



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105372415 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201510791972. 1

(22) 申请日 2015. 11. 17

(71) 申请人 武汉金开瑞生物工程有限公司

地址 430206 湖北省武汉市东湖高新区高新大道 666 号生物城创新园 B4 栋 B006 号

(72) 发明人 沈鹤霄 华权高 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.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

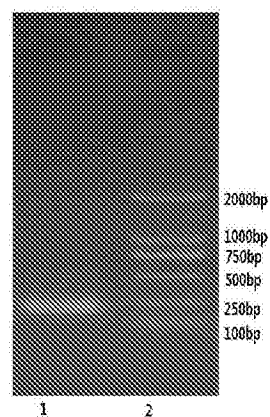
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种 DNA 标记抗体的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 DNA 标记抗体的方法, 采用异型双功能偶联剂活化抗体上的氨基, 通过共价键偶联巯基化 DNA, 形成 DNA 和抗体的复合物。通过本发明方法得到的 DNA 抗体复合物, 抗体和 DNA 分子比例固定, 可以用于免疫 PCR 等相应的实验。



1. 一种 DNA 标记抗体的方法,其特征在于,采用异型双功能交联剂活化的抗体偶联巯基化 DNA。

2. 如权利要求 1 所示的方法,其特征在于:所述巯基化 DNA 的制备方法是利用巯基化引物和普通引物不对称 PCR 扩增得到。

3. 如权利要求 2 所示的方法,其特征在于:所述不对称 PCR 扩增的巯基化引物和普通引物的比例为 50:1。

4. 如权利要求 1 所示的方法,其特征在于:所述异型双功能交联剂,一端是马来酰亚胺基团,一端是琥珀酰亚胺基团。

5. 如权利要求 4 所示的方法,其特征在于:所述异型双功能交联剂包括 MBS、Sulfo MBS、GMBS、Sulfo GMBS、EMCS、Sulfo EMCS、SMCC、Sulfo SMCC、SMPB 和 Sulfo SMPB。

6. 如权利要求 1 所示的方法,其特征在于:所述采用异型双功能交联剂活化的抗体制备方法为:将透析过的抗体和异型双功能交联剂按摩尔比以 1:5 的混合,异型双功能交联剂浓度 2mg/L,25℃搅拌反应 1 小时。

7. 如权利要求 1 所示的方法,其特征在于:先将巯基化标记 DNA 的二硫键用还原剂打断,脱盐后立即和活化的抗体等摩尔数混合,25℃反应 1 小时,加入 10 μL 1mol/L β-巯基乙醇终止反应,25℃反应 30min 后纯化。

8. 如权利要求 7 所示的方法,其特征在于:所述的纯化方法为磁珠法,在 PCR 产物和抗体的偶联物混合液中加入羧化的磁粒,然后用 PEG/NaCl 沉淀,使目的 DNA 吸附至磁珠,最后磁场分离被吸附的 DNA,经乙醇洗涤和用水洗脱完成纯化。

## 一种 DNA 标记抗体的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种 DNA 标记抗体的方法。

### 背景技术

[0002] 目前应用的 DNA 抗体偶联系统主要有:(1) 链亲和素化抗体 / 蛋白 A- 生物素化 DNA 系统 :Sano 等用链亲和素 / 蛋白 A 基因工程融合蛋白作为连接分子来连接生物素标记的 DNA 与抗体,此种融合蛋白的链亲和素部分可识别 DNA 上的生物素,蛋白部分可识别抗体的 Fc 段。但 Ruzicka 认为蛋白 A 不但可以结合特异性抗体的 IgG,而且还可以与样品中吸附于固相的无关抗体 IgG 结合,从而降低了反应的特异性,而且链亲和素 / 蛋白 A 融合蛋白没有商品化,不易进行推广。(2) 生物素化抗体 - 亲和素 - 生物素化 DNA 系统 :国内外更多的研究人员使用亲和素系统来连接 DNA 与抗体。这种偶联系统是由 Ruzicka 等率先引入免疫 PCR 技术的。其基本方法是先将亲和素和生物素化的 DNA 预结合成复合物,然后与结合固相的生物素化的特异性抗体结合。但是 1 个亲和素分子可以结合 4 个生物素分子,因此亲和素和生物素化的 DNA 预结合成复合物是高度不均一的,从而降低了准确性和可重复性。大多数学者采用分别加入生物素化抗体、游离亲和素和生物素化 DNA 分子的方法克服了以上缺点,但延长了检测周期,使检测步骤繁琐,增加了系统误差。(3) 抗体 - 叶绿素 - DNA 系统 :利用自然界广泛存在的叶绿素作为连接分子进行抗体与 DNA 的交联。这种方法具有较好的稳定性,且成本低,但该法叶绿素的提取和纯化及除交联外的其他过程均需在黑暗处进行,而交联却需在特定光下进行,故实际操作中很不方便。(4) 抗体 - DNA 系统 :还有一些学者用化学交联剂直接将 DNA 与抗体连接起来。使用的交联剂有聚乙烯亚胺和碳化二亚胺等一些双功能交联剂,Joerger 等的大致步骤是先将抗体马来酰亚胺化和 DNA 分子乙酰硫代乙酰化,然后将两者在黑暗条件下进行偶联,最后对交联产物进行纯化。该方法完全摆脱了生物素 - 亲和素系统的本身价态而造成的灵敏度和准确性下降的问题,也免去了几次洗涤步骤,减少了指示系统与固相载体的非特异结合,节省了时间。常用的偶联方法如戊二醛法、碳化二亚胺法等不可避免地会产生酶或抗体的自身交联产物或多聚物,致使偶联效率降低、结合物活性减弱。

### 发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足,提供一种 DNA 标记抗体的方法。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0005] 一种 DNA 标记抗体的方法,采用异型双功能交联剂活化的抗体偶联巯基化 DNA。

[0006] 进一步地,所述巯基化 DNA 的制备方法是利用巯基化引物和普通引物不对称 PCR 扩增得到。

[0007] 进一步地,所述不对称 PCR 扩增的巯基化引物和普通引物的比例为 50:1。

[0008] 进一步地,所述异型双功能交联剂,一端是马来酰亚胺基团,一端是琥珀酰亚胺基

团。

[0009] 进一步地,所述异型双功能交联剂包括 MBS、Sulfo MBS、GMBS、Sulfo GMBS、EMCS、Sulfo EMCS、SMCC、Sulfo SMCC、SMPB 和 Sulfo SMPB。

[0010] 进一步地,所述采用异型双功能交联剂活化的抗体制备方法为:将透析过的抗体和异型双功能交联剂按摩尔比以 1:5 的混合,异型双功能交联剂浓度 2mg/L,25℃ 搅拌反应 1 小时。

[0011] 进一步地,先将巯基化标记 DNA 的二硫键用还原剂打断,脱盐后立即和活化的抗体等摩尔数混合,25℃ 反应 1 小时,加入 10 μL 1mol/L β-巯基乙醇终止反应,25℃ 反应 30min 后纯化。

[0012] 进一步地,所述的纯化方法为磁珠法,在 PCR 产物和抗体的偶联物混合液中加入羧化的磁粒,然后用 PEG/NaCl 沉淀,使目的 DNA 吸附至磁珠,最后磁场分离被吸附的 DNA,经乙醇洗涤和用水洗脱完成纯化。

[0013] 本发明提供的 DNA 标记抗体的方法,采用异型双功能试剂作为偶联剂偶联抗体和 DNA,制备的 DNA 标记抗体可以用于免疫 PCR 试验,有反应步骤简单,偶联效率高等优点。虽然需要针对每一个特殊分析的抗体进行标记纯化,而且标记纯化过程比较繁琐,但当大量标记后进行推广时,标记纯化过程比较繁琐的缺陷也就不突出了;而且检测多种成分可以共用相同的指示系统和检测系统,进一步有利于标准化。

## 附图说明

[0014] 图 1 为本发明实施例 1 提供的免疫 PCR 反应后的电泳条带,可见泳道 1 位置 200bp 左右有明显扩增条带,证明 DNA 和抗体的偶联是成功的。

## 具体实施方式

[0015] 本发明实施例提供一种 DNA 标记抗体的方法,采用异型双功能交联剂活化的抗体偶联巯基化 DNA,通过合成巯基化引物来扩增得到巯基化的 DNA 片段。

[0016] DNA 和抗体属于两类不同的生物分子,特别是 DNA,由脱氧核糖和碱基对组成,不含有通常用于标记的氨基,羟基,羰基等基团,需要人为的引入可以标记的基团才可以进行偶联反应。虽然有一些研究人员使用生物素化抗体-亲和素-生物素化 DNA 系统,但综合考虑检测步骤繁琐程度、检测周期长短、检测重复性和准确性,可以采用本发明的共价交联直接标记的方法。本发明采用含有琥珀酰亚胺基团和马来酰亚胺基团的异型双功能偶联剂活化抗体上的氨基,并进一步和 DNA 片段上的巯基反应,形成 DNA 和抗体的复合物。得到的 DNA 抗体复合物通过共价键偶联,抗体和 DNA 分子比例固定,可以用于免疫 PCR 等相应的实验。

[0017] 实施例 1 一种 DNA 标记抗体的方法

[0018] 1. 将带马来酰亚胺基团和羟基琥珀酰亚胺基团的异双功能交联剂,例如: MBS(m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester), GMBS(N-γ-Maleimidobutyryloxysuccinimide ester), EMCS(N-(ε-Maleimidocaproyloxy)succinimide ester), SMCC(Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate), SMPB(Succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrate) 配制成溶液等。

[0019] 2. 合成巯基修饰的寡核苷酸

[0020] 设计两条引物,

[0021] 一条巯基化修饰 P1 :HO-C6-S-S-C6-P03-TTCTCATGTTTGACGCTT

[0022] 一条不用任何修饰 P2 :CGGAATGGACGATATCCCGC

[0023] 以 pBR322 质粒为模板, 扩增 200bp 长度的片段, 巯基化引物和普通引物以 50:1 的比例加入到 PCR 体系中, 不对称 PCR 扩增使扩增片段带上巯基修饰。

[0024]

10×扩增缓冲液	10ul
4 种 dNTP 混合物	各 200umol/L
巯基化引物 P1	100pmol
普通引物 P2	2pmol
模板 DNA	0.1 ~ 2ug
Taq DNA 聚合酶	2.5u
Mg <sup>2+</sup>	1.5mmol/L
加双或三蒸水至	100ul

[0025] 3. 透析抗体和纯化寡核苷酸

[0026] 以 PBS 或者双蒸水透析抗体, 以核酸纯化柱纯化 PCR 产物, 最后用水溶解 PCR 产物。

[0027] 4. 偶联剂活化抗体

[0028] 将透析过的抗体和交联剂 SMCC 按分子摩尔比以 1:5 的比例混合, SMCC 浓度 2mg/L, 25℃ 搅拌反应 1 小时, 用 Histrap Desalting G25 在 AKTA purifier 100 上脱盐, 洗脱液为 PBS, 流速为 5ml/min。

[0029] 5. 偶联剂活化的抗体与巯基化 DNA 的交联

[0030] 由于巯基修饰的结构是 HO-C6-S-S-C6-P03-oligo。在用之前要用 DTT 使二巯基断裂, 然后脱盐之后在进行连接。把寡核苷酸溶解在 100nM pH7.5 体积为 900ul 的磷酸缓冲液中, 加入 100ul DTT, 室温孵育 1h。用脱盐的方法去除 DTT 和从寡核苷酸上脱离的保护基团。用缓冲液预先平衡 NAP-10 柱子, 加 1mL 的样品用 1.5mLPBS 缓冲液进行洗脱。流速为 5ml/min, 立刻用于连接。

[0031] 将上述洗脱产物和巯基化 DNA 纯化产物等摩尔数混合 25℃ 反应 1 小时, 加入 10 μL 1mol/L β-巯基乙醇终止反应, 25℃ 反应 30min 后纯化。

[0032] 6. 纳米磁珠法纯化偶联产物

[0033] 在 PCR 产物和抗体的偶联物混合液中加入羧化的磁粒, 然后用 PEG/NaCl 沉淀, 使目的 DNA 吸附至磁珠, 最后磁场分离被吸附的 DNA, 经乙醇洗涤, 用水洗脱。

[0034] 7. 免疫 PCR 技术检测偶联物

[0035] 以溶液 0.05mO1/L, pH9.6 的碳酸盐缓冲液对重组蛋白进行 10 倍稀释, 使其浓度为

2ng/L, 分别取 50 $\mu$ L 重组蛋白稀释液于 TopYield 板, 4 $^{\circ}$ C 过夜包被 16h 以上。包被板用溶液洗涤液: 含有 1% Tween-20 和 0.1mmol/L EDTA 的 PBS 液洗涤 5 次。然后取 200  $\mu$ L 封闭液: 含有终浓度为 1g/L 叫鲑鱼精 DNA, 1% BSA、0.2% 的甘氨酸的溶液于板孔内, 放置 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h。洗板, 在各孔中加入 50  $\mu$ L 抗重组蛋白单抗 (以溶液 D 将其稀释为 1  $\mu$ g/ml 工作浓度, 溶液 D 为含有 0.1% Tween-20 和 0.5% BSA 的 PBS 溶液, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。洗板, 加入 DNA 偶联的抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, 先用洗涤液洗板 15 次, 然后用双蒸水洗涤 3 次。在 TopYield 各板孔中按照 PCR 扩增体系, 添加 PCR 反应液, 对板内结合的报告 DNA 进行 PCR 检测。选用 TaKaRa one shot LA PCR TM mix 试剂盒进行 PCR 扩增。50  $\mu$ L PCR 体系主要包含: 上游引物 (20pmol/L)、下游引物 (20pmol/L)、Mg<sup>2+</sup> (2.5mmol/L)、dNTP (Mixture, 0.4mmol/L), Taq 酶 (2.5U)。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环。本试验的 PCR 反应产物 (218bp) 通过 2% 琼脂糖凝胶 (Gelred 染色) 在 90V 电压条件下电泳 25min, 然后通过凝胶成像系统观察电泳结果。结果如图 1 所示, 从图 1 中可以看出, 包被到固相上的抗原结合的抗体偶联上了 DNA 片段, 所以该偶联片段得到了扩增。

#### [0036] 8. 对比实施例

[0037] 现有技术制备 DNA 抗体偶联物的简略方法如下:

[0038] a 制备硫代乙酰化的 DNA, 将氨基修饰的 DNA 和 SATA 反应, 首先以 100mM 碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.0) 透析, 然后加入 13.3mg/ml SATA, 和 50% 二甲基甲酰胺 (DMF)。在 25 $^{\circ}$ C 反应 30min, 用 100mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.5 透析, 浓缩。

[0039] b 制备马来酰亚胺修饰的抗体, 采用 sulfo-SMCC 对抗体进行马来酰亚胺化。含有 25nmol 的抗体被加到含 100mM 磷酸钠 (pH 7.0), 1.2mg/ml sulfo-SMCC, 1.5% DMF 的反应混合液中, 25 $^{\circ}$ C 反应半小时, 立即过柱纯化收集洗脱峰, 得到马来酰亚胺化的抗体。

[0040] c 抗体和 DNA 链反应, 纯化的马来酰亚胺修饰的抗体加入到 15mL 离心管中, 同时加入硫代乙酰化的 DNA, 加入 75  $\mu$ L 的 1M 盐酸羟胺起始偶联反应, 室温暗处反应 2 小时后加入 10  $\mu$ L 10mM N-乙酰马来酰亚胺终止反应。

[0041] 可见本发明的偶联步骤简单, 从现有技术的 3 步简化成 2 步, 从而偶联效率更高, 步骤更简单, 更实用于免疫 PCR 和长链荧光标记抗体等技术。从附图 1 上也可以看到, 在低到 2ng/L 的包被浓度时, PCR 也可以检测出条带, 可见检测效率之高。而且, 采用双功能偶联剂进行偶联时, 由于间隔臂的作用, 偶联物更稳定。

[0042] 最后所应说明的是, 以上具体实施方式仅用以说明本发明的技术方案而非限制, 尽管参照实例对本发明进行了详细说明, 本领域的普通技术人员应当理解, 可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换, 而不脱离本发明技术方案的精神和范围, 其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

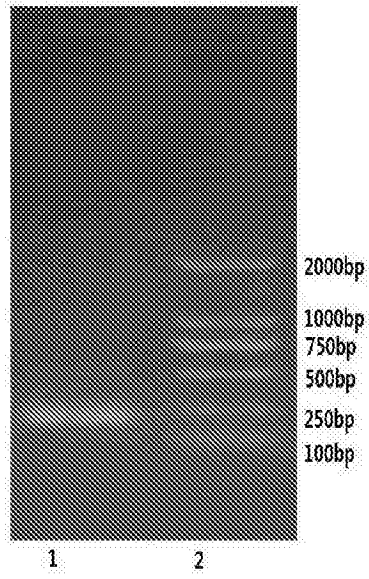


图 1

专利名称(译)	一种DNA标记抗体的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105372415A</a>	公开(公告)日	2016-03-02
申请号	CN201510791972.1	申请日	2015-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	武汉金开瑞生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉金开瑞生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉金开瑞生物工程有限公司		
[标]发明人	沈鹤霄 华权高 徐春雷		
发明人	沈鹤霄 华权高 徐春雷		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/533		
其他公开文献	CN105372415B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种DNA标记抗体的方法，采用异型双功能偶联剂活化抗体上的氨基，通过共价键偶联巯基化DNA，形成DNA和抗体的复合物。通过本发明方法得到的DNA抗体复合物，抗体和DNA分子比例固定，可以用于免疫PCR等相应的实验。

