

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510095454.2

[51] Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年7月26日

[11] 公开号 CN 1807457A

[22] 申请日 2005.11.17

[21] 申请号 200510095454.2

[71] 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路22号

[72] 发明人 华子春 黄启来

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 高桂珍

权利要求书2页 说明书11页 附图4页

[54] 发明名称

免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白融合蛋白质及其应用

[57] 摘要

本发明属于生物工程技术领域。本发明提供了一种由免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白构成的融合蛋白质，及其基因工程表达和分离纯化方法。利用本发明表达和纯化的免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白构成的融合蛋白质可以用来在生物学、医学等领域进行诸如酶联免疫吸附分析、Western Blotting分析、斑点杂交检测、免疫组化分析、流式细胞检测等各种免疫检测和分析。本发明还提供了免疫球蛋白结合结构域-绿色荧光蛋白(ZZ-EGF)、免疫球蛋白结合结构域-红色荧光蛋白(ZZ-DsRed)两种融合荧光蛋白的实例。

1. 一种由免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白构成的融合蛋白质，其特征是在该类融合蛋白质分子中，具有免疫球蛋白结合能力的结构域和能够产生荧光的荧光蛋白融合，其 N 端或 C 端还可以分别融合具有帮助蛋白质纯化作用的融合蛋白或短肽标签、或者 N 端和 C 端同时融合有具有帮助蛋白质纯化作用的融合蛋白或短肽标签，其结构组成为：

- a. ZZ-荧光蛋白
- b. 荧光蛋白-ZZ
- c. A-ZZ-荧光蛋白
- d. A-ZZ-荧光蛋白-ZZ
- e. ZZ-荧光蛋白-B
- f. 荧光蛋白-ZZ-B
- g. A-ZZ-荧光蛋白-B
- h. A-荧光蛋白-ZZ-B

其中 A 肽、B 肽分别为目前常用的融合蛋白或短肽标签，如大肠杆菌硫氧还蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白、组氨酸短肽标签、Flag 标签；荧光蛋白是指能够产生荧光的蛋白质，如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的一种由免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白构成的融合蛋白质的生产方法，其特征是合成或者克隆融合蛋白质基因、构建融合蛋白质表达质粒，在常见的基因工程表达体系中进行表达。

3. 根据权利要求 1 所述的一种由免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白构成的融合蛋白质的纯化方法，其特征是利用融合蛋白质上融合表达的、常用的融合蛋白或短肽标签进行亲和层析或者利用免疫球蛋白亲和层析进行分离纯化。

4. 根据权利要求 1 所述的一种由免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白构成的融合蛋白质在诸如酶联免疫吸附分析、Western Blotting 分析、斑点杂交检测、免疫组化分析、流式细胞分析检测、免疫芯片检测中的应用。

5. 一种荧光蛋白质，其特征是由组氨酸标签 His-tag、免疫球蛋白结合结构域 ZZ 与绿色荧光蛋白构成。
6. 根据权利要求 5 所述的荧光蛋白质的生产方法，其特征是利用重组 DNA 技术在大肠杆菌中进行表达生产。
7. 根据权利要求 5 所述的荧光蛋白质的纯化方法，其特征是利用 Ni-亲和层析或者免疫球蛋白 IgG 亲和层析进行分离纯化，获得重组荧光蛋白质。
8. 根据权利要求 5 所述的荧光蛋白质在各种免疫检测分析中的应用。
9. 一种荧光蛋白质，其特征是由组氨酸标签 His-tag、免疫球蛋白结合结构域 ZZ 与红色荧光蛋白构成。
10. 权利要求 9 所述的荧光蛋白质的生产方法，其特征是利用重组 DNA 技术在大肠杆菌中进行表达生产。
11. 权利要求 9 所述的荧光蛋白质的纯化方法，其特征是利用 Ni-亲和层析或者免疫球蛋白 IgG 亲和层析进行分离纯化，获得重组荧光蛋白质。
12. 权利要求 9 所述的荧光蛋白质在各种免疫检测分析中的应用。

免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白融合蛋白质及其应用

一、技术领域：

本发明属生物技术领域。

二、背景技术：

应用抗体进行免疫学检测是目前生物学、医学研究以及临床检测和诊断广为使用的常规方法。目前，常规的免疫学检测都是先用抗体识别抗原，然后再用第二级抗体（二抗），即针对前一个抗体（一抗）的抗体进行反应。通常，在二抗上用化学的方法偶联了能够通过化学反应显色或者发光的蛋白质（如辣根过氧化物酶，碱性磷酸酯酶），或者偶联了可以产生荧光的化合物（如 FITC），然后通过检测图象或者光密度改变达到检测的目的。其中，使用的二抗抗体，主要从动物中制备得到，而且针对不同来源的一抗，必须使用专门制备的、针对不同动物来源一抗抗体的二抗。获得的二抗必需进行分离纯化，然后再进行化学偶联，交联上能够发光或者能够通过化学反应发光、显色的化合物或者蛋白质。这种传统的方法不仅耗费时间长，成本也比较高，而且，越来越多的动物保护主义者对此提出反对。

Z 结构域由 58 个氨基酸组成，是一个根据金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 B 结构域人工合成的一个 IgG 抗体 Fc 片段结合蛋白。它缺失了天冬氨酸-甘氨酸二肽序列以及蛋氨酸残基，因此与天然金黄色葡萄球菌蛋白 A 相比，它可以抵抗羟胺和溴化氰的处理 (Nilsson B 等, Protein Eng. 1:107-113, 1987)。含有两个 Z 结构域的 ZZ 蛋白目前已经发展成了一种较常用的融合蛋白表达系统。ZZ 蛋白能够保护目的蛋白在大肠杆菌细胞质中不被降解 (Mergulhão FJM 等 J. Biotechnology 109:31-43, 2004)，并且利用 ZZ 的 IgG 结合特性可以通过一步 IgG-琼脂糖亲和层析法很容易纯化融合蛋白。

三、发明内容：

本发明的目的是建立一种由金黄色葡萄球菌蛋白 A 衍生的 ZZ 和荧光蛋白组

成的蛋白质，该融合蛋白质可以通过重组 DNA 技术方便、简易、廉价地大量生产获得；该融合蛋白质制备操作非常简单、不需要进行化学偶联，需要的时间短，消耗的成本低；并且该融合蛋白质很容易进行检测，不需要加入任何其它的辅助因子或者试剂。该融合蛋白质可以用于免疫检测，例如用于检测各种动物来源的免疫球蛋白、酶联免疫反应(ELISA)、免疫印迹分析、免疫荧光显微镜分析、流式细胞分析、免疫芯片分析等，因此具有广泛的生物学、医学研究以及临床检测和诊断应用前景。

本发明的目的可以通过以下措施来达到：

由于重组 DNA 技术目前已经是一个相当成熟的技术，能够构建任何已知序列的基因、将其进行克隆在常用的表达质粒中，在目前常用的基因工程表达体系中进行表达和分离纯化。因此，本发明可以通过目前已经极为成熟的、常规的重组 DNA 技术，人工合成、或者经 PCR 获得 ZZ 基因和荧光蛋白基因，将这两个基因克隆在常用的表达质粒中，构成融合蛋白基因，然后在常用的基因工程表达体系中（例如细菌、酵母、昆虫细胞、昆虫、哺乳动物细胞等）进行基因工程重组表达，经过分离纯化获得 ZZ-荧光蛋白融合蛋白质。ZZ-荧光蛋白融合蛋白质的分离纯化可以利用 ZZ 能够和免疫球蛋白 IgG 结合的性质、利用 IgG 亲和介质进行纯化；也可以在基因克隆时，在融合蛋白质的一端或者两端加上目前常用的亲和纯化标签（例如：大肠杆菌硫氧还蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白、组氨酸短肽标签、或者 Flag 标签等）进行分离纯化。该融合蛋白质可以直接应用于检测各种动物来源的免疫球蛋白 IgG、用于酶联免疫反应(ELISA)、免疫印迹分析、免疫荧光显微镜分析、流式细胞分析、免疫芯片检测等。

由免疫球蛋白结合结构域 ZZ 与荧光蛋白构成的融合蛋白质的构成如下：

- a. ZZ-荧光蛋白
- b. 荧光蛋白-ZZ
- c. A-ZZ-荧光蛋白
- d. A-ZZ-荧光蛋白-ZZ
- e. ZZ-荧光蛋白-B
- f. 荧光蛋白-ZZ-B
- g. A-ZZ-荧光蛋白-B
- h. A-荧光蛋白-ZZ-B

其中 A 肽、B 肽分别为目前常用的融合蛋白或短肽标签，如大肠杆菌硫氧还蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白、组氨酸短肽标签、Flag 标签等。荧光蛋白是指能够产生荧光的蛋白质，如绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(DsRed-Express)等。

同已有的、天然来源的、经过化学修饰的检测用抗体相比，本发明的特色和创新之处在于：

(1) 与传统的、在动物来源的天然抗体上偶联发光基团或者通过化学反应显色或者发光的蛋白质（如辣根过氧化物酶，碱性磷酸酯酶）的方法相比，该 ZZ-荧光蛋白融合蛋白质生产过程简便、成本低、易于大量生产，而且一个蛋白质就能够识别不同动物来源的抗体，无需制备针对不同动物来源的一抗的抗体，也无需加入任何其它的辅助因子或者试剂进行反应而产生显色，能够直接利用荧光分光光度计、X-光片、荧光显微镜或流式细胞仪或者免疫芯片进行检测。

(2) 本发明建立了利用重组 DNA 技术生产 ZZ-荧光蛋白融合蛋白质的生产及纯化方法。

以上所用方法都是分子生物学中最常用的、成熟的分离纯化方法，方法简便、价廉，具有很好的适用性，推广方便，适于生产。。

四、附图说明：

图 1 ZZ-EGFP 和 ZZ-DsRed 的表达和纯化

a: ZZ-EGFP 表达菌的非诱导对照(1)，IPTG 诱导表达(2)，表达菌超声破碎上清(3)，超声沉淀(4)，Ni 亲和层析穿过峰(5)，纯化的 ZZ-EGFP(6)；

b: ZZ-DsRed 表达菌的非诱导对照(1)，IPTG 诱导表达(2)，表达菌超声破碎上清(3)，超声沉淀(4)，Ni 亲和层析穿过峰(5)，纯化的 ZZ-DsRed(6)。

图 2 用 HRP 标记驴二抗 IgG 检测 ZZ-EGFP 和 ZZ-DsRed 与抗体的结合能力

a. 酶联免疫吸附分析 (ELISA)；

b. 免疫印迹分析 (Western Blot)。

图 3 在斑点杂交法中用 ZZ-EGFP 和 ZZ-DsRed 检测两种抗体

1, 3: 兔抗 GST 抗体；2, 4: 鼠抗 TNF α 抗体。

图 4 ZZ-EGFP, ZZ-DsRed 和常规 HRP/ECL 法在检测两种蛋白中的比较

a: 纯化的 TNF α 蛋白; b: 纯化的 GST 蛋白。

图 5 ZZ-EGFP 和 ZZ-DsRed 在免疫荧光显微镜分析中的应用

a: 用 ZZ-EGFP 作为二抗检测 293T 细胞中带有 Flag 标记的 IRF3 蛋白;

b: 用 ZZ-DsRed 作为二抗检测 HeLa 细胞中带有 Flag 标记的 IRF3 蛋白。

两种蛋白的标记效果与商品化 FITC 标记二抗相同。

图 6 在流式细胞分析技术中用 ZZ-EGFP 检测 293T 细胞表面整合素 $\beta 3$ 亚基

a: 用商品化 FITC 标记的二抗进行流式细胞检测分析;

b: 用 ZZ-EGFP 作为二抗进行流式细胞检测分析。

五、具体实施方式:

实施例 1: ZZ 蛋白和绿色荧光蛋白(EGFP)的融合及其在免疫分析中的应用:

1. ZZ 基因的克隆和表达质粒 pET28a-ZZ 的构建:

根据 ZZ 基因的序列、化学合成 ZZ-5' (5' CATGAATTCGCGCAACACGATGAAGCC 3') 和 ZZ-3' (5' CCCAAGCTTCTACCGAGCTCGAATTCGC 3') 两条引物,用 ZZ-5' 和 ZZ-3' 两条引物从 pEZZ318 质粒(安玛西亚公司)中 PCR 扩增得到 ZZ 基因编码序列,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后用于酶切和连接。PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟; 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 分钟; 4 $^{\circ}$ C 保存。

回收的 ZZ PCR 产物进行 EcoR I 和 Hind III 双酶切,质粒 pET28a(Novagen) 也进行 EcoR I 和 Hind III 双酶切。酶切并且经过回收纯化的 ZZ 片段和 pET28a 质粒片段,使用 T4 DNA 连接酶进行连接,连接产物转化大肠杆菌 Top10 菌株感受态细胞,用限制性内切酶酶切及 PCR 法筛选阳性克隆,得到重组质粒 pET28-ZZ,并经过 DNA 序列测序分析,测序引物为常规 T7 终止子引物。在 pET28a-ZZ 质粒中,在 ZZ 结构域的 N 端插入了 6 个组氨酸,该 6 个组氨酸原来就存在于 pET28a 质粒中。

2. ZZ-EGFP 基因的克隆及其表达载体的构建:

通过 Sal I 和 EcoR I 双酶切从 pEGFP (Clontech) 中得到 EGFP 的编码序列,用 T4 DNA 聚合酶补平之后、将其插入到依次经过 Xho I 酶切、碱性磷酸酶处理

的、以及 T4 DNA 聚合酶补平的 pET28a-ZZ 中。连接产物转化到 Top10 感受态细胞之后,用针对 EGFP 编码序列的引物通过 PCR 筛选阳性克隆,并通过 BamH I 限制性酶切的方法检验 EGFP 基因插入的方向。DNA 测序验证编码序列以及阅读框的正确性。

3. ZZ-EGFP 在大肠杆菌中的表达和纯化:

将 pZZ-EGFP 表达质粒转化表达菌株 BL21 (DE3),生长于含有卡那霉素的 LB 琼脂平板上,37°C 生长 16 小时之后,将平板上所有克隆刮下接种于 2 升含有 50µg/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基。剧烈振荡培养 2-3 个小时直到培养液的 OD600 达到 0.8,用 1mM IPTG 诱导目的蛋白的表达。4 个小时之后,5000 转/分钟,离心 5 分钟收集菌体,用冷的磷酸盐溶液洗涤沉淀并将其重新悬浮于 40ml 的结合缓冲液中(50mM 磷酸钠, pH7.8, 300mM 氯化钠, 40mM 咪唑)。在冰浴保护下用超声波破碎菌体。在 4°C, 13000 转/分钟,离心 15 分钟之后将超声破碎的细胞上清加载到一个 2ml Ni-琼脂糖凝胶亲和层析柱上,上样前用结合缓冲液预平衡层析柱。用洗脱缓冲液(50mM 磷酸钠, pH7.8, 300mM 氯化钠, 250mM 咪唑)洗脱 ZZ-EGFP 蛋白,将其对磷酸盐溶液透析后,采用 Bradford 法进行蛋白质定量分析。

4. 酶联免疫吸附分析 (ELISA):

将 100 µl 连续梯度稀释的 ZZ-EGFP 包被于 96 孔酶标板,置 4°C 过夜。用 PBST 洗涤 4 次,每次振荡洗涤 15 分钟。用 5% 脱脂牛奶于室温包被 1 小时之后用 PBST 洗涤 4 次。然后用 100 µl 1:4000 稀释的 HRP 标记的驴抗羊 IgG 抗体 (Santa Cruz) 在室温孵育 1 小时。PBST 洗涤 4 次之后用 TMB 底物系统对 HRP 显色 10 分钟,终止反应后,以 620nm 为参照读取 450nm 的光吸收值。

5. Western Blotting 分析 ZZ-EGFP:

连续梯度稀释的 ZZ-EGFP 在通过 SDS-PAGE 分离之后转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉包被 1 小时后,用 1:2000 稀释的 HRP 标记驴抗羊 IgG 抗体 (Santa Cruz) 与膜一起温育 1 小时。经 PBST 洗涤 4 次之后、用 ECL 系统 (Cell Signaling) 对 HRP 进行显色,并对 X 光片曝光。

6. 用 ZZ-EGFP 进行点杂交检测:

根据文献报道的方法 (Oprandy J.J.等, Am. J. Trop. Med. Hyg., 38: 181-186,

1988) 进行点杂交免疫分析。将 2 μ l 连续梯度稀释的 GST, TNF α 以及两种不同的抗体, 即兔多克隆抗 GST IgG(Oncogene)、鼠多克隆抗 TNF α IgG (Santa Cruz) 点样于甲醇处理的 PVDF 膜上。GST 和 TNF α 各点样两张膜, 点样时 PVDF 膜保持湿润并置于一层用缓冲液预湿的滤纸上, 下面依次是一层干滤纸, 6 层吸水纸, 点样过程中最下层吸水纸务必保持干燥状态。点样后用 5% 脱脂奶粉包被 PVDF 膜 1 小时, PBST 洗膜 4 次。对于 GST 和 TNF α , 分别用 1:500 稀释的兔多克隆抗 GST 抗体和鼠多克隆抗 TNF α 抗体与膜一起温育 1 小时, PBST 洗涤 4 次之后一份用 1:200 稀释的 ZZ-EGFP 温育 1 小时, 另一份分别用 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体和羊抗鼠 IgG 抗体温育 1 小时, PBST 洗涤 4 次。对于 2 种不同的抗体, 在 5% 脱脂牛奶包被之后直接用 1:200 稀释的 ZZ-EGFP 与膜温育 1 小时, PBST 洗涤 4 次。ZZ-EGFP 使用 Typhoon 9410 (安玛西亚) 进行检测, 激发波长 488nm, 检测波长 520nm。HRP 用 ECL 系统进行发光 (Cell Signaling) 并对 X 光片曝光。

7. ZZ-EGFP 用于细胞免疫组化分析:

293T 细胞培养于含 10% 胎牛血清 (Hyclone), 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中 (Invitrogen)。接种于玻璃载玻片培养室培养 24 小时之后, 通过标准磷酸钙转染的方法用 pRK5-Flag-IRF3 转染细胞。转染 48 小时之后用 4% 多聚甲醛固定细胞, 于 0.2% Triton X-100 中处理 5 分钟以增加细胞的通透性。细胞在经过 3% BSA/TBS 包被后, 与 1:100 稀释的鼠单克隆抗体 anti-Flag 抗体 (Sigma) 共孵育 1 小时, TBS 洗涤 4 次之后, 用 1:500 稀释的 ZZ-EGFP 或 1:500 稀释的 FITC 标记兔抗鼠 IgG (Sigma) 孵育 1 小时。对照细胞不经过 Flag 抗体处理而直接用 1:500 稀释的 ZZ-EGFP 进行孵育。细胞核用 DAPI 复染。细胞图像通过 Carl Zeiss 显微镜 Axioplan 2 观察, 用 AxioVision3.1 软件获取及分析。

8. ZZ-EGFP 用于流式细胞技术检测:

将 ZZ-EGFP 用于流式细胞分析技术检测细胞表面的整合素 3 亚基表达情况。使用仪器为 Becton-Dickinson FACScan, 以 488nm 激光器采集数据, 通过软件 CELLQUEST (Becton-Dickinson) 分析数据。收获 293T 细胞, 并用 1mL 预冷的 PBS 洗涤、2% BSA/PBS 溶液封闭 30 分钟之后, 用 1:100 稀释的多克隆兔抗人整合素 3 亚基抗体继续孵育 30 分钟, 用 PBS 洗涤三次之后, 将细胞与 1:100 稀

释的 FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体或者 1:100 稀释的 ZZ-EGFP 继续孵育 30 分钟，用 PBS 溶液洗涤细胞三次，将细胞重悬于 200 μ l PBS 溶液，加入 200 μ l 12% 甲醛后，进行流式细胞仪分析。

实施例 2: ZZ 蛋白和红色荧光蛋白 (DsRed-Express) 的融合及其在免疫分析中的应用

1. ZZ-DsRed 基因的克隆及其表达载体的构建:

通过 Sal I 和 EcoR I 双酶切从 pDsRed-Express (Clontech) 中得到 DsRed-Express 的编码序列,用 T4 DNA 聚合酶补平之后将其插入到依次经过 Xho I 酶切、碱性磷酸酶处理的、以及 T4 DNA 聚合酶补平的 pET28a-ZZ 中。连接产物转化到 Top10 感受态细胞之后,用针对 DsRed-Express 编码序列的引物通过 PCR 筛选阳性克隆,并通过 BamH I 限制性酶切的方法检验 DsRed-Express 基因插入的方向。DNA 测序验证编码序列以及阅读框的正确性。

2. ZZ-DsRed 在大肠杆菌中的表达和纯化:

将 pZZ-DsRed 表达质粒转化表达菌株 BL21 (DE3),生长于含有卡那霉素的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 生长 16 小时之后,将平板上所有克隆刮下接种于 2 升含有 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基。剧烈振荡培养 2-3 个小时直到培养液的 OD600 达到 0.8,用 1mM IPTG 诱导目的蛋白的表达。4 个小时之后,5000 转/分钟,离心 5 分钟收集菌体,用冷的磷酸盐溶液洗涤沉淀并将其重新悬浮于 40ml 的结合缓冲液中(50mM 磷酸钠, pH7.8, 300mM 氯化钠, 40mM 咪唑)。在冰浴保护下用超声波破碎菌体。在 4 $^{\circ}$ C, 13000 转/分钟,离心 15 分钟之后将超声破碎的细胞上清加载到一个 2ml Ni-琼脂糖凝胶亲和层析柱上,上样前用结合缓冲液预平衡层析柱。用洗脱缓冲液(50mM 磷酸钠, pH7.8, 300mM 氯化钠, 250mM 咪唑)洗脱 ZZ-DsRed 蛋白,将其对磷酸盐溶液透析后,采用 Bradford 法进行蛋白质定量分析。

3. 酶联免疫吸附分析 (ELISA):

将 100 μ l 连续梯度稀释的 ZZ-DsRed 包被于 96 孔酶标板,置 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 PBST 洗涤 4 次,每次振荡洗涤 15 分钟。用 5% 脱脂牛奶于室温包被 1 小时之后用 PBST 洗涤 4 次。然后用 100 μ l 1:4000 稀释的 HRP 标记的驴抗羊 IgG 抗体

(Santa Cruz) 在室温孵育 1 小时。PBST 洗涤 4 次之后用 TMB 底物系统对 HRP 显色 10 分钟，终止反应后，以 620nm 为参照读取 450nm 的光吸收值。

4. Western Blotting 分析 ZZ-DsRed:

连续梯度稀释的 ZZ-DsRed 在通过 SDS-PAGE 分离之后转移到 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉包被 1 小时后，用 1:2000 稀释的 HRP 标记驴抗羊 IgG 抗体 (Santa Cruz) 与膜一起温育 1 小时。经 PBST 洗涤 4 次之后、用 ECL 系统 (Cell Signaling) 对 HRP 进行显色，并对 X 光片曝光。

5. 用 ZZ-DsRed 进行点杂交检测:

根据文献报道的方法 (Oprandy J.J.等, Am. J. Trop. Med. Hyg., 38: 181-186, 1988) 进行点杂交免疫分析。将 2 μ l 连续梯度稀释的 GST, TNF α 以及两种不同的抗体，即兔多克隆抗 GST IgG (Oncogene)、鼠多克隆抗 TNF α IgG (Santa Cruz) 点样于甲醇处理的 PVDF 膜上。GST 和 TNF α 各点样两张膜，点样时 PVDF 膜保持湿润并置于一层用缓冲液预湿的滤纸上，下面依次是一层干滤纸，6 层吸水纸，点样过程中最下层吸水纸务必保持干燥状态。点样后用 5%脱脂奶粉包被 PVDF 膜 1 小时，PBST 洗膜 4 次。对于 GST 和 TNF α ，分别用 1:500 稀释的兔多克隆抗 GST 抗体和鼠多克隆抗 TNF α 抗体与膜一起温育 1 小时，PBST 洗涤 4 次之后，一份用 1:200 稀释的 ZZ-DsRed 温育 1 小时，另一份分别用 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体和羊抗鼠 IgG 抗体温育 1 小时，PBST 洗涤 4 次。对于点样的 2 种不同的抗体，在 5%脱脂牛奶包被之后直接用 1:200 稀释的 ZZ-DsRed 与膜温育 1 小时，PBST 洗涤 4 次。ZZ-DsRed 使用 Typhoon 9410 (安玛西亚公司) 进行检测，激发波长 488nm，检测波长 520nm。HRP 用 ECL 系统进行发光 (Cell Signaling) 并对 X 光片曝光。

6. ZZ-DsRed 用于细胞免疫组化分析:

293T 细胞培养于含 10%胎牛血清 (Hyclone)，青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中 (Invitrogen)。接种于玻璃载玻片培养室培养 24 小时之后通过标准磷酸钙转染的方法用 pRK5-Flag-IRF3 转染细胞。转染 48 小时之后用 4%多聚甲醛固定细胞，于 0.2% Triton X-100 中处理 5 分钟以增加细胞的通透性。细胞在经过 3%BSA/TBS 包被后，与 1:100 稀释的鼠单克隆抗体 anti-Flag 抗体 (Sigma) 共孵育 1 小时，TBS 洗涤 4 次之后，用 1:500 稀释的 ZZ-DsRed 或 1:500 稀释的 FITC

标记兔抗鼠 IgG (Sigma) 孵育 1 小时。对照细胞不经过 Flag 抗体处理而直接用 1:500 稀释的 ZZ-DsRed 进行孵育。细胞核用 DAPI 复染。细胞图像通过 Carl Zeiss 显微镜 Axioplan 2 观察, 用 AxioVision3.1 软件获取及分析。

在实施例 1 中, 我们成功构建了质粒 pZZ-EGFP, 并在大肠杆菌中表达了荧光融合蛋白 ZZ-EGFP。为了简化并提高融合蛋白的纯化效率, 利用 pET28a 载体本身的特点、在 ZZ-EGFP 的 N 端引入了含有 6 个组氨酸的表达标签, 这样 ZZ-EGFP 可以很容易通过一步 Ni²⁺螯合亲和层析进行纯化。融合蛋白的表达受 T7 启动子控制并受 IPTG 诱导调控。含有表达质粒 pZZ-EGFP 的 BL21 (DE3) 在经过 1mMIPTG 诱导 4 个小时之后, 菌体呈现鲜艳的绿色。根据 SDS-PAGE 分析, 如图 1a 所示, 在 IPTG 的诱导下, ZZ-EGFP 得到成功表达, 其表观分子量为 42.7kDa, ZZ-EGFP 大约占细胞总蛋白的 29%, 并且细胞在经过超声波破碎之后, 大部分的 ZZ-EGFP 保持可溶性状态。在 40mM 咪唑存在下融合蛋白能够较好的结合于 Ni-琼脂糖层析柱, 并能被 250mM 咪唑完全洗脱下来。从 1 升 LB 培养基中, 我们纯化得到了 35mg ZZ-EGFP, 纯度约为 83%。根据分析, 融合蛋白的荧光特性与 EGFP 相近, 最大激发波长为 490nm, 最大发射波长为 512nm。

为了检验融合蛋白的抗体结合活性, 我们首先观察了 ZZ-EGFP 在 IgG-琼脂糖亲和介质 (安玛西亚公司) 上的结合行为。将 300 μ g 纯化的 ZZ-EGFP 与 50 μ l IgG 亲和介质共同温育之后, 几乎所有的绿色 ZZ-EGFP 都结合到介质上。这表明, 在将其融合到 EGFP 之后, ZZ 结构域仍然保留了结合 IgG 的活性, 同时也说明可以利用 IgG 亲和层析对 ZZ-EGFP 进行纯化。随后我们通过 ELISA 的方法进一步观察了 ZZ-EGFP 对 IgG 的结合行为。将连续梯度稀释的 ZZ-EGFP 吸附于 96 孔酶标板, 用 HRP 标记的抗 IgG 抗体进行检测。如图 2a 所示, 用 HRP 标记的驴抗羊 IgG 可以检测到少至 4ng/ml 的 ZZ-EGFP。并且作为阴性对照, 多达 66000ng/ml 的大肠杆菌总蛋白没有给出检测信号。结果表明, ZZ-EGFP 能够特异性地结合 IgG 抗体, 在进一步用 Western blotting 分析时, 我们得到了类似的结果, 经过系列梯度稀释的 ZZ-EGFP 经过 SDS-PAGE 电泳并转移到 PVDF 膜上之后也可以被 HRP 标记的抗 IgG 抗体检测到, 如图 2b 所示。对于驴抗羊 IgG 抗体, 其检测 ZZ-EGFP 的极限为 60ng。

设计 ZZ-EGFP 融合蛋白的目的是要将其应用于基于荧光的免疫分析，为了验证 ZZ-EGFP 融合蛋白既可以与抗体结合、又能够比较容易地进行检测，我们进行了点杂交免疫分析。两种不同的抗体，鼠多克隆抗 TNF α IgG，兔多克隆抗 GST IgG 在经过系列梯度稀释之后点样于甲醇处理的 PVDF 膜上，并直接用 ZZEGFP 进行检测。如图 3 所示，鼠多克隆抗 TNF α IgG 显示了较强的结合活性，少至 0.4ng 的该抗体就可以被 ZZ-EGFP 检测到。其次是兔多克隆抗 GST IgG。这表明，作为一个具有双功能的分子 ZZ-EGFP 不仅能够和 IgG 专一性结合，并且还能够很容易地进行检测，不需要加入任何其它的辅助因子或者试剂。因此 ZZ-EGFP 显示了较好的在免疫分析中应用的潜力。

为了验证 ZZ-EGFP 在 Western blotting 中的应用，我们使用了在大肠杆菌中表达并纯化的 GST 和 TNF α 蛋白，在经过系列梯度稀释之后点样于 PVDF 膜上，各两份，分别用兔抗 GST 抗体和鼠抗 TNF α 抗体进行孵育，然后一份用 ZZ-EGFP 处理，另一份分别用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体和羊抗鼠 IgG 抗体温育。如图 4 所示，使用 ZZ-EGFP 能够检测到少至 9.4ng 的 TNF α 和 125ng 的 GST 蛋白。这表明，鼠抗 TNF α IgG，ZZ-EGFP 拥有和传统 HRP 标记二抗相当的检测效果。

ZZ-EGFP 潜在的最大的应用领域是免疫荧光显微镜分析。为了观察其应用的可行性，我们用 pRK5-Flag-IRF3 转化 293T 细胞。该质粒编码一种带有 Flag 标签的干扰素调控因子 (IRF3)，该蛋白组成型表达于各种组织和细胞中，在没有被病毒感染时 IRF3 蛋白主要停留在细胞质中，一旦发生病毒感染并诱导产生 C 末端 Ser 的磷酸化，IRF3 将会转运到细胞核中并与其它一些蛋白质形成复合物，结合到 IFN α 和 IFN β 基因的启动子上。细胞在经过抗 Flag 抗体孵育之后用 ZZ-EGFP 检测，阴性对照为不经过 Flag 抗体处理而直接用 ZZ-EGFP 孵育的细胞，阳性对照为用 FITC 标记的抗 IgG 抗体代替 ZZ-EGFP。如图 5 所示，根据 ZZ-EGFP 显示的结果，IRF3 蛋白在细胞中定位于细胞质。这和阳性对照的结果一致。并且，未经 Flag 抗体温育的阴性对照在经过 ZZ-EGFP 温育后没有显示出非特异性的背景信号。这表明，ZZ-EGFP 在应用于免疫荧光显微镜分析时，能够特异性的显示目标蛋白的表达和定位，给出令人满意的结果。

此外，ZZ-EGFP 还可以很好地用于流式细胞分析技术中对细胞进行免疫分析检测，图 6 显示出 ZZ-EGFP 能和 FITC 标记的商业化二抗一样，有效地用于检测

293T 细胞表面整合素 $\beta 3$ 亚基。

同样我们在实例 2 中,也成功构建了质粒 pZZ-DsRed,并成功地大肠杆菌中表达了荧光融合蛋白 ZZ-DsRed,表达了 ZZ-DsRed 的菌体呈现鲜亮的红色。根据 SDS-PAGE 分析,如图 1b 所示,在 IPTG 的诱导下,ZZ-DsRed 的表观分子量为 42.7kDa。IPTG 诱导后,ZZ-DsRed 大约占细胞总蛋白的 29%,在细胞超声破碎之后,大部分的 ZZ-DsRed 保持可溶性状态。在 40mM 咪唑存在下融合蛋白能够较好的结合于 Ni-琼脂糖层析柱,并能被 250mM 咪唑完全洗脱下来。从 1 升 LB 培养基中我们纯化得到了 35mgZZ-DsRed,纯度约为 75%。融合蛋白的荧光特性与 DsRed-Express 相近,最大激发波长为 457nm,最大发射波长为 586nm。

ZZ 结构域融合到 DsRed 之后,仍然保留了结合 IgG 的活性。将 300 μ g 纯化的 ZZ-DsRed 与 50 μ l IgG 亲和介质共同温育之后,几乎所有的红色 ZZ-DsRed 都结合到介质上。ELISA 检测也进一步显示出 ZZ-DsRed 对不同 IgG 的结合行为:如图 2a 所示,用 HRP 标记的驴抗羊 IgG 可以检测到少至 4ng/ml 的 ZZ-DsRed,作为阴性对照,多达 66000ng/ml 的大肠杆菌总蛋白没有给出检测信号。ZZ-DsRed 能够特异性地结合 IgG 抗体。进一步的 Western blotting 分析也表现出了类似的结果,如图 2b 所示,驴抗羊 IgG 抗体能够检测到 ZZ-DsRed 的极限为 60ng。

斑点杂交免疫分析结果显示,如图 3 所示,少至 0.4ng 的鼠多克隆抗 TNF α IgG 该抗体就可以被 ZZ-DsRed 检测到,对于兔多克隆抗 GST IgG,ZZ-DsRed 检测到的极限为 4ng。ZZ-DsRed 不仅能够和 IgG 结合,并且还能够在很容易地进行检测,不需要加入任何其它的辅助因子或者试剂。

图 4 显示,当应用 ZZ-DsRed 进行 Western blotting 分析时,ZZ-DsRed 能够检测到少至 2.8ng 的 TNF α 和 250ng 的 GST 蛋白;相应地,使用传统的 HRP 能够检测到的 TNF 和 GST 蛋白分别为少于 2.8ng 和 31.25ng。这表明,ZZ-DsRed 拥有和传统 HRP 标记二抗相当的检测效果。

与图 5a 的结果相似,图 5b 显示 ZZ-DsRed 在应用于免疫荧光显微镜分析时,能够特异性地显示目标蛋白的表达和定位,给出令人满意的结果。

因此我们有理由相信,ZZ-EGFP 和 ZZ-DsRed 可以在免疫分析领域得到广泛的应用,这将大大降低实验研究和临床检测的成本。

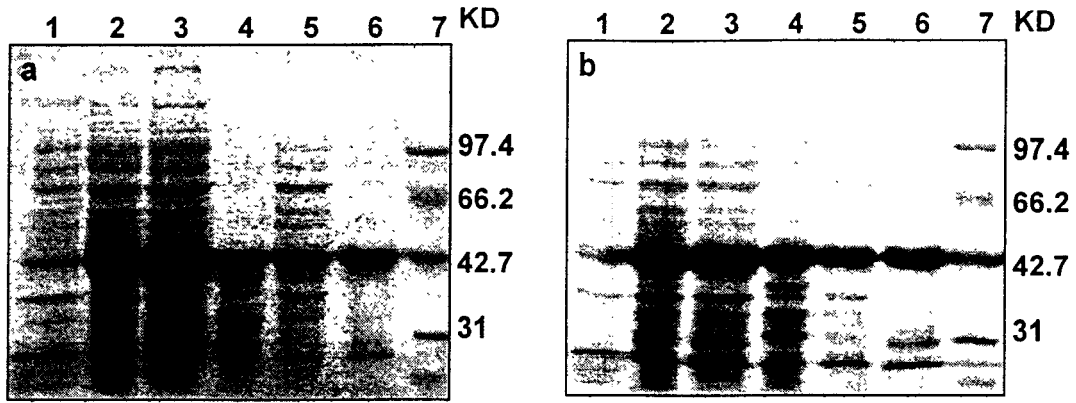


图 1

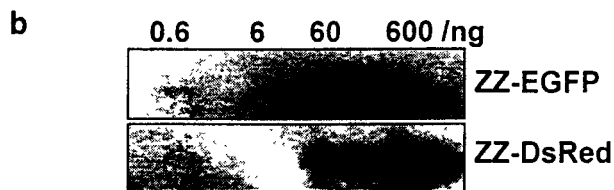
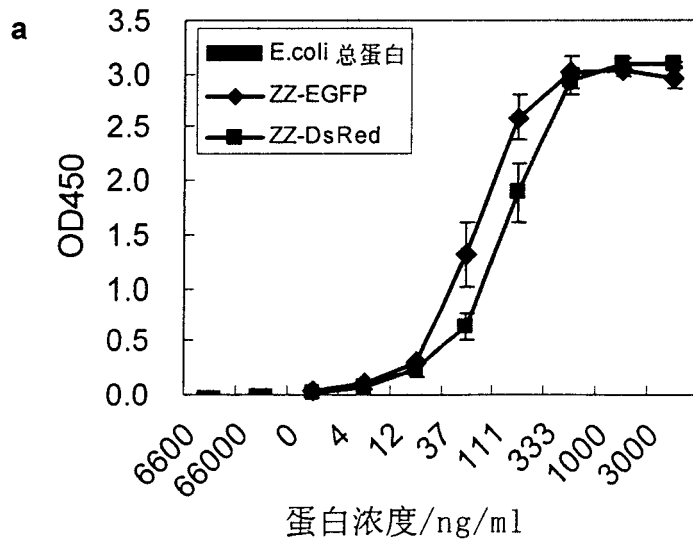


图 2

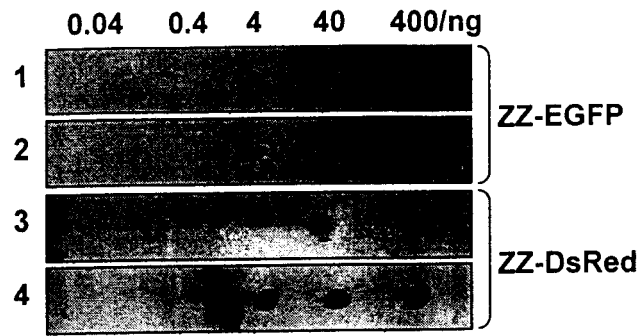


图 3

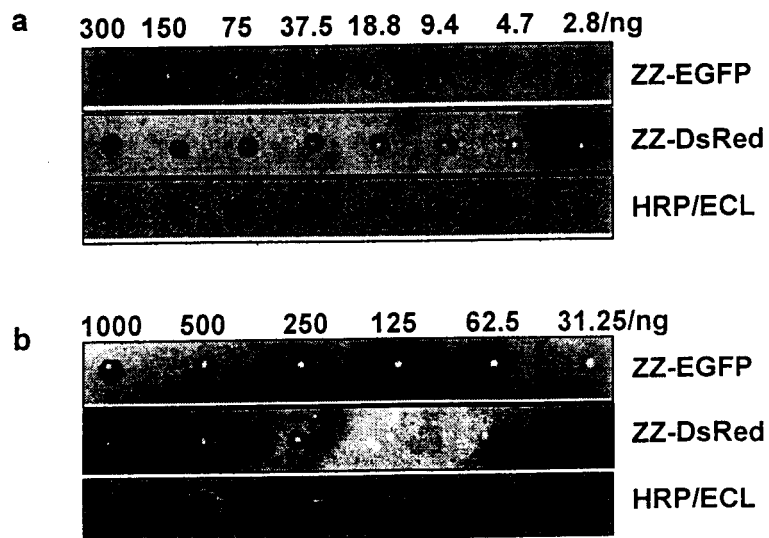


图 4

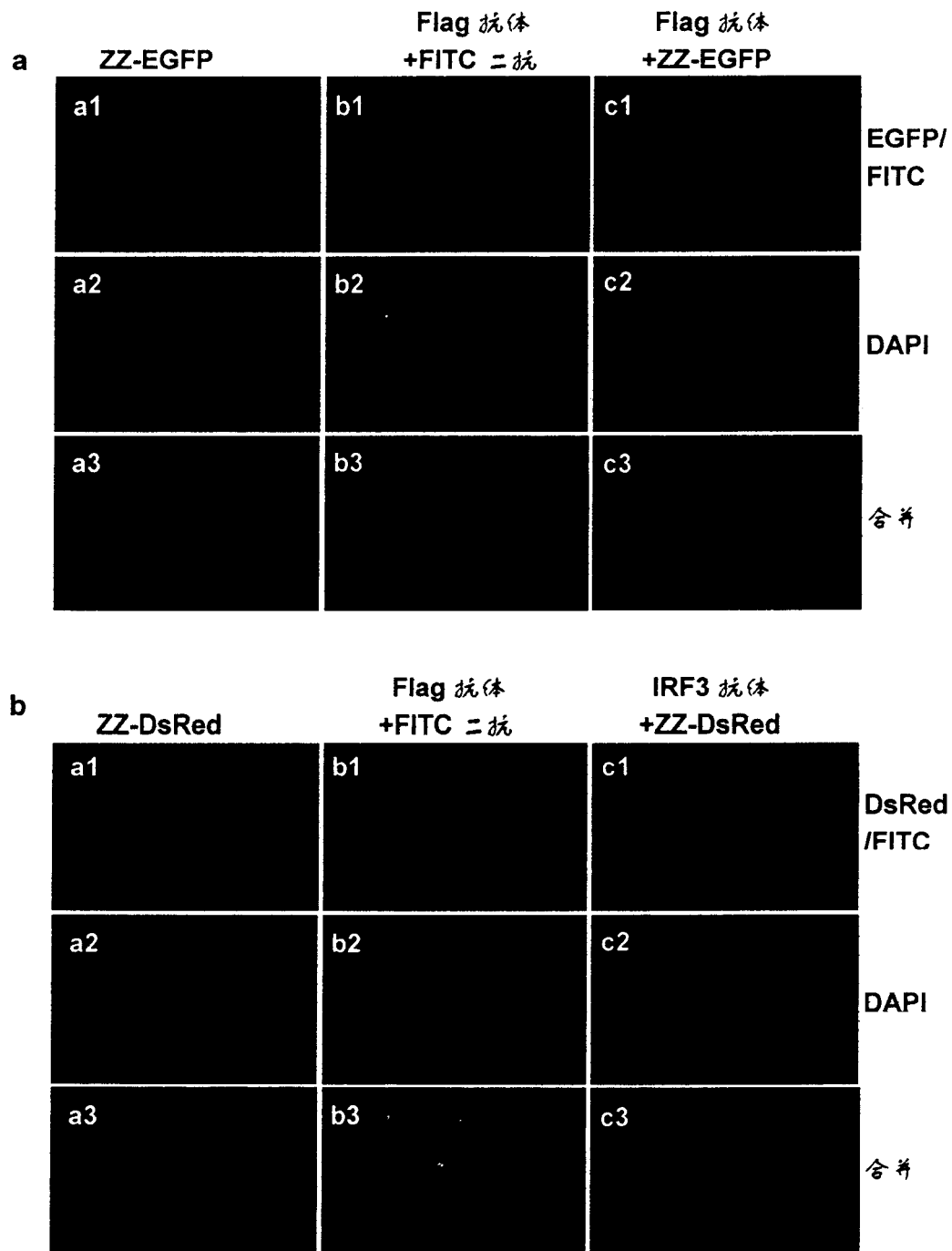


图 5

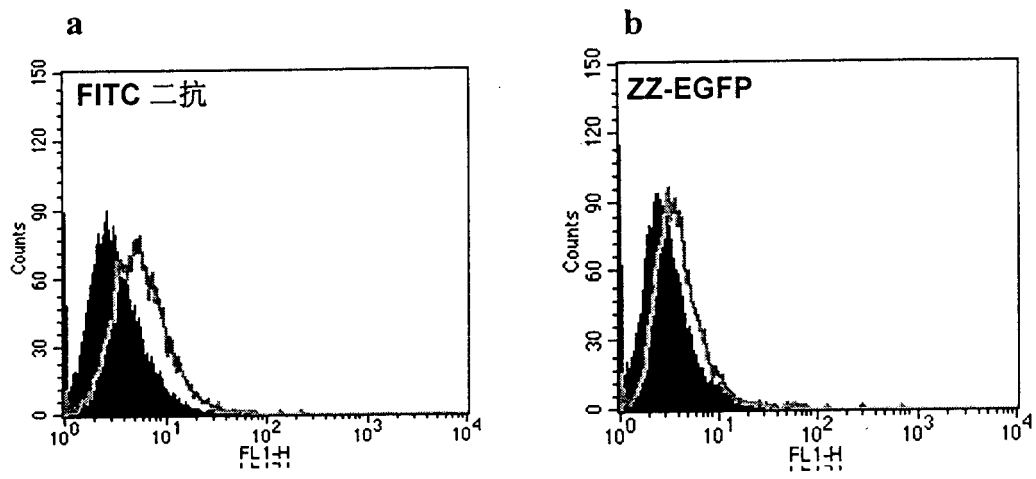


图 6

专利名称(译)	免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白融合蛋白质及其应用		
公开(公告)号	CN1807457A	公开(公告)日	2006-07-26
申请号	CN200510095454.2	申请日	2005-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	华子春 黄启来		
发明人	华子春 黄启来		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/09 G01N33/533 G01N33/53		
代理人(译)	高桂珍		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物工程技术领域。本发明提供了一种由免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白构成的融合蛋白质，及其基因工程表达和分离纯化方法。利用本发明表达和纯化的免疫球蛋白结合结构域与荧光蛋白构成的融合蛋白质可以用来在生物学、医学等领域进行诸如酶联免疫吸附分析、Western Blotting分析、斑点杂交检测、免疫组化分析、流式细胞检测等各种免疫检测和分析。本发明还提供了免疫球蛋白结合结构域 - 绿色荧光蛋白(ZZ - EGF)、免疫球蛋白结合结构域 - 红色荧光蛋白(ZZ - DsRed)两种融合荧光蛋白的实例。

