



(21) 申请号 202311708003.6

(22) 申请日 2023.12.11

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117700552 A

(43) 申请公布日 2024.03.15

(73) 专利权人 武汉爱博泰克生物科技有限公司

地址 430078 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 邹彪 吴海 孙倩 郭夏阳 黄谧王雪

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理有限公司 11401

专利代理师 张晓博

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 117085132 A, 2023.11.21

US 2011014608 A1, 2011.01.20

审查员 李有朝

权利要求书1页 说明书13页

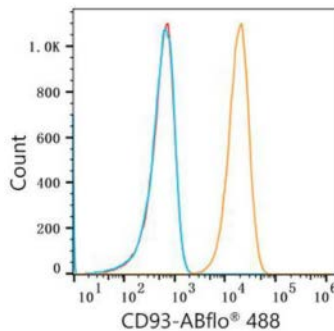
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明属于抗体制备技术领域,尤其涉及抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体及其应用。所述兔单克隆抗体的轻链可变区上互补决定区1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.3-5所示,重链可变区上互补决定区1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.8-10所示。本发明以CD93蛋白的胞外区结构域为免疫原制备兔单克隆抗体,该抗体可以特异性识别重组表达的CD93蛋白以及细胞表达的天然CD93蛋白,且抗体亲和力高、特异性好,抗干扰能力强,可以避免免疫检测时的非特异性结合等造成的假阳性或假阴性结果,有利于提高免疫检测尤其是流式细胞分析结果的准确性和可靠性,适用于高特异性和高灵敏度检测CD93蛋白。



1. 一种抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体,其特征在于,包括轻链可变区和重链可变区,其中,所述轻链可变区上互补决定区1、互补决定区2和互补决定区3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5所示;所述重链可变区上互补决定区1、互补决定区2和互补决定区3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9和SEQ ID NO.10所示。

2. 根据权利要求1所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体,其特征在于,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

3. 根据权利要求2所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体,其特征在于,还包括轻链恒定区和重链恒定区,所述轻链恒定区和所述轻链可变区构成轻链,所述轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述重链恒定区和所述重链可变区构成重链,所述重链的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

4. 根据权利要求1或2所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体,其特征在于,所述兔单克隆抗体为全长抗体或具有免疫活性的抗体片段;所述抗体片段选自Fab片段、F(ab)₂片段、Fv片段、(Fv)₂片段、scFv片段和sc(Fv)₂片段中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体,其特征在于,制备所述兔单克隆抗体的免疫原为CD93蛋白24-580aa。

6. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码如权利要求1-4任一项所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体。

7. 根据权利要求6所述的核酸分子,其特征在于,所述兔单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示,重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示。

8. 一种重组载体或宿主细胞,其特征在于,包含如权利要求6-7任一项所述的核酸分子。

9. 一种人CD93蛋白免疫检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求1-5任一项所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体或所述兔单克隆抗体与可检测标记偶联的免疫偶联物。

10. 根据权利要求9所述的人CD93蛋白免疫检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为酶联免疫吸附试剂盒或流式细胞试剂盒;

免疫检测样本包括血浆、血清、细胞和组织样本中天然表达的CD93蛋白以及重组表达的CD93蛋白,其中,细胞包括人组织细胞淋巴瘤细胞或人多发性骨髓瘤外周血B淋巴细胞。

抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体制备技术领域,特别涉及抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 黑素瘤细胞粘附分子CD93又称为C1qR1、C1qR、C1qRP、MXRA4、ECSM3,是一种I型单次跨膜糖蛋白,由C型凝集素结构域、表皮生长因子(Epidermal Growth Factor,EGF)样结构域、高度糖基化的粘蛋白样结构域组成,因其为跨膜蛋白,又可分为胞外区结构域(24-580位氨基酸序列)、跨膜结构域(581-601位氨基酸序列)和短细胞质结构域(601-652位氨基酸序列)。CD93主要在内皮细胞、血小板、干细胞和骨髓细胞(粒细胞和单核细胞)中表达,参与各种生理过程,如血管生成、细胞骨架动力学、内皮细胞的迁移和粘附、细胞凋亡和细胞外基质(ExtraCellular Matrix,ECM)重塑等。

[0003] 在研究早期,研究人员认为CD93是免疫分子,参与免疫细胞的黏附和穿越,与各种炎症和免疫相关疾病有关。2020年,韩国首尔延世大学医学院过敏研究所的研究人员发现在体外和体内模型中,过敏性哮喘与CD93表达和血清水平的显著变化相关,过敏原屋尘螨(HDM)刺激导致支气管上皮细胞中表达的CD93胞外区结构域以可溶性形式脱落到血清中,因此,在过敏刺激下的血清中可以检测到CD93,揭示了CD93在预测人类哮喘方面有潜在作用。新近文献报道CD93是一种新型的血管生成激活剂,参与内皮细胞的增殖、迁移和新生血管生成,在肿瘤血管的内皮细胞高表达而在非增殖的内皮细胞低表达,其高表达可加速肿瘤生长并减少宿主存活。血管生成是恶性肿瘤发生发展的关键步骤,肿瘤血管是实体肿瘤细胞的营养通道和转移途径,当肿瘤体积大于2mm时,开始分泌血管内皮细胞生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor,VEGF),使其迅速生长并提供转移途径。2021年,耶鲁大学陈列平课题组和科罗拉多大学安舒茨分校Zhu Yuwen课题组在Science Translational Medicine期刊上发表了题为“Blockade of the CD93 pathway normalizes tumor vasculature to facilitate drug delivery and immunotherapy”的研究,通过比较体内VEGF抑制剂治疗下肿瘤的基因表达谱分析,发现CD93是VEGF抑制中下调的候选受体,也是介导血管正常化的潜在靶点,同样证实了CD93在内皮细胞中的促血管生成作用。另外,研究发现,CD93是小鼠和人类白血病干细胞(Leukemia stem cells,LSCs)自我更新和增殖的重要调节因子,而非造血干细胞,LSCs是急性髓系白血病(acute myeloid Leukemia,AML)、慢性髓系白血病(chronic myeloid Leukemia,CML)和其他血液学肿瘤中的白血病起始细胞,LSCs的自我更新是白血病的发展和维持的一个关键特征。CD93的胞内结构域不依赖于胞外结构域的连接,通过转录调节因子SCY1-样伪激酶1促进基因转录,可作为CML LSCs重要调节因子和潜在的治疗靶点。此前,CD93已被证实为TKI治疗后持续存在的CML LSCs的标记物信号,可诱导携带混合系白血病(mixed lineage leukemia,MLL)基因重排的CML LSCs的增殖和疾病进展。可见,CD93在血液瘤中的潜力也不容小觑。

[0004] 先前的研究已经证明了CD93在实体瘤和血管瘤等恶性肿瘤中的关键作用,并将肿瘤血管中上调CD93作为某些疾病的生物标志物,在胰腺肿瘤、人类肾癌、头颈癌和结肠癌等中均可观察到肿瘤血管中CD93的过表达。因此,早期识别肿瘤组织中CD93表达情况对患者临床病理类型诊断和治疗的选择至关重要。近年来伴随免疫学研究的快速发展,使得基于抗原抗体特异性反应的免疫学检测技术受到高度重视,通过靶向CD93的特异性抗体检测CD93表达情况具有良好的应用前景。然而,现有相关抗人CD93抗体大部分是鼠单抗(如Biolegend、Thermo Fisher Scientific等生产的抗体)或羊多抗(如R&D Systems生产的抗体),这些抗体的特异性较低,难以用于免疫学检测领域,尤其是鲜有满足流式细胞分析应用的抗体。在流式细胞检测过程中,目标抗原含量低且干扰因素多,抗体的特异性偏低容易导致非特异性结合,继而影响检测结果的准确性或灵敏度。因此开发一种能满足流式细胞分析应用场景的高特异性抗体,对于人CD93蛋白的高灵敏性检测具有重要意义。

发明内容

[0005] 针对现有技术中抗人CD93蛋白抗体的特异性差、难以用于流式细胞检测等问题,本发明提供了抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体,并提供了该兔单克隆抗体在制备人CD93蛋白免疫检测试剂盒中的应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明具体通过以下技术方案实现:

[0007] 本发明第一方面提供了一种抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体,包括轻链可变区和重链可变区,其中,所述轻链可变区上互补决定区1、互补决定区2和互补决定区3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5所示;所述重链可变区上互补决定区1、互补决定区2和互补决定区3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9和SEQ ID NO.10所示。

[0008] 进一步地,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0009] 进一步地,还包括轻链恒定区和重链恒定区,所述轻链恒定区和所述轻链可变区构成轻链,所述轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述重链恒定区和所述重链可变区构成重链,所述重链的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0010] 进一步地,所述兔单克隆抗体为全长抗体或具有免疫活性的抗体片段;所述抗体片段选自Fab片段、F(ab)₂片段、Fv片段、(Fv)₂片段、scFv片段和sc(Fv)₂片段中的至少一种。

[0011] 进一步地,制备所述兔单克隆抗体的免疫原为CD93蛋白24-580aa。

[0012] 本发明第二方面提供了一种核酸分子,所述核酸分子编码如上所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体。

[0013] 进一步地,所述兔单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示,重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示。

[0014] 本发明第三方面提供了一种重组载体或宿主细胞,包含如上所述的核酸分子。

[0015] 本发明第四方面提供了如上所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体、如上所述的核酸分子、如上所述的重组载体或宿主细胞在制备人CD93蛋白免疫检测试剂盒中的应用。

[0016] 本发明第五方面提供了一种人CD93蛋白免疫检测试剂盒,包括如上所述的针对人CD93蛋白的兔单克隆抗体或所述兔单克隆抗体与可检测标记偶联的免疫偶联物。

[0017] 进一步地,所述试剂盒为酶联免疫吸附试剂盒或流式细胞试剂盒。

[0018] 进一步地,免疫检测样本包括血浆、血清、细胞和组织样本中天然表达的CD93蛋白以及重组表达的CD93蛋白,其中,细胞包括人组织细胞淋巴瘤细胞或人多发性骨髓瘤外周血B淋巴细胞。

[0019] 本发明的优点及积极效果为:

[0020] 本发明以CD93蛋白的胞外区结构域作为免疫原制备的抗CD93蛋白的兔单克隆抗体可以特异性识别重组表达的CD93蛋白以及细胞表达的天然CD93蛋白,且抗体识别和结合人CD93蛋白的亲合力高、特异性好,抗干扰能力强,可以避免免疫检测时的非特异性结合等造成的假阳性或假阴性结果,有利于提高免疫检测尤其是流式细胞分析结果的准确性和可靠性,适用于高特异性和高灵敏度检测CD93蛋白。

附图说明

[0021] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单的介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0022] 图1为本发明实施例1采用酶联免疫吸附法检测CD93蛋白免疫后的新西兰大白兔的血清效价检测结果图;

[0023] 图2为本发明实施例1新西兰大白兔免疫血清与阳性细胞U937结合的流式细胞分析检测结果图,从左至右,血清稀释度分别为1:500和1:2000;

[0024] 图3为本发明实施例1新西兰大白兔免疫血清与阴性细胞Jurkat结合的流式细胞分析检测结果图,从左至右,血清稀释度分别为1:500和1:2000;

[0025] 图4为本发明实施例1构建抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体表达载体所用的哺乳动物载体pBR322的图谱,从左至右分别为携带轻链恒定区和重链恒定区的pRB322载体图谱;

[0026] 图5为本发明实施例2的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体与阳性细胞U937结合的流式细胞分析检测结果图,荧光标记为ABflo®488;

[0027] 图6为本发明实施例2的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体与阴性细胞Jurkat结合的流式细胞分析检测结果图,荧光标记为ABflo®488;

[0028] 图7为本发明实施例2的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体与阳性细胞U937结合的流式细胞分析检测结果图,荧光标记为ABflo®647;

[0029] 图8为本发明实施例2的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体与阴性细胞Jurkat结合的流式细胞分析检测结果图,荧光标记为ABflo®647。

具体实施方式

[0030] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例对本发明进行进一步详细说明。此处所描述的实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0031] 根据本发明包含的信息,对于本领域技术人员来说可以轻而易举地对本发明的精确描述进行各种改变,而不会偏离所附权利要求的精神和范围。应该理解,本发明的范围不

局限于所限定的过程、性质或组分,因为这些实施方案以及其他的描述仅仅是为了示意性说明本发明的特定方面。实际上,本领域或相关领域的技术人员明显能够对本发明实施方式作出的各种改变都涵盖在所附权利要求的范围内。

[0032] 为了更好地理解本发明而不是限制本发明的范围,在本发明中所用的表示用量、百分比的所有数字以及其他数值,在所有情况下都应理解为以词语“大约”所修饰。因此,除非特别说明,否则在说明书和所附权利要求书中所列出的数字参数都是近似值,其可能会根据试图获得的理想性质的不同而加以改变。各个数字参数至少应被看作是根据所报告的有效数字和通过常规的四舍五入方法而获得的。

[0033] 另外,需要说明的是,除非另外定义,在本发明的上下文中,使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0034] 术语“包括”、“包含”、“含有”、“具有”等类似词语的含义是非限制性的,即可加入不影响结果的其它步骤和其它成分。术语“和/或”应被视为对在具有或不具有另一者的情况下两种指定特征或组分中的每一种的具体公开。例如,“A和/或B”将被视为包含以下情形:(i)A、(ii)B、以及(iii)A和B。

[0035] 在本发明的上下文中,术语“兔单克隆抗体”、“单克隆抗体”、“抗体”等类似词语具有相同含义,可互换使用,均指特异性结合人(Human)黑素瘤细胞粘附分子(CD93蛋白)的抗体。修饰词“兔”表示该抗体的互补决定区(complementarity determining region,CDR)来源于兔源免疫球蛋白序列。

[0036] 抗体是一种免疫球蛋白分子,其能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区的至少一个抗原识别位点特异性结合至目标抗原或表位。在本发明中,术语“抗体”应作最广泛的意义上的解释并且包括不同的抗体结构,包括但不限于所谓全长抗体、抗体片段以及它们的遗传学或化学修饰,只要它们展示所期望的抗原结合活性。其中,“抗体片段”是指全长抗体的一个或多个部分或片段,在典型的例子中,抗体片段包括:Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、(Fv)₂、scFv、sc(Fv)₂。

[0037] 典型的抗体分子(全长抗体)由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。轻链可分为两种,分别为κ链和λ链;重链可分类为五种,分别为μ、δ、γ、α和ε链,并且分别将抗体定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。重链和轻链靠近N端的氨基酸序列变化很大,其他部分氨基酸序列相对恒定,将轻链和重链中靠近N端氨基酸序列变化较大的区域称为可变区(variable region,V),将靠近C端的氨基酸序列相对稳定的区域,称为恒定区(constant region,C)。重链可变区(VH)以及轻链可变区(VL)通常是抗体的最可变部分并含有抗原识别位点。VH与VL区域可进一步细分为高变区(hypervariable region,HVR)和框架区(framework region,FR),高变区又称为互补决定区(CDR),为环状结构,重链CDR与轻链CDR通过FR区紧密地靠在一起并相互配合,共同形成能与目标抗原或表位的三维结构互补的表面,决定抗体的特异性,是抗体识别及结合抗原的部位。FR区是VH与VL中较保守的部分,它们大致上呈β-折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连。每个VH与VL通常由三个CDR以及四个FR所组成,按以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0038] CDR可以根据Kabat定义、Chothia定义、Kabat定义和Chothia定义两者的累积、AbM定义、接触定义、IMGT独特编号定义和/或构象定义或本领域熟知的任何CDR确定方法来标识。如本发明使用的,CDR由Kabat编号系统来定义。

[0039] 轻链恒定区(CL)和重链恒定区(CH)不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。不同型Ig(κ 或 λ)的CL长度基本一致,但是不同类Ig的CH长度不同,如IgG、IgA和IgD包括CH1、CH2和CH3,而IgM和IgE则包括CH1、CH2、CH3和CH4。抗体重链与轻链恒定区的氨基酸序列是本领域众所周知的。

[0040] 全长抗体是最为完整的抗体分子结构,具有典型的Y型分子结构,因此,在本发明的上下文中,“全长抗体”、“完整抗体”和“Y型抗体”具有相同含义,可互换使用。

[0041] 术语“抗原结合片段(Antigen-binding fragment, Fab)”是抗体分子中可以与抗原结合的区域,其由完整的轻链(可变区和恒定区)和部分重链(可变区和一个恒定区片段)组成,通过对全长抗体进行蛋白酶切,可得到Fab、F(ab')₂、Fab'等片段。例如,在木瓜蛋白酶的作用下,IgG可以被降解为两个Fab片段及一个Fc片段;在胃蛋白酶的作用下,IgG可以被降解为一个F(ab')₂片段和一个pFc'片段。F(ab')₂片段进一步被还原,形成两个Fab'片段。由于Fab具备抗原结合区和部分恒定区,使其不仅具备单链抗体(scFv)一样的抗体-抗原亲和力、优秀的组织穿透力等,并拥有更稳定的结构,在临床诊断和治疗上应用广泛。

[0042] 术语“可变片段(Fv)”位于抗体Fab片段的N端,仅包含可变区,并且由一条轻链和一条重链的可变区组成,是一个VH和一个VL非共价结合的二聚体(VH-VL二聚体),各可变区的3个CDR相互作用,在VH-VL二聚体表面形成抗原结合部位,具有识别和结合抗原的能力,尽管亲合力低于完整抗体。

[0043] 术语“单链抗体(Single-chain variable fragment, scFv)”是指重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过一个柔性接头(linker,一般由10-25个氨基酸组成)连接而成的最小抗体片段,其保留了原始抗体对抗原的结合特异性,本发明中的接头只要不妨碍连接在其两端的抗体可变区的表达即可,没有特别限定。与全长抗体相比,scFv具有分子量小的特点,因此具有更高的穿透力和更低的免疫副反应。

[0044] 本发明的抗体或抗体片段的全长序列可以来自单一物种,例如兔,或者可以是嵌合的或人源化的抗体,以降低机体排斥反应,同时保持所需的特异性、亲和性。术语“嵌合抗体”抗体是指抗体的一部分源自于特定的来源或物种,同时其余部分源自于不同的来源或物种。术语“人源化抗体”是非人源抗体如兔源抗体的CDR区和来自人FR区的嵌合抗体,在一些情况下,非人源抗体的可变区与人源抗体的恒定区结合,例如人兔嵌合抗体;在另一些情况下,非人源抗体的CDR区与源自人源抗体序列的FR区和恒定区结合,即将非人源抗体的CDR区嫁接到人类抗体框架(FR)序列上,这种框架序列来源于单个或多个其他人类抗体可变区框架序列。在本发明中,嵌合抗体或人源化抗体中的CDR区来源于兔源CDR区。

[0045] 术语“单克隆抗体”是指同质抗体群,即除了可能以少量存在的可能的天然出现的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)之外,构成群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原或表位。“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为限制抗体的结构、来源或制备方式。在一些实施例,单克隆抗体通过杂交瘤法、噬菌体展示法、酵母展示法、重组DNA法、单细胞筛选或单细胞测序法制备得到。

[0046] 术语“特异性结合”是本领域众所周知的术语,如果分子与特定目标抗原或表位的反应比与其他目标抗原或表位的反应更频繁、更快速、持续时间更长和/或具有更大的亲和力,则其表现出“特异性结合”,“特异性结合”或称为“优先结合”,并不一定需要(尽管可以

包括) 排斥结合。

[0047] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更为明显易懂, 下面结合附图对本发明的具体实施例做详细说明。

[0048] 本发明实施例提供了一种抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体, 包括轻链可变区和重链可变区, 所述轻链可变区和所述重链可变区均包括3个互补决定区(CDR), 其中, 所述轻链可变区上互补决定区1、互补决定区2和互补决定区3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5所示; 所述重链可变区上互补决定区1、互补决定区2和互补决定区3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9和SEQ ID NO.10所示。

[0049] 本发明选择CD93蛋白的胞外区结构域作为免疫原免疫大白兔, 之后基于单个B淋巴细胞分选和富集技术, 获得抗CD93蛋白的兔单克隆抗体, 将所得抗体用于酶连免疫吸附法检测时, 对人CD93蛋白的检测灵敏度高; 用于流式细胞法检测时, 仅在表达CD93蛋白的阳性细胞有特异性荧光信号跃迁, 而在不表达CD93蛋白的阴性细胞中无荧光信号跃迁, 说明本发明的抗体可以特异性识别重组表达的CD93蛋白以及细胞表达的天然CD93蛋白, 且抗体识别和结合人CD93蛋白的亲和力高、特异性好, 抗干扰能力强, 可以避免免疫检测时的非特异性结合等造成的假阳性或假阴性结果, 有利于提高免疫检测尤其是流式细胞分析结果的准确性和可靠性, 适用于高特异性和高灵敏度检测CD93蛋白。

[0050] 可选地, 所述轻链可变区和所述重链可变区均包括4个框架区(FR), 4个FR与3个CDR按顺序交错排列, 构成可变区。本发明兔单克隆抗体的所述轻链可变区(VL)的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示, 所述重链可变区(VH)的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0051] 可选地, 本发明兔单克隆抗体还包括轻链恒定区(CH)和重链恒定区(VH), CL和VL构成完整轻链, CH和VH构成完整重链。抗体的恒定区通常通过公开查询即可获得, 如: 通过IMGT在线数据库(www.imgt.org), 搜寻兔源IgG gamma C reign获得CH, 搜寻兔源IgG Kappa C reign获得CL。

[0052] 具体地, 包含CL的所述轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示, 包含CH的所述重链的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0053] 本发明兔单克隆抗体可以为全长抗体或抗体片段, 该抗体片段是指基本上保持与兔单克隆抗体的全长形式具有相同的生物学功能或活性的多肽, 具体而言, 抗体片段包括如上所述的CDR区(SEQ ID NO.3-5和SEQ ID NO.8-10), 更优选地具有如上所述的可变区(SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.7), 由此保留有完整的抗原识别和结合部位, 能够与全长抗体结合于相同的抗原, 尤其是结合于相同表位。所述抗体片段包括但不限于: (i) Fab片段, 由每条重链和轻链的可变区和第一恒定区构成的单价片段; (ii) F(ab)₂片段, 包含由铰链区二硫桥相连的两个Fab片段的双价片段; (iii) Fv片段, 由抗体的一个重链可变区和一个轻链可变区构成; (iv) (Fv)₂片段, 由两个共价连接在一起的Fv片段构成; (v) scFv片段, 由单一多肽链构成的Fv片段, 一个重链可变区和一个轻链可变区通过接头连接形成; (vi) sc(Fv)₂片段, 是将两个重链可变区和两个轻链可变区通过接头等连接成。这些抗体片段可通过本领域已知的常规技术获得。

[0054] 本发明又一实施例提供了一种核酸分子, 所述核酸分子编码如上所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体。

[0055] 核酸分子可以是DNA形式(例如cDNA或基因组DNA或合成DNA)或RNA形式(例如mRNA

或合成RNA)。DNA可以是单链的或是双链的,也可以是编码链或是非编码链。核酸分子的序列依据抗体的氨基酸序列通过常规手段如密码子编码规则推导即可得到。

[0056] 示例性地,本发明的兔单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示,重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示。本领域技术人员可以理解,由于遗传密码的简并性,不同于前述示例的核酸分子同样可以编码得到本发明的兔单克隆抗体,因此,前述示例的核酸分子不应作为对本发明保护范围的限定。

[0057] 核酸分子全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。

[0058] 本发明另一实施例提供了一种重组载体或宿主细胞,所述重组载体或所述宿主细胞包含如上所述的核酸分子。

[0059] 构建所述重组载体的出发载体为本领域常规的各种载体,只要其能够容载所述核酸分子即可。典型载体包括质粒、病毒载体、噬菌体、黏粒和微型染色体。质粒是最常见的载体形式,因此,在本发明的上下文中,载体与质粒可互换使用。载体可以是克隆载体(即用于将核酸分子转移到宿主中,并在宿主细胞中大量繁殖)或表达载体(即包含必要的遗传元件从而允许插入到载体的核酸分子在宿主细胞中表达)。克隆载体可以包含选择标记,以及与所述克隆载体所指定的细胞类型相匹配的复制起点,而表达载体则包含在指定宿主细胞中表达的调控元件(如启动子、增强子)。本发明的核酸分子可以插入到合适的载体中以形成携带所述核酸分子的克隆载体或表达载体。此为本领域的公知技术,在此不再详细介绍。

[0060] 编码本发明抗体重链与轻链的核酸分子可以分别构建到两个载体上,其可以被导入至相同或不同的宿主细胞中。当重链与轻链在不同的宿主细胞中表达时,每一条链都可以从表达其的宿主细胞中分离出来,并将分离的重链与轻链混合并在合适的条件下孵育以形成抗体。在另一些实施方式中,编码如本发明兔单克隆抗体的重链与轻链的核酸分子也可以克隆至一个载体中,每段核酸序列连接到合适的启动子下游;如,编码重链与轻链的每段核酸序列可操作地连接到不同的启动子,或者,编码重链与轻链的核酸序列可以与单个启动子可操作地连接,使得重链与轻链都可由相同的启动子表达。表达载体/启动子的选择取决于用于产生抗体的宿主细胞的类型。

[0061] 重组载体转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获,用CaCl₂法或MgCl₂处理。如果需要,也可用显微注射、电穿孔或脂质体包装等方法。当宿主是真核生物,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,以及显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0062] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌、链霉菌、鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞,真菌细胞如酵母、果蝇S2或Sf9的昆虫细胞、CHO、COS7、293系列细胞等。在获得转化如上所述的表达载体的宿主细胞后,在适合条件下培养该细胞,即可表达出单克隆抗体,然后再进行分离以得到纯化的抗体。

[0063] 在较佳的实施方式中,上述所述的重组载体为哺乳动物表达载体pBR322,宿主细胞为人肾上皮细胞(293F细胞)。

[0064] 本发明实施例还提供了如上所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体、如上所述的核酸分子、如上所述的重组载体或宿主细胞在制备人CD93蛋白免疫检测试剂盒中的应用。

[0065] 所述抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体、核酸分子、重组载体或宿主细胞在制备人CD93蛋白免疫检测试剂盒中的应用优势与如上所述的抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体相对于现有技术的优势相同,在此不再赘述。

[0066] 基于上述相同的发明构思,本发明实施例还提供了一种人CD93蛋白免疫检测试剂盒,包括如上所述的针对人CD93蛋白的兔单克隆抗体或所述兔单克隆抗体与可检测标记偶联的免疫偶联物。

[0067] 在免疫检测时,将待检样本与抗人CD93蛋白单克隆抗体接触,之后检测该单克隆抗体。在一些实施方案中,可以将抗人CD93蛋白单克隆抗体偶联可检测标记,通过分析可检测标记产生的可识别信号的变化来实现定性或定量检测CD93蛋白。在另一些实施方案中,不标记抗人CD93蛋白单克隆抗体(一抗或捕获抗体),而将可检测标记偶联可结合该单克隆抗体的二抗(检测抗体)或其他分子。例如,如果抗人CD93蛋白单克隆抗体是兔源IgG抗体,那么二抗可以是抗兔IgG抗体,由此通过偶联有可检测标记的二抗特异性结合一抗以产生可识别信号的变化。

[0068] 上述用于产生可识别信号变化的可检测标记包括但不限于:生物素、荧光素、化学发光基团、化学荧光基团、荧光蛋白、酶(如辣根过氧化物酶、酸性磷酸酶)、胶体金、彩色磁珠、乳胶颗粒、放射性核素、检测抗体或其组合。

[0069] 在较佳的实施方式中,免疫检测方法为酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)或流式细胞术(Flow Cytometry,FC)等,因此,所述试剂盒为酶联免疫吸附试剂盒或流式细胞试剂盒。

[0070] 可选地,免疫检测样本包括血浆、血清、细胞和组织样本中天然表达的CD93蛋白以及重组表达的CD93蛋白。其中,细胞包括但不限于:人组织细胞淋巴瘤细胞、人多发性骨髓瘤外周血B淋巴细胞。

[0071] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如冷泉港实验室出版的《分子克隆实验指南(第四版)》中所述的条件,或者通常按照制造厂商所建议的条件。

[0072] 实施例1抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体的制备

[0073] 1、抗原制备

[0074] 采用的免疫原为哺乳动物表达系统表达纯化得到的人重组CD93蛋白24-580aa,CD93蛋白全长的氨基酸序列参见Uniprot编号000274和NCBI登录号NP_036204.2,基因序列参见NCBI登录号NM_012072.4。CD93蛋白24-580aa位于CD93胞外区,胞外区检测比胞内区更简单方便,背景信号更低,将前述多肽区段对应的基因序列构建至pYURK-RaFC载体中,在293F细胞中表达出具有生物活性的高质量重组Human CD93成熟蛋白,所得蛋白纯度大于95%。

[0075] 2、动物免疫

[0076] 以上述制备的人重组CD93蛋白24-580aa为免疫原,免疫4只新西兰大白兔,每只大白兔免疫200 μ g,首次免疫前将免疫原与等量的完全弗式佐剂(购自Sigma公司)混合制成乳化剂,在兔腹部及背部皮下多点注射。首次免疫后每间隔3周取100 μ g免疫原与等量的不完全弗式佐剂(购自Sigma公司)混合制成乳化剂,在兔腹部及背部皮下多点注射,加强免疫两次。三次免疫后取血清按1:243000稀释后用ELISA测滴度,取OD_{450nm}大于0.2的兔子,用200 μ g

免疫原就皮下多点注射加强免疫一次,三至四天后取脾脏,并对终免血清稀释后用FC检测血清与待测细胞样本的亲力和特异性反应。

[0077] 免疫血清滴度检测的酶联免疫吸附(ELISA)法包括如下步骤:1)包被:用1×PBS缓冲液稀释的人重组CD93蛋白24-580aa(终浓度为1μg/mL),在384孔板中按25μL/孔加入包被液,将384孔板配平后,短暂离心(rpm到达1000后停止)平板,4℃过夜;2)封闭:取出4℃中过夜的平板,用洗板机在每孔中加入75μL的洗涤缓冲液(PBS含0.05%(v/v) Tween-20)洗涤5次;使用排枪加入封闭缓冲液(PBS含1%BSA、0.5%明胶和5%蔗糖)50μL/孔到平板内,并在室温下孵育1h,用于封闭不相关的结合位点;3)待测血清梯度稀释及加样:重复2)洗板过程清洗孔板,在96孔板中对待测血清进行梯度稀释,用稀释缓冲液(PBS含1%BSA)对血清以1:1000开始,进行三倍稀释,一共8个梯度,稀释比例可根据实际情况进行调整;4)二抗孵育:重复2)洗板过程清洗孔板,用稀释缓冲液对辣根过氧化物酶(HRP)偶联的羊抗兔IgG进行稀释,稀释比为1:5000,使用排枪按照25μL/孔加入稀释好羊抗兔IgG-HRP到平板内,用于结合平板中的目的蛋白,并在室温下避光孵育1h;5)终止反应及显色:重复洗板过程清洗孔板,按照100μL/孔加入TMB显色,37℃避光10min,加100μL/孔0.5M草酸溶液终止反应,测450nm吸收值,以免疫前兔血清作为阴性对照,以测定值与对照值的比≥2.1为阳性来判断免疫血清的效价。

[0078] 血清滴度检测结果见图1,可见在第三次免疫和第四次加强免疫时兔体内产生了较强的免疫反应,抗体滴度高,且第四次免疫的血清效价最优,可用于分离抗体。

[0079] 免疫血清与细胞样本的流式细胞(FC)分析包括如下步骤:1)实验准备:紫外照射消毒超净工作台15-20min,开风机5min,准备无菌工作;2)染色方法:a)收集并洗涤细胞,然后测定细胞总数,检查细胞活力是否在95%左右且不低于90%;用0.5% BSA/PBS溶液重悬细胞至约 3×10^6 - 5×10^6 细胞/mL,按每孔50μL将细胞分配到96孔V型板里;b)将用含0.5% BSA的PBS溶液(0.5% BSA/PBS)稀释好的免疫血清(作为一抗)分配到96孔V型板里,重悬每孔中的细胞,混合振荡,室温反应20min;c)400g离心5min,弃上清,用200μL 0.5% BSA/PBS洗涤2次;d)按每孔100μL将用0.5% BSA/PBS按1:200稀释好的Fluorescein (FITC) AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG(购自jackson,货号Cat#111-096-046)荧光二抗分配到96孔V型板里,重悬每孔中的细胞,混合;e)用铝箔纸包好,在微孔板震荡混匀仪上轻柔混匀20min;f)用200μL 0.5% BSA/PBS洗2次,最后用200μL 0.5% BSA/PBS重悬每孔细胞,避光保存;3)流式分析:按Beckman cytoflex流式分析仪使用与维护SOP-105-AND-CA-008操作进行分析。采用Rabbit IgG isotype control(来自ABclonal,货号AC042)作为同型对照。

[0080] 本实施例待测细胞样本包括人组织细胞淋巴瘤细胞U937和人T淋巴细胞白血病细胞Jurkat,免疫血清与表达CD93蛋白的阳性细胞U937以及不表达CD93的阴性细胞Jurkat的FC检测结果分别见图2-3:从左至右,血清稀释度分别为1:500、1:2000,图中横坐标表示相对荧光强度,纵坐标表示相对细胞个数,红色曲线为阴性对照,蓝色曲线为同型对照,黄色曲线为待测免疫血清。从图中可以看出,免疫血清与兔同型对照相比,在阳性细胞有特异性结合,荧光跃迁较好,在阴性细胞无非特异性结合,无荧光跃迁,确定动物体内已产生可用于流式检测的高特异性和高亲和力抗体,可进入分离脾细胞阶段。

[0081] 3、分离和培养脾脏中B淋巴细胞

[0082] 分离脾细胞:在安全柜中无菌操作取出一个培养皿,加入30-40mL的基础培养基(RPMI Medium 1640basic+1% Pen Strep;RPMI 1640购自Gibco,货号C11875500BT;Pen Strep购自Gibco,货号15140-163),放一个细胞筛网,将脾脏取出放于细胞筛中,将兔脾脏组织上多余的结缔组织、脂肪剪除,脾脏组织剪碎放入细胞筛网中研磨,取干净的研磨棒,用其按压处的末端对组织进行碾压研磨,尽可能研磨彻底至整个脾脏组织接近于白色;膜内细胞会慢慢游离出来,经过细胞筛网过滤至基础培养基中,用10mL基础培养基洗一洗细胞筛网,收集细胞筛网外基础培养基,室温下以400g离心力离心5min,吸弃上清,保留细胞,加入13mL常温的RBC红细胞裂解液(BD pharm Lyse 555899);用移液枪轻柔的吹打细胞几次后计时1min,进行红细胞裂解,计时完成后加入37mL的基础培养基以终止反应,室温下以400g离心力离心5min,吸弃上清,保留细胞;加入40mL常温放置的基础培养基,用移液枪吹打重悬细胞,室温下以400g离心力离心5min,吸弃上清,保留细胞;加入20mL常温放置的B细胞培养基,用移液器轻柔吹散细胞团,使细胞重悬,经由筛网再次过滤细胞,之后对细胞进行计数。

[0083] B淋巴细胞的分选和培养:参见专利“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(公开号:CN110016462A,公开日:2019-07-16)”和专利“一种B淋巴细胞体外培养体系及应用(公开号:CN111518765A,公开日:2020-08-11)”。

[0084] 4、编码兔单克隆抗体基因的克隆

[0085] 采用抗原包被的ELISA法检测出能够识别和结合人CD93蛋白的B淋巴细胞阳性克隆,收集前述细胞,裂解后用Quick-RNATM Micro Prep试剂盒(购自ZYMO公司,货号R1100-250)提取RNA,并反转录成cDNA。以前述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。PCR反应体系包括:4 μ L cDNA、1 μ L正向引物(10mM)、1 μ L反向引物(10mM)、12.5 μ L2 \times Gloria HiFi(来自武汉爱博泰克,货号RK20717)和6.5 μ L H₂O。PCR扩增程序包括:98 $^{\circ}$ C预变性30s,随后按照98 $^{\circ}$ C10s,64 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C30s的条件进行40次循环,最后在72 $^{\circ}$ C保持5min,得到的反应液置于4 $^{\circ}$ C保存。

[0086] 扩增VL和VH基因的正向引物(F)和反向引物(R)的核酸序列(5'-3')如下所示:

[0087] VL-F:tgaattcgagctcggtacccATGGACACGAGGGCCCCCAC(见SEQ ID NO.13);

[0088] VL-R:cacacacacgatggtgactgTTCCAGTTGCCACCTGATCAG(见SEQ ID NO.14);

[0089] VH-F:tgaattcgagctcggtacccATGGAGACTGGGCTGCGCTG(见SEQ ID NO.15);

[0090] VH-R:gtagcctttgaccaggcagcCCAGGGTCACCGTGGAGCTG(见SEQ ID NO.16)

[0091] 5、兔单克隆抗体的生产和纯化

[0092] 为了获得多株识别人CD93蛋白的兔单克隆抗体,将挑选出的兔单克隆抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)基因分别插入预先携带轻链恒定区(CL)和重链恒定区(CH)基因的哺乳动物表达载体pBR322中,形成携带抗体重链和轻链基因的表达载体。其中,哺乳动物表达载体pBR322的表达图谱见图4:图中,pRB322 origin和f1 origin是在大肠杆菌(E.Coli)中的复制启动子,Ampicillin是质粒抗性基因,CMV immearly promotor为在真核生物中的启动子,SV40 PA terminator是加尾信号,Light chain constant为轻链恒定区的核酸序列(左图),Heavy chain constant为重链恒定区的核酸序列(右图),恒定区序列通过查询IMGT在线数据库(www.imgt.org)获得。具体构建过程如下:将含兔单克隆抗体CL

和CH基因的哺乳动物细胞表达载体分别用XbaI和NheI限制性内切酶常规线性化处理。之后将上述扩增后的PCR产物(上游具有信号肽的VH基因和VL基因)纯化后,采取同源重组的方式,分别将重链可变区基因和轻链可变区基因构建到相应的哺乳动物表达载体中,经测序验证。

[0093] 本实施例的信号肽可以采用本领域常用的抗体表达信号肽序列,如专利“高亲和力Human IL-5兔单克隆抗体及其应用(公开号:CN115819578A,公开日期:2023-03-21)”,轻链可变区上游具有信号肽“MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC”,重链可变区上游具有信号肽“METGLRWLLLVAVLKGVQC”。

[0094] 将构建成功的含有相应兔单克隆抗体轻链基因和重链基因的表达载体一起转染至293F细胞中,转染72-96h获得培养上清中含有重组的识别人CD93的兔单克隆抗体;之后使用protein A亲和凝胶树脂(购自天地人和,货号SA023100)从转染后的培养基上清中纯化出重组的识别人CD93的兔单克隆抗体,纯化方案按照protein A亲和凝胶树脂说明书操作,在此不再赘述。使用12% SDS-PAGE凝胶电泳验证抗体纯度,并计算抗体浓度为1.0mg/mL,纯度大于95%。

[0095] 本实施例所得抗人CD93蛋白的兔单克隆抗体命名为1G8,其氨基酸(AA)和核酸(DNA)序列见表1,以下为描述方便,轻链互补决定区CDR1、CDR2和CDR3分别用LCDR1、LCDR2和LCDR3表示,重链互补决定区CDR1、CDR2和CDR3分别用HCDR1、HCDR2和HCDR3表示。

[0096] 表1本发明的兔单克隆抗体1G8的序列信息汇总

序列名称	序列信息
轻链 (AA)	AYDMTQTPASVSAAVGGTVTIKQASQSIGRYLAWYQQKPGHPPKLLIYAASLASGVPS RFSGSGSGTEFTLTISGVECADEAATYYCQQGYSVVDLDNAFGGGTEVVVRGDPVAPT VLI FPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSST LTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (见 SEQ ID NO.1)
VL (AA)	AYDMTQTPASVSAAVGGTVTIKQASQSIGRYLAWYQQKPGHPPKLLIYAASLASGVPS RFSGSGSGTEFTLTISGVECADEAATYYCQQGYSVVDLDNAFGGGTEVVVR (见 SEQ ID NO.2)
LCDR1 (AA)	QSIGRYLAW (见 SEQ ID NO.3)
LCDR2 (AA)	LIYAASLASGV (见 SEQ ID NO.4)
LCDR3 (AA)	QQGYSVVDLDNAF (见 SEQ ID NO.5)
重链 (AA)	QEQLKESGGGLVTPGGSLTLCTVSGIDLSSYSISWVRQAPGKGLEWIGLINSLDNTYCAT WAKGRITISRTSNTVDLKMSTLAEDTATYFCARDDATDVGYADAYDIWGPGLTVTVSSG QPKAPSVFPLAPCCGDPSTSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFSPSVRQSSG LYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVPSTCSKPMCPPPELPGGPSVFIFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSSTLPI AHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTC MINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPVLDSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCS VMHEALHNHYTQKSISRSPGK (见 SEQ ID NO.6)
VH (AA)	QEQLKESGGGLVTPGGSLTLCTVSGIDLSSYSISWVRQAPGKGLEWIGLINSLDNTYCAT WAKGRITISRTSNTVDLKMSTLAEDTATYFCARDDATDVGYADAYDIWGPGLTVTVSS (见 SEQ ID NO.7)
HCDR1 (AA)	IDLSSYSIS (见 SEQ ID NO.8)
HCDR2 (AA)	WIGLINSLDNTYCATWAK (见 SEQ ID NO.9)
HCDR3 (AA)	YFCARDDATDVGYADAYDI (见 SEQ ID NO.10)
VL (DNA)	GCATACGATATGACTCAGACACCAGCCAGCGTTAGTGCTGCCGTAGGAGGTACAGTG ACTATTAAGTGTACAGCCTCACAGAGCATCGGACGCTATCTAGCCTGGTACCAGCAGA AGCCGGGGCACCCCCCTAAATTGCTAATTTACGCCGCCAGCACTCTGGCCAGTGGCGT TCCCAGTAGATTCAGCGGTTCTGGTAGCGGAAGTGAATTCCTCTGACCATTTCTGGC GTGGAGTGTGCTGATGCGGCTACGTACTACTGTGTCAGCAGGGTTATAGCGTGGTTCGATT TGGATAACGCTTTTCGGCGGCGGCACAGAAGTGGTTGTGCGC (见 SEQ ID NO: 11)
VH (DNA)	CAAGAACAGCTTAAGGAATCAGGGGGAGGACTGGTCAACCCCGGAGGGAGTCTTAC TCTGACCTGTACTGTATCCGGCATCGATCTTAGTTCCTATAGCATCTCCTGGGTGAGGC AAGCCCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGATCGGACTTATTAACAGTCTTGATAATACCTA
[0097]	
[0098]	CTGTGCAACATGGGCGAAGGGCCGAATCACCATTAGCAGAACAAGTAATACTGTGCA CCTTAAGATGACCAGCCTTACTGCTGAGGATACAGCCACCTATTTTGTGCCAGAGAC GACGCCACAGACGTCGGCTACGCTGACGCGTACGACATTTGGGGTCCCGGTACCCTG GTTACTGTGAGTAGT (见 SEQ ID NO: 12)

[0099] 实施例2兔单克隆抗体1G8的应用研究

[0100] 兔单克隆抗体1G8的流式细胞分析 (Flow Cytometry, FC): 本实施例的细胞样本包
括阳性细胞-人组织细胞淋巴瘤细胞U937和阴性细胞-人T淋巴细胞白血病细胞Jurkat, 细
胞浓度为 $1 \times 10^6/100\mu\text{L}$ 。测定方法参见实施例1, 区别在于本发明实施例采用直标抗体, 即将兔
单克隆抗体1G8上分别偶联 **ABflo[®]488**和 **ABflo[®]647**荧光作为检测抗体, 无需使用荧光二
抗, **ABflo[®]488**兔抗人CD93抗体或 **ABflo[®]647**兔抗人CD93抗体工作浓度为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0101] 图5-8分别示出了抗人CD93蛋白兔单克隆抗体1G8与阳性细胞U937、阴性细胞
Jurkat结合的流式细胞检测结果, 图5-6分别为阳性细胞U937、阴性细胞Jurkat采用荧光信
号**ABflo[®]488**的检测结果, 图7-8分别为阳性细胞U937、阴性细胞Jurkat采用荧光信号
ABflo[®]647的检测结果, 前述图中横坐标表示相对荧光亮度, 纵坐标表示相对细胞个数, 红
色曲线为阴性对照, 蓝色曲线为同型对照, 黄色曲线为兔单克隆抗体1G8。从图中可以看出,
本发明兔单克隆抗体1G8在阳性细胞U937上有特异性结合, 在阴性细胞Jurkat上无非特异

性结合,说明兔单克隆抗体1G8能够特异性识别人细胞中表达的天然CD93蛋白,结合人CD93蛋白亲和力高,ABflo[®]488和ABflo[®]647荧光跃迁信号明显且无非特异性识别,表明抗体具有高的特异性和良好的抗干扰能力,这有利于提高免疫检测的准确性和可靠性。

[0102] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

	WA-63985D 三、四免血清检测										
	WA-63985D 筛 1ug/mL										
血清稀释度	阴性	N18819				N18820				NC	
		三免		四免		三免		四免			
0.0010000	0.199	0.957	0.966	0.956	0.98	0.99	0.992	0.986	0.975	0.032	0.027
0.0003333	0.114	0.957	0.949	0.95	0.973	0.978	0.992	0.969	0.963	0.032	0.029
0.0001111	0.077	0.904	0.897	0.914	0.901	0.939	0.952	0.959	0.949	0.03	0.028
0.0000370	0.052	0.827	0.842	0.892	0.88	0.942	0.947	0.955	0.968	0.031	0.03
0.0000123	0.04	0.683	0.663	0.742	0.761	0.849	0.854	0.872	0.88	0.03	0.03
0.0000041	0.037	0.422	0.411	0.568	0.591	0.651	0.661	0.76	0.777	0.032	0.029
0.0000014	0.035	0.187	0.192	0.353	0.363	0.345	0.361	0.488	0.457	0.029	0.027
0.0000005	0.04	0.099	0.101	0.176	0.202	0.174	0.179	0.272	0.257	0.065	0.028
	Goat anti Rabbit IgG-HRP 1:5000										

图1

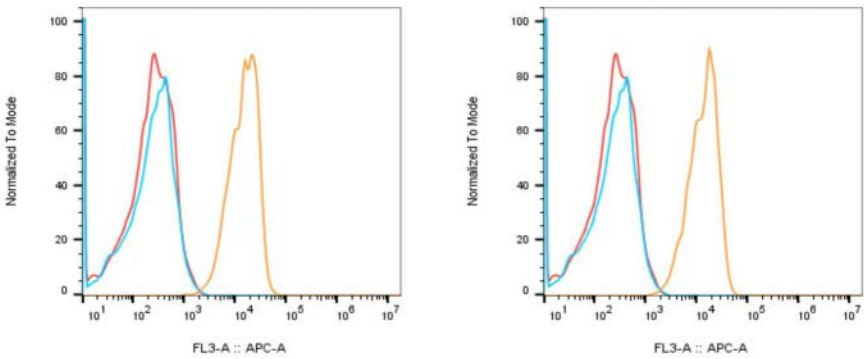


图2

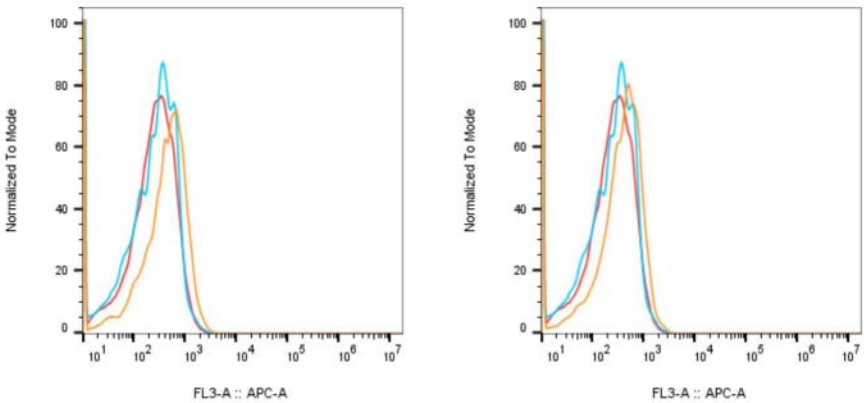


图3

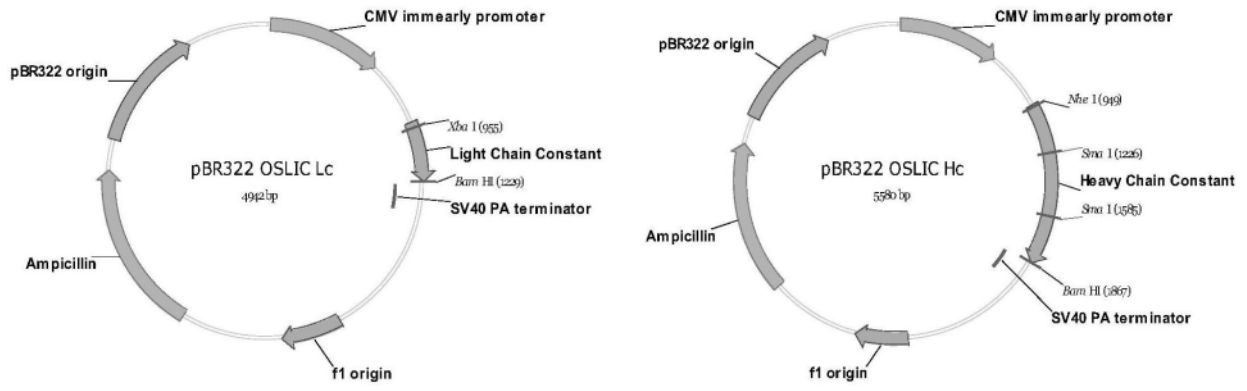


图4

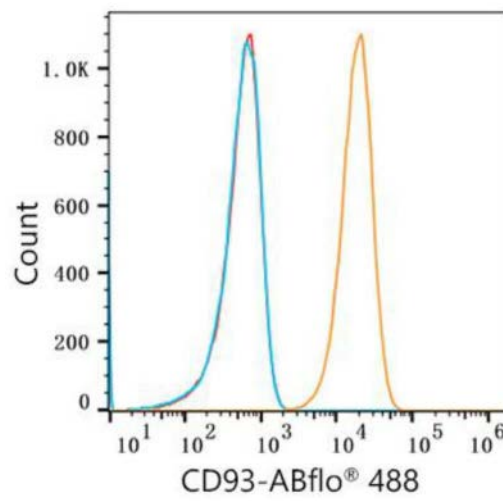


图5

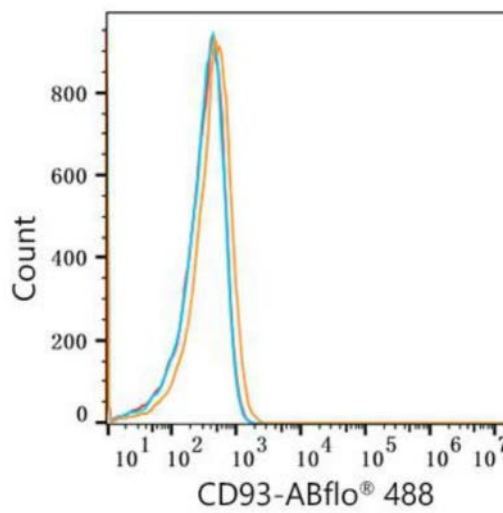


图6

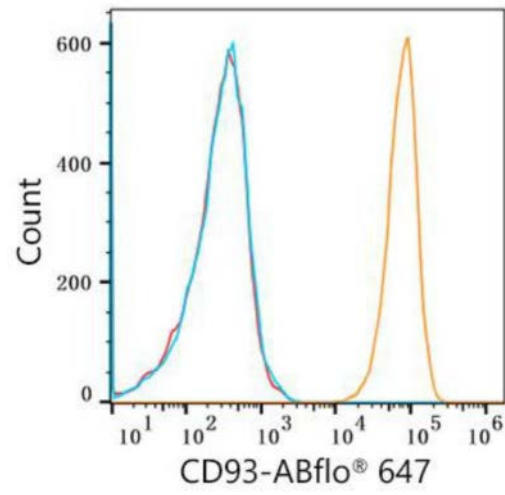


图7

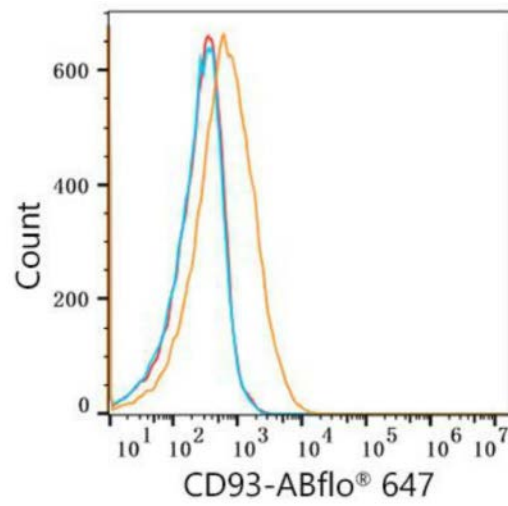


图8