

[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 200810070692.1

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G12N 15/12 (2006.01)

G12N 15/62 (2006.01)

G12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月7日

[11] 公开号 CN 101337991A

[22] 申请日 2008.3.3

[21] 申请号 200810070692.1

[71] 申请人 复旦大学附属华山医院

地址 200040 上海市静安区乌鲁木齐中路12号

共同申请人 福建医科大学附属第一医院

[72] 发明人 吴志英 王 柠

权利要求书4页 说明书13页 附图9页

[54] 发明名称

兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的制备和应用

[57] 摘要

本发明公开了兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的制备和应用, 属中药单体干预疾病的领域。本发明选定全长 IRGMa 蛋白来制备抗体, 包括了所有的功能区。在优选的基础上还提出了其制备方法, 并根据引物设计原则设计引物, 构建含 IRGMa 全长基因的 His 和 GST 融合蛋白来制备抗体。本发明所制备的抗体具有高度特异性和敏感性, 有助于研究 IRGM 基因的表达谱分析及功能, 并研究 IRGM 在 MS 发病过程中的具体作用, 从而揭示 MS 的发病机制并寻找有效的基因免疫治疗措施。因此, 人参皂甙 Rg1 有一定的干预多发性硬化的作用。本发明的人参皂甙 Rg1 可以明显降低多发性硬化的动物模型—EAE 小鼠的发病率。

1、一种兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的制备选用,其特征是:针对 IRGM 蛋白的功能区,选用 IRGMa 来制备抗体;选择 GST 和 His 基因融合蛋白的方法来制备目的蛋白片段。

2、根据权利要求 1 所述的制备选用,其特征是:表达 GST 和 His 基因融合蛋白,必须构建含 IRGMa 全长基因 546bp 的 GST 和 His 基因融合载体;根据引物设计原则设计引物。

3、本发明的兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的提取方法:

1) 从人的外周静脉血抽提基因组 DNA;

2) 引物设计及 GST 基因融合载体的选择:选择了 pCMV-myc, pGEX4T-2 和 Pet-28a (+) -His 载体,并选用限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 做为连接点;根据引物设计原则设计引物,做到同一条引物没有回文发夹结构,5' 端与 3' 端的 4 个碱基不互补,正反向引物序列不互补, T_m 值相近 (2A+2T+4G+4C),且在 Genebank 上找不到同源系列;共设计了 2 对引物,序列如下:

第一对:用于转载 pCMV-myc-IRGM 和 pGEX4T-2-IRGM 载体

1F: 5' -AgCgAATTCCTATggAAgCCATgAATgTTg-3', 含 EcoRI 切点;

1R: 5' -gCgCTCgAgTTAgTATTCACATACCCgCTC-3', 含 XhoI 切点;

第二对:用于转载 pET-28a (+) -IRGM 载体

2F: 5' -AgCgAATTCATggAAgCCATgAATgTTg-3', 含 EcoRI 切点;

2R: 5' -gCgCTCgAgTTAgTATTCACATACCCgCTC-3', 含 XhoI 切点;

3) 制备目的基因片段并连接到 myc, GST 和 His 基因融合载体上:以正常人基因组 DNA 为模板,分别采用上述 2 对引物和普通 Taq 酶扩增 IRGMa 全长编码序列;应用 TA 克隆试剂盒将 PCR 产物分别连接到 PCR2.1 载体上,转化并挑取阳性 TA 克隆,摇菌,并采用质粒抽提纯化试剂盒抽提纯化质粒;EcoRI 和 XhoI 双酶切证实阳性 TA 克隆并采用 T 载体引物及 ABI PRISM3700 DNA 序列分析仪测序鉴定连接在 PCR2.1 载体上的目的基因片段序列的正确性;正确的 TA 克隆采用应用 EcoRI 和 XhoI 双酶切,回收目的基因片段并连接到经过 EcoRI 和 XhoI 双酶切回收的 myc, GST 和 His 基因融合载体 pCMV-myc, pGEX4T-2, pET-28a

(+) -His 上并转化；抽提质粒，测序验证；

4) 含目的基因片段的 GST 和 His 基因融合载体的表达鉴定：分别挑取 1 粒转化好的 GST 和 His 基因融合载体克隆，用 5ml 2YT 培养基摇菌，离心收集细菌并制备小量的 GST 和 His 基因融合蛋白，采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段，考马斯亮兰染色，显示 GST 和 His 基因融合蛋白片段大小；

5) 制备并纯化 GST 基因融合蛋白及收集目的蛋白：大量制备 GST 基因融合蛋白，过柱纯化回收并定量，应用 Thrombin 23℃ 酶切过夜，或 GST 基因融合蛋白先挂 GST 珠子，用 Thrombin 23℃ 酶切过夜，第二天过柱收集 IRGMa 全长目的蛋白；

6) 大量制备 His 基因融合蛋白：因 IRGMa-His 基因融合蛋白为不可溶的蛋白，将离心收集的细菌用 1×蛋白上样 Buffer 裂解后采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段，考马斯亮兰染色，显示 His 基因融合蛋白目的片段，割胶冻存于 -80℃ 冰箱备用；

7) 制备并纯化含 GST-tag 和 His-tag 的兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体：分别将由 Thrombin 酶切后回收的 IRGMa 蛋白和含 His-IRGMa 融合蛋白的 PAGE 胶与不完全弗氏佐剂匀浆后皮下多点注射免疫家兔，1 个月后从家兔的耳缘静脉取血 1ml，凝固后离心取血清，ELISA 方法检测 IRGMa 多克隆抗体的滴度，为 1:2000；后每 7-14 天用不完全弗氏佐剂与蛋白匀浆后加强免疫 1 次，每次注射前均从耳缘静脉取血 1ml，ELISA 方法检测抗体滴度；加强免疫 2 次后，ELISA 方法检测抗体的滴度达到了 1:10000 以上；采用免疫印迹方法验证抗体的特异性；从家兔颈动脉取血，离心收集抗体血清分装，采用 Immobilized ProteinA Column 纯化抗体，检测浓度并分装，保存于 -80℃。

4、兔抗人 IRGMa 多克隆抗体的应用：

1) 免疫印迹：用 pCMV-myc-IRGMa 转染的 293T 细胞，将收集的细胞裂解液按不同浓度上样电泳，转膜，5%脱脂奶粉做为封闭液，室温封闭蛋白电转膜 60 分钟；兔抗人 IRGMa 多克隆抗体浓度为 5 μg / μl 做为 一抗，1: 500-1: 10000 稀释，室温摇育 2 小时，或 4 度摇育过夜，1XTBST 缓冲液摇洗 3 次，每次 5 分

种：辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 做为二抗，1：5000 稀释，室温摇育 45 分钟，1XTBST 缓冲液摇洗 3 次，每次 5-15 分钟，辣根过氧化物底物显色，压片并冲片；

2) ELISA: 将纯化的 GST 基因融合蛋白抗原按 1ng、2.5ng、5ng、10ng、100ng 的量作一梯度，并将免疫前和免疫后血清按免疫前血清 1:500、免疫后血清以 1:500、1:1000、1:2000、1:5000、1:10000 作一抗体梯度，免疫前血清作为对照，做 ELISA；

3) 细胞免疫荧光染色：将未转染的 Jurkat 细胞滴片于多聚赖氨酸处理过的盖玻片上，4%多聚甲醛固定细胞，10%山羊血清室温封闭细胞 60 分钟；兔抗人 IRGMA 抗体浓度为 5ug/ul，1：100-1：200 稀释，室温反应 2 小时，1XPBS 摇洗 3 次，每次 5-10 分钟；带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗，1：1000-1：2000 稀释，室温反应 30-60 分钟，二抗封闭结束前 5 分钟，DAPI 染核，1XPBS 摇洗 3 次，每次 5-10 分钟；封片镜下观察；

4) 免疫组化：将多种人或小鼠的组织石蜡切片脱蜡并复水，3%H₂O₂ 室温孵育 10 分钟；蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟，再将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液的容器中，置微波炉内加热使容器内液体温度保持在 92℃-98℃之间并持续 2 分钟进行抗原热修复；10%正常山羊血清 PBS 稀释封闭，室温孵育 10 分钟；倾去血清，勿洗，滴加适当比例稀释的一抗或一抗工作液，37℃孵育 1-2 小时或 4℃过夜；PBS 冲洗，5 分钟×3 次；滴加适当比例稀释的生物素标记二抗 1%BSA-PBS 稀释，37℃孵育 30 分钟；或滴加第二代生物素标记二抗工作液，37℃或室温孵育 30 分钟；PBS 冲洗，5 分钟×3 次；滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素 PBS 稀释，37℃孵育 30 分钟；PBS 冲洗，5 分钟×3 次；显色剂显色 DAB；自来水充分冲洗，复染，封片；

5) 组织免疫荧光：将多种人或小鼠的组织石蜡切片脱蜡并复水，3%H₂O₂ 室温孵育 5-10 分钟；蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟，再将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液的容器中，置微波炉内加热使容器内液体温度保持在 92℃-98℃之间并持续 2 分钟进行抗原热修复；10%正常山羊血清 PBS 稀释封闭，室温孵育 10 分钟；

倾去血清，勿洗，滴加；兔抗人 IRGMa 抗体浓度为 5ug/ul，1: 100-1: 200 稀释，室温反应 2 小时，1XPBS，冲洗 3 次，每次 10 分钟；带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗，1: 100-1: 200 稀释，室温反应 45 分钟，二抗封闭结束前 5 分钟，DAPI 染核，1XPBS 冲洗 3 次，每次 5 分钟；封片镜下观察。

5、IRGM 基因中优选出一段编码序列，SEQUENCE LISTING:

```

ATG GAA GCC ATG AAT GTT GAG AAA GCC TCA GCA GAT GGG AAC TTG CCA GAG GTG ATC TCT 60
Met Glu Ala Met Asn Val Glu Lys Ala Ser Ala Asp Gly Asn Leu Pro Glu Val Ile Ser
1           5           10           15           20

AAC ATC AAG GAG ACT CTG AAG ATA GTG TCC AGG ACA CCA GTT AAC ATC ACT ATG GCA GGG 120
Asn Ile Lys Glu Thr Leu Lys Ile Val Ser Arg Thr Pro Val Asn Ile Thr Met Ala Gly
           25           30           35           40

GAC TCT GGC AAT GGG ATG TCC ACC TTC ATC AGT GCC CTT CGA AAC ACA GGA CAT GAG GGT 180
Asp Ser Gly Asn Gly Met Ser Thr Phe Ile Ser Ala Leu Arg Asn Thr Gly His Glu Gly
           45           50           55           60

AAG GCC TCA CCT CCT ACT GAG CTG GTA AAA GCT ACC CAA AGA TGT GCC TCC TAT TTC TCT 240
Lys Ala Ser Pro Pro Thr Glu Leu Gta Lys Ala Thr Gln Arg Cys Ala Ser Tyr Phe Ser
           65           70           75           80

TCC CAC TTT TCA AAT GTG GTG TTG TGG GAC CTG CCT GGC ACA GGG TCT GCC ACC ACA ACC 300
Ser His Phe Ser Asn Val Val Leu Trp Asp Leu Pro Gly Thr Gly Ser Ala Thr Thr Thr
           85           90           95           100

CTG GAG AAC TAC CTG ATG GAA ATG CAG TTC AAC CGG TAT GAC TTC ATC ATG GTT GCA TCT 360
Leu Glu Asn Tyr Leu Met Glu Met Gln Phe Asn Arg Tyr Asp Phe Ile Met Val Ala Ser
           105          110          115          120

GCA CAA TTC AGC ATG AAT CAT GTG ATG CTT GCC AAA ACC GCT GAG GAC ATG GGA AAG AAG 420
Ala Gln Phe Ser Met Asn His Val Met Leu Ala Lys Thr Ala Glu Asp Met Gly Lys Lys
           125          130          135          140

TTC TAC ATT GTC TGG ACC AAG CTA GAC ATG GAC CTC AGC ACA GGT GCC CTC OCA GAA GTG 480
Phe Tyr Ile Val Trp Thr Lys Leu Asp Met Asp Leu Ser Thr Gly Ala Leu Pro Glu Val
           145          150          155          160

CAG CTA CTG CAG ATC AGA GAA AAT GTC CTG GAA AAT CTC CAG AAG GAG CGG GTA TGT GAA 540
Gln Leu Leu Gln Ile Arg Glu Asn Val Leu Glu Asn Leu Gln Lys Glu Arg Val Cys Glu
           165          170          175          180

TAC TAA
Tyr *
182

```

兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的制备和应用

技术领域

本发明涉及 IRGMa 蛋白的制备和应用。具体的说是一种兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的制备和应用。

背景技术

MS 是 T 细胞介导的自身免疫病，研究发现临床表型严重者，IFN- γ 表达细胞显著增多，提示 IFN- γ 可使 MS 病变加重。小鼠 Irgm1 (LRG-47) 是由 IFN- γ 诱导的蛋白，经研究发现 Irgm1 与 MS 的动物模型 EAE 的发病机制有关。

Irgm1 是 IFN- γ 的一个下游效应子，对淋巴细胞的存活具有下游调节作用，在免疫防御中起着重要作用。人类 IRGM 基因于 2006 年被克隆，定位于 5q33.1，编码一个氨基端和羧基端截短的 G 区。它与小鼠 Irgm 同源，在人类吞噬细胞的自体吞噬过程中是必要的，可以诱导 BCG 吞噬体的成熟。

IRGM 基因因 3' 端剪切方式不同，共有 5 个转录本，分别为 IRGMa、IRGMb、IRGMc、IRGMd 和 IRGMe。5 个转录本的氨基酸数目分别为 182、211、192、199、192。IRGMa 的 182 个氨基酸是 5 个转录本共有的，因此，IRGMa 是该蛋白的主要功能区。目前国外学者制备的 IRGM 抗体为 C 端涵盖 10 多个氨基酸外加一个半胱氨酸 (CQIRENVLENLQKER) 的抗体，用免疫荧光或 Western blot 的方法，该抗体不能检测到细胞内源信号，由于其未包括主要功能区，限制了抗体使用的范围。而目前没有商品化的 IRGM 抗体。因此，应用 IRGMa 全长蛋白制备兔抗人多克隆抗体，并应用于研究 IRGM 基因的表达谱分析及在 MS 发病过程中具有实际作用。

发明内容

本发明的目的是在 IRGM 基因中优选出一段编码序列，并制备出 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体及其应用。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：一种兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的制备选用，其特征是：针对 IRGM 蛋白的功能区，选用 IRGMa 来制备抗体。选用哪一段蛋白来制备抗体及如何获得正确序列的蛋白是本发明的关键。IRGM 有 5 个转录本，5 个转录本氨基酸数目分别为 IRGMa(182)、IRGMb(211)、IRGMc(192)、IRGMd(199)、IRGMe(192)，IRGMa 的 182 个氨基酸是 5 个转录本共有的，因此，1-182 氨基酸应该是该蛋白的主要功能区。而且，IRGMa 为一个外显子转录产物，IRGMb、IRGMc、IRGMd、IRGMe 为多个外显子转录产物，故用 IRGMa 来制备抗体是既方便，又包括了主要功能区，因此是可行的。

仅合成数十个氨基酸的多肽来制备兔抗人 IRGMa 多克隆抗体，可能导致抗体特异性不够高；但如果针对 IRGMa 蛋白的功能区，直接通过合成多肽来合成这么大片段且编码正确的蛋白十分昂贵，是不现实的。故本发明选择 GST 和 His 基因融合蛋白的方法来制备该目的蛋白片段。表达 GST 和 His 基因融合蛋白，必须构建含 IRGMa 全长基因 (546bp) 的 GST 和 His 基因融合载体；根据引物设计原则设计引物。

本发明的兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的提取方法：

1、从人的外周静脉血抽提基因组 DNA。

2、引物设计及 GST 基因融合载体的选择：选择了 pCMV-myc, pGEX4T-2 和 Pet-28a (+)-His 载体，并选用限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 做为连接点；根据引物设计原则设计引物，做到同一条引物没有回文发夹结构，5' 端与 3' 端的 4 个碱基不互补，正反向引物序列不互补， T_m 值相近 ($2A+2T+4G+4C$)，且在 Genebank 上找不到同源系列；共设计了 2 对引物，序列如下：

第一对：用于转载 pCMV-myc-IRGM 和 pGEX4T-2-IRGM 载体

1F: 5' -AgCgAATTCCTATggAAgCCATgAATgTTg-3' (含 EcoR I 切点)

1R: 5' -gCgCTCgAgTTAgTATTCACATACCCgCTC-3' (含 XhoI 切点)

第二对：用于转载 pET-28a (+)-IRGM 载体

2F: 5' -AgCgAATTCATggAAgCCATgAATgTTg-3' (含 EcoR I 切点)

2R: 5' -gCgCTCgAgTTAgTATTCACATACCCgCTC-3' (含 XhoI 切点)

3、制备目的基因片段并连接到 myc, GST 和 His 基因融合载体上: 以正常人基因组 DNA 为模板, 分别采用上述 3 对引物和普通 Taq 酶扩增 IRGMA 全长编码序列; 应用 TA 克隆试剂盒将 PCR 产物分别连接到 PCR2.1 载体上, 转化并挑取阳性 TA 克隆, 摇菌(大肠杆菌 DH5 α 菌株, 上海卓康生物科技有限公司), 并采用质粒抽提纯化试剂盒抽提纯化质粒; EcoRI 和 XhoI 双酶切证实阳性 TA 克隆并采用 T 载体引物及 ABI PRISM3700 DNA 序列分析仪测序鉴定连接在 PCR2.1 载体上的目的基因片段序列的正确性; 正确的 TA 克隆采用应用 EcoRI 和 XhoI 双酶切, 回收目的基因片段并连接到经过 EcoRI 和 XhoI 双酶切回收的 myc, GST 和 His 基因融合载体 pCMV-myc, pGEX4T-2, pET-28a (+)-His 上并转化; 抽提质粒, 测序验证。

4、含目的基因片段的 GST 和 His 基因融合载体的表达鉴定: 分别挑取 1 粒转化好的 GST 和 His 基因融合载体克隆, 用 5ml 2YT 培养基摇菌(大肠杆菌 origamiDE3, Novagen 公司产品), 离心收集细菌并制备小量的 GST 和 His 基因融合蛋白, 采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段, 考马斯亮兰染色, 显示 GST 和 His 基因融合蛋白片段大小。

5、制备并纯化 GST 基因融合蛋白及收集目的蛋白: 大量制备 GST 基因融合蛋白, 过柱纯化回收并定量, 应用 Thrombin 23 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 或 GST 基因融合蛋白先挂 GST 珠子, 用 Thrombin 23 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 第二天过柱收集 IRGMA 全长目的蛋白。

6、大量制备 His 基因融合蛋白: 因 IRGMA-His 基因融合蛋白为不可溶的蛋白, 故将离心收集的细菌用 1 \times 蛋白上样 Buffer 裂解后采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段, 考马斯亮兰染色, 显示 His 基因融合蛋白目的片段, 割胶冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

7、制备并纯化含 GST-tag 和 His-tag 的兔抗人 IRGMA 全长蛋白多克隆抗体: 分别将由 Thrombin 酶切后回收的 IRGMA 蛋白和含 His-IRGMA 融合蛋白的 PAGE

胶与不完全弗氏佐剂匀浆后皮下多点注射免疫家兔,1个月后从家兔的耳缘静脉取血 1ml,凝固后离心取血清,ELISA 方法检测 IRGMa 多克隆抗体的滴度,此时为 1:2000;此后每 7-14 天用不完全弗氏佐剂与蛋白匀浆后加强免疫 1 次,每次注射前均从耳缘静脉取血 1ml,ELISA 方法检测抗体滴度;加强免疫 2 次后,ELISA 方法检测抗体的滴度达到了 1:10000 以上;采用免疫印迹方法验证抗体的特异性;从家兔颈动脉取血,离心收集抗体血清分装,采用 Immobilized ProteinA Column (Pierce 公司)纯化抗体,检测浓度并分装,保存于-80℃。

8、兔抗人 IRGMa 多克隆抗体的应用:

(1)免疫印迹:用 pCMV-myc-IRGMa 转染的 293T 细胞,将收集的细胞裂解液按不同浓度上样电泳,转膜,5%脱脂奶粉做为封闭液,室温封闭蛋白电转膜 60 分钟;兔抗人 IRGMa 多克隆抗体(浓度为 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$)做为 一抗,1:500-1:10000 稀释,室温摇育 2 小时,或 4 度摇育过夜,1XTBST 缓冲液摇洗 3 次,每次 5 分钟;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 做为二抗,1:5000 稀释,室温摇育 45 分钟,1XTBST 缓冲液摇洗 3 次,每次 5-15 分钟,辣根过氧化物底物显色,压片并冲片。

(2)ELISA:将纯化的 GST 基因融合蛋白(抗原)按 1ng、2.5ng、5ng、10ng、100ng 的量作一梯度,并将免疫前和免疫后血清按免疫前血清 1:500、免疫后血清以 1:500、1:1000、1:2000、1:5000、1:10000 作一抗体梯度,免疫前血清作为对照,做 ELISA。

(3)细胞免疫荧光染色:将未转染的 Jurkat 细胞滴片于多聚赖氨酸处理过的盖玻片上,4%多聚甲醛固定细胞,10%山羊血清室温封闭细胞 60 分钟;兔抗人 IRGMa 抗体浓度为 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$,1:100-1:200 稀释,室温反应 2 小时,1XPBS 摇洗 3 次,每次 5-10 分钟;带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗,1:1000-1:2000 稀释,室温反应 30-60 分钟,二抗封闭结束前 5 分钟,DAPI 染核,1XPBS 摇洗 3 次,每次 5-10 分钟;封片镜下观察。

(4)免疫组化:将多种人或小鼠的组织石蜡切片脱蜡并复水,3%H₂O₂ 室温孵

育 10 分钟，以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟，再将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液的容器中，置微波炉内加热使容器内液体温度保持在 92℃-98℃之间并持续 2 分钟进行抗原热修复。10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭，室温孵育 10 分钟。倾去血清，勿洗，滴加适当比例稀释的一抗或一抗工作液，37℃ 孵育 1-2 小时或 4℃ 过夜。PBS 冲洗，5 分钟×3 次。滴加适当比例稀释的生物素标记二抗 (1%BSA-PBS 稀释)，37℃ 孵育 30 分钟；或滴加第二代生物素标记二抗工作液，37℃ 或室温孵育 30 分钟。PBS 冲洗，5 分钟×3 次。滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素 (PBS 稀释)，37℃ 孵育 30 分钟。PBS 冲洗，5 分钟×3 次。显色剂显色 (DAB)。自来水充分冲洗，复染，封片。

(5) 组织免疫荧光：将多种人或小鼠的组织石蜡切片脱蜡并复水，3% H_2O_2 室温孵育 5-10 分钟，以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟，再将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液的容器中，置微波炉内加热使容器内液体温度保持在 92℃-98℃之间并持续 2 分钟进行抗原热修复。10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭，室温孵育 10 分钟。倾去血清，勿洗，滴加兔抗人 IRGMa 抗体浓度为 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，1: 100-1: 200 稀释，室温反应 2 小时，1XPBS，冲洗 3 次，每次 10 分钟；带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗，1: 100-1: 200 稀释，室温反应 45 分钟，二抗封闭结束前 5 分钟，DAPI 染核，1XPBS 冲洗 3 次，每次 5 分钟；封片镜下观察。

本发明的有益效果是：由于本发明设计并制备了兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体，涵盖了其主要的功能区，从而保证了抗体的高度特异性，有助于进行 IRGM 蛋白功能的研究及其在 MS 发病过程中的具体作用，从而对揭示 MS 的发病机制并寻找有效的基因免疫治疗措施有着积极的作用。

附图说明：

图 1 是本发明抗体用于 ELISA 的结果照片。随着上样蛋白浓度的增高，抗原抗体反应明显增强，即使在 1ng 的蛋白上样量时，免疫后血清在 1: 10000 的稀释倍数下也与免疫前血清有着 10 倍的数量级差别，该结果表明，融合表达的

IRGMa-GST 蛋白和抗体具有特异的结合, 且抗体的效价达到 1: 10000 以上。

A	1 ng	1 ng	2.5ng	2.5ng	5 ng	5 ng	10ng	10ng	100n g	100n g		蛋白梯度 抗体梯度
B	0.008	0.011	0.008	0.009	0.008	0.015	0.009	0.014	0.019	0.023		免疫前 1: 500
C	0.034	0.034	0.076	0.068	0.124	0.132	0.229	0.226	0.668	0.671		免疫后 1: 500
D	0.021	0.020	0.045	0.049	0.087	0.098	0.175	0.201	0.603	0.534		1: 1000
E	0.014	0.014	0.032	0.034	0.059	0.063	0.123	0.122	0.516	0.556		1: 2000
F	0.008	0.008	0.018	0.018	0.046	0.037	0.103	0.083	0.472	0.365		1: 5000
G	0.010	0.005	0.010	0.008	0.020	0.017	0.038	0.043	0.234	0.209		1: 10000
H												
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

图 2 本发明抗体用于免疫印迹的结果照片。上样样品为 4T-2-IRGMa 原核质粒表达的蛋白, 即 IRGMa-GST 融合蛋白, 大小约为 46KDa, 介于 43 和 66KDa 之间。4 个泳道蛋白上样量一致, 但杂交用的一抗不同。1: 为免疫前血清 1: 500; 2, 3, 4 均为免疫后血清, 稀释效价分别为 1: 2000, 1: 5000 和 1: 10000。免疫印迹结果表明, 在预期大小相应的位置出现特异条带, 提示 IRGMa-GST 融合蛋白得以正确表达, 也表明本发明抗体特异性好。

图 2 本发明抗体用于免疫印迹的结果照片。1: 为 pCMV-myc-IRGMa 转染的 293T 细胞, 2: 为未转的 293T 细胞。IRGMa-myc 融合蛋白约 24KDa, 介于 20.1 和 31KDa 之间。免疫印迹结果表明, 在预期大小相应的位置出现特异条带, 提示 IRGMa-myc 融合蛋白得以正确表达, 也表明本发明抗体特异性好。

图 4 本发明抗体用于 Jurkat 细胞免疫荧光的照片。在所有 Jurkat 细胞的胞浆中都见到绿色荧光, 说明 Jurkat 细胞具有 IRGM 蛋白的内源性表达, 也表明本发明抗体特异性好。

图 5 本发明抗体用于小鼠脊髓组织免疫荧光结果。在小鼠脊髓的神经元胞浆中见到颗粒状的红色荧光, 说明在小鼠脊髓的神经元胞浆中存在 IRGM 蛋白的内源表达, 也表明本发明抗体特异性好。

图 6 本发明抗体用于人的胰腺组织的免疫组化结果。在胰岛细胞的胞浆中可见到颗粒状的棕色信号，在腺泡细胞中未见到，说明在人的胰岛细胞存在 IRGM 蛋白的内源表达，也表明本发明抗体特异性好。

图 7 本发明抗体用于人的小脑组织的免疫组化结果。在小脑浦肯野氏细胞的胞浆和轴突中均见到颗粒状的棕色信号，而在分子层和颗粒细胞层未见到，说明 IRGM 蛋白在人的小脑的浦肯野氏细胞中有内源性表达，也表明本发明抗体特异性好。

图 8 本发明抗体用于小鼠脊髓组织的免疫组化结果。在脊髓神经元胞浆和突起中均见到颗粒状的棕色信号，说明在小鼠脊髓的神经元胞浆中存在 IRGM 蛋白的内源表达，也表明本发明抗体特异性好。

图 9 小鼠的胰腺组织免疫组化结果。在小鼠胰腺的胰岛周边细胞可见到颗粒状的棕色信号，在腺泡细胞中未见到，说明在小鼠的胰岛细胞存在 IRGM 蛋白的内源表达，也表明本发明抗体特异性好。

具体实施方式

实施例 1:

一种兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的制备选用:

1、针对 IRGM 蛋白的共同功能区，选用涵盖 IRGMa 的 1-182 氨基酸的蛋白来制备抗体。

2、根据引物设计原则自行设计两对引物，构建含 IRGMa 全长基因 (546bp) 的 GST 和 His 基因融合载体，制备涵盖 IRGMa 的 1-182 氨基酸的目的蛋白片段，表达 GST 和 His 基因融合蛋白，免疫家兔，2 个月后从家兔颈动脉取血，离心收集抗体血清并纯化抗体。

本实施例的兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的具体提取方法:

1、从人的外周静脉血抽提基因组 DNA: 因 IRGMa 仅有一个外显子，从基因组 DNA 即能扩增到所要的蛋白编码序列。因此，首先从人的外周静脉血抽提基因组 DNA。

2、引物设计及 GST 基因融合载体的选择：选择了 pCMV-myc, pGEX4T-2 和 Pet-28a (+)-His 载体，并选用限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 做为连接点；根据引物设计原则设计引物，做到同一条引物没有回文发夹结构，5' 端与 3' 端的 4 个碱基不互补，正反向引物序列不互补， T_m 值相近 ($2A+2T+4G+4C$)，且在 Genebank 上找不到同源系列；共设计了 2 对引物，序列如下：

第一对：用于转载 pCMV-myc-IRGM 和 pGEX4T-2-IRGM 载体

1F: 5' -AgCgAATTCCTATggAAgCCATgAATgTTg-3' (含 EcoR I 切点)

1R: 5' -gCgCTCgAgTTAgTATTCACATACCCgCTC-3' (含 XhoI 切点)

第二对：用于转载 pET-28a (+)-IRGM 载体

2F: 5' -AgCgAATTCATggAAgCCATgAATgTTg-3' (含 EcoR I 切点)

2R: 5' -gCgCTCgAgTTAgTATTCACATACCCgCTC-3' (含 XhoI 切点)

上述 2 对引物用于 PCR 扩增构建质粒的目的基因片段。

3、制备目的基因片段并连接到 myc, GST 和 His 基因融合载体上：以正常人基因组 DNA 为模板，分别采用上述 3 对引物和普通 Taq 酶扩增 IRGMa 全长编码序列；应用 TA 克隆试剂盒将 PCR 产物分别连接到 PCR2.1 载体上，转化并挑取阳性 TA 克隆，摇菌(大肠杆菌 DH5 α 菌株, 本室保存)，并采用质粒抽提纯化试剂盒抽提纯化质粒；EcoRI 和 XhoI 双酶切证实阳性 TA 克隆并采用 T 载体引物及 ABI PRISM3700 DNA 序列分析仪测序鉴定连接在 PCR2.1 载体上的目的基因片段序列的正确性；正确的 TA 克隆采用应用 EcoRI 和 XhoI 双酶切，回收目的基因片段并连接到经过 EcoRI 和 XhoI 双酶切回收的 myc, GST 和 His 基因融合载体 pCMV-myc, pGEX4T-2, pET-28a (+)-His 上并转化；抽提质粒，测序验证。

4、含目的基因片段的 GST 和 His 基因融合载体的表达鉴定：分别挑取 1 粒转化好的 GST 和 His 基因融合载体克隆，用 5ml 2YT 培养基摇菌(大肠杆菌 origamiDE3, Novagen 公司产品)，离心收集细菌并制备小量的 GST 和 His 基因融合蛋白，采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段，考马斯亮兰染色，显示 GST 和 His 基因融合蛋白片段大小。

5、制备并纯化 GST 基因融合蛋白及收集目的蛋白：大量制备 GST 基因融合蛋白，过柱纯化回收并定量，应用 Thrombin 23℃ 酶切过夜，或 GST 基因融合蛋白先挂 GST 珠子，用 Thrombin 23℃ 酶切过夜，第二天过柱收集 IRGMa 全长目的蛋白。

6、大量制备 His 基因融合蛋白：因 IRGMa-His 基因融合蛋白为不可溶的蛋白，故将离心收集的细菌用 1× 蛋白上样 Buffer 裂解后采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段，考马斯亮兰染色，显示 His 基因融合蛋白目的片段，割胶冻存于 -80℃ 冰箱备用。

7、制备并纯化含 GST-tag 和 His-tag 的兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体：分别将由 Thrombin 酶切后回收的 IRGMa 蛋白和含 His-IRGMa 融合蛋白的 PAGE 胶与不完全弗氏佐剂匀浆后皮下多点注射免疫家兔，1 个月后从家兔的耳缘静脉取血 1ml，凝固后离心取血清，ELISA 方法检测 IRGMa 多克隆抗体的滴度，此时为 1:2000；此后每 14 天用不完全弗氏佐剂与蛋白匀浆后加强免疫 1 次，每次注射前均从耳缘静脉取血 1ml，ELISA 方法检测抗体滴度；加强免疫 2 次后，ELISA 方法检测抗体的滴度达到了 1:10000 以上；采用免疫印迹方法验证抗体的特异性，结果证实该抗体具有高度特异性；从家兔颈动脉取血，离心收集抗体血清分装，采用 Immobilized ProteinA Column (Pierce 公司) 纯化抗体，检测浓度并分装，保存于 -80℃。

8、兔抗人 IRGMa 多克隆抗体的应用：

(1) 免疫印迹：用 pCMV-myc-IRGMa 转染的 293T 细胞，将收集的细胞裂解液按不同浓度上样电泳，转膜，5% 脱脂奶粉做为封闭液，室温封闭蛋白电转膜 60 分钟；兔抗人 IRGMa 多克隆抗体(浓度为 $5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) 做为 一抗，1:500-1:10000 稀释，室温摇育 2 小时，或 4 度摇育过夜，1XTBST 缓冲液摇洗 3 次，每次 5 分钟；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 做为二抗，1:5000 稀释，室温摇育 45 分钟，1XTBST 缓冲液摇洗 3 次，每次 5-15 分钟，辣根过氧化物底物显色，压片并冲片。

(2)ELISA:将纯化的 GST 基因融合蛋白(抗原)按 1ng、2.5ng、5ng、10ng、100ng 的量作一梯度,并将免疫前和免疫后血清按免疫前血清 1:500、免疫后血清以 1:500、1:1000、1:2000、1:5000、1:10000 作一抗体梯度,免疫前血清作为对照,做 ELISA,结果如图 2 所提供。

(3)细胞免疫荧光染色:将未转染的 Jurkat 细胞滴片于多聚赖氨酸处理过的盖玻片上,4%多聚甲醛固定细胞,10%山羊血清室温封闭细胞 60 分钟;兔抗人 IRGMA 抗体浓度为 5ug/ul,1:100-1:200 稀释,室温反应 2 小时,1XPBS 摇洗 3 次,每次 5-10 分钟;带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗,1:1000-1:2000 稀释,室温反应 30-60 分钟,二抗封闭结束前 5 分钟,DAPI 染核,1XPBS 摇洗 3 次,每次 5-10 分钟;封片镜下观察。

(4)免疫组化:将多种人或小鼠的组织石蜡切片脱蜡并复水,3%H₂O₂ 室温孵育 10 分钟,以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 分钟,再将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液(工作液)的容器中,置微波炉内加热使容器内液体温度保持在 92℃-98℃之间并持续 2 分钟进行抗原热修复。10%正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 分钟。倾去血清,勿洗,滴加适当比例稀释的一抗或一抗工作液,37℃孵育 1-2 小时或 4℃过夜。PBS 冲洗,5 分钟×3 次。滴加适当比例稀释的生物素标记二抗(1%BSA-PBS 稀释),37℃孵育 30 分钟;或滴加第二代生物素标记二抗工作液,37℃或室温孵育 30 分钟。PBS 冲洗,5 分钟×3 次。滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素(PBS 稀释),37℃孵育 30 分钟。PBS 冲洗,5 分钟×3 次。显色剂显色(DAB)。自来水充分冲洗,复染,封片。

(5)组织免疫荧光:将多种人或小鼠的组织石蜡切片脱蜡并复水,3%H₂O₂ 室温孵育 5-10 分钟,以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 分钟,再将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液(工作液)的容器中,置微波炉内加热使容器内液体温度保持在 92℃-98℃之间并持续 2 分钟进行抗原热修复。10%正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 分钟。倾去血清,勿洗,滴加

兔抗人 IRGMA 抗体浓度为 5ug/ul, 1: 100-1: 200 稀释, 室温反应 2 小时, 1XPBS, 冲洗 3 次, 每次 10 分钟; 带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗, 1: 100-1: 200 稀释, 室温反应 45 分钟, 二抗封闭结束前 5 分钟, DAPI 染核, 1XPBS 冲洗 3 次, 每次 5 分钟; 封片镜下观察。

SEQUENCE LISTING

<110> 复旦大学附属华山医院

<120> 兔抗人 IRGMa 全长蛋白多克隆抗体的制备和应用

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 203

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 1

ATG GAA GGC ATG AAT GTT GAG AAA GGC TCA GCA GAT GGG AAC TTG CCA GAG GTG ATC TCT 60
 Met Glu Ala Met Asn Val Glu Lys Ala Ser Ala Asp Gly Asn Leu Pro Glu Val Ile Ser
 1 5 10 15 20

AAC ATC AAG GAG ACT CTG AAG ATA GTG TCC AGG ACA CCA GTT AAC ATC ACT ATG GCA GGG 120
 Asn Ile Lys Glu Thr Leu Lys Ile Val Ser Arg Thr Pro Val Asn Ile Thr Met Ala Gly
 25 30 35 40

GAC TCT GGC AAT GGG ATG TCC ACC TTC ATC AGT GGC CTT CGA AAC ACA GGA CAT GAG GGT 180
 Asp Ser Gly Asn Gly Met Ser Thr Phe Ile Ser Ala Leu Arg Asn Thr Gly His Glu Gly
 45 50 55 60

AAG GCC TCA CCT CCT ACT GAG CTG GTA AAA GCT ACC CAA AGA TGT GGC TCC TAT TTC TCT 240
 Lys Ala Ser Pro Pro Thr Glu Leu Gta Lys Ala Thr Gln Arg Cys Ala Ser Tyr Phe Ser
 65 70 75 80

TCC CAC TTT TCA AAT GTG GTG TTG TGG GAC CTG CCT GGC ACA GGG TCT GCC ACC ACA ACC 300
 Ser His Phe Ser Asn Val Val Leu Trp Asp Leu Pro Gly Thr Gly Ser Ala Thr Thr Thr
 85 90 95 100

CTG GAG AAC TAC CTG ATG GAA ATG CAG TTC AAC CCG TAT GAC TTC ATC ATG GTT GCA TCT 360
 Leu Glu Asn Tyr Leu Met Glu Met Gln Phe Asn Arg Tyr Asp Phe Ile Met Val Ala Ser
 105 110 115 120

GCA CAA TTC AGC ATG AAT CAT GTG ATG CTT GCC AAA ACC GCT GAG GAC ATG GGA AAG AAG 420
 Ala Gln Phe Ser Met Asn His Val Met Leu Ala Lys Thr Ala Glu Asp Met Gly Lys Lys
 125 130 135 140

TTC TAC ATT GTC TGG ACC AAG CTA GAC ATG GAC CTC AGC ACA GGT GCC CTC CCA GAA GTG 480
 Phe Tyr Ile Val Trp Thr Lys Leu Asp Met Asp Leu Ser Thr Gly Ala Leu Pro Glu Val
 145 150 155 160

CAG CTA CTG CAG ATC AGA GAA AAT GTC CTG GAA AAT CTC CAG AAG GAG CCG GTA TGT GAA 540
 Gln Leu Leu Gln Ile Arg Glu Asn Val Leu Glu Asn Leu Gln Lys Glu Arg Val Cys Glu

TAC TAA	165	170	175	180
Tyr *				546
182				

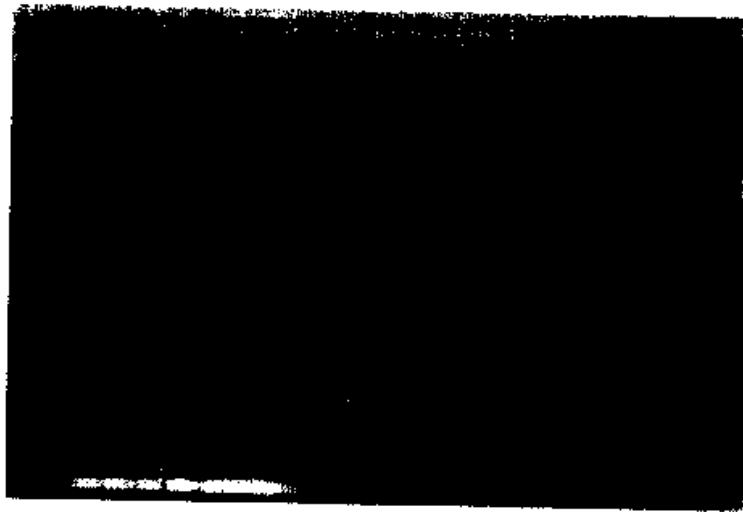


图 1

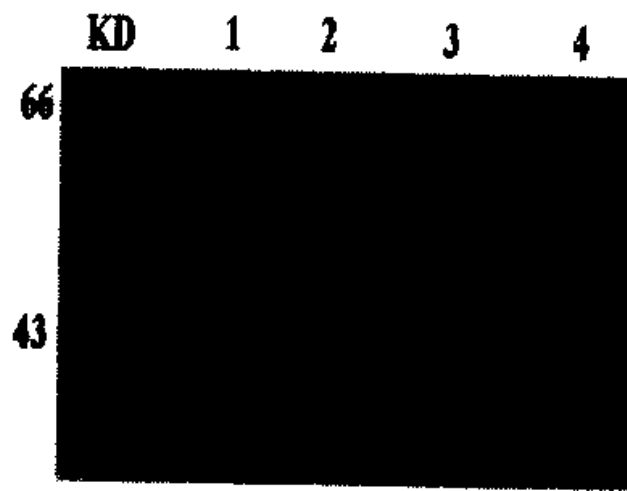


图 2

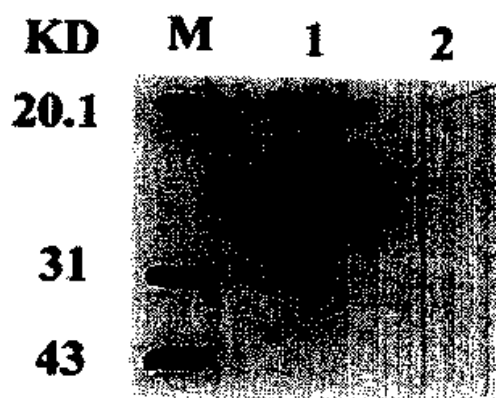


图 3



图 4

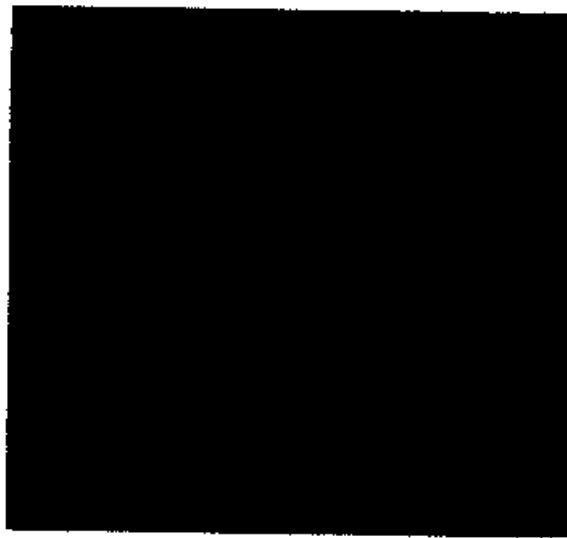


图 5

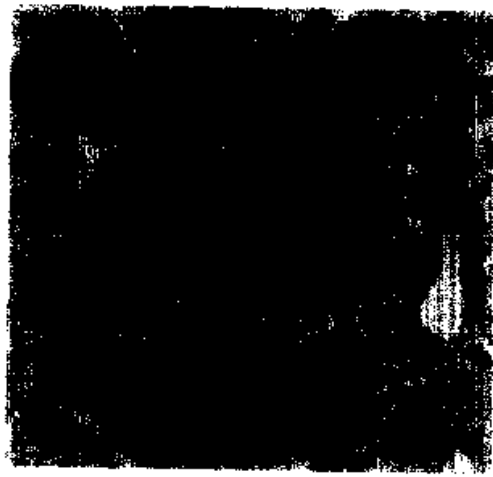


图 6

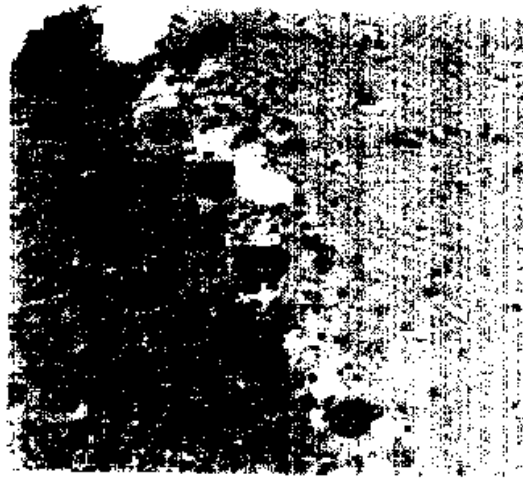


图 7

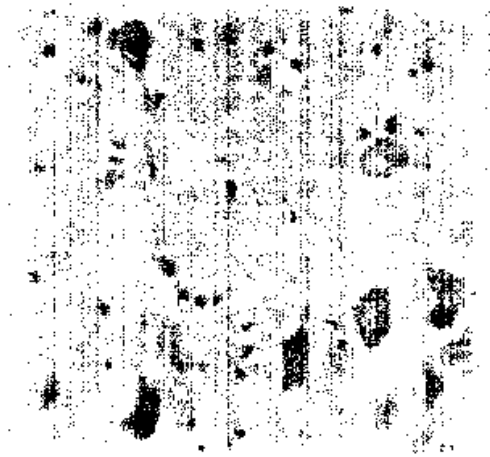


图 8



图 9

专利名称(译)	兔抗人IRGMa全长蛋白多克隆抗体的制备和应用		
公开(公告)号	CN101337991A	公开(公告)日	2009-01-07
申请号	CN200810070692.1	申请日	2008-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 福建医科大学附属第一医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 福建医科大学附属第一医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 福建医科大学附属第一医院		
[标]发明人	吴志英 王柠		
发明人	吴志英 王柠		
IPC分类号	C07K16/18 C07K19/00 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/70 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了兔抗人IRGMa全长蛋白多克隆抗体的制备和应用，属中药单体干预疾病的领域。本发明选定全长IRGMa蛋白来制备抗体，包括了所有的功能区。在优选的基础上还提出了其制备方法，并根据引物设计原则设计引物，构建含IRGMa全长基因的His和GST融合蛋白来制备抗体。本发明所制备的抗体具有高度特异性和敏感性，有助于研究IRGM基因的表达谱分析及功能，并研究IRGM在MS发病过程中的具体作用，从而揭示MS的发病机制并寻找有效的基因免疫治疗措施。因此，人参皂甙Rg1有一定的干预多发性硬化的作用。本发明的人参皂甙Rg1可以明显降低多发性硬化的动物模型—EAE小鼠的发病率。

A	1	1	2.5ng	2.5ng	5	5	10ng	10ng	100n	100n			蛋白梯度 抗体梯度
B	0.008	0.011	0.008	0.009	0.008	0.015	0.009	0.014	0.019	0.023			免疫前 1: 500
C	0.034	0.034	0.076	0.068	0.124	0.132	0.229	0.226	0.668	0.671			免疫后 1: 500
D	0.021	0.020	0.045	0.049	0.087	0.098	0.175	0.201	0.603	0.534			1: 1000
E	0.014	0.014	0.032	0.034	0.059	0.063	0.123	0.122	0.516	0.556			1: 2000
F	0.008	0.008	0.018	0.018	0.046	0.037	0.103	0.083	0.472	0.365			1: 5000
G	0.010	0.005	0.010	0.008	0.020	0.017	0.038	0.043	0.234	0.209			1: 10000
H													
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		