



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103728447 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201410003726. 0

(22) 申请日 2014. 01. 03

(71) 申请人 北京晶泰美康生物科技有限公司

地址 100094 北京市海淀区北清路 103 号超
然时代 2 号楼 2 层 2-2

(72) 发明人 殷俊 杨唐斌

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 吴贵明 张永明

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

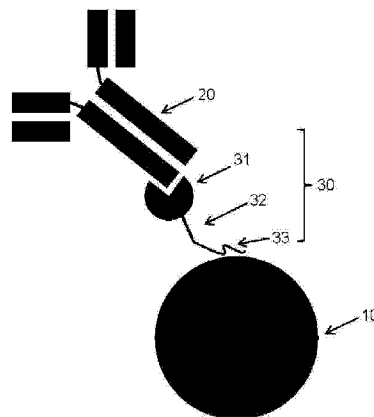
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54) 发明名称

可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记
方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法及其应用。该方法包括以下步骤：在量子点表面偶联抗体亲和配体；以及以抗体亲和配体作为桥接分子与抗体进行位点特异性自组装标记，其中，抗体亲和配体包括用于与抗体结合的抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列、用于与量子点表面偶联的标签序列以及提供抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列与标签序列之间空间间隔的间隔臂序列。应用本发明的技术方案，用带标签序列和间隔臂序列的抗体亲和蛋白或抗体结合肽作为桥接分子偶联量子点与抗体，连接方式简单、快速、可控且位点特异性好，偶联产物在大多数生物检测环境条件下稳定，且适用范围广。



1. 一种可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法,其特征在于,包括以下步骤:在量子点(10)表面偶联抗体亲和配体(30);以及以所述抗体亲和配体(30)作为桥接分子与抗体(20)进行位点特异性自组装标记,其中,所述抗体亲和配体(30)包括用于与抗体(20)结合的抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列(31)、用于与所述量子点(10)表面偶联的标签序列(33)以及提供所述抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列(31)与所述标签序列(33)之间空间间隔的间隔臂序列(32)。

2. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述抗体亲和蛋白为蛋白G、蛋白A、蛋白A/G或蛋白L;所述抗体结合肽为人工合成的经肽库筛选的与所述抗体(20)特异性结合的多肽。

3. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述标签序列(33)包括含有4~12个组氨酸的组氨酸标签、含有1~5个半胱氨酸的半胱氨酸标签或含有生物素修饰的标签。

4. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述量子点(10)表面带有供与所述标签序列(33)偶联的标签序列配体。

5. 根据权利要求4所述的抗体标记方法,其特征在于,所述配体包括配位金属离子或亲和素蛋白。

6. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述抗体(20)源自大鼠、小鼠、兔、羊、马、牛、猪或人。

7. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述抗体(20)包括通过免疫动物产生的多抗、杂交瘤方法制备的单抗、异源表达的单抗或基因工程抗体。

8. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,通过调节所述抗体(20)的浓度控制所述抗体(20)与所述抗体亲和蛋白或抗体结合肽的连接数量,并用酶解的所述抗体(20)片段封闭未结合的所述抗体亲和蛋白或抗体结合肽的结合位点。

9. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述抗体亲和蛋白或抗体结合肽与所述量子点(10)偶联摩尔比为1~200:1。

10. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述抗体(20)与所述量子点(10)偶联摩尔比为0.5~100:1。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法在酶联免疫吸附、侧向免疫层析、细胞成像、流式细胞术、蛋白印迹中的应用。

可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米生物技术领域,具体而言,涉及一种可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法及其应用。

背景技术

[0002] 量子点(Quantum dot, QD)又称半导体纳米晶,是一种纳米荧光材料,多呈球形,半径小于或接近激子波尔半径,直径一般在 1 ~ 12nm。量子点作为荧光材料具有优异的荧光特性:拥有窄而对称的荧光发射光谱,发射波长随材料及粒径大小不同而不同,具有宽泛且连续的吸收光谱,斯托克斯位移较大,以上特性使量子点易于实现单波长激发多波长同时发射的多色标记功能。此外,相对于有机荧光染料,量子点具有很好的光稳定性,耐光漂白,荧光效率高等优点,且随着量子点表面配基化学修饰技术的发展,量子点生物相容性及标记效率的进一步提高,使得相关量子点生物标记物在科研、检测领域的应用得到了进一步拓展。

[0003] 量子点探针标记要实现在生物领域的应用,首先要解决量子点与生物活性分子高效偶联的难题。其中可控、定向、定量是实现高效偶联的基本原则。传统的化学偶联方法,是利用生物分子表面的化学基团如蛋白表面的氨基或羧基等与量子点表面配基的活性基团交联。这种偶联方式缺乏位点特异性,导致偶联后生物分子活性下降、空间位阻、易聚沉等现象。取向性化学偶联方法,利用生物分子表面特定的化学基团如抗体的糖基等与量子点表面配基的活性基团交联。这种偶联方式尽管改善了位点特异性,获得了更高的偶联效率,但操作步骤仍较繁琐、条件难控制、易沉聚,不易重复,不能满足规模化生产的需要。此外使用化学偶联方法,往往需要量子点表面配基带有一定的活性基团如羧基或氨基等,这些基团通常容易与其它生物分子发生非特异结合而产生较高的背景信号,不利于高灵敏度检测。而利用分子生物学技术,在抗体亲和蛋白融合蛋白或合成的抗体结合肽基础上,加入利于交联的标签如半胱氨酸标签、组氨酸标签或生物素标签,获得抗体亲和配体,与表面含金属离子或亲和素修饰的量子点直接混合,即可实现蛋白与量子点高效、位点特异性自组装偶联。当利用金属配位偶联时,量子点表面可使用惰性配基修饰降低背景信号提高灵敏度。与采用分子生物学手段对每种目标蛋白分别进行遗传操作不同,此方法适用于通用型免疫活性量子点探针的快速标记。

发明内容

[0004] 本发明旨在提供一种可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法及其应用,以解决现有技术中抗体与量子点偶联缺乏位点特异性或操作步骤繁琐且不能满足规模化生产需要的技术问题。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供了一种可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法。该方法包括以下步骤:在量子点表面上偶联抗体亲和配体;以及以抗体亲和配体作为桥接分子与抗体进行位点特异性自组装标记,其中,抗体亲和配体包括用于与抗体结

合的抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列、用于与量子点表面偶联的标签序列以及提供抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列与标签序列之间空间间隔的间隔臂序列。

[0006] 进一步地,抗体亲和蛋白序列为蛋白 G、蛋白 A、蛋白 A/G 或蛋白 L;抗体结合肽序列为六肽 HWRGWV。

[0007] 进一步地,标签序列包括含有 4~12 个组氨酸的组氨酸标签、含有 1~5 个半胱氨酸的半胱氨酸标签或含有生物素修饰的标签。

[0008] 进一步地,量子点表面带有供与标签序列连接的标签序列配体。

[0009] 进一步地,配体包括配位金属离子或亲和素蛋白。

[0010] 进一步地,抗体源自大鼠、小鼠、兔、羊、马、猪、牛或人。

[0011] 进一步地,抗体包括通过免疫兔、羊、或鼠等动物产生的多抗、杂交瘤方法制备的单抗、异源表达的单抗或基因工程抗体。

[0012] 进一步地,通过调节抗体的浓度控制抗体与抗体亲和蛋白或抗体结合肽的连接数量,并用酶解的抗体片段封闭未结合抗体的抗体亲和蛋白或抗体结合肽的结合位点。

[0013] 进一步地,抗体亲和蛋白或抗体结合肽与量子点偶联摩尔比为 1~200:1。

[0014] 进一步地,抗体与量子点偶联摩尔比为 0.5~100:1。

[0015] 本发明还可提供一种可控量子点位点特异性桥接偶联的标记抗体在酶联免疫吸附、侧向免疫层析、细胞成像、流式细胞术、蛋白印迹中的应用。

[0016] 应用本发明的技术方案,用带标签序列和间隔臂序列的抗体亲和蛋白或抗体结合肽作为桥接分子偶联量子点与抗体,连接方式简单、快速、可控且位点特异性好,偶联产物在大多数生物检测环境条件下稳定,且不必对所获得的抗体采取任何化学修饰或改造,只要其保守区与特定的抗体亲和蛋白或抗体结合肽有特异结合能力就可以进行自组装偶联,适用范围广,大大简化了量子点与不同抗体偶联的过程,利于系列抗体标记物的快速生产。

附图说明

[0017] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0018] 图 1 显示一种可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法获得的一种抗体与量子点桥接偶联产物的结构示意图;

[0019] 图 2 显示根据本发明实施例 1 和 2 中 PEG 惰性封端的量子点与 PGHis 和 PGAsnHis 不同摩尔比偶联产物琼脂糖凝胶电泳结果,蛋白与量子点的摩尔比标识于各泳道上,分别为 2、4、8 倍,对 PGAsnHis 增加 16 倍摩尔比偶联;

[0020] 图 3 显示根据本发明实施例 3 中羧基末端修饰的量子点与 PGHis 和 PGAsnHis 不同摩尔比偶联产物琼脂糖凝胶电泳结果,蛋白与量子点的摩尔比标识于各泳道上,分别为 2、4、8 倍,对 PGAsnHis 增加 16 倍摩尔比偶联;

[0021] 图 4 显示根据本发明实施例 4 中 8 倍摩尔比交联的 PGAsnHis-量子点产物经过 Ni-NTA 柱纯化的结果,左侧为荧光显色结果,右侧为考马斯亮蓝染色结果,荧光显色结果中的荧光条带为交联产物,考马斯亮蓝染色结果中箭头所指为游离 PGAsnHis 的条带,最右侧为分子量标准,各条带分子量(kDa)已标识;

[0022] 图 5 显示根据本发明实施例 4 中 8 倍摩尔比交联的 PGAsnHis-量子点产物纯化前

后分别与兔源性 IgG 包被免疫层析试纸条的特异性结合反应结果；

[0023] 图 6 显示根据本发明实施例 5 中 8 倍摩尔比交联的 PGAsnHis- 量子点纯化后产物与小鼠、兔、羊、猪、人源性抗体包被免疫层析试纸条的结合反应结果；

[0024] 图 7 显示根据本发明实施例 5 中 8 倍摩尔比交联的 PGAsnHis- 量子点纯化后产物、蛋白 A- 量子点产物、蛋白 A/G- 量子点产物以及蛋白 L- 量子点产物与牛血清白蛋白(BSA, 作为阴性对照) 以及小鼠、兔、羊、猪和人等种属源性多克隆抗体或单克隆抗体的斑点杂交实验结果, 每种抗体点样量为 10pg, 点样顺序见图示；

[0025] 图 8 显示根据本发明实施例 6 中 PGAsnHis- 量子点连接产物与小鼠抗沙丁胺醇单克隆抗体的桥接偶联产物检测样品中沙丁胺醇含量的荧光免疫层析试纸条结果；

[0026] 图 9 显示根据本发明实施例 7 中 PGAsnAvi (左) 与 PGAsnC2X2C2 (右) 的量子点偶联产物与小鼠、兔、羊、猪、人源性抗体包被免疫层析试纸条的结合反应结果；

[0027] 图 10 显示根据本发明实施例 8 中 PEG 惰性封端的量子点与蛋白 A 不同摩尔比偶联产物琼脂糖凝胶电泳结果, 蛋白与量子点的摩尔比标识于泳道上, 分别为 1、2、4、8 倍；

[0028] 图 11 显示根据本发明实施例 9 中 PEG 惰性封端的量子点与蛋白 A/G 不同摩尔比偶联产物琼脂糖凝胶电泳结果, 蛋白与量子点的摩尔比标识于泳道上, 分别为 1、2、4、8 倍；

[0029] 图 12 显示根据本发明实施例 10 中 PEG 惰性封端的量子点与蛋白 L 不同摩尔比偶联产物琼脂糖凝胶电泳结果, 蛋白与量子点的摩尔比标识于泳道上, 分别为 1、2、4、8 倍；

[0030] 图 13 显示根据本发明实施例 11 中 8 倍摩尔比交联的 PGAsnHis- 量子点纯化后产物用于兔抗微管蛋白抗体标记的细胞免疫荧光成像结果；

[0031] 图 14 显示根据本发明实施例 12 中经纯化 8 倍摩尔比交联的 PGAsnHis(蛋白 G)- 量子点、蛋白 A- 量子点、蛋白 A/G- 量子点与一抗反应后的斑点杂交结果, 其中未加入一抗的样品组为阴性对照, 每组结果中出现的抗体斑点为阳性对照。

具体实施方式

[0032] 需要补充说明的是, 在不发生矛盾的情况下, 本申请中的实施例及实施例中的特征可以组合应用。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0033] 要实现量子点探针标记在生物领域的应用, 首先要解决量子点与生物活性分子高效偶联的难题。因为, 传统的化学偶联方法缺乏位点特异性, 取向性化学偶联方法操作步骤繁琐、条件控制难、易沉聚, 且不易重复, 不能满足规模化生产的需要, 化学偶联方法背景信号较高, 不利于高灵敏度检测。

[0034] 针对上述技术问题, 本发明利用分子生物学方法表达抗体亲和蛋白融合蛋白或合成抗体结合肽, 加入利于连接的标签如半胱氨酸标签、组氨酸标签或亲和素标签, 与表面含金属离子或生物素修饰的量子点直接混合, 实现了蛋白与量子点高效、位点特异性自组装偶联。

[0035] 根据本发明一种典型的实施方式, 提供一种可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法。该抗体标记方法包括以下步骤: 在量子点 10 表面上偶联抗体亲和配体 30; 以及以该抗体亲和配体 30 作为桥接分子与抗体 20 进行位点特异性自组装标记, 其中, 抗体亲和配体 30 包括用于与抗体 20 片段结合的抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列 31、用于与量子点 10 表面偶联的标签序列 33 以及抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列 31 与提供标签序列 33

之间空间间隔的间隔臂序列 32 (如图 1 所示)。

[0036] 抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列 31、标签序列 33 以及间隔臂序列 32 之间可以不同方式组合以肽键相连。间隔臂序列是为了减少空间位阻,可以是含有 5 个氨基酸以上长度,可根据实验与检测要求设计间隔臂长度,刚性构象可保证蛋白的固定取向,柔性多肽序列则使蛋白具有一定的自由度。用于与抗体结合的抗体亲和蛋白序列优选是密码子使用频率适于大肠杆菌工程菌表达的抗体亲和蛋白序列,这样能够使该方法更加适应于规模化生产。

[0037] 应用本发明的技术方案,用带标签序列和间隔臂序列的抗体亲和蛋白或抗体结合肽作为桥接分子偶联量子点与抗体,连接方式简单、快速、可控且位点特异性好,偶联产物在大多数生物检测环境条件下稳定,且不必对所获得的抗体采取任何化学修饰或改造,只要其保守区与特定的抗体亲和蛋白或抗体结合肽有亲和能力就可以进行自组装偶联,适用范围广,大大简化了量子点与不同抗体偶联的过程,利于快速开发系列产品。

[0038] 经优选,抗体亲和蛋白序列为蛋白 G、蛋白 A、蛋白 A/G、蛋白 L,抗体结合肽序列为 HWRGWV。其中,蛋白 G 是一种链球菌表达的可特异性地与多种哺乳动物免疫球蛋白 G(IgG)的 Fc 片段结合的蛋白。蛋白 A 是一种金黄色葡萄球菌的表达产物,与蛋白 G 功能相近,但其性质和结合特异性与蛋白 G 稍有不同。蛋白 A/G 是人工合成蛋白,兼具蛋白 G 和蛋白 A 活性域的融合蛋白,对不同种属源性的免疫球蛋白 G(IgG)的 Fc 片段有更好的亲和活性。免疫球蛋白 G(IgG),常用于特异性抗原的检测,其 Fc 区不参与抗原识别与结合反应,因此抗体亲和蛋白与 IgG Fc 片段的结合并不影响抗体的免疫活性,即 IgG 偶联位点可控。蛋白 L 是从大消化链球菌中分离出的蛋白,可特异性结合抗体 kappa 链,也不影响抗体的抗原结合活性,也可实现 IgG 位点可控偶联量子点。抗体结合肽是通过肽库筛选的人工合成的一类具有结合抗体能力的多肽,如 HWRGWV 等。

[0039] 上述抗体亲和蛋白的抗体结合域分子量适中,且利用分子生物学技术表达易于纯化,具有高稳定性和高亲和力。抗体结合肽序列简单,可通过化学合成批量制备。通过添加标签序列抗体亲和蛋白或抗体结合肽都可实现与量子点高效、位点特异性偶联。因此利用上述经改造的抗体亲和配体(抗体亲和配体包括用于与抗体结合的抗体亲和蛋白序列、用于与量子点表面偶联的标签序列以及提供抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列与标签序列之间空间间隔的间隔臂序列)作为抗体与量子点偶联的桥接分子,预先连接于量子点表面,并利用这些抗体亲和配体与多种属源性抗体位点可控结合的特性偶联抗体,可实现通用型量子点的抗体快速自组装标记,利于系列产品的标记。

[0040] 经优选,标签序列包括含有 4~12 个组氨酸的组氨酸标签、含有 1~5 个半胱氨酸的半胱氨酸标签或含有生物素修饰的标签,这样可实现抗体亲和蛋白与量子点快速偶联。这些标签序列具有不同的量子点结合速度及稳定性,可位于蛋白 N 端、C 端,或蛋白序列中,使抗体亲和蛋白的抗体结合区处于最有利结合的取向,以适用于不同的实验与检测要求。

[0041] 经优选,量子点表面带有供与标签序列连接的标签序列配体,标签序列配体包括配位金属离子或亲和素蛋白。本发明中使用的量子点主要为表面含有锌离子等易于与标签序列配位的量子点,如 CdSe/ZnS、CdTe/ZnS、CdSe/ZnSe 或者 CdTe/ZnSe,或用亲和素修饰的表面配基。

[0042] 本发明中的抗体源自多种属源性抗体,如抗体是源自于大鼠、小鼠、兔、羊、马、猪、

牛或人等所有可与抗体亲和配体特异结合的抗体。抗体包括各种具免疫活性的抗体,如针对完全抗原和小分子半抗原的抗体等。

[0043] 在本发明的一种实施方式中,抗体包括采用不同方法制备的抗体,例如通过免疫兔、羊、或鼠等动物产生的多抗、杂交瘤方法制备的单抗、异源表达的单抗或基因工程抗体等。

[0044] 经优选,通过调节抗体的浓度控制抗体与抗体亲和蛋白或抗体结合肽的连接数量,并用酶解的抗体片段封闭未结合抗体的抗体亲和蛋白或抗体结合肽的结合位点,使得该抗体标记方法更加灵敏可控。

[0045] 蛋白与量子点偶联摩尔比可以为 1 ~ 200:1,优选为 1 ~ 30 :1。在低至 1:1 偶联比条件下,标记产品适用于需要长时间孵育的实验,如细胞染色,ELISA 等实验,可以获得高灵敏度。而在高至 50 :1 的偶联比条件下,量子点被蛋白饱和标记,产品经过纯化后可用于快速检测实验,如快检试纸条,由于标记样品含有多个结合位点,可提高结合效率。

[0046] 抗体与量子点偶联摩尔比可以为 0.5 ~ 100 :1。根据所选抗体结合蛋白的摩尔比确定,例如重组蛋白 G 含单个抗体结合结构域,可以与抗体上 Fc 区的两个结合位点中的一个结合,则抗体与这种重组蛋白 G 桥接的量子点偶联摩尔比为 0.5 ~ 15 :1。而当使用含有两个结合结构域的重组蛋白 A,则抗体与量子点偶联摩尔比则为 1 ~ 30 :1,此次类推。

[0047] 上述可控量子点位点特异性桥接偶联方法标记的抗体可以应用于在酶联免疫吸附、侧向免疫层析(免疫层析试纸条)、细胞成像、流式细胞术、蛋白印迹用等。

[0048] 下面将结合实施例进一步说明本发明的有益效果。

[0049] 实施例 1

[0050] 1) 带有组氨酸标签的蛋白 G 表达

[0051] 根据公布的蛋白 G 序列 β 2 结构域(数据库编号 GenBank:X04015.1),由北京塞百盛基因技术有限公司进行全基因合成,并在基因上游添加 NcoI 酶切位点,在基因下游添加 SacI 及 HindIII 酶切位点。通过 NcoI 和 HindIII 酶切位点克隆到表达载体 pET28a (Novagen) 上构建 pET28a-PG 质粒。合成互补引物:His6SHf (SEQ ID NO:1): ccggtcaccaccaccaccactga 及 His6SHr (SEQ ID NO:2): agcttcagtggtggtggtggtggtga ccggagct,体外退火后连接入 pET28a-PG 的 SacI 及 HindIII 位点之间,得到 pET28a-PGHis 质粒,质粒转化大肠杆菌 BL21 (plysE) 菌株表达。表达条件:500ml 三角瓶中盛有已灭菌的 150ml LB 培养基,加入 25 μ g/ml 卡那霉素和 15 μ g/ml 氯霉素,接种 2ml 过夜培养的表 达菌种。37 摄氏度 220rpm 摇床培养 2 ~ 3 小时,至 OD600 达到约 0.8 ~ 1 时,加入 0.4mM IPTG 诱导表达,并将培养温度降低至 30 摄氏度,表达 6 小时后 4 摄氏度 6000rpm 离心收集菌体沉淀,-20 摄氏度冷冻保存。

[0052] 2) 带有组氨酸标签的蛋白 G 纯化

[0053] 将冷冻保存的蛋白 G 取出融化后,加入缓冲液 A(含 30mM 咪唑,500mM 氯化钠,20mM Tris-HCl,pH8.0)超声破碎至菌液澄清,4 摄氏度 15000rpm 高速离心 20 分钟弃去沉淀。上清通过 0.2 μ m 针头滤器过滤后上样 Ni-NTA 金属螯合层析重力柱,层析柱预先用缓冲液 A 平衡,样品流完后继续加入 3 倍柱体积的缓冲液 A 洗柱,之后用缓冲液 B (含 500mM 咪唑,500mM 氯化钠,20mM Tris-HCl,pH8.0)洗脱结合在镍填料上的 PGHis 蛋白,经过截留分子量为 3kDa 的超滤管脱盐及浓缩,可以得到纯度 95% 以上的带组氨酸标签的蛋白 G,即 PGHis 蛋

白。

[0054] 量子点由杭州纳晶科技有限公司合成, CdSe/ZnS 核壳结构量子点, 表面采用 PEG 惰性封端, 在硼酸缓冲液 (10mM, pH9.0) 中与不同浓度的 PGHis 偶联。PGHis :量子点摩尔比为 2、4、8, 琼脂糖电泳中可发现交联物泳动速度减慢, 表明分子量显著增加, 且随交联摩尔比增加分子量逐渐越大(如图 2 所示)。

[0055] 实施例 2

[0056] 在 pET28a-PG 质粒的基础上, 先用互补引物 Asn10SSHf (SEQ ID NO:3): tgaacaa caacaacaataacaataacaacaacctgagctcctgaa 及 Asn10SShr (SEQ ID NO:4): agctttcaggag ctcaggttggttggttattggttattggttggttggttcaagct 体外退火后连接入 pET28a-PG 的 SacI 及 HindIII 位点之间, 获得 pET28a-PGAsn 质粒。然后再用 His6SHf 和 His6Shr 体外退火后再连接入 pET28a-PGAsn 的 SacI 及 HindIII 位点之间, 最终构建成 pET28a-PGAsnHis 质粒用于表达 PGAsnHis 蛋白。除交联摩尔比增加 16 倍交联外, 其它操作步骤同实施例 1。结果显示添加了十个天冬酰胺残基的柔性间隔臂的 PGAsnHis 蛋白比不添加间隔臂的 PGHis 蛋白更易于与量子点交联, 电泳条带显示的分子量更大(图 2)。

[0057] 实施例 3

[0058] 量子点使用羧基末端修饰, 其它操作步骤同实施例 1 及实施例 2。电泳结果显示, 羧基末端修饰的量子点交联后分子量相对于游离量子点分子量变化(图 3)小于 PEG 惰性封端的量子点(图 2), 说明 PEG 惰性封端的量子点比羧基末端修饰的量子点更适于组氨酸标签配位偶联。

[0059] 实施例 4

[0060] 使用实施例 2 中 8 倍比例交联的 PGAsnHis- 量子点偶联物进行 Ni-NTA 纯化去除游离 PGAsnHis 蛋白, 具体步骤为: 使用缓冲液 A 平衡 Ni-NTA 层析重力柱后, 将偶联产物小心加入柱中, 之后继续使用 3 倍柱体积缓冲液 A 冲洗, 注意收集含有荧光物质的穿透组分。然后用缓冲液 B 洗脱结合的未偶联的游离 PGAsnHis 蛋白。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳实验检查纯化效果, 结果显示此法可回收 90% 以上的交联产物(存在于流穿组分), 在电泳图中已观察不到游离 PGAsnHis 蛋白, 而缓冲液 B 洗脱的组分中含有大量 PGAsnHis 蛋白(图 4, 箭头所指)。对纯化前后的样品进行活性测试, 结果显示纯化后样品信号强于未纯化样品(图 5), 说明该纯化方法可有效去除游离 PGAsnHis 蛋白, 可减少其对标记物的竞争, 从而提高灵敏度。

[0061] 实施例 5

[0062] 使用实施例 4 中的经过纯化的 PGAsnHis- 量子点标记产物与包被有鼠、兔、羊、猪、人源性 IgG 免疫层析试纸条进行结合测试, 结果在检测线上出现明显的荧光信号(图 6), 表明偶联产物有显著的抗体结合能力。使用斑点杂交技术, 检测固化在硝酸纤维素膜上的鼠、兔、羊、猪、人的 IgG (分别为 10pg), 可见信号明显(图 7)

[0063] 实施例 6

[0064] 使用鼠源性抗沙丁胺醇单克隆抗体与按实施例 4 方法经过纯化的 PGAsnHis- 量子点标记产物按摩尔比 2:1 在 25℃ 条件下震荡 1h, 采用竞争法检测样品中的沙丁胺醇含量, 在试纸条上可显示竞争性抑制反应, 荧光读卡仪检测灵敏度可达 1ng/ml (图 8)。

[0065] 实施例 7

[0066] 用 Avi-tag (SEQ ID NO:5) ggcctgaacgatatttttgaagcgcagaaaattgaatggcatgaa 序列替换 PGAsnHis 的 C 末端 His6-tag 序列,克隆构建表达后获得 PGAsnAvi 蛋白,在其 C 末端带有可被生物素连接酶 BirA 修饰的 Avi-tag,使之带有生物素修饰,可与亲和素化的量子点偶联。8 倍偶联产物活性免疫试纸条测试如图 9,联接物具有结合鼠、兔、羊、猪、人源性 IgG 的能力。

[0067] 用 C2X2C2-tag (SEQ ID NO:6)tggtgtgttatttgttgt 序列替换 PGAsnHis 的 C 末端 His6-tag 序列,克隆构建表达后获得 PGAsnC2X2C2 蛋白,在其 C 末端带有 4 个半胱氨酸,可通过巯基进行配位偶联量子点。8 倍偶联产物活性测试如图 9,联接物有结合鼠、兔、羊、猪、人源性 IgG 的能力。

[0068] 实施例 8

[0069] 使用在大肠杆菌中表达含有 C 端 His-tag 的重组蛋白 A (数据库编号 GenBank: JX912493.1),参照实施例 1 中蛋白 G 的偶联条件,采用 1~8 倍偶联比,配位偶联蛋白 A 与量子点,经电泳检测显示条带迁移率明显随偶联比提高而降低,表明成功获得偶联(图 10)。对 8 倍偶联比产物按照实施例 4 中的纯化方式纯化后进行斑点杂交活性测试,联接物具有结合鼠、兔、羊、猪、人源性 IgG 的能力(图 7)。

[0070] 实施例 9

[0071] 使用在大肠杆菌中表达含有 C 端 His-tag 的重组蛋白 A/G,参照实施例 1 中蛋白 G 的偶联条件,采用 1~8 倍偶联比,配位偶联蛋白 A/G 与量子点,经电泳检测显示条带迁移率明显随偶联比提高而降低,表明成功获得偶联(图 11)。对 8 倍偶联比产物按照实施例 4 中的纯化方式纯化后进行斑点杂交活性测试,联接物具有结合鼠、兔、羊、猪、人源性 IgG 的能力(图 7)。

[0072] 实施例 10

[0073] 使用在大肠杆菌中表达含有 C 端 His-tag 的重组蛋白 L (数据库编号 EMBL: S50809.1),参照实施例 1 中蛋白 G 的偶联条件,采用 1~8 倍偶联比,配位偶联蛋白 L 与量子点,经电泳检测显示条带迁移率明显随偶联比提高而降低,表明成功获得偶联(图 12)。对 8 倍偶联比产物按照实施例 4 中的纯化方式纯化后进行斑点杂交活性测试,联接物具有结合鼠、兔、羊、猪、人源性 IgG 的能力(图 7)。

[0074] 实施例 11

[0075] 使用实施例 4 中经纯化的 PGAsnHis-QD 标记产物,与经兔抗微管蛋白抗体孵育的细胞进行孵育,免疫荧光成像显示细胞骨架结构显示清晰、完整(图 13)。

[0076] 实施例 12

[0077] 使用实施例 4、8、9 中经纯化的蛋白 G、蛋白 A、蛋白 A/G-QD 偶联产物进行斑点杂交二抗活性测试,结果表明,在不加入一抗的条件下,偶联产物没有非特异背景信号,而加入 1000 倍稀释的一抗后用偶联产物检测,可检出 0.8ng 的 BSA,灵敏度高(图 14)。

[0078] 通过上述实施例可以看出,本发明采用抗体亲和蛋白与量子点偶联,采用含间隔臂的标签序列配位偶联,高效、稳定、易纯化。偶联产物抗体亲和蛋白-量子点可与不同种属抗体快速、有效地偶联,实现多种高灵敏度荧光纳米探针的制备。

[0079] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修

改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

[0080]

序列表

<110> 北京晶泰美康生物科技有限公司
<120> 可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法及其应用
<130> PN11210
<160> 6
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial
<400> 1

ccggtcacca ccaccaccac cactga 26

<210> 2
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial
<400> 2

agcttcagtg gtggtgggtg tggtagccgg agct 34

<210> 3
<211> 45
<212> DNA
<213> artificial
<400> 3

tgaacaacaa caacaataac aataacaaca acctgagctc ctgaa 45

<210> 4
<211> 53
<212> DNA
<213> artificial
<400> 4

agctttcagg agctcagggt gtgtgtattg ttattgtgtg tgttgtcaa gct 53

[0081]

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial

<400> 5

ggcctgaacg atattttga agcgcagaaa attgaatggc atgaa

45

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial

<400> 6

tgttgtgtta ttgttgt

18

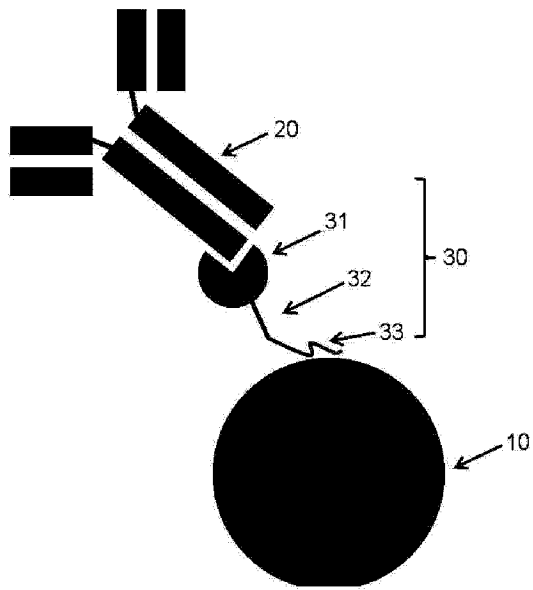


图 1

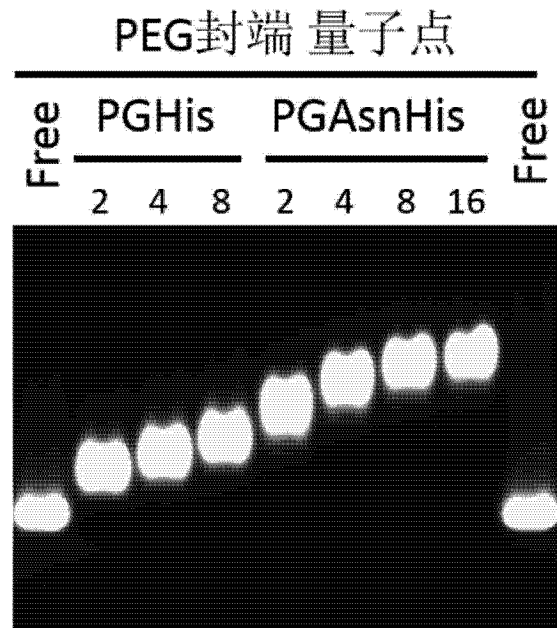


图 2

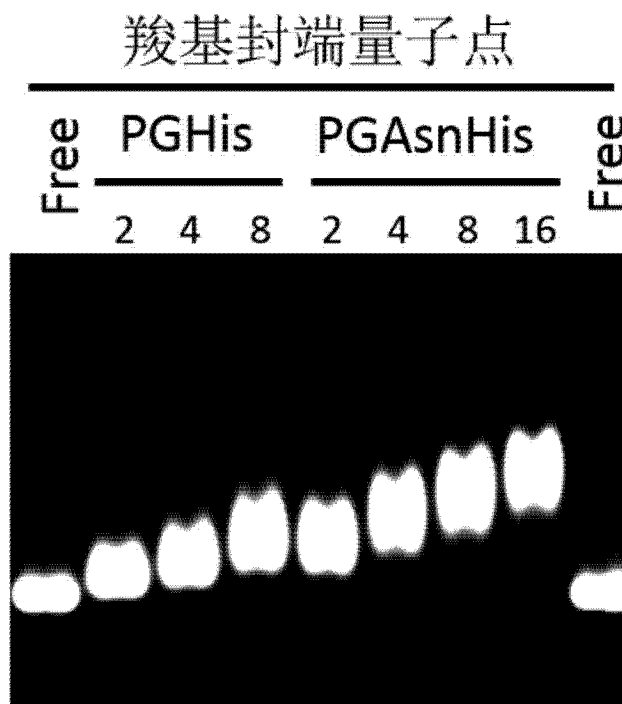


图 3

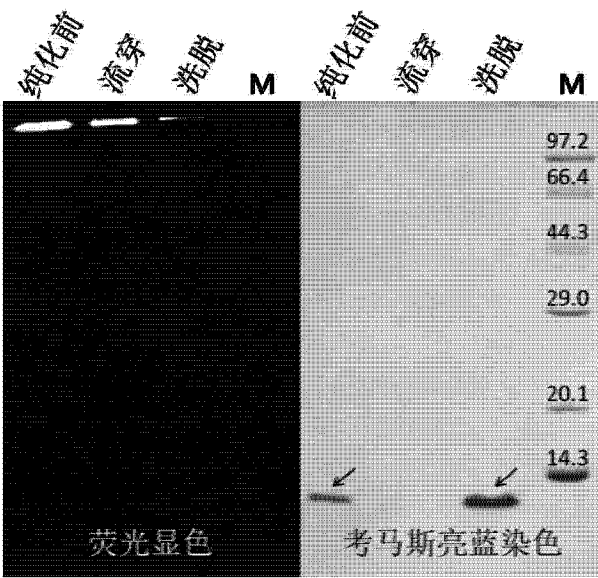


图 4

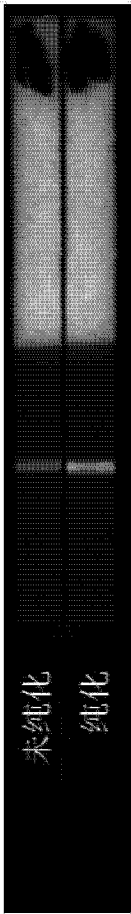


图 5

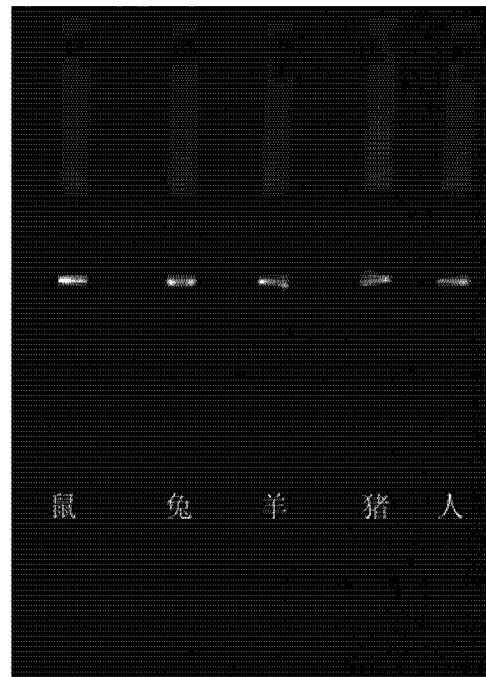


图 6

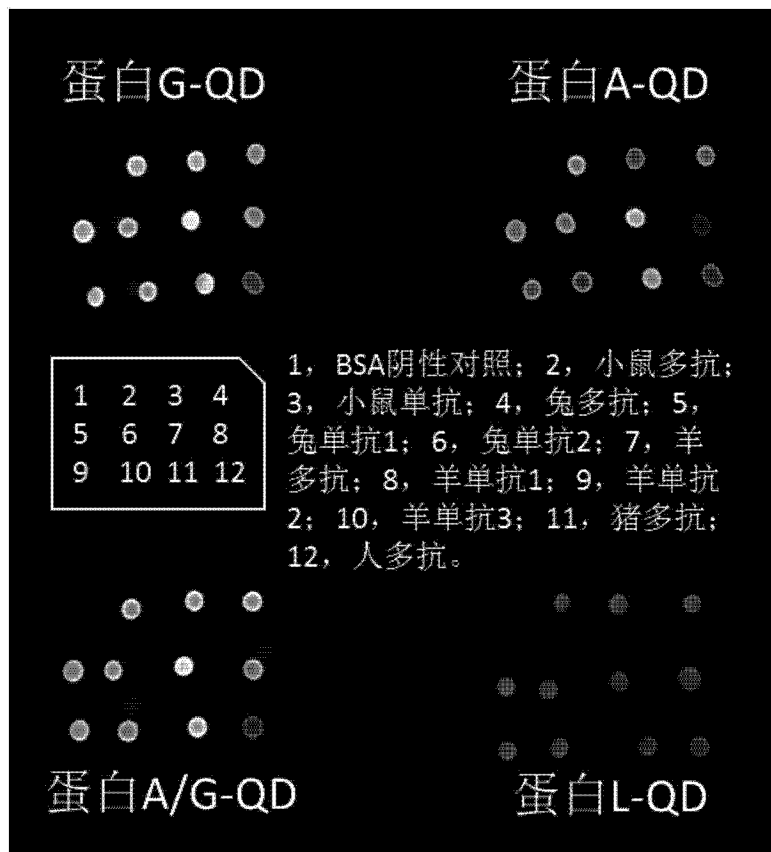


图 7

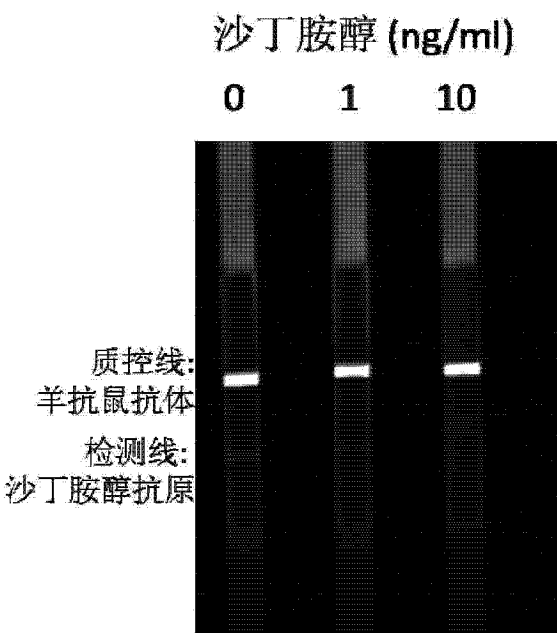


图 8

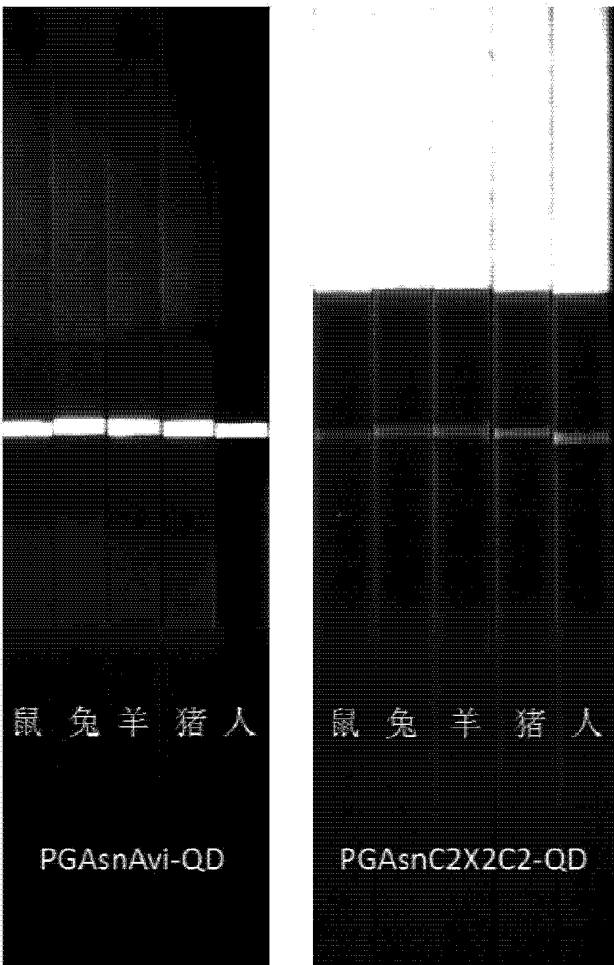


图 9

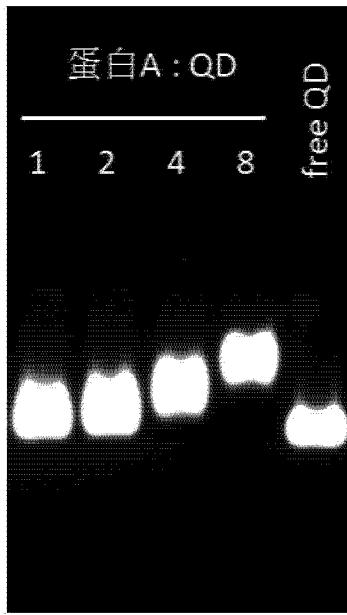


图 10

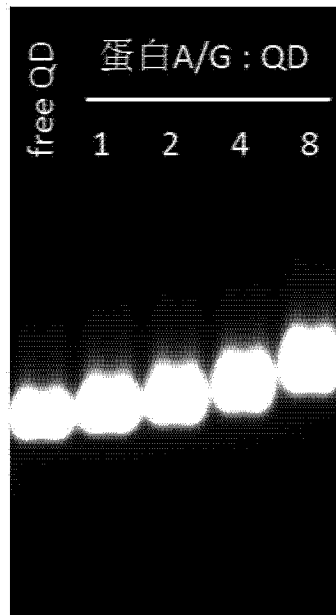


图 11

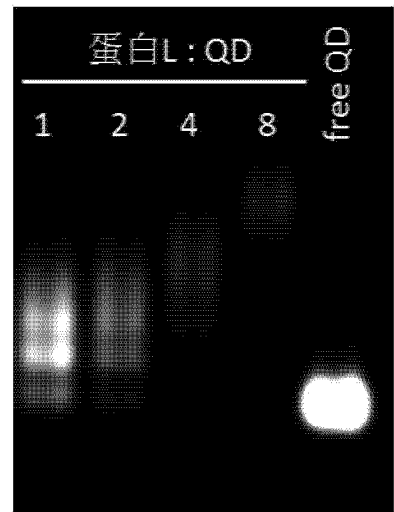


图 12

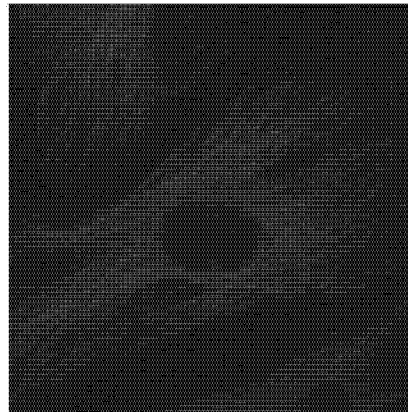


图 13

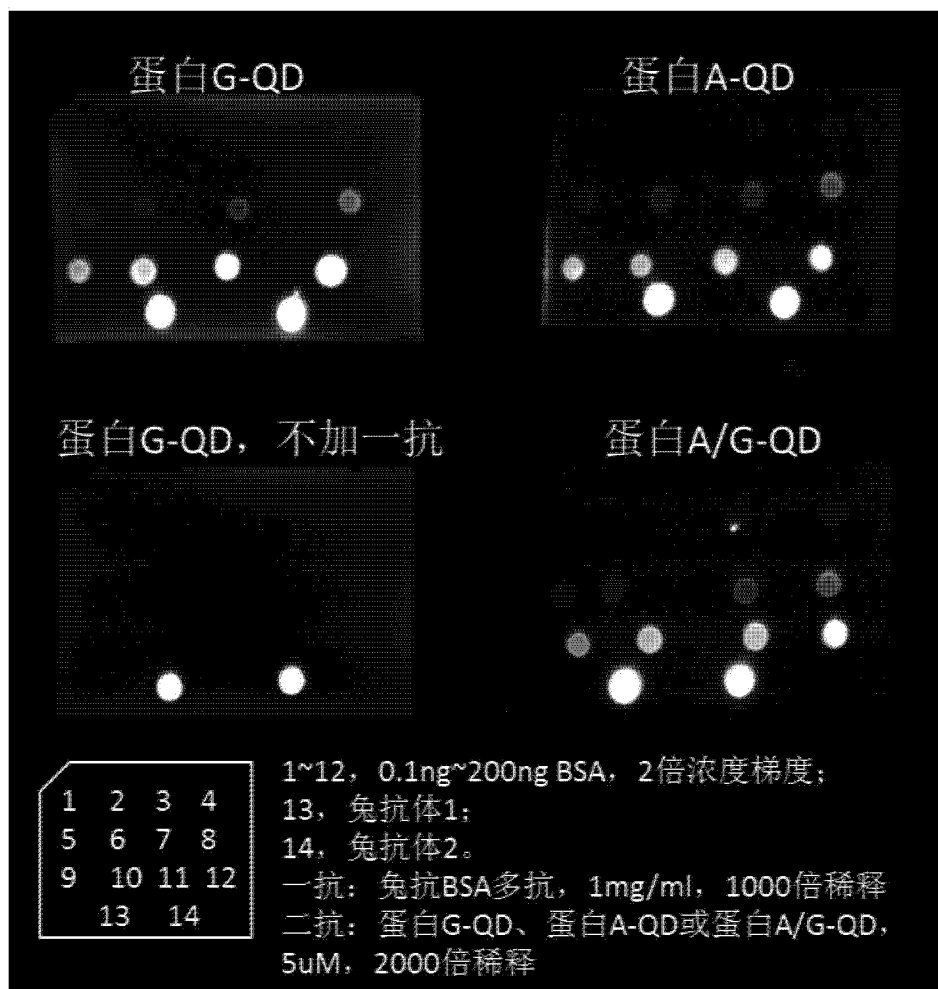


图 14

专利名称(译)	可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法及其应用		
公开(公告)号	CN103728447A	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	CN201410003726.0	申请日	2014-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京晶泰美康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京晶泰美康生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京晶泰美康生物科技有限公司		
[标]发明人	殷俊 杨唐斌		
发明人	殷俊 杨唐斌		
IPC分类号	G01N33/532 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/588		
代理人(译)	吴贵明 张永明		
其他公开文献	CN103728447B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种可控量子点位点特异性桥接偶联的抗体标记方法及其应用。该方法包括以下步骤：在量子点表面偶联抗体亲和配体；以及以抗体亲和配体作为桥接分子与抗体进行位点特异性自组装标记，其中，抗体亲和配体包括用于与抗体结合的抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列、用于与量子点表面偶联的标签序列以及提供抗体亲和蛋白或抗体结合肽序列与标签序列之间空间间隔的间隔臂序列。应用本发明的技术方案，用带标签序列和间隔臂序列的抗体亲和蛋白或抗体结合肽作为桥接分子偶联量子点与抗体，连接方式简单、快速、可控且位点特异性好，偶联产物在大多数生物检测环境条件下稳定，且适用范围广。

