

# HPV58E6特异性兔单克隆抗体及其制备方法与应用

申请号 CN201510054024. X

申请日 2015. 02. 03

公开（公告）号 [CN104610448A](#)

公开（公告）日 2015. 05. 13

分类号 C07K16/08(2006. 01); G01N33/68(2006. 01); G01N33/577(2006. 01)

申请（专利权）人 浙江大学医学院附属妇产科医院



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104610448 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201510054024. X

(22) 申请日 2015. 02. 03

(71) 申请人 浙江大学医学院附属妇产科医院  
地址 310006 浙江省杭州市上城区学士路 1  
号

(72) 发明人 吕卫国 邹健 程晓东 李阳  
章鉴洋 谢幸

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公  
司 33200

代理人 邱启旺

(51) Int. Cl.

*C07K 16/08*(2006. 01)

*G01N 33/68*(2006. 01)

*G01N 33/577*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页  
序列表9页 附图3页

(54) 发明名称

HPV58E6 特异性兔单克隆抗体及其制备方法  
与应用

(57) 摘要

本发明制备了 HPV58-E6 特异性兔单克隆抗体,包括如下步骤:设计 HPV58E6 特异性多肽段,合成多肽段并交联到两种载体。将合成好的多肽抗原免疫新西兰大白兔,测定血清滴度,Western Blot 检测抗体特异性,然后将脾细胞与融合伴侣细胞进行细胞融合培养后,取上清检测抗体滴度及特异性,筛选出特异度及效价最好的融合细胞,将融合细胞裂解提取 RNA,做 RT-PCR,获得抗体重链 cDNA,构建入 pTT5 质粒载体,将包含重链质粒共转染到 HEK-293-6E 细胞进行表达获得重组抗体,即为 HPV58-E6 单克隆抗体。此抗体可用于 Western Blot 检测 HPV58 型癌基因 E6 的表达。

1. 一种 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体,其特征在于,该抗体的基因序列由 SEQ ID NO. 1 所示的重链和 SEQ ID NO. 2 所示的轻链组成。

2. 一种权利要求 1 所述的 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体的制备方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1)比较 HPV58E6 与 HPV16E6,HPV31E6,HPV33E6,HPV52E6,HPV67E6 序列,找出 HPV58E6 的特异性序列,针对该特异性序列设计多肽 ZJM-1b ;ZJM-1b 的序列 SEQ ID NO. 6 所示;

(2)用 ZJM-1b 免疫新西兰大白兔,取免疫后的新西兰大白兔的血清,用 ELISA 检测血清的抗体滴度,筛选出滴度大于 ELISA 血清滴度判断标准的血清样本;

(3)将步骤 2 筛选出的血清样本进一步通过 Western Blot 检测血清的抗体特异性,筛选出抗体阳性的大白兔;

(4)将筛选出的大白兔的脾细胞与融合伴侣细胞 240E-W2 进行细胞融合,之后铺板到 96 孔培养板,在 1640AB 培养基(含有体积分数为 9% 的血清,体积分数为 1% 的 GlutaMAX)中进行克隆培养,培养 10 天后换液,换液后继续培养 5 天,对上清进行 ELISA 筛选,找到阳性细胞克隆;

(5)将阳性细胞克隆转移至 24 孔板继续培养 6 天(在 1640AB 培养基中培养,所述培养基中含有体积分数为 9% 的血清,体积分数为 1% 的 GlutaMAX),取细胞上清液,用 ELISA 测定上清液的滴度;将上清液 20 倍稀释后,用 ELISA 测定稀释液的滴度,筛选出上清液和稀释液滴度 OD 值均大于 0.3 的细胞上清液样本;

(6)将步骤 5 筛选出的细胞上清液样本进行抗体 Western Blot 检测,进一步筛选出表达 HPV58E6 特异性抗体的克隆;

(7)针对每个克隆,提取 RNA,用引物 F1/R1 进行 RT-PCR 扩增,得到多个重链 cDNA 和多个轻链 cDNA ;将 cDNA 分别构建到 pTT5 质粒表达载体中,将包含重链 cDNA 的 pTT5 质粒与包含轻链 cDNA 的 pTT5 质粒进行两两配对,共转染到 HEK-293-6E 细胞后进行细胞培养;引物 F1/R1 的基因序列分别如 SEQ ID NO. 7 和 SEQ ID NO. 8 所示;

(8)取细胞培养的上清液,进行 ELISA 检测;筛选 IgG 浓度最高且滴度 OD 值大于 0.3 的配对,即为 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体的重链和轻链配对。

3. 一种权利要求 1 所述的 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体的应用,其特征在于,该应用为将 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体用于检测 HPV58E6 蛋白。

## HPV58E6 特异性兔单克隆抗体及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,具体涉及一种 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体及其制备方法与应用,属于医药领域。

### 背景技术

[0002] 目前,宫颈癌是发展中国家女性的主要死亡原因之一。人乳头瘤病毒 HPV 感染是导致宫颈癌的必要因素之一,依其致癌性分为高危型和低危型。人乳头状瘤病毒是高物种特异性的 DNA 肿瘤病毒,通过感染宫颈基底上皮而引起宫颈病变。高危型人乳头瘤病毒 (HPV) 持续感染已被认为是宫颈癌及其癌前病变的主要致病因素。已知的高危型别 HPV 有 15 种, HPV58 属高危型 HPV,较 HPV16 和 HPV18 少见,其感染例数占有 HPV 感染总数的 11.5%~28%,而在全世界范围内仅为 0~3%。中国内地尤其是东南地区,是全球 HPV58 高发区之一,流行病学研究表明中国多个地区宫颈上皮内瘤变 (CIN) 和宫颈癌患者中 HPV58 阳性率甚至高于 HPV18,仅次于 HPV16。HPV58E6、E7 是主要的原癌蛋白,具有使宿主细胞转化功能。E6 和 E7 这两个病毒蛋白总在 HPV 阳性的宫颈癌细胞中表达。E6 结合细胞内的泛素连接酶 E6-AP (E6-associated protein),使 p53 泛素化降解,不能转位入核,从而抑制 p53 发挥细胞阻滞与诱导凋亡的作用。E6 蛋白还可以激活端粒酶的表达并调节含盘状同源区域 (PDZ) 结构域蛋白的活性及肿瘤坏死因子受体,使细胞达到永生。E6 与 p53 的相互作用可能影响酪氨酸激酶家族 (Src) 的非受体酪氨酸激酶的调节或使其降解,能激发 HPV 感染细胞的有丝分裂。

[0003] HPV58 属于 HPV A9 家族,其他还包括 HPV16,31,33,35,52,67。其基因序列存在很大程度的相似性。目前市面上仅有 HPV16-E6 抗体,而没有 HPV58-E6 抗体。不同型别人乳头瘤病毒具有特异的基因序列,其致癌性也存在明显的差异。因此制备检测 HPV58-E6 的抗体对研究人乳头瘤病毒致宫颈癌机制具有重要的意义。将 HPV A9 家族的不同 HPV 型别的序列进行比对,比较 HPV58 与 HPV16,31,33,52,67 序列的相似度,找出差异序列,找到 HPV58E6 的特异性序列,针对该序列设计多肽,从而获得特异性 HPV58E6 多肽抗原。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体及其制备方法与应用,所述 HPV58E6 抗体可用于检测 HPV58E6 蛋白。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用以下方案进行实施:

[0006] 一种 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体,该抗体的基因序列由 SEQ ID NO.1 所示的重链和 SEQ ID NO.2 所示的轻链组成。

[0007] 一种 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0008] (1) 比较 HPV58E6 与 HPV16E6, HPV31E6, HPV33E6, HPV52E6, HPV67E6 序列,找出 HPV58E6 的特异性序列,针对该特异性序列设计多肽 ZJM-1b;ZJM-1b 的序列 SEQ ID NO.6 所示;

[0009] (2) 用 ZJM-1b 免疫新西兰大白兔, 取免疫后的新西兰大白兔的血清, 用 ELISA 检测血清的抗体滴度, 筛选出滴度大于 ELISA 血清滴度判断标准的血清样本;

[0010] (3) 将步骤 2 筛选出的血清样本进一步通过 Western Blot 检测血清的抗体特异性, 筛选出抗体阳性的大白兔;

[0011] (4) 将筛选出的大白兔的脾细胞与融合伴侣细胞 240E-W2 进行细胞融合, 之后铺板到 96 孔培养板, 在 1640AB 培养基 (含有体积分数为 9% 的血清, 体积分数为 1% 的 GlutaMAX) 中进行克隆培养, 培养 10 天后换液, 换液后继续培养 5 天, 对上清进行 ELISA 筛选, 找到阳性细胞克隆;

[0012] (5) 将阳性细胞克隆转移至 24 孔板继续培养 6 天 (1640AB 培养基, 含有体积分数为 9% 的血清, 体积分数为 1% 的 GlutaMAX), 取细胞上清液, 用 ELISA 测定上清液的滴度; 将上清液 20 倍稀释后, 用 ELISA 测定稀释液的滴度, 筛选出上清液和稀释液滴度 OD 值均大于 0.3 的细胞上清液样本;

[0013] (6) 将步骤 5 筛选出的细胞上清液样本进行抗体 Western Blot 检测, 进一步筛选出表达 HPV58E6 特异性抗体的克隆;

[0014] (7) 针对每个克隆, 提取 RNA, 用引物 F1/R1 进行 RT-PCR 扩增, 得到多个重链 cDNA 和多个轻链 cDNA; 将 cDNA 分别构建到 pTT5 质粒表达载体中, 将包含重链 cDNA 的 pTT5 质粒与包含轻链 cDNA 的 pTT5 质粒进行两两配对, 共转染到 HEK-293-6E 细胞后进行细胞培养; 引物 F1/R1 的基因序列分别如 SEQ ID NO. 7 和 SEQ ID NO. 8 所示;

[0015] (8) 取细胞培养的上清液, 进行 ELISA 检测; 筛选 IgG 浓度最高且滴度 OD 值大于 0.3 的配对, 即为 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体的重链和轻链配对。

[0016] 一种 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体的应用, 该应用为将 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体应用于检测 HPV58E6 蛋白。

[0017] 本发明的有益效果是: 本发明实验步骤简单易操作, 周期短, 易于获得所需抗体。本方法通过设计特异性多肽段, 可以获得特异性强的抗体。通过设计重链轻链表达质粒, 可以获得高效的重组抗体, 明显缩短了时间。将 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体可用于检测 HPV58E6 蛋白, 检测特异性高, 灵敏度高。

## 附图说明

[0018] 图 1 是检测血清抗体 western blot 图, 图中, 1 和 3 上样样本为 pEGFP-C1-HPV58E6 质粒转染 293T 细胞所提蛋白 2 和 4 上样样本为 pEGFP-C1 空载质粒转染 293T 细胞所提蛋白; 1 和 2 所用一抗为 ZJM-1 兔 #YK-353 以 1:1000 倍比稀释, 3 和 4 所用一抗为 ZJM-1 兔 #YK-353 以 1:1000 倍比稀释加 5ug 多肽阻断剂;

[0019] 图 2 是检测杂交瘤细胞上清 western blot 图, 图中, 左边 4 条带为 pEGFP-C1-HPV16E6 质粒转染 293T 细胞所提蛋白, 中间 4 条带为 pEGFP-C1-HPV58E6 质粒转染 293T 细胞所提蛋白, 右边 4 条带为 pEGFP-C1 空载质粒转染 293T 细胞所提蛋白; 所用一抗为: 1 所用一抗为 ZJM-1-5 以 1:100 稀释; 2 所用抗体为 ZJM-1-9 以 1:100 稀释; 3 所用抗体为 ZJM-1-27 以 1:100 稀释; 4 所用抗体为 YK-353 抗血清以 1:1000 稀释;

[0020] 图 3 是检测重组抗体 western blot 图, 图中, HPV58E6 为 pEGFP-C1-HPV58E6 质粒转染组, HPV16E6 为 pEGFP-C1-HPV16E6 质粒转染组; 所用一抗为: IB-5 为 ZJM-1b-5 以 1:100

稀释, IB-9 为 ZJM-1b-9 以 1:100 稀释, IB-27 为 ZJM-1b-27 以 1:100 稀释;

[0021] 图 4 是重组抗体 SDS-PAGE 纯度测定结果图;

[0022] 图 5 是检测 HPV58E6 表达 western blot 图, 图中, 1 为 pEGFP-C1-HPV16E6 质粒转染组, 2 为 pEGFP-C1-HPV58E6 质粒转染组, 3 为 pEGFP-C1 空载质粒组, 4 为空白对照组, 5 为 marker。所用一抗为: 使用 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体。

### 具体实施方式

[0023] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。

[0024] 实施例 1:

[0025] 本实施例制备 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体, 包括以下步骤:

[0026] 第 1 步、多肽合成及交联

[0027] 从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> 搜索出 HPV58E6、HPV16E6、HPV31E6、HPV33E6、HPV52E6、HPV67E6 的序列, 并比较 HPV58E6 与 HPV16E6, HPV31E6, HPV33E6, HPV52E6, HPV67E6 序列, 找出 HPV58E6 的特异性序列, 针对该特异性序列设计两条多肽, 即为特异性 HPV58E6 多肽抗原 ZJM-1a 和 ZJM-1b; 两条特异性 HPV58E6 多肽抗原的序列分别为 VCWRPRRRQTQV (SEQ ID NO. 5) 和 ETSVHEIELKCV (SEQ ID NO. 6)。

[0028] 第 2 步、免疫动物和血清滴度测定

[0029] 免疫方案: 采用标准免疫方案进行免疫, 每只兔子实施 5-6 次注射免疫, 取 2-3 次血清用于测试。每次注射免疫时, 把分装好的抗原解冻并与弗氏完全佐剂 (CFA) (第一次注射免疫) 或弗氏不完全佐剂 (后面的免疫注射) 充分混匀并采用皮下注射方式免疫兔子。具体如下:

[0030] 用 HPV58E6 两条多肽抗原免疫 4 只新西兰大白兔 (YK-350、YK-351、YK-352、YK-353), 免疫办法如表 1 所示。

[0031]

	YK-350 和 YK-351	YK-352 和 YK-353
Day1	取血 2ml (YK-350B0、YK-351B0)	取血 2ml (YK-352B0、YK-353B0)
Day1	注射 0.4mg KLH-ZJM-1a	注射 0.4mg KLH-ZJM-1b
Day21	注射 0.4mg KLH-ZJM-1a	注射 0.4mg KLH-ZJM-1b
Day35	注射 0.4mg KLH-ZJM-1a	注射 0.4mg KLH-ZJM-1b
Day49	注射 0.2mg OVA-ZJM-1a	注射 0.2mg OVA-ZJM-1b
Day61	取血 10ml (YK-350B1、YK-351B1)	取血 10ml (YK-352B1、YK-353B1)
Day63	注射 0.2mg OVA-ZJM-1a	注射 0.2mg OVA-ZJM-1b
Day75	取血 10ml (YK-350B2、YK-351B2)	取血 10ml (YK-352B2、YK-353B2)

[0032] ELISA 血清滴度测定：

[0033] 免疫前血清 B0, 第一次免疫血清 B1 和第二次免疫血清 B2 的滴度测定采用通用 ELISA 方法测定。包被抗原是交联到 BSA 上的多肽。测试结果如表 2 和表 3 所示。

[0034] 表 2 :ZJM-1a 免疫的 YK-350 和 YK-351 的血清滴度表

[0035]

包被抗原	ZJM-1a-BSA (50ng/孔)				
	YK-350 B1	YK-350 B2	YK-351 B1	YK-351 B2	对照抗原/对照抗体
兔子血清/稀释度					
1:250	2.34	2.36	2.47	2.45	2.64
1:1K	2.46	2.41	2.43	2.45	2.27
1:4K	2.40	2.28	2.41	2.36	1.65
1:16K	1.90	1.73	1.96	1.87	0.85
1:64K	1.06	0.95	1.20	1.05	0.32
1:256K	0.45	0.40	0.49	0.42	0.14
空白对照	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06
阴性对照	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08

[0036] 表 3 :ZJM-1b 免疫的 YK-352 和 YK-353 的血清滴度表

[0037]

包被抗原	ZJM-1b-BSA (50ng/孔)
------	---------------------

[0038]

兔子血清/稀释度	YK-352 B1	YK-352 B2	YK-353 B1	YK-353 B2	对照抗原/对照抗体
1:250	2.40	2.32	2.50	2.49	2.45
1:1K	2.50	2.43	2.39	2.40	2.23
1:4K	2.42	2.31	1.98	1.97	1.61
1:16K	1.98	1.91	1.25	1.25	0.81
1:64K	1.19	1.23	0.54	0.53	0.32
1:256K	0.52	0.55	0.21	0.20	0.14
空白对照	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
阴性对照	0.07	0.07	0.07	0.08	0.10

[0039] 测试结果表明,所有免疫的兔子都对免疫原产生了较强的免疫反应,血清滴度明显高于判断标准(1:64K 稀释度时 ELISA 读值 O. D. >0.3)

[0040] 第 3 步、取血清进行蛋白免疫印迹测试(WB 测试)

[0041] 将血清样本(YK-350B0、YK-351B0、YK-350B1、YK-351B1、YK-350B2、YK-351B2、YK-352B0、YK-353B0、YK-352B1、YK-353B1、YK-352B2、YK-353B2)进一步通过 western blot 检测血清的抗体特异性,YK-353 相对于其他兔子表现出更好的特异性,如图 1 所示,在 37~50KD 之间存在 58E6 组,可见条带;而在阴性组未见条带。

[0042] 第 4 步、细胞融合与培养

[0043] 取 YK-353 的脾脏,制备脾细胞悬液待用;将脾细胞与融合伴侣细胞 240E-W2 进行细胞融合,之后铺板到 96 孔培养板,在 1640AB 培养基(含有体积分数为 9%的血清,体积分数为 1%的 GlutaMAX)中分别进行克隆培养,培养 10 天后换液,换液后继续培养 5 天,筛选出 73 个活性较强的克隆。

[0044] 第 5 步、将初筛得到的 73 个克隆转移至 24 孔板继续培养 6 天,挑选出 41 个活性较强的克隆;取细胞上清液,用 ELISA 测定上清液的滴度;将上清液 20 倍稀释后,用 ELISA 测定稀释液的滴度,如表 4 所示。

[0045] 表 4:ELISA 测定结果

[0046]

抗原 克隆号	ZJM-1b-BSA (50ng/孔)	
	上清液	稀释液 (1: 20)
ZJM-1b-1	2.637	2.59
ZJM-1b-5	2.649	2.445
ZJM-1b-6	2.594	1.962
ZJM-1b-7	2.519	2.356
ZJM-1b-8	2.567	2.382
ZJM-1b-9	2.492	2.416

[0047]

ZJM-1b-12	2.655	2.342
ZJM-1b-13	2.735	2.385
ZJM-1b-15	2.621	2.09
ZJM-1b-16	2.488	1.786
ZJM-1b-17	2.545	2.295
ZJM-1b-18	2.628	2.46
ZJM-1b-20	2.426	2.183
ZJM-1b-21	2.517	2.209
ZJM-1b-22	2.357	1.701
ZJM-1b-24	2.474	2.449
ZJM-1b-25	2.625	2.332
ZJM-1b-27	2.563	2.411
ZJM-1b-28	2.424	1.533
ZJM-1b-29	2.27	2.042
ZJM-1b-30	2.472	2.01
ZJM-1b-32	2.62	2.116
ZJM-1b-33	2.48	2.306
ZJM-1b-35	2.54	1.788
ZJM-1b-38	2.861	2.776
ZJM-1b-39	2.705	2.311
ZJM-1b-43	2.664	2.135
ZJM-1b-45	2.634	2.495
ZJM-1b-59	2.503	1.991
ZJM-1b-60	2.529	2.416
ZJM-1b-61	2.632	2.193
ZJM-1b-62	2.525	2.598
ZJM-1b-63	2.554	2.323
ZJM-1b-64	2.663	1.615
ZJM-1b-66	2.437	2.172
ZJM-1b-67	2.494	2.333
ZJM-1b-68	2.516	2.134
ZJM-1b-69	2.563	2.411
ZJM-1b-70	2.44	1.948
ZJM-1b-71	2.617	2.477
ZJM-1b-72	2.563	2.139
阳性对照	2.047	2.074
	2.07	2.058
阴性对照	0.075	0.085
	0.081	0.076

[0048] 测试结果表明,筛选出的融合细胞都对免疫原产生了较强的免疫反应,血清滴度明显高于 0.3。

[0049] 第 6 步、将步骤 5 筛选出的细胞上清液样本进行抗体 western blot 检测,检测结

果如图 2 所示,ZJM1b-5、ZJM1b-9、ZJM1b-27 表现出较好的特异性,在阴性对照和 16E6 组未见条带,在 58E6 组条带可见。

[0050] 第 7 步、提取 ZJM1b-5 的 RNA,用引物 F1/R1 进行 RT-PCR 扩增 (F1 的基因序列如 SEQ ID NO. 7 所示,R1 的基因序列如 SEQ ID NO. 8 所示),得到 2 个重链 cDNA 和 3 个轻链 cDNA ;提取 ZJM1b-9 的 RNA,用 RT-PCR 扩增,得到 3 个重链 cDNA 和 2 个轻链 cDNA ;提取 ZJM1b-27 的 RNA,用 RT-PCR 扩增,得到 3 个重链 cDNA 和 2 个轻链 cDNA。将 cDNA 分别构建到表达载体 pTT5 质粒中,将包含重链 cDNA 的 pTT5 质粒与包含同一克隆体的轻链 cDNA 的 pTT5 质粒进行配对,配对后的质粒共转染到 HEK-293-6E 细胞后进行细胞培养 ;

[0051] 第 8 步、取细胞培养的上清液进行 ELISA 检测 ;并检测上清液和 40 倍稀释液的滴度 OD 值,如表 5 所示。

[0052]

克隆号	H/L 链配对组合	ZJM-1b (50ng/well)				IgG (ug/ml)
		上清液滴度	稀释液滴度 (1:40)	阳性对照	阴性对照	
ZJM1b-5	H1/L1	0.078	0.07	2.406	0.076	15.7
	H1/L2	0.084	0.078			17.2
	H1/L3	0.087	0.08			15.5
	H2/L1	2.728	2.686			9.8
	H2/L2	2.679	2.651			11.4
	H2/L3	2.761	2.336			9.9
ZJM1b-9	H1/L1	2.808	2.941			27.8
	H2/L1	2.746	2.729			45.4
	H3/L1	2.785	2.819			36.6
	H1/L2	2.928	2.792			30.5
	H2/L2	2.704	2.671			37.1
	H3/L2	2.758	2.715			38.6
ZJM1b-27	H1/L1	2.925	2.849			11.7
	H2/L1	2.781	2.676			6.7
	H3/L1	2.868	2.827			10.1
	H1/L2	2.851	2.869			11.4
	H2/L2	2.895	2.547			5.2
	H3/L2	2.796	2.676			7.1

[0053] 由上表可知,ZJM1b-5 中的 H2/L2、ZJM1b-9 中的 H2/L1 以及 ZJM1b-27 中的 H1/L1 的滴度值和 IgG 较高,下面用 western blot 检测进一步检测其特异性。测试结果如图 3 所示,ZJM1b-9 中的 H2/L1 对 16E6 组未见条带,在 58E6 组条带可见,对 58E6 具有较好的特异性,因此确定为本发明的 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体。

[0054] 第 9 步、重组抗体测序。

[0055] 对 ZJM-1-9H2/L1 克隆进行测序,以获得重组抗体的 cDNA 序列 ;并进行 SDS-PAGE 纯度测定。ZJM1b-9 中的 H2/L1 进行测序,重链的基因序列如 SEQ ID NO. 1 所示,重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示,轻链的基因序列如 SEQ ID NO. 2 所示,轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示。SDS-PAGE 纯度测定结果如图 4,从图中可以看出,SDS-PAGE 纯度测定在

25 ~ 50KD 之间可见两条条带,50KD 处为重链和 25KD 处为轻链。

[0056] 实施例 2

[0057] 本实施例将实施例 1 制备的 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体应用于检测 HPV58E6 蛋白。分别将 HPV58E6 和 HPV16E6 序列构建入 pEGFP-C1 质粒载体中,将 pEGFP-C1 空载质粒和包含 HPV58E6 和 HPV16E6 的质粒转染 293T 细胞,48 小时后提取细胞蛋白,将所得蛋白为待测样本。分组为空白对照组, pEGFP-C1 空载质粒组, pEGFP-C1-HPV58E6 质粒转染组, pEGFP-C1-HPV16E6 质粒转染组。通过 western blot 检测 HPV58E6 蛋白表达情况,结果如图 5,从图中可以看出,在 40 ~ 55KD 间在 HPV58E6 组可见明显条带,而在其余各组未见条带。由此可见,实施例 1 制备的 HPV58E6 特异性兔单克隆抗体可应用于检测 HPV58E6 蛋白,且特异性高,灵敏度高。

## SEQUENCE LISTING

- <110> 浙江大学医学院附属妇产科医院
- <120> HPV58E6 特异性兔单克隆抗体及其制备方法与应用
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 1400
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 1
- |  |     |
|--|-----|
| aagcttgtag ccttcacat ggagactggg ctgcgctggc ttctcctggt cgctgtgctc   | 60  |
| aaaggtgtcc agtgtcagtc ggtggaggag tccgggggtc gcctgggtcac gcctgggaca | 120 |
| cccctgacac tcacctgcac cgtctctgga ttctccctca gtagcaagac aataagctgg  | 180 |
| gtccgccagg ctccagggaa ggggctagaa tggatcggag ccattgatag taatggtatg  | 240 |
| aaagcctacg cgaggtgggc gaaaggccga ttaccatct caaaagctc gaccacggtg    | 300 |
| tatctgaaaa tcaccagtcc gacaaccgag gacacggcca cctatttctg tgtcaaacc   | 360 |
| aacaatttgt ggggccagg caccctggtc accgtctcct cagggaacc taaggctcca    | 420 |
| tcagtcttcc cactggcccc ctgctgcggg gacacacca gctccacggt gaccctgggc   | 480 |
| tgctgtgtca aagggtacct cccggagcca gtgaccgtga cctggaactc gggcacctc   | 540 |
| accaatgggg tacgcacctt cccgtccgtc cggcagtcct caggcctcta ctgctgagc   | 600 |
| agcgtggtga gcgtgacctc aagcagccag cccgtcacct gcaacgtggc ccaccagcc   | 660 |

accaacacca aagtggacaa gaccgttgcg ccctcgacat gcagcaagcc cacgtgccca	720
ccccctgaac tcctgggggg accgtctgtc ttcattctcc ccccaaaacc caaggacacc	780
ctcatgatct cacgcacccc cgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggatgac	840
cccgaggtgc agttcacatg gtacataaac aacgagcagg tgcgcaccgc ccggccgccg	900
ctacgggagc agcagttcaa cagcacgacg cgcggtgtca gcaccctccc catcgcgcac	960
caggactggc tgaggggcaa ggagttcaag tgcaaagtcc acaacaaggc actcccggcc	1020
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaga gggcagcccc tggagccgaa ggtctacacc	1080
atgggccctc cccgggagga gctgagcagc aggtcgggtca gcctgacctg catgatcaac	1140
ggctttctacc cttccgacat ctcggtggag tgggagaaga acgggaaggc agaggacaac	1200
tacaagacca cgccggccgt gctggacagc gacggctcct acttcctcta cagcaagctc	1260
tcagtgccca cgagtgagtg gcagcggggc gacgtcttca cctgctccgt gatgcacgag	1320
gccttgacaca accactacac gcagaagtcc atctcccgt ctccgggtaa atgagcgtg	1380
tgccggcgag ctgcggccgc	1400

<210> 2

<211> 753

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

aagcttgtac ccttcacat ggacacgagg gccccactc agctgctggg gtcctgctg	60
ctctggctcc caggtgccac atttgcccaa gtgctgacct agactccatc cccagtgtct	120
gcagctgtgg gaggcacagt caccatcaat tgccagtcca gtcagagtgt ttataataac	180

aatgccttat cctggtatca gcagaaacca gggcagcctc ccaagctcct gatctattct	240
gcatccaaag tggcaactgg ggtcccatcg cggttcagcg gcagtggatc tggggcacag	300
ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaggc	360
gaatttagtt gtagtagtgc tgattgtttt gctttcggcg gagggaccga ggtggtggtc	420
aaagtgatc cagttgcacc tactgtcctc atcttcccac cagctgctga tcaggtggca	480
actggaacag tcaccatcgt gtgtgtggcg aataaatact ttcccgatgt caccgtcacc	540
tgggaggtgg atggcaccac ccaacaact ggcatcgaga acagtaaac accgcagaat	600
tctgcagatt gtacctaaa cctcagcagc actctgacac tgaccagcac acagtacaac	660
agccacaaag agtacacctg caaggtgacc cagggcacga cctcagtcgt ccagagcttc	720
aataggggtg actgttagag tgagagcggc cgc	753

<210> 3  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成

<400> 3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly  
 1                    5                    10                    15

Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro  
                   20                    25                    30

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser  
                   35                    40                    45

Ser Lys Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
50 55 60

Trp Ile Gly Ala Ile Asp Ser Asn Gly Met Lys Ala Tyr Ala Arg Trp  
65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ser Ser Thr Thr Val Tyr Leu  
85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val  
100 105 110

Lys Pro Asn Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly  
130 135 140

Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr  
145 150 155 160

Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn  
165 170 175

Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys  
195 200 205

Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala  
 210 215 220

Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln  
 260 265 270

Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val  
 275 280 285

Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val  
 340 345 350

Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser

355

360

365

Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu  
 370 375 380

Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala  
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val  
 405 410 415

Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;400&gt; 4

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro

20					25					30							
Val	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	Cys	Gln	Ser	Ser		
	35						40					45					
Gln	Ser	Val	Tyr	Asn	Asn	Asn	Ala	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro		
	50						55					60					
Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Lys	Val	Ala	Thr		
65							70					75					80
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Gln	Phe	Thr		
				85					90					95			
Leu	Thr	Ile	Ser	Asp	Leu	Glu	Cys	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys		
			100						105					110			
Gln	Gly	Glu	Phe	Ser	Cys	Ser	Ser	Ala	Asp	Cys	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly		
		115							120					125			
Gly	Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys	Gly	Asp	Pro	Val	Ala	Pro	Thr	Val	Leu		
	130								135					140			
Ile	Phe	Pro	Pro	Ala	Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Thr	Gly	Thr	Val	Thr	Ile		
145									150					155			160
Val	Cys	Val	Ala	Asn	Lys	Tyr	Phe	Pro	Asp	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Glu		
				165					170					175			

Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro  
 180 185 190

Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 195 200 205

Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr  
 210 215 220

Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys  
 225 230 235

<210> 5  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成

<400> 5

Val Cys Trp Arg Pro Arg Arg Arg Gln Thr Gln Val  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成

<400> 6

Glu Thr Ser Val His Glu Ile Glu Leu Lys Cys Val  
 1 5 10

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 7

aagcttgtac ccttcacctg ccggcgagct gcggccgc

38

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 8

aagcttgtac ccttcaccag tgagagcggc cgc

33

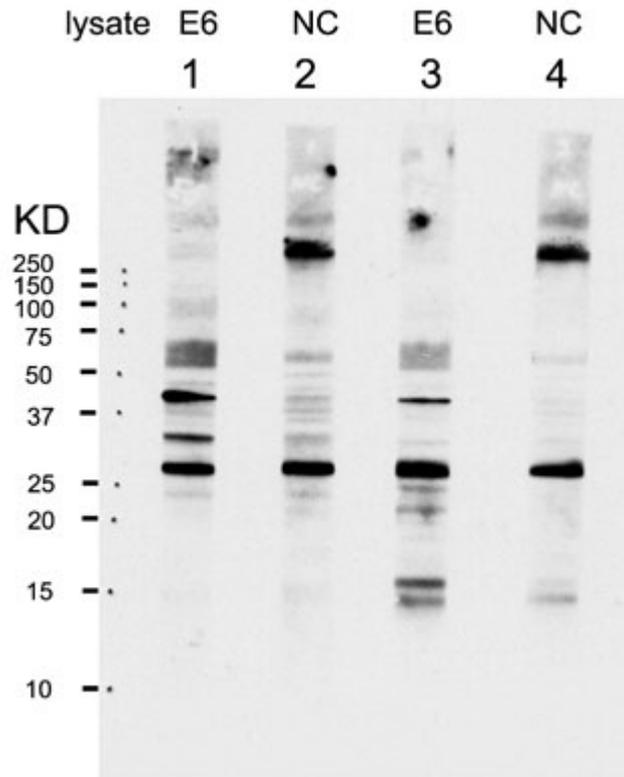


图 1

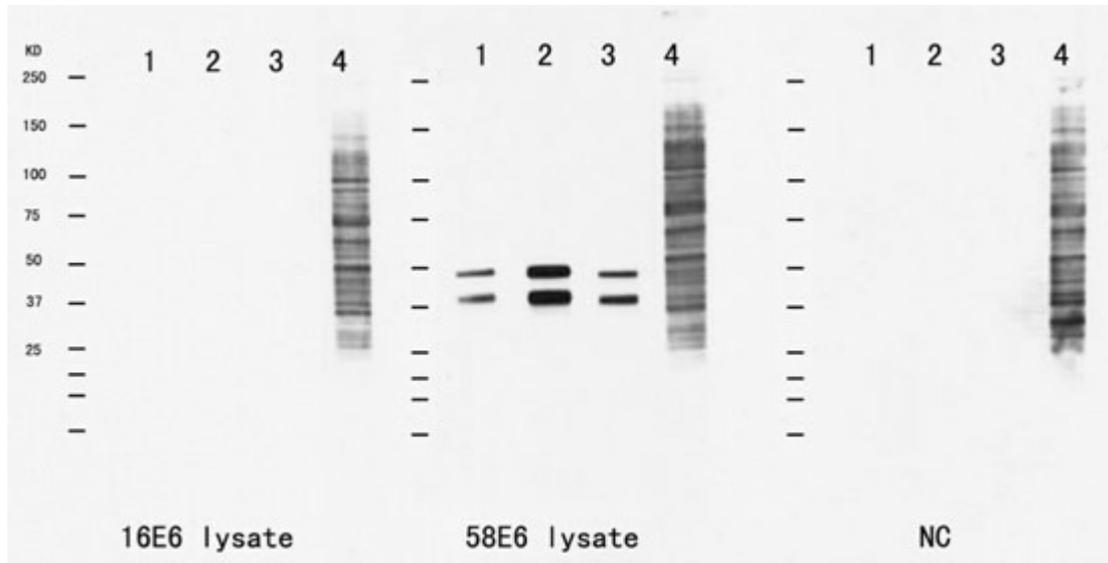


图 2

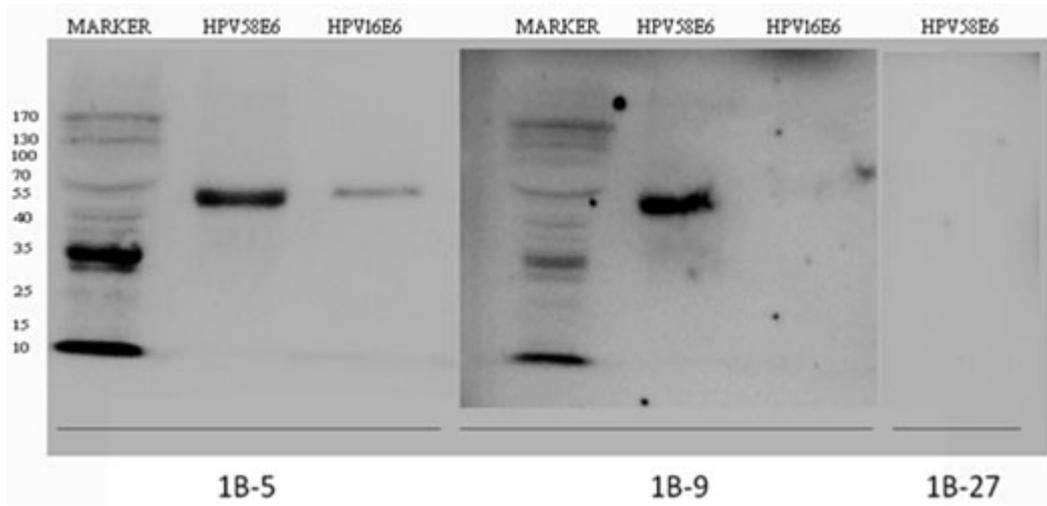


图 3

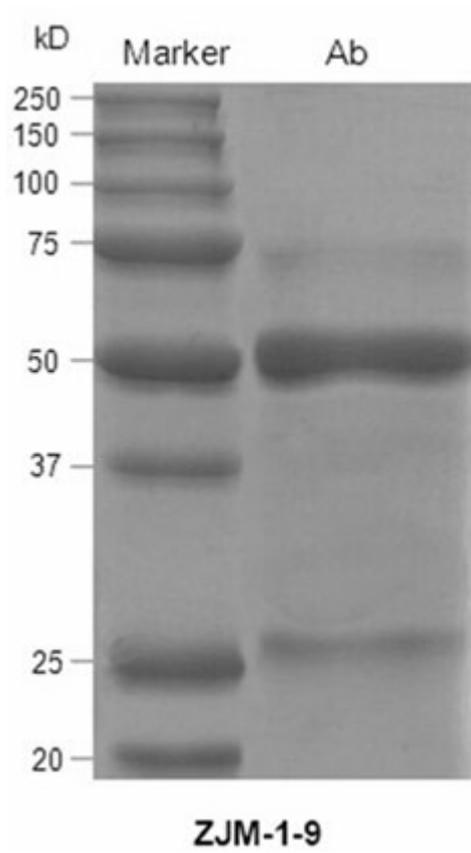


图 4

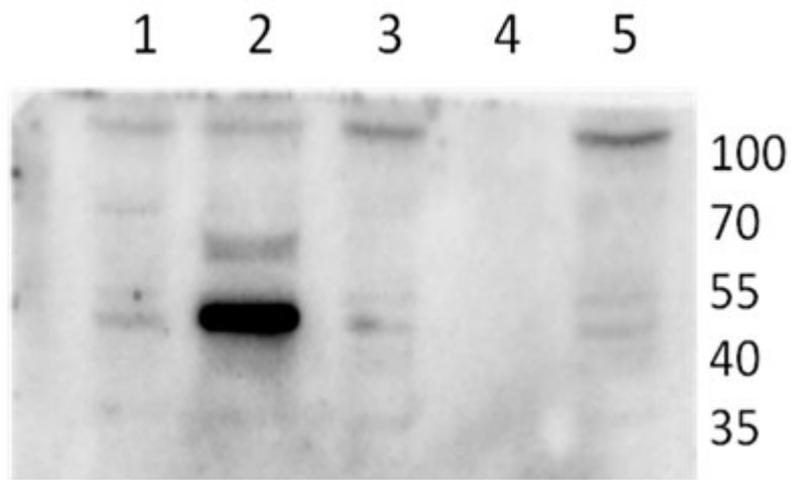


图 5