(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101948545 B
(45)授权公告日 2013.06.19

(21)申请号 201010275380.1
(22)申请日 2010.09.08
(73)专利权人 潍坊医学院
地址 261053 山东省潍坊市宝通西街7166号
(72)发明人 唐金宝 杨洪鸣 梁淑娟 陈永
(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221
代理人 杨琪
(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/81(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)

(56)对比文件
Ashima Kushwaha 等.Construction and characterization of M 13 bacteriophages displaying functional IgG-binding domains of Staphylococcal protein A.《Gene》.1994 Elsevier Science B.V.,1994,第151卷摘要、第45页左栏第1段—第46页左栏第2段.

Ashima Kushwaha 等.Construction and characterization of M 13 bacteriophages displaying functional IgG-binding domains of Staphylococcal protein A.《Gene》.1994 Elsevier Science B.V.,1994,第151卷摘要、第45页左栏第1段—第46页左栏第2段.

朱鹏.SPA-EGFP 融合蛋白在毕赤酵母中的分泌表达及其在免疫诊断中的应用.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑》.2006,(第12期),第二-三章第23-56页.

审查员 朱晓乐

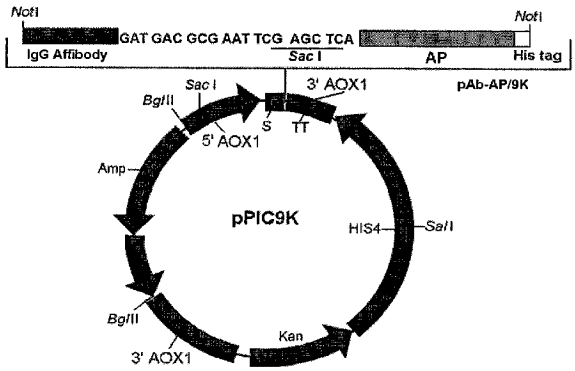
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

IgG 抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白

(57)摘要

本发明公开了一种 IgG 抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白,是 IgG 抗体亲和肽和碱性磷酸酶构成的融合蛋白,能作为替代酶标记抗体用于免疫测定,其一经产生即具有与 IgG 抗体的结合活性和 AP 催化活性,且二者标记比例为 1∶1;该融合蛋白的酶比活力为 386±82U/mg;与兔 IgG 抗体的亲和常数 Ka ≌ $6.7\times10^{7}L\cdot mol^{-1}$。本发明的 IgG 抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白的制备方法如下:(1)将 IgG 抗体亲和肽基因和碱性磷酸酶基因连接,构建重组载体;(2)电转化巴斯德毕赤酵母;(3)经 G418 抗性压力筛选高拷贝表达菌株;(4)培养菌株,诱导表达;(5)提取纯化 IgG 抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白。



CN 101948545 B

1. IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白，其特征在于：是 IgG 抗体亲和肽和碱性磷酸酶构成的融合蛋白，IgG 抗体亲和肽是来自葡萄球菌蛋白 A 的 ZZ 结构域；其一经产生即具有与 IgG 抗体的结合活性和 AP 催化活性，且二者标记比例为 1:1；该融合蛋白的酶比活力为 386±82U/mg；与兔 IgG 抗体的亲和常数 Ka ≌ $6.7\times10^{7}L\cdot mol^{-1}$；是通过以下制备方法得到的：

（1）将 IgG 抗体亲和肽基因和碱性磷酸酶基因连接，然后构建重组载体；

（2）电转化巴斯德毕赤酵母，选取重组载体整合到酵母基因组上的菌株；

（3）经 G418 抗性压力筛选高拷贝表达菌株；

（4）培养菌株，诱导表达 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白；

（5）提取纯化 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白。

2. 权利要求 1 所述的 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白的制备方法，其特征在于，步骤如下：

（1）构建重组载体：首先在分泌型碱性磷酸酶基因上游和下游提供限制性内切酶切割位点 Sac Ⅰ及 Pst Ⅰ，然后通过 PCR 扩增不带 N- 信号肽及 C- 末端扩展肽的碱性磷酸酶基因，将其插入到 IgG 抗体亲和肽下游；然后在 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶基因上游和下游提供限制性内切酶切割位点 Not Ⅰ，通过 PCR 扩增并插入 pPIC9K 的 Not Ⅰ位点，构建毕赤酵母表达载体 pIgG Ab-AP/9k；

（2）电转化，并选取整合成功的菌株：

①挑取巴斯德毕赤酵母单菌落，接种于 5mLYPD 培养基中，30℃，250rpm 培养过夜，得过夜培养物；

②取 100 ～ 500μL 的过夜培养物接种至 500mLYPD 培养基中，30℃，250rpm 培养至 OD_{600} 达到 1.3-1.5，得菌液；

③将菌液于 4℃，3000rpm 离心 5min，然后用 500mL 冰预冷的无菌水重悬菌体；

④按步骤③离心，用 250mL 冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬；

⑤按步骤③离心，用 20mL 冰预冷的 1M 的山梨醇将菌体沉淀重悬；

⑥按步骤③离心，用 1mL 冰预冷的 1M 的山梨醇重悬菌体；将细胞置于冰上；

⑦将 1μg 经 Sal Ⅰ线性化的 pAb-AP/9k 载体 DNA 加入到 80μL 细胞中，将混合物移至预冷的电转杯中；

⑧电转参数：电压 1500V，电容 25μF，电阻 200Ω；Gene Pulser Xcell 电转进行毕赤酵母的电转化，将目的基因导入到毕赤酵母中；

⑨通过组氨酸缺陷型突变的互补筛选转化子：将电转化后的细胞立即涂布到缺少组氨酸的 MD 琼脂平板上，在 30℃孵育 48-72h；

⑩挑取 MD 平板的酵母单菌落，通过菌落 PCR 直接检查载体是否与基因组整合，选取载体与基因组整合的菌落进行下一步操作；

（3）筛选高拷贝表达菌株：将上述⑩验证正确的单菌落，用枪尖点种于含有不同 G418 浓度的 YPD 平板上，30℃培养 2-5 天，出现 G418 抗性克隆；

（4）诱导表达：将通过 G418 压力筛选的高拷贝单菌落，接种于 BMGY 培养基中，30℃，280rpm 培养至 OD_{600} 达到 2 ～ 6；3000g 离心 5min 收集细胞，弃去上清，用 BMMY 培养基重悬细胞，转入 BMMY 培养基中，30℃，280rpm 诱导蛋白表达；每 24h 补加一次甲醇至甲醇浓度为

0.5%，120 小时结束诱导；

（5）提取纯化：

①取诱导后的发酵液，4℃，10000rpm，离心 10min；

②收集上清，并用 0.22μm 滤膜过滤，使用 Millipore 超滤器，4℃，4000rpm，离心 30min 浓缩，得浓缩发酵液；

③将 10mL Ni-NTA 倒入 2.5×10cm 柱中，用 3 个柱床体积的缓冲液 A 在 4℃进行柱平衡；

④将浓缩发酵液上样，用 6 个柱床体积的缓冲液 B 清洗；

⑤用 6 个柱床体积的缓冲液 C 洗脱目的蛋白；

⑥使用 Millipore 超滤器，4℃，4000rpm，离心 30min 浓缩，将浓缩液以 0.01M TBS 稀释，得稀释液；

⑦将稀释液加入 IgG-Sepharose-4B 柱，流速 0.2ml/min，以 0.01M TBS 洗至 OD_{280nm} ＜0.02 为止，然后换用 0.1mol/L pH2.3 甘氨酸－盐酸缓冲液洗脱，流速 0.2ml/min，收集洗脱液；

⑧使用 Millipore 超滤器，4℃，4000rpm，离心 30min 浓缩；

所述缓冲液 A 为 50mM Tris，pH8.0 的溶液，其中，含有 10mM 咪唑及 0.3M 氯化钠；

所述缓冲液 B 为 50mM Tris，pH8.0 的溶液，其中，含有 20mM 咪唑及 0.3M 氯化钠；

所述缓冲液 C 为 50mM Tris，pH8.0 的溶液，其中，含有 250mM 咪唑及 0.3M 氯化钠。

3. 权利要求 1 所述的 IgG 抗体亲和肽－碱性磷酸酶融合蛋白作为酶标记抗体用于免疫测定的应用。

IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及一种能作为酶标记抗体用于免疫测定的 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白，属于生物工程领域。

背景技术

[0002] 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase，AP) 和辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase，HRP) 是酶免疫测定 (enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA) 中较为常用的免疫标记用酶。在 ELISA 中应用，AP 系统的敏感性一般高于应用 HRP 系统，空白值也较低。但由于 AP 较难得到高纯度制剂，稳定性较 HRP 低，价格较 HRP 高，制备酶结合物时得率较 HRP 低等原因，因此国内在 ELISA 中一般均采用 HRP。

[0003] 碱性磷酸酶在免疫测定中作为标记用酶，是通过催化相应底物显色实现的。常用标记用酶的 AP 有两个来源，分别从大肠杆菌和小牛肠膜中提取，牛小肠碱性磷酸酶比活高达 2000U/mg 蛋白，大肠杆菌碱性磷酸酶比活 40-60U/mg 蛋白。大肠杆菌为原核生物而不能对蛋白质进行糖基化。序列分析表明 AP 活性中心 Asp101-Ser102-Ala103 序列高度保守。糖基化可能是影响其活性的重要因素，但并未得到证实。

[0004] 目前，免疫酶标试剂制备方式是采用双功能试剂（如戊二醛，过碘酸盐等）将抗体与酶偶联，按以上方法制备的结合物一般混有未结合的酶和抗体。理论上结合物中混有游离酶不影响 ELISA 中最后的酶活性测定，因经过洗涤，非特异性吸附于固相上的游离酶已被洗去。但游离的抗体则会与酶标抗体竞争相应的固相抗原，因而减低结合到固相上的酶标抗体量，故制备的结合物应予以纯化。因此，传统的抗体与酶的标记方式需要交联、纯化等多步蛋白质操作；而且偶联后往往存在蛋白质活性降低，抗体 - 酶结合物不均一，因而降低了检测的灵敏度。

[0005] 利用基因工程技术生产免疫测定标记用酶，可改变从生物体分离提纯的生产方式，也是得到符合标记要求高纯度酶的一条新途径。而将标记酶直接与抗体融合表达的方式制备，可克服化学交联剂偶联方法的弊端。

[0006] 理论上尽管将碱性磷酸酶与抗体融合表达，但目前研究主要集中在单链抗体 (ScFv) 与 AP 融合蛋白的构建，但是每检测一种抗原就要制备相应的融合抗体，在不能或不便构建抗体 - 酶融合蛋白时则融合标记受阻。因此，寻找一种可结合多种一抗的二抗并与酶以融合表达方式来制备免疫酶标试剂具有重要意义。

[0007] IgG 抗体亲和肽是来自葡萄球菌蛋白 A(staphylococcal protein A，SpA) 的 ZZ 结构域。SpA 为金黄色葡萄球菌细胞壁的单链多肽，分子量为 42kD，能通过疏水作用结合人、兔等多种动物 IgG 的 Fc 段，且这种结合不影响 IgG 的 Fab 段与抗原特异性结合的免疫活性，根据 SpA 这一特性，SpA 不仅用于免疫球蛋白和单克隆抗体的纯化，还被多种标记物 (HRP，AP，FITC，胶体金等）偶联标记用于免疫测定；因 SpA 与 IgG 结合不受种属限制，被称为“广泛二抗”。

发明内容

[0008] 针对上述现有技术，本发明的目的在于提供一种无需再次标记即可用于酶免疫测定的IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白(IgG affibody-Alkaline Phosphatase fusion protein，简写IgG Ab-AP)。

[0009] 本发明是通过以下技术方案实现的：

[0010] 一种IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白，是IgG抗体亲和肽和碱性磷酸酶构成的融合蛋白，其一经产生即具有与IgG抗体的结合活性和AP催化活性，且二者标记比例为1：1；该融合蛋白的酶比活力为386±82U/mg；与兔IgG抗体的亲和常数Ka≌$6.7\times10^{7}L\cdot mol^{-1}$。

[0011] 本发明的IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白的制备方法，步骤如下：

[0012] (1) 将IgG抗体亲和肽基因和碱性磷酸酶基因连接，然后构建重组载体；

[0013] (2) 电转化巴斯德毕赤酵母，选取重组载体整合到酵母基因组上的菌株；

[0014] (3) 经G418抗性压力筛选高拷贝表达菌株；

[0015] (4) 培养菌株，诱导表达IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白；

[0016] (5) 提取纯化IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白。

[0017] 具体如下：

[0018] (1) 构建重组载体：首先在分泌型碱性磷酸酶基因上游和下游提供限制性内切酶切割位点Sac Ⅰ及Pst Ⅰ，然后通过PCR扩增不带N-信号肽及C-末端扩展肽的碱性磷酸酶基因，将其插入到IgG抗体亲和肽下游；然后在IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶基因上游和下游提供限制性内切酶切割位点Not Ⅰ，通过PCR扩增并插入pPIC9K的Not Ⅰ位点，构建毕赤酵母表达载体pIgG Ab-AP/9k；

[0019] (2) 电转化，并选取整合成功的菌株：

[0020] ①挑取巴斯德毕赤酵母单菌落，接种于5mLYPD培养基中，30℃，250rpm培养过夜，得过夜培养物；

[0021] ②取100～500μL的过夜培养物接种至500mLYPD培养基中，30℃，250rpm培养至OD_{600}达到1.3-1.5，得菌液；

[0022] ③将菌液于4℃，3000rpm离心5min，然后用500mL冰预冷的无菌水重悬菌体；

[0023] ④按步骤③离心，用250mL冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬；

[0024] ⑤按步骤③离心，用20mL冰预冷的1M的山梨醇将菌体沉淀重悬；

[0025] ⑥按步骤③离心，用1mL冰预冷的1M的山梨醇重悬菌体；将细胞置于冰上；

[0026] ⑦将1μg经Sal Ⅰ线性化的pAb-AP/9k载体DNA加入到80μL细胞中，将混合物移至预冷的电转杯中；

[0027] ⑧电转参数：电压1500V，电容25μF，电阻200Ω；Gene Pulser Xcell电转进行毕赤酵母的电转化，将目的基因导入到毕赤酵母中；

[0028] ⑨通过组氨酸缺陷型突变的互补筛选转化子：将电转化后的细胞立即涂布到缺少组氨酸的MD琼脂平板上，在30℃孵育48-72h；

[0029] ⑩挑取MD平板的酵母单菌落，通过菌落PCR直接检查载体是否与基因组整合，选取载体与基因组整合的菌落进行下一步操作；

[0030] (3) 筛选高拷贝表达菌株：将上述⑩验证正确的单菌落，用枪尖点种于含有不同

G418 浓度 (1.0mg/mL-4.0mg/mL) 的 YPD 平板上,30℃培养 2-5 天,出现 G418 抗性克隆 ;

[0031] (4) 诱导表达 :将通过G418压力筛选的高拷贝单菌落 (G418浓度4.0mg/mL平板生长的菌落),接种于 BMGY 培养基中,30℃,280rpm 培养至 OD_{600} 达到 2 ～ 6 ;3000g 离心 5min 收集细胞,弃去上清,用 BMMY 培养基重悬细胞,转入 BMMY 培养基中,30℃,280rpm 诱导蛋白表达 ;每 24h 补加一次甲醇至甲醇浓度为 0.5%,120 小时结束诱导 ;

[0032] (5) 提取纯化 :

[0033] ①取诱导后的发酵液,4℃,10000rpm,离心 10min ;

[0034] ②收集上清,并用 0.22μm 滤膜过滤,使用 Millipore 超滤器,4℃,4000rpm,离心 30min 浓缩,得浓缩发酵液 ;

[0035] ③将 10mL Ni-NTA 倒入 2.5×10cm 柱中,用 3 个柱床体积的缓冲液 A 在 4℃进行柱平衡 ;

[0036] ④将浓缩发酵液上样,用 6 个柱床体积的缓冲液 B 清洗 ;

[0037] ⑤用 6 个柱床体积的缓冲液 C 洗脱目的蛋白 ;

[0038] ⑥使用 Millipore 超滤器,4℃,4000rpm,离心 30min 浓缩,将浓缩液以 0.01MTBS 稀释,得稀释液 ;

[0039] ⑦将稀释液加入 IgG-Sepharose-4B 柱,流速 0.2ml/min,以 0.01MTBS 洗至 OD_{280nm} ＜0.02 为止,然后换用 0.1mol/L pH2.3 甘氨酸 - 盐酸缓冲液洗脱,流速 0.2ml/min,收集洗脱液 ;

[0040] ⑧使用 Millipore 超滤器,4℃,4000rpm,离心 30min 浓缩,即得 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白。

[0041] 所述缓冲液 A 为 50mM Tris,pH 8.0 的溶液,其中,含有 10mM 咪唑及 0.3M 氯化钠。

[0042] 所述缓冲液 B 为 50mM Tris,pH 8.0 的溶液,其中,含有 20mM 咪唑及 0.3M 氯化钠。

[0043] 所述缓冲液 C 为 50mM Tris, pH 8.0 的溶液,其中,含有 250mM 咪唑及 0.3M 氯化钠。

[0044] 经上述制备方法得到的 IgG 亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白具有高度均一性,无需体外标记即可用于酶免疫测定 ;在 Dot-ELISA 检测兔 IgG 抗体中,与常规标记的山羊抗兔 IgG-AP 检测效果相当。

[0045] 本发明的 IgG 亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白是利用毕赤酵母表达的,为糖基化产物,其碱性磷酸酶活性高于从大肠杆菌提取的天然碱性磷酸酶。

[0046] 本发明是利用基因工程技术直接将抗体或抗原与酶以融合的方式表达,不但避免了繁琐且低效率的酶与蛋白质的化学交联,而且无需得到纯化的酶和抗体或抗原。

[0047] 本发明将碱性磷酸酶基因与 IgG 亲和肽重组构建 IgG 亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白,并利用巴斯德毕赤酵母分泌表达,该融合蛋白一经产生即具有与 IgG 抗体的结合活性和 AP 催化活性,无需再次标记即可用于酶免疫测定 ;同时, IgG 亲和肽仅与 IgG 的 Fc 段结合,提高了与 IgG 亲和特异性,且无需每检测一种抗原而制备相应的融合抗体。

[0048] 由背景技术可知, SpA 被称为“广泛二抗”,但尽管 SPA 已作为一种“广泛二抗”或“替代二抗”在免疫测定中应用,但 SpA 的 IgG 结合活性来自 E、D、A、B、C 5 个高度同源的 IgG 结合结构域。研究发现,其 IgG 结合结构域不仅与 IgG 的 Fc 段结合,也与某些 IgG 的 Fab 段 (如人 IgG1 的 $F(ab')_2$) 结合。为克服其弊端,以 ZZ 亲和肽结构域代替 SpA 的 5 个

同源 IgG 结合结构域，使 IgG 结合结构域的分子量减小到 14kD，也克服了 SpA 与某些 IgG 的 Fab 段结合的缺点。因此本发明采用仅与 IgG Fc 段结合的 ZZ 结构域 -IgG 抗体亲和肽，避免对 IgG 的 Fab 段与抗原特异性结合的影响。

[0049] 本发明的 IgG 亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白，具有 IgG 亲和肽和碱性磷酸酶的生物学活性，无需体外标记即可用于酶免疫测定，且其活性较常规大肠杆菌提取的碱性磷酸酶更高，本发明具有活性高、使用方便、效果好等优点。

附图说明

[0050] 图 1 为含有融合蛋白基因的表达载体 pIgG Ab-AP/9k 的质粒图；

[0051] 图 2 为 IgG Ab-AP 融合蛋白 - 山羊抗兔 IgG-HRP 百分结合率抑制标准曲线；

[0052] 图 3 为 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白、山羊抗兔 IgG-AP 检测兔 IgG 抗体的对比示意图。

[0053] 本发明中涉及的培养基的配方如下：

[0054] YPD：1% east Extract；2% Peptone；2% Dextrose；2% Agar；

[0055] MD：1.34% YNB；4×10^{-5}% Biotin；2% Dextrose；1.5% Agar；

[0056] BMGY：1% Yeast Extract；2% Peptone；100mM potassium phosphate buffer，pH6.0；1.34% YNB；4×10-5% Biotin；1% glycerol；

[0057] BMMY：1% Yeast Extract；2% Peptone；100mM potassium phosphate buffer，pH6.0；1.34% YNB；4×10^{-5}% Biotin；0.5% methanol。

具体实施方式

[0058] 下面结合实施例对本发明做进一步的说明。

[0059] 实施例 1 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白基因表达载体的构建

[0060] 为将碱性磷酸酶基因与 IgG 亲和肽基因连接，首先在分泌型碱性磷酸酶基因 (secreted alkaline phos-phatase，SEAP，GenBank Accession No：U35316) 上游和下游提供限制性内切酶切割位点 Sac Ⅰ及 Pst Ⅰ，通过 PCR 扩增不带 N- 信号肽及 C- 末端扩展肽的碱性磷酸酶基因 (1467bp)，插入 IgG 亲和肽下游 (pEZZ18 的 Sac Ⅰ及 Pst Ⅰ位点)；第二步在 IgG 亲和肽 -AP 基因上游和下游提供限制性内切酶切割位点 Not Ⅰ，通过 PCR 扩增并插入 pPIC9K 的 Not Ⅰ位点，构建毕赤酵母表达载体 pIgG Ab-AP/9k，如图 1 所示。

[0061] 实施例 2 电转化巴斯德毕赤酵母 GS115

[0062] 为在巴斯德毕赤酵母 GS115 中转化 pAb-AP/9k 并随后整合进基因组中，载体首先用 Sal Ⅰ线性化，使用 Gene Pulser Xcell 电转仪电转化进行：

[0063] 1) 挑取酵母单菌落，接种于 5mLYPD 培养基中，30℃，250rpm 培养过夜；

[0064] 2) 取 100-500μL 的过夜培养物接种至 500mLYPD 培养基中，30℃，250rpm 培养至 OD_{600} 达到 1.3-1.5；

[0065] 3) 将菌液于 4℃，3000rpm 离心 5min，用 500mL 冰预冷的无菌水重悬菌体；

[0066] 4) 按步骤 3 离心，用 250mL 冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬；

[0067] 5) 按步骤 3 离心，用 20mL 冰预冷的 1M 的山梨醇将菌体沉淀重悬；

[0068] 6) 按步骤 3 离心，用 1mL 冰预冷的 1M 的山梨醇重悬菌体；将细胞置于冰上；

[0069] 7) 约 1μg 经 Sal Ⅰ线性化的 pAb-AP/9k 载体 DNA 加入 80μL 细胞，将混合物移至预冷的电转杯中；

[0070] 8) 按照Gene Pulser Xcell 电转仪操作要求，进行毕赤酵母的电转化，将目的基因导入到毕赤酵母中；

[0071] 9) 通过组氨酸缺陷型突变的互补筛选转化子。将细胞立即涂布到缺少组氨酸的 MD 琼脂平板上，在 30℃孵育 48-72h；

[0072] 10) 挑取 MD 平板的酵母单菌落，通过菌落 PCR 直接检查载体是否与基因组整合。

[0073] 实施例 3 高拷贝菌株的筛选及目的蛋白的表达

[0074] 为了获得高拷贝的基因工程菌，使用选择压力进行筛选。将验证正确的单菌落，用枪尖点种于含有不同 G418 浓度的 YPD 平板上。点种时，按照 G418 浓度由低到高顺序点种平板，30℃培养。

[0075] 将通过 G418(4.0mg/mL) 压力筛选的高拷贝单菌落，接种于 25mL BMGY 中，30℃，280rpm 培养至 OD_{600} 达到 2-6。3000g 离心 5min 收集细胞。弃去上清，用 BMMY 培养基重悬细胞，转入 50mL BMMY 中，30℃，280rpm 诱导蛋白表达；. 每 24h 取样 1mL，并补加一次甲醇至甲醇浓度 0.5%，120 小时结束诱导。

[0076] 实施例 4IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白的纯化

[0077] 1) 取诱导一定时间的发酵液，4℃，10000rpm，离心 10min。

[0078] 2) 收集上清，并用 0.22μm 滤膜过滤，使用 Millipore 超滤器（截留分子量为 10kDa)，4℃，4000rpm，离心 30min 浓缩。

[0079] 3) 将 10mL Ni-NTA 倒入 2.5×10cm 柱中，用 3 个柱床体积的缓冲液 A(50mM Tris，pH 8.0；0.3M 氯化钠；10mM 咪唑）在 4℃进行柱平衡。

[0080] 4) 将浓缩发酵液上样，用 6 个柱床体积的缓冲液 (50mM Tris，pH 8.0；20mM 咪唑；0.3M 氯化钠）清洗。

[0081] 5) 用 6 个柱床体积的缓冲液 (50mM Tris，pH 8.0；250mM 咪唑；0.3M 氯化钠）洗脱目的蛋白。

[0082] 6) 使用 Millipore 超滤器（截留分子量为 10kD)，4℃，4000rpm，离心 30min 浓缩，将浓缩液以适当 0.01MTBS 稀释。

[0083] 7) 将步骤 6 溶液加入 IgG-Sepharose-4B 柱，流速 0.2ml/min，以 0.01MTBS 洗至 OD280nm ＜ 0.02 为止，换用 0.1mol/L pH2.3 甘氨酸 - 盐酸缓冲液洗脱，流速 0.2ml/min，收集洗脱液。

[0084] 8) 使用 Millipore 超滤器（截留分子量为 10kDa)，4℃，4000rpm，离心 30min 浓缩，12% SDS-PAGE 检测纯化效果。

[0085] 实施例 5 IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白活性鉴定

[0086] IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白是一双功能蛋白质，具有碱性磷酸酶的催化活性及与 IgG 抗体结合的活性。

[0087] 碱性磷酸酶活性检测原理：

[0088]

$$\text{4-硝基苯磷酸酯} \xrightarrow[H_2O]{\text{IgG Ab-AP}} \text{4-硝基苯酚+Pi}$$

[0089] 360μLpNPP 溶液 (50mM 的 Tris-HCl 中含 2mM 乙酸镁，pNPP 浓度 0.25 ～ 10mM，pH10.0)，加入 IgG Ab-AP 溶液 40μL(BCA 法定量，武汉博士德生物公司)，37℃反应 10min，3.6mL1MNaOH 终止反应，测定 405nm 的吸光度值。

[0090] 酶活力单位：在上述条件下，每分钟催化产生 1μmol/L pNP 所需的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。1mg 酶所含有酶的单位数称为比活力。

[0091] 根据下式计算计算活力单位

[0092] $U = M \times A^{-1} \times \varepsilon \times b$

[0093] 其中，M = IgG Ab-AP 融合蛋白质量；A = 405nm 吸光度；$\varepsilon = 18700[L \times mol^{-1} \times cm^{-1}]$；b = 1cm 经测定，IgG Ab-AP 融合蛋白的碱性磷酸酶比活力为 386±82U/mg 蛋白，比活力高于市售大肠杆菌提取天然碱性磷酸酶。

[0094] 与兔 IgG 抗体亲和活性测定：

[0095] 1) 兔 IgG 抗体用包被稀释液稀释后 (100ng/mL) 包被酶标板，每孔 100μL，4℃温育过夜，TBST(含 0.5% Tween-20 的 0.01M TBS 溶液，pH8.0)×5min×3 次；

[0096] 2) 每孔加入封闭液 200μL，于 37℃封闭 1h，TBST×5min×3 次；

[0097] 3 将纯化的 IgG Ab-AP 融合蛋白以适当梯度稀释后，与山羊抗兔 IgG-HRP(1 ∶ 5000) 按体积比 1 ∶ 1 混匀；每孔加入上述混合液 100μL，于 37℃反应结合 1h，TBST×5min×3 次；

[0098] 4) 每孔加入 TMB 底物液 100μL，37℃避光显色，当对照孔出现明显颜色反应时，每孔加入终止液 50μL，于 20min 内测定 450/630nm；

[0099] 5) 以未包被兔 IgG 抗体的孔为空白值，以只加山羊抗兔 IgG-HRP 孔的 $A_{450/620}$ 值为 B_0 值，加入不同浓度的 IgG Ab-AP 融合蛋白与山羊抗兔 IgG-HRP 混合液的 $A_{450/620}$ 值为 B 值。以 IgG Ab-AP 融合蛋白的浓度负对数 (-LogC) 为横坐标，以山羊抗兔 IgG-HRP 百分结合率 (B/B_0%) 为纵坐标，绘制抑制标准曲线，如图 2 所示。当山羊抗兔 IgG-HRP 百分结合率为 50%时所对应的 IgG Ab-AP 融合蛋白浓度倒数，即为 IgG Ab-AP 融合蛋白与兔 IgG 抗体的亲和常数。

[0100] 经测定，IgG Ab-AP 融合蛋白与兔 IgG 抗体的亲和常数 $Ka \cong 6.7 \times 10^7 L \cdot mol^{-1}$。

[0101] 实施例 6IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白在 Dot-ELISA 应用

[0102] 1) 取 NC 膜用铅笔作好加样方格 (5mm×5mm) 并作好相应标记；

[0103] 2) 将膜浸入 0.01mol/L pH7.4 的 TBS 中 15 ～ 30min，取出用滤纸吸干；

[0104] 3) 将要包被的抗体（兔 IgG 抗体）包被稀释液稀释至工作浓度；

[0105] 4) 加样 0.5μL 于相应格内，室温自然干燥后，将 NC 膜片放入封闭液中振荡封闭 30min；

[0106] 5) 将膜片放入洗涤液中振荡洗涤 3 次，每次 30min；

[0107] 6) 用滤纸吸干，将膜片放入酶标记抗体溶液（山羊抗兔 IgG-AP，1 ∶ 2000) 或 IgG Ab-AP 溶液中，室温振荡 30min；

[0108] 7) 将膜片放入洗涤液中振荡洗涤 4 次，每次 30min；

[0109] 8) 将膜片浸入 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色溶液中，在振荡条件下充分显色，用流水冲洗数分钟，放入蒸馏水中终止反应。

[0110] 如图 3 所示，IgG 抗体亲和肽 - 碱性磷酸酶融合蛋白与山羊抗兔 IgG-AP 检测效果

相当。

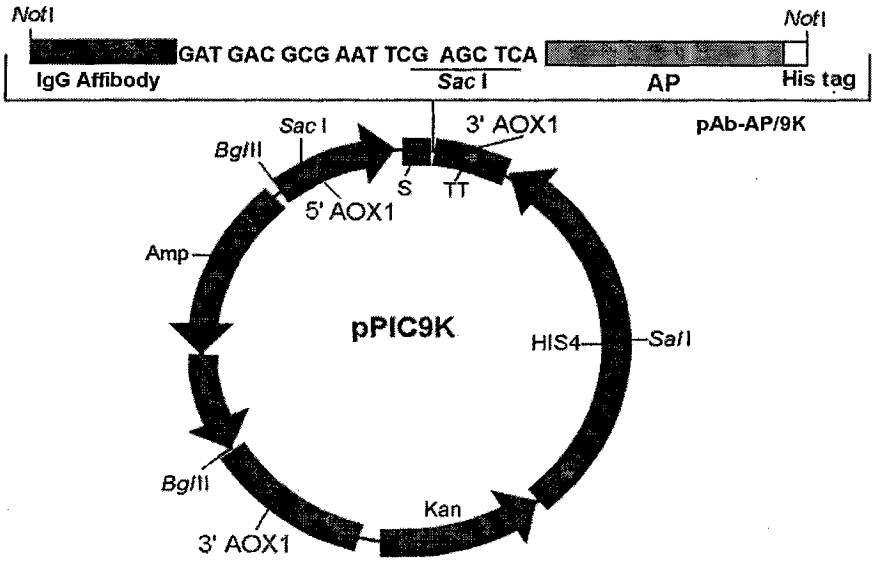

NotI
NotI
GAT GAC GCG AAT TCG AGC TCA
IgG Affibody
Sac I
AP
His tag
pAb-AP/9K
Sac I
3' AOX1
BglII
S
TT
5' AOX1
Amp
pPIC9K
HIS4
SalI
BglII
Kan
3' AOX1

图 1

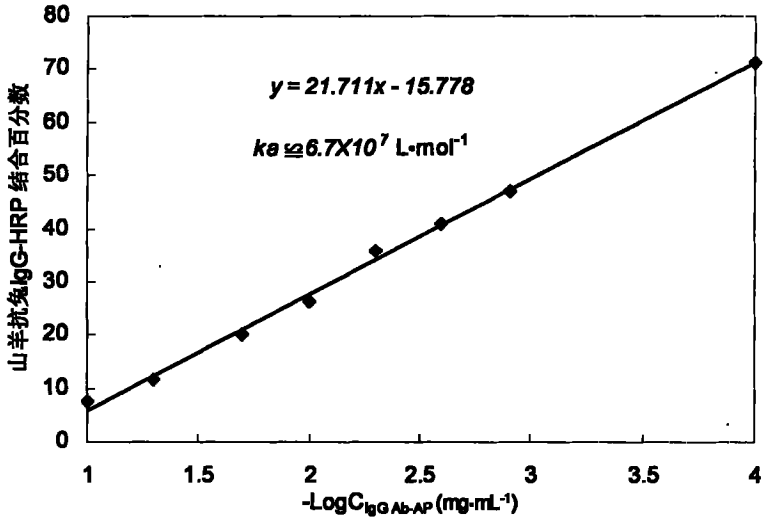

y = 21.711x - 15.778
ka ≥ 6.7X10^7 L·mol^-1
山羊抗兔IgG-HRP 结合百分数
-LogC IgG Ab-AP (mg·mL^-1)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4

图 2

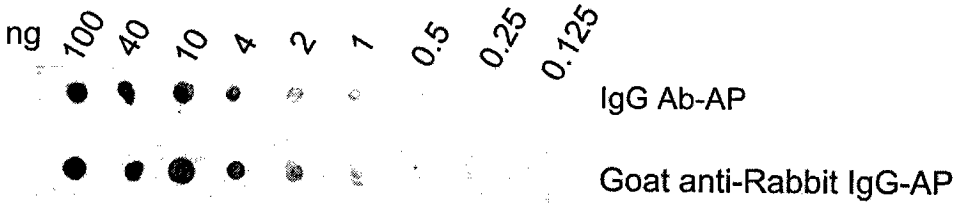
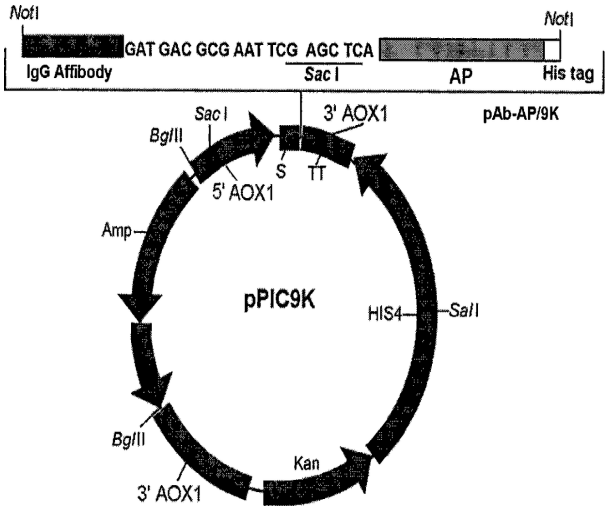

ng
100
40
10
4
2
1
0.5
0.25
0.125
IgG Ab-AP
Goat anti-Rabbit IgG-AP

图 3

专利名称(译)	IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白		
公开(公告)号	CN101948545B	公开(公告)日	2013-06-19
申请号	CN201010275380.1	申请日	2010-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
当前申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
[标]发明人	唐金宝 杨洪鸣 梁淑娟 陈永		
发明人	唐金宝 杨洪鸣 梁淑娟 陈永		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/62 C12N15/81 G01N33/535		
代理人(译)	杨琪		
审查员(译)	朱晓乐		
其他公开文献	CN101948545A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白，是IgG抗体亲和肽和碱性磷酸酶构成的融合蛋白，能作为替代酶标记抗体用于免疫测定，其一经产生即具有与IgG抗体的结合活性和AP催化活性，且二者标记比例为1:1；该融合蛋白的酶比活力为386±82U/mg；与兔IgG抗体的亲和常数Ka≅6.7×107L·mol-1。本发明的IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白的制备方法如下：(1)将IgG抗体亲和肽基因和碱性磷酸酶基因连接，构建重组载体；(2)电转化巴斯德毕赤酵母；(3)经G418抗性压力筛选高拷贝表达菌株；(4)培养菌株，诱导表达；(5)提取纯化IgG抗体亲和肽-碱性磷酸酶融合蛋白。