



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102115497 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 06

(21) 申请号 200910247716. 0

C12Q 1/68(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 12. 30

G01N 33/53(2006. 01)

(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 曹洁 温宗梅 陈秋莉
蒋少华 王锦红 戚中田

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219
代理人 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C12N 15/74(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C40B 30/04(2006. 01)

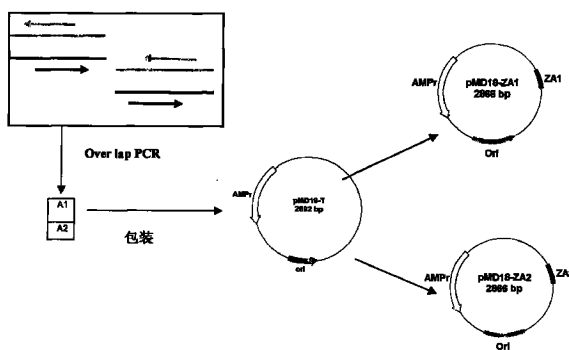
权利要求书 1 页 说明书 28 页 附图 10 页

(54) 发明名称

具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白
结合分子

(57) 摘要

本发明公开了具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子及其制备方法和应用。本发明还公开了该人 IgA 结合分子的编码基因、基于噬菌体分子进化的人 IgA 结合分子的制备方法及其应用。本发明公开的人 IgA 结合分子,尤其是人 IgA 亲和体的重复体分子,具有与人 IgA 结合的分子内亲合力效应,显示出很高的与人 IgA 结合的活性,可用于高效特异性 IgA 纯化和检测试剂的研发,以用于酶联免疫吸附法、免疫层析法和免疫组化等免疫方法对人 IgA 抗体进行检测。



1. 一种具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子,它是 SEQ ID NO :5 ~ 9 中任一所示的氨基酸序列的蛋白,或其保守性变异蛋白。

2. 一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸编码权利要求 1 中所述的具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子。

3. 如权利要求 2 中所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸具有如 SEQ ID NO : 10 ~ 14 中任一所示的核苷酸序列。

4. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体表达权利要求 1 中所述的具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子,且所述表达载体含有如权利要求 2 或 3 中任一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。

5. 如权利要求 4 中所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体为原核表达载体。

6. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞被权利要求 4-5 中任一权利要求所述的表达载体所转化。

7. 如权利要求 6 所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为原核细胞。

8. 权利要求 1 中所述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的制备方法,包括如下步骤:合成编码权利要求 1 中所述的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的多核苷酸,将此多核苷酸序列构建至表达载体中,然后将含有编码权利要求 1 中所述的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的多核苷酸的表达载体转化至宿主细胞中诱导表达,通过亲和层析制备所述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子。

9. 一种具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的定向进化筛选方法,包括如下步骤:

1) 以 hIgA 亲和体 SEG1 和 SEG2 序列作为基本结构单元,分别在其 3' 端引入长度为 3 个氨基酸的随机连接肽序列,构建噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库;

2) 以 hIgA 分子为筛选配基,通过生物淘洗方法,对步骤 1) 中得到的噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库进行多轮筛选;

3) 用 PCR 方法检测每轮筛选后各代噬菌体文库插入片段的分布情况,用 PCR 方法检测每轮筛选后各代噬菌体文库插入片段的分布情况,分析每轮筛选后噬菌体中含有的 hIgA 亲和体重复片段的数量以及含有不同数量 hIgA 亲和体重复体片段的噬菌体克隆的百分比;

4) 随机挑取含有不同数量 hIgA 亲和体重复体片段的噬菌体克隆进行鉴定,经酶联免疫吸附检测上述噬菌体克隆与 hIgA 的结合能力;

5) 测定含有不同数量 hIgA 亲和体重复体片段的阳性单克隆噬菌体的 DNA 序列,推导所含外源氨基酸序列;

6) 筛选获得的 hIgA 亲和体序列克隆至表达载体,转化受体菌,经诱导表达并纯化表达蛋白;

7) 经 ELISA 检测、Westernblot 试验以及表面等离子共振检测,筛选出与 hIgA 具有最高结合能力的 hIgA 亲和体重复体。

10. 权利要求 1 中所述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子在高效特异性 IgA 的纯化和检测中的应用。

具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具有涉及具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] IgA 是人体粘膜表面和分泌液中的主要免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig),它不仅在机体的免疫防御中起重要作用,而且与许多疾病的诊断和预后密切相关,因此研究开发高效特异性人 IgA (hIgA) 纯化和检测试剂具有重要的应用价值。金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 是具有 Ig 结合活性的细菌表面蛋白之一。据文献报道,利用蛋白 A 的 5 个 Ig 结合单结构域各位置中出现频率最高的氨基酸,合成新的含 58 个氨基酸的蛋白 A 单结构域 (命名为 Z 结构域) [Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, et al. (1997) Nat Biotechnol 15: 772-777.], 其空间构型更为稳定,呈三股反向 α 螺旋结构,其中参与 IgG Fc 段恒定区结合的 2 个 α 螺旋表面具有 13 个溶剂可及残基 (solvent accessible residues)。国外学者选择 Z 结构域作为类似抗体的支架,将这 13 个表面残基模拟抗体结合位点进行随机突变,建立噬菌体展示突变文库,并以不同的靶蛋白 (如重组人 VIII 因子、呼吸道合胞病毒 A 亚类的 G 蛋白、人表皮生长因子受体胞外区和人 CD28 分子等) 对该文库进行亲和筛选,分别获得与这些靶蛋白特异性结合的分子,并将这些类似抗体的结合分子命名为亲和体 (affibody)。人 IgA (hIgA) 亲和体是以 IgA 单克隆抗体为诱饵,经噬菌体展示 Z 结构域突变文库进化筛选获得的失去对人 IgG、IgD、IgE、IgM 的结合能力,而对 hIgA 具有很高的结合活性的结合分子。

[0003] hIgA 亲和体只存在一个 hIgA 结合位点,而细菌天然的 Ig 结合蛋白是由多个高度同源的 Ig 结合单结构域串联而成,如蛋白 A 和大芬戈尔德菌 (原名大消化链球菌) 蛋白 L 的抗体结合区分别由 5 个序列高度同源的单结构域组成。本实验室曾以蛋白 A、链球菌蛋白 G 及大芬戈尔德菌蛋白 L 的单结构域为基本单位,构建了由 4 个 Ig 结合单结构域随机组合而成的噬菌体展示文库,并以不同的 Ig 分子为配基进行亲和筛选,结果表明 Ig 结合单结构域有机串联,可产生明显高于单一单结构域的结合活性;并且各单结构域的组合方式和结构域之间不同的随机连接肽序列,对于其 Ig 结合功能均具有重要影响。国外学者用基因工程方法将两个 hIgA 亲和体头尾相连,形成人工二聚体,可从正常人血浆中回收纯化 hIgA 蛋白,同时也有少量 IgG 和 IgM 吸附回收,指出可能是污染所致,未给予合理解释 [Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA. (2002) Eur J Biochem 269(11):2647-2655.]。基于此,进一步获得高亲合力的新的 hIgA 亲和体组合分子以实质性提高与 hIgA 的结合活性是值得深入研究的问题,目前国内外尚未见报道。

发明内容

[0004] 本发明通过将具有较高 hIgA 结合活性的 hIgA 亲和体 SEG1 (其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示) 和 SEG2 (其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示) 序列作为基本结构单元,分

别在其 3' 端引入 3 个氨基酸大小的随机连接肽序列,构建噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库,然后以 hIgA 分子为筛选配基,通过“吸附-洗涤-洗脱-扩增”的生物淘洗方法,对噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库进行多轮定向进化筛选,并结合 PCR 方法检测每轮筛选后各代噬菌体文库插入片段的分布情况,根据每次筛选结果来判断占主导优势的噬菌体中含有的 hIgA 亲和体重复体片段的数量;然后测定筛选出的含有不同数量 hIgA 亲和体重复体片段的阳性单克隆噬菌体的 DNA 序列,推导所含外源氨基酸序列;最后通过 ELISA 检测、Western blot 试验、表面等离子共振检测以及竞争 ELISA 检测等检测方法,筛选出与 hIgA 具有最高结合能力的 hIgA 亲和体重复体。通过本发明的筛选方法,获得了含 1 个 hIgA 亲和体的序列为 SEQ1-_{RAI} (氨基酸序列如 SEQ NO ID :3 中所示) 或 SEQ2-_{RFY} (氨基酸序列如 SEQ NO ID :4 中所示);含 2 个 hIgA 亲和体的序列为 SEQ2-_{NFS}-SEQ2-_{ICQ} (氨基酸序列如 SEQ NO ID :5 中所示) 或 SEQ1-_{QIT}-SEQ2-_{ICM} (氨基酸序列如 SEQ NO ID :6 中所示);含 3 个 hIgA 亲和体的序列为 SEQ1-_{RSH}-SEQ1-_{AGR}-SEQ1-_{TGH} (氨基酸序列如 SEQ NO ID :7 中所示) 或 SEQ1-_{VKD}-SEQ1-_{MKI}-SEQ1-_{ADA} (氨基酸序列如 SEQ NO ID :8 中所示);含 4 个 hIgA 亲和体的序列为 SEQ2-_{RHC}-SEQ1-_{NLN}-SEQ2-_{TKD}-SEQ1-_{SRH} (氨基酸序列如 SEQ NO ID :9 中所示);其中,含 3 个 hIgA 亲和体重复体和含 4 个 hIgA 亲和体重复体与 hIgA 有明显结合优势,具有分子内结合的亲合力效应,显示出很高的与人 IgA 结合的活性,可用于高效特异性 IgA 纯化和检测试剂的研发,以用于酶联免疫吸附法、免疫层析法和免疫组化等免疫方法对人 IgA 抗体进行检测等领域。

[0005] 上述 hIgA 亲和体中使用的氨基酸单字母缩写所代表的氨基酸名称为:A,丙氨酸;C,半胱氨酸;D,天冬氨酸;F,苯丙氨酸;G,甘氨酸;H,组氨酸;I,异亮氨酸;K,赖氨酸;L,亮氨酸;M,甲硫氨酸;N,天冬酰胺;P,脯氨酸;Q,谷氨酰胺;R,精氨酸;S,丝氨酸;T,苏氨酸;V,缬氨酸;Y,酪氨酸。

[0006] 本发明的第一个目的,是克服现有技术的缺陷,提供一种具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子,及其制备方法。

[0007] 本发明的第二个目的,是提供编码上述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的多核苷酸。

[0008] 本发明的第三个目的,是提供一种具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的定向进化筛选方法。

[0009] 本发明的第一方面,公开了一种具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子,它是 SEQ ID NO :5 ~ 9 中任一所示的氨基酸序列的蛋白,或其保守性变异蛋白。

[0010] 较佳的,它是 SEQ ID NO :7 ~ 9 中任一所示的氨基酸序列的蛋白。

[0011] 本发明第二方面,公开了一种多核苷酸,所述的多核苷酸编码前述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子。

[0012] 较佳的,所述多核苷酸具有如 SEQ ID NO :10 ~ 14 中任一所示的核苷酸序列。

[0013] 编码所述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的核苷酸序列可以通过本领域技术人员熟知的任何适当的技术制备,包括但不限于重组 DNA 技术、化学合成等方法;也可以先合成具有 SEQ ID NO :10 ~ 14 所示的核苷酸序列,然后通过定点突变、定向诱变或以其它本领域熟知的技术来插入、替换、剔除序列以获得所需的核苷酸序列。

[0014] 编码所述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的核苷酸序列可

以通过本领域技术人员熟知的任何适当的技术制备。

[0015] 编码人 IgA 免疫球蛋白结合分子的核苷酸序列和编码载体蛋白的核苷酸序列之间的融合技术见于本领域的一般描述,如《分子克隆实验指南》(J. 萨姆布鲁克等,科学出版社,1995)。

[0016] 本发明的第三个方面,公开了一种表达载体,该表达载体表达上述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子,且该表达载体含有上述多核苷酸以及与该多核苷酸操作性相连的表达调控序列。

[0017] 较佳的,所述表达载体为原核表达载体,优选为 pET32a(+) 原核表达载体。

[0018] 本发明的第四方面,公开了一种宿主细胞,所述宿主细胞被上述表达载体所转化。

[0019] 较佳的,所述宿主细胞为原核细胞,如大肠杆菌,优选为大肠杆菌 BL21。

[0020] 本发明的第五方面,公开了上述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的筛选制备方法,包括如下步骤:合成编码上述人 IgA 免疫球蛋白结合分子的多核苷酸,将此多核苷酸序列构建至表达载体中,然后将含有编码上述人 IgA 免疫球蛋白结合分子的多核苷酸的表达载体转化至宿主细胞中诱导表达,通过亲和层析制备所述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子。

[0021] 优选的,所述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的筛选制备方法的步骤为:将 hIgA 亲和体序列克隆至 pET32a(+) 原核表达载体,转化 BL21 (DE3) 受体菌,经异丙基 -B-D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达后,用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化表达蛋白。

[0022] 本发明的第六方面,公开了一种具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的定向进化筛选方法,包括如下步骤:

[0023] 1) 以具有较高 hIgA 结合活性的 hIgA 亲和体 SEG1 和 SEG2 序列(其中,所述 SEG1 的序列为 SEQ ID NO:1 所示,所述 SEG2 的序列为 SEQ ID NO:2 所示)作为基本结构单元,分别在其 3' 端引入长度为 3 个氨基酸的随机连接肽序列,构建噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库;

[0024] 2) 以 hIgA 分子为筛选配基,通过“吸附-洗涤-洗脱-扩增”的生物淘洗方法,对步骤 1) 中得到的噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库进行 3~5 轮筛选;

[0025] 3) 用 PCR 方法检测每轮筛选后各代噬菌体文库插入片段的分布情况,用 PCR 方法检测每轮筛选后各代噬菌体文库插入片段的分布情况,分析每轮筛选后噬菌体中含有的 hIgA 亲和体重复片段的数量以及含有不同数量 hIgA 亲和体重复体片段的噬菌体克隆的百分比;

[0026] 4) 随机挑取含有不同数量 hIgA 亲和体重复体片段的噬菌体克隆进行鉴定,经酶联免疫吸附检测上述噬菌体克隆与 hIgA 的结合能力;

[0027] 5) 测定含有不同数量 hIgA 亲和体重复体片段的阳性单克隆噬菌体的 DNA 序列,推导所含外源氨基酸序列;

[0028] 6) 筛选获得的 hIgA 亲和体序列克隆至表达载体,转化受体菌,经诱导表达并纯化表达蛋白;

[0029] 7) 经 ELISA 检测、Western blot 试验以及表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR) 检测,筛选出与 hIgA 具有最高结合能力的 hIgA 亲和体重复体;

[0030] 8) 分别以含有不同数量 hIgA 亲和体重复体片段的亲和体重复体作为竞争抑制

剂,进一步通过竞争 ELASA 试验证实含 3 或 4 个 hIgA 亲和体重复体的蛋白与 hIgA 有明显结合优势;

[0031] 9) 将 hIgA 和 hIgG 分别用二巯基乙醇 (β -mercaptoethanol, BME) 处理,使抗体解离为单链,检测其与不同 IgA 亲和体重复分子的结合反应,通过 ELISA 试验和 Dot blot 检测表明:3-4 个亲和体重复分子与 hIgA 的结合方式是分子内结合,产生分子内亲合力效应,而 1-2 个亲和体与 hIgA 结合方式则是分子间结合;同时,2-4 个亲和体重复分子与 hIgG 的结合方式既存在分子内也存在分子间的结合作用,提示 1 个以上 hIgA 亲和体重复分子保留了与 hIgG 结合的残留活性;

[0032] 10) 将 4 个 IgA 亲和体重复分子吸附偶联于 Sepharose (琼脂糖凝胶),观察其从正常人血清中回收 hIgA 抗体作用,并用 Western blot 检测抗 hIgA、抗 hIgG 和抗 hIgM 分别与亲和层析洗脱液的反应性,结果显示 4 个 hIgA 亲和体重复体分子可回收正常人血清中 IgA,也可回收少量 IgG 和 IgM。

[0033] 优选的,所述步骤 2) 中的生物淘洗方法的具体步骤为:将 hIgA 抗体以每孔 200ng 于 37°C 包被 ELISA 板条 3h,加磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制的封闭液 (含 10% 脱脂奶粉、0.1% Tween-20, 0.2% 柳硫汞) 室温封闭 1h,用 PBS 洗涤 3 次后,加入噬菌体展示 IgA 亲和体随机组合文库 (1×10^{12} TU), 37°C 放置 2h,用 PBST (含 0.25% Tris, 0.05% Tween-20) 洗涤 40 次。每孔加入 100 μ l 对数生长期的大肠杆菌 TG1, 37°C 培养 1h,收集菌液,取 10 μ l 测定滴度,其余菌液接种至 50ml 2 \times YT 培养基 (含 Amp 100 μ g/ml), 于 37°C 振荡培养 1h 后加入辅助噬菌体 M13K07 (1×10^{10} TU), 继续培养 1h 后加入 Kana 至 15 μ g/ml, 37°C 振荡培养过夜。

[0034] 优选的,所述步骤 6) 中的表达载体为 pET32a(+) 原核表达载体,所述受体菌为 BL21 (DE3),所述诱导表达为经异丙基 -B-D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达,所述纯化为用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化。

[0035] 本发明中,所述 ELISA 检测、Western blot 试验、表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 检测以及竞争 ELASA 试验均为本领域公知技术,本领域技术人员可以参考现有技术进行确认。

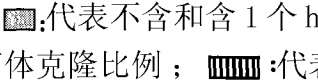






[0036] 本发明的第七方面,公开了上述具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子的应用,较佳的,所述应用为用于高效特异性 IgA 的纯化和检测,或者用于酶联免疫吸附法、免疫层析法和免疫组化等免疫方法对人 IgA 抗体进行检测。

[0037] 本发明采用噬菌体随机组合文库进行分子定向进化筛选,筛选出具有较高 hIgA 结合活性的新型蛋白结合分子。本发明中公开了几种人 IgA 免疫球蛋白结合分子,还公开了该人 IgA 结合分子的编码基因、基于噬菌体分子进化的人 IgA 结合分子的制备方法及其应用。本发明公开的人 IgA 结合分子,尤其是人 IgA 亲和体的重复体分子,具有与人 IgA 结合的分子内亲合力效应,显示出很高的与人 IgA 结合的活性,可用于高效特异性 IgA 纯化和检测试剂的研发,以用于酶联免疫吸附法、免疫层析法和免疫组化等免疫方法对人 IgA 抗体进行检测和诊断。

[0038] 本发明公开的基于噬菌体的分子定向进化筛选获得 hIgA 蛋白结合分子的制备方法,使得低成本、快速简便筛选免疫球蛋白结合分子成为可能。另一方面,本发明公开的上述 hIgA 蛋白结合分子中,含 2 个以上 hIgA 亲和体重复体与 hIgA 有明显结合优势,具有分子内结合的亲合力效应,提示人工结合蛋白的筛选和研究在亲合力层次上进行设计、构建

和评价具有重要意义。

附图说明

- [0039] 图 1 :重组 pMD-18T 克隆载体的构建流程图。
- [0040] 图 2 :噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库的构建流程图。
- [0041] 图 3 :PCR 法检测 hIgA 筛选噬菌体文库后每轮单克隆噬菌体插入片段的大小
- [0042] 1-24 :随机挑取的单克隆噬菌体 ;M :DL2000Marker ;C :阴性对照 (pCANTAB5S 质粒) ;I、II、III、IV :分别为 1-4 轮筛选的不同轮次。
- [0043] 图 4 :经 hIgA 筛选后各代噬菌体文库中的 20 个单克隆噬菌体插入片段的组成比例变化
- [0044] 横坐标 :原始噬菌体文库 0 以及经 hIgA 1-4 轮筛选后子代文库
- [0045] 纵坐标 :含不同插入片段的噬菌体克隆的百分比例
- [0046] :代表不含和含 1 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆比例 ; :代表含 2 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆比例 ; :代表含 3 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆比例 ; :代表含 4 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆比例。
- [0047] 图 5 :ELISA 方法检测含 1-4 个 hIgA 亲和体的噬菌体分别与 hIgA 和 hIgG 的结合活性
- [0048] 横坐标 :筛选的噬菌体克隆与 hIgA ()、hIgG ()和 hIgM () 的结合反应
- [0049] 纵坐标 :A490, 即波长 490nm 的光吸收值
- [0050] Ori-PL :原始噬菌体展示文库。
- [0051] 图 6 : hIgA 亲和体代表序列的原核表达、纯化及功能鉴定流程图。
- [0052] 图 7 : hIgA 亲和体表达序列的酶切回收片段的琼脂糖电泳图
- [0053] M :DL2000Marker ;1-4 :分别代表 1-4 个 hIgA 亲和体 DNA 序列。
- [0054] 图 8 : hIgA 亲和体重组表达质粒的酶切鉴定电泳图
- [0055] 1 :SEG1/pET32a (+) 质粒 ;
- [0056] 2 :SEG1/pET32a (+) 质粒 /Nco I+BamHI ;
- [0057] 3 :SEG1-SEG2/pET32a (+) 质粒 ;
- [0058] 4 :SEG1-SEG2/pET32a (+) 质粒 /Nco I+BamHI ;
- [0059] 5 :SEG1-SEG1-SEG1/pET32a (+) 质粒 /Nco I+BamHI ;
- [0060] 6 :SEG1-SEG1-SEG1/pET32a (+) 质粒 ;
- [0061] 7 :SEG2-SEG1-SEG2-SEG1/pET32a (+) 质粒 /Nco I+BamHI ;
- [0062] 8 :SEG2-SEG1-SEG2-SEG1/pET32a (+) 质粒 ;
- [0063] 9 :pET32a (+) 质粒 /Nco I+BamHI ;
- [0064] M :DL2000 Marker。
- [0065] 图 9 :hIgA 亲和体融合蛋白小量表达的 SDS-PAGE 结果
- [0066] C :空菌对照 ;
- [0067] M : 蛋 白 Marker, 97400、66200、43000、31000、20100、14400 分 别 表 示 14400-97400Daltons Marker 电泳显色条带对应的分子量
- [0068] 1 :代表含 1 个 hIgA 亲和体的融合蛋白 ;

- [0069] 2,3 :均代表含 2 个 hIgA 亲和体的融合蛋白 ;
- [0070] 4,5 :均代表含 3 个 hIgA 亲和体的融合蛋白 ;
- [0071] 6,7 :均代表含 4 个 hIgA 亲和体的融合蛋白。
- [0072] 图 10 :纯化的 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白的 SDS-PAGE 结果
- [0073] M : 蛋 白 Marker,97400、66200、43000、31000、20100、14400 分 别 表 示 14400-97400Daltons Marker 电泳显色条带对应的分子量
- [0074] 1-4 :分别代表含 1-4 个 hIgA 亲和体的融合蛋白。
- [0075] 图 11 :ELISA 检测 4 种人 IgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgA(A)、hIgG(B)、hIgG1-Fc(C) 和 hIgM(D) 的结合活性
- [0076] 横坐标 :生物素标记的 hIgA 稀释度 (1)、生物素标记的 hIgG 稀释度 (2)、生物素标记的 hIgG1-Fc 稀释度 (3)、生物素标记的 hIgM 稀释度 (4)
- [0077] 纵坐标 :A490,即波长 490nm 的光吸收值
- [0078] 带“—■—”线条 :对应 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白
- [0079] 带“—▲—”线条 :对应 3 个 hIgA 亲和体融合蛋白
- [0080] 带“—○—”线条 :对应 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白
- [0081] 带“— —”线条 :对应 1 个 hIgA 亲和体融合蛋白
- [0082] 带“—●—”线条 :对应 pET-32a(+) 融合蛋白。
- [0083] 图 12 :Western blot 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 4 种 Ig 分子的结合反应
- [0084] A :hIgA 亲和体融合蛋白与 hIgA 的结合反应
- [0085] B :hIgA 亲和体融合蛋白与 hIgG 的结合反应
- [0086] C :hIgA 亲和体融合蛋白与 hIgG1-Fc 的结合反应
- [0087] D :hIgA 亲和体融合蛋白与 hIgM 的结合反应
- [0088] 1 :pET-32a(+) 融合蛋白
- [0089] 2 :1 个 hIgA 亲和体融合蛋白
- [0090] 3 :2 个 hIgA 亲和体融合蛋白
- [0091] 4 :3 个 hIgA 亲和体融合蛋白
- [0092] 5 :4 个 hIgA 亲和体融合蛋白
- [0093] 6 :金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)。
- [0094] 图 13 :表面等离子共振 (SPR) 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 3 种 Ig 分子的结合反应
- [0095] 横坐标 :作用时间 (秒)
- [0096] 纵坐标 :共振单位 (RU)
- [0097] A :4 种 hIgA 亲和体融合蛋白与 hIgA 的结合反应
- [0098] B :4 种 hIgA 亲和体融合蛋白与 hIgG 的结合反应
- [0099] C :4 种 hIgA 亲和体融合蛋白与 hIgM 的结合反应
- [0100] SEG1, SEG2 :为 2 种 hIgA 亲和体
- [0101] 每张图中 6 条曲线代表 6 个稀释度,由上至下按 1 : 2 倍比稀释。
- [0102] 图 14 :1-4 个 hIgA 亲和体融合蛋白 (A,B,C,D) 结合生物素标记的 hIgA(b-hIgA)

的竞争抑制以及 2-4 个 hIgA 亲和体融合蛋白 (E,F,G) 结合生物素标记的 hIgG (b-hIgG) 的竞争抑制

[0103] 横坐标 : $\log(\text{inhibitor})$ (nM), 即抑制因子浓度对数值

[0104] 纵坐标 :Percent of inhibition, 即抑制百分数

[0105] 带“—■—”线条 :对应 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白

[0106] 带“—▽—”线条 :对应 3 个 hIgA 亲和体融合蛋白

[0107] 带“—▼—”线条 :对应 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白

[0108] 带“—○—”线条 :对应 1 个 hIgA 亲和体融合蛋白

[0109] 带“—●—”线条 :对应 pET-32a(+) 融合蛋白。

[0110] 图 15 :hIgA 和 hIgG 经二巯基乙醇 (BME) 处理前后的 SDS-PAGE 结果

[0111] M :蛋白 Marker, 97. 2、66. 4、44. 3、29. 0、20. 1、14. 3 分别表示 14300-97200Daltons Marker 电泳显色条带对应的分子量

[0112] 9A(1) :变性条件下 hIgA 和 hIgG 经 BME 处理前后的 SDS-PAGE 结果

[0113] 9A(2) :非变性条件下 hIgA 和 hIgG 经 BME 处理前后的 SDS-PAGE 结果

[0114] 1 :hIgA ; 2 :经 BME 处理后 hIgA ; 3 :hIgG ; 4 :经 BME 处理后 hIgG。

[0115] 图 16 :ELISA 检测 hIgA 和 hIgG 经二巯基乙醇 (BME) 处理前后分别与 2 个和 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白的结合反应

[0116] 横坐标 :生物素标记的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白稀释度 [9B(1)]、生物素标记的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白稀释度 [9B(2)]、生物素标记的 hIgA 稀释度 [9B(3)]、生物素标记的 hIgG 稀释度 [9B(4)]、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 hIgA 稀释度 [9B(5)]、HRP 标记的抗 hIgG 稀释度 [9B(6)]

[0117] 纵坐标 :A450, 即波长 450nm 的光吸收值

[0118] 图 16(A)

[0119] 带“—■—”线条 :对应生物素标记的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白与包板的 hIgA 的反应

[0120] 带“—□—”线条 :对应生物素标记的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白与包板的 BME 处理的 hIgA 反应

[0121] 带“—●—”线条 :对应生物素标记的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白与包板的 hIgG 的反应

[0122] 带“—○—”线条 :对应生物素标记的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白与包板的 BME 处理的 hIgG 反应

[0123] 带“—▲—”线条 :对应 pET-32a(+) 融合蛋白

[0124] 图 16(B)

[0125] 带“—■—”线条 :对应生物素标记的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白与包板的 hIgA 的反应

[0126] 带“—□—”线条 :对应生物素标记的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白与包板的 BME 处理的 hIgA 反应

[0127] 带“—●—”线条 :对应生物素标记的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白与包板的 hIgG 的反应

- [0128] 带“—○—”线条 :对应生物素标记的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白与包板的 BME 处理的 hIgG 反应
- [0129] 带“—▲—”线条 :对应 pET-32a(+) 融合蛋白
- [0130] 图 16(C)
- [0131] 带“—■—”线条 :对应生物素标记的 hIgA 与包板的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白的反应
- [0132] 带“—□—”线条 :对应生物素标记的 BME 处理的 hIgA 与包板的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白反应
- [0133] 带“—●—”线条 :对应生物素标记的 hIgA 与包板的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白的反应
- [0134] 带“—○—”线条 :对应生物素标记的 BME 处理的 hIgA 与包板的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白反应
- [0135] 带“—▲—”线条 :对应 pET-32a(+) 融合蛋白
- [0136] 图 16(D)
- [0137] 带“—■—”线条 :对应生物素标记的 hIgG 与包板的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白的反应
- [0138] 带“—□—”线条 :对应生物素标记的 BME 处理的 hIgG 与包板的 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白反应
- [0139] 带“—●—”线条 :对应生物素标记的 hIgG 与包板的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白的反应
- [0140] 带“—○—”线条 :对应生物素标记的 BME 处理的 hIgG 与包板的 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白反应
- [0141] 合蛋白反应
- [0142] 带“—▲—”线条 :对应 pET-32a(+) 融合蛋白
- [0143] 图 16(E)
- [0144] 带“—■—”线条 :对应辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 hIgA 与包板的 hIgA 反应
- [0145] 带“—□—”线条 :对应辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 hIgA 与包板的 BME 处理的 hIgA 反应
- [0146] 带“—▲—”线条 :对应 pET-32a(+) 融合蛋白
- [0147] 图 16(F)
- [0148] 带“—●—”线条 :对应辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 hIgG 与包板的 hIgG 反应
- [0149] 带“—○—”线条 :对应辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 hIgG 与包板的 BME 处理的 hIgG 反应
- [0150] 带“—▲—”线条 :对应 pET-32a(+) 融合蛋白。
- [0151] 图 17 :Dot blot 法检测 hIgA 和 hIgG 经二巯基乙醇 (BME) 处理前后分别与 2 个和 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白的结合反应
- [0152] BME(-) :hIgA 和 hIgG 未经 BME 处理
- [0153] BME(+) :hIgA 和 hIgG 经 BME 处理
- [0154] 1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64、1 : 128 :分别表示 hIgA 和 hIgG 的稀释度。

[0155] 图 18 :用 4 个 IgA 亲和体重复分子从正常人血清中回收 hIgA 亲和层析洗脱液的 SDS-PAGE 和 Western blot 结果

[0156] A :亲和层析洗脱液的 SDS-PAGE 结果

[0157] B :正常人血清的 SDS-PAGE 结果

[0158] C :与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 hIgA 单克隆抗体反应的 Western blot 结果

[0159] D :与 HRP 标记的抗 hIgG 单克隆抗体反应的 Western blot 结果

[0160] E :与 HRP 标记的抗 hIgM 单克隆抗体反应的 Western blot 结果

[0161] M : 蛋 白 Marker, 97. 2、66. 4、44. 3、29. 0、20. 1、14. 3 分 别 表 示 14300-97200DaltonsMarker 电泳显色条带对应的分子量

[0162] 1 :hIgA ;2 :hIgG ;3 :hIgM ;E :亲和层析洗脱液 ;N :正常人血清。

具体实施方式

[0163] 在本发明中,术语“其保守性变异蛋白”是指具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子(其氨基酸序列如 SEQ ID NO :或 SEQ ID NO :所示)的蛋白的变异形式,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。

[0164] 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。

[0165] 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。

[0166] 本发明所述适合表达具有分子内亲合力效应的人 IgA 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,表达本发明的具有分子内亲合力效应的人 IgA 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。

[0167] 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。

[0168] 实施例 1

[0169] 应用噬菌体分子进化获得具有分子内亲合力效应的人 IgA 亲和体重复分子

[0170] 1、hIgA 亲和体 SEG1、SEG2 片段的基因合成 根据文献 [Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA. (2002) Eur J Biochem 269(11):2647-2655.] 提供的 hIgA 亲和体的氨基酸序列设计大肠杆菌偏爱密码子序列的 hIgA 亲和体 SEG1 和 SEG2 基因(均含 174 个核苷酸),委托上海英骏生物技术有限公司合成。

[0171] 2、重组 pMD-18T 克隆载体的构建 将合成的 SEG1 基因和 SEG2 基因序列分别克隆于 pMD-18T 载体,命名为 pMD-18T/SEG1 和 pMD-18T/SEG2。重组 pMD-18T 克隆载体的构建流程见图 1。挑取 pMD-18T/SEG1 和 pMD-18T/SEG2 重组质粒各 3 个,委托上海英骏生物技术有限公司进行序列测定,测序结果用 DNASTAR 软件分析,结果表明合成的序列与文献 [Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA. (2002) Eur J Biochem 269(11):2647-2655.] 提供的氨基酸序列完全一致(见表 1)。

[0172] 表 1 hIgA 亲和体 SEG1 和 SEG2 的核苷酸 (NT) 和氨基酸 (AA) 序列

[0173]

hIgA 亲和体 SEG1 序列	
(1-45 NT):	GTT GAC AAC AAA TTC AAC AAA GAA ACC ATC CAG GCT TCT CAG GAA
(1-15 AA):	V D N K F N K E T I Q A S Q E
(46-90 NT):	ATC CGT CTG CTG CCG AAC CTG AAC GGT CGT CAG AAA CTG GCT TTC
(16-30 AA):	I R L L P N L N G R Q K L A F
(91-135 NT):	ATC CAC TCT CTG CTG GAC GAC CCG TCT CAG TCT GCT AAC CTG CTG
(31-45 AA):	I H S L L D D P S Q S A N L L
(136-174 NT):	GCT GAA GCT AAA AAA CTG AAC GAC GCT CAG GCT CCG AAA
(46-58 AA):	A E A K K L N D A Q A P K
hIgA 亲和体 SEG2 序列	
(1-45 NT):	GTTGACAAC AAA TTC AAC AAA GAA AAA ATC ATC GCT TCT CGT GAA
(1-15 AA):	V D N K F N K E K I I A S R E
(46-90 NT):	ATC CGTGAA CTG CCG AAC CTG AAC CAC CAG CAG AAA CTG GCT TTC
(16-30 AA):	I R E L P N L N H Q Q K L A F
(91-135 NT):	ATC CAC TCT CTG CTG GAC GAC CCG TCT CAG TCT GCT AAC CTG CTG
(31-45 AA):	I H S L L D D P S Q S A N L L
(136-174 NT):	GCT GAA GCT AAA AAA CTG AAC GAC GCT CAG GCT CCG AAA
(46-58 AA):	A E A K K L N D A Q A P K

[0174] 3、引物合成 设计 4 条引物用于构建 hIgA 亲和体随机组合文库,上游引物 UB-1K 和下游引物 DB-1K 均引入用于克隆重组的 Kpn I 酶切位点 (GGTACC)。下游引物 DB-1K 中引入 3 个氨基酸大小的随机连接肽编码序列 (NNS NNS NNS, N = A/T/C/G, S = G/C),另外设计两条引物 UB-2 和 DB-2 为保护碱基序列,保护上下游的酶切位点 ;同时合成用于噬菌粒载体 pCANTAB5S 中克隆片段的 PCR 扩增及测序引物 pCANTAB5S-1 和 pCANTAB5S-6。以上引物均由上海生工生物技术有限公司合成。引物序列见表 2。

[0175] 表 2 展示 hIgA 亲和体随机组合文库的建库和测序引物

[0176]

名称	描述	序列(5'→3')
UB-1K	hIgA 亲和体上游引物	GCTTGTGCGAATGTGACCAGCGTACGCACGGGTACCGTT GACAACAAATTCA
DB-1K	hIgA 亲和体下游引物	ACGCTCTGTGCACTCACATCTAGAGGTACC <i>SNNSNNSNN</i> TTTCGGAGCCTGAC
UB-2	上游保护引物	GTGG GGT TTT GCT TGT GCG AAT GTG ACC
DB-2	下游保护引物	GTGG GGT TTT ACG CTC TGT GCA CTC ACA
pCANTAB5S-1	5S 测序上游引物	CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC
pCANTAB5S-6	5S 测序下游引物	GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG

[0177] 注 :下划线部分为 Kpn I 酶切位点 ;斜体部分为随机连接肽编码序列 (N = A/T/C/G, S = G/C)

[0178] 4、噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库的构建

[0179] 分别以 pMD-18T/SEG1 和 pMD-18T/SEG2 为模板,以 UB1-K、DB1-K 为引物,PCR 扩

增含 Kpn I 酶切位点和 3 个氨基酸随机连接肽编码序列的 hIgA 亲和体 SEG1 和 SEG2 片段。PCR 反应体积 50 μ l, 其中含质粒模板 1 μ l, 上下游引物各 0.5 μ l, dNTP 100 μ mol/L, Mg^{2+} 3mmol/L, Taq 酶 1U; 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C, 40s; 60 $^{\circ}$ C, 40s; 72 $^{\circ}$ C, 40s; 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min 结束反应。取 PCR 反应产物 1 μ l 为模板, 再以上下游保护引物 UB-2 和 DB-2 进行第二轮 PCR, 条件同上, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。用胶回收试剂盒 3S DNAGel Purification Kit 3.1 分别回收 hIgA 亲和体 SEG1 与 SEG2 的 PCR 产物后, 用 5U Kpn I 酶切回收产物 (反应体积 80 μ l), 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 用 3S DNA Gel Purification Kit 回收纯化酶切片段。SEG1 和 SEG2 DNA 片段用 T4 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接 2h 后, 再与 Kpn I 酶切的 pCANTAB5S 噬菌粒载体连接后转化大肠杆菌 Top10F' 用于提取重组噬菌粒。之后该重组噬菌粒转化大肠杆菌 TG1 并铺 LB 平板 [含氨苄青霉素 (Amp) 100 μ g/ml]。转化菌落接种至 10ml 2 \times YT 培养基 [含 Amp 100 μ g/ml] 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A_{600} 约 0.5 时, 加入 1×10^{10} TU (Transformation unit) 的辅助噬菌体 M13K07, 37 $^{\circ}$ C 培养 1h 后于 1000g 离心 10min, 沉淀重悬于 50ml 2 \times YT 培养基 [含 Amp 100 μ g/ml 和卡那霉素 (Kana) 15 μ g/ml] 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。扩增的噬菌体颗粒用 PEG 8000/NaCl 沉淀纯化后, 重悬于 10ml 2 \times YT 中, 经 0.22 μ m 无菌滤膜过滤, 即获得展示 hIgA 亲和体随机组合文库的重组噬菌体。噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库的构建流程见图 2。

[0180] 5、噬菌体展示 hIgA 亲和体随机组合文库的亲和筛选





[0181] 将 hIgA 抗体以每孔 200ng 于 37 $^{\circ}$ C 包被 ELISA 板条 3h, 加磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制的封闭液 (含 10% 脱脂奶粉、0.1% Tween-20, 0.2% 柳硫汞) 室温封闭 1h, 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入噬菌体展示 IgA 亲和体随机组合文库 (1×10^{12} TU), 37 $^{\circ}$ C 放置 2h, 用 PBST (含 0.25% Tris, 0.05% Tween-20) 洗涤 40 次。每孔加入 100 μ l 对数生长期的大肠杆菌 TG1, 37 $^{\circ}$ C 培养 1h, 收集菌液, 取 10 μ l 测定滴度, 其余菌液接种至 50ml 2 \times YT 培养基 (含 Amp 100 μ g/ml), 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h 后加入辅助噬菌体 M13K07 (1×10^{10} TU), 继续培养 1h 后加入 Kana 至 15 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日噬菌体沉淀和收集的方法同上, 共进行 4 轮重复筛选。

[0182] 6、PCR 检测筛选后各代噬菌体文库插入片段的分布情况




[0183] 随机挑取每轮筛选后噬菌体文库感染 TG1 宿主菌生成的单克隆菌落 24 个, 分别接种至 0.5ml 2 \times YT 培养基 (含 Amp 100 μ g/ml), 于 37 $^{\circ}$ C、250rpm 培养 5h, 以 2 μ l 培养菌液为模板, 以噬菌粒载体 pCANTAB5S 克隆位点上下游的两段序列 pCANTAB5S-1 和 pCANTAB5S-6 为上、下游引物, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体积 50 μ l, 其中含上下游引物各 0.5 μ l, dNTP 100 μ mol/L, Mg^{++} 3mmol/L, Taq 酶 1U; 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C, 40s; 60 $^{\circ}$ C, 40s; 72 $^{\circ}$ C, 40s; 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min 结束反应。以 pCANTAB5S 质粒作为阴性对照。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳判断 PCR 产物, 分析比较各轮筛选文库中插入片段的分布情况。结果可见噬菌体文库展示插入片段的大小随着筛选轮次的增加发生明显的变化 (见图 3)。图 3 中显示的是 PCR 法检测 hIgA 筛选噬菌体文库后每轮单克隆噬菌体插入片段的大小, 其中 I、II、III、IV 分别代表 1-4 轮筛选的不同轮次; 第 1-24 为筛选的每一轮次中随机挑取的单克隆噬菌体; M 表示 DL2000Marker; C 表示阴性对照 (pCANTAB5S 质粒)。

[0184] 在第 1 轮和 2 轮筛选文库中, 展示 1-2 个结构域的单克隆比例 > 80%, 而经第 3 轮和第 4 轮筛选后, 文库中展示 1-2 个结构域的单克隆比例逐渐减少并消失, 而展示 3-4 个结

构域的单克隆分子占优势,其中展示 4 个结构域的克隆显著增加,至第 4 轮筛选后,其比例接近 90% (见图 4),显示筛选过程的有效性。图 4 为经 hIgA 筛选后各代噬菌体文库中的 20 个单克隆噬菌体插入片段的组成比例变化,其中,横坐标表示原始噬菌体文库 0 以及经 hIgA1-4 轮筛选后子代文库;纵坐标表示含不同插入片段的噬菌体克隆的百分比例。

[0185] 图 4 中, :表示不含和含 1 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆比例; :代表含 2 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆比例; :代表含 3 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆比例; :代表含 4 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆比例。

[0186] 7、ELISA 检测筛选后噬菌体克隆与 hIgA、hIgG 及 hIgM 的结合反应

[0187] 分别取经 PCR 检测后含 1-4 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆各 20 个,分别用 TBS 缓冲液(含 50m mol/L Tris-HCl,pH 7.5,150m mol/LNaCl)稀释至 10^{12} TU/ml 后,各取 100 μ l 分别加至 hIgA 抗体(200ng/孔)包被的 ELISA 板条中,37°C 反应 2h,加封闭液(含 10%脱脂奶粉)室温封闭 1h,PBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的鼠抗噬菌体抗体(1:5000),经邻苯二胺(OPD)显色后用酶标仪(Bio Rad)读取 A_{490} 值。同法平行检测该噬菌体克隆与 hIgG、hIgM 结合活性。以未经筛选的原始噬菌体文库(Ori-PL)作为阴性对照。结果如图 5 所示,图 5 为 ELISA 方法检测含 1-4 个 hIgA 亲和体的噬菌体分别与 hIgA 和 hIgG 的结合活性图,其中,横坐标:筛选的噬菌体克隆与 hIgA ()、hIgG ()和 hIgM()的结合反应;纵坐标表示 A_{490} ,即波长 490nm 的光吸收值,ori-PL 表示原始噬菌体展示文库。

[0188] 由图 5 中展示的结果可见:含 1-4 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆均可与 hIgA 结合,且含 3 个和 4 个 hIgA 亲和体重复体的噬菌体克隆与 hIgA 有着非常明显的结合优势;含 1 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆与 hIgG 没有明显结合作用,而展示 2-4 个 hIgA 亲和体重复体的噬菌体克隆与 hIgG 抗体有弱结合反应;含 1-4 个 hIgA 亲和体的噬菌体克隆均未检测出与 hIgM 结合(结果未显示)。

[0189] 8、测序分析每轮亲和筛选后噬菌体克隆插入片段的序列组成

[0190] 分别随机挑取含 1-4 个 hIgA 亲和体的阳性单克隆噬菌体各 20 个,委托上海英骏生物技术有限公司进行序列测定,测序引物为 pCANTAB5S-1 和 pCANTAB5S-6(见表 2),测序结果用 DNASTAR 软件分析。结果可见,含 1 个 hIgA 亲和体 SEG1 或 SEG2 噬菌体克隆中,展示 SEG1 的噬菌体克隆占明显优势;含 2 个 hIgA 亲和体重复体有 2 种构成形式:SEG2-SEG2 和 SEG1-SEG2,且这 2 种构成形式的随机连接肽序列不同,其中展示 SEG1-SEG2 的噬菌体克隆占明显优势;含 3 个 hIgA 亲和体重复体为 SEG1-SEG1-SEG1 形式,其随机连接肽序列有两种不同形式,其中展示 $SEG1_{-VKD}-SEG1_{-MKT}-SEG1_{-ADA}$ 的组合分子呈筛选优势;含 4 个 hIgA 亲和体重复体的克隆只展示一种组合分子形式,即 SEG2-SEG1-SEG2-SEG1,其随机连接肽序列完全一致(表 3),说明对该噬菌体组合文库的筛选,SEG1、SEG2 亲和体的组成形式和随机连接肽序列都受到了严格的筛选。

[0191] 表 3. 筛选后阳性噬菌体展示 hIgA 亲和体 SEG1 和 SEG2 分子组成形式

[0192]

hIgA 亲和体重复体数量	阳性噬菌体展示插入片段的组成形式	展示不同片段的噬菌体克隆数	每轮筛选后展示不同片段的噬菌体克隆发布情况
---------------	------------------	---------------	-----------------------

[0193]

			1*	2	3	4
1	SEG1- <u>RAI</u>	13	10	3	0	0
1	SEG2- <u>RFY</u>	7	4	2	1	0
2	SEG2- <u>NPS</u> -SEG2- <u>TCQ</u>	5	4	1	0	0
2	SEG1- <u>QIT</u> -SEG2- <u>ICM</u>	15	8	5	2	0
3	SEG1- <u>RSH</u> -SEG1- <u>AGR</u> -SEG1- <u>TGH</u>	5	0	1	3	1
3	SEG1- <u>VKD</u> -SEG1- <u>MKT</u> -SEG1- <u>ADA</u>	15	0	1	9	5
4	SEG2- <u>RHG</u> -SEG1- <u>MLN</u> -SEG2- <u>TKD</u> -SEG1- <u>SRH</u>	20	0	0	5	15

[0194] 下划线及斜体部分表示随机连接肽序列。SEG1 和 SEG2 表示 hIgA 亲和体。* :1-4 轮筛选轮数。氨基酸单字母缩写 :A, 丙氨酸 ;C, 半胱氨酸 ;D, 天冬氨酸 ;F, 苯丙氨酸 ;G, 甘氨酸 ;H, 组氨酸 ;I, 异亮氨酸 ;K, 赖氨酸 ;L, 亮氨酸 ;M, 甲硫氨酸 ;N, 天冬酰胺 ;P, 脯氨酸 ;Q, 谷氨酰胺 ;R, 精氨酸 ;S, 丝氨酸 ;T, 苏氨酸 ;V, 缬氨酸 ;Y, 酪氨酸。

[0195] 9、原核表达载体 pET32a(+)-SEG1/2 的构建流程见图 6

[0196] 9.1 引物合成用于 PCR 扩增筛选获得的 1-4 个 hIgA 亲和体分子的 cDNA 序列的引物为 :

[0197] 上游引物 5Nco-u :5' -TATCCATGGCTGCGGCCAGCCGGCCTCT-3', 下游引物

[0198] 5S-6 :5'-GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3'。上游引物中引入了 Nco I 酶切位点(下划线部分),引物 DNA 序列由上海生工生物技术服务有限公司合成。

[0199] 9.2 hIgA 亲和体表达序列的 PCR 扩增 以含阳性噬菌粒的菌株为模板,用合成的上、下游引物进行扩增,PCR 反应体积为 50 μ l,其中含上下游引物各 0.5 μ l, dNTP 100 μ mol/L, Mg⁺⁺3mmol/L, Taq 酶 1U。反应条件 :94 $^{\circ}$ C 30s ;60 $^{\circ}$ C 30s ;72 $^{\circ}$ C 45s ;35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5min 结束反应。PCR 扩增的 hIgA 亲和体 cDNA 片段在 Kpn I 位点后有 (G₄S)₃ 接头(为 pCANTAB5S 载体上固有的)。胶回收纯化后用 Nco I 和 BamH I 双酶切去 (G₄S)₃ 接头,1.2% 琼脂糖电泳检测,得到 1-4 个 hIgA 亲和体表达序列分别约 183bp、366bp、549bp、732bp(见图 7)。图 7 为 hIgA 亲和体表达序列的酶切回收片段的琼脂糖电泳图,其中 M 为 DL2000Marker,1-4 分别代表 1-4 个 hIgA 亲和体 DNA 序列。

[0200] 9.3 hIgA 亲和体重组表达质粒的构建和鉴定 原核表达载体 pET32a(+) 购自 Novagen 公司, pET-32a(+) 用 Nco I 和 BamH I 双酶切,试剂盒回收酶切产物。上述 PCR 纯化产物用 Nco I 和 BamH I 双酶切,试剂盒回收后取 400ng 与 400ng pET-32a(+) 载体 Nco I 和 BamH I 酶切产物连接。转化后挑选重组子用 Nco I 和 BamH I 酶切鉴定,1% 琼脂糖电泳检测显示符合理论预期(见图 8)。图 8 中, hIgA 亲和体重组表达质粒的酶切鉴定电泳图,1 为 SEG1/pET32a(+) 质粒 ;2 为 SEG1/pET32a(+) 质粒 /Nco I+BamH I ;3 为 SEG1-SEG2/pET32a(+) 质粒 ;4 为 SEG1-SEG2/pET32a(+) 质粒 /Nco I+BamH I ;5 为 SEG1-SEG1-SEG1/pET32a(+) 质粒 /Nco I+BamH I ;6 为 SEG1-SEG1-SEG1/pET32a(+) 质粒 ;7 为 SEG2-SEG1-SEG2-SEG1/pET32a(+) 质粒 /Nco I+BamH I ;8 为 SEG2-SEG1-SEG2-SEG1/pET32a(+) 质粒 ;9 为 pET32a(+) 质粒 /Nco I+BamH I ;M 为 M :DL2000 Marker。

[0201] 9.4 hIgA 亲和体重组表达质粒的序列分析 提取4种hIgA亲和体重组表达质粒,委托上海英骏生物技术有限公司进行序列测定,上游测序引物B-S-U:5' -GGATCCGAGCTCAGGCCTGTCGACGGTACCGTT-3';下游测序引物S-H-D:5' -GAGCTCAAGCTTACCAGATCCACCACCGCCGTACC-3'。序列分析结果证实pET-32a(+)在Nco I和BamH I克隆位点间的插入序列与4种hIgA亲和体代表分子的序列完全相符,读框完全正确,起始子和终止子已加上,插入片段的上下游序列与pET32a(+)载体序列完全一致。

[0202] 9.5 hIgA亲和体融合蛋白的表达

[0203] 9.5.1 重组表达载体pET-32a(+)-SEG1/2的转化 氯化钙法制备大肠杆菌BL21感受态细胞(E. coli BL21-TRXB(DE3)购自Novagen公司),取pET-32a(+)-SEG1/2200ng加入感受态BL21-TRXB 100 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Amp 100ng/ml和Kana 35ng/ml),37 $^{\circ}$ C培养过夜。

[0204] 9.5.2 hIgA亲和体的诱导表达和SDS-PAGE样品的制备 从pET-32a(+)-SEG1/2/BL21转化平板上挑取4个单克隆菌落接种至0.5mlLB(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。

[0205] 9.5.3 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12V/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9,图9为hIgA亲和体融合蛋白小量表达的SDS-PAGE结果,其中,1代表1:代表含1个hIgA亲和体的融合蛋白,2和3均代表含2个hIgA亲和体的融合蛋白,4和5均代表含3个hIgA亲和体的融合蛋白,6和7均代表含4个hIgA亲和体的融合蛋白。由图9中可以看出含1-4个hIgA亲和体的克隆分别在25KD、31KD、38KD和44.5KD左右均有目的蛋白条带,空BL21均未见该条带。

[0206] 9.6 hIgA亲和体融合蛋白的大量表达及纯化

[0207] 9.6.1 表达 将pET-32a(+)-SEG1/2/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。

[0208] 9.6.2 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,可见在25KD、31KD、38KD和44.5KD左右均有清晰的目的蛋白条带(见图10)。图10为纯化的4种hIgA亲和体融合蛋白的SDS-PAGE结果,其中1-4分别代表含1-4个hIgA亲和体的融合蛋白。

[0209] 10、ELISA法检测hIgA亲和体融合蛋白与各类抗体及抗体片断的结合活性

[0210] 10.1 与人多克隆 IgA 的结合：

[0211] 10.1.1 人多克隆 IgA 购自 Sigma 公司。

[0212] 10.1.2 1mg/ml 人多克隆 IgA 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 hIgA(1mg/ml)，在室温中轻微振荡 4h 后加入透析袋在 PBS 中 4℃ 透析过夜，透析完后加等量甘油于 -20℃ 中保存。

[0213] 10.1.3 将 10 μ g 纯化的 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别以碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 1 : 200 稀释包被 96 孔板，每种蛋白均包被 3 排复孔，4℃ 24h 后 PBST 洗 4-5 次，封闭液 (2% BSA 0.05% TWEEN-20) 封闭 37℃ 1h 后洗板，加入 1 : 2 倍比稀释的生物素标记的 hIgA 抗体（初始浓度为 2 μ g/ml），最后一孔不加，37℃ 45min 后洗板，加入亲和素 -HRP 复合物（购自 PIERCE 公司），37℃ 15min，37℃ 孵育 15min，PBST 洗涤 4 次，经 OPD 显色，2M 硫酸终止，酶标仪 (Bio Rad) 读取 A490 值；计算均值，Excel 绘制结合曲线。结果可见所有 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白均与 hIgA 结合，其中 3 个和 4 个 IgA 亲和体重分子与 hIgA 的结合有更为显著的结合优势（见图 11(1)）。图 11(A) 为 ELISA 检测 4 种人 IgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgA(A)、hIgG(B)、hIgG1-Fc(C) 和 hIgM(D) 的结合活性，图 11(A) 的横坐标为生物素标记的 hIgA 稀释度 (1)、生物素标记的 hIgG 稀释度 (2)、生物素标记的 hIgG1-Fc 稀释度 (3)、生物素标记的 hIgM 稀释度 (4)，纵坐标为 A490，即波长 490nm 的光吸收值；带“—■—”线条对应 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白；带“—▲—”线条对应 3 个 hIgA 亲和体融合蛋白；带“—○—”线条对应 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白；带“—×—”线条对应 1 个 hIgA 亲和体融合蛋白；带“—◆—”线条对应 pET-32a(+) 融合蛋白。

[0214] 10.2 与人多克隆 IgG 的结合：

[0215] 10.2.1 人多克隆 IgG 购自 Sigma 公司，生物素标记同 10.1.2。

[0216] 10.2.2 ELISA 方法同 10.1.3。结果可见 2-4 个 hIgA 亲和体重分子与 hIgG 有弱结合反应（见图 11(2)）。

[0217] 10.3 与人多克隆 IgG1-Fc 的结合：以生物素标记的 IgG1-Fc 进行与 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白的结合，方法同 10.1.3。结果可见 2-4 个 hIgA 亲和体重分子与 IgG1-Fc 有弱结合反应（见图 11(3)）。

[0218] 10.4 与人多克隆 IgM 的结合：

[0219] 10.4.1 人多克隆 IgM 购自 Sigma 公司，生物素标记同 10.1.2。

[0220] 10.4.2 ELISA 方法同 10.1.3。结果可见 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白均不与 hIgM 结合（见图 11(4)）。

[0221] 11、Western blot 检测 hIgA 亲和体融合蛋白与各类抗体及抗体片断的结合活性

[0222] 11.1 与 hIgA 的结合活性

[0223] 11.1.1 将 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白（各 5 μ g）经十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，分别以 pET-32a(+) 表达蛋白和 SPA 作为阴性对照和阳性对照。

[0224] 11.1.2 电泳结束，取出一块置于考马斯亮蓝染液中染色，另一块适当修剪，浸泡于转移缓冲液中准备转膜。

[0225] 11.1.3 剪 12 张与凝胶大小一致的滤纸与一张硝酸纤维素膜，带手套操作，将滤纸与硝酸纤维素膜用转膜缓冲液浸泡 15 分钟。

[0226] 11.1.4 将 6 张滤纸整齐叠放，凝胶置于其上（靠近负极），将硝酸纤维素膜（靠近

正极)置于凝胶上,再叠放6张滤纸。

[0227] 11.1.5 蛋白转移:300mA 稳流转膜 50min。

[0228] 11.1.6 转膜结束后加适量封闭液(含 0.01mol/L PBS、10%脱脂奶粉、0.1% Tween-20、0.2%柳硫汞)于 4℃封闭过夜。

[0229] 11.1.7 用 PBS 洗液漂洗去除封闭液,加入生物素标记 hIgA 抗体(封闭液 1:3000 稀释)37℃孵育 2h。

[0230] 11.1.8 用 PBS 洗液漂洗硝酸纤维素膜 6 遍,加入辣根过氧化酶标记的链亲和素(ABC 稀释液 1:500 稀释),37℃孵育 30min,用 PBS 洗液漂洗硝酸纤维素膜 6 次,加入底物 DAB 显色 5-10 分钟,出现棕色条带后立即用蒸馏水冲洗,终止显色反应。结果可见所有 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白均与 hIgA 结合,其中 3 个和 4 个 IgA 亲和体重分子与 hIgA 的结合有更为显著的结合优势;阴性对照未见反应条带(见图 12(A))。图 12(A)为 Western blot 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgA 的结合反应的结果图,且其中 1 表示 pET-32a(+) 融合蛋白,2 表示 1 个 hIgA 亲和体融合蛋白,3 表示 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白,4 表示 3 个 hIgA 亲和体融合蛋白,5 表示 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白,6 表示金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)。

[0231] 11.2 与 hIgG 的结合活性

[0232] 检测方法同 11.1。结果可见 2-4 个 hIgA 亲和体重分子与 hIgG 有弱结合反应(见图 12(B))。图 12(B)为 Western blot 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgG 的结合反应的结果图,且其中 1 表示 pET-32a(+) 融合蛋白,2 表示 1 个 hIgA 亲和体融合蛋白,3 表示 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白,4 表示 3 个 hIgA 亲和体融合蛋白,5 表示 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白,6 表示金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)。

[0233] 11.3 与 hIgG1-Fc 的结合活性

[0234] 检测方法同 11.1。结果可见 2-4 个 hIgA 亲和体重分子与 hIgG1-Fc 有弱结合反应,其中 2 个 hIgA 亲和体重分子与 hIgG1-Fc 的结合反应略强于与 hIgG 的结合(图 12(C))。图 12(C)为 Western blot 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgG1-Fc 的结合反应的结果图,且其中 1 表示 pET-32a(+) 融合蛋白,2 表示 1 个 hIgA 亲和体融合蛋白,3 表示 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白,4 表示 3 个 hIgA 亲和体融合蛋白,5 表示 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白,6 表示金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)。

[0235] 11.4 与 hIgM 的结合活性

[0236] 检测方法同 11.1。结果可见 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白不与 hIgM 结合(见图 12(D))。图 12(D)为 Western blot 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgM 的结合反应的结果图,且其中 1 表示 pET-32a(+) 融合蛋白,2 表示 1 个 hIgA 亲和体融合蛋白,3 表示 2 个 hIgA 亲和体融合蛋白,4 表示 3 个 hIgA 亲和体融合蛋白,5 表示 4 个 hIgA 亲和体融合蛋白,6 表示金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)。

[0237] 12、SPR 法检测 hIgA 亲和体融合蛋白与各类抗体的结合活性

[0238] 12.1 与 hIgA 的结合活性

[0239] 12.1.1 人多克隆 hIgA(浓度为 1mg/ml),用 10mM 的醋酸钠(pH 值分别为 5.0、4.5、5.0)以 1:5 稀释,以氨基共价耦连固相化到 CM-5 传感芯片。

[0240] 12.1.2 1-4 个 hIgA 亲和体分别以初始浓度 0.023mg/ml、0.021mg/ml、0.025mg/ml、

0.024mg/ml 开始,用 HEPES 缓冲液 (10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005% surfactant P20) 作为稀释液,以 1 : 2 倍比稀释。以 40 μ l/min 的流速对各个稀释度样品分别进行检测。芯片用 100mM 甘氨酸盐酸缓冲液 (pH 2.5) 进行再生。数据以 BiacoreT100 评价软件进行分析。结果可见所有 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白均与 hIgA 结合,其中 3 个和 4 个 IgA 亲和体重分子与 hIgA 的结合有更为显著的结合优势 (见图 13(A))。图 13(A) 为表面等离子共振 (SPR) 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgA 分子的结合反应结果图,其中,横坐标为作用时间 (秒),纵坐标为共振单位 (RU),且 SEG1,SEG2 分别代表 2 种 hIgA 亲和体,图中 6 条曲线代表 6 个稀释度,由上至下按 1 : 2 倍比依次稀释。

[0241] 12.2 与 hIgG 的结合活性

[0242] 检测方法同 12.1 ;1-4 个 hIgA 亲和体分别以初始浓度 0.231mg/ml、0.212mg/ml、0.251mg/ml、0.243mg/ml 开始,用 HEPES 缓冲液 (10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005% surfactant P20) 作为稀释液,以 1 : 2 倍比稀释。结果可见 2-4 个 hIgA 亲和体重分子与 hIgG 有弱结合反应,未检测出 1 个 hIgA 亲和体与 hIgG 的结合作用 (见图 13(B))。图 13(B) 为表面等离子共振 (SPR) 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgG 分子的结合反应结果图,其中,横坐标为作用时间 (秒),纵坐标为共振单位 (RU),且 SEG1,SEG2 分别代表 2 种 hIgA 亲和体,图中 6 条曲线代表 6 个稀释度,由上至下按 1 : 2 倍比依次稀释。

[0243] 12.3 与 hIgM 的结合活性

[0244] 检测方法同 12.1 ;1-4 个 hIgA 亲和体分别以初始浓度 0.231mg/ml、0.212mg/ml、0.251mg/ml、0.243mg/ml 开始,用 HEPES 缓冲液 (10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005% surfactant P20) 作为稀释液,以 1 : 2 倍比稀释。结果可见 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白不与 hIgM 结合 (见图 13(C))。图 13(C) 为表面等离子共振 (SPR) 法检测 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别与 hIgM 分子的结合反应结果图,其中,横坐标为作用时间 (秒),纵坐标为共振单位 (RU),且 SEG1,SEG2 分别代表 2 种 hIgA 亲和体,图中 6 条曲线代表 6 个稀释度,由上至下按 1 : 2 倍比依次稀释。

[0245] 13、竞争 ELISA 检测 hIgA 亲和体融合蛋白与不同抗体的结合活性

[0246] 13.1 hIgA 亲和体结合 hIgA 的竞争抑制 ELISA 试验

[0247] 13.1.1 人多克隆 IgA 购自 Sigma 公司,生物素标记同 10.1.2。

[0248] 13.1.2 将 10 μ g 纯化的 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白分别以碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 1 : 200 稀释包被 96 孔板,每种蛋白均包被 3 排复孔,另包一排用于不加竞争蛋白组,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,同时加入 0.1 μ M 生物素标记的 hIgA (b-hIgA) 和倍比稀释的 4 种竞争蛋白 (SEG1、SEG1-SEG2、SEG1-SEG1-SEG1、SEG2-SEG1-SEG2-SEG1) (初始浓度均为 1 μ M),以同时加入 b-hIgA 和 pET-32a(+) 表达蛋白作为阴性对照,37 $^{\circ}$ C 45min 后洗板,加入亲和素-HRP 复合物,37 $^{\circ}$ C 15min,洗板后 TMB 显色,2M 硫酸终止,酶标仪读取 A450 值。计算各复孔的 A450 均值,Excel 绘制竞争抑制曲线,抑制百分数 = $(A - A_x) 100 / A$ (单位%, A 代表不加抑制蛋白组的吸光度均值, A_x 表示在各种抑制浓度下的三个复孔的 A450 均值)。图 14 为 1-4 个 hIgA 亲和体融合蛋白 (A, B, C, D) 结合生物素标记的 hIgA (b-hIgA) 的竞争抑制以及 2-4 个 hIgA 亲和体融合蛋白 (E, F, G) 结合生物素标记的 hIgG (b-hIgG) 的竞争抑制,其中,横坐标为 $\log(\text{inhibitor})$ (nM),即抑制因子浓度对数值;纵坐标为 Percent of inhibition,即抑制

百分数。结果可见 1-2 个 hIgA 亲和体抑制 hIgA 与 3-4 个 hIgA 亲和体重复体结合的作用很低,远低于 3-4 个 hIgA 亲和体重复体对此的抑制作用(见图 14(A-B)),而 4 种 hIgA 亲和体融合蛋白均能有效抑制 hIgA 和 1-2 个 hIgA 亲和体的结合(见图 14(C-D)),说明 3-4 个 hIgA 亲和体重复体与 hIgA 有明显的结合优势。

[0249] 13.2 hIgA 亲和体结合 hIgG 的竞争抑制 ELISA 试验

[0250] 13.2.1 人多克隆 IgG 购自 Sigma 公司,生物素标记同 10.1.2。

[0251] 13.2.2 试验方法同 13.1.2,同时加入生物素标记的 hIgG 和倍比稀释的 4 种竞争蛋白或 pET-32a(+) 表达蛋白进行检测。结果可见除 1 个 hIgA 亲和体外,2-4 个 hIgA 亲和体重复体均能分别有效抑制其自身与 hIgG 的结合(见图 14(E-G))。

[0252] 14、新型 hIgA 亲和体重复体的分子内结合模式的证实

[0253] 14.1 ELISA 检测 hIgA 和 hIgG 经二巯基乙醇(BME)处理前后与 hIgA 亲和体重复体的结合反应

[0254] 14.1.1 ELISA 检测 hIgA 经 BME 处理前后与 hIgA 亲和体重复体的结合反应

[0255] 14.1.1.1 多克隆 hIgA 购自 Sigma 公司。

[0256] 14.1.1.2 分别取 10 μ g 多克隆 hIgA 加 50mM 二巯基乙醇(BME),于室温反应 2h 后,分别经变性的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和非变性的 SDS-PAGE 电泳,以不加 BME 处理的 hIgA 作为对照。电泳结束,凝胶置于考马斯亮蓝染液中染色。如图 15(A)的变性条件下 hIgA 和 hIgG 经 BME 处理前后的 SDS-PAGE 结果示意图中所示,经变性的 SDS-PAGE 电泳,hIgA 加或不加 BME 处理均解离为轻链和重链 2 个片段(其余条带为多聚体或非特异性条带)。如图 15(B)的非变性条件下 hIgA 和 hIgG 经 BME 处理前后的 SDS-PAGE 结果示意图中所示,经非变性的 SDS-PAGE 电泳时,只有加 BME 处理的 hIgA 解离为轻链和重链 2 个片段(其余条带为多聚体或非特异性条带),未加 BME 处理的 hIgA 因分子量过大未游离出加样孔,故未显示出电泳条带,说明 hIgA 经 BME 处理后可完全解离为单链。

[0257] 14.1.1.3 将 BME(50mM)处理前后的 hIgA 各 10 μ g 分别以碳酸盐缓冲液(pH9.6)包被 96 孔板,每种抗体包被 3 排复孔,另包一排 pET-32a(+) 表达蛋白作为阴性对照,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,分别加入 1:2 倍比稀释的生物素标记的 2 个或 4 个 hIgA 亲和体重复体(初始 1:200 稀释)(生物素标记方法同 10.1.2),37 $^{\circ}$ C 45min 后洗板,加入亲和素-HRP 复合物(购自 PIERCE 公司);阳性对照孔加 1:2 倍比稀释的 HRP 标记的抗 hIgA(初始 1:200 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 15min,PBST 洗涤 4 次,经 TMB 显色,2M 硫酸终止,酶标仪(Bio Rad)读取 A450 值;计算均值,Excel 绘制结合曲线。结果可见,hIgA 经 BME 还原处理前后,4 个 hIgA 亲和体重复体与其结合作用显著下降(见图 16(A)),而 2 个 hIgA 亲和体重复体与其的结合并无明显变化(见图 16(B)),抗 hIgA 与还原前后的 hIgA 的结合作用也无明显变化(见图 16(E)),提示 4 个 hIgA 亲和体重复体与 hIgA 的结合存在分子内的亲合力效应。

[0258] 14.1.1.4 将 2 个和 4 个 hIgA 亲和体重复体各 5 μ g 分别以碳酸盐缓冲液(pH9.6)包被 96 孔板,每种抗体包被 3 排复孔,另包一排 pET-32a(+) 表达蛋白作为阴性对照,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,分别加入 BME(50mM)处理前后的生物素标记的 hIgA(1:2 倍比稀释,初始 1:200 稀释)(生物素标记方法同 10.1.2),37 $^{\circ}$ C 45min 后洗板,加入亲和素-HRP 复合物(购自 PIERCE 公司),

37℃孵育 15min, PBST 洗涤 4 次, 经 TMB 显色, 2M 硫酸终止, 酶标仪 (Bio Rad) 读取 A450 值; 计算均值, Excel 绘制结合曲线。结果可见, 4 个 hIgA 亲和体重复体与还原后 hIgA 的结合作用显著下降, 而 2 个 hIgA 亲和体重复体与还原前后 hIgA 的结合作用并无明显变化 (见图 16(C)), 提示 4 个 hIgA 亲和体重复体与 hIgA 的结合存在分子内的亲合力效应。

[0259] 14. 1. 2 ELISA 检测 hIgG 经 BME 处理前后与 hIgA 亲和体重复体的结合反应

[0260] 14. 1. 2. 1 多克隆 hIgG 购自 Sigma 公司。

[0261] 14. 1. 2. 2 多克隆 hIgG 经 BME 处理方法及经 SDS-PAGE 电泳同 14. 1. 1. 2。结果可见经变性的 SDS-PAGE 电泳, hIgG 加或不加 BME 处理均解离为轻链和重链 2 个片段 (见图 15(A)); 而经非变性的 SDS-PAGE 电泳时, 只有加 BME 处理的 hIgG 解离为轻链和重链 2 个片段, 未加 BME 处理的 hIgG 因分子量过大未游离出加样孔, 故未显示出电泳条带 (见图 15(B)), 说明 hIgG 经 BME 处理后可完全解离为单链。

[0262] 14. 1. 2. 3 ELISA 检测 hIgG 经 BME 处理前后与 2 个和 4 个 hIgA 亲和体重复体的结合反应方法同 14. 1. 1. 3 和 14. 1. 1. 4。结果可见, 当抗体包被时, hIgG 经 BME 还原处理后, 2 个和 4 个 hIgA 亲和体重复体与 hIgA 的结合作用均显著下降 (见图 16(A 和 B)); 而当 hIgA 亲和体重复体包被时, 经 BME 处理前后的 hIgG 与 2 个或 4 个 hIgA 亲和体重复体的结合作用并无明显变化 (见图 16(D)); 抗 hIgG 与还原前后的 hIgG 的结合作用也无明显变化 (见图 16(F)), 提示 2 个和 4 个 hIgA 亲和体重复体与 hIgG 的结合既存在分子间的亲和力, 也存在分子内的亲合力效应。

[0263] 14. 2 Dot blot 检测 hIgA 和 hIgG 经二巯基乙醇 (BME) 处理前后与 hIgA 亲和体重复体的结合反应

[0264] 14. 2. 1 Dot blot 检测 hIgA 经 BME 处理前后与 hIgA 亲和体重复体的结合反应

[0265] 14. 2. 1. 1 多克隆 hIgA 购自 Sigma 公司。

[0266] 14. 2. 1. 2 多克隆 hIgA 经 BME 处理方法同 14. 1. 1. 2。hIgA 亲和体重复体的生物素标记同 10. 1. 2。

[0267] 14. 2. 1. 3 将 BME (50mM) 处理前后的 hIgA 各 3 μ g 分别用 PBS 以 1 : 2 倍比稀释 (初始 1 : 4 稀释) 依次点样于硝酸纤维素膜 (Millipore 公司产品) 上, 共点样 3 张膜, 晾干后加适量封闭液 (含 0. 01mol/L PBS、10% 脱脂奶粉、0. 1% Tween-20、0. 2% 柳硫汞) 室温封闭 2h, 用 PBS 洗液漂洗去除封闭液, 其中 2 张膜分别加入 1 : 50 生物素标记的 2 个或 4 个 hIgA 亲和体重复体 2ml, 另 1 张膜加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 hIgA 作为阳性对照, 37℃反应 2h, 用 PBS 洗液漂洗硝酸纤维素膜 6 遍, 前 2 张膜加入 HRP 标记的链亲和素 (ABC 稀释液 1 : 500 稀释), 37℃孵育 30min, 随后 3 张膜均用 PBS 洗液漂洗硝酸纤维素膜 6 次, 加入底物 DAB 显色 5-10 分钟, 出现棕色斑点后立即用蒸馏水冲洗, 终止显色反应。结果可见, hIgA 经 BME 还原处理前后, 2 个 hIgA 亲和体重复体与其的结合并无明显变化 (见图 17(1)), 而 4 个 hIgA 亲和体重复体与其结合作用显著下降 (见图 17(2)), 抗 hIgA 与还原前后的 hIgA 的结合作用也无明显变化 (见图 17(5)), 提示 4 个 hIgA 亲和体重复体可同时与 hIgA 的两条链结合而产生分子内的亲合力效应。

[0268] 14. 2. 2 Dot blot 检测 hIgG 经 BME 处理前后与 hIgA 亲和体重复体的结合反应

[0269] 14. 2. 2. 1 多克隆 hIgG 购自 Sigma 公司。

[0270] 14. 2. 2. 2 多克隆 hIgG 经 BME 处理方法同 14. 1. 1. 2。hIgA 亲和体重复体的生物

素标记同 10.1.2。

[0271] 14.2.2.3Dot blot 检测 hIgG 经 BME 处理前后与 2 个和 4 个 hIgA 亲和体重复体结合反应方法同 14.2.1.3。结果可见, hIgG 经 BME 处理后, 2 个或 4 个 hIgA 亲和体重复体与其结合作用下降, 但下降作用并不十分显著 (见图 17(3), (4)); 抗 hIgG 与还原前后的 hIgG 的结合作用无明显变化 (见图 17(6)), 提示 2 个和 4 个 hIgA 亲和体重复体与 hIgG 的结合既存在分子间的亲和力, 也存在分子内的亲合力效应。

[0272] 15. 从正常人血清中回收 hIgA 及其鉴定

[0273] 15.1 亲和层析法从正常人血清中回收 hIgA

[0274] 15.1.1 Sepharose-4B 层析柱购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。

[0275] 15.1.2 将 5mg 4 个 hIgA 亲和体重复体融合蛋白偶联吸附于层析柱, 具体步骤按试剂手册操作进行。

[0276] 15.1.3 将 5ml 正常人血清于室温过 4 个 hIgA 亲和体重复体融合蛋白偶联的 Sepharose-4B 层析柱, 依次用 10ml 0.01M 磷酸盐溶液 (pH 7.5) 和 2ml 5mM 醋酸氨溶液 (pH5.5) 液涤弃除非结合蛋白。

[0277] 15.1.4 换用 50mM 醋酸 (pH 3.0) 洗脱, 收集洗脱液。

[0278] 15.2 SDS-PAGE 电泳检测亲和层析洗脱液目的片段 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 12V/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。结果可见洗脱液 (E) 中回收到预期的 hIgA, 同时也回收到少量 hIgG 和 hIgM, 提示 4 个 hIgA 亲和体重复体融合蛋白具有与 hIgG 和 hIgM 结合的残存活性 (见图 18-A)。

[0279] 15.3 Western blot 检测亲和层析洗脱液与各类抗 Ig 的结合活性

[0280] 15.3.1 与抗 hIgA 的结合活性

[0281] 15.3.1.1 将正常人血清和上述亲和层析洗脱液各 10 μ l 经 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束, 取出凝胶适当修剪, 浸泡于转移缓冲液中准备转膜。

[0282] 15.3.1.2 剪 12 张与凝胶大小一致的滤纸与一张硝酸纤维素膜, 带手套操作, 将滤纸与硝酸纤维素膜用转膜缓冲液浸泡 15 分钟。

[0283] 15.3.1.3 将 6 张滤纸整齐叠放, 凝胶置于其上 (靠近负极), 将硝酸纤维素膜 (靠近正极) 置于凝胶上, 再叠放 6 张滤纸。

[0284] 15.3.1.4 蛋白转移: 300mA 稳流转膜 50min。

[0285] 15.3.1.5 转膜结束后加适量封闭液 (含 0.01mol/L PBS、10% 脱脂奶粉、0.1% Tween-20、0.2% 柳硫汞) 于 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。

[0286] 15.3.1.6 用 PBS 洗液漂洗去除封闭液, 加入辣根过氧化酶 (HRP) 标记的抗 hIgA 单克隆抗体 (封闭液 1 : 3000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

[0287] 15.3.1.7 用 PBS 洗液漂洗硝酸纤维素膜 6 次, 加入底物 DAB 显色 5-10 分钟, 出现棕色条带后立即用蒸馏水冲洗, 终止显色反应。结果可见洗脱液中含有与抗 hIgA 单克隆抗体特异结合的 hIgA 分子 (见图 18-C)。

[0288] 15.3.2 与抗 hIgG 的结合活性

[0289] 检测方法同 15.3.1。结果可见洗脱液中含有与抗 hIgG 单克隆抗体特异结合的

hIgG 分子,可能是由于 4 个 hIgA 亲和体重复融合蛋白可通过其分子内亲合力效应保留了与 hIgG 结合的残留活性(见图 18-D)。

[0290] 15.3.3 与抗 hIgM 的结合活性

[0291] 检测方法同 15.3.1。结果可见洗脱液中含有与抗 hIgM 单克隆抗体特异结合的 hIgM 分子,可能是由于偶联在亲和层析柱上的 4 个 hIgA 亲和体重复分子通过与血清中 hIgM 五聚体的 VH3 结合而将少量 hIgM 吸附回收(见图 18-E)。

[0292] 序列表

[0293] <110> 中国人民解放军第二军医大学

[0294] <120> 具有分子内亲合力效应的人 IgA 免疫球蛋白结合分子

[0295] <130>091834

[0296] <160>14

[0297] <170>PatentIn version 3.5

[0298] <210>1

[0299] <211>58

[0300] <212>PRT

[0301] <213>Homo sapiens

[0302] <400>1

[0303] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile

[0304] 1 5 10 15

[0305] Arg Leu Leu Pro Asn Leu Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His

[0306] 20 25 30

[0307] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

[0308] 35 40 45

[0309] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

[0310] 50 55

[0311] <210>2

[0312] <211>58

[0313] <212>PRT

[0314] <213>Homo sapiens

[0315] <400>2

[0316] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Lys Ile Ile Ala Ser Arg Glu Ile

[0317] 1 5 10 15

[0318] Arg Glu Leu Pro Asn Leu Asn His Gln Gln Lys Leu Ala Phe Ile His

[0319] 20 25 30

[0320] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

[0321] 35 40 45

[0322] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

[0323] 50 55

[0324] <210>3

[0325] <211>61
 [0326] <212>PRT
 [0327] <213>Homo sapiens
 [0328] <400>3
 [0329] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile
 [0330] 1 5 10 15
 [0331] Arg Leu Leu Pro Asn Leu Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His
 [0332] 20 25 30
 [0333] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 [0334] 35 40 45
 [0335] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Arg Ala Ile
 [0336] 50 55 60
 [0337] <210>4
 [0338] <211>61
 [0339] <212>PRT
 [0340] <213>Homo sapiens
 [0341] <400>4
 [0342] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Lys Ile Ile Ala Ser Arg Glu Ile
 [0343] 1 5 10 15
 [0344] Arg Glu Leu Pro Asn Leu Asn His Gln Gln Lys Leu Ala Phe Ile His
 [0345] 20 25 30
 [0346] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 [0347] 35 40 45
 [0348] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Arg Phe Tyr
 [0349] 50 55 60
 [0350] <210>5
 [0351] <211>122
 [0352] <212>PRT
 [0353] <213>Homo sapiens
 [0354] <400>5
 [0355] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Lys Ile Ile Ala Ser Arg Glu Ile
 [0356] 1 5 10 15
 [0357] Arg Glu Leu Pro Asn Leu Asn His Gln Gln Lys Leu Ala Phe Ile His
 [0358] 20 25 30
 [0359] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 [0360] 35 40 45
 [0361] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Asn Pro Ser Val Asp Asn
 [0362] 50 55 60
 [0363] Lys Phe Asn Lys Glu Lys Ile Ile Ala Ser Arg Glu Ile Arg Glu Leu

[0364] 65 70 75 80
 [0365] Pro Asn Leu Asn His Gln Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu
 [0366] 85 90 95
 [0367] Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 [0368] 100 105 110
 [0369] Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Thr Cys Gln
 [0370] 115 120
 [0371] <210>6
 [0372] <211>122
 [0373] <212>PRT
 [0374] <213>Homo sapiens
 [0375] <400>6
 [0376] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile
 [0377] 1 5 10 15
 [0378] Arg Leu Leu Pro Asn Leu Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His
 [0379] 20 25 30
 [0380] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 [0381] 35 40 45
 [0382] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Gln Ile Thr Val Asp Asn
 [0383] 50 55 60
 [0384] Lys Phe Asn Lys Glu Lys Ile Ile Ala Ser Arg Glu Ile Arg Glu Leu
 [0385] 65 70 75 80
 [0386] Pro Asn Leu Asn His Gln Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu
 [0387] 85 90 95
 [0388] Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 [0389] 100 105 110
 [0390] Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Cys Met
 [0391] 115 120
 [0392] <210>7
 [0393] <211>183
 [0394] <212>PRT
 [0395] <213>Homo sapiens
 [0396] <400>7
 [0397] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile
 [0398] 1 5 10 15
 [0399] Arg Leu Leu Pro Asn Leu Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His
 [0400] 20 25 30
 [0401] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 [0402] 35 40 45

[0403] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Arg Ser His Val Asp Asn
 [0404] 50 55 60
 [0405] Lys Phe Asn Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Leu Leu
 [0406] 65 70 75 80
 [0407] Pro Asn Leu Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu
 [0408] 85 90 95
 [0409] Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 [0410] 100 105 110
 [0411] Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Gly Arg Val Asp Asn Lys Phe Asn
 [0412] 115 120 125
 [0413] Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Leu Leu Pro Asn Leu
 [0414] 130 135 140
 [0415] Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu Asp Asp Pro
 [0416] 145 150 155 160
 [0417] Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 [0418] 165 170 175
 [0419] Gln Ala Pro Lys Thr Gly His
 [0420] 180
 [0421] <210>8
 [0422] <211>183
 [0423] <212>PRT
 [0424] <213>Homo sapiens
 [0425] <400>8
 [0426] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile
 [0427] 1 5 10 15
 [0428] Arg Leu Leu Pro Asn Leu Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His
 [0429] 20 25 30
 [0430] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 [0431] 35 40 45
 [0432] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Lys Asp Val Asp Asn
 [0433] 50 55 60
 [0434] Lys Phe Asn Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Leu Leu
 [0435] 65 70 75 80
 [0436] Pro Asn Leu Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu
 [0437] 85 90 95
 [0438] Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 [0439] 100 105 110
 [0440] Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Met Lys Thr Val Asp Asn Lys Phe Asn
 [0441] 115 120 125

[0442] Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Leu Leu Pro Asn Leu
 [0443] 130 135 140
 [0444] Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu Asp Asp Pro
 [0445] 145 150 155 160
 [0446] Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 [0447] 165 170 175
 [0448] Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala
 [0449] 180
 [0450] <210>9
 [0451] <211>256
 [0452] <212>PRT
 [0453] <213>Homo sapiens
 [0454] <400>9
 [0455] Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Lys Ile Ile Ala Ser Arg Glu Ile
 [0456] 1 5 10 15
 [0457] Arg Glu Leu Pro Asn Leu Asn His Gln Gln Lys Leu Ala Phe Ile His
 [0458] 20 25 30
 [0459] Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 [0460] 35 40 45
 [0461] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Arg His Gly Val Asp Asn
 [0462] 50 55 60
 [0463] Lys Phe Asn Lys Glu Thr Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Leu Leu
 [0464] 65 70 75 80
 [0465] Pro Asn Leu Asn Gly Arg Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu
 [0466] 85 90 95
 [0467] Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 [0468] 100 105 110
 [0469] Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Asn Leu Asn Val Asp Asn Lys Phe Asn
 [0470] 115 120 125
 [0471] Lys Glu Lys Ile Ile Ala Ser Arg Glu Ile Arg Glu Leu Pro Asn Leu
 [0472] 130 135 140
 [0473] Asn His Gln Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu Asp Asp Pro
 [0474] 145 150 155 160
 [0475] Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 [0476] 165 170 175
 [0477] Gln Ala Pro Lys Thr Lys Asp Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr
 [0478] 180 185 190
 [0479] Ile Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Leu Leu Pro Asn Leu Asn Gly Arg
 [0480] 195 200 205

[0481]	Gln Lys Leu Ala Phe Ile His Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser		
[0482]	210	220	
[0483]	Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro		
[0484]	225	235	240
[0485]	Lys Ser Arg His Leu Tyr Ser Ser Glu Arg Ala Arg Gly His Ile Ser		
[0486]	245	250	255
[0487]	<210>10		
[0488]	<211>366		
[0489]	<212>DNA		
[0490]	<213>Homo sapiens		
[0491]	<400>10		
[0492]	gttgacaaca aattcaacaa agaaaaaatc atcgcttctc gtgaaatccg tgaactgccg	60	
[0493]	aacctgaacc accagcagaa actggctttc atccactctc tgcctggacga cccgtctcag	120	
[0494]	tctgctaacc tgcctggctga agctaaaaaaaa ctgaacgacg ctcaggctcc gaaaaaccg	180	
[0495]	tctgttgaca acaaattcaa caaagaaaaa atcatcgctt ctcctgaaat cctggaactg	240	
[0496]	ccgaacctga accaccagca gaaactggct tcatccact cctctctgga cgaccctct	300	
[0497]	cagtctgcta acctgctggc tgaagctaaa aaactgaacg acgctcaggc tccgaaaacc	360	
[0498]	tgtcaa	366	
[0499]	<210>11		
[0500]	<211>366		
[0501]	<212>DNA		
[0502]	<213>Homo sapiens		
[0503]	<400>11		
[0504]	gttgacaaca aattcaacaa agaaaccatc caggcttctc aggaaatccg tctgctgccg	60	
[0505]	aacctgaacg gtcctcagaa actggctttc atccactctc tgcctggacga cccgtctcag	120	
[0506]	tctgctaacc tgcctggctga agctaaaaaaaa ctgaacgacg ctcaggctcc gaaacagatt	180	
[0507]	accgttgaca acaaattcaa caaagaaaaa atcatcgctt ctcctgaaat cctggaactg	240	
[0508]	ccgaacctga accaccagca gaaactggct tcatccact cctctctgga cgaccctct	300	
[0509]	cagtctgcta acctgctggc tgaagctaaa aaactgaacg acgctcaggc tccgaaaata	360	
[0510]	tgcattg	366	
[0511]	<210>12		
[0512]	<211>549		
[0513]	<212>DNA		
[0514]	<213>Homo sapiens		
[0515]	<400>12		
[0516]	gttgacaaca aattcaacaa agaaaccatc caggcttctc aggaaatccg tctgctgccg	60	
[0517]	aacctgaacg gtcctcagaa actggctttc atccactctc tgcctggacga cccgtctcag	120	
[0518]	tctgctaacc tgcctggctga agctaaaaaaaa ctgaacgacg ctcaggctcc gaaacggagt	180	
[0519]	catgttgaca acaaattcaa caaagaaacc atccaggctt ctcaggaaat cctctctctg	240	

[0520]	ccgaacctga acggtcgtca gaaactggct ttcattccact ctctgctgga cgacctgtct	300
[0521]	cagtctgcta acctgctggc tgaagctaaa aaactgaacg acgctcagge tccgaaagcg	360
[0522]	ggacgagttg acaacaaatt caacaaagaa accatccagg cttctcagga aatccgtctg	420
[0523]	ctgccgaacc tgaacggtcg tcagaaactg gctttcatcc actctctgct ggacgacctg	480
[0524]	tctcagtctg ctaacctgct ggctgaagct aaaaaactga acgacgctca ggctccgaaa	540
[0525]	acaggccac	549
[0526]	<210>13	
[0527]	<211>549	
[0528]	<212>DNA	
[0529]	<213>Homo sapiens	
[0530]	<400>13	
[0531]	gttgacaaca aattcaacaa agaaaccatc caggcttctc aggaaatccg tctgctgccg	60
[0532]	aacctgaacg gtcgtcagaa actggctttc atccactctc tgcctggacga cccgtctcag	120
[0533]	tctgctaacc tgcctggctga agctaaaaaa ctgaacgacg ctcaggctcc gaaagttaaa	180
[0534]	gatggtgaca acaaattcaa caaagaaacc atccaggctt ctcaggaaat cctctctctg	240
[0535]	ccgaacctga acggtcgtca gaaactggct ttcattccact ctctgctgga cgacctgtct	300
[0536]	cagtctgcta acctgctggc tgaagctaaa aaactgaacg acgctcagge tccgaaaatg	360
[0537]	aagacggttg acaacaaatt caacaaagaa accatccagg cttctcagga aatccgtctg	420
[0538]	ctgccgaacc tgaacggtcg tcagaaactg gctttcatcc actctctgct ggacgacctg	480
[0539]	tctcagtctg ctaacctgct ggctgaagct aaaaaactga acgacgctca ggctccgaaa	540
[0540]	gccgacgct	549
[0541]	<210>14	
[0542]	<211>732	
[0543]	<212>DNA	
[0544]	<213>Homo sapiens	
[0545]	<400>14	
[0546]	gttgacaaca aattcaacaa agaaaaaatc atcgcttctc gtgaaatccg tgaactgccg	60
[0547]	aacctgaacc accagcagaa actggctttc atccactctc tgcctggacga cccgtctcag	120
[0548]	tctgctaacc tgcctggctga agctaaaaaa ctgaacgacg ctcaggctcc gaaacgtcac	180
[0549]	ggggttgaca acaaattcaa caaagaaacc atccaggctt ctcaggaaat cctctctctg	240
[0550]	ccgaacctga acggtcgtca gaaactggct ttcattccact ctctgctgga cgacctgtct	300
[0551]	cagtctgcta acctgctggc tgaagctaaa aaactgaacg acgctcagge tccgaaaaat	360
[0552]	ctgaacggtg acaacaaatt caacaaagaa aaaatcatcg cttctcgtga aatccgtgaa	420
[0553]	ctgccgaacc tgaaccacca gcagaaactg gctttcatcc actctctgct ggacgacctg	480
[0554]	tctcagtctg ctaacctgct ggctgaagct aaaaaactga acgacgctca ggctccgaaa	540
[0555]	actaaagatg ttgacaacaa attcaacaaa gaaaccatcc aggettctca ggaaatccgt	600
[0556]	ctgctgccga acctgaacgg tcgtcagaaa ctggctttca tccactctct gctggacgac	660
[0557]	ccgtctcagt ctgtaacct gctggctgaa gctaaaaaac tgaacgacgc tcaggctccg	720
[0558]	aaaagccgcc at	732

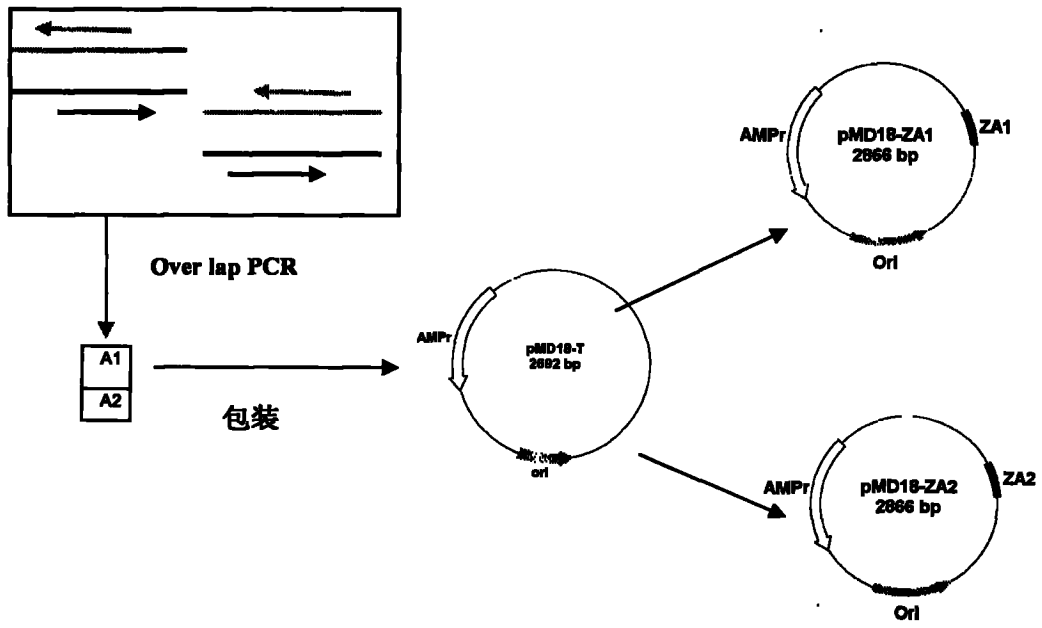


图 1

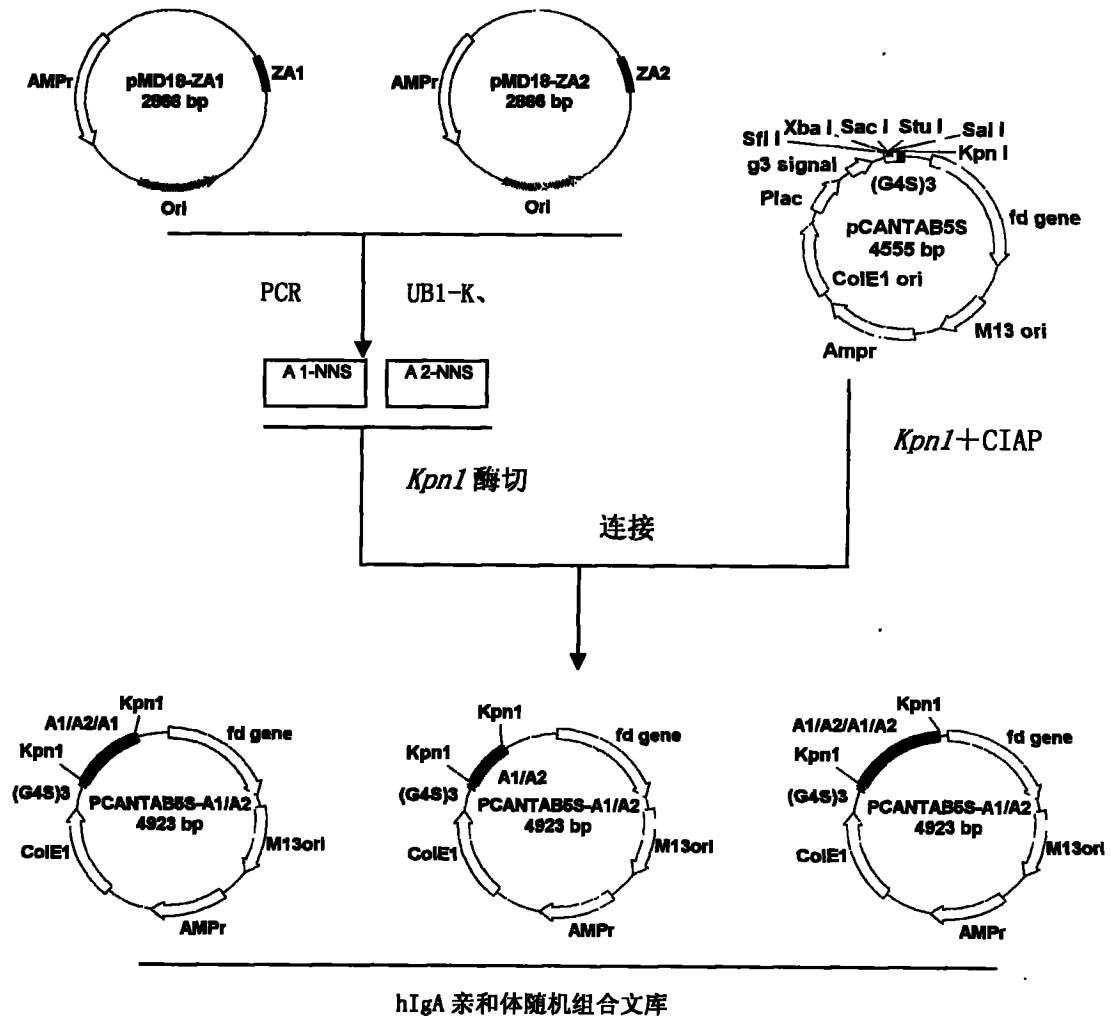


图 2

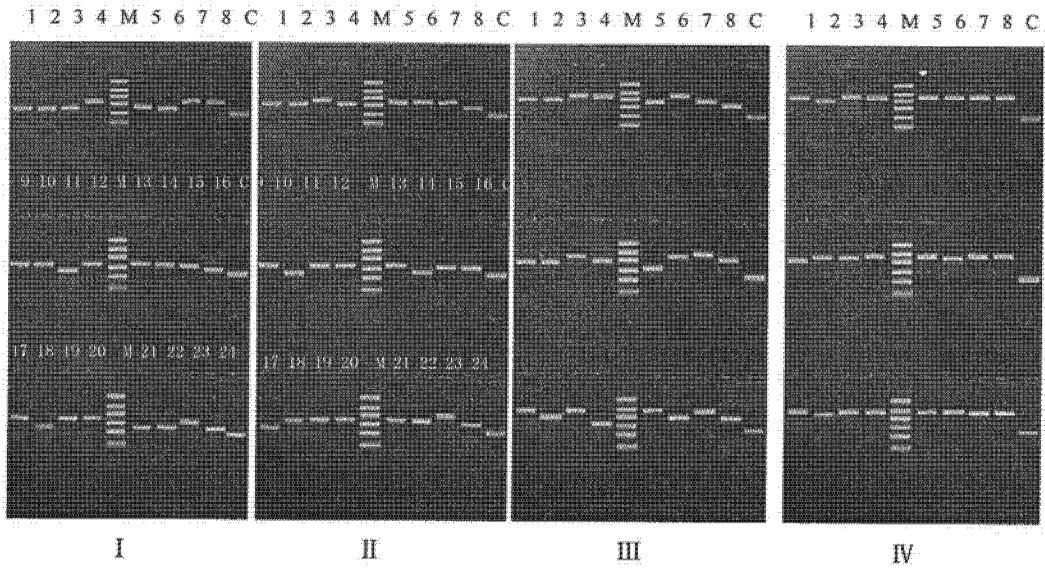


图 3

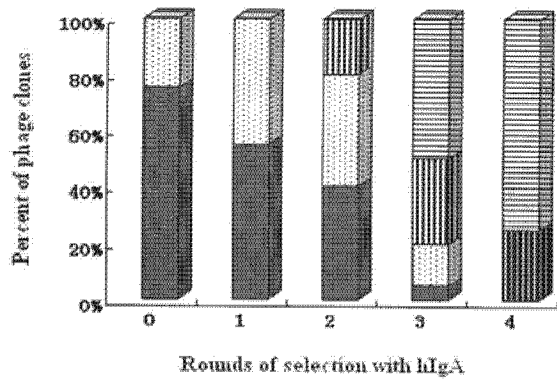


图 4

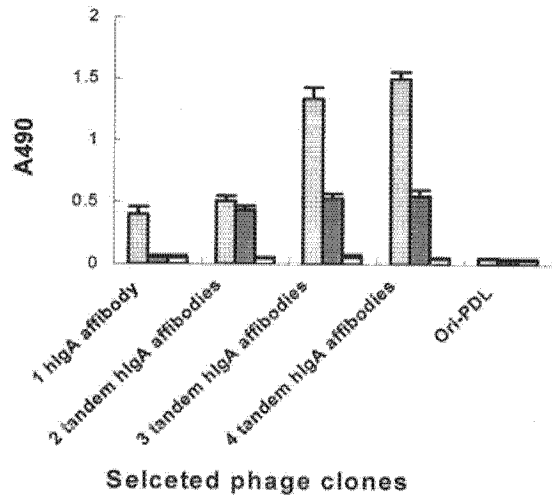


图 5

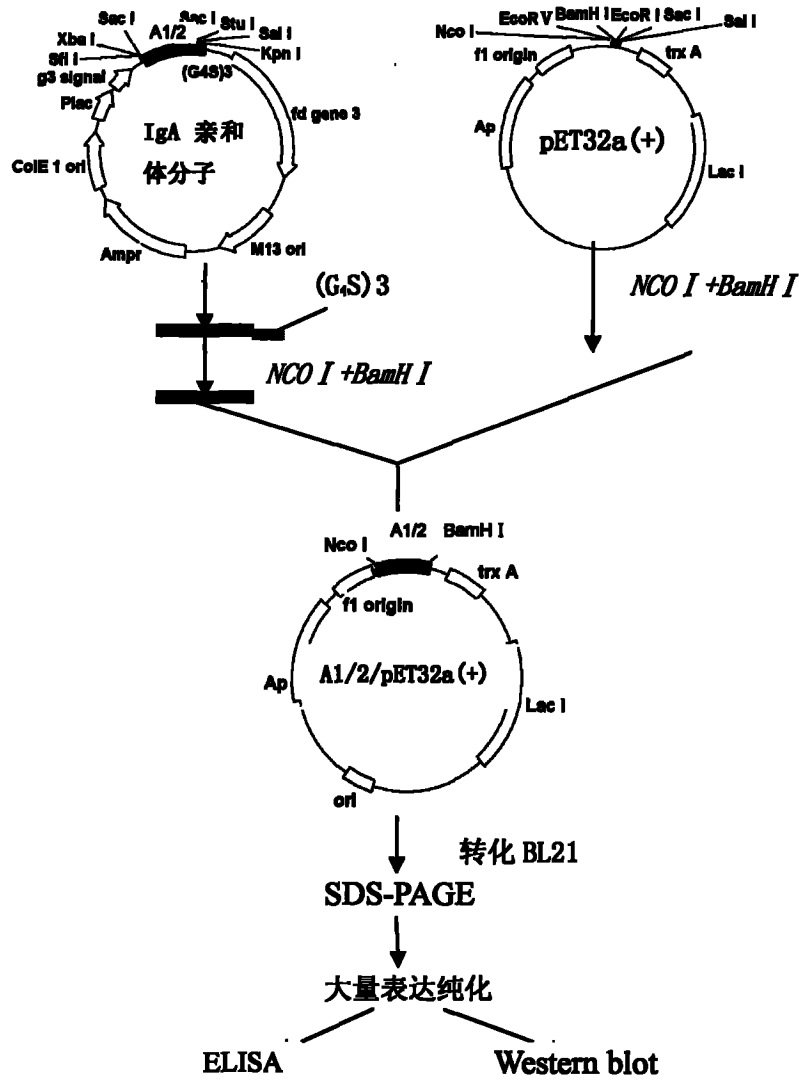


图 6

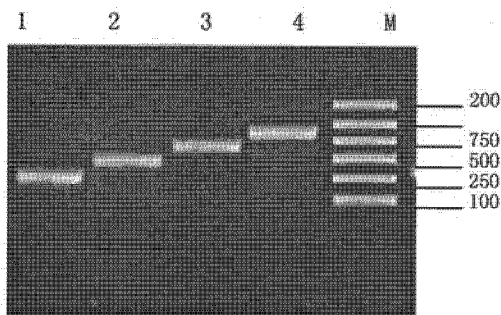


图 7

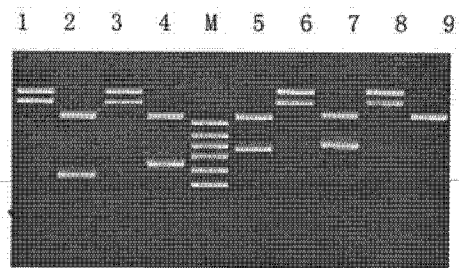


图 8

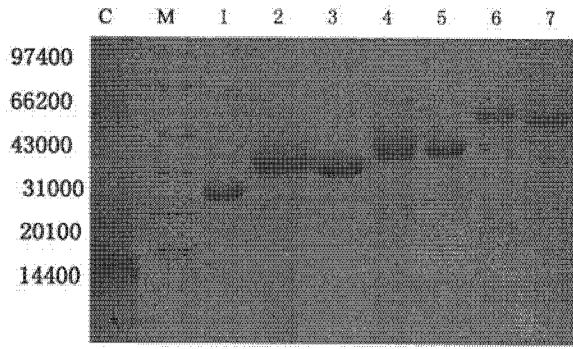


图 9

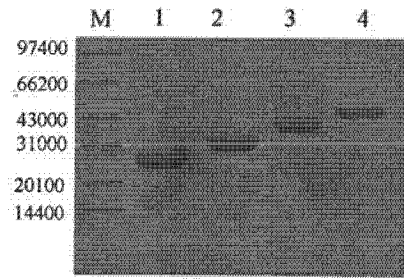


图 10

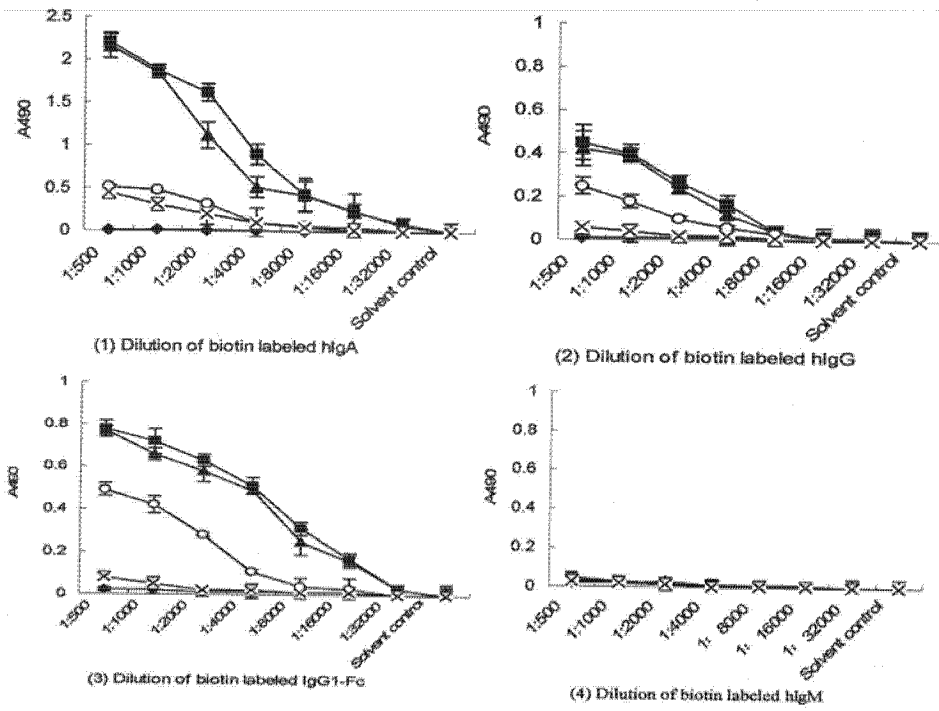


图 11

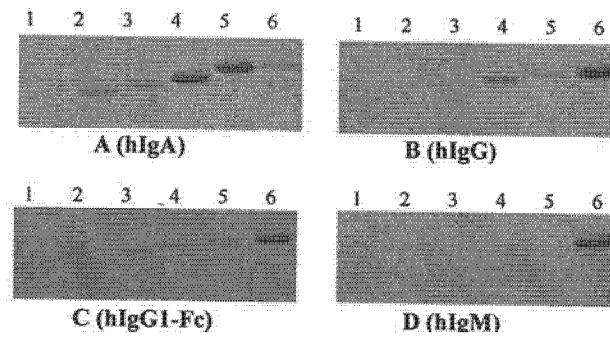


图 12

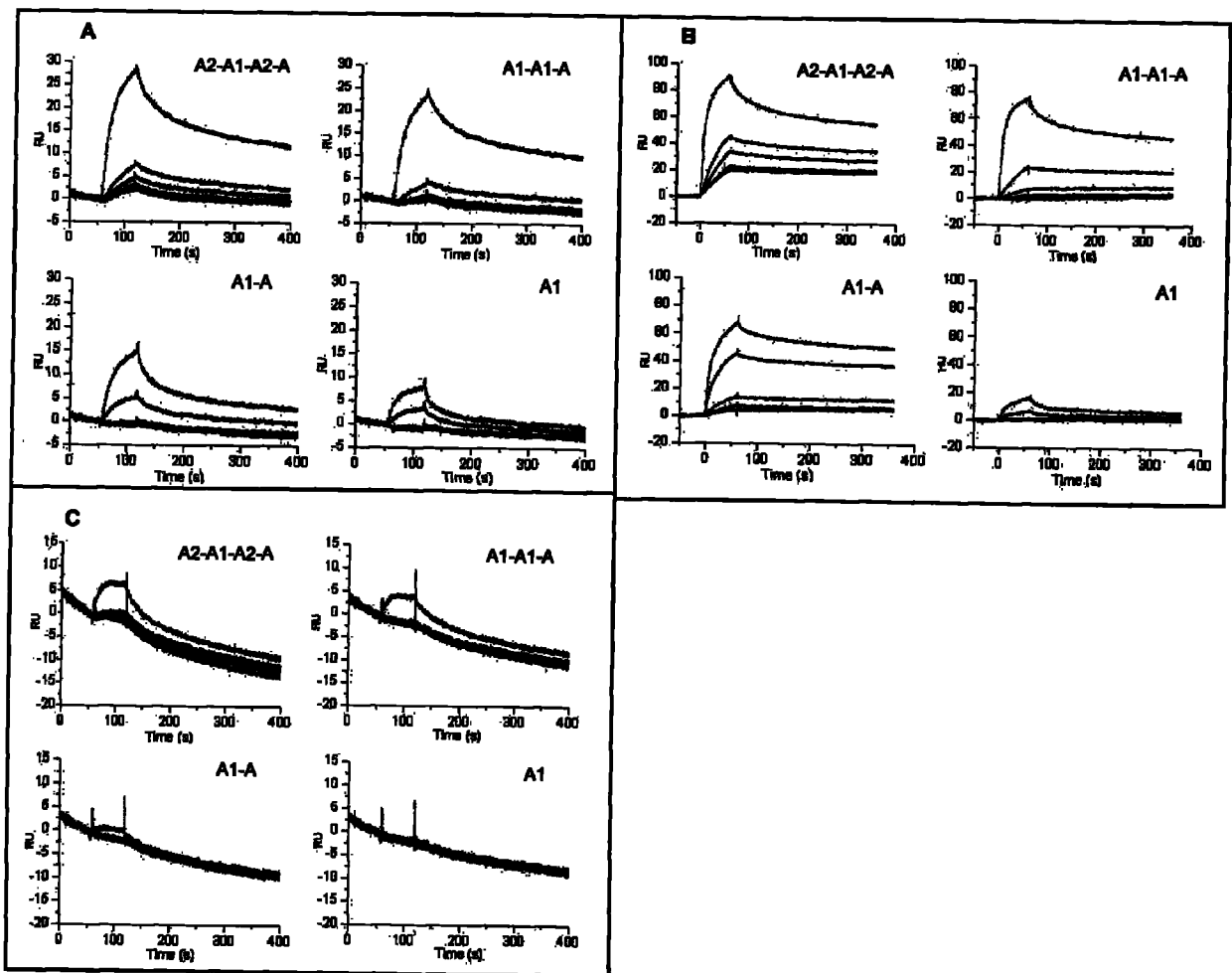


图 13

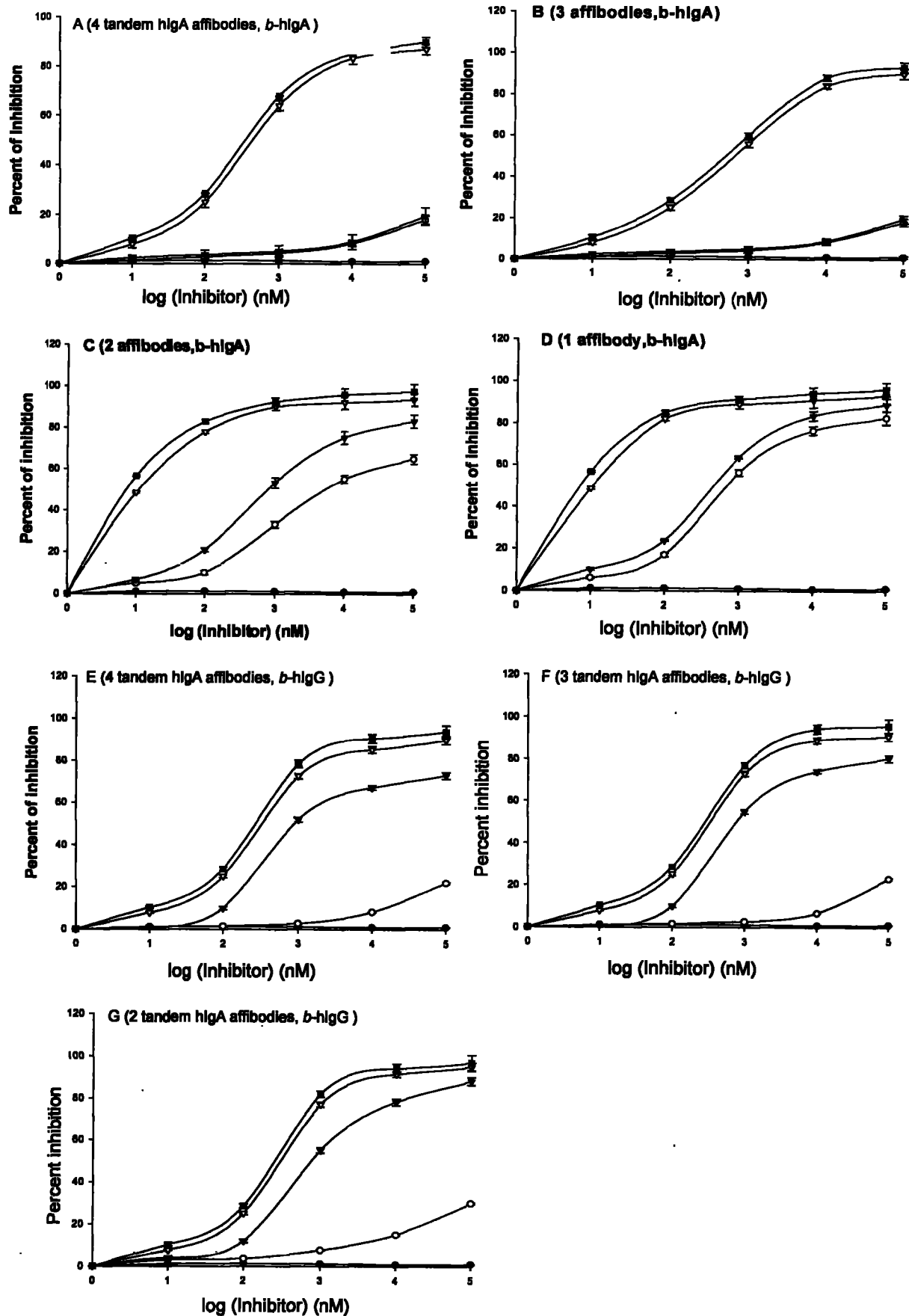


图 14

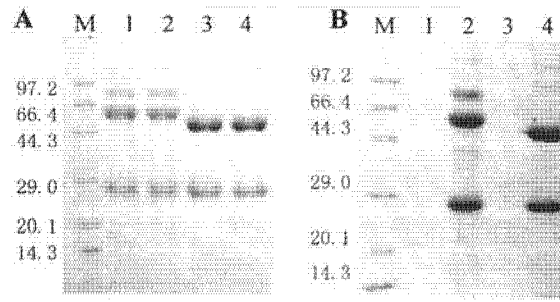


图 15

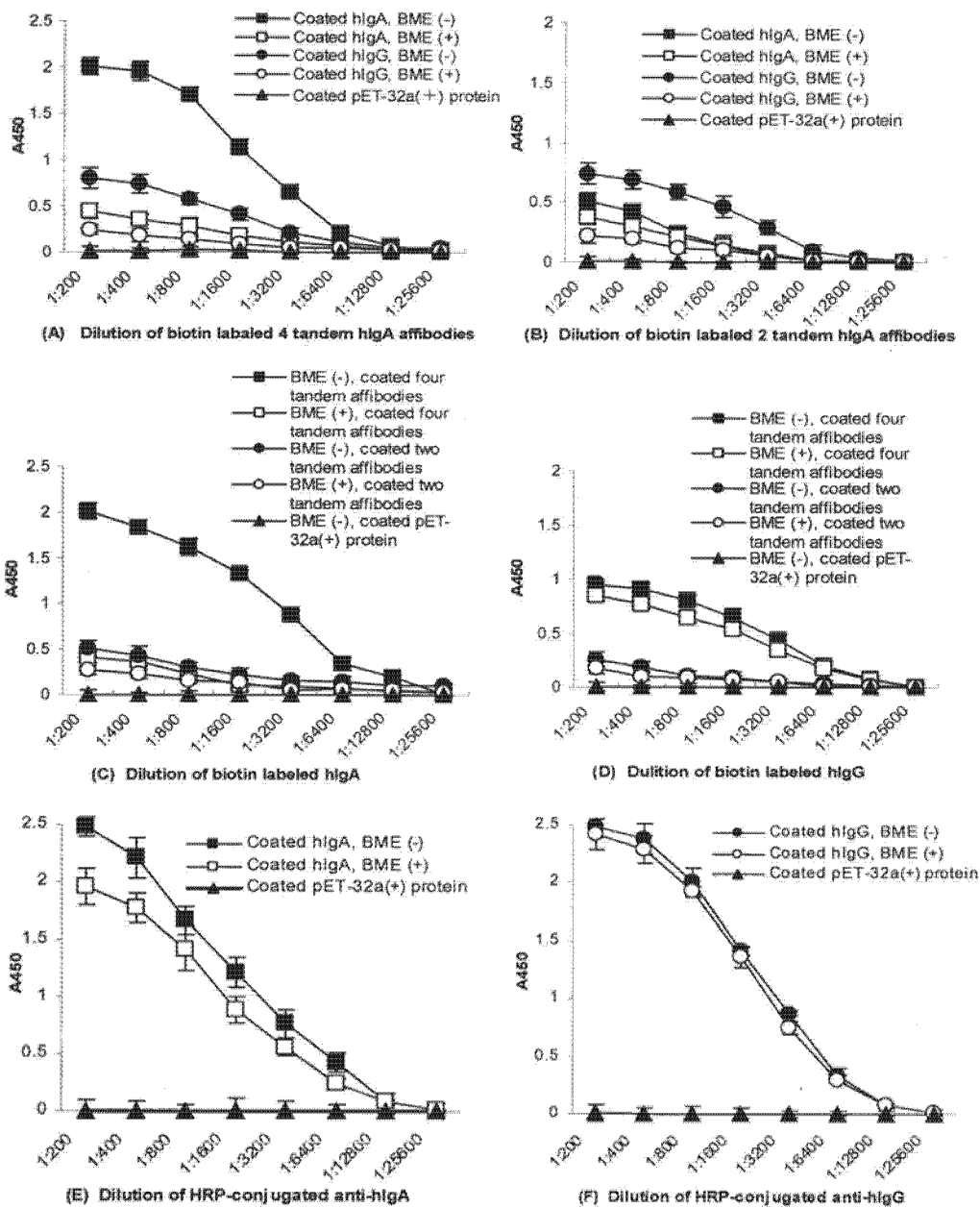


图 16

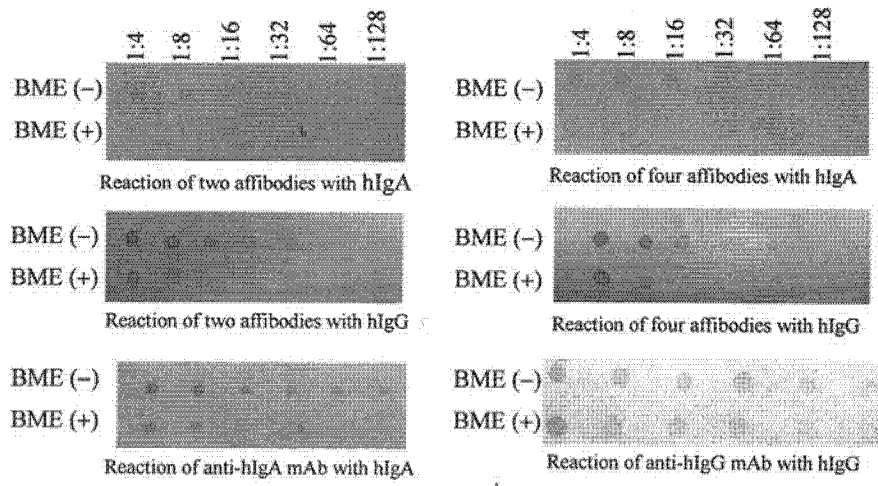


图 17

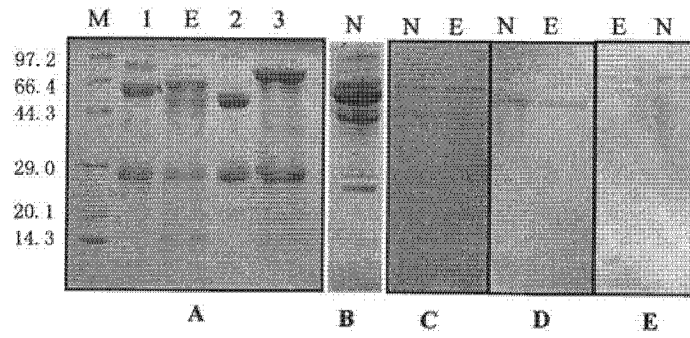


图 18

专利名称(译)	具有分子内亲合力效应的人IgA免疫球蛋白结合分子		
公开(公告)号	CN102115497A	公开(公告)日	2011-07-06
申请号	CN200910247716.0	申请日	2009-12-30
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 曹洁 温宗梅 陈秋莉 蒋少华 王锦红 戚中田		
发明人	潘卫 曹洁 温宗梅 陈秋莉 蒋少华 王锦红 戚中田		
IPC分类号	C07K14/47 C07K1/14 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/70 C12N15/74 C12N1/21 C40B30/04 C12Q1/68 G01N33/53		
代理人(译)	余明伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了具有分子内亲合力效应的人IgA免疫球蛋白结合分子及其制备方法和应用。本发明还公开了该人IgA结合分子的编码基因、基于噬菌体分子进化的人IgA结合分子的制备方法及其应用。本发明公开的人IgA结合分子，尤其是人IgA亲和体的重复体分子，具有与人IgA结合的分子内亲合力效应，显示出很高的与人IgA结合的活性，可用于高效特异性IgA纯化和检测试剂的研发，以用于酶联免疫吸附法、免疫层析法和免疫组化等免疫方法对人IgA抗体进行检测。

