

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610118694.4

C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月23日

[11] 公开号 CN 1966526A

[22] 申请日 2006.11.23

[21] 申请号 200610118694.4

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号第二军医大学科研部

[72] 发明人 潘卫 蒋少华 徐容 贾建安
沈毅珺 杨华 王锦红 陈秋莉
何俊 陈璐

[74] 专利代理机构 上海光华专利事务所
代理人 余明伟 许亦琳

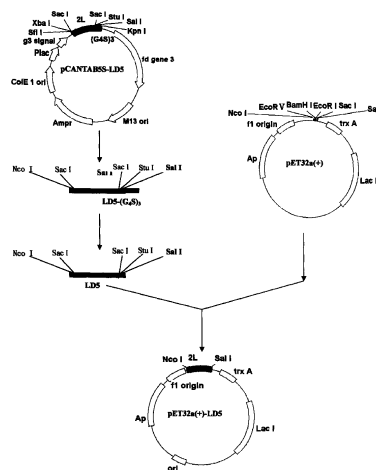
权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 10 页

[54] 发明名称

一种进化免疫球蛋白结合分子、其制备方法及应用

[57] 摘要

本发明涉及新型进化免疫球蛋白结合分子、其制备方法及其应用。本发明公开了一种分离的进化免疫球蛋白结合分子，它是具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的蛋白、或其具有免疫球蛋白结合活性的保守性变异蛋白。本发明还公开了该免疫球蛋白结合分子的编码基因、基因工程制备方法及其应用。本发明公开的免疫球蛋白结合分子广谱结合各种免疫球蛋白，显示出很高的免疫球蛋白全分子结合活性，可用于基因工程抗体的大规模纯化，天然抗体、单克隆抗体的纯化，酶联免疫吸附法、免疫层析法和免疫组化等免疫方法对抗体进行检测和诊断。



1. 一种重组的进化免疫球蛋白结合分子，其特征在于，它是具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列的蛋白、或其保守性变异蛋白。
2. 如权利要求 1 所述的进化免疫球蛋白结合分子，其特征在于，它具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。
3. 一种分离的多核苷酸，其特征在于，它编码权利要求 1 或 2 所述的蛋白。
4. 如权利要求 3 所述的多核苷酸，其特征在于，它具有 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列。
5. 一种表达载体，其特征在于，它含有权利要求 3 或 4 所述的多核苷酸以及与该多核苷酸序列操作性相连的表达调控序列。
6. 如权利要求 5 所述的载体，其特征在于，所述载体为原核载体。
7. 如权利要求 5 所述的载体，其特征在于，所述载体为 PET-32a(+)
8. 一种宿主细胞，其特征在于，它被权利要求 5—7 中任一权利要求所述的表达载体所转化。
9. 如权利要求 8 所述的宿主细胞，其特征在于所述宿主细胞为原核细胞。
10. 如权利要求 9 所述的宿主细胞，其特征在于所述原核细胞为大肠杆菌。
11. 如权利要求 10 所述的宿主细胞，其特征在于所述大肠杆菌为 BL21-TRXB。
12. 一种重组的进化免疫球蛋白结合分子的制备方法，其特征在于，该方法包含：(1) 在适合表达进化免疫球蛋白结合分子条件下，培养权利要求 8—11 中任一权利要求所述的宿主细胞；(b) 从培养物中分离出具有免疫球蛋白结合活性的多肽。
13. 权利要求 1 或 2 所述的进化免疫球蛋白结合分子用于体外结合免疫球蛋白。
14. 如权利要求 13 所述的进化免疫球蛋白结合分子用途，其特征在于，进化免疫球蛋白结合分子与体外结合免疫球蛋白结合的方式为双位点结合模式。
15. 如权利要求 14 所述的进化免疫球蛋白结合分子用途，其特征在于，所述的双位点结合模式为进化免疫球蛋白结合分子与免疫球蛋白 κ 轻链和 VH3 重链这两个位点的结合模式。
16. 如权利要求 13—15 任一权利要求所述的应用，其中所述的免疫球蛋白选自 IgG、IgM、IgA、IgG Fab 或 IgG Fc 中的一种或几种。
17. 如权利要求 16 所述的应用，其中所述的 IgG、IgM、IgA、IgG Fab 或 IgG Fc 来源于人。
18. 如权利要求 13—15 任一权利要求所述的应用，其中所述的免疫球蛋白为 scFv。

-
19. 如权利要求 13—15 或权利要求 17 中任一权利要求所述的应用，其特征在于，将进化免疫球蛋白结合分子用于抗体的体外免疫学检测。
 20. 如权利要求 16 所述的应用，其特征在于，将进化免疫球蛋白结合分子用于抗体的体外免疫学检测。
 21. 如权利要求 18 所述的应用，其特征在于，将进化免疫球蛋白结合分子用于抗体的体外免疫学检测。
 22. 如权利要求 19 所述的应用，其特征在于所述的免疫学检测为酶联免疫吸附或免疫层析或免疫组化。
 23. 如权利要求 20 或 21 所述的应用，其特征在于所述的免疫学检测为酶联免疫吸附或免疫层析或免疫组化。
 24. 如权利要求 13—15 或权利要求 17 中任一权利要求所述的应用，其特征在于将进化免疫球蛋白结合分子用于纯化抗体。
 25. 如权利要求 16 所述的应用，其特征在于将进化免疫球蛋白结合分子用于纯化抗体。
 26. 如权利要求 18 所述的应用，其特征在于将进化免疫球蛋白结合分子用于纯化抗体。
 27. 如权利要求 24 所述的应用，其中所述的抗体为基因工程抗体或天然抗体或单克隆抗体。
 28. 如权利要求 25 或 26 所述的应用，其中所述的抗体为基因工程抗体或天然抗体或单克隆抗体。

一种进化免疫球蛋白结合分子、其制备方法及应用

技术领域

本发明涉及重组的免疫球蛋白结合分子，尤其涉及将金黄色葡萄球菌蛋白和大消化链球菌表面蛋白的 Ig 结合结构域重排获得的免疫球蛋白结合分子，其制备方法及应用。

背景技术

免疫球蛋白结合分子 (Ig binding proteins, IBP) 是一类表达于细菌表面的能与宿主 Ig 特定部位结合的蛋白，调节宿主对细菌的免疫反应，是细菌重要致病因子之一。研究最多的 IBP 主要有三种：金黄色葡萄球菌蛋白 A (SpA)、人链球菌 (C 和 G 群) 蛋白 G (SpG) 和部分大消化链球菌表面的蛋白 L (PpL)。

SpA 分子量约 57KDa，由 524 个左右氨基酸构成，其胞外部分含有 5 个长 58—61 个氨基酸残基且序列高度同源的 Ig 结合结构域 (分别命名为 E、D、A、B 和 C)，单个 Ig 结合结构域由三股返折的 α 螺旋组成，每个单结构域具有独立的 Ig 结合活性。SpG 分子中包含两至三个序列高度同源的 Ig 结合结构域 (C1、C2、C3)，其单结构域由两对反向平行的 β 片层和中间的一个 α 螺旋组成。PpL 分子中包含由 4—5 个 (依不同菌株而异) 由 72-76 个氨基酸残基组成序列高度同源的 Ig 结合结构域 (B1-B5)，虽然氨基酸序列与 SpG 相差甚远，但其单结构域构象却相似。晶体结构分析含 PpL 的 B1—B4 四个 Ig 结合结构域的肽链具有同时结合同一 Ig 分子的两条 kappa 轻链的特性。SpA 和 SpG 主要与 IgG 的 Fc 段具有较强的亲和力，同时 SpA 还能结合属于 VH3 基因家族的 VH 区 (与抗原决定簇不重合，不影响与抗原的结合)，因此，它除了具有与 IgG (IgG3 除外) 较强的亲和力外，还能结合其它类的 Ig。SpG 还可以结合 IgG 的 CH1 区 (CH1 γ)，它仅结合 IgG，并具有更高的亲和力。而 PpL 通过与 Ig 的轻链，主要是 κ 轻链的 1、3、4 亚型相互作用而结合免疫球蛋白，结合位点位于抗原决定簇以外的轻链可变区，其结合能力与重链亚类无关 SpA 和 SpG 与 IgG—Fc 段的强亲和力的特性使其广泛应用于检测和纯化 IgG。此外，SpA 还被用作某些自身免疫性疾病的辅助治疗，其机制是清除循环免疫复合物和免疫调节。这三种主要的天然 Ig 结合分子各自在 Ig 结合谱上都是有限的。SpA 不结合人 IgG3，由于 VH3 基因家族在不同类 Ig 的分布不同，SpA 只结合约 15%、13% 和 40% 的人 IgGFab、IgA 和 IgM。另外，在不同种系的哺乳动物之间的结合特性差别也很大：对大鼠的 Ig 结合弱，对小鼠的 IgG 在不同亚类间差别很大，而对兔的 Ig 结合性强。与 SpA 相似，由于 PpL 只结合 κ 轻链的 1、3、4 亚型，因此只结合 60% 的人 Ig，对来源于兔、牛的 Ig 结合很弱，而对鼠的 Ig 具有较强结合性。

SpA、SpG 和 PpL 已被广泛用于免疫化学反应的定量和定性分析。当偶连到一个放射性的、酶性质的或荧光标签时, SpA 是一个很好的、检测和定量与该蛋白质高亲和力结合的抗体的试剂, 酶标 SpA 已广泛地应用到 ELISA 法的抗体检测中, 尤其是许多传染病的特异抗体检测中。SpA 与金颗粒的微粒结合可用于免疫电镜中 IgG 的定位, 使许多特殊结构及病原体的电镜检测成为可能, 此外 SpA 胶体金颗粒也已广泛应用于免疫层析法进行免疫学的抗体检测。固定在固相介质上的 SpA 可用于多种动物天然抗体和小鼠单克隆抗体的大规模纯化, 此外, 固相化的 SpA 还广泛用于收集免疫复合物、抗原或完整的细胞。尽管已经发展了许多用于纯化 IgG 分子的技术, 但优选的方法还是用 SpA 包裹的球珠来吸附和洗脱。利用纯化的 SpA 和包含 SpA 的 IgG 结合结构域的工程融合蛋白采用类 ELISA 三明治技术, 可以纯化和检测 DNA 片段。与 SpA 一样, SPG 在抗体的纯化, 免疫测定及一些治疗中都有广泛的用途。但其在收集免疫复合物和纯化 IgG 试剂中有一个潜在的劣势是它能强烈地结合牛血清白蛋白。然而, SPG 的 IgG 结合位点和牛血清白蛋白结合位点在结构上是截然不同的。而且工程版的、缺少了牛血清白蛋白结合位点的 SPG 通过商业途径也可以得到。另外, SPG 的血清白蛋白结构域一直用作融合蛋白质中的纯化标签。PpL 是一个很有用的工具, 与 SpA 和 SpG 相比, 其在从添加胎盘牛血清或牛血清白蛋白的介质中纯化单克隆抗体和从转基因动物中纯化人源化抗体等方面更具优势。

由于三种 Ig 结合分子的抗体结合位点不同, protein A 和 protein G 主要与 IgG 的 Fc 段恒定区结合而 protein L 与 Ig 的 κ 轻链可变区结合, 因此能否集合并优化两种蛋白的 Ig 结合功能, 构建出新型 Ig 结合分子用于 Ig 检测, 提高免疫诊断的敏感性和特异性, 是国外学者关注的焦点。1992 年, 瑞典学者构建出 protein L 和 protein G 的融合蛋白 Protein LG(以下简称 pLG), 发现 Protein LG 有广泛的抗体结合活性能结合大多数 Ig 的 Fc、Fab 段和 Ig 轻链。与单一的 protein L 或 G 相比, 其抗体结合特性更完全, 除人类 Ig 外, 还可用于鼠源性抗体的检测。1998 年, 瑞典学者将 protein L 的四个结合 Ig κ 轻链的结构域与 protein A 四个结合 IgG 的结构域融合, 构建出一种新型杂合蛋白 Protein LA(以下简称 pLA), 结合谱广, 不仅能结合人及一些哺乳动物的不同类型 Ig 和 IgG 所有亚类, 还能结合基因工程单链抗体 Fv (ScFv) 片段而不影响抗体的抗原结合能力, 且与抗体的亲和力得以提高, 除用于免疫检测外, 通过亲和色谱法还可纯化各类 Ig 及 Fv (ScFv) 片段, 证明 Protein LA 是一种多功能的抗体结合分子。1999 年, protein A 抗体结合区和 protein L(1-3)抗体结合区的融合蛋白 Protein LA 被 CLONTECH 公司开发为检测和纯化抗体的商品化试剂, 兼有 protein A 和 protein L 的双

重功能，Protein LA 可结合各种类型的抗体，解决了传统方法 IgM 检测困难的弊端。Protein LA 有可溶的、HRP-酶标，或结合琼脂糖形式的制剂，不仅能提高免疫检测的敏感性，还能一步法进行抗体纯化，简便易行。国内尚未有类似产品出现。

pLA 和 pLG 简单拼接虽然保留了来源分子各自的功能，但这种结构可能没有达到同时发挥双位点结合的精确构象要求。我们选择 IBP 分子发挥作用的基本单位即 Ig 结合单结构域作为研究的基本对象，对单结构域 DNA 随机的重组拼接，并用噬菌体展示为主的分子进化手段筛选，以期得到具有新的结合功能的重组分子。具体为：克隆 SpA 和 PpL 的单个 Ig 结合结构域，将单结构域 DNA 片段在体外随机拼接，再应用噬菌体展示技术将这些重组分子表达于噬菌体表面，构建了 SpA 和 PpL 的单结构域随机组合噬菌体展示文库，以人 Ig 为诱饵对文库进行亲和筛选，结果得到了一种由 PpL 的 B3 结构域与 SpA 的 D、A、B、C（主要为 D）结构域间隔排列组成的新型 Ig 结合分子形式（MDPL-MDPA）_n（MDPL,mono-domain of protein L; MDPA,mono-domain of protein A），该分子形式在天然 IBP 中不存在，在重组的 IBP 分子中也未见报道，因此是一种新的 IBP 分子结构形式，由于是通过分子进化手段获得，我们把这类分子统称为进化免疫球蛋白结合分子（evolved Ig-binding molecules），进化免疫球蛋白结合分子 LD5（L-D-L-D-L；L 为 PpL 的 B3 结构域，D 为 SpA 的 D 结构域）是其中最具代表性的优势克隆，该内容在《噬菌体展示 SpA 及 PpL Ig 结合单结构域随机组合文库及亲和筛选》，生物物理与生物化学进展，2005 年第 32 卷第 6 期第 535~543 页中具有详细描述，但该篇文章对 LD5 各种功能特性没有进一步的阐述。

本发明从多种（MDPL-MDPA）_n 序列中选取代表序列 LD5 克隆入原核表达载体 pET32a（+）构建原核表达系统，生产和纯化新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5，对该蛋白与各免疫球蛋白的结合特性进行了详细的测定，建立了应用该分子制备的亲和层析柱进行基因工程抗体的大规模纯化、天然抗体及单克隆抗体的纯化的方法，建立了应用该分子标记酶进行酶联免疫吸附试验等免疫学方法检测抗体的诊断方法，建立了应用该分子制备胶体金标记酶进行免疫层析法检测抗体的诊断方法。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种新型进化免疫球蛋白结合分子及其编码基因。

本发明的另一个目的是提供上述进化免疫球蛋白结合分子的载体、转化体及其基因工程制备方法。

本发明的再一个目的是提供上述进化免疫球蛋白结合分子的应用。

本发明的第一方面，公开了一种重组的进化免疫球蛋白结合分子，它是具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的蛋白、或其保守性变异蛋白。较佳的，它具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

上述分子是发明人构建了一个噬菌体展示 SpA 及 PpL Ig 结合单结构域随机组合文库后，通过亲和筛选发现的，具体的过程在《噬菌体展示 SpA 及 PpL Ig 结合单结构域随机组合文库及亲和筛选》，生物物理与生物化学进展，2005 年第 32 卷第 6 期第 535~543 页中有详细描述。经过发明人的一系列试验，发现该分子具有突出的免疫球蛋白结合特性：不仅能结合 IgG、IgM、IgA、IgG Fab 或 IgG Fc，还能结合 scFv。此外，实施例也证实了它与人免疫球蛋白 IgG 全分子有很高的结合活性；与人免疫球蛋白 IgG Fab 片段比 SpA 和 PpL 有增强的结合活性；与人免疫球蛋白 IgM 比 SpA 和 PpL 有增强的结合活性；与人免疫球蛋白 IgA 比 SpA 和 PpL 有增强的结合活性。并且，它与各免疫球蛋白是以 Ig κ 轻链和 VH3 重链的双位点结合模式结合的。

本发明的第二方面，公开了一种分离的多核苷酸，它编码上述进化免疫球蛋白结合分子。较佳的，它具有 SEQ ID:NO 2 所示的核苷酸序列。

本发明的第三方面，公开了一种表达载体，它含有上述多核苷酸以及与该多核苷酸序列操作性相连的表达调控序列。较佳的，上述载体为原核载体，其中优选 PET-32a(+)

本发明的第四方面，公开了一种宿主细胞，它被上述表达载体所转化。较佳的，上述宿主细胞为原核细胞，其中优选大肠杆菌，更佳的，为大肠杆菌 BL21-TRXB。

本发明的第五方面，公开了上述进化免疫球蛋白结合分子的制备方法，该方法包含：(1) 在适合表达进化免疫球蛋白结合分子条件下，培养上述宿主细胞；(b) 从培养物中分离出具有免疫球蛋白结合活性的多肽。实施例中，发明人将新型进化免疫球蛋白结合分子克隆入原核表达载体 pET32a (+) 中，构建其大肠杆菌表达菌种，对该菌种进行大规模培养，诱导生产进化免疫球蛋白结合分子，用 Ni 亲和层析柱进行纯化，制备出纯化的新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5。

本发明的第六方面，公开了将上述的进化免疫球蛋白结合分子用于体外结合免疫球蛋白，进化免疫球蛋白结合分子与体外结合免疫球蛋白结合的方式为双位点结合模式，即与免疫球蛋白 κ 轻链和 VH3 重链这两个位点的结合模式。较佳的，上述免疫球蛋白选自 IgG、IgM、IgA、IgG Fab 或 IgG Fc 中的一种或几种，更佳的，上述 IgG、IgM、IgA、IgG Fab 或 IgG Fc 来源于人。同样较佳的，上述免疫球蛋白为 scFv。

优选的，上述应用为将进化免疫球蛋白结合分子用于抗体的体外免疫学检测，其中免疫学检测优选酶联免疫吸附或免疫层析或免疫组化。

同样优选的，上述应用为将进化免疫球蛋白结合分子用于纯化抗体，其中抗体优选基因工程抗体或天然抗体或单克隆抗体。

本发明的优点在于：

本发明公开的进化免疫球蛋白结合分子，可以广谱结合各种免疫球蛋白，与现有技术中的免疫球蛋白结合分子相比，它结合更广谱，不仅可以结合 IgG、IgM、IgA、IgG Fab 或 IgG Fc，还能结合 scFv，此外，与免疫球蛋白的结合力也比现有的免疫球蛋白结合分子高。另一方面，本发明公开了上述进化免疫球蛋白结合分子的基因工程制备方法，使得低成本、大规模生产成为可能。再一方面，本发明公开了将上述进化免疫球蛋白结合分子用于抗体的体外免疫学检测及抗体的纯化，与现有技术相比，使用了本发明的进化免疫球蛋白结合分子可以提高检测的灵敏度及准确性，纯化的效果也更好。

附图说明

图 1 重组表达质粒 pET32a(+)-LD5 的构建流程图

图 2 LD5 cDNA 序列的扩增

m: DL2000 Marker

1-8: pCANTAB5S-LD5 PCR 扩增产物

图 3 LD5 表达序列的 PCR 产物回收

m: DL2000 Marker

1-4: pCANTAB5S-LD5 PCR 回收产物

图 4 pET32a(+)-LD5 的 NcoI+Sal I 双酶切鉴定

M: DL15000Marker

1: LD5/PET32(a) 质粒/ Nco I+Sal I

2:LD5/PET32(a) 质粒

图 5 融合蛋白 LD5 的表达

M:14400—97400 Daltons Marker

1-4: LD5/PET32(a)/ BL21-TRXB 单克隆 1-4#

IPTG 诱导表达

5: 空菌 BL21-TRXB 对照

97400、66200、43000、31000、20100、14400：分别表示 14400—97400 Daltons Marker
电泳显色条带对应的分子量

图 6 融合蛋白 LD5 的纯化

M:14400—97400 Daltons Marker

7: LD5

1—6: 其他 IBP 分子

图 7 LD5 与 PpL 和 SPA 对生物素标记人多克隆 IgG 结合比较

横坐标: $\log(\text{IgG-biotin})$ (nm), 即 IgG-biotin 浓度对数值

纵坐标: OD450nm, 即波长 450nm 的 OD 值

带 “—◆—” 线条: 对应 PpL

带 “—△—” 线条: 对应 LD5

带 “—×—” 线条: 对应 SPA

图 8 LD5 与 PpL 和 SPA 对生物素标记人多克隆 IgM 结合比较

横坐标: $\log(\text{IgM-biotin})$ (nm), 即 IgM-biotin 浓度对数值

纵坐标: OD450nm, 即波长 450nm 的 OD 值

带 “—◆—” 线条: 对应 PpL

带 “—△—” 线条: 对应 LD5

带 “—×—” 线条: 对应 SPA

图 9 LD5 与 PpL 和 SPA 对生物素标记人多克隆 IgA 结合比较

横坐标: $\log(\text{IgA-biotin})$ (nm), 即 IgA-biotin 浓度对数值

纵坐标: OD450nm, 即波长 450nm 的 OD 值

带 “—◆—” 线条: 对应 PpL

带 “—△—” 线条: 对应 LD5

带 “—×—” 线条: 对应 SPA

图 10 LD5 与 PpL 和 SPA 对生物素标记人多克隆 IgG Fab 结合比较

横坐标: $\log(\text{IgFab-biotin})$ (nm), 即 IgFab-biotin 浓度对数值

纵坐标: OD450nm, 即波长 450nm 的 OD 值

带 “—◆—” 线条: 对应 PpL

带 “—△—” 线条: 对应 LD5

带 “—×—” 线条: 对应 SPA

图 11 LD5 与 PpL 和 SPA 对生物素标记人多克隆 IgG Fc 结合比较

横坐标: $\log(\text{IgG Fc-biotin})$ (nm), 即 IgG Fc-biotin 浓度对数值

纵坐标: OD450nm, 即波长 450nm 的 OD 值

带 “—◆—” 线条: 对应 PpL

带 “—△—” 线条: 对应 LD5

带 “—×—” 线条: 对应 SPA

图 12: 生物素标记 LD5 与 scFv KM36、KM38、KM41 的结合

横坐标: $\log(\text{LD5-biotin})$ (nm), 即 IgLD5-biotin 浓度对数值

纵坐标: OD450nm, 即波长 450nm 的 OD 值

带 “—◆—” 线条: 对应含 KM36 的 TG1 菌裂解液上清

带 “—□—” 线条: 对应含 KM38 的 TG1 菌裂解液上清

带 “—△—” 线条: 对应含 KM41 的 TG1 菌裂解液上清

带 “—×—” 线条: 对应空 TG1 菌裂解液上清

图 13 LD5 结合人多克隆 IgG Fab 的竞争抑制

横坐标: concentration of inhibitor (nm), 即抑制因子浓度 (nm)

纵坐标: percent of inhibitin, 即抑制百分数

带 “—□—” 线条: 对应 PpL

带 “—△—” 线条: 对应 LD5

带 “—×—” 线条: 对应 SpA

带 “—○—” 线条: 对应 PpL+SpA

图 14 LD5 结合人多克隆 IgM 的竞争抑制

横坐标: concentration of inhibitor (nm), 即抑制因子浓度 (nm)

纵坐标: percent of inhibitin, 即抑制百分数

带 “—□—” 线条: 对应 PpL

带 “—△—” 线条: 对应 LD5

带 “—×—” 线条: 对应 SpA

带 “—○—” 线条: 对应 PpL+SpA

图 15 LD5 结合人多克隆 IgA 的竞争抑制

横坐标: concentration of inhibitor (nm), 即抑制因子浓度 (nm)

纵坐标: percent of inhibitin, 即抑制百分数

- 带“—□—”线条：对应 PpL
带“—△—”线条：对应 LD5
带“—×—”线条：对应 SpA
带“—○—”线条：对应 PpL+SpA

图 16 纯化基因工程抗体电泳图

图 17 纯化天然抗体电泳图

图 18 纯化单克隆抗体电泳图

图 19 抗-HCV 免疫层析测试条

A: HCV Ab 阴性血样检测结果

B: 空白

C、D: HCV Ab 阳性血样检测结果

1: chicken anti-Protein A

2: Core Ag + NS4 Ag

3: NS5 Ag, NS 即丙肝病毒的非结构蛋白 (non structure protein)

4: NS4 Ag

5: NS3 Ag

6: Core Ag

具体实施方式

在本发明中，术语“其保守性变异蛋白”是指具有免疫球蛋白高亲和活性的进化免疫球蛋白结合分子的变异形式，这些变异形式包括（但并不限于）：若干个（通常为 1—30 个，较佳的 1—10 个，更佳的 1—5 个）氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个（通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内）氨基酸，例如，在本领域中，用性能相近或相似地氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质地功能，如可以用 Val 或 Leu 或 Ile 取代 Ala 等，又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个和数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。此外，这些变异形式还包括成熟蛋白与另一个化合物（比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇）融合所形成的蛋白，附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的蛋白（如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，比如 GST）。此外，变异形式还包括（但并不限于）进化免疫球蛋白结合分子及上述蛋白经过修

饰后的形式：化学衍生形式如乙酰化或羧基化；糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的蛋白，这种修饰可以通过将蛋白暴露于进行糖基化的酶（如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶）而完成；具有磷酸化氨基酸残基（如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸）的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的蛋白。这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟悉技术人员公知的范围。

本发明所述的编码进化免疫球蛋白结合分子的多核苷酸的全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用已公开的质粒作为模板，扩增而得有关序列。应用 PCR 法被优选用于获得本发明的基因。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的多核苷酸片段。

本发明中，编码进化免疫球蛋白结合分子的多核苷酸序列可插入到各种载体中，所述载体包括各种表达载体，包括本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体，优选原核载体，比如 pKK223-3、pBR322、pGEX 载体等等，在本发明中适用的载体优选 PET-32a(+). 总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。

本发明中，术语“表达调控序列”通常指参与控制核苷酸序列表达的序列。表达调控序列包括与目标核苷酸序列操作性相连的启动子和终止信号。它们通常还包括核苷酸序列适当翻译所需的序列。“操作性相连”是指线性 DNA 序列的某些部分能够影响同一线性 DNA 序列其他部分的活性。例如，如果启动子或增强子增加了编码序列的转录，则它与编码序列是操作性相连的。

本发明中转化重组载体的宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO, COs. 293 细胞、或 Bowes 黑素瘤细胞的动物细胞等。本发明优选原核细胞中的大肠杆菌 BL21-TRXB。

用重组载体转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法或热击法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法

进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

本发明所述适合表达进化免疫球蛋白结合分子的条件与表达所用的宿主细胞有关，重组载体转化的宿主细胞获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的进化免疫球蛋白结合分子。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法（如温度转换或化学诱导）诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。上述方法中的重组蛋白可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析（HPLC）和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

一、一种新型进化免疫球蛋白结合分子原核制备

本发明所述的一种新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5 是应用分子进化方法从噬菌体展示细菌 SpA A、B、C、D 单结构域和 PpL 的 B3 结构域随机重组的分子组合文库中筛选获得的新的免疫球蛋白结合分子形式，详细情况在《噬菌体展示 SpA 及 PpL Ig 结合单结构域随机组合文库及亲和筛选》，生物物理与生物化学进展，2005 年第 32 卷第 6 期第 535~543 页中具有详细描述。本发明以含有编码进化免疫球蛋白结合分子 LD5（L-D-L-D-L；L 为 PpL 的 B3 结构域，D 为 SpA 的 D 结构域）cDNA 序列克隆 pCANTAB5S-LD5 为模板，PCR 扩增 LD5 的 DNA 片断，并通过引物合成方法在扩增片断上游引入 NcoI 和 SalI 内切酶识别位点。扩增片断用 PCR 产物回收试剂盒回收后 NcoI 和 SalI 内切酶酶切，酶切片断行琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收，克隆到原核表达载体 PET-32a(+) 的 NcoI 和 SalI 位点中，构建成功原核表达载体 PET32a(+)-LD5，用 PET32a(+) 载体的下游引物 T7ter 测定克隆片段 LD5 的 DNA 序列，序列分析结果证实 PET-32a(+) 在 NcoI 和 SalI 位点间的插入序列与 PALn 随机分子库噬菌体筛选的阳性克隆 LD5 序列完全相符，读框完全正确，起始子和终止子已加上，插入上下游序列与 PET32a(+) 载体序列完全一致。取重组质粒 PET32a(+)-LD5 200ng 转化大肠杆菌 BL21-TRXB，获得 LD5 的原核表达菌种。将该菌中培养后 IPTG 诱导表达，设空菌作阴性对照，SDS 电泳显示在分子量约 59000 Daltons 处出现对照菌没有的一条蛋白带，符合 LD5 的分子量。将菌种

活化后大量培养，IPTG 诱导表达，Ni-NTA 柱纯化获得纯化 LD5 融合蛋白，SDS 电泳显示纯化后仅出现一条蛋白带，符合其相应分子量。

二、新型进化免疫球蛋白结合分子与各类抗体及抗体片断的结合

本发明所述的一种新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5 是细菌 PpL 的 B3 结构域与 SpA D 单结构域的间隔重复序列 (L-D-L-D-L; L 为 PpL 的 B3 结构域, D 为 SpA 的 D 结构域), 其中的 PpL B3 结构域具有与免疫球蛋白 κ 轻链的结合功能, SpA D 结构域具有与免疫球蛋白 VH3 重链的结合功能和与免疫球蛋白 IgG Fc 段结合的功能。因此, 理论上 LD5 能结合各类免疫球蛋白 (IgG、IgM、IgA、IgD、IgE) Fab 和免疫球蛋白 IgG Fc。本发明应用上述所表达纯化的 LD5 融合蛋白进行包被, 分别对免疫球蛋白 IgG、免疫球蛋白 IgG Fab、免疫球蛋白 IgG Fc、免疫球蛋白 IgM 和免疫球蛋白 IgA 进行生物素标记, 用 ELISA 方法分别检测 LD5 与免疫球蛋白 IgG、免疫球蛋白 IgG Fab、免疫球蛋白 IgG Fc、免疫球蛋白 IgM 和免疫球蛋白 IgA 的结合情况, 并与 PpL 和 SpA 与上述免疫球蛋白分子的结合进行比较。结果证实 LD5 与免疫球蛋白 IgG Fab、免疫球蛋白 IgM 和免疫球蛋白 IgA 的结合比 PpL 和 SpA 有所增强, 与免疫球蛋白 IgG 和免疫球蛋白 IgG Fc 的结合与 SpA 相当。

三、新型进化免疫球蛋白结合分子 κ 轻链和 VH3 重链的双位点结合模式的证实

本发明所述的一种新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5 是应用分子进化方法从噬菌体展示细菌 SpA A、B、C、D 单结构域和 PpL 的 B3 结构域随机重组的分子组合文库中筛选获得的新的免疫球蛋白结合分子形式, 详细情况在《噬菌体展示 SpA 及 PpL Ig 结合单结构域随机组合文库及亲和筛选》, 生物物理与生物化学进展, 2005 年第 32 卷第 6 期第 535~543 页中具有详细描述。该类免疫球蛋白结合分子形式是文库筛选所获得的优势克隆, 所测定的 36 个克隆中有 33 个含有该类结构, 由于应用人免疫球蛋白结合分子 (包含 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 类型) 作为诱饵对组合文库进行分子进化筛选, 因此, 可以推定该结构与免疫球蛋白 Fab 有着比 PpL B3 与免疫球蛋白 κ 轻链和 SpA 与免疫球蛋白 VH3 重链的单独结合功能更强的结合活性, 上述的结合试验结果也证明的这一点。能具备这种增强结合活性的最可能的结合形式即是与免疫球蛋白结合分子 κ 轻链和 VH3 重链的双位点结合模式。要证实上述与免疫球蛋白结合分子 κ 轻链和 VH3 重链的双位点结合的试验为结合竞争试验。

本发明中我们应用了竞争抑制 ELISA 实验来证实 LD5 与免疫球蛋白结合分子 κ 轻链和 VH3 重链的双位点的结合。具体对 LD5 标记生物素, 分别应用免疫球蛋白 IgG Fab、免疫球蛋白 IgM 和免疫球蛋白 IgA 包被酶标板, 同时加入固定浓度的生物素标记的 LD5 和倍比稀释的各种竞争蛋白 (LD5、PpL、SpA 和 PpL+SpA), 37°C 45min 后洗板, 加入亲和素-HRP 复合物, 37°C 15min,

洗板后 TMB 显色 5-10min, 2M 硫酸终止, 酶标仪读取 OD450nm。计算各复孔的 OD 均值, Excel 绘制竞争抑制曲线。如果是双位点结合的协同效应, 则联合用 PpL 和 SpA 对 LD5 与 IgG Fab、IgM、IgA (IgG Fab 缺乏 Fc 段, IgM 和 IgA 的 Fc 段不能与 SpA 和 LD5 结合, 这样排除了 Fc 段对竞争抑制试验的干扰作用) 与结合的抑制作用要明显小于 LD5 本身的抑制作用; 如果不是双位点结合的协同效应, 而是分别对可变区 VH3 重链和 κ 轻链的单独结合, 则联合用 PpL 和 SpA 对 LD5 与 IgGFab、IgM、IgA 结合的抑制作用应与 LD5 本身的抑制作用相当。结果可见联合用 PpL 和 SpA 对 LD5 与 IgG Fab、IgM、IgA 与结合的抑制作用要明显小于 LD5 本身的抑制作用, 说明 LD5 与免疫球蛋白结合是与 κ 轻链和 VH3 重链的双位点的结合。

四、应用新型进化免疫球蛋白结合分子大规模纯化基因工程抗体、天然抗体和单克隆抗体

本发明所述的一种新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5 是应用分子进化方法从噬菌体展示细菌 SpA A、B、C、D 单结构域和 PpL 的 B3 结构域随机重组的分子组合文库中筛选获得的新的免疫球蛋白结合分子形式, 结合实验证明了该分子不仅具有 SpA 和 PpL 这两种蛋白的结合特性, 而且产生了其他细菌免疫球蛋白结合分子 (包括 SpA 和 PpL) 所不具有的 κ 轻链和 VH3 重链的双位点结合特性。在实际应用中 SpA、SpG 等一些细菌免疫球蛋白结合分子已被广泛应用于天然抗体、单克隆抗体和基因工程抗体的纯化, 在发明中新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5 也被证明能应用于天然抗体、单克隆抗体和基因工程抗体的纯化。

本发明中我们将 LD5 分子共价偶联于 CNBr-Sepharose 4B 颗粒上制备成亲和纯化柱, 利用该亲和纯化柱对来自血液、小鼠腹水及基因工程抗体的 CHO-K1 工程细胞株培养液中的各种类型的抗体进行纯化。具体是将包含各种抗体的血清稀释后过 LD5 亲和层析柱使抗体结合在柱子上, 再用酸将柱子上的抗体洗脱下来即获得纯化的抗体; 将能产生单克隆抗体的杂交瘤细胞株培养后注射小鼠腹腔, 制备腹水, 是将包含单克隆抗体的腹水稀释后过 LD5 亲和层析柱使抗体结合在柱子上, 再用酸将柱子上的抗体洗脱下来即获得纯化的抗体; 将基因工程抗体的 CHO-K1 工程细胞株体外大规模发酵培养, 制备培养液, 是将包含单克隆抗体的细胞培养液直接过 LD5 亲和层析柱使抗体结合在柱子上, 再用酸将柱子上的抗体洗脱下来即获得纯化的抗体。

五、应用新型进化免疫球蛋白结合分子 ELISA 法检测特异抗体

本发明所述的一种新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5 能与多种人免疫球蛋白分子结合其中包括免疫球蛋白 IgG Fab、免疫球蛋白 IgG Fc、免疫球蛋白 IgM、免疫球蛋白 IgA 等抗体, 因此, 将该分子标记上辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶等酶分子, 可以用作酶复合物 (酶标二抗) 进行 ELISA 法检测特异抗体。

本发明中我们将 LD5 分子标记辣根过氧化物酶 (HRP), 替代商品化的抗-HCV 抗体 ELISA

检测试剂盒中的酶复合酶（HRP 标记的动物抗人免疫球蛋白）进行抗-HCV 抗体检测，并与商品化的抗-HCV 抗体 ELISA 检测试剂盒进行平行对照检测，评价 LD5 分子标记辣根过氧化物酶作为酶复合物的检测效果。

六、应用新型进化免疫球蛋白结合分子免疫层析法检测特异抗体

本发明所述的一种新型进化免疫球蛋白结合分子 LD5 能与多种人免疫球蛋白分子结合，其中包括免疫球蛋白 IgG Fab、免疫球蛋白 IgG Fc、免疫球蛋白 IgM、免疫球蛋白 IgA 等抗体，因此，将该分子与胶体金颗粒充分吸附制备 LD5 胶体金，可以吸附被检测标本中的抗体分子用于免疫层析法检测特异抗体。

本发明中我们将 LD5 胶体金分子充分吸附制备 LD5 胶体金，在硝酸纤维素膜上用 HCV 抗原(1.5mg/L)及人 IgG(1mg/L)划线(1mm 宽)，分别作为检测线和对照线。检测样品（血清）中的抗体首先与 LD5 胶体金上的 LD5 分子结合，并被固定在胶体金颗粒上，该颗粒运动至硝酸纤维素膜上用 HCV 抗原划线处，如检测样品中含有抗-HCV 抗体，则吸附抗体的胶体金颗粒就与 HCV 抗原结合被固定在划线处，形成一紫红色的胶体金线条，检测为阳性，如检测样品中不含抗-HCV 抗体，则胶体金颗粒就不能被 HCV 抗原结合被固定在划线处，不能形成一紫红色的胶体金线条，检测为阴性。应用免疫层析法检测抗-HCV 抗体特异抗体，并与商品化的抗-HCV 抗体 ELISA 检测试剂盒进行平行对照检测，评价 LD5 分子胶体金检测效果。

下面结合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，而非限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法及未说明配方的试剂均为按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆:试验手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件或者制造商建议的条件进行或配置。

实施例 1 一种新型进化免疫球蛋白结合分子原核制备的方法

1. 新型进化免疫球蛋白结合分子 cDNA 序列及克隆

含有编码进化免疫球蛋白结合分子 LD5 (L-D-L-D-L; L 为 PpL 的 B3 结构域, D 为 SpA 的 D 结构域) cDNA 序列克隆的重组噬菌粒载体 pCANTAB5S-LD5, 是通过分子进化方法筛选获得, 制备 pCANTAB5S-LD5 的具体步骤在《噬菌体展示 SpA 及 PpL Ig 结合单结构域随机组合文库及亲和筛选》, 生物物理与生物化学进展, 2005 年第 32 卷第 6 期第 535~543 页中已完全公开, 即文献中表 4 中第 3 轮筛选的 27#/44#和第 4 轮筛选的 4#/33#克隆载体, 其 cDNA 序列如 SEQ ID No. 1 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示。

进化免疫球蛋白结合分子 LD5 cDNA 序列 (SEQ ID NO:2):

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGTTACTATTTAAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAAACACA
AACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCTGACTTATTAGCAAAAAGAAA
ATGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTTAAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGATGCG
CAACAAAATAACTTCAACAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCA
ACGCAATGGTTTCATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAA
ACGAATCTCAAGCACCGAAAGAGCTCAAAGAAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGTTACTATTTAAAGCAAAC
TTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAG
ATATGCTGACTTATTAGCAAAAAGAAAATGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTA
AATTTGCTGGAGAGCTCGCTGATGCGCAACAAAATAACTTCAACAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTG
AACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCAACGCAATGGTTTCATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAA
CGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAAACGAATCTCAAGCACCGAAAGAGCTCAAAGAAAAAACACCAGAAGAACCAA
AAGAAGAAGTTACTATTTAAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTT
GAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCTGACTTATTAGCAAAAAGAAAATGGTAAATATACAGTAGACGTTGC
AGATAAAGGTTATACTTTAAATATTTAAATTTGCTGGA

进化免疫球蛋白结合分子 LD5 氨基酸序列 (SEQ ID NO:1):

KEKTPPEPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAGELADA
QQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKELKEKTPPEPKKEEVTIKAN
LIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQNNFNKDQQSAFYEIL
NMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKELKEKTPPEPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFF
EEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAG

2. 原核表达载体 pET32a(+)-LD5 的构建流程见图 1

2.1 引物合成 用于 PCR 扩增进化免疫球蛋白结合分子 LD5 的 cDNA 序列的引物为：上游 5S_{Neo-u}：5' -TATCCATGGCTGCGGCCAGCCGGCCTCT-3'，下游 5S_{NoG-d}：5' -CCTGCGGCCGCAACTGCCGCC-3'。上游引物中引入了 NcoI 酶切位点（下划线部分），引物 DNA 序列由上海博亚生物技术公司（现为英骏生物技术公司）合成。

2.2 LD5 表达序列的 PCR 扩增 以 pCANTAB5S-LD5 为模板，用合成的上、下游引物进行扩增，PCR 的反应体积为 50 μl，加质粒模板 5ng，上、下游引物各 1 μmol，dNTP 100 μmol，Mg²⁺ 3mmol，Taq 酶 1U，加 ddH₂O 至 50 μl。反应条件：94℃ 30s-60℃ 30s-72℃ 45s；35 个循环，反应结束前 72℃ 延伸 5min，产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测，割胶回收试剂盒回收纯化。PCR 扩增的 LD5 cDNA 片段在 SalI 位点后有 (G4S)₃ 接头（为 pCANTAB5S 载体上固有

的)。由图 2 可见, PCT 产物大小符合 1156bp 左右。胶回收纯化后用 NcoI 和 SalI 双酶切切去(G4S)3 接头, 得到 LD5 表达序列 1103bp, 结果分别见图 3。

2.3 重组表达质粒的构建及 DNA 序列测定 原核表达载体 pET32a(+) 购自 Novagen 公司, pET-32a(+) 用 NcoI 和 SalI 双酶切, 试剂盒回收酶切产物。上述 PCR 纯化产物用 NcoI 和 SalI 双酶切, 试剂盒回收后取 400ng 与 400ng PET-32a(+) 载体 NcoI 和 SalI 酶切产物连接。转化后挑选重组子酶切鉴定, 获重组质粒 pET-32a(+) -LD5。提取 pET32a(+) -LD5 质粒, 用 NcoI 和 SalI 双酶切(见图 4), 符合理论预期并用其下游引物测定插入片段的 DNA 序列。

2.4 LD5 融合蛋白的表达

2.4.1 重组表达载体 pET-32a(+) -LD5 的转化 氯化钙法制备大肠杆菌 BL21 感受态细胞 (E. coli BL21trxB(DE3) 购自 Novagen 公司), 取 pET-32a(+) -LD5 200ng 加入感受态 BL21-TRXB100 μ l, 冰水浴 30min, 42 $^{\circ}$ C 90s, 冰水浴 1-2min 后加 900 μ l 的 SOC 培养基 37 $^{\circ}$ C 150rpm 培养 1h 后涂 LB 平板 (含 Amp100ng/ml 和 Kana35 ng/ml) 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

2.4.2 LD5 的诱导表达和 SDS-PAGE 样品的制备 从 pET-32a(+) -LD5/BL21 转化平板上挑取 4 个单克隆菌落接种至 0.5ml LB (含 Amp100ng/ml) 中摇床培养 3.5h 后, 取出 100 μ l 接至 700 μ l LB (Amp) 离心管中培养 4h 后加 200 μ l 甘油制备甘油菌种; 余菌液加 IPTG 至终浓度 1mM 诱导培养 3.5h 后取 300 μ l 菌液 10000rpm 离心 1 分钟, 弃上清, 加 2 \times SDS 点样液 25 μ l 及 0.01PBS25 μ l, 混匀, 制成 SDS 样品。收集空菌 BL21 培养液同样比例制成 SDS 样品。

2.4.3 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达 制备 12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶, 将上述样品及低分子量标准蛋白沸水浴 5 分钟, 加样, 初始加压 5V/cm, 待溴酚蓝进入分离胶后提高至 12 V/cm, 直至溴酚蓝达分离胶底部。电泳结束, 取出凝胶用考马斯亮蓝染色过夜, 再置于甲醇-冰醋酸溶液中脱色 3-4 小时。结果见图 5, 可见所挑取的四个克隆在 59kd 左右均有目的蛋白带, 空 BL21 均未见该条带。

2.5 融合蛋白 LD5 的大量表达及纯化

2.5.1 表达 将 pET-32a(+) -LD5/BL21 甘油菌种 500 μ l 接至 50ml LB (含 Amp) 培养过夜, 再转至 500ml LB 中 3.5h 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 3.5h 后加 1mol/l 的 IPTG 500 μ l 诱导培养 3.5h, 取出分装 250ml 离心管中 6000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟, 去上清, 加入 20ml 的 0.1mol/l 的 PBS 重悬于 50ml 离心管中, 11000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟, 去上清, 沉淀加入 20ml 的 8mol/l 的尿素重悬, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

2.5.2 纯化 过夜尿素裂解液 11000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟, 取上清过 Ni-NTA 柱 (金属螯合亲

和层析介质(Ni-NTA)购自德国 QIAGEN 公司), Ni-NTA 柱以 8M 尿素 (pH8.0) 平衡, 尿素裂解液上清上柱, 8M 尿素 (pH7.0) 洗柱, 以 8M 尿素 (pH4.5) 洗脱, 收集洗脱峰, 0.1M Tris 中和, 以 PBS 透析, SDS-PAGE 分析纯化效果 (见图 6), 可见在 59kd 有 LD5 的条带, 无明显杂蛋白带。蛋白测序结果也显示含有 SEQ ID NO:1 的序列。

实施例 2 新型进化免疫球蛋白结合分子与各类抗体及抗体片断的结合

1. 与人多克隆 IgG 的结合:

1.1 人多克隆 IgG 购自 Sigma 公司, PpL 和 SpA 购自 Sigma 公司。

1.2 1mg/ml 人多克隆 IgG 以 PBS (pH7.2) 透析。取 50 μ L 3mg/ml 长臂活化生物素(购自 PIERCE 公司)加入 1mL IgG(1mg / mL), 在室温中轻微振荡 4h 后加入透析袋在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜, 透析完后加等量甘油于-20 $^{\circ}$ C 中保存。

1.3 LD5、 PpL 和 SpA 均调整浓度至 1mg/ml 后以碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 1: 200 稀释包被 96 孔板, 每种蛋白均包被 3 排复孔, 4 $^{\circ}$ C 24h 后 PBST 洗 4-5 次, 封闭液(2%BSA 0.05%TWEEN-20) 封闭 37 $^{\circ}$ C 1h 后洗板, 生物素标记的 IgG 以一定浓度开始倍比稀释, 最后一孔不加, 37 $^{\circ}$ C 45min 后洗板, 加入亲和素-HRP 复合物(购自 PIERCE 公司), 37 $^{\circ}$ C 15min, 洗板后 TMB 显色 5-10min, 2M 硫酸终止, 酶标仪读取 OD450nm; 计算均值和标准差, Excel 绘制结合曲线。结果可见 LD5 与人多克隆 IgG 的结合与 SpA 相当, 明显高于 PpL 与人多克隆 IgG 的结合(见图 7)。

2. 与人多克隆 IgM 的结合:

2.1 人多克隆 IgM 购自 Sigma 公司, 生物素标记同 1.2。

2.2 以 LD5 PpL SpA 分别包板, 与生物素标记的 IgM 结合, 方法同 1.3。结果可见 LD5 与人多克隆 IgM 的结合明显高于 SpA 和 PpL (见图 8)。

3. 与人多克隆 IgA 的结合:

3.1 人多克隆 IgA 购自 Sigma 公司, 生物素标记同 1.2。

3.2 ELISA 方法同 1.3。结果可见 LD5 与人多克隆 IgA 的结合明显高于 SpA 和 PpL (见图 9)。

4. 与人多克隆 IgG Fab 的结合:

4.1 对 IgG 进行木瓜蛋白酶切获得 Fab 和 Fc:

4.1.1 半胱氨酸活化木瓜蛋白酶: 多克隆人 IgG IgM IgA 均购自 Sigma 公司。木瓜蛋白酶 (华美生物技术有限公司) 用 PBS 溶解成浓度 1mg/ml, 加 EDTA 和 L-半胱氨酸均至终浓度 0.01M, 37 $^{\circ}$ C 30min 后以 0.1M 醋酸钠透析除去半胱氨酸和 EDTA。

- 4.1.2 人多克隆 IgG 与活化的木瓜蛋白酶按 30:1 的质量比进行酶切, 37°C 5h 后加入碘代乙酰胺至 0.03M 终止反应。
- 4.1.3 产物过 SpA 柱分离 Fab 和 Fc: 以 20mM 磷酸钠缓冲液洗柱, 酶反应液上柱, 收集含 Fab 的流穿峰, 后以 0.1M pH3.0 的醋酸钠洗脱结合的 Fc。
- 4.2 IgGFab IgGFc 的生物素标记同 1.2
- 4.3 以生物素标记的 IgGFab 进行与包被的 LD5、SpA 和 PpL 结合, 方法同 1.3, 结果可见 LD5 与人多克隆 Ig Fab 的结合明显高于 SpA 和 PpL (见图 10)。
5. 与人多克隆 IgG Fc 的结合: 以生物素标记的 IgG Fc 进行与各种 IBP 分子的结合, 方法同 1.3。结果可见 LD5 与人多克隆 IgG Fc 的结合与 SpA 相当, PpL 与人多克隆 IgG Fc 不结合 (见图 11)。

6. 与基因工程 scFv 的结合:

6.1 scFv 在大肠杆菌中的表达和纯化

6.1.1 scFv 的诱导表达

三种 scFv 的表达载体, KM36(VH3-Vλ) KM38(VH3-Vκ) KM41(VH1-Vκ) 为荷兰 Sanquil 实验室 Dr Jan Voorberg 提供, 其详细制备方法由文献 Edward N. van den Brink, Ellen A. M. Turenhout, Niels Bovenschen, Bram G. A. D. H. Heijnen, Koen Mertens, Marjolein Peters, and Jan Voorberg. Multiple VH genes are used to assemble human antibodies directed toward the A3-C1 domains of factor VIII. BLOOD, 2001; 97(4): 966-972 完全公开。scFv 其 N 端带有 6 个组氨酸标签。转化 E Coli TG1, 挑取单克隆转接于 20ml 2×YTG (Amp100mg/ml), 37°C 250rpm 过夜后扩增至 500ml 2×YT (Amp100mg/ml 0.1%Glu), 37°C 250rpm 至 OD600=0.5 时加入 IPTG 至 0.1mM, 30°C 220rpm 3h 后离心取沉淀菌。

6.1.2 诱导菌的裂解和 scFv 的纯化

沉淀菌加入冰预冷的 50mM Tris-HCl (20%蔗糖 1mMEDTA 1mMPMSF) 悬浮, 20min 后, 12000rpm 离心 10min 取上清, 沉淀再以冰预冷的 5mM MgSO4 (1mMPMSF) 20min 后离心 12000rpm 10min 取上清。对获得的菌体裂解上清以 20mM 咪唑 (500mMNaCl 50mM 磷酸钠 pH7.5), 4°C 透析过夜; Ni-NTA 柱以透析液平衡, 样品上柱, 以 20mM 咪唑洗柱后以 100mM 咪唑洗脱, 收集洗脱液即为纯化的 scFv。

6.2 三种 scFv 与生物素标记 LD5 结合的 ELISA

将三种纯化的单克隆 scFv KM36、KM38 和 KM41 包板, 同时用不含 scFv 表达载体的 TG1 菌裂解上清包板。用生物素标记的 LD5 对固相化 Ig 行结合实验。KM36 KM38 KM41 的

TG1 和空 TG1 菌裂解上清以碳酸盐缓冲液 1:200 稀释包被 96 孔板, 每种 scFv 均包被 3 排复孔, 4°C 24h 后 PBST 洗 3-4 次, 封闭液 (2%BSA 0.05%TWEEN-20) 封闭 37°C 1h 后洗板, 2mg/ml 的生物素标记 LD5 以 1:200 开始倍比稀释, 最后一孔不加, 余步骤同 1.3。结果可见 LD5 与 KM38 (VH3-V κ) 的结合远大于与 KM41 (VH1-V κ) 和 KM36 (VH3-V λ) 的结合(图 12)。

实施例 3 新型进化免疫球蛋白结合分子 κ 轻链和 VH3 重链的双位点结合模式的证实

SpA 与 IgG 的 Fc 段具有较强的亲和力, 同时 SpA 还能结合属于 VH3 基因家族的 VH 区(Sasso EH, Silverman GJ, Mannik M. Human IgA and IgG F(ab')₂ that bind to staphylococcal SpA belong to the VHIII subgroup. J Immunol. 1991;147:1877-1883)。PpL 通过与 Ig 的轻链, 主要是 κ 轻链的 1、3、4 亚型相互作用而结合免疫球蛋白(Nilson BH, Solomon A, Bjorck L, et al. PpL from peptostreptococcus magnus binds to the kappa light chain variable domain; J Biol Chem. 1992;267(4):2234-9)。从 LD5 与各类 Ig 分子的结合实验看, LD5 具有对 IgGFab IgM IgA 较 SpA 和 PpL 更高的亲和力, 推测 LD5 具有对 VH3 重链和 κ 轻链可变区的双位点结合特性。竞争抑制试验能验证是否 LD5 具有对 VH3 重链和 κ 轻链可变区的双位点结合特性, 如果是双位点结合的协同效应, 则联合用 PpL 和 SpA 对 LD5 与 IgG Fab、IgM、IgA (IgG Fab 缺乏 Fc 段, IgM 和 IgA 的 Fc 段不能与 SpA 和 LD5 结合, 这样排除了 Fc 段对竞争抑制试验的干扰作用) 结合的抑制作用要明显小于 LD5 本身的抑制作用; 如果不是双位点结合的协同效应, 而是分别对可变区 VH3 重链和 κ 轻链的单独结合, 则联合用 PpL 和 SpA 对 LD5 与 IgGFab、IgM、IgA 结合的抑制作用应与 LD5 本身的抑制作用相当。

1. LD5 结合 IgG Fab 的竞争抑制 ELISA 实验

2mg/ml IgG Fab 以碳酸盐缓冲液(pH 9.6)1:200 稀释包被 96 孔板, 用于四类竞争蛋白 (LD5 自身、PpL+SpA、PpL、SpA) 的复孔各包被三排, 另包一排用于不加竞争蛋白组, 4°C 24h 后 PBST 洗 2-3 次, 封闭 (2%BSA 0.05%TWEEN-20) 37°C 1h 后洗板, 同时加入固定浓度的生物素标记的 LD5 和倍比稀释的各种竞争蛋白 (初始浓度为生物素标记 LD5 的 10 倍), 另一排只加入相同固定浓度的生物素标 LD5, 37°C 45min 后洗板, 加入亲和素-HRP 复合物, 37°C 15min, 洗板后 TMB 显色 5-10min, 2M 硫酸终止, 酶标仪读取 OD_{450nm}。计算各复孔的 OD 均值, Excel 绘制竞争抑制曲线, 抑制百分数 = $(OD - OD_x) \times 100 / OD$ (单位%, OD 代表不加抑制蛋白组的吸光度均值, OD_x 表示在各种抑制浓度下的三个复孔的 OD 均值)。结果可见 PpL+SpA、PpL、SpA 对生物素标记的 LD5 IgG Fab 结合的抑制作用远小于 LD5 本身 (图 13), 说明 LD5 与 IgG Fab 中的 κ 轻链和 VH3 重链的结合是同时双位点结合, 而不

是分别与各个位点单独结合。

2. LD5 结合 IgM 的竞争抑制 ELISA 实验

以 IgM 包板，方法同 1。结果可见 PpL+SpA、PpL、SpA 对生物素标记的 LD5 IgG Fab 结合的抑制作用远小于 LD5 本身（图 14），说明 LD5 与 IgM 中的 κ 轻链和 VH3 重链的结合是同时双位点结合，而不是分别与各个位点单独结合。

3. LD5 结合 IgA 的竞争抑制 ELISA 实验

以 IgA 包板，方法同 1。结果可见 PpL+SpA、PpL、SpA 对生物素标记的 LD5 IgG Fab 结合的抑制作用远小于 LD5 本身（图 15），说明 LD5 与 IgA 中的 κ 轻链和 VH3 重链的结合是同时双位点结合，而不是分别与各个位点单独结合。

实施例 4 应用新型进化免疫球蛋白结合分子 大规模纯化基因工程抗体、天然抗体和单克隆抗体

1. 琼脂糖活化

- (1) 称 4g CNBr-Sepharose 4B（购自 Pharmacia 公司），用 4 mM HCl, pH2.5 溶液浸泡 15 min，再用该溶液反复洗涤 5 次。
- (2) 将活化的琼脂糖迅速倒入布氏漏斗中，以冰水抽洗成中性，再迅速以 250ml 冷的 0.1Mol/L pH 9.0 NaHCO₃ 抽洗。

2. 偶联蛋白

- (1) 事先将 LD5 蛋白 120mg 置于 0.1Mol/L pH 9.0 NaHCO₃ 液中透析数小时（一般偶联量为 10~30mg/g 载体）。
- (2) 将活化的琼脂糖迅速倒入蛋白液中（在 1.5min 内，从抽洗到偶联），4℃缓慢搅拌过夜，使蛋白与活化的琼脂结合。

3. 装柱

将已与蛋白偶联的琼脂糖装入层析柱内，拧紧下口夹，让其下沉，数分钟后松开下口夹，使溶液约以 1ml/min 的速度流出。以 0.2Mol/L pH 9.0 NaHCO₃（含 0.1Mol/L NaCl）洗涤至洗出液的 OD₂₈₀<0.02 为止。用 0.01Mol/L pH 7.4PB 液或生理盐水洗涤，平衡后，加入 0.02%Na₃N₃ 于 4℃保存备用

4. 大规模纯化基因工程抗体

- (1) 使用复旦张江生物医药有限公司重组的表达抗 Her2 的基因工程抗体的 CHO-K1 工程细胞株生产基因工程抗体。在工程细胞株的构建中，将目的基因和谷氨酰胺合成酶基因(GS)

- 基因共转染空宿主细胞，利用 GS 基因扩增系统，使用（硫氨甲硫氨酸（MSX））作为筛选药物筛选高表达细胞株。最后进行高表达细胞株的单克隆化、适应无血清悬浮培养，扩增、建库和用于 GMP 生产。生物反应器采用 New Brunswick Scientific Co., CELLIGEN PLUS 型。工作体积为 1.4L；发酵温度为 37℃；搅拌转速为 150rpm；通过添加 CO₂ 和 8%NaHCO₃ 控制 pH 在 7.20；通过环形供气装置（ring sparger）进行气体供应，控制通气流量在 0.1-0.2vvm；通过空气、氧气、氮气控制溶氧在 50%空气饱和度。工程细胞株经悬浮扩增培养后接种至 2.2L 生物反应器，经连续灌注培养 25 天，收获培养上清进行纯化和评价。
- (2) 基因工程抗体细胞培养液按 100 倍床体积直接缓慢加入纯化柱，用 0.01Mol/L pH7.4PBS 液洗脱，流速为 1ml/min，至洗出液 OD₂₈₀<0.02 为止。
- (3) 加 0.1Mol/L pH3.0 甘氨酸-HCl 缓冲液，流速 1ml/min，收集解吸附下来的成分，立即以 1Mol/L NaHCO₃ 中和，以免蛋白变性。
- (4) 以两倍体积的 7Mol/L 尿素洗涤，再用 0.01Mol/L pH 7.4PB 液或生理盐水洗涤，平衡后，可继续使用。保存可加入 0.02%Na₂S₂O₃ 于 4℃ 保存。防止冷冻和干裂。纯化的蛋白对 PBS 透析，-40℃ 保存。纯化蛋白行 SDS PAGE 凝胶电泳分析，可见纯度达 90% 以上（图 16）。

5. 大规模纯化天然抗体

- (1) 人血清按床体积 1/10 加样，血清用 PBS 稀释至浓度为 20%，缓慢加入纯化柱，用 0.01Mol/L pH7.4PBS 液洗脱，流速为 1ml/min，至洗出液 OD₂₈₀<0.02 为止。
- (2) 加 0.1Mol/L pH3.0 甘氨酸-HCl 缓冲液，流速 1ml/min，收集解吸附下来的成分，立即以 1Mol/L NaHCO₃ 中和，以免蛋白变性。
- (3) 以两倍体积的 7Mol/L 尿素洗涤，再用 0.01Mol/L pH 7.4PB 液或生理盐水洗涤，平衡后，可继续使用。保存可加入 0.02%Na₂S₂O₃ 于 4℃ 保存。防止冷冻和干裂。纯化的蛋白对 PBS 透析，-40℃ 保存。纯化蛋白行 SDS PAGE 凝胶电泳分析，可见纯度达 90% 以上（图 17）。

6. 大规模纯化单克隆抗体

- (1) 将抗重组人干扰素- γ 单克隆抗体杂交瘤细胞株复苏，该细胞株来源的详细资料见《重组人 γ 干扰素单克隆抗体杂交瘤细胞建株研究》，上海免疫学杂志，1986 年第 6 卷第 6 期第 35~43，RPMI-1640 培养液（购自 GIBCO 公司）培养。于小鼠腹腔注射 0.5ml 降植烷（购自 SIAMA 公司），注射后第 3 周内接种杂交瘤细胞，每只腹腔注射 1ml（含 1.0×10^7 个细胞/ml），种后 10 天左右时间肿瘤体积最大，此时可由腹腔抽取腹水，每隔 1~3

天取1次,可取10次,所取腹水-40℃保存备用。

- (2) 单克隆抗体腹水按床体积 1/10 加样,小鼠腹水用冷 PBS 液稀释 4 倍后,于 1.00×10^5 转离心 30min,去沉淀,将上清缓慢加入纯化柱,用 0.01mol/L pH7.4PBS 液洗脱,流速为 1ml/min,至洗出液 OD280<0.02 为止。加 0.1mol/L pH3.0 甘氨酸-HCl 缓冲液,流速 1ml/min,收集解吸附下来的成分,立即以 1mol/L NaHCO₃ 中和,以免蛋白变性。
- (3) 以两倍体积的 7mol/L 尿素洗涤,再用 0.01mol/L pH 7.4PB 液或生理盐水洗涤,平衡后,可继续使用。保存可加入 0.02%Na N₃ 于 4℃保存。防止冷冻和干裂。纯化的蛋白对 PBS 透析,-40℃保存。纯化蛋白行 SDS PAGE 凝胶电泳分析,可见纯度达 90%以上(图 18)。

实施例 5 应用新型进化免疫球蛋白结合分子 ELISA 法检测特异抗体

1、LD5 分子标记辣根过氧化物酶(HRP)

取 10mg HRP(购自 SIAMA 公司)加 1ml 0.1 mol/L 醋酸钠或水溶解,充分混匀,约 5 分钟后加 0.08 mol/L NaIO₄,水溶液 1.0ml 混合后,置冰箱内 20 分钟,加 0.4 mol/L 乙二醇溶液 0.5ml 终止氧化反应,30 分钟后加 21% NaCl 溶液 0.3ml,再加 1.2ml 冰冷的无水乙醇(AR)沉淀醛化酶,离心去上清,沉淀酶再用 6ml 80%冰冷的乙醇溶液浸泡洗涤一次后,离心倾去乙醇(尽量去除乙醇),沉淀用 pH9.6 的 0.05 mol/L 碳酸钠缓冲液 2ml 溶解,然后加入 2ml LD5(内含蛋白量 20mg 左右),搅拌均匀,置冰箱内过夜,次日取出加 10mg NaBH₄ 混匀,3 小时后加等量饱和硫酸铵沉淀酶结合物,离心,去上清,沉淀用 50%饱和硫酸铵洗涤一次,离心,再去上清,沉淀用 0.01 mol/L PBS 3ml 溶解,置透析袋中用冰冷的生理盐水透析除盐(需换液 5 次),如有沉淀藉离心除去,上清呈淡棕色即为酶结合物。加 60%甘油 PBS,分装保存备用。

2、用 HRP 标记的 LD5 分子 ELISA 检测抗-HCV 抗体

购买商用抗-HCV ELISA 抗体检测试剂盒(上海科华生物技术有限公司),按照试剂盒的说明书对 383 份血液透析患者的血清进行抗-HCV 抗体的 ELISA 检测,所不同的是将试剂盒中的酶标稀释液重新配置,将原来的酶复合物改换成 HRP 标记的 LD5 分子。具体为:加 100 μL 稀释液于包被抗原的检测板孔内,再加 10 μL 的检测血清,盖好板盖,置 37℃ 水浴中,保温 45min。甩掉板孔内的血清,用洗液洗五次,甩净孔内残液,再在滤纸上拍打吸干。将 HRP 标记的 LD5 分子(1mg/ml)按 1:500 加入酶标记抗体稀释液(0.02mol/L pH7.2 PBS-0.05%吐温-20-0.1% 白明胶-10%健康牛血清)中,混匀后,每空加入 100 μL,置 37

℃水浴中，保温 45min。甩掉板孔内的酶复合物液，用洗液洗五次，甩净孔内残液，再在滤纸上拍打吸干。用 100 μL 微量吸液器，每孔加新配制的 TMB A 液和 B 液各 100 μL，在室温下避光反应大约 5~10min，用 2mol/L 硫酸终止反应。用酶标测试仪，在波长 450nm 下，测定各孔 OD 值。所有标本用抗-HCV ELISA 抗体检测试剂盒（上海科华生物技术有限公司）按照试剂盒的说明书进行测定，与酶复合物改换成 HRP 标记的 LD5 分子的测定结果进行比较。结果见表 1，经计算，应用 HRP 标记的 LD5 分子 ELISA 检测抗-HCV 抗体的检测结果与商用试剂盒的检测结果相比敏感度达到 99.3%，特异性达 100%，总符合率达到 99.7%，说明 HRP 标记的 LD5 分子完全达到了商用化的检测要求。

表 1 HRP 标记的 LD5 分子 ELISA 检测抗-HCV 抗体与商用试剂盒检测结果的比较

	阳性（科华）	阴性（科华）	
阳性（LD5）	145	0	145
阴性（LD5）	1	237	238
	146	237	383

实施例 6 应用新型进化免疫球蛋白结合分子免疫层析法检测特异抗体

1、柠檬酸三钠还原法制备金溶胶

取 0.01% 氯金酸水溶液 100ml 加热至沸，搅动下准确加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.7ml，金黄色的氯金酸水溶液在 2 分钟内变为紫红色，继续煮沸 15 分钟，冷却后以蒸馏水恢复到原体积。

2、LD5 标记胶体金

- ①用 0.1mol/L K₂CO₃ 或 0.1mol/L HCl 调节金溶胶至所需 pH6.0。
- ②于 100ml 金溶胶中加入 2~3 ml LD5 蛋白（10mg/ml），搅拌 2~3 分钟。
- ③加入 5ml 1% PEG20000 溶液。
- ④于 10000~100000g 离心 30~60 分钟（根据粒径大小选择不同离心条件），小心吸去上清液（切忌倾倒）。
- ⑤将沉淀悬浮于一定体积含 0.2~0.5mg/ml PEG20000 的缓冲液中，离心沉淀后，再用同一缓冲液恢复，浓度以 $A_{1cm/540nm}=1.5$ 左右为宜，以 0.5mg/ml 叠氮钠防腐，置 4℃保存。

3、免疫层析试条的制备

测试条由吸水纤维、硝酸纤维素膜和吸水滤纸三部分组成。吸水纤维部分附着有胶体金免疫复合物；在硝酸纤维素膜上用 HCV 抗原 (1.5mg/L) 及人 IgG (1mg/L) 划线 (1mm 宽)，分别作为检测线和对照线，晾干，用 50g/L BSA 封闭 2h，以 0.01mol/L PBS 洗涤 3 次，干燥后依次粘于白色塑料片 (支持物) 上，切成 0.5cm × 10cm 的试条，加干燥剂密封保存。制备的抗-HCV 免疫层析测试条见图 19。

4、抗 HCV 检测

将 0.1~0.2mL 血清点加在测试条含有金标记物一端的电样孔即可。结果判定：以测试条硝酸纤维素膜上出现两条红色条带为抗 Hp-CagA IgG 阳性；仅出现一条红色条带 (靠近吸水滤纸端，对照线) 为阴性。若无红色条带出现则视为试剂失效。结果确定时间：强阳性标本在 5min 内即可在检测线处见到红色胶体金颗粒聚集；弱阳性标本约需要 10min 确定。用该抗-HCV 免疫层析测试条对 383 份血液透析患者的血清进行抗-HCV 抗体检测，并用商用抗-HCV ELISA 抗体检测试剂 (上海科华生物技术有限公司) 作对照，结果见表 2，经计算，免疫层析测试条检测抗-HCV 抗体的检测结果与商用试剂盒的检测结果相比，敏感度达到 94.5%，特异性达 99.2%，总符合率达到 97.4%，说明 LD5 制备的抗-HCV 免疫层析测试条完全达到了实用化的检测要求。

表 2 LD5 制备的抗-HCV 免疫层析测试条与商用试剂盒检测结果的比较

	阳性 (科华)	阴性 (科华)	
阳性 (LD5 层析条)	138	2	140
阴性 (LD5 层析条)	8	235	243
	146	237	383

序列表

<110> 上海润龙生物科技有限公司

<120> 一种进化免疫球蛋白结合分子、其制备方法及应用

<130> PCNRL060599

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 346

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> misc_feature

<400> 1

```

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
1           5           10           15
Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
           20           25           30
Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu
           35           40           45
Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
           50           55           60
Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Glu Leu Ala Asp Ala Gln Gln Asn
65           70           75           80
Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met
           85           90           95
Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
           100          105          110
Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu
           115          120          125
Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Glu Leu Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu
           130          135          140
Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly
145          150          155          160
Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
           165          170          175

```

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr
 180 185 190
 Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala
 195 200 205
 Gly Glu Leu Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln
 210 215 220
 Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln
 225 230 235 240
 Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr
 245 250 255
 Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
 260 265 270
 Glu Leu Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile
 275 280 285
 Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe
 290 295 300
 Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys
 325 330 335
 Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
 340 345

<210> 2
 <211> 1038
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> misc_feature

<400> 2
 aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat 60
 gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa 120
 gcatacagat atgctgactt attagcaaaa gaaaatggta aatatacagt agacgttgca 180
 gataaagggtt atactttaaa tattaatttt gctggagagc tcgctgatgc gcaacaaaat 240
 aacttcaaca aagatcaaca aagcgccttc tatgaaatit tgaacatgcc taacttaaac 300
 gaagcgcaac gcaatggttt cattcaaagt cttaaagacg atccaagcca aagcactaac 360
 gttttagggtg aagctaaaaa attaaacgaa tctcaagcac cgaaaagagct caaagaaaaa 420
 acaccagaag aaccaaaaga agaagtact attaaagcaa acttaactta tgcagatgga 480
 aaaacacaaa cagcagaatt caaaggaaca tttgaagaag caacagcaga agcatacaga 540
 tatgctgact tattagcaaaa agaaaatggt aaatatacag tagacgttgc agataaagg 600
 tatactttaa atattaatt tgctggagag ctcgctgatg cgcaacaaaa taacttcaac 660

aaagatcaac	aaagcgcctt	ctatgaaatt	ttgaacatgc	ctaacttaa	cgaagegcaa	720
cgcaatggtt	tcattcaaag	tcttaaagac	gatccaagcc	aaagcactaa	cgtttttaggt	780
gaagctaaaa	aattaaacga	atctcaagca	ccgaaagage	tcaaagaaaa	aacaccagaa	840
gaaccaaag	aagaagttac	tattaaagca	aacttaatct	atgcagatgg	aaaaacacaa	900
acagcagaat	tcaaaggaac	atttgaagaa	gcaacagcag	aagcatacag	atatgctgac	960
ttattagcaa	aagaaaatgg	taaatataca	gtagacgttg	cagataaagg	ttatacttta	1020
aatattaaat	ttgctgga					1038

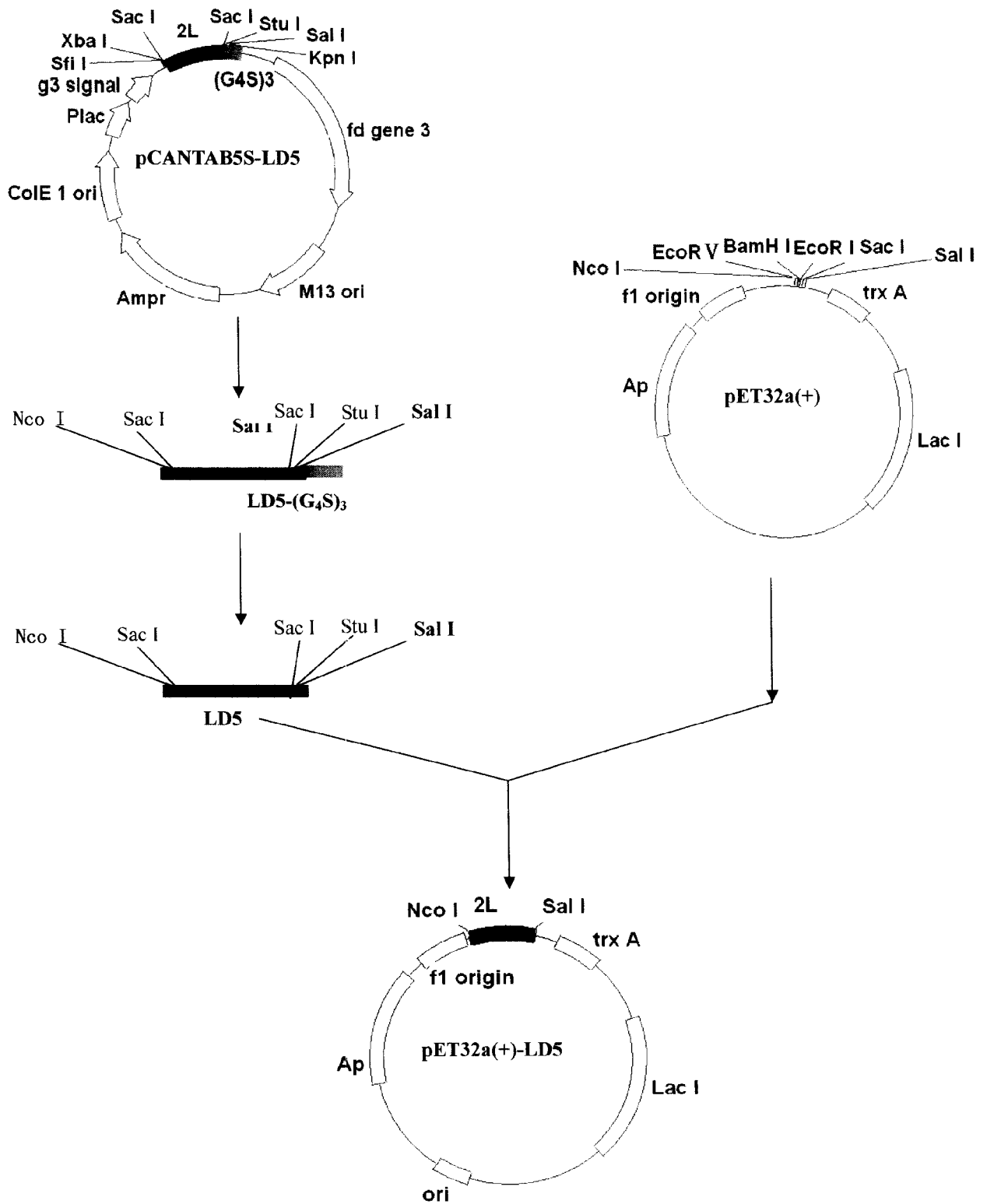


图 1

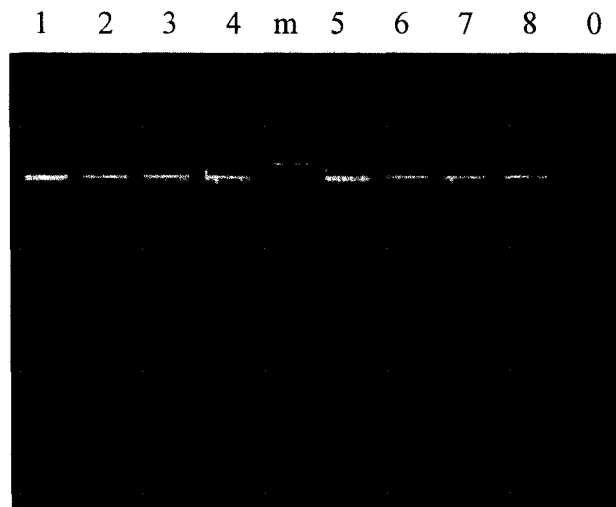


图 2

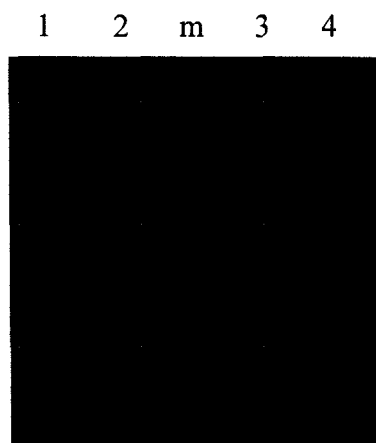


图 3

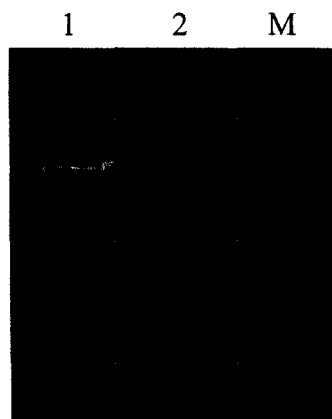


图 4

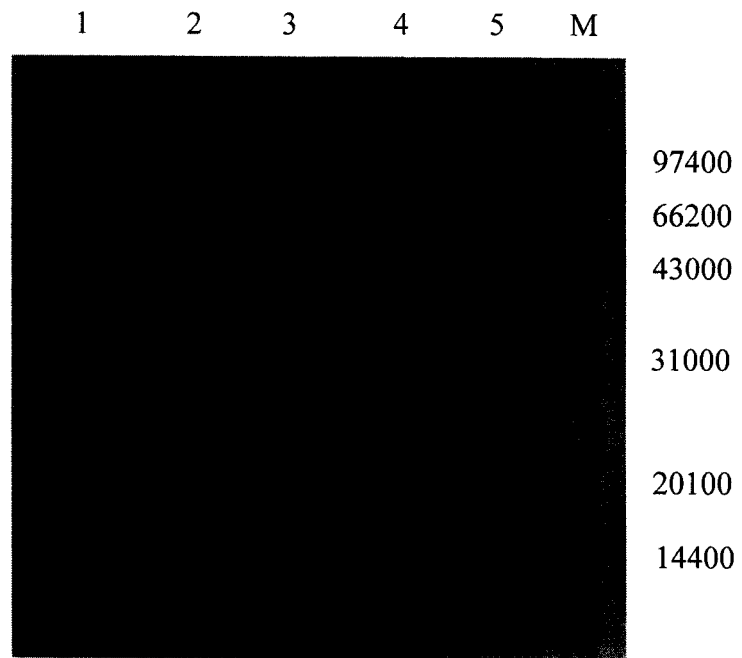


图 5

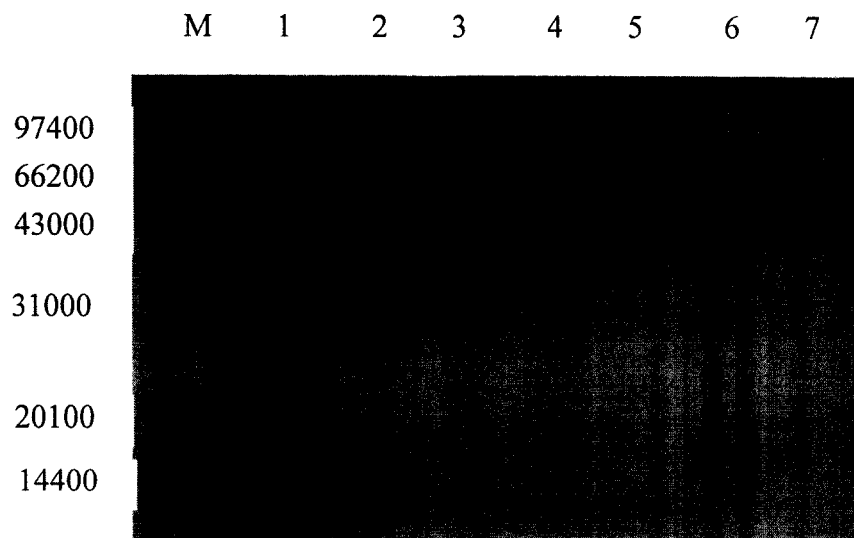


图 6

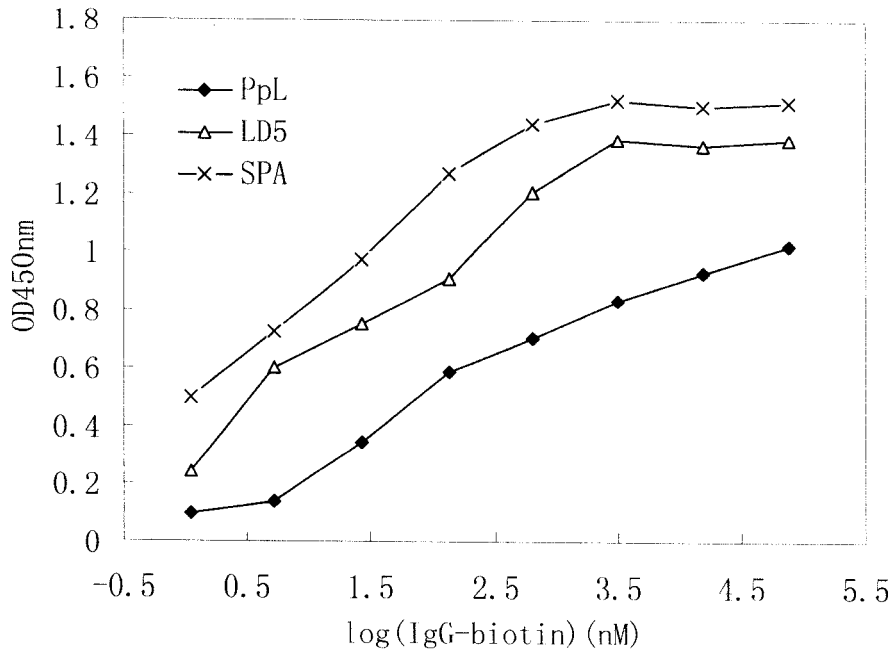


图 7

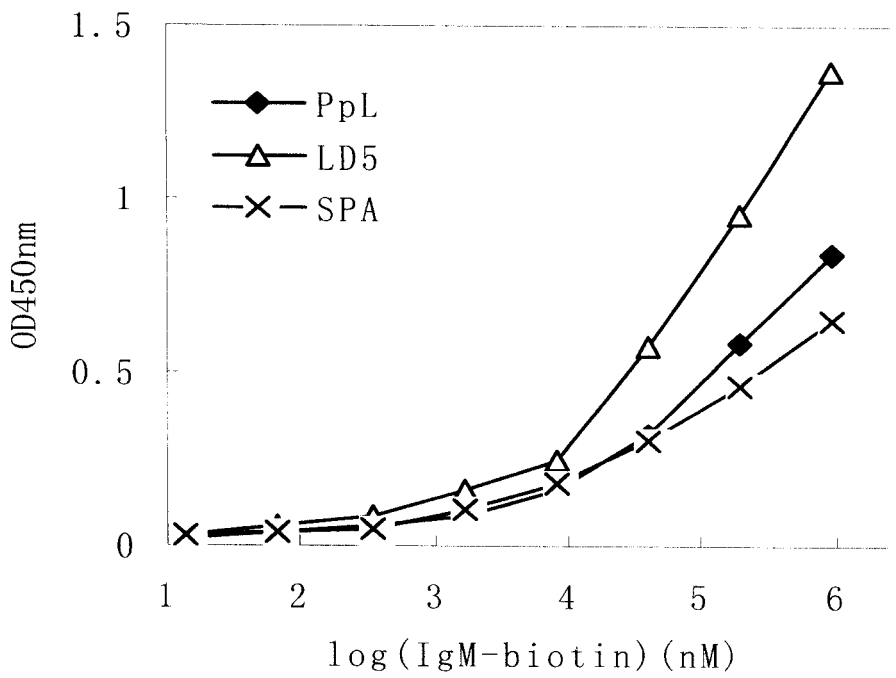


图 8

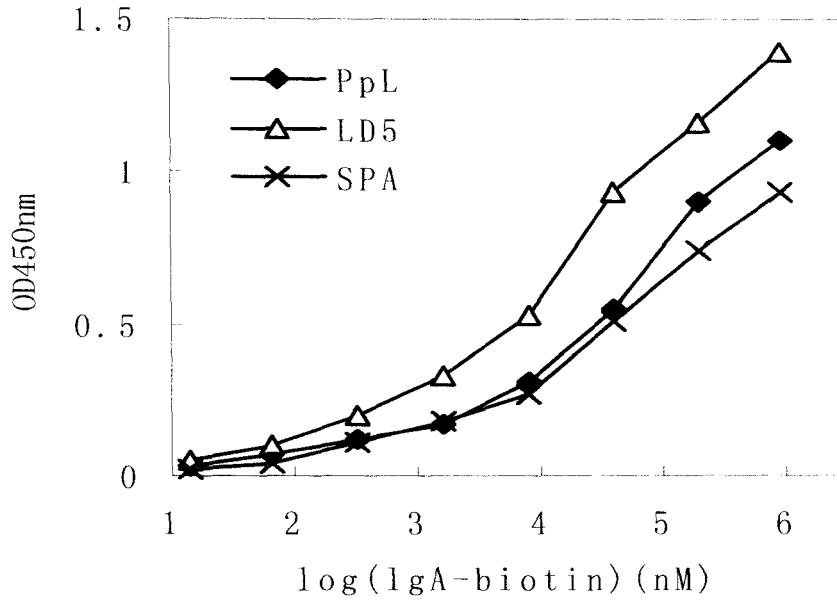


图 9

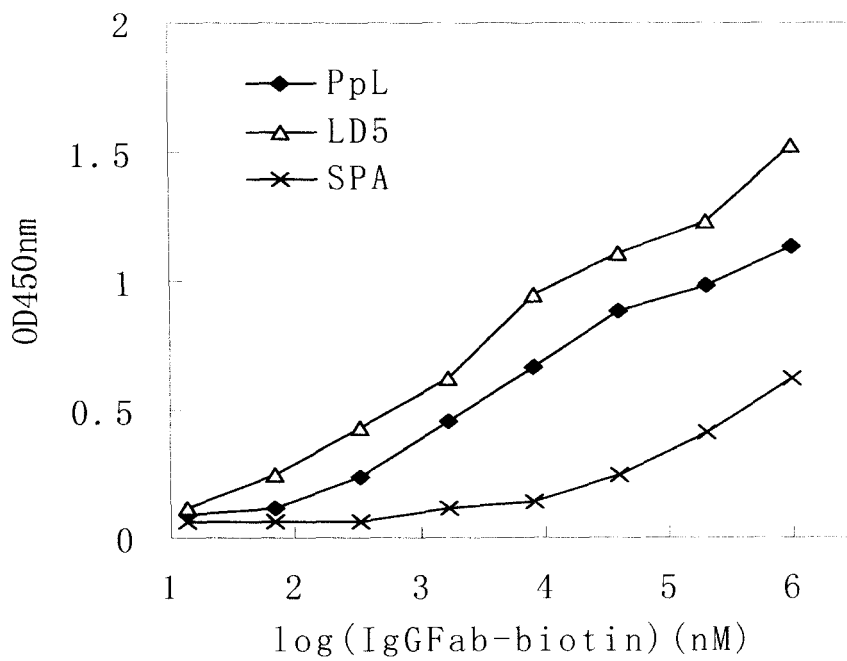


图 10

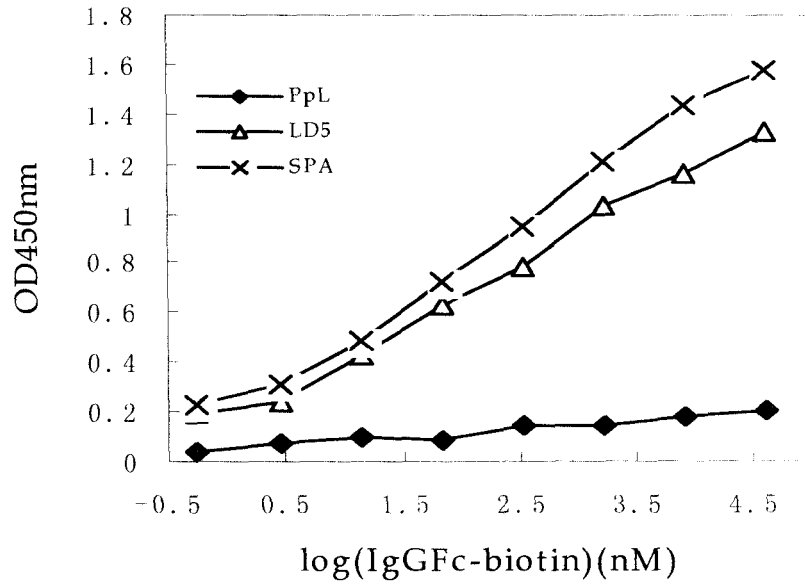


图 11

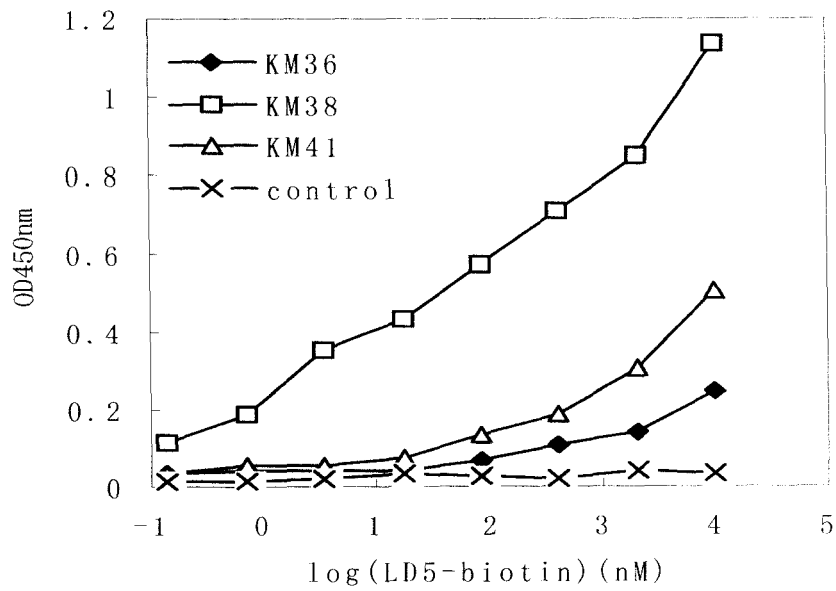


图 12

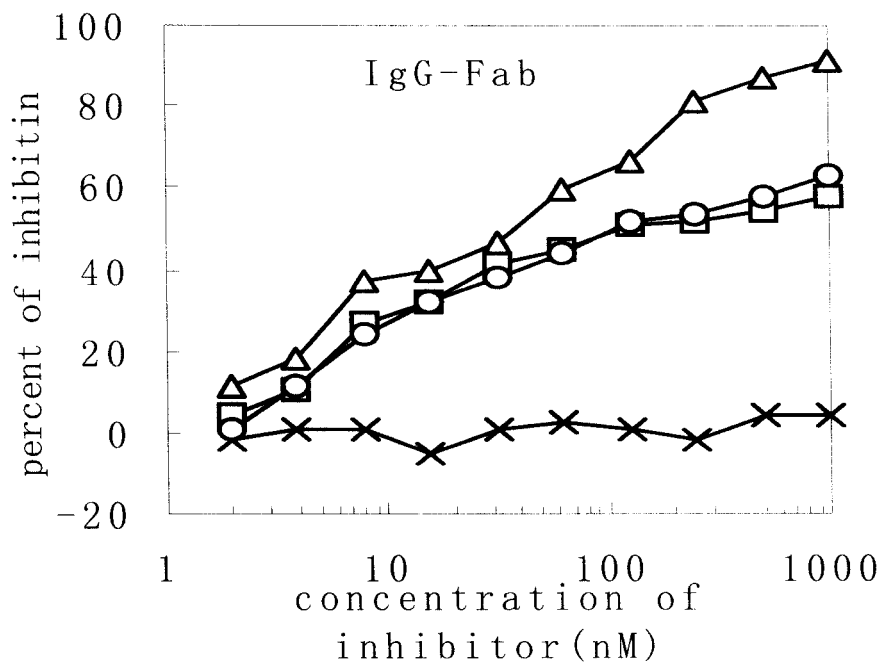


图 13

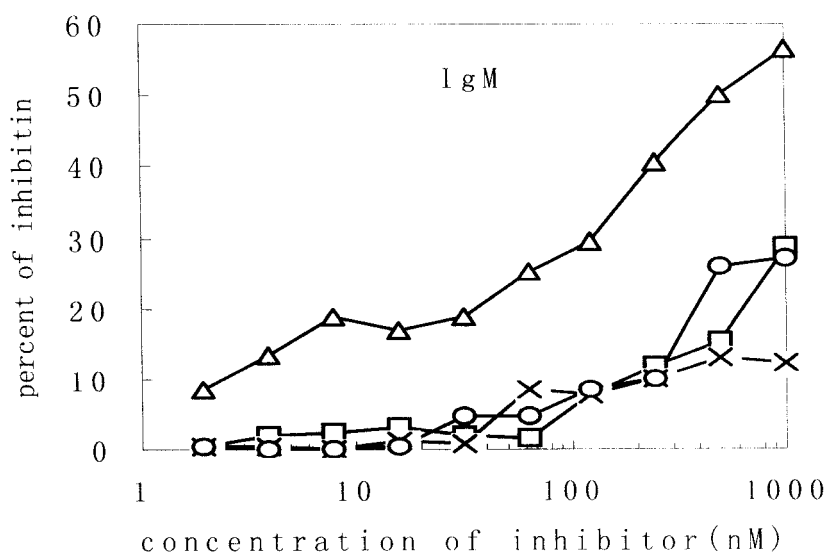


图 14

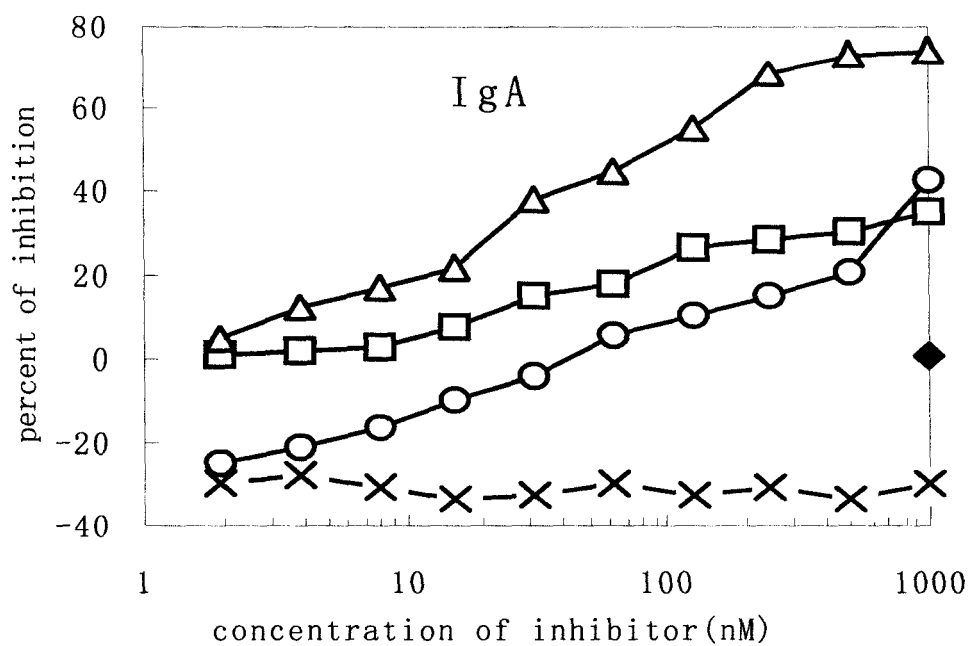


图 15

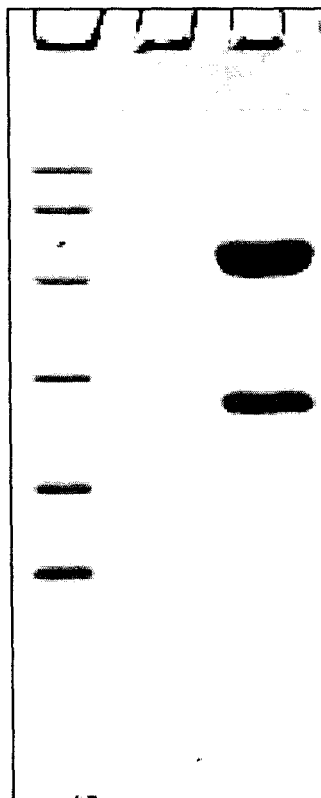


图 16

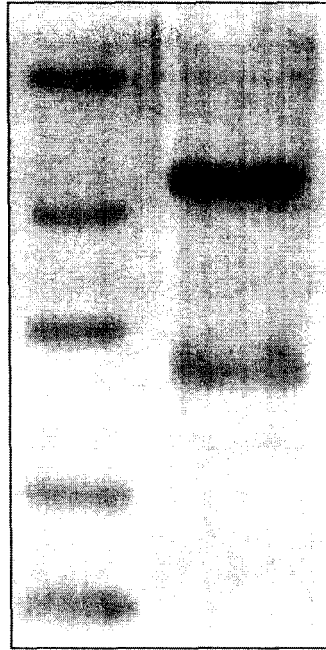


图 17

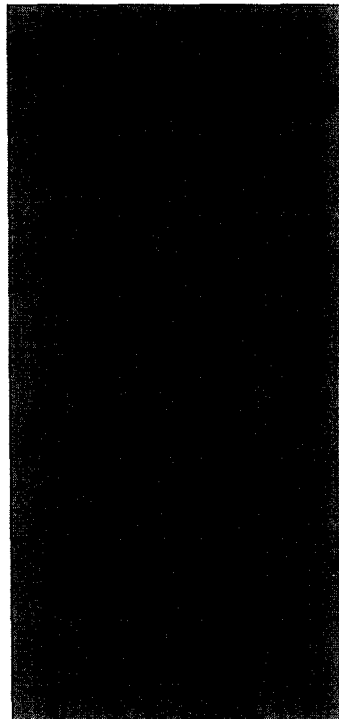


图 18

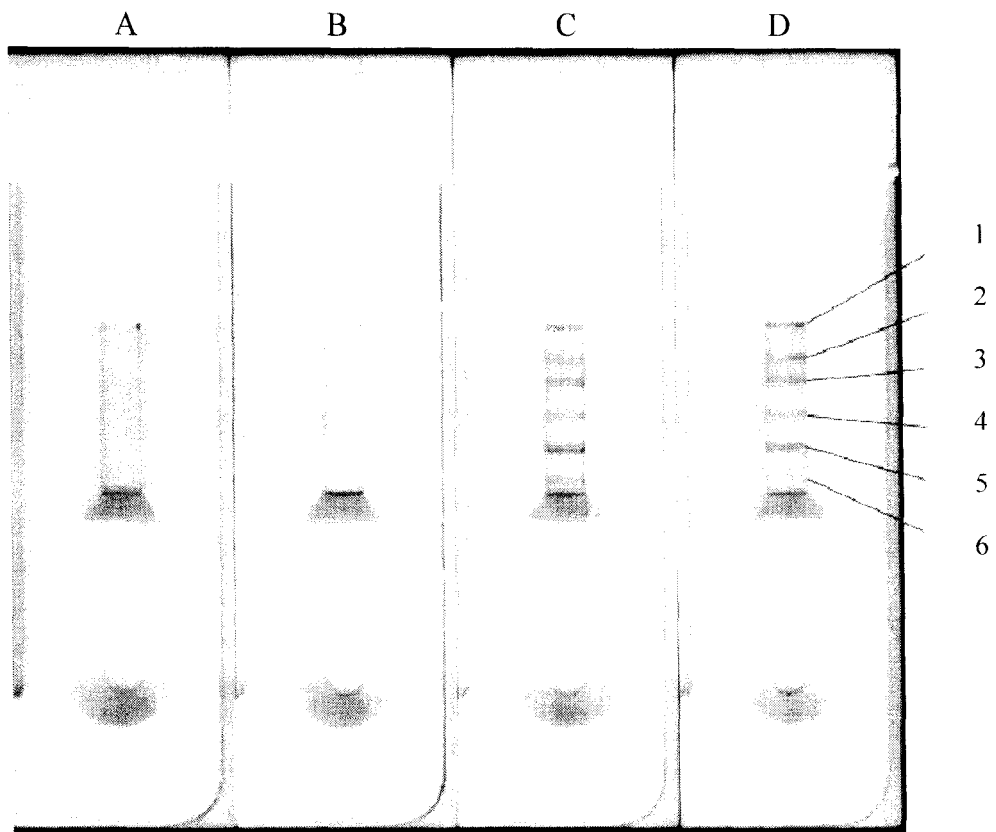


图 19

专利名称(译)	一种进化免疫球蛋白结合分子、其制备方法及应用		
公开(公告)号	CN1966526A	公开(公告)日	2007-05-23
申请号	CN200610118694.4	申请日	2006-11-23
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	潘卫 蒋少华 徐容 贾建安 沈毅璐 杨华 王锦红 陈秋莉 何俊 陈璐		
发明人	潘卫 蒋少华 徐容 贾建安 沈毅璐 杨华 王锦红 陈秋莉 何俊 陈璐		
IPC分类号	C07K16/46 C12N15/31 C12N15/70 C12N1/21 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	余明伟		
其他公开文献	CN100486993C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及新型进化免疫球蛋白结合分子、其制备方法及其应用。本发明公开了一种分离的进化免疫球蛋白结合分子，它是具有SEQ ID NO : 1所示的氨基酸序列的蛋白、或其具有免疫球蛋白结合活性的保守性变异蛋白。本发明还公开了该免疫球蛋白结合分子的编码基因、基因工程制备方法及其应用。本发明公开的免疫球蛋白结合分子广谱结合各种免疫球蛋白，显示出很高的免疫球蛋白全分子结合活性，可用于基因工程抗体的大规模纯化，天然抗体、单克隆抗体的纯化，酶联免疫吸附法、免疫层析法和免疫组化等免疫方法对抗体进行检测和诊断。

