



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103122032 A

(43) 申请公布日 2013.05.29

(21) 申请号 201210539705.1

(22) 申请日 2012.12.13

(83) 生物保藏信息

CGMCC No5828 2012.03.06

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 范祖森 叶步青 李翀 戴中华

周鹏 杜颖 王彦英 杨昭

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

抗小鼠 EID1 的单克隆抗体 1G10.7 和分泌该抗体的杂交瘤细胞系

(57) 摘要

本发明提供了一种产生抗小鼠 EID1 蛋白 (EIA 样分化抑制蛋白 1) 的单克隆抗体的杂交瘤细胞及其分泌的单克隆抗体 1G10.7, 该单克隆抗体与重组小鼠 EID1 及表达小鼠 EID1 的细胞 (如胚胎干细胞) 呈强阳性反应, 而与其它不表达 EID1 的细胞 (如分化类胚体) 无交叉反应。本发明还提供了使用单克隆抗体 1G10.7 检测 EID1 蛋白的含量的方法。

1. 一种抗小鼠 EID1 蛋白 (EIA 样分化抑制蛋白 1) 的单克隆抗体,其针对小鼠 EID1 蛋白的从氨基酸位置 69 至 108 的片段。
2. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体,其为 1G10.7,它由小鼠杂交瘤细胞系 1G10.7 (CGMCC No. 5828) 产生。
3. 一种产生抗小鼠 EID1 蛋白单克隆抗体 1G10.7 的杂交瘤细胞,其特征在于,它是保藏号为 CGMCC No. 5828 的小鼠杂交瘤细胞系 1G10.7。
4. 一种检测组织或细胞或其裂解液中 EID1 蛋白的含量的 EID1 蛋白含量的方法,该方法包括:(1) 将权利要求 1 所述的单克隆抗体 1G10.7 与待检测的分离的组织或细胞或其裂解液进行接触;和 (2) 判断是否有阳性反应。
5. 根据权利要求 4 的方法,其中所述阳性反应是通过免疫荧光检测进行判断的。
6. 一种检测组织或细胞或其裂解液的 EID1 蛋白含量的试剂盒,其包含权利要求 1 所述的单克隆抗体 1G10.7。
7. 一种检测组织或细胞或其裂解液的 EID1 蛋白含量的检测试剂,其包含权利要求 1 所述的单克隆抗体 1G10.7。
8. 权利要求 1 所述的单克隆抗体 1G10.7 在制备检测组织或细胞或其裂解液的 EID1 蛋白含量的试剂盒或检测试剂中的用途。

抗小鼠 EID1 的单克隆抗体 1G10.7 和分泌该抗体的杂交瘤细胞系

技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆抗体领域,更具体地,本发明涉及抗小鼠 EID1 蛋白 (EIA 样分化抑制蛋白 1) 的单克隆抗体 1G10.7,它是由小鼠杂交瘤细胞系 1G10.7 产生的。

背景技术

[0002] P300, CBP 及重要的抑癌基因 Rb 均在调控细胞周期及发育分化中发挥重要作用。这些分子生理上的重要意义体现在一旦对它们实施基因敲除,小鼠呈现胚胎致死的表型。同时它们的异常被报道导致鲁宾斯坦-泰比综合征等疾病。

[0003] P300/CBP 是体内重要的转录共活化因子和乙酰转移酶,对多种基因的转录调控,以及组蛋白等的乙酰化修饰发挥重要作用。特别是在一些重要的命运决定基因的启动子区,通过自身的组蛋白乙酰转移酶活性或招募其他的组蛋白乙酰转移酶,对转录激活发挥作用。在对 ES 细胞及 HSC 细胞自我更新及分化的调节中, p300 都被报道参与其中发挥重要作用。

[0004] EID1 (EIA-like inhibitor of differentiation 1, EIA 样分化抑制蛋白 1) 作为一类 Rb 结合蛋白被克隆出来,通过其上保守的 LXCXE 基序与 Rb, p300 及 CBP 结合。EID1 通过抑制 p300 的组蛋白乙酰转移酶活性而抑制多种分化基因的表达。目前被认为是与 p300 结合的抑制因子。通过上述机制调控 MyoD 的转录, EID1 已经显示出对肌肉分化调控的重要功能。同时 EID 1 还被报道可以与 Necdin, SF-1 等核受体结合并调控其表达水平。EID1 在人与小鼠序列中有比较高的同源性。其在心肌, 骨骼肌, 睾丸及脑等组织已被检测到高表达。EID1 及其对应的小 RNA miR138 均被报道在脂肪细胞分化中具有调控作用。故此目前 EID1 已经被定义为一种在分化发育过程中发挥重要作用的抑制基因。

[0005] 分化是发育生物学及细胞生物学研究的重要生理事件,分化的异常导致胚胎的死亡或多种疾病的发生,目前在生物医学领域应用人来源或小鼠来源的细胞,并且更为重要的,应用小鼠胚胎或各类组织研究发育与细胞分化已经成为主要的研究手段。随着 EID1 基因研究的不断深入,提供灵敏特异的单克隆抗体用于相关领域的科学研究及未来针对这一靶点的病理检测具有重要意义。但目前关于 EID1 的商业化抗体种类很少,且大部分是多克隆抗体,发展对 EID1 具有较强识别能力并且能在生物医学研究中广泛应用,产量稳定的单克隆抗体细胞株十分必要。

[0006] 抗小鼠 EID1 蛋白的单克隆抗体 1G10.7 的用途包括:用于检测组织和细胞或其裂解液中 EID1 蛋白的含量。

发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供一种抗小鼠 EID1 蛋白 (EIA-like inhibitor of differentiation 1, EIA 样分化抑制蛋白 1) 的单克隆抗体 1G10.7。

[0008] 本发明提供了一种抗小鼠 EID1 蛋白的单克隆抗体 1G10.7,其特征在于,它是由小

鼠杂交瘤细胞系 1G10.7 产生的。以重组小鼠 EID1 蛋白 (a. a. 69-a. a. 108) 免疫 Balb/C 小鼠,应用淋巴细胞杂交瘤技术制备的一株能稳定分泌特异性抗小鼠 EID1 蛋白单克隆抗体的细胞株 1G10.7。1G10.7 单抗与重组小鼠 EID1 蛋白及表达小鼠 EID1 蛋白的细胞(如胚胎干细胞)呈强阳性反应,而与其它不表达小鼠 EID1 蛋白的细胞(如分化类胚体细胞)无交叉反应。

[0009] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0010] 1. 一种抗小鼠 EID1 蛋白 (EIA 样分化抑制蛋白 1) 的单克隆抗体,其针对小鼠 EID1 蛋白的从氨基酸位置 69 至 108 的片段。

[0011] 2. 根据以上 1 所述的单克隆抗体,其为 1G10.7,它由小鼠杂交瘤细胞系 1G10.7 (CGMCC No. 5828) 产生。

[0012] 3. 一种产生抗小鼠 EID1 蛋白单克隆抗体 1G10.7 的杂交瘤细胞,其特征在于,它是保藏号为 CGMCC No. 5828 的小鼠杂交瘤细胞系 1G10.7。

[0013] 4. 一种检测组织或细胞或其裂解液中 EID1 蛋白的含量的 EID1 蛋白含量的方法,该方法包括:(1) 将以上 1 所述的单克隆抗体 1G10.7 与待检测的分离的组织或细胞或其裂解液进行接触;和(2) 判断是否有阳性反应。

[0014] 5. 根据以上 4 的方法,其中所述阳性反应是通过免疫荧光检测进行判断的。

[0015] 6. 一种检测组织或细胞或其裂解液的 EID1 蛋白含量的试剂盒,其包含以上 1 所述的单克隆抗体 1G10.7。

[0016] 7. 一种检测组织或细胞或其裂解液的 EID1 蛋白含量的检测试剂,其包含以上 1 所述的单克隆抗体 1G10.7。

[0017] 8. 以上 1 所述的单克隆抗体 1G10.7 在制备检测组织或细胞或其裂解液的 EID1 蛋白含量的试剂盒或检测试剂中的用途。

附图说明

[0018] 图 1 表示全长 159 个氨基酸的小鼠 EID1 蛋白全序列。

[0019] 图 2 表示 1G10.7 单抗在酶联免疫反应中对 EID1 蛋白的识别。

[0020] 图 3 表示 1G10.7 单抗细胞分泌上清按常规方法对小鼠 ES 细胞系 E14 的细胞裂解液进行 western blot。

[0021] 图 4 表示 1G10.7 单抗按常规方法对小鼠 ES 细胞(泳道 1) 及分化类胚体细胞(泳道 2) 的细胞裂解液进行 western blot。

[0022] 图 5 表示 1G10.7 单抗按常规方法对小鼠 ES 细胞进行免疫荧光染色检测,并与一种已知商业化抗体的比较(左:商业化 EID1 抗体;右:1G10.7)。

具体实施方式

[0023] EID1 通过其上保守的 LXCXE 基序与 Rb, p300 及 CBP 结合。EID1 通过抑制 p300 的组蛋白乙酰转移酶活性而抑制多种分化基因的表达,目前被认为是与 p300 结合的抑制因子。EID1 通过调控 MyoD 的转录调控肌肉分化过程。EID1 及其对应的小 RNA miR138 均报道在脂肪细胞分化中具有调控作用。故此,目前 EID1 已经被定义为一种在分化发育过程中发挥重要作用的抑制基因。

[0024] 目前为止,对于EID1在胚胎发育中的作用尚未阐明。我们采用原核及真核表达并纯化EID1,制备EID1的单抗研究了EID1在小鼠胚胎发育中的表达变化。结果发现EID1在未分化的ES细胞高表达,而在分化细胞中低表达。

[0025] 本发明包括:一种特异性的抗小鼠EID1单克隆抗体1G10.7,它是由小鼠杂交瘤细胞系1G10.7产生的。以重组小鼠EID1(aa69-aa108)免疫Balb/C小鼠,应用淋巴细胞杂交瘤技术制备的一株能稳定分泌特异性抗人膀胱癌单克隆抗体的细胞株1G10.7。

[0026] 本发明中的一种阳性杂交瘤细胞为抗小鼠EID1单克隆抗体杂交瘤细胞株1G10.7,其分类命名为小鼠抗人/鼠EID1单克隆抗体杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株于2012年3月6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(CGMCC,中国,北京市朝阳区北辰西路1号院3号,100101),保藏号为CGMCC No. 5828。

[0027] 本发明中的小鼠EID1单克隆抗体1G10.7的实验表明,1G10.7单抗与重组小鼠EID1及表达小鼠EID1的细胞呈强阳性反应,而与其它不表达小鼠EID1的细胞无交叉反应。

[0028] 本发明中的抗小鼠EID1单克隆抗体1G10.7具有以下的特点和性能:(1)与重组小鼠EID1呈强阳性反应;(2)与小鼠ES细胞系呈强阳性反应;(3)与分化类胚体细胞呈阴性反应。

[0029] 实施例1

[0030] 1G10.7单抗的制备和纯化

[0031] (1) 杂交瘤的制备

[0032] 以重组小鼠EID1蛋白(a. a. 69-a. a. 108)(如附图1所示的是小鼠EID1全长159氨基酸全序列。GenBank Accession No. NM 025613)免疫Balb/C小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),腹腔注射,每只小鼠每次50微克重组小鼠EID1。2周后对小鼠进行再次免疫,注射量和方法不变。待小鼠血清效价达到要求,即效价达到1:200以上,之后准备进行细胞融合,融合前三天对小鼠进行冲击免疫。

[0033] 在免疫小鼠的同时准备小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0(ATCC CRL-1772)。

[0034] 将致敏的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合(《实用免疫学》,杨廷彬主编,长春出版社,1994年12月出版),用HAT培养基(购于Invitrogen公司,HAT系次黄嘌呤(hypoxanthin)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidin)三种物质各英文首字之缀列,HAT培养基也就是指含有这三种物质的细胞培养基)进行选择培养(以小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞)。

[0035] 接着,用ELISA方法检测杂交瘤细胞培养上清:以重组小鼠EID1包被96孔板,4℃过夜。用含0.05% tween-20的磷酸盐缓冲液洗涤3次,加待检上清100μl,37℃孵育1h。用含0.05% tween-20的磷酸盐缓冲液洗涤3次,加酶标二抗(抗小鼠IgG-HRP)(购自北京中杉金桥生物技术有限公司),37℃孵育1h。洗涤3次,加底物显色剂四甲基联苯胺(TMB)(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)50μl,室温静置5分钟,加终止液(2mol/L的硫酸)50μl。结果用BIORAD 680型酶标仪测定,检测波长为450nm值,OD值高于阴性对照2倍以上者可视为阳性。

[0036] 然后,将选出的阳性杂交瘤细胞克隆化培养(有限稀释法,以小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞)。经过2-3轮克隆化培养,获得稳定的能够产生高效价单抗的杂交瘤细胞克隆。将杂交瘤细胞克隆扩大培养,并冻存保种。

[0037] 本发明中的一种阳性杂交瘤细胞为抗小鼠 EID1 杂交瘤细胞系 1G10.7, 该杂交瘤细胞系于 2012 年 03 月 6 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 (CGMCC, 中国, 北京), 保藏号为 CGMCC No. 5828。

[0038] (2) 1G10.7 单抗的制备和纯化

[0039] 将上述杂交瘤细胞 1G10.7 接种至 Ba1b/C 小鼠腹腔, 制备腹水, 再从腹水中提取单抗。单抗 1G10.7 的纯化: 采用 Protein G 亲和层析法。首先制备 Protein G 亲和层析柱 (购于“GE”公司), 用 PBS (磷酸盐缓冲液) 平衡柱子后, 取含 1G10.7 单抗的腹水过柱, 然后用 PBS 洗柱子, 至 OD 值接近于零, 以 0.2M 的甘氨酸-HCl 溶液 (pH 2.8) 洗脱, 收集洗脱液, 测定各收集管的 OD 值, 保留峰值区的洗脱液, 洗脱液经透析浓缩后 -20℃ 冻存。

[0040] 实施例 2

[0041] 1G10.7 单抗的鉴定

[0042] 使用在实施例 1 中制备的 1G10.7 单抗, 按常规方法对在实施例 1 中所述的重组小鼠 EID1 蛋白进行 ELISA 检测 (对照为正常 sp2/0 细胞培养上清), 结果如图 2 所示。结果表明, 1G10.7 单抗与重组小鼠 EID1 蛋白呈强阳性反应。

[0043] 在实施例 1 中制备的 1G10.7 单抗, 按常规方法对小鼠 ES 细胞系 (小鼠胚胎干细胞系购自美国 Millipore 公司, 商品目录号 SCR089) 的细胞裂解液进行 Western blotting 反应。结果如图 3 表明, 1G10.7 单抗与表达小鼠 EID1 的细胞呈强阳性反应。

[0044] 在实施例 1 中制备的 1G10.7 单抗, 按常规方法对小鼠 ES 细胞系及诱导分化的类胚体细胞裂解液进行 Western blotting 反应。结果如图 4 表明 (其中 EID1 表示本发明的抗 EID1 的 1G10.7 单抗), 1G10.7 单抗与表达小鼠 EID1 的胚胎干细胞呈强阳性反应, 而不表达 EID1 的分化类胚体细胞反应呈阴性 (注: 图 4 中的 Oct4 是胚胎干细胞最重要的转录因子和干细胞性标志物之一, 用 Oct4 蛋白表达量的下调指示分化诱导的成功, 从结果可以看出: 成功诱导分化后胚胎干细胞 Oct4 表达显著下降, 1G10.7 单抗与小鼠胚胎干细胞呈强阳性反应, 而与不表达 EID1 的分化类胚体细胞反应呈阴性)。

[0045] 用 1G10.7 单抗及另一种商业化 EID1 抗体 (购自美国 Santa Cruz 公司, 目录号 sc-98923) 按常规方法对小鼠胚胎干细胞 (ES, 购自美国 Millipore 公司, 商品目录号 SCR089) 进行免疫荧光检测。简而言之, 将小鼠胚胎干细胞 (ES) 常规培养至合适密度后, 以 4% 多聚甲醛对细胞室温固定 15 分钟, 磷酸缓冲液洗涤 3 次, 0.5% Triton 破膜处理 20 分钟, 磷酸缓冲液洗涤 3 次, 以 10% 驴血清封闭 1 小时, 将商业化 EID1 抗体与 1G10.7 单抗 1 : 1000 稀释于 10% 驴血清 - 磷酸缓冲液 4 度染色过夜, 磷酸缓冲液洗涤 3 次, Alexa-594 荧光标记二抗 (购自美国 Santa Cruz 公司) 1 : 400 稀释于 10% 驴血清 - 磷酸缓冲液室温染色 1 小时, 磷酸缓冲液洗涤 3 次, 封片并在激光共聚焦显微镜 Olympus FV1000 下观察拍照。

[0046] 结果如图 5 所示。目前商业化可得的识别小鼠 EID1 的抗体种类很少, 能用于免疫印迹及免疫荧光检测的单克隆抗体很难找到。我们的检测结果如附图 5 所示, 较之目前商业化的 EID1 抗体, 1G10.7 单抗在小鼠胚胎干细胞克隆上染色阳性更为明确, 并显示明显更为清晰的核定位信号, 这与 EID1 已知的研究结果相符。即本发明的抗小鼠 EID1 单抗不仅灵敏度高得多, 而且特异性更强。

[0047] 尽管本发明的具体实施例已经描述如上, 但是可以知道本发明可以进行除了上述

说明以外的实践。本发明的保护范围不受说明书的限制。

1 maemaelcel yeesnelqmd vlpgegymev grgargpape egpmeeeagp aaaraqrglf
61 peagadlegd efddweddye fpeeerwsa mhrvsaalee ankvflrtar agdaldggfq
121 arcekspfdq lafieelfsl mvvnrlteel gdeiidre

图 1

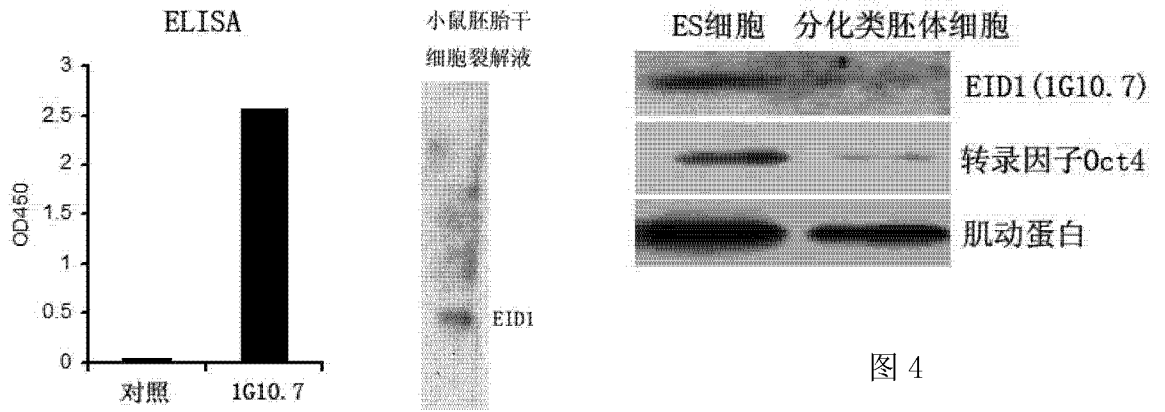


图 2

图 3

图 4

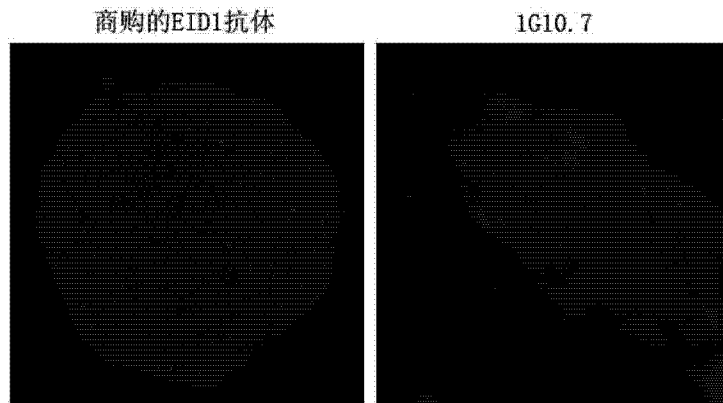


图 5