



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110615844 A

(43)申请公布日 2019.12.27

(21)申请号 201910792298.7

(22)申请日 2019.08.26

(71)申请人 中国农业科学院上海兽医研究所  
(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

地址 200241 上海市闵行区紫月路518号

(72)发明人 朱传刚 纪荣毅 沈元曦 林娇娇  
洪炆 岳永程

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页  
序列表4页 附图6页

(54)发明名称

一种具有绿色荧光活性的多物种通用检测蛋白及其应用

(57)摘要

本发明提供一种具有绿色荧光活性的多物种通用检测蛋白及其应用,其特征在于所述检测蛋白包括链球菌蛋白G(SPG)片段和荧光蛋白,将SPG基因的IgG结合片段进行重构,只保留蛋白G能与抗体IgG的Fc端特异性相结合的C3区,并将其分为三组,C3、C3-D-C3、C3-D-C3-D-C3,并都连接EGFP,制备的重组蛋白具有荧光活性与不同物种抗体结合的双重活性。本发明公开的进化免疫球蛋白结合分子,其可以广谱结合包括人及多种动物总IgG及不同亚类的IgG,与现有技术中的免疫球蛋白结合分子相比,它结合力也比现有的免疫球蛋白结合分子高。

	S*	E	A1	B1	A2	B2	A3	D	C1	D1	C2	D2	C3	W	M
--	----	---	----	----	----	----	----	---	----	----	----	----	----	---	---

A

C3-EGFP:

BamH1	C3	Linker	EcoR1	EGFP	XhoI1
-------	----	--------	-------	------	-------

C3DC3-EGFP:

BamH1	C3	D	C3	Linker	EcoR1	EGFP	XhoI1
-------	----	---	----	--------	-------	------	-------

:C3DC3DC3-EGFP:

BamH1	C3	D	C3	D	C3	Linker	EcoR1	EGFP	XhoI1
-------	----	---	----	---	----	--------	-------	------	-------

B

1. 一种具有绿色荧光活性的检测蛋白,其特征在於所述检测蛋白是将SPG基因的IgG结合片段进行重构,只保留蛋白G能与抗体IgG的Fc端特异性相结合的C3区,并将其分为三组,C3、C3-D-C3、C3-D-C3-D-C3,并都连接EGFP,制备的重组蛋白具有荧光活性和与不同物种抗体结合的双重活性。

2. 如权利要求1所述的检测蛋白,所述链球菌蛋白G (SPG) 片段为含有SPG的C3区段的序列,优选为C3、C3-D-C3、C3-D-C3-D-C3中的一种,所述荧光蛋白为绿色荧光蛋白,其中优化后的IgG结合片段C3核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示;优化后的SPG基因的D片段核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示;优化后的C3与EGFP片段之间Linker核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示;优化后的EGFP蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.14所示。

3. 如权利要求1所述的检测蛋白,所述检测蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO.5、7、9之一所示;所述检测蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO.6、8、10之一所示。

4. 一种如权利要求1-3之一所述的具有绿色荧光活性的检测蛋白的构建方法,所述方法为:

根据C3片段的基因序列,从含有C3片段的菌液中PCR扩增出C3、C3DC3、C3DC3DC3序列;

通过PCR从含有EGFP序列的菌液中扩增出EGFP序列;

先将扩增出的EGFP序列经双酶切后连接到表达载体上,经鉴定后再分别将C3、C3DC3、C3DC3DC3片段连接上去,构建重组蛋白的原核表达质粒;

将所述表达载体、共表达载体转入表达宿主中培养,活化至对数生长期后加入诱导蛋白;

经破碎、纯化后制得融合蛋白C3-EGFP、C3DC3-EGFP、C3DC3DC3-EGFP。

5. 其中,步骤(1)中使用的引物对如SEQ ID NO.1、2所示;

步骤(2)中使用的引物对如SEQ ID NO.3、4所示。

6. 一种用于免疫分析的产品,所述产品包括权利要求1-3之一所述的融合蛋白。

7. 如权利要求5所述的产品,所述产品的形式可为探针(传感器)、试纸条、芯片、试剂盒等,在使用时,将权利要求1所述的检测蛋白与其它现有的商业试剂(如酶标抗体、荧光标记抗体、显色剂、底物等)混合,可用于各种形式的免疫分析,例如抗体检测、抗体筛选、抗原检测、病原检测、蛋白检测、蛋白相互作用筛查、高通量靶标蛋白检测、蛋白-核酸相互作用分析、药物筛选等。

## 一种具有绿色荧光活性的多物种通用检测蛋白及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域,特别涉及一种具有绿色荧光活性的多物种通用检测蛋白及其应用。

### 背景技术

[0002] 各种传染性疾病大范围的流行传播,对我国的国家安全和人口健康造成严重威胁。发展灵敏、准确的病原分析方法和检测技术对于相关疾病的快速诊断和及时治疗、生物恐怖和突发性公共卫生事件的有效防范和快速处置具有重要意义。经典的微生物分离鉴定麻烦费时,难以应用于致病微生物的现场快速检测;基于病原核酸的检测方法大多具有较高的检测灵敏度,但需要复杂的核酸抽提过程,而且容易出现假阳性;免疫学方法因基于抗体对病原的特异性识别作用而具有较好的特异性,同时操作简单,因此,广泛应用于临床和基础研究的各个领域。常规的免疫分析方法虽然能够实现快速检测,但由于该方法通常通过肉眼识别纳米金聚集显色,其灵敏度较低。针对于此,我们亟需开发一种快速、高灵敏的免疫检测方法。

[0003] 链球菌蛋白G (SPG) 是能与人类及多种动物的抗体IgG结合的一种链球菌细胞壁蛋白, SPG从N段开始,有三个同源结构区域A1、A2、A3,每个同源结构都由24个氨基酸组成,同时这三个同源结构被51个氨基酸组成的同源区域B1、B2隔开,接着是一个间隔的区域S,随后是55个氨基酸组成的同源结构区C1、C2、C3,它们之间又被D1和D2区所隔开,C3区之后为亲水区域W,最后为M区 (Sjobring,1991)。有研究表明,SPG的三个同源的氨基酸序列C1、C2和C3区域与抗体IgG Fc端的结合相关,并且C1和C2区只有2个氨基酸序列不同,C1和C3区有6个氨基酸序列不同,并且C3区与抗体IgG的结合能力相当于C1区的7倍 (Kobatake,1990)。而SPG的A、B区则具有与抗体Fab段结合以及与血清白蛋白结合的活性,被认为会起到干扰抗体与抗原的作用以及带来非特异性反应的问题。

[0004] GFP是一个由约238个氨基酸组成的蛋白质,从蓝光到紫外线都能使其激发,发出绿色荧光。由于荧光蛋白能稳定在后代遗传,并且能根据启动子特异性地表达,常被用作报告基因。在需要定量或其他实验中慢慢取代了传统的化学染料。增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced Green Fluorescent Protein,EGFP) 是GFP突变系,可以发射出的荧光强度比GFP大 6 倍以上,因此,比GFP更适合作为一种报告基因来研究基因表达、调控、细胞分化及蛋白质在生物体内定位和转运等。

[0005] 绿色荧光蛋白等标记抗体或G蛋白等活性物质的方法,涉及到化学偶联,偶联后提纯,透析,浓缩等繁琐步骤;而且由于本身生物大分子的特点,偶联的结合位点多样,不仅可能造成绿色荧光蛋白的荧光活性发生改变甚至失活,而且容易造成被标记的生物大分子的活性改变或失活。且由于偶联部位的不确定性,影响了试剂的稳定性。我们的发明采用分子生物学的方法,重新构建了一个自然界不存在的新颖双功能分子,重组的G蛋白与绿色荧光蛋白rG-EGFP,构建时不仅设计了连接片段保证两种活性不相互干扰,而且进行了密码子优化及纯化标签。该蛋白由于是通过原核表达获得,产量高,可以通过纯化标签进行亲和层

析,纯度得到了保证。提纯的蛋白经过检测,具有与多物种IgG的结合活性,同时具有绿色荧光活性。在应用到试纸条等检测中时,显示了该发明蛋白具有的高灵敏性。

## 发明内容

[0006] 本发明主要解决的技术问题是提供一种快速、高灵敏的免疫检测产品及方法,实现高效、高密度的免疫检测。

[0007] 为了实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

为了实现上述技术方案,本发明提供一种能高效的结合IgG的工具蛋白,将SPG基因的IgG结合片段进行重构,只保留蛋白G能与抗体IgG的Fc端特异性相结合的C3区,并将其分为三组,C3、C3-D-C3、C3-D-C3-D-C3,并都连接EGFP,制备的重组蛋白具有荧光活性和与不同物种抗体结合的双重活性。

[0008] 一种具有绿色荧光活性的检测蛋白,包括链球菌蛋白G (SPG) 片段和荧光蛋白,所述链球菌蛋白G (SPG) 片段为含有SPG的C3区段的序列,优选为C3、C3-D-C3、C3-D-C3-D-C3中的一种,所述荧光蛋白为绿色荧光蛋白;

优选的,其中优化后的IgG结合片段C3核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示;

优化后的SPG基因的D片段核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示;

优化后的C3与EGFP片段之间Linker核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示;

优化后的EGFP蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.14所示;

优选的,一种具有绿色荧光活性的检测蛋白,所述检测蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO.5、7、9之一所示;所述检测蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO.6、8、10之一所示。

[0009] 本发明同时提供一种具有绿色荧光活性的检测蛋白的构建方法,所述方法为:

(1) 根据C3片段的基因序列,从含有C3片段的菌液中PCR扩增出C3、C3DC3、C3DC3DC3序列;

(2) 通过PCR从含有EGFP序列的菌液中扩增出EGFP序列;

(3) 先将扩增出的EGFP序列经双酶切后连接到表达载体上,经鉴定后再分别将C3、C3DC3、C3DC3DC3片段连接上去,构建重组蛋白的原核表达质粒;

(4) 将所述表达载体、共表达载体转入表达宿主中培养,活化至对数生长期后加入诱导蛋白;

(5) 经破碎、纯化后制得融合蛋白C3-EGFP、C3DC3-EGFP、C3DC3DC3-EGFP。

[0010] 其中,步骤(1)中使用的引物对如SEQ ID NO.1、2所示;

步骤(2)中使用的引物对如SEQ ID NO.3、4所示;

上述方法中,融合蛋白基因的表达、纯化可采用本领域常规用于蛋白表达纯化的方法,例如将融合蛋白基因克隆入表达载体,将表达载体和/或共表达载体转入表达宿主中培养,活化至对数生长期后加入诱导蛋白,经破碎、纯化后得到融合蛋白。其中,本发明对表达载体、共表达载体、表达宿主的种类和类别不作限定,可选用本领域常规用于遗传修饰的载体和宿主,具体的,表达载体可为pET-28、pET-32、pET-15或pET-11的等,共表达载体可为pCDFDuet-1等;表达宿主可选自大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、棒状杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母或哺乳动物细胞。

[0011] 本发明中,克隆可通过例如链式酶聚合反应(PCR)完成。

[0012] 本发明同时提供一种用于免疫分析的产品,所述产品包括本发明所述的融合蛋白。

[0013] 其中,产品的形式可为探针(传感器)、试纸条、芯片、试剂盒等,在使用时,将本发明所述的融合蛋白与其它现有的商业试剂(如酶标抗体、荧光标记抗体、显色剂、底物等)混合,可用于各种形式的免疫分析,例如抗体检测、抗体筛选、抗原检测、病原检测、蛋白检测、蛋白相互作用筛查、高通量靶标蛋白检测、蛋白-核酸相互作用分析、药物筛选等。

[0014] 产品以试纸条的形式存在时,可将本发明复合物置于金标垫,用于标记抗体分子;进一步的,当复合物融合不同的功能配体时,可实现多种目标分子的同时检测。

[0015] 产品以试剂盒的形式存在时,试剂盒中还可包括缓冲液、洗涤液、稀释液或显色剂等。

[0016] 本发明中,免疫分析可为间接免疫、夹心免疫等方式,可用于各种形式的免疫分析,例如抗体检测、抗体筛选、抗原检测、病原检测、蛋白检测、蛋白相互作用筛查、高通量靶标蛋白检测、蛋白-核酸相互作用分析、药物筛选等。

[0017] 有益效果

(1) 本发明将SPG基因的IgG结合片段进行重构,只保留蛋白G能与抗体IgG的Fc端特异性相结合的C3区,并连接EGFP,制备的重组蛋白具有荧光活性和与不同物种抗体结合的双重活性。

[0018] (2) 本发明的融合蛋白可高效、高密度的捕获目标分子,达到快速、高灵敏的检测。

[0019] (3) 本发明的融合蛋白制备过程简单、易行,可适用于不同的免疫检测模式,如可用于间接ELISA、夹心ELISA等,尤其适用于液相中的免疫分析,仅仅是替换原有检测方法中的一种试剂,不改变原有操作步骤,不需要额外的设备和仪器。

## 附图说明

[0020] 图 1A:SPG的结构示意图;B:拼接后蛋白模结构示意图。

[0021] 图2 对重组蛋白的原核表达质粒,进行PCR鉴定,其中,

A:C3-EGFP的PCR鉴定结果(M:M:蛋白标志物;1:C3区;2:EGFP区;3:全片段区);

B:C3DC3-EGFP的PCR鉴定结果(M:M:蛋白标志物;1:C3区;2:EGFP区;3:全片段区);

C:C3DC3DC3-EGFP的PCR鉴定结果(M:M:蛋白标志物;1:C3区;2:EGFP区;3:全片段区)。

[0022] 图3重组表达蛋白的SDS-PAGE分析,其中,

A:C3-EGFP的时相。M:蛋白标志物;0h:无IPTG诱导;1、2、4、6、7:IPTG诱导1h,2h,4h,6h,7h;

B:C3-EGFP的可溶性分析。M:蛋白标志物;1:超声破碎沉淀物;2:超声破碎上清液;3:上样后蛋白检测;B:Binding buffer洗脱后的滤液;W:Wash buffer洗脱后的滤液;S:Strip buffer洗脱后的目的蛋白;

C:C3DC3-EGFP的时相。M:蛋白标志物;0h:无IPTG诱导;1、2、4、6、8:IPTG诱导1h,2h,4h,6h,8h;

D:C3DC3-EGFP的可溶性分析。M:蛋白标志物;1:超声破碎上清液;2:超声破碎沉淀物;3:上样前蛋白检测;4:上样后蛋白检测;B:Binding buffer洗脱后的滤液;W:Wash buffer洗脱后的滤液;S:Strip buffer洗脱后的目的蛋白;

E:C3DC3DC3-EGFP的时相。M:蛋白标志物;0h:无IPTG诱导;1、2、4、6: IPTG诱导1h, 2h, 4h, 6h;

F:C3DC3DC3-EGFP的可溶性分析。M:蛋白标志物;1:超声破碎上清液;2:超声破碎沉淀物;3:上样前蛋白检测;4:上样后蛋白检测;B:Binding buffer洗脱后的滤液;W:Wash buffer洗脱后的滤液;S:Strip buffer洗脱后的目的蛋白;

图4 A:纯化的重组蛋白用荧光分光光度计扫描rSPG-RFP的激发光谱;B:用最大激发光波长获得重组蛋白的发射光谱。

[0023] 图5 重组蛋白与不同物种IgG的结合活性测定

A:驴抗山羊;B:山羊抗小鼠;C:小鼠抗兔;D:兔抗山羊;

M:Marker; 1:C3-EGFP蛋白; 2:C3DC3-EGFP蛋白; 3:C3DC3DC3-EGFP蛋白

图6 Elisa法分析重组蛋白与多物种的IgG的亲合常数,其中,A:C3-EGFP与不同物种IgG亲和常数测定;B:C3DC3-EGFP与不同物种IgG亲和常数测定;C:C3DC3DC3-EGFP与不同物种IgG亲和常数测定。

[0024] 图7 :毛蚴荧光染色观察 A:自然光下毛蚴观察 B:绿色荧光激发波长下观察。

## 具体实施方式

[0025] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0026] 实施例1重组蛋白的构建

### 1.1 生物材料

大肠埃希氏杆菌BL21购自南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒pET-28a(+)为实验室保存, SPG(许瑞,赵登云,洪炆,陆珂,李浩,林矫矫,冯金涛,徐玉梅,朱传刚.链球菌蛋白G的结构域重构、表达及鉴定[J].中国动物传染病学报,2015,23(05):46-52.)EGFP对应NCBI上序列号:U55762

### 1.2 重组蛋白基因序列的构建和合成(如图1B所示)

从GenBank查出,已公布的编码EGFP和SPG的C区的基因片段,找出C1、C2、C3区和D区,得到C3区的基因片段。对EGFP序列进行信号肽分析,检测基因序列里是否含有大肠杆菌稀有密码子,即使用频率<10%,将其替换成编码统一氨基酸的大肠杆菌偏爱的密码子,最后3'端添加TAA终止密码子。Primer5软件设计引物,分别在上游和下游引物中加入酶切位点,引物序列如下:

引物名称	引物序列
C区上游引物	CGCGGATCCACCTACAAAC (SEQ ID NO.1)
C区下游引物	CCGGAATTCGCTACCG (SEQ ID NO.2)
EGFP区上游引物	CCGGAATTCGTGAGTAAAG (SEQ ID NO.3)
EGFP区下游引物	GGCCTCGAGGGCTAGCTCTTATTG (SEQ ID NO.4)

注:划线部分为酶切位点

应用DNA Star软件分析重组序列所表达的氨基酸序列、理论分子量及等电点,重组序列按发明构想分别构建以下三种质粒:

(1) pET-28a(+)-C3-EGFP 其中,C3-EGFP融合蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO.5所示: 编码的氨基酸序列为SEQ ID NO.6所示:

(2) pET-28a(+)-C3DC3-EGFP, C3DC3-EGFP融合蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO.7所示: 编码的氨基酸序列为SEQ ID NO.8所示:

(3) pET-28a(+)-C3DC3DC3-EGFP, C3DC3DC3-EGFP融合蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO.9所示: 编码的氨基酸序列为SEQ ID NO.10所示。(见表1)

上述三种质粒的构建过程为本领域的常规操作,简要描述为:

(1)对已公开的SPG序列和EGFP序列进行分析,进行密码子优化,后进行全片段合成,克隆至PET-28a(+)-质粒上,转化至DH5a感受态菌中。测序验证正确做甘油菌保存。

[0027] (2)根据C3片段的基因序列,从含有C3片段的菌液中PCR扩增出C3、C3DC3、C3DC3DC3序列;

(3)通过PCR从含有EGFP序列的菌液中扩增出EGFP序列

(4)先将扩增出的EGFP序列经双酶切后连接到表达载体上,经鉴定后再分别将C3、C3DC3、C3DC3DC3片段连接上去,构建重组蛋白的原核表达质粒;

(5)将所述表达载体、共表达载体转入表达宿主中培养,活化至对数生长期后加入诱导蛋白蛋白;

(6)经破碎、纯化后制得融合蛋白C3-EGFP、C3DC3-EGFP、C3DC3DC3-EGFP。

[0028] 表1 重组C3-EGFP序列信息

缩写	全称	序列长度	编码氨基酸	分子量	等电点
1C3-EGFP	PET-28(a)-C3-EGFP	1029 bp	343 aa	37.7KDa	6.14
2C3-EGFP	PET-28(a)-C3DC3-EGFP	1239 bp	413 aa	45.4 KDa	5.9
3C3-EGFP	PET-28(a)-C3DC3DC3-EGFP	1455 bp	485 aa	53.3 KDa	5.76

### 1.3 重组质粒鉴定

对合成后的基因序列进行PCR反应,反应体系如下:

组分	所需用量 (μl)
TaKaRa Taq™ Hot Start Version	25
基因序列	2
上游引物 (10μM) (SEQ ID NO.1)	2
下游引物 (10μM) (SEQ ID NO.4)	2
ddH <sub>2</sub> O	19
Total	50

将各组分混匀后,短暂离心置于PCR仪中进行反应,反应参数如下:

温度	反应时间
94°C	3min
94°C	30s
56°C	30s 30 cycles
72°C	1min
72°C	10min
4°C	infinite

对PCR产物进行电泳鉴定;测序鉴定结果显示与设计的序列一致(图2)。C3-EGFP目的基

因全片段大小约为950bp。C3片段大小约为170bp,EGFP片段大小约为750bp。同时对PCR产物进行测序鉴定,测序鉴定结果显示与设计的序列一致。(C3片段对应上下游引物:SEQ ID NO.1、2;EGFP对应上下游引物:SEQ ID NO.3、4;全片段对应上下游引物:SEQ ID NO.1、4)。

## 实施例2重组蛋白的表达和纯化

### 2.1 重组质粒的表达

#### 时相

(1)将鉴定结果正确的pET-28a(+)-C3-RFP重组质粒分别转入BL21(DE3),并接种于5ml含Kan<sup>+</sup>的LB液体培养基中,置于37℃震荡培养箱中,250rpm震荡培养。

(2)当生长至对数期(OD<sub>600</sub>约为0.6时),加入终浓度为1mmol/L的IPTG进行诱导表达。在诱导表达前、诱导表达后1h、2h、4h、6h、8h分别取0.5ml菌液,应用SDS-PAGE电泳分析最佳诱导时间。(图3A,C,E)

#### 大量表达:

(1)将鉴定结果正确的pET-28a(+)-C3-RFP重组质粒分别转入BL21(DE3),并接种于150ml含Kan<sup>+</sup>的LB液体培养基中,置于37℃震荡培养箱中,250rpm震荡培养。

[0029] (2)当生长至对数期(OD<sub>600</sub>约为0.6时),加入终浓度为1mmol/L的IPTG进行诱导表达。将诱导8h后的菌液12000rpm离心20min弃上清,沉淀用20ml 1×PBS重悬,反复冻融三次后,冰浴超声破碎20min(超2s隔9s)后12000rpm离心15min,收集沉淀和上清。

[0030] (4)将离心后的沉淀用5ml 8mol 尿素重悬,重复上述离心步骤,收集上清。

[0031] (5)将超声后上清、沉淀重悬后上清,分别加入等体积蛋白电泳缓冲液,用SDS-PAGE电泳分析表达产物的可溶性。(图3B,D,F)

### 2.2重组蛋白的纯化

使用Ni-NTA Hisbind Resin对重组蛋白进行纯化(Ni-NTA序列号:70666-3),按照试剂盒说明书进行操作,简易操作步骤如下:

(1)取5ml树脂加入新空柱中静置平衡,当液面降到树脂表面时,依次加入15ml ddH<sub>2</sub>O,25ml 1×Charge Buffer,15ml 1×Binding Buffer溶液洗涤。

[0032] (2)当液面降到树脂表面时,加入超声破碎后的上清溶液,并重复上样3次,收集过柱后的溶液。

[0033] (3)依次加入50ml 1×Binding Buffer和30ml 1×Wash Buffer洗涤,分别收集过柱后的溶液。

[0034] (4)加入20ml 1×Stripe Buffer洗去Ni离子,收集过柱后的溶液。

[0035] (5)加入适量1×Stripe Buffer,保存树脂。

[0036] (6)将上述收集的溶液进行SDS-PAGE电泳,分析蛋白纯化情况。

[0037] SDS-PAGE分析显示(图3),重组质粒pET-28a(+)-C3-EGFP在大肠杆菌BL21(DE3)中成功表达,且1mmol/L IPTG诱导后1-6h表达量随着时间的增长而增加,诱导6h后表达量达到最高并趋于稳定。三种蛋白在超声上清和沉淀中都有所表达,沉淀中的蛋白含量高于上清中的蛋白含量,表示该蛋白具有一定的水溶性,包涵体也同时存在。上样前后可以确认到蛋白挂柱,Binding和Wash buffer步骤都洗脱大量杂蛋白,最终在Strip Buffer剥离后得到纯化后的蛋白。

[0038] 实施例3 C3-RFP重组蛋白活性鉴定

### 3.1 荧光光谱观察

纯化的重组蛋白配制不同浓度,用荧光分光光度计扫描重组蛋白的激发光谱(图4A),获得重组蛋白的最大激发波长;用最大激发光波长获得重组蛋白的发射光谱(图4B)。观察三种重组蛋白荧光强度的高低。从下图可见三种重组蛋白荧光强度均高于标准品EGFP,其中C3-EGFP荧光强度最强,C3DC3-EGFP次之,C3DC3DC3-EGFP最弱,这可能与重组蛋白C3区和EGFP片段大小有关,C3-EGFP中C3片段仅为EGFP片段的三分之一,导致两片段表达的蛋白质在结构上互相干扰较少,随着C3数量的增加,表达的蛋白质的C3功能区和EGFP功能区互相之间有所折叠导致EGFP荧光强度减弱。

### [0039] 3.2 Western blotting检测重组蛋白与IgG的结合活性

- (1) 将纯化后的蛋白进行SDS-PAGE电泳,之后将蛋白转移至NC膜上,130mA,75min。
- [0040] (2) 将NC膜浸泡于PBST稀释的5%脱脂奶粉中,室温封闭2h。
- [0041] (3) 将封闭后的NC膜用PBST洗涤三次,每次5min。
- [0042] (4) 将NC膜用HRP标记的不同物种IgG(用PBST 1:2000稀释)作为抗体,室温孵育1h。
- [0043] (5) 将孵育后的NC膜用PBST洗涤三次,每次10min。
- [0044] (6) 将NC膜用DAB双组份显色液试剂盒进行显色,显色后用流水冲洗,终止反应。
- [0045] 结果显示,三种重组蛋白均具有与驴,鼠,兔,羊IgG的结合能力(图5)

### 3.3 ELISA法测定重组蛋白与不同物种IgG亲和常数

- (1) 用BCA法测定重组蛋白的浓度,并用商品化的标准蛋白G(SPG)作为对照。
- [0046] (2) 用包被液将蛋白从10 $\mu$ g/ml开始进行倍比稀释,共进行8个稀释度,以100 $\mu$ l每孔包被于96孔板上,每个浓度设置3个重复,4 $^{\circ}$ C包被过夜。
- [0047] (3) 将96孔板用PBST洗涤三次,200 $\mu$ l每孔,每次5min。
- [0048] (4) 加入用PBST稀释的5%脱脂奶粉的溶液,150 $\mu$ l每孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h。
- [0049] (5) 将96孔板用PBST洗涤三次,200 $\mu$ l每孔,每次5min。
- [0050] (6) 将HRP标记的山羊抗鼠、兔抗山羊、小鼠抗兔、驴抗山羊这四种二抗,分别用PBST按1:500、1:1000、1:2000、1:4000进行倍比稀释,100 $\mu$ l每孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h。
- [0051] (7) 将96孔板用PBST洗涤三次,200 $\mu$ l每孔,每次5min。
- [0052] (8) 加入TMB进行显色,100 $\mu$ l每孔,室温反应15min。
- [0053] (9) 加入2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,30 $\mu$ l每孔,读取OD450值。
- [0054] 将透析后的三种重组蛋白分别测定浓度,用不同的浓度分别包被96孔板作为抗原,之后将倍比稀释的二抗加入平板中,与抗原结合。以OD450值作为纵坐标,以抗原浓度的对数值作为横坐标,进行曲线拟合,亲和曲线如图6所示。
- [0055] 根据拟合的曲线,代入相应的公式中,分别计算亲和常数K<sub>a</sub>,将得到的K<sub>a</sub>值取其平均数,获得了三种重组蛋白的亲和常数值,结果见表2。

[0056] 表2 三种重组蛋白的亲和常数

	C3-EGFP	C3DC3-EGFP	C3DC3DC3-EGFP
山羊	1.0 $\times 10^8$	1.8 $\times 10^8$	1.9 $\times 10^8$
驴	3.8 $\times 10^7$	1.2 $\times 10^8$	1.3 $\times 10^8$
小鼠	2.6 $\times 10^7$	6.0 $\times 10^7$	1.2 $\times 10^8$

兔	$3.2 \times 10^7$	$9.2 \times 10^7$	$1.3 \times 10^8$
---	-------------------	-------------------	-------------------

结果显示三种蛋白与不同物种的亲合活性分别与C3区的个数呈正相关关系。三种蛋白与不同物种的IgG亲合活性也不都一样,与山羊的亲合活性最高,其次分别是驴、小鼠和兔子。

[0057] 实施例4活体毛蚴的荧光染色观察

检验方法:

(1) 日本血吸虫毛蚴经孵化后,收集含毛蚴的液体于1.5ml EP管中,经离心后弃掉大部分液体

(2) 加入日本血吸虫阳性血清至稀释度为1:20,同时加入重组蛋白至终浓度为0.1mg/ml,37℃孵育2h。

[0058] (3) 2000rpm离心1min,弃大部分上清,加入ddH<sub>2</sub>O至原体积,2000rpm,1min,弃大部分上清,重复两次;

(4) 将洗涤后的含有毛蚴的ddH<sub>2</sub>O吸取10ul于载玻片上,盖上盖玻片,荧光显微镜下,分别自然光下、绿色荧光激发波长下观察毛蚴是否有绿色荧光染色。结果如图7所示。

[0059] 结果显示本实验将SPG基因与EGFP基因片段进行重构。保留SPG中能与抗体IgG的Fc端特异性相结合的C3区,然后连接EGFP基因片段,构建rSPG-EGFP重组蛋白的原核表达质粒构建的原核表达质粒成功表达了重组蛋白。该重组蛋白同时具有SPG与不同物种IgG结合的能力以及EGFP发射荧光的功能,是一种新型的双功能重组蛋白。

[0060] 应当理解,虽然上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明内容作了详尽的描述,但在本发明的基础上,可以对之进行一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范畴。

<110> 中国农业科学院上海兽医研究所(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

<120>一种具有绿色荧光活性的多物种通用检测蛋白及其应用

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> C区上游引物

<400>CGCGGATCCACCTACAAAC

<210>2

<211> 16

<212> DNA

<213> C区下游引物

<400>CCGGAATTCGCTACCG

<210>3

<211> 19

<212> DNA

<213> EGFP区上游引物

<400>CCGGAATTCGTGAGTAAAG

<210>4

<211> 25

<212> DNA

<213> EGFP区下游引物

<400>GGCCTCGAGGGCTAGCTCTTATTTG

<210>5

<211>1030

<212> DNA

<213> 重组蛋白1C3-EGFP的核苷酸序列

<400>ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTA  
GCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCACTTACAAACTGGTTATTAATGGTAAAACCTTGAAAGGCGAA  
ACAACACTAAAGCAGTAGACGCAGAAACTGCACAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTTGATGG  
TGTTTGGACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTAGGGTAACTGAAGGCGGTGGGGGCTCAGGAGGTGGGGGCTCAG  
AATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC  
CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC  
CGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG  
ACCACATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAG  
GACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG  
CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCA

TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC  
 GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGTCTGCTGCCCACAACCACTACCTGAGCACCCA  
 GTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCA  
 CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGGCC

<210>6

<211>344

<212>protein

<213> 重组蛋白1C3-EGFP的蛋白序列

<400>MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRRGSTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAQKAFKQY  
 ANDNGVDGVWTYDDATKTFRVTEGGGSGGGGSEFVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK  
 LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD  
 TLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPV  
 LLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDLYK-LEA

<210>7

<211>1239

<212> DNA

<213> 重组蛋白C3DC3-EGFP的核苷酸序列

<400>ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGGCAGCCATATGGCTA  
 GCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCACTTACAAACTGGTTATTAATGGTAAAACCTTGAAAGCGAA  
 ACAACTACTAAAGCAGTAGACGCAGAACTGCACAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGATGG  
 TGTTTGGACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTAGGGTAACTGAAAAACCAGAAGTGATCGATGCGTCTGAATTA  
 CACCAGCCGTGACAACCTTACAAACTGGTTATTAATGGTAAAACCTTGAAAGGCGAAACAACCTACTAAAGCAGTAGAC  
 GCAGAACTGCACAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGATGGTGTGGACTTATGATGATGC  
 GACTAAGACCTTTAGGGTAACTGAAGGCGGTGGGGGCTCAGGAGGTGGGGGCTCAGAATTCGTGAGCAAGGGCGAGG  
 AGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGC  
 GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTG  
 GCCCACCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACT  
 TCTTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC  
 CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG  
 CAACATCCTGGGGACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG  
 GCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC  
 ACCCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGCTGCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC  
 CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGT  
 ACAAGTAAGAGCTAGCC

<210>8

<211>413

<212> protein

<213> 重组蛋白C3DC3-EGFP的氨基酸序列

<400>MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAQKAFKQYA

NDNGVDGVWVWYDDATKTFRVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAQKAFKQYANDNGVD  
 GVWVWYDDATKTFRVTEGGGGSGGGGSEFVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFIC  
 TTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIE  
 LKGI DFKE DGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY  
 LSTQSALS KDPNEKRDMVLL EFTVTAAGITLGMDELYK-ELA

<210>9

<211>1455

<212> DNA

<213> 重组蛋白C3DC3DC3-EGFP的核苷酸序列

<400>ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGCAGCCATATGGCTA  
 GCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCCACTTACAACTTGTATTATAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAA  
 ACAACTACTAAAGCAGTAGACGCAGAACTGCACAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGATGG  
 TGTTTGGACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTAGGGTAACTGAAGGCAAACCAGAAGTGATCGATGCGTCTGAAT  
 TAACACCAGCCGTGACAACTTACAACTTGTATTATAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAACA ACTACTAAAGCAGTA  
 GACGCAGAACTGCACAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGATGGTGTGTTGGACTTATGATGA  
 TGCGACTAAGACCTTTAGGGTAACTGAAGGCAAACCAGAAGTGATCGATGCGTCTGAATTAACACCAGCCGTGACAA  
 CTTACAACTTGTATTATAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAACA ACTACTAAAGCAGTAGACGCAGAACTGCACAA  
 AAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGATGGTGTGTTGGACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTAG  
 GGTA ACTGAAGGCGGTGGGGGCTCAGGAGGTGGGGGCTCAGAATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGG  
 TGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT  
 GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGAC  
 CACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCA  
 TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG  
 TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA  
 CAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA ACT  
 TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC  
 GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA  
 TCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGG  
 CC

<210>10

<211>485

<212> protein

<213> 重组蛋白C3DC3DC3-EGFP的氨基酸序列

<400>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAQKAFKQYA  
 NDNGVDGVWVWYDDATKTFRVTEGKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAQKAFKQYANDNGV  
 DGVWVWYDDATKTFRVTEGKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAQKAFKQYANDNGVDGVWV  
 YDDATKTFRVTEGGGGSGGGGSEFVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGK  
 LPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI  
 DFKE DGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQ

SALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK-LEA

<210>11

<211>164

<212> DNA

<213> C3序列

<400>ACT TAC AAA CTT GTT ATT AAT GGT AAA ACATTG AAA GC GAA ACA ACT ACT  
AAA GCA GTA GAC GCA GAA ACT GCA GAA AAA GCC TTC AAA CAA TAC GCT AAC GAC AAC  
GGT GTT GAT GGT GTT TGG ACT TAT GAT GAT GCG ACT AAG ACC TTT ACG GTA ACT GAA

<210>12

<211>45

<212> DNA

<213> D序列:

<400>AAA CCA GAA GTG ATC GAT GCG TCT GAA TTAACA CCA GCC GTG ACA

<210>13

<211>30

<212> DNA

<213> Linker序列

<400>GGC GGT GGG GGC TCA GGA GGT GGG GGC TCA

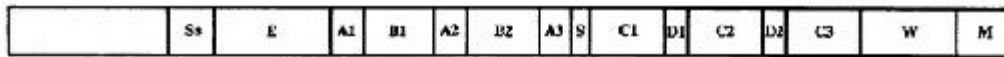
<210>14

<211>714

<212> DNA

<213> EGFP序列

<400> GTG AGT AAA GGC GAG GAG CTG TTT ACC GGT GTT GTG CCG ATT CTG GTT GAG  
CTG GAT GGC GAT GTG AAT GGC CAC AAG TTC AGC GTG AGC GGT GAG GGT GAA GGC GAT  
GCA ACC TAT GGC AAG CTG ACT TTA AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGT AAA CTG CCC GTT  
CCG TGG CCG ACT TTA GTT ACC ACT TTA ACC TAT GGC GTT CAG TGT TTC AGC CGC TAC  
CCG GAT CAT ATG AAA CAG CAT GAT TTT TTC AAG AGC GCC ATG CCG GAA GGC TAC GTG  
CAA GAA CGC ACC ATC TTT TTC AAG GAT GAT GGC AAC TAT AAA ACC CGC GCC GAA GTG  
AAG TTC GAA GGC GAC ACT TTA GTG AAC CGC ATT GAG CTG AAA GGC ATC GAC TTC AAA  
GAA GAT GGC AAT ATT TTA GGC CAT AAG CTG GAA TAT AAC TAC AAT AGC CAT AAT GTG  
TAT ATT ATG GCC GAC AAA CAG AAA AAT GGT ATT AAA GTG AAT TTT AAA ATT CGC CAC  
AAT ATT GAA GAT GGC AGC GTG CAG CTG GCC GAT CAC TAC CAG CAG AAT ACC CCG ATT  
GGT GAT GGT CCG GTG CTG CTG CCG GAT AAT CAC TAT CTG AGC ACC CAG AGC GCT TTA  
AGC AAA GAT CCT AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTG CTG CTG GAG TTC GTT ACC GCA  
GCC GGC ATT ACT TTA GGC ATG GAT GAA CTG TAC AAA TAA GAG CTA GCC



A

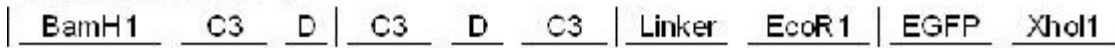
C3-EGFP:



C3DC3-EGFP: :



:C3DC3DC3-EGFP:



B

图1

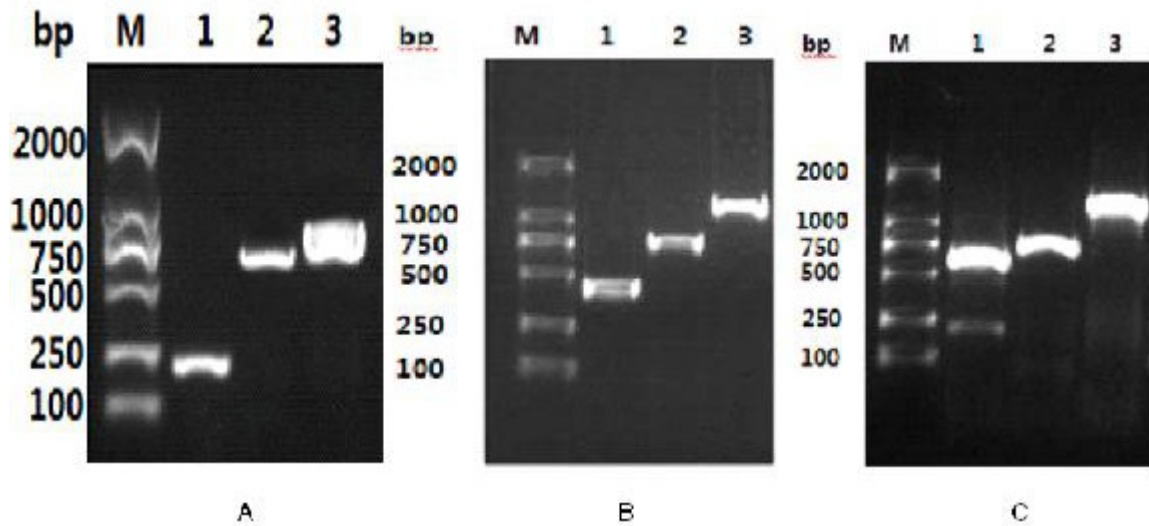


图2

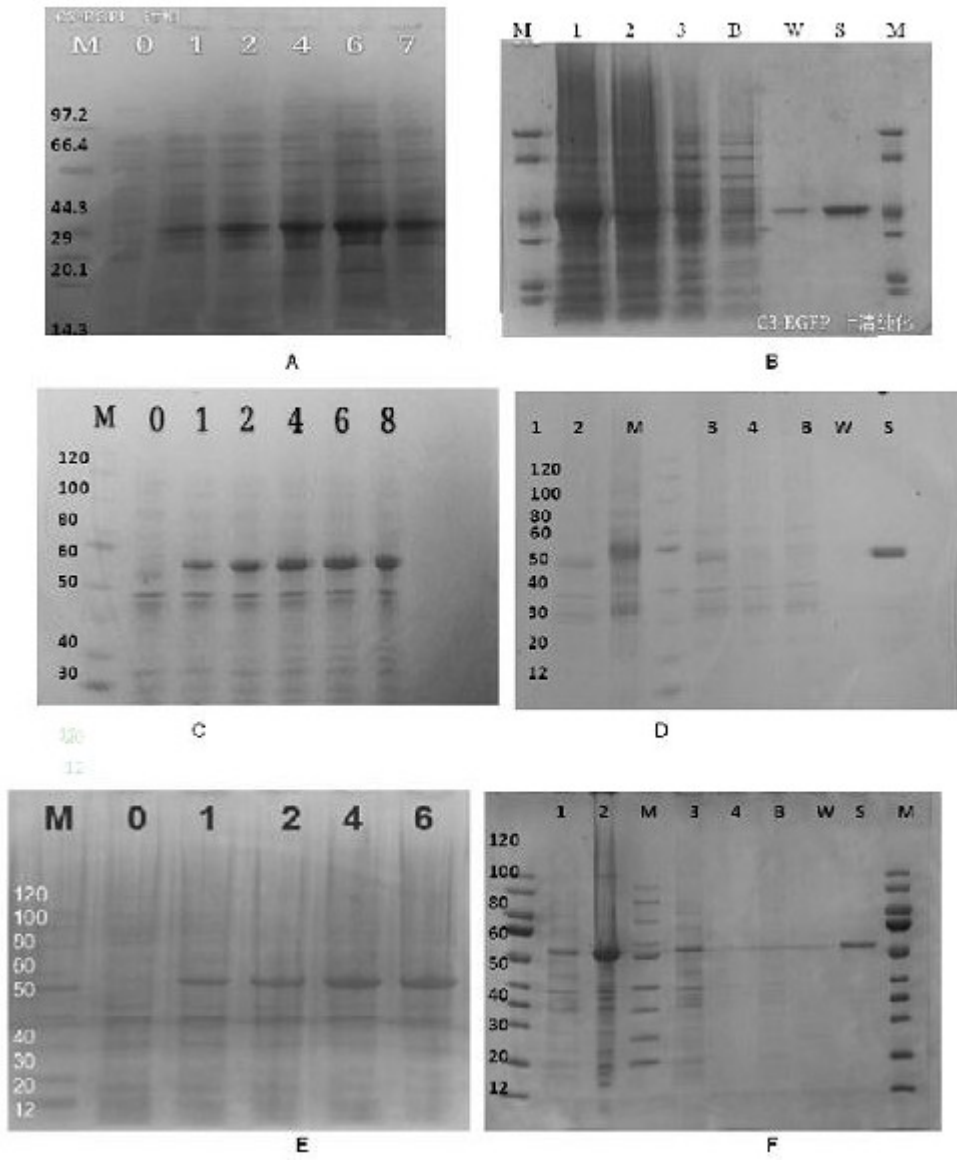
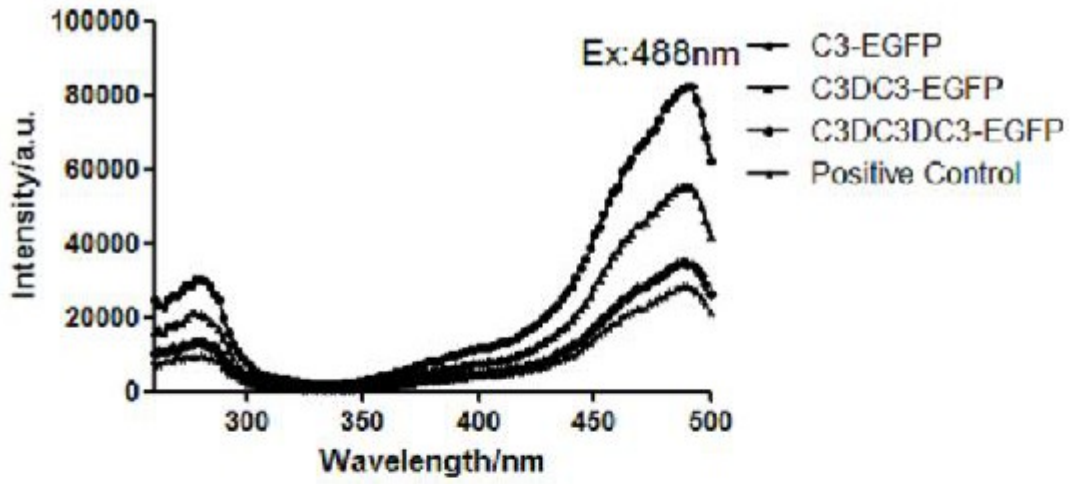
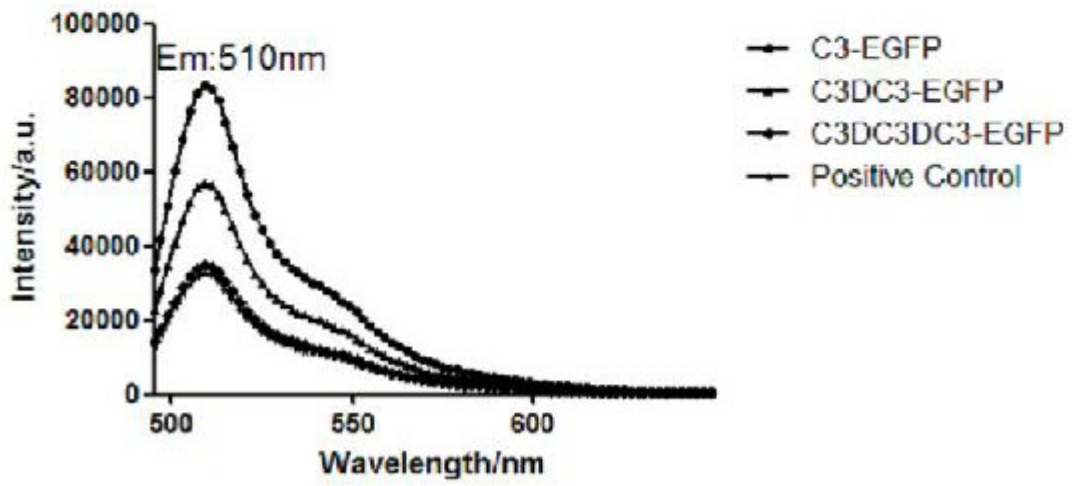


图3



A



B

图4

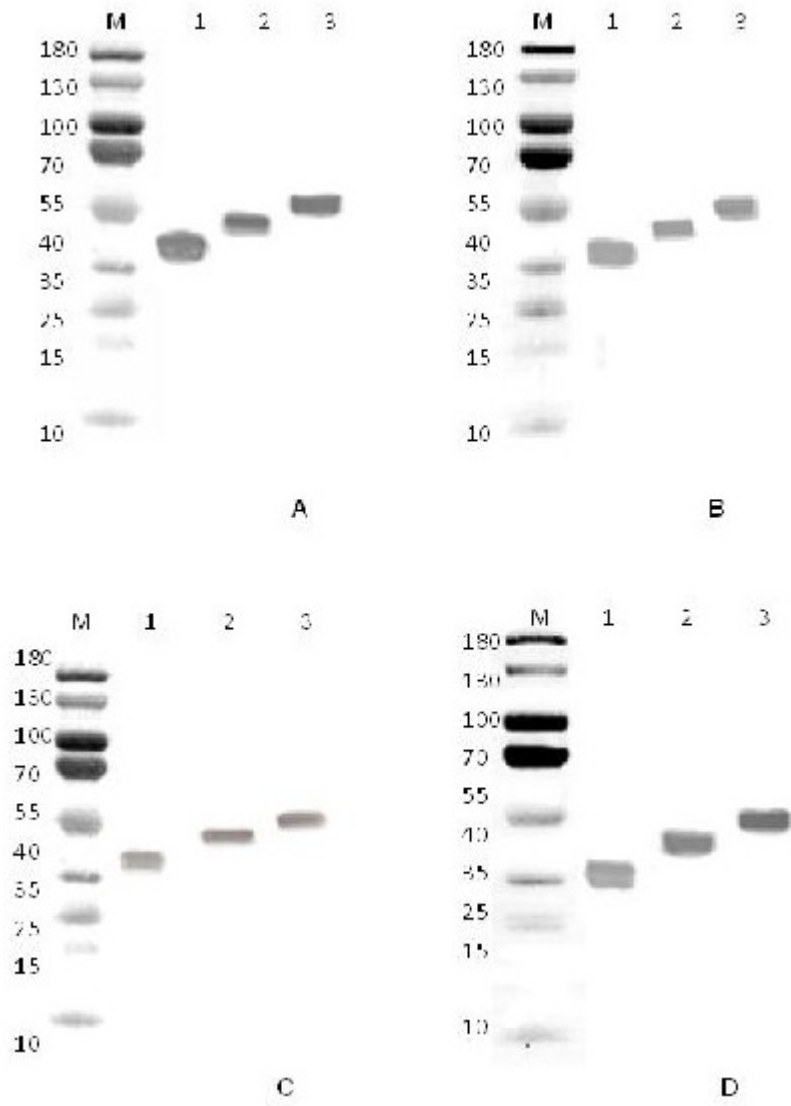


图5

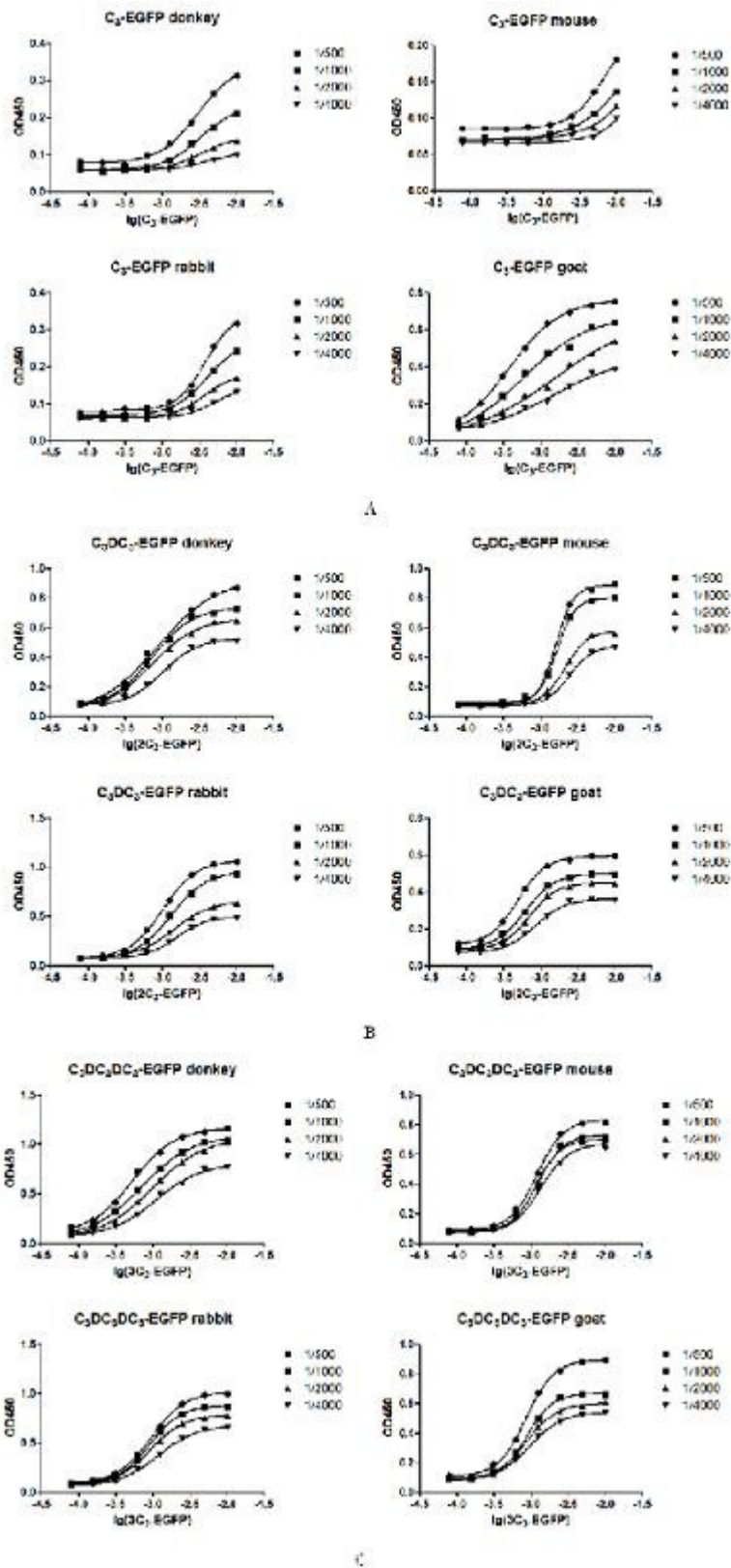
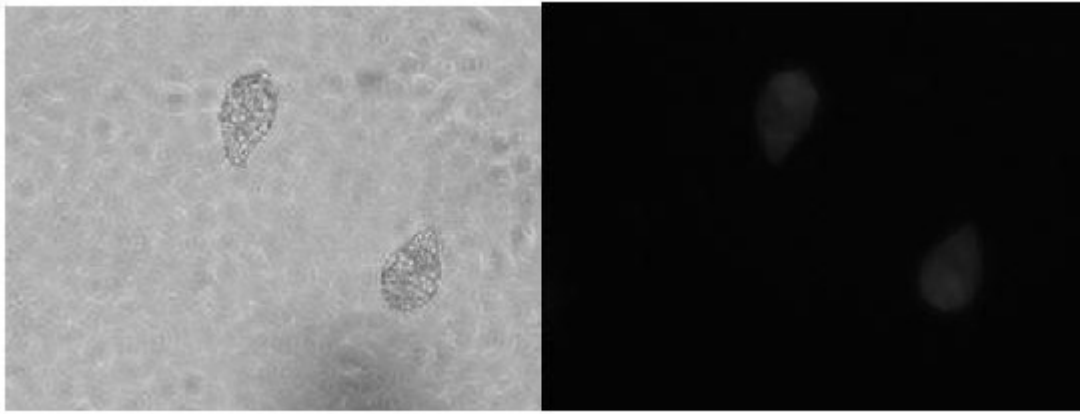


图6



A

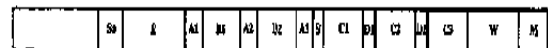
B

图7

专利名称(译)	一种具有绿色荧光活性的多物种通用检测蛋白及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110615844A</a>	公开(公告)日	2019-12-27
申请号	CN201910792298.7	申请日	2019-08-26
[标]发明人	朱传刚 沈元曦 林矫矫 洪炆		
发明人	朱传刚 纪荣毅 沈元曦 林矫矫 洪炆 岳永程		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/70 G01N33/533 C12R1/19		
CPC分类号	C07K14/315 C07K2319/60 C12N15/70 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

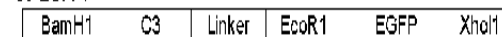
摘要(译)

本发明提供一种具有绿色荧光活性的多物种通用检测蛋白及其应用，其特征在于所述检测蛋白包括链球菌蛋白G (SPG) 片段和荧光蛋白，将SPG基因的IgG结合片段进行重构，只保留蛋白G能与抗体IgG的Fc端特异性相结合的C3区，并将其分为三组，C3、C3-D-C3、C3-D-C3-D-C3，并都连接EGFP，制备的重组蛋白具有荧光活性与与不同物种抗体结合的双重活性。本发明公开的进化免疫球蛋白结合分子，其可以广谱结合包括人及多种动物总IgG及不同亚类的IgG，与现有技术中的免疫球蛋白结合分子相比，它结合力也比现有的免疫球蛋白结合分子高。



A

C3-EGFP:



C3DC3-EGFP:



:C3DC3DC3-EGFP:



B