



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106146656 A

(43)申请公布日 2016.11.23

(21)申请号 201610531515.3

B01J 20/24(2006.01)

(22)申请日 2016.07.07

B01J 20/281(2006.01)

(71)申请人 北京大学

B01J 20/30(2006.01)

地址 100080 北京市海淀区颐和园路5号

B01D 15/38(2006.01)

(72)发明人 林坚 周鹏

(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 刘华

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

B82Y 30/00(2011.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表4页

(54)发明名称

一种特异性识别组氨酸标签的纳米抗体

(57)摘要

本发明属于基因工程领域,涉及一种特异性识别组氨酸标签的纳米抗体,具体为针对组氨酸标签的单域重链抗体,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. 一种特异性识别组氨酸标签的纳米抗体,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,其特征在于序列如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所述的特异性识别组氨酸标签的纳米抗体在免疫检测、富集纯化组氨酸标签中的应用。
7. 权利要求1所述的特异性识别组氨酸标签的纳米抗体在制备组氨酸标签免疫检测、富集以及纯化试剂或材料中的应用。
8. 权利要求1所述的特异性识别组氨酸标签的纳米抗体通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与组氨酸标签特异性结合的抗体。
9. 一种针对组氨酸标签的免疫亲和吸附材料,包括载体,搭载在载体上的配基,其特征在于该材料以特异性识别组氨酸标签的纳米抗体作为配基,所述特异性识别组氨酸标签的纳米抗体具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。

一种特异性识别组氨酸标签的纳米抗体

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,特别是针对组氨酸标签的单域重链抗体或多肽。

技术背景

[0002] 组氨酸(His)标签,通常由6和组氨酸构成,也称为多组氨酸标签,6×His标签或hexa组氨酸标签。组氨酸标签常融合在目标蛋白的C端或N端,以便于目标蛋白的纯化和检测。组氨酸残基可以在一定的缓冲液条件下特异性结合到几种类型固定的离子上(比如镍,钴和铜),然后通过更换缓冲液条件而从固定相洗脱,从而实现纯化含有His标签的目标蛋白。

[0003] His标签是最常用的蛋白标签之一,通过检测His标签即可获知样品中目标蛋白的情况。本发明公开了一种可以与His标签特异性结合的单域重链抗体(即纳米抗体,下同),可用于His标签融合蛋白的纯化及检测。

[0004] 目前市场上已经有针对His标签的单克隆或多克隆抗体用于检测,但单克隆抗体的研发和生产过程及其繁琐和复杂,多克隆抗体来源有限。相比之下,单域重链抗体仅由一个结构域组成,具有耐酸碱、耐高温、特异性高、分子量小和可大规模生产等优点,用单域重链抗体作为配基制备的纯化介质具有可重复使用、无需咪唑洗脱(免除透析操作)等优点,应用前景广阔。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供针对His标签的单域重链抗体,可以被用于制备检测和纯化His标签的试剂和工具。

[0006] 本发明提供一个针对His标签的单域重链抗体(即本发明一种特异性识别组氨酸标签的纳米抗体,下同),具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。其氨基酸序列的IMGT编号和结构域的划分包括四个框架区(Framework region,FR)和三个互补决定区(Complementarity-determining region,CDR)。

[0007] 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。

[0008] 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。可以为SEQ ID NO.:2核酸分子。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 本发明还提供一种宿主细胞,包括所述蛋白质或表达载体。

[0012] 本发明还提供一种检测His标签的方法,含有本发明所述针对His标签的单域重链抗体。基于本发明提供的针对His标签的单域重链抗体与His标签特异性结合的能力,建立His标签的检测方法。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等。

[0013] 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,该突变体能与组氨酸标签特异性结合。

[0014] 本发明还涉及前述针对His标签的单域重链抗体在免疫检测、富集以及纯化中的应用。这些免疫检测指的是非疾病诊断治疗目的的免疫检测。

[0015] 本发明还涉及针对组氨酸标签的免疫亲和吸附材料,包括载体,搭载在载体上的配基,其特征在于该材料以针对组氨酸标签的纳米抗体作为配基,所述针对组氨酸标签的纳米抗体具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。载体材料不限于琼脂糖凝胶,也可以选用硅球、纳米磁珠等。

[0016] 本发明所叙述的一些术语具有如下含义:

[0017] 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。

[0018] 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 Res 38(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.)中的描述。

[0019] 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。

具体实施方式

[0020] 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。

[0021] 实施例1:

[0022] 抗His标签单域重链抗体(即针对His标签的单域重链抗体)免疫文库的构建

[0023] 将6×His标签与牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)共价偶联,得到6×His人工抗原6×His-BSA,取300μg 6×His-BSA与弗氏完全佐剂乳化后,对羊驼(Lama pacos)进行皮下多点注射免疫。加强免疫采用150μg 6×His-BSA与弗氏不完全佐剂乳化,间隔2周进行,每次免疫7天后静脉取血,采用间接ELISA法测定血清效价,选择血清效价最高的样品分离淋巴细胞,提取RNA。

[0024] RNA的提取参照TAKARA公司RNAiso试剂说明书进行。以RNA为模板,oligo dT为引物,参照TAKARA公司反转录酶说明书合成cDNA第一链。

[0025] 采用PrimeSTAR高保真DNA聚合酶,经巢式PCR获得重链抗体的可变区编码基因(采用的引物见表1)。第一轮PCR分别以引物AlpVh-LD和CH2-R扩增cDNA,反应条件为,98℃,10s,55℃,20s,72℃,1min,20个循环,98℃,10s,68℃,1min,72℃延伸10min。

[0026] 将第一轮PCR产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳,回收600bp~750bp的DNA片段,作为第二轮PCR的模板,分别用引物AlpVh-Sfi I和AlpVHHR1-Not I,AlpVh-Sfi I和AlpVHHR2-Not I,进行扩增,反应条件为,98℃,10s,50℃,20s,72℃,40s,5个循环,98℃,10s,68℃,40s,30个循环,72℃延伸10min。经DNA片段回收试剂盒回收、定量,于-20℃保存备用。将噬菌粒pHEN1和PCR扩增产物分别用Sfi I、Not I双酶切,经琼脂糖凝胶回收、定量后,以1:3摩尔比,在16℃,过夜连接。

[0027] 表1文库构建及鉴定所用的引物

引物名称	序列
AlpVh-LD	5'-CTTGGTGGTCCTGGCTGC-3'
AlpVh-Sfi I	5'-tcgcggcccgccatggccCAGKTGCAGCTCGCTGGAGTCNGGNGG-3'
AlpVHHR1-Not I	5'-cgagtccggccGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'
AlpVHHR2-Not I	5'-cgagtccggccTTGTGGTTTGGTGTCTTGGG-3'
CH2-R	5'-GGTACGTGCTGTTGAACGTGTTCC-3'
M13-R	5'-AGCGGATAACAAATTACACAGGA-3'
pHEN-R	5'-GCCCATTCAGATCCTCTTC-3'

[0029] 注:下划线表示限制性内切酶识别序列

[0030] 连接产物经乙醇沉淀后,溶于10μL无菌水,分十次进行电穿孔转化大肠杆菌TG1。取10μL电击、培养后的菌液倍比稀释,涂布氨苄青霉素2×YT培养板,37℃,倒置培养12~16h,采用引物M13-R和pHEN-R进行菌落PCR,计算库容;其余部分全部涂布于24cm×24cm氨苄青霉素2×YT培养板,37℃,倒置培养12~16h。用10mL,2×YT培养基将培养板上的菌苔刮洗后,加入终浓度15~30%甘油,分装,-80℃保存备用。

[0031] 根据计算的库容量结果,接种10倍库容量的活细胞于20mL的2×YT(含2%葡萄糖,100μg/mL氨苄青霉素),30℃,220r/min培养至OD600达0.5,按感染复数20:1加入辅助噬菌体,37℃,220r/min,60min。将培养物离心,用50mL的2×YT(含100μg/mL氨苄青霉素和50μg/mL卡那霉素)重悬沉淀,30℃,220r/min过夜培养后,3000g离心取上清,加入5×PEG/NaCl溶液,冰上放置1h或4℃过夜,12000rpm离心30min,重悬沉淀于含10%甘油的磷酸缓冲液(PBS,0.01M,pH 7.4),即得到抗His标签单域重链抗体免疫文库,取10μL测定滴度,其余分装于-80℃保存备用。

[0032] 实施例2:

[0033] 抗His标签单域重链抗体的淘选与鉴定

[0034] 采用固相亲和淘选的方法从实施例1所得抗His标签单域重链抗体免疫文库中淘选针对His标签的单域重链抗体。将6×His与卵清白蛋白(aIbumin,OVA)共价偶联,得到人工抗原6×His-OVA。每孔加入100μL用PBS稀释的人工抗原6×His-OVA,4℃,包被过夜,每轮淘选的包被浓度分别为100,75,50μg/mL;吸出包被液,PBS洗板3次,每孔加入300μL 3%脱脂乳(in PBS),37℃,封闭2h;PBS洗板6次,加入100μL噬菌体抗体文库(约含 2×10^{11} CFU),37℃,孵育1.5h;吸出未结合的噬菌体,用PBST(含0.5%Tween-20)洗板5次(逐轮增加5次),再用PBS洗板10次(洗板次数逐轮增加5次);以100μL洗脱液(甘氨酸-盐酸,pH 2.2)洗脱吸附在酶标孔中的噬菌体,用50μL Tris-HCl(1moI/L,pH 8.0)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。

[0035] 经三轮淘选后,采用辅助噬菌体KM13对随机挑取的单克隆进行救援,分别得到展示抗体可变区的噬菌体颗粒,再用间接phage-ELISA测定噬菌体颗粒的结合活性和特异性,实验设定对照,具体加样步骤见表2。

[0036] 表2间接phage-ELISA加样表

	实验组	对照 a	对照 b
不含 His 标签的			
包被	His 标签融合蛋白	蛋白(同实验组 蛋白)	OVA
[0037] 封闭	1×Blocking buffer (3%脱脂牛奶 W/V)		
结合	噬菌体	噬菌体	PBS
二抗		HRP/anti-M13	

[0038] 将ELISA阳性克隆送生物技术服务公司进行序列测定,得到插入片段的DNA序列,其编码针对His标签的单域重链抗体,具体如下(SEQ ID NO.:2):

[0039] CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAATCTCTGAGGCTCTCCTGTTCC
GCCCTGGATTCACTTTAACAAATTGGACTAGCCTGGTCCGCCAGGCTCCGGAAAGGAGCGTGAAGAGGTGGC
GTGTATTAGAAGTCACGGTGTCCGGACACATTATGGCCCTCCGTAGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAGCG
ACAACAAGGCACTTGGCTACAAATGAACGATCTGAAACCTGAGGACTCAGCCGTCTATTACTGTGCAGCGGATCCG
GTACCGGCCAACCTCGATACATGTGTTACAACGGATATGATTACTGGGCCTGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
A

[0040] 依据DNA测序结果及密码子表可获得针对黄曲霉毒素的单域重链抗体的氨基酸序列(SEQ ID NO.:1):

[0041]

QVQLVESGGGLVQPGQSLRLSCSAPGFTFNNFGLAWFRQAPGKEREELVACIRSHGVRTHYGA
SVEGRFTISRDSDNK
ALWLQMNDLKPEDSAVYYCAADPVPA
NFDTCVHNGYDYWGLGTQTVSS。

[0042] 实施例3:

[0043] 抗His标签单域重链抗体的规模制备

[0044] 编码抗His标签单域重链抗体的DNA片段的获取:1.采用限制性内切酶Sfi I/Not I,双酶切噬菌粒pHEN-抗His标签单域重链抗体基因,琼脂糖凝胶电泳回收抗His标签单域重链抗体基因;2.直接将抗His标签单域重链抗体编码序列送生物技术服务公司进行化学合成;3.设计特异性引物,通过PCR技术从羊驼(Lama pacos)来源的cDNA库中扩增。

[0045] 将得到的抗His标签单域重链抗体基因片段克隆至表达载体pET25-fFlag(已将载体本身所带His标签替换为Flag标签:DYKDDDDK),经PCR和酶切鉴定,构建完成抗His标签单域重链抗体的大肠杆菌表达质粒。

[0046] 将表达质粒转化至大肠杆菌BL21,挑取单菌落进行诱导表达。将单菌落接入4mL LBA(Luria-Bertani broth with 100 μ g/mL ampicillin)液体培养基中,37℃、250r/min振荡培养12h;以1%培养基体积的接种量将其转接到50mL LBA液体培养基中,37℃、250r/min振荡培养至OD₆₀₀达到0.5(约需2.5~3h),加入终浓度0.1mM的IPTG,30℃、200r/min诱导培

养。

[0047] 诱导培养物8000r/min离心,在细胞沉淀中加入20mL磷酸缓冲液(pH 7.4)混匀,8000r/min离心,去上清,保留细胞沉淀;在细胞沉淀中加入10mL相同缓冲液,混匀,冰上超声波细胞破碎处理,超声破碎条件为200W,破碎2s,间歇3s,共240个循环,在4℃下对细胞破碎物12000r/min离心20min,取上清进行亲和层析纯化和SDS-PAGE电泳分析,或在上清中加入终浓度30%的甘油,混匀,保存于-20℃冰柜待用。

[0048] 通过优化诱导表达条件(如宿主菌、表达载体、诱导培养时间、温度以及IPTG浓度等),可以进一步提高目的蛋白(单域重链抗体)表达量,为大量制备抗His标签单域重链抗体提供了途径。

[0049] 实施例4:

[0050] 抗His标签单域重链抗体的融合表达

[0051] 将本发明抗His标签单域重链抗体基因克隆至融合表达载体pAP(含有碱性磷酸酶基因),经PCR和酶切鉴定,构建完成抗His标签单域重链抗体的碱性磷酸酶融合表达质粒。

[0052] 碱性磷酸酶可以非特异性催化磷酸单酯水解生成无机磷酸和相应的醇、酚或糖类化合物。该酶常作为信号元件用于ELISA、免疫印迹、组织化学等检测方法。融合表达质粒将抗His标签单域重链抗体融合于碱性磷酸酶的N端,参考应用实例3中的表达方法,可以在大肠杆菌中表达、纯化出融合蛋白AP-抗His标签单域重链抗体。

[0053] 实施例5:

[0054] 抗His标签单域重链抗体用于亲和纯化材料的制备

[0055] 将重组表达的抗His标签单域重链抗体与固相载体琼脂糖偶联,具体方法如下:

[0056] 将CNBr活化的琼脂糖干胶用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,加入抗His标签单域重链抗体(2mg/每克琼脂糖微球),室温反应4h,使抗His标签单域重链抗体与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被胶体积的磷酸缓冲液(10mM,pH 7.4)和醋酸缓冲液(0.1M,pH 4.0)交替洗涤3次,得到共价偶联了抗His标签单域重链抗体的免疫亲和吸附材料。

[0057] 固相载体材料不限于琼脂糖凝胶,也可以选用硅球、纳米磁珠等。

SEQUENCE LISTING

<110> 北京大学

<120> 一种特异性识别组氨酸标签的纳米抗体

<130> 2016

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttggcacagc ctggcaatc tctgaggc tc 60

[0001] tctgttccg cccctggatt cactttaac aattttggac tagcctggtt ccgcaggct 120

ccggaaagg agcgtgaaga ggtggcggtt attagaagtc acgggtccg gacacattat 180

ggcgcctccg tagagggccg gttcaccatc tccagagaca ggcacaacaa ggactttgg 240

ctacaaatga acgatctgaa acctgaggac tcagccgtct attactgtgc agcggatccg 300

gtacccggcca acttcgatac afgtgtcac aacggatatg attactgggg cctggggacc 360

caggteaceg tctctca 378

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Pro Gly Phe Thr Phe Asn Asn Phe
 20 25 30

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

Ala Cys Ile Arg Ser His Gly Val Arg Thr His Tyr Gly Ala Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Asp Asn Lys Ala Leu Trp
 65 70 75 80

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

Ala Ala Asp Pro Val Pro Ala Asn Phe Asp Thr Cys Val His Asn Gly
 [0002] 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 引物

<400> 3

cttggtggtc ctggctgc 18

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> 引物

<220>

<221> misc_feature
<222> (44)..(44)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)..(47)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 4
tcgccccca gccccatg gccagktgc agctcggttga gtcnggggg

49

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> 引物

<400> 5
cgagtgcggc cgccgggtct tcgctgtgt gcg

33

[0003] <210> 6
<211> 34
<212> DN
<213> 引物

<400> 6
cgagtgcggc cgcttgtgg tttggtgtct tggg

34

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 引物

<400> 7
ggtaacgtgct gttgaactgt tcc

23

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> 引物

<400>	8	
	agcggataac aattcacac agga	24
	<210> 9	
[0004]	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 引物	
<400>	9	
	gccccatca gatccttc	20

专利名称(译)	一种特异性识别组氨酸标签的纳米抗体		
公开(公告)号	CN106146656A	公开(公告)日	2016-11-23
申请号	CN201610531515.3	申请日	2016-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	林坚 周鹏		
发明人	林坚 周鹏		
IPC分类号	C07K16/00 C07K1/22 C12N15/13 G01N33/68 G01N33/53 B82Y30/00 B01J20/24 B01J20/281 B01J20/30 B01D15/38		
CPC分类号	C07K16/005 B01D15/3804 B01J20/24 B01J20/281 B82Y30/00 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/569 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	刘华		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明属于基因工程领域，涉及一种特异性识别组氨酸标签的纳米抗体，具体为针对组氨酸标签的单域重链抗体，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。

引物名称	序列
AlpVh-LD	5'-CTTGGTGCTCTGGCTGC-3'
AlpVh-SH1	5'- <u>tcgcggcc</u> ccatggccAGKTCAGCTCGTGAGTCNGGNNG-3'
AlpVHHR1-NotI	5'- <u>cgttgtcc</u> GGGTCTTCGCTGTGGTGGC-3'
AlpVHHR2-NotI	5'- <u>cgttgtcc</u> TTGTGGTTTGGTGTCTGGG-3'
CH ₂ -R	5'-GGTACCTGCTGTGAACCTTCC-3'
M13-R	5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'
pHEN-R	5'-GCCCATTCAGATCCTCTTC-3'