

(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:

2005年1月27日(27.01.2005)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2005/007851 A1

- (51) 国际分类号⁷: C12N 15/10, C12P 21/00
- (21) 国际申请号: PCT/CN2003/000715
- (22) 国际申请日: 2003年8月25日(25.08.2003)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
03139867.7 2003年7月18日(18.07.2003) CN
- (71)(72) 发明人/申请人: 文剑(WEN, Jian) [CN/CN]; 中国湖南省长沙市开福区北站路121号, Hunan 410000 (CN)。
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 刘辉(LIU, Hui) [CN/CN]; 中国湖南省长沙市车站北路319号1102, Hunan 410000 (CN)。
- (74) 代理人: 广州市诺专利事务所有限公司 (GUANGZHOU SINO PATENT AGENT CO., LTD.); 中国广东省广州市仓边路 87号四楼, Guangdong 510030 (CN)。
- (81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: THE DNA-ANTIBODY AND THE USES THEREOF

(54) 发明名称: DNA 抗体及其应用

(57) Abstract: The present invention relates to a DNA-antibody. The antibody was prepared by the following steps: 1) constructing three engineering antibody libraries of DNA polymorphism; 2) screening the above library of DNA-antibody; 3) labeling and amplifying the DNA-antibody. The present invention also relates to use the DNA molecule having antigen specially binding activity as the antibody so as to outcome the deficiency of antibody due to the variability of antigen and a series of difficulties of developing, screening, preparing, purifying protein, and expensive cost and long-term of preservation.

(57) 摘要

本发明公开了一种DNA抗体。所述的抗体按照以下步骤制成: 1) 三种DNA多样化工程抗体库的构建; 2) DNA抗体库的筛选; 3) DNA抗体的标记与扩增。本发明创造性地提出DNA抗体的概念, 即用具有特异性结合抗原活性的DNA分子用作抗体, 主要解决蛋白诊断中由于抗原的千变万化总是缺乏相应抗体以及抗体作为蛋白质不易研发、筛选、生产、纯化与保存引起的成本高、周期长等一系列问题。

WO 2005/007851 A1

DNA抗体及其应用

本发明所属技术领域

本发明涉及一种抗体，尤其涉及一种利用DNA作为抗体的技术。

在本发明之前的现有技术

5 免疫学的技术关键是制备特异性强、亲合力大、效价高的结合特异性抗原的抗体。由于每种抗原都有几个抗原决定族，由它免疫动物产生的抗体是针对多种抗原决定族产生的多个抗体，称为多克隆抗体。单克隆抗体则在此动物免疫基础上，由该免疫动物的单个抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合所形成的杂交瘤细胞经无性繁殖而来的细胞群所产生的，是针对单
10 个抗原决定族的，所以它的免疫球蛋白属同一类别，质地纯一，因此特异性强，亲和性一致。多克隆抗体则省去了单克隆抗体制作中的后期大部分工作，在免疫动物后直接取血清纯化即为多抗，但所得抗体混杂，交叉反应多，且每次制备时都需大量抗原免疫动物，耗时耗钱，无论是特异性、亲和性都比单抗差许多，故多抗逐渐为单抗取代。

15 杂交瘤技术的主要优点在于它的两大基本特点，第一、由分离的克隆产生的单克隆抗体是一种十分明确的化学制品而不是一种可随每个免疫动物，甚至随替同一动物的不同次采血而变化的不明确的非同质混合物。永久培养可无限制地提供化学结构完全相同的单克隆抗体。第二，杂交瘤技术是用不纯抗原制备纯抗体的理想方法。

20 杂交瘤-单克隆抗体技术和DNA重组技术所取得的成就促进了基因工程抗体技术的发展，最初出现的基因工程抗体是八十年代初报道的人鼠嵌合抗体(chimeric antibody)，随后出现人改型抗体(reshaped human

antibody)、小分子抗体、抗体融合蛋白等在基因水平经过改造的单克隆抗体。从八十年代末期进入九十年代初期,在(1)大肠杆菌直接表达有功能的抗体分子片段;(2)聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增抗体可变区基因以及(3)通过噬菌体表面表达系统(phage display)进行高效筛选等技术发展的基础上建立了抗体库技术,可通过基因工程手段在原核细胞体系直接克隆到特异性抗体的基因并生产该特异抗体。这一革命性的进展对抗体的制备、改造及新型抗体的开发带来了深刻的影响,标志着抗体技术经历了第一代抗体——血清多克隆抗体,第二代抗体——单克隆抗体,发展到了第三代抗体——基因工程抗体。

10 基因工程抗体技术包括两部分内容:一是用DNA重组技术对已有的单克隆抗体进行改造,包括鼠单克隆抗体的人源化、小分子抗体及抗体融合蛋白的制备。二是用抗体库技术筛选、克隆新的单克隆抗体。由于基因工程抗体技术尚处于发展阶段,探索性较强,许多技术没成熟规范化的操作程序,不同的实验室往往采用不同的技术方法。

15 真正以基因工程的方式制备抗体,始于1989年底英国剑桥winter小组与scrips研究所lerner小组创造性的工作。他们采用PCR方法克隆机体全部的抗体基因并重组于原核表达载体,以标记抗原即可筛选到相应抗体,当时称为组合抗体库技术。90年代初期,这一技术有了进一步的发展,即将抗体基因(vH或Fd)与单链噬菌体的外壳蛋白融合并表达于噬菌体表面,以固相的抗原吸附相对应的噬菌体抗体,经多次“吸附-洗脱-扩增”即可获得所需抗体。这是抗体产生的又一次重大技术革命。首先该技术将抗体的基因型及表型密切连系起来。表达的噬菌体抗体(亦可为分泌型)可供功能

检测，扩增噬菌体并抽提DNA即可获得相应抗体基因，便于测序或进一步的基因操作。其次该技术容量大，效率高，一般建库可达 10^8 ，基本包容了抗体多样性的信息。第三，“吸附-洗脱-扩增”过程将抗体的选择与再次扩增有机地结合起来，每轮操作可使特异性抗体富集 10^2 — 10^3 倍。噬菌体抗体库技术不仅摆脱了细胞融合等繁杂的操作，而且可不经免疫剂备抗体，为制备人源抗体开辟了新途径，这一点已为实验所证实。

以上所用的抗体都有一个共同特点，即都是蛋白质，不管是多克隆抗体、单克隆抗体还是基因工程抗体，其基本原理都是一致的：即利用重轻链可变区与抗原表位的相对特异性结合，通过小鼠体内筛选富集特异性抗体产生细胞或体外构建工程抗体文库并高效筛选生产特异性抗体的克隆的技术来制作各种特异抗体。

但是多抗、单抗和基因工程抗体其作为蛋白质的本质决定了其固有的缺点，因为在蛋白质水平上的各种操作如表达、分离、纯化以及诊断都需要较长的周期、繁杂的程序和较高的成本，以下以单克隆抗体和基因工程抗体来说明：

1、 周期长：单克隆抗体制作中动物的免疫周期至少一月以上，融合与筛选鉴定加上细胞克隆化至少需一月，再加上腹水制备以及抗原抗体纯化等如能在三月内制备一个足够高特异和灵敏的单抗的话，已经是很顺利了。基因工程抗体虽然周期相对单克隆抗体较短，但也需一月以上，且前提是足够多样化（ $>10^9$ ）的工程抗体库构建已成功，只需用特异抗原来筛选特异抗体。抗体库的构建繁杂，至少一个月。但基因工程抗体的特异性和亲和力都不如单抗。

2、 程序冗长、制备成本高：单抗制备中的所需操作冗长繁多，如动物免疫中的抗原制备和纯化、动物房准备和动物饲养都有一定要求，定期取血检测血清抗体效价；融合方案中骨髓瘤细胞的准备、细胞的融合和筛选、杂交细胞的克隆化、阳性克隆的筛选和维持、特异性和效价的鉴定、腹水的制备和抗体的纯化等，可见一个单抗的制备需多少操作，其中所需的细胞培养和蛋白纯化等所需的试剂价格高昂，加上时间长，成本自然就高。基因工程抗体抗体库构建繁杂，而且建立一个多样化库 ($>10^9$) 能够真正代表脾细胞中数以亿万计的变化多端的抗体，确实是一个难题；再加上要从如许之多的抗体中筛选到少数几个特异抗体，并且还要求特异性和亲和性都高，以及抗原抗体的纯化，这一切依然使其代价高昂，操作冗杂。

单克隆抗体的其他不足：

1) 对免疫原性差的抗原很难得到特异抗体或杂交瘤细胞；针对免疫原性差的抗原唯一途径是增加有用的抗体形成细胞数，可用改进免疫方案或改造抗原以提高其免疫原件。但这些手段颇复杂，因还不完全清楚抗体形成细胞或其前体是否能形成好的杂交细胞。现有的资料提示，克服弱免疫原性的唯一途径是联合技术，即要有足够的适宜B细胞，然后令其与骨髓瘤亲代细胞融合，研究者采用此方法将B细胞数浓集5-10倍，其优越性是减少了筛选量。但这样改进还不足以达到常规地获得抗弱免疫原杂交瘤。浓集技术的实用价值得进一步研究。

2) 生产小鼠和大鼠以外品系动物，特别是家兔和人的单克隆抗体存在

的困难。

3) 目前尚无成功的人源化单克隆抗体, 故不易用于药物。

基因工程抗体技术的不足:

- 1) 抗体库的多样化要求高 ($>10^9$), 构建繁杂, 构建成本很高。
- 5 2) 作为蛋白抗体, 仍然存在生产纯化中的一系列问题, 以及蛋白分子素有的免疫原性等问题, 而且基因工程抗体在原核细胞表达模拟亲本抗体结构与功能, 毕竟不如亲本抗体的亲和力和特异性。
- 3) 筛选困难, 由一个未经免疫的初级抗体库中筛选出理想的抗体肯定不是一件轻松的事情, 对许多抗原都无法筛选出理想的抗体。
- 10 4) 在靶药物筛选应用中, 虽然人源化工程抗体可避免其免疫原性, 但是抗体纯度要求很高, 且该人源化工程抗体库不易构建和筛选。

发明目的

由此可见, 作为蛋白质的抗体所固有的矛盾是无法解决的, 本发明创造性地提出DNA抗体的概念, 即用具有特异性结合抗原活性的DNA分子用作抗体, 主要解决蛋白诊断中由于抗原的千变万化总是缺乏相应抗体以及抗体作为蛋白质不易研发、筛选、生产、纯化与保存引起的成本高、周期长等一系列问题。

本发明的技术方案

在研究DNA与蛋白的相互作用中, 发现DNA与蛋白及其他大分子之间普遍存在着特异性的结合与互作, 创造性的提出了DNA抗体的概念, 意图解决蛋白质抗体中存在的固有问题, 创造出了三种DNA抗体文库构建以及其高效筛选方法, 以最终获得DNA抗体。

上述的DNA抗体，按照以下步骤制备：

- 1) 三种DNA多样化工程抗体库的构建；
- 2) DNA抗体库的筛选；
- 3) DNA抗体的标记与扩增。

5 本发明创造性地提出DNA抗体的概念，即用具有特异性结合抗原活性的DNA分子用作抗体，主要解决以往蛋白抗体所固有的缺陷，以及由于抗原的多样性总是缺乏相应抗体以及抗体作为蛋白质不易研发、筛选、生产、纯化与保存引起的成本高、周期长等一系列问题，因为在蛋白组学和基因功能研究以及各种免疫学科研实践中，经常会产生许多各种各样的抗原需
10 要临时得到相应特异性抗体，而无论是单克隆抗体还是基因工程抗体的制作周期相当长，生产纯化过程繁多，成本很高，大大限制了科研开发工作的进度和质量，从这种意义上讲，DNA抗体的制作周期短，成本低，生产出来后，客户甚至可以自己生产扩增，故将大大促进当今世界基因功能组学和蛋白质组学的发展进程。

15 而且由于蛋白质抗体分子量过大，免疫原性强，所以不易进入细胞，且不易用于靶药物；而DNA抗体分子小，免疫原性低，易穿透组织，恰好解决了这些缺点。

而且DNA抗体在保证其一定的特异性和亲和性的前提下，其各式各样的抗体库非常容易构建，且其筛选简单易行，因为筛选是通过结合—洗
20 脱—PCR富集过程进行的，周期很短，而且DNA抗体的保存与复制扩增更加简单，成本相当低廉；加上其易标记，分子小，经过进一步的优化，更可以提高其特异性和灵敏性；其小分子还可以避免免疫原性，成为抗体与

核酸药物的首选靶药物。

最主要的是，通过DNA抗体，可以把对蛋白质的诊断和分析，转移到对DNA的诊断和分析上来，从而为蛋白质组学带来一个崭新的技术平台。譬如把对蛋白水平上的消减杂交转移到基因水平上的消减杂交。可以说，DNA抗体将会为蛋白质的诊断打开一个全新的局面，其应用意义和前景是现在所无法预估的。

三种抗体的优劣性比较：

抗体类型	单克隆抗体	基因工程抗体	DNA抗体
抗体性质	免疫球蛋白	原核表达的多肽及具一定构象的蛋白分子	经过标记的单链DNA、双链DNA、杂化双链DNA
制备与筛选方法	体内富集抗体产生细胞，通过体外与骨髓瘤细胞融合筛选特异性杂交瘤克隆并鉴定。对弱免疫原难以筛选到特异单抗；很难得到除鼠之外物种的杂交瘤单抗。操作繁杂、周期长、成本高。	通过构建库容量超过 10^8 的基因工程抗体库，基本包含了抗体多样性的信息，通过Phage display的方法可进行高效筛选。库容量不足，常常是基因工程抗体筛选失败的原因。操作繁杂、周期长、成本高。	通过构建库容量超过 4^{40} 的DNA抗体库，加上3种不同的形式，远远超过了该数量；通过PCR富集的方法可高效筛选特异性抗体。操作简单、周期短、成本低。
生产纯化方式	杂交瘤小鼠腹水或培养上清液，需进一步纯化。所需操作繁杂、成本高、滴度低。	抗体可来源于原核表达克隆，需纯化去除其他杂蛋白。操作繁杂、成本较高、滴度不高。	DNA抗体随时可用PCR制备，跑胶纯化即可。操作简单、成本低、滴度极高。
制备成本	制备成本高	制备成本高	制备成本低
制备周期	至少3个月	至少2个月	一周
多样性容量	对大多数抗原都可产生特异性抗体。但对免疫原性低的抗原，由于杂交瘤形成效率的限制，	由于抗体库要求含足够的多样化抗体产生克隆，一般抗体建库可达 10^8 ，但由于抗原的多样	DNA抗体库的建库简单易行，其多样化序列完全可以远远

	较难 筛选到其特异性抗体。	性，仍然无法得到许多抗原的特异性工程抗体。	超过自然界抗原的数量，足以得到大多数抗原的特异性工程抗体。
免疫原性	分子量大，免疫原性强	除小分子工程抗体外，其他皆有强免疫原性	DNA抗体一般为小分子，免疫原性弱
特异性	对抗原的特异性较高	对抗原的特异性较高	对抗原的特异性较高
亲和性	对抗原的亲和性较高	对抗原的亲和性结合不如亲本抗体高	对抗原的亲和性不如亲本抗体高
滴度	较低	较低	高
检测灵敏度	较低	较低	高
组织穿透性	差	除小分子抗体外，其他基因工程抗体组织穿透性差	分子小，穿透性好
用于靶药物	单抗难用于靶药物，因为其强免疫原性	人源化工程抗体可用于靶药物。但生产制备繁杂	可用于靶药物，生产制备容易
用于芯片	每芯片上排列数量有限，且不易保存，重复使用性差	每芯片上排列数量有限，且不易保存，重复使用性差	每芯片上排列数量高，易保存，重复使用性好。

实施例

一、DNA抗体技术的基本原理：

针对各种核酸尤其是DNA的单克隆抗体的产生，暗示对于不同构象和序列的单链或双链DNA，都有一个特异性结合的具不同构象和序列的抗体多变区或抗原结合位点的存在，反过来，这一切意味着对于各种不同蛋白的抗原表位，都应有一种可特异结合它的DNA单链或双链DNA序列的存在。对核酸和蛋白相互作用的广泛研究表明，体内存在各式各样与DNA特异性相互作用的蛋白和酶，以及RNA对蛋白和酶的特异调控无不显示了核酸序

列和蛋白间的特异性相互作用的普遍存在。一般而言，DNA与蛋白质的特异性识别在于碱基和氨基酸的氢键、静电荷力、序列骨架构象之间的吻合、范德华力等的综合作用。研究显示，蛋白DNA结合位点的氨基酸突变会使这种特异性结合降低三个数量级。

5 DNA抗体技术基本上由三部分组成：三种DNA多样化工程抗体库的构建；DNA抗体库的筛选；DNA抗体的标记与扩增。

二、DNA抗体具体技术路线：

1) 三种多样化随机DNA序列工程抗体库（双链DNA随机序列库、单链DNA随机序列库、杂化双链DNA随机序列库）的构建：

10 DNA序列库的多样化是高效筛选出特异抗体的前提，故其DNA抗体库的构建是很重要的。通过构建双链DNA随机序列库、单链DNA随机序列库、杂化双链DNA随机序列库来达到构建足够量的多样化随机DNA序列的目的。对于杂环双链DNA，由于柄环状结构（Stem-loop structure）可稳定该分子结构并暴露可变序列，从而增加亲和性和抗体的稳定性。而多价抗体比
15 单价抗体更具亲和力。先筛选出多个单价抗体，再试图通过一序列联起来形成双价或多价抗体，两单价抗体较灵活的连接在一起。考虑到其分子体积小，故抗原构象可能对单价抗体无多大影响，但对双价抗体应有影响。

设计随机序列5'-gggggggggggatccaac-N59-CTGCAGGTCGACGCAT-3'
及两端带特定引物(F1) ggggggggggggatccac和(R1) atgcgtcgacctgcag
20 以供克隆；可PCR扩增克隆到T载体文库构建得到随机序列代表库以保存备用。

用两端引物F1和R1扩增12个循环，（94 ° C, 15 s; 55 ° C, 15 s;

72 ° C, 15 s), 即可得到双链DNA随机序列库;

以双链DNA随机序列库为模板再用其中一条引物如F1引物做不平横PCR扩增45个循环, (94 ° C, 15 s; 55 ° C, 15 s; 72 ° C, 15 s), 通过8%的PAGE胶分离纯化, 就可得到单链DNA随机序列库;

5 以此单链DNA随机序列库为模板, 在其3末端加oligo (dC), 75度中放10分钟以去除单链DNA构象, 并灭活末端转移酶, 在4度重新退火形成杂化双链, 通过8%的PAGE胶纯化可分别得到杂化双链随机DNA序列、单链随机DNA序列库。

为便于在筛选过程中高效富集具特异性结合抗原活性的杂化双链DNA, 亦可采用另一种构建杂化双链DNA随机序列库的方案, 即在同一条DNA单链上自身折叠形成柄环状杂化双链结构: 设计随机序列
10 5'-gggggggggggggggggatccaac-N50-ccccccccccccggggggggggggg —
N50-CTGCAGGTCGACGCAT-3', 其中ccccccccccccggggggggggggg序列有利于杂化双链构象的形成, 即由该序列连接其两边随机DNA序列并折叠而成。
15 同样通过PCR富集, 然后不平横PCR并跑胶纯化杂化双链带。

2) 多样化随机DNA序列抗体库的筛选:

特异性抗原的准备: 将已纯化好的抗原如在(100 mM PIPES pH 6.9, 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄; 100 uL) 溶液中包被在15个微孔板(用于蛋白包被, 购于Corning公司)中过夜, 另15个微孔板用以包被BSA或脱脂奶粉
20 用于预杂交, 一共以备15轮筛选之用, 每孔约1—10ug。用PBS(含0.1%Tween-20)洗去多余的抗原, 用3%BSA或5%的脱脂奶粉在PBS中封闭微孔板30分钟, 用PBS(含0.1%Tween-20)洗三次, 用筛选缓冲液(100 mM PIPES

pH 6.9, 1 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 100 mM NaCl)洗一次。

预杂交:用以上准备好的三种DNA随机序列库10ug在包被BSA或脱脂奶粉的微孔板中预杂交在筛选缓冲液中结合30分钟。

杂交结合:取已预杂交好的DNA随机序列,转移至包被好特异性抗原
5 的微孔板中在筛选缓冲液中杂交, 4 ° C , 30分钟。

清洗:用筛选缓冲液洗去非特异未结合的随机DNA序列,洗三次,每次30分钟。

注意:对不同的的抗原,应摸索其最佳的结合杂交与清洗条件。

3) 特异性DNA抗体的洗脱与PCR富集:

10 用等体积苯酚抽提获取DNA,离心后吸取上清(DNA部分),用乙醇和乙酸钠沉淀DNA,以此DNA为模板,先用F1和R1引物PCR扩增富集双链DNA,然后以其为模板不平横PCR扩增单链DNA序列,用此单链DNA序列为模板在其末端加oligo-dC,75度去除构象、4度复性,以上皆跑PAGE胶纯化相应富集了的双链DNA、单链DNA序列、杂化双链DNA序列。其PCR与不平横PCR
15 反应体系同。

4)如上重复预杂交—杂交—清洗—洗脱—PCR富集的过程达15轮,最后得到三种特异性结合抗原的DNA序列(单链DNA序列、双链DNA、杂化双链DNA序列)。

5)特异性DNA抗体的测序、保存与扩增:一边构建PCR—T克隆挑10个测
20 序,选取看看哪种序列最多的几个克隆,一边直接送测序选取最高峰者作为DNA序列,如峰高明显、背景较低,意味着该DNA抗体较特异、相对其他DNA随机序列亲和力较高。所得的克隆或DNA序列可用来作为模板保存,以

备直接用来制备并标记DNA抗体。

有时候需要几种DNA抗体的混合物，它们互相结合成的一种构象才能高效特异稳定结合抗原分子，故一般以筛选出来的序列作为模板直接进行扩增而无需分离出个别的序列；对于该特异序列混合物的保持，可利用结合在固相上的引物合成固定的模板，从而可以反复使用，又不会显著改变原DNA随机序列的组成比例。当然，可以进一步筛选出单纯的几种序列，通过测序确定其最终组成。

6) DNA抗体的标记和生产：用以上筛选出来的特异性DNA序列为模板，以带标记（如地高辛、生物素、放射性元素如P32）引物PCR扩增已筛选出来的特异性DNA序列，通过PAGE胶纯化制备出相应的三种DNA抗体。如用地高辛或生物素标记，用二抗扩大信号也可。或直接用胶体金、放射性元素或其他可直接显色或荧光激发标记（注意用来标记的分子要尽可能小）。

7) DNA抗体特异性鉴定：选取血清和类似抗原作对照，比较该特异DNA抗体对特异抗原及非特异抗原之间交叉反应的程度。方法可用ELISA、IFA法等。

8) DNA抗体亲和力鉴定：亲和力表示抗体与抗原结合的紧密程度，以亲和常数表示。方法可用ELISA或RIA竞争结合试验等。

9) DNA抗体抗原结合位点序列的鉴定：利用光化学交联、蛋白酶切以及氨基酸测序来确定与该DNA抗体特异结合的抗原表位序列。

20 将抗原与DNA抗体混合在TE溶液中（选用不同浓度NaCl），在冰上孵育20分钟，以0.25ml转移至硅化玻璃板上，在15瓦的灭菌紫外灯下（距离8cm）照射20分钟，紫外照射可导致特异性结合的复合物中分子间的交联，

因此可增强DNA抗体的亲和力和特异性。加TCA至终浓度10%，离心把蛋白抗原和DNA抗体的交联复合物和其余蛋白抗原沉淀下来，其余未结合DNA部分不会沉淀下去。用10%TCA洗一次，用预冷丙酮洗三次，空气干燥。加8M尿素0.2ml至沉淀，用超声仪溶解沉淀（每次超声10秒，最大功率，三次），待溶解后，继续加NH₄HCO₃至终浓度2M尿素、0.1MNH₄HCO₃。

5 按1:25（胰酶：蛋白抗体复合物）的质量比加入胰酶，37 °C，消化24小时。消化产物过离子交换柱，选取放射性最高的部分（即DNA抗体特异结合的抗原表位肽段或氨基酸序列）去测序（注意该DNA抗体用放射元素P³²标记）。

10 10) DNA抗体亲和性和特异性及检测灵敏度的提高：

a、通过增加筛选轮数从三种DNA随机抗体库中筛选出几种特异性和亲和性较高的抗体，由于每种DNA抗体所特异识别的是不同的抗原表位，可以联合应用来提高特异性。如要提高DNA抗体的检测灵敏度，可用P³²标记该抗体。

15 b、每一种抗原的DNA抗体的产生，都必需同时给出一个最佳的结合和清洗条件，以提高该DNA抗体对特异抗原的特异性和亲和力，并降低非特异性背景。

c、可用紫外交联与蛋白酶切来确定该DNA抗体结合位点是否该抗原的特异性非保守序列，并且可以通过测序直接分析其结合的抗原表位的氨基酸序

20 列。

d、可改变一系列条件以加大DNA抗体的浓度，从而加强DNA抗体与该抗原的亲和力，应可以降低该抗原的最低检测浓度。

e、可用紫外照射使特异性结合的DNA抗体与抗原之间产生交联，SDS与盐洗涤去非特异结合的DNA抗体，并且用标记引物原位PCR富集显色来进一步提高该DNA抗体检测的灵敏度和特异性。

f、通过把单价抗体改造成多价抗体，应可成倍增加抗体亲和力和特异性。

5 g、重新构建DNA抗体文库，如换用另一种DNA抗体文库，增加随机序列的长度等。

h、柄环结构与多价DNA抗体可提高其DNA单价抗体的亲和性和特异性，杂化双链的柄环结构可稳定并适当调节DNA抗体中抗原结合部位的构象，从而更好的和抗原特异结合；而通过把多个单价DNA抗体联结成多价抗体，
10 都会成倍增加DNA抗体的亲和性和特异性。

i、对于杂化双链DNA序列抗体库，中间的GC序列可试用AT序列。

四、应用：

该DNA抗体技术可广泛应用于免疫印记、免疫组化、蛋白水平上的特异性基因调控、蛋白追踪、抗体靶药物筛选、亲和层析、蛋白消减杂交等
15 免疫学领域。

在免疫印记、免疫组化、蛋白水平上的特异性基因调控与蛋白追踪、抗体靶药物筛选的领域的应用，该DNA抗体的使用基本类似一般的抗体的使用方法。由于DNA的容易获得，无论在时间上，还是在成本上，以上应用都被大大简化了。如亲和层析，如用蛋白抗体来作亲和柱，其价格之高，
20 有目共睹，而且如要自己做亲和柱，从抗体的制备到亲和柱子，这是一个漫长而又成本很高的过程。

而且DNA抗体同样可如同其他抗体一样应用于各领域：(1)免疫原性组

织相容性抗原或分化抗原，(2)分化抗原、肿瘤抗原或其他细胞表面抗原，这些抗原缺乏多形性，在同种系统中无免疫原性，但在异种免疫中却可以被识别。(3)病毒和细菌抗原；(4)各种蛋白质、核酸和糖表面的单一抗原决定族。这类抗体使我们能够鉴定和分离细胞亚群、区分细胞发育的不同阶段、更为精确地进行组织分型、提纯较小的表面抗原、精细地鉴定微生物以供诊断和流行病学研究，以及对各种生物大分子进行更可靠的各种免疫学分析和诊断。

蛋白消减杂交是一种新的在蛋白水平上系统寻找蛋白表达差异的方法，由于这些在病理细胞和正常细胞间有表达差异的蛋白之间必然存在某种信号通路或联系，从而为细胞内系统各种复杂的信号通路和大分子相互作用提供了直接在蛋白水平上的真实数据。以往研究基因的表达差异，大部分都是在RNA水平上，由于忽略了其转录后修饰、翻译水平和翻译后水平的变化，故不能真实的反映其最终在蛋白水平上的变化；至于在蛋白水平上的差异显示的研究，由于蛋白操作的困难，现在多半是用抗体芯片的方法，只能寻找已知蛋白的表达差异变化，无法寻找到新的蛋白，而且目前抗体芯片成本极高，其使用要求精密仪器，普通科研院所买不起，并且抗体芯片所含抗体数量有限，远远不如基因芯片的数量，并不能真正达到高通量筛选的目的。而本方法却通过把在蛋白水平上的表达差异，通过DNA抗体转移至DNA水平上的差异显示，从而简捷的达到了开放式的高通量筛选表达差异蛋白的目的，为蛋白相互关系的系统研究和基因功能的系统探索提供了一条捷径，而且该技术普遍适用于各大中小科研院所及公司。

蛋白消减杂交技术:

其基本原理是通过DNA随机序列抗体库进入细胞体内结合特异性抗原蛋白分子, 如果某蛋白分子有表达数量差异, 那么其结合的特异性DNA序列也会表现出相应的数量变化来, 从而把在蛋白水平上的消减杂交转移到对
5 DNA序列的消减杂交上来。

- 1) 以上3种DNA随机序列库与经过处理固定了的对照细胞和靶细胞(活体)(细胞数量以及其他条件尽可能一致)孵化, 在一定条件下该DNA随机序列库将进入细胞并特异性结合其对应分子, 然后洗去未进入细胞序列或非特异结合细胞蛋白的DNA抗体。
- 10 2) 用苯酚氯仿裂解细胞并抽提蛋白质, 取上清(含DNA序列)DNA, 用真空干燥机浓缩DNA或酒精沉淀DNA从而得到可反应蛋白水平变化的DNA随机序列库。
- 3) 对靶细胞和对照细胞的随机DNA序列库进行消减杂交(用试剂盒)后, 注意在消减之前加一已标记内对照序列以检测消减杂交效果; PCR克隆消
15 减序列以得到差异显示文库并测序, 选取几个到几十个克隆, 用标记引物扩增制备相应类型的DNA抗体, 并用血清检测其特异性, 去掉非特异结合血清的DNA序列。
- 4) 用此DNA抗体在该细胞内标记结合相应蛋白分子并形成复合物, 先用紫外照射数十分钟以形成共价交联, 然后跑SDS-PAGE胶分离检测已标记
20 DNA-蛋白复合物, 切下条带, 纯化测序。或者如非膜蛋白, 而且紫外照射形成交联复合物的效率低下, 可温和裂解, 并用相应的引物-cellulose进行亲和层析来分离纯化DNA-蛋白复合物, 亦可跑PAGE胶分离纯化, 测

序获得蛋白序列。

5) 如是膜蛋白, 先用紫外照射交联DNA分子和抗原分子, 跑SDS-PAGE胶分离纯化已标记DNA-蛋白复合物, 切下条带, 纯化测序。或如上用亲和层析。

5 五、具体制备实施例子:

微管蛋白为抗原筛选其特异性DNA抗体

1) 选用单链DNA随机序列工程抗体库来进行微管蛋白的DNA抗体筛选:

设计随机序列5'-gggggggggggatccaac-N59-CTGCAGGTCGACGCAT-3'
及两端带特定引物(F1) ggggggggggggatccac和(R1) atgctcgacctgcag
以供克隆; 可PCR扩增克隆到T载体文库构建得到随机序列代表库以保存备
10 用。N59指59个核苷酸组成的随机序列。

用两端引物F1和R1扩增12个循环, (94 ° C, 15 s; 55 ° C, 15 s; 72
° C, 15 s), 即可得到双链DNA随机序列库;

以双链DNA随机序列库为模板再用其中一条引物如F1引物做不平横PCR
15 扩增45个循环, (94 ° C, 15 s; 55 ° C, 15 s; 72 ° C, 15 s), 通过
8%的PAGE胶分离纯化, 就可得到单链DNA随机序列库;

2) 多样化随机DNA序列工程抗体库的筛选:

将已纯化好的微管蛋白抗原加在(100 mM PIPES pH 6.9, 1 mM EGTA, 0.5
mM MgSO₄; 100 uL) 溶液中包被在20个微孔板(用于蛋白包被, 购于
20 Corning公司)中过夜, 另20个微孔板用以包被BSA或脱脂奶粉用于预杂交,
一共以备20轮筛选之用, 每孔约1-10ug。用PBS(含0.1%Tween-20)洗去
多余的抗原, 用3%BSA或5%的脱脂奶粉在PBS中封闭微孔板30分钟, 用PBS

(含0.1%Tween-20)洗三次,用筛选缓冲液(100 mM PIPES pH 6.9, 1 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 100 mM NaCl)洗一次。

预杂交:用以上准备好的单链DNA随机序列库10ug在包被BSA或脱脂奶粉的微孔板中预杂交,在筛选缓冲液中结合30分钟。

5 杂交结合:取已预杂交好的DNA随机序列,转移至包被好特异性抗原的微孔板中在筛选缓冲液中杂交, 4 ° C , 30分钟。

清洗:用筛选缓冲液洗去非特异未结合的随机DNA序列,洗三次,每次30分钟。

注意:对不同的的抗原,应摸索其最佳的结合杂交与清洗条件。

10 3) 特异性DNA抗体的洗脱与PCR富集:用等体积苯酚抽提获取DNA,离心后吸取上清(DNA部分),用乙醇和乙酸钠沉淀DNA,以此DNA为模板,如上先用F1和R1引物PCR扩增富集双链DNA,然后以其为模板不平横PCR扩增单链DNA序列,跑8%的PAGE胶纯化。

4) 如上重复预杂交—杂交—清洗—洗脱—PCR富集的过程达20轮,最后得
15 到特异性结合抗原的DNA序列。

5) 特异性DNA抗体的测序:

把以上所筛选得到的特异DNA抗体作为模板,以F1和R1来扩增所得PCR产物构建入T载体,随机挑选20个克隆测序,作同源性比较。所得的克隆或DNA序列可用来作为模板保存。

20 测序筛得以下序列(不含引物序列):

ATGCTCGCGCCTGCTGTGTTGTTGCTTGGTTTGGTCTTTTTTTGGTTTGTGGGTT;

GAATTCGTTTGTGTGCGGAGGTGGTTGTTTGTTTTTTTGTTTCTTTGTTTGTGTTG;

AGATATGGTTTTGTTGTGCGTTATGTTGTGTTTTTGGGGTCTCTTTTTGGGTGTTTTGT;
TTGGTGGGTTGTAGGCAGGCGTGGGCACTGTTTGAGAAGGACGTGTTTGGTCTAT;

6) DNA抗体的标记和扩增：用以上筛选出来的特异性DNA序列为模板，以带标记（如地高辛、生物素、放射性元素如P32）引物PCR扩增已筛选出来的特异性DNA序列，通过PAGE胶纯化制备出相应的DNA抗体。

7) DNA抗体特异性鉴定亲和力鉴定：由于微管蛋白是从小牛脑里纯化出来的，故选取小牛血清和类似抗原如肌动蛋白、纤维蛋白作为非特异抗原对照，比较该特异DNA抗体对特异抗原及非特异抗原反应的特异性；同时选用筛选之前的单链DNA随机序列作对照，比较筛选所得特异DNA抗体序列和筛选之前的随机DNA序列对微管蛋白的特异结合。用ELISA方法进行检测，结果表明：筛选所得特异DNA抗体对微管蛋白的结合力显著大于筛选之前的随机序列，也显著大于对非特异抗原的结合。同时，对于非特异抗原的结合，特异DNA抗体和筛选之前的DNA随机序列没有明显差别。

8) 亲和力鉴定：亲和力表示抗体结合抗原的能力，用DNA抗体—抗原复合物的解离常数（KD）的倒数来表示。KD为引起50%最大效应时（50%受体被占领）的摩尔浓度。以上DNA抗体解离常数为20—45 μ M。通过提高DNA序列抗体浓度，可以提高亲和力。

权 利 要 求

1、一种DNA抗体，其特征在于：其按照以下步骤制备：


- 1) DNA多样化抗体库的构建；
- 2) DNA抗体库的筛选；
- 5 3) 特异性DNA抗体的标记与扩增。

2、权利要求1所述的DNA抗体，其特征在于：所述的DNA多样化抗体库的构建包括双链DNA随机序列库、单链DNA随机序列库、杂化双链DNA随机序列库的构建。

3、按权利要求1所述的DNA抗体，其特征在于：DNA抗体库的筛选包括把DNA
10 抗体库的随机DNA序列与抗原进行特异性杂交结合后，洗脱非特异结合的随机DNA序列，并对特异性DNA抗体进行洗脱和PCR富集。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/00715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <p style="text-align: center;">IPC⁷ Int.Cl.⁷: C12N15/10, C12P21/00</p> <p style="text-align: center;">According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC</p>				
B. FIELDS SEARCHED <p style="text-align: center;">Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols) IPC⁷ Int.Cl.⁷: C12N15/10, C12P21/00</p> <p style="text-align: center;">Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched</p> <p style="text-align: center;">Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used) EPOQUE(WPI), CPRS</p>				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.		
A	WO, A2, 02099085 (HUMAN GENOME SCI INC) 12.December 2002, See the whole document	1-3		
A	US, B1, 6399763 (UNILEVER PATENT HOLDINGS BV) 04. June 2002, See the whole document	1-3		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A"document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E"earlier document 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 </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A"document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E"earlier document 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
* Special categories of cited documents: "A"document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E"earlier document 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 <p style="text-align: center;">18 September 2003(18.09.03)</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">10 OCT 2003 (10.10.03)</p>		
Name and mailing address of the ISA/ The Chinese Patent Office 6, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer <p style="text-align: center;">PAN, aiqun</p>  Telephone No. 86-10-62093906		


INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN03/00715

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A2-02099085	12-12-02	None	
US-B1- 6399763	04-06-02	EP-A1-1144616	17-10-01

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN03/00715

A. 主题的分类		
Int.Cl ⁷ : C12N15/10, C12P21/00		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号) Int.Cl ⁷ : C12N15/10, C12P21/00		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词) EPOQUE(WPI), CPRS		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	WO, A2, 02099085 (人基因组科学公司) 12.12 月 2002, 参见全文	1-3
A	US, B1, 6399763 (UNILEVER PATENT HOLDINGS BV) 04.6 月 2002, 参见全文	1-3
<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。		
* 引用文件的专用类型: “A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件 “E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的 “L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件 “P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件 “T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理 “X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性 “Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性 “&” 同族专利成员的文件		
国际检索实际完成的日期 18.9 月 2003(18.09.03)		国际检索报告邮寄日期 10.10月 2003(10.10.03)
国际检索单位名称和邮寄地址 中国专利局 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: 86-010-62019451		受权官员: 潘爱群 电话号码: 86-10-62093906 

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00715

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO-A2-02099085	12-12-02	无	
US-B1- 6399763	04-06-02	EP-A1-1144616	17-10-01