



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103336124 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201210533901. 8

(22) 申请日 2012. 12. 11

(73) 专利权人 武汉工业学院

地址 430023 湖北省武汉市东西湖区学府南路 68 号

(72) 发明人 刘志国 李琦 张大川 房国梁 翟莹

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 狄宗禄

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

(续)

(56) 对比文件

CN 102021195 A, 2011. 04. 20,

CN 1666106 A, 2005. 09. 07,

CN 1820202 A, 2006. 08. 16,

CN 101842121 A, 2010. 09. 22,

US 2006078892 A1, 2006. 04. 13,

EP 2312318 A1, 2011. 04. 20,

CN 1995065 A, 2007. 07. 11,

CN 101063130 A, 2007. 10. 31,

CN 101337991 A, 2009. 01. 07,

杨正 等. 朊病毒的检测方法. 《医学研究生学报》. 2001, 第 14 卷 (第 S1 期), 60-64.

Pierluigi Gambetti et al.. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. 《Annals of Neurology》. 2008, 第 63 卷 697-708.

Jue Yuan et al.. Insoluble Aggregates and Protease-resistant Conformers of Prion Protein in Uninfected Human Brains. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2006, 第 281 卷 (第 46 期), 34848 - 34858.

Jin-Der Wen and Donald M. Gray. Selection of genomic sequences that bind tightly to Ff gene 5 protein: primer-free genomic SELEX. 《Nucleic Acids Research》. 2004, 第 32 卷 (第 22 期), e182.

Wen-Quan Zou et al.. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. 《PNAS》. 2004, 第 101 卷 (第 5 期), 1380 - 1385.

林东海 等. 月刊-朊病毒蛋白 prion 的研究进展. 《中国科学: 化学》. 2011, 第 41 卷 (第 4 期), 683-698.

审查员 周洋

权利要求书2页 说明书9页
序列表1页 附图1页

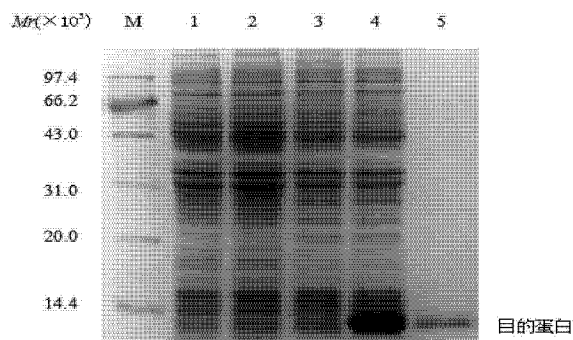
(54) 发明名称

一种检测朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种灵敏特异的朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 检测方法与检测试剂, 其技术要点在于: 将蛋白酶处理后的样本流经偶联能与朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的 Ni²⁺-NTA 树脂, 洗涤后经洗脱缓冲液洗脱并收集, 洗脱液所含的朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 通过其特异抗体进行免疫印迹检测或电泳后染色可被检测。该方法结合了 PrP^{Sc} 蛋白酶抗性和与 G5P 高亲和特性, 有效消除正常 PrP 所致的假阳性, 特异性强;

蛋白纯化效果好, 抗体免疫检测灵敏度高; 该方法具有广泛的应用前景和价值。该方法的建立对朊病毒的研究、疾病的诊断和控制有着重要的意义。



[转续页]

[接上页]

(51) Int. Cl.

C12N 15/66(2006.01)

1. 一种检测朊病毒蛋白 PrP^{Sc}的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一:将待测样本经 10 μ M 蛋白酶 K 消化,使样本中正常的 PrP 被水解,而 PrP^{Sc}因其蛋白酶抗性不被水解,以消除正常 PrP 的影响;

步骤二:将步骤一处理后的待测样本流经饱和偶联能与朊病毒蛋白 PrP^{Sc}特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的 Ni⁺-NTA 树脂,利用该重组 G5P 蛋白捕获待测样本中的朊病毒蛋白 PrP^{Sc},所述的能与朊病毒蛋白 PrP^{Sc}特异识别并结合的重组 G5P 蛋白是由序列表中序列 1 基因编码表达的;

步骤三:用洗脱缓冲液对经过步骤二后的饱和偶联能与朊病毒蛋白 PrP^{Sc}特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的 Ni⁺-NTA 树脂进行洗脱,收集洗脱液,所述的洗脱缓冲液的组成及浓度为:20mmol/L Tris-Cl,150mmol/L NaCl,500mmol/L 咪唑,pH 为 7.0;

步骤四:用以下方法检测步骤三收集到的洗脱液中的朊病毒蛋白 PrP^{Sc}:

(a) 洗脱的 PrP^{Sc}为不溶性蛋白,量多则可见白色沉淀;或

(b) 洗脱后凝胶电泳经考马斯亮蓝染色出现明显条带即为 PrP^{Sc};或

(c) 利用 PrP^{Sc}单克隆抗体进行 PrP^{Sc}的 Western blot 检测。

2. 一种用于检测朊病毒蛋白 PrP^{Sc}的试剂盒,其特征在于,包括:

(a) 朊病毒蛋白 PrP^{Sc}的富集洗脱体系:即饱和偶联能与朊病毒蛋白 PrP^{Sc}特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的 Ni⁺-NTA 树脂和洗脱缓冲液,所述的能与朊病毒蛋白 PrP^{Sc}特异识别并结合的重组 G5P 蛋白是由序列表中序列 1 基因编码表达的;所述的洗脱缓冲液体系的组成及浓度为:20mmol/L Tris-Cl,150mmol/L NaCl,500mmol/L 咪唑,pH 为 7.0;

(b) 蛋白酶 K,用于样本处理;

(c) PrP^{Sc}单克隆抗体,用于洗脱的朊病毒蛋白 PrP^{Sc}免疫印迹检测;

(d) 说明书。

3. 一种重组表达载体,其特征在于,它是由序列表中序列 1 所示的能与朊病毒蛋白 PrP^{Sc}特异识别并结合的 G5P 蛋白的编码基因与携带 His-Tag 的 pET-28a(+) 质粒重组而成。

4. 一种能与朊病毒蛋白 PrP^{Sc}特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的克隆表达方法,包括以下步骤:

步骤 1、G5P 重组子的构建:

(1) 参照 GeneBank 的 Accession No. J02450 所示 G5P 氨基酸序列对应的基因序列,根据大肠杆菌 BL21-DE3 密码子偏爱性设计出序列表中序列 1 所示的重组 G5P 蛋白表达基因;

(2) 通过 DNASTAR 比对,用引物设计软件设计合成序列表中序列 1 所示基因的 8 段引物,并在两端引入同 pET-28a(+) 质粒一样含有的 EcoR I 和 Xho I 酶切位点,以便酶切连接;8 段引物序列如下:

Pr1:CGGAATTCATGATTAAAGTTGAAATT

Pr2:GAAACACCAGAACGGGTGGTGAAGTGCCTGAGACGGTTTAATTTCAACTTTAATCAT

Pr3:CACCCGTTCTGGTGTCTCGTCAGGGCAAACCGTATTCAGTGAATGAGCAGCTGTGTT

Pr4:AATCTTGACCAGCACCGGATACTGATTACCCAGATCAACGTAACACAGCTGCTCATTCA

Pr5:CCGGTGCTGGTCAAGATTACCCTGGATGAAGGTCAGCCGGCCTATGCGCCGGGTCTGTA

Pr6:AACCGAACTGACCAACTTTGAACGAGGACAGATGAACGGGTGACAGACCCGGCGCATAG

Pr7:AAGTTGGTCAGTTCGGTTCCTGATGATTGATCGTCTGCGCCTGGTTCCGGCGAAATAA

Pr8:ATCTCGAGTTATTTGCGCGGAACCAG

其中 Pr1 的划线部分是 EcoR I 酶切位点, Pr8 的划线部分是 Xho I 酶切位点;

(3) 利用重叠延伸 PCR 合成目的基因序列, 并 PCR 扩增目的基因;

重叠延伸 PCR 反应体系:

100 pmol/ml 上游引物	1.5 μ L
100 pmol/ml 下游引物	1.5 μ L
10 $\times$ <i>Pfu</i> buffer	2 μ L
10 mM dNTPs	0.5 μ L
5 U/ μ L <i>Pfu</i> DNA 聚合酶	0.5 μ L
d ₃ H ₂ O	14 μ L
总体积	20 μ L

PCR 扩增目的基因的条件:

94 $^{\circ}$ C	10 min	} 30 循环
94 $^{\circ}$ C	1 min	
48 $^{\circ}$ C	1min 30 s	
72 $^{\circ}$ C	1 min 30 s	
72 $^{\circ}$ C	10 min	

(4) 分别用 Xho I 和 EcoR I 于 37 $^{\circ}$ C 水浴双酶切目的基因和质粒 pET-28a(+)-c(+)-4h, 各自回收后, 将两者用 T4DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接反应 10h, 得到重组子 pET-28a(+)-c(+)-G5P, 琼脂糖凝胶电泳鉴定;

步骤 2、G5P 重组子的表达:

(1) 将重组子 pET-28a(+)-c(+)-G5P 转化于 *E. coli* BL21-DE3 感受态细胞, 涂布于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜;

(2) 取少量上述菌液按 1:100 比例转接到新鲜 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、200r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ = 0.6 ~ 0.8;

(3) 加入一定量的 0.2-1.2mM IPTG 诱导 2-12h;

(4) 将诱导后的菌液冰浴 30min, 8000rpm 离心 20min, 4 $^{\circ}$ C, 弃上清;

(5) 用含 20mM NaH₂PO₄, 0.5M NaCl, 1% TritonX-100, pH7.4 的裂解液重悬细菌沉淀, 超声波破碎, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm 离心 20min, 收集上清液;

(6) 加入终浓度为 5ug/ml 的 DNase 和 RNase, 30 $^{\circ}$ C 水浴 30min, 消除核酸干扰, 收集上清, 利用携带 His 标签的重组 G5P 蛋白与 Ni²⁺-NTA 树脂形成稳定的亲和偶联特性, 使用 Ni²⁺-NTA 琼脂糖层析柱纯化上清液中相对分子质量为 9.5KD 的重组 G5P 蛋白, 并 SDS-PAGE 分析鉴定。

一种检测朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及朊病毒蛋白的分子生物学纯化与检测技术,具体地说是通过表达重组 G5P 蛋白对朊病毒蛋白高度分离纯化富集,然后利用免疫印迹法检测朊病毒蛋白 (PrP^{Sc})。

背景技术

[0002] 朊病毒 (prion) 是由朊蛋白异常折叠形成的一种对理化作用抵抗力极强,并具有传染性的蛋白质颗粒,这种异常折叠朊蛋白 (PrP^{Sc}) 为蛋白质侵染因子,属于小分子疏水性蛋白质,可侵染动物并在宿主细胞内复制,引起哺乳动物和人的中枢神经系统病变如海绵状脑病 (疯牛病),临床诊断传染性海绵状脑炎 (TSE) 的确切指标是检测 PrP^{Sc} 蛋白为阳性。

[0003] 免疫学方法目前已成为检测朊病毒蛋白的主要方法,例如组织印迹、斑点印迹、免疫印迹、免疫组化、ELISA 等。但最重要也是最关键的环节是需要对样品蛋白进行适当的分离纯化及富集,才能提高检出率并排除假阳性。目前,有关 PrP^{Sc} 的分离纯化及抽提检测方法有两大类型:一类是利用 PrP^{Sc} 区别与其他蛋白的特殊理化性质完成富集或贫化过程,另一类是利用特定的蛋白质间相互作用对 PrP^{Sc} 加以捕获。例如:前者最初由 Diringer 提出的 1% sarco syl 提取法,需用去垢剂来提取组织匀浆,配以高差速离心浓缩 PrP^{Sc};后来建立的有利用离子交换层析纯化法 (奥克塔法马有限公司,专利名称:分离和纯化靶蛋白使其不含 PrP^{Sc} 的方法,公开 (公告) 号:CN101842121A),还有混合有机溶剂提取法 (ALPERT ANDREW J, SCHMERR MARYJO, 发明名称:Method and kit forextracting prion protein, 公开 (公告) 号:HK1044588A1) 以及多离子原料结合法 (MICROSENS BIOPHAGE LTD, 发明名称: BINDING OF PATHOLOGICAL FORMS OFPRION PROTEINS, 公开 (公告) 号:US2010184054A1)。而近几年国外针对 PrP^{Sc} 的生物特性利用肽类或蛋白类对其富集检测亦建立了不同的方法,如配体法 (NOVARTISVACCINES & DIAGNOSTIC, 发明名称:Prion-specific peptide reagents, 公开 (公告) 号:AU2009225337A1; PATHOGEN REMOVAL AND DIAGNOSTI, UNIV NORTH CAROLINA STATE, 发明名称:Prion protein ligands and methods of use, 公开 (公告) 号:AU2010201499A1), 结合法 (PATHOGEN REMOVAL AND DIAGNOSTI, UNIV NORTH CAROLINA STATE, 发明名称:PRION PROTEIN BINDING MATERIALS ANDMETHODS OF USE, 公开 (公告) 号:KR20070117533A), 鸡尾酒法 (US AGRICULTURE, 发明名称:MONOCLONAL ANTIBODIES AND ANTIBODY COCKTAIL FORDETECTION OF PRION PROTEIN AS AN INDICATION OF TRANSMISSIBLESPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES, 公开 (公告) 号:BG106415A) 等等,上述各种利用生物蛋白相互作用建立的 PrP^{Sc} 检测方法能够有效提高蛋白检测特异性,或可通过减少杂蛋白增强检测灵敏度。

[0004] 近年研究发现,丝状噬菌体 gV 基因表达的 pV 蛋白能与 PrP^{Sc} 蛋白特异结合,而与正常的 PrP 的结合能力低 (Jin-Der Wen, et al. Selection of genomic sequences that bindtightly to Ff gene 5protein:primer-free genomic. Nucleic Acids Research, 2004, 32(22):e182; Wen Quan Zou, et al. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prionprotein. PANS, 2003, 101(5):1380-1385)。本发明拟利用丝状噬菌体 gV 基

因序列通过基因克隆高表达 G5P 蛋白,并将 G5P 偶联于固体介质上,利用 G5P 与 PrP^{Sc}高特异性结合,以及正常 PrP 可被蛋白酶水解而 PrP^{Sc}具有蛋白酶抗性的特性,对待测样品中的 PrP^{Sc}蛋白进行分离纯化富集,洗脱后免疫印迹检测,建立一种有效针对样本 PrP^{Sc}的纯化富集或贫化的方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是:提供一种分离纯化富集 PrP^{Sc}的方法及其检测试剂盒,即通过制备特异识别并富集 PrP^{Sc}的重组 G5P 蛋白,对生物样品中的 PrP^{Sc}进行纯化富集,洗脱后进行免疫检测。本发明的目的可以通过下述技术方案来达到。

[0006] 一种检测朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的方法,包括以下步骤:

[0007] 步骤一:将待测样本经 10 μ M 蛋白酶 K 消化,使样本中正常的 PrP 被水解,而 PrP^{Sc}因其蛋白酶抗性不被水解,以消除正常 PrP 的影响;

[0008] 步骤二:将步骤一处理后的待测样本流经饱和偶联能与朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的 Ni⁺-NTA 树脂,利用重组 G5P 蛋白捕获待测样本中的朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}),所述的能与朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白是由序列表中序列 1 基因编码表达的;

[0009] 步骤三:用洗脱缓冲液对经过步骤二后的饱和偶联能与朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的 Ni⁺-NTA 树脂进行洗脱,收集洗脱液,所述的洗脱缓冲液体系的组成及浓度为:20mmol/L Tris-Cl,150mmol/L NaCl,500mmol/L 咪唑,该洗脱缓冲液的 pH 为 7.0;

[0010] 步骤四:用以下方法检测步骤三收集到的洗脱液中的朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}):

[0011] (a) 洗脱的 PrP^{Sc}的为不溶性蛋白,量多则可见白色沉淀;或

[0012] (b) 洗脱后凝胶电泳经考马斯亮蓝染色出现明显条带即为 PrP^{Sc};或

[0013] (c) 利用 PrP^{Sc}单克隆抗体进行 PrP^{Sc}的 Western blot 检测。

[0014] 一种用于检测朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的试剂盒,包括:

[0015] (a) 朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的富集洗脱体系:即饱和偶联能与朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的 Ni⁺-NTA 树脂和洗脱缓冲液,所述的能与朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白是由序列表中序列 1 基因编码表达的;所述的洗脱缓冲液体系的组成及浓度为:20mmol/L Tris-Cl,150mmol/L NaCl,500mmol/L 咪唑,该洗脱缓冲液的 pH 为 7.0;

[0016] (b) 蛋白酶 K,用于样本处理;

[0017] (c) PrP^{Sc}单克隆抗体,用于洗脱的朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 免疫印迹检测;

[0018] (d) 说明书。

[0019] 一种重组表达载体,其特征在于它与序列表中序列 1 所示的能与朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的编码基因形成重组子可融合表达其所含的 His-Tag 标签,该载体为 pET-28a(+) 质粒。

[0020] 一种能与朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白的克隆表达方法,包括以下步骤:

[0021] 步骤 1、G5P 重组子的构建:

[0022] (1) 参照 GeneBank (Accession No. J02450) 上 G5P 氨基酸序列对应的基因序列, 根据大肠杆菌 BL21 (DE3) 密码子偏爱性设计出序列表中序列 1 所示的重组 G5P 蛋白表达基因;

[0023] (2) 通过 DNASTAR 比对, 用引物设计软件设计合成序列表中序列 1 所示基因的 8 段引物, 并在两端引入同 pET-28a(+) 质粒一样含有的 EcoR I 和 Xho I 酶切位点, 以便酶切连接。8 段引物如下:

[0024] Pr1: CGGAATTCATGATTAAAGTTGAAATT

[0025] Pr2: GAAACACCAGAACGGGTGGTGAAGTGCCTGAGACGGTTTAATTTCAAC TTTAATCAT

[0026] Pr3: CACCCGTTCTGGTGTCTCTCGTCAGGGCAAACCGTATTTCAGTGAATGAGCAGCTGTGTT

[0027] Pr4: AATCTTGACCAGCACCAGTACTGATTACCCAGATCAACGTAACACAGCTGCTCATTCA

[0028] Pr5: CCGGTGCTGGTCAAGATTACCCTGGATGAAGGTCAGCCGGCCTATGCGCCGGGTCTGTA

[0029] Pr6: AACCGAAGTACCAACTTTGAACGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCCGGCGCATAG

[0030] Pr7: AAGTTGGTCAGTTCGGTTCCCTGATGATTGATCGTCTGCGCCTGGTTCCGGCGAAATAA

[0031] Pr8: ATCTCGAGTTATTTCCCGGAACCAG

[0032] 其中 Pr1 的划线部分是 EcoR I 酶切位点, Pr8 的划线部分是 Xho I 酶切位点。

[0033] (3) 利用重叠延伸 PCR 合成目的基因序列, 并 PCR 扩增目的基因;

[0034] 重叠延伸 PCR 反应体系:

[0035]

上游引物 (100 pmol/ml)	1.5 μ L
下游引物 (100 pmol/ml)	1.5 μ L
10 $\times$ Pfu buffer	2 μ L
dNTPs (10 mM)	0.5 μ L
Pfu DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)	0.5 μ L
d ₃ H ₂ O	14 μ L
总体积	20 μ L

[0036] PCR 扩增目的基因的条件:

[0037]

94 $^{\circ}$ C	10 min	} 30 循环
94 $^{\circ}$ C	1 min	
48 $^{\circ}$ C	1 min 30 s	
72 $^{\circ}$ C	1 min 30 s	
72 $^{\circ}$ C	10 min	

[0038] (4) 分别用 Xho I 和 EcoR I 于 37 $^{\circ}$ C 水浴双酶切目的基因和质粒 pET-28a(+)-c(+)-4h, 各自回收后, 将两者用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接反应 10h, 得到重组子 pET-28a(+)-c(+)-G5P, 琼脂糖凝胶电泳鉴定;

[0039] 步骤 2、G5P 重组子的表达:

[0040] (1) 将重组子 pET-28a(+)-c(+)-G5P 转化于 E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜;

[0041] (2) 取少量上述菌液按 1:100 比例转接到新鲜 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、200r/

min 摇床培养至 OD600=0.6~0.8 ;

[0042] (3) 加入一定量的 IPTG (0.2-1.2mM) 诱导 2-12h ;

[0043] (4) 将诱导后的菌液冰浴 30min, 8000rpm 离心 20min, 4℃, 弃上清 ;

[0044] (5) 裂解液 (NaH_2PO_4 20mmol/L, NaCl 0.5mol/L, 1% TritonX-100, pH7.4) 重悬细菌沉淀, 超声波破碎, 4℃, 12000rpm 离心 20min, 收集上清液 ;

[0045] (6) 加入终浓度为 5ug/ml 的 DNase 和 RNase, 30℃ 水浴 30min, 消除核酸干扰, 收集上清, 利用重组 G5P 蛋白融合表达的 His 标签与 Ni^{2+} -NTA 树脂形成稳定的亲和偶联特性, 使用 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖层析柱纯化上清液中相对分子质量为 9.5KD 的重组 G5P 蛋白, 并 SDS-PAGE 分析鉴定。

[0046] 本发明内容涉及有 :

[0047] 克隆表达可与 PrP^{Sc} 特异识别并结合的重组 G5P 蛋白, 建立分离纯化和富集生物样本中 PrP^{Sc} 的方法, 该重组蛋白与丝状噬菌体 gV 基因表达的 pV 蛋白性质相似, 具有特异亲和 PrP^{Sc} 的能力, 而与正常结构 PrP 结合力低 ;

[0048] 重组 G5P 蛋白的表达基因序列 (GeneBank Accession No. J02450) 如下 : 843-5' ATGATTAAAGTTGAAATTAACCGTCTCAAGCGCAATTTACTACCCGTTCTGGTGTTCCTCGTCAGGGCAAGCCTTATTCACTGAATGAGCAGCTTTGTTACGTTGATTTGGGTAATGAATATCCGGTGCTTGTCAGATTACTCTCGACGAAGGTCAGCCAGCGTATGCGCCTGGTCTGTACACCGTGCATCTGTCCCTCGTTCAAAGTTGGTCAGTTCGGTTCTCTTATGATTGACCGTCTGCGCCTCGTTCCGGCTAAGTAA3' -1106 ;

[0049] 与 G5P 基因序列重组的载体为含有 EcoR I 和 Xho I 酶切位点的 pET-28a(+) 质粒, 宿主细胞为 BL21 (DE3), 诱导表达的条件为 : 0.2-1.2mM 的 IPTG 诱导 2-12h。表达的重组 G5P 蛋白相对分子质量为 9.5KD, 结构上含有 6×His 标签, 该标签与 Ni^{2+} -NTA 树脂形成稳定的亲和偶联, 该偶联可被凝血酶水解, 酶切缓冲液为 20mmol/L Tris-Cl, 150mmol/L NaCl, 2.5mmol/L CaCl₂, pH8.0 ;

[0050] 待测样本经 10 μM 蛋白酶 K 处理后, 样本中正常的 PrP 被水解, 而 PrP^{Sc} 因其蛋白酶抗性不被水解, 消除正常 PrP 的影响。该处理样本温育或流经偶联树脂时 G5P 可捕获其中的 PrP^{Sc} ; 随后洗脱 PrP^{Sc} , 洗脱缓冲液为 : 20mmol/L Tris-Cl, 150mmol/L NaCl, 500mmol/L 咪唑, pH7.0, 获得纯化的 PrP^{Sc} ;

[0051] 检测 PrP^{Sc} 方法包括 :

[0052] (1) 洗脱的 PrP^{Sc} 的为不溶性蛋白, 量多则可见白色沉淀 ;

[0053] (2) 洗脱后凝胶电泳经考马斯亮蓝染色出现明显条带即为 PrP^{Sc} ;

[0054] (3) 利用 PrP^{Sc} 单克隆抗体进行 PrP^{Sc} 的 Western blot 检测。

[0055] 形成一种用于检测 PrP^{Sc} 的试剂盒, 包括 :

[0056] (1) PrP^{Sc} 的富集洗脱体系, 主要为饱和偶联重组 G5P 的 Ni^{2+} -NTA 树脂 ;

[0057] (2) 蛋白酶 K, 用于样本处理 ;

[0058] (3) PrP^{Sc} 单克隆抗体 ;

[0059] (4) 说明书。

[0060] 本发明方法所涉及的流程为 :

[0061] 1、通过基因工程构建 G5P 重组子

[0062] 2、G5P 重组子的表达与诱导优化

- [0063] 3、用树脂纯化并偶联重组 G5P 蛋白
- [0064] 4、偶联重组 G5P 蛋白的树脂对经蛋白酶 K 处理的蛋白样本温育或层析
- [0065] 5、洗涤后洗脱靶蛋白,分析重组 G5P 蛋白和靶蛋白间的结合力
- [0066] 6、对洗脱的靶蛋白电泳,染色或 Western blot 检测
- [0067] 本发明通过以下步骤来实现:
- [0068] 一、重组 G5P 的克隆表达与条件优化
- [0069] 1、G5P 重组子的构建
- [0070] (1) 参照 GeneBank (Accession No. J02450) 上 G5P 氨基酸序列对应的基因序列,根据大肠杆菌 BL21 (DE3) 密码子偏爱性部分修改基因序列
- [0071] (2) 通过 DNASTAR 比对,用引物设计软件设计引物并引入酶切位点
- [0072] (3) 利用重叠延伸 PCR 合成目的基因序列,并 PCR 扩增目的基因
- [0073] (4) 分别用 Xho I 和 EcoR I 于 37 °C 水浴双酶切目的基因和质粒 pET-28a(+)-c(+)-4h,各自回收后,将两者用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接反应 10h
- [0074] 2、G5P 重组子的表达
- [0075] (1) 将重组子 pET-28a(+)-c(+)-G5P 转化于 E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞,涂布于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养过夜
- [0076] (2) 取少量上述菌液按 1:100 比例转接到新鲜 LB 液体培养基中,于 37 °C、200r/min 摇床培养至 OD₆₀₀=0.6~0.8
- [0077] (3) 加入终浓度为 1.0mmol/L 的 IPTG 诱导 10h
- [0078] (4) 收集上清并提取菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳鉴定
- [0079] 3、优化诱导重组 G5P 蛋白表达条件
- [0080] (1) IPTG 浓度:从 0.2mmol/L 到 1.2mmol/L 确定最适浓度
- [0081] (2) 反应时间:从 2h 到 12h 确定最适反应时间
- [0082] 4、重组 G5P 蛋白的纯化与偶联
- [0083] (1) 将诱导后的菌液冰浴 30min,8000rpm 离心 20min,4 °C,弃上清
- [0084] (2) 裂解液重悬细菌沉淀,超声波破碎,4 °C,12000rpm 离心 20min,收集上清液
- [0085] (3) 加入终浓度为 5ug/ml 的 DNase 和 RNase,30 °C 水浴 30min.,收集上清液
- [0086] (4) 利用 Ni²⁺-NTA 层析柱纯化并偶联上清液中带有 6×His 标签的重组 G5P
- [0087] (5) 凝血酶酶切 24h 水解偶联,离心取上清 SDS-PAGE 分析鉴定 G5P
- [0088] 二、偶联重组 G5P 的 Ni²⁺-NTA 树脂对 PrP^{Sc}的纯化富集
- [0089] 1、生物样本处理
- [0090] (1) 称取适量兔脑样本、研磨、离心收集蛋白并定量,以 PrP27-30 蛋白掺入其中配成浓度为 0.5pmol/L、1pmol/L、2pmol/L、3pmol/L、4pmol/L 的模拟检测样本
- [0091] (2) 对上述模拟样本以终浓度为 10 μM 蛋白酶 K37 °C 消化 1h,1mM 的 PMSF 终止消化,可消化样本中可能存在的正常的靶蛋白
- [0092] 2、纯化富集程序
- [0093] (1) 取 1ml 上述处理的蛋白样本和 50ul 的偶联有重组 G5P 蛋白的 Ni²⁺-NTA 树脂于 1.5mL EP 管中震荡 2h 后 8000g 离心 5min 去上清液
- [0094] (2) 洗涤:EP 管加入 1ml 洗涤 Buffer,震荡 10min,8000g 离心 1min,去上清,重复

三次

[0095] (3) 洗脱 :EP 管加入 50uL 洗脱 Buffer,充分混匀,10000g 1min 收集洗脱液,蛋白定量

[0096] 3、重组 G5P 与 PrP^{Sc}蛋白间亲和力测定

[0097] (1) 将一定含量的重组 G5P 与 Ni²⁺-NTA 树脂偶联,依次加入不同浓度的 PrP27-30 蛋白,确定最大结合量,根据 Seatchard 方程计算结合常数 Ka1

[0098] (2) 同样,将克隆表达带有 His 标签的重组 PrP27-30 蛋白与 Ni²⁺-NTA 树脂偶联固定,次加入不同浓度的被凝血酶切除 His 标签的重组 G5P 蛋白,确定最大结合量,计算结合常数 Ka2

[0099] (3) 比较 Ka1、Ka2,分析 G5P 与 PrP^{Sc}间的亲和力

[0100] 三、PrP^{Sc}蛋白检测

[0101] 1、对定量后的洗脱液以 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 1h,电流 20~40mA,电压 60~120V

[0102] 2、凝胶室温考马斯亮蓝染色 2h 左右,室温脱色 4~8h,期间更换脱色液 3~4 次,直至能够区分蛋白条带

[0103] 3、或者对凝胶转膜,利用 PrP^{Sc}单克隆抗体进行免疫印迹检测即 Western blot 检测

[0104] 四、PrP^{Sc}蛋白阳性结果判断

[0105] 1、如果 PrP^{Sc}量多,离心后于 EP 管底可见沉淀物

[0106] 2、电泳后考马斯亮蓝染色相应位置出现浓集单一蛋白条带

[0107] 3、抗体 ECL 显影出现唯一一条带

附图说明

[0108] 图 1 重组 G5P 蛋白的表达及纯化

[0109] 泳道 M:蛋白分子量标准;泳道 1:未诱导的 BL21 (DE)-pET-28a-c(+) 全菌蛋白;泳道 2:未诱导的 BL21 (DE)-pET-28a-c(+)-G5P 全菌蛋白;泳道 3:经 IPTG 诱导的 BL21 (DE)-pET-28a-c(+) 全菌蛋白;泳道 4:经 IPTG 诱导的 BL21 (DE)-pET-28a-c(+)-G5P 全菌蛋白;泳道 5:纯化后的重组 G5P 蛋白

[0110] 图 2 重组 G5P 富集 PrP^{Sc}蛋白后考马斯亮蓝染色

[0111] 泳道 0:诱导表达 pET-28a-c(+)-G5P 全菌蛋白,泳道 M:蛋白分子量标准;泳道 1~7:分别偶联不同浓度 G5P 对同一浓度的 PrP^{Sc}富集后收集的洗脱液电泳。

[0112] 图 3 重组 G5P 蛋白富集 PrP^{Sc}蛋白后 Western blot 检测

[0113] 泳道 1~5:依次为掺入 PrP27-30 浓度为 0.5,1,2,3,4pmol/L 的兔脑样品富集后免疫印迹检测。

[0114] 本发明所具有的优点:

[0115] 该方法结合了 PrP^{Sc}蛋白酶抗性和与 G5P 高亲和特性,有效消除正常 PrP 所致的假阳性,特异性强;蛋白纯化效果好,抗体免疫检测灵敏度高;该方法具有广泛的应用前景和价值。

具体实施方式

[0116] 为进一步详细阐述本发明,下面结合具体实施例。

[0117] 实施例:

[0118] 材料

[0119] 1、菌株及动物:大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株, DH5 α 菌株, 质粒 pET-28a(+), 1.5-2kg 新西兰雄性大白兔

[0120] 2、试剂:限制性内切酶 Xho I、EcoR I;T4 连接酶;1 kbplus DNA Ladder;50bpDNA LadderMarker;DL100;PCR 产物纯化试剂盒;DNA 凝胶回收试剂盒;质粒小量制备试剂盒;Pfu DNA 聚合酶;中分子量标准蛋白;蛋白胨;酵母浸提物; Ni^{2+} -NTA 树脂;咪唑;SDS;IPTG;丙烯酰胺;甲叉双丙烯酰胺;Tris 碱;甘氨酸;考马斯亮蓝 G-250;溶菌酶;TEMED;TritonX-100;蛋白酶 K;蛋白 G 琼脂糖凝胶;Tween-20;辣根过氧化物酶(HRP);标记羊抗兔 IgG;PDVF 膜;NC 膜;ECL 试剂

[0121] 3、仪器:高速冷冻离心机、自动凝胶成像分析系统、PCR 仪、电泳仪、恒温水浴锅、恒温摇床、超净工作台、生化培养箱、双垂直电泳槽、脱色摇床、化学发光成像系统、半湿转膜器

[0122] 方法与结果

[0123] 一:偶联重组 G5P 蛋白的 Ni^{2+} -NTA 树脂的制备

[0124] 1、G5P 重组子的构建

[0125] (1) 参照 GeneBank 上 G5P 氨基酸序列对应的基因序列,根据大肠杆菌 BL21(DE3) 密码子偏爱性部分修改基因序列

[0126] (2) 通过 DNASTAR 比对,用引物设计软件设计引物并引入酶切位点

[0127] (3) 利用重叠延伸 PCR 合成目的基因序列,并 PCR 扩增目的基因

[0128] (4) 分别用 Xho I 和 EcoR I 于 37 °C 水浴双酶切 4h 目的基因及质粒 pET-28a(+)-c(+),各自回收后,将酶切回收的目的基因和质粒用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 进行连接反应 10h

[0129] 2、G5P 重组子的表达

[0130] (1) 将重组子 pET-28a(+)-c(+)-G5P 转化到 E. coli BL21(DE3) 感受态细胞,涂布于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养过夜

[0131] (2) 取少量上述菌液按 1:100 比例转接到新鲜 LB 液体培养基中,于 37 °C、200r/min 摇床培养至 OD₆₀₀=0.6~0.8

[0132] (3) 在含重组子的菌液中加入终浓度为 1.0mmol/L 的 IPTG 诱导 10h

[0133] (4) 收集菌体,提取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 1)

[0134] 3、优化诱导表达重组 G5P 蛋白的条件

[0135] 诱导剂 IPTG 浓度从 0.2mmo/L 到 1.2mmo/L 诱导 2h 到 12h,结果显示 0.8mmol/L IPTG 诱导 6h 表达量最高

[0136] 4、重组 G5P 蛋白的纯化与偶联

[0137] (1) 将诱导后的菌液冰浴 30min,8000r/min 离心 20min,4 °C,弃上清

[0138] (2) 细菌沉淀用裂解液(50mmol/L Tris-Cl pH8.0,2mmol/L EDTA, 1%TritonX-100)重悬,超声波破碎(工作 5s,间歇 5s,功率 200W,60 次),于 4 °C,12000r/min 离心 20min,收集细胞上清液

[0139] (3) 加入终浓度为 5ug/ml 的 DNase 和 RNase, 30℃ 水浴 30min

[0140] (4) 利用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱结合带有 6×His 标签的 G5P 性质, 纯化并偶联上清液中的重组 G5P 目的蛋白

[0141] (5) 重组 G5P 蛋白的鉴定: 凝血酶水解偶联, 酶切 24h, 10000g 离心 10min, 取上清进行 SDS-PAGE 分析 (图 1)

[0142] 二、偶联重组 G5P 蛋白的 Ni^{2+} -NTA 树脂对 PrP^{Sc} 的纯化富集

[0143] 1、生物样本处理

[0144] (1) 称取适量兔脑样本、研磨、离心收集蛋白并定量, 以 PrP27-30 蛋白掺入其中配成浓度为 0.5pmol/L、1pmol/L、2pmol/L、3pmol/L、4pmol/L 的模拟检测样本

[0145] (2) 对上述模拟样本以终浓度为 10 μM 蛋白酶 K37℃ 消化 1h, 1mM 的 PMSF 终止消化

[0146] 2、纯化富集程序

[0147] (1) 取 1ml 上述处理的蛋白样本和 50ul 的偶联有重组 G5P 蛋白的 Ni^{2+} -NTA 树脂于 1.5ml EP 管中震荡 2h 后 8000g 离心 5min 去上清液

[0148] (2) 洗涤: EP 管加入 1ml 洗涤 Buffer (20mmol/L Tris-Cl, 150mmol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑, PH7.0), 震荡 10min, 8000g 离心 1min, 去上清, 重复三次

[0149] (3) 洗脱: EP 管加入 50ul 洗脱 Buffer (20mmol/L Tris-Cl, 150mmol/L NaCl, 500mmol/L 咪唑, PH7.0), 充分混匀, 10000g 1min 收集洗脱液, 即为纯化富集后的目的蛋白, 进行蛋白定量

[0150] 3、重组 G5P 与 PrP^{Sc} 蛋白间结合力测定

[0151] (1) 将一定含量的重组 G5P 与 Ni^{2+} -NTA 树脂偶联, 依次加入不同浓度的 PrP27-30 蛋白, 确定最大结合量, 根据 Seatchard 方程计算结合常数 $K_{a1}=1.019 \times 10^5 \text{mol/L}$

[0152] (2) 同样, 将克隆表达带有 His 标签的重组 PrP27-30 蛋白与 Ni^{2+} -NTA 树脂偶联固定, 依次加入不同浓度的被凝血酶切除 His 标签的重组 G5P 蛋白, 确定最大结合量, 计算结合常数 $K_{a2}=1.167 \times 10^5 \text{mol/L}$

[0153] (3) 分析比较 K_{a1} 、 K_{a2} , 重组 G5P 与 PrP^{Sc} 间的结合常数 K_a 值均较大, 约为 10^5 , 数值接近, 可以判断重组 G5P 蛋白与 PrP^{Sc} 间有较好的结合能力且结果可靠

[0154] 三、富集后 PrP^{Sc} 的免疫印迹检测

[0155] 1、SDS-PAGE 电泳: 取 10~20ul 富集后的样本蛋白煮沸 5min, 上样, 60~120V 电泳 60min

[0156] 2、电转移: 转膜仪中 10mA, 电转 20min, 将分离胶上蛋白转至 PDVF 或 NC 膜上

[0157] 3、抗体封闭: TBS-Tween 洗涤 PVDF 膜, 37℃ BSA 封闭 1h 缓摇, 然后 PrP^{Sc} 抗体 (1:100~1000) 4℃ 封闭过夜, 一抗封闭完后 TBS-Tween 洗 3 次, 用二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (1:1000) 37℃ 平摇封闭 1h

[0158] 4、ECL 显影: 加入 ECL 显色液, 置于化学发光成像系统中观察结果

[0159] 四、 PrP^{Sc} 蛋白阳性结果判断:

[0160] 1、聚丙烯酰胺凝胶电泳后考马斯亮蓝染色相应位置出现条带即为 PrP^{Sc} 蛋白 (图 2)

[0161] 2、ECL 显影 PDVF 或 NC 膜上出现唯一一条带时即为 G5P 富集后的 PrP^{Sc} 蛋白, 纯化富

集后,免疫印迹检出限为 1pmol/L(图 3)。

[0001]

序列表

<110> 武汉工业学院

<120> 一种检测朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的方法和试剂盒

<130> /

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 264

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

atgattaaag ttgaaattaa accgtctcaa gcgcaattta ctaccggtc tgggttttct
60

cgtcagggca agccttattc actgaatgag cagctttggt acgttgattt gggtaatgaa
120

tatccgggtgc ttgtcaagat tactctcgac gaaggtcage cagcgtatgc gcctgggtctg
180

tacaccgtgc atctgtcctc gttcaaagtt ggtcagttcg gttctcttat gatigaccgt
240

ctgcgcctcg ttccggctaa gtaa
264

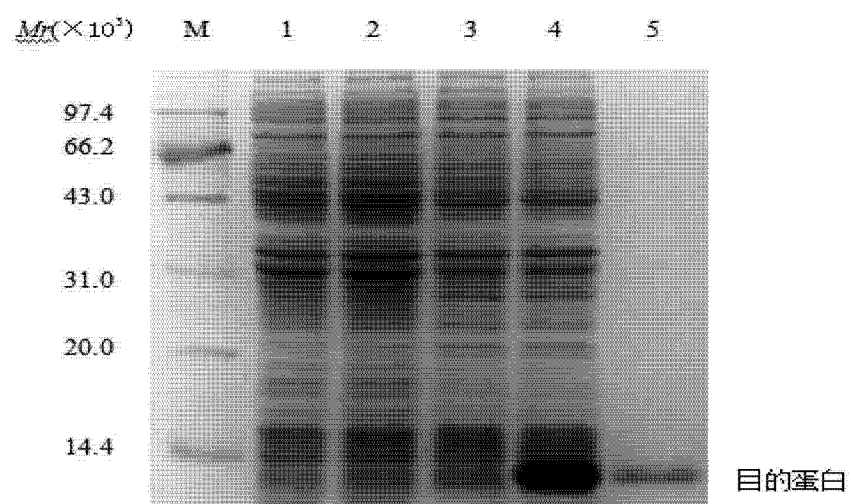


图 1

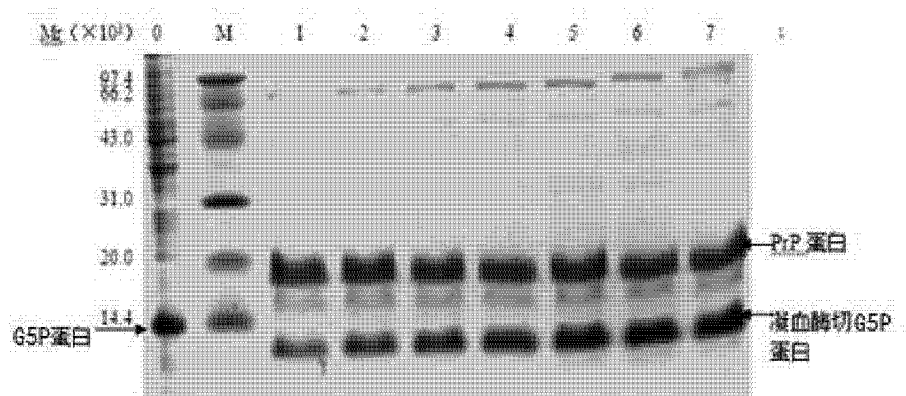


图 2

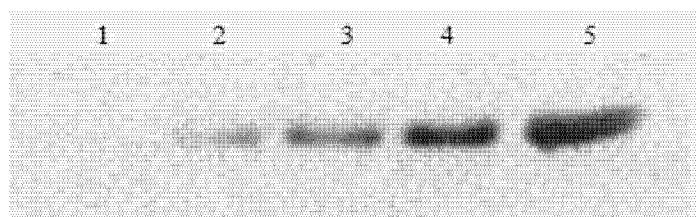


图 3

专利名称(译)	一种检测朊病毒蛋白(PrPSC)的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN103336124B	公开(公告)日	2015-07-15
申请号	CN201210533901.8	申请日	2012-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	武汉轻工大学		
申请(专利权)人(译)	武汉工业学院		
当前申请(专利权)人(译)	武汉工业学院		
[标]发明人	刘志国 李琦 张大川 房国梁 翟莹		
发明人	刘志国 李琦 张大川 房国梁 翟莹		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/531 C12N15/70 C12N15/66		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN103336124A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种灵敏特异的朊病毒蛋白(PrPSC)检测方法与检测试剂，其技术要点在于：将蛋白酶处理后的样本流经偶联能与朊病毒蛋白(PrPSC)特异识别并结合的重组G5P蛋白的Ni²⁺-NTA树脂，洗涤后经洗脱缓冲液洗脱并收集，洗脱液所含的朊病毒蛋白(PrPSC)通过其特异抗体进行免疫印迹检测或电泳后染色可被检测。该方法结合了PrPSC蛋白酶抗性和与G5P高亲和特性，有效消除正常PrP^{Sc}所致的假阳性，特异性强；蛋白纯化效果好，抗体免疫检测灵敏度高；该方法具有广泛的应用前景和价值。该方法的建立对朊病毒的研究、疾病的诊断和控制有着重要的意义。

