

[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 200910084226.3

[51] Int. Cl.

*C07K 14/47 (2006.01)*

*C12N 15/12 (2006.01)*

*C12N 15/70 (2006.01)*

*C12P 21/02 (2006.01)*

*C07K 16/18 (2006.01)*

*G01N 33/577 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年10月7日

[11] 公开号 CN 101550186A

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/53 (2006.01)*

*C12R 1/19 (2006.01)*

[22] 申请日 2009.5.14

[21] 申请号 200910084226.3

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路17号

[72] 发明人 周向梅 赵德明 张奥 李丽好  
余琦 杨利峰 尹晓敏 杨建民

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 王朋飞

权利要求书1页 说明书17页 附图3页

[54] 发明名称

绵羊重组朊蛋白、其单克隆抗体及应用

[57] 摘要

本发明涉及绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 及其制备方法, 该蛋白具有序列表 SEQ No. 2 所示的氨基酸残基序列, 或者是该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。本发明还涉及编码该蛋白的基因及利用该蛋白制备得到的单克隆抗体。本发明获得的针对绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 的特异单克隆抗体, 可以作为诊断试剂用于疯牛病、羊痒病诊断和研究。

1、绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216，其特征在于，该蛋白具有序列表 SEQ NO.2 所示的氨基酸序列，或者是该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

2、编码权利要求 1 所述绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 的基因。

3、如权利要求 2 所述的基因，其特征在于，该基因的核苷酸序列如序列表 SEQ NO.1 所示。

4、权利要求 1 所述蛋白的制备方法，包括如下步骤：

利用权利要求 2 或 3 所述的基因构建表达载体，转化宿主菌，经过筛选得到阳性转化体；阳性转化体经发酵培养后，破碎菌体，分离纯化 PrP<sup>C</sup> 成熟蛋白，经复性，得到活性蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216。

5、由绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 作为免疫原制备得到的抗 PrP<sup>C</sup>51-216 抗体。

6、如权利要求 5 所述的抗体，其为单克隆抗体。

7、含有权利要求 5 或 6 所述抗体的诊断试剂。

## 绵羊重组朊蛋白、其单克隆抗体及应用

### 技术领域

本发明属于生物技术领域，特别地，涉及绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216、其单克隆抗体及应用。

### 背景技术

痒病 (scrapie) 是绵羊的一种缓慢发展的致死性中枢神经系统退行性疾病，病羊具有中枢神经系统变性、空泡化、星形胶质细胞增生等特点，表现为共济失调、痉挛、麻痹、衰弱和严重的皮肤搔痒，病畜 100% 死亡，人们称之为羊痒病。羊群感染后，很难清除病原体。羊痒病早在 1732 年在英格兰发现，1920-1950 年曾在英国严重流行，现已广泛分布于欧洲、亚洲和美洲多数养羊业发达国家。更为严重的是，1986 年发生于英国的疯牛病，其病原因子后来被证实与羊痒病的病原因子一致，而人类变异性克雅氏病 (vCJD) 是由食入感染了 BSE 的食物而传播。因此，羊痒病发生或流行对于人类社会公共卫生造成严重威胁，目前我国尚未见到发生羊痒病的报道，为了防患于未然，国家投入大量资金和力量预防和控制这类疾病的发生，目前该病的诊断主要依据病理学检查及用免疫组化、免疫印迹试验 (Western Blot) 检测神经组织中的病原因子 PrP<sup>Sc</sup>，这些方法大多需要高度灵敏、特异的抗体。由于单克隆抗体具有灵敏度高、特异性强、成分均一的优点，已成为羊痒病检测技术中的核心试剂。国外有商品化单克隆抗体出售，但未见有使用去除 N 端信号肽、C 端 GPI 锚定位点的核心片段绵羊 PrP<sup>C</sup>51-216 重组蛋白制作的单克隆抗体。

目前我国羊痒病的检测主要在 OIE 的指导下，在专业实验室进行，包括病理组织学检测、免疫组织化学检测和 Western Blot 检测，其中免疫组织化学检测和 Western Blot 检测是检测羊痒病的“金标

准”，这两种方法的关键技术或核心试剂就是单克隆抗体，国内尚没有商品化的产品。国际上商品化的羊痒病检测试剂盒，每头份的检测费用约为 0.04 万，如果用自主研发的试剂盒代替进口产品，我国羊痒病的监测工作每年仅试剂费用就可节约百余万，并打破国际在疯牛病等重大外来动物疫病检测技术方面的技术壁垒，从而保障我国畜牧业的健康发展以及人民的公共卫生。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 及其体外制备方法。

本发明再一个目的是提供绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216。

本发明另一个目的是提供用于制备绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 的基因工程菌。

本发明还有一个目的是提供采用绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 制备的单克隆抗体。

为实现上述目的，本发明克隆和表达了绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216，这段蛋白去除 N 端的信号肽，C 端的 GPI 锚定位点，包含蛋白酶 K 抗性片段，更有利于制备单克隆抗体。

本发明提供绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216，该蛋白具有序列表 SEQ NO.2 所示的氨基酸序列，或者是该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。该蛋白分子大小为 27 kD。

本发明还提供编码所述绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 的基因，优选地，该基因为 PRNP，其核苷酸序列如序列表 SEQ NO.1 所示。

本发明进一步提供所述绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 的制备方法，包括如下步骤：

利用所述 PRNP 基因构建表达载体，转化宿主菌，经过筛选得到阳性转化体；阳性转化体经发酵培养后，破碎菌体，分离纯化 PrP<sup>C</sup>

成熟蛋白，经复性，得到活性蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216。

本发明还提供由所述 PrP<sup>C</sup>51-216 作为免疫原制备得到的抗 PrP<sup>C</sup>51-216 抗体。优选地其为单克隆抗体。

上述抗体可由下述步骤得到：采用所述绵羊重组朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216，免疫 Balb/c 小鼠，利用淋巴细胞杂交瘤技术，经融合筛选出杂交瘤细胞株，该细胞株能稳定分泌针对绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 特异单克隆抗体。

本发明还提供含有上述抗体的诊断试剂。

具体地说，本发明包括如下步骤：

### 1、基因工程菌的构建

根据绵羊朊蛋白基因序列，截去 PrNP 部分 N 端信号肽（150bp）和 C 端 GPI 锚定位点（123bp）形成 PrNPq（其核苷酸序列如序列表 SEQ NO.1 所示），设计合成扩增这段多肽的 PCR 引物（末端分别带有 EcoR I 和 Hind III 的酶切位点），以绵羊全血 DNA 为模板，进行 PCR 扩增；扩增产物经琼脂糖电泳，回收 500 bp 左右 DNA 片段，与 pGEM-T easy 载体连接，转化 DH5  $\alpha$  感受态细胞；纯化重组质粒，用 EcoR I/Hind III 双酶切鉴定，并测序，测序正确的阳性质粒经 EcoR I/Hind III 双酶切后，与用经过 EcoR I/Hind III 双酶切的 pET30a（+）连接后，转化至 BL21（DE3）菌株，用上述引物做菌落 PCR，筛选阳性克隆，得到含有表达载体的宿主菌。

### 2、重组蛋白的表达及纯化

将含有表达载体的宿主菌接种到 LB 液体培养基，经扩大培养，加入 IPTG 诱导表达，取出菌液离心，菌体用裂解缓冲液重悬，在冰浴条件下超声破碎，离心，沉淀即为包涵体。将获得的包涵体蛋白用结合缓冲液溶解，离心，取上清，加入经 pH 值为 7.4 的结合缓冲液平衡的 HisTrap 镍琼脂糖凝胶柱，结合 10min，结合缓冲液冲洗 3min，然后用 pH 值为 7.4 洗脱缓冲液冲洗 7min，分管收集。

本发明还提供了一种可高效表达绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 的基因工程菌 *Esherichia coli* PET30/ ovine-PrP<sup>C</sup>。该菌具有 Kana 抗性，对人体无害，且在 IPTG 的诱导下，能够大量表达绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216。

本发明将获得的绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 按《分子克隆》所述方法进行 Western-blotting。一抗为鼠 PrP 单克隆抗体 AH6，二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗鼠 IgG，ECL 化学发光曝光。结果显示绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 能与鼠 PrP 单克隆抗体 AH6 发生特异性血清学反应。

本发明将获得的绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 免疫 Balb/c 小鼠，利用淋巴细胞杂交瘤技术，经融合共筛选出 3 株能稳定分泌针对绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 特异单克隆抗体的杂交瘤细胞株。免疫印迹试验表明：腹水单抗可特异识别重组绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 和绵羊脑组织朊蛋白。

本发明具有以下有益效果：

1) 本发明首次在体外表达并获得了具有活性的绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216，并且建立了纯化的方法，该蛋白能与鼠 PrP 单克隆抗体 AH6 发生特异性血清学反应。PrP<sup>C</sup> 成熟蛋白的表达量可达 20 mg/L 培养基。

2) PrP<sup>C</sup>51-216 蛋白去除 N 端的信号肽，C 端的 GPI 锚定位点，包含蛋白酶 K 抗性片段，更有利于制备单克隆抗体。

3) 本发明利用绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 免疫 Balb/c 小鼠，获得了针对绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 的特异单克隆抗体，从而可以利用该单克隆抗体作为诊断试剂用于疯牛病、羊痒病诊断和研究。

## 附图说明

图 1 绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup>51-216 的 PCR 扩增产物的电泳图；M: Mark, 1: 扩增产物；

图 2 PGEM-T easy- PrP<sup>C</sup>51-216 重组载体的 *EcoR I/Hind III* 双酶

切电泳图; M: Mark, 1: 双酶切产物;

图 3 菌落 PCR 鉴定重组质粒 PET30a-PrP<sup>C</sup>51-216; M: Mark, 1: PCR 产物;

图 4 转化子经 IPTG 诱导 PET30a - PrP<sup>C</sup>51-216 蛋白表达的电泳图; 1、2: 转化空质粒的对照; 3: 37°C 诱导 1.5 h; 4: 37°C 诱导 2 h; 5: 37°C 诱导 3 h; M: 蛋白 Marker;

图 5 纯化后的 PrP<sup>C</sup>51-216 电泳图; 1: 终末洗脱液中的产物; 2、3: 纯化洗脱后的产物; M: 蛋白 Marker;

图 6 PrP<sup>C</sup>51-216 经 Western blotting 显影后的图; 1、纯化后的样品; 2、37°C 诱导 3 h 的样品; M、蛋白 Marker;

图 7 间接 ELISA 检测免疫小鼠血清抗体效价;

图 8 腹水单抗特异性鉴定 Western-blotting 检测; 1、细胞克隆 3G11; 2、细胞克隆 4E1; 3、阳性对照 (抗体 AH6); Marker: 低分子量蛋白标准

## 具体实施方式

以下实施例用于说明本发明, 但不用来限制本发明的范围。

### 实施例 1 基因工程菌的构建

根据已发表的绵羊朊蛋白基因 (PrNP, GenBank accession EF189729) 序列设计特异性引物 1 对。P1 5'- gga gaa ttc cgc tat cca cct cag gg -3' (下划线为 EcoR I 酶切位点), P2 5'- ggg aag ctt aca ttt gct cca cca ctc -3' (下划线为 Hind III 酶切位点); 提取绵羊全血基因组 DNA, 以全血 DNA 为模板, 以 P1、P2 为引物, 参照 TaKaRaEx Taq PCR 试剂盒说明书对 PrP<sup>C</sup>51-216 进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 20 μL: 上下游引物、模板各 1 μL, PCRmix 10 μL, 水 7 μL。PCR 程序: 94°C 热变性 5min; 加入 Ex Taq 酶; 再 94°C 热变性 50s, 然后 60°C 退火 1min, 72°C 延伸 50s, 33 个循环; 72°C 延伸 8min; 4°C 保存。扩增片段命名为 ovine-PrP 51-216, 即截去 PRNP N 端的信

号肽和 C 端的 GPI 锚定位点, 大小约 498bp, 编码 165aa (PrP<sup>C</sup> 51-216)。

反应产物经 1%琼脂糖凝胶电泳(图 1), 用 OMEGA 的 GEL EXTRACTION KIT 回收 500bp 左右 DNA 片段后, 与 pGEM-T easy 载体连接, 转化 DH5  $\alpha$  感受态细胞; 再用博大泰克的 B 型质粒提取试剂盒纯化重组质粒, 用 EcoR I /Hind III 双酶切鉴定(图 2), 并测序, 测序正确的阳性质粒经 EcoR I /Hind III 双酶切后, 与用经过 EcoR I /Hind III 双酶切的 pET30a(+) 连接过夜, 转化到 BL21(DE3) 菌株, 用上述 PCR 引物做菌落 PCR, 快速筛选克隆, 所得克隆再经菌落 PCR(图 3) 及 DNA 测序鉴定。经上述筛选获得 *Esherichia coli* PET30/ PrP<sup>C</sup>51-216。

## 实施例 2 重组蛋白的表达及纯化

将含有表达载体的宿主菌接种到 LB 液体培养基, 待菌生长到 A600 约 0.8 时, 加终浓度为 100 $\mu$ g / mL IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 3h, 取出菌液离心, 菌体用裂解缓冲液 (Tris-base 0.6056g, EDTA 0.0186g, NaCl 0.2925g, 甘油 5 mL, 加入去离子水 95 mL 至总体积为 100mL, 调 pH 值至 8.0, 常温保存) 重悬, 在冰浴条件下超声破碎, 10000 rpm/min, 离心 10min, 沉淀即为包涵体, 上清和沉淀用 SDS-PAGE 电泳检测(图 4)。结果在预期的 27 KD 处出现特异的、大量表达的蛋白条带, 表达量占菌体总蛋白 48%。

将获得的包涵体蛋白依次加入 10ml 结合缓冲液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.58g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.56g, NaCl 29.22g, 2g 咪唑, 6M 尿素, 混合后, 加入去离子水定容为 1000ml, 调 pH 值至 7.4, 常温保存), 用枪吹打混合, 超声 5min, 条件同上。再加入 5ml 结合缓冲液, 吹打, 超声 5min。再加入 5ml 吹打, 超声 10min。最终体积 20ml。10000 rpm/min 离心 10min, 弃沉淀, 取上清用 0.45 $\mu$ m 的滤膜过滤。用蛋白纯化仪纯化, 设定参数为: 用带有 His-标签的镍柱纯化蛋白,

结合缓冲液平衡 10min; 进样 10min, 结合缓冲液冲洗 3min, 洗脱缓冲液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.58g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.56g,  $\text{NaCl}$  29.22g, 34g 咪唑, 6M 尿素, 混合后, 加入去离子水定容为 1000ml, 调 pH 值至 7.4, 常温保存) 冲洗 7min。取 280nm 第二次出现波峰时的液体, 即为纯化蛋白, 如图 5 所示, 纯化的蛋白在 27KD 处出现单一的条带, 纯化率在 95% 以上。PrP<sup>C</sup> 51-216 的表达量可达 20 mg/L 培养基。

### 实施例 3 Western-blotting 鉴定

Western-blotting 按《分子克隆》所述方法进行。一抗为鼠朊蛋白单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠的抗体, 显色剂为 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB)。结果发现 PrP<sup>C</sup> 51-216 能与鼠朊蛋白单克隆抗体发生特异性血清学反应。如图 6 所示。具体操作步骤如下:

SDS-PAGE 结束后, 取出凝胶, 在转移缓冲液中浸泡 30min, 将浸泡过的与胶同样大小的 NC 膜和滤纸, 按纤维垫-滤纸-凝胶-NC 膜-滤纸-纤维垫的结构, 装入转印夹。转印时凝胶侧接负极, NC 膜侧接正极, 电泳槽冰浴, 200mA 恒流转印 1h。转印结束后, 剪下分子量标准的膜条用氨基黑染色。其余部分置于封闭液中室温振摇封闭 1h; 取出 NC 膜置于用封闭液稀释好的鼠朊蛋白单克隆抗体内, 4℃ 过夜; TBS 洗涤 3 次, 每次 5min; 置于用封闭液稀释好的辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠的抗体溶液中, 室温振摇 1h; TBS 洗涤 3 次, 每次 5min; 最后将 NC 膜 ECL 化学发光曝光 X-光片, 显影, 定影。

### 实施例 4 绵羊重组蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 单克隆抗体制备

1、用绵羊重组蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 免疫 Balb/c 小鼠 (见表 1)

表1 Balb/c 小鼠免疫方案

免疫时间	抗原类型	免疫剂量 (ug/只)	免疫途径
首免	纯化的绵羊重组蛋白PrP (用适	100	颈背部皮下多点

	量生理盐水稀释)+完全福式佐剂		注射
间隔2周 二免	纯化的绵羊重组蛋白PrP (用适量生理盐水稀释)+不完全福式佐剂	100	颈背部皮下多点注射
间隔2周 三免	纯化的绵羊重组蛋白PrP (用适量生理盐水稀释)+不完全福式佐剂	100	颈背部皮下多点注射
融合前3天 四免	纯化的绵羊重组蛋白PrP (用适量生理盐水稀释)	100	腹膜内注射

三免后7~10天采血用建立的ELISA法测效价，选择效价最高者用于细胞融合

## 2、检测方法的建立

健康和三免后10d的Balb/c小鼠尾部采血0.1ml，室温静置1h，4℃放2h，3000rpm离心10min，收集血清，4℃保存。用间接非竞争性ELISA法测定血清效价并建立单抗筛选方法。

(1)包被抗原：用包被缓冲液将包被用绵羊重组蛋白PrP<sup>C</sup> 51-216作倍比稀释：向微孔中每孔加100ul，4℃过夜；然后弃去孔内的液体。

(2)封闭：用封闭液向微孔中每孔加100ul，37℃湿盒在温箱中孵育30min，同时用洗涤缓冲液(PBST)洗3次，每次90s(简称洗涤，下同)，拍干。

(3)加待测血清样品：将血清样品按倍比稀释后顺序加入，每孔100ul；每块板同时设空白对照、阴性对照和阳性对照各2孔。37℃湿盒在温箱中孵育1h，然后洗涤、拍干。

(4)加酶标羊抗鼠IgG：先用稀释液将酶标羊抗鼠IgG作倍比稀释，每孔加入100ul，置37℃湿盒在温箱中孵育1h；然后洗涤、拍干。

(5)加底物液：各孔加新鲜配置的底物使用液100ul，37℃湿盒10~15min。

(6)终止反应：每孔加终止液50ul。

(7) 判定结果：阴性对照孔应无色或接近无色，阳性对照孔应明确显色。测定OD值，以空白孔调零，若待测孔OD值大于或等于阴性对照孔的2.1倍，即为阳性，这样可以得出血清的效价，同时选择OD值在1.0~1.5之间的包被抗原浓度，酶标兔抗鼠IgG浓度等，建立单抗筛选方案。

### 3、细胞融合

(1) 收集全部SP2/0细胞，1000rpm离心6分钟，去上清，反复用无血清培养基洗2次，最后悬浮于10ml无血清培养基中，取0.1ml至住0.9ml无血清培养基中，混匀，细胞计数。

(2) 取全部脾细胞，将三免后效价较高的免疫Balb/c小鼠脾细胞，与SP2/0细胞按5:1~10:1的比例充分混匀，1000rpm离心5分钟，弃上清。

(3) 轻弹离心管管底，使沉淀细胞疏松，吸取1ml DMEM液加入1g灭菌的PEG2000（预先要加热融化）中，并用7.5%NaHCO<sub>3</sub>调PH值至7.5~7.8，混匀。一手匀速转动离心管，另一手吸取1ml上述调好的PEG2000液，沿转动的离心管壁缓缓加入，控制在60s加完。然后将悬液吸入移液管（时间控制在30s左右），静置30s，再将其吹入离心管（时间也控制在30s左右）。融合时间共约2分钟。

(4) 缓慢小心地加入25ml预温的20%完全培养基以终止PEG2000的作用，2分钟完成，第一分钟加入1ml DMEM液，第二分钟缓缓加入4ml DMEM液，然后在3min内缓慢加入剩余的20%完全培养基。

(5) 将融合细胞8000rpm离心7min，弃上清，加入20ml 1%HAT培养液轻轻吹吸，使沉淀细胞混合均匀，将悬浮细胞液加入有饲养细胞的96孔板中，每孔100ul，置37℃，含5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜。

(6) 融合后，每天在倒置显微镜下注意观察杂交瘤细胞的生长情况，7~10天用HAT培养基半量换液。

(7) 2周后换HT选择培养基, 3周后可换完全培养基。

#### 4、杂交瘤细胞的筛选

采用间接非竞争性ELISA方法检测。

(1) 包被抗原: 用包被液将包被用绵羊重组蛋白PrP<sup>C</sup> 51-216稀释至适当的工作浓度(由建立的筛选方法确定), 向微孔中每孔加100ul, 4℃过夜, 然后弃去孔内的液体。

(2) 封闭: 用封闭液向微孔中每孔加100ul, 37℃湿盒孵育30min, 然后用洗涤缓冲液(PBST)洗3次, 每次90s(简称洗涤, 下同), 拍干。

(3) 加待测培养上清液: 将上清液顺序加入, 每孔100ul, 每块板同时设空白对照、阴性对照和阳性对照各2孔。37℃湿盒在温箱中孵育1h, 然后洗涤5次、拍干。

(4) 加酶标第二抗体: 先用稀释液将酶标羊抗鼠IgG作倍比稀释, 每孔加入100ul, 置37℃湿盒温箱中孵育1h; 然后洗涤5次、拍干。

(5) 加底物液: 各孔加新鲜配置的底物使用液100ul, 37℃在温箱中孵育10-15min。

(6) 终止反应: 每孔加终止液50ul。

(7) 判定结果: 阴性对照孔(适当稀释SP2/0上清和阴性血清)应无色或接近无色。

阳性对照孔(免疫小鼠血清)应明确显色。测定OD值, 以空白孔调零, 若待测孔OD值大于或等于阴性对照孔的2.1倍, 即为阳性。

#### 5、杂交瘤细胞的克隆

杂交瘤的克隆化的方法一有限稀释法, 即将细胞悬液连续稀释, 至一定浓度时就有可能得到含单个细胞的悬液, 将其接种到培养板中, 就可由此单个细胞繁殖形成同源性的细胞克隆。采用有限稀释法克隆, 具体方法如下:

(1) 制备饲养细胞。可于克隆化前一天制备, 也可于克隆化当

天制备。

(2) 将待克隆化的杂交瘤细胞用加样器或弯头吸管反复吹打均匀后取少许细胞悬浮至另一无菌青霉素小瓶中，作10倍稀释。

(3) 取上述无菌小瓶中的细胞准确计数。

(4) 根据细胞计数结果，对细胞悬液做适当稀释。因计数误差，为保险起见，可稀释成不同梯度，如每孔5个，1个，0.5个细胞梯度，这样总会有一个梯度其细胞真实浓度在1个/孔附近。具体方法如下：

取250个活细胞悬浮于4.6ml培养液中，此时平均每0.1ml溶液中含5个细胞，接种96孔培养板，每孔0.1ml，共36孔。这样就用去3.6ml。余下1.0ml，再加入4ml培养液，共5ml（此时平均每0.1溶液中含1个细胞），接种此细胞液至其次的36孔，每孔0.1ml，最后剩余细胞悬液1.4ml，再补加培养液1.4ml（此时平均每0.1ml溶液中含细胞0.5个），接种最后的24孔，每孔0.1ml。这样共以三种不同的细胞浓度进行克隆化，第一组36孔，平均每孔5个细胞，第二组36孔。平均每孔1个细胞，第三组24孔，平均每孔0.5个细胞。

(5) 将培养板置5%CO<sub>2</sub>，37℃温箱中培养。一般5d左右（在此之前不换液）即可在倒置显微镜下观察细胞克隆生长，注意记录各孔细胞生长情况并确定单克隆细胞株。

(6) 适时进行换液及检测。有多孔阳性时，应尽可能取单克隆孔进行再次克隆化，同时转入24孔板，继而转入培养瓶中进行扩大培养，直至所有细胞孔的培养上清液均为阳性，克隆方算成功。

## 6、单克隆抗体的大量制备

采用动物体内诱生单克隆抗体的方法。取健康Balb/c雌性小鼠10只，每只腹腔注射液体石蜡1ml，1~2周后备用。将培养的阳性克隆杂交瘤细胞吹下来，1000rpm离心10min收集细胞，弃上清液。用不完全培养基将细胞悬浮，混匀，并将细胞数调至10<sup>6</sup>个/ml，每只预处理的小鼠腹腔注射1ml阳性克隆杂交瘤细胞；7~9d后收集腹水，3000rpm

离心10min, 弃脂肪层和细胞层, 收集中间澄清层, 纯化后小管分装, -20℃冻存。

### 7、单抗特异性鉴定

使用本实验室建立的 Western-blot 方法进行, 采用 BioRad 微型垂直板电泳转印系统, 分别将正常羊脑组织、绵羊重组肌蛋白上样于 15% SDS-PAGE 进行电泳分离。电泳后, 4℃, 100V 条件下转印 1h, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上。转印后的 NC 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1h, 加入 1: 1000 稀释的腹水单抗, 室温轻摇作用 2h, 随后与按 1: 2000 稀释的辣根过氧化物酶标二抗反应 1h。最后用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒显示印迹结果。

具体实验步骤如下:

#### (1) 样品脑匀浆处理和消化

**匀浆** 从脑干的脑干部位 (obex 区) 称取 0.45 ~ 0.70g 组织, 放入 10ml 的匀浆器中, 加入 10 倍的匀浆缓冲液, 然后手动匀浆 45s ~ 1min, 800 转/秒离心 1min, 取上层脑匀浆分装, -20℃保存。

**消化** 每个 Eppendorf 管中加入 10 μl 消化缓冲液, 再加入 100 μl 脑匀浆, 混匀; 加入 10 μL 蛋白酶 K, 充分混合均匀; 水浴 48℃, 消化 40 分钟, 然后迅速加入 10 μl 的终止缓冲液终止消化。

#### (2) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

**样品变性** 上样前每管中加入 100 μL 电泳上样缓冲液, 混合均匀; 水浴 96℃, 煮沸 5 分钟 (已变性样品可在使用前 65℃温育 5 分钟)。

**上样** 将 10 μL 对照样品加入右边泳道, 其余样品分别为 10 μL 按顺序加入其它泳道。内槽和外槽加入电泳缓冲液。

**电泳** 恒定电压 180V 电泳 40 ~ 45 分钟, 直到溴酚兰指示剂到达底端约 1 ~ 2 毫米处。

### (3) 电转

**准备步骤** 将 PVDF 膜在 100% 的甲醇中浸泡数秒，然后在蒸馏水中洗涤数秒，再置于电转缓冲液中平衡 10 分钟；滤纸在电转液中平衡 5 分钟。（PVDF 膜和滤纸大小应与凝胶基本一致）

**电转组装** 打开电泳槽，将凝胶的梳子部分切去，取出凝胶。然后按照纤维垫 - 两层滤纸 - 凝胶 - PVDF 膜 - 两层滤纸 - 纤维垫的顺序组装（注意滤纸与凝胶、PVDF 膜务必对齐；每层接触面都尽量赶走气泡），将该“三明治”装置装入转印夹，近胶的一面朝向阴极（黑），近 PVDF 膜的一面朝向阳极（红），确保该装置全部浸入电转缓冲液。

**蛋白转印** 4℃ 恒定电压 100 V 转印 75 分钟（内槽加冰盒，外槽可置于冰水混合物中）。

### (4) 免疫检测

**封闭** 将 PVDF 膜从转印夹中取出，做好标记，然后把两张膜分别置于自封袋中，各加入 25ml 封闭液，于摇床室温封闭 50min，摇床转速约为 60 转/min。封闭结束后用 TBST 洗液洗涤 2 次，每次 5 分钟。

**一抗孵育** 将 3.75  $\mu$ l 一抗（AH6）加入到 15ml 的 TBST 中（稀释倍数 1: 4000），混匀，装入自封袋中；作为阳性对照；腹水用 TBST 稀释（稀释倍数 1: 1000），然后两张膜凸面相对放置，置于同一自封袋中，于摇床室温孵育 2 小时，转速约为 65 转/min；孵育结束后用 TBST 洗液洗涤 5 次，每次 5 分钟。

**二抗孵育** 将 15  $\mu$ l 二抗（羊抗鼠）加入到 15mL 的 TBST 溶液中（稀释倍数 1: 2000），混匀，装入自封袋中；然后两张膜凸面相对放置，置于同一自封袋中，于摇床室温孵育 1 小时，转速约为 65 转/min；孵育结束后用 TBST 洗液洗涤 5 次，每次 5 分钟。

**曝光** 将 PVDF 膜置入暗盒中曝光 5-10 分钟，取出放入显影液中 4 分钟，然后再放入定影液中作用 1 分钟。

## 实验结果

本发明应用基因工程技术,首次在体外表达并获得了具有活性的绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216,并且建立了纯化的方法;利用本发明的方法,绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 的表达量可达 20 mg/L 培养基。

本发明利用绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 免疫 Balb/c 小鼠,获得了针对绵羊朊蛋白 PrP<sup>C</sup> 51-216 和绵羊脑组织朊蛋白的特异单克隆抗体,从而可以利用该单克隆抗体作为诊断试剂用于疯牛病、羊痒病诊断和研究。

### 序列表

<110> 中国农业大学

<120> 绵羊重组肌蛋白、其单克隆抗体及应用

<130> KHP09112351.2

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 499

<212> DNA

<213> 羊 (*Ovis aries*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(498)

<400> 1

cgc tat cca cct cag gga ggg ggt ggc tgg ggt cag ccc cat gga ggt	48
Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly	
1                    5                    10                    15	
ggc tgg ggc caa cct cat gga ggt ggc tgg ggt cag ccc cat ggt ggt	96
Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly	
20                    25                    30	
ggc tgg gga cag cca cat ggt ggt gga ggc tgg ggt caa ggt ggt agc	144
Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Ser	
35                    40                    45	
cac agt cag tgg aac aag ccc agt aag cca aaa acc aac atg aag cat	192
His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His	
50                    55                    60	
gtg gca gga gct gct gca gct gga gca gtg gta ggg ggc ctt ggt ggc	240
Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly	
65                    70                    75                    80	
tac aag ctg gga agt gcc atg agc agg cct ctt ata cat ttt ggc aat	288
Tyr Lys Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn	



---

Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly  
65 70 75 80

Tyr Lys Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn  
85 90 95

Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn  
100 105 110

Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe  
115 120 125

Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val Thr Thr  
130 135 140

Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile Met Glu  
145 150 155 160

Arg Val Val Glu Gln Met  
165

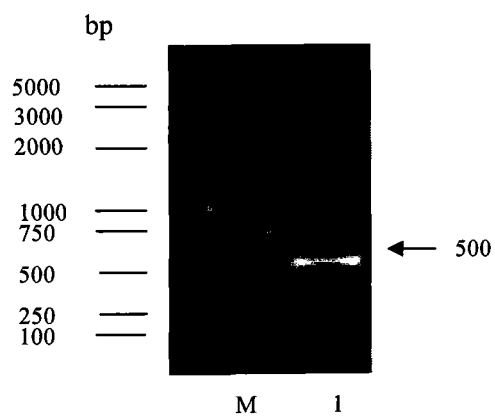


图 1

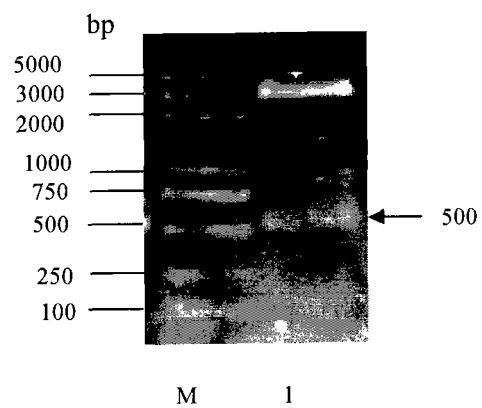


图 2

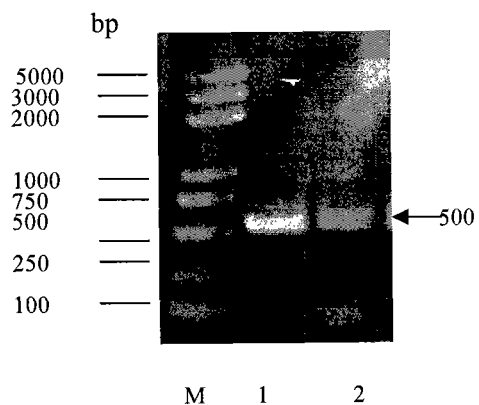


图 3

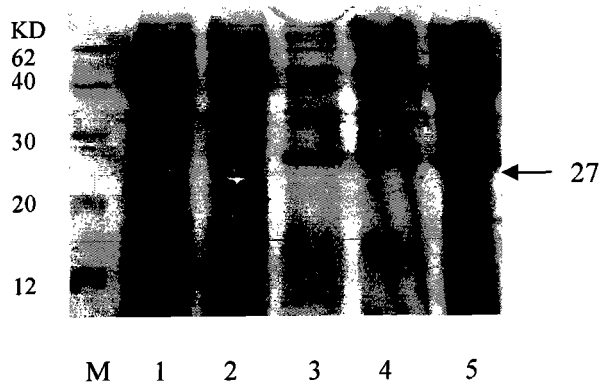


图 4

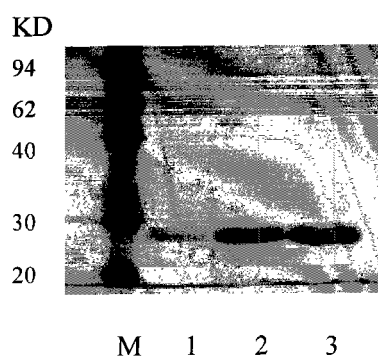


图 5

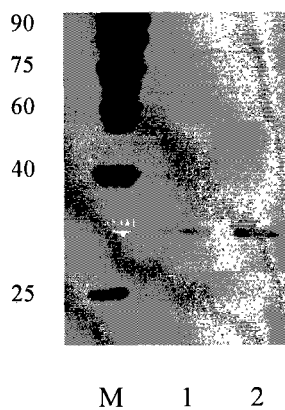


图 6

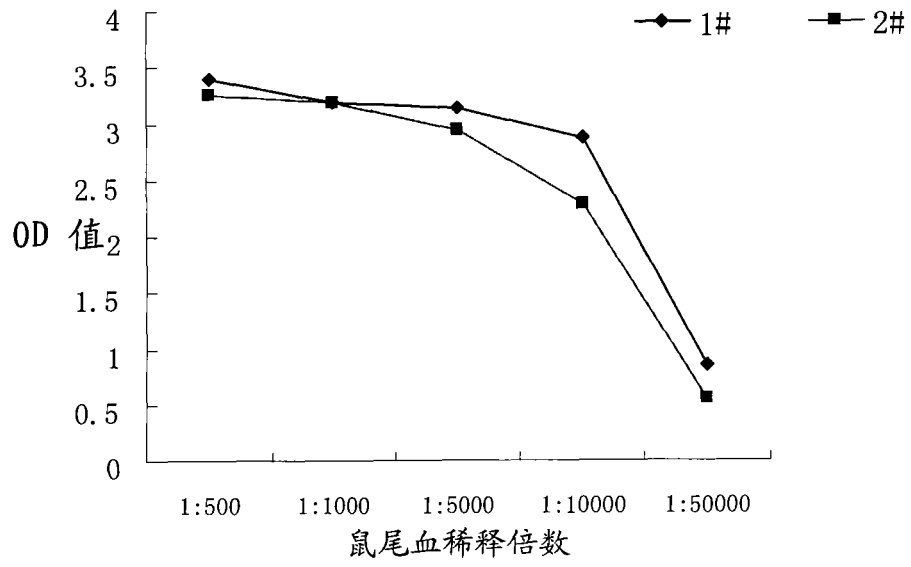


图 7

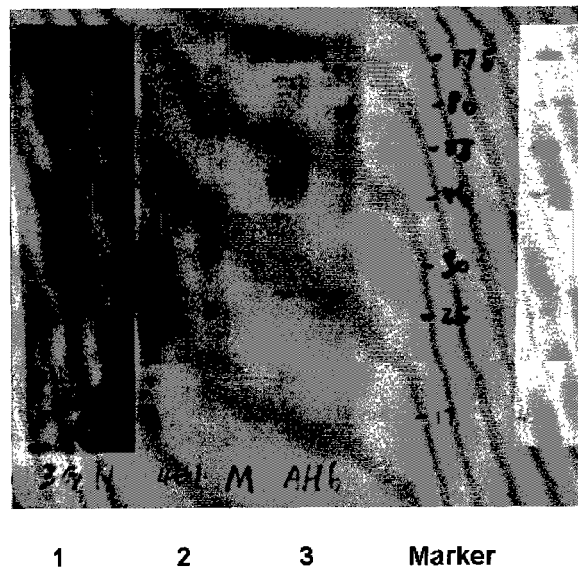


图 8

专利名称(译)	绵羊重组朊蛋白、其单克隆抗体及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101550186A</a>	公开(公告)日	2009-10-07
申请号	CN200910084226.3	申请日	2009-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	周向梅 赵德明 张奥 李丽好 余琦 杨利峰 尹晓敏 杨建民		
发明人	周向梅 赵德明 张奥 李丽好 余琦 杨利峰 尹晓敏 杨建民		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/12 C12N15/70 C12P21/02 C07K16/18 G01N33/577 G01N33/53 C12R1/19		
代理人(译)	王朋飞		
其他公开文献	CN101550186B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及绵羊重组朊蛋白PrPC51 - 216及其制备方法，该蛋白具有序列表SEQ No.2所示的氨基酸残基序列，或者是该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。本发明还涉及编码该蛋白的基因及利用该蛋白制备得到的单克隆抗体。本发明获得的针对绵羊朊蛋白PrPC51 - 216的特异单克隆抗体，可以作为诊断试剂用于疯牛病、羊痒病诊断和研究。

免疫时间 抗原类型 免疫剂量 (ug/只) 免疫途径

首免 纯化的绵羊重组蛋白PrP (用适 100 颈背部皮下多点