



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101830983 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201010164851. 1

(22) 申请日 2010. 05. 07

(73) 专利权人 东北师范大学

地址 130024 吉林省长春市人民大街 5268 号

(72) 发明人 李晓萌 张淑芝 汪小莞 关新刚 杨南扬 麻彤辉

(74) 专利代理机构 长春市东师专利事务所 22202

代理人 刘延军 修雪静

(51) Int. Cl.

C07K 16/16 (2006. 01)

C12N 15/62 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C07K 19/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

李晓萌等. 水通道蛋白 1-C 末端肽段 /GST 融合蛋白的原核表达. 《分子细胞生物学报》. 2008, 第 41 卷 (第 1 期), 第 81-85 页.

梁松岚等. 视神经脊髓炎与其特异性抗体 - 抗水通道蛋白 4 抗体. 《中国神经免疫学和神经病学杂志》. 2008, 第 15 卷 (第 2 期), 第 109-111 页.

杨南扬等. 水通道蛋白 AQP1/GST 融合蛋白的原核表达及其抗体的制备. 《吉林省第六届生命科学大型学术报告会论文集》. 2008, 第 178-179 页.

审查员 李子东

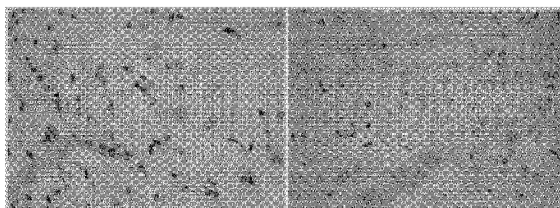
权利要求书 1 页 说明书 4 页
序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

特异序列基础的水通道蛋白 4 高效价抗体的制备及应用

(57) 摘要

本发明属于生物工程技术领域, 涉及特异序列基础的水通道蛋白 4 高效价抗体的制备及应用, 利用基因工程技术, 将小鼠 AQP4 基因近 3' 端亲水区克隆到原核表达载体中。经酶切和序列分析后, 用重组质粒转化大肠杆菌, 并经异丙基 -β-D- 硫代半乳糖苷诱导产生 GST-AQP4 融合蛋白。以纯化的融合蛋白免疫新西兰兔制备抗血清。抗血清的效价及特异性采用 ELISA 和 Western blot 检测。构建融合蛋白原核表达载体, 可高效表达特异性的融合蛋白, 获得抗 GST-AQP4 融合蛋白的高效价抗血清。该抗 AQP4 多克隆抗体效价与特异性均较良好, 适合对 AQP4 的检测应用。为从蛋白水平深入研究 AQP4 功能提供了必要的实验工具。



CN 101830983 B

1. 特异序列基础的原核表达 GST-AQP4 融合蛋白的多克隆抗体,其特征在于利用特异序列原核表达的 GST-AQP4 融合蛋白作为抗原免疫动物产生抗血清而获得,该抗血清中抗 GST-AQP4 抗体的滴度高达 1 : 50000,并经过 Western blot 和免疫组化鉴定抗 GST-AQP4 血清具有较好的特异性,其中,所述的特异序列是指 AQP4 基因近 3' 端亲水区的一段序列,其氨基酸序列为:

tkgsymev ednrsqvete dlilkpgvvh vididrgeek kgkd,

核苷酸序列为:

781tgtcctgatg tggagctcaa acgtcgcctt

841aaggaagcct tcagcaaagc cgcgcagcag acaaaaggga gctacatgga ggtggaggac

901aaccggagcc aagtggagac ggaagacttg atcctg。

特异序列基础的水通道蛋白 4 高效价抗体的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程中的 DNA 重组技术领域,具体涉及特异序列基础的原核表达 GST-AQP4 融合蛋白的多克隆抗体及应用。

背景技术

[0002] 水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 是一类广泛存在于原核和真核生物细胞膜上,选择性高效转运水分子的特异孔道,目前在哺乳类已发现至少 12 个成员。研究表明, AQP 家族在多种组织的液体转运生理和病理中发挥重要作用。水通道 AQP4 在脑的星形细胞、眼睛、耳朵、骨骼肌、胃腔壁细胞以及肾的集合管等处高表达,并在渗透压驱动的跨内皮水转运中发挥重要作用。

[0003] 自 2003 年美国两位科学家因在膜通道研究领域的一些开创性工作而获当年的诺贝尔化学奖以来,水通道蛋白结构与功能的研究已成为热点。对于一种新蛋白质说来,抗体是研究其功能最有力的工具之一。在抗原-抗体相互作用基础上发展起来的一系列技术,如免疫组织化学、免疫印迹和免疫沉淀等,在蛋白质的检测和功能研究中都有着广泛的应用。

[0004] 水通道蛋白 4 作为一种跨膜的蛋白分子,其中的疏水片段是无法进行原核表达的,而膜外小的亲水区域无抗原性或抗原性较小。现世面出售的 AQP4 抗体是以人工合成短肽链作为抗原制备而成,其抗原蛋白的空间结构较 AQP4 蛋白的空间结构有很大差异。

发明内容

[0005] 本发明的目的是建立一种能够用于 AQP4 的检测的模型,为从蛋白水平深入研究 AQP4 功能及相关疾病提供必要的实验工具。

[0006] 利用基因工程技术,将小鼠 AQP4 基因近 3' 端亲水区克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 中。经酶切和序列分析后,用重组质粒转化大肠杆菌 BL21,并经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导产生 GST-AQP4 融合蛋白。以纯化的融合蛋白免疫新西兰兔制备抗血清。抗血清的效价及特异性采用 ELISA 和 Western blot 检测。

[0007] 本发明的 GST-AQP4 融合蛋白是将利用特殊序列 (小鼠 AQP4 基因近 3' 端亲水区) 构建 GST-AQP4 融合蛋白原核表达载体,转化 BL21 得到的高效表达特异性的 GST-AQP4 融合蛋白,这段近 3' 端亲水区基因核苷酸序列为:

[0008] 781 tgtcctgatg tggagctcaa acgtcgctt

[0009] 841aaggaagcct tcagcaaagc cgcgcagcag acaaaagga gctacatgga ggtggaggac

[0010] 901aaccggagcc aagtggagac ggaagacttg atcctg

[0011] 所表达蛋白的氨基酸序列为:

[0012] tkgsymev ednrsqvete dlilkpgvvh vididrgeek kgkd

[0013] 这种 GST-AQP4 融合蛋白及其多克隆抗体制备包括以下步骤:

[0014] 第一步,克隆载体的构建

[0015] 从小鼠 AQP4 基因全长上应用 PCR 技术以 p8p64 为模板,扩增得到的目的片段与 PMD18-T 载体连接,经转化、提取等步骤得到重组质粒后,酶切鉴定并测序。

[0016] 第二步,原核表达载体 pGEX-4T-1 的构建

[0017] 将克隆质粒和质粒 pGEX-4T-1 双酶切后,利用回收试剂盒获得 AQP4 基因该区片段和载体连接。经转化、提取等步骤获得重组的表达载体。酶切鉴定重组体,并且测序进一步确定。

[0018] 第三步,GST-AQP4 融合蛋白的诱导表达和纯化

[0019] 重组质粒 PGEX-4T-1/AQP1 转化大肠杆菌 BL21,利用 IPTG 诱导,GST-AQP4 融合蛋白的表达。以 SDS-PAGE 进行鉴定,并优化表达条件,进行大量扩增诱导。用超声裂解细菌,所获蛋白用 Glutathione-Sepharose 4B 柱纯化,SDS-PAGE 鉴定纯化产物。

[0020] 第四步,兔抗 AQP4 抗血清的制备,即获得该发明的多克隆抗体

[0021] 以纯化的 AQP4 融合蛋白免疫雄性新西兰大白兔,初次免疫用 500 μ g 融合蛋白,与等体积的完全弗氏佐剂充分混匀乳化后背部皮下多点注射。免疫前取耳静脉血分离血清,作为免疫前的血清对照。2wk 后进行第 1 次加强免疫,500 μ g 纯化的 GST-AQP4 融合蛋白与不完全弗氏佐剂等体积混匀,前后四脚掌肌肉注射。之后每隔 2wk 加强免疫 1 次。于末次免疫后 1wk 取耳血,用 ELISA 法测定抗体的效价,当抗体效价达到 1 : 100000 时,颈动脉放血,收集血清,应用多种免疫学方法检测其效价及特异性。

[0022] 我们应用该进行免疫组化鉴定,即取野生型小鼠脑,以 AQP4 敲除鼠脑做对照,做免疫组化。将组织剪碎加适量 RIPA 裂解液 [0.1% SDS,150Mm NaCl,10Mm Tris, (pH7.4), 1% Triton X-100,1% sodium deoxycholate,1mM PMSF],充分研磨后,离心收集上清。取等量的细胞总蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳分离,电转移至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭 1h;与自制的 I 级抗体室温反应 1h,PBS 洗 3 次;再与 HRP 标记的羊抗兔 II 级抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories) 室温反应 1h,PBS 洗 3 次,用 ECL 光化学试剂盒 (Amersham Phamacia) 检测信号,X 光片曝光显影。结果显示该兔抗 GST-AQP4 血清可特异性的与 AQP4 蛋白结合,成功对 AQP4 进行了检测【图 7】。

[0023] 利用选取的 3' 端亲水区基因序列成功地构建 GST-AQP4 融合蛋白原核表达载体,转化 BL21 后可高效表达特异性的 GST-AQP4 融合蛋白。以该融合蛋白免疫兔子获得抗 GST-AQP4 融合蛋白的高效价抗血清且特异性良好,克服了现存的以人工合成肽制备的抗体时,其抗原空间结构与表达蛋白差异大的缺点,所得到的抗体的效价和特异性都有大幅提升。可应用于对 AQP4 的检测,推进从蛋白水平 AQP4 功能的深入研究。

[0024] 附图说明:

[0025] 图 1 为 PCR 扩增出的 AQP4 基因近 3' 端亲水区 DNA 琼脂糖凝胶电泳图;

[0026] 图 2 为双酶切质粒 pGEX-4T-1 琼脂糖凝胶电泳图;

[0027] 图 3 为 pGEX-4T-1/AQP4 重组体测序结果;

[0028] 图 4 为纯化后的 GST 及 GST-AQP4 融合蛋白 SDS-PAGE 图,其中 1、2. GST (26KD); 3、4. GST-AQP4 (30KD);

[0029] 图 5 为间接 ELISA 法测定抗体的效价;

[0030] 图 6 为抗血清特异性的 Western blot 分析,其中 1,2,4. 野生型 CD1 小鼠脑组织; 3. buffer 对照;

[0031] 图 7 为抗 GST-AQP4 血清免疫组化鉴定结果,其中左侧为野生鼠的脑组织,右侧为敲除鼠的脑组织。

[0032] 具体实施方式:

[0033] 实施例 1:抗 GST-AQP4 血清的在制备

[0034] 1. PCR-PMD18-T/AQP4 重组质粒的构建

[0035] 小鼠 AQP4 基因全长从 Genebank 得到,基因序列号为 NM009700。以 p8p64 为模板,上游引物为 5'-GAATTCGACAACCGGAGCCAAGTG(含 EcoR I 酶切位点);下游引物为 5'-CTCGAGTACGGAAGACAATACCTC(含 Xho I 酶切位点)。应用 PCR 成功扩增出了 AQP4 基因近 3' 端亲水区 DNA 序列,长度 102bp,编码 34 个氨基酸【图 1】。扩增得到的片段与 PMD18-T 载体连接,将连接产物转入感受态大肠杆菌 DH5 α 中,在含 Amp⁺ 琼脂平板上挑选克隆,以碱裂解法小提重组质粒后,以 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定。

[0036] 2. 原核表达载体 pGEX-4T-1 的构建

[0037] 将含有 AQP4 基因近 3' 端亲水区片段的 pMD18-T 质粒经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后,利用回收试剂盒获得 AQP4 基因该区片段,同时用相同的酶处理质粒 pGEX-4T-1【图 2】。然后将回收的 AQP4 基因近 3' 端亲水区片段和经酶切的载体 pGEX-4T-1 在 T4 DNA 连接酶作用下于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。酶切鉴定重组体,并且测序进一步确定【图 3】,结果显示该 AQP4 片段正确。

[0038] 3. GST-AQP4 融合蛋白的诱导表达和纯化

[0039] 重组质粒 pGEX-4T-1/AQP1 转化大肠杆菌 BL21,挑取单菌落接入 LB/Amp^r 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日,将培养物按 1:50 的比例转接于含 Amp⁺ 的 LB 培养基中,继续在 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至对数生长期。在培养液的 A600 为 0.5~0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.08mmol/L,不加入 IPTG 者为阴性对照,置 25 $^{\circ}$ C 继续培养 4~5h。离心收集菌体,以 SDS-PAGE 进行鉴定 GST-AQP4 融合蛋白的表达,并优化表达条件,进行大量扩增诱导。以 5000r/min 于 4 $^{\circ}$ C 离心 5min,收集菌体,用 60mL 冰预冷的 NETN 悬浮 1L 菌液的沉淀。用超声裂解细菌,再以 9600rpm,于 4 $^{\circ}$ C 离心 15min,取上清,过 Glutathione-Sepharose 4B 柱,先以等体积洗脱缓冲液 1(含 20mM 谷胱甘肽、50mM TrisCl, pH = 8.0)洗脱,收集洗脱液,再以等体积洗脱缓冲液 2(含 100mM 谷胱甘肽)洗两遍,收集洗脱液,SDS-PAGE 鉴定纯化产物【图 4】。

[0040] 1、兔抗 AQP4 抗血清的制备及分析

[0041] i. 抗血清的制备

[0042] 以纯化的 AQP4 融合蛋白免疫雄性新西兰大白兔,初次免疫用 500 μ g 融合蛋白,与等体积的完全弗氏佐剂充分混匀乳化后背部皮下多点注射。免疫前取耳静脉血分离血清,作为免疫前的血清对照。2wk 后进行第 1 次加强免疫,500 μ g 纯化的 GST-AQP4 融合蛋白与不完全弗氏佐剂等体积混匀,前后四脚掌肌肉注射。之后每隔 2wk 加强免疫 1 次。于末次免疫后 1wk 取耳血,用 ELISA 法测定抗体的效价,当抗体效价达到 1:100000 时,颈动脉放血,收集血清。

[0043] ii. 抗血清效价的测定

[0044] 用 GST-AQP4 融合蛋白免疫前的新西兰大白兔血清作为对照,取末次加强免疫后第 7 天的血清。血清先稀释 10 倍再倍比稀释后,用间接 ELISA 测定抗体的效价。结果显示,

免疫前的兔血清未测出抗融合蛋白 GST-AQP4 的抗体,末次免疫后抗血清中抗 GST-AQP4 抗体的滴度高达 1 : 50000 以上【图 5】。

[0045] iii 抗血清特异性的 Western blot 分析

[0046] 以可溶性 GST-AQP4 融合蛋白作为免疫原制备的兔抗 GST-AQP4 血清进行 Western blot,将纯化的融合蛋白 GST2LZP3 样品,经 SDS-PAGE 分离后再电转移至硝酸纤维素膜上。以 5%脱脂奶粉封闭 1h,依次滴加兔抗鼠 LZP3 抗血清(室温 2h、PBS 洗 3 次)及山羊抗兔 IgG2HRP(室温反应 1h、PBS 洗涤 3 次),最后加底物 DAB 显色,并拍照。在 Mr×103 为 30 处出现 1 条特异的蛋白带,说明抗 GST-AQP4 血清具有较好的特异性【图 6】。

[0047] 实施例 2 :抗 GST-AQP4 血清的应用

[0048] 应用该进行免疫组化鉴定,即取野生型小鼠脑,以 AQP4 敲除鼠脑做对照,做免疫组化。将组织剪碎加适量 RIPA 裂解液 [0.1% SDS,150Mm NaCl,10Mm Tris, (pH7.4), 1% Triton X-100,1% sodium deoxycholate,1mM PMSF],充分研磨后,离心收集上清。取等量的细胞总蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳分离,电转移至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭 1h;与自制的 I 级抗体室温反应 1h, PBS 洗 3 次;再与 HRP 标记的羊抗兔 II 级抗体 (JacksonImmunoResearch Laboratories) 室温反应 1h, PBS 洗 3 次,用 ECL 光化学试剂盒 (AmershamPharmacia) 检测信号, X 光片曝光显影,结果显示该兔抗 GST-AQP4 血清可特异性的与 AQP4 蛋白结合,成功对 AQP4 进行了检测【图 7】。

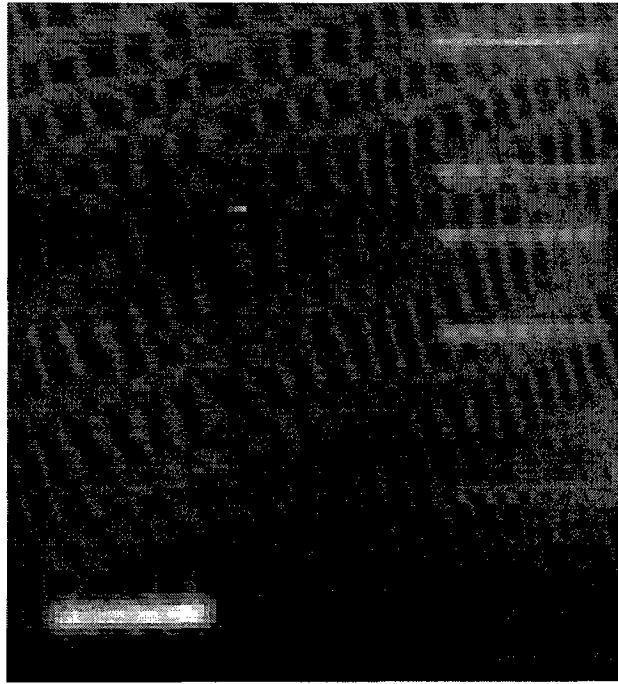


图 1

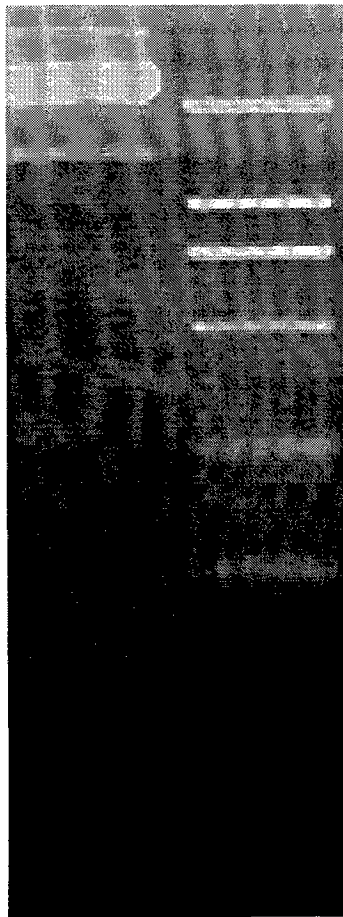


图 2

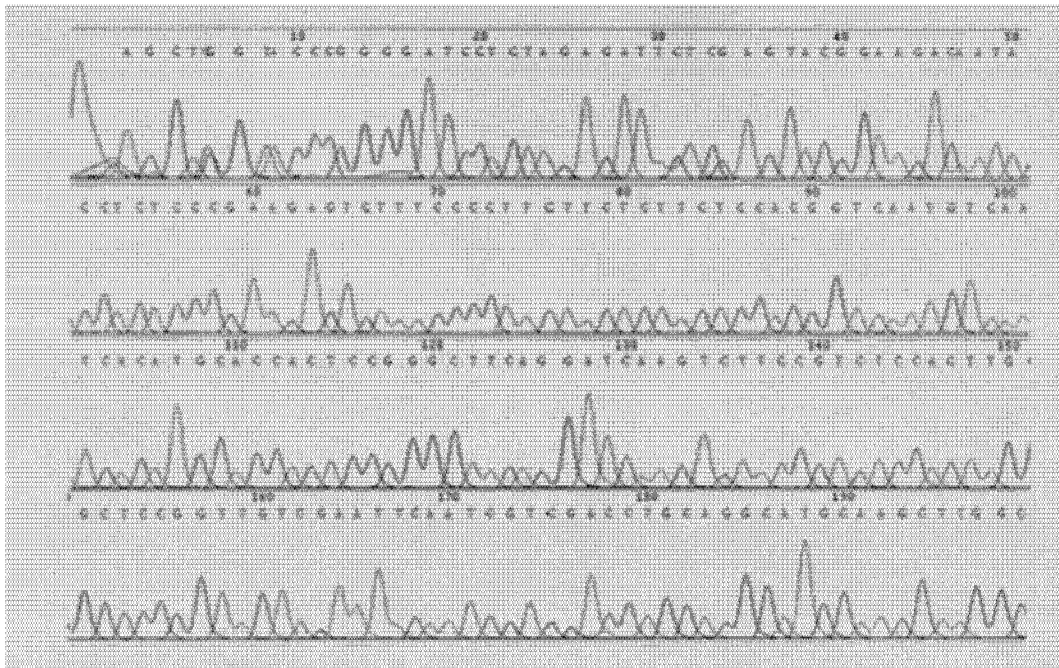


图 3

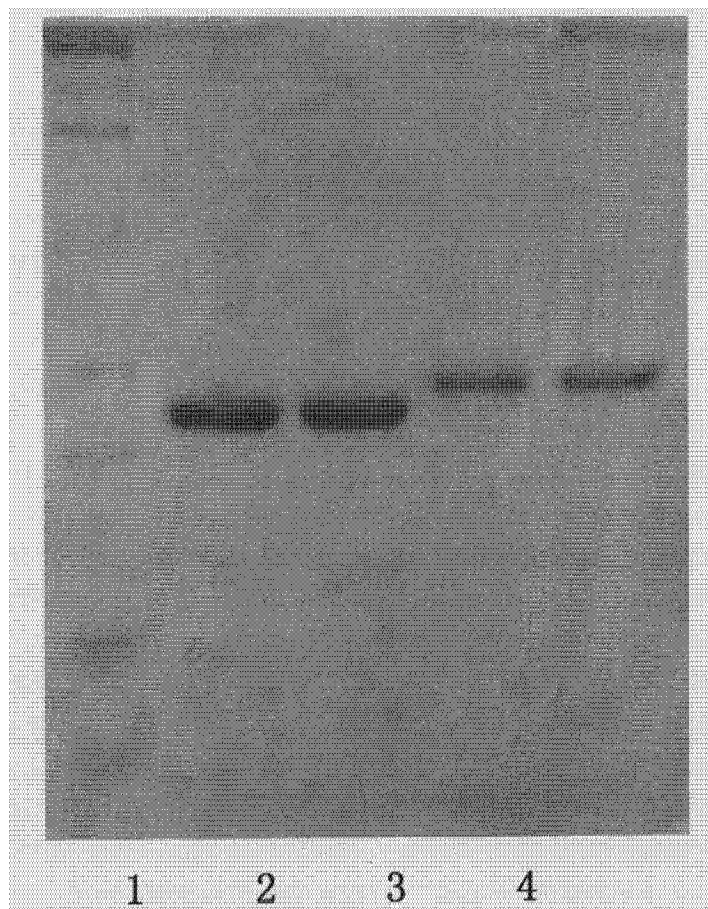


图 4

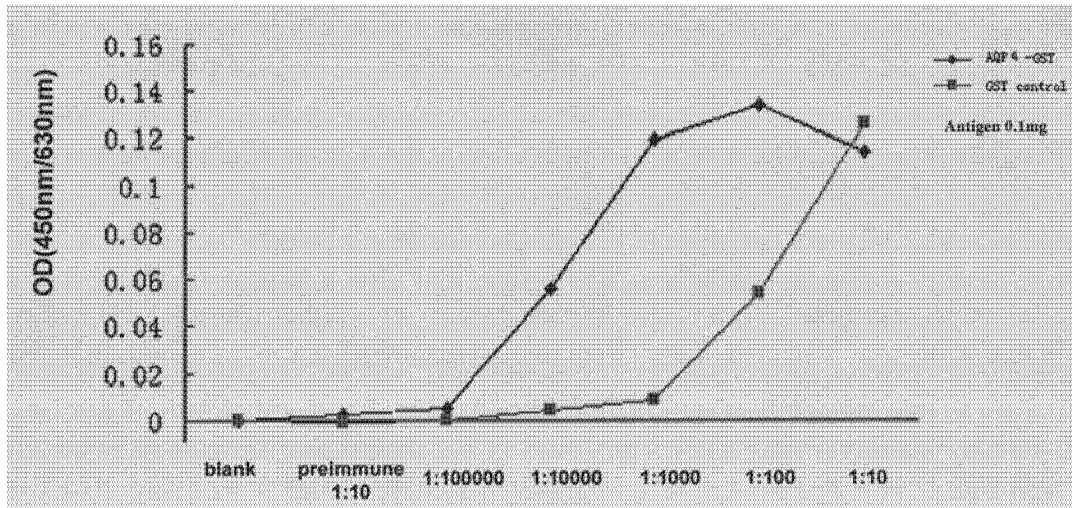


图 5

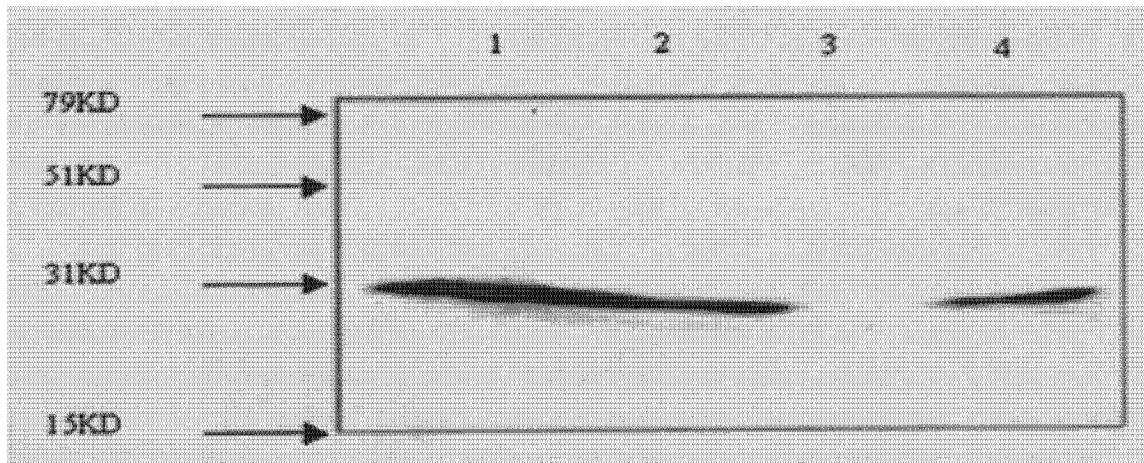


图 6

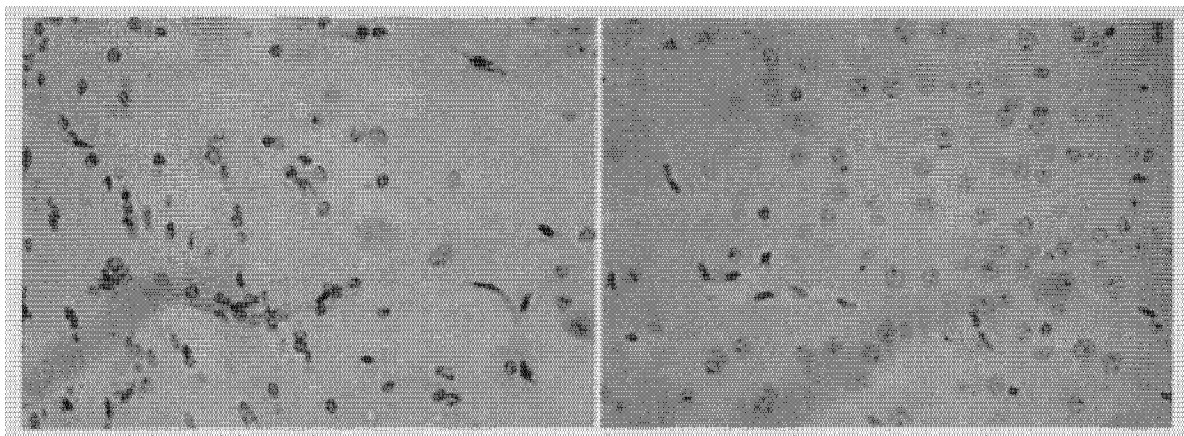


图 7

专利名称(译)	特异序列基础的水通道蛋白4高效价抗体的制备及应用		
公开(公告)号	CN101830983B	公开(公告)日	2012-11-07
申请号	CN201010164851.1	申请日	2010-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
[标]发明人	李晓萌 张淑芝 汪小莞 关新刚 杨南扬 麻彤辉		
发明人	李晓萌 张淑芝 汪小莞 关新刚 杨南扬 麻彤辉		
IPC分类号	C07K16/16 C12N15/62 C12N15/70 C07K19/00 G01N33/53		
代理人(译)	刘延军		
审查员(译)	李子东		
其他公开文献	CN101830983A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物工程技术领域，涉及特异序列基础的水通道蛋白4高效价抗体的制备及应用，利用基因工程技术，将小鼠AQP4基因近3'端亲水区克隆到原核表达载体中。经酶切和序列分析后，用重组质粒转化大肠杆菌，并经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导产生GST-AQP4融合蛋白。以纯化的融合蛋白免疫新西兰兔制备抗血清。抗血清的效价及特异性采用ELISA和Western blot检测。构建融合蛋白原核表达载体，可高效表达特异性的融合蛋白，获得抗GST-AQP4融合蛋白的高效价抗血清。该抗AQP4多克隆抗体效价与特异性均较良好，适合对AQP4的检测应用。为从蛋白水平深入研究AQP4功能提供了必要的实验工具。

