



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106520777 A

(43)申请公布日 2017. 03. 22

(21)申请号 201610891509.9

(22)申请日 2016.10.12

(71)申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号

(72)发明人 黄志纾 刘慧云 殴田苗 赵勇
古练权 谭嘉恒

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈卫

(51)Int.Cl.

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

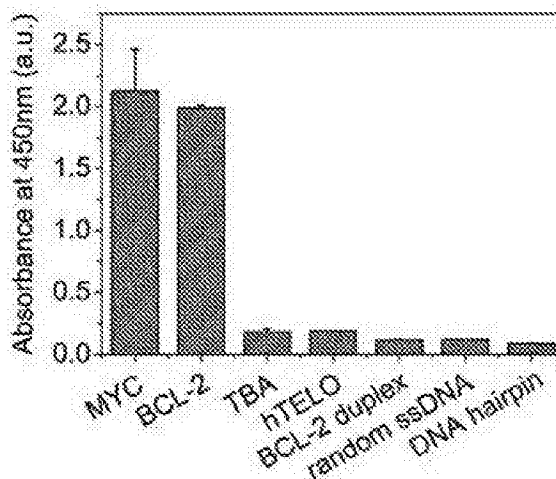
权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图8页

(54)发明名称

一种单链抗体及其在特异性检测正平行型G-四链体中的应用

(57)摘要

本发明属于生物检测技术领域,具体公开了一种单链抗体,及其在特异性检测正平行型G-四链体中的应用。编码该单链抗体的基因序列如SEQ ID NO:1所示。本发明提供的抗体基因序列长度较短,克隆简单,便于表达;其转录翻译的单链抗体片段可以特异性地检测识别正平行构象的G-四链体结构,实现了正平行构象G-四链体结构与其他二级结构的区分,用简单的酶联免疫吸附试验可在体外检测正平行型G-四链体DNA;本发明提供的基因序列所编码的单链抗体作为有用工具实现在细胞内基因组中正平行型构象G-四链体的探测,并可通过共定位的方法实现在细胞内特定定位点检测正平行型构象G-四链体结构的形成及其相应生物功能。



1. 一种单链抗体,其特征在于,编码该单链抗体的基因序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 一种单链抗体的制备方法,其特征在于,将权利要求1所述的基因序列插入到原核表达载体中,获得重组质粒,再将重组质粒转化到大肠杆菌中进行表达与纯化。
3. 权利要求1所述的单链抗体在特异性检测正平行型G-四链体中的应用。
4. 权利要求1所述的单链抗体在制备特异性检测正平行型G-四链体材料中的应用。
5. 一种特异性检测正平行型G-四链体的免疫方法,其特征在于,使用SEQ ID NO:1所示基因序列编码的单链抗体作为探针,用于特异性识别正平行型G-四链体。
6. 根据权利要求5所述的免疫方法,其特征在于,所述的免疫方法为ELISA方法。
7. 根据权利要求6所述的免疫方法,其特征在于,所述的免疫方法为ELISA方法时,具体步骤为:将生物素标记的待测核酸样品结合到链霉亲和素包被的96孔板,4℃过夜,采用ELISA 缓冲液洗板,然后采用封闭液室温孵育,孵育后用 ELISA 缓冲液洗板;加入单链抗体,孵育后用ELISA缓冲液洗板,加入用封闭液稀释的HRP-Protein A,孵育后,用缓冲液洗板;然后加入TMB底物,显色,加入终止液终止反应,用酶标仪测定 450 nm的吸光值。

一种单链抗体及其在特异性检测正平行型G-四链体中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,更具体地,涉及一种单链抗体及其在特异性检测正平行型G-四链体中的应用。

背景技术

[0002] 端粒G-四链体的构象确证一直以来都是G-四链体研究领域的热点,已有结果表明端粒G-四链体在不同的溶液环境中会形成不同的构象,例如,在 K^+ 溶液中,端粒富G序列形成混合型G-四链体,在 Na^+ 溶液中,端粒富G序列形成反平行型G-四链体,而在 Sr^{2+} 溶液中,端粒富G序列则会形成正平行型G-四链体。除此之外,分子拥挤,高温等溶液环境也会促进端粒正平行型G-四链体的形成。但是,这些研究结果都只局限于在体外溶液环境中测得,对于端粒富G序列在细胞内环境下的构象确证依然缺乏相关证据。

[0003] G-四链体这一特殊的核酸二级结构参与的生命事件及其是否能成为药物靶点也引起了研究者的广泛关注。因此,G-四链体在体内是否能够稳定存在以及G-四链体小分子配体能否直接靶向G-四链体结构DNA成为了关键问题。近年来,G-四链体抗体发展成为了研究细胞内G-四链体的有用工具。2001年,Christiane Schaffitzel等利用核糖体展示技术筛选得到的G-四链体抗体Sty49,并利用此抗体检测到了原核生物棘尾虫中端粒G-四链体结构DNA。此研究成果首次证明了体内G-四链体结构的存在。而分别在2013年和2014年,Shankar Balasubramanian等利用噬菌体展示技术筛选得到的高亲和力高选择性G-四链体抗体BG4,首次证明了在哺乳动物细胞中存在DNA G-四链体结构以及RNA G-四链体结构,为体内G-四链体的研究取得了突破性的进展。同时,这些研究结果也表明G-四链体抗体成为了体内G4结构与功能的重要研究工具。目前为止,已发表的用于G4结构与功能研究的G-四链体抗体主要有五个,分别为mev11B4,Sty49,HF2,BG4,1H6。这些抗体都能够特异性识别G-四链体结构DNA,而与其他的DNA二级结构不结合,但是,它们对不同构象G-四链体的选择性较差,这也限制了这些抗体用于特定功能位点的G-四链体的结构研究。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于根据现有技术中的不足,提供了一种单链抗体。

[0005] 本发明的另一目的在于提供上述单链抗体在特异性检测正平行型G-四链体中的应用。

[0006] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

[0007] 本发明提供了一种单链抗体,编码该单链抗体的基因序列如SEQ ID NO:1所示。

[0008] 本发明设计的单链抗体在体外酶联免疫吸附试验中可选择性识别正平行型构象G-四链体DNA,而与混合型G-四链体以及反平行型G-四链体DNA检测不到结合。同时,将纯化的抗体用于细胞内G-四链体的检测,也发现此抗体可选择性识别正平行型构象G-四链体。因此,本发明的单链抗体片段可以用于细胞内源性G-四链体DNA的研究。以基因组DNA以及端粒DNA为例来说明本发明的单链抗体片段使用免疫荧光以及染色质免疫沉淀等方法检测

正平行构象G-四链体核酸二级结构的应用。

[0009] 本发明同时提供了一种单链抗体的制备方法,将SEQ ID NO:1所示的基因序列插入到原核表达载体中,获得重组质粒,再将重组质粒转化到大肠杆菌中进行表达与纯化。

[0010] 本发明同时提供上述单链抗体在特异性检测正平行型G-四链体中的应用。

[0011] 更近一步地,可以将上述单链抗体应用于制备特异性检测正平行型G-四链体的材料,例如,制备成相应的试剂盒或试纸材料。

[0012] 一种特异性检测正平行型G-四链体的免疫方法,具体为使用SEQ ID NO:1所示基因序列编码的单链抗体作为探针,用于特异性识别正平行型G-四链体。

[0013] 优选地,所述的免疫方法为ELISA方法。另外,采用现有其他免疫分析方法特异性检测正平行型G-四链体均在本发明的保护范围之内。

[0014] 更优选地,一种特异性检测正平行型G-四链体的ELISA方法,具体步骤为:将生物素标记的待测核酸样品结合到链霉亲和素包被的96孔板,4℃过夜,采用ELISA缓冲液洗板,然后采用封闭液室温孵育,孵育后用ELISA缓冲液洗板;加入单链抗体,孵育后用ELISA缓冲液洗板,加入用封闭液稀释的HRP-Protein A,孵育后,用缓冲液洗板;然后加入TMB底物,显色,加入终止液终止反应,用酶标仪测定450nm的吸光值。

[0015] 与现有技术相比,本发明具有以下优点及有益效果:

[0016] 本发明提供的抗体基因序列长度较短,克隆简单,便于表达;其转录翻译的单链抗体片段(scFv)可以特异性地检测识别正平行构象的G-四链体结构,实现了正平行构象G-四链体结构与其他二级结构的区分,用简单的酶联免疫吸附试验可在体外检测正平行型G-四链体DNA;本发明提供的基因序列所编辑的抗体蛋白作为有用工具实现在细胞内基因组中正平行型构象G-四链体的探测,并可通过共定位的方法实现在细胞内特定定位点检测正平行型构象G-四链体结构的形成及其相应生物功能。

附图说明

[0017] 图1为基因序列编码的单链抗体片段纯化结果,其中,E-1、E-2、E-3、E-4分别为纯化过程中洗脱下来的目的单链抗体片段四次重复检测。

[0018] 图2为单链抗体片段选择性结合正平行型G-四链体DNA的ELISA结果。

[0019] 图3为单链抗体片段选择性结合正平行型G-四链体DNA的竞争性ELISA结果。

[0020] 图4为单链抗体片段在细胞水平上选择性结合正平行型G-四链体DNA的免疫荧光结果。

[0021] 图5为单链抗体片段与正平行型G-四链体DNA(MYC)的结合常数测定。

[0022] 图6为单链抗体片段选择性在基因组内的结合位点分布。

[0023] 图7为单链抗体片段选择性在基因组内的结合序列G-四链体构象分析。

[0024] 图8为单链抗体片段在活细胞内结合端粒正平行型G-四链体的生物信息学结果分析。

[0025] 图9为单链抗体片段在活细胞内结合端粒正平行型G-四链体的免疫印迹结果分析。

[0026] 图10为端粒DNA在不同离子环境下的G-四链体构象测定。

[0027] 图11为单链抗体片段结合在不同离子环境下的不同构象端粒G-四链体DNA结合常

数测定。

[0028] 图12为单链抗体片段与TRF2共定位检测端粒正平行型G-四链体DNA的免疫荧光结果。

[0029] 图13为单链抗体片段或BG4与TRF2共定位检测端粒G-四链体优势构象的免疫荧光结果。

具体实施方式

[0030] 以下结合具体实施例和附图来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0031] 除非特别说明,本发明所用试剂和材料均为市购。

[0032] 实施例1

[0033] 抗体的筛选:本发明的正平行型G-四链体抗体是采用噬菌体展示技术进行筛选的。筛选抗原为生物素标记的能形成正平行型G-四链体的DNA序列,将其溶解于50mM Tris-HCl (pH 7.4),95℃加热10分钟并缓慢退火至室温,使其形成正平行型G-四链体结构。噬菌体抗体库为Tomlinson (I+J),购买自英国 (Source Bioscience),用于正平行型G-四链体抗体筛选的抗体库为Tomlinson J。抗体筛选过程都严格按照MRC描述的方法开展 (<http://www.geneservice.co.uk/products/proteomic/datasheets/tomlinsonIJ.pdf>),但由于G-四链体抗原的特殊性,在实验中使用ELISA缓冲液 (50mM磷酸钾缓冲液,pH 7.4,100mM氯化钾) 替代了PBS来维持其正平行型G-四链体构象的稳定,用链霉亲和素标记的磁珠替代了免疫管来实现抗原抗体的分离。简单步骤如下所述:

[0034] 首先,将生物素标记的正平行型G-四链体DNA包被在链霉亲和素标记的磁珠上,室温轻摇孵育15分钟,洗去未结合的DNA并用生物素封闭磁珠表面。将 2×10^{14} 个表面携带抗体的噬菌体与竞争性双链DNA平衡1小时之后加入标有正平行型G-四链体的磁珠中,室温孵育1小时,将未结合的噬菌体洗去,与正平行型G-四链体结合噬菌体使用胰酶消化洗脱。洗脱的噬菌体感染TG1大肠杆菌进行扩大培养。历经三轮重复筛选之后,将获得的噬菌体感染HB2151,平板培养获得单菌落,挑取约100个单菌落进行单链抗体的表达,并使用ELISA的方法进行阳性克隆的验证。通过对不同DNA二级结构结合的验证以及对不同构象G-四链体的结合表征,最终获得能特异性识别正平行型G-四链体的单链抗体片段,对其基因序列进行测序分析得到序列SEQ ID NO:1。

[0035] 实施例2

[0036] SEQ ID NO:1所示基因序列编码的单链抗体片段的属性表征,具体步骤如下:

[0037] 1. 测试的核酸样品制备:核酸样品购自英骏生物技术有限公司,将核酸适量溶于磷酸钾的缓冲液中 (ELISA缓冲液:pH 7.4,50mM磷酸二氢钾,100mM KCl),超微量紫外测定浓度,再用ELISA缓冲液稀释成5μM的DNA溶液在95℃下加热5min后缓慢冷却退火到室温,用圆二色谱法测定核酸的DNA二级结构及G-四链体构象。

[0038] 测试的核酸样品代表性序列如表1所示,包括:

[0039] 表1

[0040]

核酸样品	序列	序列号
MYC	TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG	SEQ ID NO: 1
KRAS	AGGGCGGTGTGGGAAGAGGGAAGAGGGGG AGG	SEQ ID NO: 2
KIT1	AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG	SEQ ID NO: 3
KIT2	CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGG	SEQ ID NO: 4
BCL-2	GGGCGGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGG	SEQ ID NO: 5
HIF-1 α	GGGGAGGGGAGAGGGGGCGGGA	SEQ ID NO: 6
VEGF	GGGGCGGGCCGGGGGGCGGGG	SEQ ID NO: 7
RET	GGGTAGGGGCGGGGCGGGGCGGGGGC	SEQ ID NO: 8
hTELO	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	SEQ ID NO: 9
TBA	GGTTGGTGTGGTTGG	SEQ ID NO: 10
HRAS-1	TCGGGTTGCGGGCGCAGGGCACGGGCG	SEQ ID NO: 11
duplex	CGGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGGAGC/G CTCCCGCCCCCTTCCTCCCGCGCCCCG	SEQ ID NO: 12
DNA hairpin	TGCGATACTCATCGCA	SEQ ID NO: 13
Random ssDNA	GGCATAGTGCGTGGGCG	SEQ ID NO: 14

[0041] 2. 单链抗体片段的表达

[0042] 通过基因工程技术将SEQ ID NO:1所示的基因序列插入到原核表达载体pSANG10中,获得重组质粒,经测序验证序列正确。再将重组质粒转化到大肠杆菌(BL21DE3)中进行表达与纯化:将储存在-80℃的菌种接种到5mL 2×TY+2%葡萄糖+50ng/ μ I卡那霉素的培养基中,放入摇床中30℃,200rpm过夜培养;取3mL过夜培养的菌种接种到300mL 2×TY+0.1%葡萄糖+50ng/ μ I卡那霉素的培养基中,放入摇床中37℃,250rpm培养3小时。加入IPTG到培养基中使其终浓度为0.2mM,放入摇床中25℃,280rpm过夜培养。收集过夜培养的细菌,4℃4000rpm离心30分钟,弃去上清,得菌体沉淀。用12mL的TES重悬菌体沉淀,冰上放置10分钟。加入18mL 5倍稀释的TES(50mM Tris-HCl,1mM EDTA,20% sucrose,pH8.0),冰上放置15分钟。4℃8000rpm离心10分钟,取上清液。上清液用镍柱纯化,上样之后,用20mL洗涤液(PBS+100mM NaCl+10mM咪唑,pH8.0)洗去杂蛋白。待杂蛋白冲洗完全,用洗脱液(PBS+250mM咪唑,pH8.0)将抗体洗脱下来。洗脱下来的样品用超滤管超滤脱盐浓缩。浓缩后的样品用BCA法测定抗体浓度并用液氮速冻储存于-80℃。

[0043] 取表达纯化过程中各个阶段的样品进行SDS-PAGE分析,得到结果如下图1所示,洗

脱下来的样品即为目的抗体片段,并且纯度高。纯化获得的单链抗体片段可用于后续的活性表征。

[0044] 3. 单链抗体片段识别正平行型G-四链体DNA检测:

[0045] (1) 体外酶联免疫吸附法检测

[0046] 体外酶联免疫吸附试验(ELISA)方法如下:配制生物素标记的100nM待测G-四链体样品,分别结合到链霉亲和素包被的96孔板,4℃过夜。ELISA缓冲液洗板3次。用封闭液(ELISA缓冲液中加入3%的BSA)室温孵育3小时。ELISA缓冲液洗板3次。加入100μL封闭液稀释的正平行型G-四链体抗体片段,孵育1小时后,用含0.1%Tween20的ELISA缓冲液洗板3次。加入用封闭液以1:5000稀释的HRP-Protein A,孵育1小时后,再用含0.1%Tween20的ELISA缓冲液洗板3次。加入100μL新鲜配制的TMB底物,显色5~30分钟。加入50μL 1mol/L H₂SO₄终止反应,并用酶标仪测定450nm各孔的吸光值。450nm处的吸光值代表抗体与DNA的结合强度,吸光值越高代表结合越强。

[0047] 酶联免疫吸附法试验(ELISA)的结果显示(图2),单链抗体高选择性结合正平行型G-四链体DNA(MYC和BCL-2),对反平行型G-四链体(TBA)、混合型G-四链体(hTELO)、双链DNA、单链DNA以及发卡DNA结构未检测到结合,说明本发明所提的基因序列所编辑的单链抗体片段高选择性识别正平行型构象G-四链体DNA。

[0048] 竞争性ELISA进一步验证抗体结合正平行型G-四链体的特异性,即在上述的ELISA实验方法加入抗体的步骤之前,将抗体与等量的竞争性DNA先孵育1个小时。检测结果显示(图3),正平行型构象的G-四链体(MYC,KIT1,KIT2,HIF-1α,VEGF,KRAS,RET)可完全竞争结合单链抗体,而混合型G-四链体(hTELO)、反平行型G-四链体(TBA,HRAS-1)以及非G4序列(duplex,Random ssDNA,DNA Hairpin)都表现为很弱的竞争能力或无竞争能力。这一结果与之前的测定结果保持一致。

[0049] (2) 细胞内免疫荧光法检测

[0050] 接种数量为 4×10^5 的SiHa细胞于confocal专用皿中,过夜培养待细胞贴壁,用Lipo2000分别转染200nM的Cy5荧光基团标记的正平行型G-四链体DNA MYC以及反平行型G-四链体DNA TBA入SiHa细胞,培养24小时,收集细胞。用4%多聚甲醛室温避光固定15分钟,PBS洗5分钟,共洗3次,用0.3%Triton X-100(破膜)孵育室温孵育30分钟,PBS洗5分钟,3次,用5%山羊血清封闭液封闭细胞,室温孵育3小时,直接孵育大连抗体片段,4℃过夜,封闭液洗细胞样品,因单链抗体片段上携带FLAG标签,因此孵育抗FLAG的一抗标记scFv,4℃过夜,封闭液洗去未结合的抗体,同时孵育荧光标记的二抗以及DAPI(染细胞核),室温孵育1小时,用封闭液洗去未结合的抗体及核染料后,使用激光共聚焦显微镜进行成像分析。

[0051] 免疫荧光法的结果显示(图4),本发明所提的基因序列编辑的单链抗体片段在细胞内显示的荧光点与荧光标记的正平行型G-四链体MYC的重叠融合高达80%,而与反平行型G-四链体TBA的荧光点重叠小于20%,表明,D1在细胞内对正平行型G-四链体的结合依然保持构象选择性,可用于细胞内正平行型构象G-四链体DNA的检测。

[0052] 4. 单链抗体片段与正平行型G-四链体抗体的结合常数测定

[0053] 为定量表征本发明所提的基因序列编辑的单链抗体片段对不同构象G-四链体的亲和力,用ELISA的方法测定了scFv对MYC、TBA和hTELO的结合常数,结果显示(图5),D1对正平行型构象G-四链体MYC的结合常数为 27.8 ± 0.9 nM,而对反平行型G-四链体TBA以及混合

型G-四链体hTELO检测不到结合。这一结果也同时验证本发明所提的基因序列编辑的单链抗体片段特异性结合正平行型构象G-四链体,并且结合亲和力高。

[0054] 实施例3

[0055] 将发明单链抗体应用于基因组正平行型G-四链体DNA的检测

[0056] 为检测基因组正平行型G-四链体在活细胞内的形成并稳定存在,将SEQ ID NO:1所示的基因片段插入真核表达载体pEGFP-N3质粒中,通过瞬时转染的方法使单链抗体片段在活细胞中表达24小时。将表达了单链抗体片段的SiHa细胞收集,用1%多聚甲醛交联固定15分钟,终止交联裂解细胞,用Micrococcal Nuclease (Chip Grade) 切断染色质得到200到500bp的染色质片段,该染色质片段去10%作为Input,剩下的进行后续的染色质免疫沉淀实验。将已经结合染色质上正平行型G-四链体DNA与scFv复合物用Protein A进行分离,最终得到scFv结合的来自人基因组的DNA片段。

[0057] 将上述实验获得的DNA片段进行Hi-seq2500测序分析,结果显示(图6),相比于Input,本发明的单链抗体片段在活细胞内富集了8345个显著峰,显示正平行型G-四链体广泛分布在基因组中。单链抗体片段的结合位点主要分布于基因区(69.7%),剩下的都分布在基因间区(30.3%)。正平行型G-四链体在基因区的分布情况为非翻译区UTR(5%),启动子转录起始位点promoter-TSS(16.8%),转录终止位点TTS(1.7%),外显子(14.7%)以及内含子(30.3%)。

[0058] 为了验证本发明所提的基因序列所编辑的单链抗体片段在活细胞内结合的DNA片段是否为正平行型G-四链体DNA,从由scFv富集的前99个峰中选取寡核苷酸分别用圆二色谱法(CD)验证。结果显示(图7),大部分的DNA片段形成了正平行型构象的G-四链体(91/99, 92%),剩下的DNA形成了混合型G-四链体,而在混合型G-四链体的CD图谱中也是以正平行型构象吸收峰为主峰。结果证明了本发明所提基因序列所编辑的单链抗体片段在基因组中选择性结合正平行型G-四链体的特性。

[0059] 实施例4

[0060] 将本发明单链抗体应用于端粒正平行型G-四链体DNA的检测

[0061] 人端粒DNA由TTAGGG重复序列组成,符合形成G-四链体的序列特征,为了探究正平行型G-四链体结构是否在细胞内端粒区稳定形成,根据上述ChIP-seq数据,我们设定出现大于3个TTAGGG/CCCTAA重复序列的峰为端粒峰,进行进一步的生物信息学数据分析。结果显示(图8),在scFv ChIP样品中,含有我们设定的端粒峰是Input样品中的4.8倍,说明细胞内端粒正平行型G-四链体被scFv检测到并被富集。同时,得到的样品做端粒dot blotting分析得到结果显示(图9),scFv能够明显富集端粒序列,说明D1在活细胞内结合到正平行型端粒G-四链体,也同时说明这种二级结构的在活细胞内的形成并稳定存在。

[0062] 已有文献报道,端粒富G序列在不同溶液背景下形成不同构象的G-四链体结构,我们选用了三种离子溶液环境下形成的三种不同构象端粒G-四链体以检测本发明的单链抗体片段对其结合能力。首先,我们通过CD实验验证了端粒富G序列在Na⁺离子溶液中退火形成反平行型G-四链体,在K⁺离子溶液中退火形成混合型G-四链体,在Sr²⁺溶液中,则形成正平行型G-四链体(图10)。在此三种溶液条件下,我们用ELISA实验分别检测scFv与三种不同构象端粒G-四链体的结合能力,结果显示(图11),scFv与由Sr²⁺诱导的正平行型端粒G-四链体的结合常数为17.6±0.8nM,而与混合型以及反平行型的端粒G-四链体检测不到结合,此

结果再一次说明了scFv与正平行型构象G-四链体结合的选择性,为细胞内端粒正平行型构象G-四链体的检测提供了可靠依据。

[0063] 免疫荧光结果显示(图12),相比于未处理细胞中的scFv与TRF2融合荧光点,经RNase处理后的细胞中融合点并未发生显著变化,说明端粒区正平行型构象G-四链体DNA的存在。相应的经DNase处理后的细胞中融合点减少,也说明端粒区正平行型G-四链体DNA的形成并被本发明所提基因序列编辑的单链抗体片段特异性识别而检测到。

[0064] 此外,我们将本发明设计的单链抗体(scFv)用于探究细胞内端粒G-四链体的主要存在构象,利用BG4与scFv这两个G4抗体进行了定量分析研究。抗体BG4能够结合不同构象的G-四链体DNA,而本发明所提基因序列编辑的scFv选择性结合正平行型构象的G4DNA,通过对比检测D1、BG4与端粒结合蛋白TRF2的共定位量来判断端粒G-四链体构象的唯一性或多样性。结果显示(图13),在两组细胞端粒结合蛋白TRF2荧光点计数无显著变化的情况下,细胞核内BG4检测到的G-四链体的量明显多于scFv检测到的正平行型G-四链体的量,说明体内存在不同构象的G-四链体DNA,并且BG4检测到的端粒G-四链体的量也多于scFv检测到的正平行型G-四链体的量,但增加倍数不大(1.3倍),说明端粒区除了正平行型构象G-四链体之外,还存在其他两种构象的G-四链体(混合型和反平行型),而正平行型构象可能是端粒G-四链体在细胞内的主要存在方式(77%)。

[0065] 上述结果表明本发明提供的单链抗体是一个优秀的大分子探针,可用于细胞内基因组以及特定功能区域的正平行型G-四链体DNA的结构研究。

SEQUENCE LISTING

<110> 中山大学

<120> 一种单链抗体及其在特异性检测正平行型G-四链体中的应用

<130>

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 735

<212> DNA

<213> 单链抗体

<400> 1

```

atggccgagg tgcagctgtt ggagtctggg ggaggettgg tacagcctgg ggggtccctg      60
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgcatgag ctgggtccgc      120
caggtccag ggaaggggct ggagtgggtc tcagctatta ctaagaatgg tgcggcgaca      180
aggtagcgag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaattc caagaacacg      240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaag      300
ggatcatcaga ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gacgggtgga      360
ggcgggttcag gcggagggtg cagcggcggg ggcgggtcga cggacatcca gatgaccag      420
tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg ccgggcaagt      480
cagagcatta gcagctatth aaattggtat cagcagaaac cagggaagc ccctaagctc      540
ctgatctatg ctgcatccag ttgcaaagt ggggtcccat caaggttcag tggcagtgga      600
tctgggacag atttcactct caccatcagc agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac      660
tactgtcaac agagttacag taccctaat acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc      720
aaacgggcgga ccgca

```

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> MYC

<400> 2

```

tggggagggt ggggagggtg gggaagg

```

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> KRAS

<400> 3

```

agggcgggtg gggaagaggg aagaggggga gg

```

<210> 4

<211> 22

<212>	DNA	
<213>	KIT1	
<400>	4	
	agggagggcg ctgggaggag gg	22
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	KIT2	
<400>	5	
	cgggcgggcg cgagggagg g	21
<210>	6	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	BCL-2	
<400>	6	
	gggcgggcgc gggaggaagg gggcggg	27
<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	HIF-1 α	
<400>	7	
	ggggagggga gagggggcgg ga	22
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	VEGF	
<400>	8	
	ggggcgggcc gggggcgggg	20
<210>	9	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	RET	
<400>	9	
	gggtaggggc ggggcggggc gggggc	26
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	hTELO	
<400>	10	

gggttagggg tagggtagg g	21
<210> 11	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> TBA	
<400> 11	
ggttggtgtg gttgg	15
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> HRAS-1	
<400> 12	
tcgggttgcg ggcgagggc acgggagc	27
<210> 13	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> dupIex-1	
<400> 13	
cgggcgcggg aggaaggggg cgggagc	27
<210> 14	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> dupIex-2	
<400> 14	
gctcccgccc ccttcctccc gcgccc	27
<210> 15	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> DNA hairpin	
<400> 15	
tgcgatactc atcgca	16
<210> 16	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Random ssDNA	
<400> 16	
ggcatagtgc gtgggagc	17

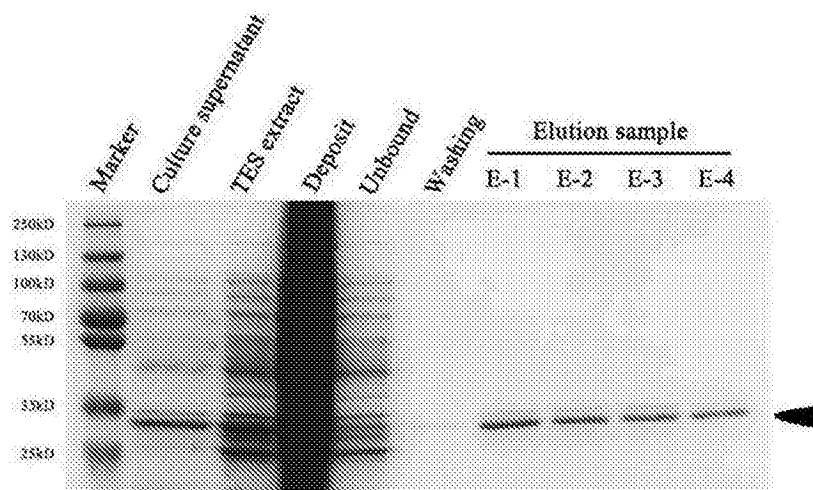


图1

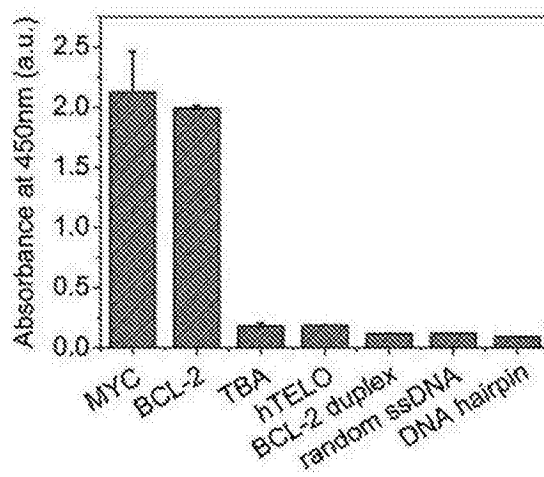


图2

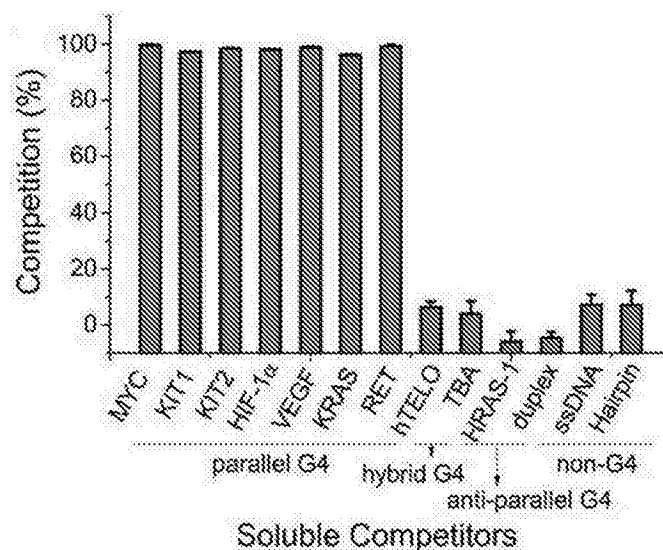


图3

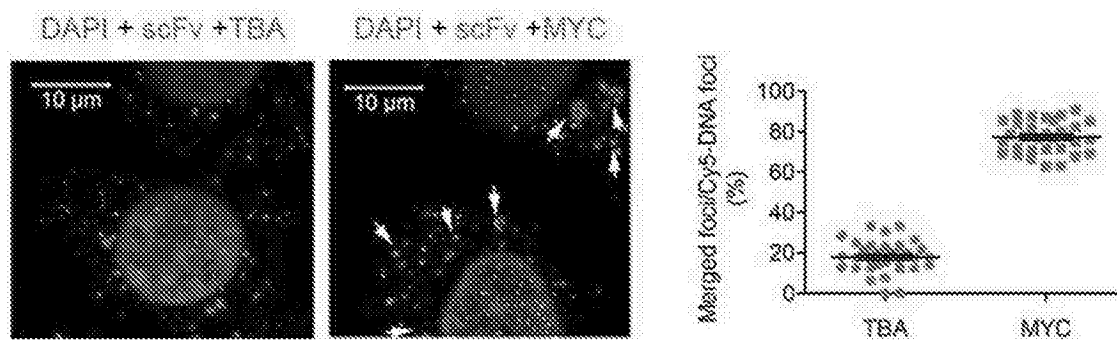


图4

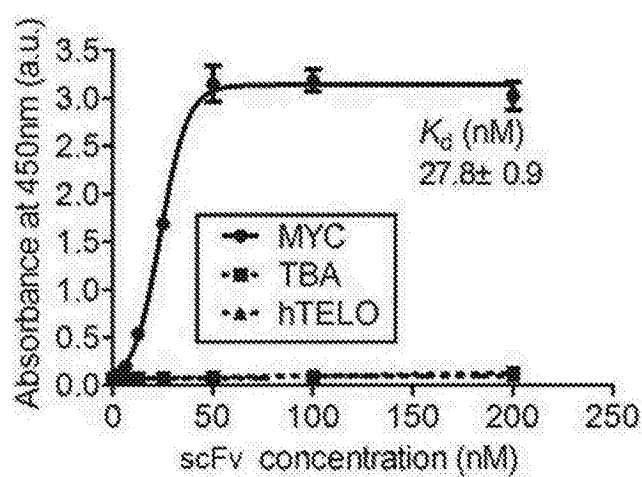


图5

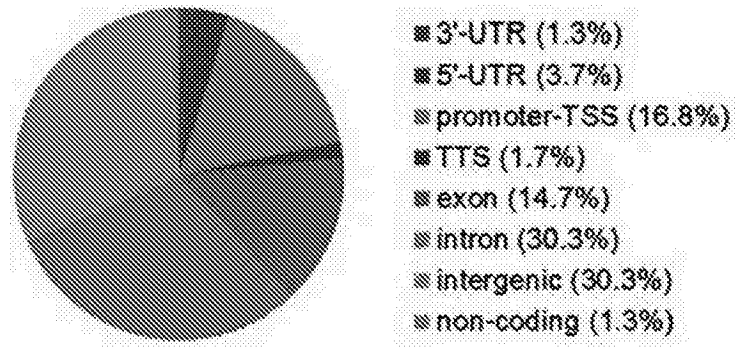
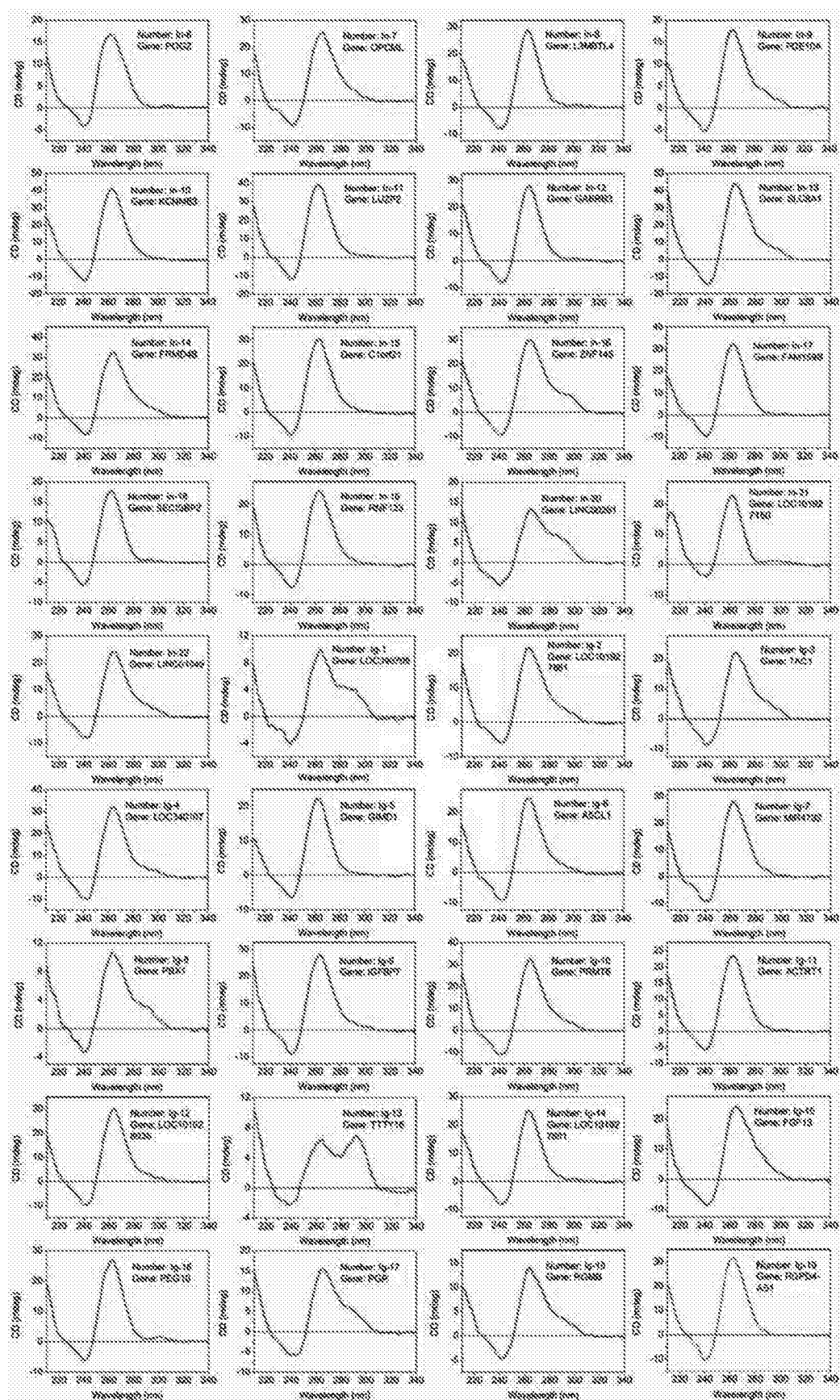
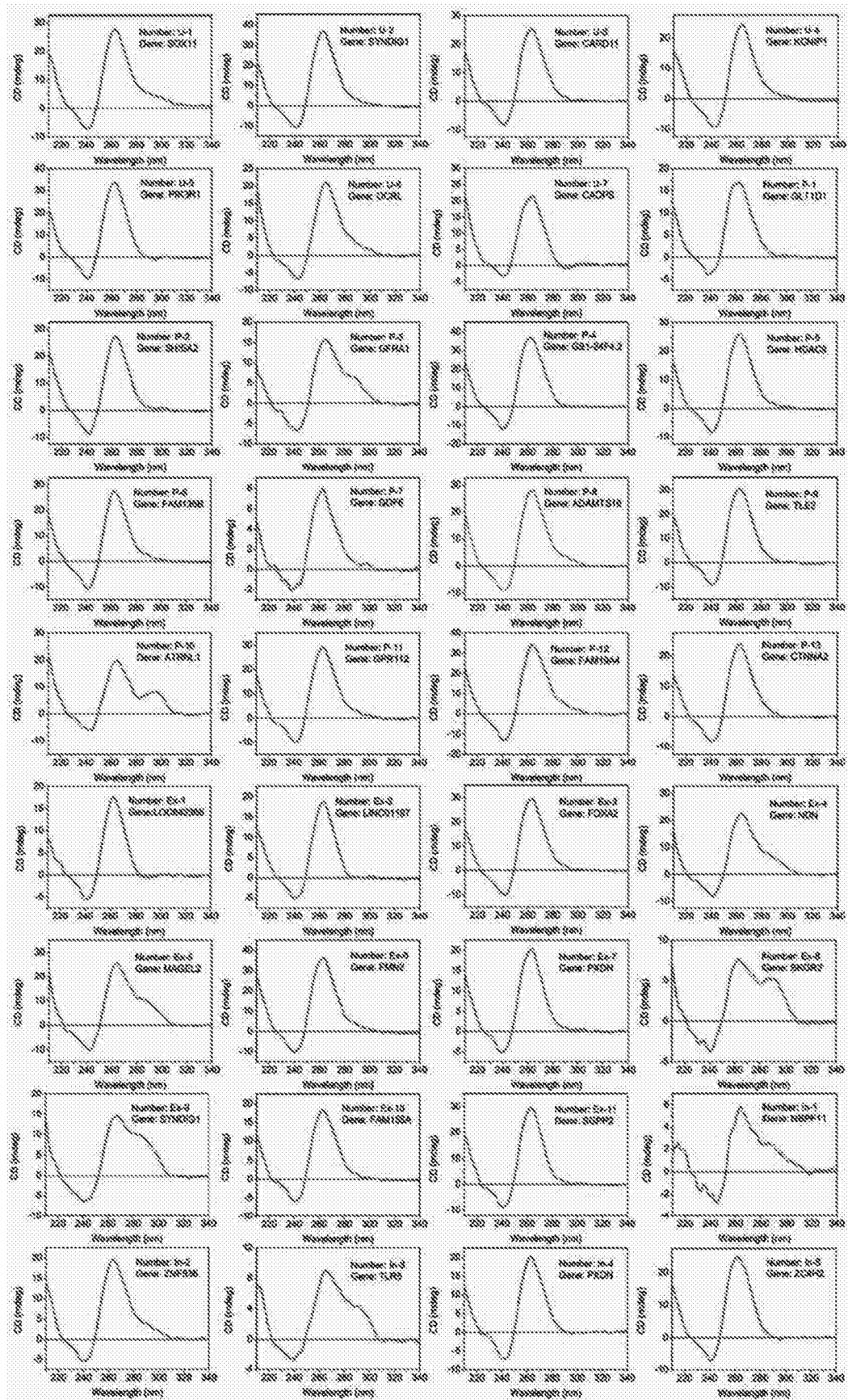


图6





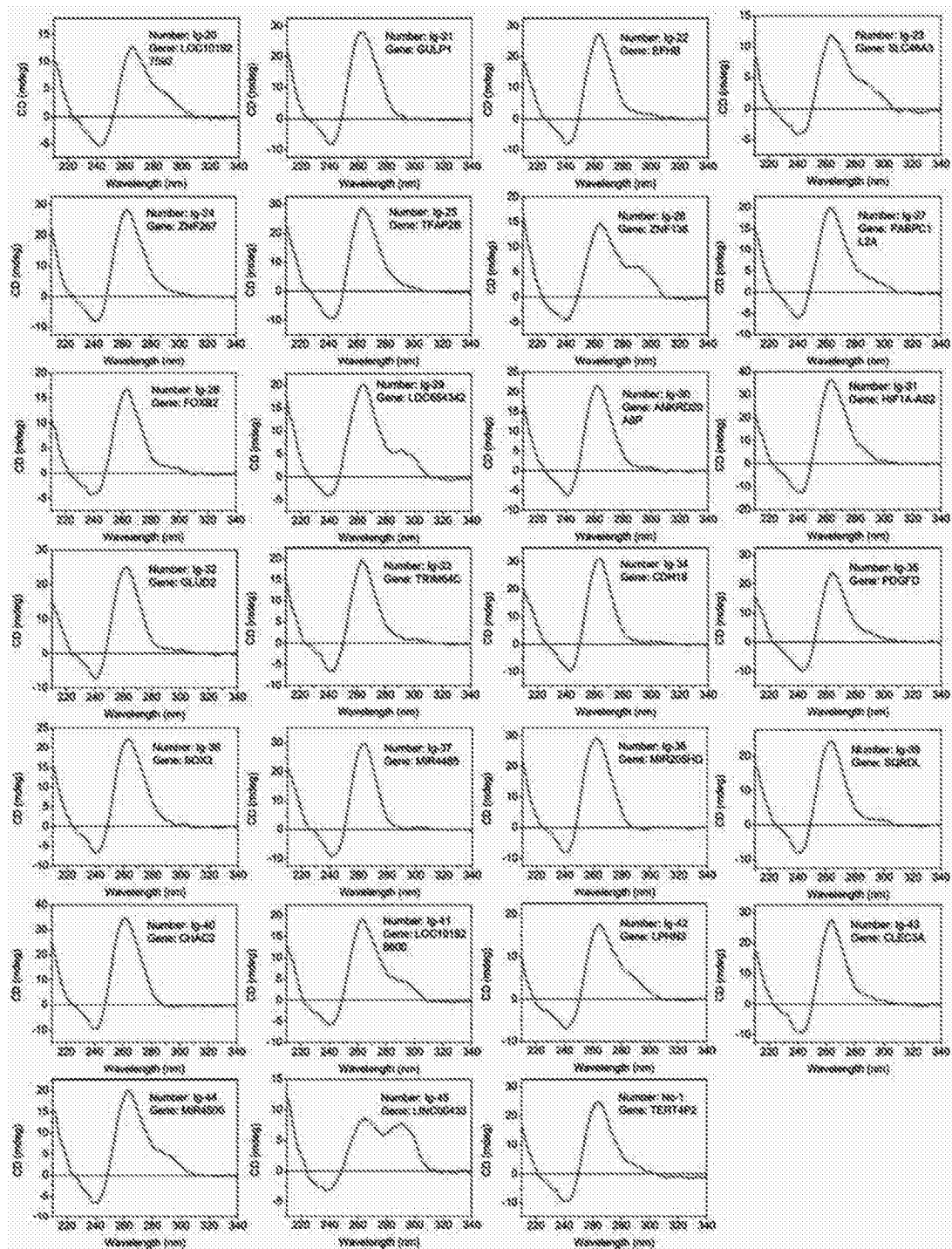


图7

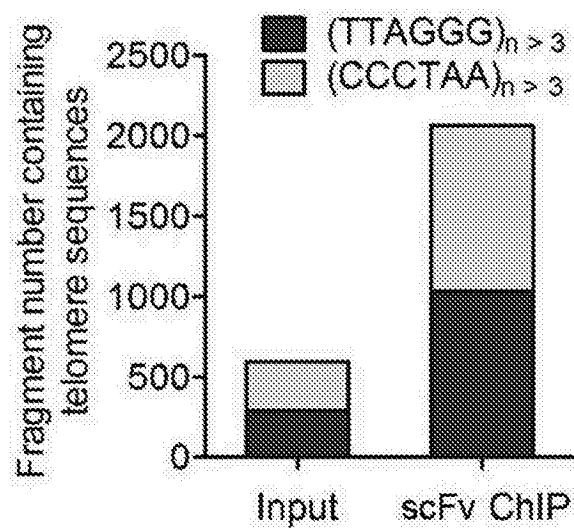


图8

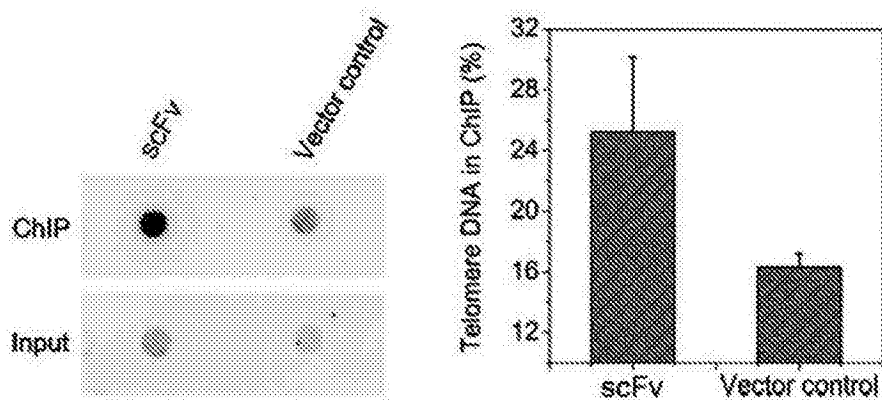


图9

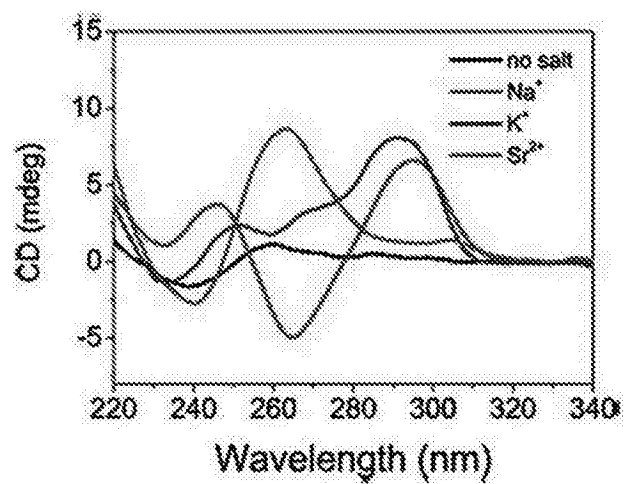


图10

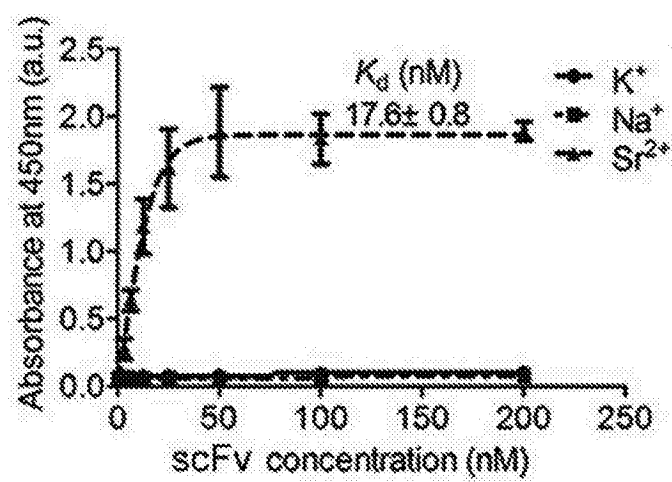


图11

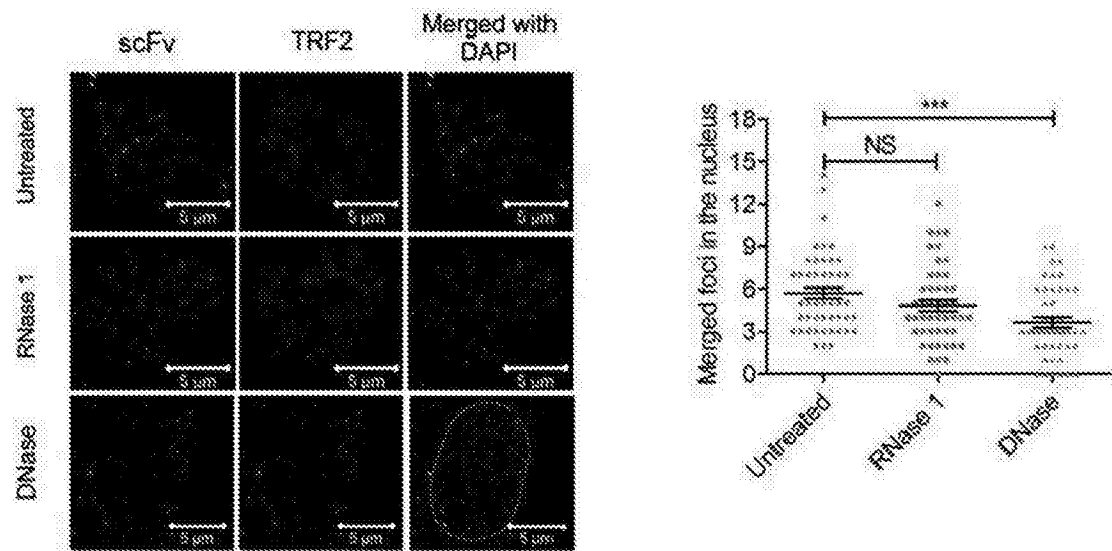


图12

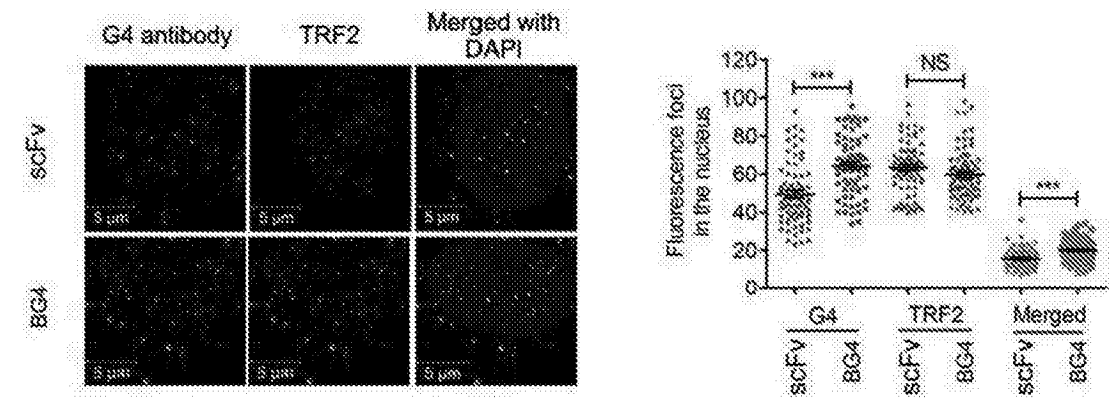


图13

专利名称(译)	一种单链抗体及其在特异性检测正平行型G-四链体中的应用		
公开(公告)号	CN106520777A	公开(公告)日	2017-03-22
申请号	CN201610891509.9	申请日	2016-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	黄志纾 刘慧云 殴田苗 赵勇 古练权 谭嘉恒		
发明人	黄志纾 刘慧云 殴田苗 赵勇 古练权 谭嘉恒		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/70 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/622 G01N33/5308 G01N33/543		
代理人(译)	陈卫		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物检测技术领域，具体公开了一种单链抗体，及其在特异性检测正平行型G-四链体中的应用。编码该单链抗体的基因序列如SEQ ID NO：1所示。本发明提供的抗体基因序列长度较短，克隆简单，便于表达；其转录翻译的单链抗体片段可以特异性地检测识别正平行构象的G-四链体结构，实现了正平行构象G-四链体结构与其他二级结构的区分，用简单的酶联免疫吸附试验可在体外检测正平行型G-四链体DNA；本发明提供的基因序列所编码的单链抗体作为有用工具实现在细胞内基因组中正平行型构象G-四链体的探测，并可通过共定位的方法实现在细胞内特定定位点检测正平行型构象G-四链体结构的形成及其相应生物功能。

