

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610008063.7

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月2日

[11] 公开号 CN 1810835A

[22] 申请日 2006.2.27

[21] 申请号 200610008063.7

[71] 申请人 福建医科大学附属第一医院

地址 350005 福建省福州市台江区茶中路 20 号

[72] 发明人 王 柠 陈万金 吴志英

权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称

兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的优选与提取法

[57] 摘要

本发明公开了一种兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的优选与提取法, 属对脊髓性肌萎缩症的早期基因诊断疾病、SMN 蛋白功能研究及疾病预后判断的方法。兔抗人 SMN 全长多克隆抗体选用涵盖 1 至 294 位氨基酸的全长 SMN 蛋白来制备抗体, 针对 SMN 蛋白的所有功能区。采用制备正常人全长编码区 cDNA 片段, 引物设计及 His 基因融合载体的选择, 制备目的基因片段, 并纯化 His 基因融合蛋白及收集目的蛋白, 最终制备并纯化兔抗人 SMN 全长多克隆抗体, 并使兔抗人 SMN 多克隆抗体得以应用。本发明抗体的特异性和敏感性, 有助于 SMN 蛋白功能及发病机制研究, 早期快速诊断及预后判断, 对于脊髓性肌萎缩症今后的治疗方面的研究有着积极的作用。

1. 兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的优选,其特征是:选用涵盖 1 至 294 位氨基酸的全长 SMN 蛋白来制备抗体,针对 SMN 蛋白的所有功能区。

2. 本发明根据引物设计原则设计的引物,其特征是:共设计了 4 条引物,序列如下:

1F 5' —AgAATTCATggCgATgAgCAgC—3' (含 EcoRI 切点)

1R 5' —ACTCgAgATTAAggAATgTg—3' (含 XhoI 切点)

442F 5' —AAT CTg TCC gAT CTA CTT TC—3'

486R 5' —TTC ATT TTC ATT CTC TTg AgC—3' 。

3. 根据权利要求 2 所述的引物,其特征是:1F 和 1R 用于 PCR 扩增目的基因片段,即 SMN 基因 1-882bp 片段,442F、486R 用来测序证实所扩增的目的基因片段序列。

4. 根据权利要求 2 所述的引物,其特征是:同一条引物没有回文发夹结构,5' 端与 3' 端的 4 个碱基不互补,正反向引物序列不互补, T_m 值相近 ($2A+2T+4G+4C$),且在 Genebank 上找不到同源系列。

5.本发明的兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的具体提取方法,其特征是:

(1)制备正常人全长编码区 cDNA 片段:新鲜脑组织来源于急性颅脑外伤手术患者,组织一经离体,迅速放置液氮中;称取 50mg 脑组织,加入 1ml TRIZOL 液体,匀浆器捣烂组织,混匀后转移至 1.5ml 的 Eppendorf (Ep) 管中;加入 200 μ l 氯仿,上下甩动,使 TRIZOL 与氯仿充分混匀,冰浴 5~10 分钟,4~10°C 10000~13000rpm 离心 10~30 分钟;吸取上清移至一个新的 1.5ml Ep 管中,加入 450~550 μ l 异丙醇,轻轻翻转 Ep 管 5~15 次,置冰浴 5~15 分钟,4~10°C 10000~13000rpm 离心 10~15 分钟,见管底有白色沉淀;去上清,往沉淀中加入

0.2~1ml 70~75%乙醇, 振荡, 4~10℃ 7000~10000rpm 离心 3~8 分钟; 去上清, 翻转 Ep 管, 室温干燥沉淀 15~30 分钟。溶解沉淀后即得总核糖核酸 (RNA), -80℃ 保存备用; 将此 RNA 用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA, 即为正常人脑组织全长编码区 cDNA 片段;

(2) His 基因融合载体的选择: 保证长达 882bp 的 PCR 扩增产物片段的目基因片段 SMN 基因 1-294 氨基酸片段与 His 基因融合载体连接后, 氨基酸编码不发生移码改变, 选择了 pET-28a-c(+) 载体, 并选用限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 做为连接点;

(3) 制备目的基因片段并连接到 pET-28a-c(+) 表达载体上: 以正常人全长编码区 cDNA 片段为模板, 采用引物 1F、1R 和高保真 PCR 扩增试剂盒扩增 SMN 基因 1~882cDNA 序列; 应用 TA 克隆试剂盒将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化 DH5 α 大肠杆菌并挑取阳性 TA 克隆, 摇菌并采用质粒抽提纯化试剂盒抽提纯化质粒; EcoRI 和 XhoI 双酶切证实阳性 TA 克隆并采用引物 442F、486R 及 ABI PRISM3730 DNA 序列分析仪测序鉴定连接在 pMD18-T 载体上的目的基因片段序列的正确性; 应用 EcoRI 和 XhoI 双酶切正确的 TA 克隆, 用胶回收试剂盒回收目的基因片段并连接到经过 EcoRI 和 XhoI 双酶切回收的 pET-28a-c(+) 载体上并转化大肠杆菌 E.coli BL21;

(4) 含目的基因片段的 His 基因融合载体的表达鉴定: 挑取 1 粒转化好的 His 基因融合载体克隆, 用 5ml LB 培养基摇菌, 离心收集细菌并制备小量的 His 基因融合蛋白, 采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段, 考马斯兰染色, 结果显示 His 基因融合蛋白片段大小正确, 表达产量高;

(5) 制备并纯化 His 基因融合蛋白及收集目的蛋白: 制备 His 基因融合蛋白, PAGE-SDS 胶电泳分离并回收目的蛋白片段;

(6)制备并纯化兔抗人 SMN 全长多克隆抗体(Rabbit anti-human SMN full-length polyclonal antibody): SMN 目的蛋白与完全弗氏佐剂匀浆后皮下多点注射免疫新西兰大白兔,此后每 7~14 天加强免疫 1 次,每次均从耳缘静脉取血 1ml,凝固后离心取血清,Western Blot 方法检测 SMN 多克隆抗体的滴度及特异性;加强免疫 4 次后,Western Blot 方法检测抗体的效价达 1: 2000,且具有高度特异性,无非特异性条带;从新西兰大白兔颈总动脉放血,离心收集抗体血清分装,采用 Immobilized ProteinA Column 纯化抗体,检测浓度并分装,保存于-80℃。

6、兔抗人 SMN 多克隆抗体的应用,其特征是:

(1)免疫印迹: 2.5~10%脱脂奶做为封闭液,室温封闭蛋白电转膜 30~60 分钟;兔抗人 SMN 全长多克隆抗体(浓度为 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)做为 一抗, 1:500~1: 1000 稀释,室温摇育 2~6 小时或 4~8℃摇育过夜,1XTBST 缓冲液摇洗 3 次,每次 5~15 分钟;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 做为二抗, 1: 5000~1: 10000 稀释,室温摇育 45~90 分钟,1XTBST 缓冲液摇洗 3 次,每次 5~15 分钟,辣根过氧化物底物显色,压片并冲片;

(2)免疫荧光染色: pcDNA3.1mycHisBSMN 表达质粒转染 CHO 细胞, 4~8%多聚甲醛固定细胞, 5~10%山羊血清室温封闭细胞 30~60 分钟;兔抗人 SMN 抗体(浓度为 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)1: 50~1: 150 稀释,室温反应 1~3 小时,1XPBS 摇洗 3 次,每次 5~10 分钟;带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗, 1: 100~1: 300 稀释,室温反应 30~60 分钟,1XPBS 摇洗 3 次,每次 5~10 分钟。

兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的优选与提取法

技术领域

本发明涉及早期基因诊断疾病、SMN 蛋白功能研究及疾病预后判断的方法，具体的说是对脊髓性肌萎缩症的兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的优选与提取法。

背景技术

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy ,SMA)是一类以脊髓前角 α -运动神经元退行性变、肢体近端无力、萎缩为主要特征的遗传性疾病，临床表现为进行性对称性肌无力及肌萎缩，近端重于远端，下肢重于上肢。儿童期起病的 SMA 呈常染色体隐性遗传，群体发病率为 1/6000-1/10000，携带者频率为 1/40-1/60。根据发病年龄和病情的轻重,临床上将儿童期起病的 SMA 分为 3 型：I 型患儿多在 2 岁内死于呼吸肌麻痹；II、III 型虽然病情相对较轻，但晚期严重致残，生活自理能力差，给社会和家庭带来极大负担。

运动神经元生存蛋白基因 (survival of motor neuron, SMN) 为儿童型 SMA 的致病基因，该基因定位于 5q11.2-13.3 区域，编码含 294 个氨基酸的 SMN 蛋白，SMN 蛋白在哺乳动物组织中广泛表达,与其它多种蛋白相结合形成蛋白复合体，参与机体 mRNA 的剪接过程，是维持机体正常生命活动的必须成份，完全缺失 SMN 的个体将在胚胎期即死亡。在病人中进行 SMN 蛋白表达研究发现，SMN 蛋白下降水平与疾病严重程度相关，即患者病情越重，其外周血及肌肉组织中 SMN 蛋白含量越低，病情较轻者其 SMN 蛋白含量较高。多年来本病在治疗上一直未取得突破，其主要原因在于 SMN 蛋白功能及 SMN 表达调控机制未阐明。因此只有进行 SMN 蛋白功能的研究，从而揭示 SMA 发病机制，才能从

根本上解决 SMA 的早期诊断、预后判断和治疗等问题。

研究 SMN 蛋白的功能及其致病机制, 高质量的 SMN 抗体是必备条件。由于 SMN 蛋白不同区域其功能不同, 如氨基端主要与蛋白在细胞内正确定位有关, 中间的核心区域是剪接体蛋白装配与合成的关键, 而羧基端则与 SMN 蛋白自身聚积和稳定性有关。

从包括中国专利在内的有关资料检索表明, 目前国内尚无现成的 SMN 抗体, 而国外学者制备的 SMN 抗体均为羧基端或氨基端多肽抗体, 此类抗体制备时仅需合成数十个氨基酸的多肽去免疫家兔, 制备工艺较为简单、快速, 但由于无法同时涵盖 SMN 蛋白的三个不同的关键区域, 因此这类抗体的敏感性及其特异性均较低, 限制了抗体使用的深度和广度, 如仅能用于细胞免疫荧光染色或仅能用于免疫组化, 并且容易导致假阳性或假阴性结果, 因此不是最佳的 SMN 抗体。

发明内容

为了克服现有技术的不足, 本发明的目的是在 SMN 基因中扩增出其全长编码序列, 并进行兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的优选与提取法。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是: 制备抗体, 首先必须合成制备抗体所需的蛋白。选用哪一段蛋白来制备抗体及如何合成正确序列的蛋白是本发明的关键。如果仅合成羧基端或氨基端数十个氨基酸的蛋白来制备抗体, 将导致抗体的特异性和敏感性均不够高。由于 SMN 基因全长编码区仅 882bp, 编码的蛋白序列为 294 个氨基酸, 因此完全可制备全长编码区的 SMN 蛋白。兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的优选, 其特征是: 选用涵盖 1 至 294 位氨基酸的全长 SMN 蛋白来制备抗体, 针对 SMN 蛋白的所有功能区。

直接通过合成多肽来制备这么大大片段且编码正确的蛋白十分昂贵, 也是不

现实的,因此本发明选择诱导大肠杆菌表达 His 基因融合蛋白的方法来制备该目的蛋白片段。所述的 His 基因融合蛋白,必须自行设计引物扩增 SMN 基因全长编码区,与表达载体连接后构建 His 基因融合载体。

本发明的兔抗人 SMN 全长多克隆抗体的具体提取方法:

1、制备正常人全长编码区 cDNA 片段:新鲜脑组织来源于急性颅脑外伤手术患者,组织一经离体,迅速放置液氮中;称取 50mg 脑组织,加入 1ml TRIZOL 液体,匀浆器捣烂组织,混匀后转移至 1.5ml 的 Eppendorf (Ep) 管中。加入 200 μ l 氯仿,用力上下甩动,使 TRIZOL 与氯仿充分混匀,冰浴 5~10 分钟, 4~10 $^{\circ}$ C 10000~13000rpm 离心 10~30 分钟;小心吸取上清移至一个新的 1.5ml Ep 管中,加入 450~550 μ l 异丙醇,轻轻翻转 Ep 管 5~15 次,置冰浴 5~15 分钟,4~10 $^{\circ}$ C 10000~13000rpm 离心 10~15 分钟,见管底有白色沉淀;去上清,往沉淀中加入 0.2~1ml 70~75%乙醇,振荡,4~10 $^{\circ}$ C 7000~10000rpm 离心 3~8 分钟;去上清,翻转 Ep 管,室温干燥沉淀 15~30 分钟。溶解沉淀后即得总核糖核酸 (RNA), -80 $^{\circ}$ C 保存备用。将此 RNA 用逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司) 逆转录成 cDNA, 即为正常人脑组织全长编码区 cDNA 片段。

2、引物设计及 His 基因融合载体的选择:要保证长达 882bp 的 PCR 扩增产物片段 (目的基因片段) 正确无误,引物的设计至关重要。为了保证目的基因片段 (SMN 基因 1-294 氨基酸片段) 与 His 基因融合载体连接后,氨基酸编码不发生移码改变,我们选择了 pET-28a-c(+)载体,并选用限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 做为连接点。之所以选择这 2 种内切酶,是因为 SMN 基因片段上没有这 2 个切点,而且它们也是比较常见的限制性内切酶。根据引物设计原则自行设计引物,做到同一条引物没有回文发夹结构,5' 端与 3' 端的 4 个碱基不互

补，正反向引物序列不互补， T_m 值相近 ($2A+2T+4G+4C$)，且在 Genebank 上找不到同源系列。共设计了 4 条引物，序列如下：

1F 5' —AgAATTCATggCgATgAgCAgC—3' (含 EcoRI 切点)

1R 5' —ACTCgAgATTTAAggAATgTg—3' (含 XhoI 切点)

442F 5' —AAT CTg TCC gAT CTA CTT TC—3'

486R 5' —TTC ATT TTC ATT CTC TTg AgC—3'

1F 和 1R 用于 PCR 扩增目的基因片段，即 SMN 基因 1-882bp 片段，442F、486R 用来测序证实所扩增的目的基因片段序列。

3、制备目的基因片段并连接到 pET-28a-c(+)表达载体上：以正常人全长编码区 cDNA 片段为模板，采用引物 1F、1R 和高保真 PCR 扩增试剂盒扩增 SMN 基因 1~882cDNA 序列。应用 TA 克隆试剂盒将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上，转化 DH5 α 大肠杆菌并挑取阳性 TA 克隆，摇菌并采用质粒抽提纯化试剂盒抽提纯化质粒。EcoRI 和 XhoI 双酶切证实阳性 TA 克隆并采用引物 442F、486R 及 ABI PRISM3730 DNA 序列分析仪测序鉴定连接在 pMD18-T 载体上的目的基因片段序列的正确性。共挑取了 30 个阳性 TA 克隆才挑到了一个序列完全正确的克隆。应用 EcoRI 和 XhoI 双酶切正确的 TA 克隆，用胶回收试剂盒回收目的基因片段并连接到经过 EcoRI 和 XhoI 双酶切回收的 pET-28a-c(+)载体上并转化大肠杆菌 E.coli BL21。

4、含目的基因片段的 His 基因融合载体的表达鉴定：挑取 1 粒转化好的 His 基因融合载体克隆，用 5ml LB 培养基摇菌，离心收集细菌并制备小量的 His 基因融合蛋白，采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段，考马斯兰染色，结果显示 His 基因融合蛋白片段大小正确，表达产量高。

5、制备并纯化 His 基因融合蛋白及收集目的蛋白：大量制备 His 基因融合蛋白，PAGE-SDS 胶电泳分离并回收目的蛋白片段。

6、制备并纯化兔抗人 SMN 全长多克隆抗体(Rabbit anti-human SMN full-length polyclonal antibody)：SMN 目的蛋白与完全弗氏佐剂匀浆后皮下多点注射免疫新西兰大白兔，此后每 7~14 天加强免疫 1 次，每次均从耳缘静脉取血 1ml，凝固后离心取血清，Western Blot 方法检测 SMN 多克隆抗体的滴度及特异性。加强免疫 4 次后，Western Blot 方法检测抗体的效价达 1：2000，且具有高度特异性，无非特异性条带。上述结果提示该抗体的敏感性和特异性均很高。此时，从新西兰大白兔颈总动脉放血，离心收集抗体血清分装，采用 Immobilized ProteinA Column(Pierce 公司)纯化抗体，检测浓度并分装，保存于-80℃。我们将该抗体命名为兔抗人 SMN 全长多克隆抗体(Rabbit anti-human SMN full-length polyclonal antibody)。

7、兔抗人 SMN 多克隆抗体的应用：

(1)免疫印迹：2.5~10%脱脂奶做为封闭液，室温封闭蛋白电转膜 30~60 分钟；兔抗人 SMN 全长多克隆抗体(浓度为 5 μg / μl)做为 一抗，1:500~1:1000 稀释，室温摇育 2~6 小时或 4~8℃摇育过夜，1XTBST 缓冲液摇洗 3 次，每次 5~15 分钟；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 做为二抗，1:5000~1:10000 稀释，室温摇育 45~90 分钟，1XTBST 缓冲液摇洗 3 次，每次 5~15 分钟，辣根过氧化物底物显色，压片并冲片(请参阅图 1 的结果)。

(2)免疫荧光染色：pcDNA3.1mycHisBSMN 表达质粒转染 CHO 细胞，4~8%多聚甲醛固定细胞，5~10%山羊血清室温封闭细胞 30~60 分钟；兔抗人 SMN 抗体(浓度为 5 μg / μl)1:50~1:150 稀释，室温反应 1~3 小时，1XPBS 摇洗 3

次，每次 5~10 分钟；带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗，1: 100~1: 300 稀释，室温反应 30~60 分钟，1XPBS 摇洗 3 次，每次 5~10 分钟；封片镜下观察，结果见图 2。

本发明的有益效果是：由于本发明设计并制备了兔抗人 SMN 全长多克隆抗体，保证了抗体的高度特异性，有助于进行 SMN 蛋白功能及发病机制研究，有助于儿童型脊髓性肌萎缩症的早期快速诊断及预后判断。同时本发明在优选的基础上提出了其制备及提取的方法，对于脊髓性肌萎缩症今后的治疗方面的研究有着极积的作用。

附图说明：

图 1 是本发明抗体用于免疫印迹的结果照片。标记 1 为不表达 SMN 蛋白的空 CHO 细胞；2 为转染 pcDNA3.1mycHisBSMN 表达质粒的 CHO 细胞；3 为正常人外伤手术后的肌肉组织。3 所示片段大小为 38KD，而 2 由于所表达的是 SMN—His 融合蛋白，故约 39KD。

图 2 是本发明抗体检测转染质粒的 CHO 细胞的结果。1 为转染 pcDNA3.1mycHisBSMN 的 CHO 细胞（带绿色荧光），2 为未转染质粒的空 CHO 细胞。

具体实施方式

实施例 1：

针对 SMN 全长蛋白来制备抗体。

选择 His 基因融合蛋白的方法来制备该目的蛋白片段，His 基因融合蛋白，必须构建含 SMN 基因 1 至 294 位氨基酸（882bp）目的片段的 His 基因融合载体；根据引物设计原则自行设计引物。

具体提取方法:

1、制备正常人全长编码区 cDNA 片段: 新鲜脑组织来源于急性颅脑外伤手术患者, 组织一经离体, 迅速放置液氮中; 称取 50mg 脑组织, 加入 1ml TRIZOL 液体, 匀浆器捣烂组织, 混匀后转移至 1.5ml 的 Eppendorf (Ep) 管中。加入 200 μ l 氯仿, 用力上下甩动, 使 TRIZOL 与氯仿充分混匀, 冰浴 10 分钟, 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 15 分钟; 小心吸取上清移至一个新的 1.5ml Ep 管中, 加入 500 μ l 异丙醇, 轻轻翻转 Ep 管 15 次, 置冰浴 10 分钟, 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 15 分钟, 见管底有白色沉淀; 去上清, 往沉淀中加入 1ml 75%乙醇, 振荡, 4 $^{\circ}$ C 7500rpm 离心 5 分钟; 去上清, 翻转 Ep 管, 室温干燥沉淀 20 分钟。溶解沉淀后即得总核糖核酸 (RNA), -80 $^{\circ}$ C 保存备用。将此 RNA 用逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司) 逆转录成 cDNA, 即为正常人脑组织全长编码区 cDNA 片段。

2、引物设计及 His 基因融合载体的选择: 为了保证目的基因片段 (SMN 基因 1-294 氨基酸片段) 与 His 基因融合载体连接后, 氨基酸编码不发生移码改变, 我们选择 pET-28a-c(+)载体, 并选用限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 做为连接点。之所以选择这 2 种内切酶, 是因为 SMN 基因片段上没有这 2 个切点。根据引物设计原则自行设计引物, 做到同一条引物没有回文发夹结构, 5' 端与 3' 端的 4 个碱基不互补, 正反向引物序列不互补, Tm 值相近 (2A+2T+4G+4C), 且在 Genebank 上找不到同源系列。共设计了 4 条引物, 序列如下:

1F 5' —AgAATTCATggCgATgAgCAgC—3' (含 EcoRI 切点)

1R 5' —ACTCgAgATTAAggAATgTg—3' (含 XhoI 切点)

442F 5' —AAT CTg TCC gAT CTA CTT TC—3'

486R 5' —TTC ATT TTC ATT CTC TTg AgC—3'

1F 和 1R 用于 PCR 扩增目的基因片段，即 SMN 基因 1-882bp 片段，442F、486R 用来测序证实所扩增的目的基因片段序列。对于 1F 和 1R 引物设计是有一定技巧的，在 1F 的 5'端添加了 EcoRI 切点序列 gAATTC，其后的碱基序列与 SMN 基因氨基酸片段一致，1R 为反向序列，在其 5'端添加了 XhoI 切点序列 CTCgAg，其后的碱基序列与 SMN 基因氨基酸片段一致，使目的基因片段可通过 EcoRI 和 XhoI 双酶切连到 pET-28a-c(+)载体上。442F 和 486R 引物设计遵从常规引物设计原则即可。

3、制备目的基因片段并连接到 pET-28a-c(+)表达载体上：以正常人全长编码区 cDNA 片段为模板，采用引物 1F、1R 和高保真 PCR 扩增试剂盒扩增 SMN 基因 1~882cDNA 序列。应用 TA 克隆试剂盒将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上，转化 DH5 α 大肠杆菌并挑取阳性 TA 克隆，摇菌并采用质粒抽提纯化试剂盒抽提纯化质粒。EcoRI 和 XhoI 双酶切证实阳性 TA 克隆并采用引物 442F、486R 及 ABI PRISM3730 DNA 序列分析仪测序鉴定连接在 pMD18-T 载体上的目的基因片段序列的正确性。共挑取了 30 个阳性 TA 克隆才挑到了一个序列完全正确的克隆。应用 EcoRI 和 XhoI 双酶切正确的 TA 克隆，用胶回收试剂盒回收目的基因片段并连接到经过 EcoRI 和 XhoI 双酶切回收的 pET-28a-c(+)载体上并转化大肠杆菌 E.coli BL21。

4、含目的基因片段的 His 基因融合载体的表达鉴定：挑取 1 粒转化好的 His 基因融合载体克隆，用 5ml LB 培养基摇菌，离心收集细菌并制备小量的 His 基因融合蛋白，采用 PAGE-SDS 胶电泳分离蛋白片段，考马斯兰染色，结果显示 His 基因融合蛋白片段大小正确，表达产量高。

5、制备并纯化 His 基因融合蛋白及收集目的蛋白：大量制备 His 基因融合

蛋白，PAGE-SDS 胶电泳分离并回收目的蛋白片段。

6、制备并纯化兔抗人 SMN 全长多克隆抗体(Rabbit anti-human SMN full-length polyclonal antibody): SMN 目的蛋白与完全弗氏佐剂匀浆后皮下多点注射免疫新西兰大白兔,此后每 14 天加强免疫 1 次,每次均从耳缘静脉取血 1ml,凝固后离心取血清, Western Blot 方法检测 SMN 多克隆抗体的滴度及特异性。加强免疫 4 次后, Western Blot 方法检测抗体的效价达 1: 2000, 且具有高度特异性, 无非特异性条带。上述结果提示该抗体的敏感性和特异性均很高。此时, 从新西兰大白兔颈总动脉放血, 离心收集抗体血清分装, 采用 Immobilized ProteinA Column(Pierce 公司)纯化抗体, 检测浓度并分装, 保存于-80℃。

7、兔抗人 SMN 多克隆抗体的应用:

(1)免疫印迹(请参阅图 1): 5%脱脂奶做为封闭液, 室温封闭蛋白电转膜 60 分钟; 兔抗人 SMN 全长多克隆抗体(浓度为 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$)做为 一抗, 1:1000 稀释, 室温摇育 3 小时, 1XTBST 缓冲液摇洗 3 次, 每次 5 分钟; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 做为二抗, 1: 5000 稀释, 室温摇育 60 分钟, 1XTBST 缓冲液摇洗 3 次, 每次 10 分钟, 辣根过氧化物底物显色, 压片并冲片。

(2)免疫荧光染色(请参阅图 2): pcDNA3.1mycHisBSMN 表达质粒转染 CHO 细胞, 4%多聚甲醛固定细胞, 10%山羊血清室温封闭细胞 60 分钟; 兔抗人 SMN 抗体(浓度为 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$)1: 100 稀释, 室温反应 3 小时, 1XPBS 摇洗 3 次, 每次 5 分钟; 带绿色荧光的羊抗兔 IgG 作为二抗, 1: 200 稀释, 室温反应 60 分钟, 1XPBS 摇洗 3 次, 每次 5 分钟; 封片镜下观察。

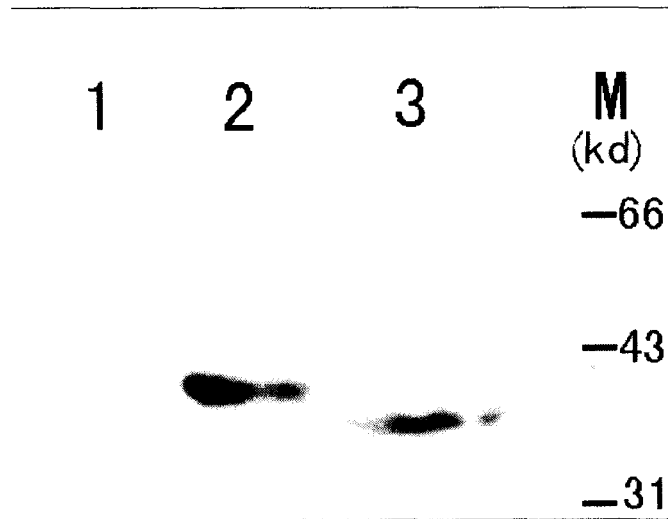


图 1

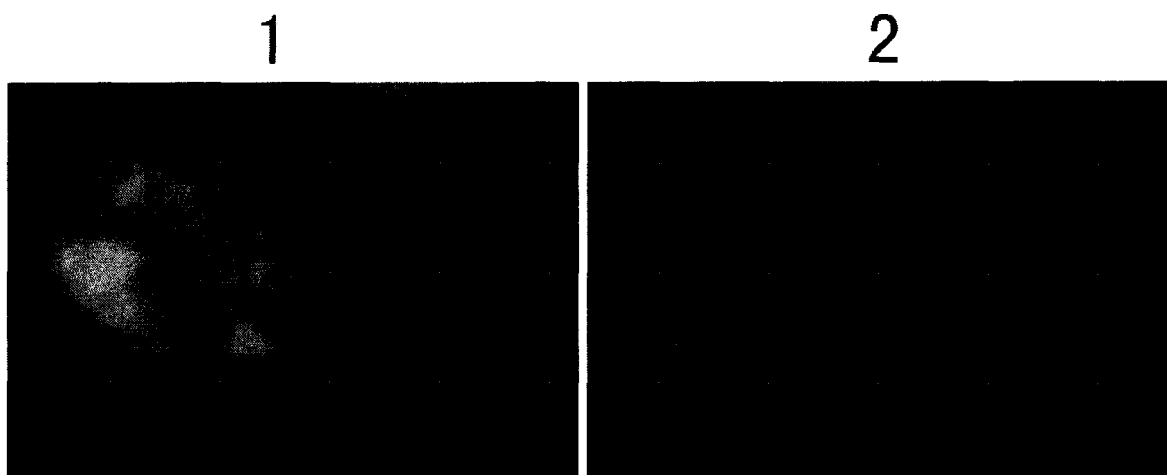


图 2

专利名称(译)	兔抗人SMN全长多克隆抗体的优选与提取法		
公开(公告)号	CN1810835A	公开(公告)日	2006-08-02
申请号	CN200610008063.7	申请日	2006-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	福建医科大学附属第一医院		
申请(专利权)人(译)	福建医科大学附属第一医院		
当前申请(专利权)人(译)	福建医科大学附属第一医院		
[标]发明人	王柠 陈万金 吴志英		
发明人	王柠 陈万金 吴志英		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/09 C12N15/12 G01N33/53 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种兔抗人SMN全长多克隆抗体的优选与提取法，属对脊髓性肌萎缩症的早期基因诊断疾病、SMN蛋白功能研究及疾病预后判断的方法。兔抗人SMN全长多克隆抗体选用涵盖1至294位氨基酸的全长SMN蛋白来制备抗体，针对SMN蛋白的所有功能区。采用制备正常人全长编码区cDNA片段，引物设计及His基因融合载体的选择，制备目的基因片段，并纯化His基因融合蛋白及收集目的蛋白，最终制备并纯化兔抗人SMN全长多克隆抗体，并使兔抗人SMN多克隆抗体得以应用。本发明抗体的特异性和敏感性，有助于SMN蛋白功能及发病机制研究，早期快速诊断及预后判断，对于脊髓性肌萎缩症今后的治疗方面的研究有着积极的作用。

