



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101935338 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201010278259. 4

(22) 申请日 2010. 09. 10

(71) 申请人 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工业
区综合楼

(72) 发明人 徐宁志 曹英豪 李莉云 刘丽娟
李倩

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 程泳

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006. 01)

C07K 16/16 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

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

一种网状蛋白抗原表位、抗网状蛋白抗体及其用途

(57) 摘要

本发明属于分子生物学和免疫学领域, 涉及网状蛋白抗原表位、抗网状蛋白抗体及其用途。具体地, 所述网状蛋白抗原表位具有 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所示的序列。本发明还涉及一种抗网状蛋白多克隆抗体, 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、以及检测网状蛋白的方法。

1. 一种网状蛋白抗原表位,其由 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列组成。
2. 一种组合物,其中含有权利要求 1 所述的网状蛋白抗原表位,任选地,还含有用于免疫的佐剂。
3. 一种网状蛋白抗原表位-载体复合物,其中,所述网状蛋白抗原表位为权利要求 1 所述的网状蛋白抗原表位,所述载体选自钥孔戚血蓝素、BSA、以及酪蛋白。
4. 一种抗网状蛋白抗体的制备方法,包括使用权利要求 1 的网状蛋白抗原表位或者权利要求 2 的组合物或者权利要求 3 的复合物的步骤;任选地,所述抗网状蛋白抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体;具体地,所述制备方法包括如下步骤:
 - 1) 将权利要求 1 所述的网状蛋白抗原表位或者权利要求 2 的组合物或者权利要求 3 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,得到抗网状蛋白多克隆抗体。
5. 一种多抗血清,其由权利要求 1 的网状蛋白抗原表位或者权利要求 2 的组合物或者权利要求 3 的复合物免疫动物制得。
6. 一种抗网状蛋白抗体,其能够特异地结合权利要求 1 所述的网状蛋白抗原表位,任选地,其为多克隆抗体或者单克隆抗体。
7. 一种组合物,其包含权利要求 6 所述的抗网状蛋白抗体。
8. 一种网状蛋白检测剂,其包含权利要求 6 所述的抗网状蛋白抗体。
9. 权利要求 6 所述的抗体在制备检测网状蛋白的药物中的用途。
10. 一种检测网状蛋白的方法,所述方法包括使用权利要求 6 所述的抗网状蛋白多克隆抗体的步骤;具体地,所述网状蛋白为水稻的网状蛋白。

一种网状蛋白抗原表位、抗网状蛋白抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和免疫学领域。具体地,涉及一种网状蛋白抗原表位、抗网状蛋白抗体。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网状蛋白中的用途。

背景技术

[0002] 网状蛋白(Reticulon protein)家族是一类结构蛋白,也是内质网的构成成分。真核生物的网状蛋白家族均与内质网的组成紧密相关。网状蛋白的氨基末端区域互不相连,在羧基末端却有一个相似序列(SEQ ID NO:1),该区域包含两个的大疏水性区域,被66个亲水残基片段分隔开。实验证明,C端保守的疏水性片段在网状蛋白和内质网膜的联系中发挥重要作用。预测疏水性片段被包埋在膜内核而66个亲水残基位于膜外表面。大多数网状蛋白在C端均有一个赖氨酸固位基序。因为网状蛋白与粗面内质网及光面内质网可能存在的内在联系,他们可能在细胞运输过程及维持细胞内Ca离子水平稳定发挥重要作用。网状蛋白被认为是与内质网密切相关的类似通道的蛋白质(Thereticulons:a family of proteins with diverse functions YvonneS Yang and Stephen MStrittmatter Genome Biol. 2007 ;8(12) :234. Published online 2007 December 28. doi :10.1186/gb-2007-8-12-234. PMID :PMC2246256)。

[0003] 在水稻中,网状蛋白由位于第4号染色体上的基因Os04t0670000(GenBank中的ID号为NM_001060744)编码,该基因具有2915个碱基,于2004年首次被Sasaki, T.等人发现,(Submitted(25-OCT-2004)Contact:Takuji Sasaki National Institute of Agrobiological Sciences, Rice Genome Research Program ;Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan)。该基因编码框长600bp(SEQ ID NO:2),编码的网状蛋白(SEQ ID NO:3)具有199个氨基酸,分子量约22kda。

[0004] 然而,迄今为止,水稻网状蛋白仍属于高度有待鉴定的蛋白,该蛋白在转录水平上的活动是其存在的证据。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,如果用网状蛋白制备抗原的话,无论是从重组表达还是化学合成,全长的氨基酸序列有1996个氨基酸,蛋白质空间结构的重建是一个很困难的工作,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网状蛋白本身的抗原表位(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。

[0005] 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. 2008 Nov-Dec ;21(6) :431-41)。

发明内容

[0006] 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 12 个抗原表位中有一个抗原表位序列 DTIISKTGESTKQK (SEQ ID NO :4) 是最有效的抗原表位,并且其具有良好的抗原特异性,并且制备了能与网状蛋白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:

[0007] 本发明的一个方面涉及一种网状蛋白抗原表位,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :4 所示。

[0008] 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 DTIISKTGESTKQKC (SEQ ID NO :5) 的抗原表位。

[0009] 半胱氨酸也可以加在多肽的 N 末端,得到序列为 CDTIISKTGESTKQK (SEQ ID NO :6) 的抗原表位。

[0010] 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,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。

[0011] 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。

[0012] 本发明的还一方面涉及一种组合物,其包含 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所示的网状蛋白抗原表位,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。

[0013] 本发明的还一方面涉及一种网状蛋白抗原表位-载体复合物;其中,所述网状蛋白抗原表位为本发明的网状蛋白抗原表位,所述载体可以是钥孔戚血蓝素 (KLH)、BSA、或酪蛋白等。

[0014] 本发明的还一方面涉及一种抗网状蛋白抗体,所述抗网状蛋白抗体能够特异性地结合 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所示的网状蛋白抗原表位。所述抗网状蛋白抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

[0015] 本发明的抗网状蛋白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。

[0016] 对本领域技术人员而言,可以根据 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所示的网状蛋白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 Nature 1975Kohler&Milstein Vol256, p495。

[0017] 本发明的还一方面涉及一种含有抗网状蛋白多克隆抗体的血清(简称多抗血清),其通过使用 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所示的抗原表位免疫动物制得。

[0018] 本发明的还一方面涉及一种抗网状蛋白多克隆抗体制备方法,包括将 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所示的网状蛋白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。

[0019] 本发明的一个实施方案中,所述抗网状蛋白多克隆抗体制备方法,包括如下步骤:

[0020] 1) 将 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所示的网状蛋白抗原表位作为抗原免疫动物;

[0021] 2) 取血,离心收集多抗血清;和

[0022] 3) 纯化步骤 2) 中的多抗血清,得到抗网状蛋白多克隆抗体。

[0023] 本发明的还一方面涉及一种组合物,其包含本发明的抗网状蛋白多克隆抗体。

[0024] 本发明的还一方面涉及一种网状蛋白检测剂,其包含本发明的抗网状蛋白多克隆抗体。

[0025] 其中由于网状蛋白在多个物种中是保守的(见下面的 SEQ ID NO :1),而且本发明中作为抗原表位的 SEQ ID NO :4 存在于保守序列中(参见 SEQ ID NO :1 中加框的序列),因此本发明的多克隆抗体不仅可以检测水稻中的网状蛋白,也可以检测其它多个物种(例如人类、白喉麻雀、秀丽隐杆线虫、拟南芥,等等)中的网状蛋白。

[0026] MATTSRRSXXXXXXXXXXXXXXXXXWRRRNXXXXXXXXXXXXXXXXXWFLFERAGYSFPSVMANALLLVAILFFWAKSASXXXXXXXXXXXXXEVSDVVVEKAADRALVWINKVLAUGHDIKIKRDRSVFIKVLILWVVSYIGMLFNFLTIYIGVMFSLLPPLYEKYQDQVDEKIGMAHSVLSRHL **DTIISKTGESTKQK** KTE (SEQ ID NO :1)

[0027] 其中, X 代表任意氨基酸,加边框的序列为 SEQ ID NO :4。

[0028] 本发明的还一方面涉及本发明的抗网状蛋白多克隆抗体在制备检测网状蛋白的药物中的用途。

[0029] 本发明的还一方面涉及一种检测网状蛋白的方法,所述方法包括使用本发明的抗网状蛋白多克隆抗体的步骤。具体地,包括如下步骤:

[0030] 1) 将待测样品与本发明的抗网状蛋白多克隆抗体孵育,使所述的抗网状蛋白多克隆抗体与待测样品中的网状蛋白特异性结合,由此形成免疫复合物;和

[0031] 2) 检测是否存在免疫复合物。

[0032] 上述检测网状蛋白的方法可以检测网状蛋白的有无、对其进行半定量(例如 western blot 方法);在有网状蛋白标准品的情况下,还可以通过 ELISA 方法对网状蛋白进行定量检测。

[0033] 在本发明的一个实施方案中,所述网状蛋白为水稻的网状蛋白。具体的,所述水稻为水稻 93-11。

[0034] 发明的有益效果

[0035] 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),特异性高;

[0036] 2) 本发明提供的网状蛋白抗原合成简易,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。

[0037] 3) 本发明提供的多克隆抗体可用于所有检测网状蛋白存在与否的试剂。

[0038] 4) 本发明提供的多克隆抗体可对水稻中网状蛋白在不同时空、不同生长条件下的表达情况进行分析研究,将进一步解释网状蛋白的功能和作用机理提供重要的线索。

附图说明

[0039] 图 1 :使用抗网状蛋白多克隆抗体 1 对网状蛋白在水稻不同组织的免疫印迹检测结果。

具体实施方式

[0040] 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。

[0041] 实施例 1 :候选抗原表位 1 的预测

[0042] 水稻网状蛋白对应的基因在 GenBank 中的基因 ID 为 NM-001060744。读码框序列如下:

[0043] ATGGCCACCACCTCCCGCCGATCCCTCCACGCCCTCCTCGGCGGCGGCGCAGTCGCCGACTTGGTGCTGTGGCGGCGGAGGAACGTGTCCGCGGCGGCCGTGGCGGGCGCCACGGCGGTGTGGTTCCTCTTCGAGCGCGGGGTA CAGCTTCCCGTCAGTCATGGCCAACGCCCTGCTCCTCCTCGTCGCCATCCTCTTCTTCTGGGCCAAGTCCGCCTCGC TGCTCAACAGGCCTCTTCCACCCTCCCTAAACTAGAGGTCTCAGATGTGGTTGTTGAGAAAGCTGCAGATCGGGCT CTTGTATGGATCAACAAGGTGTTGGCTGTTGGCCATGATATTGCCATCAAGAGAGATAGGAGTGT TTTTATAAAGGT TATATTGATTTTATGGGTGGTTTCATACATTGGAATGCTCTTCAACTTCCTTACGCTCATTTACATTGGTGTAAATGT TTTCTCTGTTAGTTCCACCATTGTATGAGAAGTACCAGGACCAAGTCGATGAAAAGATTGGTATGGCGCACAGTGTA CTATCAAGGCACTTAGATACCATCATTAGCAAGACTGGAGAATCAACCAAGCAAAAAGAAGACTGAGTAA (SEQ ID NO :2)

[0044] 所编码的水稻网状蛋白全长序列如下:

[0045] MATTSRRSLHALLGGGAVADLVLRWRRRNVSAAA VAGATAVWFLFERAGYSFPSV MANALLLVAILFFW AKSASLLNRPLPLPKLEVSDVVVEKAADRALVWINKVLA VGHDI AIKRDRSVFIKVILILWVVS YIGMLFNFLTLI YIGVMFSLLPPLYEKYQDQVDEKIGMAHSVLSRHL **DTIISKTGESTKQK** KTE (SEQ ID NO :3,其中加框的序列为 SEQ ID NO :4)

[0046] 然后根据 SEQ ID NO :3,用 BEPITOPE 软件对水稻网状蛋白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 inproteins[J]. J Mol Recognit, 2003, 16(1) :20-22。

[0047] 一共预测得到了 12 个候选的抗原表位,选出抗原表位峰值较高的片段 DTIISKTGESTKQK (SEQ ID NO :4)。

[0048] 然后该片段在 TIGR 水稻数据库 (<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。

[0049] 实施例 2 :抗原表位 1 的化学合成

[0050] 实施例 1 中得到的候选抗原表位 1 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:DTIISKTGESTKQKC(SEQ ID NO :5)。

[0051] 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),得到网状蛋白的抗原表位 1。

[0052] 实施例 3:抗原表位 1-KLH 复合物的制备

[0053] 采用戊二醛连接法,将实施例 2 中合成的抗原表位 1 的 C 端与交联载体蛋白-钥孔戚血蓝素(KLH) 交联,得到抗原表位 1-KLH 复合物。

[0054] 具体实施步骤如下:

[0055] 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 1-KLH 复合物。

[0056] 实施例 4:多抗血清 1 的制备

[0057] 取 1-2mg 实施例 3 中制备的抗原表位 1-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(5000r pm 离心 10min),收集上清,测效价。同时按照相同的步骤,用抗原表位 1(SEQ ID NO :5) 作为对照。

[0058] 具体步骤如下:

[0059] 取 1-2mg 实施例 3 中制备的抗原表位 1-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。

[0060] 其中,耳静脉取血进行效价检测(ELISA 法)的步骤如下:

[0061] 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 I g 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。使用酶标仪测定 A490nm 值,高于免疫前血清 10 倍的为阳性。

[0062] 经过 2 次加强免疫后,效价检测的结果如下:

[0063] 多抗血清 1(抗原表位 1-KLH 复合物免疫) > 102400(抗原表位 1-KLH 复合物有免疫原性的最大稀释倍数是 102400);

[0064] 裸肽免疫(抗原表位 1, SEQ ID NO :5)得到的多抗血清 > 102400(仅仅由抗原表位 1 组成的裸肽具有免疫原性的最大稀释倍数是 102400)。

[0065] 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。将收集的血样在 3-4 $^{\circ}$ C 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 1(耳静脉检测效价符合要求后,颈动脉取的血样不必再检测效价)。无菌分装保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

[0066] 实施例 5:抗网状蛋白多克隆抗体 1(多抗 1)的制备

[0067] 将实施例 4 中制备的多抗血清 1 进行纯化,制得多克隆抗体 1(多抗 1)。

[0068] 将抗原表位 DTIISKTGESTKQKC(SEQ ID NO :5) 多肽与溴化氰活化的 Sepharose 4B 偶联,制备多肽亲和层析柱。

[0069] 将制备的多抗血清 1 加入到以上制备的层析柱中,放置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,洗脱抗

体,即得到抗网状蛋白多克隆抗体(多抗1)。

[0070] 实施例6:多抗1对网状蛋白的特异性检验

[0071] 选取新鲜的水稻93-11(获自国家杂交水稻工程技术中心)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(共9个部位),分别提取总蛋白质。

[0072] 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 μ l粉末加入800 μ l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 $^{\circ}$ C,12000r/min离心15分钟。取上清,转移到新的离心管中,-70 $^{\circ}$ C保存。得到水稻总蛋白。

[0073] Western印记:

[0074] 将提取的上述水稻蛋白质进行SDS-PAGE(12%),检测时,Marker(Transgen Biotech,货号:DM 201)和上述9个部位的水稻总蛋白的上样量从左至右依次为:10 μ l、7 μ l、8 μ l、7 μ l、6 μ l、6 μ l、6 μ l、10 μ l、3 μ l、5 μ l(图1)。

[0075] SDS-PAGE后电转移到PVDF膜上,用5%的脱脂奶粉封闭PVDF膜。使用实施例5中制备的多抗1,以1:1000稀释后室温孵育3小时,TTBS(2mmol/L Tris·HCl pH7.6,13.6mmol/L NaCl,0.1% Tween-20)洗膜3次,每次5分钟。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1小时,TTBS洗膜3次,每次5分钟。加ECL Plus显色剂显色,暗室曝光5分钟。结果如图1所示,抗体有特异性,只有1条明显的主带,并且在水稻的不同发育时期,该蛋白均有表达且表达量趋于稳定。

[0076] 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1特异性结合的就只有网状蛋白一个。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TIGR水稻数据库作用相同,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网状蛋白。

[0077] 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> 一种网状蛋白抗原表位、抗网状蛋白抗体及其用途
 <130> IDC100137
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.2

 <210> 1
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> 保守序列
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(23)
 <223> Xaa 表示任意的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(40)
 <223> Xaa 表示任意的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (75)..(86)
 <223> Xaa 表示任意的氨基酸
 <400> 1
 Met Ala Thr Thr Ser Arg Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Arg Arg Arg Asn Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Phe Leu Phe Glu Arg Ala Gly
 35 40 45
 Tyr Ser Phe Pro Ser Val Met Ala Asn Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
 50 55 60
 Ile Leu Phe Phe Trp Ala Lys Ser Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Val Ser Asp Val Val Val Glu Lys Ala
 85 90 95
 Ala Asp Arg Ala Leu Val Trp Ile Asn Lys Val Leu Ala Val Gly His
 100 105 110
 Asp Ile Ala Ile Lys Arg Asp Arg Ser Val Phe Ile Lys Val Ile Leu
 115 120 125
 Ile Leu Trp Val Val Ser Tyr Ile Gly Met Leu Phe Asn Phe Leu Thr
 130 135 140
 Leu Ile Tyr Ile Gly Val Met Phe Ser Leu Leu Val Pro Pro Leu Tyr
 145 150 155 160
 Glu Lys Tyr Gln Asp Gln Val Asp Glu Lys Ile Gly Met Ala His Ser
 165 170 175
 Val Leu Ser Arg His Leu Asp Thr Ile Ile Ser Lys Thr Gly Glu Ser
 180 185 190
 Thr Lys Gln Lys Lys Thr Glu

[0002]

195

<210> 2
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> 水稻
 <400> 2
 atggccacca cctcccgcg atccctccac gccctcctcg gcggcggegc agtcgccgac 60
 ttggtgctgt ggcggcggag gaacgtgtcc gcggcggccg tggcgggcgc cacggcggtg 120
 tggttcctct tcgagcgcgc ggggtacagc ttcccgtcag tcatggccaa cgcctgctc 180
 ctctcgtcgc ccatectctt cttctgggcc aagtccgcct cgctgctcaa caggcctctt 240
 ccaccactec ctaaactaga ggtctcagat gtggttgttg agaaagctgc agatcgggct 300
 cttgtatgga tcaacaaggt gttggctgtt ggccatgata ttgcatcaa gagagatagg 360
 agtgttttta taaaggttat attgatttta tgggtggttt catacattgg aatgctcttc 420
 aacttcctta cgctcattta cattgggtga atgttttctc tgttagttcc accatigtat 480
 gagaagtacc aggaccaagt cgatgaaaag attggatagg cgcacagtgt actatcaagg 540
 cacttagata ccatcattag caagactgga gaatcaacca agcaaaagaa gactgagtaa 600

<210> 3
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> 水稻
 <400> 3
 Met Ala Thr Thr Ser Arg Arg Ser Leu His Ala Leu Leu Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Asp Leu Val Leu Trp Arg Arg Arg Asn Val Ser Ala Ala
 20 25 30
 Ala Val Ala Gly Ala Thr Ala Val Trp Phe Leu Phe Glu Arg Ala Gly
 35 40 45
 Tyr Ser Phe Pro Ser Val Met Ala Asn Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
 50 55 60
 Ile Leu Phe Phe Trp Ala Lys Ser Ala Ser Leu Leu Asn Arg Pro Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Leu Pro Lys Leu Glu Val Ser Asp Val Val Val Glu Lys Ala
 85 90 95
 Ala Asp Arg Ala Leu Val Trp Ile Asn Lys Val Leu Ala Val Gly His
 100 105 110
 Asp Ile Ala Ile Lys Arg Asp Arg Ser Val Phe Ile Lys Val Ile Leu
 115 120 125
 Ile Leu Trp Val Val Ser Tyr Ile Gly Met Leu Phe Asn Phe Leu Thr
 130 135 140
 Leu Ile Tyr Ile Gly Val Met Phe Ser Leu Leu Val Pro Pro Leu Tyr
 145 150 155 160
 Glu Lys Tyr Gln Asp Gln Val Asp Glu Lys Ile Gly Met Ala His Ser
 165 170 175
 Val Leu Ser Arg His Leu Asp Thr Ile Ile Ser Lys Thr Gly Glu Ser
 180 185 190
 Thr Lys Gln Lys Lys Thr Glu
 195

<210> 4

[0003]

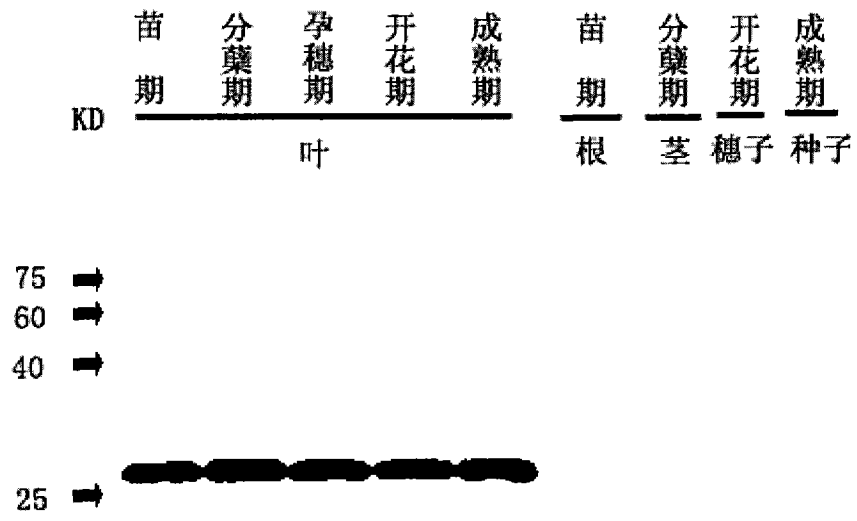


图 1

专利名称(译)	一种网状蛋白抗原表位、抗网状蛋白抗体及其用途		
公开(公告)号	CN101935338A	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	CN201010278259.4	申请日	2010-09-10
[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	徐宁志 曹英豪 李莉云 刘丽娟 李倩		
发明人	徐宁志 曹英豪 李莉云 刘丽娟 李倩		
IPC分类号	C07K7/08 C07K16/16 C07K16/06 G01N33/577 G01N33/53		
代理人(译)	程泳		
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，涉及网状蛋白抗原表位、抗网状蛋白抗体及其用途。具体地，所述网状蛋白抗原表位具有SEQ IDNO：4或SEQ ID NO：5或SEQ ID NO：6所示的序列。本发明还涉及一种抗网状蛋白多克隆抗体，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、以及检测网状蛋白的方法。

