

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710163672.4

[51] Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月22日

[11] 公开号 CN 101412748A

[22] 申请日 2007.10.18

[21] 申请号 200710163672.4

[71] 申请人 北京人民警察学院

地址 102202 北京市昌平区南口镇南涧路 11 号

[72] 发明人 魏玉芝 刘晓维 杜宏武 梁武斌
吴巧雯

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种 C 端特异的 ADRA1A 多肽及其抗体制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种 C 端特异的人 ADRA1A 多肽及其抗体的制备方法，属于以抗体为特征的体外试验用的生物制品。C 端特异的 ADRA1A 多肽的氨基酸序列为：TPSLDKNHQVPTI。抗 ADRA1A 多肽抗体按以下方法制备：(1) ADRA1A 抗原表位的分析；(2) ADRA1A 的 C 端多肽合成；(3) 合成多肽与载体蛋白交联；(4) 制备兔抗 ADRA1A 多肽抗体；(5) 收集、分离得到含有抗体的血清，纯化抗体，即得到抗 ADRA1A 多肽抗体。本发明制备的 C 端特异的抗 ADRA1A 合成多肽抗体效价高、亲和力强、特异性好，可与天然 ADRA1A 发生特异性结合反应；制备成本低；纯化后的抗体可完全用于免疫印迹和酶联免疫吸附实验，以及建立体外免疫分析方法。该抗体为研究 ADRA1A 的体内外生物学功能提供了有用的工具。

1. 一种 C 端特异的 ADRA1A 多肽，其特征在于多肽的氨基酸序列为：TPSLDKNHQVPTI。
2. 一种 C 端特异的 ADRA1A 合成多肽抗体，其特征在于该抗体效价在 1: 600000 以上，特异性强，亲和力达 10^7-10^8 L/mol。
3. 一种 C 端特异的 ADRA1A 合成多肽抗体的制备方法，其特征在于以人 ADRA1A 氨基酸序列中第 440 到第 452 位的 TPSLDKNHQPVTI 肽段序列作为抗原肽合成人 ADRA1A 抗原肽；纯化的抗原肽与蛋白载体偶联，经柱层析纯化后；制备出人工免疫原，免疫动物，制备多肽抗体，并经亲和层析纯化而成。
4. 根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于载体蛋白为钥孔贼血蓝素（KLH）。
5. 根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于偶联的 KLH-多肽加福氏佐剂免疫后收集抗体。
6. 根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于抗原肽与载体蛋白偶联作为免疫原，免疫家兔制备兔抗人 ADRA1A 合成多肽抗体。
7. 根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于合成多肽偶联 Sepharose 4B，制备亲和层析柱，用于纯化抗多肽抗体。

一种 C 端特异的 ADRA1A 多肽及其抗体制备方法

技术领域

本发明涉及以抗体为特征的体外试验用的生物制品，具体是一种 C 端特异的 ADRA1A 多肽及其抗体制备方法，属于生物医学技术领域。

背景技术

ADRA1A 是 G 蛋白偶联受体超家族的一员，有 7 个跨膜结构，能结合内源性儿茶酚胺和肾上腺素。从药理学及分子克隆研究结果证实该受体家族具有复杂的异质性，至今已经有 9 个亚型被鉴定，包括 3 个 alpha 1 亚型 (1A, 1B and 1C)，3 个 alpha 2 受体 (2A, 2B and 2C) 以及 3 个 beta 受体 (1, 2 and 3)。ADRA1A 参与若干种疾病的发作和维持，如高血压、慢性心衰、糖尿病、青光眼等。该基因各个亚型还被广泛发现在多个脏器组织中，并证实通过脉管和心输出调节血压，子宫收缩、肝脏葡萄糖代谢、原癌基因表达、以及有丝分裂等重要生理活动均已报道与 ADRA1A 相关。

发明内容

本发明是为了解决通过免疫实验特异性检测 ADRA1A 的表达与天然存在，并建立相应体外免疫分析所需基本生物制品的问题，而提供的一种能特异性针对 ADRA1A 的 C 端的合成多肽抗体及其制备方法。本发明还可

同时解决日前使用的类似抗体价格高，亲和力低，抗体结合蛋白的位置不特异且抗原性较差等问题。本发明所述的抗 **ADRA1A** 合成多肽抗体，按照以下步骤制备：

抗原表位分析与拮抗位置确定：利用多种表位预测软件，如 **DNASTAR**，**OMIGA**，**UWGCG** 等进行综合分析，主要考量指标包括亲水性结构、抗原指数、表面可及性等，再结合我们已有实际制备抗体的验证经验，最终确定第 **440** 到第 **452** 位为该抗体的靶标，其氨基酸序列为 **TPSLDKNHQVPTI**。

多肽的合成：靶标多肽采用全自动多通道多肽合成仪合成，柱层析纯化，然后通过 **HPLC**，用每分钟 **1%** 的标准乙晴梯度来检测纯度。

多肽与载体蛋白交联：由于本合成多肽分子量太小，在动物体内不能诱导产生免疫反应，因此将多肽与载体蛋白交联后才能进行免疫，选择钥孔棘血蓝素进行交联，能显著增加抗原的大小和免疫原性，从而制备出人工免疫原。

免疫动物：所述的制备方法，其抗原肽-交联载体蛋白做为免疫原，免疫家兔制备抗体。选取适龄免疫用新西兰兔，经过适应性饲养后进行多点注射免疫。反复加强免疫，至取血测抗体效价达到标准时停止免疫。

抗体纯化：达到要求的免疫动物放血，标准方法收集抗血清，依次使用辛酸-硫酸铵方法和亲和层析过柱纯化方法，进行抗血清纯化，通过 **SDS-PAGE** 和 **HPLC** 验证纯度，得到目标抗体。

本发明制备的高质量多肽抗体效价高、亲和力强，可与天然 **ADRA1A** 分子发生特异性结合反应。用多肽制备抗体的成本较常规的重组抗原制备抗体方法低，抗体特异性好，经亲和层析纯化后可以用于各种酶免检测和 **WB** 试验要求，可用于建立体外免疫分析。该合成肽抗体的制备，为 **ADRA1A** 分子的研究及其相关疾病的研究（如诊断策略的制定，流行病学调查、预防和控制）提供了一个重要的工具，以及在生物医学研究中对相应靶蛋白的特性、含量的测定、分布情况和蛋白的确证等方面都具有重要作用。

附图说明

图 1 是 **DNASTAR** 软件分析图。

图 2 是通过间接 **ELISA** 方法鉴定纯化抗体相对亲和常数结果图。

图 1 表明本发明所选择的肽段位于该蛋白的抗原性和亲水性较强区段。

图 2 中 **ELISA** 检测制备的多抗和多肽抗原亲和常数为 10^7 - 10^8 L/mol。

具体实施方式

实施例 1: **ADRA1A** 抗原肽的合成。

用 **DNAstar**, **OMIGA**, **UWGCG** 等蛋白分析软件, 对 **ADRA1A** 氨基酸序列进行亲水性结构(**hydrophilicity**)、抗原指数(**antigenicity**)、表面可及性(**surface probability**)等分析以及同源性分析(**homology**), 再结合我们已有实际制备抗体的验证经验, 最终确定第 **440** 到第 **452** 位为靶标, 其氨基酸序列为 **TPSLDKNHQVPTI**。在全自动多肽合成仪上由固定羧基向氨基端递减合成后获得粗品。经 **30%** 乙晴溶解后, 进行高压液相色谱(**HPLC**)分析, 计算主峰面积并收集, 经冷冻真空抽干后纯化合成肽, 质谱鉴定。

实施例 2: 合成多肽与载体的偶联。

载体蛋白选择 **KLH** (**Keyhole limpet hemocyanin**), 用双功能试剂顺丁烯酰胺苯甲酸-**N**-琥珀酸酯 (**MBS**) 连接法将 **KLH** 与合成肽进行偶联: 取 **KLH 5mg** (**0.11 μ mol**, 含赖氨酸 **2.2 μ mol**), 溶于 **0.75mL** 偶联缓冲液 **1** (**50mmol/L** 硼酸盐缓冲液, **pH8.5**); **3mg MBS** (**11 μ mo**) 溶于 **75 μ L** 二甲基酰胺 (**DMF**)。将 **MBS** 溶液分 **3** 次加入 **KLH** 溶液, 旋转混匀, 室温作用 **30** 分钟。迅速离心后, 将反应混合物 (约 **0.8mL**) 加入预先用偶联缓冲液 **2** (**0.1mol/L** 磷酸盐, **0.15mol/LNaCl**, **0.01mol/LNa₂EDTA**, **pH7.0**) 平衡的 **PD-10** 柱。用偶联缓冲液 **2** 洗脱, 收集洗脱液 (即 **MBS-KLH** 溶液)。溶解 **1.5mg** 合成多肽于 **0.15mL** 偶联缓冲液 **2**, 加入 **MBS-KLH** 缓冲液 **0.56**, 室温下旋转混合, 作用 **2** 小时后置 **4 $^{\circ}$ C** 过夜, 将反应混合物 (约 **0.7mL**) 加入预先用磷酸缓冲液平衡的 **PD-10** 柱, 磷酸缓冲液洗脱, 收集流出液。将 **KLH**、**MBS-KLH** 和偶联物进行 **SDS-KLH** 和偶联物进行 **SDS-PAGE** (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 鉴定偶联效率。

实施例 3: 抗多肽抗体的制备。

取偶联的 KLH-多肽 500 μ g，溶于 500 μ L 磷酸缓冲液，加等体积的完全福氏佐剂。免疫选取适龄免疫用新西兰兔（体重标准为 2-2.5 公斤），经过适应性饲养后，背部皮内不少于 15 点注射。2 周后抗原量减半（250 μ g），加等体积的不完全福氏佐剂，第一次加强免疫。2 周后进行第二次加强免疫，方法同前。再 2 周后耳缘静脉少量采血，用合成多肽（1 μ g/mL）包被酶标板，间接 ELISA 法检测免疫血清效价。反复加强免疫，至取血测抗体效价达到 1: 16 万时停止免疫，采用颈动脉放血收集抗体。

实施例 4：亲和层析纯化抗多肽抗体。

①ADRA1A 合成多肽亲和层析柱的制备：称取 1.5g CNBr 活化 Sepharose 4B，用 1mmol/L 盐酸充分浸洗膨胀凝胶后，再用偶联缓冲液洗 2 次，迅速与溶于 5mL 偶联缓冲液的合成多肽 500 μ g 混合，室温下旋转混合 2 小时。加入 0.2mol/L 甘氨酸 4mL 终止反应，室温下旋转混合 1 小时。用偶联缓冲液和甘氨酸缓冲液交替洗凝胶各 2 次，再用 50mL 磷酸盐缓冲液洗凝胶，按终止浓度 0.02%加叠氮钠（NaN₃），置 4 $^{\circ}$ C 保存。

②亲和层析纯化抗多肽抗体：将 20mL 兔抗多肽血清与 1.6mL 多肽偶联的 Sepharose 4B 共同加入 50mL 离心管，4 $^{\circ}$ C 旋转混合 6 小时。将凝胶加入层析柱，弃去流出液，用 15mL 磷酸盐缓冲液冲洗凝胶。每次加 0.8mL pH2.9, 0.1mol/L 甘氨酸缓冲液洗脱，共 8 次，洗脱液分别加入 8 支预先加入 80 μ L 2mol/L Tris-HCL 缓冲液（pH7.5），20mL 磷酸盐缓冲液洗凝胶。上述全部操作过程在 4 $^{\circ}$ C 下完成。每管取洗脱液 2 μ L，稀释 50 倍后测 280nm 的 OD 值，计算蛋白质含量并绘制洗脱曲线。

实施例 5: 抗体的鉴定, 使用间接 ELISA 方法检测抗体相对亲和常数。

用合成肽交联 BSA, 分别以 $5 \mu\text{g/mL}$ 和 $10 \mu\text{g/mL}$ 的浓度, 在 4 度下包被 ELISA 检测板过夜, 10% 的山羊血清室温封闭 2 小时后加入倍比稀释的已知蛋白浓度的纯化后的抗体, 再加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 0.1mL , TMB 显色测定 A_{450} 。以抗体浓度的对数为横坐标, 以曲线达到水平时的 A_{450} 值为 100%, 以其他相对于该浓度的百分数为纵坐标作图, 求出 A_{50} 即 50% A 值对应的抗体浓度。按照 $K_{\text{aff}} = (n-1)/2(n[\text{Ab}'] t - 2[\text{Ab}] t)$ 算出抗体相对亲和常数, 其中 $[\text{Ab}'] t$ 、 $[\text{Ab}] t$ 指的是 A_{50} 时即包被抗原分别为 $5 \mu\text{g/mL}$ 和 $10 \mu\text{g/mL}$ 时抗体半饱和时抗体的摩尔浓度, $[\text{Ag}] t$ 、 $[\text{Ag}'] t$ 指的是包被的抗原浓度本实验中即指 $10 \mu\text{g}$ 和 $5 \mu\text{g}$, $n = [\text{Ag}] t / [\text{Ag}'] t$, 本实验中 $n=2$ 。

试验效果

1. 多肽与载体的偶联效率: SDS-PAGE 电泳鉴定偶联效率与样品回收率大致相符, 大于 80%。
2. 抗体效价: 多只家兔得到的抗血清效价均在 1: 60 万以上。
3. 抗体亲和力: 相对亲和常数为 10^7 - 10^8L/mol 。
4. 抗体的应用: 以上技术指标的实现保证该抗体完全可以应用于蛋白印迹和各种酶免实验, 以及建立相应体外免疫分析试剂。

序列表

<110> 北京意宏安生物科技有限公司

<120> 一种 C 端特异的 ADRA1A 多肽及其抗体制备方法

<160> 2

<210> 1

<211> 466

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

MVFLSGNATPSLDKNHQVPTIPVNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILVILSV
 ACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIW
 AAVDVLCTASIMGLCHISIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALS
 LVISIGPLFGWRQPAPEDETICQINEEPGYVLFSAALGSFYLPALAILVMYCR
 VYVAKRESRGLKSGLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGMASAKTK
 THFSVRLKFSREKKAAKTLGIVVGCFLCWLPFFLVMPIGSFFPDFKPS
 ETVFKIVFWLGYLNSCINPIIYPCSSQEFKAFQNVLRIQCLCRKQSSKHA
 LGYTLHPPSQAVEGQHKDMVRIPVGSRETFYRISKTDGVCEWKFFSSMP
 RGSARITVSKDQSSCTTARVRSKSFLQVCCCVGPSTPSLDKNHQVPTIK
 VHTISLSENGEEV

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

TPSLDKNHQVPTI

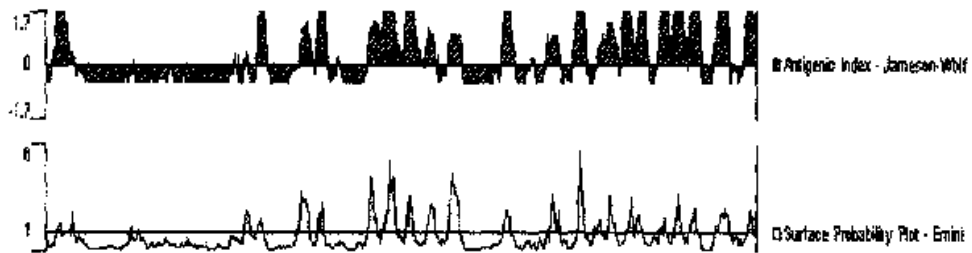


图 1

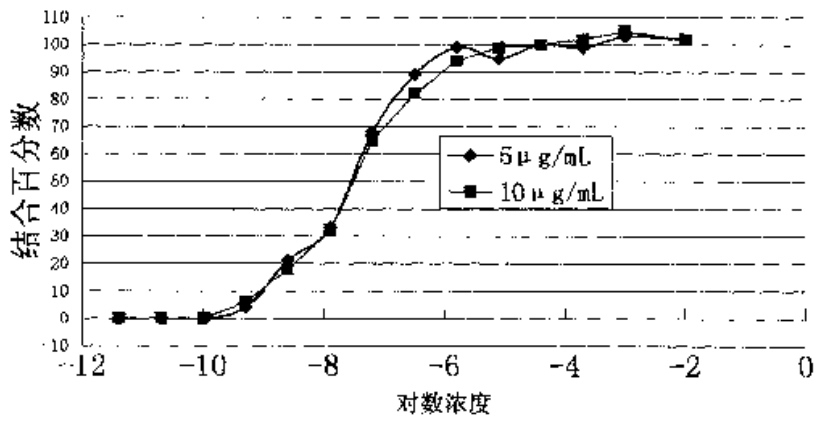


图 2

专利名称(译)	一种C端特异的ADRA1A多肽及其抗体制备方法		
公开(公告)号	CN101412748A	公开(公告)日	2009-04-22
申请号	CN200710163672.4	申请日	2007-10-18
[标]发明人	魏玉芝 刘晓维 杜宏武 梁武斌 吴巧雯		
发明人	魏玉芝 刘晓维 杜宏武 梁武斌 吴巧雯		
IPC分类号	C07K7/08 C07K16/18 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种C端特异的人ADRA1A多肽及其抗体的制备方法，属于以抗体为特征的体外试验用的生物制品。C端特异的ADRA1A多肽的氨基酸序列为：TPSLDKNHQVPTI。抗ADRA1A多肽抗体按以下方法制备：(1)ADRA1A抗原表位的分析；(2)ADRA1A的C端多肽合成；(3)合成多肽与载体蛋白交联；(4)制备免抗ADRA1A多肽抗体；(5)收集、分离得到含有抗体的血清，纯化抗体，即得到抗ADRA1A多肽抗体。本发明制备的C端特异的抗ADRA1A合成多肽抗体效价高、亲和力强、特异性好，可与天然ADRA1A发生特异性结合反应；制备成本低；纯化后的抗体可完全用于免疫印迹和酶联免疫吸附实验，以及建立体外免疫分析方法。该抗体为研究ADRA1A的体内外生物学功能提供了有用的工具。

MVFLSGNATPSLDKNHQVPTIPVNISKAILLGVILGGLIFGVLGNILVILSV
 ACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIW
 AAVDVLCCITASIMGLCCIISIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALS
 LVISIGPLFGWRQPAPEDETICQINEEPGYVLFSLGSLFYLPLAILVMYCR
 VYVAKRESRGLKSGLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGMASAKTK
 THFSVRLKFSREKKAATLGIVVGCFLCWLFFLVMPIGSFFPDFKPS
 ETVFKIVFWLGYLNSCINPIIYPCSSQEFKAFQNVLRQCLCRKQSSKHA
 LGYTLHPPSQAVEGQHKDMVRIPVGSRETFYRISKTDGVCEWKFFSSMP
 RGSARITVSKDQSSCTTARVRSKSLQVCCVGPSTPSLDKNHQVPTIK
 VHTISLSENGEEV