



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105254759 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201510703012. 5

C12N 5/20(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 10. 26

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 11081 2015. 07. 03

(71) 申请人 无锡傲锐东源生物科技有限公司

地址 214092 江苏省无锡市滨湖区马山梅梁路 168 号

(72) 发明人 何为无 马东晖 袁克湖 王宜

褚伯阳 王广力 舒又敏

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 赵青朵

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表7页 附图3页

(54) 发明名称

抗 CD56 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞及其产生的抗 CD56 单克隆抗体和应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,公开了一种杂交瘤细胞株(保藏编号为CGMCC No. 11081),以及由此杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体 Umab83。本发明还涉及单克隆抗体 Umab83 在制备用于检测 CD56 蛋白的免疫检测工具中的应用,含单克隆抗体 Umab83 的免疫组化试剂盒,以及单克隆抗体 Umab83 在制备用于标记肿瘤的试剂盒中的应用。本发明所述单克隆抗体可与 CD56 蛋白特异性结合,而与细胞内其他蛋白无交叉反应,显著提高了 CD56 蛋白免疫检测的特异性、准确性和可靠性。

1. 一种单克隆抗体,其特征在於,其与 CD56 蛋白特异性结合。
2. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体,其特征在於,由保藏编号为 CGMCC No. 11081 的杂交瘤细胞株产生。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体在制备用于检测 CD56 蛋白的免疫检测工具中的应用。
4. 根据权利要求 3 所述的应用,其特征在於,所述免疫检测工具为试剂、试剂盒、芯片或试纸。
5. 一种免疫组化检测试剂盒,其特征在於,包括权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体。
6. 如权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体在制备用于标记组织细胞的试剂或试剂盒中的应用。
7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在於,所述组织细胞为自然杀伤细胞、NK 样 T 细胞、神经、神经内分泌组织或相关肿瘤。
8. 一种标记组织细胞的试剂盒,其特征在於,包括权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体。
9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在於,所述组织细胞为自然杀伤细胞、NK 样 T 细胞、神经、神经内分泌组织或相关肿瘤。
10. 一种杂交瘤细胞株,其特征在於,其保藏编号为 CGMCC No. 11081。

抗 CD56 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞及其产生的抗 CD56 单克隆抗体和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种抗 CD56 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞及其产生的抗 CD56 单克隆抗体和应用。

背景技术

[0002] CD56 又称为神经细胞粘附分子(N-CAM),属于 I 型跨膜糖蛋白。广泛存在于大部分的神经外胚层来源的细胞、组织和肿瘤中,包括视网膜母细胞瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤、小细胞癌,也表达于一些中胚层衍生的肿瘤、自然杀伤细胞和 NK 淋巴瘤。

[0003] CD56 的表达量可反映肿瘤细胞的迁移能力,目前临床上通常通过免疫组织化学(IHC)病理实验检测肿瘤细胞中 CD56 蛋白的表达状况。IHC 实验的核心为特异性结合 CD56 蛋白的单克隆抗体,其性能的优劣决定着整个检测的灵敏度和特异性。因此,研制出一种结合特异性较高的针对 CD56 蛋白的单克隆抗体具有重要的意义。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供一种抗 CD56 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞及其产生的抗 CD56 单克隆抗体和应用。本发明所述单克隆抗体可与 CD56 蛋白特异性结合,而与细胞内其他蛋白无交叉反应,显著提高了 CD56 蛋白免疫检测的特异性、准确性和可靠性,真实反映肿瘤细胞内 CD56 蛋白表达水平,可应用于视网膜母细胞瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤、小细胞癌、NK 淋巴瘤和自然杀伤细胞的辅助诊断与分型。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种单克隆抗体,其与 CD56 蛋白特异性结合。

[0007] 在本发明的一些具体实施方案中,单克隆抗体由保藏编号为 CGMCC No. 11081 的杂交瘤细胞株产生。

[0008] 本发明还提供了所述单克隆抗体在制备用于检测 CD56 蛋白的免疫检测工具中的应用。

[0009] 在本发明的一些具体实施方案中,所述免疫检测工具为试剂、试剂盒、芯片或试纸。

[0010] 本发明还提供了一种免疫组化检测试剂盒,包括所述单克隆抗体。

[0011] 本发明还提供了所述单克隆抗体在制备用于标记组织细胞的试剂或试剂盒中的应用。

[0012] 在本发明的一些具体实施方案中,所述免疫组化检测试剂盒中所述组织细胞为自然杀伤(NK)细胞、NK 样 T 细胞、神经、神经内分泌组织或相关肿瘤。所述相关肿瘤为与上述细胞、组织类型相同的肿瘤。

[0013] 本发明还提供了一种标记组织细胞的试剂盒,包括所述单克隆抗体。

[0014] 在本发明的一些具体实施方案中,所述标记组织细胞的试剂盒中所述组织细胞为

自然杀伤 (NK) 细胞、NK 样 T 细胞、神经、神经内分泌组织或相关肿瘤。所述相关肿瘤为与上述细胞、组织类型相同的肿瘤。

[0015] 本发明还提供了一种杂交瘤细胞株,其保藏编号为 CGMCC No. 11081。

[0016] 与现有技术相比,本发明提供了一种杂交瘤细胞株(保藏编号为 CGMCC No. 11081),以及由此杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体 Umab83。本发明还提供了单克隆抗体 Umab83 在制备用于检测 CD56 蛋白的免疫检测工具中的应用,含单克隆抗体 Umab83 的免疫组化试剂盒,以及单克隆抗体 Umab83 在制备用于标记肿瘤的试剂盒中的应用。本发明所述单克隆抗体可与 CD56 蛋白特异性结合,而与细胞内其他蛋白无交叉反应,显著提高了 CD56 蛋白免疫检测的特异性、准确性和可靠性,真实反映肿瘤细胞内 CD56 蛋白表达水平,可应用于视网膜母细胞瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤、小细胞癌、NK 淋巴瘤和自然杀伤细胞的辅助诊断与分型。

[0017] 生物保藏说明

[0018] 用于保藏的杂交瘤细胞株 UMAB83 的分类命名为:神经细胞黏附分子 1 (CD56) 单克隆抗体杂交瘤细胞株;

[0019] 保藏单位全称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;

[0020] 保藏单位简称:CGMCC;

[0021] 保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所;

[0022] 保藏日期:2015 年 07 月 03 日;

[0023] 保藏编号:CGMCC No. 11081。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0025] 图 1 示实施例 1 克隆位点设计如图,其中底纹部分为 ORF 区;

[0026] 图 2 示实施例 2 重组 CD56 蛋白 Western blot 检测结果图,以 anti-DDK 检测重组 CD56 蛋白在 HEK293T 细胞中的表达,其中左侧泳道为转染空载体的 HEK293T 细胞裂解液为抗原的检测结果、右侧泳道为转染 pCMV6-rCD56 质粒的 HEK293T 细胞裂解液抗原的检测结果;

[0027] 图 3 示实施例 2 重组 CD56 蛋白 SDS-PAGE 结果图,用抗 DDK 亲和层析柱纯化重组 CD56 蛋白,纯化后的蛋白通过 SDS-PAGE 胶电泳、考马斯亮蓝染色;

[0028] 图 4 示实施例 3 以单克隆抗体 Umab83 识别完整的 CD56(Full length CD56, CD56-FL) 蛋白的 Western blot 检测结果图。泳道 1 为转染 pCMV6-Entry 的细胞裂解液;泳道 2 为转染 pCMV6-CD56-FL 的细胞裂解液;

[0029] 图 5 示实施例 4 福尔马林固定、石蜡包埋的成年人大脑组织免疫组化结果图(一抗为 CD56 单克隆抗体 Umab83);

[0030] 图 6 示实施例 4 福尔马林固定、石蜡包埋的人胚胎小脑组织免疫组化结果图(一抗为 CD56 单克隆抗体 Umab83);

[0031] 图 7 示实施例 5 OriGene 蛋白芯片鉴定结果图(一抗为 CD56 单抗 Umab83, 1:100; 二抗为 DyLight649-conjugated AffiniPure Fragment Goat-anti-Mouse IgG, 1:400)。

具体实施方式

[0032] 本发明公开了一种抗 CD56 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞及其产生的抗 CD56 单克隆抗体和应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0033] 本发明提供了一种杂交瘤细胞株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称为 CGMCC),保藏日期为 2015 年 07 月 03 日,保藏编号为 CGMCC No. 11081。

[0034] 本发明还提供了一种特异性结合 CD56 蛋白的单克隆抗体 Umab83,由上述杂交瘤细胞株产生。

[0035] 本发明所述单克隆抗体的制备方法如下:

[0036] (1) 重组表达载体的构建:根据 CD56ORF 核苷酸序列(CD56ORF 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示,2574bp;CD56 氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示)

[0037] 设计引物 PCR 扩增 CD56ORF 第 58bp 位到第 2154bp 位序列,基因两侧分别引入限制性内切酶位点 SgfI 和 MluI,插入表达载体 pCMV6-Entry,构建 CD56 氨基酸序列第 20 位到第 718 位的重组表达质粒 pCMV6-rCD56;上游扩增引物序列,SEQ ID NO. 3:CACGCGATCGCATGCTGCAGGTGGATATTGTTC 下游扩增引物序列 SEQ ID NO. 4:ACCGACGCGTCACCAGGAGCAGGACGAA GAT

[0038] (2) CD56 重组蛋白的表达与纯化:将 CD56 重组表达质粒转化 HEK293T 细胞,裂解离心获得上清,DDK 亲和层析柱纯化,获得纯化的 CD56 重组蛋白;

[0039] (3) 单克隆抗体的筛选与制备:采用上述纯化的 CD56 重组蛋白免疫 Balb/c 小鼠,取小鼠脾脏细胞与 SP2/0 细胞进行融合,有限稀释法获得单克隆,ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞,获得能分泌抗 CD56 特异性抗体的杂交瘤细胞株,命名为 Umab83,亚型鉴定为 IgG1;通过无血清培养基制备抗体,通过亲和层析柱纯化获得 CD56 单克隆抗体 Umab83。分别通过 Western Blot、免疫组化实验验证该单克隆抗体的灵敏度和特异性。

[0040] 进一步采用 OriGene 高密度蛋白芯片对上述单克隆抗体的特异性进行验证:OriGene 高密度蛋白芯片上包含 10,000 个 HEK293T 细胞蛋白过表达裂解物,每种蛋白裂解液在芯片上具有两个拷贝的重复。蛋白裂解液被印迹在硝酸纤维素膜上。每一种蛋白裂解液的定位可以通过 Excel 文件进行准确定位。蛋白芯片上蛋白分为 40 个亚矩阵,每个亚矩阵上有一些参照,通过参照,可以定量每个芯片点上蛋白的含量,监控每次免疫反应数据的重复性,以及定位阳性信号的方向。

[0041] 本发明将所述单克隆抗体 Umab83 与上述芯片杂交并确定阳性信号位点,结果显示本发明所述单克隆抗体 Umab83 特异性结合 CD56 蛋白,而与其他蛋白无交叉反应。

[0042] 本发明还提供了单克隆抗体 Umab83 在制备用于检测 CD56 蛋白的免疫检测工具中的应用。

[0043] 具体地,所述免疫检测工具为试剂盒、芯片或试纸。

[0044] 在具体的实施例中,本发明提供了一种免疫组化检测试剂盒,包括上述单克隆抗

体 Umab83, 可检测组织细胞中 CD56 的表达状况。

[0045] 本发明还提供了上述单克隆抗体在制备用于标记肿瘤的试剂盒中的应用。其中所述肿瘤具体是指肿瘤细胞的增殖与 CD56 的表达密切相关的肿瘤, 包括但不限于视网膜母细胞瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤、小细胞癌、NK 淋巴瘤和自然杀伤细胞。

[0046] 与现有技术相比, 本发明提供了一种杂交瘤细胞株 (保藏编号为 CGMCC No. 11081), 以及由此杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体 Umab83。本发明还提供了单克隆抗体 Umab83 在制备用于检测 CD56 蛋白的免疫检测工具中的应用, 含单克隆抗体 Umab83 的免疫组化试剂盒, 以及单克隆抗体 Umab83 在制备用于标记肿瘤的试剂盒中的应用。本发明所述单克隆抗体可与 CD56 蛋白特异性结合, 而与细胞内其他蛋白无交叉反应, 显著提高了 CD56 蛋白免疫检测的特异性、准确性和可靠性, 真实反映肿瘤细胞内 CD56 蛋白表达水平, 可应用于视网膜母细胞瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤、小细胞癌、NK 淋巴瘤和自然杀伤细胞的辅助诊断与分型。

[0047] 本发明提供了单克隆抗体及其用途、产生所述单克隆抗体的杂交瘤细胞株、含有该单克隆抗体的诊断工具中所用原料及试剂均可由市场购得。

[0048] 下面结合实施例, 进一步阐述本发明:

[0049] 实施例 1、CD56 重组表达质粒的构建

[0050] 以从美国傲锐东源生物科技有限公司获得的质粒 RC207890 (含 CD56ORF 2574bp) 为模板, 设计两条引物并分别引入酶切位点 SgfI 和 MluI, 克隆入表达载体 pCMV6-Entry, 建立 CD56 重组表达质粒。克隆位点设计如图 1 所示。

[0051] 实施例 2、CD56 重组蛋白的表达与纯化

[0052] 1、转染 HEK293T 细胞: HEK293T 细胞以 1:3 传至培养皿中继续培养; 取 7.5mL DMEM (无血清及抗生素) 至 50mL 管中, 加入 300 μ L PEI MegaTran1.0 混匀; 加入 75 μ g CD56 重组表达质粒 DNA 至混匀液中, 混匀并静置 30 分钟; 分别取 515 μ L 至各培养皿中于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养。转染 24 小时后, 每皿细胞添加 25 μ L 2M 丁酸钠至终浓度 5mM。

[0053] 2、裂解细胞: 转染 48 小时后, 进行细胞裂解。吸去培养基, 加入 1mL PBS 进行漂洗, 吸去 PBS。加入 1mL 裂解缓冲液, 使用前加入蛋白酶抑制剂 PI 和 PMSF。置于冰盒中在摇床上振荡, 收集所有培养皿中得裂解液, 4 $^{\circ}$ C 离心, 收集上清。取少量上清采用 WB 鉴定重组 CD56 的表达, 结果图 2。

[0054] 3、DDK 亲和层析柱纯化: 以 0.45 μ M, 33mm PVDF 膜滤器过滤离心后的裂解液上清并转入 15mL 管, 加入混合好的 Beads 1mL, 封口后放入 360 度混匀器中, 于 4 $^{\circ}$ C 结合 2 小时; 取出 15mL 管, 将裂解液倒入 BIO-RAD 层析柱中, 并接住穿透液, 滴尽后穿透液取样 WB 检测; 以裂解缓冲液冲洗柱料 1-2 次, 滴尽后再用 TBST 冲洗 Beads 3 次, 滴尽后用 0.1M Glycine pH3.5 洗脱, 第一次 200 μ L, 滴尽不收集, 第二、三次各 500 μ L, 第三次 250 μ L, 收集至一个 1.5mL 离心管中, 并迅速加入 NaH₂PO₄ (pH = 11.0) 中和至 pH7.0 左右, 每管加入甘油至终浓度为 10%, Tween-80 至终浓度为 0.1%。纯化后的重组 CD56 蛋白用 SDS-PAGE 鉴定, 见图 3。

[0055] 由图 2 结果可见, 转染 pCMV6-rCD56 质粒的 HEK293T 细胞裂解液中 WB 检测后在 100kD 处有明显的特异条带, 与多肽的理论分子量 80kD 基本相符。表明细胞中重组 CD56 蛋白特异表达。

[0056] 由图 3 结果可见,纯化的蛋白在 PAGE 胶 100kD 处有明显的特异条带,与多肽的理论分子量 80kD 基本相符。表明已获得了纯度较好的 CD56 重组蛋白。

[0057] 实施例 3、CD56 单克隆抗体的制备与筛选

[0058] 根据标准方法用重组产生的纯化的 CD56 蛋白片段用于对 Balb/c 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)进行免疫。具体方法如下:

[0059] 1、动物免疫:经过纯化的 CD56 抗原以完全弗氏佐剂乳化,采用皮下或腹腔注射方法免疫 6-8 周龄 Balb/c 小鼠,免疫剂量为 50 μ g/只,间隔两周后进行第二次免疫,以不完全弗氏佐剂乳化,免疫剂量为 50 μ g/只。免疫两次后取尾血以 ELISA 法梯度稀释测定血清效价;根据结果确定是否加强免疫,选取抗体效价最高的小鼠进行细胞融合。

[0060] 2、细胞融合:骨髓瘤细胞采用 Balb/c 来源的 sp2/0,融合时处于对数生长期;取已免疫小鼠脾脏,制成淋巴细胞单细胞悬液;小鼠脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞以 1:5-1:10 混合,滴加 37 $^{\circ}$ C 的 50% PEG(PH 8.0) 1mL,加入不完全培养基及其余终止液,离心弃上清后加入 HAT 培养基悬浮混匀,MC 定容到 50mL,分装到 3.5cm 培养皿中,放于湿盒中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温培养箱中进行培养。

[0061] 3、筛选和克隆:融合 7-10 天内挑选细胞克隆,使用 CD56 纯化重组蛋白进行 ELISA 测试。标记细胞株号。对阳性孔细胞进行有限稀释,每次有限稀释后 5-6 天测定 ELISA 值,挑取 OD280 阳性值较高的单克隆孔进行有限稀释,直至 ELISA 测定 96 孔板全板结果为阳性。挑取阳性值高的单克隆定株。其对应融合板细胞株为 Umab83。

[0062] 4、腹水单抗的制备与纯化:10-12 周龄的雄性 Balb/c 小鼠腹腔注射 0.5ml 降植烷,一周后每只小鼠用 1mL 注射器腹腔注射经 PBS 洗涤重悬的单克隆细胞悬液,细胞用量为 5 \times 10⁶/只,每株抗体打 2 只小鼠。待小鼠腹水积聚后收集腹水,离心取上清,亲和层析法进行腹水纯化,根据抗体亚型选择相应柱料,细胞株 Umab83 产生的单抗为 IgG1,采用 protein G 进行纯化。纯化后的单抗浓度测定、WB 检测、分装、冻存在 -20 $^{\circ}$ C。其中 WB 检测结果见图 4。

[0063] 由图 4 结果可见,泳道 2 在分子量约 100kD 处有特异的条带,表明单克隆抗体 Umab83 能特异地 Western blot 检测完整的全长 CD56 蛋白。

[0064] 实施例 4、单克隆抗体 Umab83 为一抗的免疫组化检测

[0065] (1)、实验方法:

[0066] 1、取福尔马林固定的成人 大脑组织与人胚胎小脑组织块进行石蜡包埋,使用 Finesse 组织切片机进行切片,组织厚度为 6 μ m。

[0067] 2、脱蜡与水化:分析纯二甲苯 3 \times 10min,无水乙醇 3 \times 10min,95%乙醇 5min,85%乙醇 5min,75%乙醇 5min,去离子水浸泡 3min \times 3 次

[0068] 3、加入抗原修复液(0.01M, pH6.0 枸橼酸钠缓冲液)高压锅高压热修复 3min,待高压锅温度降至约 90 $^{\circ}$ C 时,打开高压锅,取出标本,然后自然冷却至室温。去离子水浸泡 3min \times 3 次。

[0069] 4、使用 3%过氧化氢灭活组织内源性过氧化物酶,室温静置 10min。去离子水浸泡 5min \times 3 次。

[0070] 5、加上封闭液(PBS+5%脱脂奶粉+5%正常山羊血清),37 $^{\circ}$ C 孵育 60min。

[0071] 6、去除封闭液,勿冲洗,加入 CD56 单抗(Umab83),稀释比:1:150,使用封闭液进

行稀释。置于湿盒中,37℃孵育 60min。PBST(0.1% Tween-20) 洗涤 2 次,每次洗涤 5min。PBST(0.02% Tween-20) 洗涤 1 次,每次洗涤 5min。

[0072] 7、滴加 Polink- 试剂盒 2(Catlog No. D37-15) 试剂 1,37℃孵育 10-20 分钟。使用 PBS 洗涤 3 次,每次 5min。滴加 Polink-2 试剂盒 (Catlog No. D37-15) 试剂 2,37℃孵育 10-20 分钟,使用 PBS 洗涤 3 次,每次 5min。

[0073] 8、应用 DAB 溶液 (中杉金桥 ZLI-9019) 显色,显色 3 ~ 10min。蒸馏水洗涤。

[0074] 9、苏木精复染细胞核 2min,蒸馏水漂洗,1% 盐酸分化。蒸馏水漂洗 3 次,室温静置 1min。

[0075] 10、脱水和透明:75%乙醇 5min,100%乙醇 5min x 3 次,85%乙醇 5min,95%乙醇 5min,100%乙醇 3×5min;二甲苯 3×5min,中性树胶封片。

[0076] 11、镜检,见图 5-6。

[0077] (2)、实验结果:

[0078] 由图 5-6 结果可见,在成人脑组织与胚胎小脑组织中可见到特异性膜染色。结果与 CD56 在细胞内的定位及组织表达特异性一致,表明单克隆抗体 Umab83 可用于免疫组织化学检测 CD56 蛋白的水平。

[0079] 实施例 5、单克隆抗体 Umab83 的特异性检测

[0080] OriGene 高密度蛋白芯片上包含 10,000 个 HEK293T 细胞蛋白过表达裂解物,每种蛋白裂解液在芯片上具有两个拷贝的重复。蛋白裂解液被印迹在硝酸纤维素膜上。每一种蛋白裂解液的定位可以通过 Excel 文件进行准确定位。蛋白芯片上蛋白分为 40 个亚矩阵,每个亚矩阵上有一些参照,通过参照,可以定量每个芯片点上蛋白的含量,监控每次免疫反应数据的重复性,以及定位阳性信号的方向。以下为使用 OriGene 蛋白 (OriGene Cat PA100001) 芯片进行 Umab83 抗体鉴定实验的实验方法:

[0081] 1、将一张蛋白芯片放在 50mL 离心管中,使用 40mL 去离子水浸润芯片,置于摇床上,室温混合 30 分钟。弃掉去离子水,使用 10mLPBST 平衡芯片。室温处理 10 分钟。

[0082] 2、向 50mL 离心管中加入 40mL5%脱脂牛奶(用 PBST 进行稀释)置于摇床上,室温封闭 30 分钟。

[0083] 3、使用封闭液(5%脱脂牛奶)稀释一抗 Umab83,稀释比列为 1:100。

[0084] 4、将洁净的封口膜粘贴到实验台上,滴加 250-300 μ L 一抗在封口膜上。

[0085] 5、将蛋白芯片从封闭液中抽出,将蛋白芯片 NC 膜的一面朝下,从芯片的一边接触抗体,慢慢滑下,依靠液体表面张力,抗体将慢慢浸润芯片 NC 膜,直至整张 NC 膜浸润在一抗溶液中。整个操作过程避免产生气泡。将芯片移到 4℃环境下,静置,一抗孵育过夜。在芯片上加盖培养皿盖,其上黏附一张湿纸中,以防止长时间孵育导致抗体蒸发。

[0086] 6、第二天将芯片移至 50mL 离心管中,使用 PBST 漂洗芯片两次,去除多余的抗体。使用 40mL PBST(0.1% Tween-20) 洗涤芯片,置于摇床上混合均匀,洗涤三次,每次洗涤 5min。

[0087] 7、使用封闭液(5%脱脂牛奶)稀释二抗 Dy Light 649-conjugated AffiniPure Fragment Goat-anti-Mouse IgG,稀释比例为 1:400。

[0088] 8、按照上述步骤 4,步骤 5 进行二抗孵育操作。室温孵育 1 小时。在芯片上方用铝箔纸遮盖,以防止发生信号漂白。

- [0089] 9、按照上述步骤 6,使用 PBST 洗涤芯片。
- [0090] 10、使用去离子水冲洗芯片,以去除残余的盐分和变性剂。
- [0091] 11、室温干燥芯片,确保芯片完全干燥。
- [0092] 12、使用芯片扫描仪读取荧光信号。
- [0093] 13、根据 BSA-Cy3 以及 BSA-Cy5 确定芯片方向以及阳性信号的位点。
- [0094] 14、根据阳性信号位点找出对应蛋白裂解液 ID,根据裂解液数据库信息,查找到对应蛋白名称,NCBI 录入号 (accession number),蛋白 ID,蛋白大小等信息。
- [0095] 结果如图 7 所示,单抗 Umab83 在 OriGene 蛋白芯片上能特异地识别 CD56 蛋白,表明单抗 Umab83 的特异性较好。
- [0096] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001]

SEQUENCE LISTING

- <110> 无锡傲锐东源生物科技有限公司
 <120> 抗CD56蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞及其产生的抗CD56单克隆抗体和应用
 <130> MP1507556
 <160> 4
 <170> Patent In version 3.3
 <210> 1
 <211> 2574
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 1

```

atgetgcaaa ctaaggatct catctggact ttgtttttcc tgggaactgc agtttctctg      60
caggtggata ttgttcccag ccagggggag atcagcgttg gagagtccaa attcttctta      120
tgccaagtgg caggagatgc caaagataaa gacatctcct ggttctcccc caatggagaa      180
aagetcaccc eaaaccagca gcggatetca gtggtgtgga atgatgatte ctctccacc      240
ctcaccatct ataacgcaa catcgaegac gccggcattt acaagtgtgt ggttacagge      300
gaggatggca gtgagtcaga ggccaccgtc aacgtgaaga ttttccagaa gctcatgttc      360
aagaatgctc caaccccaca ggagttccgg gagggggaag atgccgtgat tgtgtgtgat      420
gtggtcagct cctctcccacc aacctcctc tggaacacaca aaggccgaga tgtcctctg      480
aaaaaagatg tccgattcat agtctgttcc aacaactacc tgcagatccg gggcatcaag      540
aaaacagatg agggcactta tctctgtgag ggcagaatcc tggcacgggg ggagatcaac      600
ttcaaggaca ttcaggtcat tgtgaatgtg ccacctacca tccaggccag gcagaatatt      660
gtgaatgcc aegccaacct cggccagtcc gtcaccctgg tgtgcatgac cgaaggcttc      720
ccagagccca ccatgagctg gacaaaggat ggggaacaga tagagcaaga ggaagacgat      780
gagaagtaca tcttcagega cgatagttcc cagctgacca tcaaaaaggt ggataagaac      840
gacgaggetg agtacatctg cattgetgag aacaaggctg gcgagcagga tgcgaccatc      900
cacctcaaag tctttgcaaa acccaaaatc acatatgtag agaaccagac tgccatggaa      960
ttagaggagc aggtcactct tacctgtgaa gcctccggag accccattcc ctccateacc     1020

```

[0002]

tggaggactt ctacccggaa catcagcagc gaagaaaagg ctctgtggac tgcaccagag	1080
aagcaagaga ctctggatgg gcacatgggtg gtgcgtagcc atgcccgtgt gtcgtcgtg	1140
accctgaaga geatccagta cactgatgcc ggagagtaca tctgcaccgc cagcaacacc	1200
atcgccagg actcccagtc catgtaectt gaagtgcaat atgccccaaa gctacagggc	1260
cctgtggetg tftacacttg ggaggggaac caggtgaaca teacctgca ggtatttggc	1320
tatcccagtg ccacgatctc atggtttgg gatggccagc tgcctgccaag ctccaattac	1380
agcaatata agatctacaa caccccctct gccagctatc tggaggtgac cccagactct	1440
gagaatgatt ttgggaacta caactgtact gcagtgaacc geattgggca ggagtccttg	1500
gaattcatec ttgttcaage agacaccccc tcttcacat ccctgacca ggtggagcca	1560
tactccagca cagcccaggt gcagtttgat gaaccagagg ccacaggtgg ggtgccatc	1620
ctcaaataca aagctgagtg gagagcagtg ggtgaagaag tatggcattc caagtgtat	1680
gatgccaagg aagccagcat ggagggcacc gtcaccatcg tgggctgaa gcccgaaaca	1740
acgtacgccg taaggettgg ggctctcaat ggcaaagggc tgggtgagat cagcgggcc	1800
tccagttca agacgcagcc agtccaaggg gaaccagtg cacctaagct cgaagggcag	1860
atgggagagg atggaaactc tattaaagtg aacctgatca agcaggatga cggcgctcc	1920
cccacagac actatctggt caggtaccga gcctctctct ccgagtggaa accagagatc	1980
aggetcccgt ctggcagtga ccacgtcatg ctgaagtccc tggactggaa tgctgagtat	2040
gaggtctacg tgggtgctga gaaccagcaa ggaaaatcca aggcggetca ttttgtgttc	2100
aggacctcgg cccagcccac agccatccca gccaacggca gcccacete aggcctgagc	2160
accggggcca tegtgggcat cctcactgtc atcttctgctc tgcctctggt ggttgtggac	2220
atcacctgct acttctgaa caagtgtggt ctgttcatgt geattgeggt caacctgtgt	2280
ggaaaagccg ggcccggggc caagggcaag gacatggagg agggcaagge cgccttctcg	2340
aaagatgagt ccaaggagcc catcgtggag gttegaacgg aggaggagag gaccccaaac	2400
catgatggag ggaaacacac agageccaac gagaccacgc cactgacgga gcccgagaag	2460
ggccccgtag aagcaaagcc agagtgccag gagacagaaa cgaagccagc gccagccgaa	2520
gtcaagacgg tcccacatga cgcacacag acaaaggaga acgagaacaa agca	2574

<210> 2

<211> 858

<212> PRT

[0003]

<213> 人工序列

<400> 2

```

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

```

[0004]

Ile Tyr Asn Thr Pro Ser Ala Ser Tyr Leu Glu Val Thr Pro Asp Ser
 465 470 475 480
 Glu Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile Gly
 485 490 495
 Gln Glu Ser Leu Glu Phe Ile Leu Val Gln Ala Asp Thr Pro Ser Ser
 500 505 510
 Pro Ser Ile Asp Gln Val Glu Pro Tyr Ser Ser Thr Ala Gln Val Gln
 515 520 525
 Phe Asp Glu Pro Glu Ala Thr Gly Gly Val Pro Ile Leu Lys Tyr Lys
 530 535 540
 Ala Glu Trp Arg Ala Val Gly Glu Glu Val Trp His Ser Lys Trp Tyr
 545 550 555 560
 Asp Ala Lys Glu Ala Ser Met Glu Gly Ile Val Thr Ile Val Gly Leu
 565 570 575
 Lys Pro Glu Thr Thr Tyr Ala Val Arg Leu Ala Ala Leu Asn Gly Lys
 580 585 590
 Gly Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Ser Glu Phe Lys Thr Gln Pro Val
 595 600 605
 Gln Gly Glu Pro Ser Ala Pro Lys Leu Glu Gly Gln Met Gly Glu Asp
 610 615 620
 Gly Asn Ser Ile Lys Val Asn Leu Ile Lys Gln Asp Asp Gly Gly Ser
 625 630 635 640
 Pro Ile Arg His Tyr Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Ser Ser Glu Trp
 645 650 655
 Lys Pro Glu Ile Arg Leu Pro Ser Gly Ser Asp His Val Met Leu Lys
 660 665 670
 Ser Leu Asp Trp Asn Ala Glu Tyr Glu Val Tyr Val Val Ala Glu Asn
 675 680 685
 Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala Ala His Phe Val Phe Arg Thr Ser Ala
 690 695 700

[0006]

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

accgacgcgt caccaggagc aggacgaaga t

31

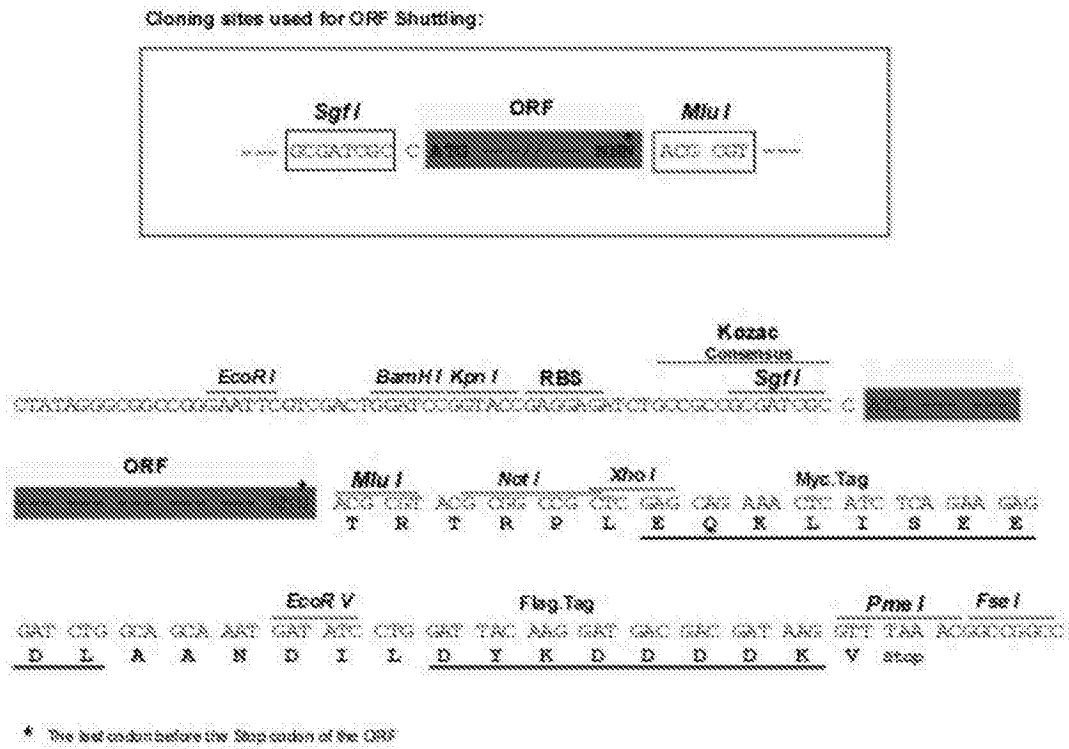


图 1

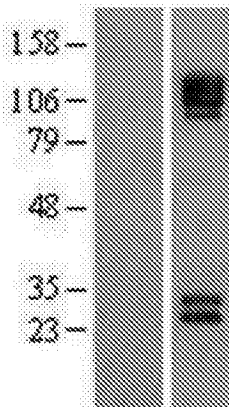


图 2

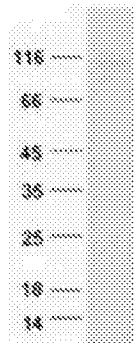


图 3

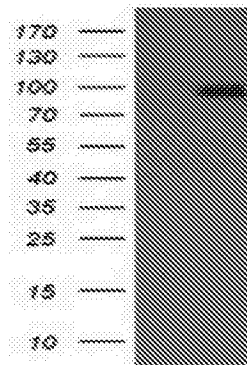


图 4

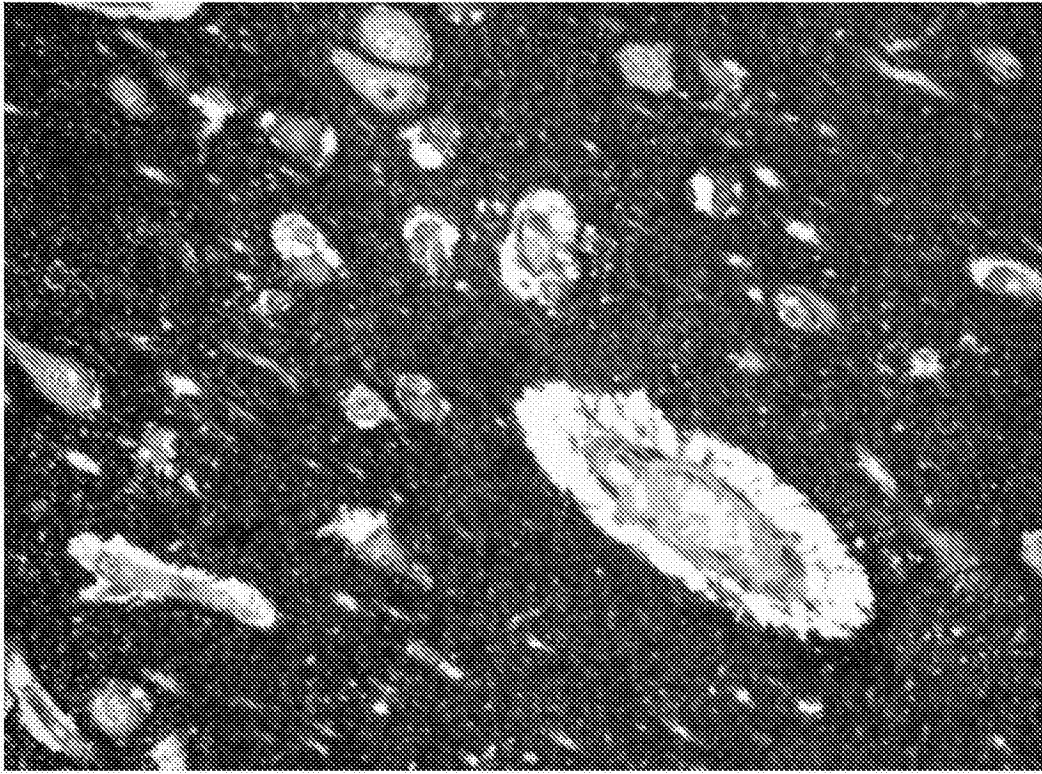


图 5

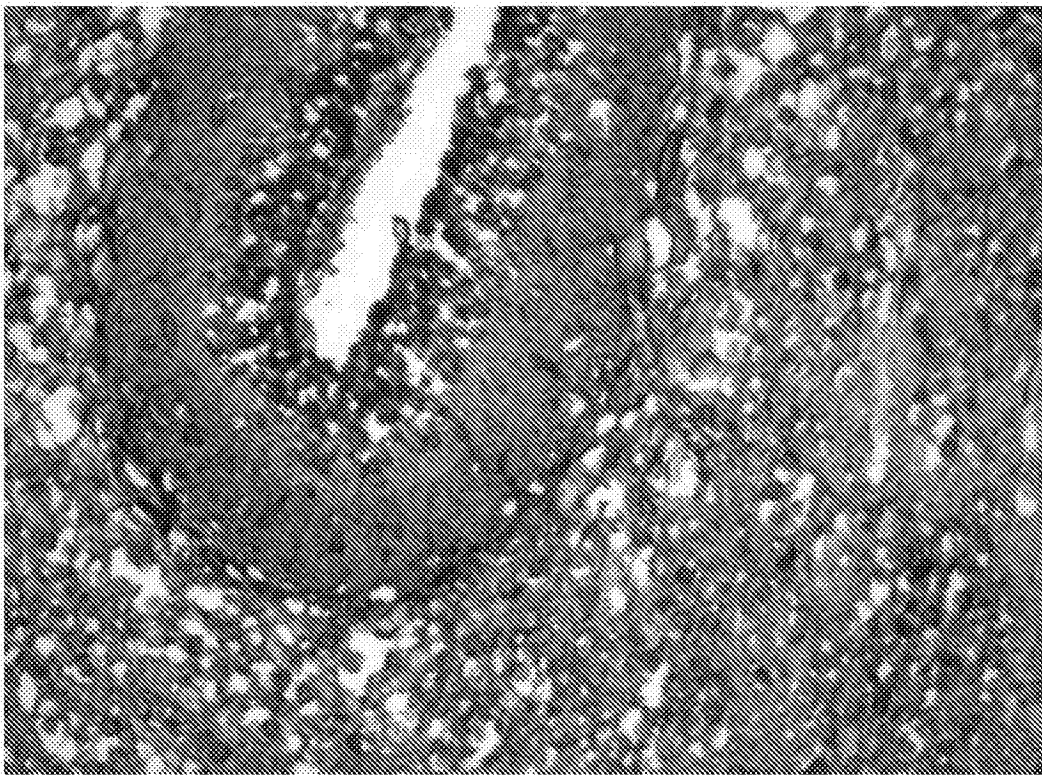


图 6

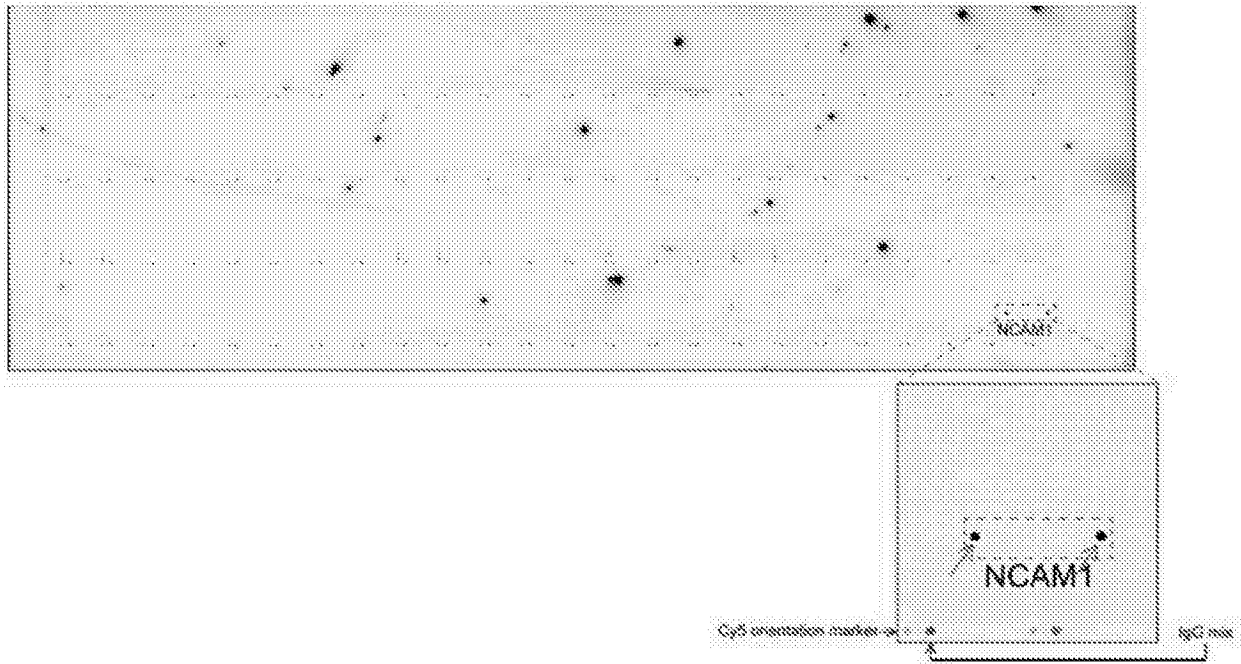


图 7