



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101497665 B

(45) 授权公告日 2013. 02. 06

(21) 申请号 200910111114. 2

(22) 申请日 2009. 02. 25

(73) 专利权人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

(72) 发明人 金光辉 王洋 葛庆 郭中强

王恩华

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

C07K 16/40 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2004007703 A1, 2004. 01. 22,

CN 1542132 A, 2004. 11. 03,

CN 1405312 A, 2003. 03. 26,

李福洋 等. 血管生成抑制素的功能结构域 K1-3 的融合表达与抗体制备. 《第四军医大学学报》. 1999,

Eric Gabison, et al. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. 《Experimental Eye Research》. 2004,

审查员 唐宁

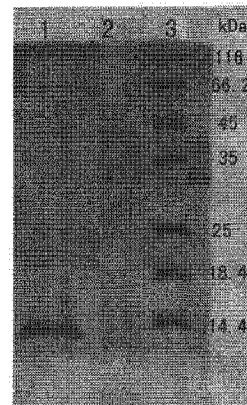
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体及其制备方法及应用

(57) 摘要

人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体及其制备方法及应用, 涉及一种抗体。提供一种人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体及其制备方法及应用。为兔的血清免疫球蛋白 Ig G, 由重链 55kDa 和轻链 30kDa 两条链组成。先表达和纯化 K5 多肽; 再制备人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体。用于人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体可以特异性与 K5 蛋白结合; 人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体可以检测标本中转染表达 K5 蛋白质质的人肺腺癌细胞的 K5 表达分布; 人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体可以检测标本中转染表达 K5 蛋白质质的人肺腺癌细胞的 K5 表达分布。



1. 人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 表达和纯化 K5 多肽,其具体方法如下:将含有 K5 部分序列的 cDNA 的质粒 pPIC9K-K5,经测序鉴定正确后,利用限制性内切酶 Sal I 线性化,通过电转化至毕赤酵母 GS115 中,通过 PCR 方法鉴定阳性重组子,挑取的阳性重组子经甲醇诱导表达挑选高拷贝阳性菌,进行诱导表达,收集部分酵母上清,经三氯乙酸沉淀法浓缩蛋白后,Tricine SDS-PAGE 电泳检测,用硫酸铵盐沉淀法纯化浓缩蛋白、透析后,阴离子交换层析过柱,用洗脱液上柱,流出液即为纯化的 K5 蛋白;

2) 制备人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体,其具体方法如下:用纯化的 15kDa 的 K5 蛋白与弗氏佐剂混合,免疫动物,经纯化获得人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体;

所述用纯化的 15kDa 的 K5 蛋白与弗氏佐剂混合,免疫动物,经纯化的具体方法如下:第一次用纯化的 K5 蛋白 1mg 加弗氏完全佐剂,剧烈震荡,充分乳化后免疫新西兰兔,每隔 14 天用纯化的 K5 蛋白 0.5mg 加不完全弗氏佐剂,与生理盐水乳化,加强免疫两次,用颈动脉取血法接取兔血清,用 ELISA 法检测多克隆抗体的效价,抗体效价分析表明抗体效价达到 1 : 1000,将血清总蛋白经过 50%硫酸铵沉淀后,结合于 protein A 柱上,用亲和层析法分离出多克隆抗体。

2. 如权利要求 1 所述的人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体的制备方法,其特征在于所述进行诱导表达时,培养条件为 28 ~ 30°C, 250rpm, 48h,按体积百分比,每 24h 补加甲醇至 1%。

3. 如权利要求 1 所述的人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体的制备方法,其特征在于所述用硫酸铵盐沉淀法纯化浓缩蛋白的硫酸铵盐的浓度按质量百分比为 65%。

4. 如权利要求 1 所述的人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体的制备方法,其特征在于所述洗脱液用含 0.2mol/L NaCl 的洗脱液。

## 人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体及其制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗体,尤其是涉及一种人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体及其制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 新生血管异常增生所引起的全身组织及器官的损害是目前最为棘手的医学难题之一,是全身许多重大疾病的病因和 / 或重要病理特征。人纤溶酶原 Kringle5 (Human Plasminogen Kringle 5, K5) 是引人注目的抑制血管生成蛋白之一,是目前发现抑制新生血管活性最强的纤溶酶原片段,具有生物活性强、细胞特异性高、分子量小、副作用小、性质比较稳定等诸多显著优点 (1、Cao. Y, Chen. A. An, S. S. Ji, R. W, Davidson. D and Llinas. M. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. J Biol Chem, 272(36) :22924-22928, 1997 ;2、W. R. Ji, L. G. Barrientos, M. Llinás, H. Gray, X. Villarreal, M. E. DeFord, F. J. Castellino, R. A. Kramer and P. A. Trail. Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun, 247(2) :414-419, 1998 ;3、Soff, G. A. Angiostatin and angiostatin-related proteins. Cancer Metastasis Rev, 19(1-2) :97-107, 2000)。已证实了 K5 在新生血管性疾病如实体瘤 (4、Davidson DJ, Haskell C, Majest S, et al. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. Cancer Res, 65 :4663-4672, 2005 ;5、Perri SR, Nalbantoglu J, Annabi B, et al. Plasminogen kringle 5-engineered glioma cells block migration of tumor-associated macrophages and suppress tumor vascularization and progression. Cancer Res, 65 :8359-8365, 2005)、糖尿病性视网膜增生 (Zhihong Zhang, Jian-xing Ma, Guoquan Gao, Chaoyang Li, Lihui Luo, Mei Zhang, Wenzhao Yang, Aihua Jiang, Wenhui Kuang, Liying Xu, Jiaqi Chen, and Zuguo Liu. Plasminogen Kringle 5 Inhibits Alkali-Burn-Induced Corneal Neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46 :4062-4071, 2005) 等疾病治疗中具有潜在的应用前景。但目前尚缺乏有效、特异的人源性 K5 检测抗体,严重制约着 K5 作用机制的进一步深入探讨及其应用。

[0003] 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体及其制备方法及应用。

[0005] 本发明所述人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体为兔的血清免疫球蛋白 Ig G, 由重链 55kDa 和轻链 30kDa 两条链组成。它可以特异性识别并结合 K5 蛋白,可以有效应用于检测 K5 蛋白的多种方法,如酶联免疫吸附实验 (ELISA)、蛋白免疫印迹 (Western Blot)、免疫组织化学、免疫荧光等检测。

[0006] 本发明所述人纤溶酶原 Kringle5 多克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

[0007] 1) 表达和纯化 K5 多肽：

[0008] 2) 制备人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体。

[0009] 所述表达和纯化 K5 多肽可采用以下方法：将含有 K5 部分序列的 cDNA 的质粒 pPIC9K-K5，经测序鉴定正确后，利用限制性内切酶 Sal I 线性化，通过电转化至毕赤酵母 GS115 中，通过 PCR 方法鉴定阳性重组子，挑取的阳性重组子经甲醇诱导表达挑选高拷贝阳性菌，进行诱导表达，收集部分酵母上清，经三氯乙酸沉淀法浓缩蛋白后，Tricine SDS-PAGE 电泳检测，用硫酸铵盐沉淀法纯化浓缩蛋白、透析后，阴离子交换层析过柱，用洗脱液上柱，流出液即为纯化的 K5 蛋白。

[0010] 所述毕赤酵母 GS115 可购买于 Invitrogen 公司。进行诱导表达时，为保证表达蛋白的活性，培养条件最好为 28 ~ 30°C，250rpm，48h，按体积百分比，每 24h 最好补加甲醇至 1%。收集部分酵母上清，经三氯乙酸沉淀法浓缩蛋白后，Tricine SDS-PAGE 电泳检测，15.0kDa 处有预期的条带。所述用硫酸铵盐沉淀法纯化浓缩蛋白的硫酸铵盐的浓度按质量百分比最好为 65%。所述阴离子交换层析最好采用 Bio-Rad 公司出品的 UNOsphere Q cartridge 阴离子交换层析。所述洗脱液最好用含 0.2mol/L NaCl 的洗脱液。

[0011] 所述制备人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体可采用以下方法：用纯化的 15kDa 的 K5 蛋白与弗氏佐剂混合，免疫动物，经纯化获得人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体。

[0012] 所述免疫动物可选用家兔，小鼠或大鼠等。用纯化的 15kDa 的 K5 蛋白与弗氏佐剂混合，免疫动物，经纯化可采用以下方法：第一次用纯化的 K5 蛋白 1mg 加弗氏完全佐剂，剧烈震荡，充分乳化后免疫新西兰兔，每隔 14 天用纯化的 K5 蛋白 0.5mg 加不完全弗氏佐剂，与生理盐水乳化，加强免疫两次，用颈动脉取血法接取兔血清，用 ELISA 法检测多克隆抗体的效价，抗体效价分析表明抗体效价达到 1 : 1000。将血清总蛋白经过 50%硫酸胺沉淀后，结合于 protein A 柱上，用亲和层析法分离出多克隆抗体。

[0013] 本发明以毕赤酵母系统表达了 K5 蛋白的部分多肽，以纯化的 K5 多肽为抗原，制备了抗 K5 蛋白的多克隆抗体。本发明所述人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体有如下的应用：

[0014] 1) 蛋白免疫印记实验证明人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体可以特异性与 K5 蛋白结合。

[0015] 2) 应用免疫组织化学技术，人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体可以检测标本中转染表达 K5 蛋白质粒的人肺腺癌细胞 (A549) 的 K5 表达分布。

[0016] 3) 应用免疫荧光组织化学技术，人纤溶酶原 Kringle5 蛋白的多克隆抗体可以检测标本中转染表达 K5 蛋白质粒的人肺腺癌细胞的 K5 表达分布。

#### 附图说明

[0017] 图 1 为 K5 蛋白的表达 (Tricine SDS-PAGE 检测，考马斯亮蓝染色)。在图 1 中，条带 1. pPIC9K-K5 菌株；条带 2. 阴性对照 pPIC9K 菌株；条带 3. 蛋白分子量 Marker。

[0018] 图 2 为 K5 蛋白的纯化 (Tricine SDS-PAGE 检测，考马斯亮蓝染色)。在图 2 中，1. 蛋白分子量 Marker；2. K5Q Sepharose 离子交换介质穿过液；3. 同 2；4. 0.1M NaCl 洗脱；5. 0.2M NaCl 洗脱；6. 0.3M NaCl 洗脱；7. 0.4M NaCl 洗脱；8. 0.5M NaCl 洗脱。

[0019] 图 3 为 K5 的多克隆抗体效价的 ELISA 测定。在图 3 中, K5 兔多克隆抗体效价为 1 : 1000。横坐标为稀释倍数,纵坐标 OD450 ;◆为 NC, ■为样品。

[0020] 图 4 为 K5 多克隆抗体的纯化 (Tricine SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝染色)。在图 4 中,条带 1. 蛋白分子量 Marker ;条带 2. 兔血清总蛋白 ;条带 3. 硫酸铵沉淀后上清 ;条带 4. 硫酸铵沉淀 ;条带 5. 穿过液 ;条带 6. 洗脱目的带,主要为兔 IgG 的重链和轻链。

[0021] 图 5 为 Western blot 检测酵母细胞表达的 K5 蛋白。

[0022] 图 6 为多克隆抗体用于免疫组化检测 K5 的分布。图 6A 为转染 pcDNA3. 1 (+) 质粒的 A549 细胞,图 6B 为转染 pcDNA3. 1 (+)-K5 质粒的 A549 细胞。

[0023] 图 7 为多克隆抗体用于免疫荧光检测 K5 的分布。图 7A 为转染 pcDNA3. 1 (+) 质粒的 A549 细胞,图 7B 为转染 pcDNA3. 1 (+)-K5 质粒的 A549 细胞 ;标尺为 20  $\mu$  m。

### 具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0025] 1. K5 蛋白的构建,表达,纯化 :

[0026] (1)K5 质粒的构建 :将含有 K5 的 cDNA (Genbank) 的质粒 pPIC9K (朱明等构建) 转化大肠杆菌 TOP10 中,在含氨苄青霉素 (终浓度 100ug/ml) 的 LB 平板培养过夜后,用菌落 PCR 方法筛选阳性克隆,并进行测序。DNA 序列分析结果表明 DNA 序列与人纤溶酶原 Kringle5 的 cDNA (Genebank) 序列完全相同。

[0027] K5 的表达纯化 :将经限制性内切酶 SalI 线性化 CIAP 去磷酸化处理的 pPIC9K-K5 质粒电转化到毕赤酵母 GS115 中,电转参数 :电压 1. 5kV ;电容 25  $\mu$  F ;电阻 200  $\Omega$  。经过高浓度 G418 抗生素 (浓度 3mg/ml) 筛选的阳性酵母菌在 28 ~ 30 $^{\circ}$ C, 250rpm, 培养 48h 后离心收集菌体,换用含 1% (v/v) 甲醇的培养基继续培养诱导 48h, 并且每 24h 补加甲醇至 1% (v/v)。离心收集酵母上清,用 65%硫酸铵盐沉淀法纯化浓缩蛋白、透析后,将样品加入 UNOsphere Qcartridge 阴离子交换层析过柱,通过含 0. 2mol/L NaCl 的洗脱液将 K5 洗脱。流出液经 TricineSDS-PAGE 电泳检测, K5 的纯度在 98%以上。

[0028] 图 1 给出 K5 蛋白的表达 (Tricine SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝染色)。在图 1 中,条带 1. pPIC9K-K5 菌株 ;条带 2. 阴性对照 pPIC9K 菌株 ;条带 3. 蛋白分子量 Marker。

[0029] 图 2 给出 K5 蛋白的纯化 (Tricine SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝染色)。在图 2 中, 1. 蛋白分子量 Marker ;2. K5 Q Sepharose 离子交换介质穿过液 ;3. 同 2 ;4. 0. 1M NaCl 洗脱 ;5. 0. 2MNaCl 洗脱 ;6. 0. 3M NaCl 洗脱 ;7. 0. 4M NaCl 洗脱 ;8. 0. 5M NaCl 洗脱。

[0030] 2. K5 蛋白的多克隆抗体制备纯化及其效价测定 :

[0031] 多克隆抗体的生产可用纯化的 K5 蛋白直接注射动物 (如家兔,小鼠,大鼠等) 的方法得到,多种佐剂可用于增强免疫反应,包括但不限于弗氏佐剂。

[0032] 用 1mg 上述 K5 蛋白加上完全弗氏佐剂加,完全乳化后,于新西兰兔背部、腹股沟处注射 5 个点进行初次免疫,每隔 14 天再用 K5 蛋白加不完全弗氏佐剂加强免疫两次。采用经 5. 4ug/mL K5 蛋白包被的 96 孔聚苯乙烯微量滴定板做 ELISA 测定兔血清中抗体的滴度。ELISA 实验的抗体效价分析表明,抗体效价达到 1 : 1000。将血清总蛋白经过 50%硫酸沉淀后,结合于 protein A Sepharose 柱上,用亲和层析法分离出多克隆抗体。

[0033] 图 3 给出 K5 的多克隆抗体效价的 ELISA 测定。在图 3 中, K5 兔多克隆抗体效价为 1 : 1000。

[0034] 图 4 给出 K5 多克隆抗体的纯化 (Tricine SDS-PAGE 检测, 考马斯亮蓝染色)。在图 4 中, 条带 1. 蛋白分子量 Marker ; 条带 2. 兔血清总蛋白 ; 条带 3. 硫酸铵沉淀后上清 ; 条带 4. 硫酸铵沉淀 ; 条带 5. 穿过液 ; 条带 6. 洗脱目的带, 主要为兔 IgG 的重链和轻链。

[0035] 3. K5 蛋白的多克隆抗体的特异性检测 :

[0036] 蛋白免疫印记检测 : 上述制备的酵母表达上清经 Tricine SDS-PAGE 电泳后, 电转 PVDF 膜。10% 小牛血清封闭非特异性结合位点, 加入 K5 蛋白的多克隆抗体 (1 : 500), 于 4℃ 过夜, TBST 溶液洗涤 1h 后, 加 1 : 50000 稀释的 HRP 标记二抗, 置于室温振荡 2h, 用 TBST 溶液洗涤 2h 后, 在新鲜的 ECL 底物液中反应 3min, 进行医学 X- 光片曝光。Western blot 实验证明多克隆抗体可特异性与 K5 蛋白结合。图 5 给出 Western blot 检测酵母细胞表达的 K5 蛋白。

[0037] 4. 利用 K5 多克隆抗体检测 K5 :

[0038] 对表达 K5 蛋白的哺乳动物细胞标本, 经 PBS 清洗, 福尔马林固定后, 使用 K5 兔多克隆抗体包被, 与 HRP 标记的二抗反应后, 经 DAB 显色, 苏木素返蓝, 脱水, 晾干后树脂固定在显微镜下观察 ; 或加入绿色荧光标记二抗反应, DAPI 染核, 晾干后利用共聚焦显微镜检测标本。结果显示, K5 兔多克隆抗体能够应用于免疫组织化学及免疫荧光技术实验中, 检测标本中 K5 蛋白和突变修饰的 K5 的表达和分布情况。

[0039] 图 6 给出多克隆抗体用于免疫组化检测 K5 的分布。图 6A 为转染 pcDNA3. 1 (+) 质粒的 A549 细胞, 图 6B 为转染 pcDNA3. 1 (+)-K5 质粒的 A549 细胞。

[0040] 图 7 给出多克隆抗体用于免疫荧光检测 K5 的分布。图 7A 为转染 pcDNA3. 1 (+) 质粒的 A549 细胞, 图 7B 为转染 pcDNA3. 1 (+)-K5 质粒的 A549 细胞。

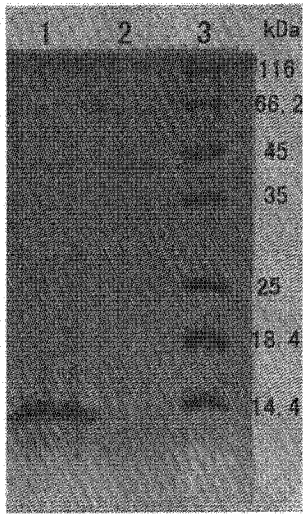


图 1

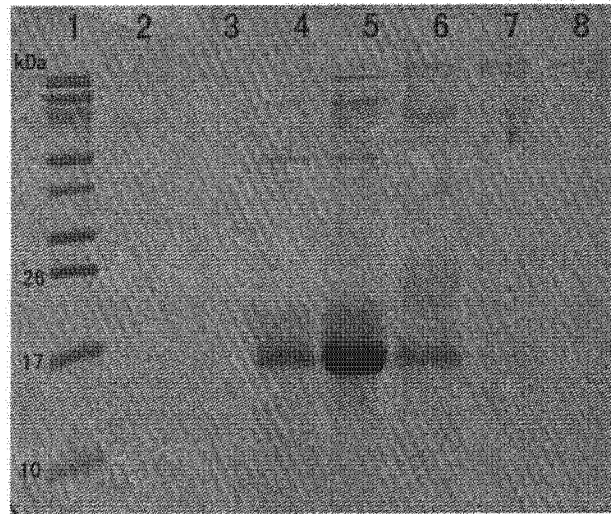


图 2

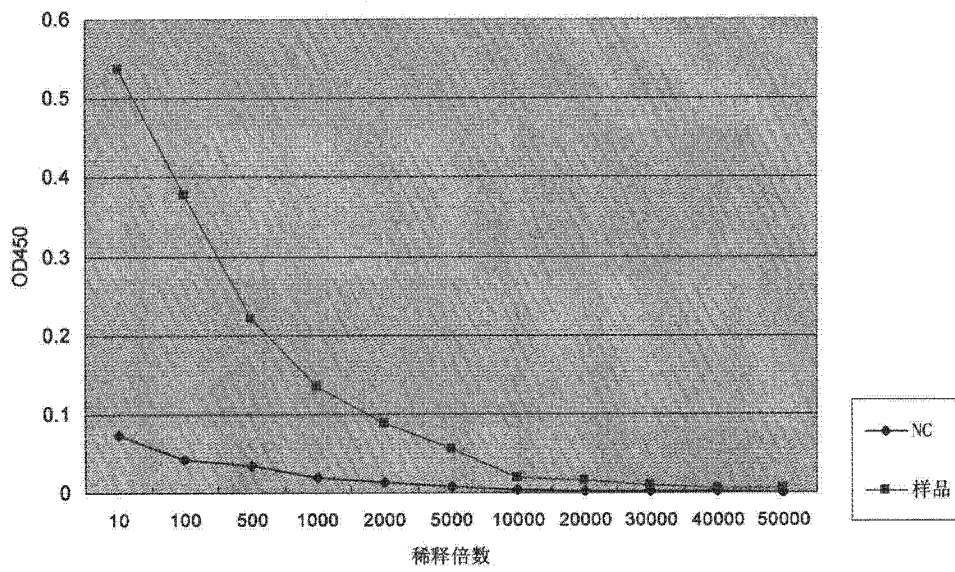


图 3

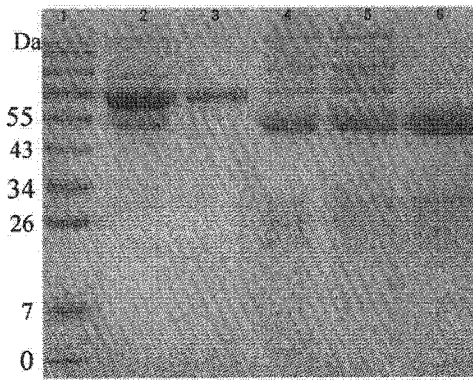


图 4

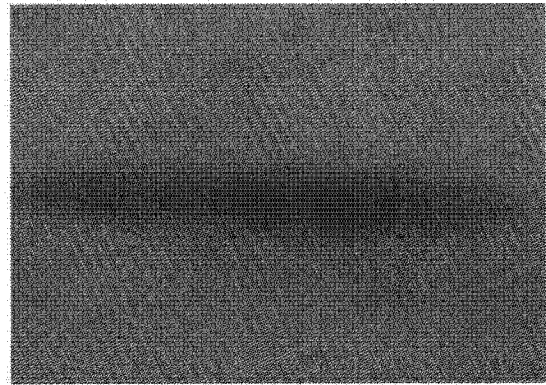


图 5

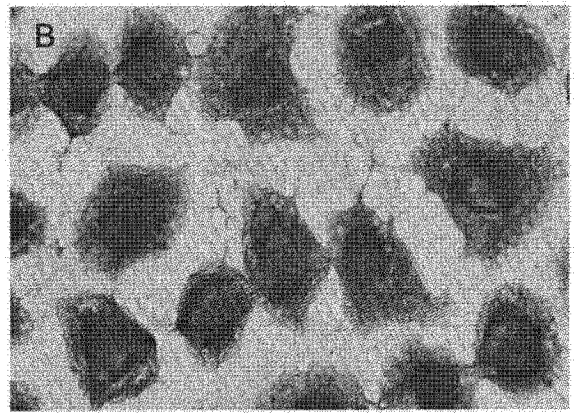
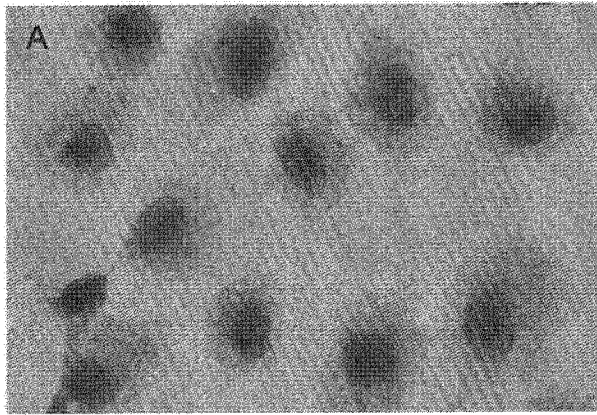


图 6

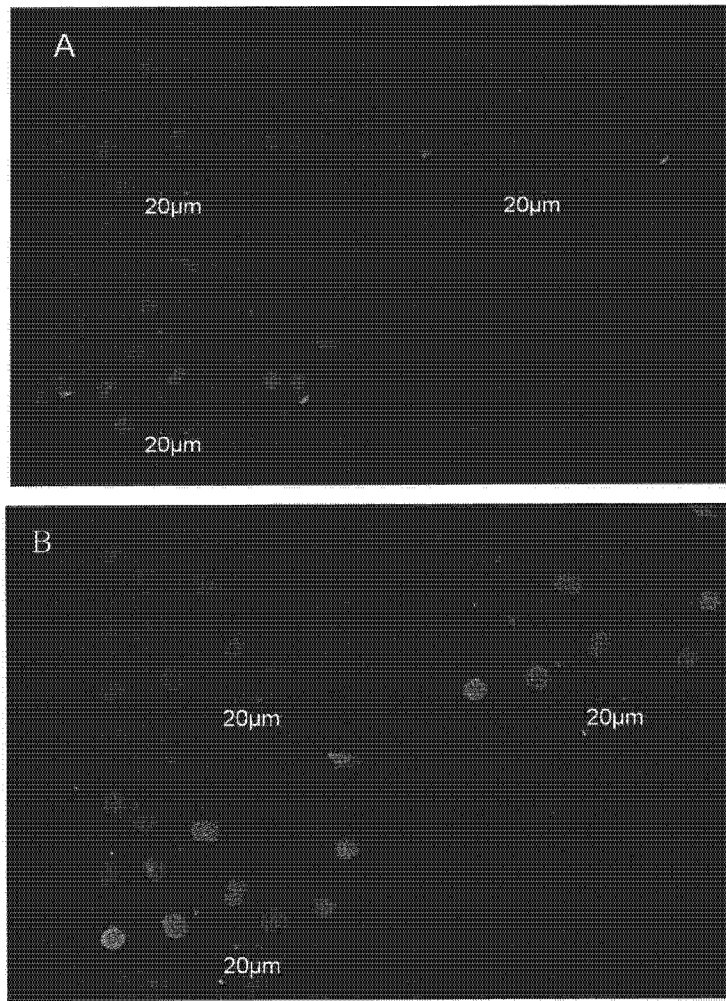


图 7

专利名称(译)	人纤溶酶原Kringle5多克隆抗体及其制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101497665B</a>	公开(公告)日	2013-02-06
申请号	CN200910111114.2	申请日	2009-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	金光辉 王洋 葛庆 郭中强 王恩华		
发明人	金光辉 王洋 葛庆 郭中强 王恩华		
IPC分类号	C07K16/40 G01N33/53		
审查员(译)	唐宁		
其他公开文献	CN101497665A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

人纤溶酶原Kringle5多克隆抗体及其制备方法及应用，涉及一种抗体。提供一种人纤溶酶原Kringle5多克隆抗体及其制备方法及应用。为兔的血清免疫球蛋白Ig G，由重链55kDa和轻链30kDa两条链组成。先表达和纯化K5多肽；再制备人纤溶酶原Kringle5蛋白的多克隆抗体。用于人纤溶酶原Kringle5蛋白的多克隆抗体可以特异性与K5蛋白结合；人纤溶酶原Kringle5蛋白的多克隆抗体可以检测标本中转染表达K5蛋白质粒的人肺腺癌细胞的K5表达分布；人纤溶酶原Kringle5蛋白的多克隆抗体可以检测标本中转染表达K5蛋白质粒的人肺腺癌细胞的K5表达分布。

