



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102286097 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 201110165331. 7

(22) 申请日 2011. 06. 20

(71) 申请人 中国农业科学院植物保护研究所
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 李莉 王锡锋 李羽 周广和
刘艳 吴蓓蕾

(74) 专利代理机构 北京兆君联合知识产权代理
事务所 (普通合伙) 11333
代理人 胡敬红

(51) Int. Cl.

C07K 14/795 (2006. 01)

C07K 16/16 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 抗原、
抗体及其制备方法、应用

(57) 摘要

本发明涉及“人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 抗原、抗体及其制备方法、应用”，属于生物技术领域。人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白抗原，包括具有免疫原性的载体蛋白和与其偶联的人工合成的多肽，所述多肽的氨基酸序列为 SEQ ID N01 或 / 和 SEQ ID N02。本发明应用该人工合成多肽与匙孔血蓝蛋白的偶联物作为抗原，制备得到了三种 PAP 抗血清，可应用于 PAP 制剂、PAP 基因原核表达和真核表达产物、转基因再生植株等检测，能够采用免疫学手段检测 PAP 及其基因的表达情况，为 PAP 的检测提供物质基础。

1. 人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 抗原,包括具有免疫原性的载体蛋白和与其偶联的人工合成的多肽,所述多肽的氨基酸序列为 SEQ ID N01 或 / 和 SEQ ID N02。
2. 根据权利要求 1 所述的抗原,所述具有免疫原性的载体蛋白为马来酰胺活化的匙孔贻血蓝蛋白 (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH)。
3. 权利要求 1 或 2 所述的抗原制备得到的美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 抗体。
4. 权利要求 3 所述的抗体,其中抗体为兔多克隆抗体。
5. 权利要求 4 所述的抗体的制备方法,其特征在于:将权利要求 1 或 2 所述的抗原免疫兔子,然后取其静脉血或全血,分离抗血清纯化即可。
6. 权利要求 5 所述的制备方法,所述抗原采用下述方法制得:人工合成 SEQ ID N01 或 / 和 SEQ ID N02 所示的多肽,将其与马来酰胺活化的匙孔贻血蓝蛋白偶联得到。
7. 权利要求 5 所述的制备方法,所述免疫的程序为:1) 首免:600ug/ 只,将权利要求 1 或 2 所述的抗原溶液加等体积弗氏完全佐剂乳化后皮下 6 点注射,2) 二免、三免、四免分别 在第 21、35 和 49 天注射,每次 400ug/ 只,权利要求 1 或 2 所述的抗原溶液加等体积弗氏不完全佐剂乳化后皮下 4 点注射。
8. 权利要求 5 所述的制备方法,所述兔子为新西兰大白兔。
9. 权利要求 3 或 4 所述的美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 抗体在天然的美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 或缺失型 PAP 基因的表达产物或转基因美洲商陆抗病毒蛋白基因的植株检测中的应用。

人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)抗原、抗体及其制备方法、应用

技术领域

[0001] 本发明专利属于生物学和生物技术领域,特别是涉及利用人工合成的多肽作为抗原,制备得到美洲商陆抗病毒蛋白多克隆抗体的技术。

背景技术

[0002] 美洲商陆抗病毒蛋白(Pokeweed antiviral protein, PAP)是从美洲商陆(*Phytolacca americana* L.)植株春天叶片中分离出的单链(I型)核糖体失活蛋白(Ribosome Inactivating Proteins, RIPs),分子量约为30kD。RIPs具有独特的rRNA-N糖苷酶活性,能够水解真核生物核糖体28S大亚基RNA GAGA茎环(stemloop)结构上特定位点的腺嘌呤残基,从而使核糖体失活,干扰核糖体与延伸因子的结合,继而抑制蛋白质的生物合成(Irvin, J. D. & Uckun, F. M. Pokeweed antiviral protein: ribosome inactivation and therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.* 1992, 55: 279-302)。

[0003] 自Duggar等1925年发现商陆中存在一种潜在的能阻碍植物病毒传播的因子, Kassanis等从美洲商陆叶片中分离、纯化了该阻碍因子,并初步描述了其特性后,人们开始了一系列研究。研究发现PAP是目前所有RIPs中最为有效的抗病毒蛋白,低浓度就具有很强的抗性。其不仅对7个病毒组的7种植物病毒有抑制作用,还对包括艾滋病毒(human immunodeficiency virus 1, HIV 1)在内的多种动物病毒、真菌、细菌的侵染有一定的抑制作用,在体外,该蛋白可以阻碍脊髓灰质炎病毒和流感病毒的复制,在体外无细胞蛋白质合成系统(兔网织红细胞)中,可以阻碍真核生物蛋白质的合成(Kassanis, B., & A. Kleczkowski. The isolation and some properties of a virus-inhibiting protein from *Phytolacca esculents*. *J. Gen. Microbiol.* Academic Press, N. Y. 1948; Tomlinson, J. A. et al., The inhibition of infection by cucumber mosaic virus and influenza virus by extract of *Phytolacca americana*, *J. Gen. Virol* 1974, 22, 225-232; Aron G M, Irvin J D, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980, 17: 1032-1033; Zarling J M, Moran P A, Haffar O et al. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4 cells by monoclonal antibodies. *Nature*, 1990, 347: 92-95; Chen Z C, White R F, Antoniw J F, et al. Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the infection of plant viruses. *Plant Pathology*, 1991, 40: 610-612; Olson, M. S. Ramakrishnan, T. Anand, Ribosomal inhibitory proteins from plants inhibits HIV-1 replication in acutely infected peripheral blood mononuclear cells, *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1991, 7, 1025-1030)。

[0004] 正是由于PAP有着这种广谱性的抑制危害动、植物及人体的病原真菌、细菌和病毒的作用,因此其越来越引起人们的好奇和重视,不断的促使人们对其进行深入研究,并希望在不久的将来在农业和医学领域发挥其特殊的作用和实用价值。

[0005] 成熟的PAP全长262个氨基酸,其中N端22个氨基酸组成信号肽,负责将PAP

从核糖体向细胞膜运输, C 端 25 个氨基酸为毒性区 (Nonzingo, A. F. E. J. Collons, The 2.5A structure of pokeweed antiviral protein, J. Mol. Biol. 1993, 233, 705-715)。缺失 C 端毒性区的 PAP 突变体对细胞的毒性很低, 仍具有较强的抗病毒活性 (Jennifer K. Lodge, Nilgun E. Tumer. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. 1993, 90 :7089-7093.)。Lodge 等将 PAP 基因导入烟草和马铃薯, 获得的转基因植株及其后代具有广谱的抗病毒特性, 包括对机械和蚜虫传播的病毒如马铃薯 X 病毒 (Potato virus X, PVX)、马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY)、马铃薯卷叶病 (Potato leaf roll virus, PLRV)、黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV)、烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV)、苜蓿花叶病毒 (alfalfa mosaic virus, AMV) 等均有抗性 (Jennifer K. Lodge, Nilgun E. Tumer. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. 1993, 90 :7089-7093)。国内学者在油菜、番茄等作物上也获得了对芜菁花叶病毒 (Turnip mosaic virus, TuMV)、TMV、CMV、PVX 有抗性的转基因植株 (张海燕, 党本元, 周奕华等用微束激光穿刺技术将 PAP 导入油菜获得抗病毒转基因植株中国激光, 1999, 26 (1) :1053-1056.; 傅道林, 王兰岚, 张海燕等用微束激光穿刺技术将商陆抗病病毒蛋白 (PAP) cDNA 导入马铃薯的研究光子学报, 2000, 29 (11) :970-974.)。本实验室也克隆到了缺失 C、N 端的 PAP 基因, 并构建原核生物、真核生物表达载体, 通过室内摇瓶发酵制备了 PAP, 并分别将缺失型 PAP 基因导入小麦、玉米、棉花和矮牵牛, 获得了抗病植株 (陈定虎, 王锡锋, 李莉等, 美洲商陆抗病病毒蛋白在毕赤酵母中的表达及其抗病毒活性的测定 [J]。农业生物技术, 2003, 11 (2) :183-186; 周倩, 王锡锋, 李莉, 周广和, 高必达. 2003 毕赤酵母 Mut+ 和 Muts 重组子表达美洲商陆抗病病毒蛋白基因的比较, 植物病理学报, 33 (5) :425-428.)。

[0006] 在 PAP 基因及制剂的研究应用过程中, 经常需要明确 PAP 基因是否表达, 以及表达的情况。比如在转基因植株的检测、PAP 原核和真核表达产物的检测、PAP 与寄主植物的互作因子等研究中, 都需要高效价、特异性的 PAP 抗血清。Schlick 等从美洲商陆植株中分离、纯化了 PAP, 制备 PAP 的多克隆抗血清, 能有效的检测 PAP, 但由于 PAP 在美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 植株内的含量有限, 纯化步骤繁琐、费时, 使得 PAP 的提取非常困难 (Jean-Luc Schlick, Philippe Dulieu, Development of a double sandwich ELISA able to discriminate between free PAP and complexed PAP in leaf extracts. Plant Science 1999, 140 :1-8.)。本实验室曾利用原核表达产物制备了多克隆抗血清, 但特异性差, 不能满足转基因植株和 PAP 表达产物检测的需要。

发明内容

[0007] 本发明应用人工合成多肽与具有免疫原性的载体蛋白 (马来酰胺活化的匙孔碱血蓝蛋白) 的偶联产物作为抗原, 制备得到了兔多克隆抗体, 该抗体可应用于 PAP 制剂、PAP 基因原核和真核表达产物、转基因再生植株、PAP 与寄主植物的互作因子等研究中, 能够采用免疫学手段检测 PAP 及其基因的表达情况, 为 PAP 的检测提供物质基础。

[0008] 人工合成的美洲商陆抗病病毒蛋白 (PAP) 抗原, 包括具有免疫原性的载体蛋白和与其偶联的人工合成的多肽, 所述多肽的氨基酸序列为 SEQ ID N01 或 / 和 SEQ ID N02。

[0009] 所述具有免疫原性的载体蛋白为马来酰胺活化的匙孔碱血蓝蛋白 (Keyhole

LimpetHemocyanin, KLH)。

[0010] 所述的抗原制备得到的美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 抗体。

[0011] 其中抗体为兔多克隆抗体。

[0012] 所述的抗体的制备方法,其特征在於:将权利要求 1 或 2 所述的抗原免疫兔子,然后取其静脉血或全血,分离抗血清纯化即可。

[0013] 所述抗原采用下述方法制得:人工合成 SEQ ID NO1 或 / 和 SEQ ID NO2 所示的多肽,将其与马来酰胺活化的匙孔瓣血蓝蛋白偶联得到。

[0014] 所述免疫的程序为:1) 首免:600ug/只,将权利要求 1 或 2 所述的抗原溶液加等体积弗氏完全佐剂乳化后皮下 6 点注射,2) 二免、三免、四免分别在第 21、35 和 49 天注射,每次 400ug/只,权利要求 1 或 2 所述的抗原溶液加等体积弗氏不完全佐剂乳化后皮下 4 点注射。

[0015] 所述兔子为新西兰大白兔。

[0016] 所述的美洲商陆抗病毒蛋白抗体在天然的美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 或缺失型 PAP 基因的表达产物或转基因美洲商陆抗病毒蛋白基因的植株检测中的应用。

[0017] 本发明根据本实验室改造的缺失了 N 端信号肽及 C 端毒性区的美洲商陆抗病毒蛋白 (缺失型 PAP) 基因片段推测的氨基酸的序列 (Genbank No. AF338910), 序列如 SEQ ID NO3 所示,通过在 GenBank 的 BLAST 比对,选择免疫原性和亲水性均较好、线性表位可能性大、且预测无二级结构的多肽序列 (SEQ. ID NO. 1 :DISGTERQDVETTLIC 和 SEQ. IDNO. 2 : CRYPTLESKAGVKSR)。人工合成多肽片段,并与具有免疫原性的载体蛋白匙孔瓣血蓝蛋白偶联,免疫新西兰大白兔,制备得到了抗体,该抗体可特异性的检测美洲商陆植株内的天然 PAP、缺失型 PAP 基因在原核和真核生物内的表达产物、以及其在转基因植物的表达情况。

[0018] 本发明的抗原有三个,其中的一个是采用 SEQ ID NO1 所编码的多肽与马来酰胺活化的匙孔瓣血蓝蛋白偶联得到,另一个是采用 SEQ ID NO2 所编码的多肽与马来酰胺活化的匙孔瓣血蓝蛋白偶联得到,还有一个是采用上述两个抗原的混合体作为抗原。

[0019] 上述抗原分别制备得到了三种兔多克隆抗体 antiPAP1、antiPAP2 和 antiPAP3,其中 antiPAP1 效价最高,说明 SEQ ID NO1 所示的多肽偶联得到的抗原,其免疫原性最好。应用该抗体检测美洲商陆植株、缺失型 PAP 基因在酵母中的表达产物、及转基因矮牵牛中的 PAP 表达情况,均获得了成功。

附图说明

[0020] 图 1. SDS-PAGE 凝胶电泳检测纯化后的抗体

[0021] 其中泳道 1 :中分子量蛋白非预染 Marker IV

[0022] 泳道 2 :抗原亲和纯化抗 SEQ ID NO1 多肽的兔多克隆抗体 (antiPAP1)

[0023] 图 2 抗体的特异性检测

[0024] 其中泳道 1 :预染 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 ;泳道 2 :阴性对照 (非转基因矮牵牛植株);泳道 3 :转缺失型 PAP 基因矮牵牛植株 ;泳道 4 :缺失型 PAP 基因在酵母中的表达产物

[0025] 图 3 转缺失型 PAP 基因矮牵牛植株的检测

[0026] 其中泳道 1 :预染 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 ;泳道 2 :阴性对照 (非转基因矮

牵牛植株);泳道3:美洲商陆春天植株;泳道4-9:转缺失型PAP基因矮牵牛植株;泳道10:缺失型PAP基因在酵母中的表达产物

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0028] 下述实施例中所用的方法如无特殊说明均为常规方法。

[0029] 试剂和仪器

[0030] 用于多肽偶联的载体蛋白马来酰胺活化的匙孔瓣血蓝蛋白试剂盒 (ImjectR Maleimide Activated mcKLH Kit)、免疫动物的完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂为 Pierce 公司 (Pierce Biotechnology, USA) 产品。用于抗血清纯化的 CNBr-activated Sepharose 4B 购自 GE Healthcare Life Science, Protein A 凝胶为北京康为世纪生物科技有限公司 (CW BIO) 产品。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 购自 Promega 公司。TMB 底物显色试剂盒 (20x)、中分子量蛋白非预染 Marker IV 为北京康为世纪生物科技有限公司 (CW BIO) 产品。HD-4 层析工作站出自上海沪西仪器厂,层析柱为 Phamacia 产品,DEM-3 型自动洗板机为北京拓普分析仪器有限公司产品,酶标仪为 BIO-RAD (680 型) 产品。免疫用新西兰大白兔,体重约 2kg,来自北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂。PAP 在酵母中的表达产物和转基因矮牵牛植株保存在本实验室,可以向公众提供。其它生化试剂均为进口或国产分析纯。

[0031] 实施例 1

[0032] 1.1 多肽序列的设计和合成

[0033] 根据本实验室改造的缺失型 PAP 基因片段 (缺失了 N 端信号肽及 C 端致毒区) 推测的氨基酸的序列 (Genbank No. AF338910) (SEQ ID NO3),通过 BLAST 与 Genbank 检索的序列进行同源比对分析,利用 DNASTar 和 Biosum 等分析软件进行蛋白的二级结构和抗原表位预测,选择了 2 个免疫原性和亲水性均较好、线性表位可能性大、且预测无二级结构的多肽序列,SEQ ID NO1:DISGTERQDVETTLIC 和 SEQ ID NO2:CRYPTLESKAGVKSR。多肽由上海吉尔多肽有限公司 (Shanghai GL peptide Ltd.) 合成。

[0034] 1.2 多肽偶联制得抗原

[0035] 由于小分子多肽没有免疫原性,需要偶联到一个具有免疫原性的载体蛋白上,将偶联物作为抗原,用于免疫动物。本发明用于多肽偶联的载体蛋白为匙孔瓣血蓝蛋白 (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH),偶联步骤按照试剂盒 (ImjectR Maleimide Activated mcKLH Kit) 的说明进行,偶联结束后通过电泳检测偶联效率。

[0036] 1.3 抗血清的制备

[0037] 1.3.1 动物免疫

[0038] 免疫前,每只兔子耳缘静脉取血 0.5-1ml,分离抗血清,4℃保存,备用。

[0039] 用 1XPBS 缓冲液将偶联物稀释到 1mg/ml,用于免疫新西兰大白兔。分别以序列为 SEQ ID NO1、SEQ ID NO2、SEQ ID NO1/SEQ ID NO2 的多肽偶联物为抗原免疫三只动物,动物编号分别为 R01、R02 和 R03,获得的血清分别编号为 antiPAP1、antiPAP2、antiPAP3。

[0040] 每只兔子总共免疫 4 次。1) 首免:600ug/只,抗原溶液加等体积弗氏完全佐剂乳化后皮下 6 点注射。2) 二免、三免、四免分别在第 21、35 和 49 天注射,每次 400ug/只,抗原

溶液加等体积弗氏不完全佐剂乳化后皮下 4 点注射。

[0041] 1.3.2 抗血清的效价测定和收集

[0042] 4 次免疫结束后 10 天, 每只兔子耳缘静脉取血 0.5-1ml, 分离抗血清, 间接 ELISA 检测免疫后血清效价。抗原为人工合成的多肽, 一抗为免疫后的抗血清。抗血清分别稀释 200 倍、1000 倍、5000 倍、25000 倍、125000 倍、625000 倍、3125000 倍。空白对照为 PBS 缓冲液, 阴性对照为免疫前血清, 稀释 10000 倍。二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 稀释 10000 倍使用。当效价达到要求后, 以心脏穿刺的方式采取兔子的全血, 分离 PAP 抗血清。

[0043] 1.3.3 抗血清的效价测定

[0044] 间接 ELISA 检测步骤: 1) 以 2ug/ml 的人工合成的 PAP 多肽包被酶标板, 100ul/孔, 4℃冰箱过夜; 2) PBST 洗涤 3 次, 每次振板 5 秒; 3) 5% 脱脂奶封闭, 300ul/孔, 37℃孵育 2h; 4) PBST 洗涤 3 次; 5) 将稀释后的待检测抗血清(一抗)或免疫前血清加入酶标板中, 100ul/孔, 37℃, 孵育 1h; 6) PBST 洗涤 3 次; 7) 加入二抗, 即 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 稀释 10000 倍, 100ul/孔, 37℃, 孵育 40min; 8) PBST 洗涤 3 次; 9) 加入现配的 TMB 底物显色工作液, 100ul/孔, 显色 10min; 10) 加入 2M H₂SO₄ 终止显色反应, 50ul/孔; 11) 酶标仪测 450nm 波长的 OD 值。

[0045] 1.3.4 PAP 特异性抗体 IgG 的纯化和纯度测定

[0046] 采用抗原亲和纯化方法从 PAP 抗血清中纯化特异性抗体 IgG。抗体纯化采用 ProteinA 凝胶和 CnBr-activated Sepharose 4B, 以人工合成的 PAP 多肽为抗原, 使其与亲和层析填料偶联制备亲和柱, 层析纯化与抗原特异性结合的抗体, 并进行洗脱、回收。纯化后的 PAP 抗体保存在 0.01M PBS, pH7.2 中, 用蛋白定量检测仪测定特异抗体浓度。抗体纯化由北京康为世纪生物科技有限公司 (CWBI) 完成。

[0047] 采用 SDS-PAGE 电泳检测纯化后抗体的纯度。SDS-PAGE 电泳的上样量是 8ug, 分离胶 12%、浓缩胶 4%, 浓缩胶电泳电压 60V, 分离胶电泳电压 80V, 电泳结束后, 采用 0.05% 的考马斯亮蓝 R250 染色, 甲醇、冰醋酸溶液脱色后, 凝胶成像系统照相。

[0048] 1.3.5 Western bolt 检测

[0049] 首先从美洲商陆植株、转基因矮牵牛再生植株和缺失型 PAP 基因在酵母中的表达产物、以及非转基因矮牵牛植株中提取总蛋白, 通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 其中分离胶 12%、浓缩胶 4%, 浓缩胶电泳电压 60V, 分离胶电泳电压 80V。随后, 在 37V 恒压情况下, 4. C 过夜, 将蛋白电转移到蛋白杂交膜上。将膜在 5% 脱脂奶粉 37℃封闭 2h, PBST 洗涤 3 次, 加入一抗 (PAP 抗体, 稀释 3000 倍), 室温孵育 2h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10min, 加入二抗 (HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 稀释 5000 倍), 室温孵育 1h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10min, 采用 DAB 显色液显色, 待到信号清晰后, 终止反应。

[0050] 2、结果与分析

[0051] 2.1 抗血清的效价检测

[0052] 以人工合成的多肽, SEQ ID NO1、SEQ ID NO2、SEQ ID NO1 和 SEQ ID NO2) 制备抗原, 采用间接酶联免疫吸附法 (间接 EILSA) 分别对三只相应动物免疫获得的 PAP 抗血清进行检测, 血清的稀释倍数分别为 200 倍、1000 倍、5000 倍、25000 倍、125000 倍、625000 倍、3125000 倍; 以免疫前同只动物的血清稀释 10000 倍, 作为阴性对照, 以 PBS 缓冲液为空白对照, 在 450nm 波长下的读取 OD 值, 实验重复 2 次。当同一被测样品 2 次重复的读数均为

阴性对照 2.0 倍以上时 (且 OD 值 > 0.1), 该样品的稀释倍数即为抗血清的效价。检测结果表明: 当 antiPAP1 稀释 125000 倍时 2 次重复的 OD450 值分别是 0.613 和 0.541, 是对照的 7.1 和 6.0 倍; 当 antiPAP2 稀释 25000 倍时 2 次重复的 OD450 值分别是 0.223 和 0.208, 是对照的 2.3 和 2.1 倍; antiPAP3 稀释 25000 倍时 2 次重复的 OD450 值分别是 0.183 和 0.178, 是对照的 22 和 2.0 倍。因此, antiPAP1 效价最高, 是 1 : 125000, 说明该段多肽偶联物抗原性较好, 免疫动物后, 产生了较强的应答, 适于准备抗血清; antiPAP2 和 antiPAP3 的效价稍差, 均为 1 : 25000, 说明多肽 SEQ ID NO2 的偶联物不仅免疫原性稍差, 当与 SEQ ID NO1 的多肽偶联物同时注射动物时, 不能起到增强免疫原性的作用, 还干扰了动物对 SEQ ID NO1 的多肽偶联物的应答 (表 1)。

[0053] 表 1 间接 ELISA 检测免疫后血清效价 (OD 值) 结果

[0054]

抗体编号 稀释比例	antiPAP1		antiPAP2		antiPAP3	
	1: 200	3.501	3.501	3.501	3.501	3.501
1: 1000	3.501	3.501	2.493	2.364	2.929	2.999
1: 5000	3.501	3.501	0.749	0.672	0.730	0.747
1: 25000	3.227	3.087	0.223	0.208	0.183	0.178
1: 125000	0.613	0.541	0.102	0.098	0.092	0.108
1: 625000	0.151	0.168	0.085	0.089	0.072	0.074
1: 3125000	0.076	0.079	0.075	0.073	0.068	0.65
阴性对照	0.086	0.090	0.098	0.101	0.085	0.090
空白对照	0.051	0.055	0.052	0.054	0.055	0.057

[0055] 2、2PAP 抗体的纯化和纯度检测

[0056] 在效价检测的基础上, 采用 CNBr-activated Sepharose™ 4B 对效价好的抗体 antiPAP1 进行了亲和纯化, 并采用蛋白定量检测仪 (Amersham Biosciences) 测定了抗体的浓度, 结果表明: antiPAP1 的浓度为 0.9mg/ml。

[0057] 进一步采用 SDS-PAGE 电泳检测了其纯度, 上样量为 8 μg, 电泳结果显示重链和轻链两条带, 重链约为 50kD, 轻链约为 25kD, 重链的浓度明显大于轻链, 其他杂带不明显 (图 1), 说明得到了纯度较高的抗体。

[0058] 2、3 抗体的特异性检测及应用

[0059] 采用 Western blot 技术, 以本发明制备的抗体 antiPAP1 为一抗 (稀释 3000 倍), 对缺失型 PAP 基因在酵母中的表达产物和经 PCR 和 RT-PCR 检测为阳性的转缺失型 PAP 基因的再生矮牵牛植株 (CF37 ②) 叶组织进行了检测, 以非转基因的矮牵牛为对照, 目的是验证抗体的特异性, 了解缺失型 PAP 基因是否表达, 以及表达情况, 检测结果表明: 阴性对照与抗体无反应, 酵母表达产物和 PCR 和 RT-PCR 检测的阳性转基因植株 CF37 ②均有一条约

26kD 的条带与 PAP 抗体有强烈的反应,说明本发明制备的 PAP 抗体特异性较好。

[0060] 进一步采用 Western blot 检测技术,以 antiPAP1 为一抗(稀释 3000 倍),对美洲商陆春天的植株中表达的天然 PAP 和转缺失型 PAP 基因的矮牵牛进行检测,以非转基因的矮牵牛为对照,结果表明:阴性对照与 PAP 抗体无反应,酵母表达产物和 PCR 和 RT-PCR 检测的阳性转基因植株均有一条约 26kD 的条带与 PAP 抗体有强烈的反应,美洲商陆春天植株有一条约 29KD 的条带与抗体有明显的杂交反应,该条带略大于缺失型 PAP 基因的表达产物,说明其是未缺失的天然 PAP。试验结果说明本发明制备的 PAP 抗体可以用于美洲商陆植株中天然 PAP 和转基因矮牵牛植株中的缺失型 PAP 检测。

[0001]

SEQUENCE LISTING

- <110> 中国农业科学院植物保护研究所
 <120> 人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白（PAP）抗原、抗体及其制备方法、应用
 <130> PP1119-ZWB
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工合成的多肽 1
 <400> 1
 Asp Ile Ser Gly Thr Glu Arg Gln Asp Val Glu Thr Thr Leu Cys
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工合成的多肽 2
 <400> 2
 Cys Arg Tyr Pro Thr Leu Glu Ser Lys Ala Gly Val Lys Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> 缺失型 PAP 基因推测的氨基酸序列
 <400> 3
 Val Asn Thr Ile Ile Tyr Asn Val Gly Ser Thr Thr Ile Ser Lys Tyr
 1 5 10 15

[0002]

Ala Thr Phe Leu Asn Asp Leu Arg Asn Glu Ala Lys Asp Pro Ser Leu			
	20	25	30
Lys Cys Tyr Gly Ile Pro Met Leu Pro Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys			
	35	40	45
Tyr Val Leu Val Glu Leu Gln Gly Ser Asn Lys Lys Thr Ile Thr Leu			
	50	55	60
Met Leu Arg Arg Asn Asn Leu Tyr Val Met Gly Tyr Ser Asp Pro Phe			
	65	70	75
Glu Ala Asn Lys Cys Arg Tyr His Ile Phe Asn Asp Ile Ser Gly Thr			
	85	90	95
Glu Arg Gln Asp Val Glu Thr Thr Leu Cys Pro Asn Ala Asn Ser Arg			
	100	105	110
Val Ser Lys Asn Ile Asn Phe Asp Ser Arg Tyr Pro Thr Leu Glu Ser			
	115	120	125
Lys Ala Gly Val Lys Ser Arg Ser Gln Val Gln Leu Gly Ile Gln Ile			
	130	135	140
Leu Asp Ser Asn Ile Gly Lys Ile Ser Gly Val Met Ser Phe Thr Glu			
	145	150	155
Lys Thr Glu Ala Glu Phe Leu Leu Val Ala Ile Gln Met Val Ser Glu			
	165	170	175
Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Asn Gln Val Lys Thr Asn Phe Asn			
	180	185	190
Arg Ala Phe Asn Pro Asn Pro Lys Val Leu Asn Leu Gln Glu Thr Trp			
	195	200	205
Gly Lys Ile Ser Thr Ala Ile His Gly Ala Lys Asn Gly Val Leu Pro			
	210	215	220
Lys Pro Leu Glu Leu Val Asp Ala Ser Gly Ala Lys Trp			
	225	230	235

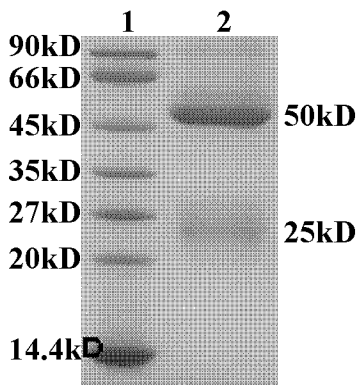


图 1

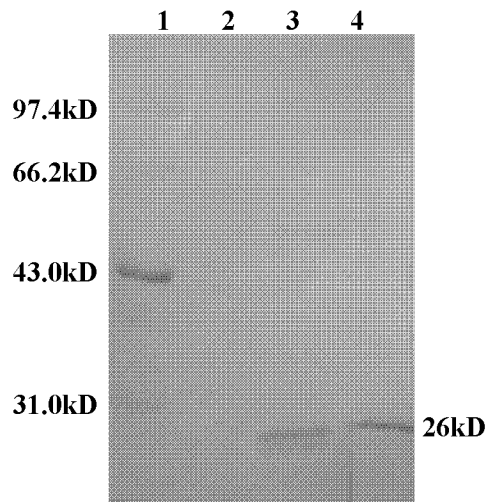


图 2

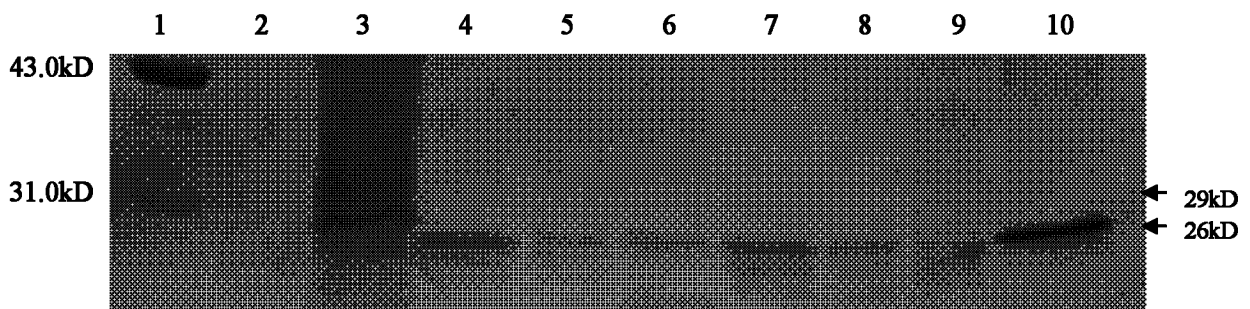


图 3

专利名称(译)	人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)抗原、抗体及其制备方法、应用		
公开(公告)号	CN102286097A	公开(公告)日	2011-12-21
申请号	CN201110165331.7	申请日	2011-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院植物保护研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院植物保护研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院植物保护研究所		
[标]发明人	李莉 王锡锋 李羽 周广和 刘艳 吴蓓蕾		
发明人	李莉 王锡锋 李羽 周广和 刘艳 吴蓓蕾		
IPC分类号	C07K14/795 C07K16/16 C07K16/06 G01N33/53		
其他公开文献	CN102286097B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及“人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)抗原、抗体及其制备方法、应用”，属于生物技术领域。人工合成的美洲商陆抗病毒蛋白抗原，包括具有免疫原性的载体蛋白和与其偶联的人工合成的多肽，所述多肽的氨基酸序列为SEQ ID NO1或/和SEQ ID NO2。本发明应用该人工合成多肽与匙孔血蓝蛋白的偶联物作为抗原，制备得到了三种PAP抗血清，可应用于PAP制剂、PAP基因原核表达和真核表达产物、转基因再生植株等检测，能够采用免疫学手段检测PAP及其基因的表达情况，为PAP的检测提供物质基础。

稀释比例 \ 抗体编号	antiPAP1		antiPAP2		antiPAP3	
1: 200	3.501	3.501	3.501	3.501	3.501	3.501
1: 1000	3.501	3.501	2.493	2.364	2.929	2.999
1: 5000	3.501	3.501	0.749	0.672	0.730	0.747
1: 25000	3.227	3.087	0.223	0.208	0.183	0.178
1: 125000	0.613	0.541	0.102	0.098	0.092	0.108
1: 625000	0.151	0.168	0.085	0.089	0.072	0.074
1: 3125000	0.076	0.079	0.075	0.073	0.068	0.65
阴性对照	0.086	0.090	0.098	0.101	0.085	0.090
空白对照	0.051	0.055	0.052	0.054	0.055	0.057