



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103728447 B

(45)授权公告日 2016.07.13

(21)申请号 201410003726.0

(22)申请日 2014.01.03

(73)专利权人 北京纳晶生物科技有限公司

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)

(56)对比文件

CN 102731657 A,2012.10.17,

CN 101336376 A,2008.12.31,

CN 2489341 Y,2002.05.01,

CN 103014880 A,2013.04.03,

CN 101936987 A,2011.01.05,

李永进 等.融合标签技术及其应用.《生物
工程学报》.2006,第22卷(第4期),

曹黎明 等.酶的定向固定化方法及其对酶
生物活性的影响.《中国生物工程杂志》.2003,第
23卷(第1期),第22-29页.

武东亮 等.融合杀虫基因植物表达载体的
构建及转基因烟草的获得.《中国农业科学》
.2001,第34卷(第5期),

Alyona Sukhanova,et al..Oriented
conjugates of single-domain antibodies
and quantum dots: toward a new generation
of ultrasmall diagnostic nanoprobes.
《Nanomedicine: Nanotechnology, Biology,
and Medicine》.2012,第8卷(第4期),第516-525
页.

审查员 赵晓明

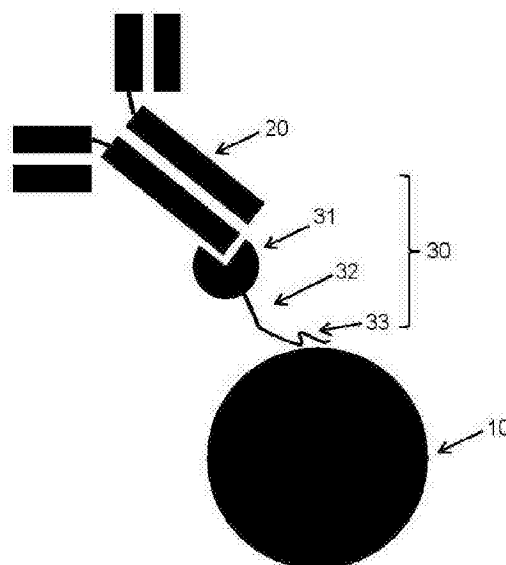
权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(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),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。

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,所述标签序列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,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。

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(20)与所述量子点(10)偶联摩尔比为0.5~100:1。

10. 根据权利要求1至9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):agcttcagtggtggtggtggtggtgaccggagct,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):
tgaacaacaacaacaataacaataacaacaacctgagctcctgaa及Asn10SShr(SEQ ID NO:4):
agctttcaggagctcaggttggttggttattggttattggttggttggttcaagct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)tggtgtgttatttggtgt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。

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> artifical	
	<400> 1	
	ceggtcacca ccaccaccac cactga	26
	<210> 2	
	<211> 34	
	<212> DNA	
[0080]	<213> artifical	
	<400> 2	
	agcttcagtg gtggtggtgg tggtagccgg agct	34
	<210> 3	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> artifical	
	<400> 3	
	tgaacaacaa caacaataac aataacaaca acctgagctc ctgaa	45
	<210> 4	
	<211> 53	
	<212> DNA	
	<213> artifical	
	<400> 4	
	agcttcagg agctcagggt gtgtgtatgt ttatgttgt tgtgttcaa gct	53

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial

<400> 5

[0081]

ggcctgaacg atatttttga agcgcagaaa attgaatggc atgaa

45

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial

<400> 6

tgttgtgtta ttgttgtt

18

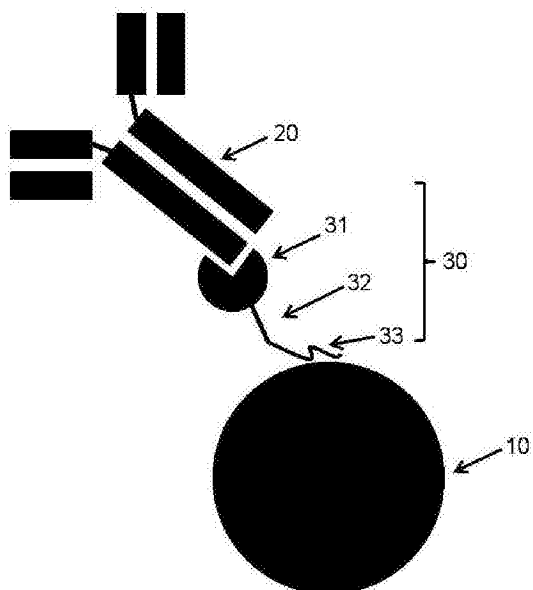


图1

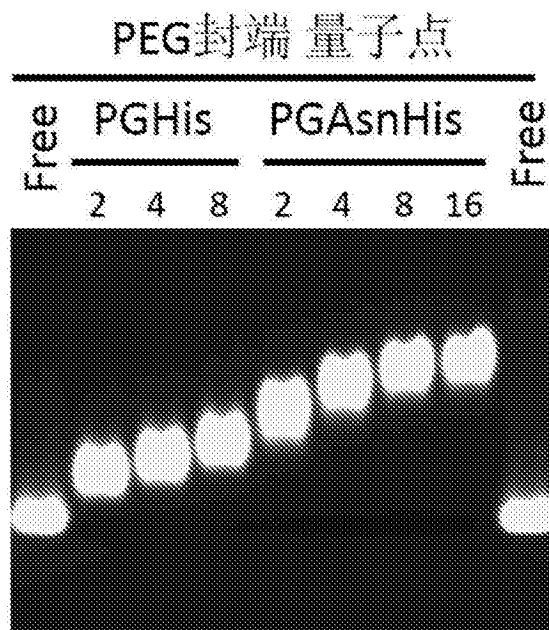


图2

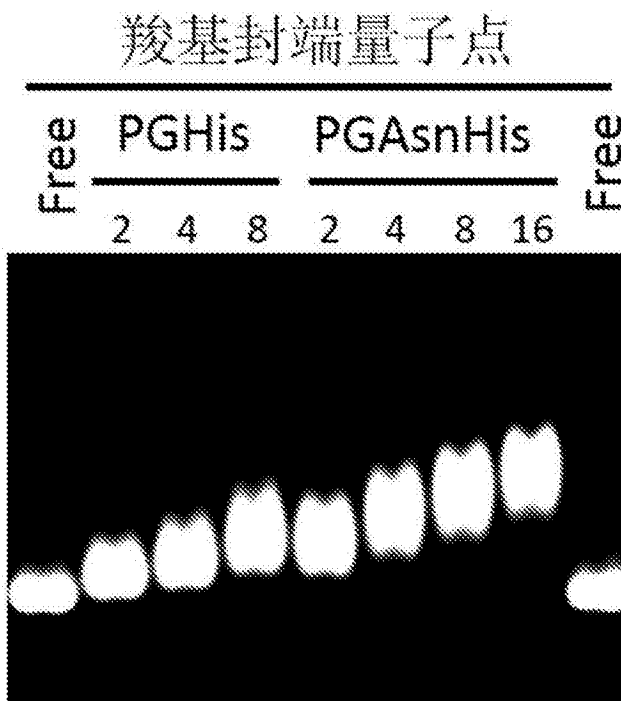


图3

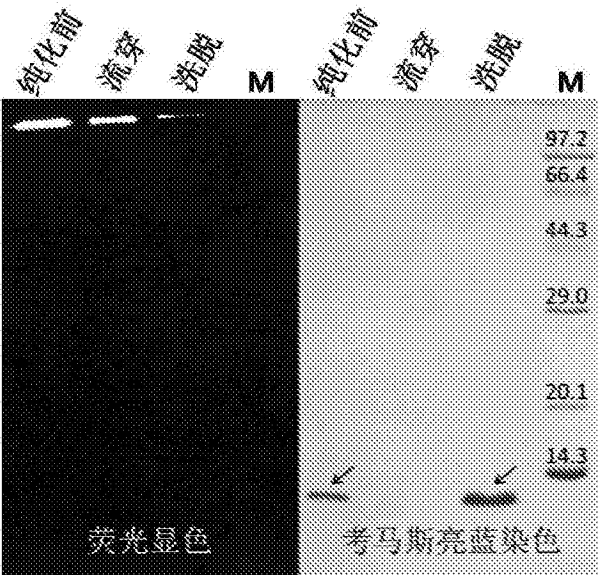


图4

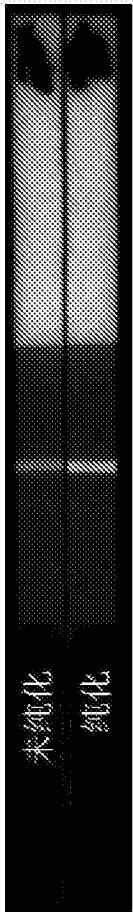


图5

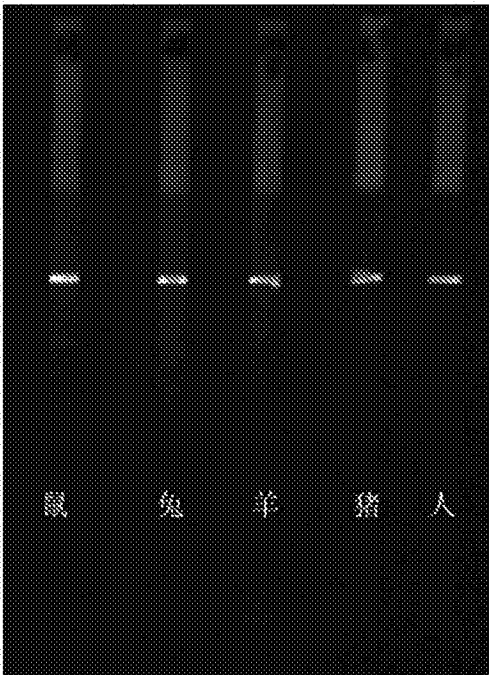


图6

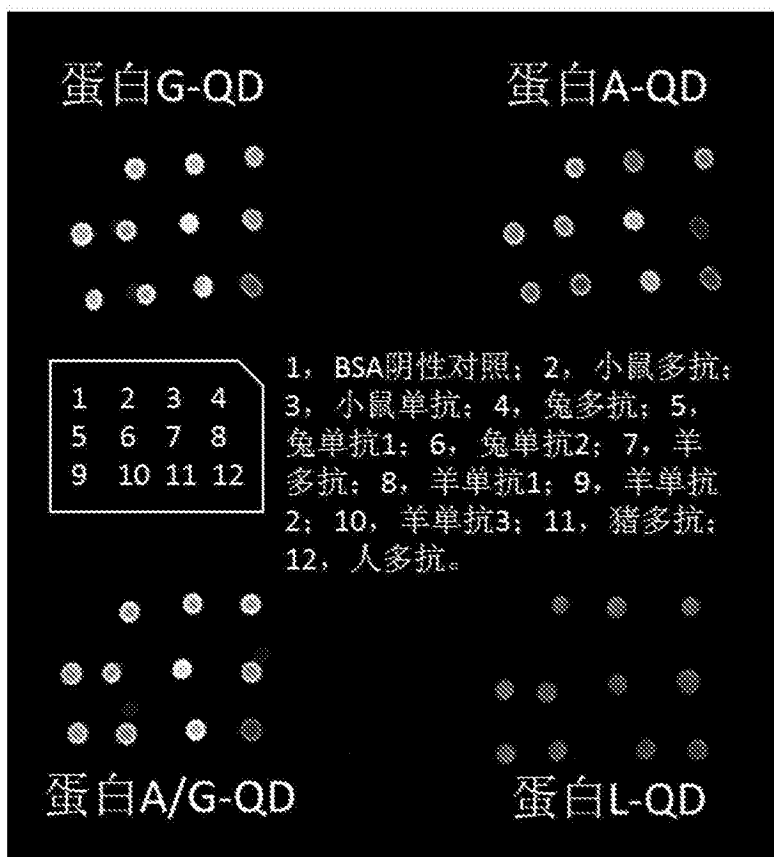


图7

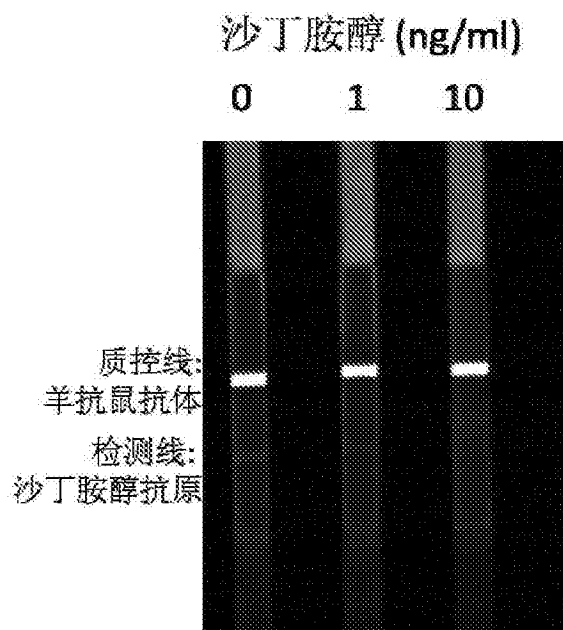


图8

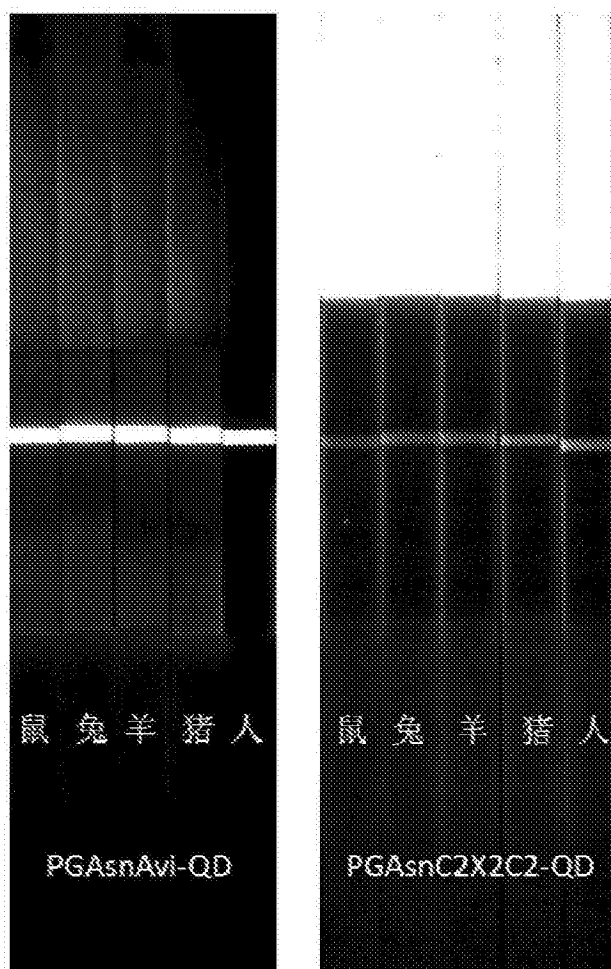


图9

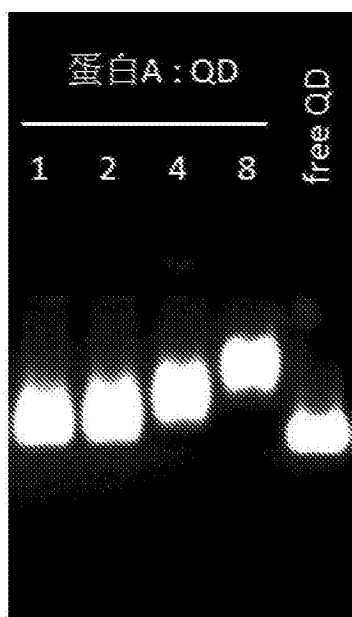


图10

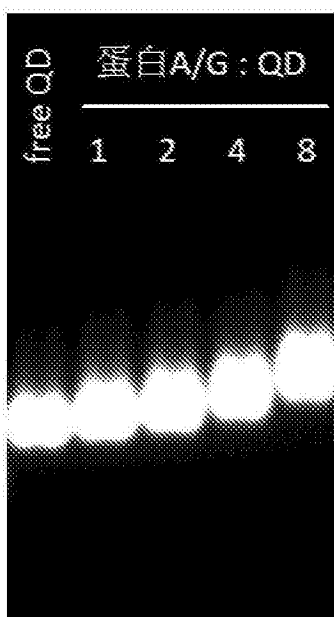


图11

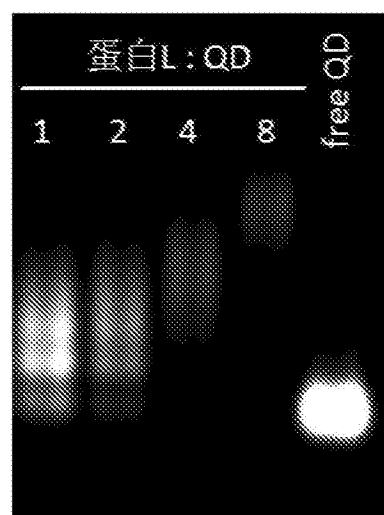


图12

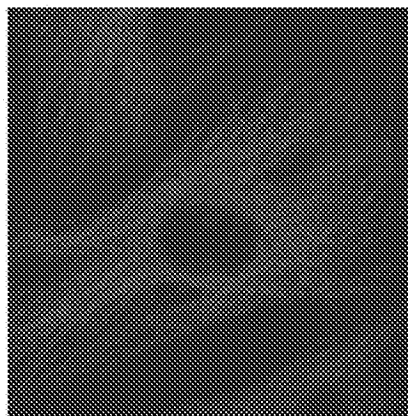


图13

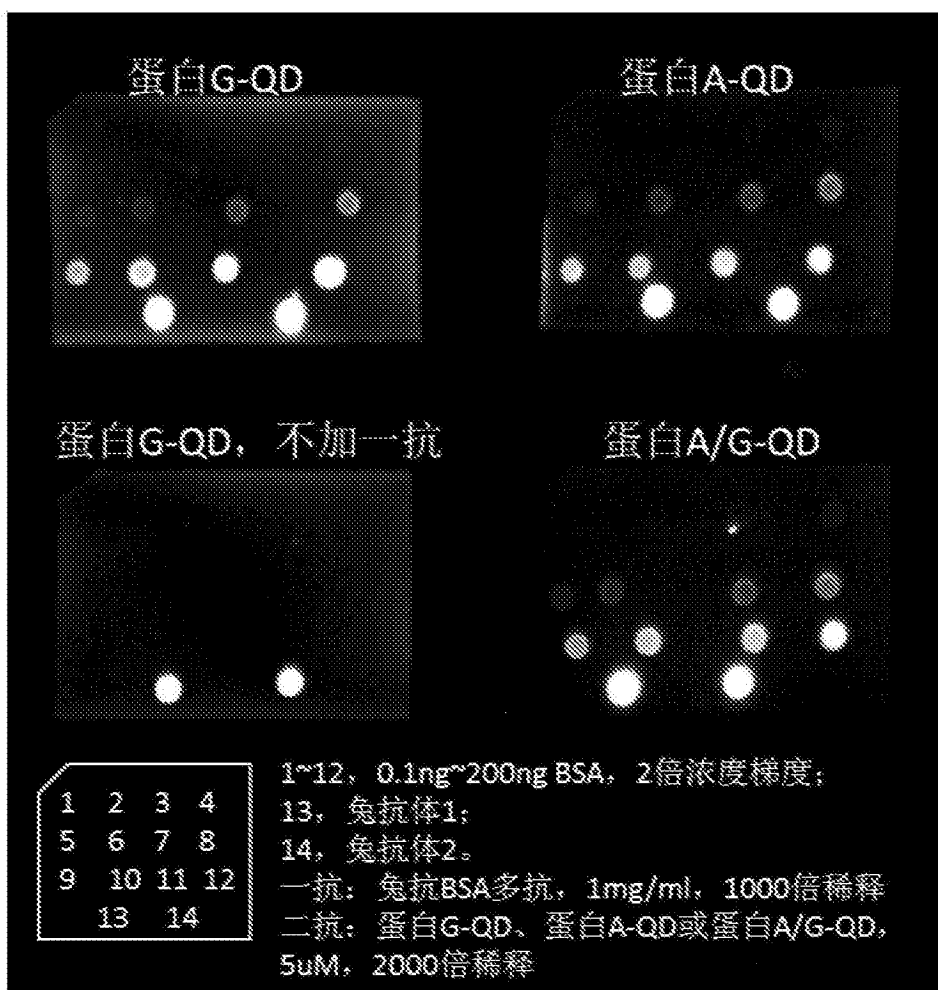


图14

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	CN103728447B	公开(公告)日	2016-07-13
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)	北京纳晶生物科技有限公司		
[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		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN103728447A		
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。

