



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103694358 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201310730765. 6

G01N 33/532(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 26

G01N 33/545(2006. 01)

(73) 专利权人 潍坊医学院

地址 261053 山东省潍坊市奎文区胜利东街
288 号

(56) 对比文件

JP 2-247564 A, 1990. 10. 03, 全文 .

CN 103267841 A, 2013. 08. 28, 全文 .

CN 103374068 A, 2013. 10. 30, 说明书第

[20]-[22]、[66] 段、权利要求 1、实施例 1-2.

CN 101149372 A, 2008. 03. 26, 全文 .

(72) 发明人 唐金宝 杨洪鸣

审查员 劳芳

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限
公司 37221

代理人 彭成

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C07K 1/36(2006. 01)

C07K 1/34(2006. 01)

C07K 1/16(2006. 01)

C07K 17/08(2006. 01)

C07K 17/06(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

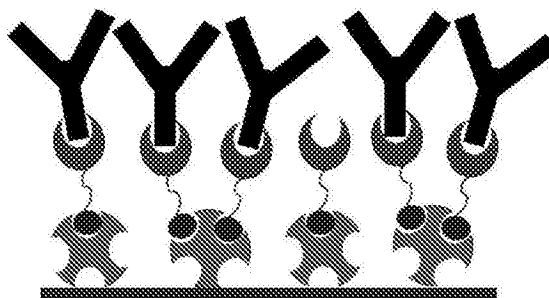
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽及其
在三维定向固定 IgG 抗体中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种位点特异性生物素标记的
IgG 亲和肽,是在 IgG 亲和肽的羧基端以生物方
式连接生物素构建而成,该位点特异性生物素标
记的 IgG 亲和肽一经产生,无需体外标记即可定
向亲和吸附于亲和素或链霉亲和素预包被的固相
载体表面。本发明的位点特异性生物素标记重组
IgG 亲和肽,可用于将 IgG 抗体固定在固相载体表
面,结合后,IgG 抗体的 Fab 端可充分暴露,从而充
分保持了抗体的抗原结合活性,进而可有效提高
固相免疫分析的灵敏性、特异性与稳定性。本发明
采用 Avi-tag 与 IgG 抗体亲和肽构建融合蛋白,解
决了 IgG 抗体亲和肽的定向亲和固定,进而获得
均一、Fab 段充分暴露及保持高抗原结合活性的
三维定向固相化 IgG 抗体。



1. 一种位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽在制备三维定向固定 IgG 抗体中的应用,其特征是,所述位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽制备方法包括以下步骤:

(1)根据 (Gly- Gly Gly Gly-Ser)₃及 Avi 基因序列,化学合成 (Gly₄-Ser)₃-Avi 的基因片段,所述 Avi 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,重组至 pUC18 载体,获得中间质粒载体;

(2)设计引物以 PCR 方式获得 IgG 亲和肽基因,重组至步骤(1)获得的中间质粒载体,获得原核表达载体,其中所述的 IgG 亲和肽为 ZZ 亲和肽;

(3)原核表达载体转化感受态大肠杆菌 BL21,获得基因工程菌;

(4)培养基因工程菌,培养基中含有生物素,依菌体内 BirA 酶同步催化,在所表达的蛋白的 Avi 序列的赖氨酸位点结合生物素;

(5)纯化目的蛋白,获得生物素定点定量连接的 IgG 亲和肽;

应用时,方法为:(A)首先,将位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽与预包被亲和素或链霉亲和素的聚苯乙烯载体以生物素-亲和素结合特异性定向吸附固定;(B)然后再利用 IgG 亲和肽与 IgG 抗体的特异性结合将 IgG 抗体 Fc 端结合到 IgG 亲和肽上。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征是,所述位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽的制备方法具体步骤如下:

(1)根据 Avi-tag 氨基酸序列,化学合成其基因序列,并在其 5' 端置入柔性蛋白 Linker:(Gly₄-Ser)₃的基因序列,得 (Gly₄-Ser)₃-Avi-tag 基因序列,并分别在该重组基因片段上下游置入 Pst I、Hind III 酶切位点,酶切插入 pUC18 载体,得中间质粒载体;

(2)表达载体及基因工程菌的构建:

①设计引物 PCR 扩增 ZZ 亲和肽基因,并插入到步骤(1)获得的中间质粒载体的 EcoR I、Pst I 位点,构建得到重组表达载体 pUC ZZ-(Gly₄-Ser)₃-Avi-tag;

②步骤①获得的重组表达载体通过 CaCl₂转化感受态大肠杆菌 BL21,氨苄 LB 抗性平板筛选阳性克隆,获得基因工程菌;

(3)基因工程菌的培养及体内生物素化:

①挑取步骤(2)获得的基因工程菌的单克隆菌落,接种于 5mL 液体 LB 培养基,37℃ 过夜培养、活化;

②步骤①获得的活化菌液按照 2% 的接种量转接于新鲜的 50mL 液体 LB 培养基,37℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.3 时,在培养基中加入终浓度为 50 μM 的生物素,继续培养 16h,依大肠杆菌菌体内 BirA 酶同步催化所表达的蛋白在 Avi 序列赖氨酸位点结合生物素;

(4)融合蛋白的提取:

①步骤(3)培养获得的基因工程菌于 4℃,1000rpm 离心 10min,收集菌体;

②菌体以 5mL 0.1M 的 Tris 缓冲液重悬,置入 -80℃液氮中 10min,再迅速置入 37℃的恒温水浴中 15min,如此反复冻融 3 次;

③步骤②反复冻融的菌液 4℃,1200rpm 离心 10min,上清转入一新离心管中;

(5)目的融合蛋白的纯化:

①清洗柱子:用 2 柱体积的 Buffer A 清洗 Strep-Tactin 柱,所述 Buffer A 的配方组成为:100mMTris·Cl,150mMNaCl,1mMEDTA,余量为水,pH8.0;

- ② 样品上柱 :取步骤(4)冻融的菌液上清 5mL 流通上柱结合目的蛋白 ;
 - ③ 冲洗柱子 :用 5 柱体积的 Buffer A 洗柱,并收集每部分的洗脱液 ;
 - ④ 目的蛋白的洗脱 :以 Buffer B 洗脱目的蛋白, 所述 Buffer B 的配方组成为 :
100mMTris • Cl,150mMNaCl,1mMEDTA, 2.5mMdesthiobiotin,pH8.0 ;
 - ⑤ 目的蛋白的脱盐与浓缩 :使用 Millipore 超滤器,4°C,4000 rpm,离心 30 min 浓缩,即得定点定量生物素标记的 ZZ 亲和肽。
3. 如权利要求 1 所述的应用,其特征是 :所述步骤(A)的具体方式如下 :
- ① 100 μ L / 孔的量将 IgG 亲和肽 -Biotin 蛋白溶液加到亲和素预包被聚苯乙烯的 96 孔聚苯乙烯板孔内,37°C 温育 2h ;
 - ②以含 0.2M NaCl 的 PBST 溶液洗涤,或 :以含 0.2M NaCl 及 0.005% NaN_3 的 PBST 溶液洗涤,共洗涤 3 次,每次 5min,在吸水纸上拍干 96 孔板,获得 IgG 亲和肽 -Biotin 定向吸附固定的聚苯乙烯微孔板。
4. 如权利要求 1 所述的应用,其特征是 :所述步骤(B)的具体方式如下 :
- ①按 100 μ L / 孔的量将 IgG 抗体加到 步骤(A)处理后的 IgG 亲和肽 -Biotin 定向吸附固定的聚苯乙烯微孔板,37°C 温育 2h ;
 - ②以含 0.2M NaCl 的 PBST 溶液洗涤,共洗涤 3 次,每次 5min,在吸水纸上拍干 96 孔板,获得三维定向固定的 IgG 抗体。

位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽及其在三维定向固定 IgG 抗体中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽,及其在三维定向固定 IgG 抗体中的应用,属于基因工程及免疫分析领域。

背景技术

[0002] 固相免疫测定技术是临床免疫学检验的重要组成部分,如酶联免疫吸附试验及免疫传感器、免疫诊断芯片等新技术,其应用基础是将抗原或抗体包被在固相载体上进行免疫测定,一般包被抗体更为常用。如酶联免疫吸附试验(Enzymelinkedimmunosorbentassay, ELISA)即是经典的固相免疫测定技术,具有灵敏、简单、快速及易于自动化操作等特点,在生物医学、临床诊断等领域广泛应用,国内外普遍采用聚苯乙烯(Polystyrene, PS)微孔板/管/珠等为固相载体材料且 96 孔 PS 微孔板更为常用。目前抗体在 PS 固相载体表面固相化方法主要有物理吸附法、化学共价交联法及捕获间接包被法等方法。

[0003] 物理吸附法是应用较早的抗体固相化技术,目前仍有相当普遍的应用。该法原理是通过蛋白质分子结构的疏水基团与固相载体表面疏水基团通过物理吸附结合,这种吸附是非特异性的,存在蛋白吸附能力差及抗体活性低等问题。研究表明通过物理吸附作用直接固定在载体表面的多克隆抗体 75% 失去抗原结合活性,而单克隆抗体则 90% 没有抗原结合活性(ButlerJE, etal. Mol Immunol. 1993, 30:1165)。

[0004] 化学共价交联法主要是通过载体表面的改性或修饰,引入双功能偶联剂、-NH₂等活性基团,使生物分子吸附到 PS 表面过程由被动的物理吸附变成了共价偶联。共价键依靠不同分子间活性基团的化学反应产生的强相互作用力,如丹麦 NUNC 公司的氨基化 PS 微孔板及美国康宁公司的琥珀酰亚胺脂活化酶标板,有效提高了固相抗体(抗原)的结合量。目前认为化学共价法是提高固相材料抗体结合数量相对有效的方法,理论上只要带有合适活性基团的生物活性分子都能通过共价键牢固地结合在固相表面,研究者在载体表面引入不同的活性基团,与蛋白质分子内天然氨基酸残基,或经“ClickChemistry”修饰的某些氨基酸残基共价结合完成抗体的固定。尽管该模式是可控的固定方式,但存在的问题是:参与共价化学键的活性基团在蛋白质分子内的位置有不确定性和不唯一性,不能有效保证抗体定向固定及高免疫学活性。Peter 对 NUNC 公司的高吸附酶标板(MaxiSorp-650)研究发现,尽管抗体包被量达到 650ng/cm²,但仅仅只有 5~10% 的包被抗体具有抗原捕捉能力。

[0005] 利用抗原-抗体反应捕获待包被抗体,在一定程度上可实现被捕获抗体的定向固定。即将抗-抗体的包被抗体先进行固定;也可采用 IgG 亲和蛋白如 SpA,该蛋白为金黄色葡萄球菌细胞壁的单链多肽,分子量为 42kD,能通过疏水作用结合人、兔等多种动物 IgG 的 Fc 段,且这种结合不影响 IgG 的 Fab 段与抗原特异性结合的免疫活性。在 IgG 抗体固定化时,SpA 可作为受体蛋白先吸附在 PS 板后,再结合 IgG 抗体 Fc 段实现捕获法固定 IgG。采用间接包被方式能暴露抗体的抗原结合部位,有利于捕捉体系中的抗原,在一定程度上提

高了免疫检测的特异性与灵敏度,但第一抗体或受体蛋白仍采用物理吸附法或化学共价偶联,仍不能有效实现第一抗体或受体蛋白的定向包被固定。

[0006] 间接包被技术中也可利用生物素-亲和素系统(biotin-avidin system, BAS)固定生物素化抗体,该技术以化学共价偶联标记抗体分子内 $-NH_2$ 、 $-CHO$ 或 $-SH$ 等活性位点通过化学法与活化生物素共价偶联得到生物素化抗体,与已包被在聚苯乙烯等固相载体表面的亲和素或链霉亲和素,以生物素-亲和素具有的独特结合特性介导生物素化抗体的固相化。一个抗体分子内存在多个偶联位点,故一个抗体分子可偶联上3~5个生物素分子;尽管亲和素或链霉亲和素的包被方式不是定向固定,然而一个亲和素或链霉亲和素具有4个生物素结合位点,因而其生物素结合位点不易全被掩盖,所以该技术可有效提高抗体的包被量。然而,生物素与抗体分子内的活性基团是一种随机结合方式,当反应基团的氨基酸残基位于抗体 Fab 或附近时,导致固相化的生物素化抗体的 Fc 端向外而掩盖 Fab 段,这样的固相抗体就失去了抗原结合能力(如图 1 所示)。

[0007] 抗体在载体表面固定后的空间构型、数量及免疫学活性是影响固相免疫测定技术稳定性、灵敏度和选择性的关键因素,建立一种抗体固定化技术,将抗体的 Fc 段固定在载体表面,使得 Fab 端从载体的表面充分向空间展示且抗原结合活性得以完好保持,对于提高固相免疫分析的灵敏性、特异性与稳定性具有重要意义。

发明内容

[0008] 针对上述现有技术,本发明的目的在于提供一种实现 IgG 抗体的特异性三维定向固定的“生物桥梁”——位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽,本发明的位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽,一经产生,无需体外标记即可介导 IgG 亲和肽定向亲和和吸附于亲和素或链霉亲和素预包被的固相载体表面。利用生物亲和方式将本发明的位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽与预包被亲和素或链霉亲和素的聚苯乙烯载体特异性结合,再利用生物亲和方式将本发明的位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽与 IgG 抗体结合,即可得到三维固相化 IgG 抗体,该三维固相化 IgG 抗体的 Fab 端可充分暴露,从而充分保持抗体的抗原结合活性,进而可有效提高固相免疫分析的灵敏性、特异性与稳定性。

[0009] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0010] 一种位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽,是在 IgG 亲和肽的羧基端连接生物素构建而成,该位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽一经产生,无需体外标记即可定向亲和和吸附于亲和素或链霉亲和素预包被的固相载体表面。

[0011] 所述位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽的制备方法如下:

[0012] (1) 根据 $(Gly_4-Ser)_3$ 及 Avi 基因序列,化学合成 $(Gly_4-Ser)_3-Avi$ 的基因片段,重组至 pUC18 载体,获得中间质粒载体(这个过程是常规技术手段就可以实现的,所提及的 pUC18 载体是所属领域的常规载体);

[0013] (2) 设计引物以 PCR 方式获得 IgG 亲和肽(ZZ 亲和肽)基因,重组至上述中间质粒载体,获得原核表达载体;

[0014] (3) 原核表达载体转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3),获得基因工程菌;

[0015] (4) 培养基因工程菌,培养基中含有终浓度为 $50 \mu M$ 的生物素,依菌体内 BirA 酶同步催化,在所表达的目的蛋白的 Avi 序列的赖氨酸位点结合生物素;

[0016] (5) 纯化目的蛋白, 获得生物素定点定量连接的 IgG 亲和肽 :ZZ-Biotin。

[0017] 进一步地, 制备方法具体如下 :

[0018] (1) 根据 Avi-tag 氨基酸序列, 化学合成其基因序列 :

[0019] 5' -GGTCTGAACGATATCTTCGAAGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAA-3' (如 SEQIDNO. 1 所示) ;

[0020] 并在其 5' 端置入柔性蛋白 Linker : $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3$ 的基因序列, 得 $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3\text{-Avi-tag}$ 基因序列, 并分别在该重组基因片段上下游置入 PstI、HindIII 酶切位点, 酶切插入 pUC18 载体, 得中间质粒载体 ;

[0021] (2) 表达载体及基因工程菌的构建 :

[0022] ①设计引物 PCR 扩增 ZZ 亲和肽基因, 并插入到上述中间质粒载体的 EcoRI、PstI 位点, 构建得到重组表达载体 pUCZZ- $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3\text{-Avi-tag}$, 该重组表达载体表达得到的重组蛋白是羧基端带柔性蛋白 Linker 及 Avi-tag 的 ZZ 亲和肽 ;

[0023] ②上述重组表达载体 CaCl_2 转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3), 氨苄 LB 抗性平板 (即培养基中除常规 LB 培养基的成分外, 还含氨苄 $100 \mu\text{g/mL}$) 筛选阳性克隆, 获得基因工程菌 ;

[0024] (3) 基因工程菌的培养及体内生物素化 :

[0025] ①挑取单克隆菌落接种于 5mL 液体 LB 培养基 (培养基中除常规 LB 培养基的成分外, 还含氨苄 $100 \mu\text{g/mL}$), 37°C 过夜培养、活化 ;

[0026] ②活化菌液按照 2% (v/v) 的接种量转接于新鲜的 50mL 液体 LB 培养基 (培养基中除常规 LB 培养基的成分外, 还含氨苄 $100 \mu\text{g/mL}$), 37°C 培养至 OD_{600} 为 0.3 时, 在培养基中加入终浓度为 $50 \mu\text{M}$ 的生物素, 继续培养 16h, 依大肠杆菌菌体内 BirA 酶同步催化所表达的目的蛋白在 Avi 序列赖氨酸位点结合生物素 ;

[0027] (4) 融合蛋白的提取 :

[0028] ①经上述培养的基因工程菌 4°C , 1000rpm 离心 10min, 收集菌体 ;

[0029] ②菌体以 5mL 0.1M 的 Tris 缓冲液重悬, 置入 -80°C 液氮中 10min, 再迅速置入 37°C 的恒温水浴中 15min, 如此反复冻融 3 次 ;

[0030] ③上述反复冻融的菌液 4°C , 1200rpm 离心 10min, 上清转入一新离心管中 ;

[0031] (5) 目的融合蛋白的纯化 :

[0032] ①清洗柱子 : 用 2 柱体积的 BufferA 清洗 Strep-Tactin 柱 ;

[0033] ②样品上柱 : 取步骤 (4) 冻融的菌液上清 5mL 流通上柱结合目的蛋白 ;

[0034] ③冲洗柱子 : 用 5 柱体积的 BufferA 洗柱, 并收集每部分的洗脱液 ;

[0035] ④目的蛋白的洗脱 : 以 BufferB 洗脱目的蛋白, 收集每一部分并各取 $20 \mu\text{L}$ SDS-PAGE 鉴定 ;

[0036] ⑤目的蛋白的脱盐与浓缩 : 使用 Millipore 超滤器, 4°C , 4000rpm, 离心 30min 浓缩, 将浓缩液以 0.01M TBS 稀释至合适体积, 既得定点定量、生物学标记的生物素化 IgG 抗体亲和肽 :ZZ-Biotin。

[0037] 所述 BufferA 的配方组成为 : 100mM Tris · Cl, 150mM NaCl, 1mMEDTA, 余量为水, pH8.0 (为现有技术中的常规试剂)。

[0038] 所述 BufferB 的配方组成为 : 100mM Tris · Cl, 150mM NaCl, 1mMEDTA,

2.5mM desthiobiotin, pH8.0 (为现有技术中的常规试剂)。

[0039] 所述 LB 培养基的配方为:1L 培养基中含 5g 酵母粉, 10g 蛋白胨, 5g NaCl, 100mg 氨苄青霉素, 余量为水, pH7.2 ~ 7.4。

[0040] 本发明的位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽, 可用于将 IgG 抗体固定在固相载体表面, 利用本发明的位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽将 IgG 抗体固定在固相载体表面的方法为:(A) 首先, 将位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽(ZZ-Biotin)与预包被亲和素或链霉亲和素的聚苯乙烯载体以生物素-亲和素结合特异性定向吸附固定;(B) 然后再利用 IgG 亲和肽与 IgG 抗体的特异性结合将 IgG 抗体结合到 IgG 亲和肽上, 结合后, IgG 抗体的 Fab 端可充分暴露, 从而充分保持了抗体的抗原结合活性, 进而可有效提高固相免疫分析的灵敏性、特异性与稳定性。

[0041] 一种结合有 IgG 亲和肽的固相载体, 其结构为:在预包被亲和素或链霉亲和素的聚苯乙烯载体表面特异性定向吸附固定有 IgG 亲和肽, 是通过以下方法制备而成:将位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽(ZZ-Biotin)与预包被亲和素或链霉亲和素的聚苯乙烯载体以生物素-亲和素结合特异性定向吸附固定, 即得。

[0042] 一种三维固相化 IgG 抗体, 其结构为:IgG 亲和肽与 IgG 抗体结合, IgG 亲和肽定向吸附固定在预包被亲和素或链霉亲和素的聚苯乙烯载体表面, 是通过上述方法制备而成。

[0043] 上述步骤(A)“将位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽(ZZ-Biotin)与预包被亲和素或链霉亲和素的聚苯乙烯载体以生物素-亲和素结合特异性定向吸附固定”的具体方式如下:

[0044] ①按 100 μ L/孔的 ZZ-Biotin 蛋白溶液(PBST 溶液, 含 1M NaCl; ZZ-Biotin 蛋白浓度 0.05 μ g/mL) 加到亲和素预包被聚苯乙烯的 96 孔聚苯乙烯板孔内, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h;

[0045] ②以含 0.2M NaCl 的 PBST 溶液洗涤, 或:以含 0.2M NaCl 及 0.005% Na₃N 的 PBST 溶液洗涤, 共洗涤 3 次, 每次 5min, 在吸水纸上拍干 96 孔板, 获得 ZZ-Biotin 定向吸附固定的聚苯乙烯微孔板, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0046] 上述步骤(B)“利用 IgG 亲和肽与 IgG 抗体的特异性结合将 IgG 抗体结合到 IgG 亲和肽上”的具体方式如下:

[0047] ①按 100 μ L/孔的 IgG 抗体(抗体的浓度为 0.1 μ g/mL, 溶剂为含 1M NaCl 的 PBS 溶液,) 加到上述 ZZ-Biotin 定向吸附固定的聚苯乙烯微孔板, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h;

[0048] ②以含 0.2M NaCl 的 PBST 溶液洗涤, 共洗涤 3 次, 每次 5min, 在吸水纸上拍干 96 孔板, 获得三维定向固定的 IgG 抗体。

[0049] 所述缓冲液 PBST 为 pH7.4 的 PBS 溶液中含有 0.05% Tween-20。

[0050] 所述缓冲液 PBS 为 pH7.4 的溶液, 含有 NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM。

[0051] 由背景技术可知, SpA 可亲和 IgG 抗体而在免疫测定中应用, 但 SpA 的 IgG 结合活性来自 E、D、A、B、C5 个高度同源的 IgG 结合结构域。研究发现, 其 IgG 结合结构域不仅与 IgG 的 Fc 段结合, 也与某些 IgG 的 Fab 段(如人 IgG1 的 F(ab')₂) 结合。本发明以 ZZ 亲和肽结构域代替 SpA 的 5 个同源 IgG 结合结构域克服了 SpA 与某些 IgG 的 Fab 段结合的缺点。SpA 也应用于 IgG 抗体的间接包被, 但 SpA 与固相载体的吸附是随机化学或物理吸附, 不能实现 SpA 的定向吸附固定。因此本发明采用仅与 IgG 的 Fc 段结合结构域—ZZ 亲和肽, 提

高了对 IgG 的 Fc 结合特异性,也实现了 ZZ 亲和肽的定向固定。

[0052] 由背景技术可知,生物素化抗体可通过生物素-亲和素作用有效包被在亲和素包被的载体表面,但生物素与抗体分子内的活性基团是一种随机结合方式,当反应基团的氨基酸残基位于抗体 Fab 或附近时,导致固相化的生物素化抗体的 Fc 端向外而掩盖 Fab 段,仍不能保证所吸附的抗体是定向固定的抗体。理论上讲,Avi-tag 可与单链抗体 ScFv 构建融合蛋白实现生物素标签介导 ScFv 抗体的定向固定,但对于目前免疫分析中最为常用的多克隆及单克隆抗体,因受到构建融合蛋白技术限制,不能实现多克隆及单克隆抗体的定向固定。

[0053] 本发明采用 Avi-tag 与 IgG 抗体亲和肽构建融合蛋白,解决了 IgG 抗体亲和肽的定向亲和固定,更为进步的是,实现了多克隆及单克隆抗体在聚苯乙烯载体上的生物学方式三维定向固定。本发明提供了一种位点特异性生物素标记的 IgG 亲和肽介导固相化三维 IgG 抗体,是利用生物素化标签肽(Avi-tag)与 IgG 抗体亲和肽之间构建重组蛋白,在菌体内实现 IgG 亲和肽的定点生物素化,继而利用生物素-亲和素特异性亲和作用将 IgG 抗体亲和肽定向吸附在 PS 表面,进而结合 IgG 抗体 Fc 段达到抗体 Fab 端向外定向展示,获得均一、Fab 段充分暴露及保持高抗原结合活性的三维定向固相化 IgG 抗体。

附图说明

[0054] 图 1:化学共价偶联的生物素化抗体在亲和素包被的固相载体表面的结合固定示意图。

[0055] 图 2:位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽在亲和素包被的固相载体表面的定向固定示意图。

[0056] 图 3:位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽导向 IgG 抗体的三维定向固定示意图。

[0057] 图 4:位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽介导 IgG 定向固定与化学共价偶联生物素化 IgG 直接吸附固定的 ELISA 检测结果比较。

具体实施方式

[0058] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0059] 若无特别说明,所涉及的试剂、试验方法均为常规试剂、常规方法。

[0060] 所述 BufferB 的配方组成为:100mMTris·Cl,150mMNaCl,1mMEDTA,2.5mMdesthiobiotin,pH8.0(为现有技术中的常规试剂)。

[0061] 所述 LB 培养基的配方为:1L 培养基中含 5g 酵母粉,10g 蛋白胨,5gNaCl,100mg 氨苄青霉素,余量为水,pH7.2~7.4。

[0062] 所述 LB 培养基的配方为:1L 培养基中含 5g 酵母粉,10g 蛋白胨,5gNaCl,100mg 氨苄青霉素,余量为水,pH7.2~7.4。

[0063] 所述缓冲液 PBST 为 pH7.4 的 PBS 溶液中含有 0.05%Tween-20。

[0064] 所述缓冲液 PBS 为 pH7.4 的溶液中,含有 NaCl137mM, KCl2.7mM, Na₂HPO₄10mM, KH₂PO₄2mM。

[0065] 实施例 1 含 (Gly₄-Ser)₃-Avi-tag 基因序列中间质粒载体的构建

[0066] 步骤如下：

[0067] (1) 根据 $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3$ 及 Avi-tag 基因序列设计如下基因序列：

[0068] 5' -GCGGAGGTGGATCTGGCGGAGGTGGATCGGGCGGAGGTGGATCAGGTCTGAACGATATCTTCGAA GCTCAGAA AATCGAATGGCACGAA-3' ;如 SEQIDNO. 2 所示；

[0069] 其 5' 端及 3' 端分别设有 PstI、HindIII 酶切位点。

[0070] 上述基因序列化学合成委托大连宝生物生物工程公司完成；

[0071] (2) 化学合成得到的 DNA 片段双酶切重组至 pUC18 载体，获得含有 $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3\text{-Avi-tag}$ 融合基因的中间载体 pUC $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3\text{-Avi-tag}$ 。

[0072] 实施例 2 IgG 亲和肽 -Avi-tag 融合蛋白 (ZZ-Avi-tag fusion protein) 的基因重组技术制备与纯化

[0073] 步骤如下：

[0074] (1) IgG 亲和肽 (ZZ 基因) 序列的扩增、载体及基因工程菌的构建：设计引物：

[0075] 5' -CCGGAATCCATGGCGCAACACGATGAAG-3' (如 SEQIDNO. 3 所示)；

[0076] 和：5' -CCCCTGCAGTTAATTCGCGTC-3' (如 SEQIDNO. 4 所示)；

[0077] 以 pEZZ18 为模板，上述引物 PCR 扩增 ZZ 基因，克隆至实例 1 构建的中间质粒载体 pUC $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3\text{-Avi-tag}$ 的 EcoRI、PstI 位点，获重组表达载体 pUCZZ- $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3\text{-Avi-tag}/E. coli\text{BL}21$ 质粒，CaCl₂ 转化 E. coli BL21，氨苄 LB 抗性平板 (即培养基中除常规 LB 培养基的成分外，还含氨苄 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 筛选阳性克隆，获得基因工程菌。

[0078] (2) ZZ-Avi-tag 融合蛋白的表达：

[0079] ① 挑取单克隆菌落接种于 5mL 液体 LB 培养基 (培养基中除常规 LB 培养基的成分外，还含氨苄 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，37°C 过夜 (12h) 培养、活化；

[0080] ② 活化菌液按照 2% (v/v) 的接种量转接于新鲜的 50mL 液体 LB 培养基 (培养基中除常规 LB 培养基的成分外，还含氨苄 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，37°C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.3 时，在培养基中加入终浓度为 50 μM 的生物素，继续培养 16h，依大肠杆菌菌体内 BirA 酶同步催化所表达的目的蛋白在 Avi 序列赖氨酸位点结合生物素。

[0081] (3) 融合蛋白的提取：

[0082] ① 经上述培养的基因工程菌 4°C，1000rpm 离心 10min，收集菌体；

[0083] ② 菌体以 5mL 0.1M 的 Tris 缓冲液重悬，置入 -80°C 液氮中 10min，再迅速置入 37°C 的恒温水浴中 15min，如此反复冻融 3 次，释放目的蛋白；

[0084] ③ 上述反复冻融的菌液 4°C，12000rpm 离心 10min，上清转入一新离心管中；

[0085] (4) 目的融合蛋白的纯化：

[0086] ① 清洗柱子：用 2 柱体积的 BufferA 清洗 Strep-Tactin 柱；

[0087] ② 样品上柱：取步骤 (4) 冻融的菌液上清 5mL 流通上柱结合目的蛋白；

[0088] ③ 冲洗柱子：用 5 柱体积的 BufferA 洗柱；

[0089] ④ 目的蛋白的洗脱：以 BufferB 洗脱目的蛋白，流速 0.2ml/min，收集每一部分并各取 20 μL SDS-PAGE 鉴定；

[0090] ⑤ 目的蛋白的脱盐与浓缩：使用 Millipore 超滤器，4°C，4000rpm，离心 30min 浓缩，用 5mL 0.1MPBS 加入超滤管中，离心 30min，重复 3 次，可去除浓缩液中的 EDTA 并将缓冲

液更换为 0.1MPBS,将浓缩液以 0.1MPBS 稀释至合适体积,既得定点定量生物素标记的 ZZ 亲和肽:ZZ-Biotin。

[0091] 实施例 3ZZ-Biotin 对 ZZ 亲和肽的定向固定

[0092] 步骤如下:

[0093] (1)按 100 μ L/ 孔的 ZZ-Biotin 蛋白溶液(PBST 溶液,含 1MNaCl ;ZZ-Biotin 蛋白浓度 0.05 μ g/mL)加到亲和素预包被聚苯乙烯的 96 孔聚苯乙烯板孔内,37 $^{\circ}$ C 温育 2h ;

[0094] (2)以含 0.2MNaCl 的 PBST 溶液洗涤,共洗涤 3 次,每次 5min,在吸水纸上拍干 96 孔板,获得 ZZ-Biotin 定向吸附固定的聚苯乙烯微孔板(如图 2 所示),4 $^{\circ}$ C 保存。

[0095] 实施例 4ZZ-Biotin 导向 IgG 多克隆抗体在微孔板表面的三维定向固定

[0096] 步骤如下:

[0097] (1)按 100 μ L/ 孔的兔 IgG 抗体(兔 IgG 抗体的浓度为 0.1 μ g/mL,溶剂为含 1MNaCl 的 PBS 溶液,)加到上述 ZZ-Biotin 定向吸附固定的聚苯乙烯微孔板,37 $^{\circ}$ C 温育 2h ;

[0098] (2)以含 0.2MNaCl 的 PBST 溶液洗涤,共洗涤 3 次,每次 5min,在吸水纸上拍干 96 孔板,获得三维定向固定的兔多克隆 IgG 抗体(如图 3 所示)。

[0099] 实施例 5ZZ-Biotin 导向 IgG 单克隆抗体在微孔板表面的三维定向固定

[0100] 步骤如下:

[0101] (1)按 100 μ L/ 孔的鼠单克隆抗体(0.01 μ g/mL,含 1MNaCl 的 PBS 溶液,)加到聚苯乙烯微孔板已包被的 96 孔细胞培养板,37 $^{\circ}$ C 温育 2h ;

[0102] (2)以含 0.2MNaCl 的 PBST 溶液洗涤,共洗涤 3 次,每次 5min,在吸水纸上拍干 96 孔板,获得三维定向固定的鼠单克隆 IgG 抗体。

[0103] 实施例 6ZZ-Biotin 导向三维定向固定 IgG 抗体对检测效能的影响

[0104] 步骤如下:

[0105] (1)按 100 μ L/ 孔的鼠 - 抗 IgY 单克隆抗体(IgG2a 亚类)(鼠 IgG 抗体的浓度为 0.1 μ g/mL,溶剂为含 1MNaCl 的 PBS 溶液)加到实施例 3 的 ZZ-Biotin 定向吸附固定的聚苯乙烯微孔板,37 $^{\circ}$ C 温育 2h ;

[0106] (2)以含 0.2MNaCl 的 PBST 溶液洗涤,共洗涤 3 次,每次 5min,在吸水纸上拍干 96 孔板。

[0107] (3)100 μ L 系列浓度的 IgY (0 ~ 400ng/mL)加入到孔内,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,以 PBST 洗涤 3 次,100 μ L/ 孔 HRP 标记的山羊 - 抗 IgY 抗体(1:2000)加入到孔内,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,以 PBST 洗涤 3 次,TMB 底物显色。

[0108] (4)对照实验:生物素化学直接标记的鼠 - 抗 IgY 单克隆抗体(IgG2a 亚类)(鼠 IgG 抗体的浓度为 0.1 μ g/mL,溶剂为含 1MNaCl 的 PBS 溶液)按 100 μ L/ 孔的加入亲和素预包被聚苯乙烯的 96 孔聚苯乙烯板孔,4 $^{\circ}$ C 过夜包被,以 PBST 洗涤 3 次,每次 5min,甩干;100 μ L 系列浓度的 IgY (0 - 400ng/mL)加入到孔内,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,以 PBST 洗涤 3 次,100 μ L/ 孔 HRP 标记的山羊 - 抗 IgY 抗体(1:2000)加入到孔内,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,以 PBST 洗涤 3 次,TMB 底物显色。

[0109] (5)两种不同固定方式的结果如图 4 所示,本发明 ZZ-Biotin 导向三维定向固定 IgG 抗体的检测线性范围为 0.5 ~ 800ng/mL,检测灵敏度为 0.1ng/mL;对照试验即直接吸附固定模式的检测线性范围为 2 ~ 600ng/mL,检测灵敏度为 1ng/mL。本发明 ZZ-Biotin 导

向三维定向固定 IgG 抗体技术在 ELISA 测定中有更宽的检测线性范围,检测灵敏度可提高 10 倍。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 潍坊医学院

<120> 位点特异性生物素标记重组 IgG 亲和肽及其在三维定向固定 IgG 抗体中的应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ggctcgaacg atatcttcga agctcagaaa atcgaatggc acgaa 45

<210> 2

<211> 89

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gcggaggtgg atctggcggg ggtggatcgg gcggaggtgg atcaggtctg aacgatatct 60

tcgaagctca gaaaatcgaa tggcaccgaa 89

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

ccggaattcc atggcgcaac acgatgaag 29

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

[0002]

<213> 人工序列

<400> 4

cccctgcagt taattcgegt c

21

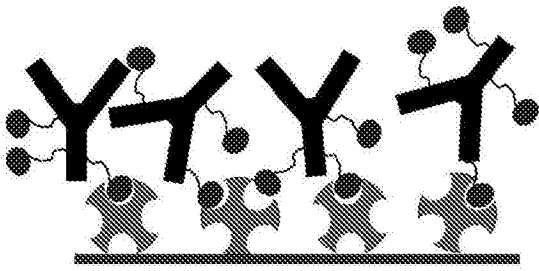


图 1

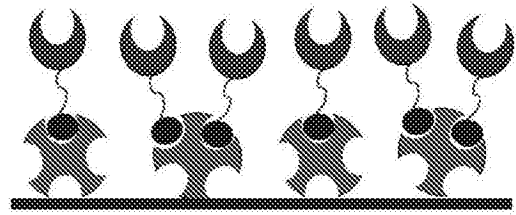


图 2

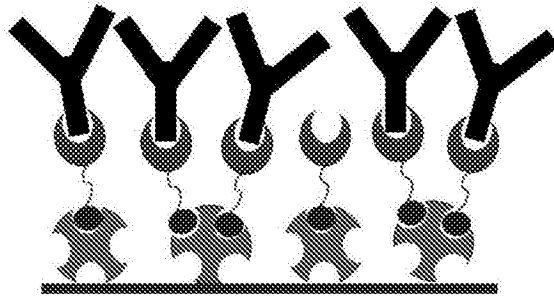


图 3

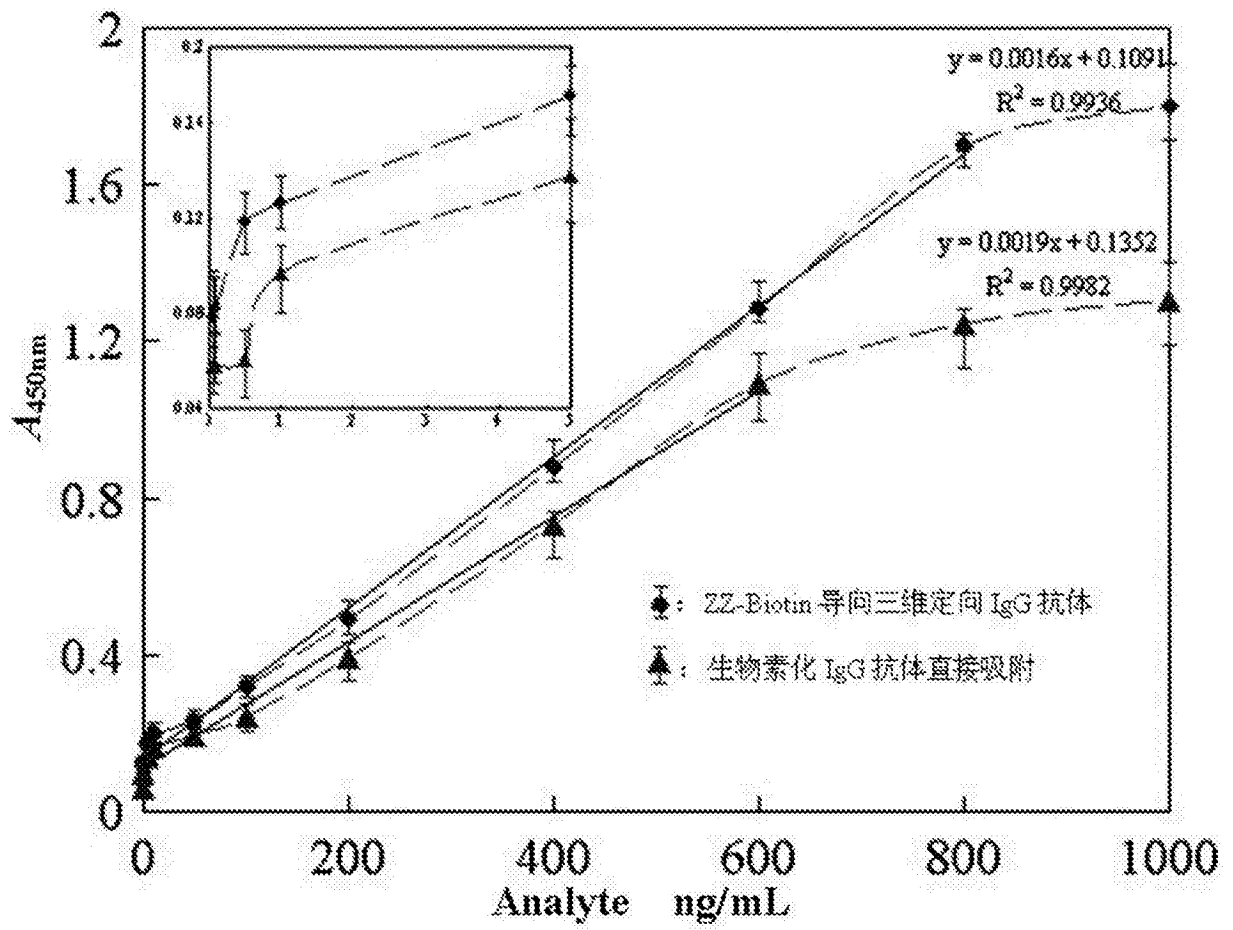


图 4

专利名称(译)	位点特异性生物素标记重组IgG亲和肽及其在三维定向固定IgG抗体中的应用		
公开(公告)号	CN103694358B	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201310730765.6	申请日	2013-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
当前申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
[标]发明人	唐金宝 杨洪鸣		
发明人	唐金宝 杨洪鸣		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/70 C07K1/36 C07K1/34 C07K1/16 C07K17/08 C07K17/06 G01N33/532 G01N33/545		
代理人(译)	彭成		
其他公开文献	CN103694358A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种位点特异性生物素标记的IgG亲和肽，是在IgG亲和肽的羧基端以生物方式连接生物素构建而成，该位点特异性生物素标记的IgG亲和肽一经产生，无需体外标记即可定向亲和吸附于亲和素或链霉亲和素预包装的固相载体表面。本发明的位点特异性生物素标记重组IgG亲和肽，可用于将IgG抗体固定在固相载体表面，结合后，IgG抗体的Fab端可充分暴露，从而充分保持了抗体的抗原结合活性，进而可有效提高固相免疫分析的灵敏性、特异性与稳定性。本发明采用Avi-tag与IgG抗体亲和肽构建融合蛋白，解决了IgG抗体亲和肽的定向亲和固定，进而获得均一、Fab段充分暴露及保持高抗原结合活性的三维定向固相化IgG抗体。

