

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710014195.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月26日

[11] 公开号 CN 101149372A

[22] 申请日 2007.4.16

[21] 申请号 200710014195.5

[71] 申请人 山东大学威海分校

地址 264209 山东省威海市文化西路180号

[72] 发明人 吉爱国 梁浩 宋超

[74] 专利代理机构 威海科星专利事务所

代理人 于涛

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

免疫荧光标记试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种免疫荧光标记试剂盒。是以绿色荧光蛋白(GFP)为指示剂、以葡萄球菌蛋白A(SPA)为抗抗体、应用于免疫标记方面的试剂盒。同时还公开了该试剂盒的制备方法。本发明可广泛应用于免疫荧光标记、免疫组织化学、生化分析、抗体检测、蛋白质芯片等领域,可有效取代现有产品,且操作更加简便,稳定性、灵敏性和可靠性更好,尤其适用于采用荧光分析仪器进行的高通量分析。

1. 一种使用绿色荧光蛋白作为荧光指示剂的免疫荧光标记试剂盒。
2. 如权利要求 1 所述的免疫荧光标记试剂盒，其特征在于由下列试剂组成：增强型绿色荧光蛋白（EGFP）和葡萄球菌蛋白 A（ProA）构成的 SPA-EGFP 融合蛋白，封闭剂，洗脱缓冲液；所述的封闭剂为 0.5%的牛血清白蛋白，所述的洗脱缓冲液为含 0.5%吐温 20 的 10mM PBS，pH7.4。
3. 如权利要求 2 所述的免疫荧光标记试剂盒，其特征在于 SPA-EGFP 融合蛋白为酵母分泌表达，表达用宿主细胞为毕赤酵母 GS115。
4. 如权利要求 2 所述的免疫荧光标记试剂盒，其特征在于将 spa-egfp 融合基因插入酵母表达载体 pPIC9K 中，将此表达载体转化毕赤酵母 GS115，构建成 SPA-EGFP 融合蛋白毕赤酵母工程菌。
5. 如权利要求 3 所述的免疫荧光标记试剂盒，其特征在于 SPA-EGFP 融合蛋白在酵母中表达后有效地分泌至培养基中，表达产物同时具备 SPA 的 IgG 结合活性以及 EGFP 的荧光活性。
6. 权利要求 1 所述的免疫荧光标记试剂盒在制备检测试剂中的应用。
7. 权利要求 1 所述的免疫荧光标记试剂盒在制备免疫学标记、细胞免疫组化检测及蛋白芯片等方面上的应用。

免疫荧光标记试剂盒

技术领域

本发明是以绿色荧光蛋白为指示剂、以葡萄球菌蛋白 A 为抗抗体、应用于免疫标记方面的试剂盒，其涉及免疫荧光标记、免疫组织化学、生化分析、抗体检测、蛋白质融合、绿色荧光蛋白、蛋白 A、基因工程等，属于免疫分析和生物技术应用等相关领域。

背景技术

自标记免疫测定技术出现以来，其在医学和生物学研究中已被广泛应用。其原理就是将抗原抗体反应的特异性和敏感性与显微示踪的精确性相结合，以显色或荧光物质标记抗体，对组织或细胞内的抗原物质进行定位检测。

在免疫测定中，用酶或荧光物质标记抗体/抗原是必需的。传统的标记方法是将指示物通过化学交联法耦联到抗体/抗原分子上（如将酶通过具有双功能或多功能化学基团的交联剂结合到蛋白分子上。但这种方法有其缺点：大量的抗体或抗原分子、酶作为反应物参加耦合；需纯化步骤才可获得抗体-酶耦合物；交联后酶活性时常降低；而且在测定过程中因随机结合引发的空间位阻的干扰而影响免疫测定的灵敏度。另外，传统荧光染料在荧光显微镜发光照射下易发生光漂白现象，而且传统抗体制备及标记方法易降低抗体效价并产生非特异性染色。因此开发新的标记物及标记方法是很有意义的。

绿色荧光蛋白（GFP）是来自发光水母等海洋无脊椎动物的一种功能独特的蛋白质，其受到紫外或蓝光激发时，可以发射出绿色荧光。自 1994 年 GFP 基因被克隆成功以来，其作为生物标记分子有着巨大的应用潜力，主要因为它具有以下特性：（1）种属不依赖性，原核、真核细胞中都可表达为有活性的 GFP；（2）荧光的产生不需要反应底物与辅助因子；（3）相对较小的分子和单体蛋白使之易于融合；（4）GFP 肽链中一些特定氨基酸的替代可使之产生不

同颜色的荧光,可适应于不同研究的需要;(5)GFP 可作为一种非侵入方法(无需细胞通透作用,无毒作用)检测体内基因表达或蛋白标记;(6)它构象稳定,无光漂白作用,荧光强度高;(7)对一系列与 GFP 的 N 端或 C 端融合蛋白的性质研究中,已证明融合蛋白具有 GFP 的荧光性质和配体蛋白质的生物功能。

葡萄球菌A蛋白(SPA)是金黄色葡萄球菌细胞壁分离出的一种分子量为42000的单一多肽链。SPA具有许多生物学活性如激活补体、促有丝分裂、抑制吞噬等。其中SPA可与人和多种哺乳动物血清中IgG的Fc片段非特异性结合,且这种结合不影响Fab片段与抗原特异性结合的免疫活性,利用这一特性,结合放射、荧光、酶联及免疫电镜等技术建立了许多敏感、特异、快速、简便的实验方法,用于疾病诊断和其它方面的研究。目前SPA除用于免疫球蛋白和单克隆抗体的纯化外,以生物素(biotin)、过氧化物酶(peroxidase)、异硫氰酸荧光素(FITC)、胶体金(colloidal gold)等标记蛋白SPA,在免疫组化、免疫电镜、Western Blotting和ELISA中得到大量应用,被称为“广泛二抗”。

CN1731181公开了一种免疫荧光检测试剂,由增强型绿色荧光蛋白与葡萄球菌蛋白A的融合蛋白(ProA-EGFP)组成。同时还公开了该试剂的制备方法,即构建绿色荧光蛋白(GFP)和葡萄球菌蛋白A(ProA)融合基因表达载体,以大肠杆菌E.coli DH5 α 菌株表达ProA-EGFP融合蛋白;分离纯化ProA-EGFP融合蛋白。本发明的免疫荧光检测试剂在制备免疫学诊断或检测试剂中具有广泛的应用。该专利申请针对的是免疫荧光试剂的制备。本申请针对的是该试剂的具体应用。

发明内容

针对现有技术的不足,本发明提供了一种免疫荧光标记试剂盒及其制备方法。

本发明的免疫荧光标记试剂盒,是一种使用绿色荧光蛋白作为荧光指示剂的免疫荧光标记试剂盒。

本发明的免疫荧光标记试剂盒，组成如下：

增强型绿色荧光蛋白（EGFP）和葡萄球菌蛋白 A（SPA）构成的融合蛋白 SPA-EGFP，封闭剂，洗脱缓冲液。

所述的封闭剂为 0.5%的牛血清白蛋白。

所述的洗脱缓冲液为含 0.5%吐温 20 的 10mM PBS，pH7.4。

本发明的免疫荧光标记试剂盒的制备方法，构建增强型绿色荧光蛋白和葡萄球菌蛋白 A 的融合蛋白基因 spa-egfp，以毕赤酵母表达 SPA-EGFP 融合蛋白，分离纯化 SPA-EGFP 融合蛋白；分离纯化的 SPA-EGFP 融合蛋白作为荧光指示剂与封闭剂、洗脱缓冲液共同构成试剂盒。

所述的 SPA-EGFP 融合蛋白为酵母分泌表达，作用表达载体为质粒 pPIC9K，引物按常规设计，SPA-EGFP 融合蛋白基因 spa-egfp 插入质粒 pPIC9K 的 α -factor 信号肽下游，表达用宿主细胞为毕赤酵母 GS115，电转化毕赤酵母并筛选高拷贝重组子，构建重组 spa-egfp 融合基因毕赤酵母工程菌。

对上述毕赤酵母工程菌进行发酵，方法如下：

使用 BMMY 培养基，发酵条件为：30℃，甲醇浓度 2%，缓冲液 pH 值 7.0，同时添加 1%酸水解酪素（Casamino acids）。300rpm 摇床培养 80~84h，每 20~24 小时添加甲醇至终浓度 2%。

上述 BMMY 培养基配方：1%酵母提取物，2%多聚蛋白胨，100mM 磷酸缓冲液，1.34%无氨基酵母氮源， 4×10^{-5} %生物素，2%甲醇，1%酸水解酪素（Casamino acids）。

将上述毕赤酵母工程菌发酵液离心，取上清液过 0.45 微米滤膜，上 HisTrap HP 柱纯化，再过 HiTrap Desalting 柱脱盐，得到纯度大于 99%的 SPA-EGFP。

将纯化的 SPA-EGFP 融合蛋白冻干浓缩，所获得的 SPA-EGFP 融合蛋白用稀释缓冲液定容至一定浓度，作为荧光指示剂与封闭剂、洗脱缓冲液共同构成试剂盒。

所述的 SPA-EGFP 融合蛋白在酵母中表达后可以有效地分泌至培养基中，并且表达产物同时具备 SPA 的 IgG 结合活性以及 EGFP 的荧光活性。

本发明所述的免疫荧光标记试剂盒可用于制备临床诊断试剂盒。

本发明所述的免疫荧光标记试剂盒可用于制备检测试剂盒。

本发明所述的免疫荧光标记试剂盒可用于免疫学标记、细胞免疫组化检测及蛋白芯片等方面的研究。

本发明通过 DNA 重组技术，将增强型绿色荧光蛋白（EGFP）基因与葡萄球菌蛋白 A（SPA）基因融合，将融合基因转染到毕赤酵母 GS115 中，并使其高效表达 SPA-EGFP，将表达产物分泌至培养基中，纯化后获得高纯度的 SPA-EGFP 融合蛋白。利用此融合蛋白取代传统免疫标记试剂盒中的指示剂系统（酶联显色/荧光试剂）和抗抗体（也可称为二抗），配合以专用的封闭剂、洗脱缓冲溶液，构成新型免疫标记试剂盒。

本发明的绿色荧光蛋白免疫荧光标记试剂盒，以增强型绿色荧光蛋白（EGFP）为指示剂、以葡萄球菌蛋白 A（SPA）为抗抗体，可广泛应用于免疫荧光标记、免疫组织化学、生化分析、抗体检测、蛋白质芯片等领域，可有效取代现有产品，且操作更加简便，稳定性、灵敏性和可靠性更好，尤其适用于采用荧光分析仪器进行的高通量分析。

具体实施方式

实施例 1：免疫荧光标记试剂盒

组成如下：增强型绿色荧光蛋白和葡萄球菌蛋白 A 构成的融合蛋白 SPA-EGFP，封闭剂 0.5% 的牛血清白蛋白，洗脱缓冲液含 0.5% Tween 20 的 10mM PBS，pH7.4。

实施例 2：免疫荧光标记试剂盒的制备

1、融合蛋白 SPA-EGFP 构建表达方法参见 CN1731181。

SPA-EGFP 融合蛋白基因 spa-egfp（质粒是 DNA 序列，只有基因才可插入质粒中）插入质粒 pPIC9K 的 α -factor 信号肽下游，表达用宿主细胞为毕赤

酵母 GS115，电转化毕赤酵母并筛选高拷贝重组子，构建重组 SPA-EGFP 融合基因毕赤酵母工程菌。对上述毕赤酵母工程菌进行发酵，使用 BMMY 培养基，发酵条件为：30℃，甲醇浓度 2%，缓冲液 pH 值 7.0，同时添加 1% Casamino acids。300rpm 摇床培养 80~84h，每 20~24 小时添加甲醇至终浓度 2%。将毕赤酵母工程菌发酵液离心，取上清液过 0.45 微米滤膜，上 HisTrap HP 柱纯化，再过 HiTrap Desalting 柱脱盐，得到纯度大于 99% 的 SPA-EGFP。将纯化的 SPA-EGFP 融合蛋白冻干浓缩，备用。

2、采用 0.5% 的牛血清白蛋白作为封闭剂。

3、采用含 0.5% Tween 20 的 50mM PBS 作为洗脱缓冲液，其 pH7.4。

4、将所获得的纯化 SPA-EGFP 融合蛋白用稀释缓冲液定容至 1:100（质量体积百分比），作为荧光指示剂与封闭剂、洗脱缓冲液共同构成试剂盒。

上述的稀释缓冲液具体是 20mM PBS，其为 pH8.0。下面的实施例 3-4 的稀释缓冲液与本实施例相同。

实施例 3：免疫荧光标记试剂盒的使用方法（直接法）

稀释：根据需要，用稀释缓冲液将抗原稀释至一定浓度。

固定：将稀释好的抗原滴加至固相载体上，以封闭剂覆盖无抗原区域，避免荧光指示剂的非特异性吸附。

标记：将荧光指示剂稀释至实验所需浓度，与样品混合，温育，以使之与抗体结合。

加样：滴加标记好的样品至固定有抗原的固相载体上，温育，以使抗原抗体结合。

清洗：以洗脱缓冲液冲洗固相载体三次，去除未结合样品及荧光指示剂。

结果观察：荧光显微镜下进行定性/定量观察。

实施例 4：免疫荧光标记试剂盒的使用方法（间接法）

稀释：根据需要，用稀释缓冲液将抗原稀释至一定浓度。

固定：将稀释好的抗原滴加至固相载体上，以封闭剂覆盖无抗原区域，避免荧光指示剂的非特异性吸附。

样品处理：使用稀释缓冲液将样品稀释至一定浓度。

加样：将处理好的样品滴加至固定有抗原的固相载体上，温育，以使抗原抗体结合。

标记：将荧光指示剂滴加至抗原抗体结合后的固相载体上，以使之与抗体结合。

清洗：以洗脱缓冲液冲洗固相载体三次，去除未结合样品及荧光指示剂。

结果观察：荧光显微镜下进行定性/定量观察。

专利名称(译)	免疫荧光标记试剂盒		
公开(公告)号	CN101149372A	公开(公告)日	2008-03-26
申请号	CN200710014195.5	申请日	2007-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学威海分校		
申请(专利权)人(译)	山东大学威海分校		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学威海分校		
[标]发明人	吉爱国 梁浩 宋超		
发明人	吉爱国 梁浩 宋超		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/53 G01N33/533		
代理人(译)	于涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫荧光标记试剂盒。是以绿色荧光蛋白(GFP)为指示剂、以葡萄球菌蛋白A(SPA)为抗抗体、应用于免疫标记方面的试剂盒。同时还公开了该试剂盒的制备方法。本发明可广泛应用于免疫荧光标记、免疫组织化学、生化分析、抗体检测、蛋白质芯片等领域，可有效取代现有产品，且操作更加简便，稳定性、灵敏性和可靠性更好，尤其适用于采用荧光分析仪器进行的高通量分析。