



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116120452 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 16

(21) 申请号 202211581245.9

C07K 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.12.07

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(71) 申请人 武汉爱博泰克生物科技有限公司

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路388号武汉光谷国际生物医药企业加速器1.1期7栋4层01室 (自贸区武汉片区)

(72) 发明人 周涛 李倩倩 程瑶 雷雅君 田科 张云 刘政泽 吴海

(74) 专利代理机构 武汉蓝宝石专利代理事务所 (特殊普通合伙) 42242

专利代理师 方菲

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

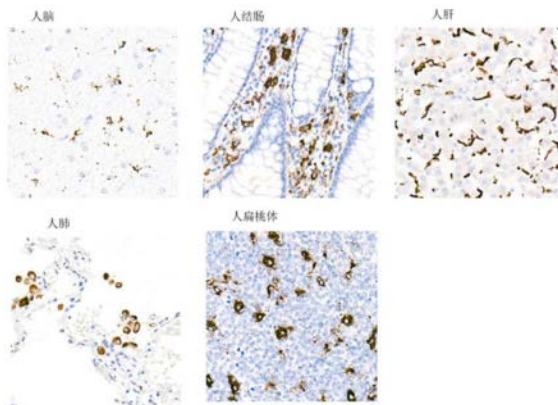
权利要求书1页 说明书9页  
序列表 (电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

Human CD68的兔单克隆抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供Human CD68的兔单克隆抗体及其制备方法和应用。本发明具体提供Human CD68的高亲和力兔单克隆抗体,轻链互补决定区的序列分别如SEQ ID NO:5、SEID NO:6、SEQ ID NO:7所示,重链互补决定区的序列分别如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10所示。本发明利用该Human CD68兔单克隆抗体开发的免疫组化检测方法,具有优异的特异性。



1. 一种Human CD68的兔单克隆抗体,其特征在于,所述Human CD68的兔单克隆抗体的轻链互补决定区的序列分别如SEQ ID NO:5、SEID NO:6、SEQ ID NO:7所示,重链互补决定区的序列分别如SEQ ID NO:8、SEQ IDNO:9、SEQ ID NO:10所示。

2. 根据权利要求1所述的Human CD68的兔单克隆抗体,其特征在于,所述兔单克隆抗体的轻链可变区的序列如SEQ ID NO:3所示;和/或所述兔单克隆抗体的重链可变区的序列如SEQ ID NO:4所示。

3. 根据权利要求2所述的Human CD68的兔单克隆抗体,其特征在于,所述兔单克隆抗体的轻链全长序列如SEQ ID NO:1所示;和/或所述兔单克隆抗体的重链全长序列如SEQ ID NO:2所示。

4. 编码权利要求1至3任一项所述的HumanCD68的兔单克隆抗体的基因,或者包含该基因的表达载体或者宿主。

5. 一种兔单克隆抗体偶联物,其特征在于,主要由权利要求1至3任一项所述的Human CD68的兔单克隆抗体与抗原和/或荧光标记分子反应制备而成。

6. 如权利要求1至3任一项所述的Human CD68的兔单克隆抗体在制备检测人CD68的试剂或者试剂盒中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述检测的方法为免疫检测。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述免疫检测为免疫组织化学法、免疫印迹法中的一种。

9. 一种用于制备权利要求1至3任一项所述的Human CD68的兔单克隆抗体的免疫原,其特征在于,所述免疫原为由蛋白KLH或BSA与如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15所示氨基酸序列片段合成的重组蛋白。

10. 一种权利要求1至3任一项所述的Human CD68兔单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

将编码权利要求1至3任一项所述的Human CD68的兔单克隆抗体的重链基因、轻链基因分别装载在表达载体上,转染宿主;

培养获得包含兔单克隆抗体的上清液;

纯化,即得。

## Human CD68的兔单克隆抗体及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种Human CD68的兔单克隆抗体及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] CD68是一种高度糖基化的跨膜蛋白,是目前常规应用最广泛的巨噬细胞标记物。CD68在巨噬细胞的吞噬活动,胞内容酶体的新陈代谢,胞外的细胞与细胞以及细胞与病原体间的相互作用中发挥功能。CD68在不同类型的巨噬细胞中被检测出来,且与骨髓中的骨髓前体细胞发生反应。CD68阳性可见于Kupffer细胞、正常淋巴组织细胞、肥大细胞和小神经胶质细胞。在肿瘤组织中,CD68表达于纤维组织肿瘤、部分上皮肿瘤以及一些恶性黑色素瘤的上皮细胞。

[0003] 但是,目前针对HumanCD68跨膜蛋白的高敏检测技术并未得到有效研究和开发。

### 发明内容

[0004] 基于此,有必要提供针对HumanCD38的兔单克隆抗体及其制备方法和应用。该Human CD38的兔单克隆抗体适用于免疫组化检测人CD68蛋白,特异性好。

[0005] 本发明采用如下技术方案:

[0006] 本发明提供针对HumanCD68的兔单克隆抗体,兔单克隆抗体的轻链全长序列如SEQ ID NO:1所示,重链全长序列如SEQ ID NO:2所示,轻链可变区的序列如SEQ ID NO:3所示,重链可变区的序列如SEQ ID NO:4所示,轻链互补决定区的序列分别如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7所示,重链互补决定区的序列分别如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10所示。

[0007] 本发明还可以提供编码上述针对HumanCD68的兔单克隆抗体的基因,或者包含该基因的表达载体或者宿主。

[0008] 本发明还可以提供兔单克隆抗体偶联物,主要由上述针对人CD68的兔单克隆抗体与抗原和/或荧光标记分子反应制备而成。

[0009] 本发明还可以提供针对HumanCD68的兔单克隆抗体在制备检测人CD68的试剂或者试剂盒中的应用。

[0010] 所述检测的方法为免疫检测,所述免疫检测为免疫组织化学法、免疫印迹法中的一种。

[0011] 本发明还提供用于制备针对HumanCD68的兔单克隆抗体的免疫原,所述免疫原为由蛋白KLH或BSA与如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15所示氨基酸序列片段合成的重组蛋白。

[0012] 本发明还提供针对Human CD68兔单克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:将编码针对HumanCD68的兔单克隆抗体的重链基因、轻链基因分别装载在表达载体上,转染宿主;培养获得包含兔单克隆抗体的上清液;纯化,即得。

[0013] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0014] 本发明选取人CD68蛋白第124-135、146-158位氨基酸片段为抗原,经与KLH或BSA偶联后为免疫原。利用免疫原对新西兰大白兔进行免疫,基于单个B淋巴细胞筛选和培养的单克隆抗体开发技术,获得抗CD68蛋白的兔单克隆抗体及重链序列、轻链序列。本发明制备得到的兔单克隆抗体具有高特异性,可以特异性识别含人CD68蛋白的细胞,适用于免疫学检测,特别是免疫组化检测人CD68蛋白。

### 附图说明

[0015] 图1为免疫印迹的方法检测N11874兔多克隆抗体针对细胞样本中CD68的识别特异性。

[0016] 图2为采用免疫组化检测人组织样本中N11874兔多克隆抗体的染色定位图。

[0017] 图3为实施例4中用免疫印迹的方法检测兔单克隆抗体针对细胞样本中CD68的识别特异性。

[0018] 图4为实施例5中采用免疫组化检测人组织样本中兔单克隆抗体的染色定位图。

[0019] 图5为实施例2中Human CD68的兔单克隆抗体的纯化胶图。

### 具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明,以使本领域的技术人员更加清楚地理解本发明。以下各实施例,仅用于说明本发明,但不止用来限制本发明的范围。基于本发明中的具体实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的情况下,所获得的其他所有实施例,都属于本发明的保护范围。

[0021] 在本发明实施例中,若无特殊说明,所有原料组分均为本领域技术人员熟知的市售产品;在本发明实施例中,若未具体指明,所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0022] 本发明筛选获得了针对Human CD68的兔单克隆抗体,其序列如下:

[0023] 轻链氨基酸序列:

[0024] MDTRAPTQLLGLLLLWLPATFAQVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQASQSVYDNNCAWFQQKPGQPP  
KLLIYDASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGEFSCNNECDVFGGGTEVVVKGDPVAPTCLI  
FPFSADLVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTC  
KVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO:1)。

[0025] 重链氨基酸序列:

[0026] METGLRWLLLVAVLKGVCQSVVEESGRLVTPGTPLTLCTTSGFSLSNYYMSWVRQAPGKGLKWIGV  
ITYHGKTSYASWAKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCVRDVGKSGWSYDAFNPWPGTLVTVSSGQPKAP  
SVFPLAPCCGDTSSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNV  
AHPATNTKVDKTVAPSTCSKPMCPPELPGGPSVIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQDDPEVQFTWYINNE  
QVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNAKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREEL  
SSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPTVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHN  
HYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO:2)。

[0027] 轻链可变区的氨基酸序列:

[0028] GLLLLWLPATFAQVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQASQSVYDNNCAWFQQKPG QPPKLLIYDAST

LASGVPSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGEFSCNNECDV FGGGTEVVVK (SEQ ID NO:3)。

[0029] 重链可变区的氨基酸序列:

[0030] QSVVEESGRLVTPGTPLTLTCTTSGFSLSNYYMSWVRQAPGKGLKWIGVITYHGK TSYASWAKGRFT  
ISRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCVRDVGKSGWSYDAFNPWPGPT LVTVSS (SEQ ID NO:4)。

[0031] 轻链互补决定区CDR1的序列:

[0032] QSVYDNNCAW (SEQ ID NO:5)。

[0033] 轻链互补决定区CDR2的序列:

[0034] LIYDASTLASGV (SEQ ID NO:6)。

[0035] 轻链互补决定区CDR3的序列:

[0036] LGEFSCNNECDVF (SEQ ID NO:7)。

[0037] 重链互补决定区CDR1的序列:

[0038] FSLSNYYMS (SEQ ID NO:8)。

[0039] 兔单克隆抗体重链互补决定区CDR2的序列:

[0040] WIGVITYHGKTSYASWAK (SEQ ID NO:9)。

[0041] 兔单克隆抗体重链互补决定区CDR3的序列:

[0042] YFCVRDVGKSGWSYDAFNP (SEQ ID NO:10)。

[0043] 上述针对HumanCD68的兔单克隆抗体为IgG型,可以特异性识别含人CD68蛋白的细胞,适用于免疫学检测。

[0044] 下面举例说明:

[0045] 实施例1

[0046] 本实施例提供重组人CD68蛋白免疫原的制备方法,具体包括如下步骤:

[0047] S1,按照Uniprot数据库中登录号为P34810的CD68蛋白序列:

[0048] MRLAVLFSGALLGLLAAQGTGNDCPHKKSATLLPSFTVTPVTESTGTTSHRRTKSHKTTTHRTTTTG  
TTHSGPTTATHNPTTSHGNVTVHPTSNSTATSQGPSTATHSPATTSHGNATVHPTSNSTATSPGFTSSAHPEPPP  
PSPSPSPTSKETIGDYTWNGSQPCVHLQAQIQIRVMYTTQGGGEAWGISVLNPNKTKVQGSCEGAHPHLLLSFPY  
GHLSFGFMQDLQQKVVVYLSYMAVEYNVSPHAAQWTFSAQNASLRDLQAPLGQSFSCSNSSIILSPAVHLDLLSLR  
LQAAQLPHTGVFGQSFSCPSDRSILLPLIIGLILLGLLALVLI AF CI IRRRPSAYQAL (SEQ ID NO:11)。

[0049] 筛选CD68蛋白序列的氨基酸片段:124-135AA (TSNSTATSPGFT,SEQ ID NO:12) 和  
146-158AA (YSPSPSPTSKETI,SEQ ID NO:13)。

[0050] 委托上海吉尔生化公司进行人工合成2条多肽抗原,序列分别如下:

[0051] 人抗原肽1序列:

[0052] TSNSTATSPGFT-C (SEQ ID NO:14)。

[0053] 抗原肽2序列:

[0054] YSPSPSPTSKETI-C (SEQ ID NO:15)。

[0055] 筛选CD68蛋白的124-135AA和146-158AA不能用于直接免疫,需要在末端增加一个  
Cys用于交联载体蛋白。

[0056] 将化学合成的2条多肽抗原 (SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15),按照1:1的等摩尔比  
混合均匀,溶解于交联缓冲液 (0.1M PB缓冲液pH 7.2,0.15MNaCl) 中,配制5mL、浓度约4mg/  
mL的多肽溶液备用。

[0057] S2,准确量取浓度6.15mg/mL的KLH载体蛋白(Merck,货号:374805)溶液4mL。

[0058] 称量10mg Sulfo-SMCC(Sigma,货号M6035),用2mL超纯水溶解配制成5mg/mL的Sulfo-SMCC溶液。

[0059] 将KLH载体蛋白溶液和Sulfo-SMCC溶液等体积混匀,用磁力搅拌器50~100rpm搅拌,室温(25℃)反应60min,得KLH载体蛋白反应产物液。

[0060] 将KLH载体蛋白反应产物液装入10kD透析袋,在PBS(pH 7.2)缓冲溶液中透析除去多余的Sulfo-SMCC。每隔3h换液一次,换液3-4次,得KLH载体蛋白反应产物纯化液。

[0061] S3,将透析完成后的KLH载体蛋白反应产物纯化液加入步骤S1中的多肽溶液中,混合均匀,然后室温(25℃)放置反应4h,得偶联产物溶液。

[0062] 最后用10kD透析袋,在PBS(pH 7.2)缓冲溶液中透析偶联产物溶液,除去游离未偶联的多肽。每隔2h换液一次,换液3-4次。

[0063] 透析完成后,用10kD的超滤管浓缩,将偶联产物(重组人CD68蛋白,抗原)浓度调整到约1mg/mL,分装成1mL每管备用。

[0064] 实施例2

[0065] 本实施例提供Human CD68兔单克隆抗体的制备方法,用来用于免疫学检测,特别是免疫组化检测人CD68蛋白。制备方法为基于单个B淋巴细胞筛选和培养的单克隆抗体开发技术,具体包括以下步骤:

[0066] S1,动物免疫:免疫原免疫4只新西兰大白兔。对兔子背部和腹部多点注射完全佐剂(Sigma,货号:F5881)和试验例1制备的重组人CD68蛋白(重量比1:1)。每隔2周进行重复免疫,重复免疫用不完全佐剂(北京博奥龙,货号:KX0210047Q-10)和试验例1制备的重组人CD68蛋白(重量比1:1),重复3次。其中,首免:每只兔子750μg多肽抗原,重复免疫:每只兔子350μg抗原。

[0067] S2,采血验证:免疫结束后1周,取兔血清进行WB(免疫印迹)与IHC(免疫组化)检测。4只兔子的血清编号:N11873,N11874,N11875,N11876。其中,血清编号为N11875的兔子多抗鉴定结果最好(结果见图1、图2,检测方法见实施例3、实施例4)。

[0068] S3,B淋巴细胞分选:参考专利文献CN110016462B(专利名称:从脾脏细胞中高效分离单个抗原特异性B淋巴细胞的方法)说明书中第[0030]-[0044]段的方法,针对血清编号为N11875的兔子进行B淋巴细胞分选。

[0069] S4,编码兔单克隆抗体基因的克隆:

[0070] 培养后的B细胞上清用抗原包被的ELISA与WB(免疫印迹)、IHC(免疫组化)来鉴定阳性克隆。阳性克隆的细胞收集裂解后用Quick-RNATM MicroPrep试剂盒(购自ZYMO公司)提取RNA,并反转录成cDNA。以cDNA为模板,采用PCR方法,将天然配对的兔单克隆抗体轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)基因从对应阳性克隆的cDNA中被扩增出来,挑选若干个克隆进行测序,测序工作由金开瑞生物科技有限公司完成。

[0071] 其中,PCR反应体系如下:4μL cDNA,1μL正向引物(10mM),1μL反向引物(10mM),12.5μL 2×Gloria HiFi(爱博泰克),6.5μL N.F H<sub>2</sub>O。

[0072] 轻链可变区引物对为:

[0073] VL-Primer-F:

[0074] 5'-tgaattcgagctcggtacctatggacacgagggcccccac-3'(SEQ ID NO:16);

[0075] VL-Primer-R:

[0076] 5'-cacacacacgatggtgactgttccagttgccacctgatcag-3' (SEQ ID NO:17);

[0077] 重链可变区引物对为:

[0078] VH-Primer-F:

[0079] 5'-tgaattcgagctcggtagccatggagactgggctgcgctg-3' (SEQ ID NO:18);

[0080] VH-Primer-R:

[0081] 5'-gtagcctttgaccaggcagcccagggtcaccgtggagctg-3' (SEQ ID NO:19)。

[0082] PCR扩增程序:98℃预变性30s,随后按照98℃10s,64℃30s,72℃30s的条件进行40次循环,最后在72℃保持5min,得到的反应液置于4℃保存。

[0083] 筛选获得的兔单克隆抗体的重链基因、轻链基因的测序结果如下:

[0084] 兔单克隆抗体的轻链核苷酸序列如下:

[0085] ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGACTCCTCTTGCTCTGGTTGCCTGG

[0086] AGCCACGTTTGCACAAGTTCTCACCCAGACACCGTCACCGGTGAGCGCTGCTGTTG

[0087] GCGGGACGGTCACTATAAATTGTCAAGCGTCTCAAAGCGTTTATGATAACAACA

[0088] GTGCATGGTTCCAGCAAAAGCCTGGTCAACCCCCCAAGCTGCTGATATACGATGCTT

[0089] CCACGCTGGCTTCCGGAGTTCCGTCCAGATTCAAGGAAGCGGCTCAGGCACACA

[0090] GTTCACCCTACAATTAGTGACGTTTCAGTGTGATGACGCGGCGACGTATTATTGTCT

[0091] GGGGAATTTAGTTGCAACAATGAATGTGATGTGTTCCGGCGGGGTACAGAGGTTG

[0092] TCGTCAAAGGTGATCCTGTGGCCCCGACAGTCTTGATCTTTCTCCCTCCGCTGATC

[0093] AGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGAT

[0094] GTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATCGAGAACA

[0095] GTAAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACA

[0096] CTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGG

[0097] GCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG (SEQ ID NO:20)。

[0098] 轻链可变区的核苷酸序列如下:

[0099] GGACTCCTCTTGCTCTGGTTGCCTGGAGCCACGTTTGCACAAGTTCTCACCCAGAC

[0100] ACCGTCACCGGTGAGCGCTGCTGTTGGCGGGACGGTCACTATAAATTGTCAAGCGT

[0101] CTCAAAGCGTTTATGATAACAACAACCTGTGCATGGTTCCAGCAAAAGCCTGGTCAA

[0102] CCCCCAAGCTGCTGATATACGATGCTTCCACGCTGGCTTCCGGAGTTCCGTCCAGA

[0103] TTCAAGGAAGCGGCTCAGGCACACAGTTCACCCTACAATTAGTGACGTTTCAGTG

[0104] TGATGACGCGGCGACGTATTATTGTCTGGGGGAATTTAGTTGCAACAATGAATGTGA

[0105] TGTGTTCCGGCGGGGTACAGAGGTTGTCGTCAAAGGTGATCCTGTGGCCCCGACAG

[0106] TCTTGATCTTTCTCCCTCC (SEQ ID NO:21)。

[0107] 兔单克隆抗体的重链核苷酸序列如下:

[0108] ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTGGCTGTCTGAAAGGCGTTCAATG

[0109] CCAGTCCGTCGAGGAATCTGGCGGTGCGCTGGTCAACCCCGGCACTCCGCTGACCC

[0110] TGACGTGTACGACGAGTGGATTCTCACTGTCAAACCTACTACATGAGCTGGGTCAGA

[0111] CAGGCACCGGGGAAGGGTTTGAATGGATAGGGTTATCACATAACCATGGCAAGAC

[0112] AAGCTATGCATCTTGGGCGAAGGGTAGGTTTACAATATCTCGCACGTCAACAACCGT

[0113] CGACTTGAAAATGACGAGCCTCACAACCTGAAGACACAGCAACGTA CTCTGCGTCC  
[0114] GCGACGTCGGCAAATCCGGCTGGAGCTATGATGCTTTTAATCCATGGGGCCCTGGGA  
[0115] CTTTGGTGACGGTCTCTAGCGGGCAGCCAAAAGCTCCGTCAGTGTTCCCATTGGCC  
[0116] CCGTGTTGTGGAGACACGCCAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAG  
[0117] GCTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCTCACCAATGGG  
[0118] GTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGT  
[0119] GGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCGTCACCTGCAACGTGGCCCACCCAGCC  
[0120] ACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCCATGT  
[0121] GCCCACCCCTGAACTCCCGGGGGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAAACCC  
[0122] AAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT  
[0123] GAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAACAACGAGCAGGTG  
[0124] CGCACCGCCCGGCCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGG  
[0125] TCAGCACCTCCCCATCGCGCACCCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTG  
[0126] CAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC  
[0127] AGAGGGCAGCCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGC  
[0128] TGAGCAGCAGGTCCGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCTTCCGAC  
[0129] ATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACCTACAAGACCACG  
[0130] CCGACCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCC  
[0131] CACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC  
[0132] TTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATAA (SEQ ID  
[0133] NO:22)。

[0134] 重链可变区的核苷酸序列如下：

[0135] GTGGCTGTCCTGAAAGGCGTTCAATGCCAGTCCGTCGAGGAATCTGGCGGTTCGCT  
[0136] GGTCACCCCGGCACTCCGCTGACCCTGACGTGTACGACGAGTGGATTCTCACTGT  
[0137] CAAACTACTACATGAGCTGGGTGACAGGCACCGGGGAAGGGTTTCAAATGGATA  
[0138] GGGGTTATCACATAACCATGGCAAGACAAGCTATGCATCTTGGGCGAAGGGTAGGTTT  
[0139] ACAATATCTCGCACGTCAACAACCGTCGACTTGAAAATGACGAGCCTCACAACCTGA  
[0140] AGACACAGCAACGTA CTCTGCGTCCGCGACGTCGGCAAATCCGGCTGGAGCTATG  
[0141] ATGCTTTTAATCCATGGGGCCCTGGGACTTTGGTGACGGTCTCTAGCGGGCAGCCAA  
[0142] AAGCTCCGTCAGTGTTCCCATTGGCCCCGTGTTGTGGAGACACG (SEQ ID NO:23)。

[0143] 根据核苷酸序列翻译推导出氨基酸序列，兔单克隆抗体的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1所示；兔单克隆抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ IDNO:2所示；兔单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3所示；兔单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4所示；兔单克隆抗体的轻链互补决定区CDR1的序列如 SEQ ID NO:5所示；兔单克隆抗体的轻链互补决定区CDR2的序列如 SEQ ID NO:6所示；兔单克隆抗体的轻链互补决定区CDR3的序列如 SEQ ID NO:7所示；兔单克隆抗体的重链互补决定区CDR1的序列如 SEQ ID NO:8所示；兔单克隆抗体的重链互补决定区CDR2的序列如 SEQ ID NO:9所示；兔单克隆抗体的重链互补决定区CDR3的序列如 SEQ ID NO:10所示。

[0144] S5,进一步采用如下方法制备并纯化获得本发明的兔单克隆抗体：



[0145] 将抗体重链和轻链的基因分别用同源重组的方式连接至到pcDNA3.1载体(购自 invitrogen)中,无内毒素质粒提取后共转染CHO细胞,转染72-96小时后,离心除去细胞,收集细胞上清。

[0146] 使用proteinA亲和凝胶树脂从转染后的培养基上清中纯化出重组的识别人CD68蛋白的兔单克隆抗体,使用12%SDS-PAGE凝胶电泳验证抗体纯度,验证合格(图5)后分装,于-20℃低温保存备用。

[0147] 实施例3

[0148] 本实施例使用免疫印迹的方法检测兔单克隆抗体针对细胞样本中CD68的识别特异性:

[0149] 取CD68的高表达细胞样本THP-1(白血病细胞单核细胞,中科院上海细胞库:TCHu 57)、中表达细胞样本U-937(白血病细胞原巨核细胞型,上海思路迪)和低表达细胞样本Jurkat(白血病急性T细胞,上海思路迪)作为抗体的检测用样本WB检测。

[0150] 将上述制备的细胞样本,SDS-PAGE电泳后,用电转仪将蛋白转移到NC膜上;之后,将NC膜置于5%的脱脂奶粉(PBS缓冲液+0.5%Tween-20溶液)中,37℃封闭2小时;其次,将NC膜置于杂交袋中,加入1:1000稀释的人CD68兔单克隆抗体(试验例2制备)2mL,4℃孵育过夜。用TBST洗膜后,加入1:10000稀释的羊抗兔二抗(Jackson ImmunoResearch),室温孵育1小时。再次TBST洗膜,加入ECL显色液,显影,结果见图3。

[0151] 由图3可以看出:细胞样本THP-1与U-937都检到了显著且单一的目的条带,细胞样本Jurkat未检测到明显的目的条带,检测趋势和表达量与预期相符。Human CD68蛋白全长为333AA,包含9个糖基化修饰位点,为重度糖基化蛋白,主要表达在巨噬细胞与部分肿瘤细胞中,因为重度糖基化蛋白在WB检测时在130~140KD。同时根据CST(CST:#86985)、Abcam(ab283654,ab955,ab213363)公司验证目的蛋白大小与表达量是与此结果相符的。

[0152] 实施例4免疫组化组织芯片染色和鉴定

[0153] (1) 芯片选择:人CD68蛋白在人样本中广泛表达,主要定位在巨噬细胞与部分肿瘤组织,选择人扁桃体、人结肠、人卵巢、人肝、人结外NK/T细胞淋巴瘤、人结肠浸润性腺癌、人子宫内膜样癌、人肝细胞癌、人前列腺腺癌、人高级别尿路上皮癌、人卵巢浆液性癌、人肝胆管癌、人恶性胶质瘤、人乳腺、人宫颈、人肺、人脑(神经元)、人乳腺浸润性导管癌、人宫颈鳞状细胞癌、人肺鳞癌、人小细胞肺癌、人胎盘、人子宫内膜间质肉瘤、人肺腺癌样本,用于免疫组化检测。

[0154] (2) IHC染色及分析

[0155] 样本准备,烤片:将石蜡24点组织芯片(百奥斯定制24点组织芯片)按同一朝向放置在切片架上,将其放入56℃的恒温箱中烤片30min;同时将脱蜡液(江原,货号:201029)1缸一起放入56℃的恒温箱中。

[0156] 脱蜡:将石蜡切片连同切片架一起放入脱蜡液1缸中,再一起从恒温箱中取出置于常温,5min后,将切片取出浸入到常温脱蜡液2缸中,并按照脱蜡液2、脱蜡液3、无水乙醇1、无水乙醇2、无水乙醇3的顺序依次将石蜡切片放入缸中,其中置于脱蜡液试剂缸时每缸放置5min,置于无水乙醇试剂缸中时每缸放置3min;用流水清洗切片3min。

[0157] 抗原修复:在高压锅中,加入抗原修复液(0.01M柠檬酸+0.3%二水合柠檬酸三钠,pH6.0),高火预热;待修复液沸腾后将切片置于其中,并完全浸泡组织,盖好锅盖,扣上压力

阀,高火继续加热;待限压阀开始转动喷气后调至中火,同时开始计时2min;计时结束后离开热源,自然降压后将高压锅移入冷水中缓慢冷却。待修复液温度降至室温。

[0158] 内源性过氧化物酶灭活:用PBS缓冲液浸洗3次,每次1min,去除切片上的缓冲液;将切片完全浸入到3%过氧化氢溶液中,室温,孵育10min。

[0159] 封闭:用PBS缓冲液浸洗3次,每次3min,去除切片上的缓冲液;在样本上滴加封闭液(5%空白山羊血清,博士德生物,货号:AR1009);将切片水平放置在底部呈有水的孵育湿盒中,于常温孵育30min。

[0160] 一抗孵育:去掉封闭液,每个切片上加1:8100倍用封闭液稀释的CD68兔单克隆抗体(试验例2制备),于常温孵育60min;去除抗体工作液,PBS缓冲液快速漂洗1次,用缓冲液PBS浸泡洗涤3次,每次3min。

[0161] 二抗孵育:在组织切片上滴加即用型二抗工作液(Dako,货号:K400311-2)后水平放置于孵育湿盒中,于常温孵育25min;去除切片上的试剂,缓冲液PBS快速漂洗1次,用缓冲液PBS浸泡洗涤3次,每次3min;浸泡洗涤期间需反复上下提拉多次。

[0162] 显色:在组织切片上滴加显色液液(DAKO,货号:K5007)工作液,显微镜下密切观察颜色变化情况,得到合适的染色强度后;将切片浸入大量蒸馏水中即可终止显色;终止显色后,将切片入流水中清洗10min。

[0163] 复染:将稍沥干的切片浸入Mayer's苏木素(AppliChem,货号:254766.1611)中复染切片1min,复染完成后,用流水清洗3min。

[0164] 返蓝:将稍沥干的切片浸入碳酸锂饱和水溶液中蓝化3s,用流水清洗3min。

[0165] 脱水:将清洗后的切片于无水乙醇中浸泡1次,浸泡期间需上下提拉数次,计时10s后,取出;置于恒温鼓风干燥箱中高温(54~58℃)下完全干燥。

[0166] 封片:在切片中心滴加适量中性树胶胶(国药,货号10004160),并加盖盖玻片,加胶量需适量,加封盖玻片后需完全覆盖组织,且不能有胶溢出。

[0167] 镜检:用显微镜观察并拍照。

[0168] 需要说明的是,免疫组化染色结果分为:阳性和阴性。阳性表达必须在细胞和组织特定的抗原部位才能视为阳性。

[0169] 采用实施例2筛选制备的抗人CD68兔单克隆抗体检测的结果表明:使用实施例2筛选制备的抗人CD68兔单克隆抗体在人肺、人卵巢、人宫颈、人结肠、人乳腺、人扁桃体、人恶性胶质瘤、人肝细胞癌、人肺鳞癌、人子宫内膜样癌、人宫颈鳞状细胞癌、人结肠浸润性腺癌、人乳腺浸润性导管癌、人结外NK/T细胞淋巴瘤、人脑(神经元)、人肝胆管癌、人肺腺癌、人卵巢浆液性癌、人子宫内膜间质肉瘤、人高级别尿路上皮癌、人胎盘、人前列腺腺癌、人小细胞肺癌的巨噬细胞与上皮细胞(百奥斯定制24点组织芯片)有特异性染色,阳性率100%=24/24。

[0170] 其中,在人脑、结肠、肝、肺和扁桃体组织中的染色显示结果见图2。图2结果显示,实施例2筛选制备的抗人CD68兔单克隆抗体染色定位准确,染色清晰且无非特异性染色,背景干净。人CD68兔单克隆抗体(试验例2筛选制备)阳性率100%=24/24。

[0171] 另外,需要说明的是,较克隆号KP1的CD68抗体(克隆号KP1,Abcam)吻合率为100%。相较于其它的CD68抗体,实施例2筛选制备的抗人CD68兔单克隆抗体能够在高稀释倍数的情况下仍然有高阳性率,同时背景更为干净,无非特异性染色,有效避免假阳性结果

(图4)。

[0172] 在此有必要指出的是,以上实施例仅限于对本发明的技术方案做进一步的阐述和说明,并不是对本发明的技术方案的进一步的限制,本发明的方法仅为较佳的实施方案,并非用于限定本发明的保护范围。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

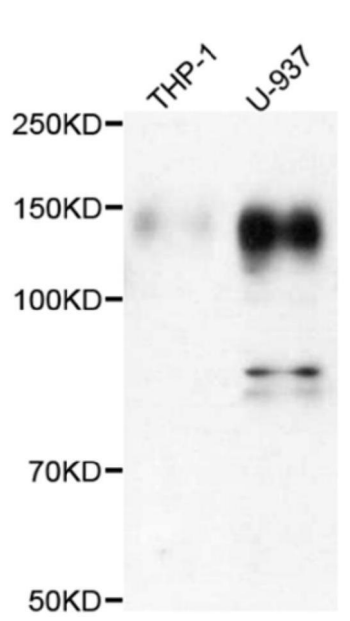


图1

人肝

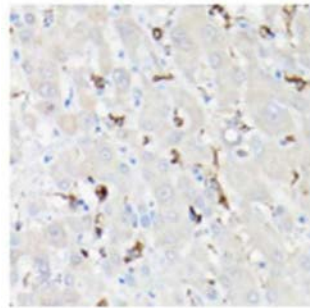


图2

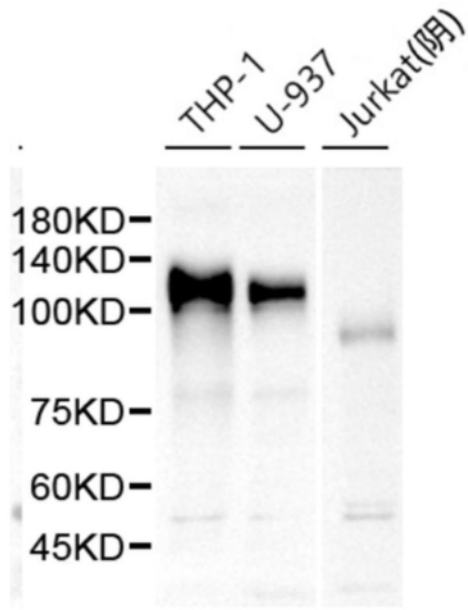


图3

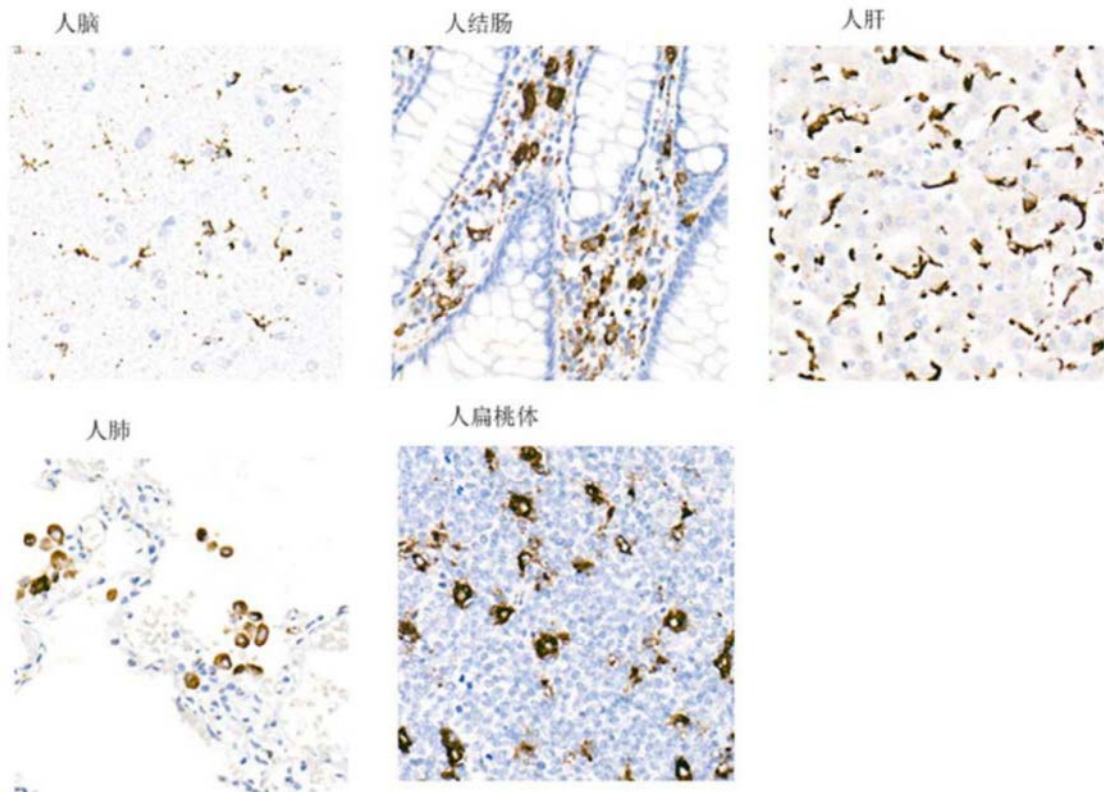


图4

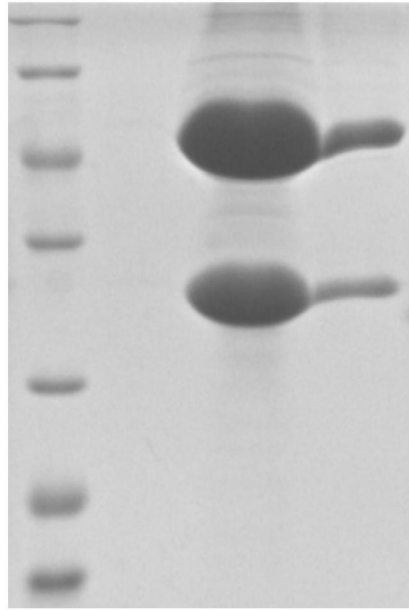


图5