



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102364342 A

(43) 申请公布日 2012.02.29

(21) 申请号 201110223453.7

(22) 申请日 2011.08.05

(71) 申请人 北京康为世纪生物科技有限公司
地址 100085 北京市海淀区上地东路1号院
1号楼盈创动力A座602A

(72) 发明人 高建恩 奇日迈励图 王春香

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种重组蛋白表达的快速检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种快速检测重组蛋白表达的方法。该方法利用免疫胶体金技术可以方便快捷地检测样本中是否存在重组蛋白。本发明可应用于生物医药相关科研中重组蛋白的表达实验,亦可应用于生物制药企业在重组蛋白药物的发酵生产过程中对重组蛋白表达水平的频繁检测与快速半定量评估。在这些应用中,本发明方法可部分取代常规的 SDS 凝胶电泳和免疫印记检测,显著简化了检测程序,缩短了检测时间并降低了检测成本。

1. 一种利用免疫胶体金技术鉴定样本中是否存在重组标签融合蛋白,并可对重组标签融合蛋白进行半定量检测的方法。包括实现上述目标的具体方法:标签蛋白单克隆抗体的纯化,胶体金试剂与试纸条的制备,具体的检测方法及检测结果的判定方法。

2. 根据权利要求1的方法,可利用此方法检测的融合蛋白标签包括但不限于常用标签,如,GST 标签、His 标签、c-myc 标签、V5 标签、HA 标签、Trx 标签、GFP 标签,及 FLAG 标签等。

3. 根据权利要求1的方法,当使用针对重组表达蛋白自身成份的特异性抗体时,可利用此方法检测不含标签的重组蛋白表达情况,包括但不限于在真核重组表达体系和原核表达体系中表达的重组蛋白。

4. 根据权利要求1、2、3的方法,在生物医药相关研发中对重组蛋白表达进行检测的应用。

5. 根据权利要求1、2、3的方法,在重组蛋白药物的发酵生产过程中对重组蛋白表达水平的检测与半定量评估及其它应用。

6. 根据权利要求1、2、3的方法在包括但不限于制药、兽医、兽药、食品、饲料、生化与分子生物学试剂等行业的商业和生产领域的应用。

一种重组蛋白表达的快速检测方法

一技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫胶体金偶联单克隆抗体的方法及应用,提供了一种应用于基因重组蛋白表达的快速检测方法,该方法利用针对重组表达蛋白中特定抗原表位(可以是标签或非标签成份)的特异抗体,可以简便/快速地判别生物标本中是否存在所表达的靶标蛋白,整个检测过程不超过 30 分钟。

二背景技术

[0002] 基因的重组表达,已经成为生命科学技术中的一种常用手段,被应用于生命科学研究和生产的各个领域,如蛋白质的功能研究、生物医药研究、药物的生产等等。在基因的重组表达中为了方便外源基因表达的检测,大多数蛋白是以融合蛋白的形式进行表达,也就是在欲表达蛋白的氨基端或羧基端加入一些具有抗原表位性质的多肽序列,即表达标签,通过使用标签特异性抗体对表达样品进行检测,即可确定外源基因是否表达。常用的表达标签有:GST 标签、His 标签、c-myc 标签、V5 标签、HA 标签、Trx 标签、GFP 标签及 FLAG 标签等等。这些常用的标签中有些还可以用来对表达蛋白进行纯化如 GST 标签和 His 标签就可以分别用谷胱甘肽和镍偶联的凝胶对表达蛋白进行亲和纯化。

[0003] 在基因重组表达的研究和生产中,检测目的基因是否在宿主(细菌、真菌、细胞、组织、器官)中表达是至关重要的。常用的检测方法有:对于表达量较高的原核表达系统来说,可以使用常规的 SDS-PAGE 进行检测,与未诱导或无插入片段的菌相比较,有明显的新的条带出现,即初步认为有目的基因的表达。对于表达量较低的原核表达载体和真核表达系统,SDS-PAGE 染色后很难见到明显的表达条带,因此需要对样品通过灵敏度更高的免疫印迹(Western Blot)方法进行检测,以确定目的基因是否表达。

[0004] 免疫胶体金技术自上个世纪 70 年代发明以来,已经广泛应用于生物医学领域。与传统的免疫临床诊断试剂相比,免疫胶体金试剂具有简便、快速、不依赖任何仪器的特点。免疫胶体金试剂的原理是通过将纳米金颗粒标记在特定的抗原和抗体上,当被标记的抗体或抗原与固相化的相应的抗原或抗体发生反应后,造成被标记的抗体或抗原在局部区域的聚集,从而产生肉眼可见的红色条带。与传统的 SDS-PAGE 和 Western Blot 相比较,免疫胶体金技术具有简便、快速、不依赖任何仪器等特点:简便,样品处理方案简便,不需要电泳等过程;快速,Western Blot 需要 2 天时间才能检测完成,SDS-PAGE 也需要 4—5 小时,而本发明采用的免疫胶体金技术全过程不超过 30 分钟;不依赖任何仪器,SDS-PAGE 需要电泳仪及相应的缓冲体系,Western Blot 则需要的仪器试剂更多,免疫胶体金技术则不需要任何仪器,仅需要的简单缓冲体系即可。因此,本发明非常适合重组融合蛋白的快速检测,为科研研究、蛋白表达生产等节省了大量时间。

三发明内容

[0005] 本发明的目的是要提供一种利用特异性抗体和胶体金技术,简便快速地检测基因重组蛋白表达的方法以及由此方法所产生的用于实现这一目的的相关试剂。基因的重组表

达可以是天然蛋白表达,也可以是带有标签的融合蛋白。当使用针对重组表达蛋白自身成份的特异性抗体时,本发明所用的方法与根据这些方法制备的试剂可以且只可以用于该种重组蛋白表达的检测。当使用针对重组融合表达蛋白中标签成份的特异性抗体时,本发明所用的方法与根据这些方法制备的试剂可以作为一种普适性的检测产品,用于检测带有该标签的任意融合蛋白的表达。在本发明方法中所适用的重组融合蛋白标签包括但不限于1) 在原核系统和真核系统中表达的带有 His 标签的融合表达蛋白;2) 在原核系统和真核系统中表达的带有 GST 标签的融合表达蛋白;3) 在原核系统和真核系统中表达的带有 TRX 标签的融合表达蛋白;4) 在原核系统和真核系统中表达的带有 V5 标签的融合表达蛋白;5) 在原核系统和真核系统中表达的带有 c-myc 标签的融合表达蛋白;6) 在原核系统和真核系统中表达的带有 HA 标签的融合表达蛋白,7) 在原核系统和真核系统中表达的带有 GFP 标签的融合表达蛋白 8) 在原核系统和真核系统中表达的带有 FLAG 标签的融合表达蛋白。本发明提供了实现上述目标的具体方法,包括:1) 特异性重组蛋白抗体(针对重组蛋白中的标签或非标签成份)的选择及纯化;2) 纳米金颗粒的制备方法;3) 以纳米金颗粒标记抗体的方法;4) 免疫胶体金快速检测试纸条的制备及组装方法;5) 使用免疫胶体金快速检测试纸条检测重组蛋白的方法;6) 发明相关参数的检测方法

[0006] 本发明所涉及的旨在简化重组标签融合蛋白表达检测步骤,缩短检测时间,提高检测效率的方法,主要包括以下步骤:1) 特异性重组蛋白抗体(针对重组蛋白中的标签或非标签成份)的选择与纯化,根据欲检测的重组蛋白的不同选用特异性识别所需检测的重组蛋白的抗体,该抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体。所选择的抗体需进行纯化,纯化的方法可以选择目前使用的常规的抗体纯化方法,包括但不限于:辛酸-硫酸铵沉淀法、Protein A 或 Protein G 亲和纯化法,以及抗原亲和纯化法等。2) 纳米金标记的抗体的制备,通过还原法制备一定直径的纳米金胶体溶液。本发明中所用的胶体金颗粒的直径为 20nm,在现有的方法的基础上稍加改动可以制备直径范围在 10-200nm 之间的胶体金颗粒。然后用此胶体金溶液对纯化后的抗体进行标记,标记后的抗体经过纯化后用于免疫胶体金试纸条的制备。3) 免疫胶体金快速检测试纸条的制备及组装方法。4) 使用免疫胶体金快速检测试纸条检测重组蛋白的方法。

[0007] 重组蛋白的表达是当前生物与医药科研相关领域广泛应用的实验技术。本发明利用免疫胶体金技术对包括但不限于原核和真核生物中表达的重组蛋白进行简便快速地检测,部分取代常规的 SDS 凝胶电泳和免疫印记检测,显著地提高了工作效率。在生物制药领域,在重组蛋白药物的发酵生产过程中需频繁检测重组蛋白的表达水平以相应地调节技术参数、确定发酵终点。本发明方法可以半定量方式对重组蛋白的表达水平进行快速评估,简化了检测程序,缩短了检测时间并降低了检测成本。

四. 附图说明

[0008] 附图 1 胶体金溶液质量检测

[0009] 附图 2 胶体金最适 pH 条件摸索

[0010] 附图 3 胶体金最适 pH 条件确认

[0011] 附图 4 胶体金最佳抗体标记浓度确认

[0012] 附图 5 胶体金交叉反应检测。只有当样品中含有 His 标签融合蛋白时 T 线消失。

当样品中无重组蛋白,或重组蛋白不含有 His 标签时 T 线出现。C 线在各样本检测中均出现,提示检测试剂工作正常,检测结果有效。

[0013] 附图 6 胶体金灵敏度检测。当样品中 His 标签融合蛋白含量大于或等于 $1\mu\text{g/ml}$ 时 T 线消失。当样品中 His 标签融合蛋白含量小于或等于 100ng/ml 时 T 线出现。C 线在各样本检测中均出现,提示检测试剂工作正常,检测结果有效。

五. 具体实施方式

[0014] 以下以重组 His 标签融合蛋白快速检测试纸的制备与检测实验为例,描述本发明方法的实施过程和实际可应用性。这些实施例并不以任何方式限制本发明待批权利要求的范围。实施例 1. 抗 His 标签单克隆抗体的纯化:

[0015] 单克隆抗体纯化所需试剂:a)Protein G 偶联的 Sepharose 凝胶(GE 公司产品),b)磷酸盐缓冲液(PBS): 20mM sodium phosphate, 0.15M NaCl, pH 7.2, c)洗脱液:Glycin-HCl(pH 2.7)

[0016] 小鼠抗 His 标签的单克隆抗体由北京康为试剂生物科技有限公司通过常规细胞融合技术制备完成,抗 His 标签的单克隆抗体经 Protein G 亲和纯化的方法从小鼠腹水中获得。取 10ml 腹水,用 PBS(pH7.2)稀释 1 倍后,加入装有 2ml Protein G 偶联的 Sepharose 凝胶,控制流速 0.2ml/min ,上样完成后用平衡缓冲液 PBS 冲洗亲和柱至流出液的 OD 280 监测值回到基线水平后,用 pH2.7 的 Glycin-HCL 洗脱抗体,洗脱后的溶液立即用 1M Tris 中和。提纯后的抗体经 SDS-PAGE 检测其纯度,并用 ELISA 法测定其抗体活性。

[0017] 实施例 2. 纳米金胶体溶液的制备:

[0018] 采用柠檬酸三钠还原法并简述如下:取硅化过的三角瓶,加入 100mL 去离子水及 $1\text{mL}1\%$ 氯金酸,加热沸腾;迅速加入 4mL 的 1% 柠檬酸三钠,此时可观察到淡黄色的氯金酸水溶液很快变成灰色,续而转成黑色,随后逐渐稳定成红色。全过程约 3min ,继续煮沸 15min ,冷却后用去离子水补足体积至 100mL 。用可见光光谱扫描检测胶体金的制备效果,在 522nm 处有单一吸收峰(附图 1)。

[0019] 实施例 3. His 标签抗体标记纳米金颗粒的方法

[0020] 3.1 抗体与胶体金结合的最适 pH 值确定

[0021] 取 1.5mL 离心管,分别加入 1mL 胶体金溶液,用 0.1mol/L K_2CO_3 将 pH 值分别调至 6.0 、 6.5 、 7.0 、 7.5 、 8.0 、 8.5 、 9.0 和 9.5 。将单抗溶液以 3000r/min 4°C 离心 20min ,去除不溶性残渣。取 $50\mu\text{L}$ 1mg/mL 的单抗加入上述胶体金管中,震荡 20min 后室温放置 10min ;然后每管分别加入 $100\mu\text{L}$ 10% NaCl 溶液,震荡混合后室温放置 10min ,进行可见光光谱扫描检测,记下偶联率最高的 pH 值 X(在相同条件下,吸收峰最高时的 pH 值)。再将 pH 值调至 $X-0.6$ 、 $X-0.4$ 、 $X-0.2$ 、 X 、 $X+0.2$ 、 $X+0.4$ 和 $X+0.6$,重复上述试验,偶联率最高的 pH 值,即为最适 pH 值。pH 条件的优化实验结果显示,适宜的 pH 范围在 6.4 与 10.0 之间,更适宜的 pH 范围在 7.0 与 8.0 之间,最适宜的 pH 条件为 pH7.4。可见光谱扫描检测结果见附图 2 和 3。

[0022] 3.2 抗体与胶体金结合的最佳浓度的确定

[0023] 分别取 0.5mL pH7.4 的胶体金加入到 1.5mL 离心管中,加入 His 单抗溶液,使其终浓度分别为 0 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 $45\mu\text{g/mL}$,震荡混合 20min ,室温放置 10min 。然后每管

加入 100 μ L 100% NaCl, 震荡混合后室温放置后 10min, 进行可见光光谱扫描检测, 结果显示, 适宜的抗体终浓度范围为 15-45 μ g/mL 之间, 更适宜的抗体终浓度范围为 35-45 μ g/mL 之间, 最适宜的抗体浓度为 35 μ g/mL (附图 4)。

[0024] 3.3 胶体金探针的制备及纯化

[0025] 取 1.5mL 离心管, 加入 1mL 胶体金; 用 0.1mol/L K₂CO₃ 调 pH 值最适 pH; 逐滴加入 His 单抗, 整个过程大约 5min 加完。摇匀 15 ~ 20min, 室温放置 10 ~ 15min; 加入 10% BSA 至终浓度为 1.5% (标记体积可增加, 所需要的相应试剂也增加)

[0026] 标记的胶体金抗体溶液应用差速离心法进行纯化: 将标记的胶体金溶液以 10000r/min 离心 45s, 弃去沉淀。12000r/min 离心 30min, 吸弃上清液; 加入 1/10 体积的硼酸缓冲液, 充分溶解沉淀, 重复离心 2 ~ 3 次, 转到 1.5mL 离心管中。将纯化好的胶体金探针用等量的硼酸缓冲液溶解。

[0027] 实施例 4. 免疫胶体金试纸条的制备及组装

[0028] 4.1 玻璃纤维膜探针的制备

[0029] 按 0.5mL/条 (0.5 \times 5cm/条) 的量将胶体金探针均匀涂布在玻璃纤维上, 置于超净工作台中通风干燥过夜, 37 $^{\circ}$ C 放置备用。

[0030] 4.2 NC 膜的预处理

[0031] 将 NC 膜, 用 0.01mol/L PBS+1% BSA+0.2% Tween-20+0.05mol/L NaCl 溶液 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 ~ 60min, 去离子水洗 2 次, 4 $^{\circ}$ C 过夜干燥备用。

[0032] 4.3 T 线及 C 线条件的优化

[0033] 设置几组不同的抗原浓度对 NC 膜的 T 线 (检测线) 和 C 线 (质控线) 进行优化, 优选出一组作为 T 线和 C 线的包被浓度, 分别为 1.0-20.0mg/mL 和 1.0mg/mL。T 线的包被浓度将决定试纸条产品的检测灵敏度。制备一系列 T 线包被浓度不同, 因而检测灵敏度不同的试纸条即可形成具半定量检测功能的检测试纸条套装。T 线与 C 线宽度均为 0.5mm。

[0034] 4.4 T 线及 C 线的划膜方法

[0035] 根据 T 线与 C 线抗原浓度的优化的结果, 分别将纯化好的抗原和羊抗鼠 IgG 抗体用缓冲液稀释至最佳浓度; NC 膜 4 $^{\circ}$ C 放置过夜后备用。

[0036] 4.5 试纸的组装

[0037] 戴上手套, 将包被好的 NC 膜粘到 PVC 底板上, 注意膜的下缘与模具上的标记线对齐, 小心抹平膜面。将喷涂好金标抗体的玻璃纤维紧靠标尺下边缘粘到 PVC 底板上, 并小心抹平。将样品垫紧靠模具下边缘粘到 PVC 底板上, 并小心抹平。将吸水纸紧靠模具上边缘粘到 PVC 底板上, 并小心抹平。用切条机切成 3.5mm 宽的试纸, 在装配区将切好的试纸放入适当尺寸的商品塑料外壳并置于装有干燥剂的包装袋内保存。

[0038] 实施例 5. 免疫胶体金试纸条快速检测重组 His 标签融合蛋白的使用方法及结果判定

[0039] 将试纸条加样孔向上置于平整表面, 向加样孔内滴入约 100 微升待测样本。室温下静置 5 ~ 10min 后观察检测结果。阴性反应出现两条红线 (C 线和 T 线), 提示样本中不含有重组 His 标签融合蛋白。阳性反应只出现一条红线 (C 线), 提示样本中含有重组 His 标签融合蛋白且检测有效。质控线 (C 线) 必须出现, 否则该试纸无效 (附图 5)。

[0040] 实施例 6. 发明相关参数实验检测

[0041] 6.1 特异性实验

[0042] 分别收集含有重组 His 标签融合蛋白的大肠杆菌菌液和含有非 His 标签重组蛋白的大肠杆菌菌液,另以不含有任何重组蛋白的大肠杆菌菌液作对照,用商品细菌裂解液(北京康为世纪生物科技有限公司产品)按说明书操作,将细菌裂解后以实施例 5. 的方法进行检测。实验结果显示只有当样品中含有 His 标签融合蛋白时 T 线消失。当样品中无重组蛋白,或重组蛋白不含有 His 标签时 T 线出现。C 线在各样本检测中均出现,提示检测试剂工作正常,检测结果有效(附图 5)。检测结果说明制备的试纸可有效检测含有 His 标签的重组融合蛋白,而不与非 His 标签菌液发生交叉反应。

[0043] 6.2 灵敏度实验

[0044] 如实施例 4.3 中所述,T 线的包被浓度将决定试纸条产品的检测灵敏度。制备一系列 T 线包被浓度不同,因而检测灵敏度不同的试纸条即可形成具半定量检测功能的检测试纸条套装。本实验以 T 线包被量为 1.0mg/mL 的试纸条显示产品的灵敏度。

[0045] 将重组 His 标签融合蛋白稀释至 100 μ g/ml、10 μ g/ml、1 μ g/ml、100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml 后用本发明产品检测。结果显示,当样品中 His 标签融合蛋白含量大于或等于 1 μ g/ml 时 T 线消失。当样品中 His 标签融合蛋白含量小于或等于 100ng/ml 时 T 线出现。C 线在各样本检测中均出现,提示检测试剂工作正常,检测结果有效。检测灵敏度约为 1 μ g/ml。(附图 6)。

[0046] 6.3 准确率检测

[0047] 对随机选取的 42 个带有 His 标签的大肠杆菌菌液(SDS 电泳检测结果显示有 8 个阴性,34 个阳性)用该发明成品检测:8 个阴性菌液检测结果均为阴性;32 个阳性菌液检测结果为阳性,2 个阳性菌液的检测结果为阴性,准确率为 94%。

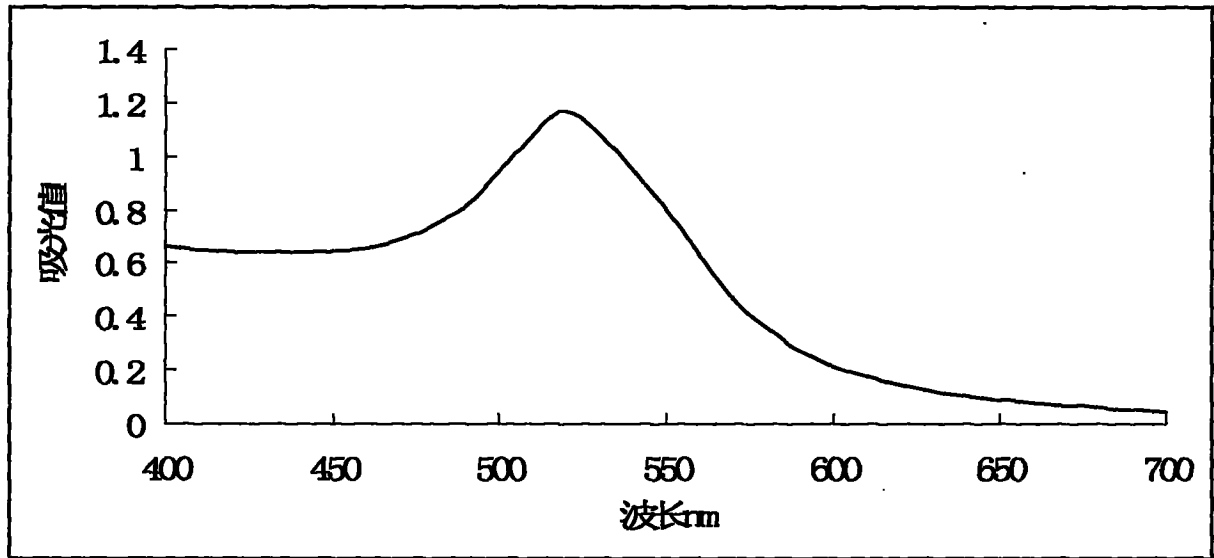


图 1

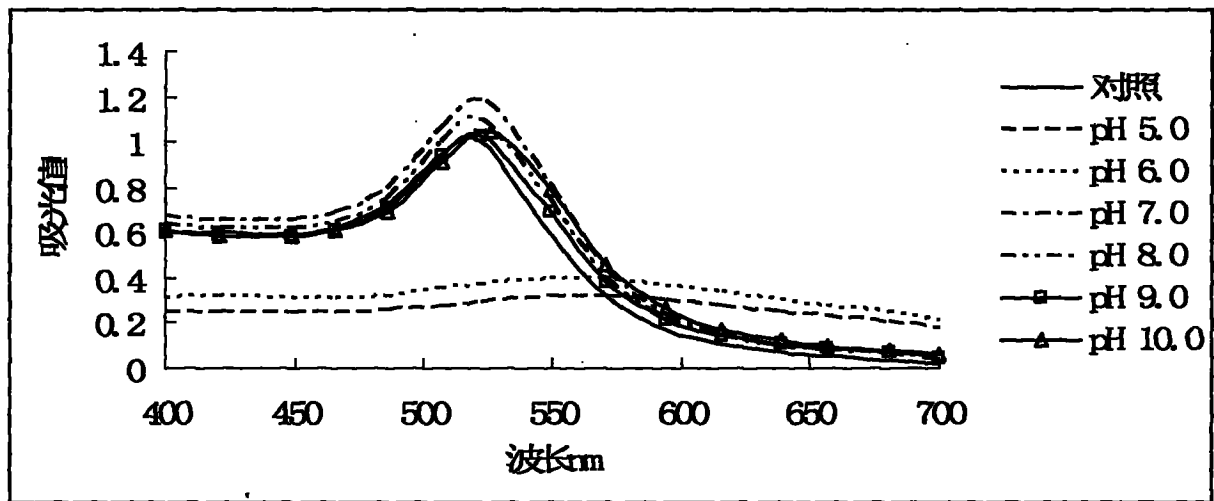


图 2

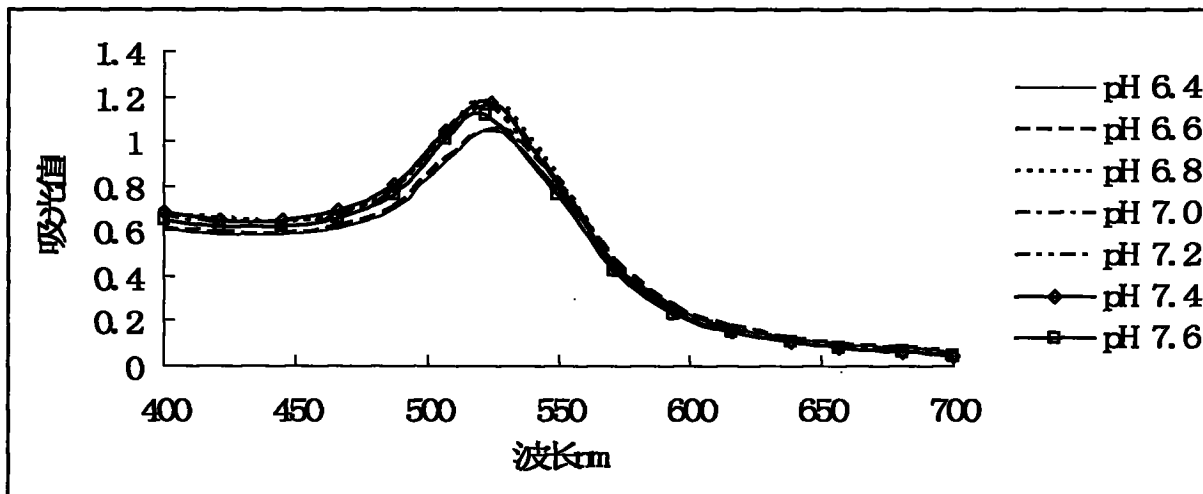


图 3

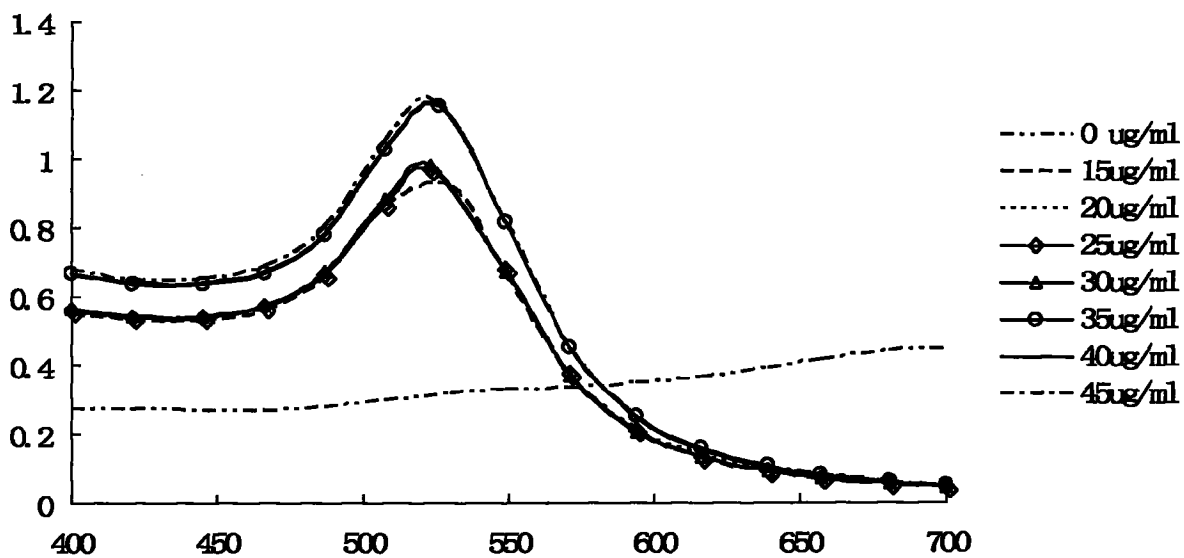


图 4

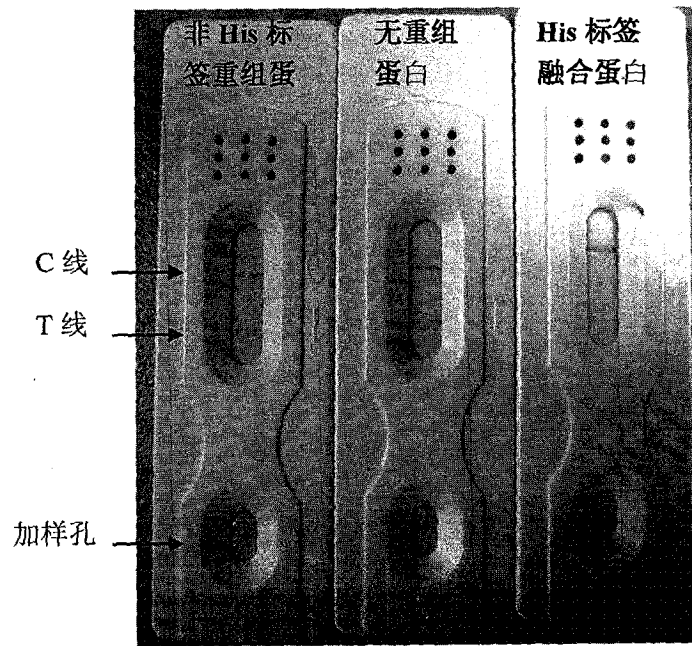


图 5

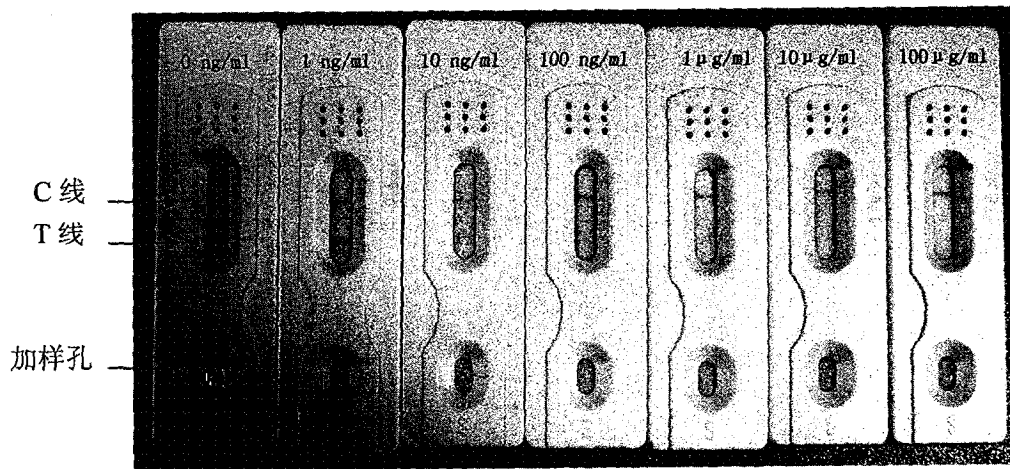


图 6

专利名称(译)	一种重组蛋白表达的快速检测方法		
公开(公告)号	CN102364342A	公开(公告)日	2012-02-29
申请号	CN201110223453.7	申请日	2011-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	北京康为世纪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京康为世纪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京康为世纪生物科技有限公司		
[标]发明人	高建恩 奇日迈励图 王春香		
发明人	高建恩 奇日迈励图 王春香		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测重组蛋白表达的方法。该方法利用免疫胶体金技术可以方便快捷地检测样本中是否存在重组蛋白。本发明可应用于生物医药相关科研中重组蛋白的表达实验，亦可应用于生物制药企业在重组蛋白药物的发酵生产过程中对重组蛋白表达水平的频繁检测与快速半定量评估。在这些应用中，本发明方法可部分取代常规的SDS凝胶电泳和免疫印记检测，显著简化了检测程序，缩短了检测时间并降低了检测成本。

