

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102206252 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 05

(21) 申请号 201010520306. 1

(22) 申请日 2010. 10. 25

(71) 申请人 深圳华大基因科技有限公司

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山路
146 号北山工业区综合楼

(72) 发明人 刘斯奇 史晓儒 朱健辉 韩宇宁
尹成园

(51) Int. Cl.

C07K 7/08(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

C07K 16/06(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页
序列表 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

早老素 5 抑制因子抗原表位、抗早老素 5 抑制因子抗体及其用途

(57) 摘要

本发明属于分子生物学和免疫学领域,涉及早老素 5 抑制因子抗原表位、抗早老素 5 抑制因子抗体及其用途。具体地,所述早老素 5 抑制因子抗原表位具有 SEQ ID NO :3 或 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的序列。本发明还涉及一种抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体,所述多克隆抗体与上述抗原表位特异性结合。所述多克隆抗体具有高的特异性和效价。本发明还涉及所述多克隆抗体的制备方法和用途、含有该多克隆抗体的组合物、以及检测早老素 5 抑制因子的方法。

1. 一种早老素 5 抑制因子抗原表位, 其由 SEQ ID NO :3 或 SEQID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列组成。
2. 一种组合物, 其中含有权利要求 1 所述的早老素 5 抑制因子抗原表位, 任选地, 还含有用于免疫的佐剂。
3. 一种早老素 5 抑制因子抗原表位 - 载体复合物, 其中, 所述早老素 5 抑制因子抗原表位为权利要求 1 所述的早老素 5 抑制因子抗原表位, 所述载体选自钥孔戚血蓝素、BSA、以及酪蛋白。
4. 一种抗早老素 5 抑制因子抗体的制备方法, 包括使用权利要求 1 的早老素 5 抑制因子抗原表位或者权利要求 2 的组合物或者权利要求 3 的复合物的步骤; 任选地, 所述抗早老素 5 抑制因子抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体; 具体地, 所述制备方法包括如下步骤:
 - 1) 将权利要求 1 所述的早老素 5 抑制因子抗原表位或者权利要求 2 的组合物或者权利要求 3 的复合物免疫动物得到的血样进行离心, 得到多抗血清; 和
 - 2) 纯化步骤 1) 中的多抗血清, 得到抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体。
5. 一种多抗血清, 其由权利要求 1 的早老素 5 抑制因子抗原表位或者权利要求 2 的组合物或者权利要求 3 的复合物免疫动物制得。
6. 一种抗早老素 5 抑制因子抗体, 其能够特异地结合权利要求 1 所述的早老素 5 抑制因子抗原表位, 任选地, 其为多克隆抗体或者单克隆抗体。
7. 一种组合物, 其包含权利要求 6 所述的抗早老素 5 抑制因子抗体。
8. 一种早老素 5 抑制因子检测剂, 其包含权利要求 6 所述的抗早老素 5 抑制因子抗体。
9. 权利要求 6 所述的抗体在制备检测早老素 5 抑制因子的药物中的用途。
10. 一种检测早老素 5 抑制因子的方法, 所述方法包括使用权利要求 6 所述的抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体的步骤; 具体地, 所述早老素 5 抑制因子为水稻的早老素 5 抑制因子。

早老素 5 抑制因子抗原表位、抗早老素 5 抑制因子抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和免疫学领域。具体地，涉及一种早老素 5 抑制因子抗原表位、抗早老素 5 抑制因子抗体。本发明还涉及分别含有所述抗原表位或抗体的组合物、以及所述抗体在检测早老素 5 抑制因子中的用途。

背景技术

[0002] 早老素 5 抑制因子（又称 Spr-5, 酶分类号 EC:1）是定位于水稻第四号染色体上的基因，早老素 5 抑制因子是一个组织特异性基因，在叶中有特异性表达。它所表达的早老素 5 抑制因子蛋白质，其构象与人基因 KIAA0601 所编码的多胺氧化酶类似。水稻早老素 5 抑制因子是位于叶绿体上的具有电子载体活性和氧化还原活性的蛋白酶，属于氨基氧化酶家族。这个家族由各种各样的氨基氧化酶组成，包括许多的多胺氧化酶 (PAO) 和各种黄素多巴胺氧化酶 (MAO)。在植物、细菌和原生动物中 PAOs 把亚精胺和精胺氧化成氨基丁缩醛、双氨基丙烷和过氧化氢，参与到多胺的分解代谢中。在其他生物中，大部分的早老素 5 抑制因子质导致 hop-1 的低表达。早老素 5 抑制因子与抑制转录复合体具有同源性，它的抑制活性需要功能性的早衰蛋白 HOP-1，并通过非等位基因特异性使 sel-12Eg1 表型低表达。

[0003] 水稻 (Oryzae Sativa L.) 是世界上最重要的粮食作物，也是单子叶植物的模式植物，它为全球近一半的人口提供食物。水稻基因组测序工作的成果极大地推动了水稻相关研究的进展，带动了水稻转录组学和蛋白质组学的研究，目前一些研究功能基因组学的新技术如 cDNA 微阵列、基因芯片、基因表达系统分析、基因敲除等在分析基因表达、发掘基因资源上取的了很大进展，很多与优良性状相关的基因被克隆并转化应用。在研究基因功能过程中，作为一种灵敏度高、特异性好、操作简便、结果直观的技术，蛋白质印记 (Western Blot) 表现出了良好的效果。蛋白印迹 (Western Blot) 是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的某种蛋白的方法，用于检测经电泳或斑点杂交后固定于膜上的蛋白质。特异、稳定的液态酶标抗体和相应的底物，保证了快速、准确的检测；而避免了放射性物质的使用，现已成为蛋白分析的一种常规技术，对蛋白进行定性和半定量分析。

[0004] 然而，迄今为止，在水稻生长发育过程中表达的早老素 5 抑制因子基因的功能研究目前并不清楚。并且在现有技术中，通常制备的多克隆抗体特异性不高，用于检测目标物质会存在准确性不足的问题。另一方面，如果用早老素 5 抑制因子制备抗原的话，如果是采用重组表达的方法，步骤比较繁琐，如果是采用化学合成的方法，全长的氨基酸序列有 492 个氨基酸，合成很困难，而且蛋白质空间结构的重建是一个很困难的工作，再现与生物体内相同的空间构象仍然是现阶段蛋白质学研究的难点。一般来说抗原表位合成简易，准确性高，成本低廉，空间构象容易再现，因此有必要开发一种具有代表早老素 5 抑制因子本身的抗原表位 (antigenic determinant, AD)（又称抗原决定簇，是指抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团）来代替全长蛋白。

[0005] 尽管目前已经有用于预测抗原表位的软件，例如 BEPIPOPE 软件，但是预测得到

的抗原表位中会有 30% 左右的非有效抗原表位, 即不能特异性地代表抗原的抗原表位, 或者不能引发免疫应答 (Chang HT, Liu CH, Pai TW. Estimation and extraction of B-cell linear epitopes predicted by mathematical morphology approaches. *J Mol Recognit.* 2008 Nov-Dec; 21(6):431-41)。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题, 本发明人在通过 BEPIPOPE 软件预测得到多个抗原表位序列的基础上, 进行了大量的实验和不懈的努力, 结果发现在预测的 40 个抗原表位中有一个抗原表位序列 DNISLKNWDQEHV (SEQID NO:3) 是最有效的抗原表位, 并且其具有良好的抗原特异性, 并且制备了能与该蛋白酶特异免疫结合的抗体, 该抗体具有足够的灵敏性和准确性。由此提供了下述发明:

[0007] 本发明的一个方面涉及一种早老素 5 抑制因子抗原表位, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

[0008] 在本发明的一个实施方案中, 为了增加与载体的交联性, 在上述抗原表位的 N 末端添加了一个半胱氨酸 (半胱氨酸提供二硫键与载体交联), 得到序列为 CDNISLKNWDQEHV (SEQ ID NO:4) 的抗原表位。

[0009] 半胱氨酸也可以加在多肽的 C 末端, 得到序列为 DNISLKNWDQEHVLC (SEQ ID NO:5) 的抗原表位。

[0010] 末端加 1 个半胱氨酸就可以了。如果在同一端加多个半胱氨酸, 导致成本上升, 而且会影响抗体的特异性, 并且二硫键密度太大, 而实际上也不需要这么多二硫键。另外不宜在 N 末端和 C 末端都加半胱氨酸, 因为一个抗原表位和一个载体结合, 如果在两端分别加 1 个半胱氨酸, 半胱氨酸与载体结合后, 抗原表位少了游离端, 反而不利于产生抗体。

[0011] 本发明的抗原表位可以通过常规的肽合成技术化学合成得到, 也可以在适当的宿主中表达得到; 优选的是化学合成。

[0012] 本发明的还一方面涉及一种组合物, 其包含 SEQ ID NO:3 或 SEQID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的早老素 5 抑制因子抗原表位, 任选地, 可以含有免疫佐剂, 例如氢氧化铝、弗氏完全佐剂、或者弗氏不完全佐剂等。

[0013] 本发明的还一方面涉及一种早老素 5 抑制因子抗原表位-载体复合物; 其中, 所述早老素 5 抑制因子抗原表位为 SEQ ID NO:3 或 SEQID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的早老素 5 抑制因子抗原表位, 所述载体可以是钥孔戚血蓝素 (KLH)、BSA、或酪蛋白等。

[0014] 本发明的还一方面涉及一种抗早老素 5 抑制因子抗体, 所述抗早老素 5 抑制因子抗体能够特异性地结合 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的早老素 5 抑制因子抗原表位。所述抗早老素 5 抑制因子抗体可以是单克隆抗体, 也可以是多克隆抗体。

[0015] 本发明的抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体可以得自各种常规制备多克隆抗体的动物, 例如山羊, 兔子, 大鼠, 小鼠等。

[0016] 对本领域技术人员而言, 可以根据 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的早老素 5 抑制因子抗原表位制备单克隆抗体, 具体操作可以参见本领域的技术手册, 也可以参考文献例 *Nature* 1975 Kohler & Milstein Vol 256, p495。

[0017] 本发明的还一方面涉及一种含有抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体的血清 (简称多

抗血清),其通过使用 SEQ ID NO :3 或 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的抗原表位免疫动物制得。

[0018] 本发明的还一方面涉及一种抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体制备方法,包括将 SEQ ID NO :3 或 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的早老素 5 抑制因子抗原表位作为抗原免疫动物的步骤。任选地,所述免疫步骤可以加入佐剂,例如氢氧化铝、弗氏完全佐剂、或者弗氏不完全佐剂,等等。

[0019] 本发明的一个实施方案中,所述抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体制备方法,包括如下步骤:

[0020] 1) 将 SEQ ID NO :3 或 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的早老素 5 抑制因子抗原表位作为抗原免疫动物;

[0021] 2) 取血,离心收集多抗血清;和

[0022] 3) 纯化步骤 2) 中的多抗血清,得到抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体。

[0023] 本发明的还一方面涉及一种组合物,其包含本发明的抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体。

[0024] 本发明的还一方面涉及一种早老素 5 抑制因子检测剂,其包含本发明的抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体。

[0025] 其中早老素 5 抑制因子的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) 如下:

[0026] MDQPSNGFAAGGLFLRHDGQNASPPSVIVIGGGISGIAARALSNASFKVTLLSERDRLGGRVHTDYS
FGCPIDMGASWLHGVCNENSLAPLIRLLGLRLYRTSGDNSVLYDHDLESYALFDKDGRQVPQEIVTKVGETFEKILK
ETVKVRAEHEDDMPLIQAISIVLDRNPHLKLDGLQYEVLQWCICRLEAWFATDV **DNISLKNWDQEHV**L_rGGHGL
MVHGYDPVIKALAQDLDIHLNHRVTKIIQRYNKTIVCVEDGTSFVADAAITVPLGVLKANI IKFEPELPDWKLSSI
SDLGIGIENKIALRFNSVFWPNVEVLGRVAPTSNACGYFLNLHKATGHPVLVCMVAGRFAFEKLSDEESVNFVMS
QLKKMLPGATEPVQYLVSRWGTDPNLSGSYSCDLVGKPADLYERFCAPVGNLFFAGEAACIDHSGSVHGAYSSGIVA
AEDCRRHLSTQLGISDLFQVGKIIIMREEMTEVMVPFQISRL (SEQ ID NO :1)

[0027] 其中,加边框的序列为 SEQ ID NO :3。

[0028] 本发明的还一方面涉及本发明的抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体在制备检测早老素 5 抑制因子的药物中的用途。

[0029] 本发明的还一方面涉及一种检测早老素 5 抑制因子的方法,所述方法包括使用本发明的抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体的步骤。具体地,包括如下步骤:

[0030] 1) 将待测样品与本发明的抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体孵育,使所述的抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体与待测样品中的早老素 5 抑制因子特异性结合,由此形成免疫复合物;和

[0031] 2) 检测是否存在免疫复合物。

[0032] 上述检测早老素 5 抑制因子的方法可以检测早老素 5 抑制因子的有无、对其进行半定量(例如 western blot 方法);在有早老素 5 抑制因子标准品的情况下,还可以通过 ELISA 方法对早老素 5 抑制因子进行定量检测。

[0033] 在本发明的一个实施方案中,所述早老素 5 抑制因子为水稻的早老素 5 抑制因子。具体的,所述水稻为水稻 93-11。

[0034] 发明的有益效果

- [0035] 1) 本发明提供的多克隆抗体,特异性和灵敏度高,具有很高的应用价值;
- [0036] 2) 本发明提供的早老素 5 抑制因子抗原合成简易,准确性高。本发明提供的抗原表位是经软件预测选出的抗原表位片段后化学合成的,片段短小,容易合成,空间构象再现容易。
- [0037] 3) 本发明提供的抗体制备方法简单,收获量大。取合成的抗原 1-2mg 免疫新西兰大白兔,每隔 14 天加强免疫一次;第 2 次加强免疫后 7 天耳静脉取血,离心收集多抗血清,获得大量的多克隆抗体。
- [0038] 4) 通过本发明获得早老素 5 抑制因子蛋白多克隆抗体,除了可以用于检测早老素 5 抑制因子基因在植物中早老素 5 抑制因子蛋白表达以外,还应用于研究早老素 5 抑制因子结构与功能相关的多个方面:通过免疫荧光检测,可以检测早老素 5 抑制因子在转基因植物中的分布;Western blot 分析早老素 5 抑制因子在转基因植物中是否表达;免疫荧光检测可以确定蛋白表达的部位;确定表达的蛋白是在叶片、茎秆、种子、还在根部等。此外,在对水稻的研究中,本发明的多克隆抗体可应用于水稻蛋白质水平的科学的研究中,也可以用于免疫共沉淀、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白芯片、免疫组化及细胞定位等实验中,此外还可能用于其它植物的相关研究。

附图说明

- [0039] 图 1: 使用抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体对早老素 5 抑制因子在水稻不同组织的免疫印迹检测结果。

具体实施方式

- [0040] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

- [0041] 实施例 1: 候选抗原表位的预测

- [0042] 水稻早老素 5 抑制因子对应的基因在 GenBank 中的基因 ID 是:NP_001054219.1。读码框序列如下:

[0043] ATGGACCAGCCTCTAATGGCTCGCCGCCGGAGGTCTTTCTCGTCACATTGATGGCAAAATGCC
TCTCCCCCTCTGTCTATTGTGATTGGTGGAGGGATTTCAGGCATTGCAGCTGCTCGTGCCTGTCTAATGCTCGTT
TAAGGTACACTATTAGAGTCACGGGACCGACTTGGTGGCCGTGTCATACTGACTATTCTTTGGCTGCCAATTG
ACATGGGAGCATCTGGTTGCATGGTGTATGCAATGAGAATTCAATTGGCACCACTGATTAGGTTGCTGGCCTAGA
TTATATCGCACCACTGGTGATAACTCTGTGCTATATGACCATGATCTGGAGAGCTATGCTCTTTGATAAGGATGG
TCGTCAAGTCCCCAGGAGATAGTGACAAAAGTCGGGAAACATTGAGAAAATTCTTAAGGAGACGGTGAAAGTAA
GAGCTGAACATGAAGATGACATGCCTCTTATTCAAGCCATCTCAATTGTGCTTGACAGGAATCCACACCTAAAGCTT
GATGGTTGCAATATGAAGTACTGCAGTGGTCATATGTAGGCTGGAGGCATGGTTGCCACAGATGTGGATAATAT
ATCTCTGAAAAATTGGGATCAGGAACATGTTACTGGTGGCCATGGCTTATGGTGCATGGTTATGATCCTGTTA
TCAAAGCTCTCGCGCAAGATCTTGATATCCACCTGAACCACAGGGTTACCAAAATCATCCAGAGGTACAACAAACT

ATAGTATGTGTTGAAGATGGGACAAGCTTGTGCAGATGCTGCTATAATAACTGTCCTCTGGTGTACTTAAAGC
 AAATATCATCAAGTTGAACCTGAGCTCCCAGATTGGAAGCTTCATCAATATCTGATCTGGTATTGGCATGGAGA
 ACAAAATAGCCCTCCGCTTCAATAGTGTATTGGCAAATGTAGAAGTGCTAGGCAGGGTTGCCAACATCAAAT
 GCCTGCGGTTACTTCTAACCTTCACAAAGCCACAGGGCATCCGGTCTGTATGCATGGTAGCAGGAAGATTCGC
 ATATGAATTGAGAAGCTATCCGATGAAGAATCCGTAAACTTGTATGCTCAGCTCAAGAAAATGCTACCAGGAG
 CTACTGAACCGGTCCAGTATTGGTTCAAGGTGGGAACCGACCCGAATTGCTGGTCTTATTGCGACCTT
 GTTGGGAAGCCAGCTGACTGTATGAAAGATTCTGTGCTCCGGTGGCAACCTGTTTCGCTGGGAGGCCCTG
 CATCGATCACTCTGGTCCGTGCATGGAGCTTATTCTCAGGCATTGTTGCTGCAGAGGATTGCCGAAGGCATCTGT
 CGACGCAGCTAGGCATCTCCGACCTTCCAGGTTGGGAAGATTATCATGAGGGAGGAGATGACTGAAGTCATGGTC
 CCCTTCCAGATATCCAGGCTGTGA (SEQ ID NO :2)

[0044] 所编码的水稻早老素 5 抑制因子全长序列如下：

[0045] MDQPSNGFAAGGLFLRHIDGQNASPPSVIVIGGGISGIAARALSASFVTLLESRDLGGRVHTDYS
 FGCPIDMGASWLHGVCNENSLAPLIRLLGLRLYRTSGDNSVLYDHDLERYALFDKDGRRQVPQEIVTKVGETFEKILK
 ETVKVRAEHEDDMLIQAISIVLDRNPHLKLDGLQYEVLQWCICRLEAWFATDV **DNISLKNWDQEHV** TGGHG
 LMVHGYDPVIKALAQDLIHLNHRVTKIIQRYNKTIVCVEDGTSVADAAITVPLGVLKANIIFKEPELPDWKLSS
 ISDLGIGIENKIALRFNSVFWPNVEVLGRVAPTSNACGYFLNLHKATGHPVLCMVAGRFAFEKLSDEESVNFVM
 SQLKKMLPGATEPVQYLVSRWGTDPNSLGSYSCDLVGKPADLYERFCAPVGNLFFAGEAACIDHSGSVHGAYSSGIV
 AAEDCRRHLSTQLGISDLFQVGKIMREEMTEVMVPFQISRL (SEQ ID NO :1, 其中加框的序列为 SEQ ID NO :3)

[0046] 早老素 5 抑制因子来源于水稻 (*Oryzae Sativa L.*), 具有序列表中的 SEQ ID NO :1 序列; 及与序列表中 SEQ ID NO :1 序列中任意连续 14 个氨基酸的相似性大于 80% 的多肽片段。

[0047] 然后根据 SEQ ID NO :3, 用 BEPIPOPE 软件对水稻早老素 5 抑制因子基因编码的蛋白质进行抗原表位的预测。本实施例中使用了 BEPIPOPE 软件提供的五种方法 Standard、Karplus、Emini、Amphiphi、Pellequer, 以及这五种方法的综合方法 cons_Sta_Kar_Emi_Amp_Pel, 所有参数选择默认。具体方法可以参考 Odorico M, Pellequer J L. BEPIPOPE : predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins [J]. J Mol Recognit, 2003, 16 (1) :20-22 一共预测得到了 40 个候选的抗原表位, 在 TIGR 水稻数据库上筛选肽段结构, 选出抗原表位峰值较高的片段 DNISLKNWDQEHV (SEQ ID NO :3)。

[0048] 然后该片段在水稻蛋白质库 (RAP-DB 数据库, 网址 :<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) 进行唯一性检索 (蛋白序列比对), 确定了该片段在水稻蛋白质库中的唯一性。

[0049] 实施例 2 :抗原表位的化学合成

[0050] 实施例 1 中得到的候选抗原表位的两端没有半胱氨酸, 为了实现与载体的交联,

合成的序列需加入半胱氨酸, 因此要合成的多肽序列为 :CDNISLKNWDQEHV (SEQ ID NO :4)。

[0051] 对 SEQ ID NO :4 所示的多肽序列进行化学合成 (由吉尔生化公司合成), 得到早老素 5 抑制因子的抗原表位。

[0052] 实施例 3 :抗原表位 -KLH 复合物的制备

[0053] 采用戊二醛连接法, 将实施例 2 中合成的抗原表位的 N 端与交联载体蛋白 - 钥孔戚血蓝素 (KLH) 交联, 得到抗原表位 -KLH 复合物。

[0054] 具体实施步骤如下：

[0055] 将 5mg 合成多肽加入 7mg KLH 中,边震荡边缓慢加入新鲜配制的 3g/L 戊二醛溶液 1ml, 室温孵育 2h。以 pH8.5 的硼酸缓冲液透析 24h, 得到抗原表位 -KLH 复合物。

[0056] 实施例 4: 多抗血清的制备

[0057] 取 1-2mg 实施例 3 中制备的抗原表位 -KLH 复合物, 免疫新西兰大白兔, 每隔 14 天加强免疫一次; 第 2 次加强免疫后 7 天, 耳静脉取血, 分离血清 (5000rpm 离心 10min), 收集上清, 测效价。同时按照相同的步骤, 用抗原表位 (SEQ ID NO:4) 作为对照。

[0058] 具体步骤如下：

[0059] 取 1-2mg 实施例 3 中制备的抗原表位 -KLH 复合物与等量的完全福氏佐剂充分乳化, 形成油水包, 于兔颈部和背部皮下多点注射, 每点约 100 μg。2 周后加强免疫, 剂量同前, 用不完全福氏佐剂充分乳化后, 于兔背部皮下多点注射; 以后隔 2 周加强免疫 1 次; 从第 2 次加强免疫开始, 每次免疫 7 天后, 经耳静脉取血测定抗体的效价。

[0060] 其中, 耳静脉取血进行效价检测 (ELISA 法) 的步骤如下:

[0061] 在 96 孔板上, 每孔加入 50 μg/ml 磷酸酪氨酸 100 μl, 4°C 过夜后, 进行包被, 洗涤。将按照前述方法制备的耳静脉血的多抗血清稀释为 1:100, 1:500, 1:2500, 1:3200, 1:12800, 1:25600, 每孔各加 100 μl, 37°C 保温 30min, 洗涤。各加入 1:100 稀释的羊抗兔 Ig 酶结合物 100 μl, 37°C 保温 30min, 洗涤。加入 TMB (3,3,5,5-四甲基联苯胺) 100 μl, 20min 后, 加 2mol/l 的 H₂SO₄ 终止反应。

[0062] 经过 2 次加强免疫后, 效价检测的结果如下:

[0063] 多抗血清 (抗原表位 -KLH 复合物免疫) > 25600 (抗原表位 -KLH 复合物有免疫原性的最大稀释倍数是 51200);

[0064] 裸肽免疫 (抗原表位, SEQ ID NO:4) 得到的多抗血清 > 800 (仅仅由抗原表位组成的裸肽具有免疫原性的最大稀释倍数是 800)。

[0065] 上述结果已经符合要求, 遂于末次加强免疫 7 天后颈动脉放血, 收集血样。将收集的血样在 3-4°C 下静置 3-4 小时, 然后 5000rpm 离心 10 分钟, 收集血清, 得到多抗血清 (耳静脉检测效价符合要求后, 颈动脉取的血样不必再检测效价)。无菌分装保存于 -80°C 备用。

[0066] 实施例 5: 抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体 (多抗) 的制备

[0067] 将实施例 4 中制备的多抗血清进行纯化, 制得多克隆抗体 (多抗)。

[0068] 将抗原表位 DNISLKNWDQEHL (SEQ ID NO:4) 多肽与溴化氰活化的 Sepharose 4B 偶联, 制备多肽亲和层析柱。

[0069] 将制备的多抗血清加入到以上制备的层析柱中, 放置于 4°C 孵育过夜后, 洗脱抗体, 即得到抗早老素 5 抑制因子多克隆抗体 (多抗)。

[0070] 实施例 6: 多抗对早老素 5 抑制因子的特异性检验

[0071] 选取水稻 93-11 不同发育阶段和不同部位的组织, 提取总蛋白质, 用 Bradford 法测定样品水稻总蛋白含量, 每个样品分别上样为: 苗期地上部上样量: 7 μL; 分蘖期叶片上样量: 8 μL; 孕穗期剑叶上样量: 7 μL; 开花期剑叶上样量: 6 μL; 成熟期剑叶上样量: 6 μL; 苗期地下部上样量: 6 μL; 分蘖期茎上样量: 10 μL; 开花期穗子上样量: 3 μL; 成熟期种子上样量: 5 μL, 利用制备的 eEF-1α 多克隆抗体检测蛋白质表达 (图 1)。

[0072] 总蛋白质样品的制备 :用液氮研磨上述新鲜水稻组织至粉末状,分装到预冷离心管中,每 300 μ l 粉末加入 800 μ l 蛋白质裂解液 (62.5mmol/L pH7.4Tris • HCl, 10% 甘油, 2% SDS, 20mmol/LNaF, 2mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 5% β - 疏基乙醇), 迅速混匀并置于冰上,冰水混合物中孵育 10 分钟,约每 2 分钟震荡混匀 1 次。4℃,12000r/min 离心 15 分钟。取上清,转移到新的离心管中, -70℃ 保存。得到水稻总蛋白。

[0073] Western 印记 :

[0074] 免疫反应 western blotting 为 :将提取的水稻蛋白质进行 SDS-PAGE 后电转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜,用制备的抗体室温孵育 3h, TTBS(2mmol/L Tris • HCl pH7.6, 13.6mmol/LNaCl, 0.1% Tween — 20) 洗膜 3 次,每次 5min,之后加入羊抗兔二抗室温孵育 1h, TTBS 洗膜 3 次,每次 5min, 加 ECL Plus 检测液检测,暗室曝光 5min.

[0075] 免疫反应检测到苗期 (地上部)、分蘖期 (叶片)、孕穗期 (剑叶)、开花期 (剑叶)、成熟期 (剑叶) 五个时期的叶片样品中与理论中的 35KD 分子量相接近的条带,该蛋白质在不同组织中有特异性表达。需要说明的是,尽管水稻全蛋白中可能有很多分子量与其相似的蛋白,但是与多抗特异性结合的就只有早老素 5 抑制因子一个。关于特异性的预测 :SEQ ID NO :4 经过 <http://rice.plantbiology.msu.edu/blast.shtml> (与实施例 1 中的 <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/> 作用相同,目的是再次检验唯一性) 的检查,确定此多肽序列特异,该序列在水稻总蛋白中唯一确定早老素 5 抑制因子。

[0076] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

[0001]

序列表

<110> 深圳华大基因科技有限公司

<120> 早老素 5 抑制因子抗原表位、抗早老素 5 抑制因子抗体及其用途

<130> P2010-1-0055. CN

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 492

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 1

Met Asp Gln Pro Ser Asn Gly Phe Ala Ala Gly Gly Leu Phe Leu Arg

1

5

10

15

His Ile Asp Gly Gln Asn Ala Ser Pro Pro Ser Val Ile Val Ile Gly

20

25

30

Gly Gly Ile Ser Gly Ile Ala Ala Ala Arg Ala Leu Ser Asn Ala Ser

35

40

45

Phe Lys Val Thr Leu Leu Glu Ser Arg Asp Arg Leu Gly Gly Arg Val

50

55

60

[0002]

His Thr Asp Tyr Ser Phe Gly Cys Pro Ile Asp Met Gly Ala Ser Trp

65 70 75 80

Leu His Gly Val Cys Asn Glu Asn Ser Leu Ala Pro Leu Ile Arg Leu

85 90 95

Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Ser Gly Asp Asn Ser Val Leu Tyr

100 105 110

Asp His Asp Leu Glu Ser Tyr Ala Leu Phe Asp Lys Asp Gly Arg Gln

115 120 125

Val Pro Gln Glu Ile Val Thr Lys Val Gly Glu Thr Phe Glu Lys Ile

130 135 140

Leu Lys Glu Thr Val Lys Val Arg Ala Glu His Glu Asp Asp Met Pro

145 150 155 160

Leu Ile Gln Ala Ile Ser Ile Val Leu Asp Arg Asn Pro His Leu Lys

165 170 175

Leu Asp Gly Leu Gln Tyr Glu Val Leu Gln Trp Cys Ile Cys Arg Leu

180 185 190

Glu Ala Trp Phe Ala Thr Asp Val Asp Asn Ile Ser Leu Lys Asn Trp

[0003]

195

200

205

Asp Gln Glu His Val Leu Thr Gly Gly His Gly Leu Met Val His Gly

210

215

220

Tyr Asp Pro Val Ile Lys Ala Leu Ala Gln Asp Leu Asp Ile His Leu

225

230

235

240

Asn His Arg Val Thr Lys Ile Ile Gln Arg Tyr Asn Lys Thr Ile Val

245

250

255

Cys Val Glu Asp Gly Thr Ser Phe Val Ala Asp Ala Ala Ile Ile Thr

260

265

270

Val Pro Leu Gly Val Leu Lys Ala Asn Ile Ile Lys Phe Glu Pro Glu

275

280

285

Leu Pro Asp Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Asp Leu Gly Ile Gly Ile

290

295

300

Glu Asn Lys Ile Ala Leu Arg Phe Asn Ser Val Phe Trp Pro Asn Val

305

310

315

320

Glu Val Leu Gly Arg Val Ala Pro Thr Ser Asn Ala Cys Gly Tyr Phe

325

330

335

[0004]

Leu Asn Leu His Lys Ala Thr Gly His Pro Val Leu Val Cys Met Val

340 345 350

Ala Gly Arg Phe Ala Tyr Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Glu Glu Ser

355 360 365

Val Asn Phe Val Met Ser Gln Leu Lys Lys Met Leu Pro Gly Ala Thr

370 375 380

Glu Pro Val Gln Tyr Leu Val Ser Arg Trp Gly Thr Asp Pro Asn Ser

385 390 395 400

Leu Gly Ser Tyr Ser Cys Asp Leu Val Gly Lys Pro Ala Asp Leu Tyr

405 410 415

Glu Arg Phe Cys Ala Pro Val Gly Asn Leu Phe Phe Ala Gly Glu Ala

420 425 430

Ala Cys Ile Asp His Ser Gly Ser Val His Gly Ala Tyr Ser Ser Gly

435 440 445

Ile Val Ala Ala Glu Asp Cys Arg Arg His Leu Ser Thr Gln Leu Gly

450 455 460

Ile Ser Asp Leu Phe Gln Val Gly Lys Ile Ile Met Arg Glu Glu Met

[0005]

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Thr Glu Val Met Val Pro Phe Gln Ile Ser Arg Leu

485	490	
-----	-----	--

<210> 2

<211> 1479

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 2

atggaccagg cttctaattgg ctgcggcc ggaggcttt ttcttcgtca cattgatggg	60
---	----

caaaatgcct ctcccccttc tgtcattgtg attggtgag ggatttcagg cattgcagct	120
--	-----

gctcggtgcgc tgtctaattgc ttgcgttaag gtcacactat tagagtcacg ggaccgactt	180
---	-----

ggtggccgtg tgcatactga ctatttttt ggctgcccaa ttgacatggg agcatcttgg	240
--	-----

ttgcattggc tatgcaatga gaattcattt gcaccactga tttagttgtc tggcctttaga	300
--	-----

ttatatcgca ccagtggta taactctgtg ctatatgacc atgatctgga gagctatgtc	360
--	-----

ctctttgata aggatggtcg tcaagttccc caggagatag tgacaaaagt cggggaaaca	420
---	-----

tttggaaaaa ttcttaagga gacggtaaaa gtaagagctg aacatgaaga tgacatgcct	480
---	-----

cttattcaag ccatctcaat tgtgcgttgc aggaatccac acctaaagct tgatggtttgc	540
--	-----

caatatgaag tactgcagtgt gtgcataatgt aggctggagg catggtttgc cacagatgtg	600
---	-----

gataatataat ctctgaaaaa ttgggatcag gaacatgttc ttactgggg ccatgggctt	660
---	-----

[0006]

atggtgcatg gttatgatcc tgttatcaaa gctctgcgc aagatcttga tatccacctg	720
aaccacaggg ttaccaaaat catccagagg tacaacaaaaa ctatagtatg tgtgaagat	780
gggacaagct ttgttgaga tgctgctata ataactgtcc ctcttgggt acttaaagca	840
aatatcatca agtttgaacc tgagctcca gattggaagc tttcatcaat atctgatctt	900
ggtattggca ttgagaacaa aatagccctc cgcttcaata gtgtatttg gccaaatgta	960
gaagtgctag gcagggttgc cccaacatca aatgcctgct gttactttct taacccatcac	1020
aaagccacag ggcatccggt tcttgatgc atggtagcag gaagattcgc atatgaattc	1080
gagaagctat ccgatgaaga atccgtaaac ttgtcatgt cttagctcaa gaaaatgcta	1140
ccaggagcta ctgaaccggt ccagtatttgc gttcaaggt ggggaaccga cccgaattcg	1200
cttgggttctt attcctgcga ctttgggg aagccagctg acttgtatga aagattctgt	1260
gctccgggtgg gcaacctgtt tttcgtggg gaggccgcct gcatcgatca ctctgggtcc	1320
gtgcatggag cttattcttc aggcatgtt gctgcagagg attgccgaag gcatctgtcg	1380
acgcagctag gcatctccga cctttccag gtggaaaga ttatcatgag ggaggagatg	1440
actgaagtca tggccccctt ccagatatcc aggctgtga	1479

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 水稻

[0007]

<400> 3

Asp Asn Ile Ser Leu Lys Asn Trp Asp Gln Glu His Val Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 4

Cys Asp Asn Ile Ser Leu Lys Asn Trp Asp Gln Glu His Val Leu

1 5 10

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 5

Asp Asn Ile Ser Leu Lys Asn Trp Asp Gln Glu His Val Leu Cys

1 5 10 15

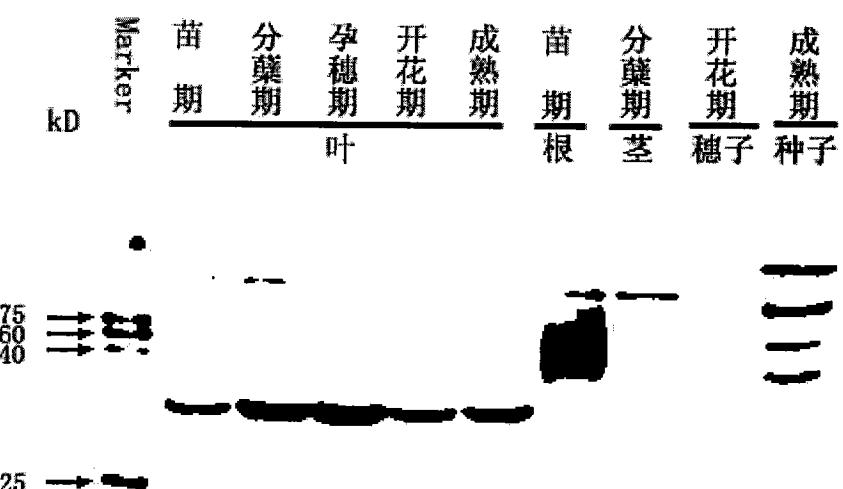


图 1

专利名称(译)	早老素5抑制因子抗原表位、抗早老素5抑制因子抗体及其用途		
公开(公告)号	CN102206252A	公开(公告)日	2011-10-05
申请号	CN201010520306.1	申请日	2010-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	深圳华大基因科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳华大基因科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳华大基因科技有限公司		
[标]发明人	刘斯奇 史晓儒 朱健辉 韩宇宁 尹成园		
发明人	刘斯奇 史晓儒 朱健辉 韩宇宁 尹成园		
IPC分类号	C07K7/08 C07K14/795 C07K14/765 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/06 G01N33/577 G01N33/53		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明属于分子生物学和免疫学领域，涉及早老素5抑制因子抗原表位、抗早老素5抑制因子抗体及其用途。具体地，所述早老素5抑制因子抗原表位具有SEQ ID NO：3或SEQ ID NO：4或SEQ ID NO：5所示的序列。本发明还涉及一种抗早老素5抑制因子多克隆抗体，所述多克隆抗体与上述抗原表位特异性结合。所述多克隆抗体具有高的特异性和效价。本发明还涉及所述多克隆抗体的制备方法和用途、含有该多克隆抗体的组合物、以及检测早老素5抑制因子的方法。

