC荧光标记小鼠抗人G2A单克隆抗体;

[0037] 交联反应液的制备方法为:称取7.56g NaHCO₃,1.06g Na₂CO₃,7.36g NaCl,加水定容至1L。

[0038] 交联物的鉴定:蛋白浓度(mg/mL)=[A₂₈₀-0.31×A₄₉₅]/1.4,F/P比例:3.1×A₄₉₅/[A₂₈₀-0.31×A₄₉₅],该值应介于2.5~6.5之间。FITC交联的蛋白应置于pH 7.4的磷酸盐缓冲液中,加入0.1%NaN₃、1%BSA,4℃避光保存。

[0039] 本实施例中PE荧光标记抗人CD14抗体为从德国Miltenyi Biotec公司购买的PE荧光标记的抗人CD14抗体;FC受体封闭液为从美国BD公司购买的Human BD Fc Block。

[0040] FACS染色缓冲液为pH7.4磷酸缓冲液PBS,其中含5%小牛血清(FCS)、0.01%叠氮化钠,保存在4℃。

[0041] pH7.4PBS洗涤液:每1L的pH7.4PBS洗涤液含0.05%Tween20、8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄,保存在4℃。

[0042] 细胞固定液 (FCAS缓冲液) 为pH7.4磷酸缓冲液,其中含4%多聚甲醛、5%小牛血清(FCS)、0.01%叠氮化钠,并避光保存在4℃。

[0043] 实施例3

[0044] 本实施例的检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0045] 取 $1-3 \times 10^6$ PBMC放入FACS染色管中,用PBS洗涤液洗涤后,重新悬浮于FCAS染色缓冲液中,加入FC受体封闭液5ul,室温放置10min,用0.5ug FITC荧光标记小鼠抗人G2A单克隆抗体和PE荧光标记抗人CD14抗体在室温染色10min,用PBS洗涤液洗2次,重悬于1mL细胞固定液中,上流式细胞仪分析,如图2所示。

[0046] 多发性硬化症 (MS) 病人外周血已经过体外实验分析,通过特定的细胞因子谱分析巨噬细胞,结果显示M1巨噬细胞有显著增加。

[0047] 验证试验

[0048] 用密度梯度离心法将多发性硬化症病人 (MS) 和非病人对照者 (NS) 的外周血单个核细胞分离出来,然后用PE荧光标记的抗人CD14抗体和FITC荧光标记的抗人G2A抗体同时染色来分析巨噬细胞表面G2A的表达情况,流式细胞仪的分析结果图3所示。

[0049] 由图3可知,G2A的表达在病人组中约占总CD14+细胞的50%,在对照组中约占5%,即在多发性硬化症病人的外周血中,表达G2A的CD14+细胞显著高于正常人对照组。图中每个点代表一个单独的病人或非病人对照者。星号代表两组的差异用统计学意义 ($p < 0.01$, T-test)。

[0050] 用密度梯度离心法将多发性硬化症病人 (MS) 和非病人对照者 (NS) 的外周血单个核细胞分离出来,用CD14分离磁珠分离出CD14+巨噬细胞。细胞裂解后,用RNA纯化柱提取RNA,反转录到cDNA后,用荧光定量PCR分析如图4横坐标所示12个相关基因的表达。

[0051] 如图4所示,其中IL6、TNFA、IL23A、IL1B、IL12B、IDO、CXCL10的表达具有极显著的差异。结果以PCR的2-CT值表示;黑色菱形代表病人,空心菱形代表对照;星号代表两组的差异用统计学意义 ($p < 0.01$, T-test)。

[0052] 将正常人的外周血单个核细胞PBMC用PE荧光标记的抗人CD14抗体和FITC荧光标记的抗人G2A抗体同时染色后,用流式细胞仪分析被染色的细胞,如图5所示,其中双阳性的为G2A+。然后用流式细胞仪分选出G2A+和G2A-的细胞。分选的细胞经过短期培养后 (24h),收集培养上清。用Luminex法测定细胞所表达的M1和M2巨噬细胞相关的细胞因子含量,如图6所示,其中,TNF- α 、IL-10差异极显著,IL-6、IL-1 β 、IL-13差异显著。星号代表两组的差异用统计学意义 ($p < 0.01$, T-test)。

[0053] 虽然以上描述了本发明的具体实施方式,但是本领域的技术人员应当理解,这些仅是举例说明,本发明的保护范围是由所附权利要求书限定的。本领域的技术人员在不背离本发明的原理和实质的前提下,可以对这些实施方式作出多种变更或修改,但这些变更和修改均落入本发明的保护范围。

序列表.txt

SEQUENCE LISTING

[0001]

<110> 申请人名称 苏州莱泰生物科技有限公司

<120> 抗人G2A单克隆抗体以及检测人巨噬细胞G2A表达量的试剂盒

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Glu Val Gly Leu Gln Val Pro Trp Thr Ser Cys

11

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

His Arg Thr Ile Ser Arg Thr Phe Gln Lys Phe Glu Ile

13

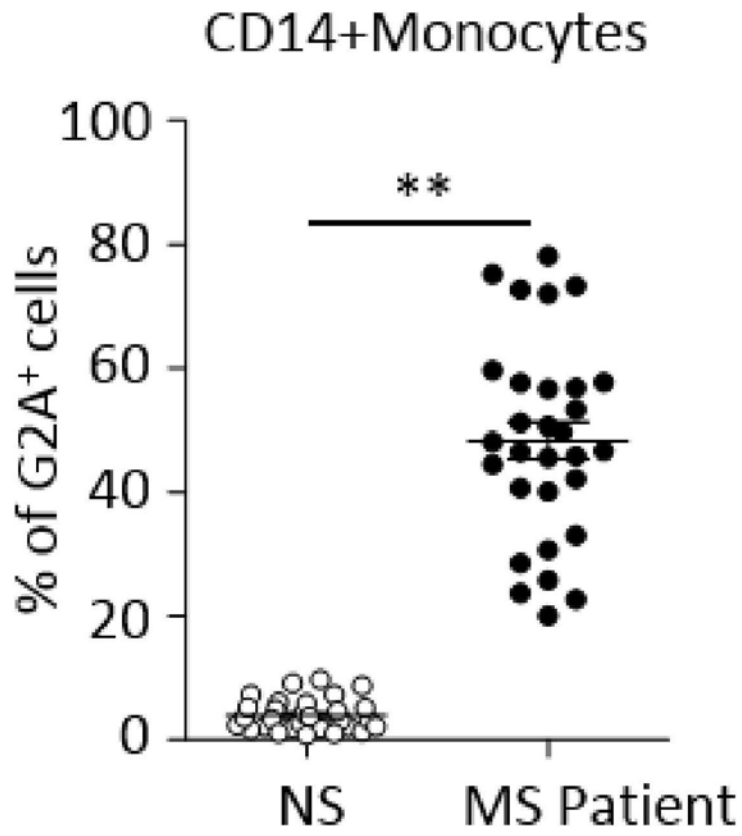


图3

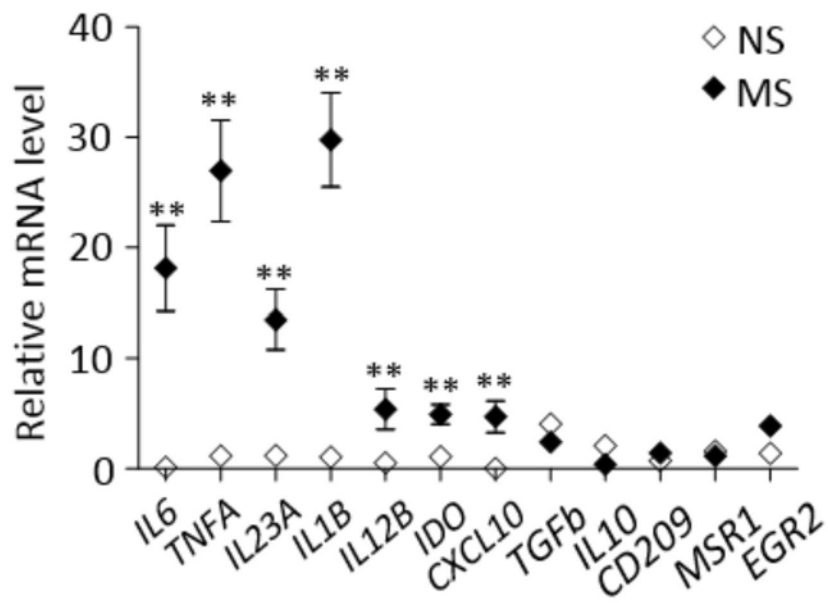


图4

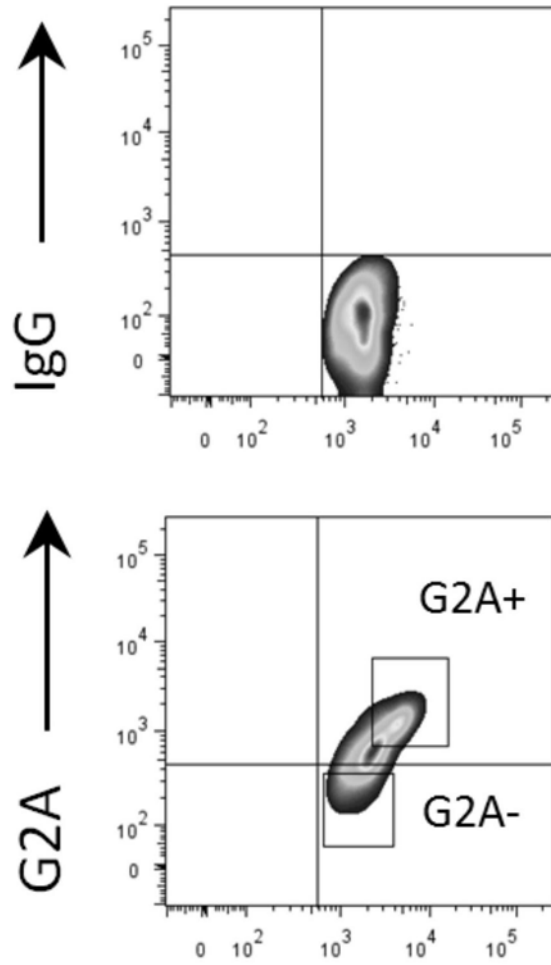


图5

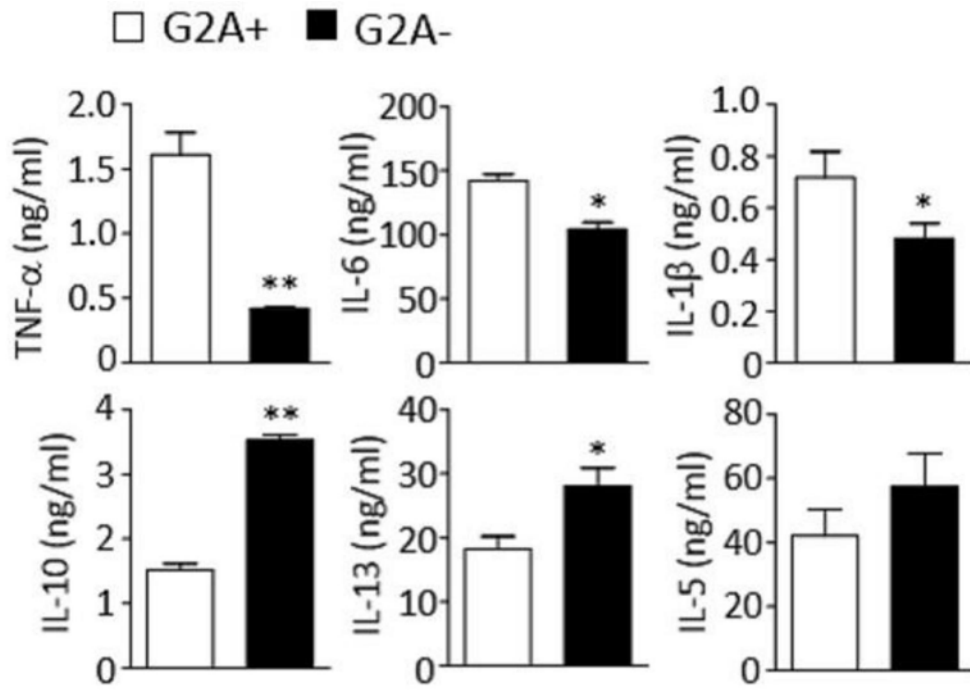


图6

