



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110872354 A

(43)申请公布日 2020.03.10

(21)申请号 201811026810.9

C12N 15/13(2006.01)

(22)申请日 2018.09.04

C12N 15/85(2006.01)

(71)申请人 华瑞同康生物技术(深圳)有限公司

G01N 33/574(2006.01)

地址 518110 广东省深圳市龙华区观澜街
道新澜社区观光路1301-76号银星智
界二期1号楼A201A301

G01N 33/53(2006.01)

(72)发明人 李作生 陈湖 李惠军 党利
梁丽雯 方聪 谭俊焯 艾伦·何
斯文·斯库格 周际

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 赵天月

(51)Int.Cl.

C07K 16/40(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页
序列表6页 附图2页

(54)发明名称

哺乳动物细胞重组抗人TK1的鸡源的单克隆
抗体、单链抗体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了利用哺乳动物细胞重组抗人TK1的鸡源的单克隆抗体、单链抗体及其制备方法和应用,其中,所述单克隆抗体的轻链具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,重链具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。该单克隆抗体亲和力高,避免了哺乳动物IgG的非特异性反应,相对于分子量更小,更容易进入到细胞内。

1. 一种单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的轻链具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,重链具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,

任选地,所述单克隆抗体进一步包括:

连接肽,所述连接肽具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,

任选地,所述单克隆抗体进一步包括下列表达元件的至少一种:

信号肽,所述信号肽具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

标签,所述标签具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,

任选地,所述单克隆抗体具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

2. 一种单链抗体,其特征在于,所述单链抗体的轻链具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,重链具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,

任选地,所述单链抗体进一步包括:

连接肽,所述连接肽具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,

任选地,所述单链抗体进一步包括下列表达元件的至少一种:

信号肽,所述信号肽具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

标签,所述标签具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,

任选地,所述单链抗体具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

3. 一种核酸,其特征在于,所述核酸编码权利要求1所述的单克隆抗体或权利要求2所述的单链抗体。

4. 根据权利要求3所述的核酸,其特征在于,所述核酸进一步包括下列表达元件的至少一种:

KOZAK序列,所述KOZAK序列具有SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列;

信号肽,所述信号肽具有SEQ ID NO:8所示的核苷酸序列;

标签,所述标签具有SEQ ID NO:9所示的核苷酸序列,

任选地,所述核酸具有SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列。

5. 一种重组载体,其特征在于,所述重组载体包含权利要求3或4所述的核酸,

任选地,所述重组载体的载体为pIRES2-EGFP载体。

6. 一种重组细胞,其特征在于,所述重组细胞含有权利要求5所述的重组载体。

7. 一种制备权利要求1所述的单克隆抗体或权利要求2所述的单链抗体的方法,其特征在于,包括:

将权利要求6所述的重组细胞在适于蛋白表达和分泌的条件下进行培养,以便获得所述单克隆抗体或单链抗体。

8. 一种免疫偶联物,其特征在于,包括,

权利要求1所述的单克隆抗体,或者权利要求2所述的单链抗体;以及

选自下组的偶联部分:药物、毒素、细胞因子、放射性核素或酶。

9. 一种检测条或检测试剂盒,其特征在于,所述检测条和检测试剂盒含有权利要求1所述的单克隆抗体、权利要求2所述的单链抗体、权利要求8所述的免疫偶联物、或它们与可检测标记物的结合物。

10. 权利要求1所述的单克隆抗体、权利要求2所述的单链抗体、权利要求8所述的免疫偶联物和权利要求9所述的检测条或检测试剂盒在检测细胞异常增殖的用途,

任选地,所述细胞异常增殖包括怀孕、组织增生和肿瘤。

哺乳动物细胞重组抗人TK1的鸡源的单克隆抗体、单链抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,具体地,涉及单克隆抗体、单链抗体及其制备方法和应用,更具体地,涉及单克隆抗体、单链抗体、分离的核酸、载体、重组细胞、制备单克隆抗体的方法、免疫偶联物、检测条或检测试剂盒,以及单克隆抗体、免疫偶联物和检测条或检测试剂盒在检测细胞异常增殖的用途。

背景技术

[0002] 胸苷激酶1(TK1)是一特殊激酶,催化胸苷(TdR)为1-磷酸胸苷酸(TMP)。TK1是细胞周期依赖酶,主要存在于细胞质中。哺乳动物细胞中染色体DNA的复制是限制在细胞周期中的某一特定期内进行的,它称为S期。DNA前体合成和DNA复制过程中所需要的许多酶的酶活性在细胞进入S期时升高,并在DNA合成完成后降低。一类型类的S期特殊酶,包括TK、胸苷酸合成酶、二磷酸核糖核苷还原酶、二氢叶酸还原酶,其特征是这类型酶被大幅度诱导升高。这类酶活性的改变,揭示了存在着两种截然不同的调节机制:一种启动方式是酶活性在S期升高;另一种则是使酶活降低,并恢复到S期之前的水平。血清的胸苷激酶1的检测具有重要临床检测意义。

[0003] 目前,检测胸苷激酶1(STK1)的产品不多,主要是检测人血清中胸苷激酶1(STK1)的产品和检测免疫组化用的标记抗体。TK浓度检测一般采用TK1蛋白质作抗原,制备单/多克隆抗人TK1抗体,但抗体的灵敏度和特异性普遍不高。

[0004] 由此,现有的TK1抗体有待改进。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出一种单克隆抗体,该抗体为抗TK1的IgY的单克隆抗体,亲和力高,避免了哺乳动物IgG的非特异性反应,相对于分子量更小,更容易进入到细胞内。

[0006] 需要说明的是,本发明是基于发明人的下列工作而完成的:

[0007] 目前,单/多克隆抗人TK1抗体的灵敏度和特异性大多不高,主要是应用的抗体是鼠源的抗人源胸苷激酶1(STK1)的单克隆抗体,但应用人源胸苷激酶1(STK1)蛋白分子为抗原诱导的小鼠的免疫应答水平低,因此筛选的单克隆抗体的亲和性也低;在加上鼠源的单克隆抗体作为检测试剂,因其异嗜性抗体,类风湿因子和人抗鼠抗体而导致假阳性和假阴性和检测的敏感性低。免疫球蛋白在各哺乳动物品种中具有很高的保守性,以及与哺乳动物和细菌的多种蛋白反应的性质,限制了在免疫诊断上的应用。由于鸡的系统发育差异,鸡IgY在免疫上的应用广泛。IgY是卵生动物主要低分子量免疫球蛋白。IgY可以从免疫的鸡鸡蛋中轻易获得,IgY在诊断和治疗应用中具有很大的优势。但IgY是多克隆抗体,由于缺乏异嗜性抗体、类风湿因子和人抗鼠抗体和补体成分而使得反应检测背景低。在免疫实验中,异嗜性抗体、类风湿因子和人抗鼠抗体被认为是产生假阳性和假阴性最大诱因。异嗜性抗体

亲和力低, IgY并不与发现的胞哺乳动物的多种免疫细Fc受体分子结合, 因此, 哺乳动物组织的免疫组化操作中, 应用IgY抗体比用IgG抗体可以有效地降低假阳性信号。但是, IgY是多克隆抗体, 相对于单克隆抗体, 多克隆抗体的固有缺陷限制了IgY的应用潜力。

[0008] 发明人利用重组抗体制备IgY的单克隆抗体, 利用DNA重组技术将抗体重链可变区和轻链可变区基因通过一个短肽连接后融合表达出来的抗体片段。它具备天然抗体的抗原特异性和亲和性, 它没有Fc段, 故不能与细胞的Fc受体结合, 因此更有利于作为药物导向载体; 同时由于它的分子量较小(约30kDa, 抗体约为150kDa), 易于通过血管壁和实体瘤, 有利于作用药物进行治疗。

[0009] 抗体的重组目前最常用的表达系统是大肠杆菌表达系统和哺乳动物细胞表达系统, 但各有其优缺点。在大肠杆菌中获得高表达, 易于大量制备, 但往往形成不具生物活性的包涵体, 而可溶性表达量很少, 尤其翻译表达时难以进行有效的修饰而导致生物活性的丧失, 从而限制了它的应用。发明人采用哺乳动物表达系统表达抗TK1的IgY的单克隆抗体, 不仅表达出能与TK1特异性结合的抗体分子, 而且还避免了哺乳动物抗体Fc片段本身就有的非抗原特异性反应的缺陷, 并且该单克隆抗体的特异性和敏感性高。并且, 该重组抗人源TK1分子的单链抗体用于检测人血清中的TK1分子既可以克服鼠源单克隆抗体亲和力低和交叉反应导致的背景高的缺点, 又可以提高小分子抗体容易进入细胞内可以提高免疫组化中检测效果。

[0010] 因而, 根据本发明的一个方面, 本发明提供了一种单克隆抗体。根据本发明的实施例, 所述单克隆抗体的轻链具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列, 具体地, SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列可以是轻链可变区序列, 重链具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列, 具体地, SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列可以是重链可变区序列。

[0011] MKSLLPTAAAGLLLLAAQPMAAVTLDESGGLQTPGGALSLVCKGSGFTFSSDAMGWMRQAPGKGLE
FVARINSAGSYTDYGSVDGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTSTYFCAKSPGGFSCAYGLCWDAAGSIDAWGH
GTEVIVS (SEQ ID NO:1)

[0012] ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGANYYGWFQQKTPGSAPVSLIYESTKRPSNIPSRFSGSKSGSTGTL
TITGVRADDEAVYYCGTYDSSHTTIFGAGTTLTVLGASGAEFAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPRE
(SEQ ID NO:2)

[0013] 根据本发明实施例的单克隆抗体为重组的抗TK1的IgY单克隆抗体, 亲和力高, 交叉反应低, 有效避免了IgG的非特异性反应, 并且相对于IgG, 本发明实施例的单克隆抗体的相对于分子量更小, 更容易进入到细胞内, 可以提高免疫组化中检测效果, 并且, 易于通过血管壁和实体瘤, 可以有利于作用药物进行治疗。

[0014] 另外, 根据本发明上述实施例的单克隆抗体还可以具有如下附加的技术特征:

[0015] 根据本发明的实施例, 该单克隆抗体进一步包括: 连接肽, 所述连接肽具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。由此, 连接肽连接轻链可变区的N端和重链可变区的C端, 形成单克隆抗体。并且, 该连接肽具有良好的柔性, 不会影响重链可变区和轻链可变区的正确折叠。

[0016] 根据本发明的实施例, 所述单克隆抗体进一步包括下列表达元件的至少一种: 信号肽, 所述信号肽具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列; 标签, 所述标签具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。其中, 信号肽引导重组的单克隆抗体分泌的到细胞外, 有利于于重组的单克隆抗体的纯化。本发明实施例的信号肽为CHO表达系统抗体重组常用的鼠IL-2信号肽; 而

连接肽用于将标签序列连接到抗体上,通过标签序列对抗体进行分离,其中,该标签为人流感病毒血凝素9肽。

[0017] SGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:3)

[0018] MGRMQLLSICIALSLALVTNS (SEQ ID NO:4)

[0019] YPYDVDPYA (SEQ ID NO:5)

[0020] 根据本发明的实施例,所述单克隆抗体具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0021] MGRMQLLSICIALSLALVTNSMAAVTLDESGGLQTPGGALSLVCKGSGFTFSSDAMGWMRQAPGKGLE
FVARINSAGSYTDYGSVAVDGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTSTYFCAKSPGGFSCAYGLCWDAAGSIDAWGH
GTEIVVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSSALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGANYYGWFQKTPGSAPVSLIYESTKRP
SNIPSRFSGSKSGSTGLTITGVRADDEAVYYCGTYDSSHTSIFGAGTTLYPYDVDPYA (SEQ ID NO:6)

[0022] 根据本发明的第二方面,本发明提供了一种单链抗体。根据本发明的实施例,所述单链抗体的轻链具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,重链具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0023] 本文所用术语“单链抗体”是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽(linker)连接而成的抗体。具体地,相对于单克隆抗体,单链抗体没有恒定区,但本发明实施例的单链抗体和单克隆抗体的功能和免疫效果是相同和相近的。

[0024] 根据本发明的实施例,该单链抗体进一步包括:连接肽,所述连接肽具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。由此,连接肽连接轻链可变区的N端和重链可变区的C端,形成单链抗体。并且,该连接肽具有良好的柔性,不会影响重链可变区和轻链可变区的正确折叠。

[0025] 根据本发明的实施例,所述单链抗体进一步包括下列表达元件的至少一种:信号肽,所述信号肽具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;标签,所述标签具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。其中,信号肽引导重组的单链抗体分泌的到细胞外,有利于于重组的单链抗体的纯化。本发明实施例的信号肽为CHO表达系统抗体重组常用的鼠IL-2信号肽;而连接肽用于将标签序列连接到抗体上,通过标签序列对抗体进行分离,其中,该标签为人流感病毒血凝素9肽。

[0026] 根据本发明的第三方面,本发明提供了一种核酸。根据本发明的实施例,所述核酸编码前述的单克隆抗体或单链抗体。发明人惊奇地发现,该核酸编码的抗TK1的IgY单克隆抗体,亲和力高,交叉反应低,有效避免了哺乳动物IgG的非特异性反应,并且相对于IgG,该单克隆抗体的相对于分子量更小,更容易进入到细胞内,可以提高免疫组化中检测效果,并且,易于通过血管壁和实体瘤,可以有利于作用药物进行治疗。

[0027] 根据本发明的实施例,所述核酸进一步包括下列表达元件的至少一种:

[0028] KOZAK序列,所述KOZAK序列具有SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列,它可以与翻译起始因子结合而介导含有5'帽子结构的mRNA翻译起始。

[0029] GCCACCATGG (SEQ ID NO:7)

[0030] 信号肽,所述信号肽具有SEQ ID NO:8所示的核苷酸序列,信号肽引导重组的单链抗体分泌的到细胞外。

[0031] ATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCCTTGTCAAAACAGTATGGCCGCA (SEQ ID NO:8)

[0032] 标签,所述标签具有SEQ ID NO:9所示的核苷酸序列,通过标签序列对抗体进行分

离,其中,该标签为人流感病毒血凝素的序列

[0033] TACCCATACGACGTCCCAGACTACGCT (SEQ ID NO:9)

[0034] 根据本发明的实施例,所述核酸具有SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列。

[0035] AGATCTGCCACCATGGGCAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAA
CAGTATGGCCGAGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTGAAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGC
AAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGTTACTATAGCCTGGCCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGTTGGAGTTCG
TTGCTGATATTGACAATAGTGGTAGTAGTTACACAACATACGGGGCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAG
GGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCC
AAAGATGCTCATACTAATAGTTTTATTGGTGATGATATCGACGGGTGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCT
CTGGTGGAGGATCAGGTGGAGGAGGATCCGGAGGTGGTGATTCTGGAGGTGGTTCTGCGCTGACTCAGCCGTCCTC
GATGTCAGCGAACCCGGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGCAGCTACTATGGAAGTTACTATTAT
GGCTGGTACCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCCATAGCAACGACAAGAGACCCTCAGACA
TCCCTTACGATTCTCCGGTCCAAATCCGGTCCGCAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGA
GGCTGTCTATTTCTGTGGTGGCTACGACAGCAACAGTGATAGTGCAATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGTACCCA
TACGACGTCCCAGACTACGCTTAACCGCGG (SEQ ID NO:10)

[0036] 其中,3'端的AGATCT序列和5端的CCGCGG为酶切位点。

[0037] 其中,需要说明的是,DNA转录成mRNA,mRNA经剪接等加工后翻译出蛋白质,所谓编码序列就是与蛋白质序列一一对应的DNA序列,且该序列中间不含其它非该蛋白质对应的序列,不考虑mRNA加工等过程中的序列变化,总之,编码序列就是与蛋白质的密码子完全对应,换句话说,编码序列就是编码一段蛋白产物的序列。

[0038] 在本发明中,该核酸还包括对SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列进行一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列,是指分别或同时在所述核苷酸序列的5'端和/或3'端,和/或序列内部进行例如不超过2-60个,或者不超过2-40个,或者不超过3-30个,或者不超过4-15个,或者不超过5-10个,或者不超过6-8个的分别用逐个连续整数表示的碱基的取代、缺失、添加修饰。

[0039] 在本发明中,该核酸还包括对SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列进行如上述一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列具有与SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列相同或相似的抗TK1单克隆抗体功能。

[0040] 根据本发明的第四方面,本发明提供了一种重组载体。根据本发明的实施例,所述重组载体包含前述的核酸。根据本发明实施例的载体导入受体细胞后,能分泌产生抗TK1单克隆抗体,该单抗的免疫反应性好、亲和力高,交叉反应低,有效避免了IgG的非特异性反应,并且相对于IgG,该单克隆抗体的相对于分子量更小,更容易进入到细胞内,可以提高免疫组化中检测效果,并且,易于通过血管壁和实体瘤,可以有利于作用药物进行治疗。

[0041] 该载体可以通过例如将上述核苷酸序列插入克隆载体或表达载体而得到,或者可以通过人工合成得到。

[0042] 根据本发明的实施例,所述重组载体的载体为真核载体,例如pIRES2-EGFP载体。由此,含有哺乳动物细胞表达所需的调控原件,能在哺乳动物细胞中分泌表达抗人TK1单链抗体。

[0043] 根据本发明的第五方面,本发明提供了一种重组细胞。根据本发明的实施例,该重

组细胞含有前述的载体。根据本发明实施例的重组细胞能分泌产生抗TK1单克隆抗体,该单抗的免疫反应性好、亲和力高,交叉反应低,有效避免了IgG的非特异性反应,并且相对于IgG,该单克隆抗体的相对于分子量更小,更容易进入到细胞内,可以提高免疫组化中检测效果,并且,易于通过血管壁和实体瘤,可以有利于作用药物进行治疗。

[0044] 根据本发明的一些实施例,该重组细胞可以通过将前述载体转化至宿主细胞而得到。本发明实施例的真核核表达载体转染CHO细胞(中国仓鼠卵巢细胞,属于一种卵巢成纤维肿瘤细胞)16小时可以观察明显的表达(绿色荧光蛋白标记)。

[0045] 根据本发明的第六方面,本发明提供了一种制备前述的单克隆抗体或前述单链抗体的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:将前述的重组细胞在适于蛋白表达和分泌的条件下进行培养,以便获得所述单克隆抗体或单链抗体。由此,利用该方法制备的单克隆抗体具有免疫反应性好、亲和力高,交叉反应低,有效避免了IgG的非特异性反应,并且相对于IgG,该单克隆抗体的相对于分子量更小,更容易进入到细胞内,可以提高免疫组化中检测效果,并且,易于通过血管壁和实体瘤,可以有利于作用药物进行治疗。

[0046] 根据本发明的一些实施例,该方法还包括对该单克隆抗体进行纯化处理,该纯化处理可以通过TK1-31氨基酸偶联多肽抗原的琼脂糖凝胶柱亲和层析进行。由此,该纯化处理得到的单克隆抗体纯度和活性高。

[0047] 根据本发明的第七方面,本发明提供了一种免疫偶联物。根据本发明的实施例,该免疫偶联物包括:前述的单克隆抗体,或者前述的单链抗体;以及选自下组的偶联部分:药物、毒素、细胞因子、放射性核素或酶。根据本发明实施例的免疫偶联物,通过偶联单克隆抗体,能有效提高偶联部分的药物效果,对细胞异常疾病,例如组织增生和肿瘤等的疗效更佳。

[0048] 根据本发明的第八方面,本发明提供了一种检测条或检测试剂盒。根据本发明的实施例,该检测条和检测试剂盒含有前述的单克隆抗体、前述的单链抗体、前述的免疫偶联物、或它们与可检测标记物的结合物。由此,该检测条或检测试剂盒能用于检测TK1,进而判断细胞的异常增殖情况。并且该检测条或检测试剂盒的检测灵敏度高、特异性好。

[0049] 根据本发明的一个优选实施例中,该可检测标记物选自:胶体金标记、荧光标记、同位素标记、酶标记,优选该酶标记为HRP酶标。

[0050] 根据本发明的第八方面,本发明提供了前述的单克隆抗体、前述的单链抗体、前述的免疫偶联物和前述的检测条或检测试剂盒在检测细胞异常增殖的用途。由此,利用前述的单克隆抗体、前述的免疫偶联物和前述的检测条或检测试剂盒通过检测TK1,进而判断细胞的异常增殖情况,检测灵敏度高、特异性好。

[0051] 其中,细胞异常增殖的情况有多种,针对本发明实施例的抗TK1单克隆抗体,该细胞异常增殖可以包括怀孕、组织增生和肿瘤,检测的灵敏度和准确率高。

[0052] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0053] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

- [0054] 图1显示了根据本发明一个实施例的单链抗体的PCR鉴定结果示意图；
 [0055] 图2显示了根据本发明一个实施例的双酶切琼脂糖电泳结果示意图；
 [0056] 图3显示了根据本发明一个实施例的单链抗体基因真核表达载体转染CHO细胞的荧光显微观察图片示意图。

具体实施方式

[0057] 下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

[0058] 下面参考具体实施例，对本发明进行说明，需要说明的是，这些实施例仅仅是说明性的，而不能理解为对本发明的限制。

[0059] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考J. 萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品，例如可以采购自Sigma公司。

[0060] 实施例1

[0061] 本发明实施例的本发明实施例的抗TK1单克隆抗体的表达方法如下：

[0062] 1、哺乳动物细胞表达系统的构建：

[0063] 1.1引物设计

[0064] 根据真核表达需要的调控元件和具有原核活性的单链抗体基因序列，设计从单链抗体基因文库中扩增鸡IgY抗体可变区基因的上下游引物序列：

[0065] TK1scfvmLVFP5' :GAAGATCTGCCACCATGGGCAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCCTTGTCAAAACAGTGCCTGACTCAGCCGTCCTC-3' (SEQ IDNO:11)

[0066] TK1HVscfvmRP5' :CGGGATCCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAAGAGGAGACGATGACTTCGG-3' (SEQ ID NO:12)

[0067] 1.2基因克隆

[0068] 以噬菌体展示系统筛选出具有对人源分子TK1的C端31肽活性的单链抗体基因为模板，应用设计的一对引物，按照下列程序扩增适宜真核表达载体构建的序列。

[0069] 扩增体系:PCR反应体系:10*PCR buffer

	5ul
dNTP (2.5uM)	4ul
TK1SCFVHVFP 引物 (20uM)	2ul
[0070] TK1SCFVLVRP 引物 (20uM)	2ul
scAB-pMoPac-hck-SBP 质粒模板	0.5ul
dd H2O	36.25ul
Taq 酶	0.25ul

[0071] 扩增参数：

	温度/	时间	备注
	94℃	2min	
	94℃	45min	30cycle
[0072]	65℃	45min	
	72℃	1min	
	72℃	5min	
	4℃	∞	

[0073] 扩增的序列包含构建需要的酶切位点,真核表达需要的kozak序列GCCACCATGG,动物细胞分泌表达需要的N端信号肽MGRMQLLSICIALSLALVTNS序列、连接重轻链可变区的linker序列GGGSGGGSGGGSGGGG、用于检测和纯化的标签序列(人流感病毒血凝素9肽,YPYDVPDYA序列)。

[0074] 将PCR扩增的产物琼脂糖电泳鉴定,并回收目的片段。

[0075] 1.3表达载体和目的基因的连接

[0076] 将电泳纯化回收的片段,和表达载体pIRSE2-EGFP分别用Bgl II 和Sac II 进行双酶切,酶切后电泳回收单链抗体片段和载体线性化片段,以除去切除的两端的小片段和酶蛋白分子,将两种回收的片段以等摩尔比例混合用T4连接酶连接,得到连接目的基因的表达载体。

[0077] 1.3.1、Bgl II 酶切

[0078] Pires2-EGFP质粒2ug/scfv基因PCR扩增产物1ug,10*NEB Buffer 5ul,Bgl II 酶1ul灭菌去离子水至50ul,37℃酶切过夜(14h),产物用乙醇/醋酸钠沉淀法纯化回收。

[0079] 1.3.2 Sac II 酶切

[0080] Bgl II 酶切回收产物,10*cutsmart Buffer 5ul,Sac II 酶1ul,灭菌去离子水至50ul,37℃1h,产物电泳Qiagen胶回收试剂盒纯化回收。

[0081] 1.3.3酶链接与转化

[0082] 取Pires2-EGFP双酶切的产物与scAB-pMoPac PCR扩增产物的双酶切产物(载体:插入片段的摩尔比约为1:3)其中,载体约200ng,2*酶链接buffer 10ul,T4连接酶1ul,水至20ul,16℃链接过夜,产物用乙醇/醋酸钠沉淀法纯化回收(20ul)。取1ul回收产物加入40ulDH5α感受态细胞冰上静置2min,加入预冷的1mm电转杯中,1.8KV,5mm电转,立即加入1mlSOC培养基,取出200r/min,振荡培养1h,取出加到含50ug/ml kana抗性的SOB平板,37℃过夜培养。

[0083] 1.4表达载体的鉴定

[0084] 将连接产物直接热冲击转化或电转化DH5α感受态细胞(Solarbio,C1100),转化后将所有转化的细菌铺到含有卡那霉素的琼脂平板上,37℃倒置培养16~20小时(h),从平板上生长的细菌菌落中,于37℃过夜后,挑取5-10个菌落,置于5毫升(mL)含卡那霉素的LB培养基中培养16h,提取质粒。将质粒纯化后用Bgl II 和Sac II 进行双酶切,能够切得800bp片段的克隆(如图1所示),进行序列测定,再次进行目的基因的确定。将测定的序列用DNAMANV6进行序列分析,测定的序列与设计的优化序列完全相同。将转化子进行单链抗体基因PCR扩增阳性的转化子菌落进行扩增培养,提取质粒DNA,然后用Bgl II 和Sac II 进行双酶切鉴定,结果如图2所示,结果显示可以产生于单链抗体基因大小一致的DNA片段。将鉴定大小正确

的质粒DNA送金斯瑞生物技术公司进行序列测定,测定的序列与设计的优化序列完全相同。

2、哺乳动物细胞CHO的转染

[0085] 中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese Hamster Ovary, CHO), 1957年美国科罗拉多大Dr. Theodore T. Puck从一成年雌性仓鼠卵巢分离获得, 为上皮贴壁型细胞, 是生物工程上广泛使用的细胞系。该细胞具有不死性, 可以传代百代以上。另外CHO细胞在基因工程使用中还有一个优点, 该细胞属于成纤维细胞 (Fibroblast), 是一种非分泌型细胞, 它本身很少分泌CHO内源蛋白, 因此对目标蛋白分离纯化工作十分有利。并且CHO细胞可形成有活性的二聚体, 具有糖基化的功能, 为表达复杂生物大分子的理想宿主, 获得的抗体蛋白具有与人自然产生的蛋白完全相似的生物学特性。本实施例中, 以CHO细胞作为表达载体的宿主细胞。

[0086] 2.1细胞准备

[0087] 选择24孔细胞培养板在每一孔中, 在转染前24小时传代CHO细胞, 转染日细胞达到70%~90%的丰盈度, 其中, 丰盈度为70%~90%时, 悬浮细胞转染时应处于对数生长期。

[0088] 2.2载体DNA准备

[0089] 在100 μ L/孔无血清DMEM或其他无血清生长培养基中稀释1 μ g“步骤1”构建好的载体DNA后, 按照每1 μ gDNA:2 μ L的转染剂TurboFect, 按该比例进行混合, 转染效率高。漩涡震荡充分混合均匀, 添加到稀释后的载体DNA中2 μ L/孔。

[0090] 2.3转染细胞

[0091] 将混合后的载体DNA和转染剂TurboFect室温下孵育15~20分钟, 取100 μ L转染试剂/DNA的混合液加入培养基进行孵育。孵育过程中, 不要移除培养基, 轻轻地摇动板, 以达到复合物的均匀分布。在37 $^{\circ}$ C的二氧化碳孵化器中孵育, 从而得到转染细胞。

[0092] 2.4表达检测

[0093] 2.4.1荧光显微检测

[0094] 转染后48h后, 通过观察细胞荧光蛋白表达, 结果如图3所示, 呈现绿色荧光的细胞约占细胞总数的75%以上, 因绿色荧光的选择性标志蛋白, 与单链抗体基因在同一个表达调控原件调控序列内, 表面各种调控原件工作正常。

[0095] 2.4.2间接ELISA检测

[0096] 重组IgY的单链抗体不仅含有与TK1结合的超变区, 也含有高度保守的骨架区 (FR), 在本实施例中还添加了人流感血凝素的HA的9肽标签。因此, 在间接ELISA检测重组的单链抗体时, 分别应用生物素标记的抗全长IgY二抗和辣根过氧化物酶标记的抗人流感血凝素的HA的9肽的单克隆抗体为标记抗体, 检测在CHO细胞中表达的重组抗TK1单链抗体。收集转染细胞的上清, 通过ELISA实验, 检测重组单链抗体的表达水平, 具体方法如下:

[0097] (1) 将重组TK1蛋白以1x包被液稀释成0.5 μ g/ml浓度, 每孔100 μ L, 4 $^{\circ}$ C过夜包被。

[0098] (2) 洗板机400 μ L/孔洗涤ELISA板1次。加入封闭液200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C封闭1小时。

[0099] (3) 洗板机400 μ L/孔洗涤ELISA板1次, 分别加入100 μ L/孔转染细胞上清、正常CHO细胞空白上清和稀释的IgY阳性对照, 37 $^{\circ}$ C反应1小时。

[0100] (4) 洗板机400 μ L/孔洗涤ELISA板3次, 分别加入1:20000稀释的HRP标记羊抗鼠IgG二抗和生物素标记的抗全长IgY二抗及辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素), 100 μ L/孔。

[0101] (5) 37 $^{\circ}$ C反应1小时。洗板机400 μ L/孔洗涤ELISA板3次, 加入单组份TMB显色液VII 100 μ L/孔。37 $^{\circ}$ C 10-15分钟。

[0102] (6) 加终止液50 μ l/孔终止反应。ELISA板放入酶标仪中,以620nm为参考波长,450nm波长测定吸光度。

[0103] 据酶标仪读数判定每孔对应的转染细胞上清抗体与对照空白CHO上清及纯化IgY阳性对照的比较,包被TK1抗原与空白抗原对照比较,结果如下表所示:

[0104]

包被抗原	抗全长 IgY 生物素标记驴 IgG 抗体			HRP 标记抗 HA 鼠单抗	
	转染 CHO 上清	CHO 上清	IgY	转染 CHO 上清	CHO 上清
TK1,50ng/well	1.623	0.245	2.985	0.867	0.334
包被液	0.235	0.221	0.243	0.302	0.362

[0105] 结果显示:用抗全长IgY生物素标记驴IgG抗体为标记抗体,转染单链抗体基因的CHO细胞上清的OD值是没有转染的CHO细胞上清的OD的6.6倍,重组TK1抗原与阴性抗原对照的比值为6.9;用抗人流感血凝素的HA的9肽的单克隆抗体为标记抗体检测的重组单链抗体的检测结果显示,转染单链抗体基因的CHO细胞上清的OD值是没有转染的CHO细胞上清的OD的2.6倍,重组TK1抗原与阴性抗原对照的比值为0.287。因此,应用两种标签检测都证明,转染单链抗体基因在CHO细胞中呈现明显的表达。

[0106] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0107] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

SEQUENCE LISTING

<110> 华瑞同康生物技术(深圳)有限公司

<120> 哺乳动物细胞重组抗人TK1的鸡源的单克隆抗体、单链抗体及其制备方法和应用

<130> PIDC4180129

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 151

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 轻链可变区序列

<400> 1

```

Met Lys Ser Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1           5           10           15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly
           20           25           30
Leu Gln Thr Pro Gly Gly Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly
           35           40           45
Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala Met Gly Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly
           50           55           60
Lys Gly Leu Glu Phe Val Ala Arg Ile Asn Ser Ala Gly Ser Tyr Thr
65           70           75           80
Asp Tyr Gly Ser Ala Val Asp Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn
           85           90           95
Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp
           100          105          110
Thr Ser Thr Tyr Phe Cys Ala Lys Ser Pro Gly Gly Phe Ser Cys Ala
           115          120          125
Tyr Gly Leu Cys Trp Asp Ala Ala Gly Ser Ile Asp Ala Trp Gly His
           130          135          140
Gly Thr Glu Val Ile Val Ser
145           150

```

<210> 2

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 重链可变区序列

<400> 2

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val
 1 5 10 15
 Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ala Asn Tyr Tyr Gly Trp Phe Gln Gln
 20 25 30
 Lys Thr Pro Gly Ser Ala Pro Val Ser Leu Ile Tyr Glu Ser Thr Lys
 35 40 45
 Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser
 50 55 60
 Thr Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala Asp Asp Glu Ala Val
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Cys Gly Thr Tyr Asp Ser Ser Thr His Thr Thr Ile Phe Gly
 85 90 95
 Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly Ala Ser Gly Ala Glu Phe Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 连接肽

<400> 3

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 信号肽

<400> 4

Met Gly Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser
 165 170 175
 Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly
 180 185 190
 Gly Ala Asn Tyr Tyr Gly Trp Phe Gln Gln Lys Thr Pro Gly Ser Ala
 195 200 205
 Pro Val Ser Leu Ile Tyr Glu Ser Thr Lys Arg Pro Ser Asn Ile Pro
 210 215 220
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Gly Thr Leu Thr Ile
 225 230 235 240
 Thr Gly Val Arg Ala Asp Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Thr Tyr
 245 250 255
 Asp Ser Ser Thr His Thr Ser Ile Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Tyr
 260 265 270
 Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 275 280

<210> 7

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> KOZAK序列

<400> 7

gccacatgg 10

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 信号肽

<400> 8

atgcaactcc tgtcttgcac tgcaactaagt cttgcacttg tcacaaacag tatggccgca 60

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 标签

<400> 9

tacccatacg acgtcccaga ctacgct 27
 <210> 10
 <211> 858
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 核酸
 <400> 10
 agatctgcca ccatgggcag gatgcaactc ctgtcttga ttgcactaag tcttgcaact 60
 gtcacaaaaca gtatggccgc agtgacgttg gacgagtcgc ggggcggcct gaagacgccc 120
 ggaggagcgc tcagcctcgt ctgcaaggcc tccgggttea cttcagtta ctatagcctg 180
 gcctgggtgc gacaggcgc cggcaagggg ttggagtgc ttgctgatat tgacaatagt 240
 ggtagtagtt acacaacata cggggcggcg gtgaagggcc gtgccaccat ctgagggac 300
 aacgggcaga gcacagtgag gctgcagctg aacaacctca gggctgagga caccggcacc 360
 tactactgcg ccaaagatgc tcataactaat agttttattg gtgatgatat cgacgggtgg 420
 ggccacggga ccgaagtcac cgtctcctct ggtggaggat caggtggagg aggatccgga 480
 ggtggtgatt ctggaggtgg ttctgcgctg actcagccgt cctcgatgac agcgaacccg 540
 ggagaaaccg tcaagatcac ctgctccggg ggtggcagct actatggaag ttactattat 600
 ggctggtacc agcagaagtc tcctggcagt gccctgtca ctgtgatcca tagcaacgac 660
 aagagaccct cagacatccc ttcacgattc tccggttcca aatccggctc cgcagccaca 720
 ttaacatca ctgggttcca agccgaggac gagctgtct atttctgtgg tggctacgac 780
 agcaacagtg atagtgcaat atttggggcc gggacaacce tgtaccata cgacgtccca 840
 gactacgctt aaccgagg 858
 <210> 11
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 引物
 <400> 11
 gaagatctgc caccatgggc aggatgcaac tectgtcttg cattgcacta agtcttgcaac 60
 ttgtcacaana cagtgcgctg actcagccgt cctc 94
 <210> 12
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 引物
 <400> 12

cgggatcctt aagcgtagtc tgggacgtcg tatgggtaag aggagacgat gacttcgg 58

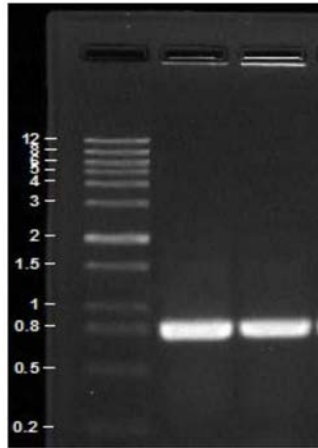


图1

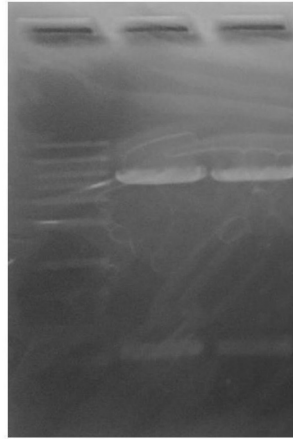


图2

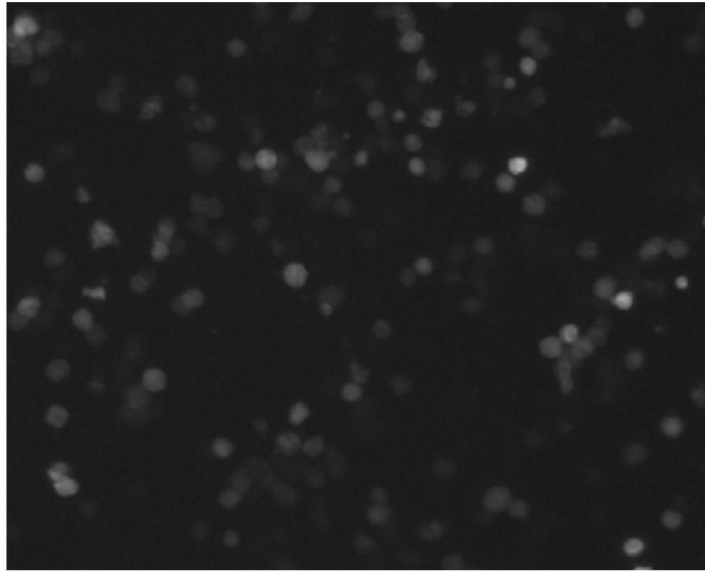


图3

专利名称(译)	哺乳动物细胞重组抗人TK1的鸡源的单克隆抗体、单链抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110872354A	公开(公告)日	2020-03-10
申请号	CN201811026810.9	申请日	2018-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	华瑞同康生物技术(深圳)有限公司		
申请(专利权)人(译)	华瑞同康生物技术(深圳)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	华瑞同康生物技术(深圳)有限公司		
[标]发明人	李作生 陈湖 李惠军 党利 梁丽雯 方聪 艾伦何 斯文斯库格 周际		
发明人	李作生 陈湖 李惠军 党利 梁丽雯 方聪 谭俊烨 艾伦·何 斯文·斯库格 周际		
IPC分类号	C07K16/40 C07K19/00 C12N15/13 C12N15/85 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/40 C07K2317/622 C07K2319/02 C07K2319/42 C12N15/85 G01N33/53 G01N33/574 G01N2800/7023 C07K16/02 C07K16/32 C07K19/00		
代理人(译)	赵天月		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了利用哺乳动物细胞重组抗人TK1的鸡源的单克隆抗体、单链抗体及其制备方法和应用，其中，所述单克隆抗体的轻链具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列，重链具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。该单克隆抗体亲和力高，避免了哺乳动物IgG的非特异性反应，相对于分子量更小，更容易进入到细胞内。

