



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102140129 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 23

(21) 申请号 201010105298. 4

Genbank. accession No: xp_001234636.

(22) 申请日 2010. 02. 03

《NCBI》. 2006, 全序列.

(73) 专利权人 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

审查员 劳芳

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 关伟军 马月辉 郑扬 侯玲玲
何晓红 浦亚斌 白春雨 冯宝刚
王会

(74) 专利代理机构 北京市隆安律师事务所
11323

代理人 权鲜枝

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101413012 A, 2009. 04. 22, 全文.

CN 101573445 A, 2009. 11. 04, 全文.

王廷华 等. 免疫程序. 《抗体理论与技术》. 科学出版社, 2005, 84 — 88.

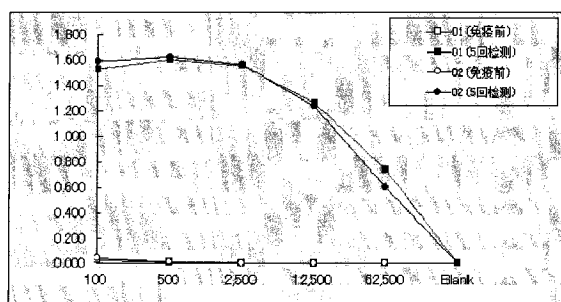
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

鸡 pdx1 多克隆抗体及应用

(57) 摘要

本发明的一个目的是提供抗鸡 pdx1 多克隆抗体,其是通过免疫原序列引起的,能与鸡胰腺干细胞表面分子特异结合,用鸡 pdx1 多克隆抗体通过免疫印迹法检测提取的鸡胰腺干细胞蛋白,可获得单一的特异性阳性条带。通过免疫组化检测,鸡胰腺干细胞表现特异性阳性荧光。



1. 免疫原多肽,其选自:
CVVSSGKLQGKEDLQP (SEQ ID NO:1)。

鸡 pdx1 多克隆抗体及应用

技术领域

[0001] 本发明属生物技术领域,涉及抗鸡 pdx1 多克隆抗体的制备及应用,本发明还涉及制备抗鸡 pdx1 多克隆抗体的免疫原序列。

背景技术

[0002] 抗原上可以引起机体产生抗体的分子结构为抗原决定簇,一个抗原上可以有若干个不同的抗原决定簇使机体产生不同的抗体,最终产生出抗体是浆细胞。只针对一个抗原决定簇起作用的浆细胞群就是一个纯系,即克隆(纯系的英文为 Clone)。单克隆抗体(Monoclonal antibody)是指由一种抗原决定簇刺激机体,由一个 B 淋巴细胞接受该抗原所产生的抗体。由多种抗原决定簇刺激机体,相应地就产生各种各样的单克隆抗体,这些单克隆抗体混杂在一起就是多克隆抗体,机体内所产生的抗体就是多克隆抗体;除了抗原决定簇的多样性以外,同样一类抗原决定簇,也可刺激机体产生 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD 等五类具有中和毒素和病毒、凝集和沉淀抗原、激活补体及通过特异的膜受体等功能的抗体。克隆抗体技术(Polyclonal antibodies preparation technique)是指抗原刺激机体,产生免疫学反应,由机体的浆细胞合成并分泌的与抗原有特异性结合能力的一组球蛋白,这就是免疫球蛋白,这种与抗原有特异性结合能力的免疫球蛋白就是抗体。

[0003] Pdx1(pancreatic duodenal homeobox 1) 又称胰岛素启动子 1、胰岛素上游因子 1、葡萄糖敏感因子 1 或胰岛-十二指肠同源域蛋白,是一种器官同源结构域蛋白,在胰腺的发育中起着重要作用,是 β 细胞形成和成熟的标志。人类 pdx1 基因全长约 6kb,包含 2 个外显子,其编码区由 283 个氨基酸组成,相对分子质量是 3.1×10^4 。外显子 1 编码 pdx1 的氨基端区域,外显子 2 编码同源域及羧基端区域,在多种物种间高度保守。人类、小鼠、大鼠基因分别定位在 13 号、5 号及 12 号染色体上。Pdx1 的转录活化区域在氨基末端,同源结合域区参与 DNA 结合从而激活其转录;二者共同参与蛋白质间相互作用发挥协同转录作用。Pdx1 基因无 TATA 框,它具有 3 个转录起始位点,后面伴随一个短的 5' 非翻译区,约 100 个核苷酸,为 pdx1 启动子区。

[0004] Pdx1 蛋白结构由多个功能区构成。转录活化区(transactivation domain)存在于氨基末端,包括 1~77 个氨基酸(aa),由 A、B、C 三个高度保守的亚区组成(A:13~22aa; B:32~38aa; C:60~73aa)。点突变分析证明转录活化区为激活胰岛素基因转录所必需。同源结合域区(HD)含有一个由 7 个氨基酸组成的核定位信号(nuclear localization signal, NLS),可能与葡萄糖或胰岛素诱导的 pdx1 蛋白磷酸化在细胞核和细胞浆之间穿梭有关,是 pdx1 发挥转录因子作用的区域。Pdx1 通过 HD 区与其调控的基因启动子 DNA 结合,而激活其转录。HD 区还可以与其他转录因子通过蛋白-蛋白相互作用发挥协同转录激活作用。富含脯氨酸区位于 HD 区两侧,其 Antenna-type 六肽(PEPWMK)可能参与生长抑素(somatostatin, SST)的转录调控。

[0005] Pdx1 基因 5' 非翻译区 6.5kb 区域构成 pdx1 基因调控区。-190~-95bp 区为 pdx1 启动子区,含有 3 个同源 E-box,为转录因子 USF 作用位点。另外,在 -6200~-5670bp

区有一个类似于胰岛素启动子的 E2box, 为 HNF-3 β 、BETA2/NeuroD(β cell E-box transactivator-2) 与 E47 以异聚体形式结合的位点。通常这些 E-box 特异存在于胰岛细胞中。此外, 在 -2.5kb ~ -3.5kb 区域为 HNF-1 α 、HNF3 β 与 pdx1 或 SP1/3 形成三聚体结合于 PDX21 的位点, 最近证明 -2.8kb ~ -1.7kb 区域在人类与小鼠中具有很高的同源保守序列, 称为 PH 区 (PDX1homelyregion)。克隆抗体问世后取得了辉煌的成就, 如应用白喉外毒素单克隆抗体治疗白喉棒状杆菌; 应用抗内毒素类脂 A 的单克隆抗体治疗 G $\sim$ 菌败血症等, 该项技术也因此获得了 1984 年的诺贝尔医学奖, 发展至今, 已出现抗人、大鼠、小鼠及兔的 pdx1 多克隆抗体, 应用于胰腺干细胞等细胞的鉴定。根据申请人所进行的文献检索, 目前尚未发现有抗鸡的 pdx1 多克隆抗体的相关文献报道。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供抗鸡 pdx1 多克隆抗体, 其是通过免疫原序列引起的, 能与鸡胰腺干细胞表面分子特异结合, 用鸡 pdx1 多克隆抗体通过免疫印迹法检测提取的鸡胰腺干细胞蛋白, 可获得单一的特异性阳性条带。通过免疫组化检测, 鸡胰腺干细胞表现特异性阳性荧光。

[0007] 本发明还涉及选择抗鸡 pdx1 多克隆抗体免疫原序列的方法, 所述方法包括:

[0008] (a) 从基因文库中查询鸡 pdx1 序列, 优选针对 GENBANK 上鸡 pdx1 序 Gene ID: 771348 进行,

[0009] (b) 选择综合评分高的部位, 所述综合评分高是指根据 2 级结构预测, 预测有重复性的结构, 以及可及性、机动性、概率面、抗原力、亲水性和偶极的值较高, 露在分子表面的概率较大;

[0010] (c) 针对鸡 pdx1 基因检索将所选择的部位的序列, 选择在所述 pdx1 基因中无其它相似序列的序列作为所述免疫原序列。

[0011] 本发明还涉及用于获得抗鸡 pdx1 多克隆抗体的免疫原序列, 其选自:

[0012] (a) CVVSSGKLQGKEDLQP (SEQ ID NO:1);

[0013] (b) 通过取代、缺失、和 / 或添加一个或几个氨基酸从 (a) 的序列衍生的序列, 其具有免疫原性;

[0014] (c) CDKKRG TANSADPEQD (SEQ ID NO:2);

[0015] (d) 通过取代、缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸从 (b) 的序列衍生的序列, 其具有免疫原性。

[0016] 优选地, 所述序列通过上述选择方法获得。

[0017] 此外, 本发明涉及上述免疫原序列在制备抗鸡 pdx1 多克隆抗体中的用途。

[0018] 还可以应用上述免疫原序列免疫动物 (优选为兔) 以获得抗 pdx1 多克隆抗体。

[0019] 本发明进一步涉及制备抗鸡 pdx1 多克隆抗体的方法以及由所述方法获得的 pdx1 多克隆抗体, 其包括:

[0020] (a) 用权利要求 1-3 中任一项所述的免疫原序列免疫动物, 优选免疫兔;

[0021] (b) 采血及 ELISA 检测抗体效价;

[0022] (c) 效价合格后采血并获得血清;

[0023] (d) 纯化血清以获得所述多克隆抗体。

[0024] 本发明的另一个目的是建立应用该多克隆抗体,通过免疫荧光染色、免疫印迹等技术检测胰腺干细胞的方法。

[0025] 用兔抗鸡 pdx1 多克隆抗体,通过免疫荧光法检测培养扩增的胰腺干细胞。

[0026] 用兔抗鸡 pdx1 多克隆抗体,通过免疫印迹法检测其相应抗原在培养扩增的胰腺干细胞中的表达。

附图说明

[0027] 图 1 :ELISA 实验步骤分别检测免疫前与免疫后抗体水平,检测 OD(450) 值峰图。

[0028] 图 2 :以兔抗鸡 pdx1 多克隆抗体,通过间接免疫荧光染色法检测鸡胰腺干细胞。A 为 1 : 500 稀释抗体检测相差图,B 为稀释抗体检测 pdx1 阳性胰腺干细胞,C 为 A 与 B 的叠加 ;

[0029] 图 3 :以兔抗鸡 pdx1 多克隆抗体,通过免疫印迹法检测鸡胰腺干细胞中相应抗原的表达。

[0030] 发明详述

[0031] 除非另有说明,本发明中所述的术语为本领域技术人员通常理解的含义,为了更好地说明本发明,现对一些重要术语进行具体描述。

[0032] 本文中所用的“多克隆抗体”是指来自于多个细胞克隆的抗体,是针对抗原物质上不同决定簇所产生抗体的混合物,主要存在于血清中。多克隆抗体可以通过用免疫原性物质免疫动物、提取并纯化血清获得(可以为多种动物,优选为哺乳动物,最优选为兔),也可以通过噬菌体库筛选。

[0033] 本文所用的术语“免疫原序列”为可以作为免疫原性物质的序列,其可以通过查询蛋白质数据库选择所要针对的序列(例如 Genebank ID 771348 所提供的基 pdx1 序列(NCBI 提供))并且评价其抗原综合评分来获得,最优选的免疫原序列是针对其所查询的蛋白质中的其它部分而言,没有与其相似的序列。

[0034] 本文所用的术语“抗原综合评分”(参考文献:曹谨玲,陈剑杰,俞菊华,等. 奥利亚罗非鱼 DMO 和 DMT 蛋白二级结构和 B 细胞抗原表位的预测 [J]. 中国生物工程杂志,2006, 26(7):19-24)是指对于免疫原性物质所评价的一种判断标准,其通常是根据二级结构预测,如果预测有重复性的结构以及可及性、柔性、表位获得性、抗原性、亲水性和极性的值较高,露在分子表面的概率较大的部位,则所述序列的抗原综合评分就高,反之则比较低。具体到 pdx1 蛋白质,针对所选择的抗原综合评分高的序列,可以进行检索(例如 BLAST),确认了在鸡蛋白质中无与候补序列相似的序列。根据抗原综合评分较高以及 BLAST 检索无相似序列、同源性低的部分进行选择。

[0035] 本发明所述的免疫原多肽优选为 (CVVSSGKLQ GKEDLQP (SEQ ID NO:1) 或 CDKKRG TANSADPEQD (SEQ ID NO:2), 以及其衍生物,所述衍生物是本领域技术人员众所周知的,通常与所述序列具有高于 80% 的同一性,通常为 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 乃至更高的同一性。所述衍生物可以通过在所述序列上取代、缺失、和 / 或添加一个或几个氨基酸而衍生的,且具有免疫原性,能够针对鸡 pdx1 基因免疫动物,从而获得抗鸡 pdx1 基因的多克隆抗体。

[0036] 本文所述的动词“免疫(动物)”通常是指通过体腔内注射、静脉注射及肌肉注射

等方式将免疫原性物质（例如上述免疫原序列所编码的多肽）接种到动物体内，使其针对这一种抗原物质产生抗体于血清中。

[0037] 本文所述的检测抗体效价可以通过本领域已知的各种方法进行，包括有试管凝集反应、琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验等。（参考文献：【1】Gupta A, Chaudhary VK. Whole-blood agglutination assay for on-site detection of human immunodeficiency virus infection[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 2814-2821. 【2】赵增连, 陈溥言, 林祥梅, 等. 一种敏感的禽流感病毒快速定型双扩散法 [J]. 中国兽医学报, 1997, 17(3): 291-308 【3】夏勇, 吴学诗, 张美英, 等. 夹心酶联免疫吸附试验检测人表皮生长因子的方法建立及其应用研究 [J] 实用医学杂志, 2005, 21(14): 1588-1590), 优选可以采血后通过 ELISA 检测抗体效价。

[0038] 本文所述的抗体的效价，是指抗体的物理状态及其在体内的滞留时间，以其与抗原反应的多少来表示其免疫效果，即 A 值高于生理盐水对照组值加 2 倍对照组标准差的最高稀释度。

[0039] 本文所述的体外检测鸡胰腺干细胞是指检测鸡胰腺干细胞中的 pdx1 蛋白质的表达以及对其分布进行定量，所述检测可以通过多种方法进行，例如免疫荧光技术、蛋白质组学、ELISA、Western blotting、免疫组化技术、Chip 及 EMSA 等，优选通过免疫荧光染色进行检测。

[0040] 胰腺干细胞的相关细胞是指可以分化为胚胎发育形成的胰腺干细胞、胰腺自身干细胞和其他成体组织分化的胰腺干细胞的总称。（参考文献：吴宁, 肖家诚, 金晓龙, 等. 胰腺干细胞 [J]. 国外医学·消化系疾病分册, 2004, 24(1): 15 ~ 17)

具体实施方式

[0041] 实施例 1：抗鸡 pdx1 多克隆抗体抗原肽合成及纯度等方面的检测

[0042] (1) 免疫原序列的选择

[0043] 通过 GENE BANK 上鸡 pdx1 序列的查询，Gene ID: 771348，对合成多肽序列进行分析，推荐出以下候选序列：

[0044] A: 216-231 CVVSSGKLQ GKEDLQP (抗原综合评分: 0.857)

[0045] B: 201-215 CDKKRG TANSADPEQD (抗原综合评分: 0.812)

[0046] C: 90-106 CHQDALPFADGADPGAME (抗原综合评分: 0.681)

[0047] 抗原选择综合评分高 A 序列，综合评分高的部位是根据二级结构预测，预测有重复性的结构以及可及性、柔性、表位获得性、抗原性、亲水性和极性的值较高，露在分子表面的概率较大的部位。通过对候补序列进行 BLAST 检索，确认了在鸡蛋白质中无与候补序列相似的序列。根据抗原综合评分较高以及 BLAST 检索无相似序列、同源性低的部分进行选择。

[0048] (2) 免疫动物

[0049] 采用 20 周龄以内，2.5-3Kg 的 SPF 新西兰大耳兔 2 只，从耳缘静脉采取 4ml 左右血液，用促凝剂促凝，3000 转离心 20 分钟取血清，为阴性血清；以 2mg 多肽连接同等质量 (2mg) KLH 为免疫原，每次每只免疫 0.1mg，20 点以上多点背部皮下免疫。

[0050] (3) 免疫流程

- [0051] 第 1 周 0.1mg 抗原混合同体积 Sigma 费氏完全佐剂进行免疫
- [0052] 第 2 周休息（给与应激缓冲时间）
- [0053] 第 3 周 0.1mg 抗原混合同体积 Sigma 费氏不完全佐剂进行免疫
- [0054] 第 4 周 0.1mg 抗原混合同体积 Sigma 费氏不完全佐剂进行免疫
- [0055] 第 5 周 0.1mg 抗原混合同体积 Sigma 费氏不完全佐剂进行免疫
- [0056] 第 6 周 0.1mg 抗原混合同体积 Sigma 费氏不完全佐剂进行免疫
- [0057] 第 7 周进行检测采血及 ELISA 检测，观察抗体效价。
- [0058] 0.1mg 抗原混合同体积 Sigma 费氏不完全佐剂进行免疫
- [0059] 第 8 周效价合格进行全采血（处死）
- [0060] 全采血从耳部及心脏采取 150ml 血液，用促凝剂促凝，3000 转离心 20 分钟取血清。
- [0061] (4) 抗原肽的合成与表型、合成后分子量及纯度检测
- [0062] 首先根据第一条候选序列利用多肽合成仪合成多肽，然后进行 N-Biotinylation 修饰，最后进行纯化和鉴定。鉴定结果如下：
- [0063] 样品信息
- [0064] 肽序列 CVVSS GKLQG KEDLQ P
- [0065] 分子量（理论值） 1687.94
- [0066] 合成量（mg） 20mg
- [0067] 检测内容 结果
- [0068] 表型 冻干粉
- [0069] 分子量（by MS, M+H⁺） 1688.61（附原始数据）
- [0070] 分子量（by MS, M+Na⁺）
- [0071] 分子量（by MS, M+K⁺）
- [0072] 纯度（HPLC 纯化） 96%（HPLC, 220nm, C18, 线性梯度）
- [0073] （附原始数据）
- [0074] (5) ELISA 检测鸡 pdx1 多克隆抗体水平
- [0075] 按 ELISA 实验步骤分别检测免疫前与免疫后抗体水平，检测 OD(450) 值如下：
- [0076]

稀释倍数	100	500	2,500	12,500	62,500	Blank
01（免疫前血清）	0.029	0.012	0.006	0.005	0.004	0.005
01（5 次免疫后血清）	1.522	1.600	1.552	1.262	0.737	0.005
02（免疫前血清）	0.043	0.014	0.007	0.005	0.004	0.004
02（5 次免疫后血清）	1.584	1.624	1.560	1.234	0.600	0.005

[0077] (6) 免疫荧光法检测鸡 pdx1 多克隆抗体表达

[0078] 采用体外培养的鸡胰腺干细胞作为实验对象, 分别设空白对照组 (PBS 代替血清)、阴性血清组 (免疫前血清)、阳性血清组 (五次免疫后血清), 使用中杉金桥羊抗兔二抗 (Zf-0311), 按免疫组化实验步骤进行检测胰腺干细胞相应抗原的表达, 结果显示大于 95% 的细胞呈阳性。

[0079] (7) 免疫印迹法检测鸡 pdx1 多克隆抗体表达

[0080] 提取体外培养的鸡胰腺干细胞总蛋白, 用鸡 pdx1 多克隆抗体通过常规蛋白免疫印迹法检测相应抗原的表达, 可见一特异性的阳性条带。通过免疫印迹法的方法可以进一步研究鸡 pdx1 多克隆抗体的相应抗原在鸡胰腺干细胞中的表达, 以及该抗原的生物学特性。

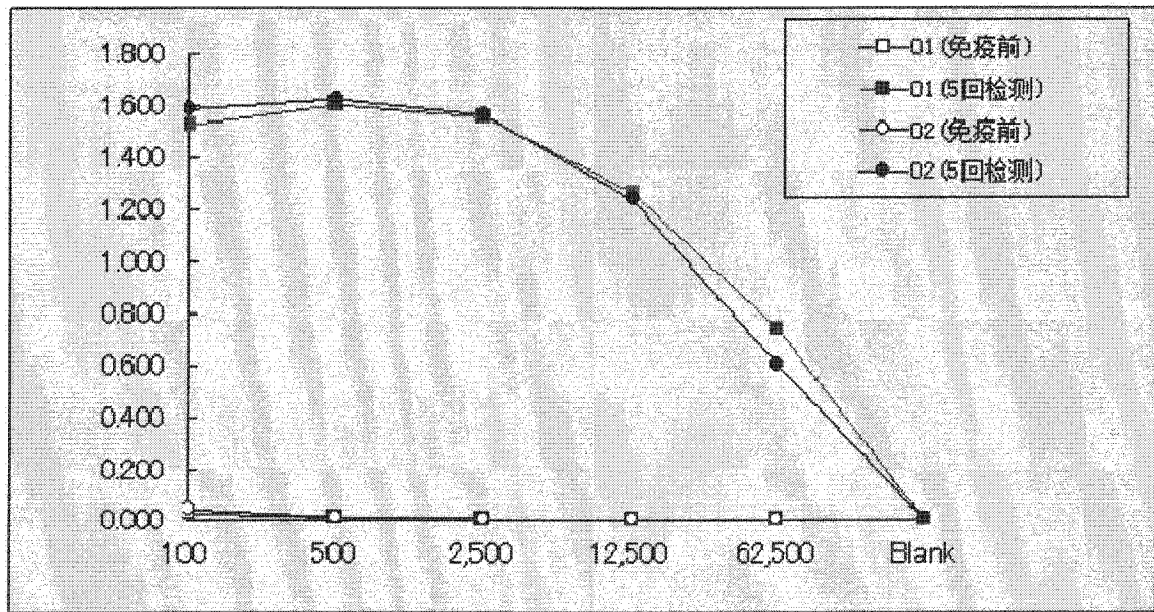
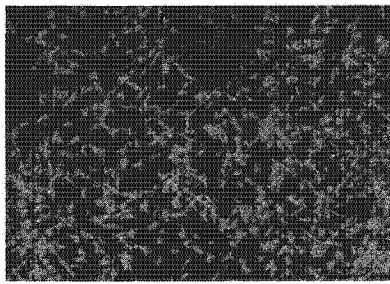
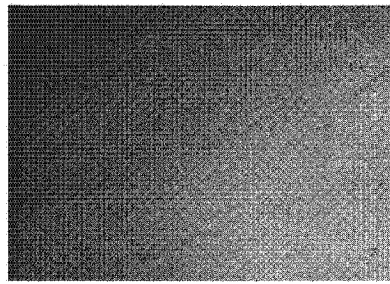


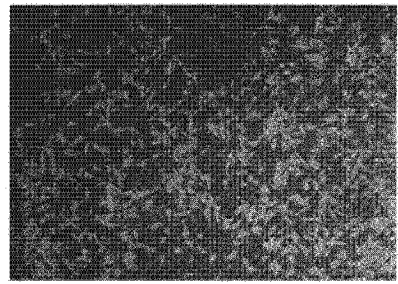
图 1



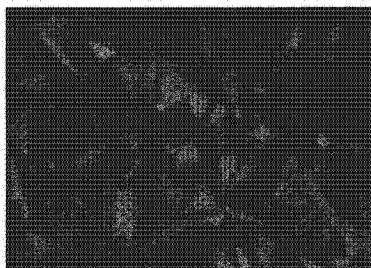
A1



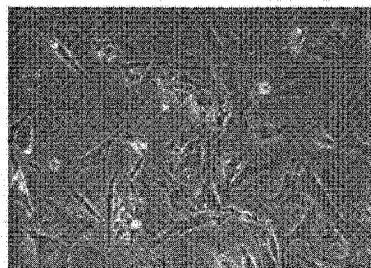
A2



A3



B1



B2



B3

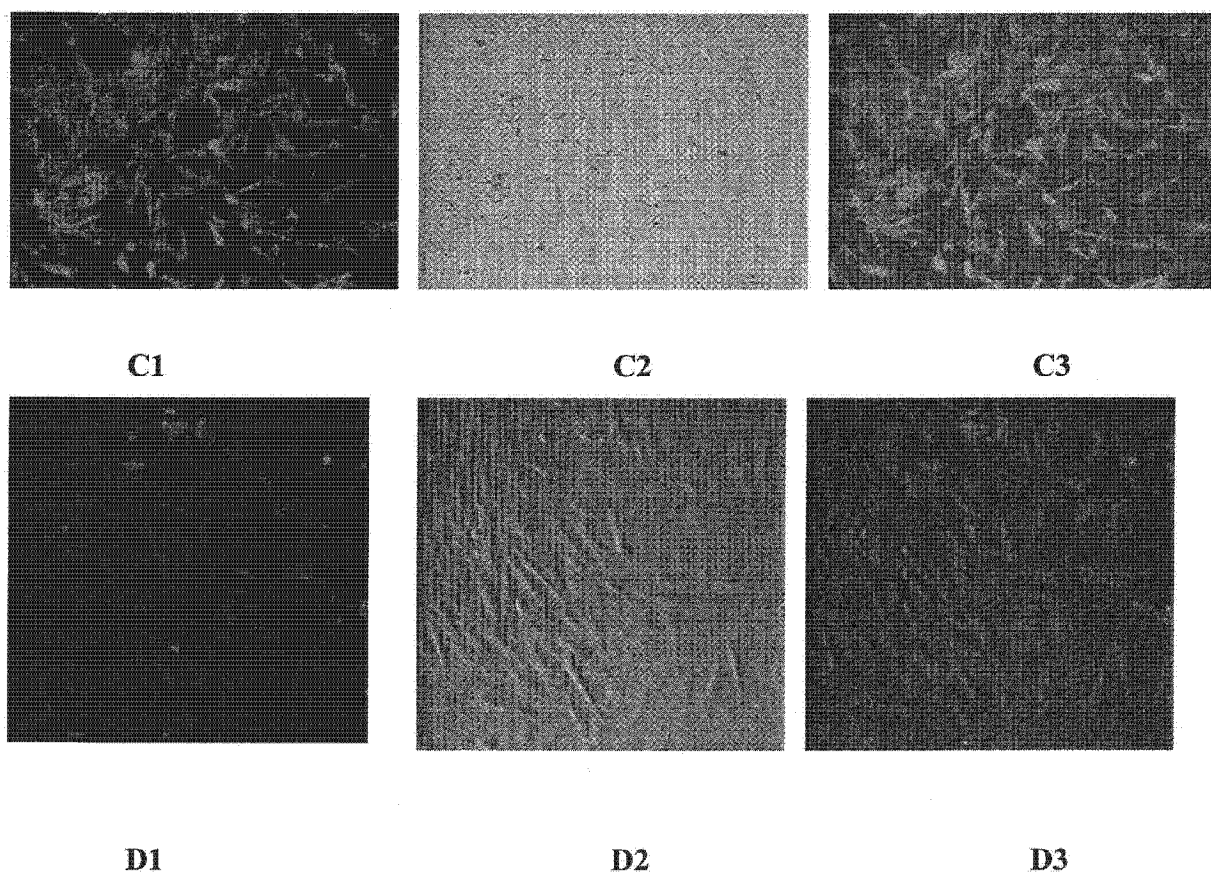


图 2

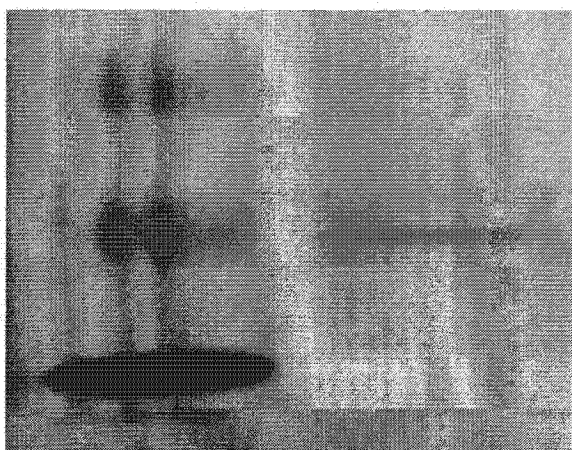


图 3

专利名称(译)	鸡pdx1多克隆抗体及应用		
公开(公告)号	CN102140129B	公开(公告)日	2014-04-23
申请号	CN201010105298.4	申请日	2010-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所		
[标]发明人	关伟军 马月辉 郑扬 侯玲玲 何晓红 浦亚斌 白春雨 冯宝刚 王会		
发明人	关伟军 马月辉 郑扬 侯玲玲 何晓红 浦亚斌 白春雨 冯宝刚 王会		
IPC分类号	C07K7/08 C07K16/18 C07K16/06 G01N33/53		
其他公开文献	CN102140129A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供抗鸡pdx1多克隆抗体，其是通过免疫原序列引起的，能与鸡胰腺干细胞表面分子特异结合，用鸡pdx1多克隆抗体通过免疫印迹法检测提取的鸡胰腺干细胞蛋白，可获得单一的特异性阳性条带。通过免疫组化检测，鸡胰腺干细胞表现特异性阳性荧光。

