



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102206253 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201010520323. 5

JP 2005184101 A, 2005. 07. 07,

(22) 申请日 2010. 10. 25

T. Sasaki et al. BAC16183.

《GenBank》. 2008, 1-2.

(73) 专利权人 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

审查员 冯晓亮

(72) 发明人 刘国振 徐宁志 林梁 潘秦
张利

(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)

(56) 对比文件

WO 2006012985 A2, 2006. 02. 09,

权利要求书1页 说明书6页

序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

肌动蛋白解聚因子抗原表位、抗肌动蛋白解聚因子抗体及其用途

(57) 摘要

本发明属于分子生物学和免疫学领域, 涉及肌动蛋白解聚因子抗原表位、抗肌动蛋白解聚因子抗体及其用途。具体地, 所述肌动蛋白解聚因子抗原表位具有 SEQ ID NO :3 所示的序列。本发明还涉及一种抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体, 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、以及检测肌动蛋白解聚因子的方法。

1. 一种肌动蛋白解聚因子抗原表位, 其由 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列组成。
2. 一种用于制备抗肌动蛋白解聚因子抗体的组合物, 其中含有权利要求 1 所述的肌动蛋白解聚因子抗原表位。
3. 权利要求 2 的组合物, 其特征在于, 还含有用于免疫的佐剂。
4. 一种肌动蛋白解聚因子抗原表位 - 载体复合物, 其中, 所述肌动蛋白解聚因子抗原表位为权利要求 1 所述的肌动蛋白解聚因子抗原表位, 所述载体选自钥孔戚血蓝素、BSA、以及酪蛋白。
5. 一种抗肌动蛋白解聚因子抗体的制备方法, 包括使用权利要求 1 的肌动蛋白解聚因子抗原表位或者权利要求 2 或 3 的组合物或者权利要求 4 的复合物的步骤。
6. 权利要求 5 的制备方法, 其特征在于, 所述抗肌动蛋白解聚因子抗体是单克隆抗体。
7. 权利要求 5 的制备方法, 其特征在于所述抗肌动蛋白解聚因子抗体是多克隆抗体。
8. 权利要求 7 的制备方法, 其中, 所述制备方法包括如下步骤:
 - 1) 将权利要求 1 所述的肌动蛋白解聚因子抗原表位或者权利要求 2 或 3 的组合物或者权利要求 4 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, 得到抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体。
9. 一种多抗血清, 其由权利要求 1 的肌动蛋白解聚因子抗原表位或者权利要求 2 或 3 的组合物或者权利要求 4 的复合物免疫动物制得。
10. 一种抗肌动蛋白解聚因子抗体, 其能够特异地结合权利要求 1 所述的肌动蛋白解聚因子抗原表位。
11. 权利要求 10 的抗肌动蛋白解聚因子抗体, 其为多克隆抗体或者单克隆抗体。
12. 一种用于检测肌动蛋白解聚因子的组合物, 其包含权利要求 11 或 10 所述的抗肌动蛋白解聚因子抗体。
13. 一种肌动蛋白解聚因子检测剂, 其包含权利要求 10 或 11 所述的抗肌动蛋白解聚因子抗体。
14. 权利要求 11 或 10 所述的抗体在制备检测肌动蛋白解聚因子的检测剂中的用途。
15. 一种检测肌动蛋白解聚因子的方法, 所述方法包括使用权利要求 10 或 11 所述的抗肌动蛋白解聚因子抗体的步骤。
16. 权利要求 15 所述的方法, 其中, 所述肌动蛋白解聚因子为水稻的肌动蛋白解聚因子。

肌动蛋白解聚因子抗原表位、抗肌动蛋白解聚因子抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和免疫学领域。具体地,涉及一种肌动蛋白解聚因子抗原表位、抗肌动蛋白解聚因子抗体,本发明还涉及分别含有所述抗原表位和抗体的组合物、以及所述抗体在检测肌动蛋白解聚因子中的用途。

背景技术

[0002] 肌动蛋白解聚因子 (actin depolymerizing factor/cofilin, ADF/cofilin) 属于肌动蛋白结合蛋白 (actin-binding protein) 家系。迄今为止,可以在所有的真核细胞中检测到 ADF/cofilin。它们能调节 (纤) 丝状肌动蛋白细胞骨架 (F-actin cytoskeleton), 影响细胞的各种生理功能。不同的生物有不同的 ADF/cofilin, 但其功能基本相似。ADF/cofilin 可以使 (纤) 丝状肌动蛋白 (F-actin) 解聚合, 而且这种解聚合活性是可逆的, ADF/cofilin 切割 F-actin 并且能提高球状肌动蛋白 (G-actin) 离开纤维突出端 (pointed end) 的能力, 其作用受很多因素调控。肌动蛋白对生物正常细胞形态维持、胞质分裂、胞质环流、细胞器运动及植物的顶端生长起着重要的作用。一旦破坏生物体细胞肌动蛋白的动态平衡, 生物或多或少表现出形态异常。

[0003] 研究表明, 肌动蛋白解聚因子解聚和切割肌动蛋白, 肌动蛋白解聚因子的过表达会破坏肌动蛋白的动态平衡。肌动蛋白动态平衡一旦遭到破坏, 就有可能影响植物正常生长。肌动蛋白解聚因子在植物体内的动态变化, 是影响肌动蛋白的动态平衡的重要因素。

[0004] 水稻 (*Oryza sativa* L.) 是世界上最重要的粮食作物之一, 也是植物生长发育、逆境反应等基础研究的模式植物。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, 筛选并提出了适合水稻肌动蛋白解聚因子基因肌动蛋白解聚因子。肌动蛋白解聚因子基因 Os07t0484200-01, 通过生物信息学分析, 位于水稻第七条染色体上, DNA 序列全长 1514bp, cDNA 序列全长 420bp, 编码 139 个氨基酸组成的肌动蛋白解聚因子蛋白。通过 RAP-DB 数据库比对分析, 肌动蛋白解聚因子 Os07t0484200-01 为一种肌动蛋白解聚因子蛋白。目前还没有关于该基因和蛋白等相关的报道。

[0005] 目前对肌动蛋白解聚因子全长抗原产生的抗体的研究为空白。查阅文献发现, BEPITOPE 软件会有超过 30% 的概率不能预测到抗原决定簇 (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), 该软件对全长抗原的抗原决定簇预测存在着特异性问题。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题, 本发明人在通过 BEPITOPE 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 36 个抗原表位中有一个抗原表位序列 CKFKFQELKTRRG (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。由此提供了下述发明：

[0007] 本发明的一个方面涉及一种肌动蛋白解聚因子抗原表位，其氨基酸序列如 SEQ ID NO :3 所示。

[0008] 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。

[0009] 本发明的还一方面涉及一种组合物，其包含 SEQ ID NO :3 所示的肌动蛋白解聚因子抗原表位，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。

[0010] 发明的还一方面涉及一种肌动蛋白解聚因子抗原表位-载体复合物；其中，所述肌动蛋白解聚因子抗原表位为 SEQ ID NO :3 所示的肌动蛋白解聚因子抗原表位，所述载体可以是钥孔戚血蓝素 (KLH)、BSA 或酪蛋白等。

[0011] 本发明的还一方面涉及一种抗肌动蛋白解聚因子抗体，所述抗肌动蛋白解聚因子抗体能够特异性地结合 SEQ ID NO :3 所示的肌动蛋白解聚因子抗原表位。所述抗肌动蛋白解聚因子抗体可以是单克隆抗体，也可以是多克隆抗体。

[0012] 本发明的抗肌动蛋白解聚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。

[0013] 对本领域技术人员而言，可以根据 SEQ ID NO :3 所示的肌动蛋白解聚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，也可以参考文献例如 Nature 1975 Kohler&Milstein Vol256, p495。

[0014] 本发明的还一方面涉及一种含有抗肌动蛋白解聚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 所示的抗原表位免疫动物制得。

[0015] 本发明的还一方面涉及一种抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体制备方法，包括将 SEQ ID NO :3 所示的肌动蛋白解聚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。

[0016] 本发明的一个实施方案中，所述抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体制备方法，包括如下步骤：

[0017] 1) 将 SEQ ID NO :3 所示的肌动蛋白解聚因子抗原表位作为抗原免疫动物；

[0018] 2) 取血，离心收集多抗血清；和

[0019] 3) 纯化步骤 2) 中的多抗血清，得到抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体。

[0020] 本发明的还一方面涉及一种组合物，其包含本发明的抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体。

[0021] 本发明的还一方面涉及一种肌动蛋白解聚因子检测剂，其包含本发明的抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体。

[0022] 肌动蛋白解聚因子的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2) 如下：

[0023] MANSASGLAVNDE **CKFKFQELKTRRG** FRFIVFKIDDKAMEIKVERLGQTAEGYEDFAATLPADCE
RYAVYDLDFVTDENCQKSKIFFFSWSPDTARTRSKMLYASSKDRFRRELDGIQCEIQATDPSEMSLDIIRARAH (SEQ ID NO :2)

[0024] 其中加框的序列为 SEQ ID NO :3

[0025] 本发明的还一方面涉及本发明的抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体在制备检测肌

动蛋白解聚因子的药物中的用途。

[0026] 本发明的还一方面涉及一种检测肌动蛋白解聚因子的方法,所述方法包括使用本发明的抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体的步骤。具体地,包括如下步骤:

[0027] 1) 将待测样品与本发明的抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体孵育,使所述的抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体与待测样品中的肌动蛋白解聚因子特异性结合,由此形成免疫复合物;和

[0028] 2) 检测是否存在免疫复合物。

[0029] 上述检测肌动蛋白解聚因子的方法可以检测肌动蛋白解聚因子的有无、对其进行半定量(例如 western blot 方法);在有肌动蛋白解聚因子标准品的情况下,还可以通过 ELISA 方法对肌动蛋白解聚因子进行定量检测。

[0030] 在本发明的一个实施方案中,所述肌动蛋白解聚因子为水稻的肌动蛋白解聚因子。具体的,所述水稻为水稻 93-11。

[0031] 发明的有益效果

[0032] 1) 抗原获得方便。本发明采用化学合成多肽的方法获得抗原,合成了 13 个氨基酸的抗原决定簇,保证了抗体的特异性,避免了抗原制备的繁琐。

[0033] 2) 抗体制备简单,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。

[0034] 3) 抗体的特异性强。用抗原免疫获得的多克隆抗体特异性强,其多抗血清的效价信息为 KLH > 25600,裸肽 > 12800,抗体和抗原的结合灵敏,为科学研究肌动蛋白解聚因子蛋白的表达情况提供了坚实的基础。

附图说明

[0035] 图 1:使用抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体对肌动蛋白解聚因子在水稻不同组织的免疫印迹检测结果。

[0036] 图 2:多抗检测的肌动蛋白解聚因子的一级质谱图。

[0037] 图 3:多抗检测的肌动蛋白解聚因子的二级质谱图。

具体实施方式

[0038] 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。

[0039] 实施例 1:候选抗原表位 1 的预测

[0040] 水稻肌动蛋白解聚因子对应的基因是 Os07g0485100, GenBank 登录号: NP_001059648. 1。读码框序列如下:

[0041] ATGGCGAATTCTGCGTCAGGGCTGGCGGTGAACGACGAGTGCAAGTTCAAGTTCAGGAGCTGAAGACGAGGAGGGGGTTCAGGTTTCATCGTGTTC AAGATCGACGACAAGGCCATGGAGATCAAGGTGGAGAGGCTCGGGCAGAC

1 : 25600, 每孔各加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 30min, 洗涤。各加入 1 : 100 稀释的羊抗兔 Ig 酶酶结合物 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 30min, 洗涤。加入 TMB 100 μ l, 20min 后, 加 2mol/l 的 H₂SO₄ 终止反应。使用酶标仪测定 A_{490nm} 值, 高于免疫前血清 10 倍的为阳性。

[0058] 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。将收集的的血样在 3-4 $^{\circ}$ 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 : KLH > 25600, 裸肽 > 12800 后, 颈动脉取的的血样不必再检测效价)。无菌分装保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

[0059] 实施例 5 : 抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体 (多抗) 的制备

[0060] 将实施例 5 中制备的多抗血清进行纯化, 制得多克隆抗体 (多抗)。

[0061] 将抗原表位 CKFKFQELKTRRG (SEQ ID NO : 3) 多肽与溴化氰活化的 Sepharose 4B 偶联, 制备多肽亲和层析柱。

[0062] 将制备的多抗血清加入到以上制备的层析柱中, 放置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后, 洗脱抗体, 即得到抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体 (多抗)。

[0063] 实施例 6 : 多抗针对肌动蛋白解聚因子的特异性检验

[0064] 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, 选取水稻不同发育阶段和不同部位的组织, 提取总蛋白质, 每个样品上样 10 μ g 水稻总蛋白, 利用制备的多克隆抗体检测蛋白质表达, 免疫印迹 (Western blotting) 可检测到与预期分子量 (16kDa) 接近的条带, 由于目标蛋白质存在二聚体和单聚体, 所以目标条带是 32kD 和 16kD, 与目标蛋白质 16kD 是两倍和一倍的关系, 后面通过实验对此进行了验证。该蛋白质在水稻的不同组织中都表达量的不同, 可进一步研究肌动蛋白在水稻中的动态平衡。

[0065] 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 pH7.4 Tris • HCl, 10% 甘油, 2% SDS, 20mmol/L NaF, 2mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 5% β -巯基乙醇), 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 $^{\circ}$ C, 12000r/min 离心 15 分钟。取上清, 转移到新的离心管中, -70 $^{\circ}$ C 保存。得到水稻总蛋白。

[0066] Western 印记 :

[0067] 将提取的上述水稻蛋白质进行 SDS-PAGE (12%), SDS-PAGE 后电转移到 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 PVDF 膜。使用实施例 7 中制备的多抗 1, 以 1 : 1000 稀释后室温孵育 3 小时, TTBS (2mmol/L Tris • HCl pH7.6, 13.6mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 洗膜 3 次, 每次 5 分钟。之后加入以 1 : 15000 稀释的兔源多抗 (厂家货号 : 中杉 ZB2301), 室温孵育 1 小时, TTBS 洗膜 3 次, 每次 5 分钟。加 ECL Plus 显色剂显色, 暗室曝光 5 分钟。结果如图 1 所示, 在 PVDF 膜上看到 16kDa 附近的一条特异性条带, 这与预测分子量 (16kDa) 几乎完全一致。

[0068] 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肌动蛋白解聚因子一个。关于特异性的预测 : SEQ ID NO : 3 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肌动蛋白解聚因子。

[0069] 此外,为了进一步证明检测到的两条条带的确是肌动蛋白解聚因子二聚体和肌动蛋白解聚因子,将上述9个表位分别提取的总蛋白进行第二次 SDS-PAGE 电泳,得到 SDS 胶,然后在上面选取与 western blot 上的目标条带(16kDa)对应的条带,用 Trypsin 酶消化后打质谱,通过对一级质谱图(图2)和二级质谱图(图3)的联合搜索,可以推测是肌动蛋白解聚因子,western blot 的预测是通过实验证实的。

[0070] 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> 肌动蛋白解聚因子抗原表位、抗肌动蛋白解聚因子抗体及其用途

<130> P2010-1-0060. CN

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 420

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 1

atggcgaatt ctgcgtcagg gctggcggtg aacgacgagt gcaagttcaa gttccaggag 60

ctgaagacga ggagggggtt caggttcacg gtgttcaaga tcgacgacaa ggccatggag 120

atcaaggtgg agaggctcgg gcagactgcc gagggctacg aggacttcgc cgccaccctc 180

cccgccgacg agtgccgcta cgccgtctac gacctcgact tcgtcaccga cgagaactgc 240

cagaagagca agatcttctt cttctcctgg tcgcctgaca cggcgaggac aaggagcaag 300

atgctgtacg cgagctccaa ggacaggttc aggagggagc tggacggaat ccagtgcgag 360

[0002]

attcaggcca cagaccccag cgagatgagc ctcgacatca tcagagccag agctcactga 420

<210> 2

<211> 139

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 2

Met Ala Asn Ser Ala Ser Gly Leu Ala Val Asn Asp Glu Cys Lys Phe

1 5 10 15

Lys Phe Gln Glu Leu Lys Thr Arg Arg Gly Phe Arg Phe Ile Val Phe

 20 25 30

Lys Ile Asp Asp Lys Ala Met Glu Ile Lys Val Glu Arg Leu Gly Gln

 35 40 45

Thr Ala Glu Gly Tyr Glu Asp Phe Ala Ala Thr Leu Pro Ala Asp Glu

 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Tyr Asp Leu Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys

65 70 75 80

[0003]

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Phe Ser Trp Ser Pro Asp Thr Ala Arg
 85 90 95

Thr Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Arg Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Cys Glu Ile Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Leu Asp Ile Ile Arg Ala Arg Ala His
 130 135

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 3

Cys Lys Phe Lys Phe Gln Glu Leu Lys Thr Arg Arg Gly
 1 5 10

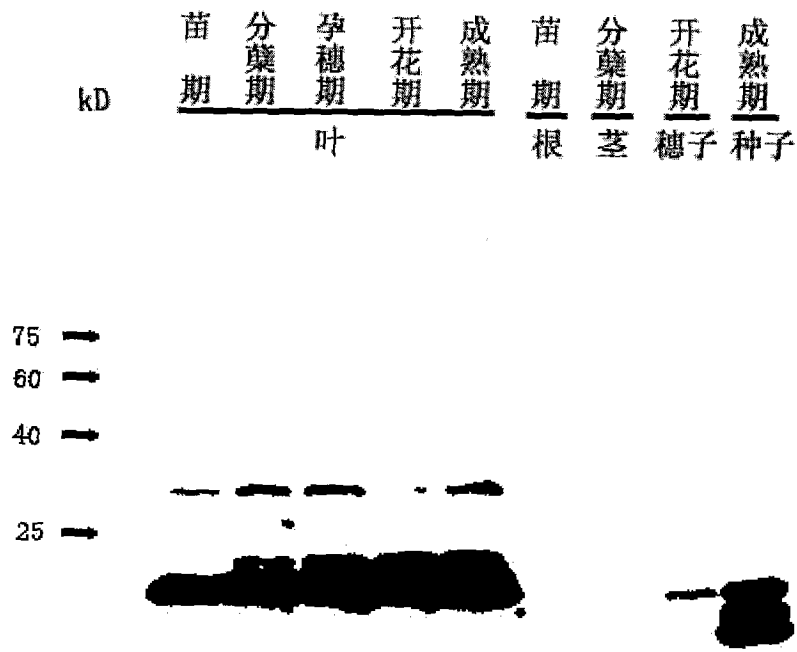


图 1

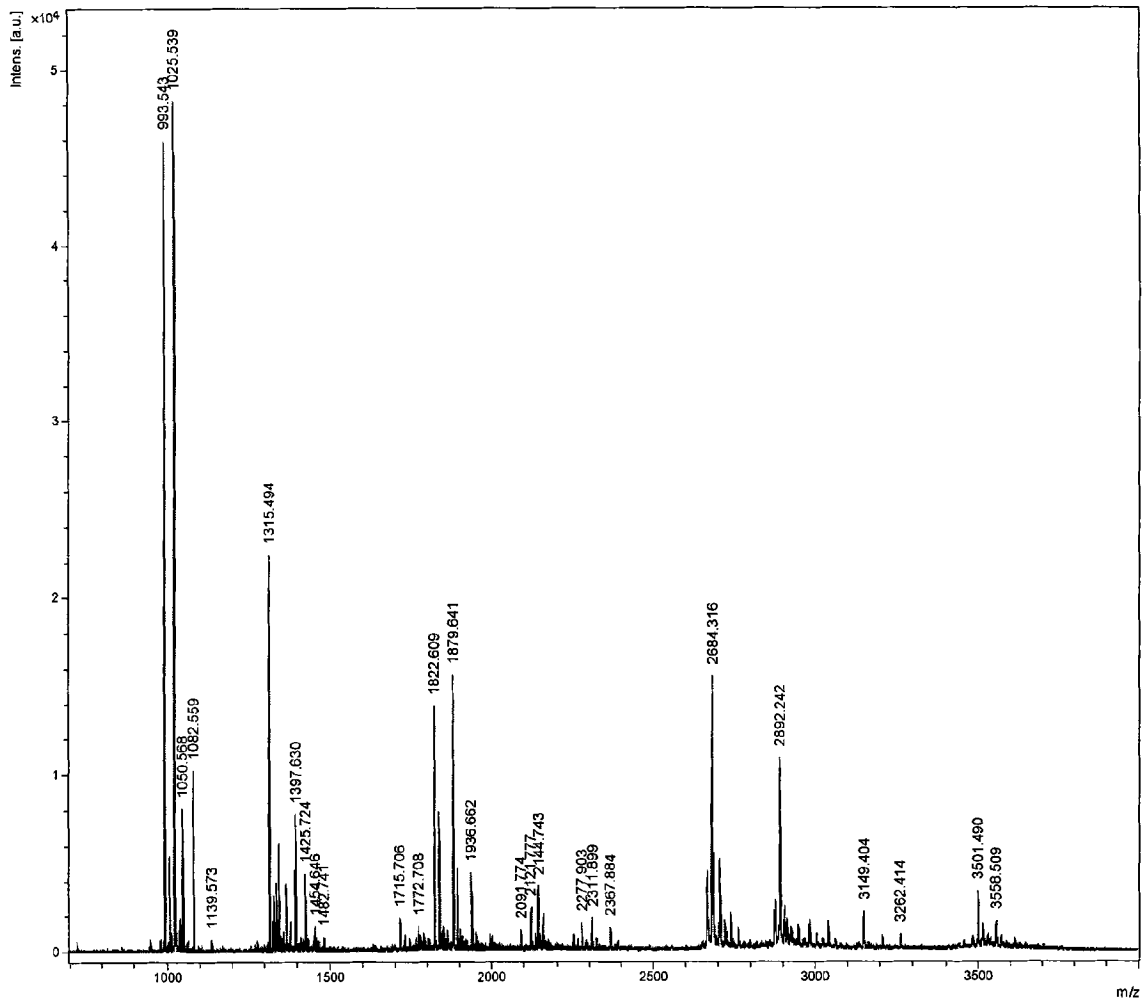


图 2

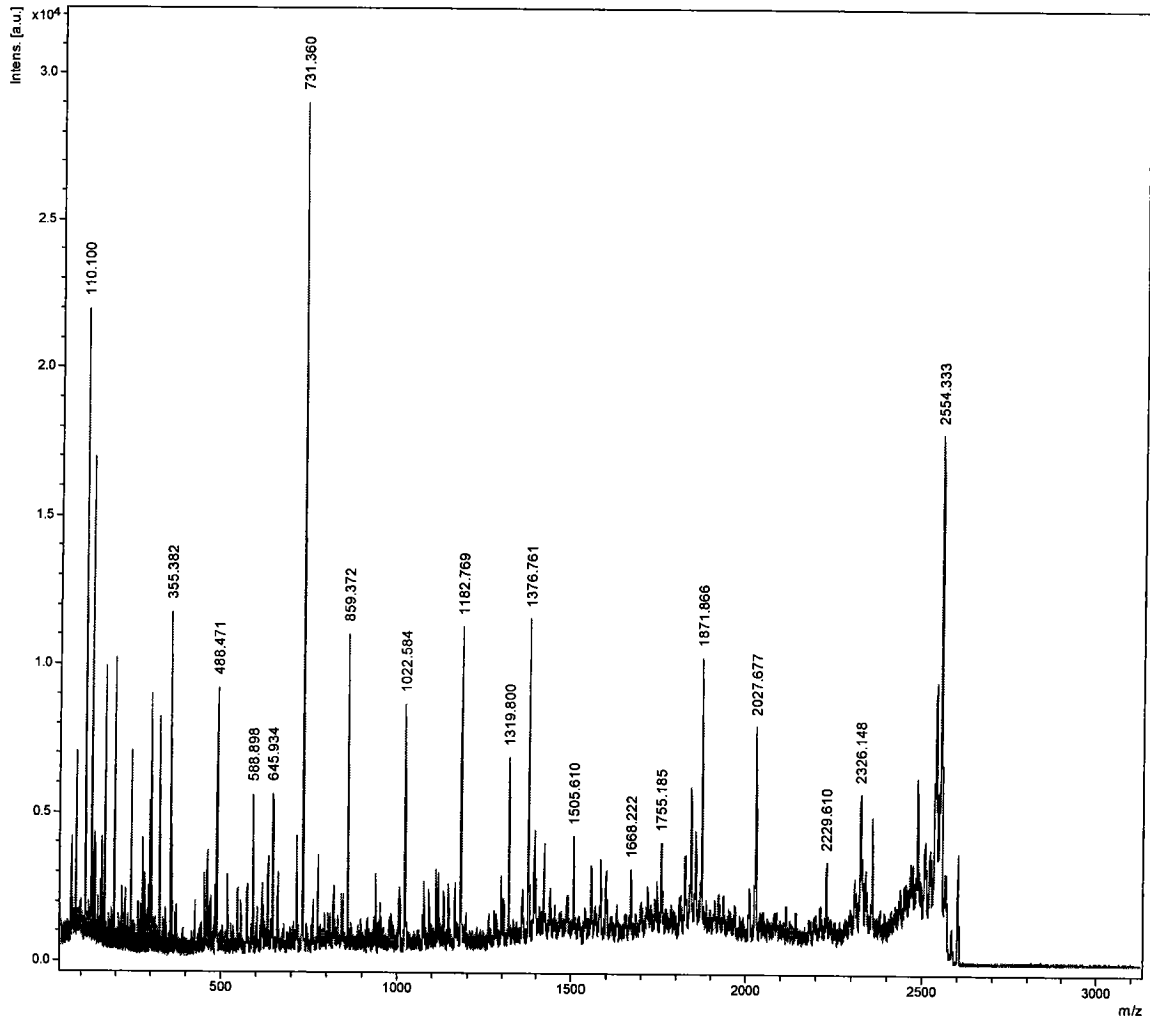


图 3

专利名称(译)	肌动蛋白解聚因子抗原表位、抗肌动蛋白解聚因子抗体及其用途		
公开(公告)号	CN102206253B	公开(公告)日	2013-09-18
申请号	CN201010520323.5	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	刘国振 徐宁志 林梁 潘秦 张利		
发明人	刘国振 徐宁志 林梁 潘秦 张利		
IPC分类号	C07K7/08 C07K14/795 C07K14/765 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/06 G01N33/577 G01N33/53		
审查员(译)	冯晓亮		
其他公开文献	CN102206253A		
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，涉及肌动蛋白解聚因子抗原表位、抗肌动蛋白解聚因子抗体及其用途。具体地，所述肌动蛋白解聚因子抗原表位具有SEQ ID NO：3所示的序列。本发明还涉及一种抗肌动蛋白解聚因子多克隆抗体，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、以及检测肌动蛋白解聚因子的方法。

