



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102206251 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 28

(21) 申请号 201010520290. 4

(22) 申请日 2010. 10. 25

(73) 专利权人 深圳华大基因科技有限公司

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山路
146 号北山工业区综合楼

(72) 发明人 刘斯奇 吴琳 韦汉福 曹英豪
邱雪梅

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006. 01)

C07K 14/795 (2006. 01)

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 14/47 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 2005184101 A, 2005. 07. 07,
Shoshi Kikuchi et al. Collection,

mapping, and Annotation of over 28,000 cDNA
clones from japonica rice. 《SCIENCE》. 2003,
第 301 卷 376-379.

C. R. Buell et al. AAP21392.
《GenBank》. 2003, 1-2.

审查员 冯晓亮

权利要求书1页 说明书6页
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

酰基载体蛋白III抗原表位、抗酰基载体蛋白III抗体及其用途

(57) 摘要

本发明属于分子生物学和免疫学领域, 涉及酰基载体蛋白III抗原表位、抗酰基载体蛋白III抗体及其用途。具体地, 所述酰基载体蛋白III抗原表位具有 SEQ ID NO :3 或 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的序列。本发明还涉及一种抗酰基载体蛋白III多克隆抗体, 所述多克隆抗体与上述抗原表位特异性结合。所述多克隆抗体具有高的特异性和效价。本发明还涉及所述多克隆抗体的制备方法和用途、含有该多克隆抗体的组合物、以及检测酰基载体蛋白III的方法。

1. 一种酰基载体蛋白 III 抗原表位,其由 SEQ ID NO :3 或 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列组成。
2. 一种用于制备抗酰基载体蛋白 III 抗体的组合物,其中含有权利要求 1 所述的酰基载体蛋白 III 抗原表位。
3. 权利要求 2 的组合物,其特征在于,还含有用于免疫的佐剂。
4. 一种酰基载体蛋白 III 抗原表位-载体复合物,其中,所述酰基载体蛋白 III 抗原表位为权利要求 1 所述的酰基载体蛋白 III 抗原表位,所述载体选自钥孔戚血蓝素、BSA、以及酪蛋白。
5. 一种抗酰基载体蛋白 III 抗体的制备方法,包括使用权利要求 1 的酰基载体蛋白 III 抗原表位或者权利要求 2 或 3 的组合物或者权利要求 4 的复合物的步骤。
6. 权利要求 5 的制备方法,其特征在于,所述抗酰基载体蛋白 III 抗体是单克隆抗体。
7. 权利要求 5 的制备方法,其特征在于,所述抗酰基载体蛋白 III 抗体是多克隆抗体。
8. 权利要求 7 的制备方法,其中,所述制备方法包括如下步骤:
 - 1) 将权利要求 1 所述的酰基载体蛋白 III 抗原表位或者权利要求 2 或 3 的组合物或者权利要求 4 的复合物免疫动物得到的血样进行离心,得到多抗血清;和
 - 2) 纯化步骤 1) 中的多抗血清,得到抗酰基载体蛋白 III 多克隆抗体。
9. 一种多抗血清,其由权利要求 1 的酰基载体蛋白 III 抗原表位或者权利要求 2 或 3 的组合物或者权利要求 4 的复合物免疫动物制得。
10. 一种抗酰基载体蛋白 III 抗体,其能够特异地结合权利要求 1 所述的酰基载体蛋白 III 抗原表位。
11. 权利要求 10 的抗酰基载体蛋白 III 抗体,其为多克隆抗体或者单克隆抗体。
12. 一种用于检测酰基载体蛋白 III 的组合物,其包含权利要求 10 或 11 所述的抗酰基载体蛋白 III 抗体。
13. 一种酰基载体蛋白 III 检测剂,其包含权利要求 10 或 11 所述的抗酰基载体蛋白 III 抗体。
14. 权利要求 10 或 11 所述的抗体在制备检测酰基载体蛋白 III 检测剂中的用途。
15. 一种检测酰基载体蛋白 III 的方法,所述方法包括使用权利要求 10 或 11 所述的抗酰基载体蛋白 III 抗体的步骤。
16. 权利要求 15 所述的方法,其中,所述酰基载体蛋白 III 为水稻的酰基载体蛋白 III。

酰基载体蛋白III抗原表位、抗酰基载体蛋白III抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和免疫学领域。具体地,涉及一种酰基载体蛋白III抗原表位、抗酰基载体蛋白III抗体。本发明还涉及分别含有所述抗原表位或抗体的组合物、以及所述抗体在检测酰基载体蛋白III中的用途。

背景技术

[0002] 酰基载体蛋白(ACP)是脂肪酸合酶复合体的组成成分之一,参与脂肪酸合成。磷酸泛酰巯基乙胺是 ACP 的辅基,其磷酸基团与 ACP 的丝氨酸残基以磷酸酯键相连,另一端的 -SH 与脂酰基形成硫酯键,这样形成的分子相当于“摆臂”,可把底物在酶复合体上从一处的催化中心转移到另一处或者从一酶反应转移到另一酶反应。在植物中,脂肪酸合酶由多酶体系构成,它是由不同的 7 种多肽链组成的聚合体。其中一链是 ACP,其余六链是酶。

[0003] 酰基载体蛋白III是酰基载体蛋白家族的成员,它存在于叶绿体中。叶绿体是植物的光合中心,利用光能,把 CO₂ 的碳固定,转变成化学能和 O₂,是植物细胞所特有的能量转换器。光合作用是自然界最重要的化学反应,是包括人类在内的生物体赖以生存和繁衍的基础,也是能源利用和开发的一个重要方向。酰基载体蛋白III编码后定位于叶绿体,参与脂肪酸合成、脂质合成。该蛋白质的 N 末端有一段转运肽序列,能够指导到达目标细胞器。

[0004] 大麦叶酰基载体蛋白III的 cDNA 首先在 1987 年由 Hansen L. 等人克隆出(Three cDNA clones for barley leaf acyl carrier proteins I and III, Hansen L., Carlsberg Res. Commun. 52 :381-392(1987))。已有文献报道,大麦酰基载体蛋白III基因参与脂肪酸生物合成过程,具有酰基载体活性,定位于叶绿体。该大麦酰基载体蛋白III由 132 个氨基酸组成,其氨基酸序列与水稻酰基载体蛋白III的氨基酸序列有很大差别,并且大麦酰基载体蛋白III的氨基酸序列不含本发明所预测的水稻酰基载体蛋白III的抗原决定簇序列。生物信息学分析,水稻酰基载体蛋白III基因位于 3 号染色体,从 37018254 到 37020511bp,编码 140 个氨基酸组成的蛋白,分子量为 14819.85Da。现认为其类似于酰基载体蛋白III,对其功能的确定都是从它对应的家族去推断的。

[0005] 水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上最重要的粮食作物之一,也是植物生长发育、逆境反应等基础研究的模式植物。水稻酰基载体蛋白III参与了脂肪酸、脂质合成,与叶绿体密切相关,其个别功能的阐明有助于揭示水稻特异的表型、基因功能,为筛选优异特性的水稻品种提供理论基础。如何检测水稻酰基载体蛋白III在细胞内的分布和表达活性的变化成为一个亟待解决的问题。

[0006] 然而,迄今为止,在水稻生长发育过程中表达的酰基载体蛋白III基因的功能研究目前并不清楚。并且在现有技术中,通常制备的多克隆抗体特异性不高,用于检测目标物质会存在准确性不足的问题。另一方面,如果用酰基载体蛋白III制备抗原的话,无论是从重组表达还是化学合成,全长的氨基酸序列有 376 个氨基酸,重组表达步骤比较繁琐,化学合成蛋白质空间结构的重建很困难,再现与生物体内相同的空间构象仍然是现阶段蛋白质学研

究的难点。一般来说抗原表位合成简易,准确性高,成本低廉,空间构象容易再现,因此有必要开发一种具有代表酰基载体蛋白III本身的抗原表位(antigenic determinant,AD)(又称抗原决定簇,是指抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团)来代替全长蛋白。

[0007] 尽管目前已经有用于预测抗原表位的软件,例如BEPITOPE软件,但是预测得到的抗原表位中会有30%左右的非有效抗原表位,即不能特异性地代表抗原的抗原表位,或者不能引发免疫应答(Chang HT, LiuCH, Pai TW. Estimation and extraction of B-cell linear epitopes predicted by mathematical morphology approaches. J Mol Recognit. 2008Nov-Dec ;21(6) :431-41)。

发明内容

[0008] 为了解决上述问题,本发明人在通过BEPITOPE软件预测得到多个抗原表位序列的基础上,进行了大量的实验和不懈的努力,结果发现在预测的15个抗原表位中有一个抗原表位序列RFQALSCSAKQD(SEQ ID NO :3)是最有效的抗原表位,并且其具有良好的抗原特异性,并且制备了能与该蛋白酶特异免疫结合的抗体,该抗体具有足够的灵敏性和准确性。由此提供了下述发明:

[0009] 本发明的一个方面涉及一种酰基载体蛋白III抗原表位,其氨基酸序列如SEQ ID NO :3所示。

[0010] 在本发明的一个实施方案中,为了增加与载体的交联性,在上述抗原表位的C末端添加了一个半胱氨酸(半胱氨酸提供二硫键与载体交联),得到序列为RFQALSCSAKQDC(SEQ ID NO :4)的抗原表位。

[0011] 半胱氨酸也可以加在多肽的N末端,得到序列为CRFQALSCSAKQD(SEQ ID NO :5)的抗原表位。

[0012] 末端加1个半胱氨酸就可以了。如果在同一端加多个半胱氨酸,导致成本上升,而且会影响抗体的特异性,并且二硫键密度太大,而实际上也不需要这么多二硫键。另外不宜在N末端和C末端都加半胱氨酸,因为一个抗原表位和一个载体结合,如果在两端分别加1个半胱氨酸,半胱氨酸与载体结合后,抗原表位少了游离端,反而不利于产生抗体。

[0013] 本发明的抗原表位可以通过常规的肽合成技术化学合成得到,也可以在适当的宿主中表达得到;优选的是化学合成。

[0014] 本发明的还一方面涉及一种组合物,其包含SEQ ID NO :3或SEQ ID NO :4或SEQ ID NO :5所示的酰基载体蛋白III抗原表位,任选地,可以含有免疫佐剂,例如氢氧化铝、弗氏完全佐剂、或者弗氏不完全佐剂等。

[0015] 本发明的还一方面涉及一种酰基载体蛋白III抗原表位-载体复合物;其中,所述酰基载体蛋白III抗原表位为本发明的酰基载体蛋白III抗原表位,所述载体可以是钥孔戚血蓝素(KLH)、BSA、或酪蛋白等。

[0016] 本发明的还一方面涉及一种抗酰基载体蛋白III抗体,所述抗酰基载体蛋白III抗体能够特异性地结合SEQ ID NO :3或SEQ ID NO :4或SEQ ID NO :5所示的酰基载体蛋白III抗原表位。所述抗酰基载体蛋白III抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

[0017] 本发明的抗酰基载体蛋白III多克隆抗体可以得自各种常规制备多克隆抗体的动物,例如山羊,兔子,大鼠,小鼠等。

[0018] 对本领域技术人员而言,可以根据 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的酰基载体蛋白III抗原表位制备单克隆抗体,具体操作可以参见本领域的技术手册,也可以参考文献例如 Nature1975Kohler & Milstein Vol 256, p495。

[0019] 本发明的还一方面涉及一种含有抗酰基载体蛋白III多克隆抗体的血清(简称多抗血清),其通过使用 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的抗原表位免疫动物制得。

[0020] 本发明的还一方面涉及一种抗酰基载体蛋白III多克隆抗体制备方法,包括将 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的酰基载体蛋白III抗原表位作为抗原免疫动物的步骤。任选地,所述免疫步骤可以加入佐剂,例如氢氧化铝、弗氏完全佐剂、或者弗氏不完全佐剂,等等。

[0021] 本发明的一个实施方案中,所述抗酰基载体蛋白III多克隆抗体制备方法,包括如下步骤:

[0022] 1) 将 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的酰基载体蛋白III抗原表位作为抗原免疫动物;

[0023] 2) 取血,离心收集多抗血清;和

[0024] 3) 纯化步骤 2) 中的多抗血清,得到抗酰基载体蛋白III多克隆抗体。

[0025] 本发明的还一方面涉及一种组合物,其包含本发明的抗酰基载体蛋白III多克隆抗体。

[0026] 本发明的还一方面涉及一种酰基载体蛋白III检测剂,其包含 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的抗酰基载体蛋白III多克隆抗体。

[0027] 其中酰基载体蛋白III的氨基酸序列如下:

[0028] MAAPITAATSPLSPASRVQVMCSMLNPTSASFSTRQTASFPSIRLRPVPS **RFQALSCSAKQD** TIDKV
CEIVKNQLAVDEGTAVSGETKFVDLGADSLDTVEIVMGLEEFQITVDESSAQVIQTVEDAAVLIDKLVAEKDA (SEQ ID NO:2)

[0029] 其中,加边框的序列为 SEQ ID NO:3。

[0030] 本发明的还一方面涉及本发明的抗酰基载体蛋白III多克隆抗体在制备检测酰基载体蛋白III的药物中的用途。

[0031] 本发明的还一方面涉及一种检测酰基载体蛋白III的方法,所述方法包括使用本发明的抗酰基载体蛋白III多克隆抗体的步骤。具体地,包括如下步骤:

[0032] 1) 将待测样品与本发明的抗酰基载体蛋白III多克隆抗体孵育,使所述的抗酰基载体蛋白III多克隆抗体与待测样品中的酰基载体蛋白III特异性结合,由此形成免疫复合物;和

[0033] 2) 检测是否存在免疫复合物。

[0034] 上述检测酰基载体蛋白III的方法可以检测酰基载体蛋白III的有无、对其进行半定量(例如 western blot 方法);在有酰基载体蛋白III标准品的情况下,还可以通过 ELISA 方法对酰基载体蛋白III进行定量检测。

[0035] 在本发明的一个实施方案中,所述酰基载体蛋白III为水稻的酰基载体蛋白III。具体的,所述水稻为水稻 93-11。

[0036] 发明的有益效果

[0037] 1) 本发明提供的多克隆抗体,特异性高;Western blot 检测时只出现特异性的一条条带(见图1)。

[0038] 2) 本发明提供的酰基载体蛋白III抗原合成简易,准确性高。本发明提供的抗原表位是经软件预测选出的抗原表位片段后化学合成的,片段短小,容易合成,空间构象再现容易。

[0039] 3) 本发明提供的多克隆抗体可用于作为检测酰基载体蛋白III存在与否的试剂;还可用于检测酰基载体蛋白III在不同细胞器或细胞质基质的表达情况,通过分别提取不同细胞器或细胞质基质的总蛋白后,通过用本发明提供酰基载体蛋白III多克隆抗体,可以检测酰基载体蛋白III在哪个部位表达,以及表达量如何。

[0040] 4) 本发明提供的多克隆抗体可应用于具有酰基载体蛋白III基因的物种的研究中,其研究方法有:免疫共沉淀、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白芯片、免疫组化、细胞定位。这都是以抗原抗体反应为基础的研究方法。

[0041] 5) 本发明提供的多克隆抗体可用于研究脂肪酸、脂质合成过程。通过与荧光试剂结合,可跟踪酰基载体蛋白III在细胞内的表达情况。

附图说明

[0042] 图1:使用抗酰基载体蛋白III多克隆抗体对酰基载体蛋白III在水稻不同组织的免疫印迹检测结果。

具体实施方式

[0043] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0044] 实施例1:候选抗原表位的预测

[0045] 水稻酰基载体蛋白III对应的基因在GenBank中的基因ID是:NP_001051948.1。读码框序列如下:

[0046] ATGGCTGCTCCCATCACCGCCGCCACATCGCCTCTCTCCCCCTGCGTCTCGGGTTCAGGTGATGTGCTCAATGCTCAATCCAACCTCAGCTTCTTTCTCCAGGCAAACAGCAAGCTTCCCGTCCATTTCGGTTGCGCCCGGTCCCAAGTCGCTTCCAGGCCTTGTCTTGTTTCGGCCAAAACAAGACACTATTGATAAGGTTTGCAGAAATAGTTAAGAATCAGTTAGCAGTAGATGAAGGCACTGCCGTTTCTGGAGAAACAAAATTCGTGGACCTTGGTGCTGATTCACTTGACACGGTTGAATTGTGATGGGCCTTGAGGAGGCATTTTCAGATTACCGTGGACGAATCGAGTGCAGCAAGTGATTTCAGACAGTGGAGGATGCTGCTGTGCTTATCGACAAGCTTGTGGCAGAGAAGGACGCCTAA (SEQ ID NO:1)

[0047] 所编码的水稻酰基载体蛋白III全长序列如下:

[0048] MAAPITAATSPLSPASRVQVMCSMLNPTSASFQRQTASFPSIRLRPVPS **RFQALSCS** **AKQD** TIDKVCEIVKNQLAVDEGTAVSGETKFVDLGADSLDTVEIVMGLEEFQITVDESSAQVIQTVEDAAVLIDKLVAEKDA

[0049] (SEQ ID NO:2,其中加框的序列为SEQ ID NO:3)

[0050] 然后根据SEQ ID NO:2,用BEPITOPE软件对水稻酰基载体蛋白III基因编码的蛋

白质进行抗原表位的预测。本实施例中使用了 BEPITOPE 软件提供的五种方法 Standard、Karplus、Emini、Amphiphi、Pellequer, 以及这五种方法的综合方法 cons_Sta_Kar_Emi_Amp_Pel, 所有参数选择默认。具体方法可以参考 Odorico M, Pellequer J L. BEPITOPE: predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins[J]. J Mol Recognit, 2003, 16(1): 20-22。

[0051] 一共预测得到了 15 个候选的抗原表位, 选出抗原表位峰值较高的片段 RFQALSCSAKQD (SEQ ID NO: 3)。

[0052] 然后该片段在水稻蛋白质库 (RAP-DB 数据库, 网址: <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) 进行唯一性检索 (蛋白序列比对), 确定了该片段在水稻蛋白质库中的唯一性。

[0053] 实施例 2: 抗原表位的化学合成

[0054] 实施例 1 中得到的候选抗原表位的两端没有半胱氨酸, 为了实现与载体的交联, 合成的序列需加入半胱氨酸, 因此要合成的多肽序列为: CRFQALSCSAKQD (SEQ ID NO: 5)。

[0055] 对 SEQ ID NO: 5 所示的多肽序列进行化学合成 (由吉尔生化公司合成), 得到酰基载体蛋白 III 的抗原表位。

[0056] 实施例 3: 抗原表位 -KLH 复合物的制备

[0057] 采用戊二醛连接法, 将实施例 2 中合成的抗原表位的 N 端与交联载体蛋白 - 钥孔戚血蓝素 (KLH) 交联, 得到抗原表位 -KLH 复合物。

[0058] 具体实施步骤如下:

[0059] 将 5mg 合成多肽加入 7mg KLH 中, 边震荡边缓慢加入新鲜配制的 3g/L 戊二醛溶液 1ml, 室温孵育 2h。以 pH8.5 的硼酸缓冲液透析 24h, 得到抗原表位 -KLH 复合物。

[0060] 实施例 4: 多抗血清的制备

[0061] 取 1-2mg 实施例 3 中制备的抗原表位 -KLH 复合物, 免疫新西兰大白兔, 每隔 14 天加强免疫一次; 第 2 次加强免疫后 7 天, 耳静脉取血, 分离血清 (5000rpm 离心 10min), 收集上清, 测效价。同时按照相同的步骤, 用抗原表位 (SEQ ID NO: 5) 作为对照。

[0062] 具体步骤如下:

[0063] 取 1-2mg 实施例 3 中制备的抗原表位 -KLH 复合物与等量的完全福氏佐剂充分乳化, 形成油水包, 于兔颈部和背部皮下多点注射, 每点约 100 μ g。2 周后加强免疫, 剂量同前, 用不完全福氏佐剂充分乳化后, 于兔背部皮下多点注射; 以后隔 2 周加强免疫 1 次; 从第 2 次加强免疫开始, 每次免疫 7 天后, 经耳静脉取血测定抗体的效价。

[0064] 其中, 耳静脉取血进行效价检测 (ELISA 法) 的步骤如下:

[0065] 在 96 孔板上, 每孔加入 50 μ g/ml 磷酸酪氨酸 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过夜后, 进行包被, 洗涤。将按照前述方法制备的耳静脉血的多抗血清稀释为 1:100, 1:500, 1:2500, 1:3200, 1:12800, 1:25600, 每孔各加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 30min, 洗涤。各加入 1:100 稀释的羊抗兔 Ig 酶结合物 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 30min, 洗涤。加入 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 100 μ l, 20min 后, 加 2mol/l 的 H₂SO₄ 终止反应。

[0066] 经过 4 次加强免疫后, 效价检测的结果如下:

[0067] 多抗血清 (抗原表位 -KLH 复合物免疫) > 25600 (抗原表位 -KLH 复合物有免疫原性的最大稀释倍数是 25600);

[0068] 裸肽免疫 (抗原表位, SEQ ID NO: 5) 得到的多抗血清 > 12800 (仅仅由抗原表位

组成的裸肽具有免疫原性的最大稀释倍数是 12800)。

[0069] 上述结果已经符合要求,遂于末次加强免疫 7 天后颈动脉放血,收集血样。将收集的的血样在 3-4℃ 下静置 3-4 小时,然后 5000rpm 离心 10 分钟,收集血清,得到多抗血清(耳静脉检测效价符合要求后,颈动脉取的的血样不必再检测效价)。无菌分装保存于 -80℃ 备用。

[0070] 实施例 5:抗酰基载体蛋白 III 多克隆抗体(多抗)的制备

[0071] 将实施例 4 中制备的多抗血清进行纯化,制得多克隆抗体(多抗)。

[0072] 将抗原表位 RFQALSCSAKQD(SEQ ID NO:3) 多肽与溴化氰活化的 Sepharose 4B 偶联,制备多肽亲和层析柱。

[0073] 将制备的多抗血清加入到以上制备的层析柱中,放置于 4℃ 孵育过夜后,洗脱抗体,即得到抗酰基载体蛋白 III 多克隆抗体(多抗)。

[0074] 实施例 6:多抗对酰基载体蛋白 III 的特异性检验

[0075] 选取水稻 93-11 苗期地上部、分蘖期叶片、孕穗期剑叶、开花期剑叶、成熟期剑叶、苗期地下部、分蘖期茎、开花期穗子、成熟期种子,分别提取总蛋白质。Western blot 检测时它们的上样量都为 10 μl;Marker(Transgen Biotech,货号:DM 201) 为 10 μl。

[0076] 总蛋白质样品的制备:用液氮研磨上述新鲜水稻组织至粉末状,分装到预冷离心管中,每 300 μl 粉末加入 800 μl 蛋白质裂解液(62.5mmol/L pH7.4 Tris •HCl,10%甘油,2% SDS,20mmol/L NaF,2mmol/L EDTA,1mmol/L PMSF,5% β-巯基乙醇),迅速混匀并置于冰上,冰水混合物中孵育 10 分钟,约每 2 分钟震荡混匀 1 次。4℃,12000r/min 离心 15 分钟。取上清,转移到新的离心管中,-70℃ 保存。得到水稻总蛋白。

[0077] Western 印记:

[0078] 将提取的上述水稻蛋白质进行 SDS-PAGE(12%),将提取的水稻蛋白质进行 SDS-PAGE(12%) 后电转移到 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂奶粉封闭 PVDF 膜。用制备的多克隆抗体以 1:1000 稀释后室温孵育 3h,TTBS 洗膜 3 次,每次 5min。之后加入以 1:15000 稀释的兔源多抗(厂家货号:中杉 ZB2301),室温孵育 1h,TTBS 洗膜 3 次,每次 5min。加 ECL Plus 显色剂显色,暗室曝光 5min。结果在 PVDF 膜上看到 15kDa 附近的一条特异性条带,这与预测分子量(15kDa) 几乎完全一致(图 1)。

[0079] 需要说明的是,尽管水稻全蛋白中可能有很多分子量与其相似的蛋白,但是与多抗特异性结合的就只有酰基载体蛋白 III 一个。关于特异性的预测:SEQ ID NO:5 经过 <http://rice.plantbiology.msu.edu/blast.shtml>(与实施例 1 中的 <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/> 作用相同,目的是再次检验唯一性) 的检查,确定此多肽序列特异,该序列在水稻总蛋白中唯一确定酰基载体蛋白 III。

[0080] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

[0001]

序列表

<110> 深圳华大基因科技有限公司

<120> 酰基载体蛋白III抗原表位、抗酰基载体蛋白III抗体及其用途

<130> P2010-1-0058. CN

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 423

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 1

atggctgctc ccataccgc cgccacatcg cctctctccc ctgcgtctcg ggttcaggtg	60
atgtgctcaa tgctcaatcc aacctcagct tctttctcca ggcaaacage aagcttcccg	120
tccattcggt tgcgcccggc cccaagtcgc ttccaggcct tgtcttggtc ggccaaacaa	180
gacactattg ataaggtttg cgaaatagtt aagaatcagt tagcagtaga tgaaggcact	240
gccgtttctg gagaaacaaa attcgtggac cttggtgctg attcacttga cacggttgaa	300
attgtgatgg gccttgagga ggcatttcag attaccgtgg acgaatcgag tgcgcaagtg	360
attcagacag tggaggatgc tgctgtgctt atcgacaagc ttgtggcaga gaaggacgcc	420
taa	423

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 2

Met Ala Ala Pro Ile Thr Ala Ala Thr Ser Pro Leu Ser Pro Ala Ser

[0002]

1	5	10	15
Arg Val Gln Val Met Cys Ser Met Leu Asn Pro Thr Ser Ala Ser Phe	20	25	30
Ser Arg Gln Thr Ala Ser Phe Pro Ser Ile Arg Leu Arg Pro Val Pro	35	40	45
Ser Arg Phe Gln Ala Leu Ser Cys Ser Ala Lys Gln Asp Thr Ile Asp	50	55	60
Lys Val Cys Glu Ile Val Lys Asn Gln Leu Ala Val Asp Glu Gly Thr	65	70	75
Ala Val Ser Gly Glu Thr Lys Phe Val Asp Leu Gly Ala Asp Ser Leu	85	90	95
Asp Thr Val Glu Ile Val Met Gly Leu Glu Glu Ala Phe Gln Ile Thr	100	105	110
Val Asp Glu Ser Ser Ala Gln Val Ile Gln Thr Val Glu Asp Ala Ala	115	120	125
Val Leu Ile Asp Lys Leu Val Ala Glu Lys Asp Ala	130	135	140

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 3

Arg Phe Gln Ala Leu Ser Cys Ser Ala Lys Gln Asp
1 5 10

[0003]

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 4

Arg Phe Gln Ala Leu Ser Cys Ser Ala Lys Gln Asp Cys
1 5 10

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 5

Cys Arg Phe Gln Ala Leu Ser Cys Ser Ala Lys Gln Asp
1 5 10

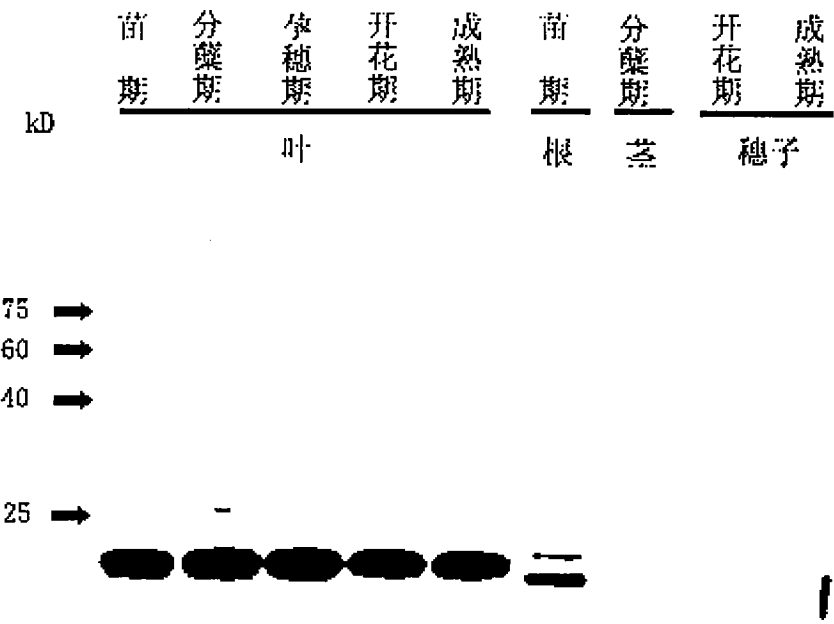


图 1

专利名称(译)	酰基载体蛋白III抗原表位、抗酰基载体蛋白III抗体及其用途		
公开(公告)号	CN102206251B	公开(公告)日	2013-08-28
申请号	CN201010520290.4	申请日	2010-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	深圳华大基因科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳华大基因科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳华大基因科技有限公司		
[标]发明人	刘斯奇 吴琳 韦汉福 曹英豪 邱雪梅		
发明人	刘斯奇 吴琳 韦汉福 曹英豪 邱雪梅		
IPC分类号	C07K7/08 C07K14/795 C07K14/765 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/06 G01N33/577 G01N33/53		
审查员(译)	冯晓亮		
其他公开文献	CN102206251A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于分子生物学和免疫学领域，涉及酰基载体蛋白III抗原表位、抗酰基载体蛋白III抗体及其用途。具体地，所述酰基载体蛋白III抗原表位具有SEQ ID NO：3或SEQ ID NO：4或SEQ ID NO：5所示的序列。本发明还涉及一种抗酰基载体蛋白III多克隆抗体，所述多克隆抗体与上述抗原表位特异性结合。所述多克隆抗体具有高的特异性和效价。本发明还涉及所述多克隆抗体的制备方法和用途、含有该多克隆抗体的组合物、以及检测酰基载体蛋白III的方法。

