

一种抗 SMIM15 单克隆抗体及其应用

技术领域

本发明属于免疫学技术领域，涉及一种单克隆抗体，具体涉及一种抗 SMIM15 单克隆抗体及其应用。

背景技术

小整合膜蛋白 15 (Small Integral Membrane Protein 15, SMIM15, 别名 C5orf43) 是一种蛋白质编码基因, 在机体的结肠、甲状腺以及其他组织中普遍表达, 已知 SMIM15 包括 2 个转录本, 155 个同源基因, SMIM15 的主要功能是在各种生理病理情况下控制蛋白质的合成, 进一步在细胞间的免疫识别以及物质运输等过程起到关键作用。

相比于正常组织, 大多数癌组织中 SMIM15 的表达量较高, 如胶质瘤、胃癌以及乳腺癌等, 但是其相关机制以及研究未见有文献报道。近几年随着免疫治疗及免疫靶向治疗在多种疾病的综合治疗过程发挥重要作用, 利用抗体将药物导向靶点细胞更是一种理想途径。当前对于蛋白质编码基因的研究逐步成为基础科研以及生物医学的重要靶标, 使得用于医学科研和临床诊断的生物试剂市场需求量增加, 就目前国内外文献的报道情况, 尚未见具有人鼠交叉反应、高特异性抗 SMIM15 的单克隆抗体可用于免疫学方法的研究。

发明内容

针对现有技术存在的上述问题, 本发明所要解决的技术问题是提供一种抗 SMIM15 单克隆抗体, 本发明所要解决的另一技术问题是提供上述抗 SMIM15 单克隆抗体的应用。

为了解决上述技术问题, 本发明所采用的技术方案如下:

本申请所提供的分泌抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 的杂交瘤细胞株 1M5, 已于 2020 年 11 月 18 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO: C2020247; 所制备得到的抗 SMIM15 的单克隆抗体, 命名为 A1M5。

一种抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5, 是由杂交瘤细胞株 1M5 分泌的。

采用杂交瘤细胞株 1M5 产生单克隆抗体 A1M5 的方法如下:

(1) 为了增强免疫原性, 从 GenBank 获取 SMIM15 基因的核苷酸片段序列 (Accession: NM_001048249.4), 人工合成多肽片段: CAWAEYVVEWAAKDPY, 并将多肽片段与 KLH 偶联作为免疫原, 命名为 2019-348 多肽-KLH, 以常规方法免疫 SPF BALB/c 雌性小鼠;

(2) 从免疫合格小鼠无菌取其脾细胞作为抗原致敏的 B 细胞, 按常规方法, 将 B 细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 株融合, 然后利用常规的融合细胞 HAT 筛选方法进行筛选, 进而获取融合细胞生长克隆;

(3) 应用酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) 方法筛选出抗 SMIM15 阳性而正常人血清阴性的单克隆抗体, 最终选取 9 株稳定分泌抗 SMIM15 抗体的杂交瘤细胞, 分别命名为 1M4、1M5、1M6、1M7、1M8、1M9、1M10、1M11 和 1M15, 它们分泌的单抗分别命名为 A1M4、A1M5、A1M6、A1M7、A1M8、A1M9、A1M10、A1M11 和 A1M15;

(4) 将筛选出来的 9 株阳性细胞株进行亚类鉴定, 最后得到 9 株 IgG 的阳性杂交瘤细胞株, 亚型分别为 G1、G2a、G2b、G2b、G2a、G2a、G2a、G2b 和 G2a;

(5) 蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 检测 SMIM15 阳性单克隆抗体特异性, 结果显示 2019-348 多肽-BSA 与 SMIM15 阳性单克隆抗体 (A1M4、A1M5、A1M6、A1M7、A1M8、A1M9、A1M10、A1M11 和 A1M15) 均能发生特异性反应 (图 1);

(6) 在动物腹腔内接种最终选择的杂交瘤细胞 1M5, 动物腹水中分离和纯化得到所需的抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5;

(7) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测 A1M5 抗体纯度, 结果显示出现清晰两条带分别是重链和轻链 (图 2), 说明抗体纯化的效果较高;

(8) WB 对 SMIM15 抗体进行功能鉴定及应用, 发现 A1M5 抗体与胃癌细胞、胶质瘤细胞和乳腺癌细胞中的天然抗原 SMIM15 均有较好的结合活性, 表明纯化的 A1M5 抗体特异性较好, 在 WB 中应用, 能识别 SMIM15 天然抗原 (图 3)。

(9) 免疫组织化学技术 (Immunohistochemistry, IHC) 对 SMIM15 抗体进行功能鉴定及应用, 发现 A1M5 抗体有阳性染色结果 (图 4、乳腺癌; 图 5、胶质瘤; 图 6、胃癌), 在乳腺癌、胶质瘤和胃癌的细胞质中表达, 说明纯化的 A1M5 抗体效价、特异性较好, 在 IHC 中应用, 可与过表达 SMIM15 的组织结合。

(10) ELISA 检测抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 效价, 发现 A1M5 抗体浓度低至 93.75 ng/mL 与 SMIM15 的多肽抗原 (浓度为 0.0025 $\mu\text{g/mL}$) 有较好的结合活性, A1M5 具有较好的 ELISA 反应滴度 (图 7)。

一种试剂盒, 含有抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5。

所述的抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5 在制备检测 SMIM15 抗原试剂中的应用。

所述的抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5 在制备 SMIM15 相关疾病的治疗性药物、相关的诊断试剂及科研试剂中的应用。

有益效果：相比于现有技术，本发明的优点为：

本发明从 GenBank 获取 SMIM15 基因的核苷酸片段序列（Accession: NM_001048249.4），运用单克隆抗体制备技术制备的抗 SMIM15 单克隆抗体，制备方法简单，可由杂交瘤细胞株 1M5 直接分泌产生。该抗体是一种免疫球蛋白，不会通过身体表面接触和呼吸道而伤害健康，无毒；可以应用于免疫印迹和免疫组化，也可以潜在应用该抗体为活性成分制成与 SMIM15 相关疾病的诊断及治疗的试剂或药物。

附图说明

图 1 是 WB 检测 2019-348 多肽-BSA 与 SMIM15 阳性单克隆抗体能否发生特异性反应，图中，抗体 A1M4、A1M5、A1M6、A1M7、A1M8、A1M9、A1M10、A1M11 和 A1M15 均能与 SMIM15 分子发生特异性结合；

图 2 是 SDS-PAGE 检测 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 纯度，图中，出现清晰的两条带分别是重链（55KD）和轻链（25KD）；

图 3 是 WB 检测抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 与细胞来源的天然抗原反应结果，图中，出现清晰条带，A1M5 与天然抗原 SMIM15 有较好的结合活性；

图 4 是 IHC 检测抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 在乳腺癌组织中的表达情况图，图中，阳性定位在乳腺癌细胞的细胞质；

图 5 是 IHC 检测抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 在胶质瘤组织中的表达情况图，图中，阳性定位在胶质瘤细胞的细胞质；

图 6 是 IHC 检测抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 在胃癌组织中的表达情况图，图中，阳性定位在胃癌细胞的细胞质；

图 7 是 ELISA 检测抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 与 SMIM15 偶联多肽的反应效价，显示 A1M5 抗体有较高的滴度反应。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明进一步进行描述。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。以下实施例中如无特殊说明，所用实验方法均为常规方法。

实施例 1

I、以下实施例中使用的主要试剂为：

（1）细胞融合用：

IMDM 培养基；

IMDM 完全培养基（含 15%血清）；

2.2%甲基纤维素（SIGMA；货号：M0262-100G）；

新生牛血清; PEG1500 (Roche; 货号: 78364);

HAT (Sigma; 货号: H0262-10VL);

HT (Sigma; 货号: H0137-10VL)。

(2) 单克隆细胞筛选用:

包被液: 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH9.6); PBS 缓冲液 (pH7.4);

封闭液: 含 2%牛奶的 PBS;

洗液: PBS-T (0.05%吐温, PBS);

显色液: 1%A 液+10%B 液 (A 液: 1%TMB in DMSO; B 液: 0.1% H₂O₂ 的柠檬酸缓冲液);

终止液: 2M 硫酸;

二抗: 山羊抗小鼠 IgG/HRP。

(3) 单克隆细胞亚类鉴定用:

包被抗体 (Southern Biotech);

封闭液: 2%BSA+3%蔗糖 in PBS;

显色液: 0.2 mL A 液+ 10 μ L 30% H₂O₂ in 10 mL B 液 (A 液: 15 mg/mL ABTS in H₂O; B 液: 柠檬酸缓冲液, pH4.0);

各型亚类二抗 (Southern Biotech)。

(4) SDS-PAGE 凝胶电泳及 WB 用:

SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (碧云天生物技术有限公司);

2 $\times$ Loading Buffer (碧云天生物技术有限公司);

预染蛋白 Marker (美国 Thermo 公司);

考马斯亮蓝 R-250 (碧云天生物技术有限公司);

PDVF 膜 (美国 Millipore 公司);

滤纸 (碧云天生物技术有限公司);

IgG 鼠二抗 (美国 abcam 公司);

ECL 显影液 (苏州新赛美公司)。

(5) 免疫组化用:

DAB 染色液 (增强聚合物法) 试剂盒 (福州迈新生物技术开发公司);

柠檬酸组织抗原修复液 (100X) (福州迈新生物技术开发公司);

内源性过氧化物酶阻断剂 (福州迈新生物技术开发公司);

反应增强液 (福州迈新生物技术开发公司);

酶标抗小鼠/兔 IgG 聚合物（福州迈新生物技术开发公司）。

（6）ELISA 用：

ELISA 包被液（北京索莱宝科技有限公司）；

ELISA 终止液（北京索莱宝科技有限公司）；

单组分 TMB 显色液（北京索莱宝科技有限公司）；

羊抗小鼠 IgG-HRP（北京索莱宝科技有限公司）。

II、以下实施例中使用的主要仪器为：

组织芯片系统（UT06，韩国，Unitma 公司）；倒置显微镜（DMIRB，德国，Leica 公司）；全自动酶标仪（SN209941，美国，Bio-Tek 公司）；二氧化碳水套式培养箱（HEPACCLASS 100，美国，ThermoFisher 公司）；pH 计（EL20，瑞士，Mettler Toledo 公司）；垂直电泳转印系统（1658033，美国 BIO-RAD 公司）；UVP 凝胶成像系统（UVP Biosp，美国 UVP 公司）。

实施例 1

1、制备小鼠免疫原和检测用抗原

多肽设计及合成 2019-348 多肽：CAWAEYVVEWAAKDPY-NH₂（序列），多肽偶联：将偶联 KLH 后的多肽定量 3.0 mg/mL（命名：2019-348 多肽-KLH）。

2、制备抗 SMIM15 杂交瘤细胞

用“2019-348 多肽-KLH”，按 60 μg 蛋白/只小鼠的量，皮下初次免疫 4 只 SPF BALB/c 雌性小鼠，编号为：1、2、3、4。皮下第一次加强免疫，免疫量为 30 μg 蛋白/只。随后分别进行第二次、第三次、第四次、第五次加强免疫，免疫量均为 30 μg 蛋白/只。眼眶取血，测血清效价。用免疫原 50 μg，腹腔冲击小鼠。

免疫效价检测步骤：

用“2019-348 多肽-BSA”，2 μg/mL，4 °C 包被过夜；2%脱脂奶粉，37 °C 封闭 2 h；血清从 200 倍开始 2 倍梯度稀释，空白对照（blank）为 PBS，阴性对照（negative）为阴性血清 200 倍稀释；冲击小鼠做细胞融合实验；

取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞（骨髓瘤细胞），采用 PEG 法进行融合，融合完细胞用半固体培养基（含 HAT）进行筛选培养。

细胞融合步骤：

（1）将状态良好的 SP2/0 细胞轻柔地从培养瓶壁上吹打下来，吸入到 50 mL 离心管中；

（2）小鼠摘眼球取血，然后拉颈处死，放入 75%的酒精中浸泡 5 min；

(3) 在平皿中倒入少量无血清的 IMDM，将细胞筛及注射器内芯放入平皿中；用剪刀和镊子取下小鼠的脾脏，放到细胞筛上；用注射器的内芯轻轻地将脾充分碾碎，将碾好的细胞吸入到装有 SP2/0 的离心管中，离心 1500 rad/min，5 min；

(4) 用剪刀和镊子取下小鼠的胸腺，碾碎；将碾好的胸腺细胞吸到 15 mL 离心管中，再加入 1 mL 的 HAT，放在孵箱中备用；

(5) 将离心好的细胞，倒掉上清，用无血清的 IMDM 将细胞小心轻柔地吹匀，离心 (1500 rad/min，5 min)；

(6) 将离心好的细胞上清倒掉，拍打离心管底悬浮细胞，将离心管放入 37 °C 温水中，1 min 内缓慢加入 1 mL PEG (Roche)，温水静置 1 min，随后缓慢加入 2 mL 的无血清 IMDM，接着 2 min 内缓慢加入 8 mL 无血清 IMDM，1000 rad/min，离心 5 min；

(7) 倒掉上清，加入 10 mL 的血清，小心地将细胞吹匀，倒入前面准备好的胸腺细胞；再加入 25 mL 灭过菌的半固体培养基，充分混匀；然后均匀倒入 30 个细胞培养皿中；将细胞培养皿放入湿盒中，然后放入孵箱中培养。

3、抗 SMIM15 阳性单克隆抗体的筛选

两周后，挑 10 板×93 个细胞单克隆，培养于 96 孔细胞培养板（事先用胸腺细胞铺板，100 μ L/孔）；

3 天后，用“2019-348 多肽-BSA”包板，对挑选的克隆采用 ELISA 方法，做第一次筛选，得到 15 株阳性杂交瘤细胞株，编号：1M1、1M2、1M3、1M4、1M5、1M6、1M7、1M8、1M9、1M10、1M11、1M12、1M13、1M14 和 1M15。

实验步骤：

(1) 用包被液（碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液，pH9.6）稀释“2019-348 多肽-BSA”，终浓度为 2 μ g/mL，100 μ L/孔，4 °C 过夜；后用 PBST（含 0.05%吐温的 PBS）洗涤 3 次；

(2) 封闭液（含 2%牛奶的 PBS）封闭，200 μ L/孔，37°C 孵箱，2 h，PBST 洗涤 3 次；

(3) 加入一抗（细胞培养上清）、阴性对照（SP2/0 培养上清）、空白对照（PBS）、阳性对照（阳性血清，PBS 稀释 1000 倍），均为 100 μ L/孔，37 °C 孵箱，1 h；PBST 洗涤 3 次；

(4) 加入 PBS 稀释 20000 倍的二抗，100 μ L/孔，37°C 孵育 1 h；取出后用 PBST 洗涤 3 次；

(5) 显色，每孔加 100 μ L 显色液，显色时间为 5 min；

(6) 每孔加入 50 μ L 终止液终止;

(7) 双波长 (450, 630) 测吸光值, 对免疫蛋白筛选呈阳性的杂交瘤细胞株, 共 15 株。

将 15 株阳性的细胞株, 用 “2019-348 多肽-BSA” 再次包板, 采用 ELISA 方法, 做第二次筛选, 最终选取 9 株稳定分泌抗 SMIM15 抗体的杂交瘤细胞, 分别命名为 1M4、1M5、1M6、1M7、1M8、1M9、1M10、1M11 和 1M15, 它们分泌的单抗分别命名为 A1M4、A1M5、A1M6、A1M7、A1M8、A1M9、A1M10、A1M11 和 A1M15。

4、单克隆细胞的亚型鉴定

将筛选出来的 9 株阳性细胞株进行亚类鉴定, 最后得到 9 株 IgG 的阳性杂交瘤细胞株, 亚型分别为 G1、G2a、G2b、G2b、G2a、G2a、G2a、G2b 和 G2a。

实验步骤:

(1) 用 100 mM PBS (pH 7.4) 稀释包被抗体 (Southern Biotech) 至 0.5 μ g/mL, 每孔加 0.1 mL, 4 $^{\circ}$ C, 过夜;

(2) PBST 洗 2 次, 每孔加入 200 μ L 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;

(3) PBST 洗 3 次, 每孔加入 100 μ L 杂交瘤上清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;

(4) PBST 洗 3 次, 用封闭液 1: 10000 (κ , λ) 或 1: 20000 (其它的) 稀释的 HRP 标记的抗体每孔 0.1 mL, 分别加入适当的孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;

(5) PBST 洗 3 次; 每孔加 50 μ L 底物溶液, 10-20 min 内于双波长 (450, 630) 测吸光值, 最终得到 9 株阳性单克隆细胞株的亚型, 分别为 G1、G2a、G2b、G2b、G2a、G2a、G2a、G2b 和 G2a。

5、单克隆抗体特异性检测

(1) 按说明装好蛋白垂直电泳槽;

(2) 配制 12% 分离胶: 室温下静置 50 min 至凝胶聚合;

(3) 配制浓缩胶: 待分离胶完全聚合后配制 5% 浓缩胶;

(4) 上样: 待浓缩胶完全聚合后, 拔取梳子, 加入 SDS 甘氨酸电泳缓冲液并清理上样孔, 将准备好的样品 (2019-348 多肽-BSA) 加入上样孔中;

(5) 电泳: 接通电源, 以 80V 恒压电流 50 min, 待蛋白预染 Marker 分开之后转换为 120V 恒压电流继续电泳约 40 min。

(6) 转膜: 300 mA 电流下转膜 90 min。

(7) 一抗: 转膜结束后, 封闭液封闭 2 h, 随后给与稀释好的一抗 (9 株杂交瘤细胞分泌的单抗)。

(8) 二抗：采用 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 的二抗，按照 1:5000 稀释比例配制后室温孵育 2h；

(9) 显影：UVP 凝胶成像系统显影并拍照保存。

结果发现 SMIM15 单克隆抗体能与 SMIM15 的偶联多肽（2019-348 多肽-BSA）特异性结合，形成阳性条带。表明 9 株杂交瘤细胞株分泌的阳性上清均具有识别 SMIM15 分子的良好特异性（图 1）。

6、BALB/c 小鼠体内生产单抗并纯化

6 周龄小鼠每只腹腔接种 0.5 mL 降植烷，10 天后腹腔接种 RPMI-1640 基础培养基稀释的 1M5 和 1M15 细胞悬液，同时用骨髓瘤细胞 SP2/0 做为对照组，每只小鼠接种 5×10^6 个细胞；10 天后收集腹水，离心，取上清，用二氧化硅粉末去除杂质，接着用 Protein G 亲和层析柱（Amersham）对抗体进行纯化，纯化完毕后分装冻存于 -80 °C。

7、SDS-PAGE 检测 SMIM15 单克隆抗体纯度

- (1) 按说明装好蛋白垂直电泳槽；
- (2) 配制 12% 分离胶：室温下静置 50 min 至凝胶聚合；
- (3) 配制浓缩胶：待分离胶完全聚合后配制 5% 浓缩胶；
- (4) 上样：待浓缩胶完全聚合后，拔取梳子，加入 SDS 甘氨酸电泳缓冲液并清理上样孔，将准备好的样品（纯化抗体）按预定顺序加入上样孔中；
- (5) 电泳：接通电源，以 80V 恒压电流 50 min，待蛋白预染 Marker 分开之后转换为 120V 恒压电流继续电泳约 40 min。
- (6) 电泳结束后关闭电源取出凝胶，室温下以考马斯亮蓝 R-250 染液平缓染色 4 h，然后以脱色液充分脱色后观察蛋白条带，拍照。

结果表明，SMIM15 单克隆抗体 A1M5 经 SDS-PAGE 电泳，出现清晰的两条带，分别为重链和轻链，表明纯化抗体具有较高的纯化效果（图 2）。

8、WB 对 SMIM15 抗体进行功能鉴定及应用

- (1) 将数量为 1×10^7 的胃癌细胞（MKN-1）、胶质瘤细胞（U87-mg）和乳腺癌细胞（MCF-7）分别在 RAPI 裂解液中裂解，取得细胞总蛋白。
- (2) 如先前所述进行凝胶电泳及转膜，一抗为稀释后的 A1M5（1:500），二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG（1:5000），并进行显影保存。

结果表明，A1M5 与多种肿瘤细胞中天然抗原 SMIM15 有较好的结合活性，在 WB 应用中能识别 SMIM15 天然抗原（图 3）。

9、IHC 对 SMIM15 抗体进行功能鉴定及应用

(1) 70 °C的烘箱中烤片(乳腺癌、胶质瘤和胃癌切片) 90 min, 60 °C烘片 60 min, 随后进行 2 次二甲苯脱蜡, 每次 5 min, 脱蜡完成后依次过 100%、95%、70%酒精, 每次 5 min;

(2) 在微波炉中进行抗原修复, 先 100%功率修复 2.5 min, 再 20%功率修复 15 min, 待冷却后用 PBS 冲洗;

(3) 用 3%过氧化氢孵育 30 min, PBST 冲洗 2 min×3 次;

(4) 用含 5% BSA 的 PBS 溶液封闭 30 min;

(5) 孵育一抗(纯化抗体), 4 °C过夜;

(6) 从 4 °C取出组织芯片后常温放置半小时, PBST 冲洗 2 min×3 次;

(7) 滴加二抗增强液, 室温孵育 20min, PBST 冲洗 2 min×3 次;

(8) 滴加二抗, 室温 30 min 后, PBST 冲洗 2 min×3 次;

(9) 用 DAB 进行显色, 显色完全后立即终止显色;

(10) 放入苏木素中 30s, 过盐酸酒精分化, 而后流水冲洗 10 min;

(11) 依次放入 70%、95%、100%酒精, 每次 5 min, 过两次二甲苯, 每次 5 min, 最后自然晾干, 中性树胶封片。

染色结果见 A1M5 抗体有阳性染色结果(图 4、乳腺癌; 图 5、胶质瘤; 图 6、胃癌), 在乳腺癌、胶质瘤和胃癌的细胞质中表达, 说明纯化的 A1M5 抗体效价、特异性较好, 在 IHC 中应用, 可与过表达 SMIM15 的组织结合。

10、ELISA 检测抗 SMIM15 单克隆抗体 A1M5 效价

(1) 用包被液(碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH9.6) 稀释 SMIM15 的偶联多肽(2019-348-BSA), 终浓度分别为 0.01 µg/mL、0.005 µg/mL、0.0025 µg/mL, 100 µL/孔, 4 °C过夜; 后用 PBST(含 0.05%吐温的 PBS) 洗涤 3 次;

(2) 封闭液(含 2%牛奶的 PBS) 封闭, 200 µL/孔, 37 °C孵箱, 2 h, PBST 洗涤 3 次;

(3) 加入不同浓度的纯化抗体 A1M5(初始浓度 1.2 mg/mL, 分别按照 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800 浓度梯度稀释, 阴性对照为 PBS), 100 µL/孔, 37 °C孵箱, 1 h; PBST 洗涤 3 次;

(4) 加入 PBS 稀释 3000 倍的二抗(山羊抗小鼠 IgG/HRP, Southern Biotech), 100 µL/孔, 37 °C孵箱, 1 h; 取出后用 PBST 洗涤 3 次;

(5) 显色, 显色液 100 µL/孔, 显色时间为 10 min 左右;

(6) 每孔加入 50 µL 终止液(2M 硫酸) 终止;

(7) 双波长 (450, 630) 测吸光值。

经间接 ELISA 实验结果表明, A1M5 抗体浓度低至 93.75 ng/mL 与 SMIM15 的多肽抗原 (浓度为 0.0025 $\mu\text{g/mL}$) 有较好的结合活性, A1M5 具有较好的 ELISA 反应滴度 (图 7)。

综上所述, 获得的单克隆抗体 A1M5 是目的抗 SMIM15 单抗, 具有高特异性识别 SMIM15 蛋白抗原, 可用于 IHC 的免疫学研究, 也可潜在用于 SMIM15 相关疾病的诊断和治疗。

权利要求书

1. 一种抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5，是由保藏号为 CCTCC NO：C2020247 的杂交瘤细胞株 1M5 所分泌的。
2. 根据权利要求 1 所述的抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5，其特征在于，其属于 G2a 亚型。
3. 根据权利要求 1 所述的抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5，其特征在于，其免疫小鼠用的抗原是将 N-端氨基酸序列如 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸残基序列与 KLH 偶联得到。
4. 一种试剂盒，其特征在于，含有如权利要求 1 或权利要求 2 或权利要求 3 所述的任意一种单克隆抗体。
5. 权利要求 1 所述的抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5 在制备检测 SMIM15 抗原试剂中的应用。
6. 权利要求 1 所述的抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5 在制备 SMIM15 相关疾病的治疗性药物、相关的诊断试剂及科研试剂中的应用。
7. 分泌权利要求 1 所述的抗 SMIM15 的单克隆抗体 A1M5 的杂交瘤细胞，是保藏号为 CCTCC NO：C2020247 的杂交瘤细胞株 1M5。