



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105567724 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201610095916. 9

G01N 33/577(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 02. 22

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(71) 申请人 武汉华美生物工程有限公司

地址 430206 湖北省武汉市东湖开发区高新大道 818 号医疗器械园 B11 栋

(72) 发明人 沈鹤霄 华权高 马峰 马婷
徐春雷

(74) 专利代理机构 北京华沛德权律师事务所
11302

代理人 房德权

(51) Int. Cl.

C12N 15/70(2006. 01)

C12N 15/66(2006. 01)

C07K 16/26(2006. 01)

G01N 33/74(2006. 01)

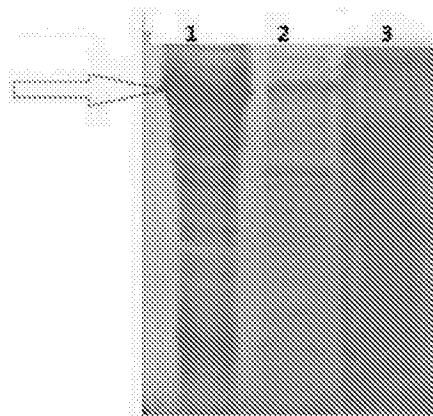
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建、单抗及试剂盒的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建、单抗及试剂盒的制备方法,载体构建时在 HSPA6 和 ProGRP 之间加上了肠激酶酶切位点,并且采用 N 端融合的方式来做融合表达;将重组的 HSPA6+ProGRP 融合蛋白替代半抗原 ProGRP 做为免疫原制备单抗,利用肠激酶切掉 HSPA6+ProGRP 融合蛋白的 HSPA6 标签部分,得到纯的 ProGRP 来筛选单克隆抗体;本申请分别将两株单克隆抗体偶联上磁粒子和标记上吖啶酯,可以进行双抗体夹心法的磁粒子化学发光检测样本,作为试剂盒用于样本检测。本发明制备抗体的周期短,效价高,适合用于化学发光试剂盒的检测,可用于临床诊断。



1. 一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建,其特征在于:包括如下步骤:

在HSPA6蛋白基因上引入肠激酶酶切位点序列,通过酶切位点将带肠激酶酶切位点的HSPA6克隆到载体上,得到中间表达载体;通过酶切位点将ProGRP目的基因克隆到所述中间表达载体上,构建得到ProGRP-HSPA6目的表达载体。

2. 根据权利要求1所述的胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建,其特征在于:通过BamHI/NotI双酶切位点将带肠激酶酶切位点的HSPA6克隆到载体上。

3. 根据权利要求1所述的胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建,其特征在于:通过NadI/BamHI双酶切位点将ProGRP目的基因克隆到所述中间表达载体上。

4. 根据权利要求1所述的胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建,其特征在于:所述中间表达载体为PET-28a-HSPA6表达载体,所述目的表达载体为PET-28a-ProGRP-HSPA6表达载体。

5. 利用权利要求1-4任一项所述的胃泌素释放肽前体蛋白表达载体制备单抗的方法,其特征在于:包括如下步骤:

- 1)将ProGRP-HSPA6表达载体导入宿主;
- 2)采用IPTG诱导表达融合蛋白;
- 3)镍离子柱纯化得高纯度蛋白做为免疫原;
- 4)免疫动物;

5)取所述免疫动物的细胞制备融合细胞;筛选分泌单抗的杂交瘤细胞系,建立单抗细胞株,并制备单抗腹水。

6. 根据权利要求5所述的制备单抗的方法,其特征在于:还包括步骤6)抗体的筛选:利用肠激酶切掉HSPA6+ProGRP融合蛋白的HSPA6标签部分,得到纯的ProGRP来筛选所述单抗。

7. 一种胃泌素释放肽化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

利用吖啶酯标记一如权利要求5或6所述的Pro-GRP单克隆抗体;

将另一一如权利要求5或6所述的Pro-GRP单克隆抗体偶联磁粒子;

将样本、磁粒子偶联的所述Pro-GRP单克隆抗体及吖啶酯标记的所述Pro-GRP单克隆抗体进行反应,形成抗体-抗原-抗体夹心复合体,制作成化学发光试剂盒用于样本检测。

8. 根据权利要求7所述的胃泌素释放肽化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于:吖啶酯标记所述Pro-GRP单克隆抗体具体步骤如下:取一定量Pro-GRP单克隆抗体,采用0.05mol/L pH 9.5CB调整浓度为1mg/mL;按抗体:吖啶酯=1:10~20摩尔比加入已活化吖啶酯,室温反应0.5~1.0h;将反应液移至透析袋,采用0.05mol/L pH 9.5CB透析24h,加入等量甘油,放置~20℃以下保存。

9. 根据权利要求7所述的胃泌素释放肽化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于:将所述单克隆抗体偶联磁粒子具体步骤如下:将磁粒子用50mmol/L NaCO₃-NaHCO₃pH9.6缓冲液稀释至适当浓度,按1mL磁粒子加1m L抗体的比例进行固相,4℃搅拌过夜,磁分离器分离磁粒子,用pH7.4 PBS反复洗涤3次,加5g/L BSA封闭4℃搅拌过夜,磁分离器分离磁粒子,用pH7.4 PBS洗3次,加入磁微粒稳定剂,使微球浓度为5mg/mL。

10. 根据权利要求7所述的胃泌素释放肽化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于:样本检测步骤如下:将形成的所述抗体-抗原-抗体夹心复合体反应液置于一个磁场内,检测中的磁粒子将被吸附,通过洗涤,将未结合物冲洗除去;注入第一化学发光激发液及第二

化学发光激发液,检测其化学发光光子强度,用双对数法,以发光值对Pro-GRP浓度作图,通过标准曲线对血清Pro-GRP浓度进行测定。

一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建、单抗及试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学测定分析领域,特别涉及一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建、单抗及试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 胃泌素释放肽前体(ProGRP)是小细胞肺癌的一个非常可靠的指标,具有很好的灵敏度和特异性。肺癌早期无症状和症状轻微,2/3的患者在发现时已处于扩散阶段,五年存活率小于5%,如能早期发现,通过手术治疗,五年存活率高达70%—80%,ProGRP在小细胞肺癌早期就有可测浓度的分泌,所以该标志物毫无疑问能用于高危患者的筛查。

[0003] ProGRP的释放不仅更多见于小细胞肺癌的癌细胞,而且还发现其在肿瘤和器官的特异性方面优于其他生物标志物。ProGRP具有强大的鉴别诊断能力是因为良性病变时ProGRP的产生量很少,其他癌症(非小细胞癌症和非神经内分泌癌症)中也没有ProGRP产生,或者产生量很少。ProGRP在预测复发及转移可能性方面的表现要优于NSE,并能取代NSE对小细胞肺癌的治疗进行监测。

[0004] 但是,单纯大肠表达的ProGRP免疫原是半抗原,免疫原性很差,后期尝试过将重组表达的ProGRP化学偶联大分子载体蛋白BSA或者KLH结构免疫活性也是很差。

[0005] 人体正常状态下少量表达HSP,其含量仅占总蛋白5%~10%,而且受自身免疫调节网络作用,不会引起免疫应答反应。当病原体感染机体时,病原体相对抗体及其机体针对病原体均可合成HSP,二者HSP同源性高于50%,由此构成HSP在不同个体中介导抗感染免疫或自身免疫反应的基础。

[0006] 热激蛋白融合表达蛋白是一种能增强所融合表达的蛋白免疫效果的一种表达方法,但这种方法存在筛选抗体时用到的抗原需要另外制备的问题,且往往需要额外的制备纯的蛋白来进行抗体筛选;而未采用融合表达的方法制备出的抗体效价往往不高,需要很长时间才能筛选出较高效价的单抗。

发明内容

[0007] 针对现有技术中的上述问题,本发明的目的是提供一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建,能够通过一次克隆表达,制备出高免疫原性的ProGRP和HSPA6融合蛋白,ProGRP-HSPA6融合蛋白既可以作为免疫原,也可以很方便的通过一步酶切制备出不含表达标签的纯ProGRP用于单抗鉴定及抗体筛选的蛋白抗原。

[0008] 本发明的另一目的是提供一种利用上述胃泌素释放肽前体蛋白表达载体制备单抗的方法,利用ProGRP-HSPA6融合蛋白做为免疫原提高了免疫原性,增加了免疫效果,很大程度的提高了抗体制备和筛选效率。

[0009] 本发明的另一目的是提供一种胃泌素释放肽化学发光试剂盒的制备方法,试剂盒的制备周期短,所述试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中胃泌素释放肽前体(ProGRP)水

平,可以进行双抗体夹心法的磁粒子化学发光检测样本。

[0010] 为了达到上述目的,本发明采用如下技术方案:一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建,包括如下步骤:

[0011] 在HSPA6蛋白基因上引入肠激酶酶切位点序列,通过酶切位点将带肠激酶酶切位点的HSPA6克隆到载体上,得到中间表达载体;再通过酶切位点将ProGRP目的基因克隆到所述中间表达载体上,以构建得到ProGRP-HSPA6目的表达载体。

[0012] 作为进一步的优选,通过BamHI/NotI双酶切位点将带肠激酶酶切位点的HSPA6克隆到载体上。

[0013] 作为进一步的优选,通过NadI/BamHI双酶切位点将ProGRP目的基因克隆到所述中间表达载体上。

[0014] 作为进一步的优选,所述中间表达载体为PET-28a-HSPA6表达载体,所述目的表达载体为PET-28a-ProGRP-HSPA6表达载体。

[0015] 作为进一步的优选,根据uniprot蛋白数据库的基因序列合成ProGRP基因片段。

[0016] 利用上述胃泌素释放肽前体蛋白表达载体制备单抗的方法,包括如下步骤:

[0017] 1)将ProGRP-HSPA6表达载体导入宿主;

[0018] 2)采用IPTG诱导表达融合蛋白;

[0019] 3)镍离子柱纯化得高纯度蛋白做为免疫原;

[0020] 4)免疫动物;

[0021] 5)取所述免疫动物的细胞制备融合细胞;筛选分泌单抗的杂交瘤细胞系,建立单抗细胞株,并制备单抗腹水。

[0022] 作为进一步的优选,还包括步骤6)抗体的筛选:利用肠激酶切掉HSPA6+ProGRP融合蛋白的HSPA6标签部分,得到纯的ProGRP来筛选所述单克隆抗体。

[0023] 作为进一步的优选,步骤2)中,将测序正确的重组体PET-28a-ProGRP-HSPA6转入至BL21菌株中,经37℃培养至OD值达到0.55~1.0,在22℃下以0.1mmol/L IPTG诱导2h,收集菌体,取少量的菌体制成SDS-PAGE样品;将收集的菌体用PBS将菌株悬浮起来,加PMSF和DTT,然后加溶菌酶30min,期间要随时调pH至8.0,最后加完Triton离心,去沉淀,取少量上清和沉淀制成SDS-PAGE样品,进行SDS-PAGE分析。

[0024] 作为进一步的优选,步骤3)中,将表达菌体重悬于60ml Bufer B(0.05mol/L Na₃P₀4,0.3mol/L NaCl,0.01mol/L imidazole,pH 8.0),进行超声破碎细菌,然后离心取上清,上样由Bufer B平衡过的Ni-IDA亲和层析柱,再用Bufer C(0.05mol/L Na₃P₀4,0.3mol/L NaCl,0.05mol/L imidazole,pH8.0)洗层析柱去除杂蛋白,最后通过Buffer D(0.05mol/L Na₃P₀4,0.3mol/L NaCl,0.25mol/L imidazole,pH 8.0)洗脱,收集目的蛋白洗脱峰;SDS-PAGE检验蛋白纯度,考马斯亮蓝染色结果用Quantity one进行灰度分析,估算目的蛋白纯度;Western blot对蛋白进行鉴定。

[0025] 作为进一步的优选,步骤4)中,免疫前先尾静脉取血,作阴性对照。用ProGRP-HSPA6免疫6周龄BALB/C小鼠6只,背部皮下多点注射,免疫剂量为100只(即0.2mL/只);首次免疫,取无菌PBS溶解的ProGRP-HSPA6,与等体积的弗氏完全佐剂混合,漩涡混合仪上充分乳化;加强免疫,弗氏佐剂改用弗氏不完全佐剂,其余同前;共免5次,每次间隔2周,每次免疫后第10天断尾采血,最后一次免疫后第10天眼眶采血,4℃过夜析出血清,3000r/min下离

心10min,取上清,一部分直接于4℃冰箱内保存,一部分-20℃下保存备用,收集的抗血清用硫酸胺法进行纯化。

[0026] 作为进一步的优选,步骤5)中,蛋白纯化产物免疫BA1B/c小鼠,取鼠脾脏与Sp2/0细胞混合;用ELISA方法筛选分泌单抗的杂交瘤细胞系,建立单抗细胞株,并制备单抗腹水。

[0027] 作为进一步的优选,步骤6)中,纯化的融合蛋白在50mM Tris,pH值为8.5的缓冲液中透析过夜,置换缓冲体系为EK切割buffer(50mmol/L Tris-HCl,pH8.5),按EK酶与蛋白1:1000的质量比加入EK酶,4℃低速摇床(60r/min)切割12h左右;切割后用Buffer B稀释后镍离子柱纯化,分别收集穿透、10%B和100%B的蛋白,17.5%SDS-PAGE电泳进行鉴定;取穿透蛋白洗脱液,浓缩后包被于空白的酶标板上,用于抗体的ELISA效价鉴定;抗体效价测定:倍比稀释单抗腹水,进行ELISA检测,同时用Sp2/0细胞腹水作阴性对照。

[0028] 一种胃泌素释放肽化学发光试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0029] 吡啶酯标记一所述Pro-GRP单克隆抗体;

[0030] 将另一所述Pro-GRP单克隆抗体偶联上磁粒子;

[0031] 将样本、磁粒子偶联的Pro-GRP单克隆抗体及吡啶酯标记的Pro-GRP单克隆抗体进行反应后,形成抗体-抗原-抗体夹心复合体,制作成化学发光试剂盒用于样本检测。

[0032] 作为进一步的优选,吡啶酯标记所述Pro-GRP单克隆抗体具体步骤如下:取一定量Pro-GRP单克隆抗体,采用0.05mol/L pH 9.5CB调整浓度为1mg/mL;按抗体:吡啶酯=1:10~20摩尔比加入已活化吡啶酯,室温反应0.5~1.0h;将反应液移至透析袋(截留分子量8000~12000),采用0.05mol/L pH 9.5CB透析24h,加入等量甘油,放置~20℃以下保存。

[0033] 作为进一步的优选,将所述抗体偶联磁粒子具体步骤如下:将磁微粒或磁粒子用50mmol/L NaCO₃-NaHCO₃pH9.6缓冲液稀释至适当浓度,按1mL磁微粒加1mL抗体的比例进行固相,4℃搅拌过夜,磁分离器分离磁微粒,用pH7.4PBS反复洗涤3次,加5g/L BSA封闭4℃搅拌过夜,磁分离器分离磁微粒,用pH7.4PBS洗3次,加入磁微粒稳定剂,使微球浓度为5mg/mL。

[0034] 作为进一步的优选,样本检测步骤如下:将形成的所述抗体-抗原-抗体夹心复合体反应液置于一个磁场内,检测中的磁微粒将被吸附,通过洗涤,将未结合物冲洗除去;然后,注入第一化学发光激发液及第二化学发光激发液,检测其化学发光光子强度,用双对数法,以发光值对Pro-GRP浓度作图,通过标准曲线对血清Pro-GRP浓度进行测定。

[0035] 本发明的有益效果是:(1)本申请载体构建的时候在HSPA6和ProGRP之间加上了肠激酶酶切位点,并且采用在HSPA6蛋白的N端融合的方式来融合表达,与C端表达相比,本申请主要集中在上清表达。(2)本申请用融合的HSPA6+ProGRP蛋白代替半抗原ProGRP做为免疫原制备单抗,提高了免疫原性,增加了免疫效果。(3)本申请可利用肠激酶切掉HSPA6+ProGRP融合蛋白的HSPA6标签部分,得到纯的Pro-GRP蛋白来用于抗体鉴定和单抗筛选。(4)本申请将样本和磁粒子偶联的Pro-GRP单克隆抗体及吡啶酯标记Pro-GRP单克隆抗体进行反应后,形成抗体-抗原-抗体夹心复合体,用于形成化学发光试剂盒,可以进行双抗体夹心法的磁粒子化学发光检测样本。(5)本发明制备抗体周期短,效价高,适合用于化学发光试剂盒的检测,可用于临床诊断。

附图说明

- [0036] 图1为本申请采用N端表达的GRP-HSPA6融合蛋白在大肠表达宿主中的表达情况。
- [0037] 图2为采用C端表达的HSPA6-ProGRP融合蛋白在大肠表达宿主中的表达情况。
- [0038] 附图中标记的说明:箭头所指为目的带,图1中各列从左至右,1-上清,2-沉淀,3-marker;图2中各列从左至右,1-marker,2-上清,3-沉淀。

具体实施方式

[0039] 本申请实施例通过提供一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建方法,能够通过一次克隆表达,制备出高免疫原性的ProGRP和HSPA6融合蛋白,ProGRP-HSPA6融合蛋白既可以作为免疫原,也可以很方便的通过一步酶切制备出不含表达标签的纯ProGRP用于单抗鉴定及抗体筛选的蛋白抗原。

[0040] 本申请实施例通过提供一种利用上述胃泌素释放肽前体蛋白表达载体制备单抗的方法,利用ProGRP-HSPA6融合蛋白做为免疫原提高了免疫原性,增加了免疫效果,很大程度的提高了抗体制备和筛选效率。

[0041] 本申请实施例通过提供一种胃泌素释放肽化学发光试剂盒的制备方法,试剂盒的制备周期短,所述试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中胃泌素释放肽前体(ProGRP)水平,可以进行双抗体夹心法的磁粒子化学发光检测样本。

[0042] 为了更好的理解上述技术方案,下面将结合说明书附图以及具体的实施方式对上述技术方案做详细的说明。

[0043] 本申请实施例胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建方法,包括如下步骤:

[0044] 在HSPA6蛋白基因上引入肠激酶酶切位点序列,通过酶切位点将带肠激酶酶切位点的HSPA6克隆到载体上,得到中间表达载体;再通过酶切位点将ProGRP目的基因克隆到所述中间表达载体上,以构建得到ProGRP-HSPA6目的表达载体。

[0045] 通过BamHI/NotI双酶切位点将带肠激酶酶切位点的HSPA6克隆到载体上。

[0046] 通过NadI/BamHI双酶切位点将ProGRP目的基因克隆到所述中间表达载体上。

[0047] 所述中间表达载体为PET-28a-HSPA6表达载体,所述目的表达载体为PET-28a-ProGRP-HSPA6表达载体。

[0048] 根据uniprot蛋白数据库的基因序列合成ProGRP基因片段。

[0049] 本申请实施例利用上述胃泌素释放肽前体蛋白表达载体制备单抗的方法,包括如下步骤:

[0050] 1)将ProGRP-HSPA6表达载体导入宿主;

[0051] 2)采用IPTG诱导表达融合蛋白;

[0052] 3)镍离子柱纯化得高纯度蛋白做为免疫原;

[0053] 4)免疫动物;

[0054] 5)取所述免疫动物的细胞制备融合细胞;筛选分泌单抗的杂交瘤细胞系,建立单抗细胞株,并制备单抗腹水。

[0055] 还包括步骤6)抗体的筛选:利用肠激酶切掉HSPA6+ProGRP融合蛋白的HSPA6标签部分,得到纯的ProGRP来筛选所述单克隆抗体。

[0056] 本申请胃泌素释放肽化学发光试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0057] 吡啶酯标记一所述Pro-GRP单克隆抗体;

[0058] 将另一所述Pro-GRP单克隆抗体偶联上磁粒子；

[0059] 将样本、磁粒子偶联的Pro-GRP单克隆抗体及吖啶酯标记的Pro-GRP单克隆抗体进行反应后,形成抗体-抗原-抗体夹心复合体,制作成化学发光试剂盒用于样本检测。

[0060] 实施例1:

[0061] (1)PET-28a-GRP-HSPA6载体构建

[0062] 将肠激酶酶切位点基因与HSPA6基因通过linker串联起来,利用BamHI/NotI双酶切位点将带肠激酶酶切位点的HSPA6A6克隆到PET28A载体上,得到含有肠激酶切位点的PET-28a-HSPA6表达载体,完成PET-28a-HSPA6载体构建。根据uniprot的基因序列合成GRP基因片段,利用NadI/BamHI双酶切位点将GRP目的基因克隆到PET-28a-HSPA6的表达载体上,得到PET-28a-GRP-HSPA6表达载体。

[0063] (2)基因的表达

[0064] 将测序正确的重组体PET-28a-GRP-HSPA6转入至BL21菌株中,经37℃培养至OD值达到0.55~1.0,在22℃下以0.1mmol/L IPTG诱导2h,收集菌体,取少量的菌体制成SDS-PAGE样品。将收集的菌体用PBS将菌株悬浮起来,加PMSF和DTT,然后加溶菌酶30min,期间要随时调pH至8.0,最后加完Triton离心,去沉淀,取少量上清和沉淀制成SDS-PAGE样品,进行SDS-PAGE分析。

[0065] (3)蛋白的纯化

[0066] 将表达菌体重悬于60ml Bufer B(0.05mol/L Na₃PO₄,0.3mol/L NaCl,0.01mol/L imidazole,pH 8.0),进行超声破碎细菌,然后离心取上清,上样由Bufer B平衡过的Ni-IDA亲和层析柱,再用Bufer C(0.05mol/L Na₃PO₄,0.3mol/L NaCl,0.05mol/L imidazole,pH8.0)洗层析柱去除杂蛋白,最后通过Buffer D(0.05mol/L Na₃PO₄,0.3mol/L NaCl,0.25mol/L imidazole,pH 8.0)洗脱,收集目的蛋白洗脱峰。SDS-PAGE检验蛋白纯度,考马斯亮蓝染色结果用Quantity one进行灰度分析,估算目的蛋白纯度。Western blot对蛋白进行鉴定。

[0067] (4)动物的免疫

[0068] 免疫前先尾静脉取血,作阴性对照。用GRP-HSPA6免疫6周龄BALB/C小鼠6只,背部皮下多点注射,免疫剂量为100只(即0.2mL/只)。首次免疫,取无菌PBS溶解的GRP-HSPA6,与等体积的弗氏完全佐剂混合,漩涡混合仪上充分乳化;加强免疫,弗氏佐剂改用弗氏不完全佐剂,其余同前。共免5次,每次间隔2周,每次免疫后第10天断尾采血,最后一次免疫后第10天眼眶采血,4℃过夜析出血清,3000r/min下离心10min,取上清,一部分直接于4℃冰箱内保存,一部分-20℃下保存备用,收集的抗血清用硫酸胺法进行纯化。

[0069] (5)单克隆抗体的制备

[0070] 蛋白纯化产物免疫BA1B/c小鼠,取鼠脾脏与Sp2/0细胞混合。用ELISA方法筛选分泌单抗的杂交瘤细胞系,建立单抗细胞株,并制备单抗腹水。单克隆抗体反应特性鉴定抗体亚类鉴定:按照Southernbiotech公司单抗亚型鉴定试剂盒说明书进行。

[0071] (6)抗体的筛选

[0072] 纯化的融合蛋白在50mM Tris,pH值为8.5的缓冲液中透析过夜,置换缓冲体系为EK切割buffer(50mmol/L Tris-HCl,pH8.5),按EK酶与蛋白1:1000的质量比加入EK酶,4℃低速摇床(60r/min)切割12h左右。切割后用Bufer B稀释后镍离子柱纯化,分别收集穿透、

10%B和100%B的蛋白,17.5%SDS-PAGE电泳进行鉴定。取穿透蛋白洗脱液,浓缩后包被于空白的酶标板上,用于抗体的ELISA效价鉴定。抗体效价测定:倍比稀释单抗腹水,进行ELISA检测,同时用Sp2/o细胞腹水作阴性对照。

[0073] (7)化学发光试剂盒的制备

[0074] (1)吡啶酯标记抗体取一定量Pro-GRP单克隆抗体,采用0.05mol/L pH9.5CB调整浓度为1mg/mL;按抗体:吡啶酯=1:10~20摩尔比加入已活化吡啶酯,室温反应0.5~1.0h;将反应液移至透析袋(截留分子量8000~12000),采用0.05mol/L pH 9.5CB透析24h,加入等量甘油,放置-20℃以下保存。

[0075] (2)抗体偶联磁微粒将磁微粒用50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃pH9.6缓冲液稀释适当浓度按1mL磁微粒加1μL抗体的比例进行固定,4℃搅拌过夜,磁分离器分离磁微粒,用pH7.4PBS反复洗涤3次,加5g/L BSA封闭4℃搅拌过夜,磁分离器分离磁微粒,用pH7.4PBS洗3次,加入磁微粒稳定剂,使微球浓度为5mg/mL。

[0076] (3)样本检测第一步反应:将样本和磁粒子偶联的Pro-GRP单克隆抗体及吡啶酯标记Pro-GRP单克隆抗体进行反应后,形成抗体-抗原-抗体夹心复合体。将复合体反应液置于一个磁场内,检测中的磁微粒将被吸附,通过洗涤,将未结合物冲洗除去;然后,注入化学发光激发液1及化学发光激发液2,检测其化学发光光子强度,用双对数法,以发光值对Pro-GRP浓度作图,通过标准曲线对血清Pro-GRP浓度进行测定。

[0077] 实验例2:C端表达

[0078] 根据uniprot的基因序列合成Pro-GRP基因片段,将Pro-GRP基因和肠激酶酶切位点基因通过linker串联起来,利用BamHI/NotI双酶切位点将带肠激酶酶切位点的Pro-GRP克隆到PET28A载体上,得到含有肠激酶酶切位点的PET-28a-ProGRP表达载体。完成PET-28a-ProGRP载体构建,利用NadI/BamHI双酶切位点将HSPA6目的基因克隆到PET-28a-Pro-GRP的表达载体上,得到PET-28a-HSPA6-ProGRP表达载体。构建好HSAP基因的C端表达的载体。

[0079] 使用实施例1的步骤(2),分别诱导表达构建好的N端表达和C端表达载体。分别收集上清表达和包涵体沉淀表达的样本,SDS-PAGE凝胶电泳检测HSPA6-ProGRP融合蛋白在大肠表达宿主中的表达情况。结果分别如图1和图2所示,图2中可见:实施例2的C端表达,主要集中在包涵体沉淀中表达;图1中可见:本申请实施例1的N端表达,沉淀中也有一点表达但是主要集中在上清表达。

[0080] 上述本申请实施例中的技术方案,至少具有如下的技术效果或优点:(1)本申请载体构建的时候在HSPA6和ProGRP之间加上了肠激酶酶切位点,并且采用在HSPA6蛋白的N端融合的方式来做融合表达,与C端表达相比,本申请主要集中在上清表达。(2)本申请用融合的HSPA6+ProGRP蛋白代替半抗原ProGRP做为免疫原制备单抗,提高了免疫原性,增加了免疫效果。(3)本申请可利用肠激酶切掉HSPA6+ProGRP融合蛋白的HSPA6标签部分,得到纯的Pro-GRP蛋白来用于抗体鉴定和单抗筛选。(4)本申请将样本和磁粒子偶联的Pro-GRP单克隆抗体及吡啶酯标记Pro-GRP单克隆抗体进行反应后,形成抗体-抗原-抗体夹心复合体,用于形成化学发光试剂盒,可以进行双抗体夹心法的磁粒子化学发光检测样本。(5)本发明制备抗体周期短,效价高,适合用于化学发光试剂盒的检测,可用于临床诊断。

[0081] 尽管已描述了本发明的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优

选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。显然，本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样，倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内，则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

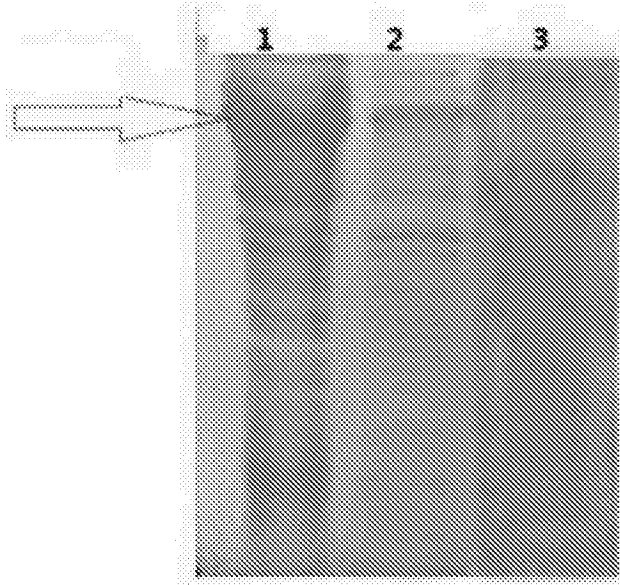


图1

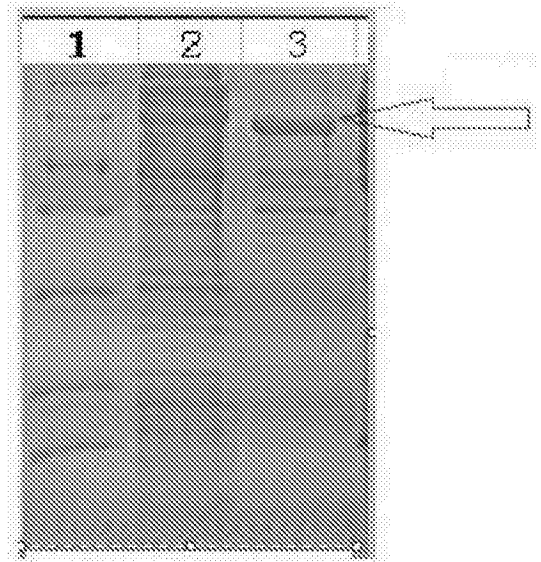


图2

专利名称(译)	一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建、单抗及试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN105567724A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201610095916.9	申请日	2016-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
[标]发明人	沈鹤霄 华权高 马峰 马婷 徐春雷		
发明人	沈鹤霄 华权高 马峰 马婷 徐春雷		
IPC分类号	C12N15/70 C12N15/66 C07K16/26 G01N33/74 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	C12N15/70 C07K16/26 C12N15/66 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/577 G01N33/74 G01N2333/5758		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种胃泌素释放肽前体蛋白表达载体的构建、单抗及试剂盒的制备方法，载体构建时在HSPA6和ProGRP之间加上了肠激酶酶切位点，并且采用N端融合的方式来做融合表达；将重组的HSPA6+ProGRP融合蛋白替代半抗原ProGRP做为免疫原制备单抗，利用肠激酶切掉HSPA6+ProGRP融合蛋白的HSPA6标签部分，得到纯的ProGRP来筛选单克隆抗体；本申请分别将两株单克隆抗体偶联上磁粒子和标记上吖啶酯，可以进行双抗体夹心法的磁粒子化学发光检测样本，作为试剂盒用于样本检测。本发明制备抗体的周期短，效价高，适用于化学发光试剂盒的检测，可用于临床诊断。

