



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102924577 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201210494560. 8

(22) 申请日 2012. 11. 28

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6708 2012. 10. 26

(73) 专利权人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

(72) 发明人 钱琨 秦爱建 张娜 朱明月

高爱俊 金文杰 邵红霞

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 卢亚丽

(51) Int. Cl.

C07K 7/08(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

C12N 5/20(2006. 01)

C12R 1/91(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101798347 A, 2010. 08. 11, 摘要, 权利要

求.

CN 1878793 A, 2006. 12. 13, 摘要, 权利要

求.

王维. 高迁移率族蛋白 B1 单克隆抗体制备与竞争 ELISA 测定法的建立. 《现代检验医学杂志》. 2007, 第 22 卷 (第 2 期), 摘要, 材料与方

审查员 穆彬

权利要求书1页 说明书4页

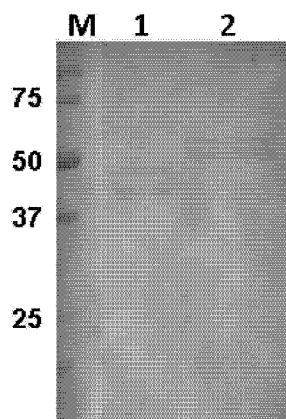
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

鸡高迁移率族蛋白 B1 抗原多肽和抗鸡高迁移率族蛋白 B1 单克隆抗体

(57) 摘要

本发明公开了鸡高迁移率族蛋白 B1 (chHMGB1) 抗原多肽和抗 chHMGB1 的单克隆抗体。该 chHMGB1 抗原多肽序列为 VDAGKKVVAKEKSKK。以该抗原多肽为免疫原免疫 Balb/c 小鼠, 筛选得到一株杂交瘤细胞株 2G1, 保藏编号为 CGMCCNo. 6708。该细胞株能够持续稳定地分泌抗 chHMGB1 的单克隆抗体。该单克隆抗体不仅能够与融合蛋白表达的 chHMGB1 反应, 而且能够与禽类巨噬细胞系 HD11 和 CEF、DF1 细胞中天然的 chHMGB1 特异性反应; 该抗体还可以用于细胞刺激后培养上清中 chHMGB1 的分析, 因此可用于对 chHMGB1 分子生物学功能的深入研究。



1. 一种能诱导抗鸡高迁移率族蛋白 B1 抗体的抗原多肽, 其特征在于氨基酸序列 VDAGKKVVAKAEKSKK。
2. 一株杂交瘤细胞株, 其特征在于由权利要求 1 所述抗原多肽作为抗原制备得到, 能够分泌抗 chHMGB1 的单克隆抗体, 保藏编号为 CGMCC No. 6708。
3. 一种抗 chHMGB1 的单克隆抗体, 其特征在于由杂交瘤细胞株 CGMCC No. 6708 分泌得到。

## 鸡高迁移率族蛋白 B1 抗原多肽和抗鸡高迁移率族蛋白 B1 单克隆抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞工程技术领域,具体涉及利用 chHMGB1 抗原多肽制备抗 chHMGB1 单克隆抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] 高迁移率族蛋白(HMG)最早由 Johns 于 20 世纪 70 年代在小牛胸腺中发现,是种几乎存在于所有真核细胞内的非组蛋白染色体结合蛋白,因其分子质量小(<30kD),在聚丙烯酰胺凝胶电泳快速迁移而被命名为高迁移率族蛋白(HMG 蛋白)。根据分子质量大小及 DNA 结合特性,HMG 族蛋白分为 HMGA, HMGB, HMGN 家族;HMGB 又分为 HMGB1 和 HMGB2。HMGB1 在进化过程中高度保守,在所有哺乳动物中有 99% 同源性。HMGB1 分子包括 3 个功能区:含与 DNA 结合的结构域 A 盒(1aa~79aa)和 B 盒(89aa~163aa),及 1 个高度重复并富含带负电荷的天冬氨酸和谷氨酸的 C- 末端(186aa~215aa)。其中,B 盒前 20 个氨基酸是其发挥细胞因子活性的关键位点。A 盒蛋白(A-box)能取代全长 HMGB1 而与相应受体结合,但不发挥生物学效应,故纯化的 A-box 可作为 HMGB1 特异性拮抗剂。HMGB1 广泛分布于淋巴、心、肝、肺、脑、脾、肾等组织,在肝和脑组织中 HMGB1 主要存在于胞浆,而大多数其他组织中存在于细胞核内。在这些细胞核中,HMGB1 和 HMGB2 结合于 DNA 双螺旋小沟内,引起 DNA 构象变化。这种结合无序列选择性,可以帮助特异性 DNA 结合蛋白正确装配到其在染色体内的结合位点。

[0003] 高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group boxB1, HMGB1),是一种典型的危险因子,正常情况下表达于胞核和胞浆内的非组蛋白染色体结合蛋白,参与多种生物学过程包括基因转录、DNA 修复、V (D) J 重组(胚系基因片段重组)、分化和发育。其功能主要为:①使双螺旋极度扭曲以便各种转录因子和染色质相互作用;②调节类固醇激素受体、NF- $\kappa$  B、p53 及 RAG1 重组酶的转录活性;③与组蛋白作用而影响染色质结构,使染色质解螺旋。HMGB1 非特异性与 DNA 结合,可通过核孔而穿梭于胞核与胞浆之间。HMGB1 仅在危险信号出现时释放至胞外发挥作用。胞外 HMGB1 不仅可直接充当炎性细胞因子参与固有免疫效应,也可作为内源性 DAMP 激活 APC,从而启动、增强适应性免疫应答,并参与多种疾病过程发生和发展。HMGB1 过表达有抑制细胞凋亡,诱导细胞分化、细胞迁移、细胞增殖等作用。因此, HMGB1 可能作为干预多种免疫相关疾病的重要靶标。目前已发现的 HMGB1 的重要受体包括晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)、Toll 样受体 2 (toll like receptor2, TLR2)、TLR4。新近研究表明它也不但是一种转录因子和促生长因子,而且是一种重要的炎性细胞因子,并与肿瘤的发生、浸润、转移等生物学行为关系密切,有很重要的临床价值。本课题组前期的蛋白质组学结果也显示 chHMGB1 在 J 亚群禽白血病(ALV-J)感染的细胞中蛋白表达水平有差异,故推测 chHMGB1 在 ALV-J 感染致病过程中发挥一定的作用。

[0004] 目前对于 chHMGB1 的研究还处于起始阶段,各种检测 chHMGB1 表达的方法还很欠缺。为了深入研究 chHMGB1 的生物学功能,必须有相应的抗体工具,因此筛选合适的

chHMGB1 抗原多肽以及制备抗 chHMGB1 的单克隆抗体对进行相应研究具有重要作用。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对现有技术中的不足,提供一种 chHMGB1 抗原多肽,它的氨基酸序列为 VDAGKKVVAKAEKSKK,该多肽能诱导动物产生抗鸡 chHMGB1 抗体。

[0006] 本发明的另一目的是提供一株能分泌抗 chHMGB1 抗原多肽的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0007] 本发明的又一目的是提供 chHMGB1 抗原多肽的单克隆抗体,这些多肽制备的单克隆抗体能够与融合蛋白表达的 chHMGB1 反应,也能与禽类巨噬细胞系 HD11 和 CEF、DF1 细胞中天然的 chHMGB1 特异性反应,还可以应用于免疫蛋白印迹反应,检测细胞受到刺激后分泌到培养上清中的 chHMGB1。

[0008] 本发明通过以下技术方案实现上述目的:

[0009] 筛选合适的 chHMGB1 多肽序列,获得良好的免疫原,以此制备抗 chHMGB1 的单克隆抗体。

[0010] 具体技术方案如下:

[0011] 一种 chHMGB1 抗原多肽,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。chHMGB1 蛋白共有 16 个氨基酸,经过对其进行亲水区,疏水区,抗原性等多方面的研究,最终筛选确定 16 个氨基酸序列即 VDAGKKVVAKAEKSKK,作为抗原多肽。

[0012] 一株杂交瘤细胞株 2G1 是由上述 chHMGB1 抗原多肽作为抗原制备得到,能够分泌抗 chHMGB1 的单克隆抗体,2012 年 10 月 26 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址:中国·北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所;保藏编号为 CGMCC No. 6708。

[0013] 一种抗 chHMGB1 的单克隆抗体是由上述杂交瘤细胞株 2G1 得到的。

[0014] 该抗 chHMGB1 的单克隆抗体的制备方法如下:

[0015] 1. chHMGB1 抗原多肽合成,与匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KHL)偶联后免疫小鼠;

[0016] 2. 杂交瘤细胞株制备与筛选:取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,然后用常规 ELISA 检测技术筛选,建立杂交瘤细胞株;

[0017] 3. 单克隆抗体的纯化:对所得杂交瘤细胞株分泌的单抗利用 Protein G 层析柱纯化,SDS-PAGE 电泳分析纯化结果。

[0018] 上述抗 chHMGB1 单克隆抗体可以与融合蛋白表达的 chHMGB1 反应,而且能够与禽类巨噬细胞系 HD11 和 CEF、DF1 细胞中天然的 chHMGB1 特异性反应;该抗体还可以用于细胞刺激后培养上清中 chHMGB1 的分析,因此可以用于对 chHMGB1 分子生物学功能的深入研究,以及监测与 chHMGB1 分子相关的疾病。

### 附图说明

[0019] 图 1 chHMGB1 融合蛋白 western blot 鉴定

[0020] M: 蛋白 Marker; 1: PET32a-chHMGB1; 2: GST-chHMGB1。

[0021] 图 2 细胞裂解物中 chHMGB1 蛋白的 western blot 鉴定

[0022] M: 蛋白 Marker;1:HD11 细胞裂解上清 ;2:CEF 细胞裂解上清。

[0023] 图 3HD11 细胞培养上清中 chHMGB1 蛋 western blot 鉴定

[0024] M: 蛋白 Marker;1:LPS 刺激后 1 小时 ;2:LPS 刺激后 6 小时 ;3:LPS 刺激后 12 小时 ;4:LPS 刺激后 24 小时。

[0025] 图 4 鸡高迁移率族蛋白 B1 间接免疫荧光鉴定(X100)

[0026] A/D:DF1 细胞阳性 / 阴性对照 ;B/E:CEF 细胞阳性 / 阴性对照 ;C/F:HD11 细胞阳性 / 阴性对照。

## 具体实施方式

[0027] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解这些实施例仅用于解释发明,而不适用于限制发明的范围。在不背离本发明的技术方案的前提下,对本发明所做的本领域普通技术人员容易实现的任何改动都将落入本发明的权利要求范围内。

[0028] 实施例 1chHMGB1 抗原多肽的设计

[0029] 1. 鸡高迁移率族蛋白 B1 抗原多肽的设计及合成:根据已登录的鸡高迁移率族蛋白 B1 (GenBank:AF178849, Y17968) 获得 chHMGB1 蛋白序列,含有 215 个氨基酸。

[0030] 2. 用 DNASTAR 软件分析 chHMGB1 蛋白特性、亲疏水性、表露性、免疫原性及结构组成情况,最终获得一段符合要求的序列:VDAGKKVVAKAIEKSKK 位于 168~183 位 (SEQ IDNO:1)。

[0031] 实施例 2 制备抗 chHMGB1 的单克隆抗体

[0032] 1. 抗原多肽合成与动物免疫

[0033] 根据实施例 1 的设计抗合成原多肽,该多肽与 KHL 偶联,免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠。采用腹腔直接注射,三免后采集血清进行 ELISA 实验测定小鼠血清效价,选择免疫效价高的小鼠进行加强免疫后准备细胞融合。

[0034] 2. 细胞融合

[0035] 取加强免疫三天后的小鼠脾脏,分离脾脏细胞并计数。将分离的脾细胞与骨髓瘤细胞以 5:1 比例在 PEG 作用下融合,并分别加入到 96 孔细胞培养板。利用 HAT 选择培养基培养,观察细胞生长情况。

[0036] 3. 阳性杂交瘤细胞的筛选

[0037] 当融合阳性细胞克隆生长出来时,采集细胞上清进行 ELISA 检测,单抗分泌阳性孔保留,进一步经过有限稀释法进行亚克隆筛选。

[0038] 4. 单克隆抗体杂交瘤细胞建株

[0039] 经过三次亚克隆筛选,选高分泌特异性抗体的细胞扩大培养或冻存。反复冻存和复苏的杂交瘤细胞系,经染色体分析稳定,抗体检测保持阳性的细胞系进行建株命名 2G1,同时送中国微生物菌种管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No. 6708。

[0040] 实施例 3chHMGB1 单克隆抗体的应用

[0041] 1. 检测抗原制备

[0042] 免疫印迹所需抗原来自原核表达载体表达的 chHMGB1 融合蛋白、CEF 和 HD11 细胞裂解上清,以及 HD11 细胞刺激物的培养上清。

[0043] 1.1 原核表达载体表达的 chHMGB1 融合蛋白制备

[0044] 按照 Axygen 公司总 RNA 小量制备试剂盒步骤提取 DF-1 细胞的总 RNA,并逆转录

为 cDNA。以新鲜制备的 cDNA 为模板进行 HMGB1 基因的扩增,反应体系为 50  $\mu$  L :cDNA 模板 1  $\mu$  L,上游引物为 5'-AG GAA TTC ATG GGC AAA GGA GAT CCT AA - 3'(SEQ ID NO:2)下游引物为 5'-GC CTC GAG TTA TTC ATC ATC ATC TT-3'(SEQ ID NO:3)上下游引物各 1  $\mu$  L (10nM), dNTP4  $\mu$  L, 10 $\times$ buffer (含  $MgCl_2$ ) 5  $\mu$  L, LA TaqDNA 聚合酶 0.5  $\mu$  L, ddw37.5  $\mu$  L。PCR 反应的循环参数 :95 $^{\circ}C$  5min ;95 $^{\circ}C$  30s,60 $^{\circ}C$  (退火温度根据不同基因有所调整) 30s, 72 $^{\circ}C$  30s,30 个循环 ;72 $^{\circ}C$  延伸 10min。反应结束后进行电泳,凝胶浓度 1% 上样量 5  $\mu$  L。胶回收上样 50  $\mu$  L 电泳,按照胶回收试剂盒回收 PCR 产物 -20 $^{\circ}C$  保存备用。

[0045] 将目的基因片段与 pGEM-T Easy 载体(购于美国 Promega 公司)按说明书要求以 3:1 的摩尔比在 16 $^{\circ}C$  水浴中连接过夜(连接体系 10  $\mu$  L :5 $\times$ ligationbuffer2  $\mu$  L, pGEM-T 载体 3  $\mu$  L, 目的片段 3  $\mu$  L, T4 连接酶 1  $\mu$  L, ddw1  $\mu$  L),连接产物 5  $\mu$  L 加入 DH5  $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,将转化后的感受态细胞均匀涂布于 LB-Amp 平板(添加 X-Gal 和 IPTG),37 $^{\circ}C$  过夜培养。挑取白色菌落进行培养,按常规方法提取质粒,用进行 EcoRI 单酶切鉴定(酶切体系 10  $\mu$  L :Buffer1  $\mu$  L, EcoR10.5  $\mu$  L, 质粒 3  $\mu$  L, ddw5.5  $\mu$  L),筛选阳性质粒标记为 pGEM-T-chHMGB1。

[0046] 利用引物两端酶切位点 EcoR I 和 Xho I 酶切重组质粒 pGEM-T-chHMGB1,回收目的条带并亚克隆入 PGEX-6P-1 和 PET-32a (购于美国罗氏公司),构建重组原核表达质粒 PGEX-chHMGB1 和 PET-chHMGB1。经 IPTG 诱导后,超声波裂解细菌,按照 GE 公司的蛋白纯化试剂盒纯化融合蛋白,即为检测用抗原。

[0047] 1. 2CEF 和 HD11 细胞裂解上清制备

[0048] CEF 和 HD11 细胞用 RIPA 细胞裂解液置于冰上裂解 1 小时,13200rpm 离心 30 分钟,收集上清即为检测用抗原。

[0049] 1. 3HD11 细胞刺激物的培养上清制备

[0050] HD11 细胞利用 400ng/ml 的脂多糖(LPS)刺激,分别收集刺激后 1 小时,6 小时,12 小时和 24 小时的培养上清作为检测用抗原。

[0051] 2. Western blot 检测抗体特异性

[0052] 将检测用抗原原核表达载体表达的 chHMGB1 融合蛋白和 HD11 细胞刺激上清进行 SDS-PAGE,然后按照 Western 印迹操作步骤转移到硝酸纤维素膜,依次加一抗、二抗(AP 标记的羊抗鼠 IgG 购于美国 SIGMA 公司),观察结果。

[0053] Western blot 结果显示,2G1 不仅可与 chHMGB1 融合蛋白反应(如图 1),还能与 CEF、HD11 细胞裂解上清中天然的 chHMGB1 反应(如图 2),此外 2G1 还能与 HD11 细胞受 LPS 刺激后释放到培养上清中的天然 chHMGB1 反应(如图 3)。

[0054] 3. 共聚焦显微镜观察

[0055] 将禽类巨噬细胞系 HD11 或 CEF、DF1 爬片培养 24h 后,取出爬片 4% 多聚甲醛固定并破膜,BSA 封闭后分别孵育一抗,二抗,PBS 洗涤五次,控干过量缓冲液,抗淬灭剂封片,然后用莱卡 SP2 共聚焦显微镜观察 chHMGB1 在细胞中细胞定位情况。另设 Isotype 抗体孵育的细胞为阴性对照。

[0056] 共聚焦免疫荧光发现,单克隆抗体 2G1 能够与禽类巨噬细胞系 HD11、CFE、DF1 细胞中天然 chHMGB1 特异性反应(如图 4)。

序列表

SEQUENCE LISTING

1  
2  
3 <110> 扬州大学  
4  
5 <120> 鸡高迁移率族蛋白BI抗原多肽和抗鸡高迁移率族蛋白BI单克隆抗体  
6  
7 <130>  
8  
9 <160> 3  
10  
11 <170> PatentIn version 3.3  
12  
13 <210> 1  
14 <211> 16  
15 <212> PRT  
16 <213> 鸡  
17  
18 <400> 1  
19  
20 Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys  
21 1 5 10 15  
22  
23  
24 <210> 2  
25 <211> 28  
26 <212> DNA  
27 <213> 人工序列  
28  
29 <400> 2  
30 aggaattcat gggcaaagga gatcctaa 28  
31  
32  
33 <210> 3  
34 <211> 28  
35 <212> DNA  
36 <213> 人工序列  
37  
38 <400> 3  
39 gccctcagatt attcatcacc atcatctt 28  
40  
41  
42

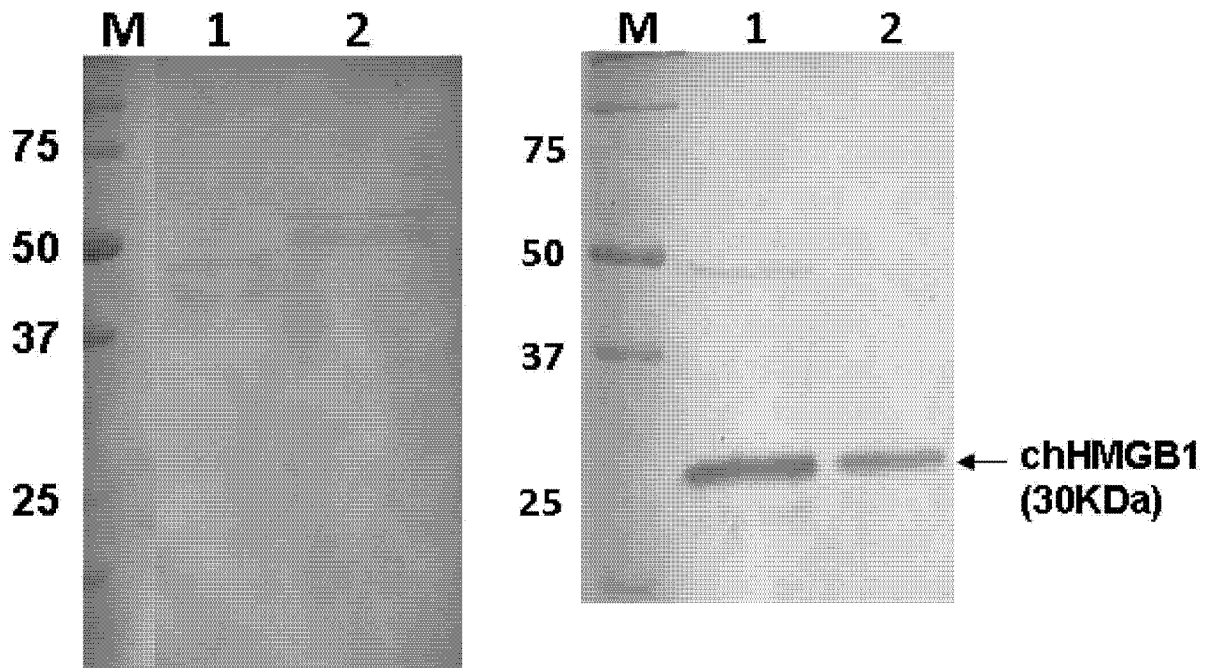


图 2

图 1

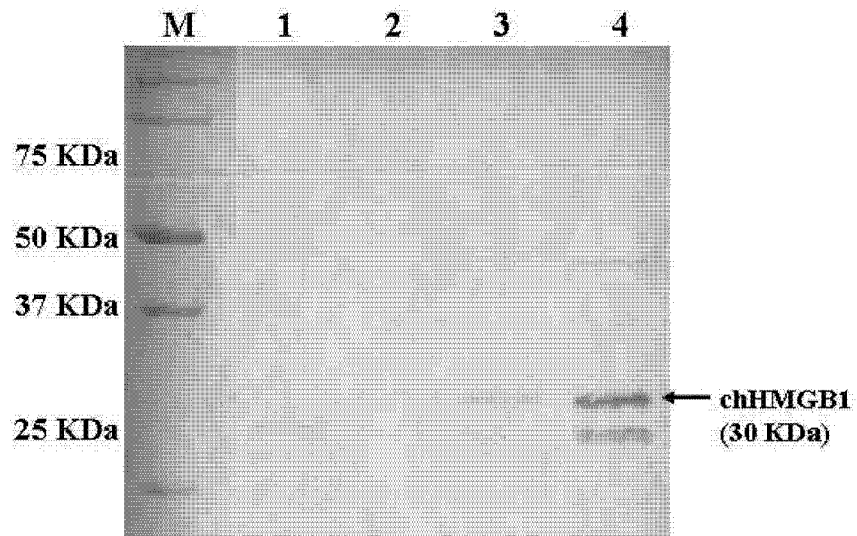


图 3



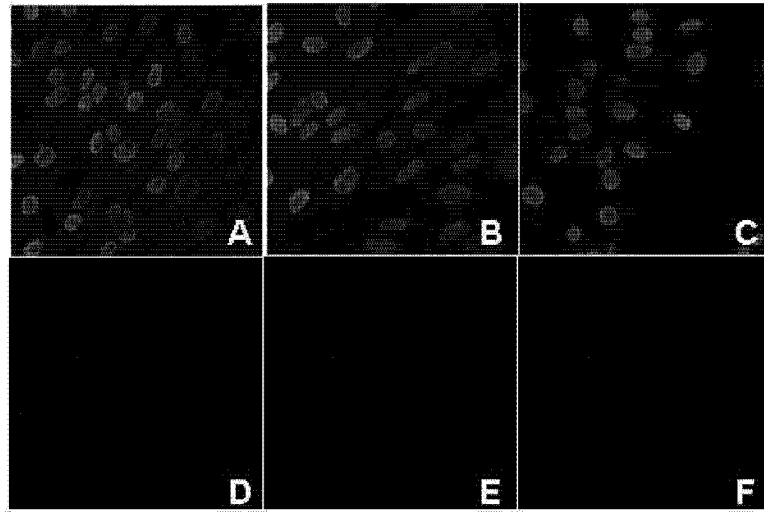


图 4