



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102766202 B

(45) 授权公告日 2014.08.27

(21) 申请号 201110117083.9

(22) 申请日 2011.05.06

(73) 专利权人 中国科学院上海生命科学研究院
地址 200031 上海市徐汇区岳阳路 320 号

(72) 发明人 陈正军 雷蕾

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101633694 A, 2010.01.27,

CN 1339481 A, 2002.03.13,

Ek S et al..From Gene Expression
Analysis to Tissue Microarrays. 《Molecular
& Cellular Proteomics》.2006, 第 5 卷 (第 6
期), 1076.

审查员 赵九永

权利要求书1页 说明书10页
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

PHF14 C 端蛋白、其多克隆抗体及应用

(57) 摘要

本发明涉及 PHF14C 端蛋白、其多克隆抗体及应用。本发明分离出人源 PHF14C 端蛋白,并意外地发现该抗原片段具有良好的免疫原性,由该抗原片段免疫动物获得的抗体可特异性地识别 PHF14 α 蛋白而不识别 PHF14 β 片段。本发明提供的 PHF14C 端蛋白及其多克隆抗体,制备方法简单,效价高,特异性强,灵敏度高。

1. 一种分离的 PHF14C 端蛋白,其特征在于,它是如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的蛋白。
2. 一种分离的多核苷酸,其特征在于,它编码权利要求 1 所述的蛋白。
3. 如权利要求 2 所述的多核苷酸,其特征在于,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。
4. 一种重组载体,其特征在于,它含有权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸序列。
5. 一种宿主细胞,其特征在于,它含有权利要求 4 所述的重组载体,或其基因组中整合有权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸。
6. 一种权利要求 1 所述的蛋白的制备方法,包括下列步骤:
 - (a) 培养权利要求 5 所述的宿主细胞;
 - (b) 从培养物中分离出权利要求 1 所述的蛋白。
7. 一种抗体,其特异性识别和/或结合权利要求 1 所述的蛋白,所述的抗体是多克隆抗体。
8. 一种制备抗体的方法,其特征在于,所述方法包括:以权利要求 1 所述的蛋白免疫动物,从免疫后的动物体内分离出特异性抗权利要求 1 所述的蛋白的抗体。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述的抗体是多克隆抗体,用以下所述方法制备:

用权利要求 1 所述的蛋白与完全弗氏佐剂混合后免疫兔子,3-5 周后用权利要求 1 所述的蛋白与不完全弗氏佐剂混合后强化免疫兔子,3-5 周后用权利要求 1 所述的蛋白再次强化免疫,1-3 周后从血清中分离出多克隆抗体。
10. 权利要求 7 所述抗体的用途,用于制备检测 PHF14 蛋白的不同异构体的试剂盒。
11. 一种检测 PHF14 蛋白的不同异构体的试剂盒,其特征在于,其中含有权利要求 7 所述的抗体。

PHF14 C 端蛋白、其多克隆抗体及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域;更具体地,本发明涉及 PHF14C 端蛋白、其多克隆抗体及应用。

背景技术

[0002] PHD 锌指 (PHD finger) 结构域是一个常见的约 50-80 个氨基酸残基组成的基模,通过 Cys4-His-Cys3 的保守氨基酸残基结合两个锌离子形成特定的结构,该结构在从酵母到人的真核基因组中广泛存在。PHD 锌指蛋白则是一类广泛存在于真核生物中,在基因转录调控和疾病发生中有重要作用的锌指蛋白。大部分 PHD 锌指蛋白的功能亦尚不清楚。

[0003] PHF14 (PHD 锌指蛋白 14, PHD finger protein 14) 是一个新的人源的 PHD 锌指蛋白。其由 PHF14 基因编码。PHF14 是一个进化上保守的基因,以单拷贝形式定位于人的 7 号染色体,通过可变剪切最终编码两个蛋白产物, PHF14 α 和 PHF14 β 。研究发现 PHF14 β 的表达量很低,主要分布在胞浆内; PHF14 α 是 PHF14 基因主要的蛋白产物,软件预测它含有四个 PHD 锌指、两个 coiled-coil 结构域及四个可能的核定位信号, PHF14 α 在小鼠各组织和人源细胞株中广泛表达,定位于细胞核内且大部分与染色质结合。

[0004] 在 RNA 剪接过程中,可以透过对同一个基因转录的相同 pre-mRNA 使用不同的剪接选择,产生不同的 mRNA 异构物 (isoform),最后产生多种相似却又独特的蛋白质。据分析推测,产生多种异构体的原因可能有如下几种:第一,是生物体进化过程遗留的产物。第二,该 RNA 编码的蛋白行使十分重要的功能,其产生多个蛋白异构体,在其中一种或几种蛋白由于突变或缺失等原因未能行使该重要功能时,其余的蛋白可以代为行使。从该角度上来讲,区分同一个蛋白的不同异构体具有十分重要的意义。

[0005] 然而,区分 PHF14 α 和 PHF14 β 存在的技术难点是它们在大部分结构上是相同的,仅有少部分的序列上存在差异。是否可以找到可特异性区分这么小的差异的试剂是本领域未知的。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种分离的 PHF14C 端蛋白及其制备。

[0007] 本发明的另一个目的是提供一种 PHF14C 端蛋白多克隆抗体及其制备与应用。

[0008] 在本发明的第一方面,提供一种分离的 PHF14C 端蛋白,它是如 SEQ IDNO :1 所示氨基酸序列的蛋白,或其保守性变异蛋白。

[0009] 在本发明的另一方面,提供一种分离的多核苷酸,它编码所述的蛋白。

[0010] 在另一优选例中,其核苷酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。

[0011] 在本发明的另一方面,提供一种重组载体,它含有所述的多核苷酸序列。

[0012] 在另一优选例中,所述的重组载体中还含有与所述的多核苷酸序列操作性相连的表达调控序列。

[0013] 在本发明的另一方面,提供一种宿主细胞,它含有所述的重组载体,或其基因组中

整合有所述的多核苷酸。

[0014] 在另一优选例中,所述的宿主细胞为大肠杆菌。

[0015] 在本发明的另一方面,提供一种所述的蛋白的制备方法,包括下列步骤:

[0016] (a) 培养所述的宿主细胞;

[0017] (b) 从培养物中分离出所述的蛋白。

[0018] 在本发明的另一方面,提供一种抗体,其特异性识别和 / 或结合所述的蛋白。

[0019] 在另一优选例中,所述的抗体是多克隆抗体。

[0020] 在本发明的另一方面,提供一种制备抗体的方法,所述方法包括:以所述的蛋白免疫动物,从免疫后的动物体内分离出特异性抗所述的蛋白的抗体。

[0021] 在另一优选例中,所述的抗体是多克隆抗体,用以下所述方法制备:

[0022] 用所述的蛋白与完全弗氏佐剂混合(按照体积比 1 : 2 ~ 2 : 1 混合,较佳地按照体积比 1 : 1 混合)后免疫兔子,3-5 周后用所述的蛋白与不完全弗氏佐剂混合(按照体积比 1 : 2 ~ 2 : 1 混合,较佳地按照体积比 1 : 1 混合)后强化免疫兔子,3-5 周后用所述的蛋白再次强化免疫,1-3 周后从血清中分离出多克隆抗体。

[0023] 在本发明的另一方面,提供所述抗体的用途,用于制备检测 PHF14 蛋白的不同异构体的试剂盒。

[0024] 在另一优选例中,所述 PHF14 异构体为 PHF14 α 和 PHF14 β 。

[0025] 在本发明的另一方面,提供一种检测 PHF14 蛋白的不同异构体的试剂盒,其中含有所述的抗体。

[0026] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0027] 图 1、SDS-PAGE 分析 PHF14C 端蛋白的表达图。第 1 泳道为 marker (M);第 2 泳道 (CT) 为纯化的目的蛋白 PHF14C 端蛋白,其浓度稀释了十倍上样;第 3 泳道为纯化的 GST 蛋白;第 4-7 泳道为 BSA 蛋白,上样量依次为 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g;左侧数字表示分子量,以 KD 为单位。

[0028] 图 2、PHF14 两个异构体 (PHF14 α , PHF14 β) 的图。上图为 PHF14 α 的结构示意图,下图为 PHF14 β 的结构示意图。橙色的圆圈表示 coiled-coil 结构,蓝色的多边形表示 PHD 锌指。图中显示 PHF14 α 有 948aa, PHF14 β 有 888aa,两个异构体之间的差别仅在于 PHF14C 端。前者较后者多 60aa。

[0029] 图 3、PHF14C 端蛋白多克隆抗体在 293A 细胞株中的 Western Blot 检测图。

[0030] 上图(从左至右):第 1 泳道标记为 c,样品是未作任何处理的 293A 细胞株裂解液;第 2 泳道标记为 α ,样品是过表达 PHF14 α 的 293A 细胞株裂解液,第 3 泳道标记为 β ,样品是过表达 PHF14 β 的 293A 细胞株裂解液。

[0031] 下图:阳性对照,使用自制的 PHF14N 端的多克隆抗体作为对照。

[0032] 图 4、PHF14C 端蛋白多克隆抗体在 293A 细胞株中的免疫共沉淀 (IP) 检测图。

[0033] 上图(从左至右):第 1 泳道标记为 c, IP 体系中是未作任何处理的 293A 细胞株裂解液;第 2 泳道标记为 α , IP 体系中是过表达 PHF14 α 的 293A 细胞株裂解液,第 3 泳道

标记为 β ，IP 体系中是过表达 PHF14 β 的 293A 细胞株裂解液。

[0034] 下图：对照，用作阳性对照的自制抗体 PHF14N 端抗体 Western Blot 检测细胞裂解液。

具体实施方式

[0035] 鉴于如何识别 PHF14 蛋白的不同异构体，本发明人经过深入的研究，分离出来源于 PHF14 α 的蛋白抗原片段 (PHF14C 端蛋白)，并意外地发现该抗原片段具有良好的免疫原性，由该抗原片段免疫动物获得的抗体可特异性地识别 PHF14 α 蛋白而不识别 PHF14 β 片段。本发明提供的 PHF14C 端蛋白及其多克隆抗体，制备方法简单，效价高，特异性强，灵敏度高。

[0036] 本发明中，“分离的 PHF14C 端蛋白”是指 PHF14C 端蛋白基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质，本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化 PHF14C 端蛋白，基本上纯的蛋白在非还原聚丙烯酰胺凝胶上产生单一的主带。

[0037] 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。

[0038] 在本发明中，术语“其保守性变异蛋白”是指 PHF14C 端蛋白的变异形式，这些变异形式包括（但并不限于）：若干个（通常为 1-10 个，较佳的 1-5 个，更佳的 1-3 个，最佳的 1-2 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 1-10 个，较佳的 1-5 个，更佳的 1-3 个，最佳的 1-2 个）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，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。这些变异形式还包括成熟蛋白与另一个化合物（比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇）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，或与抗原 IgG 片段的形成的融合蛋白）。此外，变异形式还包括（但不限于）PHF14C 端蛋白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多肽，这种修饰可以通过将多肽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。根据本文的教导，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。

[0039] 除了来源于人，PHF14 蛋白还可来源于其它动物中。因此，术语“其保守性变异蛋白”还指那些非人来源的，与 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的蛋白同源性高（如高于 80%；更佳地高于 90%；更佳地高于 95%；更佳地高于 99%）的 PHF14C 端蛋白。

[0040] 本发明的所述的 PHF14C 端蛋白可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明所述的 PHF14C 端蛋白可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主（例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞）中产生。

根据重组生产方案所用的宿主,本发明所述的 PHF14C 端蛋白可以是糖基化的,或可以是非糖基化的。

[0041] 编码所述的 PHF14C 端蛋白的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ IDNO :2 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO :1 所示序列的蛋白质,但与 SEQ IDNO :2 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

[0042] 术语“编码 PHF14C 端蛋白的多核苷酸”可以是包括编码此 PHF14C 端蛋白的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和 / 或非编码序列的多核苷酸。

[0043] 本发明还涉及上述多核苷酸的变异体,其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的,等位变异体是一个多核苷酸的替换形式,它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

[0044] 编码 PHF14C 端蛋白的多核苷酸通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板,扩增而得有关序列。

[0045] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0046] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0047] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0048] 应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法(Saiki, et al. Science 1985 ;230 : 1350-1354) 被优选用于获得本发明的基因。特别是很难从文库中得到全长的 cDNA 时,可优选使用 RACE 法(RACE-cDNA 末端快速扩增法),用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。

[0049] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或编码 PHF14C 端蛋白的多核苷酸经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

[0050] 通过常规的重组 DNA 技术(Science, 1984 ;224 :1431),可利用本发明的多聚核苷酸序列可用来表达或生产重组的 PHF14C 端蛋白。一般来说有以下步骤:

[0051] (1). 用本发明的编码 PHF14C 端蛋白的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0052] (2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞;

[0053] (3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0054] 本发明中,编码 PHF14C 端蛋白的多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。本发明中,编码 PHF14C 端蛋白的多核苷酸序列可插入到载体中。所述载体包括各种表达载体,包括本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。在本发明中适用的载体包括但不限于:在细菌中表达的基于 T7 的表达载体 (Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56. 125)、PGEX-5x-1 表达载体;在哺乳动物细胞中表达的 pMSXND 表达载体 (Lee and Nathans, J Bio Chem. 263 :3521, 1988) 和在昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之,只要能在宿主体内复制和稳定,任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

[0055] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含编码 PHF14C 端蛋白的多核苷酸和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导 mRNA 合成。这些启动子的代表性例子有:大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子; λ 噬菌体 PL 启动子;真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、反转录病毒的 LTRs 和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

[0056] 此外,表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白 (GFP),或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

[0057] 包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0058] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;植物细胞;果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞;CHO、COS、293 细胞、或 Bowes 黑素瘤细胞的动物细胞等。

[0059] 本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时,如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是 DNA 的顺式作用因子,通常大约有 10 到 300 个碱基对,作用于启动子以增强基因的转录。可举的例子包括在复制起始点晚期一侧的 100 到 270 个碱基对的 SV40 增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

[0060] 本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

[0061] 用重组 DNA 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。

[0062] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。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。

[0063] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、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。

[0064] 本发明还包括对所述的 PHF14C 端蛋白具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体。这里,“特异性”是指抗体能识别和结合于 PHF14C 端蛋白,但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。

[0065] 本发明更优选多克隆抗体,本发明中,所用的术语“多克隆抗体”(多抗)指一组与抗原有特异性结合能力的球蛋白,其是由抗原刺激机体,产生免疫学反应后,由机体的浆细胞合成并分泌的。抗原通常是由多个抗原决定簇组成的,由一种抗原决定簇刺激机体,由一个 B 淋巴细胞接受该抗原所产生的抗体称之为单克隆抗体。由多种抗原决定簇刺激机体,相应地就产生各种各样的单克隆抗体,这些单克隆抗体混杂在一起就是多克隆抗体。多克隆抗体的好处在于它们的效价高,特异性高,亲和力强,灵敏度好,便于人为处理和质量控制,此外,多克隆抗体制备相对容易,更为经济。

[0066] 多克隆抗体可用本领域技术人员熟知的各种方法来制得。纯化的 PHF14C 端蛋白,可被施用于动物(如兔,小鼠,大鼠等;较佳地是兔)以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的,表达 PHF14C 端蛋白的细胞可用来免疫动物来生产抗体。多克隆抗体可以用淋巴结注射法,皮下多点注射法,多途径联合注射法等免疫方法制得。实施例中采用纯化的 PHF14C 端蛋白与完全性弗氏佐剂混合后,背部皮下多点注射,免疫 2-2.5kg 的新西兰大耳兔。四周后,再用纯化的该蛋白与不完全弗氏佐剂混合后加强免疫。再隔四周后,该纯化蛋白与 PBS 混合后加强免疫。两周后,放血获取血清。

[0067] 本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人, Nature 256:495,1975;Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:511,1976; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:292,1976;Hammerling 等人, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., 1981)。本发明的抗体可以利用 PHF14C 端蛋白,通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。

[0068] 多种佐剂可用于增强免疫反应,包括但不限于弗氏佐剂等。抗 PHF14 蛋白的抗体可用于免疫学的实验中,也可以检测活检标本中的 PHF14 蛋白

[0069] 抗 PHF14C 端蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中,检测 PHF14 α 蛋白,将之与 PHF14 β 蛋白相区分。

[0070] 本发明还提供了检测样品中是否存在 PHF14 α 蛋白的方法,是利用抗 PHF14C 端蛋白的特异性抗体进行检测,它包括:将样品与 PHF14C 端蛋白特异性抗体接触;观察是否形成抗体复合物,形成了抗体复合物就表示样品中存在 PHF14C 端蛋白。

[0071] PHF14C 端蛋白的抗体用于检测 PHF14 蛋白,可以用本领域技术人员熟知的各种按照抗原抗体体外特异性结合的原理设计的方法来达到,例如蛋白免疫印迹实验,免疫共沉淀实验等。

[0072] 所述 PHF14C 端蛋白多克隆抗体在区分 PHF14 蛋白不同异构体中的应用,包括用常规手段制备含有 PHF14C 端蛋白多克隆抗体的免疫学试剂及包含上述诊断试剂的固相载体,如试剂条、试剂盒等。

[0073] 本发明还提供了一种检测试剂盒,其中含有本发明的抗体,较佳地是多克隆抗体。

[0074] 本发明的主要优点在于:

[0075] (1) 本发明首次纯化了 PHF14C 端蛋白,该蛋白是仅存在于 PHF14 α 中,而 PHF14 β 不含该片段。

[0076] (2) 本发明还公开了 PHF14C 端蛋白对应的多克隆抗体,其仅能识别 PHF14 α ,不能识别 PHF14 β ,从而为区分 PHF14 两种同源异构体提供了可行,有效的手段。

[0077] 下面结合具体实施例,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不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,科学出版社,2002 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0078] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0079] I. 材料和方法

[0080] 引物合成

[0081] 按常规方法设计人 PHF14C 端蛋白基因特异性引物 SEQ ID NO :3 和 SEQID NO :4,常规方法人工合成引物。

[0082] 质粒构建

[0083] 制备插入目的基因片段时,使用上述 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 所描述的引物和适当的模板(人胎盘 cDNA 文库),DNA 聚合酶以及 PCR 常规扩增插入片段,采用 Generay PCR extract kit 纯化。载体采用相同的酶切后,将扩增和酶切获得的目的基因与载体 pGex-5x-1(Amersham Pharmacia Biotech 公司产品),16 $^{\circ}$ C 连接过夜。2 μ l 连接产物常规转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布含氨苄青霉素的 LB 细菌培养板,37 $^{\circ}$ C 生长 16 个小时左右,随机挑选 4 个克隆,酶切鉴定,筛选阳性克隆。将鉴定为阳性的克隆测序,确认载体中含有 SEQ ID NO :2 的序列,且读框正确。

[0084] 表达纯化 PHF14 蛋白

[0085] 表达纯化 PHF14 融合蛋白:含目的基因的 pGex-5x-1 常规转化 E. coli BL21。单个克隆接种到含氨苄青霉素(25 μ g/ μ l)的 LB 培养基,200rpm,37 $^{\circ}$ C 培养到 OD600 = 0.6,加 0.1mM IPTG 在 250rpm 低温 16 $^{\circ}$ C 诱导表达 12-24 小时。以 8000rpm 离心 10 分钟收菌,重悬于 PBS 中,反复冻融 3 次(每次冻融时间为半小时)后,用超声波破菌(6s,9s,99 次,300W),12000rpm 离心 20 分钟,收集上清液。上清液与 GST beads 结合两小时后,用 PBS 洗非特异性结合三次后,用 10mM 还原性谷胱甘肽(溶于 PH = 8.0 的 trisbase 里)洗脱 beads 上结合的蛋白。-80C 保存。

[0086] 制备 PHF14 多克隆抗体

[0087] 多克隆抗体的生产可用纯化的 PHF14 蛋白直接注射免疫动物(如家兔,小鼠,大鼠等)的方法得到。

[0088] 用 0.5mg 上述 PHF14 蛋白加上完全弗氏佐剂免疫家兔隔 4 周后再用 PHF14 蛋白加不完全弗氏佐剂加强免疫一次,隔 4 周后再用 0.5mg PHF14 蛋白加上 PBS 加强免疫一次,隔 4 周再用 0.5mg PHF14 蛋白加强免疫一次。ELISA 实验的抗体效价分析表明,抗体达到要求。蛋白免疫印迹实验与免疫共沉淀实验都证明多克隆抗体可特异性地跟 PHF14 蛋白结合。

[0089] 细胞转染

[0090] 按照产品说明书用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 将 Myc-PHF14 α 及 Myc-PHF14 β 瞬时转染到 293A 细胞 (ATCC) 中。

[0091] Myc-PHF14 α 及 Myc-PHF14 β 构建方法:

[0092] 根据 PHF14 α 及 PHF14 β 的序列 (PHF14 α 的 GenBank 号为 :NM_001007157.1, PHF14 β 的 GenBank 号为 :NM_014660.2) 设计引物,通过 PCR 获得人 PHF14 α 及 PHF14 β 的整个编码区。PCR 正向引物序列均为 :5' -GCGAATTCATGGATCGCAGCTCCAAGAG-3' (SEQ ID NO :5); 人 PHF14 α 的反向引物则为 :5' -GCTCTAGATTTCTTTGGATTTTCTGTTCC-3' (SEQ ID NO :6); 人 PHF14 β 的反向引物则为 :5' -GCTCTAGATGAAGGGTATCTGACAAGATTTTC-3' (SEQ ID NO :7)。用来自 HeLa 细胞的 cDNA 作为模板。PHF14 α 及 PHF14 β 的 5' 端非编码区的 PCR 引物为 :GTATCCGGGTCGCTGCTTTCC (SEQ ID NO :8) 和 TCAAGAGCTTCCAGCAGAG (SEQ ID NO :9), 分别对应起始密码子之前的 436-415 核苷酸及起始密码子之后的 45-64 核苷酸。PHF14 α 的 3' 端非翻译区的引物为 GTCTGTGTTGCAAAAAGAAGC (SEQ ID NO :10) 及 GAATGACTTTATTGAGAACATTTTGC (SEQ ID NO :11), 分别对应终止子之前的 260-280 核苷酸及终止子之后的 407-433 核苷酸; PHF14 β 的 3' 端非翻译区的引物为 GTCTGTGTTGCAAAAAGAAGC (SEQ ID NO :12) 及 AGATGTCCAAAACCAC ATTTATTAATC (SEQ ID NO :13), 分别对应终止子之前的 80-100 核苷酸及终止子之后的 1132-1159 核苷酸。

[0093] 将 PHF14 α 及 PHF14 β 的 PCR 产物克隆到 Prk5-RS 载体 (获自 Maritinsried, Germany), 所用的酶切位点为 EcoRI 及 XbaI。分别获得 Myc-PHF14 α 及 Myc-PHF14 β 。

[0094] Western Blot

[0095] 将所培养的 293A 细胞在 RIPA 缓冲液 (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1% Na-deoxychoale, 4mM EDTA, 0.1% SDS, 1% TritonX-100 和 cocktail) 中充分裂解后,进行超声,超声程序如下:功率为 200w,超声 6 次,每次 5s。再以 12000rpm 在 4°C 离心 10 分钟,所获得的上清即为 293A 细胞裂解液。

[0096] 转染了 Myc-PHF14 α 及 Myc-PHF14 β 的 293A 细胞也采用相同的方法裂解,所获得的上清即为过表达的 293A 细胞裂解液。按标准 Western Blot 程序检测指定的蛋白。蛋白转移到硝酸纤维化膜 (Schleicher&Schuell BioScience, Keene, NH) 上。

[0097] 免疫共沉淀

[0098] Protein A 是细菌 *Staphylococcus aureus* 的膜蛋白,它特异地结合到某些抗体的 Fc 区,将抗体耦联到 protein A sepharose 上,可以用来从总细胞裂解液中特异性富集某种蛋白并检测蛋白之间的相互结合。根据表达蛋白的量,加入不等量的细胞裂解液,加入 1-5 微升的抗体和 12 微升的 protein A beads (50% 悬液),用细胞裂解液补充至总体积到 0.5ml,于 4°C 孵育过夜,beads 通过离心沉淀下来 (6000rpm, 2min),然后用 1×PBS 缓冲液洗三次,每次 1ml,沉淀用 30 微升 1×loading buffer 洗脱上样。通过 Western Blot 的方法检测两蛋白之间的结合。

[0099] II. 实施例

[0100] 实施例 1、PHF14C 端蛋白的制备

[0101] 一、PHF14C 端开放阅读框的核苷酸序列的扩增

[0102] 人 PHF14C 端蛋白基因开放读码框从人胎盘 cDNA 文库中扩增获得,用于扩增的引物序列为 5' CCGAATTCTGTGATGAATGCAGACTCTG 3' (SEQ ID NO :3) 和 5' CCGCTCGAGTTTCTTTGGATTTTTCTGTT 3' (SEQ ID NO :4)。PCR 条件:94℃ 5 分钟;94℃ 1 分钟,63℃ 1 分钟,72℃ 3 分钟,共 20 个循环;72℃ 5 分钟;4℃ 保温。产物经 EcoRI 和 XhoI 双酶切(37℃ 3 小时)后,用 T4DNA 连接酶(16℃ 过夜)连入同样双酶切后的克隆载体 pGex-5x-1 中,将连接产物转化入 DH5 α (Invitrogen 公司)中,酶切鉴定出阳性克隆后,将构建成功的 pGex-5x-1-PHF14C 端测序。测序结果经鉴定符合预期,载体中含有 SEQ ID NO :2 的序列,且读框正确。

[0103] PHF14C 端蛋白基因的 cDNA 序列如下 (SEQ ID NO :2) :

[0104] TGTGATGAAT GCAGACTCTG CTACCATTTT GGCTGTTTGG ATCCTCCTTT

[0105] GAAAAAGTCT CCTAAACAGA CAGGCTACGG ATGGATATGT CAGGAATGTG

[0106] ATTCTTCATC TTCCAAGGAA GATGAAAATG AAGCTGAAAAG AAAAAATATA

[0107] TCTCAGGAGC TCAACATGGA ACAGAAAAAT CCAAAGAAA

[0108] PHF14C 端蛋白基因编码蛋白的氨基酸序列如下 (SEQ ID NO :1) :

[0109] CRLCYHFGCLDP PLKKSPKQTG YGWICQECD SSSKEDENEA ERKNISQELN

[0110] MEQKNPKK

[0111] 本发明人通过 DNA software 软件分析该抗原片段的抗原性,发现其三个指数:亲水性,抗原指数,位于表面的可能性均良好。本发明人再根据分析结果对该抗原片段进行表达纯化及免疫。

[0112] 二、PHF14C 端蛋白的制备

[0113] 采用常规分子生物学技术,将转化了上述 PHF14 C 端 cDNA 重组质粒的大肠杆菌 BL21 (Invitrogen 公司)接种于 LB 培养基(含有氨苄青霉素 50ug/ml),37℃ 振荡过夜,1 : 100 稀释到 LB 培养基,在 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 约 0.6-0.8,经 1mM 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 IPTG 诱导,16℃ 振荡过夜。细胞采用超声裂解,-80℃ 保存。

[0114] 取一定量细菌总蛋白样品,用 SDS-PAGE 分析蛋白的表达。在经过诱导的样品细胞溶解液产物中检测出适宜大小 176KD 的蛋白。PHF14C 端蛋白的表达电泳分析如图 1 所示。

[0115] 三、PHF14 蛋白的纯化

[0116] 采用 Glutathione sepharose 4B (Amphamacia) 纯化蛋白。SDS-PAGE 分析纯化产物可看到单一的纯化条带。纯化产物经氨基酸序列分析符合预期,表达产物含有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

[0117] 实施例 2、PHF14C 端蛋白基因编码蛋白特异性多克隆抗体

[0118] 用实施例 1 获得的纯化的 PHF14C 端蛋白作为抗原,皮下多点注射法免疫,制备本发明的多克隆抗体。

[0119] 用纯化的 PHF14C 端蛋白(抗原)背部皮下常规免疫 2-2.5kg 的新西兰大耳兔(上海生命科学院动物试验中心),首次免疫以等量弗氏完全佐剂(Sigma 公司)乳化抗原(抗原:弗氏完全佐剂=1 : 1),每鼠注射 1ml(含蛋白 500ug),间隔四周以弗氏不完全佐

剂 (Sigma 公司) 乳化抗原 (抗原: 弗氏不完全佐剂 = 1 : 1) 同法重复注射, 加强免疫一次, 间隔四周以抗原 (溶于 PBS) 重复注射, 再次加强免疫一次。2 周后取血, 4℃ 静置过夜后 3000rpm 离心 10 分钟, 所获得的上清即为含有目的抗体的血清。

[0120] 实施例 3、PHF14C 端蛋白多克隆抗体在 Western Blot 中的应用

[0121] 用实施例 2 获得的多克隆抗体, Western Blot 检测内源性 & 外源性 PHF14 蛋白的表达, 区别 PHF14 的两个异构体。

[0122] 将所培养的 293A 细胞在 RIPA 缓冲液中充分裂解后, 进行超声, 再以 12000rpm 在 4℃ 离心 10 分钟, 所获得的上清即为 293A 细胞裂解液。按标准 Western Blot 程序检测该细胞裂解液中的 PHF14 蛋白。蛋白转移到硝酸纤维化膜 (Schleicher & Schuell BioScience, Keene, NH) 上。封闭一小时后, 用实施例 2 所获得的多克隆抗体 1 : 1000 检测, 此次即为内源性 PHF14 蛋白的检测。

[0123] 转染了 Myc-PHF14 α 及 Myc-PHF14 β 的 293A 细胞也采用相同的方法裂解, 所获得的上清即为过表达的 293A 细胞裂解液。按上述相同的流程, 用实施例 2 所获得的多克隆抗体 1 : 1000 检测, 此次即为外源性 PHF14 蛋白的检测。

[0124] 结果如图 3。可见实施例 2 获得的多抗可特异性地识别 PHF14 α , 而不识别 PHF14 β 。

[0125] 实施例 4、PHF14C 端蛋白多克隆抗体在免疫共沉淀中的应用

[0126] 用实施例 2 获得的多克隆抗体, 免疫共沉淀检测内源性 & 外源性 PHF14 蛋白的表达, 区别 PHF14 的两个异构体。

[0127] 在检测内源性 & 外源性 PHF14 蛋白时, 相对应的加入 200 μ l 实施例 3 中所获得的细胞裂解液, 加入 1-5 微升的抗体和 12 微升的 protein A beads (50% 悬液), 用细胞裂解液补充至总体积到 0.5ml, 于 4℃ 孵育过夜, beads 通过离心沉淀下来 (6000rpm, 2min), 然后用 1 \times PBS 缓冲液洗三次, 每次 1ml, 沉淀用 30 微升 1 \times 上样缓冲液洗脱上样。

[0128] 通过 Western Blot 的方法检测实施例 2 所获得的抗体与细胞裂解液中目的蛋白 PHF14 之间的结合。结果如图 4, 可见实施例 2 所获得的抗体可特异性地与 PHF14 α 发生免疫共沉淀, 而不识别 PHF14 β 。而利用 PHF14N 端抗体, 则对于 PHF14 的两种异构体无法加以区分。

[0129] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> PHF14 C端蛋白、其多克隆抗体及应用

<130> 112346

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 60

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<400> 1

Cys	Arg	Leu	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Cys	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Lys	Lys
1			5					10					15		
Ser	Pro	Lys	Gln	Thr	Gly	Tyr	Gly	Trp	Ile	Cys	Gln	Glu	Cys	Asp	Ser
			20				25					30			
Ser	Ser	Ser	Lys	Glu	Asp	Glu	Asn	Glu	Ala	Glu	Arg	Lys	Asn	Ile	Ser
			35				40				45				
Gln	Glu	Leu	Asn	Met	Glu	Gln	Lys	Asn	Pro	Lys	Lys				
	50					55				60					

<210> 2

<211> 189

<212> DNA

<213> 智人(Sapiens)

<400> 2

tgtgatgaat	gcagactctg	ctaccatttt	ggctgtttgg	atcctccttt	gaaaaagtct	60
cctaaacaga	caggctacgg	atggatatgt	caggaatgtg	attcttcate	ttccaaggaa	120
gatgaaaatg	aagctgaaag	aaaaaatata	tctcaggagc	tcaacatgga	acagaaaaat	180
ccaaagaaa						189

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

[0002]

<400> 3
ccggaattct gtgatgaatg cagactctg 29

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 4
ccgctcgagt ttctttggat tttctgtt 29

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 5
gcgaattcat ggatgcagc tccaagag 28

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 6
gctctagatt tctttggatt tttctgttcc 30

<210> 7
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

[0003]

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	7	
	gctctagatg aagggtatct gacaagattt tc	32
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	8	
	gtatccgggt cgctgetttc c	21
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	9	
	tcaagagctt ccagcagag	19
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	10	
	gtctgtgttg caaaagaagc	20

[0004]

<210>	11	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	11	
	gaatgacttt attgagaaca ttttgc	26
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	12	
	gtctgtgttg caaaagaagc	20
<210>	13	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	13	
	agatgtccaa aaccacattt attaatc	27

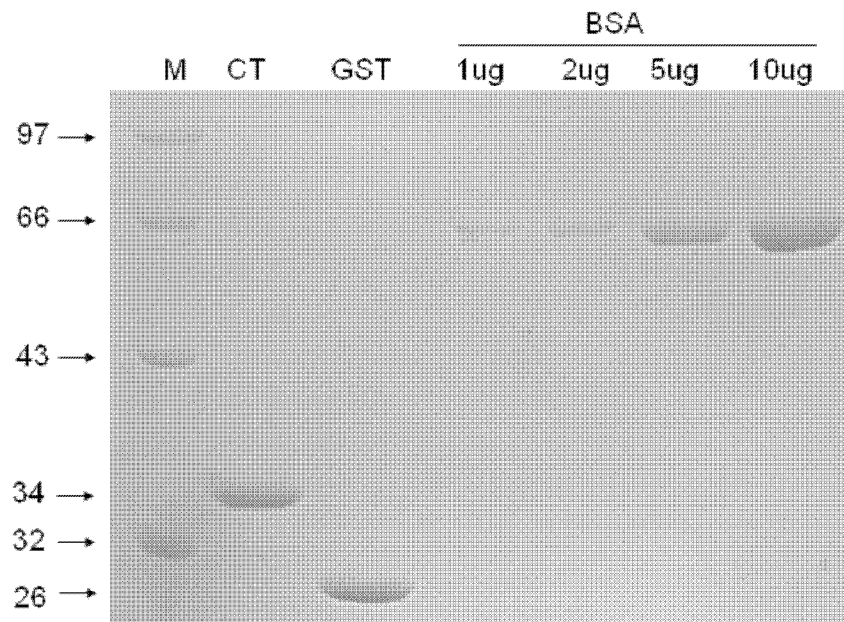


图 1

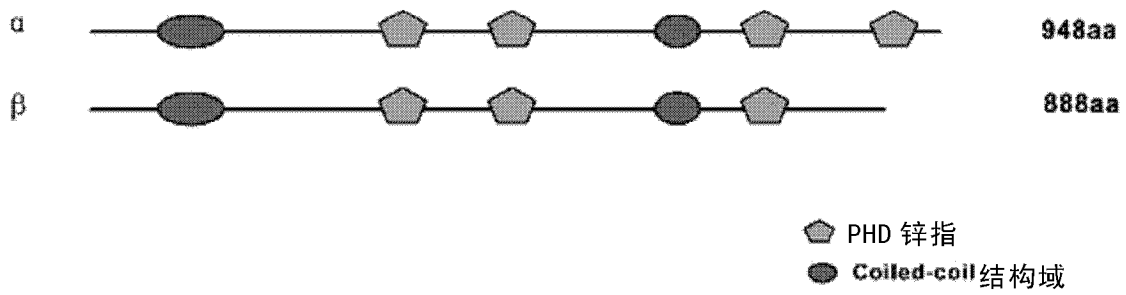


图 2

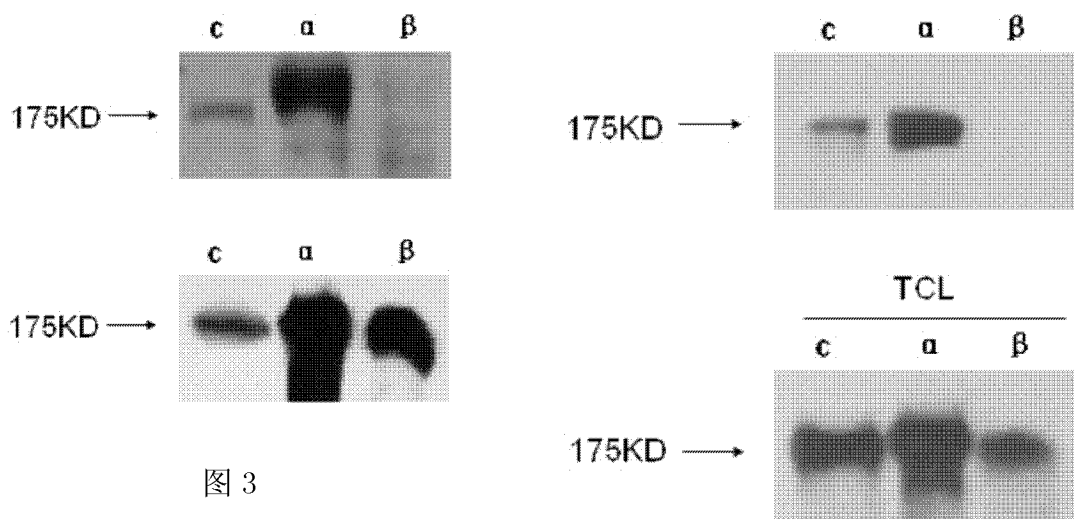


图 3

图 4

专利名称(译)	PHF14 C端蛋白、其多克隆抗体及应用		
公开(公告)号	CN102766202B	公开(公告)日	2014-08-27
申请号	CN201110117083.9	申请日	2011-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	陈正军 雷蕾		
发明人	陈正军 雷蕾		
IPC分类号	C07K14/435 C12N15/12 C12N15/63 C12N1/21 C12P21/02 C07K16/18 G01N33/68 G01N33/53		
代理人(译)	陈静		
其他公开文献	CN102766202A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及PHF14C端蛋白、其多克隆抗体及应用。本发明分离出人源PHF14C端蛋白，并意外地发现该抗原片段具有良好的免疫原性，由该抗原片段免疫动物获得的抗体可特异性地识别PHF14 α 蛋白而不识别PHF14 β 片段。本发明提供的PHF14C端蛋白及其多克隆抗体，制备方法简单，效价高，特异性强，灵敏度高。

