



(21) 申请号 202510526715.9

(22) 申请日 2025.04.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 120040586 A

(43) 申请公布日 2025.05.27

(73) 专利权人 苏州方科生物科技有限公司
地址 215100 江苏省苏州市工业园区崇文
路100号1幢实验楼2楼
专利权人 苏州系统医学研究所
江西省人民医院

(72) 发明人 王雅楠 杨衡 马瑜婷 段利华

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332
专利代理师 巩克栋

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104422763 A, 2015.03.18

审查员 张智贤

权利要求书1页 说明书8页

序列表(电子公布) 附图1页

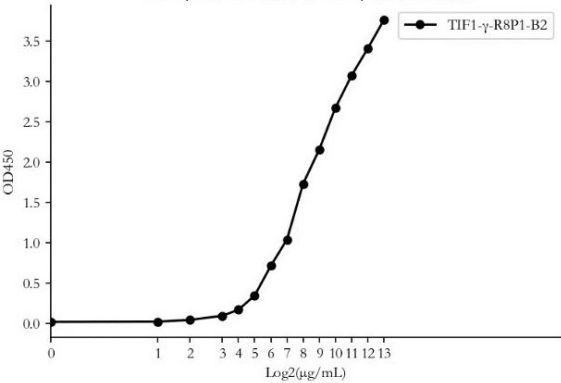
(54) 发明名称

一种识别TIF1- γ 的抗体及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域,提供了一种识别TIF1- γ 的抗体及其应用,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示;所述重链可变区包括如SEQ ID NO:2所示的CDR1,如SEQ ID NO:3所示的CDR2,如SEQ ID NO:4所示的CDR3;所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:6所示的CDR1,CDR2为DVN,如SEQ ID NO:7所示的CDR3。本发明的抗体具有特异性好、亲和力强的特点,能够用于定量检测DM患者中抗TIF1- γ 自身抗体水平,从而监测病情活动度,可用于DM患者的临床诊断。

TIF1- γ -R8P1-B2抗体与TIF1- γ 的ELISA检测



1. 一种识别TIF1- γ 的抗体,其特征在于,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示;

所述重链可变区包括如SEQ ID NO:2所示的CDR1,如SEQ ID NO:3所示的CDR2,如SEQ ID NO:4所示的CDR3;

所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:6所示的CDR1,CDR2为DVN,如SEQ ID NO:7所示的CDR3。

2. 根据权利要求1所述的识别TIF1- γ 的抗体,其特征在于,所述抗体的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;所述抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

3. 一种制备权利要求1或2所述的识别TIF1- γ 的抗体的方法,其特征在于,所述方法包括:合成编码权利要求1或2所述的识别TIF1- γ 的抗体的核酸分子,构建重组表达载体,并将所述重组表达载体导入宿主细胞中,筛选阳性宿主细胞进行培养,得到识别TIF1- γ 的抗体。

4. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1或2所述的识别TIF1- γ 的抗体。

5. 一种表达盒,其特征在于,所述表达盒中含有编码权利要求1或2所述的识别TIF1- γ 的抗体的核酸分子。

6. 一种重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体中含有权利要求4所述的核酸分子或权利要求5所述的表达盒。

7. 一种重组细胞,其特征在于,所述重组细胞表达权利要求1或2所述的识别TIF1- γ 的抗体。

8. 一种检测TIF1- γ 的免疫组化试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中含有权利要求1或2所述的识别TIF1- γ 的抗体;以及抗原修复缓冲液、封闭液、酶标二抗、显色剂或苏木素复染液中的任意一种或至少两种的组合。

9. 一种检测TIF1- γ 的酶联免疫吸附检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中含有权利要求1或2所述的识别TIF1- γ 的抗体;以及封闭液、酶标二抗、显色液或终止液中的任意一种或至少两种组合。

10. 权利要求1或2所述的识别TIF1- γ 的抗体、权利要求8所述的检测TIF1- γ 的免疫组化试剂盒或权利要求9所述的检测TIF1- γ 的酶联免疫吸附检测试剂盒中任意一种或至少两种的组合在制备用于诊断和/或检测特发性炎性肌病的产品中的用途。

一种识别TIF1- γ 的抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种识别TIF1- γ 的抗体及其应用。

背景技术

[0002] TIF1- γ (Transcriptional Intermediary Factor 1 Gamma),也称为TRIM33 (Tripartite Motif Containing 33),是一种转录调控蛋白,其属于TIF1家族。它通过参与染色质重塑和转录调控,在细胞分化、发育和肿瘤发生中发挥重要作用。早期发现TIF1- γ 在胚胎发育和细胞分化中具有关键作用。进一步研究发现TIF1- γ 通过结合染色质和转录因子调控基因表达,它参与TGF- β 信号通路,影响细胞增殖和分化。

[0003] TIF1- γ 抗体在癌症诊断和预后评估中显示出潜力,特别是在自身免疫性疾病和癌症的免疫治疗中。抗TIF1- γ 抗体为DM特异性的新型自身抗体,也称抗p155或抗155/140抗体。因TIF1- γ 可作为转录辅助因子阻断TGF- β /Smad信号通路而受到广泛的关注。临床上成人DM患者中抗TIF1- γ 抗体与恶性肿瘤的发生相关。典型的TGF- β 信号通路首先是TGF- β 与II型TGF- β 受体(TGF β RII)结合,然后与I型TGF- β 受体(TGF β RI)形成复合物使之激活,TGF β RI磷酸化激活R-Smad (Smad1、2、3、5、8)成员,R-Smad再与Co-Smad (Smad4)结合形成复合物转入细胞核内调控靶基因的转录。

[0004] TIF1- γ 蛋白属于TRIMs (Tripartite motif-containing)家族蛋白,具有一个RING结构域,可作为泛素连接酶E3发挥作用,在肿瘤发生过程中扮演着重要的角色,如参与凋亡相关蛋白P53的调控、抑制TGF- β 信号通路的活性等,推测这些蛋白的自身抗体可能是肿瘤发生过程中产生的,从而促进癌症的发生。因此,测定DM患者中抗TIF1- γ 自身抗体水平,为DM合并恶性肿瘤的发病机制研究奠定了实验基础,为临床对IIM患者进行疾病预判、预后评估和治疗方案的选择提供了重要的线索。

[0005] TIF1- γ 抗体阳性DM患者的检测方式和治疗方案均缺乏特异性,疗效差且疗程长。国内针对抗TIF1- γ 抗体检测方法均为定性的免疫印迹法和免疫膜条法,检测结果一致性较差,且无法定量检测患者血清中抗TIF1- γ 抗体水平。目前对于快速准确诊断此类疾病并定量检测患者血清中抗TIF1- γ 抗体水平缺乏有效检测手段。因此,提供一种新的抗TIF1- γ 单克隆抗体对IIM患者的疾病预判、预后评估和治疗具有重要意义。

发明内容

[0006] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种识别TIF1- γ 的抗体及其应用。本发明以TIF1- γ 抗体阳性患者PBMC构建噬菌体人源抗体库,通过与TIF1- γ 特异性结合,从而筛选到特异性结合TIF1- γ 的人源性抗TIF1- γ 抗体,所述抗体活性高、稳定性好,且具有较强的特异性,能定量检测DM患者中抗TIF1- γ 自身抗体水平。

[0007] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 第一方面,本发明提供一种识别TIF1- γ 的抗体,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示;

[0009] 所述重链可变区包括如SEQ ID NO:2所示的CDR1,如SEQ ID NO:3所示的CDR2,如SEQ ID NO:4所示的CDR3;

[0010] 所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:6所示的CDR1,CDR2为DVN,如SEQ ID NO:7所示的CDR3。

[0011] 本发明分离了TIF1- γ 抗体阳性患者的PBMC并提取RNA,采用RT-PCR技术将质检合格的RNA反转录成cDNA,扩增其中全部的抗体VH、VL基因片段,并构建抗体文库;通过噬菌体展示技术表达和筛选高亲和力的抗体。

[0012] 优选地,所述抗体的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,所述抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0013] 第二方面,本发明提供一种制备第一方面所述的识别TIF1- γ 的抗体的方法,所述方法包括:合成编码第一方面所述的识别TIF1- γ 的抗体的核酸分子,构建重组表达载体,并将所述重组表达载体导入宿主细胞中,筛选阳性宿主细胞进行培养,得到识别TIF1- γ 的抗体。

[0014] 第三方面,本发明提供一种核酸分子,所述核酸分子编码第一方面所述的识别TIF1- γ 的抗体。

[0015] 第四方面,本发明提供一种表达盒,所述表达盒中含有编码第一方面所述的识别TIF1- γ 的抗体的核酸分子。

[0016] 第五方面,本发明提供一种重组表达载体,所述重组表达载体中含有第三方面所述的核酸分子或第四方面所述的表达盒。

[0017] 第六方面,本发明提供一种重组细胞,所述重组细胞表达第一方面所述的识别TIF1- γ 的抗体。

[0018] 第七方面,本发明提供一种检测TIF1- γ 的免疫组化试剂盒,所述试剂盒中含有第一方面所述的识别TIF1- γ 的抗体,以及抗原修复缓冲液、封闭液、酶标二抗、显色剂或苏木素复染液中的任意一种或至少两种的组合。

[0019] 第八方面,本发明提供一种检测TIF1- γ 的酶联免疫吸附检测试剂盒,所述试剂盒中含有第一方面所述的识别TIF1- γ 的抗体,以及封闭液、酶标二抗、显色液或终止液中的任意一种或至少两种组合。

[0020] 第九方面,本发明提供第一方面所述的识别TIF1- γ 的抗体、第七方面所述的检测TIF1- γ 的免疫组化试剂盒或第八方面所述的检测TIF1- γ 的酶联免疫吸附检测试剂盒中任意一种或至少两种的组合在制备用于诊断和/或检测特发性炎性肌病的产品中的用途。

[0021] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0022] 本发明经过多轮抗体噬菌体库的筛选,并结合ELISA鉴定,筛选得到一种高亲和力的抗体,命名为TIF1- γ -R8P1-B2,所述抗体活性高、稳定性好,且具有较强的特异性,能定量检测DM患者中抗TIF1- γ 自身抗体水平,在特发性炎性肌病的检测和诊断中具有重要应用价值。

附图说明

[0023] 图1是ELISA检测抗体不同稀释浓度条件下的OD值结果。

具体实施方式

[0024] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0025] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

[0026] 实施例1

[0027] 1、构建人源ScFv噬菌体展示文库

[0028] (1)分离TIF1- γ 抗体阳性患者的PBMC

[0029] 取一支无菌离心管,加入5 mL淋巴细胞分离液,然后缓慢加入血液样本。20℃环境下,500 g离心25分钟。离心后,小心吸取离心管中的环状乳白色(人)淋巴细胞层转移到新离心管中。向含有(人)淋巴细胞的离心管中加入10 mL PBS,混匀细胞。250 g,离心10分钟,弃上清。用5 mL PBS重悬所得细胞,250 g,离心10分钟,弃上清。用5 mL PBS重悬所得细胞,250 g,离心10分钟,弃上清。用0.5 mL PBS重悬所得细胞备用。

[0030] (2)提取RNA并对RNA进行质检

[0031] 将-80℃保存的PBMC(Trizol)常温下解冻。每管加入1/5体积的氯仿。震荡15s,充分乳化,使溶液呈乳白色。静置5分钟。12000 rpm,4℃离心15分钟。取无色上清,加入等体积异丙醇。上下颠倒混匀-20℃静置10分钟。12000 rpm,4℃离心10分钟,弃上清。沿管壁缓慢加入75%乙醇。轻轻上下颠倒洗涤离心管。12000 rpm,4℃离心5分钟,弃上清。超净台室温干燥2-5分钟,加入适量RNase-free水溶解。

[0032] (3)RNA反转录

[0033] 配制反转录扩增PCR反应体系,扩增采用的酶为Phanta® Max超保真DNA聚合酶(Phanta® Max超保真DNA聚合酶,货号P505-d3,厂家Vazyme),扩增反应体系如表1所示。

[0034] 表1

[0035]	组成	用量
	2×Phanta Max 缓冲液	25 μ L
	Phanta®Max 超保真 DNA 聚合酶	1 μ L
	dNTP 预混液	1 μ L
	cDNA	2 μ L
	重链/轻链可变区上游引物(F)	2 μ L
	重链/轻链可变区下游引物(R)	2 μ L
	ddH ₂ O	17 μ L

[0036] 其中,所述重链可变区上游引物F包括:

[0037] 5' L-VH 1:acaggtgccactcccaggtgcag。(SEQ ID NO:12)

[0038] 5' L-VH 3:aaggtgtccagtgtgargtgcag。(SEQ ID NO:13)

[0039] 5' L-VH 4/6:cccagatgggtcctgtcccaggtgcag。(SEQ ID NO:14)

- [0040] 5' L-VH 5/7:caaggagtctgttccgaggtgcag。(SEQ ID NO:15)
- [0041] 所述轻链可变区上游引物F包括:
- [0042] 5' L VK 1/2:atgaggstcccygctcagctgctgg。(SEQ ID NO:16)
- [0043] 5' L VK 3:ctcttcctcctgctactctggctcccag。(SEQ ID NO:17)
- [0044] 5' L VK 4/5:atttctctgttgctctggatctctg。(SEQ ID NO:18)
- [0045] 5' L Vλ 1:ggtcctgggcccagctctgtgctg。(SEQ ID NO:19)
- [0046] 5' L Vλ 2:ggtcctgggcccagctctgccctg。(SEQ ID NO:20)
- [0047] 5' L Vλ 3:gctctgtgacctcctatgagctg。(SEQ ID NO:21)
- [0048] 5' L Vλ 4/5:ggtctctctcscagcytgctgctg。(SEQ ID NO:22)
- [0049] 5' L Vλ 6:gttcttgggccaattttatgctg。(SEQ ID NO:23)
- [0050] 5' L Vλ 7:ggtccaattcycaggctgtggtg。(SEQ ID NO:24)
- [0051] 5' L Vλ 8/9/10:gagtggattctcagactgtggtg。(SEQ ID NO:25)
- [0052] 所述重链可变区下游引物R包括:
- [0053] 3' VH:ACTCGAGACGGTGACCAGGGTGCC。(SEQ ID NO:26)
- [0054] 所述轻链可变区下游引物R包括:
- [0055] 3' CK:tgctgtccttgctgtcctgct。(SEQ ID NO:27)
- [0056] 3' Cλ:caccagtgtggccttggtggccttg。(SEQ ID NO:28)
- [0057] 反转录扩增PCR的程序为:预变性,95℃,3 min;变性,95℃,15 s;退火,56℃,15 s;延伸(1),72℃,20 s;延伸(2),72℃,5 min;4℃,保温。其中,变性,退火,延伸(1)这三个步骤,重复30次。
- [0058] (4) 构建VK文库和Vλ文库
- [0059] 载体片段:
- [0060] 消化pATA-scFv-2质粒(厂家ProteoGenix):将pATA-scFv质粒于37℃,5 h双酶切(NheI + NotI),切胶并回收酶切后载体。
- [0061] PCR产物片段:
- [0062] 消化VK和Vλ片段的PCR产物:将PCR获得的VK,Vλ片段于37℃,5 h双酶切(NheI + NotI),切胶并回收酶切后片段。
- [0063] 载体与PCR产物片段连接:将消化后的pATA-scFv-2质粒与VK片段连接得到pATA-VK质粒。将消化后的pATA-scFv-2载体与Vλ片段连接得到pATA-Vλ质粒。
- [0064] 转化TG1感受态细胞(TG1电感受态细胞,货号60502,厂家Lucigen):将所得的pATA-VK质粒和pATA-Vλ质粒分别电转入TG1感受态细胞中,收集所有的电转化培养基。连续稀释10 μL培养物到90 μL SOC培养基中,涂布于LB/Amp/葡萄糖琼脂平板上。37℃孵育过夜。通过计数菌落数量,乘以培养体积,除以平板接种体积,计算转化子总数。
- [0065] (5) 构建VL-VH文库
- [0066] 载体片段:
- [0067] 消化pATA-scFv-VK质粒和pATA-scFv-Vλ质粒:将pATA-scFv-VK质粒及pATA-scFv-Vλ分别用SfiI和XhoI双酶切,切胶并回收酶切载体。
- [0068] PCR产物片段:
- [0069] 消化VH片段的PCR产物:将PCR获得的VH片段用SfiI和XhoI双酶切,切胶并回收酶

切后片段。

[0070] 载体与PCR产物片段连接:将消化后的pATA-scFv-VK质粒与VH片段链接得到pATA-scFv-KH质粒;将消化后的pATA-scFv-V λ 质粒与VH片段链接得到pATA-scFv- λ H质粒。

[0071] 转化TG1感受态细胞:将所得的pATA-scFv-KH质粒和pATA-scFv- λ H质粒电转入TG1感受态细胞中,收集所有的电转化培养基。连续稀释10 μ L培养物到90 μ L SOC培养基中,涂布于LB/Amp/葡萄糖琼脂平板上。37°C孵育过夜。通过计数菌落数量,乘以培养体积,除以平板接种体积,计算转化子总数。

[0072] (6)文库评估

[0073] 菌落PCR:以构建好的文库为模板,进行PCR。PCR的体系如表2所示,PCR程序入表3所示。

[0074] 表2

组分	用量
2 $\times$ T5 快速扩增 PCR 预混液	5 μ L
pATA-scFv-2 载体鉴定上游引物 (F)	0.2 μ L
pATA-scFv-2 载体鉴定下游引物 (R)	0.2 μ L
模板	1 μ L
ddH ₂ O	3.6 μ L

[0076] 表3

PCR 反应步骤	反应条件
变性前	98°C, 3 min
变性	98°C, 10 s
退火	56°C, 10 s
延伸 (1)	72°C, 20 s
变性, 退火, 延伸 (1)	循环 30 次
延伸 (2)	72°C, 2 min
保存	4°C, 保温

[0078] pATA-scFv-2载体鉴定上游引物(F):agcggataacaatttcacacagga (SEQ ID NO: 29)。

[0079] pATA-scFv-2载体鉴定下游引物(R):gcccccttatttagcgtttgccatc (SEQ ID NO: 30)。

[0080] 经过菌落PCR,结果表明,PCR的片段大小均符合预期 1.1-1.3kb左右,说明文库的插入率达到了100%。

[0081] (7)制备展示抗体的噬菌体颗粒。

[0082] 将原始菌液接种于2YT-Amp-Glucose培养基中,使菌液OD=0.1,37°C,220 rpm培养至OD₆₀₀达到0.4-0.6。

[0083] 培养基中加入辅助噬菌体 (M13K07辅助噬菌体,货号N0315S,厂家NEB)。37°C静置30分钟后,220 rpm,培养45-60分钟。

[0084] 离心菌液,弃上清。用同等体积的2YT-Amp-Kan 培养基重悬菌体。30°C,220 rpm,培养过夜。

[0085] 离心菌液,将上清转入新的离心管中。加入1/4体积的5×PEG/NaCl溶液。充分混匀后,冰上静置1-2 h。以10000 g离心30分钟,收集沉淀并用PBS缓冲液重悬,4℃短期保存或加入甘油后-80℃长期保存。

[0086] 2、抗体筛选

[0087] (1) 免疫管固相淘选

[0088] 抗原包被:包被离心管,4℃孵育过夜。抗原组:1 mL TIF1- γ 转染液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对照组:500 μL 转染液(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。第二天弃掉离心管中液体,用5 mL 0.05% PBST洗涤三遍。

[0089] 封闭:在管中加入5 mL 5%脱脂牛奶或1%酪蛋白(PBST溶解),37℃封闭1小时。弃掉离心管中液体,用5 mL PBS洗涤一遍。

[0090] 噬菌体文库与抗原结合:1×10¹² pfu噬菌体文库(或者上一轮的扩增噬菌体)用5%脱脂牛奶或1%酪蛋白(PBST溶解)+100 μg 对照his蛋白(带有相同his标签的无关蛋白)室温负筛30分钟,将负筛后的文库加入到免疫管中,30℃孵育2小时。弃掉离心管中液体,用5 mL 0.05% PBST洗涤4-6次。

[0091] 洗脱:用1 mL的甘氨酸-盐酸(pH=2.2)洗脱噬菌体,室温振荡孵育6-8分钟左右,加入120-130 μL 的Tris-HCl(pH=9.6)中和溶液至pH=7.0-8.0。将洗脱后的噬菌体稀释后,侵染对数期的大肠杆菌TG1,铺板测定滴度。

[0092] (2) 洗脱噬菌体的扩增

[0093] 吸取洗脱后的噬菌体,加入到对数期的大肠杆菌TG1菌液中,37℃静置30分钟后,220 rpm培养30分钟-1小时。培养基中加入抗生素Amp,37℃、220 rpm培养至菌液OD=0.4-0.6左右。在菌液中加入辅助噬菌体,37℃静置30分钟后,220 rpm培养45分钟-1小时。3000-5000 rpm离心菌液,弃上清,用同等体积2YT-Amp-Kan培养基重悬菌体,30℃、220 rpm培养过夜。次日,4℃、8000 rpm离心菌液20分钟,将上清转入新的离心管中;加入1/4体积的5×PEG/NaCl溶液,充分混匀后,放置冰上或者4℃,静置1-2小时。4℃、8000 rpm离心30分钟,弃上清;沉淀用1 mL左右PBS重悬;12000 rpm离心5分钟,将上清转入到新的离心管中。将扩增后噬菌体稀释,侵染对数期的TG1,铺板测定滴度。

[0094] TIF1- γ 转染液中的TIF1- γ 蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示。

[0095] 重复上述免疫管固相淘选和洗脱噬菌体的扩增步骤。

[0096] 3、单克隆分离与鉴定

[0097] (1) 从最后一轮筛选中挑取单克隆进行扩增,并对阳性单克隆噬菌体进行ELISA验证。

[0098] 将最后一轮的洗脱phage(噬菌体)稀释到合适的浓度,侵染对数期的TG1,铺板。

[0099] 次日,从板上挑取单克隆接入600 μL 2YT-Amp-Glucose 培养基中37℃ 250 rpm振荡培养2 h,至菌液OD=0.4-0.6后加入辅助噬菌体。37℃静置30分钟,250 rpm,振荡培养45分钟。离心5分钟,弃上清。每孔用2YT-Amp-Kan培养基重悬菌液,30℃,250 rpm,振荡培养过夜。

[0100] 次日,离心10-15分钟,取上清进行ELISA实验。包被免疫板:抗原蛋白(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 缓冲体系为PBS),100 μL ,4℃过夜。对照孔包被100 μL PBS。300 μL PBST洗涤3次。300 μL 5%脱脂牛奶/PBST 30℃封闭1小时。300 μL PBST洗涤3次。每孔中加入100 μL 噬菌体上清液,

30℃孵育1小时。300 μL PBST洗涤3次。加入100 μL二抗稀释液(anti-M13-HRP, 1:5000), 30℃孵育1小时。300 μL PBST洗涤3次。加入100 μL显色液TMB避光显色5分钟, 加入100 μL 2 M HCl终止反应。酶标仪读数(450-620 nm)。

[0101] 结果如表4所示。

[0102] 表4

	克隆	抗原组	对照组 1	对照组 2
[0103]	TIF1-γ-R8P1-B2	1.51	0.09	0.10

[0104] 表中, 抗原组: 100 μL/每孔TIF1-γ蛋白(4 μg/mL), 对照组1: 100 μL/每孔N-His(4 μg/mL), 对照组2: 100 μL/每孔PBS。

[0105] 从上述结果可知, TIF1-γ-R8P1-B2对于抗原有明显特异性结合。

[0106] 筛选得到的噬菌体阳性克隆, 进行全序列测序, 得到相应的抗体重链轻链, 以及全序列如下:

[0107] TIF1-γ-R8P1-B2抗体的重链可变区如SEQ ID NO:1所示:

[0108] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRV
TMRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGSGSPRGGLDIWGQGTMTVTVSS。

[0109] TIF1-γ-R8P1-B2抗体的重链可变区CDR1-3如下所示:

[0110] CDR1, SEQ ID NO:2:GYTFTSY。

[0111] CDR2, SEQ ID NO:3:INPSGGST。

[0112] CDR3, SEQ ID NO:4:ARGSGSPRGGLDI。

[0113] TIF1-γ-R8P1-B2抗体的轻链可变区如SEQ ID NO:5所示:

[0114] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSGVAYRFSGSK
SGNTASLSISGLQAEDEADYYCSSFTSSRTYVFGTGKVTVL。

[0115] TIF1-γ-R8P1-B2抗体的轻链可变区CDR1-3如下所示:

[0116] CDR1, SEQ ID NO:6:SSDVGGYNY。

[0117] CDR2, DVN。

[0118] CDR3, SEQ ID NO:7:SSFTSSRTYV。

[0119] TIF1-γ-R8P1-B2抗体的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0120] TIF1-γ-R8P1-B2抗体的重链碱基序列如SEQ ID NO:10所示。

[0121] TIF1-γ-R8P1-B2抗体的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0122] TIF1-γ-R8P1-B2抗体的轻链碱基序列如SEQ ID NO:11所示。

[0123] 实施例2

[0124] ELISA检测抗体不同稀释浓度条件下的OD值, 酶联免疫吸附反应ELISA实验步骤如下所示:

[0125] 1、包被: 100 μL/每孔TIF1-γ蛋白(4 μg/mL)包被酶标板, 4℃孵育过夜。

[0126] 2、洗涤: 弃掉酶标板中液体, 每孔用300 μL的0.05% PBST洗涤三遍。

[0127] 3、封闭: 每孔加入300 μL的5%脱脂牛奶(PBS溶解), 37℃封闭2小时。

[0128] 4、阳性抗体孵育: 将TIF1-γ-R8P1-B2抗体分别进行梯度稀释, 每孔中加入100 μL稀释后的抗体溶液, 37℃孵育1小时。

[0129] 5、洗涤:弃掉酶标板中液体,每孔用300 μ L的0.05% PBST洗涤三遍。

[0130] 6、二抗孵育:用封闭液10000倍稀释Goat Anti-Human IgG (H+L) antibody (Jackson,code:109-035-088),每孔加入100 μ L稀释的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。

[0131] 7、洗涤:弃掉酶标板中液体,每孔用300 μ L的0.05% PBST洗涤三遍。

[0132] 8、显色:每孔加100 μ L TMB,37 $^{\circ}$ C孵育10分钟,然后每孔加50 μ L 2 M HCl终止反应。

[0133] 9、读板:使用酶标仪在450 nm-620 nm读取数值,如图1所示。

[0134] 图1的结果表明,筛选得到的人源性抗TIF1- γ 单克隆抗体与TIF1- γ 具有较强的特异性结合的能力。

[0135] 实施例3

[0136] 检测TIF1- γ 的免疫组化的实验步骤如下所示:

[0137] 1、样本准备:准备细胞样本,进行FFPE包埋并切片。用柠檬酸钠抗原修复溶液在微波炉中进行抗原修复。

[0138] 2、用3%的BSA溶液进行封闭。

[0139] 3、甩掉封闭液,滴加TIF1- γ 抗体,将切片平放于湿盒内4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0140] 4、用PBS清洗切片,滴加二抗覆盖组织,室温孵育30分钟。

[0141] 5、将切片用PBS清洗后,滴加新鲜配制的DAB显色溶液,显微镜下控制显色时间。当出现棕黄色时即使用自来水冲洗切片,以终止显色。

[0142] 6、使用苏木素复染3分钟左右,自来水冲洗。接着使用苏木素分化液分化数秒,再次冲洗。最后使用苏木素返蓝液返蓝,流水冲洗。

[0143] 7、将切片依次进行脱水透明处理,然后用中性树胶封片。

[0144] 8、在显微镜下对染色强度进行判定。

[0145] 实验结果中对照细胞不表达,阳性细胞表达,表明本发明提供的TIF1- γ 抗体可以用于免疫组化检测。

[0146] 综上,本发明提供了一种识别TIF1- γ 的抗体及其应用,所述抗体活性高、稳定性好,且具有较强的特异性,在TIF1- γ 的检测中具有重要应用价值。

[0147] 申请人声明,以上所述仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,所属技术领域的技术人员应该明了,任何属于本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

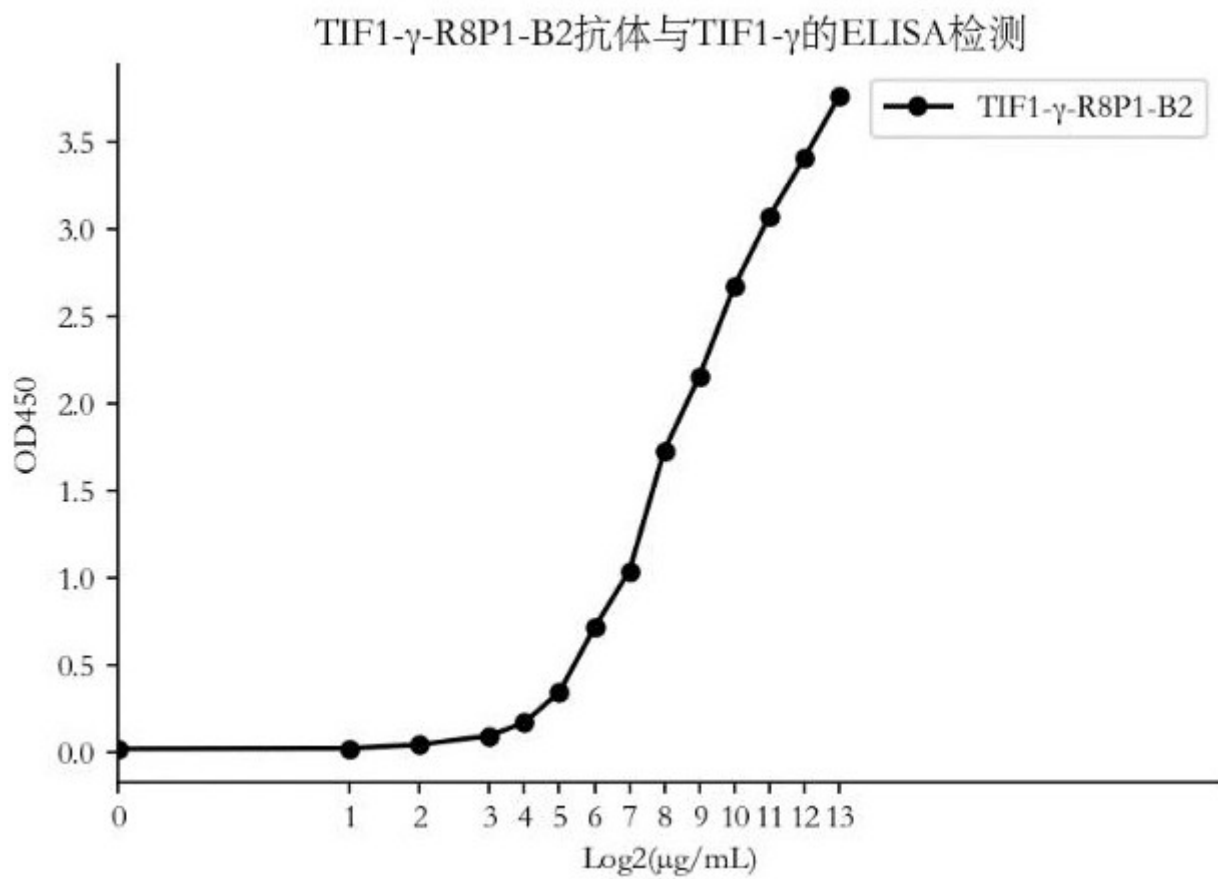


图 1