

小鼠杂交瘤细胞单抗可变区片段扩增（测序）试剂盒

产品简介：

单克隆抗体序列可变区获取和序列测定是基因工程抗体的必备技能，但是由于抗体基因序列 5' -端复杂性和多样性，往往获取可变区序列比较困难，5' -RACE 虽然可以实现，但是成本高，操作复杂，由于抗体序列的复杂性和 SP20 基因干扰序列太多，RACE 往往不是最优的手段；本试剂盒通过优化设计采用高效引物 Mix 组合覆盖，可以快速简便扩增出抗体基因可变区序列，扩增序列之后连到 T 载体，通过简单测序，可以快速得到抗体可变区序列，后期用于基因工程抗体的改造表达。

产品优势：

1. 操作时间短，如果操作顺利，3-5 个工作日内可以获取到抗体可变区序列；
2. 本试剂盒操作简单，具备基本分子生物学操作基础的人可以轻松入手实现操作；
3. 本试剂盒可以剔除和降低基因组或者相似序列对序列准确度的影响；
4. 实验室内实现抗体基因测序，成本更低：目前委托技术服务公司进行杂交瘤测序费用较高；
5. 实验室内实现抗体基因测序，更有利于抗体序列的核心知识产权和专利的保护。

特别注意事项：

1. 本试剂盒适用于单抗轻链为 Kappa 亚型细胞株，如果轻链 Lambda 请联系购买另外产品。
2. 本试剂盒的操作人员必须熟练掌握分子生物学相关实验操作技能，包括 mRNA 提取，反转录，PCR 扩增，PCR 产物胶回收，T 载体连接，大肠杆菌转化，菌落 PCR 鉴定，以及测序结果的识读和序列比对等技能；
3. 实验室必须具备开展以上实验所必须的实验仪器和实验条件；
4. 实验室必须具备开展以上实验所必须的高性能试剂；
5. 务必保证杂交瘤细胞株为单克隆，状态好，传代培养越少越好；
6. 实验室环境必须洁净，实验人员操作规范，避免交叉污染。

产品组分：

组分名称	内容	备注说明
4 x RT-Mix	60ul	1
2 x 1 st PCR mix(V _k)	300ul	1
2 x 1 st PCR mix(V _H)	300ul	1
2 x 2 nd PCR mix(V _k)	300ul	1
2 x 2 nd PCR mix(V _H)	300ul	1
Primer SP2/0	100ul	10uM
说明书		1 份

产品使用：

本产品操作流程包括以下环节：mRNA 提取→反转录→1st PCR 和 2ndPCR 扩增→PCR 产物胶回收→T 载体连接→大肠杆菌转化→菌落 PCR 鉴定→测序结果识读→序列比对/抗体序列分析→抗体重组表达

1.实验准备

- 1) 为确保实验能够顺利开展，您必须具备试剂盒操作流程各环节技能：
- 2) 必备仪器：PCR 仪，水平电泳仪，高速离心机
- 3) 其他需要您准备的试剂：RNA 提取试剂盒/Trizol 试剂(氯仿，75% 乙醇，无 RNase ddH₂O，异丙醇)，T-载体连接试剂盒，DNA 凝胶回收试剂盒，ddH₂O(无 RNase) 等
- 4) 必备耗材：吸头/EP 管(无 RNase)

2.实验操作

1) 杂交瘤细胞 mRNA 提取

(1) 培养杂交瘤细胞

首先确保你的杂交瘤细胞株是单克隆，杂交瘤细胞株培养至细胞数约 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ (大约 24 孔培养板 1-2 个孔细胞长满) 时，将细胞吹起重悬，1500rpm x 5min，离心收集细胞；同时收集细胞培养上清用于鉴定单克隆抗体杂交瘤细胞分泌抗体的亚型。(细胞株不纯，可能获取到多条干扰或重链或轻链)

(2) 单抗亚型及轻链测定 (可选)

步骤 1 收集的细胞培养上清，通过 ELISA 方法测定抗体亚型 (如果之前已经完成亚型和轻链鉴定,此处不必再测)，亚型测定不方便的可以购买我们的亚型测定试剂盒。

(3) 杂交瘤细胞 mRNA 的提取

以下步骤仅供参考，强烈建议:使用高品质 RNA 提取试剂盒并消化掉基因组 DNA

- 步骤 (1) 得到细胞离心沉淀，尽量吸干残余液体；在超净工作台环境，加入 1ml Trizol 试剂使其裂解，静置 5min；
- 加入 200ul 氯仿，剧烈震荡 30 秒，室温静置 3min，12000 rpm 15 min；
- 取上层水样层至新的 EP 管，加入等体积异丙醇，室温静置 30 分钟或 -20°C 放 1~2 小时；
- 12000 rpm 10 min，弃上清，管底白色沉淀物即为 RNA；
- 加入 1 mL 75% 乙醇重悬洗涤 RNA，12000rpm 10 min，小心吸弃液体，超净台风干管底沉淀；
- 加入 50ul 无 RNase ddH₂O 复溶 (如果难以溶解，请放在 55°C 至完全溶解)，即得到 mRNA,立即进行反转录步骤，或者 -80°C 保存备用。

2) RT 反转录

上述步骤得到的 mRNA 立即进行 cDNA 反转录。

按照以下的配置体系进行操作

反转录体系配制		反转录程序	
组分	体积/用量	温度	反应时间
4XRT-Mix	2.5ul	30°C	10min
mRNA 模版	≤2.5ug 或 1ul	42°C	60min
ddH ₂ O (无 RNase)	补足至 10 ul	65°C	20min
总体积	10 ul	冰上	冷却

cDNA 可以作为轻链和重链可变区的 PCR 扩增的模版，也可以保存于 -20°C 备用。

3) RCR 扩增轻链 kappa 可变区 (V_k)、重链可变区 (V_H)

V _k 1 st PCR 扩增		V _H 1 st PCR 扩增	
组分	体积/用量		
2X1 st PCR mix(V _k)	15ul	/	
2X1 st PCR mix(V _H)	/	15ul	
cDNA 模版	2ul	2ul	
ddH ₂ O (无 RNase)	13ul	13ul	
总体积	30 ul	30 ul	

1st PCR 反应程序:

94°C 5 min, (94°C 30s, 46°C 30s, 72°C 55s) X35 循环, 72°C 延伸 10min, 4°C hold。

V _k 2 nd PCR 扩增		V _H 2 nd PCR 扩增	
组分	体积/用量		
2X 2 nd PCR mix	15ul	/	
2X 2 nd PCR mix(V _H)	/	15ul	
1 st PCR (V _k)产物	2ul	/	

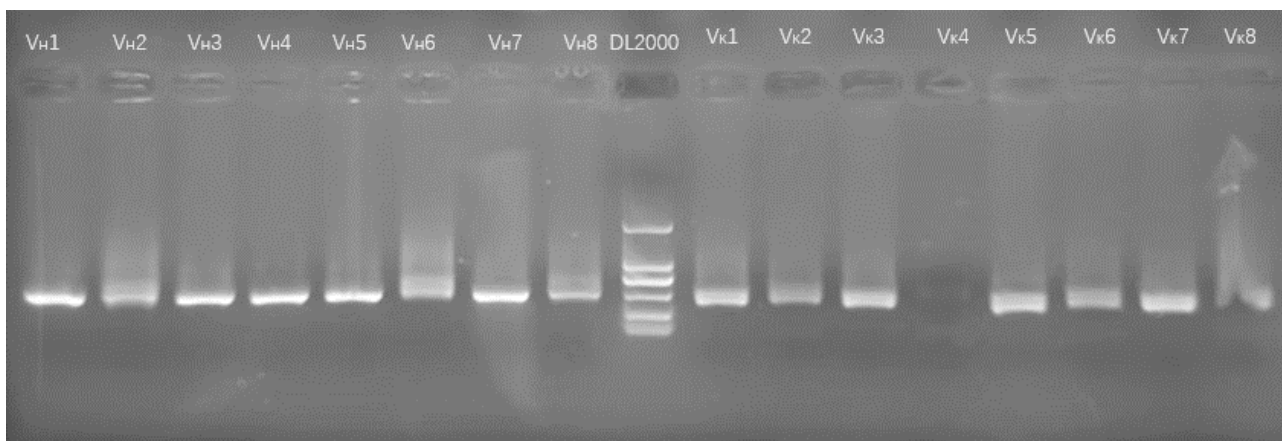
1 st PCR (V _H)产物	/	2ul
ddH ₂ O (无 RNase)	13ul	13ul
总体积	30 ul	30 ul

2nd PCR 反应程序:

94°C 5 min, (94°C 30s, 57°C 30s, 72°C 55s) X35 循环, 72°C延伸 10min, 4°C hold 。

4) PCR 产物鉴定及产物回收

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳, 如果轻链可变区 (V_k) 得到扩增产物~450bp,重链可变区 (V_H) 得到扩增产物为~600bp, 分别切胶回收 PCR 产物。



5) PCR 胶回收产物的 T 载体连接

选用通用型 T 载体 (连接平端 PCR 产物和带 A 尾巴 PCR 产物), 按照操作说明进行连接;

6) 连接产物转化 DH5a 感受态细胞

- (1) 连接产物(10ul)加入冰上解冻的 100ul 感受态细胞 DH5a 或 TOP10;
- (2) 42°C热击 60-90 秒,冰上冷却 3-5min;
- (3) 向离心管中加入 1ml 不含抗生素的 LB 培养基, 轻轻混匀, 置于 37 °C, 220 rpm 摇床振荡培养 1 小时, 使细菌复壮;
- (4) 4000rpm 离心 2-3 分钟, 弃掉上清 1ml, 剩余 100ul 培养基重悬离心管底部菌体, 将其涂布于含相应抗生素的筛选平板上;
- (5) 将平板正面向上放在 37°C培养箱 1 小时, 待菌液完全被平板吸收后, 倒扣平板放置 37°C培养箱 16-24 小时。

7) 连接产物初步鉴定

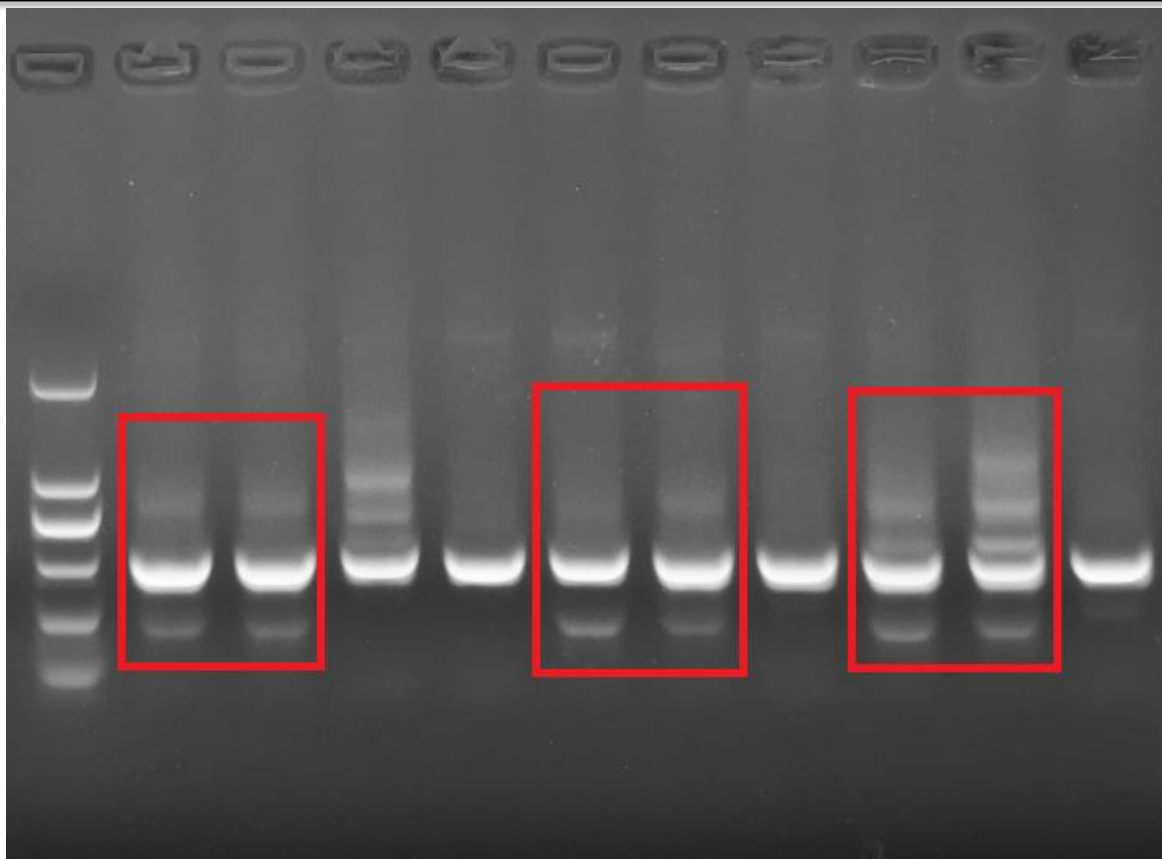
如果熟练掌握菌落 PCR 鉴定技术, 可进行 PCR 菌落鉴定 (载体上下游测序用引物对连接产物)。

常规方法: 挑取平板上的菌斑, 加入到 2ml 含有抗生素的培养基中 220rpm 培养摇床 37 °C培养至其浑浊, 其 1ul 菌液进行 PCR 鉴定即可。

注意:

Ø 建议每个 V_H (重链可变区) 平板挑取 10 个菌斑培养并做 PCR 鉴定, 建议每个 V_k (kappa 轻链可变区) 平板挑取 10 个以上菌斑培养并做 PCR 鉴定; PCR 鉴定引物为 T 载体测序的上下游引物;

Ø PCR 引物为载体测序的上下游引物, 加上 Primer SP20 引物 (1ul/50ul PCR 体系); PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, V_H 电泳正确的结果为 750bp 左右; V_k 电泳正确的结果应该为 580bp 左右, 且没有 250-300bp 左右条带 (下图红框内为 SP2/0 自身的 kappa 干扰序列)。



8) 测序

PCR 初步鉴定正确的菌液送去测序，测序引物为 T 载体对应的上下游引物（一般为 M13F/M13R）。

9) 测序结果分析及应用

返回的测序结果去掉 T 载体序列后，即为扩增得到的 V_H 和 V_K 序列，由于外源 DNA 片段插入 T 载体是没有方向性的，因此我们得到的可能是反向互补序列，需要将其转换过来。

通过 NCBI 数据库比对找到所得序列的 CDS 编码区，获取正确的读码框，翻译出对应的氨基酸序列；如果需要得到抗体全序列，可以与相应抗体亚型的保守区序列拼接，得到完整的抗体重链和轻链序列。