



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102928583 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 13

(21) 申请号 201110230688. 9

(22) 申请日 2011. 08. 12

(71) 申请人 上海瑞晶生物科技有限公司

地址 201108 上海市闵行区颛兴东路 1528
号 7 号楼 5 楼 B502

(72) 发明人 王志超 刘喜朋

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

基于蛋白融合表达的免疫反应标记酶制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于蛋白融合表达的免疫反应标记酶制备方法。制备方法是具有生物素结合活性的链亲和素蛋白与显色酶蛋白融合表达，二者之间插入一段有氨基酸残基构成的 linker 序列，提高融合蛋白的可溶性、链亲和素蛋白与显色酶蛋白的酶活性。该免疫反应标记酶与生物素标记的第一抗体一起可以进行酶联免疫测定。

1. 一种基于蛋白融合表达的免疫反应标记酶制备方法,其特征在于链亲和素和显色酶的融合表达,包括链亲和素和显色酶的融合顺序,二者之间的 linker 氨基酸残基组成和长度。

2. 利用本专利中的标记酶进行的酶联免疫测定。

基于蛋白融合表达的免疫反应标记酶制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的免疫反应标记酶制备方法,尤其涉及一种基于蛋白融合表达的免疫反应标记酶制备方法,可以用于制备融合了链亲和素(streptavidin)的显色酶,进行酶联免疫反应,属于蛋白工程和抗原检测技术领域。

背景技术

[0002] 基因克隆技术的出现极大地促进了现代基因工程、蛋白质工程的发展。众多蛋白质,包括医用蛋白和工业用蛋白,是通过基因工程技术制备的。但酶联免疫上的标记酶主要是通过将第二抗体与显色酶(辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶等)采用化学试剂共价交联的方式制备的。传统方法制备的标记酶具有如下缺点:1)操作复杂,产品批间差大,重现性差。2)标记酶中含有未交联的抗体和显色酶单体,影响标记酶抗体效价和显色反应效率。3)二抗种类较多导致标记酶通用性差。因此制备性能稳定的通用型酶联免疫标记酶将解决这一问题。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于针对现有酶联免疫标记酶的不足,提供一种新的酶联免疫标记酶制备方法,这种标记酶制备技术不需要化学试剂共价交联二抗和显色酶,而是通过将链亲和素和显色酶融合表达,制备融合型的标记酶。制备的融合型标记酶可以用于酶联免疫测定。

[0004] 为实现这样的目的,在本发明中,用于显色的酶可以是常规的显色酶,例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等。链亲和素具有接近共价键水平的生物素结合活性,因次将链亲和素与显色酶融合在一起,通过链亲和素和生物素间的强相互作用将融合型标记酶(融合了链亲和素的显色酶)与生物素标记的一抗非特异性的结合在一起,通过显色酶进行酶联免疫的显色反应。

[0005] 本发明的具体步骤如下:

[0006] 第一步,制备链亲和素和显色酶重组蛋白。利用原核表达系统或真核表达系统表达纯化重组链亲和素和显色酶(例如辣根过氧化物酶)。原核表达系统所用表达质粒为pET28,表达菌株为BL21(DE3)。重组蛋白通过 Ni^{2+} 亲和色谱纯化。

[0007] 第二步,链亲和素和显色酶活性测定。测定重组表达的链亲和素的生物素结合能力,计算链亲和素的比活性。同样测定显色酶的活并计算比活性。

[0008] 第三步,制备链亲和素和显色酶融合型的标记酶。链亲和素处于N端或C端,碱性磷酸酶处于C端或N端,二者中间插入一定数目的氨基酸残基,以便促进融合蛋白的表达和三级结构的正确形成,提高酶活性。插入的氨基酸残基数目和组成依显色酶不同有所差异。融合蛋白可以利用原核表达系统或真核表达系统进行表达。融合型标记酶可以通过 Ni^{2+} 亲和色谱纯化。

[0009] 第四步,标记酶结合生物素活性和显色酶活性测定。测定融合型标记酶的生物素

结合活性（链亲和素酶活性）和显色酶活性，计算融合型标记酶的两种酶活性的比活性。

[0010] 第五步，融合型标记酶进行酶联免疫测定。将待测抗原固定在纤维素膜上，脱脂奶粉室温封闭纤维素膜 2 小时，膜与生物素标记的待测抗原的第一抗体室温温育 2 小时，磷酸盐缓冲液洗涤膜 3 次，融合型标记酶与膜温育 2 小时，磷酸盐缓冲液洗涤膜 3 次，加入显色剂显色拍照。

[0011] 本发明与现有的标记酶制备方法相比有显著的进步。主要优点如下：(1) 标记酶批间差小，性能稳定。(2) 消除了为标记的显色酶或二抗。所有标记酶均为链亲和素和显色酶的融合型蛋白。(3) 1 种标记酶可以显色所有一抗抗体。

[0012] 本发明制备的标记酶可用于酶联免疫、蛋白质工程等领域。融合型标记酶中的链亲和素和显色酶以等分子数比例融合在一起，因此可以大大提高标记酶的显色效果，提高酶联免疫的检测灵敏度，简化操作步骤。

附图说明

[0013] 图 1 为本发明基于蛋白融合表达的免疫反应标记酶制备的原理图。

具体实施方式

[0014] 以下通过实施例对本发明的技术方案作进一步详细描述。以下实施例不构成对本发明的限定。

[0015] 本发明方法如图 1 所示，首先构建链亲和素和碱性磷酸酶的重组表达载体，诱导表达纯化链亲和素和碱性磷酸酶，测定两种重组蛋白活性；然后构建二者的融合表达载体，包括链亲和素 - 碱性磷酸酶顺序的融合蛋白，两种蛋白间通过 linker 连接；通过测定融合蛋白的链亲和素和碱性磷酸酶活性确定最佳的 linker 序列和长度。

[0016] 本发明一个实施例中的免疫反应标记酶为链亲和素 - 碱性磷酸酶，将其与生物素标记的第一抗体一起使用检测一抗特异性的抗原，具体实施步骤如下：

[0017] 第一步，制备链亲和素和碱性磷酸酶。利用原核表达系统表达纯化重组链亲和素和碱性磷酸酶。原核表达系统所用表达质粒为 pET28，表达菌株为 BL21 (DE3)。重组蛋白通过 Ni^{2+} 亲和色谱纯化，产量分别为 100 毫克（链亲和素）和 50 毫克（碱性磷酸酶）。

[0018] 第二步，链亲和素和碱性磷酸酶活性测定。链亲和素结合生物素的比活性为 100U/毫克，碱性磷酸酶活性水解磷酸酯键的比活性为 1000U/毫克。

[0019] 第三步，制备链亲和素和碱性磷酸酶融合在一起的标记酶。链亲和素处于 N 端，碱性磷酸酶处于 C 端，二者中间为 15 个甘氨酸组成的 linker。原核表达系统所用表达质粒为 pET28，表达菌株为 BL21 (DE3)。重组蛋白通过 Ni^{2+} 亲和色谱纯化，产量分别为 120 毫克。

[0020] 第四步，标记酶结合生物素活性和水解磷酸酯键活性测定。重组标记酶的比活性为 1) 链亲和素比活性为 30U/毫克，碱性磷酸酶活性比活性为 600U/毫克。

[0021] 第五步，融合型标记酶进行酶联免疫测定。将 p53 抗原固定在纤维素膜上，脱脂奶粉室温封闭纤维素膜 2 小时，膜与生物素标记的 p53 抗原的抗体室温温育 2 小时，磷酸盐缓冲液洗涤膜 3 次，融合型标记酶与膜温育 2 小时，磷酸盐缓冲液洗涤膜 3 次，加入显色剂显色拍照。

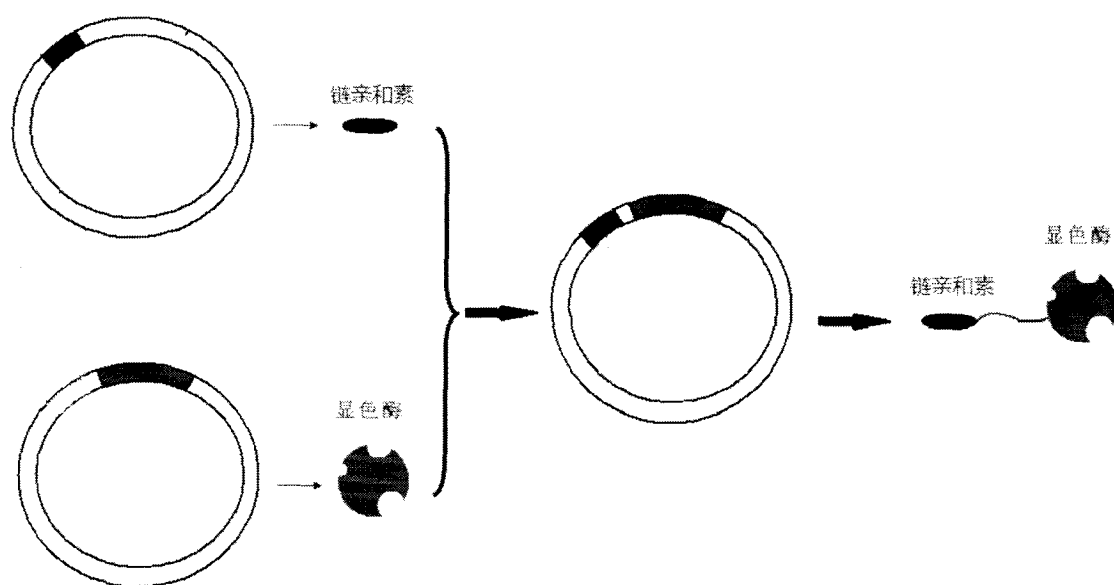


图 1

专利名称(译)	基于蛋白融合表达的免疫反应标记酶制备方法		
公开(公告)号	CN102928583A	公开(公告)日	2013-02-13
申请号	CN201110230688.9	申请日	2011-08-12
[标]发明人	王志超 刘喜朋		
发明人	王志超 刘喜朋		
IPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于蛋白融合表达的免疫反应标记酶制备方法。制备方法是具有生物素结合活性的链亲和素蛋白与显色酶蛋白融合表达，二者之间插入一段有氨基酸残基构成的linker序列，提高融合蛋白的可溶性、链亲和素蛋白与显色酶蛋白的酶活性。该免疫反应标记酶与生物素标记的第一抗体一起可以进行酶联免疫测定。

