

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年9月7日 (07.09.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/165230 A1

(51) 国际专利分类号:
CI2N 5/20 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
CI2N 15/13 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/141244

(22) 国际申请日: 2022年12月23日 (23.12.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210189230.1 2022年3月1日 (01.03.2022) CN

(71) 申请人: 天津一瑞生物科技股份有限公司(TIANJIN ERA BIOLOGY TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国天津市经济技术开发区第一大街79号泰达MSD-C区C2座1601单元, Tianjin 300457 (CN)。北京金山川科技发展有限公司(BEIJING GOLD MOUNTAINRIVER TECH DEVELOPMENT CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区白石桥路30号东门五区, Beijing 100081 (CN)。天津喜诺生物医药有限公司(GENOBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国天

津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。

(72) 发明人: 李可可(LI, Keke); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。苑庆华(YUAN, Qinghua); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。何永胜(HE, Yongsheng); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。陈晓玲(CHEN, Xiaoling); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。夏斌(XIA, Bin); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。王亚苗(WANG, Yamiao); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。孔迪(KONG, Di); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。王思怡(WANG, Siyi); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。杨彦霖(YANG, Yanlin); 中国天津市滨海新区滨海旅游区滨海产业园安正路喜诺大厦, Tianjin 300480 (CN)。

(54) Title: MOUSE ANTI-MCR-1/MCR-2 PROTEIN HYBRIDOMA CELL STRAIN, MONOCLONAL ANTIBODY AND USE

(54) 发明名称: 一种鼠抗MCR-1/MCR-2蛋白杂交瘤细胞株, 单克隆抗体及应用

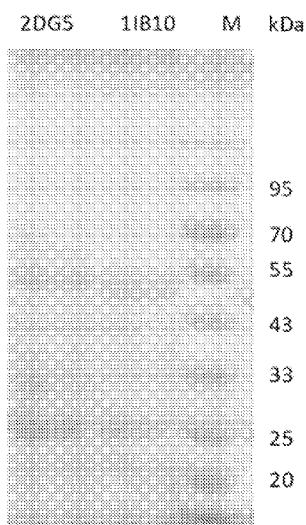


图 2

(57) Abstract: The present invention provides a mouse anti-MCR-1/MCR-2 protein hybridoma cell strain, a monoclonal antibody and use. An Ig variable region gene is cloned by means of mouse hybridoma monoclonal antibody screening and RT-PCR to obtain a hybridoma cell strain capable of stably secreting a mouse anti-MCR-1/MCR-2 protein antibody and a variable region sequence thereof; a systematic evaluation shows that the mouse anti-MCR-1/MCR-2 protein antibody has good performance in various aspects, with the titer reaching 1:1280000 or above, and is suitable for use as an immunodiagnostic reagent for preparing a polymyxin drug-resistant strain in-vitro diagnostic kit.

(57) 摘要: 本发明提供鼠抗MCR-1/MCR-2蛋白杂交瘤细胞株, 单克隆抗体及应用, 通过小鼠杂交瘤单克隆抗体筛选及RT-PCR法克隆Ig可变区基因, 获得稳定分泌鼠抗MCR-1/MCR-2蛋白抗体的杂交瘤细胞株及其可变区序列; 通过系统性评价, 鼠抗MCR-1/MCR-2蛋白抗体在各方面均有较佳表现, 效价达到了1:1280000以上, 适合作为免疫诊断试剂用于制备多粘菌素耐药菌株体外诊断试剂盒。



WO 2023/165230 A1

(74) 代理人: 天津诺德知识产权代理事务所
(特殊普通合伙) (NUODE IP LAW FIRM); 中
国天津市南开区开华道3号华科创业中
心501, Tianjin 300384 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧
亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株，单克隆抗体及应用

技术领域

本发明属于抗体制备技术领域，尤其是涉及一种鼠抗 MCR-1、MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株，单克隆抗体及应用。

背景技术

多黏菌素(polymyxin)是目前用于多重耐药和泛耐药革兰氏阴性细菌感染临床治疗的最后选择，近年来由于多粘菌素的临床使用增加，耐药菌株数量也逐年增加，虽然目前细菌的对多粘菌素耐药性并不强，却可能导致无药可医的地步，如何有效遏制耐药性的蔓延成为一个全球公共卫生问题。在多种药机制中，介导脂质A磷酸乙醇胺(PEtn)添加相关MCR基因被发现在多种质粒中，并可通过质粒在不同细菌中水平传播，甚至可以与其他耐药基因共同存在于同一质粒，表达后产生多种耐药机制。加之抗生素的不合理应用使得细菌耐药能力不断增强，给临床医师选用抗生素造成了极大的困扰。

实验室检测MCR介导的多黏菌素耐药主要是通过分子生物学法。研发具有自主知识产权的MCR蛋白快速诊断产品对于快速鉴定多黏菌素耐药菌株及其耐药机制，优化多黏菌素治疗方案，延长多黏菌素作为最后一线治疗药物的使用寿命具有重要意义。

发明内容

为解决上述技术问题，本发明提供一种鼠抗 MCR-1、MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株，单克隆抗体及应用。

本发明采用的技术方案是：鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株，命名为 2DG5，保藏编号为 CGMCCNo.23034；或者命名为 1IB10，保藏编号为 CGMCCNo.23032。

鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体，抗体 2DG5，包括轻链可变区和重链可变区，轻链可变区包括如 SEQ ID NO:1 所示的 CDRL1、SEQ ID NO:2 所示的 CDRL2 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDRL3，重链可变区包括如 SEQ ID NO:4 所示的 CDRH1、SEQ ID NO:5 所示的 CDRH2 和 SEQ ID NO:6 所示的 CDRH3；

SEQ ID NO:1 RASQDINNYLN (CDRL1)

SEQ ID NO:2 YTSRLHS (CDRL2)
 SEQ ID NO:3 QQGKTIHPWT (CDRL3)
 SEQ ID NO:4 GYSITSDYAWN (CDRH1)
 SEQ ID NO:5 QISDSAVTTYNPSLKS (CDRH2)
 SEQ ID NO:6 RNFYGYNFFDY (CDRH3)

或者，

抗体 1B10, 轻链可变区包括如 SEQ ID NO:11 所示的 CDRL1、SEQ ID NO:12 所示的 CDRL2 和 SEQ ID NO:13 所示的 CDRL3, 重链可变区包括如 SEQ ID NO:14 所示的 CDRH1、SEQ ID NO:15 所示的 CDRH2 和 SEQ ID NO:16 所示的 CDRH3;

SEQ ID NO:11 RSSQNIVCSYGNPCLE (CDRL1)
 SEQ ID NO:12 KVSNRFS (CDRL2)
 SEQ ID NO:13 FQSSHVPWT (CDRL3)
 SEQ ID NO:14 GYTFTSYVMH (CDRH1)
 SEQ ID NO:15 YFNPYNDGANYNEKFKG (CDRH2)
 SEQ ID NO:16 GPYGNAMDY (CDRH3)

优选地, 抗体 2DG5 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:7 所示, 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:9 所示;

SEQ ID NO:7

DIQMTQTSSLSASLGDRVTINCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY
 T SRLHSGVPSRFSGSGSRTDYSLTISNLEREDIATYFCQQGKTIHPWTFGGGTK
 LDIKRA

SEQ ID NO:9

VKLQESGPGVLKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMG
 QISDSAVTTYNPSLKSRLSINRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYYCARRNFYGY
 NFFDYWGRGTSSTVSSAK

或者，

抗体 1B10 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:17 所示, 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:19 所示;

SEQ ID NO:17

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVCSYGNPCLEWYLQKPGQSPK
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSSHVPWTF
GGGTELEIKR

SEQ ID NO:19

VKLQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIG
YFNPYNDGANYNEKFKGKATLSSDKSSGTAYMDLSSLTSEDSAVYYCARGPY
GNYAMDYWGQGTSVTVSSA

优选地，抗体 2DG5 由保藏编号为 CGMCCNo.23034 的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株产生；

或者，

抗体 1B10 由保藏编号为 CGMCCNo.23032 的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株产生。

一种核酸分子，包含编码鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体的核苷酸。

优选地，所述核酸分子编码抗体 2DG5 的轻链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:8 所示，所述核酸分子编码抗体 2DG5 的重链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:10 所示；

SEQIDNO:8

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAG
ACAGAGTCACCATCAATTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAACAATTATTTAA
ACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACTACA
CTTCAAGATTACATTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGGTCTA
GAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACGAGAAGATATTGCCA
CTTACTTTTGCCAACAGGGTAAAACGATTCATCCGTGGACGTTCCGGTGGAG
GCACCAAGCTGGACATCAAACGGGCT

SEQIDNO:10

GTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTC
TCTGTCCCTCACCTGCACTGTCCTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCC
TGGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCCA

GATAAGCGACAGTGCTGTCACCTACAACCCATCTCTCAAAGTCGAAT
CTCTATCAATCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCT
GTGACTCCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAAGGAAGTTCTAC
GGGTACAATTTTTTTGACTACTGGGGCCGAGGCACCTCTCTCACTGTCTCTT
CAGCCAAA

或者，

所述核酸分子编码抗体 11B10 的轻链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:18 所示，所述核酸分子编码抗体 11B10 的重链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:20 所示；

SEQIDNO:18

GATGTTTTGATGACCCAGACGCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGA
GATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTATGTAGTTATG
GAAACCCCTGTTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAG
CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTC
AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAAGTTCACATGTTCCGTGG
ACGTTCCGGTGGAGGCACCGAGCTGGAAATCAAACGG

SEQIDNO:20

GTGAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCCTAGCTATGTTATG
CACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATTTT
AATCCTTACAATGACGGTGCTAACTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCC
ACACTGTCTTCAGACAAATCCTCCGGCACAGCCTATATGGACCTCAGCAGC
CTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCGAGAGGCCCTATGGTA
ACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG
CC

鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体在制备检测 MCR-1 或 MCR-2 蛋白试剂中的应用。

优选地，将鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体用于制备体外诊断试剂盒或微流体

芯片,所述体外诊断试剂盒为胶体金免疫试剂盒、化学发光试剂盒、放射免疫试剂盒、酶联免疫试剂盒或荧光免疫试剂盒。

优选地,制备双抗体夹心法免疫胶体金试纸条,抗体 2DG5 为包被抗体,抗体 11B10 为金标抗体;

或者,抗体 11B10 为包被抗体,抗体 2DG5 为金标抗体。

本发明具有的优点和积极效果是:本发明提供两种鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株,分别能够产生两种鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体,这两种抗体均能与 MCR-1 蛋白或 MCR-2 蛋白发生特异性反应;通过系统性评价,包括对抗体亚型及效价、试剂盒灵敏度、特异性和稳定性的评价,鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白单克隆抗体在各方面均有较佳表现,效价达到了 1:1280000 以上,从而适合作为免疫诊断试剂用于制备检测多黏菌素耐药菌株体外诊断试剂盒。

附图说明

图 1 是鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白蛋白电泳图;

图 2 是鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体蛋白电泳图;

图 3 胶体金法鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白检测卡检测结果。

生物材料: 2DG5, 保藏日期为 2021 年 9 月 24 日, 保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC), 保藏编号是 CGMCC No.23034;

生物材料: 11B10, 保藏日期为 2021 年 9 月 24 日, 保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC), 保藏编号是 CGMCC No.23032。

具体实施方式

下面对本发明的实施例做出说明。

本发明涉及鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株,生物材料命名为 2DG5, 属杂交瘤细胞, 其保藏编号是 CGMCC No. 23034; 保藏地为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 其保藏日期为 2021 年 9 月 24 日, 检测为存活。另有一株鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株, 生物材料命名为 11B10, 属杂交瘤细胞, 其保藏编号是 CGMCC No.23032; 保藏地为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 其保藏日期为 2021 年 9 月 24 日, 检测为存活。

鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株生产得到的抗体 2DG5, 包括轻链可变区和重链可变区, 轻链可变区包括如 SEQ ID NO:1 所示的 CDRL1、SEQ ID

NO:2 所示的 CDRL2 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDRL3, 重链可变区包括如 SEQ ID NO:4 所示的 CDRH1、SEQ ID NO:5 所示的 CDRH2 和 SEQ ID NO:6 所示的 CDRH3;

SEQ ID NO:1 RASQDINNYLN (CDRL1)

SEQ ID NO:2 YTSRLHS (CDRL2)

SEQ ID NO:3 QQGKTIHPWT (CDRL3)

SEQ ID NO:4 GYSITSDYAWN (CDRH1)

SEQ ID NO:5 QISDSAVTTYNPSLKS (CDRH2)

SEQ ID NO:6 RNFYGYNFFDY (CDRH3)

抗体 2DG5 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:7 所示, 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:9 所示;

SEQ ID NO:7

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTINCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY
TSRLHSGVPSRFSGSGSRTDYSLTISNLEREDIATYFCQQGKTIHPWTFGGGK
LDIKRA

SEQ ID NO:9

VKLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMG
QISDSAVTTYNPSLKSRLSINRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYYCARRNFGY
NFFDYWGRGTSSTVSSAK

编码抗体 2DG5 的轻链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:8 所示, 编码抗体 2DG5 的重链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:10 所示;

SEQIDNO:8

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAG
ACAGAGTCACCATCAATTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAACAATTATTTAA
ACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACTACA
CTTCAAGATTACATTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGGTCTA
GAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACGAGAAGATATTGCCA
CTTACTTTTGCCAACAGGGTAAAACGATTCATCCGTGGACGTTTCGGTGGAG
GCACCAAGCTGGACATCAAACGGGCT

SEQIDNO:10

GTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTC
TCTGTCCCTCACCTGCACTGTCCTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCC
TGGAAGCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCCA
GATAAGCGACAGTGCTGTCCTACTACCTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAAT
CTCTATCAATCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCT
GTGACTCCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAAGGAACCTTCTAC
GGGTACAATTTTTTTGACTACTGGGGCCGAGGCACCTCTCTCACTGTCTCTT
CAGCCAAA

鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株生产得到的抗体 1IB10, 轻链可变区包括如 SEQ ID NO:11 所示的 CDRL1、SEQ ID NO:12 所示的 CDRL2 和 SEQ ID NO:13 所示的 CDRL3, 重链可变区包括如 SEQ ID NO:14 所示的 CDRH1、SEQ ID NO:15 所示的 CDRH2 和 SEQ ID NO:16 所示的 CDRH3;

SEQ ID NO:11 RSSQNIVCSYGNPCLE (CDRL1)

SEQ ID NO:12 KVSNRFS (CDRL2)

SEQ ID NO:13 FQSSHVPWT (CDRL3)

SEQ ID NO:14 GYTFTSYVMH (CDRH1)

SEQ ID NO:15 YFNPYNDGANYNEKFKG (CDRH2)

SEQ ID NO:16 GPYGNAMDY (CDRH3)

抗体 1IB10 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:17 所示, 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:19 所示;

SEQ ID NO:17

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVCSYGNPCLEWYLQKPGQSPK
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSSHVPWTF
GGGTELEIKR

SEQ ID NO:19

VKLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIG
YFNPYNDGANYNEKFKGKATLSSDKSSGTAYMDLSSLTSEDSAVYYCARGPY
GNYAMDYWGQGTSVTVSSA

编码抗体 1B10 的轻链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:18 所示，编码抗体 1B10 的重链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:20 所示；

SEQIDNO:18

GATGTTTTGATGACCCAGACGCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGA
GATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTATGTAGTTATG
GAAACCCCTGTTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAG
CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTC
AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGA
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAAGTTCACATGTTCCGTGG
ACGTTCCGGTGGAGGCACCGAGCTGGAAATCAAACGG

SEQIDNO:20

GTGAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCCTAGCTATGTTATG
CACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATTTT
AATCCTTACAATGACGGTGCTAACTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCC
ACACTGTCTTCAGACAAATCCTCCGGCACAGCCTATATGGACCTCAGCAGC
CTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCGAGAGGCCCTATGGTA
ACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG
CC

鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白单克隆抗体通过系统性评价，包括对抗体亚型及效价、试剂盒灵敏度、特异性和稳定性的评价；MCR-1 蛋白和 MCR-2 蛋白较为相似，本发明制备得到的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白单克隆抗体既能够特异性识别 MCR-1 蛋白也能够特异性识别 MCR-2 蛋白，并在各方面均有较佳表现，从而适合作为免疫诊断试剂用于制备体外诊断试剂盒。可以制作成胶体金免疫试剂盒、化学发光试剂盒、放射免疫试剂盒、酶联免疫试剂盒或荧光免疫试剂盒，或者制作成微流体芯片；制作的试剂盒能够检测 MCR-1、MCR-2 蛋白。本方案所涉及的两种抗体尤其适合搭配形成双抗体夹心法免疫胶体金试纸条，其中抗体 2DG5 为包被抗体，抗体 1B10 为金标抗体，制得的胶体金试纸条灵敏性更高，同时，也可将抗体 2DG5 做为金标抗体，抗体 1B10 为包被抗体。

下面通过具体实施例对本发明做出进一步说明。其中，未具体说明操作步骤的实验方法，均按照相应商品说明书进行，实施例中所用到的仪器、试剂、耗材如无特殊说明，均可从商业公司购买得到。

实施例 1：鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白单克隆抗体的制备

1.1 抗原制备

从 NCBI 中查找并下载 *mcr-1* 与 *mcr-2* 型基因序列，分别将重组质粒转化到大肠杆菌中进行诱导表达；纯化方法为镍柱亲和层析，菌体重悬于平衡缓冲液 pH7.4 中，超声至菌液澄清，高速离心，上清过膜后过镍柱，洗脱出目的蛋白，分子量和预计相符，SDS-PAGE 如图 1-2 所示，用 BCA 法定量后分装。

1.2 小鼠免疫

用纯化的 MCR-1 蛋白免疫 6 周龄左右的雌性 Balb/c 小鼠，进行抗体制备，按照免疫剂量分为 2 组，每组 5 只小鼠；按照抗原含量计算，第一组免疫剂量为 25ug/只，第二组免疫剂量为 50ug/只，首免，取适量 MCR-1 蛋白经生理盐水稀释至 500ul，加入等量弗氏完全佐剂 500ul 乳化均匀，皮下多点注射免疫小鼠；两周后，取相同剂量进行二免，二免将佐剂换为弗氏不完全佐剂，并腹腔注射免疫小鼠，两周后再追加免疫一次，亦为腹腔注射免疫小鼠，7 天后鼠尾采血，ELISA 测定小鼠血清效价。具体步骤为：MCR-1 蛋白 0.2ug/ml，100ul/孔，4℃ 过夜包被 ELISA 板，甩干，PBST 洗涤 3 次。5% 脱脂乳粉，200ul/孔，37 度封闭 2h。小鼠鼠尾采血，3000 转/min，离心后收集血清，从 1:1000 开始用 PBS 进行倍比稀释至 1:512000，备用。甩干，PBST 洗涤 3 次，1:1000 倍起加入 PBS 稀释的一抗，100ul/孔，37 度，1h。甩干，PBST 洗涤 3 次，加 PBS 1:10000 倍稀释的羊抗鼠二抗，100ul/孔，37 度，45min。甩干，PBST 洗涤 5 次，加 100ul TMB/孔，37℃，显色 10min，终止，读值。

1.3 细胞融合

融合前三天进行小鼠加强免疫，接种量同前次免疫，不加佐剂，腹腔注射。融合前一天准备饲养层细胞，取 6-8 周龄小鼠 Balb/c 1 只，取眼球放血后颈椎脱位致死，放于 75% 酒精中消毒 5min，固定于盘上，在超净台中无菌剪开腹部皮肤。用无菌注射器吸取 HAT 选择培养液 10ml 注入小鼠腹腔，用酒精棉球轻揉腹

部，抽回培养基。加入 40ml HAT 培养液中，铺入到 4 块 96 孔细胞培养板中， $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养。融合前一周复苏骨髓瘤细胞 (Sp2/0 细胞)，用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养， 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中传代培养。将处于对数生长期的细胞收集至离心管中，细胞计数，把细胞稀释为 10^7 个/ml 备用。取加强免疫 3 天的 Balb/c 小鼠，摘眼球放血制备阳性血清，脱颈椎处死，75% 酒精消毒 5min，在超净工作台无菌取出脾脏，在无菌平皿中洗涤数次，剥离结缔组织。将脾脏放在微孔铜网上，加入新鲜的 RPMI-1640 培养液，先用注射器吸取培养液由脾脏一段注入，吹下脾细胞，反复数次之后，用注射器的内塞轻轻将剩余脾脏研磨，直到无明显的红色组织块。将平皿中脾细胞悬液轻轻吹打后转移到 50ml 离心管中， $1000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min，收集脾细胞，计数后备用。将免疫鼠脾细胞与 Sp2/0 细胞按细胞数量 10:1 混合，加入 50ml 的离心管内， $1000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min，弃上清，在手心轻轻摩擦使两种细胞充分混匀，将离心管至于 100mL 蓝盖瓶内，蓝盖瓶内装有 37°C 热水，将预热好的 1ml DMSO/PEG 在 1min 内逐滴加入融合管内，先慢后快，边加边轻轻旋转离心管。然后立即加入无抗无血 RPMI-1640 培养液终止反应，第一分钟加 1ml，第二分钟加 2ml，第三分钟加 3ml，第四分钟加 4ml。 37°C 水浴 5min，后 $800\text{r}/\text{min}$ 离心 5min，弃上清，将沉淀以 HAT 悬起，混匀到 40ml 含 37°C 预热的 20% 小牛血清的 HAT 选择培养液中，铺入已加有饲养细胞的 96 孔细胞板中， $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ，将培养板放入 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养。7d 后将用新鲜的 HAT 培养基对细胞板半换液，10 天后用 HT 培养基全换液。将 96 孔板中检测阳性的细胞采用有限稀释法进行亚克隆：首先按照上述方法制备饲养层细胞，取待克隆杂交瘤细胞进行细胞计数，用 HT 培养基将细胞稀释至 5-8 个细胞/ml，加入到已铺饲养细胞的 96 孔细胞板中 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ，每株杂交瘤细胞克隆一块 96 孔细胞板， 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养。约 5 天后数出细胞孔里的克隆数，标记，7 天时并换新的培养基，待细胞铺满整个孔底的 $1/3\sim 1/2$ 时检测。经过 2-3 次克隆化，待 96 孔板所有细胞孔均为阳性时，即可进行扩大培养，定株，冻存。将检测阳性确定定株的杂交瘤细胞扩大培养并冻存。具体过程如下：将生长旺盛、状态良好的杂交瘤细胞用无抗无血 DMEM 轻轻从细胞瓶上吹下， $1000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min，弃去上清。加入冻存液（含 40% RPMI-1640 培养液、50% 胎牛血清、10% DMSO），将细胞

吹散后分装到细胞冻存管中。将冻存管放入冻存盒置于-70℃冰箱中，一天后将冻存管转移入液氮中，做好记录。

1.4 腹水制备

取10-12周龄雌性Balb/c小鼠，腹腔注射无菌液体石蜡，0.5mL/只，7d后腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞， 5×10^6 个细胞/只。每天注意观察，约7-10天，待小鼠腹部出现明显隆起后，用75%酒精棉球消毒下腹部皮肤，用16号针头刺入腹腔，收集腹水。待腹水再生积聚后，再次收集。将收集的腹水3000 r/min离心10min，取中间澄清部分，用滤纸过滤后，分装，-70℃保存。

1.5 抗体纯化

用 Protein-G 柱子进行腹水纯化，步骤如下：取腹水 2ml，10000g 离心，取澄清部分，加入 2ml 洗涤缓冲液，混匀，柱子用 20%乙醇流尽后用 8mL 洗涤液平衡，样本过柱子，流速为 8S/滴，反复上样 3 次，然后用 15mL 洗涤缓冲液进行洗涤，流速为 8S/滴，洗涤完毕后用 10mL 的洗脱缓冲液进行洗脱，洗脱完毕会用 1M Tris PH=9 调 PH 至 7.4，然后用浓缩柱进行浓缩，于 50kd 透析袋，PBS，4℃透析过夜。

实施例 2：鼠抗 MCR-1、MCR-2 蛋白单克隆抗体的鉴定

2.1 抗体亚类鉴定

按照SIGMA试剂盒说明书，以捕获ELISA的方法进行单抗的亚类鉴定，具体如下：将单抗亚类鉴定试剂1:1000稀释后，加入酶标孔中，100 μ L/孔，37℃孵育1h；PBST洗三次，拍干；将抗体1:1000倍稀释后加样，100 μ L/孔，37℃孵育1h；PBST洗三次，拍干；HRP酶标羊抗鼠IgG二抗以1:10000稀释后加样，100 μ L/孔，室温孵育30min；显色10~20min。以OD₄₅₀读值明显高于其他孔所加亚类试剂为单抗所属亚类类型。抗体2DG5、11B10的抗体亚型为IgG1。

2.2 抗体效价测定

采用间接ELISA法进行纯化后抗体效价测定，步骤如下：分别将MCR-1蛋白和MCR-2蛋白稀释至0.2 μ g/mL，100 μ L/孔，同时设立不包被对照，4℃过夜包被，甩干，PBST洗涤3次；5%脱脂乳粉，200 μ L/孔，37度封闭2h；甩干，PBST洗涤3次，加入从1:1000倍开始进行倍比稀释的抗体（浓度为1mg/ml），共计12个梯度，

同时设立不包被对照100ul/孔，37℃，1h。甩干，PBST洗涤3次，加 PBS 1:10000倍稀释的羊抗鼠二抗，100ul/孔，37℃，45min。甩干，PBST洗涤5次，加100ulTMB/孔，37℃，显色10min，终止，读值。纯化后抗体稀释至1mg/ml，针对MCR-1蛋白和MCR-2蛋白分别进行效价检测，效价均达到了1:1280000以上。

2.3 抗体纯度及分子量鉴定

采用 SDS-PAGE 法进行抗体分子量及纯度鉴定；制胶，分离胶为 12%，浓缩胶为 5%；制样，20ul 样品+20ul buffer，混匀，煮沸 3min；每孔上样 20ul，同时设立蛋白预染 Marker 对照；80 伏 30min，120 伏 2h；电泳完毕后，放入考马斯亮蓝溶液进行染色；脱色，去离子水煮沸脱色，每次 5min，共计 3 次；IgG 抗体重链的分子质量一般为 50-75KDa，IgG 抗体轻链的分子量约为 25KDa，通过 SDS-PAGE 对纯化得到的单克隆抗体进行鉴定；如图 2 所示，抗体 2DG5 和抗体 1IB10 在 50-75KDa 和约 25KDa 处各有清晰的条带。

实施例 3：鼠抗 MCR-1、MCR-2 蛋白单克隆抗体的基因验证

RT-PCR 法克隆 Ig 可变区基因，提取总 RNA，合成单链 cDNA；用 Trizol 法(试剂盒购自 Invitrogen)提取 1IB10, 2DG5 杂交瘤细胞株的总 RNA, 用 M-MLV 逆转录酶(购自 Invitrogen)将总 RNA 逆转录为 cDNA 文库。

重链骨架区上游引物

P1: 5'SAGGTGMAGCTKCASSARTCWGG3'

重链可变区下游引物

P2: 5'TGGGGSTGTYGTTTTGGCTGMRGAGACRGTGA3'

轻链前导肽上游引物

P3: 5'ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG3'

轻链可变区下游引物

P4: 5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCAGCCCGTTT3'

配制PCR反应体系(50μl)如下:

cDNA:2μl; 上游引物(10μM):2μl; 下游引物(10μM):2μl; dNTP mixture:2μl;
pfu DNA聚合酶(5U/μl):1μl; 10×pfu Buffer II :5μl; ddH₂O:补足至50μl。

反应条件:95℃预变性5min;重复如下循环35次:95℃30s,58℃30s,72℃1min;

最后，72℃延伸10min。

琼脂糖凝胶电泳分离并回收VL、VH片段。将回收后的VL、VH片段分别与pMD19-T (sKPCle)载体(Takara公司)进行连接，连接体系如下：

VL PCR产物/VH PCR产物各70ng，pMD19-T(sKPCle) 载体1μl，Solution I 连接反应液5μl；ddH₂O补足至10μl，4℃连接过夜。

连接产物转化入E.coli DH5α感受态细菌中，37℃过夜培养后，挑取单个菌落，37℃震荡2小时后进行菌液PCR鉴定，以对应抗体的cDNA为阳性对照。配制反应体系（25μl）如下：

菌液：1μl，上游引物(10μM)：1μl；下游引物(10 μM)：1μl；dNTP Mixture (各2.5 Mm) 2 μl；Taq DNA聚合酶 (5U/μl)：0.5 μl；10×Taq Buffer (Mg²⁺ plus)：2.5 μl；补水至25μl。反应条件同前。

选取菌PCR阳性的克隆扩大培养，用质粒提取试剂盒(Takara公司)提取阳性克隆质粒，送检测序。每个抗体的每条链至少送检5个克隆样品，至少三个样品测序结果相同为止。成功克隆得到抗体1IB10、2DG5的重链、轻链可变区序列，经比对符合典型抗体可变区序列特征。

实施例 4：胶体金法制备 MCR-1/MCR-2 蛋白检测卡

制备双抗体夹心法免疫胶体金试纸条，制备方法为：

步骤一向胶体金溶液中边搅拌边加入 0.1M K₂CO₃ 溶液，调节 pH 值后加入抗 MCR-1 单克隆抗体 1IB10，搅拌后加入 10%的牛血清白蛋白溶液，2%PEG20000，搅拌后低速离心取上清，再高速离心后取沉淀，用胶体金重悬液定容形成金标抗体；

步骤二将金标抗体喷于玻璃纤维素膜，烘干制成金标垫；

步骤三向鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白单克隆抗体 2DG5 中加入 1%的硫柳汞钠溶液，混匀后形成检测线包被液，再向羊抗鼠 IgG 中加入 PBS 和 1%的硫柳汞钠溶液，混匀后形成质控线包被液，将质控线包被液和检测线包被液划在硝酸纤维素膜上，烘干后获得包被膜；

步骤四将包被膜贴在底板上，将金标垫和吸水纸搭上包被膜，层压后切割获得胶体金法 MCR-1/MCR-2 蛋白检测卡。

取通过上述方法制备得到的胶体金法 MCR-1/MCR-2 蛋白检测卡，分别取空白样、MCR-1 抗原、MCR-2 抗原、含有 MCR-1 蛋白阳性样本 1 和含有 MCR-2 蛋白阳性样本 2 点样于检测卡。结果如图 3 所示，从左到右依次为空白样、MCR-1 抗原、MCR-2 抗原、含有 MCR-1 蛋白阳性样本 1 和含有 MCR-2 蛋白阳性样本 2，能够看出，空白样点样的检测卡检测结果呈阴性，MCR-1 抗原、MCR-2 抗原、含有 MCR-1 蛋白阳性样本 1 和含有 MCR-2 蛋白阳性样本 2 点样结果均为阳性，证明通过本方案制备得到的胶体金法 MCR-1/MCR-2 蛋白检测卡能够检测 MCR-1 蛋白或 MCR-2 蛋白及相应阳性样本。

以上对本发明的实施例进行了详细说明，但所述内容仅为本发明的较佳实施例，不能被认为用于限定本发明的实施范围。凡依本发明申请范围所作的均等变化与改进等，均应仍归属于本发明的专利涵盖范围之内。

PCT

打印件(原件为电子形式)

| | | |
|-------|--|--|
| 0-1 | PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二) | CEPCT 版本 10. 28. 47(20220706) MT/FOP 20140331/0. 20. 5. 21 |
| 0-1-1 | 软件版本 | |
| 0-2 | 国际申请号 | PCT/CN2022/141244 |
| 0-3 | 申请人或代理人的档案号 | XNPCT2203 |

| | | |
|-------|------------------------------------|--|
| 1 | 下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关: | |
| 1-1 | 页码 | |
| 1-2 | 行号: | |
| 1-3 | 保藏事项 | 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 中国微生物菌种保藏委员会, 中国北京市2714信箱, 邮政编码:100080, Beijing (CN)。 2021年 9月 24日 (24. 09. 2021) CGMCC No. 23034 |
| 1-3-1 | 保藏单位名称 | |
| 1-3-2 | 保藏单位地址 | |
| 1-3-3 | 保藏日期 | |
| 1-3-4 | 保藏号 | CGMCC No. 23034 |
| 1-4 | 补充说明 | |
| 1-5 | 本说明是对下列指定国 | 所有指定国 |
| 1-6 | 单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局 | |
| 2 | 下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关: | |
| 2-1 | 页码 | |
| 2-2 | 行号: | |
| 2-3 | 保藏事项 | 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 中国微生物菌种保藏委员会, 中国北京市2714信箱, 邮政编码:100080, Beijing (CN)。 2021年 9月 24日 (24. 09. 2021) CGMCC No. 23032 |
| 2-3-1 | 保藏单位名称 | |
| 2-3-2 | 保藏单位地址 | |
| 2-3-3 | 保藏日期 | |
| 2-3-4 | 保藏号 | CGMCC No. 23032 |
| 2-4 | 补充说明 | |
| 2-5 | 本说明是对下列指定国 | 所有指定国 |
| 2-6 | 单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局 | |

由受理局填写

| | | |
|-------|------------------------|--|
| 0-4 | 本表格与国际申请一起收到: (是或否) | |
| 0-4-1 | 授权官员 | |

PCT

打印件(原件为电子形式)

由国际局填写

| | | |
|-------|-------------|--|
| 0-5 | 国际局收到本表格日期: | |
| 0-5-1 | 受权官员 | |

权利要求书

1. 鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株，其特征在于：命名为 2DG5，保藏编号为 CGMCCNo.23034；或者命名为 11B10，保藏编号为 CGMCCNo.23032。

2. 鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体，其特征在于：抗体 2DG5，包括轻链可变区和重链可变区，轻链可变区包括如 SEQ ID NO:1 所示的 CDRL1、SEQ ID NO:2 所示的 CDRL2 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDRL3，重链可变区包括如 SEQ ID NO:4 所示的 CDRH1、SEQ ID NO:5 所示的 CDRH2 和 SEQ ID NO:6 所示的 CDRH3；或者，

抗体 11B10，轻链可变区包括如 SEQ ID NO:11 所示的 CDRL1、SEQ ID NO:12 所示的 CDRL2 和 SEQ ID NO:13 所示的 CDRL3，重链可变区包括如 SEQ ID NO:14 所示的 CDRH1、SEQ ID NO:15 所示的 CDRH2 和 SEQ ID NO:16 所示的 CDRH3。

3. 根据权利要求 2 所述的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体，其特征在于：抗体 2DG5 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:7 所示，重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:9 所示；

或者，

抗体 11B10 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:17 所示，重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:19 所示。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体，其特征在于：抗体 2DG5 由保藏编号为 CGMCCNo.23034 的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株产生；

或者，

抗体 11B10 由保藏编号为 CGMCCNo.23032 的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白杂交瘤细胞株产生。

5. 一种核酸分子，其特征在于：包含编码权利要求 2 或 3 所述的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体的核苷酸。

6. 根据权利要求 5 所述的核酸分子，其特征在于：所述核酸分子编码抗体 2DG5 的轻链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO:8 所示，所述核酸分子编码抗体 2DG5 的重链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO:10 所示；

或者，

所述核酸分子编码抗体 1IB10 的轻链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:18 所示，
所述核酸分子编码抗体 1IB10 的重链可变区的核苷酸序列如 SEQIDNO:20 所示。

7. 权利要求 2-4 中任一所述的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体在制备检测 MCR-1 或 MCR-2 蛋白试剂中的应用。

8. 根据权利要求 7 所述的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体在制备检测 MCR-1 或 MCR-2 蛋白试剂中的应用，其特征在于：将鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体用于制备体外诊断试剂盒或微流体芯片，所述体外诊断试剂盒为胶体金免疫试剂盒、化学发光试剂盒、放射免疫试剂盒、酶联免疫试剂盒或荧光免疫试剂盒。

9. 根据权利要求 7 所述的鼠抗 MCR-1/MCR-2 蛋白抗体在制备检测 MCR-1 或 MCR-2 蛋白试剂中的应用，其特征在于：制备双抗体夹心法免疫胶体金试纸条，抗体 2DG5 为包被抗体，抗体 1IB10 为金标抗体；
或者，抗体 1IB10 为包被抗体，抗体 2DG5 为金标抗体。

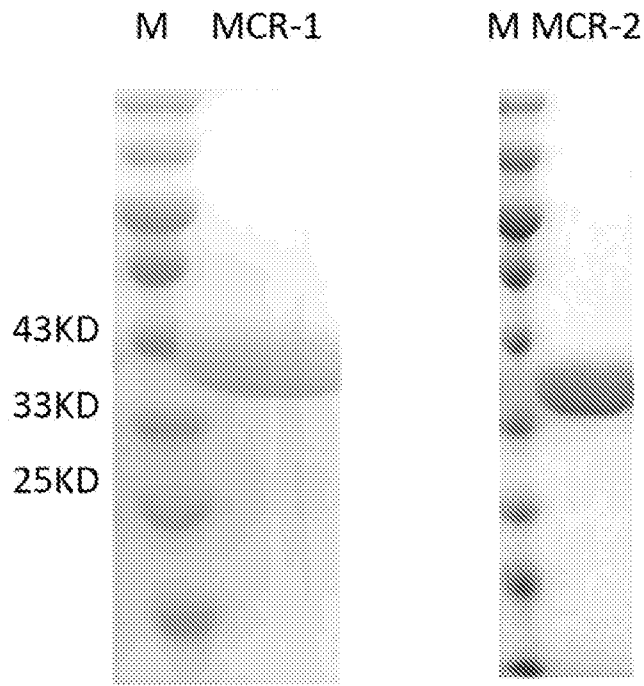


图 1

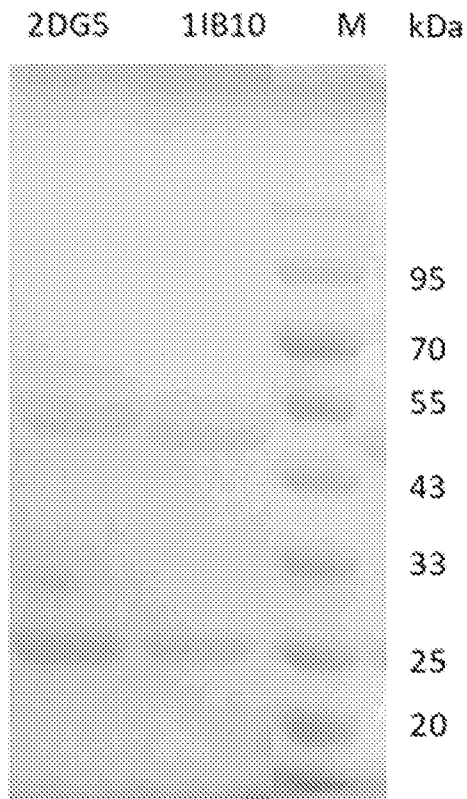


图 2

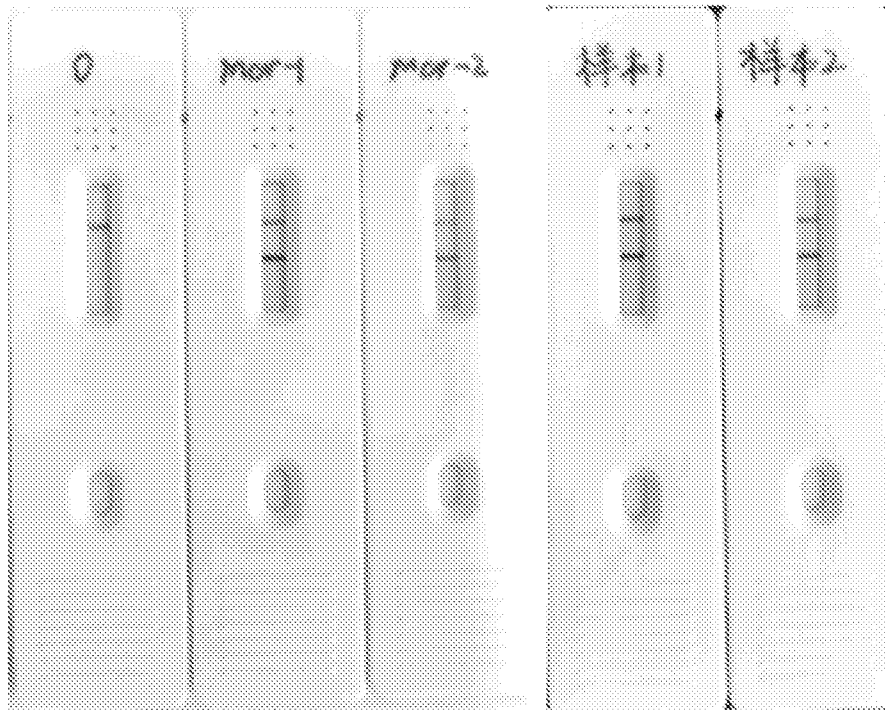


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/141244

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|--|--|--|
| C12N5/20(2006.01)i;C07K16/28(2006.01)i;C12N15/13(2006.01)i;G01N33/577(2006.01)i;G01N33/68(2006.01)i | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N,C07K,G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI, CNTXT, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+STN; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 对SEQ ID NOs: 1-20的检索, search for SEQ ID NOs: 1-20, MCR, MCR-1, MCR-2, CGMCC s 23034, CGMCC s 23032 | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| PX | CN 114250203 A (TIANJIN ERA BIOLOGY TECHNOLOGY CO., LTD.; BEIJING GOLD MOUNTAINRIVER TECH DEVELOPMENT CO., LTD.; TIANJIN XINUO BIOLOGICAL PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 29 March 2022 (2022-03-29) see claims 1-9 | 1-9 |
| A | CN 113416710 A (TIANJIN ERA BIOLOGY TECHNOLOGY CO., LTD.) 21 September 2021 (2021-09-21) see claims 1-9 | 1-9 |
| A | GenBank. "Chain B, Fab" <i>PDB: 7O85_B</i> , 29 September 2021 (2021-09-29), see amino acid sequence and related information | 1-9 |
| A | LL, Hui et al. "Identification of Functional Interactome of Colistin Resistance Protein MCR-1 in <i>Escherichia coli</i> " <i>Frontiers in Microbiology</i> , 25 January 2021 (2021-01-25), see pp. 1-9 | 1-9 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 10 March 2023 | | Date of mailing of the international search report 22 March 2023 |
| Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 | | Authorized officer |
| Facsimile No. (86-10)62019451 | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/141244

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | 刘艳华等 (LIU, Yanhua et al.). "质粒介导多黏菌素耐药基因mcr的研究进展 (Non-official translation: Research Progress of Plasmid-mediated Colistin Resistance Gene Mcr)" <i>实验与检验医学 (Experimental and Laboratory Medicine)</i> , Vol. 37, No. 3, 30 June 2019 (2019-06-30), see pp. 347-350 | 1-9 |
| | | |

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/141244

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| CN 114250203 A | 29 March 2022 | None | |
| CN 113416710 A | 21 September 2021 | None | |

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/141244

| <p>A. 主题的分类</p> <p>C12N5/20(2006.01)i;C07K16/28(2006.01)i;C12N15/13(2006.01)i;G01N33/577(2006.01)i;G01N33/68(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|------------|--------------------------------|-------------------|---------|----|---|-----|---|--|-----|---|--|-----|---|---|-----|---|---|-----|
| <p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N, C07K, G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>数据库: DWPI, CNTXT, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+STN; 中国专利生物序列检索系统 检索词: 对SEQ ID NOs: 1-20的检索, MCR, MCR-1, MCR-2, CGMCC s 23034, CGMCC s 23032</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 114250203 A (天津一瑞生物科技股份有限公司;北京金山川科技发展有限公司;天津喜诺生物医药有限公司) 2022年3月29日 (2022 - 03 - 29) 参见权利要求1-9</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113416710 A (天津一瑞生物科技股份有限公司) 2021年9月21日 (2021 - 09 - 21) 参见权利要求1-9</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GenBank. "Chain B, Fab" PDB: 7085_B, 2021年9月29日 (2021 - 09 - 29), 参见氨基酸序列及相关信息</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Hui Li et al. "Identification of Functional Interactome of Colistin Resistance Protein MCR-1 in Escherichia coli" Frontiers in Microbiology, 2021年1月25日 (2021 - 01 - 25), 参见第1-9页</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>刘艳华等. "质粒介导多黏菌素耐药基因mcr的研究进展" 实验与检验医学, 第37卷, 第3期, 2019年6月30日 (2019 - 06 - 30), 参见第347-350页</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p> | | | 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | PX | CN 114250203 A (天津一瑞生物科技股份有限公司;北京金山川科技发展有限公司;天津喜诺生物医药有限公司) 2022年3月29日 (2022 - 03 - 29) 参见权利要求1-9 | 1-9 | A | CN 113416710 A (天津一瑞生物科技股份有限公司) 2021年9月21日 (2021 - 09 - 21) 参见权利要求1-9 | 1-9 | A | GenBank. "Chain B, Fab" PDB: 7085_B, 2021年9月29日 (2021 - 09 - 29), 参见氨基酸序列及相关信息 | 1-9 | A | Hui Li et al. "Identification of Functional Interactome of Colistin Resistance Protein MCR-1 in Escherichia coli" Frontiers in Microbiology, 2021年1月25日 (2021 - 01 - 25), 参见第1-9页 | 1-9 | A | 刘艳华等. "质粒介导多黏菌素耐药基因mcr的研究进展" 实验与检验医学, 第37卷, 第3期, 2019年6月30日 (2019 - 06 - 30), 参见第347-350页 | 1-9 |
| 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PX | CN 114250203 A (天津一瑞生物科技股份有限公司;北京金山川科技发展有限公司;天津喜诺生物医药有限公司) 2022年3月29日 (2022 - 03 - 29) 参见权利要求1-9 | 1-9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | CN 113416710 A (天津一瑞生物科技股份有限公司) 2021年9月21日 (2021 - 09 - 21) 参见权利要求1-9 | 1-9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | GenBank. "Chain B, Fab" PDB: 7085_B, 2021年9月29日 (2021 - 09 - 29), 参见氨基酸序列及相关信息 | 1-9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | Hui Li et al. "Identification of Functional Interactome of Colistin Resistance Protein MCR-1 in Escherichia coli" Frontiers in Microbiology, 2021年1月25日 (2021 - 01 - 25), 参见第1-9页 | 1-9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 刘艳华等. "质粒介导多黏菌素耐药基因mcr的研究进展" 实验与检验医学, 第37卷, 第3期, 2019年6月30日 (2019 - 06 - 30), 参见第347-350页 | 1-9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 国际检索实际完成的日期 | 2023年3月10日 | 国际检索报告邮寄日期 | 2023年3月22日 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ISA/CN的名称和邮寄地址 | 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451 | 授权官员 | 邵旭倩 电话号码 (+86) 010-62411298 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

第1栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的;
- b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/141244

| 检索报告引用的专利文件 | 公布日 (年/月/日) | 同族专利 | 公布日 (年/月/日) |
|----------------|----------------|------|----------------|
| CN 114250203 A | 2022年3月29日 | 无 | |
| CN 113416710 A | 2021年9月21日 | 无 | |