

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710046170.3

[51] Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 9 日

[11] 公开号 CN 101157906A

[22] 申请日 2007.9.20

[21] 申请号 200710046170.3

[71] 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 陈金中 田 聆 姚纪花 丁晓明
赵国屏 薛京伦

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司
代理人 陆 飞 盛志范

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

Phi BT1 - TAT - NLS - HIS6 整合酶及其制备方法与应用,其多克隆抗体及其应用

[57] 摘要

本发明属生物技术和基因工程技术领域,具体涉及一种用于定点整合的蛋白酶 Phi BT1 - TAT - NLS - HIS6 整合酶及其制备方法,其多克隆抗体及其应用。首先表达纯化 Phi BT1 - TAT - NLS - HIS6 整合酶蛋白质,该蛋白质保持 PhiBT1 整合酶的基本特性,但是其可以通过蛋白转导进入高等生物细胞,并增加蛋白向细胞核转移的能力,同时适用于细胞外体系以及活细胞体系中介导特异性附加在 attP 与 attB 上的 DNA 分子之间的交换与转移等基因操作。用 Phi BT1 - TAT - NLS - HIS6 整合酶蛋白质直接与佐剂相混合,注射免疫动物,制得 Phi BT1 整合酶多克隆抗体。该抗体可以用于特异性识别 Phi BT1 整合酶蛋白质。

1.一种表达重组 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白的方法，其特征在于具体步骤：

使用大肠杆菌表达 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白并用 NTA 树脂纯化 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白，利用基于 PCR 引物末端修饰的技术，通过多轮 PCR 操作在 Phi BT1 整合酶表达框架 3'附加表达编码-TAT -NLS -HIS6 的序列，从而形成 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶标大框架，将其克隆到原核表达载体 pET22b(+)上，经测序鉴定正确后，转化到 BL21 菌株中，进行大量诱导表达和纯化；条件为：诱导温度 15-25°C，时间 12-24 小时，采用含咪唑的高盐缓冲液梯度洗脱收集纯化蛋白。

2、一种重组 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白，由权利要求 1 所述方法表达。

3、一种如权利要求 2 所述重组 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白的应用，其特征在于该项蛋白在体外用于介导两个含有 Phi BT1 特异性的分子之间的 DNA 片段之间的互换，实现体外常规基因操作；或者 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白与含有 Phi BT1 特异性 att 序列的基因片段共同转染细胞，并且介导该外源基因整合到宿主染色体 DNA。

4、一种 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白多克隆抗体，由下述方法获得：

利用原核表达的噬菌体 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白，与福氏佐剂混合免疫新西兰大白兔，第一次 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白与完全福氏佐剂混合免疫,然后每 1-2 周用 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白与不完全福氏佐剂强化免疫,最后常规放血植被血清,该血清为用蛋白 A-Sepharose 从抗体阳性的家兔血清中分离总 IgG 即为制备的抗 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶的多克隆抗体。

5、如权利要求 4 所述的多克隆抗体在特异性识别 Phi BT1 整合酶蛋白质的应用。

Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶及其制备方法与应用，其多克隆抗体及其应用

技术领域

本发明属生物技术和基因治疗技术领域，具体涉及一种用于定点整合的蛋白酶 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶及其制备方法和应用，其多克隆抗体及其应用。

背景技术

噬菌体 Phi BT1 整合酶作为丝氨酸重组酶家族的一员，具有在生物体外和体内识别特异性核酸序列，进行不可逆的 DNA 重组反应的能力。

在哺乳动物细胞中，噬菌体 Phi BT1 整合酶可将外源核苷酸序列定点整合到基因组的特异性位点上，近年来已成为在哺乳动物细胞中进行转基因位点特异性重组操作和基因治疗的有用工具。

在生物体外的基因操作中，噬菌体 Phi BT1 整合酶可以将带有特定核酸序列(attB, attP) 的大片段核酸分子，进行分子间和分子内的重组，构建出新的核酸分子，从而成为 DNA 重组的工具。

本发明以原核表达系统表达纯化了毫克级的 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶，在体内外建立了应用重组 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶的方法。并以纯化的 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白为抗原，制备了动物抗 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶的多克隆抗体，抗体特异性检测证明其可以特异性识别 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶，可以用于检测 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白和封闭 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶的作用。

发明内容

本发明的目的在于提供一种 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白的功能性表达和多克隆抗体制备方法与应用。

1. 本发明提出的表达重组 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白的方法如下：

使用大肠杆菌表达 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白并用 NTA 树脂纯化 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白。利用基于 PCR 引物末端修饰的技术，通过多轮 PCR 操作在 Phi BT1 整合酶表达框架 3'附加表达编码-TAT -NLS -HIS6 的序列，从而形成 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶标大框架，将其克隆到原核表达载体 pET22b(+) (Novagen, USA) 上，经测序鉴定正确后，转化到 BL21(DE3)菌株(Promega, USA)中，进行大量诱导表达和纯化。为保证其活性，探索到条件为：低温诱导（15-25⁰C，12-24 小时），采用含咪唑的高盐缓冲液（0.5-2 M NaCl）梯度洗脱收集纯化蛋白。

2. 表达纯化 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白的应用

Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白应用: Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白在体外可以用于介导两个含有 Phi BT1 特异性的分子之间的 DNA 片段之间的互换, 实现体外常规基因操作; Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白可以与含有 Phi BT1 特异性 att 序列的基因片段共同转染细胞, 并且可以介导该外源基因整合到宿主染色体 DNA。

3. 制备 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白多克隆抗体及抗体应用

利用原核表达的噬菌体 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白, 按常规方法与福氏佐剂(Sigma)混合免疫新西兰大白兔, 第一次 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白与完全福氏佐剂(Sigma)混合免疫, 然后每 1-2 周用 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白与不完全福氏佐剂(Sigma)强化免疫, 最后常规放血植被血清, 该血清为用蛋白 A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB) 从抗体阳性的家兔血清中分离总 IgG 即为制备的抗 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶的多克隆抗体, 此抗体可以特异性识别真核与原核表达的 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶。并能够在免疫组织化学方面定位 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶蛋白及封闭 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 整合酶的作用。

附图说明

图 1 表达纯化 Phi BT1-TAT-NLS-His6。

图片上方序号为泳道, 右侧数值为分子量。1: 阴性对照; 2: 表达 Phi BT1-TAT-NLS-His6 细菌全菌裂解液; 3: 表达 Phi BT1-TAT-NLS-His6 细菌裂解液可溶部分; 4: 洗柱液, 第一次; 5: 洗柱液, 第二次; 6, 7: 含纯化 Phi BT1-TAT-NLS-His6 的洗脱液; 8: 低分子量蛋白标准品。

图 2 制备 Phi BT1 多克隆抗体的滴度与特异性

A: 连续稀释滴定 Phi BT1 多克隆抗体的滴度; B: 用 Phi BT1 多克隆抗体检测表达 Phi BT1-TAT-NLS-His6 细菌全菌裂解液 western blots。

图 3 Phi BT1 多克隆抗体检测 Phi BT1 细胞内定位

1: 表达 Phi BT1 的细胞用 DAPI 染色; 2: 同一视野用 Phi BT1 多克隆抗体-罗丹名染色。

具体实施方式

1. 构建表达 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 的质粒:

(1) 使用附加 Nde I 位点 Phi BT1 整合酶基因特异性 5'引物 (SEQ N₀₁) 和附加 TAT 编码序列的 phiBT1 整合酶基因特异性 3'引物 (SEQ N₀₂), 采用常规 PCR 方法 (分子克隆) 从 Phi BT1 基因组中扩增产生含 3'附加 TAT 编码序列的 Phi BT1 整合酶阅读框。PCR 体系

(引物 (SEQ №1;SEQ №2), Pfu DNA polymerase 1u(1ul, Sagon), Pfu DNA polymerase buffer 5ul (Sagon), Phi BT 基因组 DNA 1ul, H₂O 39ul), PCR 循环(94℃ 1min, 94℃ 30sec-55℃ 30sec-72℃ 1min 循环 25 次, 72℃ 5min)。常规纯化 PCR 产物(Qiagen PCR purification kit)。采用 Qiagen PCR extract kit 纯化(反应物加 PB Buffer (Qiagen) 500ul 并混匀, 混合物加到 PCR extract column (Qiagen) 1200rpm 离心 1min, 用 0.5ml PE buffer (Qiagen) 1200rpm 离心 1min 清洗一次, 再 1200rpm 离心 1min 一次, PCR extract column 加 50ul Elute buffer (Qiagen), 1200rpm 离心 1min 洗脱)收集产物。

(2) 使用附加 Nde I 位点 phiBT1 整合酶基因特异性 5'引物 (SEQ №1) 和附加部分 NLS 编码序列, TAT 特异性 3'引物 (SEQ №3), 以 (1) 纯化的 PCR 产物为模板, 常规 PCR, 条件同上 (1), 扩增产生编码 C 端附加 TAT 和部分 NLS 序列的 Phi BT1 整合酶阅读框, 如 (1) 所描述的常规方法纯化 PCR 产物 (Qiagen PCR purification kit)。

(3) 使用附加 Nde I 位点 Phi BT1 整合酶基因特异性 5'引物 (SEQ №1) 和附加其余部分 NLS 和 His6 表达标签和 Xho I 酶切位点的 NLS 特异性引物 (SEQ №4), 以 (2) 纯化 PCR 产物为模板, 常规 PCR 扩增产生编码 C 端附加 TAT - NLS -HIS6 序列的 Phi BT1 整合酶阅读框, 如 (1) 所描述的常规方法纯化 PCR 产物 (Qiagen PCR purification kit)。

(4) 按分子克隆描述的常规方法, pET22b 和 (3) 纯化 PCR 产物分别常规用 Nde I 和 Xho I 双酶切。酶切体系: PCR 纯化产物 44ul 或 pET22b 44ul (1ug), Nde I 5u (Bio lab. 1ul), Xho I 5 u (Bio lab.), 10X buffer II 5ul(Bio lab.), 37℃ 12h。采用切胶回收试剂(Qiagen gel extraction kit)回收, 1%agarose gel 电泳分离酶切片段, 目的片段切胶后用 buffer QG 55℃ 溶解 10min, 混合物加到 PCR extract column (Qiagen) 1200rpm 离心 1min, 用 0.5ml PE buffer (Qiagen) 1200rpm 离心 1min 清洗一次, 再 1200rpm 离心 1min 一次, extract column 加 50ul Elute buffer (Qiagen), 1200rpm 离心 1min 洗脱收集产物。用 T4 连接酶将表达 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 的框架插入 pET22b (连接体系: 连接: pET22b 质粒骨架 4ul, 表达 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 的框架片段 4ul, T4 ligase 1ul (Bio Lab.), 10X T4 ligase buffer 1ul, 16℃, 12h)。常规转化细菌感受态细胞, 鉴定阳性克隆, 抽提质粒以及重组质粒测序验证。连接产物用分子克隆所提供的常规方法转化 DH5 alpha 感受态细胞, 筛选阳性 (抗氨苄青霉素) 克隆 10 个, 使用分子克隆所描述的常规方法抽提相应的质粒。质粒测序鉴定: 采用序列 pET22 通用引物作为引物对上述质粒在 ABI3700 上测序分析, 所得序列结果常规作 Blastn 分析确定插入序列。

2. 表达纯化 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白及应用

(1) 表达纯化 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白: pET-22b-ΦC31 常规转化 *E coli* BL21

(DE3)。单个克隆接种到含氨苄青霉素 (25ug/ml) 的 LB 培养基, 250rpm, 37℃培养到 $OD_{600}=0.8$, 加 0.1 mM IPTG 在 250 rpm 低温 (如 15-25 °C) 诱导表达 12-24 h。常规离心收集细菌, 重悬于细菌裂解缓冲液 (20 mM Tris-Cl, pH 8, 1 M NaCl, 20 mM imidazole), 超声波破菌, 12,000 g 离心 40 min, 收集上清液, 上清液通过 0.25um 滤膜后加到 Ni-NTA agarose 亲和纯化柱, 用细菌裂解缓冲液充分洗涤, 然后用洗脱缓冲液 (20 mM Tris-Cl, pH 8, 0.5-2 M NaCl, 500 mM imidazole) 洗脱, 收集物为 Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白。进一步用超滤方法浓缩到保存缓冲液 (5 mM Tris-Cl, pH 8, 1 M NaCl, 10% glycerol)。-70℃保存。

(2) Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白应用

①Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白体外介导框架互换---在 pBCFX+和 pBCFX-定向插入目的 DNA 片段

5'引物合成: 按常规方法设计基因特异性引物, 在设计的基因特异性引物 5'附加序列 (SEQ №5), 常规合成引物。3'引物合成: 按常规方法设计基因特异性引物, 在设计的基因特异性引物 3'附加序列 (SEQ №6, pBCFX+; SEQ №7, pBCFX-), 常规合成引物。制备插入目的基因片段: 使用上述 1)/2)所描述的引物和适当的模板, DNA 聚合酶以及 PCR 条件常规扩增插入片段, 采用 Qiagen PCR extract kit 纯化。框架交换: 维持 pBCFX+或 pBCFX-与插入片段的分子数约 1:1, 每种分子质量不少于 100ng, 在 50 ul 整合酶反应物 (50 mM glycine-NaOH, pH 8.5, 100 mM KCl, 10 mM DTT, 0.01 % bovine serum albumin, and 0.1 μM ΦC31 integrase 和 0.1 μM ΦBT1 integrase) 22 °C 作用 30 min -12h。也可以常规用插入片段与 pBCFX+或 pBCFX-以及 ΦC31 integrase 和 ΦBT1 共转染实现框架交换。阳性克隆筛选: 10ul 框架交换产物常规转化 DH5 alpha 感受态细胞, 涂布含 X-gal 和氯霉素的 LB 细菌培养板, 37 °C 生长 12-20h, 常规蓝白筛选阳性克隆。含插入片段的克隆由于丢失 LacZ 而表现为白色克隆, 常规抽提质粒继序列测定确定重组子的正确性。

②Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白介导细胞外源基因染色体整合

在一对基因特异性引物两侧附加恰当的酶切位点, 依据目的和载体质粒的特性在其中一个引物的酶切位点内侧与基因特异性序列之间附加 Phi BT1 特异性 attB 序列 (SEQ №6 或 SEQ №7), 常规限制性酶切, 连接到含哺乳动物表达 NeoR 的质粒 (如: pcDNA3.1 myc-his-, invitrogen), 重组质粒常规转染 HEK 细胞, Phi BT1-TAT -NLS -HIS6 蛋白常规转导 HEK 细胞, 24h 后用 G418 常规筛选 2-3 周。据有稳定表达的细胞为有目的基因染色体插入的细胞, 通过常规质粒拯救试验确定插入的具体位点。

3. 制备 Phi BT1 蛋白多克隆抗体及抗体应用

(1) 制备 Phi BT1 多克隆抗体

多克隆抗体的生产可用纯化的 Phi BT1 蛋白直接注射免疫动物（如家兔，小鼠，大鼠等）的方法得到，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 Phi BT1 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术以及免疫学的试验中，也可以检测活检标本中的 Phi BT1 蛋白和突变修饰的 Phi BT1 蛋白及跟踪其位置和分布。

用 0.1mg 上述 Phi BT1 蛋白加上完全弗氏佐剂免疫家兔，每隔 7-14 天后再用 Phi BT1 蛋白加不完全弗氏佐剂加强免疫四次。采用经 $10\mu\text{g/ml}$ 的 Phi BT1 蛋白包被的滴定板做 ELISA 测定兔血清中抗体的滴度。用蛋白 A-Sepharose 从抗体阳性的家兔血清中分离总 IgG。将多肽结合于溴化氰活化的 Sepharose 4B 柱上，用亲和层析法从总 IgG 中分离抗多肽抗体。ELISA 实验的抗体效价分析表明，抗体达到要求。蛋白免疫印记实验证明多克隆抗体可特异性地与 Phi BT1 结合

(2) Phi BT1 多克隆抗体的应用---检测 Phi BT1 的亚细胞分布特性

对经 Phi BT1 整合酶 DNA、RNA 转染和蛋白转导的哺乳动物细胞，用 PBS 清洗，多聚甲醛固定后，用制备的 Phi BT1 的多克隆抗体包被，罗丹明偶联的抗兔第二抗体作用后，DAPI 染核。标本利用蔡司公司的双光子激光共聚焦显微镜检测细胞图像表明 Phi BT1 多克隆抗体能够用免疫细胞组织化学的方法，很好的定位和跟踪各种途径表达的 Phi BT1 整合酶。

本发明所涉及的序列

SEQ. №1:

5'-ggaattccatatgtcgcccttcacgctccc-3'

SEQ. №2:

5'-aaccttctcttctttagggcgggcgctggcggtttcttgcg-3'

SEQ. №3:

5'-gctggcggtttcttgcgtccgtacagcgccgcaagctcccgtcag-3'

SEQ. №4:

5'-ccgctc**gag**ctagtgggtgggtgggtgaaccttcttcttc-3'

SEQ. №5:

5'-ccgcggtgcgggtgccagggcggtgcccttgggctccccgggcggtactcc-3'

SEQ. №6:

5'-gcccgtgccgtccttgaccagggttttgacgaaagtgatccagatgatccagctccacacccgaacgcgag-3'

SEQ. №7:

5'-gagcgcaagccccacacctgacctagtagacctagtgaagcagttttggaccagttcctgccgtcgccc-3'

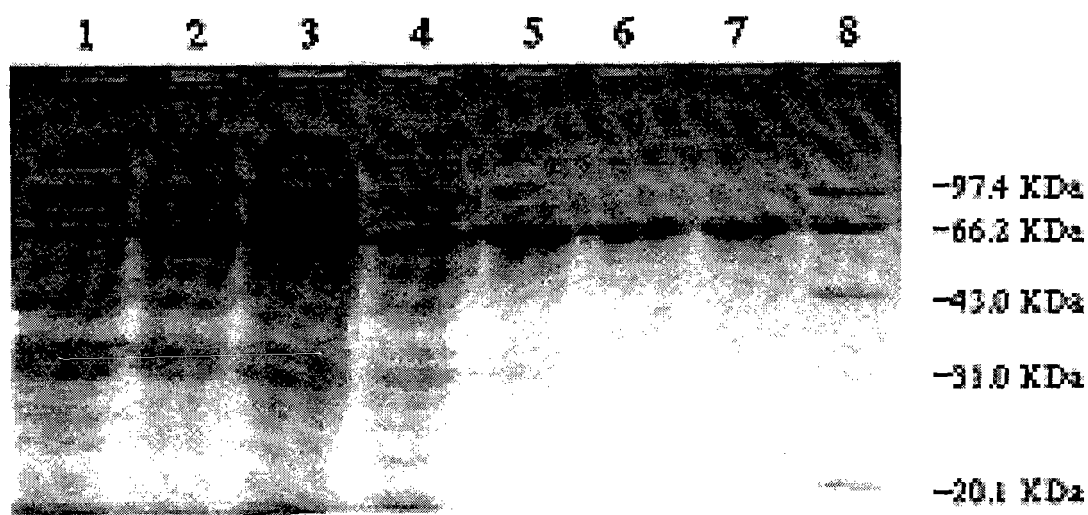


图 1

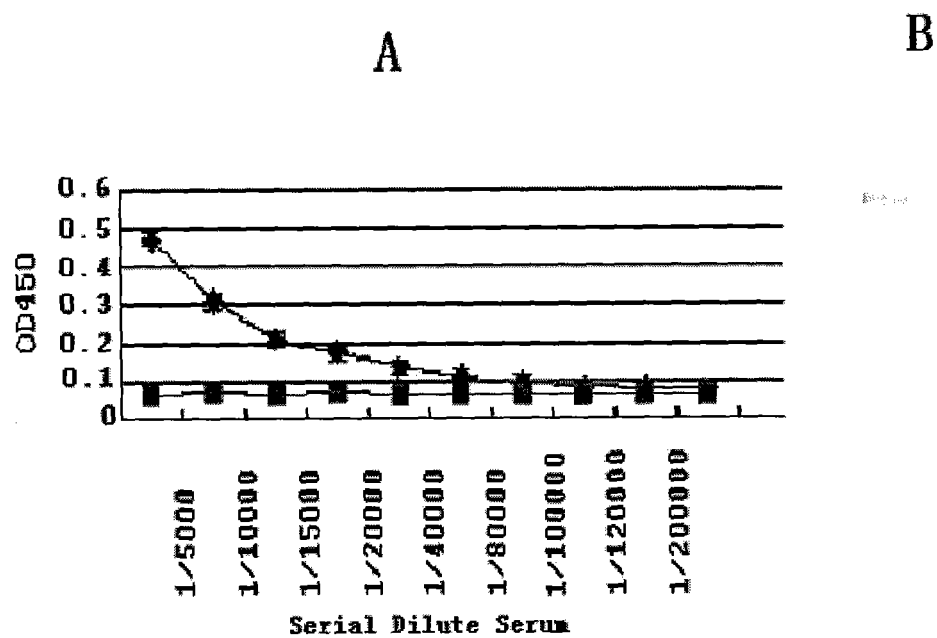


图 2

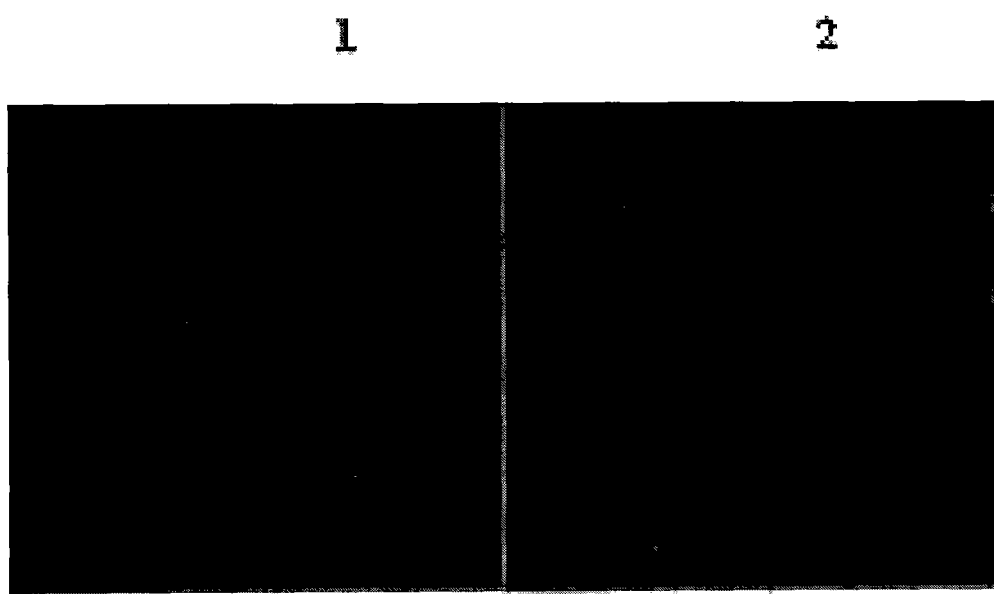


图 3

专利名称(译)	Phi BT1 - TAT - NLS - HIS6整合酶及其制备方法与应用,其多克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN101157906A	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN200710046170.3	申请日	2007-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	陈金中 田聆 姚纪花 丁晓明 赵国屏 薛京伦		
发明人	陈金中 田聆 姚纪花 丁晓明 赵国屏 薛京伦		
IPC分类号	C12N1/21 C12N9/00 C12N15/66 C07K16/40 G01N33/53 G01N33/573		
代理人(译)	陆飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物技术和基因工程技术领域，具体涉及一种用于定点整合的蛋白酶Phi BT1 - TAT - NLS - HIS6整合酶及其制备方法，其多克隆抗体及其应用。首先表达纯化Phi BT1 - TAT - NLS - HIS6整合酶蛋白质，该蛋白质保持PhiBT1整合酶的基本特性，但是其可以通过蛋白转导进入高等生物细胞，并增加蛋白向细胞核转移的能力，同时适用于细胞外体系以及活细胞体系中引导特异性附加在attP与attB上的DNA分子之间的交换与转移等基因操作。用Phi BT1 - TAT - NLS - HIS6整合酶蛋白质直接与佐剂相混合，注射免疫动物，制得Phi BT1整合酶多克隆抗体。该抗体可以用于特异性识别Phi BT1整合酶蛋白质。

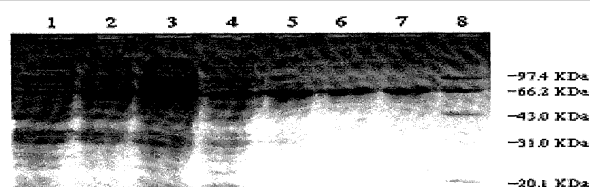


图 1

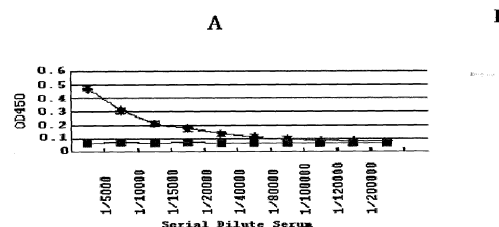


图 2