

杂交瘤抗体基因测序实验

1. 案例概述	2
2. 实验设计	2
3. 单抗杂交瘤总 RNA 的提取	2
4. 第一链 cDNA 合成	3
5. 可变区基因扩增与纯化	3
6. 载体构建	3
7. 转化与质粒抽提	3
7.1. 转化和 PCR 鉴定	3
7.2. 质粒抽提	4
8. 双酶切鉴定	4
9. 测序	5
10. 生物信息学分析	5
11. 服务网址	5

南京德泰生物拥有丰富的杂交瘤抗体基因测序经验，我们的杂交瘤抗体基因测序服务是基于 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 技术，快速可靠。相较于直接进行氨基酸序列分析的抗体测序，杂交瘤测序可以避免亮氨酸/异亮氨酸较难区分等缺陷，提供更准确可靠的结果。我们可对抗体能够对抗体的轻链、重链以及全长进行测序，测序范围涵盖小鼠、大鼠、兔、山羊、鸡等多个物种。同时，德泰还拥有成熟的抗体制备与重组蛋白表达平台，除了传统的单抗多抗制备，我们还能提供重组抗体表达服务。

1. 案例概述

某客户在制备鼠单克隆抗体之后，想要继续深入研究，改造该抗体，委托我们对该抗体的可变区基因进行测序。

2. 实验设计

培养客户提供的杂交瘤细胞株，利用试剂盒抽提杂交瘤细胞株的总 RNA，利用 3' 与 5' 端 RACE 技术进行 RT-PCR 反应获得第一链 cDNA，设计引物，PCR 扩增抗体的轻链和重链可变区序列。将可变区序列克隆到载体上表达，转入 DH5a 克隆菌株中培养。挑选单菌落，PCR 鉴定，确保目的序列连接到载体上。抽提质粒，酶切鉴定后测序。对测序结果进行生物信息学分析。

3. 单抗杂交瘤总 RNA 的提取

复苏杂交瘤细胞株后培养，待细胞长至对数生长期，细胞计数约 8×10^7 时，离心，5min 后收集细胞。实验开始前，将实验用的枪头烧杯等仪器浸泡于 DEPC 溶液，除去 RNA 酶，高温灭菌后烘干。超净工作台环境下，用试剂盒提取细胞总 RNA， -80°C 保存。

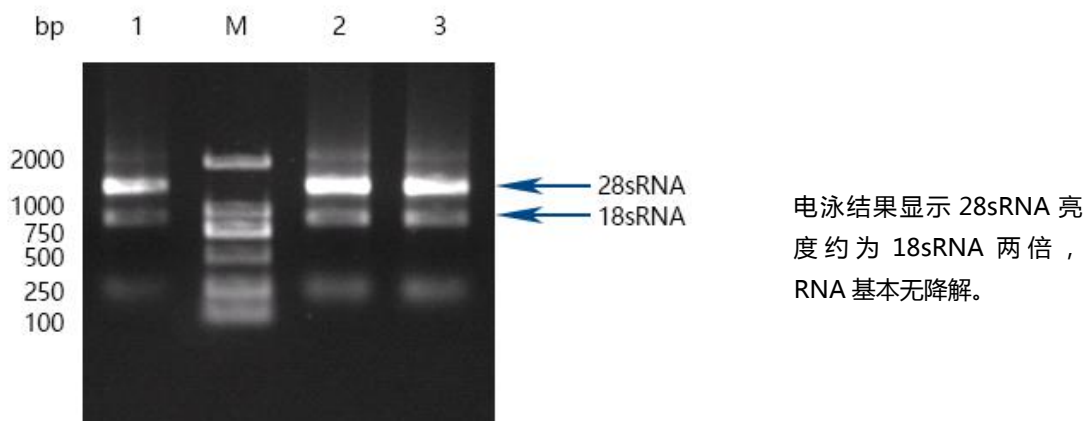


图 3-1 总 RNA 提取结果

4. 第一链 cDNA 合成

提取杂交瘤总 RNA 后 利用 3' RACE 技术与 5' RACE 技术 ,RT-PCR 得到与全长 mRNA 互补的第一链 cDNA ,引物为帽子结合引物。

5. 可变区基因扩增与纯化

以合成的 cDNA 作为模板,设计并合成 V_H 和 V_L 的上下游引物,PCR 扩增 V_L 与 V_H 基因。分别取 V_H 和 V_L 基因的 PCR 产物各 20 μ l 进行电泳,采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,切下目的条带,纯化后回收目的条带。

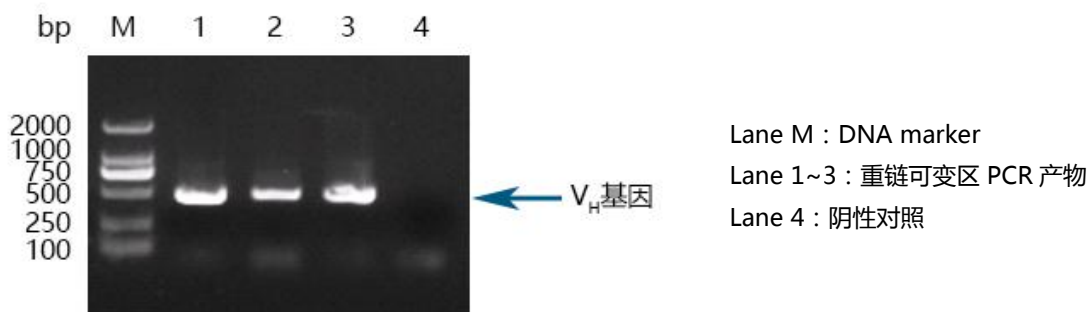


图 5-1 重链可变区基因 PCR 结果

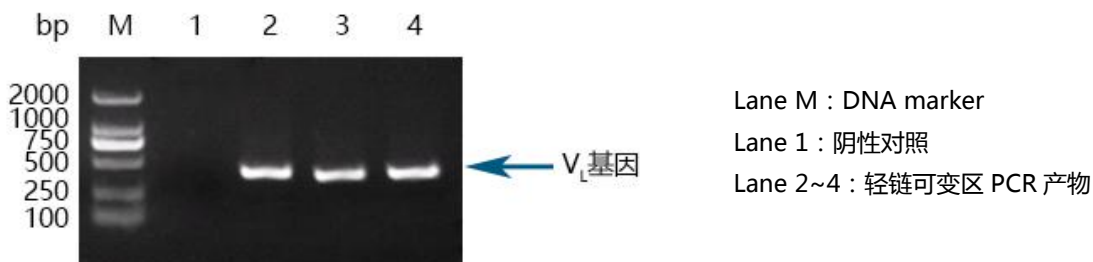


图 5-2 轻链可变区基因 PCR 结果

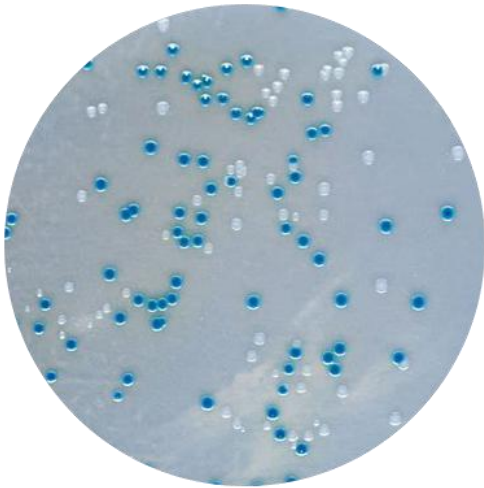
6. 载体构建

将目的基因片段和 T 载体连接。连接体系 (10 μ l) : 10 \times T4 连接 buffer 2 μ l , T4 连接酶 1 μ l , V_H 或 V_L 基因片段 3 μ l , T 载体质粒 DNA 1 μ l (1:3-1:8) , ddH₂O 3 μ l , 16 $^{\circ}$ C 连接 3 小时后进行下一步。

7. 转化与质粒抽提

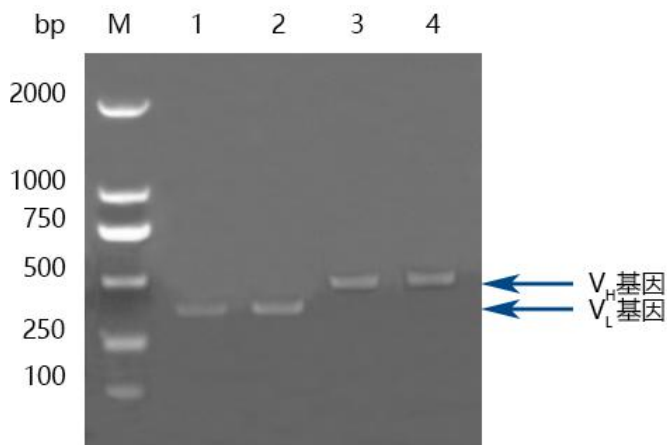
7.1. 转化和 PCR 鉴定

将质粒转入感受态 DH5a , 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜后,蓝白斑筛选阳性菌落。挑取白色阳性菌落,进行菌液 PCR,分别扩增重链可变区与轻链可变区基因。反应结束后,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。



蓝色菌落为阴性菌落，白色菌落为阳性菌落。

图 7-1 蓝白斑筛选



Lane M : DNA marker
Lane 1~2 : 轻链可变区 PCR 产物
Lane 3~4 : 重链可变区 PCR 产物

图 7-2 质粒鉴定结果

7.2. 质粒抽提

无菌条件下，从培养板上挑取阳性的白色菌落，将挑取的菌落置于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37°C 条件下振荡培养过夜。取 1.5ml 菌液，用试剂盒抽提质粒。

8. 双酶切鉴定

根据质粒上的酶切位点，双酶切鉴定插入片段大小是否与插入的可变区基因大小一致。

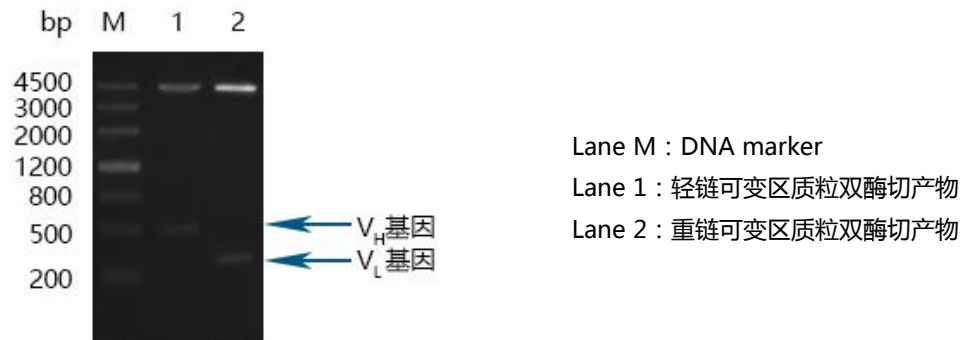


图 8-1 质粒双酶切结果

9. 测序

对 PCR 和双酶切结果均为阳性的质粒进行测序，对序列进行比对分析，确定可变区的基因序列，再进行下一步生物信息学分析。

10. 生物信息学分析

在 GenBank 中，比对测序结果与小鼠抗体核酸序列，结果显示该抗体的轻链和重链的可变区序列与提交的小鼠 IgG 可变区序列的同源性超过 96%，确定测序得到的基因序列为小鼠抗体序列。利用 IMGT/V-QUEST 与 ABYSSIS 软件分析得到抗体轻链和重链可变区的氨基酸序列及 CDR 区、FR 区的划分。

11. 服务网址

www.detaibio.com/hybridoma-antibody-sequencing-service.html