



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105017417 B

(45)授权公告日 2018.05.29

(21)申请号 201510409322.6

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2015.07.13

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105017417 A

CN 1951966 A, 2007.04.25,

CN 1422864 A, 2003.06.11,

WO 03/087153 A1, 2003.10.23,

(43)申请公布日 2015.11.04

陈颖等. 锌指蛋白K0X12单克隆抗体的制备及在肿瘤组织中的表达.《放射免疫学杂志》.2010,第23卷(第2期),第183-187页.

(73)专利权人 北京林业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路35号
北京林业大学

Ayaka Yano等. Heritable Targeted

Inactivation of the Rainbow Trout

(Oncorhynchus mykiss) Master Sex-

Determining Gene Using Zinc-Finger

Nucleases.《Mar Biotechnol》.2013,第16卷第243-250页.

(72)发明人 晁跃辉 韩烈保 肖国增 滕珂
郭涛

审查员 李婧文

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

C07K 16/16(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

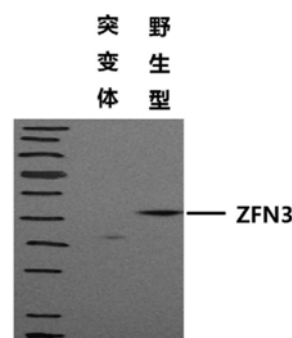
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体的制备方法,该方法包括以下步骤:(1)构建含有SEQ ID No:1和SEQ ID No:2所示核苷酸序列的重组表达载体,将所述重组表达载体转化大肠杆菌感受态细胞获得重组蛋白抗原;(2)将所述重组蛋白抗原免疫动物,经血清分离纯化获得拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体。利用本发明所提供的方法制备的多克隆抗体,能够特异性识别拟南芥ZFN3蛋白,而不能识别拟南芥其他蛋白,在ZFN3蛋白的检测和功能鉴定具有广泛用途。ZFN3蛋白抗体的制备为在拟南芥中检测ZFN3蛋白及研究ZFN3蛋白功能具有一定的意义。



1. 一种拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体的制备方法,该方法包括以下步骤:

(1) 构建含有如SEQ ID No.3所示核苷酸序列的重组表达载体,将所述重组表达载体转化大肠杆菌感受态细胞获得重组蛋白抗原;

(2) 将所述重组蛋白抗原免疫动物,经血清分离纯化获得拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述重组表达载体是将SEQ ID No.3所示的核苷酸序列克隆至原核表达载体获得的。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述原核表达载体为pE-SUM0pro。

4. 根据权利要求1-3任意一项所述的制备方法,其特征在于,所述重组蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID No.6所示。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,大肠杆菌感受态细胞为大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞。

6. 根据权利要求1、2、3、5中任意一项所述的制备方法,其特征在于,免疫动物的步骤包括4次免疫,首先将重组蛋白抗原与完全弗氏佐剂混合后第1次免疫动物,而后将重组蛋白抗原与非完全弗氏佐剂混合后进行第2-4次免疫,每次免疫的时间间隔为14天。

7. 利用权利要求1-6中任意一项所述的方法制备的拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体。

一种拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体及其制备方法。

背景技术

[0002] 拟南芥,是在植物科学,包括遗传学和植物发育研究中的模式生物之一。拟南芥的优点是植株小、每代时间短、结子多、生活力强。拟南芥的基因组是目前已知植物基因组中最小的。其整个基因组已于2000年由国际拟南芥菜基因组合作联盟联合完成,也是第一个被顺序分析的植物基因组。拟南芥是自花受粉植物,基因高度纯合,用理化因素处理突变率很高,容易获得各种代谢功能的缺陷型。由于具有上述这些优点,所以拟南芥是进行遗传学研究的理想材料,被科学家誉为“植物中的果蝇”。

[0003] 转录因子是一组识别特异DNA序列的蛋白,能促进或抑制某些特定基因的转录及表达,从而导致组织细胞结构和功能的改变。转录因子ZFN3是一种特殊的锌指蛋白(zinc finger protein),它含有五个CCCH锌指结构,在拟南芥叶片衰老过程中,表达量逐渐升高。拟南芥yuc6-1D的突变体,能够通过不断积累生长素,来推迟叶片的衰老,通过基因芯片分析表明,ZFN3基因在该突变体中,表达量显著下降,ZFN3蛋白编码基因已经被北京大学Leaf Senescence Database收录为调节叶片衰老的候选基因。但目前关于ZFN3蛋白的抗体未见报道。

[0004] 因此有必要提供一种针对拟南芥ZFN3蛋白的多克隆抗体,从而为研究和利用该蛋白的生物学功能提供有力工具。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于填补现有的拟南芥ZFN3蛋白检测领域的空白,开发一种针对拟南芥ZFN3蛋白的多克隆抗体及其制备方法。

[0006] 一种拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0007] (1) 构建含有SEQ ID No:1和SEQ ID No:2所示核苷酸序列的重组表达载体,将所述重组表达载体转化大肠杆菌感受态细胞获得重组蛋白抗原;

[0008] (2) 将所述重组蛋白抗原免疫动物,经血清分离纯化获得拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体。

[0009] 其中,所述SEQ ID No:1和SEQ ID No:2所示核苷酸序列为发明人通过对拟南芥ZFN3蛋白序列进行大量分析比对发现的两条特异性多肽片段的编码DNA。

[0010] 可选的,所述重组表达载体含有如SEQ ID No.3所示的核苷酸序列。其中,SEQ ID No.3所示的核苷酸序列含有SEQ ID No:1和SEQ ID No:2所示核苷酸序列,为了使得SEQ ID No:1和SEQ ID No:2所示的核苷酸序列所编码的多肽片段能够在大肠杆菌感受态细胞中准确高效的表达获得重组蛋白抗原,发明人在这两段序列之间加入了一段GGGGGGGGGGTCC序列。

[0011] 可选的,所述重组表达载体是将含有SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示的核苷酸序列的片段克隆至原核表达载体获得的。

[0012] 可选的,所述重组蛋白抗原含有如SEQ ID No.4和SEQ ID No.5所示的氨基酸序列。

[0013] 优选的情况下,所述重组蛋白抗原含有如SEQ ID No.6所示的氨基酸序列。

[0014] 本发明对于所使用的大肠杆菌感受态细胞的种类没有特别的限制,只要能够适合重组表达载体在细胞中有效表达即可,优选的情况下,为了获得更好的表达效果,大肠杆菌感受态细胞为大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞。

[0015] 在本发明中,可以利用本领域常规适合于重组蛋白抗原的原核表达载体,优选的情况下,当所述原核表达载体为pE-SUMOpro时,重组蛋白抗原的表达效果更好。

[0016] 在本发明所提供的方法中,免疫动物的步骤包括4次免疫,首先将纯化的重组蛋白抗原与完全弗氏佐剂混合后第1次免疫动物,而后将纯化的重组蛋白抗原与非完全弗氏佐剂混合后进行第2-4次免疫,每次免疫的时间间隔为14天。

[0017] 在本发明中,免疫动物时所使用的免疫剂量及与佐剂的混合比例都可以按照本领域常规的方法进行。免疫的动物包括但不限于新西兰大白兔、小白鼠和大白鼠。

[0018] 在第四次免疫后第10天,取动物血液,收集抗血清,利用纯化试剂获得纯度不低于80%的拟南芥ZFN3多克隆抗体。

[0019] 本分发明还提供了利用本发明所述的方法制备的拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体。所述多克隆抗体能够特异性的识别ZFN3蛋白中的特异性氨基酸片段SEQ ID No.4和SEQ ID No.5,为ZFN3蛋白的特异性抗体。

[0020] 本发明还提供了所述的拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体的应用。所述应用包括制备含有所述拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体的试剂或试剂盒,用于检测拟南芥ZFN3蛋白或进行功能鉴定。

[0021] 本发明所提供的方法通过PCR方法克隆得到拟南芥ZFN3蛋白编码DNA中的两段特异性片段的编码DNA,从而获得特异性的多克隆抗体。利用本发明所提供的方法制备的多克隆抗体,能够特异性识别拟南芥ZFN3蛋白,而不能识别拟南芥其他蛋白,在ZFN3蛋白的检测和功能鉴定、研究中具有广泛用途。ZFN3蛋白抗体的制备为在拟南芥中检测ZFN3蛋白及研究ZFN3蛋白功能具有一定的意义。

附图说明

[0022] 图1为目的DNA的PCR扩增结果;

[0023] 图2为原核表达载体菌体PCR检测电泳图;

[0024] 图3为重组蛋白SDS-PAGE电泳图;

[0025] 图4为重组蛋白纯化后SDS-PAGE电泳图,其中,M为蛋白Marker;1和2为纯化的蛋白;箭头指示的条带为目标蛋白条带;

[0026] 图5为拟南芥Western检测图片。

具体实施方式

[0027] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细的说明。应当理解的是,此处所描述的

具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0028] 以下实施例中所使用的仪器和试剂均可以通过购买市售产品的方式获得。

[0029] 实施例1

[0030] 1、拟南芥ZFN3蛋白序列获得

[0031] 在北京天一辉远生物技术公司通过全基因合成的方法,合成用于原核表达载体构建的DNA序列,即合成SEQ ID No.3所示的核苷酸序列,将SEQ ID No.3所示的核苷酸序列克隆至载体pGM-T(购自北京天根生物公司)中,经DNA测序序列正确,将其命名为pGM-ZP质粒。

[0032] 2、原核表达载体构建:设计一对引物用于构建原核表达载体引物:

[0033] ZP-f:5'-GAACAGATTGGAGGTAACCTTGATGGTTTCTGTTCG-3'

[0034] ZP-r:5'-GTGAGACCGGTACCATCAGAATTCGAGTGATGTGGG-3'

[0035] 以pGM-ZP质粒为模板,进行PCR扩增。PCR程序为:95℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸30s,25个循环。PCR产物经凝胶电泳分析,获得约为250bp的DNA条带(图1),产物回收纯化待用。

[0036] 提取原核表达载体pE-SUMOPro质粒,SpeI酶切pE-SUMOPro,回收、纯化酶切产物。按照pE-SUMOPro载体:PCR产物片段为1:1的比例,用无缝连接酶于50℃连接15min,将连接产物转化大肠杆菌感受态BL21(DE3),经氨苄青霉素筛选后,挑取单克隆菌落进行菌体PCR检测(图2),选取PCR检测阳性菌落,命名为SUMO-ZP。

[0037] 3、重组蛋白表达及纯化:

[0038] 将含有SUMO-ZP的大肠杆菌菌液,接种至LB培养液中,使用恒温摇床,37℃,180rpm培养,待菌体OD值达到0.6,加入终浓度1mM的IPTG,并将温度调至30℃,180rpm继续培养6h。取50ml大肠杆菌菌液,放置在离心机,10000rpm,1min,弃上清收集菌体,加入10ml PBS,重新悬浮菌体。将重新悬浮的菌体放置在冰浴中,使用超声破碎仪,进行菌体破碎。将破碎处理后的菌液,放置在离心机中,12000rpm,10min,分别收集上清和沉淀,沉淀使用10ml PBS重新悬浮,分别取两种溶液10μl,加入10μl 2×SDS缓冲液,沸水煮沸10min,离心后,取上清进行SDS-PAGE检测,检测结果显示:上清中含有一条目的蛋白大小的条带(图3)。将上清溶液,经Ni柱纯化后,进行SDS-PAGE检测,结果显示:能够纯化出目标蛋白条带,与预测目的蛋白大小一致(图4),其氨基酸序列为SEQ ID No:6所示。

[0039] 4、免疫动物:

[0040] 将纯化的重组蛋白与完全弗氏佐剂1:1混合,进行第一次免疫,第一次免疫后第14天,将纯化的抗原与非完全弗氏佐剂1:1混合,进行第二次免疫,第二次免疫后第14天,将纯化的抗原与非完全弗氏佐剂1:1混合,进行第三次免疫,第三次免疫后第14天,将纯化的抗原与非完全弗氏佐剂1:1混合,进行第四次免疫进行;

[0041] 5、抗体分离及纯化:

[0042] 待第四次免疫后第10天,将免疫用青年新西兰大白兔(体重:6-7斤,购自芳缘养殖场),采用颈动脉放血,将血液在37℃恒温箱中放置30分钟,再在4℃放置过夜。用药铲将血凝块从管壁上拨落,将血液转移至塑料离心管中,4℃,10000g离心10min,收集上清液即为抗血清。使用康为世纪公司的Protein A+G Agarose试剂(货号:CW0349)纯化抗体,具体步骤:

[0043] (1) 在10ml抗体血清中加入100μl充分重悬的Protein A+G Agarose,4℃缓慢摇动

3个小时；

[0044] (2) 2500rpm离心5分钟，小心吸除上清；

[0045] (3) 用PBS洗涤沉淀5次，PBS的用量每次为10ml。洗涤时离心条件：2500rpm离心5分钟，小心吸除上清。

[0046] (4) 完成最后一次洗涤后，去除上清，检测产物纯度，产物抗体的纯度为86%。

[0047] 6、抗体检测：

[0048] 选取野生型拟南芥和ZFN3基因突变拟南芥为实验材料，使用康为世纪公司的植物蛋白质提取试剂盒(货号：CW0885B)，分别提取总蛋白。具体步骤为：选取拟南芥叶片组织大约100mg，放置在研钵中，加入抽提试剂0.5ml，进行匀浆处理；匀浆后冰上孵育20分钟后，利用低温高速冷冻离心机4℃ 12,000rpm，离心20分钟；收集上清中的可溶性蛋白，放置在4℃，待下一步实验。

[0049] 提取蛋白质，经SDS-PAGE电泳后，经半干转膜仪，转移至硝酸纤维素膜上，以5%的脱脂奶粉(TBST缓冲液溶解)在4℃条件下，封闭2h；加入纯化的多克隆抗体(1:5000)，在4℃条件下，反应12h；加入辣根过氧化物标记的羊抗兔IgG抗体(1:2000)，在37℃条件下，反应1h；采用化学发光显色，检测结果如图5所示，野生型拟南芥有一条单一清晰的杂交条带，而突变体中没有检测信号(图5)。

[0050] 结果证明：本发明所制备的多克隆抗体，能够识别植物体内的ZFN3蛋白，而且能够特异性地与拟南芥ZFN3蛋白结合。

[0051] 结论：上述实验结果表明，制备的拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体能够识别拟南芥中的ZFN3蛋白，能够检测ZFN3蛋白，而不与植物体内的其他蛋白发生作用。该多克隆抗体，可以作为ZFN3蛋白检测试剂，对ZFN3蛋白的功能鉴定具有重要的意义。

[0052] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，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围。

序列表

<110> 北京林业大学

<120> 一种拟南芥 ZFN3 蛋白多克隆抗体及其制备方法

<130> KHP151113338.6

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 108

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 1

aacttgatgg ttctgttcg tggctctccg gtttactctg ctcttcaatc tctaactggt 60

caaccgtctt attcttggtc gagaacatct ttgttgcaa accctcct 108

[0001]

<210> 2

<211> 99

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 2

ccttctcctt catcatctct gcatcaagag actgcaatca ccacagagct caggaatctc 60

ctagtctctt ctctgtgga agcaaaaccc acatcactc 99

<210> 3

<211> 228

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

aacttgatgg ttctgttcg tggctctccg gtttactctg ctcttcaatc tctaactggt 60

caaccgtctt attcttggtc gagaacatct ttgttgcaa accctctgg gggggggggg 120

tcccttctc ctcatcatc tctgcatcaa gagactgcaa tcaccacaga gctcaggaat 180

ctcctagtct cttcttctgt ggaagcaaaa cccacatcac tcgaattc 228

<210> 4

<211> 36

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 4

Asn Leu Met Val Ser Val Arg Gly Ser Pro Val Tyr Ser Ala Leu Gln
1 5 10 15

Ser Leu Thr Gly Gln Pro Ser Tyr Ser Trp Ser Arg Thr Ser Phe Val
20 25 30

Ala Asn Pro Pro
35

[0002]

<210> 5

<211> 33

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 5

Pro Ser Pro Ser Ser Ser Leu His Gln Glu Thr Ala Ile Thr Thr Glu
1 5 10 15

Leu Arg Asn Leu Leu Val Ser Ser Ser Val Glu Ala Lys Pro Thr Ser
20 25 30

Leu

<210> 6

<211> 76

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Asn Leu Met Val Ser Val Arg Gly Ser Pro Val Tyr Ser Ala Leu Gln
1 5 10 15

Ser Leu Thr Gly Gln Pro Ser Tyr Ser Trp Ser Arg Thr Ser Phe Val
20 25 30

Ala Asn Pro Pro Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser Ser Ser Leu
35 40 45

His Gln Glu Thr Ala Ile Thr Thr Glu Leu Arg Asn Leu Leu Val Ser
50 55 60

[0003] Ser Ser Val Glu Ala Lys Pro Thr Ser Leu Glu Phe
65 70 75

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

gaacagattg gaggtactt gatggttct gtctg 35

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

gtgagaccgg taccatcaga attcgagtga tgtggg 36

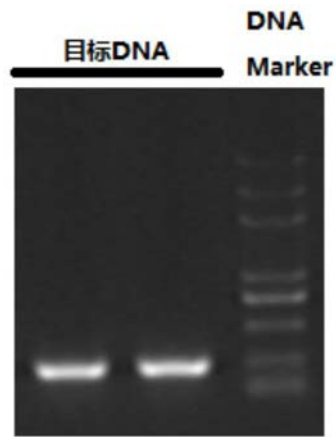


图1

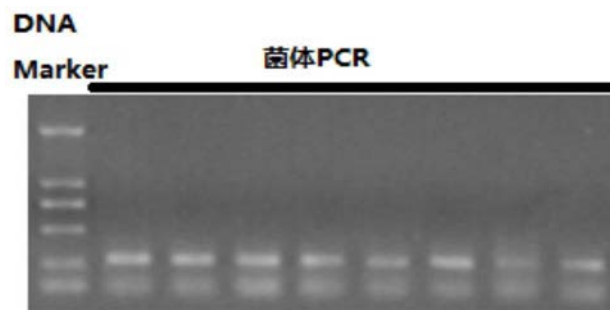


图2

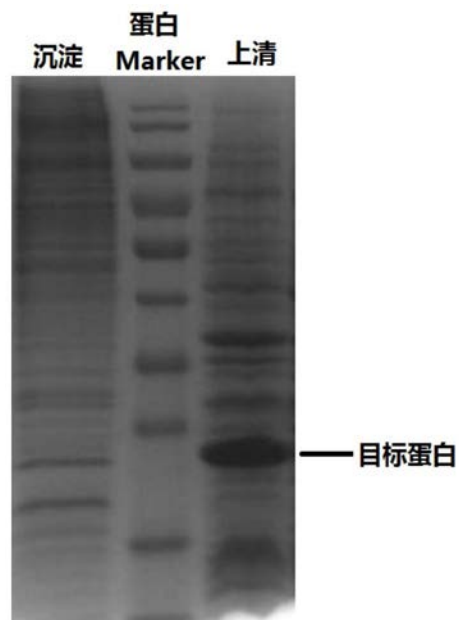


图3

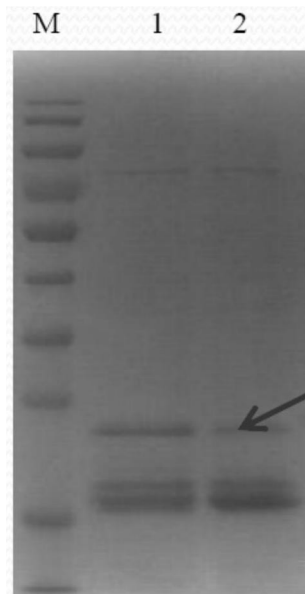


图4

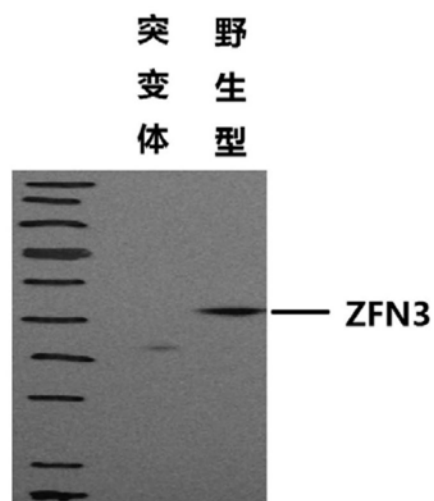


图5

专利名称(译)	一种拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体及其制备方法		
公开(公告)号	CN105017417B	公开(公告)日	2018-05-29
申请号	CN201510409322.6	申请日	2015-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	北京林业大学		
申请(专利权)人(译)	北京林业大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京林业大学		
[标]发明人	晁跃辉 韩烈保 肖国增 滕珂 郭涛		
发明人	晁跃辉 韩烈保 肖国增 滕珂 郭涛		
IPC分类号	C07K16/16 G01N33/53		
代理人(译)	王文君		
审查员(译)	李婧文		
其他公开文献	CN105017417A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体的制备方法，该方法包括以下步骤：(1)构建含有SEQ ID No：1和SEQ ID No：2所示核苷酸序列的重组表达载体，将所述重组表达载体转化大肠杆菌感受态细胞获得重组蛋白抗原；(2)将所述重组蛋白抗原免疫动物，经血清分离纯化获得拟南芥ZFN3蛋白多克隆抗体。利用本发明所提供的方法制备的多克隆抗体，能够特异性识别拟南芥ZFN3蛋白，而不能识别拟南芥其他蛋白，在ZFN3蛋白的检测和功能鉴定具有广泛用途。ZFN3蛋白抗体的制备为在拟南芥中检测ZFN3蛋白及研究ZFN3蛋白功能具有一定的意义。

突 野
变 生
体 型

