

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610117198.7

[51] Int. Cl.

G12N 15/09 (2006.01)

G12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

G12N 1/21 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月23日

[11] 公开号 CN 101165178A

[22] 申请日 2006.10.17

[21] 申请号 200610117198.7

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市岳阳路 320 号

[72] 发明人 孙 兵 罗 敏 唐琳娜 蔡兴锋

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 发明名称

RBP4 抗体及其制法及用途

[57] 摘要

本发明公开了一种制备视黄醇结合蛋白的方法，本发明还公开了用所述方法获得的视黄醇结合蛋白，以及特异性抗本发明的视黄醇结合蛋白以及天然视黄醇结合蛋白的抗体。本发明首次高效地表达了视黄醇结合蛋白，所述的蛋白与天然的视黄醇结合蛋白(RBP4)非常接近，用该蛋白免疫动物可获得可灵敏地识别人体中天然的视黄醇结合蛋白的抗体，填补了以往在 RBP4 抗血清制备上的空白。

1. 一种制备视黄醇结合蛋白的方法，其特征在于，包括以下步骤：
 - (a) PCR 扩增获得视黄醇结合蛋白的编码序列；
 - (b) 将(a)所述的视黄醇结合蛋白的编码序列插入表达载体的多克隆位点中，获得插入了视黄醇结合蛋白编码序列的表达载体；
 - (c) 使(b)获得的插入了视黄醇结合蛋白编码序列的表达载体转入宿主细胞，获得转化的宿主细胞；
 - (d) 培养转化的宿主细胞，从而表达出视黄醇结合蛋白；
 - (e) 分离获得视黄醇结合蛋白。
2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述的表达载体为pET28a载体。
3. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述的宿主细胞为BL21表达型大肠杆菌。
4. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，在步骤(d)中，还包括用0.5±0.2mM IPTG诱导表达。
5. 一种通过权利要求1所述的方法制备的视黄醇结合蛋白。
6. 一种多克隆抗体，其特征在于，所述的多克隆抗体特异性地抗权利要求5所述的视黄醇结合蛋白。
7. 如权利要求6所述的多克隆抗体，其特征在于，所述的多克隆抗体与标记偶联，所述的标记选自：
辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、或生物素。
8. 一种单克隆抗体，其特征在于，所述的单克隆抗体是由杂交瘤细胞系S-18-16产生的。
9. 一种试剂盒，其特征在于，含有权利要求6-8任一所述的抗体。
10. 如权利要求9所述的试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒中还含有：
标记或显色剂。

RBP4抗体及其制法及用途

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及一种利用原核蛋白表达系统制备的视黄醇结合蛋白，其抗体及抗体的用途。

背景技术

视黄醇结合蛋白(Retinol Binding Proteins, RBPs)是一类在人体内负责从肝脏转运视黄醇至各靶细胞的运载蛋白，对视黄醇生理功能的发挥起着重要作用。目前已发现七种不同的 RBP 亚型，主要分布于血液循环系统(RBP4, 简称 RBP)、细胞(RBP1, RBP2, RBP5, RBP6, RBP7, 简称 CRBPs)和视网膜光感受器间(RBP3, 简称 IRBP)。1968年 Kanai 等首次从人体中分离发现 RBP, 随后在小鼠、大鼠及猪等动物中亦发现人 RBP 的同源蛋白。至今, RBP 的蛋白序列、蛋白晶体结构和生理学功能已得到充分的研究。在 RBP 各亚型中, RBP4 的应用性尤为显著。

RBP4(NM_006744)的蛋白大小为 21kDa, 含 184 个氨基酸残基和 3 个二硫键, 与全反式视黄醇结合, 是 α -球蛋白的一种[郭晓红, 储明星, 周忠孝, 视黄醇结合蛋白及其基因的分子生物学, 遗传, 26(2), 257-262, 2004]。RBP4 主要在肝脏中合成。除了肝脏, 肾脏、大脑、胰腺和心脏等器官也能合成 RBP4。不论其最终被转化成视黄酸、视黄醛还是维生素 A, 视黄醇均以全反式视黄醇的形式与 RBP4 结合, 且只有视黄醇才能触发 RBP4 的分泌[Helen M. Naylor and Marcia E. Newcomer, The structure of human retinol-binding protein with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP, Biochemistry, 38, 2647-2653, 1999]。

肝脏分泌的 RBP4-视黄醇与 Transthyretin(TTR)形成稳定的蛋白复合物在血液系统中循环。RBP-视黄醇-TTR 复合体的形成有助于防止小分子量的 RBP4 在肾脏中的损失, 同时还可能降低 RBP4 在血液循环中对胞间组织的渗入 [Marcia E. Newcomer and David E. Ong, Plasma retinol binding protein:

structure and function of the prototypic lipocalin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, 57-64, 2000]。RBP4-视黄醇-TTR 复合体进入血液系统之后,随着血流进入身体各组织,与靶细胞细胞膜上的RBP受体结合。此时,该复合体携带的视黄醇被释放,并转运到细胞内与CRBP结合,随后在辅酶II介导的脱氢酶和细胞视黄醛脱氢酶的作用下转变为视黄酸,从而调控多种基因的表达。RBP4-视黄醇-TTR复合体在视黄醇释放后解体,RBP4以游离的形式存在于血液系统中,游离的RBP4在肾近曲小管被重新吸收和分解。研究表明,人体液中RBP4的含量与一些疾病关系密切。当肾小管损伤时,尿液中RBP4含量会有不同程度的上调。在肝脏疾病(如慢性活动性肝炎)患者中,由于肝脏蛋白合成功能受损,与正常人($46.2 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$)相比,患者体内的RBP4浓度降低了55%左右($21.2 \pm 46 \mu\text{g/ml}$) [杨顺江,视黄醇结合蛋白的测定及其临床意义,国外医学临床生物化学与检验学分册,11(5),16-19,1990]。

目前RBP4的抗体均由天然纯化的蛋白免疫动物获得。人体中RBP4含量甚微(正常人血液及尿液中含量分别为40-50mg/L和0.1-0.2mg/24小时尿,肾小管病人尿液中含量一般大于1mg/24小时尿),此外RBP4的纯化繁琐、得率较低(1L血清仅纯化得到12mg RBP4,仅占RBP4总含量的30%)、成本较高[金宏,高兰兴,王宗印,许志勤,视黄醇结合蛋白的分离纯化及其抗血清的制备,生物化学与生物物理进展,20(6),1993]。因此获得天然纯化的RBP4较为困难。

原核蛋白表达系统具备外源基因的高通量表达、易于扩大再生产、低成本、菌体繁殖迅速、无转录后修饰和表达蛋白可被标记等优点[Niraj H Tolia & Leemor Joshua-Tor, *Strategies for protein coexpression in Escherichia coli*, *Nature Methods*, 55-64, Vol. 3 No. 1, Jan, 2006]。然而,目前现有技术中根据天然蛋白、利用原核表达系统制备的重组蛋白常常存在与天然蛋白不同的一些特点,造成用其制备的抗体难以检测出天然蛋白,或者检测效果不理想,无法达到临床的灵敏性要求。

发明内容

本发明的目的在于提供一种高效表达和纯化视黄醇结合蛋白的方法。

本发明的目的还在于提供抗视黄醇结合蛋白的抗体。

在本发明的第一方面,提供一种制备视黄醇结合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

- (a) PCR 扩增获得视黄醇结合蛋白的编码序列；
- (b) 将(a)所述的视黄醇结合蛋白的编码序列插入表达载体的多克隆位点中，获得插入了视黄醇结合蛋白编码序列的表达载体；
- (c) 使(b)获得的插入了视黄醇结合蛋白编码序列的表达载体转入宿主细胞，获得转化的宿主细胞；
- (d) 培养转化的宿主细胞，从而表达出视黄醇结合蛋白；
- (e) 分离获得视黄醇结合蛋白。

在本发明的另一优选例中，所述的表达载体为pET28a载体。

在本发明的另一优选例中，所述的宿主细胞为BL21表达型大肠杆菌。

在本发明的另一优选例中，在步骤 (d)中，还包括用 $0.5 \pm 0.2\text{mM}$ IPTG诱导表达。更优选的，用 0.5mM IPTG诱导表达。

在本发明的第二方面，提供一种通过所述的方法制备的视黄醇结合蛋白。

在本发明的第三方面，提供一种多克隆抗体，所述的多克隆抗体特异性地抗所述的视黄醇结合蛋白。

在本发明的另一优选例中，所述的多克隆抗体是如下制备的：用所述的视黄醇结合蛋白免疫动物，从动物体内分离多克隆抗体。

更优选的，所述的多克隆抗体如下制备：用所述的视黄醇结合蛋白免疫兔子，免疫量 $0.5 \pm 0.2\text{mg}$ (更优选的，免疫量为 0.5mg) 每只每次，每隔至少 2 周 (更优选的，每隔 3 周) 免疫 1 次，至少免疫 2 次 (优选的为免疫 3 次)，从兔血清中分离多克隆抗体。采用该步骤获得的多克隆抗体不仅稳定，而且具有特别良好的结合体内天然视黄醇结合蛋白的效果。

在本发明的另一优选例中，所述的多克隆抗体与标记偶联，所述的标记选自：辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、或生物素。

在本发明的第四方面，提供一种单克隆抗体，所述的单克隆抗体是由杂交瘤细胞系S-18-16产生的。

在本发明的第五方面，提供一种试剂盒，其中含有所述的抗体。

在本发明的另一优选例中，所述的试剂盒中还含有：标记或显色剂。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图1显示了 pET28a-RBP 诱导纯化。各泳道样品依次为：

1. 低分子量蛋白 marker，2. pET28a-RBP 诱导前菌体，3. pET28a-RBP IPTG(0.5mM) 诱导后菌体，4. 诱导后菌体超声破碎细胞上清，5. 诱导后菌体超声破碎细胞沉淀，6. 纯化的重组蛋白，7. 仅转化 pET28a 的 BL21 菌体诱导前对照，8. 仅转化 pET28a 的 BL21 菌体 IPTG(0.5mM) 诱导后对照。

图2显示了兔抗血清免疫印迹检测结果。

图3显示了鼠单抗免疫印迹检测结果。

图4兔抗血清ELISA检测结果。

具体实施方式

本发明人经过广泛的研究，发现采用基因工程手段，将编码视黄醇结合蛋白(RBP4)的基因导入到适当的原核表达系统中，可制备出一种在活性上与天然的视黄醇结合蛋白(RBP4)非常接近的重组视黄醇结合蛋白，用该蛋白免疫动物可获得灵敏地识别人体中天然的视黄醇结合蛋白的抗体，从而用于对相关疾病的诊断或检测。

表达视黄醇结合蛋白的方法

本发明提供了一种表达视黄醇结合蛋白的方法，所述方法包括：

- (a) PCR 扩增获得视黄醇结合蛋白的编码序列；
- (b) 将(a)所述的视黄醇结合蛋白的编码序列插入表达载体的多克隆位点中，获得插入了视黄醇结合蛋白编码序列的表达载体；
- (c) 使(b)获得的插入了视黄醇结合蛋白编码序列的表达载体转入宿主细胞，获得转化的宿主细胞；
- (d) 培养转化的宿主细胞，从而表达出视黄醇结合蛋白；
- (e) 分离获得视黄醇结合蛋白。

在另一优选例中，在步骤(a)和(b)之间，还包括步骤：对扩增获得的视黄醇结合蛋白的编码序列进行测序鉴定。

作为本发明的一种优选方式，所述的表达载体为 pET28a 载体(购自 Novagen 公司)，其中自带有 His 标签。

将表达载体引入到基因工程化的宿主细胞中，即可表达所述的蛋白。在本发明的优选方式中，采用的宿主细胞为大肠杆菌 BL21。

视黄醇结合蛋白的纯化

可采用许多蛋白纯化技术来纯化上述表达的视黄醇结合蛋白。包括(但不限于)：亲和层析、分子筛、柱层析、或细胞超声。

在本发明的优选方式中，为了便于蛋白纯化，将所述的视黄醇结合蛋白的编码基因克隆于携带 His 标签的表达载体中，在表达后，所述的视黄醇结合蛋白携带 His 标签，因此可通过亲和层析的方法来纯化所述的嗜视黄醇结合蛋白。在更优选的方式中，将得到的蛋白初提物用分子筛进行进一步的纯化，获得所需的纯化的蛋白。

抗视黄醇结合蛋白多克隆抗体的获得

通过将所述的视黄醇结合蛋白导入动物中来获得，优选地将视黄醇结合蛋白与弗氏佐剂按照适当比例(如 1:1)混合后免疫动物。免疫方法可使用兔皮下注射。兔免疫 1.5-4 个月(更优选的，为 2 个月左右)后，可从兔静脉血中收获抗血清并纯化，获得抗视黄醇结合蛋白多克隆抗体。

抗视黄醇结合蛋白单克隆抗体的获得

抗视黄醇结合蛋白单克隆抗体利用杂交瘤技术获得。

首先准备小鼠的脾脏细胞：用所述的视黄醇结合蛋白免疫小鼠，免疫 1.5-4 个月(更优选的，为 2 个月左右)后，取小鼠的脾脏细胞。优选的，在融合前 2-5 天做回忆刺激后再进行融合。

可采用常规的聚乙二醇(PEG)细胞融合方法进行细胞融合。

抗体的鉴定和分析

可使用正常人和肾小管疾病病人(其中含有天然的视黄醇结合蛋白)的尿液进行免疫试验,来分析抗体对于天然的视黄醇结合蛋白的特异性和敏感性。用免疫印迹检测方法或 ELISA 检测。

本发明的主要优点在于:

(1) 首次采用原核表达系统,高效地表达了视黄醇结合蛋白,所述的蛋白与天然的视黄醇结合蛋白(RBP4)非常接近,用该蛋白免疫动物可获得可灵敏地识别人体中天然的视黄醇结合蛋白的抗体。

(2) 首次采用原核表达的重组视黄醇结合蛋白获得了可识别和结合天然视黄醇结合蛋白的兔抗血清和鼠单抗。

(3) 以往,原料来源、纯化效率、纯化成本等因素直接限制了天然视黄醇结合蛋白的纯化。采用本发明的方法克服了上述的限制。而原核蛋白表达系统具备外源基因的高通量表达、易于扩大再生产、低成本、菌体繁殖迅速、无转录后修饰和表达蛋白可被标记等优点。

(4) 本发明所制备的RBP4兔抗血清能有效的用于病人尿液中RBP4的检测,填补了以往在RBP4抗血清制备上的空白。

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室指南(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1: 原核蛋白表达

本发明人抽提了人肝脏组织的 mRNA,以 GGCGGATTCCTGGGCAAGAT (SEQ ID NO: 1)为正向引物,以 GATGGGGAGAGAAGGGCAAA (SEQ ID NO: 2)为反向引物,并通过 RT-PCR 获得 RBP4 基因。克隆出的基因经测序验证不含有义突变。通过两端添加 BamH I 和 Xho I 酶切位点的引物(以 CGCGGATCCATGAAGTGGGTGTGGGCGCTCTT (SEQ ID NO: 3)为正向引物,以 CCGCTCGAGGCTACAAAAGGTTTCTTTCTGATC (SEQ ID NO: 4)为反向引物),本发明人将克隆的基因连接到 pET28a 载体的 BamH I 和

Xho I 位点中，获得 pET28a-RBP4 重组质粒。

之后，将该重组质粒转化到 BL21 表达型大肠杆菌中，在 0.5mM IPTG 条件下诱导，表达的蛋白主要存在于包涵体中。表达在包涵体中的 RBP4 蛋白通过载体自带的 His 标签纯化(纯化介质为 Amersham 公司的 Ni Sepharose High Performance)。纯化的蛋白溶于 8M 尿素溶液中(pH 8.0)，浓度 2mg/ml，共 10ml，20mg。

结果见图 1。各泳道样品依次为：1. 低分子量蛋白 marker，2. pET28a-RBP 诱导前菌体，3. pET28a-RBP IPTG(0.5mM) 诱导后菌体，4. 诱导后菌体超声破碎细胞上清，5. 诱导后菌体超声破碎细胞沉淀，6. 纯化的重组蛋白，7. 仅转化 pET28a 的 BL21 菌体诱导前对照，8. 仅转化 pET28a 的 BL21 菌体 IPTG(0.5mM) 诱导后对照。

实施例 2：动物免疫

用实施例 1 中纯化的 RBP4 免疫小鼠。Balb/c 小鼠免疫剂量：0.1mg 每只每次。肌肉多点注射。免疫程序：0，3，6 周三次免疫。融合前三天取 0.1mg 蛋白腹腔注射，做回忆刺激。

用实施例 1 中纯化的 RBP4 免疫兔子。大耳兔免疫剂量：0.5mg 每只每次。肌肉多点注射。免疫程序：0，3，6 周三次免疫。效价测评后取血。

实施例 3：杂交瘤细胞株的构建及单克隆抗体的制备

回忆刺激后三天做融合。取免疫后小鼠的脾脏细胞和鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 采用聚乙二醇(PEG) 常规融合法做融合。

融合后加 HAT 选择性培养基，筛选采用 ELISA 法，所用筛选用抗原为实施例 1 中纯化的 RBP4 蛋白。

经过三次有限稀释法克隆化筛选得到一株单克隆抗体，命名为 S-18-16。

实施例 4：尿液中 RBP4 蛋白的免疫印迹检测

正常人尿液共四例 N1，N2，N3，N4；肾小管疾病病人尿液共五例 P1，P2，P3，P4，P5。用本发明人制备的 RBP4 兔抗血清和鼠单抗对其进行免疫印迹检测。

免疫印迹实验：

在本实施例中，所用抗体为 RBP4 兔抗血清 (Protein G 纯化) 和鼠单抗 (细胞培养上清)。

实验流程如下：

1. SDS-PAGE:

样品：正常人尿液 N1, N2, N3, N4；肾小管疾病病人尿液 P1, P2, P3, P4, P5。

上样量：5ul

上层胶：3.5%，下层胶：12%，上层胶 100V 30 分钟，下层胶 150V 1 小时。

2. 转膜：

电流：200mA，90 分钟

3. 封闭：

5%脱脂奶粉封闭 2 小时 (兔抗血清)，3%BSA 封闭 2 小时 (鼠单抗)。

4. 杂交：

一抗：均 1:1000 稀释在相应的封闭液中，4℃杂交过夜。

二抗：羊抗兔 HRP (购自 Santa Cruze 公司)，1:5000 稀释；羊抗鼠 HRP (购自 Sigma 公司)，1:1000 稀释。均杂交 1 小时。

5. 显色：

实验结果见图 2 和图 3。结果表明，本发明人所制备的兔抗血清和鼠单抗均能有效的识别肾小管疾病病人尿液中的 RBP4，而对正常人尿液中的痕量 RBP4 没有反应 (免疫印迹法一般仅能检测 1ng 以上的目的蛋白，而实验时每个泳道本发明人仅加了 5ul 尿液，按照正常人尿液的 RBP4 水平，其中所含的 RBP4 不足 1ng)。

实施例 5：尿液中 RBP4 蛋白的 ELISA 检测

正常人尿液共四例 N1, N2, N3, N4；肾小管疾病病人尿液共四例 P1, P2, P3, P4。用本发明人制备的 RBP4 兔抗血清 (Protein G 纯化) 对其进行 ELISA 检测。

ELISA 实验：

1. 包被：

各尿液样本 1:25 稀释于包被液中。

阴性对照：BSA, 10ug/ml；阳性对照：实例 1 中纯化的 RBP4, 10ug/ml。

每孔加 50ul, 4°C 包被过夜。

2. 封闭:

封闭液: 5% BSA

每孔加 100ul, 37°C 2 小时。

3. 杂交:

一抗: RBP4 兔抗血清 1:1000 稀释于封闭液中, 每孔加 50ul, 37°C 2 小时。

二抗: 羊抗兔 HRP (购自 Santa Cruze 公司), 1:5000 稀释于封闭液中, 每孔加 50ul, 37°C 1 小时。

4. 显色。

结果见图 4。实验结果表明, 本发明人制备的兔抗血清能非常有效的识别肾小管病人尿液中的 RBP4 蛋白。

实施例 6 含有抗视黄醇结合蛋白抗体的试剂盒

所述的试剂盒中含有前述制备的抗视黄醇结合蛋白抗体。

此外, 所述的试剂盒中还含有羊抗兔 HRP 或羊抗鼠 HRP。

此外, 所述的试剂盒中还含有相应于羊抗兔 HRP 或羊抗鼠 HRP 的显色剂。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> RBP4抗体及其制法及用途

<130> 065776

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 1

ggcggattcc tgggcaagat

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 2

gatggggaga gaagggcaaa

20

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 3

cgcggatcca tgaagtgggt gtgggcgctc tt

32

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 4
ccgctcgagg ctacaaaagg tttctttctg atc

33

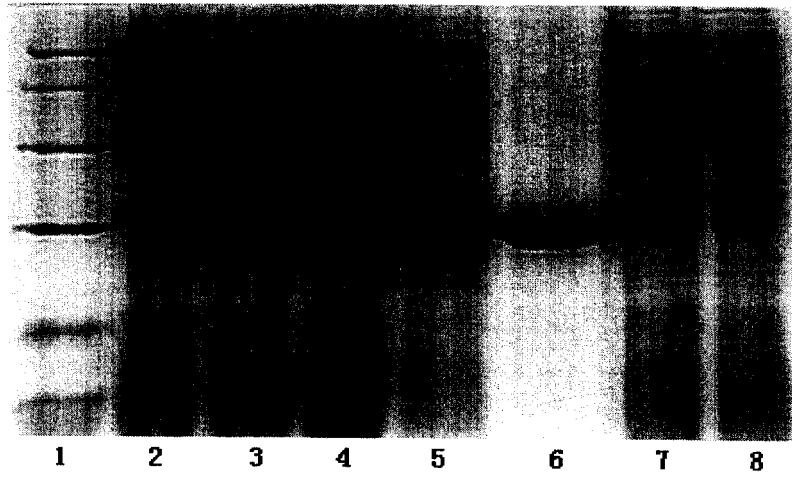


图 1



图 2



图 3

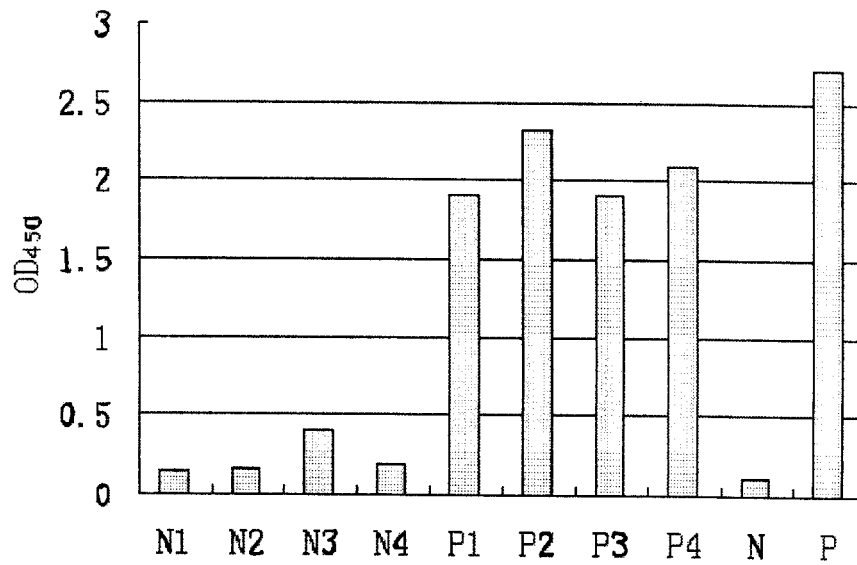


图 4

专利名称(译)	RBP4抗体及其制法及用途		
公开(公告)号	CN101165178A	公开(公告)日	2008-04-23
申请号	CN200610117198.7	申请日	2006-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	孙兵 罗敏 唐琳娜 蔡兴锋		
发明人	孙兵 罗敏 唐琳娜 蔡兴锋		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/12 C07K14/435 C12N1/21 C07K16/18 G01N33/53		
代理人(译)	徐迅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种制备视黄醇结合蛋白的方法，本发明还公开了用所述方法获得的视黄醇结合蛋白，以及特异性抗本发明的视黄醇结合蛋白以及天然视黄醇结合蛋白的抗体。本发明首次高效地表达了视黄醇结合蛋白，所述的蛋白与天然的视黄醇结合蛋白(RBP4)非常接近，用该蛋白免疫动物可获得可灵敏地识别人体中天然的视黄醇结合蛋白的抗体，填补了以往在RBP4抗血清制备上的空白。