



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118812711 A

(43) 申请公布日 2024.10.22

(21) 申请号 202410837482.X

(22) 申请日 2024.06.26

(71) 申请人 杭州斯达特生物科技有限公司

地址 310009 浙江省杭州市上城区同协路
1279号西子智慧产业园7号楼4层

(72) 发明人 章红芳 魏力 潘红阳 霍娜

(74) 专利代理机构 安徽知问律师事务所 34134

专利代理师 侯晔

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

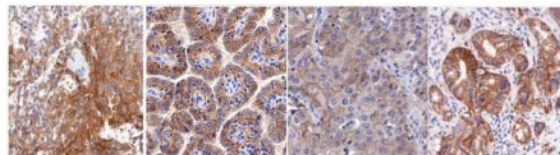
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种抗c-MET抗体及其制备与应用

(57) 摘要

本申请公开了一种抗c-MET抗体及其制备与应用,属于生物技术领域。该抗c-MET抗体是以c-MET多肽为免疫原,免疫新西兰大白兔并经细胞分选等步骤获得,包括重链及轻链。本申请提供的抗c-MET抗体,可应用于免疫组织化学、间接ELISA、流式细胞术等检测与筛查领域,能够特异性地识别和检测肿瘤组织上c-MET蛋白的表达,有利于获得准确的评估和检测结果。



人肺腺癌组织

人甲状腺腺癌组织

人肝癌组织

人胰腺癌组织

1. 一种抗c-MET抗体,其特征在于,所述抗c-MET抗体包括重链和轻链,重链包括SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列,轻链包括SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列。
2. 一种核酸,其特征在于,所述核酸编码权利要求1所述的抗c-MET抗体的重链和/或轻链。
3. 根据权利要求2所述的一种核酸,其特征在于,所述的核酸包括SEQ ID NO.2和/或SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。
4. 一种重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体含有权利要求2或3所述的核酸。
5. 一种重组表达细胞,其特征在于,所述重组表达细胞包括权利要求4所述的重组表达载体,或权利要求2或3所述的核酸。
6. 权利要求2或3所述的核酸、或权利要求4所述的重组表达载体、或权利要求5所述的重组表达细胞在制备抗c-MET抗体中的应用。
7. 权利要求1所述的抗c-MET抗体的制备方法,其特征在于,所述方法包括:
采用权利要求4所述的重组表达载体转染到细胞获得重组表达细胞;培养重组表达细胞;收集上清液并纯化,得到抗c-MET抗体。
8. 权利要求1所述的抗c-MET抗体、或权利要求2或3所述的核酸、或权利要求4所述的重组表达载体、或权利要求5所述的重组表达细胞、或权利要求7所述的抗c-MET抗体的制备方法在检测c-MET蛋白,或制备检测c-MET蛋白设备中的应用。
9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述的检测c-MET蛋白包括免疫组织化学、ELISA、免疫荧光、流式细胞术中的任意一种或多种。
10. 一种检测c-MET蛋白的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1所述的抗c-MET抗体。

一种抗c-MET抗体及其制备与应用

技术领域

[0001] 本申请属于生物技术领域,具体涉及一种抗c-MET抗体及其制备与应用。

背景技术

[0002] 目前,单克隆抗体开发技术主要有杂交瘤技术、噬菌体展示技术和B细胞技术等。传统的杂交瘤技术依赖于骨髓瘤细胞,而兔单克隆抗体制备的兔骨髓瘤细胞受到专利技术限制,目前只有拥有该项专利技术公司使用该技术制备兔单克隆抗体。噬菌体展示抗体库采用大肠杆菌作为表达宿主,采用单链抗体(scFv)、单域抗体(VHH)或Fab抗体等非天然抗体分子形式,抗体的结构和功能远不如哺乳动物细胞表达的抗体产品。此外,噬菌体展示抗体库筛选的抗体在分子转换成IgG之后,即使采用哺乳动物细胞表达生产,也会出现部分克隆活性降低和丢失的现象。采用B细胞技术表达天然的抗体基因,表达的抗体具有高特异性和高亲和力。

[0003] 细胞间质上皮转换因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor,c-MET),为受体酪氨酸激酶家族成员,作为肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)的受体,是一种多功能跨膜酪氨酸激酶。c-MET在一般组织中呈低表达或不表达,但在肺癌、肝癌、胰腺癌以及甲状腺癌等组织中均可见c-MET的过表达。免疫组织化学(IHC)可用于检测c-MET蛋白的过表达情况,通过检测c-MET蛋白的表达水平和突变情况,可以帮助医生更好地诊断和预测某些疾病的发展和预后。c-MET基因突变正是在许多肿瘤药物耐药的关键所在,作为细胞膜表面的靶点,c-MET为抗体类药物开发提供了机会。

[0004] 因此,开发一种亲和力高、特异性强的抗c-MET抗体,对特异性地识别和检测肿瘤组织上c-MET蛋白的表达,获得准确的评估和检测结果具有非常重要的意义。

发明内容

[0005] 1.发明目的

[0006] 本申请目的是提供一种抗c-MET抗体及其制备与应用,该抗c-MET抗体是以c-MET蛋白的胞内段多肽为免疫原,免疫新西兰大白兔并经细胞分选等步骤获得,能够特异性识别c-MET蛋白。经过多种不同组织的免疫组织化学(IHC)检测发现,该抗c-MET抗体可以很好的检测到细胞上c-MET蛋白的表达,可应用于免疫组织化学、间接ELISA、免疫荧光、流式细胞术等技术检测与筛查c-MET蛋白的表达。

[0007] 2.技术方案

[0008] 为了达到上述目的,本申请所采用的技术方案如下:

[0009] 第一方面,本申请提供了一种抗c-MET抗体,该抗c-MET抗体能特异性与c-MET蛋白结合,包括重链和轻链。

[0010] 具体地,上述重链包括SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列。

[0011] 具体地,上述轻链包括SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列。

[0012] 第二方面,本申请还提供了一种核酸,该核酸编码上述抗c-MET抗体。

[0013] 具体地,上述编码抗c-MET抗体的核酸,包括:

[0014] 如SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列,用于编码上述抗c-MET抗体的包括SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的重链;

[0015] 如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列,用于编码上述抗c-MET抗体的包括SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的轻链。

[0016] 第三方面,本申请还提供了一种重组表达载体,该重组表达载体含有上述编码抗c-MET抗体的核酸,可以表达抗c-MET抗体。

[0017] 具体地,上述重组表达载体包括:含有上述编码抗c-MET抗体的核酸,可以表达抗c-MET重组单克隆抗体的pcDNA3.1质粒。

[0018] 第四方面,本申请还提供了一种重组表达细胞,该重组表达细胞包括上述重组表达载体或上述编码抗c-MET抗体的核酸,可以表达抗c-MET抗体。

[0019] 具体地,上述重组表达细胞包括:HEK293细胞系。

[0020] 第五方面,本申请还提供了上述核酸、重组表达载体、重组表达细胞在制备抗c-MET抗体中的应用。

[0021] 第六方面,本申请还提供了一种上述抗c-MET抗体的制备方法,包括:采用上述的重组表达载体转染到细胞获得重组表达细胞;培养重组表达细胞;收集上清液并纯化,得到抗c-MET抗体。

[0022] 第七方面,本申请还提供了上述抗c-MET抗体、核酸、重组表达载体、重组表达细胞或抗c-MET抗体的制备方法在检测c-MET蛋白,或制备检测c-MET蛋白设备中的应用。

[0023] 具体地,上述检测c-MET蛋白包括免疫组织化学、ELISA、免疫荧光、流式细胞术检测c-MET蛋白中的任意一种或多种。

[0024] 具体地,上述检测c-MET蛋白设备包括试剂盒、抗体偶联、抗体芯片等中的任意一种或多种。

[0025] 第八方面,本申请还提供了一种检测c-MET蛋白的试剂盒,该试剂盒包括上述抗c-MET抗体,以抗c-MET抗体为一抗。

[0026] 具体地,上述试剂盒为流式细胞检测试剂盒,包括上述抗c-MET抗体,还包括流式细胞检测试剂。

[0027] 进一步地,上述流式细胞检测试剂盒还包括:荧光标记二抗、PBS、牛血清白蛋白、Human IgG、7-AAD等试剂。

[0028] 具体地,上述试剂盒为免疫组织化学检测试剂盒包括:包括上述抗c-MET抗体,还包括免疫组织化学检测试剂。

[0029] 进一步地,上述免疫组织化学检测试剂盒包括:HRP酶标二抗、EDTA修复液、过氧化氢酶封闭液、DAB浓缩液、DAB缓冲液、苏木素、返蓝液等。

[0030] 第九方面,本申请还提供了上述一种检测c-MET蛋白的试剂盒在检测c-MET蛋白中的应用。

[0031] 具体地,上述流式细胞检测试剂盒应用包括:细胞复苏、FC受体阻断、一抗孵育、二抗孵育、7-AAD活性染色、上机收集数据等。

[0032] 具体地,上述免疫组织化学检测试剂盒应用包括:脱蜡、抗原修复、内源性过氧化物酶失活、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB显色、复染、脱水、封片和镜检等。

[0033] 3.有益效果

[0034] 本申请与现有技术相比,其有益效果在于:

[0035] (1)本申请提供的一种抗c-MET抗体及其制备与应用,该抗c-MET抗体是以c-MET蛋白的胞内段多肽为免疫原,免疫新西兰大白兔并经细胞分选等步骤获得,包括如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的重链和SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的轻链,能够特异性地识别和检测肺腺癌、甲状腺癌、肝癌、胰腺癌等肿瘤或癌症组织上c-MET蛋白的表达,有利于获得准确的评估和检测结果。

[0036] (2)本申请提供的一种抗c-MET抗体及其制备与应用,与传统杂交瘤方法相比,周期更短,不受骨髓瘤细胞限制;与噬菌体展示技术相比,天然抗体具有更高的亲和力。

附图说明

[0037] 图1是免疫后的纯化血清免疫组织化学结果图。

[0038] 图2是特异性B细胞增殖后的细胞图。

[0039] 图3是特异性B细胞上清在人胰腺癌组织、肠癌组织、肺癌组织上特异性验证免疫组织化学结果图。

[0040] 图4是抗体在人肺腺癌组织、人甲状腺癌组织、人肝癌组织、人胰腺癌组织的特异性验证免疫组织化学结果图。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施例对本申请进一步进行描述。

[0042] 需要说明的是,本说明书中所引用的如“上”、“下”、“左”、“右”、“中间”等用语,亦仅为便于叙述的明了,而非用以限定可实施的范围,其相对关系的改变或调整,在无实质变更技术内容下,当亦视为本申请可实施的范畴。

[0043] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请的技术领域的技术人员通常理解的含义相同;本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0044] 实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0045] 如本文所使用,术语“约”用于提供与给定术语、度量或值相关联的灵活性和不精确性。本领域技术人员可以容易地确定具体变量的灵活性程度。

[0046] 如本文所使用,术语“.....中的至少一个”旨在与“.....中的一个或多个”同义。例如,“A、B和C中的至少一个”明确包括仅A、仅B、仅C以及它们各自的组合。

[0047] 浓度、量和其他数值数据可以在本文中以范围格式呈现。应当理解,这样的范围格式仅是为了方便和简洁而使用,并且应当灵活地解释为不仅包括明确叙述为范围极限的数值,而且还包括涵盖在所述范围内的所有单独的数值或子范围,就如同每个数值和子范围都被明确叙述一样。例如,约1至约4.5的数值范围应当被解释为不仅包括明确叙述的1至约4.5的极限值,而且还包括单独的数字(诸如2、3、4)和子范围(诸如1至3、2至4等)。相同的原理适用于仅叙述一个数值的范围,诸如“小于约4.5”,应当将其解释为包括所有上述的值和范围。此外,无论所描述的范围或特征的广度如何,都应当适用这种解释。

[0048] 实施例1

[0049] 本实施例提供c-MET多肽免疫原的设计及合成,具体包括:

[0050] 以c-MET(Uniprot ID:P08581)为靶抗原,对c-MET蛋白序列进行分析,结合c-MET蛋白序列进行结构、线性、长度、亲疏水性的预测、并最终选择区域肽段aa997-aa1007作为制备抗c-MET抗体的免疫原,该肽段属于胞内段,更适合于免疫组织化学应用等的开发,其具体序列为:HNESVDYRATF(SEQ ID NO.1)。

[0051] 同时在肽段aa997-aa1007的C端加一个半胱氨酸,用来交联KLH,命名为多肽A,用于动物免疫;在肽段aa997-aa1007的N端加一个生物素,用于交联亲和素磁珠,命名为多肽B。

[0052] 两条多肽均由安徽国平药业有限公司合成。

[0053] 实施例2

[0054] 本实施例提供抗c-MET抗体的制备及筛选,具体包括如下步骤:

[0055] (1) 动物免疫及血清检测

[0056] 将实施例1合成的多肽A与KLH偶联作为免疫原,将500 μ g免疫原与0.5mL完全弗氏佐剂混合并乳化,采用背部多点皮下免疫方式分别免疫两只新西兰大白兔,两只新西兰大白兔编号分别为K0021和K0022;15天后将0.25mL不完全弗氏佐剂和250 μ g免疫原混合并乳化进行第二次免疫;15天后进行第三次免疫,免疫方式与第二次相同;15天后进行第四次免疫,免疫方式与第二次相同。最后一次免疫后10天,兔耳缘静脉取血,3000rpm离心20min获取兔抗血清。

[0057] 取c-MET多肽A用碳酸盐缓冲液(50mM,pH9.6)稀释成0.5 μ g/mL后,100 μ L/孔的多肽A包被酶联板,4 $^{\circ}$ C过夜;次日2%明胶封闭,37 $^{\circ}$ C封闭1h。将兔抗血清梯度稀释作为一抗,37 $^{\circ}$ C恒温孵育1 h后,加1:10000羊抗兔二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1h,加显色液显色。

[0058] 检测结果如表1所示,编号为K0021的兔子的抗c-MET特异性多抗血清的效价在稀释度1:64000时OD₄₅₀值高于0.5;并且利用该兔子血清纯化的多抗进行免疫组织化学检测,结果显示在人乳腺癌肿瘤组织上有膜染色,但有非特异性(图1)。取编号为K0021的新西兰大白兔脾脏并研磨获取淋巴细胞。

[0059] 表1不同稀释度K0021兔子抗c-MET特异性多抗血清的效价

[0060]

| 新西兰大白兔编号 | K0021 | K0022 |
|----------|-------|-------|
| 1:250 | 3.391 | 3.408 |
| 1:1000 | 3.25 | 3.315 |
| 1:4000 | 3.226 | 3.05 |
| 1:16000 | 2.781 | 2.261 |
| 1:64000 | 1.56 | 0.969 |
| 1:256000 | 0.502 | 0.285 |
| 0值 | 0.041 | 0.057 |

[0061] (2) 特异性B细胞富集及增殖

[0062] 本申请使用的链霉亲和素磁珠为苏州为度生物技术有限公司购买,货号CMP1001SB。取25 μ L磁珠经PBS清洗后直接交联100 μ g多肽B得到磁珠混合物;将上述脾脏中获取的淋巴细胞计数后放 5×10^6 个活细胞至一个9cm培养皿中,37 $^{\circ}$ C培养箱中摇床孵育2h

后,将细胞和磁珠混合物吸入到15mL离心管中,再放到ThermoDynaMag™-15磁力架(货号:12301D)上,将上清吸弃,加入新的2% FBS1640培养基重悬后继续清洗,直到上清中看不到细胞为止。将磁珠分选后的特异性B细胞用培养基重悬后进行细胞计数,计数后进行稀释,放至96孔板铺板,5% CO₂培养箱,37°C培养7天进行增殖。

[0063] (3) 克隆筛选

[0064] 增殖后96孔板获得可高效分泌单克隆抗体的B细胞小群体,如图2所示,通过ELISA间接法实验得到抗原特异性克隆。实验方法如下:

[0065] 1) 从冰柜中取出多肽A以0.5μg/mL的浓度用包被液碳酸盐coating buffer,将配制好的包被液以50μL/孔加到标记好的96孔酶标板中,轻轻振板使包被液铺满孔底,在最上面的96孔酶标板上粘上不干胶,2~8°C冰箱放置过夜;次日将包被液甩干;

[0066] 2) 封闭:每孔加入60μL/孔的1% BSA,室温静置封闭45min;

[0067] 3) 洗板:甩掉封闭液,1×PBST 200μL/孔机洗一次;

[0068] 4) 加样:用排枪每孔加50μL上清;

[0069] 5) 加阳性对照及阴性对照:K0021四次免疫兔血清,将血清用1% BSA 1:1000稀释,混匀,加在板子上最后一列的其中两孔,阴性对照最后两孔不加一抗;

[0070] 6) 洗板:甩掉一抗,1×PBST 200μL机洗二次;

[0071] 7) 加二抗:Fc-HRP 1:10000稀释,50μL/孔,室温静置孵育40min;

[0072] 8) 洗板:甩掉二抗,1×PBST 200μL机洗二次,然后拍干;

[0073] 9) 显色:每孔加入50μL TMB底物,室温避光显色5min;

[0074] 10) 终止:按显色顺序每孔依次加入50μL 4.9%的磷酸终止反应;

[0075] 11) 读数:酶标仪OD₄₅₀nm波长读数,终止后15min内读板。

[0076] 挑出ELISA抗原特异性阳性克隆上清进行免疫组织化学验证,结果如图3所示,得到能特异性识别癌症组织中c-MET蛋白的B细胞克隆。

[0077] (4) 重组抗体载体构建及表达

[0078] 免疫组织化学检测的能特异性识别癌症组织中c-MET蛋白的B细胞裂解后,获取mRNA,并通过RT-PCR获得特异性B细胞的重、轻链序列的cDNA,通过同源重组将所得的cDNA构建到表达载体pCDNA3.1上,测序分析获得重、轻链基因序列。将重、轻链基因序列两两组合,并将构建的真核表达载体通过转染试剂转染到HEK293细胞系中,收集细胞上清。

[0079] (5) 抗体序列

[0080] 通过酶联免疫(ELISA)、免疫组织化学验证收集的HEK293细胞上清,证实含有以下核酸的质粒表达出的抗体与抗原有很好的免疫反应:

[0081] 编码重链的核酸序列为:

[0082] ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGTTCAAAGGTGCCAGTGTCCAGGAGCAGCTGAAGGAGACCGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGGGGATCCCTGACACTCTCCTGCAAAGCCTCTGGATACGAGTTGAGTAGCAACGACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGATCGGTGAACTCAGGACTAGTGTGGTCTGTGGTACGCGACCTGGGTGAATGGCCGATTCTCCATCTCCAGAGAGAACACCCAGAACACGGTGTCTCTACAACCTGAACAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGTGGCTGGGATACTGACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCAACCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTG

GAAC TCGGGCACCCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGC
AGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGG
ACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCATGTGCCACCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTT
CATCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCAGGATGACCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCACCCGCCCCGCCGCCCTAC
GGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCAGCACCCCTCCCCATCGCGCACCAGGACTGGCTGAGGGGCAA
GGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAG
CCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGTCAGCCTGACCTGCA
TGATCAACGGCTTCTACCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACACTACAAGAC
CACGCCGACCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAG
CGGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCT
CTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO.2) ;

[0083] 编码轻链的核酸序列为:

[0084] ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCACATTTGC
CCAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTCTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGTCTAGT
CGGAGCCTATGCAGCCAGAACAACATAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGGTCTTGATCTtGC
CGGTATCGAATCTGCCATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTGATCTGGGACACAGTTCAGTCTCACCAT
CAGCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCGGTTATACAAGTGGTGTATGGTTTCGGC
GGAGGGACCGAGGTGGTTCGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCCACCATCTGCTGATCTTG
TGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGA
TGGCAC CACCCAAACAACCTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCCGAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAG
CAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCACGACC
TCAGTCGTCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG (SEQ ID NO.3) 。

[0085] 根据上述核酸序列,得到相对应的抗体的重链和轻链的氨基酸序列:

[0086] 重链氨基酸序列:

[0087] METGLRWLLLVAVFKGVQCQEQLKETGGGLVQPGGSLTSLCKASGYELSSNDMCWVRQAPGEGLEWIG
ELRTSGGLWYATWVNGRFSISRENTQNTVSLQLNSLTAADTATYFCARGGWDTDLWPGTLTVVSSGQPKAPSVFP
LAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPA
TNTKVDKTVAPSTCSKPMCPPPELLGGPSVFI FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRT
ARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTIKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRS
VSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPTVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQ
KSISRSPGK (SEQ ID NO.4) ;

[0088] 轻链氨基酸序列:

[0089] MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSPVSAALGGTVTINCQSSRSLCSQNNIAWYQQKPGQPP
KVLILPVSNLPSGVPSRFSGSGSGTQFSLTISDLECDAAATYYCAGGYTSGVYGFGGGTEVVVKGDPVAPTFLIFP
PSADLVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKV
TQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO.5) 。

[0090] 在实施例中,将确认阳性的表达载体进行大量的细胞转染,继续培养3~5天后,收取细胞悬液,离心后取上清,经Protein A柱亲和层析纯化细胞上清,纯化步骤如下:

- [0091] 1) 上清过滤:将细胞培养上清均经0.45 μ m滤器过滤后进行孵育;
- [0092] 2) 上样:根据上清体积计算孵育或上样所需的Protein A填料体积,将填料加入50mL离心管,并放置于旋转摇床,于室温下孵育1h,随后将填料转移至6mL层析空柱中;孵育结束后室温下静置10min,等待填料沉降,上样后无需静置,可直接进行后续冲洗;
- [0093] 3) 冲洗:依次使用15倍柱体积的Wash Buffer A,1 \times PBS冲洗填料,测定柱后流出液的蛋白浓度,待OD280<0.01时可进行洗脱;
- [0094] 4) 洗脱:使用Elute Buffer B进行洗脱,待流出液OD280>0.1时开始收集,直至OD280<0.1结束;于中和后的洗脱液中加入10 \times PBS,使洗脱液重新处于1 \times PBS的环境中;使用蛋白浓度测定仪(兔IgG吸光系数需手动设置为1.37),测定IgG浓度并将相关数据记录后进行超滤浓缩。
- [0095] 经上述步骤后可得到纯度大于95%的兔抗人c-MET抗体。
- [0096] 实施例3
- [0097] 本实施例提供本申请筛选的抗c-MET抗体在检测c-MET蛋白中的应用,检测方法为免疫组织化学方法,以抗c-MET抗体为一抗,以PolyHRP-GAR为二抗,具体包括:
- [0098] (1) 将含癌症组织(m-c)芯片进行切片,切片厚度4微米,42 $^{\circ}$ C水温展片,置于干燥箱中以63~65 $^{\circ}$ C烤约1h;
- [0099] (2) 脱蜡水化:切片依次置于a)组织透明剂2次,每次15min;b)100%酒精2次,每次5min;c)95%酒精2次,每次5min;d)85%酒精1次,5min;e)75%酒精1次,5min;结束后取出切片,蒸馏水冲洗三次,每次5min。(所有操作全部在通风橱中完成);
- [0100] (3) 抗原修复:将切片置于盛有柠檬酸钠缓冲液(用去离子水配置200mL,即加入50 \times 修复液4mL)或者EDTA修复液的染色盒,抗原修复锅中加入2L蒸馏水,并将染色盒置于高压锅中高温高压修复,待高压锅开始放气后,关闭出气阀,持续20min,然后结束加热,打开盖子,将内锅端出,自然冷却,蒸馏水冲洗3次,可置摇床上每次5min;
- [0101] (4) 阻断内源性过氧化物酶:洗涤3次后,用免疫组织化学笔在载玻片上对切片进行画圈,画圈时注意组织画圈大小差不多一致,彼此间隔,且切片位置差不多置于圈中间,用10%羊血清(PBS配置)封闭非特异性抗原,室温下30min;
- [0102] (5) 一抗添加:封闭结束,磕掉片子上的封闭液,加入稀释好的一抗(抗c-MET抗体)每孔80~100 μ L,根据画圈的大小适当调整,将片子放入湿盒,然后缓慢地放进冰箱4 $^{\circ}$ C静置过夜;
- [0103] (6) 二抗工作液添加:第二天早上,拿出湿盒,室温静置10min;1 \times PBST漂洗3次,每次5min;加入二抗,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;
- [0104] (7) DAB显色配置:按照每孔100 μ L计算,需要配置6mL,即用6mL显色缓冲液加入6滴显色液;每片滴加新鲜配置的显色液,显色1~2min,可以肉眼观察,以出现棕黄色为准,时间到了直接自来水冲洗终止显色;苏木素复染2~5min;蒸馏水冲洗5min,PBS中脱色返蓝30s,蒸馏水冲洗5min;
- [0105] (8) 切片脱水:依次经梯度酒精脱水干燥a)50%酒精,5min;b)75%酒精,5min;c)90%酒精,5min;d)100%酒精3次,每次5min;e)二甲苯2次,每次5min;
- [0106] (9) 封片:每片滴加50~100 μ L中性树胶,然后缓慢加盖玻片;
- [0107] (10) 扫片:封片后的片子过夜晾干,第二天显微镜观察并用组织切片仪扫片得到

免疫组织化学结果。

[0108] 结果如图4所示,本申请抗c-MET抗体能够检测到肺腺癌、甲状腺癌、肝癌、胰腺癌组织中c-MET蛋白的表达,肿瘤细胞被抗体均匀染色,细胞膜显示很强染色,而在正常细胞几乎无法检测到染色。

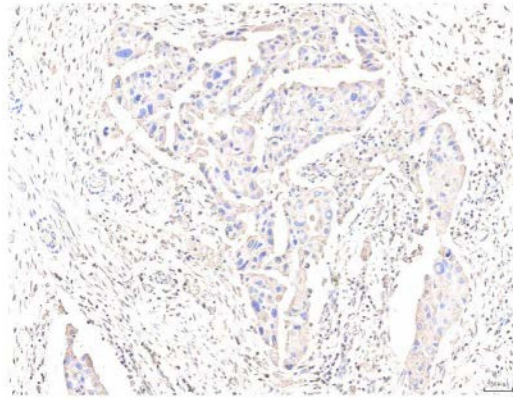
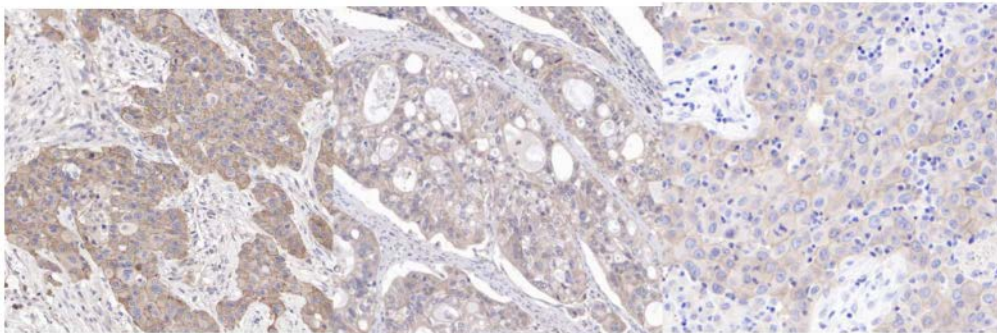


图1



图2

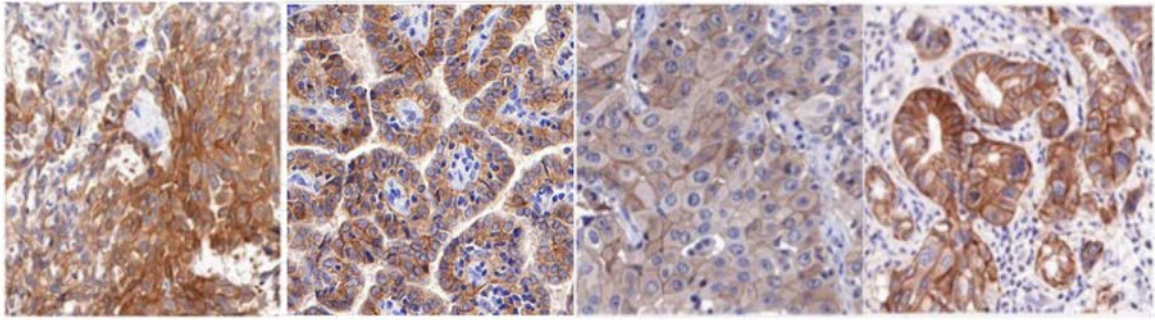


人胰腺癌组织

肠癌组织

肺癌组织

图3



人肺腺癌组织

人甲状腺癌组织

人肝癌组织

人胰腺癌组织

图4