

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510112199.8

[51] Int. Cl.  
C07K 16/18 (2006.01)  
C07K 16/40 (2006.01)  
C12P 21/02 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年9月6日

[11] 公开号 CN 1827648A

[22] 申请日 2005.12.29

[21] 申请号 200510112199.8

[71] 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 张茂祥 陈金中 朱焕章 薛京伦  
贾韦国

[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 5 页 附图 3 页

[54] 发明名称

Φ C31 整合酶多克隆抗体及其应用

[57] 摘要

本发明属生物技术和基因治疗技术领域，具体为一种 Φ C31 整合酶的多克隆抗体及其制备方法和应用。首先表达和纯化 Φ C31 蛋白，然后由纯化的 Φ C31 蛋白直接与佐剂相混合，注射免疫动物，如家兔、小鼠、大鼠等，即制得 Φ C31 多克隆抗体。该多克隆抗体可用于特异性的识别人类 293 细胞经质粒转染表达的 Φ C31 整合酶的蛋白，也可用于检测标本中的 Φ C31 蛋白的分布，或用于封闭 Φ C31 整合酶的体外活性。

1、一种 $\Phi$ C31 整合酶多克隆抗体，其特征在于由纯化的约 68Kda 的 $\Phi$ C31 蛋白直接与佐剂相混合后注射免疫动物而制备获得。

2、一种 $\Phi$ C31 整合酶多克隆抗体的制备方法，其特征在于步骤如下：用纯化的约 68Kda 的 $\Phi$ C31 蛋白直接与佐剂相混合，然后注射免疫动物，制得所需多克隆抗体。

3、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于所述纯化的约 68Kda 的 $\Phi$ C31 蛋白的制备步骤如下：链霉菌噬菌体 $\Phi$ C31 的 cDNA 的质粒 pCMVint 为模板，用 *SpeI* 和 *XhoI* 酶切质粒 pCMVint，回收 1.8kb 的 DNA 片断，然后连接到经 *XbaI* 和 *Sall* 酶切回收原核表达载体 pMAL-p2X 上，连接液转化大肠杆菌 TOP10 中，经测序鉴定正确后，将质粒 p2X- $\Phi$ C31 转化到 TB1 菌株中，进行大量诱导表达；对大量诱导表达的菌体经超声破菌后，用 Amylose 亲和柱纯化出 MBP- $\Phi$ C31 蛋白，用 Micon Ultrafiltration-15 浓缩纯化的蛋白；对浓缩后纯化的融合蛋白用 Xa Factor 进行蛋白酶切，在约 68kDa 处出现预期的条带；对经 Xa Factor 蛋白酶切纯化的 MBP- $\Phi$ C31 蛋白后的产物，用过量的 Amylose 亲和柱过柱，流出液即为纯化的约 68kDa 的 $\Phi$ C31 蛋白。

4、根据权利要求 1 所述的 $\Phi$ C31 整合酶多克隆抗体用于特异性识别人胚胎胃细胞系 293 细胞经质粒转染表达的 $\Phi$ C31 整合酶蛋白，或者用于检测标本中的 $\Phi$ C31 蛋白的分布，或者用于封闭 $\Phi$ C31 整合酶的体外活性。

## ΦC31 整合酶多克隆抗体及其应用

### 技术领域

本发明属生物技术与基因治疗技术领域，具体涉及一种 ΦC31 整合酶的功能性表达、纯化方法和相应的多克隆抗体及其应用。

### 背景技术

噬菌体 ΦC31 整合酶作为丝氨酸重组酶家族的一员，在哺乳动物细胞中，ΦC31 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。

1998 年，Smith 等用硫酸胺沉淀法首次纯化出约 68KD 的原核表达的 ΦC31 整合酶，其可以与特异性的核苷酸序列 *attP*, *attB*, *attL*, *attR* 结合。凝胶漂移实验证明 ΦC31 整合酶可以介导不可逆的重组反应。突变分析表明，ΦC31 整合酶的 12 位的丝氨酸突变会失活其催化重组反应的能力，但并不改变其体外结合特异性 DNA 序列的能力。

Calos 等人使用噬菌体 ΦC31 整合酶的真核表达质粒应用于哺乳动物细胞，表现了长期的目的基因的表达和特异性定点的整合在染色体上。说明其应用于基因治疗和转基因动物方面的可行性前景。Kuhn 等加 SV40 的带有核定位信号的 11 氨基酸的多肽到噬菌体 ΦC31 整合酶的 C 端，融合蛋白的整合效率提高了大约 40%。ΦC31 整合酶在哺乳动物细胞内的整合机理，细胞定位和毒性等目前还没有说明。

本发明以原核表达系统表达了 ΦC31 整合酶，经体外检测其的活性，并以纯化的 ΦC31 整合酶蛋白为抗原，制备了抗 ΦC31 整合酶的多克隆抗体。该多克隆抗体经证明其可以特异性识别并结合 ΦC31，可以用于检测 ΦC31 蛋白和封闭 ΦC31 整合酶的作用。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种 ΦC31 整合酶多克隆抗体及其制备方法和应用。

本发明提出的 ΦC31 整合酶多克隆抗体的制备方法如下：

使用常规方法（分子克隆指南，1998 年第二版，萨姆布鲁克等著，科学出版社）制备 ΦC31 蛋白的多克隆抗体。基本过程为：

(1) 首先表达和纯化 ΦC31 蛋白。链霉菌噬菌体 ΦC31 的 cDNA (Genbank No: X59938) 的质粒 pCMVint (Calos 等构建) 为模板，用 *SpeI* 和 *XhoI* 酶切质粒 pCMVint, 回收 1.8kb 的 DNA 片断，然后连接到经 *XbaI* 和 *SaII* 酶切回收原核表达载体 pMAL-p2X (New England 公司) 上，连接液转化大肠杆菌 TOP10 (Novagen 公司) 中，经测序鉴定正确后，将质粒

p2X- $\Phi$ C31 转化到 TB1 菌株 (New England 公司) 中, 进行大量诱导表达。为保证其活性, 条件为: 37°C, 4-6 小时, IPTG 0.1-0.5mM。对大量诱导表达的菌体经超声破菌后, 用 Amylose 亲和柱 (New England 公司) 纯化出 MBP- $\Phi$ C31 蛋白, 如图 1 的 SDS-PAGE 检测所示, 细菌裂解液中有 116kDa 处有预期的条带。用 Micon Ultrafiltration-15 (Millipore 公司) 浓缩纯化的蛋白。对浓缩后纯化的融合蛋白用 Xa Factor (New England 公司) 进行蛋白酶切, 在约 68kDa 处出现预期的条带; 对经 Xa Factor 蛋白酶切纯化的 MBP- $\Phi$ C31 蛋白后的产物, 用过量的 Amylose 亲和柱过柱, 流出液即为纯化的约 68kDa 的  $\Phi$ C31 蛋白 (见图 1)。

(2) 制备链霉菌噬菌体  $\Phi$ C31 的多克隆抗体。用纯化的约 68kDa 的  $\Phi$ C31 蛋白直接与佐剂相混合, 免疫动物注射 (家兔, 小鼠, 大鼠等), 制得链霉菌噬菌体  $\Phi$ C31 多克隆抗体。例如, 每次用 0.1mg 纯化的  $\Phi$ C31 蛋白加上弗氏佐剂 (Sigma 公司) 免疫家兔, 每隔 10 天加强免疫共 4 次, 用颈动脉取血法接取兔血清, 沉淀离心后得到兔血清。采用 10ug/ml 的  $\Phi$ C31 蛋白包被滴定板进行 ELISA 测定抗体的滴度, 抗体效价分析表明抗体效价达到 1:5000 (见图 2)。

$\Phi$ C31 整合酶的多克隆抗体的应用。(1) 蛋白免疫印记实验证明多克隆抗体可以特异性的与  $\Phi$ C31 蛋白结合 (见图 3)。制备的多克隆抗体可以特异性的识别人类胚肾胃细胞系 293 细胞经质粒转染表达的  $\Phi$ C31 整合酶的蛋白。(2) 利用免疫荧光组织化学技术,  $\Phi$ C31 的多克隆抗体可以检测标本中的  $\Phi$ C31 蛋白的分布, 用罗丹明标记的羊抗兔抗体显色表现为红色 (见图 4(c), 图中为灰色部分)。(3)  $\Phi$ C31 的多克隆抗体在体外封闭  $\Phi$ C31 整合酶的作用。活性的  $\Phi$ C31 整合酶蛋白可以在体外结合并催化 DNA 的重组反应, 利用  $\Phi$ C31 的多克隆抗体和活性  $\Phi$ C31 整合酶混合后, 检测  $\Phi$ C31 整合酶的活性, 经琼脂糖凝胶电泳检测证明封闭后的  $\Phi$ C31 整合酶失去活性 (见图 5)。

#### 附图说明

图 1. 噬菌体整合酶  $\Phi$ C31 的表达与纯化 (SDS-PAGE 检测, 考马斯亮兰染色): 条带 1 是未诱导的重组菌, 条带 2. 诱导后重组菌, 条带 3. 超声后上清, 条带 4. 超声后沉淀, 条带 5. 经 Amylose 纯化后的产物, 主要是 MBP- $\Phi$ C31 融合蛋白; 条带 6. 经 Xa Factor 因子酶切, 亲和层析后的最终产物, 主要为  $\Phi$ C31 融合蛋白。条带 7 是蛋白分子量 Markers。

图 2. 噬菌体整合酶  $\Phi$ C31 的多克隆抗体效价测定: 整合酶  $\Phi$ C31 兔多克隆抗体的效价为 1:5000。

图 3. 兔多克隆抗体特异性识别人 293 细胞表达的整合酶  $\Phi$ C31。

图 4. 整合酶  $\Phi$ C31 多克隆抗体检测 COS-7 细胞表达的  $\Phi$ C31 分布, 图 4(c) 中灰色表示

ΦC31 主要分布在 C0S-7 细胞的细胞质中。图 4(B)中灰色表示 DAPI 染色所示的细胞核。

图 5. ΦC31 多克隆抗体封闭体外 ΦC31 活性图示。其中, A 为整合酶 ΦC31 检测活性的策略。B 为活性的 ΦC31 作用琼脂糖电泳的结果。C 为活性 ΦC31 作用后转化细菌和蓝白斑检测结果。D 为 ΦC31 抗体封闭其活性后的玉脂糖电泳的检测结果。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例子, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例子仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例子中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如分子克隆指南(1998 年第二版, 萨姆布鲁克等著, 科学出版社)中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

#### 1. 噬菌体整合酶 ΦC31 蛋白的构建, 表达, 纯化:

噬菌体整合酶 ΦC31 的表达质粒的构建: 用 *Spe*I 和 *Xho*I 酶切质粒 pCMVint, 回收 1.8kb 的片断, 用博大泰克公司的试剂盒纯化. *Xba*I 和 *Sa*II 双酶切并回收 7.3kb 的表达载体 pMAL-p2X (New England 公司产品)。用连接试剂盒 (TAKARA 公司) 连接上述两个 DNA 片断。连接产物转化用氯化钙法大肠杆菌 TOP10, 在含氨苄青霉素 (终浓度 50 μg/ml) 的 LB 平板培养过夜后, 用菌落 PCR 方法筛选阳性克隆, 并进行测序。DNA 序列分析结果表明 DNA 序列与链霉菌噬菌体 ΦC31 的 cDNA (Genbank No: X59938) 序列完全相同。

噬菌体整合酶 ΦC31 的表达纯化: 然后用氯化钙法将测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) plySs (Novagen 公司产品)。宿主菌 BL21 (p2X-ΦC31) 在 37°C 培养至对数生长期, 加入 IPTG 为 0.1-0.3 mmol/L, 37°C 继续培养 4-6 小时。离心收集菌体, 经超声波破碎菌体, 离心收集上清, 用能与麦芽糖结合蛋白 (MBP) 结合的亲和层析柱 Amylose (New England 公司产品) 进行层析, 得到了纯化的 MBP-ΦC31 融合蛋白。融合蛋白被 Factor Xa 酶切后, 用过量的 Amylose 亲和柱层析, 流出液主要为 ΦC31 蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳, 在 68kDa 处得到一单一的条带。

#### 2. 噬菌体整合酶 ΦC31 蛋白的多克隆抗体制备及其效价测定:

多克隆抗体的生产可用纯化的 ΦC31 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。

用 0.1mg 上述 ΦC31 蛋白加上完全弗氏佐剂免疫家兔, 每隔 10 天后再用 ΦC31 蛋白加不完全弗氏佐剂加强免疫四次。采用经 10 μg/ml 的 ΦC31 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 中分离多克隆抗体。ELISA 实验的抗体效价分析表明, 抗体效价达到 5000:1。

### 3. 噬菌体整合酶 $\Phi$ C31 蛋白的多克隆抗体的特异性检测:

制备表达  $\Phi$ C31 蛋白的 293 细胞裂解液:  $10^5$  的 293 细胞 (ATCC 细胞库), 接种培养在  $25\text{cm}^2$  的培养板上, 细胞培养基为 DMEM (Gibco 公司产品), 含氨苄青霉素  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ , 链霉素  $25\mu\text{g}/\text{ml}$ , 小牛血清 10%,  $5\%\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  培养。当细胞铺板率达到 90% 时, 利用脂质体试剂 (Invitrogen 公司产品) 混合  $5\mu\text{g}$  的 pCMVint 质粒转染细胞, 7-10 小时后换新的细胞培养液, 培养 48-60 小时后, 收获细胞。加蛋白质电泳上样缓冲液,  $100^\circ\text{C}$  煮沸 5 分钟, 离心后进行 SDS-PAGE。

蛋白免疫印记检测: 上述制备的细胞裂解液按照常规方法的 SDS-PAGE 以后, 电转印制备印记膜。10% 小牛血清封闭非特异性结合位点, 加入  $\Phi$ C31 的多克隆抗体 (1:500), 在  $37^\circ\text{C}$  放置 1 小时, PBS 溶液清洗后, 常规 DAB 试剂显色 (Tiangen 公司)。Western blot 实验证明多克隆抗体可特异性地与  $\Phi$ C31 结合。

### 4. 利用 $\Phi$ C31 多克隆抗体检测 $\Phi$ C31 的细胞内位置和分布:

对表达  $\Phi$ C31 蛋白的哺乳动物细胞标本, 经 PBS 清洗, 多聚甲醛固定后, 使用  $\Phi$ C31 的多克隆抗体包被, 罗丹明标记的第二抗体作用和 DAPI 对细胞核染色。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  $\Phi$ C31 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  $\Phi$ C31 整合酶。抗  $\Phi$ C31 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, 也可以用于检测跟踪活体标本中的  $\Phi$ C31 蛋白和突变修饰的  $\Phi$ C31 蛋白的位置和分布。

### 5. $\Phi$ C31 多克隆抗体体外封闭 $\Phi$ C31 活性的方法:

噬菌体整合酶  $\Phi$ C31 蛋白具有重组酶的功能, 在体外和体内试验中能够识别特异性的 DNA 序列 (attP 34bp 和 attB 39bp), 重组形成不能被整合酶  $\Phi$ C31 识别的 attL 和 attR 序列 (各包含 attP 和 attB 序列的一半组成)。整合酶  $\Phi$ C31 介导的重组反应受识别特异性的 DNA 序列的方向的影响, 当 attP 和 attB 在两个 DNA 分子上时, 重组整合成为一个分子。当 attP 和 attB 同在一个 DNA 分子上时, 依赖他们序列中的 TTG 为方向, 同向重组删除, 反向颠倒 attP 和 attB 之间的 DNA 序列。根据整合酶  $\Phi$ C31 介导同在一个 DNA 分子同向的 attP 和 attB 重组的原理, 我们用 pBCBP+ 分子 (Calos 等构建) 作底物, 由整合酶  $\Phi$ C31 介导重组删除反应, 形成两个小的 DNA 分子, pBC-attL 和 pBC-attR (见图 5-A)。探索的条件为:  $20\text{mmol}/\text{L}$  HEPES (PH8.5),  $100\text{mmol}/\text{L}$  KCl,  $10\text{mM}$  Dithiothreitol,  $0.01\%$  BSA) 在  $30^\circ\text{C}$  孵育 20 小时后, 经转化细菌后的蓝白斑鉴定, 白斑代表重组的产物 pBC-attL 的细菌 (见图 5-C)。另外还可以对体外重组产物在进行过量的限制性内切酶的作用, 使得产物线性化, 进行琼脂糖电泳鉴定结果 (见图 5-B)

---

ΦC31多克隆抗体可以特异性与ΦC31蛋白结合，从而可以封闭ΦC31活性。利用体外将ΦC31多克隆抗体与纯化的活性ΦC31蛋白共孵育后，再进行整合酶ΦC31蛋白介导DNA体外重组实验（实施步骤见上述），结果表明抗体在体外完全封闭了ΦC31活性，使其失去介导DNA重组反应的能力（见图5-D）。

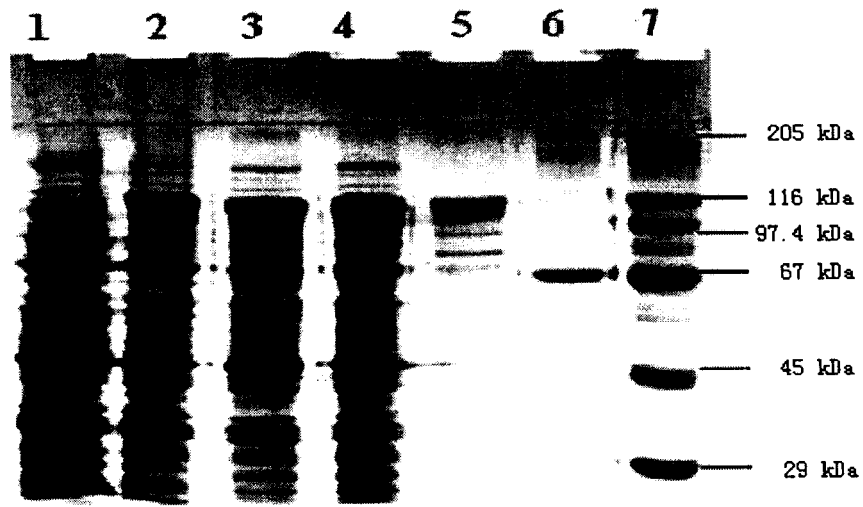


图 1

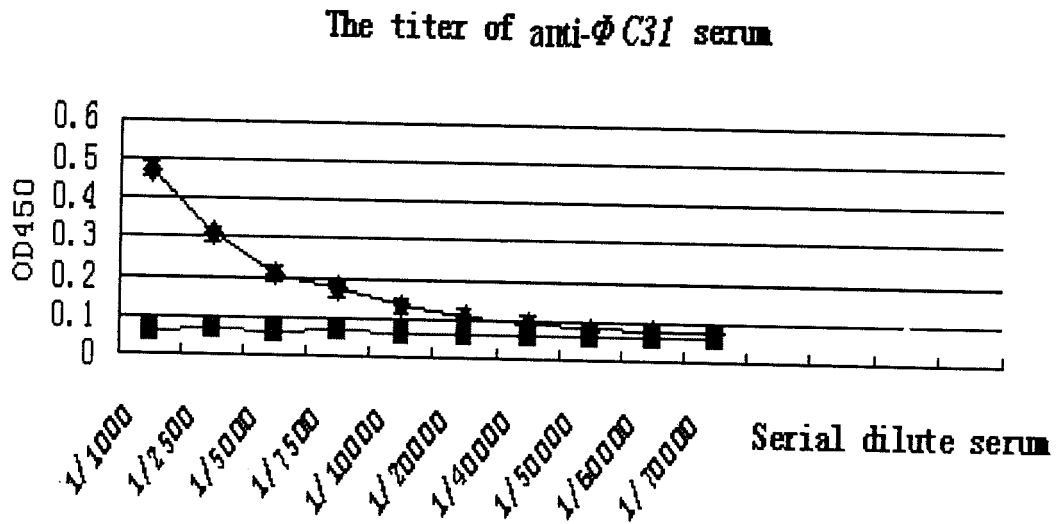
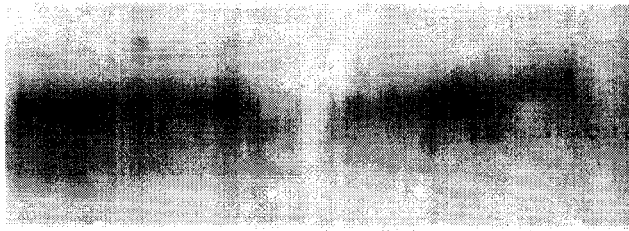


图 2



$\Phi$ C31

图 3

1

2

3

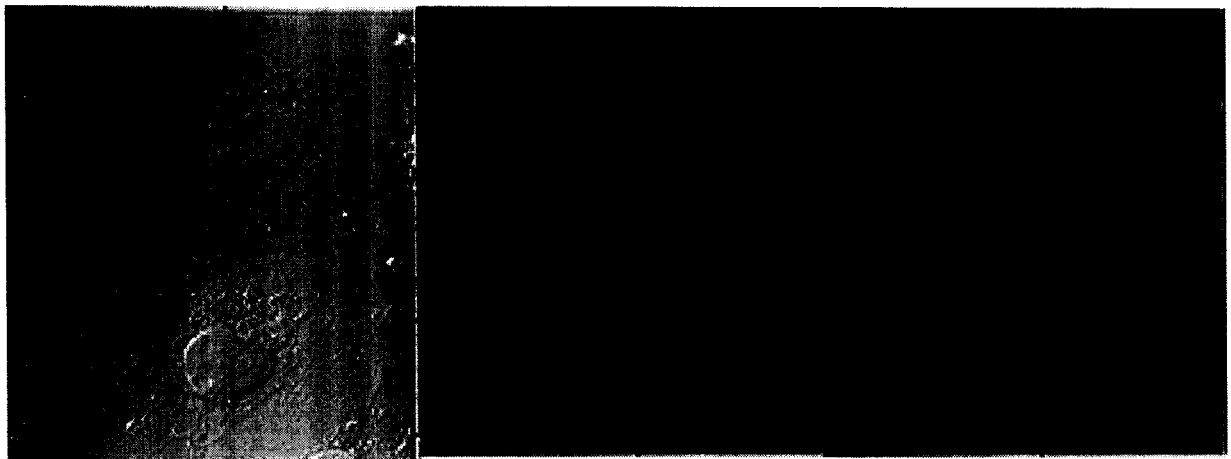


图 4

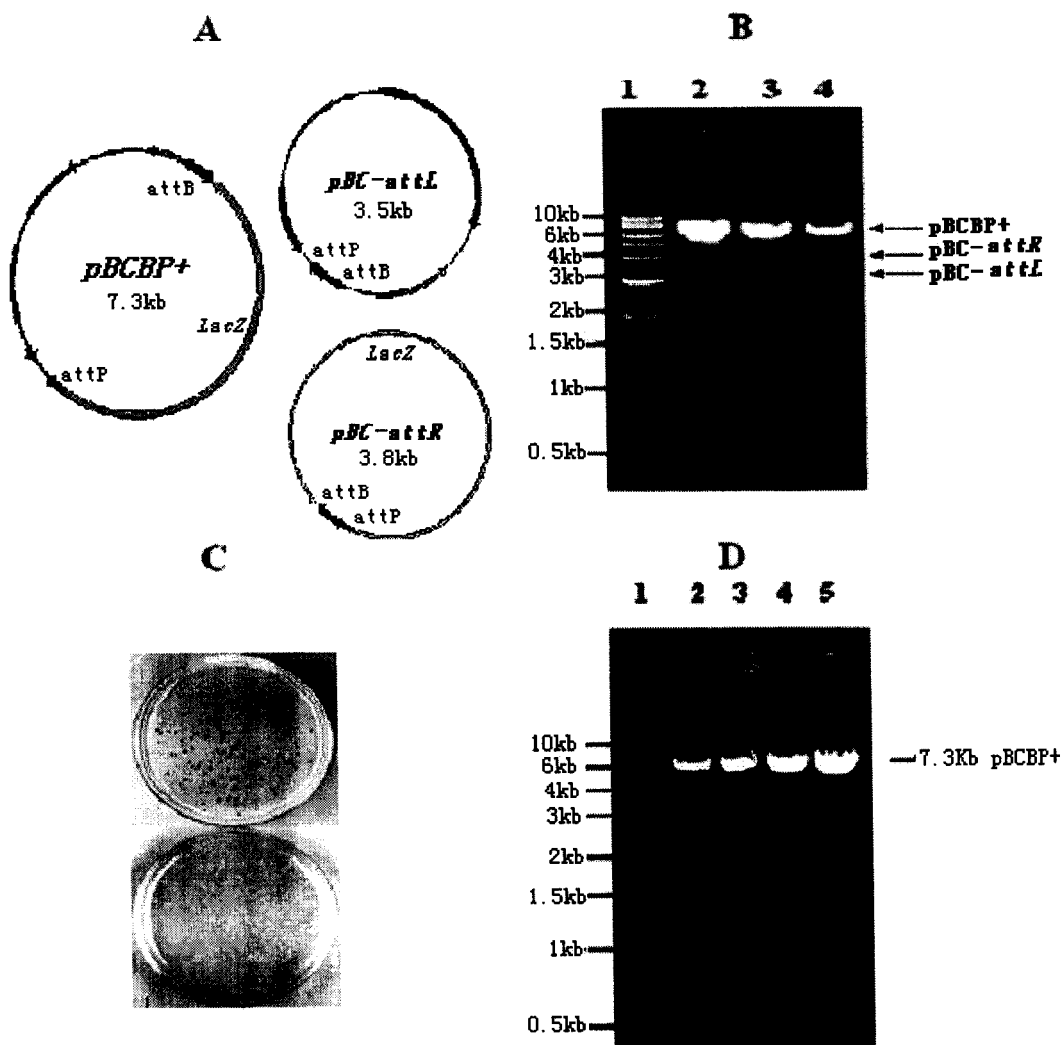


图 5

专利名称(译)	ΦC31整合酶多克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1827648A</a>	公开(公告)日	2006-09-06
申请号	CN200510112199.8	申请日	2005-12-29
[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	张茂祥 陈金中 朱焕章 薛京伦 贾韦国		
发明人	张茂祥 陈金中 朱焕章 薛京伦 贾韦国		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/40 C12P21/02 G01N33/53		
代理人(译)	陆飞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属生物技术和基因治疗技术领域，具体为一种ΦC31整合酶的多克隆抗体及其制备方法和应用。首先表达和纯化ΦC31蛋白，然后由纯化的ΦC31蛋白直接与佐剂相混合，注射免疫动物，如家兔、小鼠、大鼠等，即制得ΦC31多克隆抗体。该多克隆抗体可用于特异性的识别人类293细胞经质粒转染表达的ΦC31整合酶的蛋白，也可用于检测标本中的ΦC31蛋白的分布，或用于封闭ΦC31整合酶的体外活性。

