



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105524172 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 27

(21) 申请号 201610074727. 3

(22) 申请日 2016. 02. 03

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学第一
附属医院

地址 400000 重庆市沙坪坝区高滩岩 30 号
重庆市沙坪坝区西南医院

(72) 发明人 郭燕丽 范校周

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

C07K 16/30(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

B01J 20/24(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

一种能特异结合前列腺特异性膜抗原的纳米
抗体

(57) 摘要

本发明属于基因工程领域,具体为针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体,其具有 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列,可用于免疫检测、抗原富集纯化等领域。本发明所提供的氨基酸序列可以作为前体,通过随机或定点突变技术进行改造,能够获得性质(亲和性、特异性、稳定性等)更好的突变体,用来发展进一步用于医药、工业、农业的蛋白质或多肽。

1. 针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体,具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。
2. 一种核酸分子,其特征是编码权利要求1中所述氨基酸序列。
3. 根据权利要求2所述的核酸分子,其特征是序列如SEQ ID NO.:2。
4. 一种包含权利要求2所述的核酸序列的载体。
5. 一种包含权利要求4所述的载体的宿主细胞。
6. 权利要求1所述的针对前列腺特异性膜抗原单域重链抗体在免疫检测、菌体或抗原富集纯化中的应用。
7. 权利要求1所述的针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体在制备前列腺特异性膜抗原免疫检测、富集以及纯化试剂或材料中的应用。
8. 权利要求1所述的针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与前列腺特异性膜抗原特异性结合的抗体。
9. 一种针对前列腺特异性膜抗原的免疫亲和吸附材料,包括载体,搭载在载体上的配基,其特征是材料以针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体作为配基,所述针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。

一种能特异结合前列腺特异性膜抗原的纳米抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及单域重链抗体技术(又称纳米抗体技术),以及基因工程抗体技术,特别是针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体或多肽。

技术背景

[0002] 单域抗体是指由普通抗体可变区(VH或VL)组成的基因工程抗体。单域重链抗体(又称为纳米抗体,VHH抗体,variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody)是指仅由重链抗体(heavy-chain antibody)可变区(Variable region)组成的基因工程抗体,其中,重链抗体(heavy-chain antibody)是一种存在于骆驼、鲨鱼等动物体内天然缺失轻链的抗体。单域重链抗体是目前已知的最小的完整抗原结合片段,具有分子量小、渗透性好等特点,目前已广泛用于基础研究、医学诊断和检测、抗体药物开发等领域。

[0003] 前列腺癌是一种严重威胁老年男性健康的恶性肿瘤,其早期诊断和治疗对于其预后具有重要的意义。前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen,PSMA)是一种位于前列腺细胞膜上的II型跨膜糖蛋白,由750个氨基酸组成,分为胞内区(氨基酸序列为1-18)、跨膜区(19-43)和胞外区(44-750),相对于传统用于临床检测的前列腺特异抗原(prostate specific antigen,PSA),是一种更加敏感和特异的前列腺癌肿瘤标记物,尤其是在激素难治性前列腺癌及前列腺癌转移灶中均为高表达,在区分前列腺癌和其他类型恶性肿瘤的敏感度和特异性分别为65.9%和94.5%。另外,在多种非前列腺来源的实体瘤,如肺癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾癌和结直肠癌等,PSMA也高度特异地表达于肿瘤血管内皮细胞上。而且本身具有神经羧基肽酶和叶酸水解酶的活性,加之707个氨基酸组成的胞外区能够提供多个抗原表位等特点,使其成为了肿瘤免疫靶向治疗和分子影像学中重要的研究靶点。

[0004] 目前,人们发现了多种针对PSMA亦制备了多种能与其发生特异性结合的物质,包括单克隆抗体7E11、J591,适体A9和A10,重组技术得到的ScFv抗体D7、Fab抗体及人源化抗体的报道特别是已经通过美国FDA批准用于前列腺癌的诊断和晚期核素治疗的¹¹¹In-喷地肽,就是基于针对PSMA的单克隆抗体与放射性核素相连而成。但与单域重链抗体相比,这些配体存在生产成本相对较高,制备过程复杂等缺点。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体,可以被用于制备检测前列腺特异性膜抗原的试剂和工具。

[0006] 本发明提供一个针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体(即本发明一种能特异结合前列腺特异性膜抗原的纳米抗体),具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列,其氨基酸序列可通过标准化的抗体氨基酸序列编号方法(ImMunoGeneTics,IMGT)进行编号和结构域的划分。

[0007] 本发明提供一种蛋白质或多肽,其特征是包含框架区中的一个或者两个以上的氨

基酸序列,且至少与一个氨基酸序列具有90%同源性。

[0008] 本发明提供一种蛋白质或多肽,其特征是包含互补决定区中的一个或者两个以上的氨基酸序列,且至少与一个氨基酸序列具有80%同源性。

[0009] 本发明提供一个核酸分子,其特征是编码SEQ ID NO.:1,通过遗传密码子可以随时获得该核酸分子的具体序列。该核酸分子的序列如SEQ ID NO.:2。

[0010] 本发明还提供一个核酸分子,其特征是编码SEQ ID NO.:1部分结构域,通过遗传密码子可以随时获得该核酸分子的具体序列。

[0011] 本发明所提供的核苷酸序列或者至少部分序列可以通过合适的表达系统进行表达以得到相应的蛋白质或多肽。这些表达系统包括细菌,酵母菌,丝状真菌,动物细胞,昆虫细胞,植物细胞,或无细胞表达系统。

[0012] 本发明还提供一种载体,包含所述核酸序列。由于遗传密码子具有简并性,该核酸序列可以根据不同的应用目的而不同。

[0013] 本发明还提供一种宿主细胞,包括所述蛋白质或表达载体。

[0014] 本发明还提供一种检测细胞上前列腺特异性膜抗原的方法,其特征是含有上述蛋白质或多肽。基于本发明提供的蛋白质或多肽与前列腺特异性膜抗原特异性结合的能力,建立前列腺特异性膜抗原的检测方法。其中,优选的方法包括酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA),荧光免疫法(Fluoroimmunoassay,FIA),免疫芯片法,亲和层析法和免疫层析法。

[0015] 本发明针对前列腺特异性膜抗原单域重链抗体在非疾病诊断治疗目的免疫检测、以及菌体或抗原富集纯化中的应用。

[0016] 本发明所提供的氨基酸序列可以作为前体,通过随机或定点突变技术进行改造,能够获得性质(水溶性、稳定性、亲和力以及特异性等)更好的突变体,用来发展进一步用于医药、工业、农业的蛋白质或多肽。

[0017] 本发明还涉及一种针对前列腺特异性膜抗原的免疫亲和吸附材料,包括载体,搭载在载体上的配基,该材料以针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体作为配基,所述针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。所述载体为磁珠、琼脂糖凝胶微球、硅胶微球或多孔材料。

[0018] 本发明所叙述的一些术语具有如下含义:

[0019] 同源性:描述两个或更多氨基酸序列的相似程度,第一个氨基酸序列和第二个氨基酸序列之间同源性的百分比可以通过【第一个氨基酸序列中与第二个氨基酸序列中相应位置处的氨基酸序列相同的氨基酸残基的数量】除以【第一个氨基酸序列中氨基酸总数】在乘以【100%】来计算,其中第二个氨基酸序列中的某个氨基酸的缺失、插入、替换或添加(与第一个氨基酸相比)被认为是有差别。备选地,同源性百分比也可以利用已知的用于序列匹配的计算机运算程序如NCBI Blast获得。

[0020] 结构域:蛋白质三级结构的基本结构单位,通常具有一定的功能。

[0021] IMGT编号:IMGT数据库(The International ImMunoGeneTics Database)中的一种已经标准化的抗体氨基酸序列编号方法。具体编号方法可以参考文献(Ehrenman,F.,Q.Kaas,et al.(2010).”IMGT/3D structure-DB and IMGT/DomainGapAlign:a database and a tool for immunoglobulins or antibodies,T cell receptors,MHC,

IgSF and MhcSF.”Nucleic Acids Res38(Database issue):D301-307.Lefranc,M.P., C.Pommie,et al.(2003).”IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Igsuperfamily V-like domains“Dev comp Immunol 27(1):55-77.http://www.imgt.org/)中的描述。

[0022] 密码子(codon):又称为三连体密码子(triplet code),指对应于某种氨基酸的核苷酸三联体。在转译过程中决定该种氨基酸插入生长中多肽链的位置。

[0023] 本发明的有益效果:本发明针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体或多肽具有与前列腺特异性膜抗原特异性结合、可以通过生物学方法大规模生产、成本低、高效、分子量小、渗透性好等性质,显示出良好的应用前景。

附图说明

[0024] 图1菌落PCR产物电泳、重组蛋白电泳和Western Blot鉴定图。左边Marker泳道为DNA分子量标准,泳道1中的菌落PCR片段出现在预期位置。中间为纯化后的蛋白进行SDS-PAGE检测,在预期位置出现明亮条带。右边为以抗PSMA单克隆抗体和抗His标签抗体的Western Blot鉴定图。

具体实施方式

[0025] 下面通过单域重链抗体(多肽)的制备、分析及应用,对本发明做进一步说明,这些具体实施例不应以任何方式被解释为限制本发明的应用范围。

[0026] 实施例1

[0027] 前列腺特异性膜抗原膜外区的真核表达

[0028] 采用RNAiso Plus试剂提取高表达PSMA的LNCaP细胞中总RNA,利用RT-PCR方法得到编码PSMA胞外区片段的DNA片段,使用Not I与BamH I两种限制性内切酶将其插入真核表达载体pRAG2a,通过T4DNA连接酶连接为重组质粒。重组质粒热击转化到TOP10感受态细胞培养过夜,将鉴定正确的克隆送测序验证。提取阳性克隆的质粒,使用脂质体Lipofectamine 2000将DNA质粒转染至HEK-293细胞中培养,于不同时相点收集上清,进行SDS-PAGE电泳检测。培养一定时间后,按照HisTrap FF Crude试剂盒操作纯化该蛋白。将纯化后的蛋白进行SDS-PAGE后,电转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭后,分别加入PSMA抗体和His抗体,4℃过夜;漂洗后,加二抗室温下孵育1h,再次漂洗,加入显色液进行显影(图1)。

[0029] 实施例2

[0030] 抗前列腺特异性膜抗原单域重链抗体(即针对抗前列腺特异性膜抗原单域重链抗体)的淘选与鉴定

[0031] 采用固相淘选的方法从驼源天然抗体噬菌体展示文库(为参考文献:“涂追,许杨,刘夏,等.驼源天然单域重链抗体库的构建与鉴定[J].中国生物工程杂志,2011,31(4):31-36.”中构建的展示文库)中淘选针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体。前列腺特异性膜抗原膜外区的表达按照上述的实施例1进行,第一轮淘选时,采用磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH7.4)稀释上述合成的PSMA胞外区蛋白至150μg/mL(第2-4轮包被浓度分别为100、50、50μg/mL),在酶标板上每孔加入100μL,4℃包被过夜。PBST(含0.5%Tween 20)洗板5次,3%BSA-PBS在37℃封闭2h,洗板3次,加入与0.5%BSA-PBS孵育过的噬菌体抗体库100μL(约含2

×10¹¹CFU), 37°C 孵育 1h, 用 PBST 洗板 5 次 (逐轮增加 3 次), 再用 PBS 洗板 10 次 (逐轮增加 5 次)。再以 100μL 洗脱液 (甘氨酸-盐酸, pH 2.2) 洗脱吸附的噬菌体 (37°C, 5min), 用 50μL Tris-HCl (1mol/L, pH 9.0) 中和洗脱物, 取 10μL 用于滴度测定, 其余洗脱物扩增后用于下一轮淘选。

[0032] 经过四轮淘选后采用浓度为 5μg/mL 的 PSMA 胞外区蛋白包被酶标板, 洗板、封闭同上。加入扩增纯化的噬菌体克隆 37°C 孵育 15min, 100μL/孔, 37°C 孵育 1h。洗板后加入稀释度为 1:5000 的 HRP-anti-M13 抗体, 100μL/孔, 37°C 孵育 1h。PBST 洗板 5 次, 加 TMB 工作液 100μL/孔, 室温 20min, 每孔加入 50μL 硫酸 (浓度为 2mol/L) 终止反应, 测定 450nm 吸光值。以前一轮扩增的噬菌体抗体库直接包被酶标板作为阳性对照, 以 PBS 替代噬菌体克隆为空白对照, 用间接 phage-ELISA 法测定噬菌体颗粒的结合活性。

[0033] 表 1 间接 phage-ELISA 加样表

[0034]

	实验组	阳性对照组	空白对照组
包被	PSMA 蛋白	扩增的噬菌体抗体库	PBS
封闭	3%BSA-PBS		
结合	噬菌体		
二抗	辣根过氧化物酶标记的小鼠抗 M13 噬菌体抗体 HRP/anti-M13 (GE 公司)		

[0035] 将 ELISA 阳性克隆送测序公司进行序列测定, 得到抗前列腺特异性膜抗原单域重链抗体噬菌体阳性克隆的插入片段 DNA 序列, 具体为 (SEQ ID NO.: 2):

[0036]

ATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGTGGAGGATTGGTGCGGGCCGGGGACTCTGCGAGACTCGCCTGTGCAGC
CTCCGGACGCACCTTCAGGCGGTATACCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAG
CTATTAAGTGGAGTGGTACTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCATTACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACC GG GTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCCATACCCACGG
GATAGCTGGCCGCATAACGGACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCAAGACACCAAAAACCAC
AAGCGGCCGC

[0037] 其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO.: 1 所示:

[0038]

QVQLVESGGGLVLRAGDSARLACAASGRTRFRRTMGWFRQAPGKEREFVAAIKWSGTSTYYADSVKGRFTISRDNAKN
RVYLQMNSLQPEDTAVYYCAIPHG IAGRI TDWGQGTQVTVSS。即本发明抗前列腺特异性膜抗原的单域
重链抗体, 其能与 PSMA 蛋白的膜外区发生特异性结合。

[0039] 实施例 3

[0040] PSMA 表达细胞的 ELISA 和荧光免疫检测

[0041] 胃癌细胞 MKN45 不表达 PSMA, 而前列腺癌细胞 LNCaP 表达 PSMA, 以这两种细胞为例, 采用实施例 2 中淘选获得的抗前列腺特异性膜抗原单域重链抗体噬菌体阳性克隆进行细胞

水平的ELISA和荧光免疫检测。向96孔板中分别种入LNCaP细胞(表达PSMA)和MKN45细胞(不表达PSMA)各 1×10^4 个,培养过夜。4%多聚甲醛固定,每孔滴加100 μ L的3%过氧化氢液,用以阻断内源性过氧化物酶活性,37 $^{\circ}$ C孵育30min。TBS洗板3次,5%BSA-PBS封闭,加入100 μ L抗前列腺特异性膜抗原单域重链抗体噬菌体阳性克隆,于37 $^{\circ}$ C孵育1h。其后PBS漂洗,添加HRP-anti-M13抗体、TMB工作液和OD₄₅₀的测定同实施例2。阳性对照使用噬菌体替代细胞,空白对照使用PBS替代添加的噬菌体克隆,重复3次。

[0042] 向24孔板中的每孔中添加细胞爬片后种入LNCaP细胞和MKN45细胞各 4×10^5 个,培养过夜。取出爬片,4%多聚甲醛固定,漂洗,滴加3%过氧化氢在爬片表面,用以阻断内源性过氧化物酶活性。其后TBS洗3次,5%BSA-PBS封闭30min。滴加100 μ L展示本发明所述纳米抗体的噬菌体克隆孵育1h,以不加噬菌体克隆的细胞爬片为空白对照。其后添加稀释度为1:2000的anti-M13单克隆抗体孵育30min。洗片后滴加30 μ L稀释度为1:200的FITC-山羊抗小鼠二抗,避光孵育30min,并用DAPI染色液进行复染,置于荧光显微镜下观察。

[0043] 结果表明:由于不表达PSMA的MKN45细胞测值在统计学上与空白对照存在差异,表明该噬菌体能够与其发生非特异性结合;但是LNCaP细胞测值显著高于MKN45细胞,表明这一部分差异来自于PSMA和抗前列腺特异性膜抗原单域重链抗体噬菌体阳性克隆的特异性结合。同时,细胞免疫荧光表明LNCaP细胞能够与针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体阳性克隆结合,而MKN45细胞以及未加抗前列腺特异性膜抗原单域重链抗体噬菌体阳性克隆的细胞爬片为阴性,表明淘选出的抗前列腺特异性膜抗原单域重链抗体噬菌体阳性克隆能够有效地与PSMA表达阳性的细胞发生特异性结合。

[0044] 实施例4

[0045] 抗前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体在大肠杆菌中的表达

[0046] 提取实施例2中针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体阳性克隆的噬菌粒为模板,设计特异性引物扩增目的基因,扩增条件:94 $^{\circ}$ C5min预变性;94 $^{\circ}$ C30s、55 $^{\circ}$ C30s、72 $^{\circ}$ C40s共30个循环;最后72 $^{\circ}$ C再延伸5min。结束后用1%琼脂糖凝胶电泳检测,并切胶回收目的片段。

[0047] 将得到编码本发明所提供的抗前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体的双酶切基因片段克隆连接到表达载体pET-28a,经测序验证后,得到重组质粒。

[0048] 重组质粒转化到大肠杆菌BL21(Rosseta)中,并挑取单菌落进行诱导表达。将单菌落接种于LB培养基的试管中,37 $^{\circ}$ C振荡培养,过夜活化;次日,按1%的比例转接于新鲜的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、250rpm振荡培养,至OD₆₀₀约为0.6后,加入终浓度为0.1mM的IPTG,37 $^{\circ}$ C、250rpm诱导4h。

[0049] 上述诱导的2mL菌液通过8000rpm离心得到菌体,菌体使用无菌PBS洗涤3次,并用1mL无菌PBS进行重悬菌体,冰上超声破碎菌体直至菌液清亮,在4 $^{\circ}$ C下对细胞裂解液进行离心,离心条件为12000rpm/min,时间为10min,取上清加入5 μ L 5 \times SDS上样缓冲液,沸水煮沸5min,离心后取上清液进行SDS-PAGE电泳分析并采用镍柱对其进行纯化。

[0050] 通过优化诱导表达条件(如宿主菌、表达载体、诱导时间、诱导温度及IPTG浓度等),可以进一步提高目的蛋白(单域重链抗体)的表达量,为大量制备抗前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体提供了途径。

[0051] 实施例5

[0052] 针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体亲和常数的测定

[0053] 将实施例4中表达的单域重链抗体采用生物素化试剂盒进行生物素化标记,其后使用标准的竞争性ELISA技术测定生物素化针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体与实施例1中重组表达的PSMA蛋白亲和能力。具体步骤为:首先采用1nM生物素化的针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体分别与13种不同浓度(0.1nM~100 μ M)的PSMA抗原在EP管中进行30min孵育;其后,将90 μ L混合液加入已使用3%BSA-PBST封闭的、包被有PSMA蛋白的酶标板中,孵育10min后,吸弃反应液,并用PBST清洗;接着,加入100 μ L稀释度为1:2000HRP标记的链霉亲和素,孵育1h后采用PBST清洗5次;TMB工作液的使用和OD₄₅₀的测定同实施例2。采用非线性回归分析得到OD₄₅₀最大值一半时,对应的PSMA浓度,根据抗原-抗体竞争性结合实验的原理得出生物素化的针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体亲和常数为 5×10^{-7} /M左右。

[0054] 实施例6免疫亲和吸附材料的制备

[0055] 1、免疫亲和磁珠的制备

[0056] 采用纳米磁珠作为载体,偶联针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体后,得到针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体免疫磁珠,具体制备方法如下:

[0057] 取1mg羧基修饰的磁珠(购自无锡百运纳米科技有限公司,羧基磁珠300nm)于离心管中,加入500 μ L活化缓冲液(10mM,NaH₂PO₄,pH 6.0),涡旋混合均匀,磁力架回收磁珠,再用活化缓冲液洗涤2遍。分别加入2mg碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),涡旋混合后,静置30min。用偶联缓冲液(10mM,Na₂HPO₄,pH 7.4)洗涤磁珠3遍,加入溶于偶联缓冲液的针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体1mg,室温反应3h,用偶联缓冲液洗涤磁珠3次,加入500 μ L含1%(w/v)牛血清白蛋白(BSA)或1%(w/v)卵清蛋白(OVA)的偶联缓冲液封闭未反应的活性基团,室温反应30min。用偶联缓冲液洗涤磁珠3次,PBS溶液(10mM,pH7.4,0.02%w/v,Na₃N)重悬后保存于4 $^{\circ}$ C。

[0058] 2、针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体免疫亲和吸附材料及亲和柱的制备。采用琼脂糖微球作为载体,偶联前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体,具体制备方法如下:

[0059] 将CNBr活化的干胶用0.1M HCl洗涤10次,每次平衡5min。用偶联缓冲液(10mM,Na₂HPO₄,pH 7.4)洗涤10次,加入针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体(2mg/每克琼脂糖微球),室温反应4h,使针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体与CNBr活化的琼脂糖凝胶微球共价偶联。用偶联缓冲液(10mM,Na₂HPO₄,pH 7.4)洗涤2次后,加入封闭液室温反应2h以封闭未反应的活性基团。用5倍胶体体积的磷酸缓冲液(10mM,pH 7.4)和醋酸缓冲液(0.1M,pH 4.0)交替洗涤3次,得到共价偶联了针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体的免疫亲和吸附材料。取0.2ml上述免疫亲和吸附材料于容量为1ml的层析柱,5~10倍柱床体积的PBS(10mM,pH 7.4)洗涤后,加入20%乙醇溶液,4 $^{\circ}$ C保存。

[0060] 3、针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体免疫亲和吸附材料及亲和柱的制备。采用硅胶微球作为载体,偶联抗前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体,具体制备方法如下:

[0061] 取2g硅胶微球用纯水和磷酸缓冲液(PBS,10mM,pH 6.0)交替洗涤5~10次,用10ml PBS缓冲液悬浮硅胶微球,加入5mg针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体,混匀,加入终浓度5mg/ml的碳二亚胺(EDC),迅速混匀,4 $^{\circ}$ C搅拌反应12~24h,得到共价偶联了针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体的免疫亲和吸附材料。取0.2ml上述免疫亲和吸附材料于

容量为1ml的层析柱,5~10倍柱床体积的PBS(10mM,pH 6)洗涤后,加入含0.02%(w/v)Na₃N的PBS(10mM,pH 6),4℃保存。

[0062] 本发明针对前列腺特异性膜抗原的免疫亲和吸附材料配基为单域重链抗体,具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列,该配基可特异性识别前列腺特异性膜抗原。该单域重链抗体容易获得、吸附效率高,可以通过生物学方法大量培养生产配基为单域重链抗体,避免了人工抗体等繁琐生产方法,大大降低了生产成本。具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性,这些特性对于前列腺特异性膜抗原的低成本、可重复使用的纯化及免疫学检测方法有重要的实用价值。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院

<120> 一种能特异结合前列腺特异性膜抗原的纳米抗体

<130> 2015

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 395

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

[0001] atggcccagg tgcagctggt ggagtcgggt ggaggattgg tgcgggccgg ggactctgcg 60

agactcgctt gtcagcctc cgaagcacc ttcaggcggf ataccatggg ctggtccgc 120

caggctccgg ggaaggagcg tgagttgta gcagctatta agtggagtgg tactagcaca 180

tactatcgag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaaccgg 240

gtgtatctgc aatgaacag cctgcaacct gaggacacgg ccgtttatta ctgtgccata 300

ccccacggga tagctggccg cataacggac tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc 360

tcagaacca agacaccaa accacaagcg gccgc 395

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Ala Gly Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Lys Trp Ser Gly Thr Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

[0002] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ile Pro His Gly Ile Ala Gly Arg Ile Thr Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

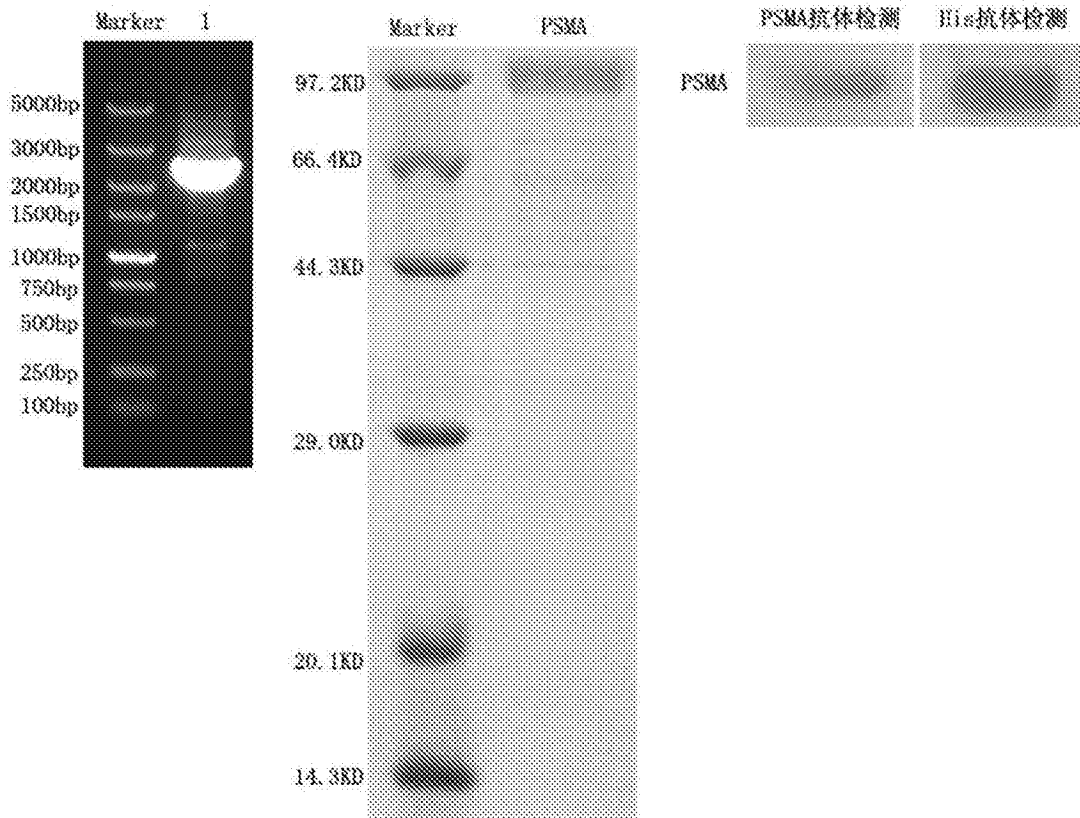


图1

专利名称(译)	一种能特异结合前列腺特异性膜抗原的纳米抗体		
公开(公告)号	CN105524172A	公开(公告)日	2016-04-27
申请号	CN201610074727.3	申请日	2016-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
[标]发明人	郭燕丽 范校周		
发明人	郭燕丽 范校周		
IPC分类号	C07K16/30 C07K14/47 C07K11/14 C12N15/13 G01N33/53 B01J20/24		
CPC分类号	B01J20/24 B01J2220/4856 C07K14/4748 C07K16/3069 C07K2317/622 G01N33/53 G01N2333/47		
其他公开文献	CN105524172B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于基因工程领域，具体为针对前列腺特异性膜抗原的单域重链抗体，其具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，可用于免疫检测、抗原富集纯化等领域。本发明所提供的氨基酸序列可以作为前体，通过随机或定点突变技术进行改造，能够获得性质(亲和性、特异性、稳定性等)更好的突变体，用来发展进一步用于医药、工业、农业的蛋白质或多肽。

	实验组	阳性对照组	空白对照组
包被	PSMA 蛋白	扩增的噬菌体抗体库	PBS
封闭		3%BSA-PBS	
结合		噬菌体	
二抗		辣根过氧化物酶标记的小鼠抗 M13 噬菌体抗体 HRP/anti-M13 (GE 公司)	