

[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 200910062497.9

[51] Int. Cl.

*G12N 15/70 (2006.01)*

*C12P 21/02 (2006.01)*

*C07K 14/435 (2006.01)*

*C07K 1/14 (2006.01)*

*C07K 16/18 (2006.01)*

*G01N 33/543 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年12月16日

[11] 公开号 CN 101603047A

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/536 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*C12R 1/19 (2006.01)*

[22] 申请日 2009.6.10

[21] 申请号 200910062497.9

[71] 申请人 武汉华美生物工程有限公司

地址 430070 湖北省武汉市洪山区关山一路

SBI 创业街特一号二单元 2302 室

[72] 发明人 华权高

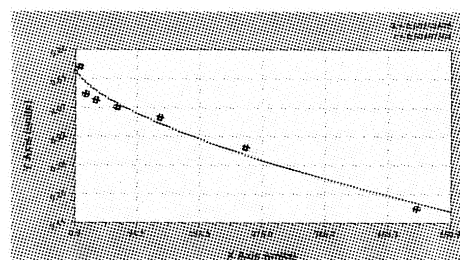
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 6 页

[54] 发明名称

重组人肾脏损伤分子 1 (KIM - 1) 的原核表达、纯化及其检测方法的建立

[57] 摘要

本发明涉及一种肾脏损伤相关蛋白的原核表达、纯化及其在体液样本中浓度的免疫学检测方法的建立。本发明提供了肾脏损伤分子 1 (KIM - 1) 的原核表达及纯化的方法, 该方法的建立为得到高纯度的 KIM - 1 提供了强有力的实验基础; 另外本发明涉及的重组 KIM - 1 作为抗原, 通过免疫学方法或基因工程原理有效的获得了, 特异性针对 KIM - 1 蛋白的抗体, 通过反复的实验验证, 该发明涉及的抗原抗体可以有效利用于人体液中 KIM - 1 的浓度检测; 该发明为肾病病人尿液或血浆中 KIM - 1 确定了一个简便、重现性好、适应性强的检测手段, 并使 KIM - 1 对临床的指导作用及进一步研究其功能提供了可能。



利用竞争法 ELISA 检测人尿液中 KIM-1 含量的标准曲线

- 1、重组人肾脏损伤分子 1 (KIM-1) 的原核表达、纯化及其检测方法的建立。
- 2、根据权利要求 1 所述的原核表达, 其特征是, 使用装载有包含人 KIM-1 基因的原核表达载体在原核宿主大肠杆菌中表达蛋白产物。
- 3、根据权利要求 1 所述的纯化, 其特征是, 将宿主表达出的带有标签的重组人 KIM-1 蛋白利用亲和层析、分子筛、离子交换等方法提高重组蛋白纯度。
- 4、根据权利要求 1 所述的重组人 KIM-1, 其特征是, 与天然人 KIM-1 具有相同或相似的免疫原性。
- 5、根据权利要求 1 所述的重组人 KIM-1, 其特征是, 该蛋白包括整个胞外域部分。
- 6、根据权利要求 1 所述的检测方法, 其特征是, 使用重组人 KIM-1, 通过免疫小鼠、家兔或通过噬菌体库, 获得高特异性人 KIM-1 的单抗、多抗、基因工程抗体, 并通过获得的抗体及重组蛋白, 基于免疫学方法建立包括但不限于免疫比浊法以及酶联免疫 (ELISA) 法的免疫学方法检测样品中人 KIM-1 的浓度的方法。

## 重组人肾脏损伤分子 1 (KIM-1) 的原核表达、纯化 及其检测方法的建立

### 技术领域

本发明涉及一种肾脏损伤相关蛋白的原核表达、纯化及其在体液样本中浓度的免疫学检测方法的建立。具体的来讲,本发明提供了肾脏损伤分子 1(KIM-1)的原核表达及纯化的方法,该方法的建立为得到高纯度的 KIM-1 提供了强有力的实验基础;另外本发明涉及的 KIM-1 作为抗原,通过免疫学方法或基因工程原理有效的获得了,特异性针对 KIM-1 蛋白的抗体,通过反复的实验验证,该发明涉及的抗原抗体可以有效利用于人体液中人 KIM-1 的浓度检测。

### 背景技术

肾脏损伤分子-1(KIM-1)是一种跨膜蛋白,在正常肾脏中并不表达,而在肾脏损伤的动物模型中表达明显增加。动物研究表明,KIM-1 的外功能区断裂后产物能够通过尿中排出,因此检测尿中 KIM-1 水平可以间接评价肾脏损伤的情况,但尚未证实这一理论在人类肾脏损伤中同样成立。荷兰学者 Timmeren 等对 102 例不同肾脏疾病病理标本及正常对照标本的肾小管中 KIM-1 表达的差异进行了分析,并对尿中 KIM-1 水平与肾脏损伤程度进行了相关性分析。

结果表明,与正常对照组相比,在所有肾脏疾病中肾组织 KIM-1 的表达和尿中 KIM-1 水平均明显增高。免疫组化检测显示,肾脏损伤时 KIM-1 在发

生纤维化及炎症反应部位的肾小管弥漫性表达，集中在靠近管腔一侧，与钙粘蛋白分离，与波形蛋白紧密结合。另一个鲜明的特点是，不管造成肾脏损伤的原发疾病是否相同，KIM-1 的表达与肾脏损伤的程度呈现正向相关，而与肾脏功能呈现明显的负相关，与蛋白尿的水平之间并没有相关关系。尿中 KIM-1 水平与局部组织中 KIM-1 表达水平具有密切的正相关关系，同时局部组织中的炎症情况也会影响尿中 KIM-1 的水平，尿中 KIM-1 排泄增多提示肾脏功能的下降，这种相关关系同样具有统计学差异，尿中 KIM-1 水平与蛋白尿水平间同样没有明确的相关关系。

因此 Timmeren 等认为，在肾脏疾病患者中，KIM-1 在肾小管细胞表达增加并与肾脏损伤程度密切相关。尿中 KIM-1 水平能够反映组织中 KIM-1 表达情况及炎症反应程度，并与肾脏功能密切相关，因此可将 KIM-1 作为监测肾脏病损伤状态的非侵入性生物标志。

从蛋白一级结构分析，人 KIM-1 共包括 364 个氨基酸，其中 1-20 为信号肽，表达时被切除成为成熟状态；21-290 位为胞外部分；291 位-311 位为一段具有 21 个氨基酸的跨膜序列；最后 48 个氨基酸则构成了该蛋白的胞内域。

## 发明内容

本发明提供了重组人 KIM-1 的原核表达、纯化及其检测方法的建立，包括以下步骤：

将KIM-1编码胞外域的基因扩增获得后插入表达载体PET28a，得到PET28a-KIM-1。

所述表达是在将质粒HIS-KIM-1在大肠杆菌中表达和培养。

所述纯化是指将大肠杆菌破碎，然后离心或过滤分离出融合蛋白。破碎可采用电动捣碎机或匀浆机破碎或用超声波处理破碎，也可以用溶菌酶处理。可用本领域内常用的层析法或电泳法进行，优选凝胶层析法进行。

所述检测方法是指利用上述方法得到蛋白作为抗原通过免疫学方法或基因工程原理获得的抗体，利用免疫学方法检测样品中的浓度的方法

具体的说：上述步骤如下进行：

1) PCR扩增表达KIM-1的基因片段，两端带有NdeI和XhoI酶切位点，酶切消化后插入NdeI和XhoI消化后的Pet28a，得到质粒PET28a-KIM-1；

2) HIS-KIM-1在大肠杆菌Rosetta中表达，克隆接种至3ml含有100ug/ml kana的LB缓冲液，37℃，过夜，220rpm；将过夜培养物1：100稀释至1L含有100ug/ml kana的LB缓冲液，37℃，220rpm，培养5h；加入终浓度为0.1mM的IPTG，22℃，180rpm，继续培养22h；以8000g，15min，4℃离心收菌；菌体用50mM Tris-Cl，200mM NaCl pH8.0悬起至25ml，加入5mg溶菌酶，RT，0.5h；用超声破碎仪超声至溶液澄清，12000rpm，20min离心3次；

3) 将上清液使用GE healthcare的chelating sepHarose Fast Flow柱料纯化，得到纯化融合蛋白。

4) 凝血酶酶切HIS标签，Ni柱纯化，得到除去标签的KIM-1蛋白。

实验证明，纯化后KIM-1可溶性极高，20mg/ml KIM-1在50mM Tris，500mM NaCl中保存，于4℃几个月内未见明显沉淀未有降解，FPLC表明KIM-1为单体，一年内未有聚合物出现。

本发明提供的利用PET28a系统融合表达再经酶切处理去掉标签制得的

KIM-1蛋白，可以在大肠杆菌中成功表达，表达量与前人的结果类似，相对于真核表达，原核表达制备工程化抗体技术相对简单，成本更低；

5) 将纯化后重组KIM-1蛋白作为抗原分别免疫家兔和小鼠，获得高特异性针对KIM-1蛋白的多克隆抗体及单克隆抗体；

6) 利用获得的抗体及高纯度的重组KIM-1蛋白，利用包括但不限于双夹心ELISA法、免疫比浊法等方法检测人体液中的KIM-1的含量。

## 附图说明

图1: 图中显示内容为本发明中使用的蛋白表达载体PET28a的载体图谱。

图2: 图中显示内容为本发明中HIS-KIM-1融合蛋白小量表达蛋白电泳图片。

图中: 1、蛋白分子量标准，由上至下分子量标准为115kd、66kd、45kd、

35kd、25kd、18.4kd、14.4kd

2、未加IPTG诱导的菌株；

3、加IPTG诱导的菌株。

图3: 图中显示内容为本发明中纯化后的KIM-1蛋白电泳图片。

图中: 1和2、纯化后的KIM-1蛋白；M、蛋白分子量标准，由上至下分子量标准为115kd、66kd、45kd、35kd、25kd、18.4kd、14.4kd。

图4: 图中显示内容为本发明中纯化后KIM-1蛋白Superdex200凝胶过滤层析洗脱曲线。

图中: 最高的峰为纯化后KIM-1蛋白的峰。

图5: 图中显示内容为本发明中纯化KIM-1多克隆抗体亲和层析柱洗脱曲线。

图6: 利用竞争法ELISA检测人尿液中KIM-1含量的标准曲线。

表 1: 利用免疫比浊法检测人尿液中 KIM-1 的回收率。

尿液中添加浓度 (ug/ml)	检测浓度 (ug/ml)	回收率
0	<0.0002	0
0.002	0.00209	104.5%
0.008	0.00803	100.36%
0.04	0.0397	99.25%
0.1	0.0985	98.5%
0.2	0.187	93.4%
0.5	0.502	100.4%

## 具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

### 实施例1 KIM-1的制备

KIM-1蛋白广泛存在于多种生物体中，其编码基因一般可以通过RT-PCR从生物体cDNA中获得，本发明中，以质粒PCDNA3.1-KIM-1为模板扩增得到。

#### 1. 克隆PET28a-KIM-1:

选择表达载体PET28a为克隆载体（见图1），根据其多克隆位点及KIM-1序列特点，设计两端引物PCR扩增表达KIM-1的基因片段，两端带有NdeI和XhoI酶切位点，酶切消化后插入NdeI和XhoI消化后的Pet28a，得到质粒PET28a-KIM-1；

## 2. 表达纯化PET28a-KIM-1:

将质粒HIS-KIM-1在大肠杆菌Rossetta中表达。首先通过小量表达鉴定，诱导株与未诱导株相比，在60KD左右处有明显特异条带（见图2），大量培养后，通过SDS-PAGE分析上清沉淀，结果显示，该蛋白在上清中存在，利用其所带HIS标签，通过IMAC的方法，可获得纯度为99%以上的目的蛋白（见图3）。

HIS-KIM-1在大肠杆菌Rosetta中表达，克隆接种至3ml含有100ug/ml kana的LB缓冲液，37℃，过夜，220rpm；将过夜培养物1:100稀释至1L含有100ug/ml kana的LB缓冲液，37℃，220rpm，培养5h；加入终浓度为0.1mM的IPTG，22℃，180rpm，继续培养22h；以8000g，15min，4℃离心收菌；菌体用50mM Tris-Cl，200mM NaCl pH8.0悬起至25ml，加入5mg溶菌酶，RT，0.5h；用超声破碎仪超声至溶液澄清，12000rpm，20min离心3次；上清使用GE healthcare的chelating sepHarose Fast Flow柱料纯化，步骤参照其厂家提供的说明书。

HIS-KIM-1于咪唑浓度为60mM时被洗脱。产量高达50-100毫克每升培养物。

凝血酶酶切HIS标签，Ni柱纯化，得到除去标签的KIM-1蛋白。

为分析KIM-1在溶液中是否均一，将2mg KIM-1换至20mM Tris-Cl，pH8.0，50mM NaCl的缓冲液中。样品通过20mM Tris-Cl，pH8.0，50mM NaCl平衡好的superdex 200柱子。整个操作参考AKTA Purifier提供的手册。结果显示：纯化好的KIM-1于咪唑浓度为60mM时被洗脱。产量高达50-100毫克每升培养物。

通过superdex 200柱子时未见明显的多聚体，主要以一个均一的峰出现（见图4）。

## 实施例2 KIM-1多克隆抗体及单克隆抗体的制备

1. 多克隆抗体的制备：取蛋白1ml（0.5mg左右），与弗式完全佐剂1: 1（V/V）充分混合乳化，乳化物滴于冰水上几分钟内完全不扩散为好。选取2.5-3kg的健康雌兔一只，初次免疫在兔后足足垫和背部皮下多点注射，每点注射量约100 $\mu$ l。两周后，再取1ml，与不完全佐剂1: 1混合，兔背部皮下多点注射。两周后，同样加强免疫一次。10天后，加强免疫一次，10天后再加强免疫一次。若测效价高（双扩散，1/8以上），三天后颈动脉放血，血液于4度凝固后，于5000rpm离心5min得到抗血清，用亲和层析方法纯化抗体。

### 2. 单克隆抗体制备：

2.1 免疫6周龄雌性BALB/C小鼠5只，剂量为每只0.2mL（含50 $\mu$ g KIM-1蛋白），背部皮下分点注射。首免与等量弗式完全佐剂混合乳化，加强免疫与等量弗式完全佐剂混合乳化，共免5次，每次间隔4周，最后1次免疫后10天断尾采血分离血清，间接ELISA检测效价，操作程序参照TIJSEN的方法。

### 2.2 融合、杂交瘤筛选

#### 1) 细胞融合

融合前2d用RPMI-1640传代培养NS0细胞，前1d用HAT培养滋养细胞；小鼠摘除眼球采血，分离阳性血清，脱颈致死小鼠，无菌取脾脏制备脾细胞，在50% PEG4000作用下与NS0细胞融合，将融合后的细胞悬液加到已铺有滋养细胞层的96孔细胞培养板中，HAT培养。

#### 2) 融合细胞的培养及阳性杂交瘤的筛选与克隆

融合细胞共培养14d，分别于第4，7，10d用HAT换液，第14d起用RPMI-1640培养并筛选；间接ELISA进行阳性孔筛选，选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔有限稀释克隆化，而后扩大培养、冻存和鉴定。

3) mAb的制备采用体内诱生腹水法。并用亲和层析纯化抗体。

### 实施例3 用夹心法 ELISA 确定病人尿液 KIM-1 浓度

具体步骤是：包被 KIM-1 抗体 A；配制系列 KIM-1 标准品；准备病人尿液；将系列标准品或待定值的病人尿液加入 96 微孔板孔内，再使已标记的、结合位点不同于包被在 96 微孔板上抗体 A 的抗体 B 结合，用基质液显色 20-30 分钟后终止显色，10 分钟后测定上述系列标准品和待检测的病人尿液中 KIM-1 反应后的吸光度；建立系列标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从曲线中查出待定值的病人尿液的 KIM-1 的浓度。

### 实施例4 用竞争法 ELISA 确定病人尿液 KIM-1 浓度

具体步骤是：包被 KIM-1 多克隆抗体；配制系列 KIM-1 标准品；准备病人尿液；使系列标准品或待定值的病人尿液和已标记的 KIM-1 标准品混合；用基质液显色 20-30 分钟后终止显色，10 分钟后测定上述系列标准品和待检测的病人尿液中 KIM-1 反应后的吸光度；建立系列标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从曲线中查出待定值的病人尿液的 KIM-1 的浓度。

### 实施例5 乳胶增强免疫比浊法检测病人尿液中的 KIM-1 含量

实现本实例的技术方案：一种检测人 KIM-1 的免疫比浊法，用抗 KIM-1 的

多克隆抗体首先与乳胶交联，然后用交联后的乳胶溶液与待检标本的 KIM-1 反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光投射强度或光散射强度表征这种变化；从 KIM-1 标准品的浓度与相应光散射强度或光投射强度的标准曲线查出待检样本的 KIM-1 含量；其中所用的 KIM-1 的多克隆抗体效价至少为 1: 500，不含杂抗体，具有识别 KIM-1 多种抗原决定簇；待检标本用稀释剂做 1: 200-1: 1000 稀释。

上述方法中，所述 KIM-1 标准品是纯 KIM-1，其浓度为 0.2mg/ml，先用稀释剂做 1: 200 倍稀释，再做倍比稀释，做成系列标准品，供作标准曲线用。

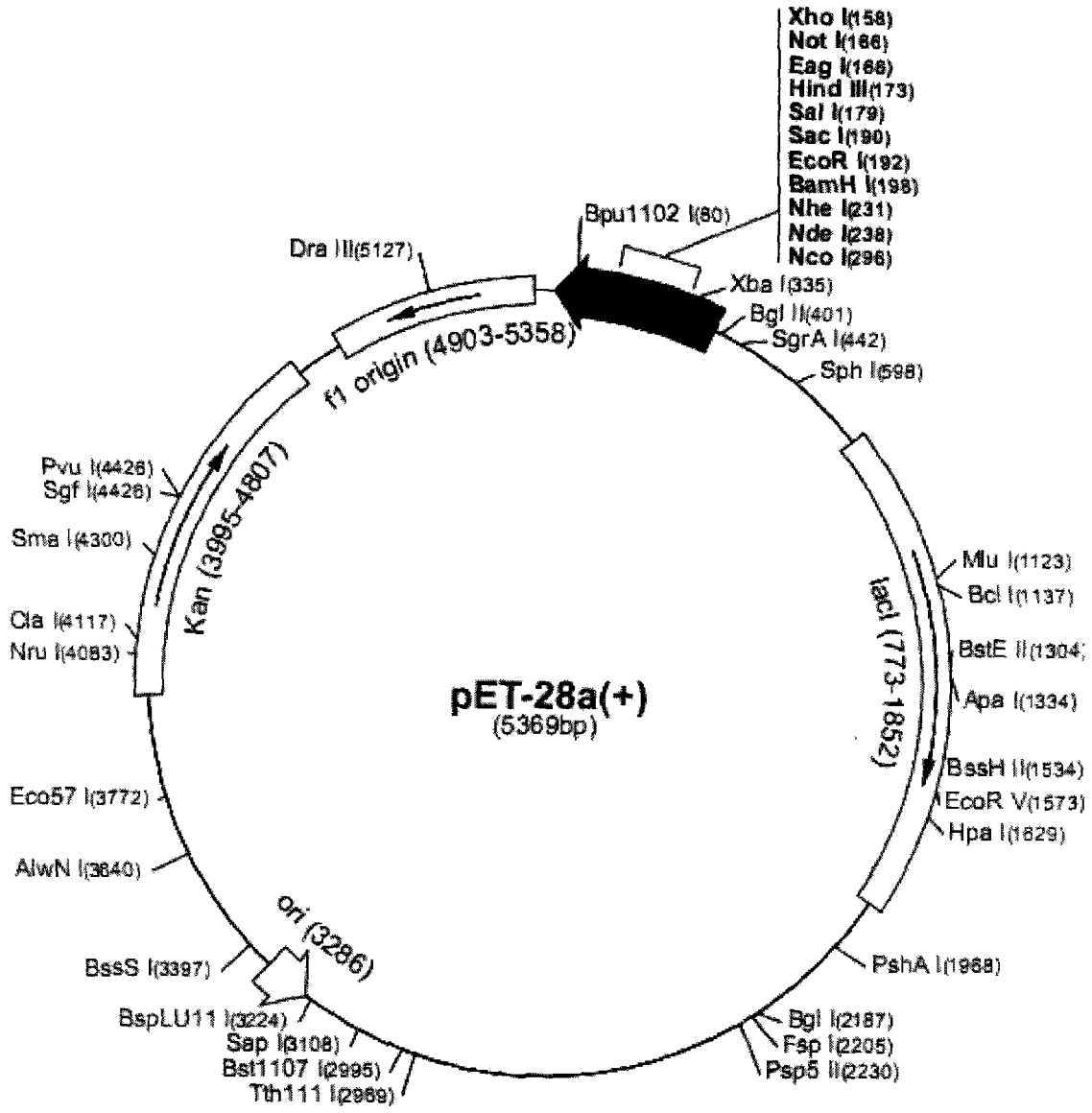


图 1 PET-28a 载体图谱

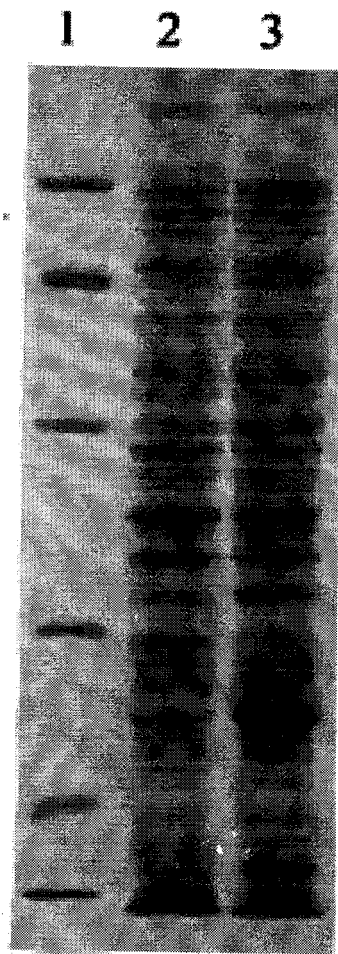


图2 KIM-1 的小量表达图谱

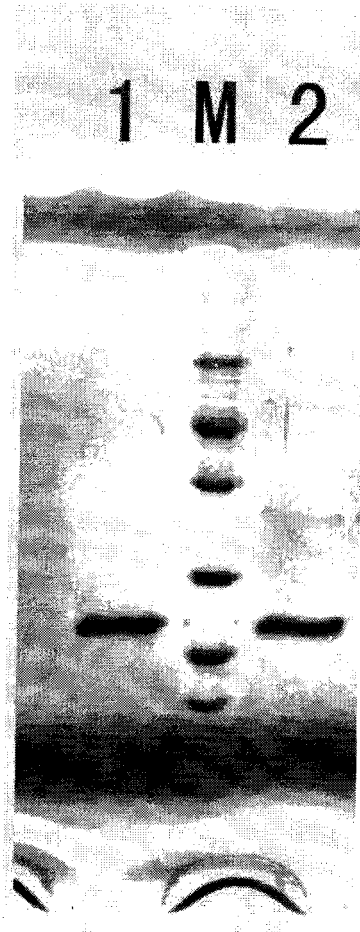


图3 纯化后的 KIM-1 蛋白质

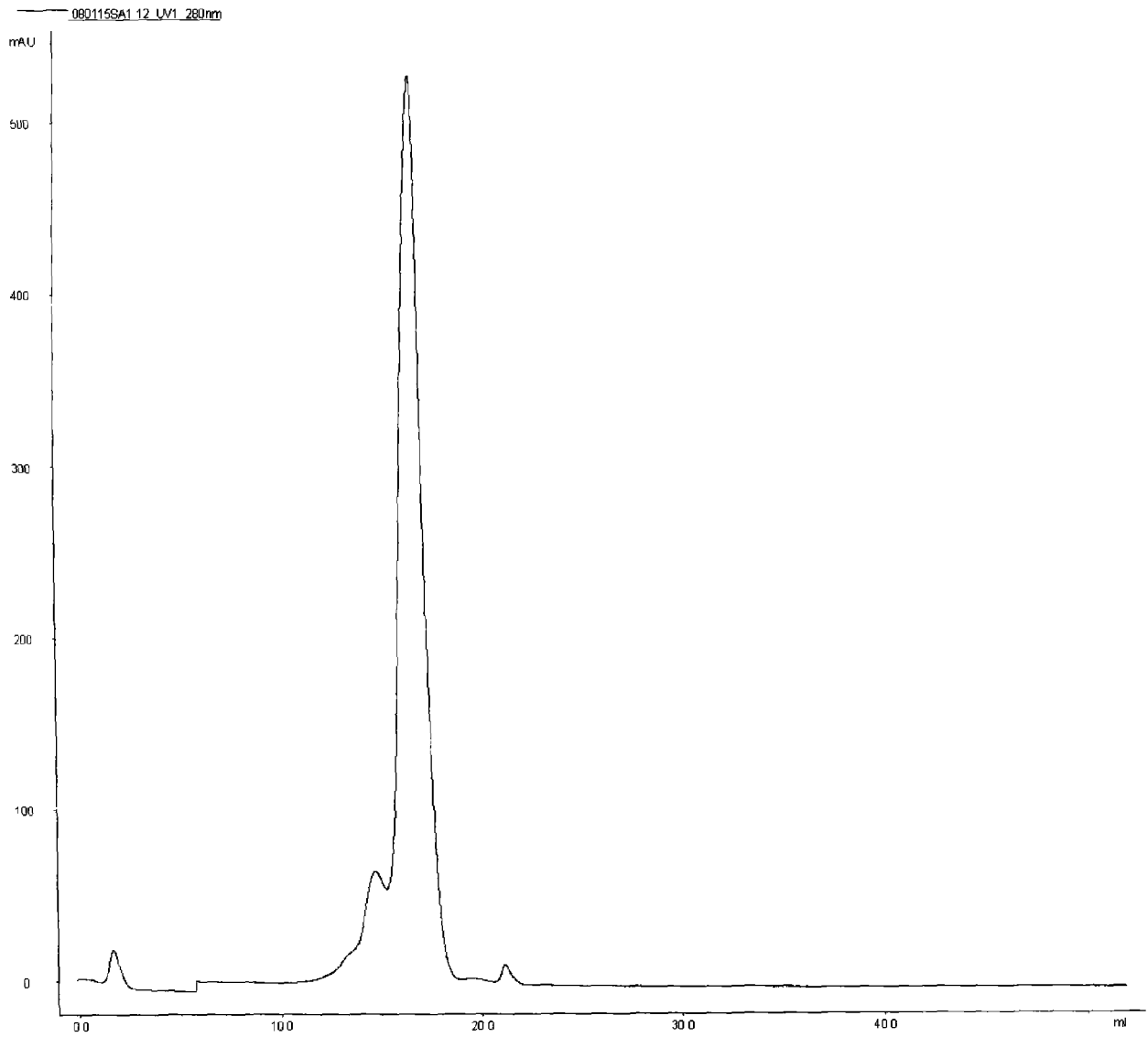


图 4 纯化后 KIM-1 蛋白 Superdex200 凝胶过滤层析洗脱曲线

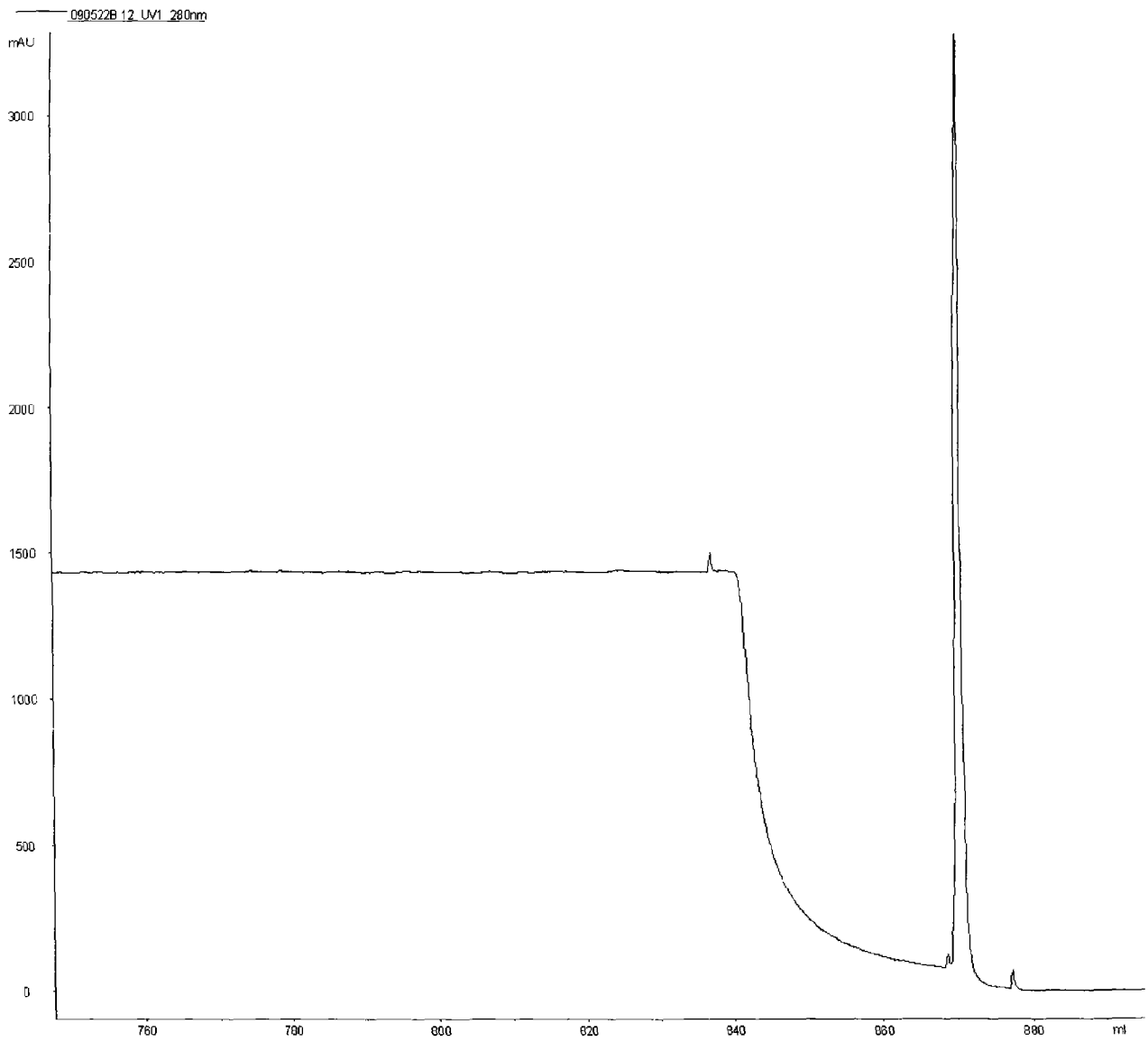


图 5 纯化 KIM-1 多克隆抗体亲和层析柱洗脱曲线

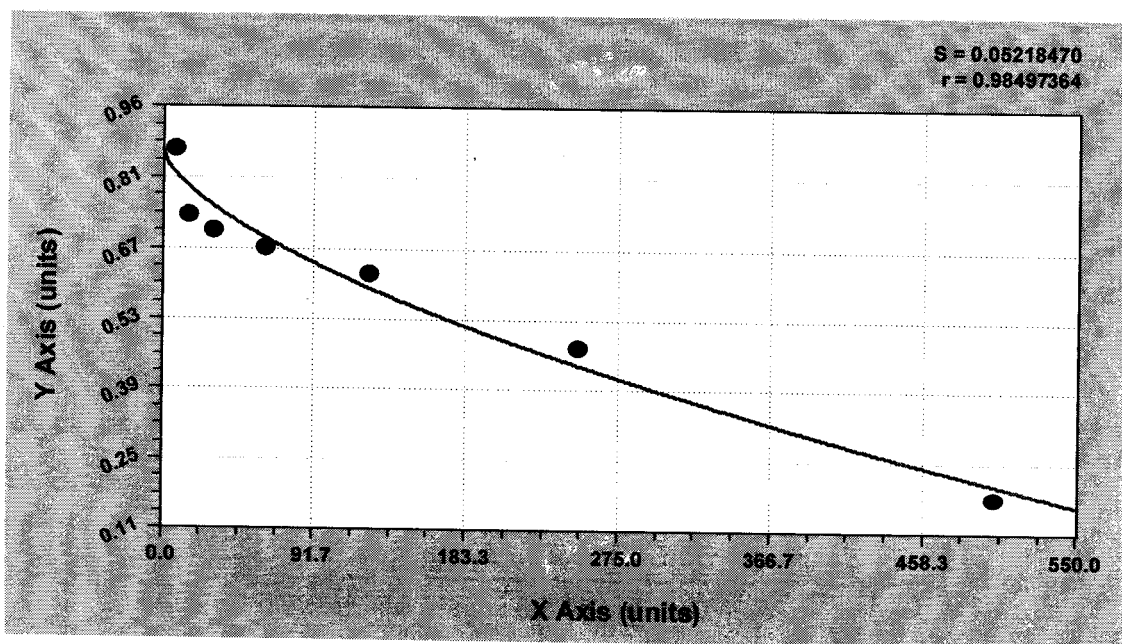
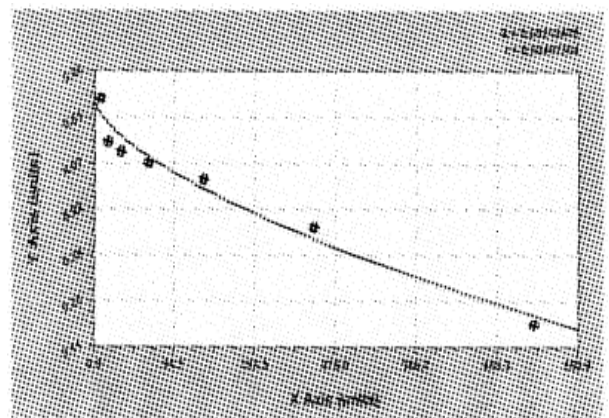


图 6 利用竞争法 ELISA 检测人尿液中 KIM-1 含量的标准曲线

专利名称(译)	重组人肾脏损伤分子1(KIM - 1)的原核表达、纯化及其检测方法的建立		
公开(公告)号	<a href="#">CN101603047A</a>	公开(公告)日	2009-12-16
申请号	CN200910062497.9	申请日	2009-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
[标]发明人	华权高		
发明人	华权高		
IPC分类号	C12N15/70 C12P21/02 C07K14/435 C07K1/14 C07K16/18 G01N33/543 G01N33/536 G01N33/53 C12R1/19		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种肾脏损伤相关蛋白的原核表达、纯化及其在体液样本中浓度的免疫学检测方法的建立。本发明提供了肾脏损伤分子1(KIM - 1)的原核表达及纯化的方法，该方法的建立为得到高纯度的KIM - 1提供了强有力的实验基础；另外本发明涉及的重组KIM - 1作为抗原，通过免疫学方法或基因工程原理有效的获得了，特异性针对KIM - 1蛋白的抗体，通过反复的实验验证，该发明涉及的抗原抗体可以有效利用于人体液中KIM - 1的浓度检测；该发明为肾病病人尿液或血浆中KIM - 1确定了一个简便、重现性好、适应性强的检测手段，并使KIM - 1对临床的指导作用及进一步研究其功能提供了可能。



利用竞争法 ELISA 检测人尿液中 KIM-1 含量的标准曲线