



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103215292 A

(43) 申请公布日 2013.07.24

(21) 申请号 201210016565.X

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2012.01.18

G01N 33/577 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 5014 2011.06.30

(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 钟超 李翀 杨轩

刘朝霞

(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 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

人 Pcid2 蛋白的可溶性表达及抗人 Pcid2 蛋白的单克隆抗体 2D7-F11 和分泌该抗体的杂交瘤细胞系

(57) 摘要

本发明提供了一种表达人 Pcid2 可溶性重组蛋白的方法,利用可溶性 Pcid2 重组蛋白作为抗原免疫小鼠获得的抗人 Pcid2 蛋白的单克隆抗体以及分泌其的杂交瘤细胞系。所述单克隆抗体与重组人 Pcid2 蛋白及表达人天然 Pcid2 蛋白的细胞呈强阳性反应,而与其它蛋白无交叉反应。本发明还提供了包括所述单克隆抗体的试剂盒和使用单克隆抗体检测内源 Pcid2 的含量的方法。

1. 一种表达可溶性人源 Pcid2 蛋白的办法,其特征在于将 Pcid2 蛋白和其相互作用蛋白 Dss1 进行共表达,所述方法包括:
 - (a) 分别获得 Pcid2 蛋白和 Dss1 蛋白的编码核酸序列;
 - (b) 将 (a) 中获得的 Pcid2 蛋白和 Dss1 蛋白的编码核酸序列插入适合的载体中;
 - (c) 将 (b) 中构建得到的载体在适合的宿主中在适于表达的条件下进行表达。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,所述人源 Pcid2 蛋白的编码核酸序列为 SEQ ID NO :1。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,所述 Dss1 蛋白的编码核酸序列为 SEQ ID NO :2。
4. 一种可溶性重组人 Pcid2/Dss1 蛋白,其由权利要求 1-3 中任一项的方法产生。
5. 一种利用权利要求 4 所述的人重组 Pcid2 蛋白为抗原产生的抗人 Pcid2 蛋白的单克隆抗体。
6. 权利要求 5 所述的单克隆抗体,由保藏编号为 CGMCC No. 5014 的小鼠杂交瘤细胞系 2D7-F11 产生。
7. 一种杂交瘤细胞系,其保藏编号为 CGMCC No. 5014。
8. 用于检测 Pcid2 蛋白含量的试剂盒,其包含权利要求 4 所述的重组 Pcid2/Dss1 蛋白和 / 或权利要求 5 或 6 的单克隆抗体。
9. 根据权利要求 5 或 6 所述的单克隆抗体在检测 Pcid2 组织分布的免疫组化方法、检测 Pcid2 细胞分布的免疫荧光方法以及检测 Pcid2 相互作用蛋白的免疫共沉淀方法中的应用。

人 Pcid2 蛋白的可溶性表达及抗人 Pcid2 蛋白的单克隆抗体 2D7-F11 和分泌该抗体的杂交瘤细胞系

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白重组表达及单克隆抗体领域,更具体地,本发明涉及抗人 Pcid2 蛋白的可溶性重组表达,及利用可溶性表达的 Pcid2 蛋白为抗原制备的单克隆抗体 2D7-F11,它是由小鼠杂交瘤细胞系 2D7-F11 产生的。

背景技术

[0002] Pcid2(PCI domain containing 2) 蛋白是真核细胞中高度保守的一种蛋白。其典型的结构特征是其序列中带有一段 PCI(proteasome, COP9 signalosome, initiation factor 3) 结构域。PCI 结构域是在真核生物的蛋白酶体、COP9 复合体及转录起始因子 3 复合体中广泛存在的一类功能结构域。一般位于相关蛋白的 C 端,约 200 个氨基酸,通常用来介导蛋白复合体中蛋白与蛋白间相互作用。含有 PCI 结构域的蛋白通常会出现在大的多蛋白复合体中,例如 26S 蛋白酶体、COP9 信号复合体、转录起始因子 3 复合体。

[0003] 人 Pcid2 蛋白共含有 399 个氨基酸,其 C 端为 PCI 结构域。Pcid2 蛋白在真核生物中具有高度的保守性。Pcid2 的酵母同源蛋白 Thp1 存在于 TREX-2/Sac3-Thp1-Sus1-Cdc31 复合体中,该复合体与转录激活基因的核孔定位 (“gene gating”)、mRNA 的核孔运输密切相关。同时的报道指出,在果蝇中的 Pcid2 蛋白具有相同的性质,能够在细胞核与胞浆中穿梭,同 mRNA 的出核运输密切相关。

[0004] 最近有报道指出,Pcid2 与细胞的存活、增殖密切相关。Pcid2 基因敲除小鼠会发生胚胎致死。利用 RNA 干扰技术抑制细胞内 Pcid2 蛋白的表达后,细胞的增殖基本被阻断。另有研究指出,在 Pcid2 条件性敲除的小鼠中,特异地敲出 B 细胞中的 Pcid2 蛋白,能够导致 B 细胞发育过程中的细胞凋亡,最终导致 B 细胞数目的下降。

[0005] Pcid2 蛋白还与干细胞的分化过程及自我更新有关。有研究者利用大规模的 RNA 干扰筛选策略,得到了包括 Pcid2 在内的 148 个与干细胞分化与自我更新相关的基因。进一步的实验结果确证了这一发现。以碱性磷酸酶作为细胞分化的指标,发现对 Pcid2 进行 RNA 干扰之后,碱性磷酸酶的染色水平下降,标志着干细胞发生了分化。

[0006] 最近也有报道指出,在一类比较难治疗的三阴性乳腺癌 (Triple negative breast cancer) 中,在增生的肿瘤组织中发现,Pcid2 基因会发生拷贝数的异常扩增。这预示着 Pcid2 蛋白可能对三阴性乳腺癌的诊断和治疗提供帮助。

[0007] Pcid2 蛋白单抗的潜在用途包括:1. 用于检测干细胞组织中 Pcid2 的含量及分布,作为干细胞分化的指征;2. 检测肿瘤组织中 Pcid2 的含量及分布,作为肿瘤发生及发展的指标。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种表达可溶性 Pcid2 蛋白的方法及抗人 Pcid2 的单克隆抗体 2D7-F11。

[0009] 在第一个方面,本发明提供了一种表达可溶性 Pcid2 蛋白的方法,其特征在于利用 Pcid2 的相互作用蛋白 Dss1 同 Pcid2 的共表达来促进 Pcid2 的可溶性表达,所述方法包括:

[0010] (a) 分别获得 Pcid2 蛋白和 Dss1 蛋白的编码核酸序列;

[0011] (b) 将 (a) 中获得的 Pcid2 蛋白和 Dss1 蛋白编码核酸序列插入适合的载体中;

[0012] (c) 将 (b) 中构建得到的载体在适合的宿主中在适于表达的条件下进行表达。

[0013] 在一个实施方案中,所述 Pcid2 蛋白的编码核酸序列为 SEQ ID NO :1。在一个实施方案中,所述 Dss1 蛋白的编码核酸序列为 SEQ ID NO :2。在一个实施方案中,所述载体为原核表达载体,具体地为 pETDuet-1。在一个实施方案中,所述宿主为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株。在一个实施方案中,所述菌株为大肠杆菌 BL-21 菌株。

[0014] 在第二个方面中,本发明提供一种可溶性重组人 Pcid2/Dss1 蛋白,其由第一方面的方法产生。在一个实施方案中,所述 Pcid2 蛋白的编码核酸序列为 SEQ ID NO :1。在一个实施方案中,所述 Dss1 蛋白的编码核酸序列为 SEQ ID NO :2。

[0015] 在第三个方面中,本发明提供一种利用本发明第二个方面所述的人重组 Pcid2 蛋白为抗原产生的抗人 Pcid2 蛋白的单克隆抗体。在一个实施方案中,单克隆抗体由保藏编号为 CGMCC No. 5014 的小鼠杂交瘤细胞系 2D7-F11 产生。

[0016] 在第四个方面中,本发明提供一种杂交瘤细胞系,其保藏编号为 CGMCC No. 5014。

[0017] 在第五个方面中,本发明提供用于检测 Pcid2 蛋白含量的试剂盒,其包含第二个方面所述的重组 Pcid2/Dss1 蛋白和 / 或第三个方面所述的单克隆抗体。

[0018] 在第六个方面中,本发明提供根据第三个方面所述的单克隆抗体在检测 Pcid2 组织分布的免疫组化方法、检测 Pcid2 细胞分布的免疫荧光方法以及检测 Pcid2 相互作用蛋白的免疫共沉淀方法中的应用。

[0019] 本发明以可溶性 Pcid2 蛋白为抗原,通过免疫小鼠及后续的单克隆抗体筛选制备过程,得到了针对 Pcid2 蛋白的单克隆抗体。进一步的抗体功能检验表明,该单克隆抗体 2D7-F11 既能识别重组表达的 Pcid2 蛋白,也能识别内源性表达的 Pcid2 蛋白。该单克隆抗体能够应用于 ELISA、Western Blot、免疫沉淀、免疫荧光等方面。与细胞内其它蛋白不存在非特异识别。

[0020] 具体来说,本发明提供了以下内容:

[0021] 1) 一种可溶性表达重组 Pcid2 蛋白的方法,它通过共表达 Pcid2 蛋白的相互作用蛋白 Dss1,从而稳定 Pcid2 蛋白的结构,使 Pcid2 蛋白能够在体外可溶性存在。

[0022] 2) 一种抗人 Pcid2 蛋白的单克隆抗体 2D7-F11,它由小鼠杂交瘤细胞 2D7-F11 (CGMCC No. 5014) 产生。能够用于 ELISA、免疫印迹、免疫沉淀、免疫荧光及免疫组织化学等实验检测。

[0023] 3) 一种产生抗人 Pcid2 蛋白的单克隆抗体 2D7-F11 的杂交瘤细胞,其特征在于,它是保藏号为 CGMCC No. 5014 的小鼠杂交瘤细胞系 2D7-F11。

[0024] 4) 用于检测 Pcid2 蛋白含量的试剂盒,其包含以上 1)、2) 所述的可溶性 Pcid2 蛋白及其单克隆抗体 2D7-F11。试剂盒的制备可以通过本领域技术人员所公知的方法进行。

[0025] 5) 根据以上 2) 的抗体或 4) 的试剂盒,其中所检测得到的 Pcid2 蛋白的含量及分布情况,可作为干细胞发育分化的标志及三阴性乳腺癌增生的表征。

附图说明：

[0026] 图 1. pETDuet-1 载体图谱。

[0027] 图 2. Western blotting 检测 MCF-7 细胞中的 Pcid2 蛋白。

[0028] 图 3. 免疫荧光检测 MCF-7 中 Pcid2 蛋白。

[0029] 图 4. 2D7-F11 免疫沉淀 MCF-7 细胞裂解液中 Pcid2 蛋白（左：IgG 对照，右：Pcid2 mAb）。

[0030] 图 5. 免疫组化检测乳腺癌组织切片中 Pcid2 表达。

具体实施方式

[0031] Pcid2 蛋白在干细胞能存在高表达，具有维持干细胞自我更新 (self-renewal) 能力的重要功能。实验表明，通过 RNA 干扰的方法，降低干细胞内 Pcid2 蛋白的水平，能够导致干细胞自我更新能力的下降，分化的出现，表现为碱性磷酸酶染色的异常。类似的报道也指出，Pcid2 蛋白可能同 B 细胞的发育分化有关，条件性敲除小鼠 B 细胞表达的 Pcid2 蛋白可最终导致外周血中 B 细胞数目的下降。进一步的实验证明了在 B 细胞分化过程中的一些 B 细胞前体细胞，受 Pcid2 蛋白敲除的影响，出现了细胞数目的减少，这说明 Pcid2 在 B 细胞的发育分化过程中发挥着重要作用。此外，Pcid2 蛋白还与细胞凋亡及细胞周期调控密切相关。同一篇报道指出，在 Pcid2 蛋白敲除的 B 细胞中，Caspase3 的活性大大提高，导致大量 B 细胞出现凋亡特性。此外，Pcid2 能够影响细胞中 MAD2 的表达水平，RNA 实验表明，Pcid2 敲除细胞中，胞浆内 MAD2 mRNA 的水平明显下降，最终导致 MAD2 蛋白表达水平的下调。MAD2 是有丝分裂过程中调节细胞周期的重要蛋白，其功能保证细胞周期过程中纺锤体的正确形成。MAD2 蛋白的错误下调能够导致细胞周期在有丝分裂过程中停滞，从而使 Pcid2 敲除细胞表现出很明显的多核特性。另外，最近又有报道指出，在三阴性乳腺癌增生过程中，Pcid2 基因出现拷贝数的扩增，这表明 Pcid2 蛋白很可能与三阴性乳腺癌的病变过程相关，从而可能为三阴性乳腺癌的病理检测及治愈途径提供一种分子指标。关于 Pcid2 功能的分子机制还不是很清楚。其同源蛋白研究表明，酵母及果蝇的 Pcid2 同源蛋白都与 mRNA 的出核运输密切相关，其同源蛋白的缺失能够导致 mRNA 的核内聚集。另外，具有 PCI 结构域的其他蛋白通常能够借助 PCI 结构域形成大的复合体蛋白结构，存在于蛋白酶体、COP9 复合体、真核转录起始因子复合体 3 及其它一些复合体结构中，发挥复杂的生物学功能。人的 Pcid2 蛋白很可能与其酵母及果蝇同源蛋白及具有 PCI 结构域的其他蛋白具有类似的分子机制，其复杂的功能亟需深入研究。但是，目前对于该蛋白的可溶性重组表达没有任何报道。目前已知的抗体只能在 Western Blot 水平识别变性的包涵体形式的重组蛋白，对于胞内内源表达的 Pcid2 蛋白无法检测。

[0032] 本发明包括：一种可溶性表达 Pcid2 重组蛋白的方法，它通过 Pcid2 蛋白与其相互作用蛋白 Dss1 共表达得到。一种特异性的抗人 Pcid2 蛋白的抗体 2D7-F11，它由小鼠杂交瘤细胞系 2D7-F11 产生。该抗体在免疫学功能实验上具有广泛的应用。以重组 Pcid2 蛋白免疫 Balb/C 小鼠，应用淋巴细胞杂交瘤技术，制备了一株能够稳定分泌特异性抗人 Pcid2 蛋白单克隆抗体的细胞株 2D7-F11。

[0033] 本发明中的一种可溶性表达 Pcid2 重组蛋白的方法是通过共表达 Pcid2 与其相互

作用蛋白 Dss1 得到。Pcid2 单独表达均以包涵体形式存在,只有与 Dss1 共表达才能形成正确的构象,存在于上清中。

[0034] 本发明中的一种阳性杂交瘤细胞为抗人 Pcid2 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株 2D7-F11,该杂交瘤细胞株于 2011 年 6 月 30 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. 5014。

[0035] 本发明中的抗人 Pcid2 蛋白单克隆抗体 2D7-F11 的实验表明,2D7-F11 与重组人 Pcid2 蛋白及细胞或组织内源性表达的 Pcid2 蛋白呈强阳性反应,但与共表达的 Dss1 蛋白不存在阳性反应。与细胞内其它蛋白不存在交叉反应。

[0036] 本发明中抗人 Pcid2 蛋白的单克隆抗体 2D7-F11 具有以下特点和性能:(1)ELISA 实验中与重组 Pcid2 蛋白及细胞裂解液中的 Pcid2 蛋白呈强阳性反应;(2)Western Blot 实验中能够识别变性的重组 Pcid2 蛋白及内源性表达的 Pcid2 蛋白的条带;(3)免疫沉淀实验能够特异性结合重组及细胞裂解液中内源性的 Pcid2 蛋白;(4)免疫荧光实验能够识别固定细胞中的 Pcid2 蛋白;(5)免疫组织化学实验能够识别固定组织切片中的 Pcid2 蛋白。

[0037] 实施例 1

[0038] 可溶性 Pcid2 重组蛋白的制备和纯化

[0039] (1) 表达质粒构建

[0040] 通常以重组蛋白表达难易来看,利用大肠杆菌的原核表达策略是最简单易行的蛋白表达策略。我们成功地利用原核表达得到了可溶性的 Pcid2 蛋白。首先,为了表达 Pcid2 蛋白及其相互作用蛋白 Dss1,我们利用 PCR 技术从 cDNAs 中扩增得到这两个序列 (NCBI 序列号 NP_001120675.1、NP_006295.1),经过限制性酶切和连接构建到 Novagen 的商品化原核表达载体 pETDuet-1 上,其中 Pcid2 蛋白带有 His 标签,用于重组蛋白的纯化,而 Dss1 不带任何标签。pDuet 质粒能够保证两个蛋白的同时翻译表达。

[0041] 表达载体构建过程:

[0042] Pcid2 核酸序列:

[0043] DNA Sequence Open Reading Frame:82 to 1281 (SEQ ID NO:1) NM_018356.2

[0044] AGACGGACCG AGGGCCGGAA GTGACGCCAG CTGGCCCGCT TGAGGCGTAG GGGGTGGCGC TCTCCGTTGC

[0045] GCGGCGCTCC CATGGCGCAC ATTACCATTA ACCAGTACCT GCAGCAGGTG TACGAAGCCA TCGACAGCAG

[0046] AGATGGAGCA TCTTGTGACAG AGTTGGTGTG TTTTAAACAT CCTCATGTTG CAAACCCAG ACTTCAAATG

[0047] GCCTCTCCAG AGGAGAAGTG TCAACAAGTC TTGGAACCCC CTTATGATGA AATGTTTGCA GCTCATTTAA

[0048] GGTGCACTTA TGCAGTGGGG AATCATGACT TCATAGAGGC ATACAAGTGC CAGACCGTGA TAGTCCAATC

[0049] ATTCTTGCGA GCATTGCAGG CCCACAAAGA AGAAACTGG GCTCTGCCTG TCATGTATGC AGTAGCGCTT

[0050] GACCTTCGAG TGTTTGCCAA TAATGCAGAT CAACAGTTGG TAAAGAAAGG AAAAAGCAAA GTTGGGGACA

[0051] TGTTGGAAAA AGCAGCAGAG TTAGTATGA GCTGTTTCCG GGTCTGTGCC AGCGACACCC GTGCTGGTAT

[0052] AGAGGACTCT AAGAAGTGGG GCATGCTGTT TCTGGTGAAC CAGCTGTTTA AAATCTACTT CAAGATCAAC

[0053] AAACCTCATT TATGTAACC CCTAATTAGA GCAATTGACA GCTCAAACCT GAAAGACGAT TACAGCACTG

[0054] CACAGAGAGT AACATACAAA TACTACGTTG GACGCAAGGC TATGTTTGAC AGCGATTTTA AGCAAGCTGA

[0055] GGAGTACCTG TCATTTGCCT TTGAGCATTG TCACCGTTCT AGTCAGAAAGA ACAAAGGAT GATTCTGATC

[0056] TATTTGCTTC CAGTAAAAAT GCTATTGGGT CACATGCCCA CTGTGGAGCT CCTGAAAAAG TATCACCTGA

[0057] TGCAGTTTGC GGAAGTAACC AGAGCTGTGA GCGAGGGCAA CCTGCTGCTG CTGCACGAGG CGCTGGCGAA

[0058] GCACGAGGCC TTCTTCATTC GCTGCGGAAT CTTCCTCATC CTGGAGAAGC TGAAGATCAT CACCTACAGG
 [0059] AACCTCTTTA AGAAAGTGTA TTTGTTACTG AAAACACACC AGCTGTCTCT GGATGCTTTT CTGGTTGCCT
 [0060] TGAAGTTCAT GCAGGTGGAG GACGTGGACA TTGACGAAGT TCAGTGTATT CTGGCTAACT TGATATACAT
 [0061] GGGACACGTC AAAGGCTACA TATCGCATCA GCATCAGAAG CTGGTGGTCA GCAAGCAGAA CCCATTTCTT
 [0062] CCCCTGTCCA CGGTGTGTTG AAAGTACACG GAGCCCCGAG GACGGACTCG GCTGGTTCTG GAGTCTTTGT
 [0063] GAGACTTCTT TGAAGGAGGC TTTGCGTGAA GGCTGCTCGG CTCACTTTTC CTAAGTGTGG TTCCTGAAGG
 [0064] CTGTCTTTGT AACTTTTTGT AGTTCTTTGT GTAAAAAGCG TATTCTGAAT TTATACACAT GGCATGTTCT
 [0065] TCATTATATC TTCCAGGATA CATCTATTTT TATATATTAA ATTTGAATGT GTTATCAAAA TGCTTGGTTA
 [0066] ACTTAAGGCA CCTTTTTAAA AGCAGAATTT AATTTGATTT AAATTTTCCA GATTTTATAG CTTGCCCTGTA
 [0067] TGGATGCTCC TCAATTTATG ATAGGGTTAC ATCCCAATAA ACTTATTTTA TTTGCCCTTG CAAAAAAAAA
 [0068] AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA
 [0069] Dss1 核酸序列：

[0070] DNA Sequence Open Reading Frame :129 to 341 (SEQ ID NO :2) NM_006304.1
 [0071] ATTCTTTCCC CAAGTCTCTA TGGTAGCGTC AGCGTCGGAG GCGGTAGTGA CGGTGGCGTT TCCTTGAGGA
 [0072] AGAGTGAGGG TTCCAACTTT TCTGCTTATC TGGGAGGTGT TGGGCGCGGA CAGTCGAGAT GTCAGAGAAA
 [0073] AAGCAGCCGG TAGACTTAGG TCTGTTAGAG GAAGACGACG AGTTTGAAGA GTTCCCTGCC GAAGACTGGG
 [0074] CTGGCTTAGA TGAAGATGAA GATGCACATG TCTGGGAGGA TAATGGGAT GATGACAATG TAGAGGATGA
 [0075] CTTCTCTAAT CAGTTACGAG CTGAACTAGA GAAACATGGT TATAAGATGG AGACTTGATA GCATCCAGAA
 [0076] GAAGTGTTGA AGTAACCTAA ACTTGACCTG CTTAATACAT TCTAGGCAG AGAACCCAGG ATGGGACACT
 [0077] AAAAAATGT GTTTATTTCA TTATCTGCTT GGATTTATTT GTGTTTTTGT AACACAAAAA ATAAATGTTT
 [0078] TGATATAAAA AAAAAAAAAA

[0079] 利用 PCR 将 Pcid2 (SEQ ID NO :1)、Dss1 (SEQ ID NO :2) 扩增出来并在序列两端加入双酶切位点 (Pcid2 两端酶切位点为 EcoRI、HindIII ;Dss1 两端酶切位点为 NdeI、XhoI)，将上述两段序列分别插入 pETDuet-1 载体 (pETDuet-1 载体图谱见图 1) 的 MCS1、MCS2 位置。

[0080] (2)Pcid2 蛋白表达

[0081] 将步骤 (1) 中构建好的 pETDuet-1 质粒转入表达菌株中，我们选用了通常的 BL21 菌株即得到了 Pcid2 蛋白的高效的可溶表达。其表达流程同普通的原核蛋白表达流程。简要过程为表达质粒转化 BL21 蛋白表达菌株，12 小时后挑克隆至 10ml Amp 抗性 LB 液体培养基中，摇菌 12 小时左右至 $OD_{600} \approx 4$ ，按 1 : 100 接入 1L Amp 抗性液体培养基中培养至 $OD_{600} \approx 1$ ，加入 1mM IPTG 诱导 4 小时，4000rpm 离心 0.5 小时收菌，超声破碎，16000rpm 离心 0.5 小时取上清，过镊柱纯化，用含 300mM 咪唑的洗脱缓冲液洗脱，即得到带有 His 标签的重组蛋白，His 标签能够通过蛋白酶切除，并经过后续的纯化，得到的产物序列与人 Pcid2 蛋白完全一致。蛋白电泳证明，虽然我们纯化过程中是针对 Pcid2 蛋白上存在的 His 标签，但是，Dss1 蛋白同样随 Pcid2 而纯化出来，表明二者之间通过相互作用结合在一起。我们的实验也表明，仅表达 Pcid2 蛋白会导致该蛋白完全存在于包涵体中，而无可溶形式存在。在后面的抗体制备过程中，以包涵体蛋白为抗原制备的抗体，虽然可能在 Western Blot 水平，识别变性的 Pcid2 蛋白，但在免疫沉淀、免疫荧光、免疫组化等实验中，很难识别具有类似天然构像的 Pcid2 蛋白。我们的表达方法通过 Pcid2 与其相互作用蛋白 Dss1 的相互作

用从而稳定了 Pcid2 的结构,使其在表达过程中能够形成正确的构像,从而能以可溶形式存在。Dss1 仅含有 70 个氨基酸,是分子量很小的小分子肽段,常常能够与具有 PCI 结构域的蛋白共同存在,也被有些研究人员称为“分子胶”,能够把某些蛋白结构中不稳定的区域,通过与 Dss1 的相互作用,填补不稳定区域,从而使蛋白形成正确构像。我们的实验表明,在原核水平和真核水平上,Dss1 都能够促进 Pcid2 蛋白稳定性的提高。

[0082] 实施例 2

[0083] (1) 杂交瘤的制备

[0084] 以实施例 1 中所得的重组人 Pcid2/Dss1 蛋白作为抗原免疫 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,每只小鼠每次注射 50 微克重组人 Pcid2/Dss1 蛋白。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。

[0085] 在免疫小鼠的同时准备小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0(ATCC CRL-1772)。

[0086] 将从免疫小鼠脾脏中分离得到的致敏的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0(ATCC CRL-1772) 融合(《实用免疫学》,杨廷彬主编,长春出版社,1994 年 12 月出版),以小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞,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)常规细胞培养操作进行选择培养。

[0087] 接着,用 ELISA 方法检测上述杂交瘤细胞培养上清:以重组人 Pcid2 蛋白包被 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 100 μl,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) 50 μl,室温静置 5 分钟,加终止液(2mol/L 的硫酸)50 μl。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。

[0088] 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。

[0089] 本发明中的一种阳性杂交瘤细胞为抗人 Pcid2 蛋白杂交瘤细胞株 2D7-F11,将该杂交瘤细胞株与 2011 年 6 月 30 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通生物中心(CGMCC,中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,100101),保藏号为 CGMCC No. 5014

[0090] (2) 2D7-F11 单抗的制备和纯化

[0091] 将上述杂交瘤细胞 2D7-F11 接种至 Balb/c 小鼠腹腔,制备腹水,再从腹水中提取单抗。单抗 2D7-F11 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 2D7-F11 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(pH2.8)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。

[0092] 实施例 3

[0093] 2D7-F11 单抗的鉴定

[0094] 将在实施例 2 中制备的 2D7-F11 单抗,按常规方法对重组人 Pcid2 蛋白及人肿瘤细胞系细胞裂解液进行 western blotting。如图 2 所显示,2D7-F11 单抗与重组人 Pcid2 蛋白及表达人天然 Pcid2 蛋白的细胞呈强阳性反应,而与其它蛋白包括 Dss1 无交叉反应。

[0095] 将在实施例 2 中制备的 2D7-F11 单抗,按常规方法对肿瘤细胞系 HeLa、MCF-7、HepG2(购自协和细胞库)等进行免疫荧光反应。结果表明,2D7-F11 单抗与表达人天然 Pcid2 的细胞呈强阳性反应,如图 3 所显示。

[0096] 在实施例 2 中制备的 2D7-F11 单抗,与 MCF-7 细胞的裂解液进行免疫沉淀反应,能够特异识别细胞裂解液中的 Pcid2 蛋白,而与其它蛋白没有交叉反应,如图 4 所显示。

[0097] 在实施例 2 中制备的 2D7-F11 单抗,按常规方法检测乳腺癌组织的石蜡切片,可以观察到特异的 Pcid2 组织分布,如图 5 所显示。

[0001]

IB115038

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 人Pcid2蛋白的可溶性表达及抗人Pcid2蛋白的单克隆抗体2D7-F11和分泌该抗体的杂交瘤细胞系

<130> IB115038

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1200

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

atggcgcaca ttaccattaa ccagttacctg cagcaggtgt acgaagccat cgacagcaga    60
gatggagcat cttgtgcaga gttggtgtct tttaaaccatc ctcatgttgc aaaccacaga    120
cttcaaatgg cctctccaga ggagaagtgt caacaagtct tggaaacccc ttatgatgaa    180
atgtttgcag ctcatttaag gtgcacttat gcagtgggga atcatgactt catagaggca    240
tacaagtgcc agaccgtgat agtccaatca ttcttgcgag cattccagge ccacaaagaa    300
gaaaactggg ctctgcctgt catgtatgca gtacgcttg accttcgagt gtttgcaat    360
aatgcagatc aacagttggt aaagaaagga aaaagcaaag ttggggacat gttggaaaaa    420
gcagcagagt tactgatgag ctgtttccgg gtctgtgcca ggcacaccg tgctggtata    480
gaggactcta agaagtgggg catgctgttt ctggtgaacc agctgtttaa aatctacttc    540
aagatcaaca aactccattt atgtaaacc ctaattagag caattgacag ctcaaacctg    600
aaagacgatt acagcactgc acagagagta acatacaaat actacgttgg acgcaaggt    660
atgtttgaca gcattttaa gcaagctgag gagtaectgt catttgcctt tgagcattgt    720
caccgttcta gtcagaagaa caaaagatg attctgatct atttgccttc agtaaaaatg    780
ctattgggtc acatgcccac tgtggagctc ctgaaaaagt atcactgat gcagtttgcg    840
gaagtaacca gagctgtgag cgagggcaac ctgctgctgc tgcacaggc gctggcgaag    900
cacgaggcct tcttcattcg ctgcggaate ttctcatcc tggagaagct gaagatcacc    960
acctacagga acctctttaa gaaagtgtat ttgttactga aaacacacca gctgtctctg    1020
gatgcttttc tggttgcctt gaagttcatg caggtggagg acgtggacat tgacgaagtt    1080
cagtgtattc tggctaactt gatatacatg ggacacgtca aaggctacat atcgcatcag    1140
caccagaagc tgggtgctcag caagcagaac ccatttctc cctgtccac ggtgtgttga    1200

```

[0002]

IB115038

<210> 2

<211> 213

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

atgfcagaga aaaagcagcc ggtagactta ggtctgttag aggaagacga cgagtttgaa 60

gagttccctg ccgaagactg ggctggctta gatgaagatg aagatgcaca tgtctgggag 120

gataattggg atgatgacaa tgtagaggat gacttctcta atcagttacg agctgaacta 180

gagaaacatg gttataagat ggagacttca tag 213

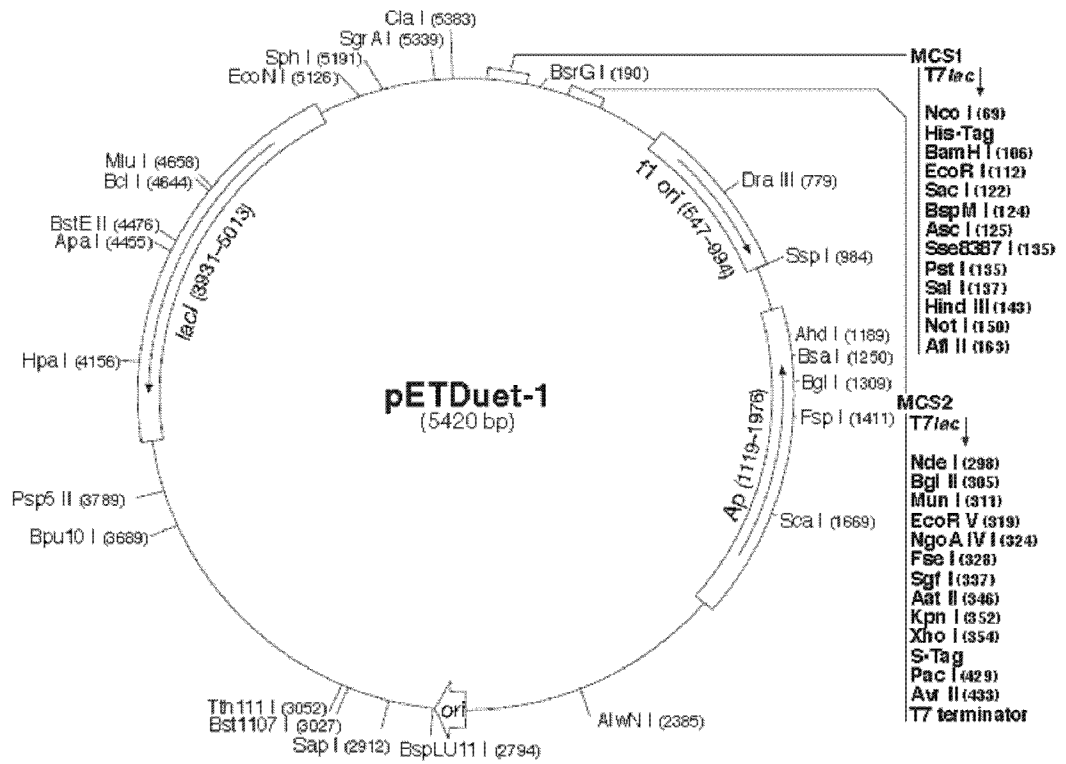


图 1

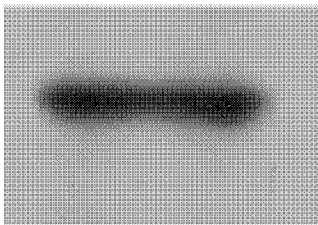


图 2

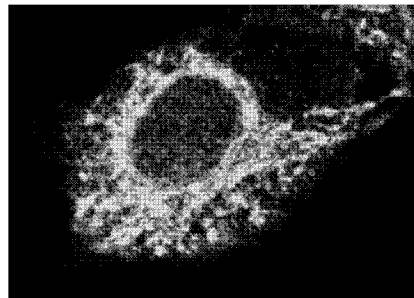


图 3

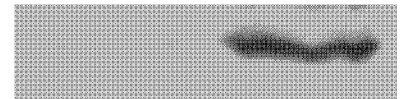


图 4

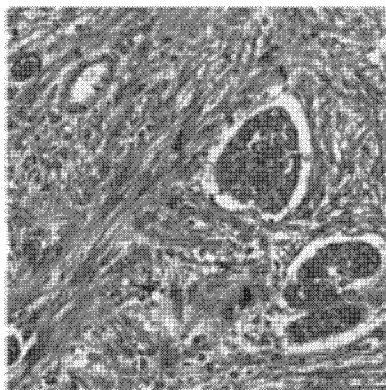


图 5